

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26800228

研究課題名(和文) 分子動力学シミュレーションで探るDNA配列探索中の蛋白質の分子動態

研究課題名(英文) Molecular dynamics study on proteins searching for the recognition sequence of DNA

研究代表者

米谷 佳晃 (YONETANI, YOSHITERU)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・主幹研究員(定常)

研究者番号：80399419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：分子動力学計算により、DNA配列探索中の蛋白質のカイネティクスについて研究を行った。ABFの方法を使って様々な方向にバイアスフォースを加えることで蛋白質の運動を調べた。結合サイトと蛋白質重心間のベクトル方向に力を加えていくと、蛋白質がDNAの溝に沿ってらせん状に動いていく様子が見られた。これは、DNA配列探索中の蛋白質がらせん運動していることを示唆する結果である。自由エネルギー計算の結果からは、蛋白質がいったんDNAに結合すると、解離方向よりもスライド方向に移動しやすいことが分かった。自由エネルギー地形から遷移状態理論をもとに遷移レートを計算するための理論的背景について検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Molecular dynamics simulations are performed to explore the kinetics of a protein searching for the recognition sequence of DNA. By applying bias force, various protein motions were induced. Among them, a possible motion was obtained when the bias force was applied to the direction from the binding site to the protein center of mass. Simulations with this setting successfully produced spiral motion of protein where the protein slides on the DNA while maintaining the DNA-protein contact surface. Results of free-energy calculations suggest that such protein sliding is much preferred to dissociation. Relation between free-energy profiles and transition rate constant is also discussed within the framework of transition state theory, which enables us to make more reliable discussion about the protein kinetics.

研究分野：化学物理・生物物理

キーワード：分子動力学シミュレーション 自由エネルギー レアイベント カイネティクス レートコンスタント
生体分子

1. 研究開始当初の背景

数々のゲノム DNA の塩基配列が明らかになってきた。DNA に結合する蛋白質は、膨大な DNA 塩基配列の中から、どのようにしてターゲット配列を見つけ出すのだろうか？配列探索の過程は、遺伝子発現の出発点となる重要な段階であり、これを分子レベルで捉えることができれば、生命現象の本質的理解につながる。これまでに一分子蛍光測定や NMR 測定が行われ、配列探索中の蛋白質は、1次元サーチと3次元サーチの2つの過程を利用していることが分かってきた(図1)

[Zukrzewska, Lavery, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012]。1次元サーチでは、蛋白質が DNA に沿ってスライドしながら移動するのに対し、3次元サーチでは、DNA から離れて溶液中を移動する(ホッピング、ジャンピング)。

しかし、その分子レベルの様子については明確になっていなかった。例えば、1次元サーチで蛋白質が DNA 上をスライドする際、DNA 2重らせんの溝に沿ってらせん運動 [Blainey et al, *Nat. Struct. Biol.* 2009] しているのか、それとも DNA の溝とは無関係にランダム運動 [Kampmann, *J. Biol. Chem.* 2004] しているのか、といった点など、明確な答えは得られていなかった。

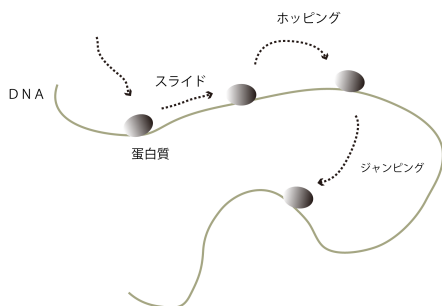


図1：実験データから考えられている蛋白質の DNA 配列探索過程。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、全原子モデルの動力学計算シミュレーションを使って、自由エネルギー地形を計算し、DNA 配列探索中の蛋白質の分子動態を明らかにすることである。DNA に結合した蛋白質の構造は、X 線や NMR の実験から解かれており、配列による結合状態の違いが明らかにされてきた。しかし、配列探索中の蛋白質を捉えるには、結合状態からの変化を調べる必要がある。これを実験的手法のみから導くことは困難である。本申請課題の特色は、結合状態の実験構造からシミュレーションを開始し、蛋白質の構造変化と自由エネルギーをもとに、蛋白質の分

子動態を導きだそうとする点にある。そのため、自由エネルギー地形から分子動態を議論するための理論的枠組みについても検証を行った。

3. 研究の方法

Adaptive Biasing Force (ABF) のアルゴリズム [Darve et al, *J. Chem. Phys.* 2008] をもとに、自由エネルギーの計算プログラムを開発した。そして、AMBER10 の分子動力学計算モジュールに実装した。反応座標としては、原子間距離、原子集団の重心間距離、DNA の長軸ベクトルと蛋白質の重心間距離などを利用できるようにした。また、多次元自由エネルギー地形計算への拡張も行った。

ABF法を実装した AMBER10 プログラムを使って、DNA とラックリプレッサー蛋白質を対象に、分子動力学シミュレーションを行った。初期構造には、NMR によって解かれている2つの分子構造データを利用した。これら2つは、DNA の配列に違いがあり、DNA と蛋白質の構造にも違いがみられる。DNA とラックリプレッサー蛋白質をシミュレーションボックスの真中に置き、周りに水分子を並べ、3次元周期境界条件を課した。ボックスサイズは、DNA と蛋白質が離れた状態でも隣のイメージに接触しないように設定した。蛋白質と DNA の力場パラメータは、それぞれ Amber *ff99SB* と *bsc0*、水は TIP3P を用いた。系を中和するために、カウンターイオン K^+ を加えた。

最初、エネルギー極小化を行い、その後、分子動力学シミュレーションを開始した。最初は、原子位置に束縛をかけて平衡化を行い、その後、300K、1気圧の条件でシミュレーションを行った。シミュレーション中、水素原子を含む共有結合の距離は拘束しながら、2 fs の時間ステップで運動方程式を解いた。温度と圧力は、weak coupling により制御した。系の平衡化後、ABF 法を用いて蛋白質にバイアスフォースを加え、蛋白質を元の結合サイトから変位させるシミュレーションを行った。

4. 研究成果

初めに、開発した自由エネルギー計算プログラムのテスト計算の結果を示す(図2)。水中の C_6H_6 分子の系をテスト系として、2つの分子重心間距離に対する自由エネルギー地形を計算した。長時間シミュレーションから求めたものと対応することを確認することで、開発したプログラムが自由エネルギーを正しく計算できていることを確認した。

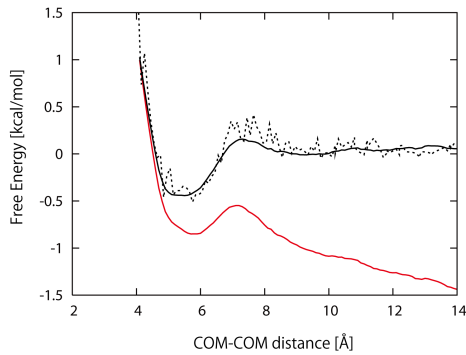


図2：テスト計算の結果。(黒線)開発したプログラムを使って計算した自由エネルギープロファイル。(破線)長時間シミュレーションの分布から求めた結果。(赤線)動径方向の空間的広がりに対応する成分(ヤコビアン項)を含めた自由エネルギー。

次に、開発した計算プログラムを使って、DNA 配列探索中の蛋白質の分子動態を調査した。DNA に結合した状態で、分動力学シミュレーションを行い、ABF法を使って蛋白質の重心にバイアスフォースを加え、変化の様子を調べた。このとき、バイアスフォースを加える方向は、次の3通りについて調査した。(1)結合サイトの重心と蛋白質の重心を結ぶベクトル方向、(2)DNAの長軸方向(3)DNAの長軸に垂直で、蛋白質の重心を通るベクトル方向。

(1)の場合、バイアスフォースを加えていっても、最初のうち、蛋白質はあまり変化しなかったが、バイアスフォースがある程度の大きさになった段階で、大きく動き始めた。このとき、蛋白質は、DNAの表面から離れることはなく、らせん状に移動する様子が見られた。この結果は、DNA配列探索中のラックリプレッサーが、ランダム運動ではなく、らせん運動することを示唆するものである。

通常分子動力学計算では、このような蛋白質の大きな変位は起こらない。今回の計算では、人為的にバイアスフォースを加えて変化を誘導したため、自然な熱揺らぎのもとでの運動を観測できたわけではない。しかし、バイアスフォースを少しずつ大きくしていくことで、もとの配置からもっとも起こりやすい変化が誘導されたと考えられる。

(2)の場合、蛋白質がDNAの長軸方向に移動し始めると期待していたが、うまくいかなかった。系に加わったエネルギーが、回転運動の自由度に分配されてしまい、蛋白質の運動をうまく誘導することができなかった。

(3)の場合は、蛋白質がDNAの表面から離れていく方向に解離していく変化がみられた。また、その過程の自由エネルギー変化を計算し、解離の自由エネルギー障壁が、少なくとも16 kcal/mol程度あることが分かった(図3)。

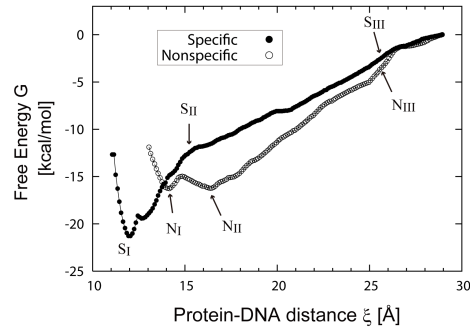


図3：蛋白質 - DNA の距離に対する自由エネルギー変化。Specific と Nonspecific は、それぞれ配列特異的結合状態、非特異的結合状態に対する結果。

得られた計算結果をもとに、蛋白質がDNA配列を探索する分子動態について検討した。前述したように、DNAに沿った1次元移動とDNAから離れた3次元移動の2つが考えられているが、各頻度は、どの程度であろうか。ここでは、蛋白質がDNAにいったん結合した状況を考えてみよう。結合した蛋白質が、次に動くとするれば、DNAに沿った方向か、それともDNAから離れる方向であろうか。先ほど示したように、解離の自由エネルギー障壁は、少なくとも16 kcal/mol以上ある。一方、DNAに沿ったスライド方向に対しては、~8.7 kcal/molあることが、先行研究により示されている。両者の自由エネルギーの障壁を比較すると、明らかに解離よりもスライド方向の変化の方が起こりやすいといえる。また、両者のエネルギーの差を、遷移の頻度に換算すると $\exp[-(8.7-16)/k_B T] = 1.9 \times 10^5$ となる。これは、解離は、スライド19万回に1回程度であることを示唆している。実際には、スライド方向のエネルギー障壁は、8.7 kcal/molよりも低い可能性が指摘されており、そうであれば、スライドに対する解離の割合はさらに小さくなると予想される。

先ほど自由エネルギーの障壁をもとに遷移レートの相対値を比較したが、より正確には、エネルギー障壁の部分だけでなく他の要素も考慮しなければならない。自由エネルギー地形と分子運動の関係より慎重に議論するため、自由エネルギーと遷移レートの関係を検証した。遷移状態理論の形式を利用すると、遷移レート定数 k^{TST} は、以下のように表される。

$$k^{TST} = \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi\mu}} \frac{\exp[-G(r^*)/k_B T]}{\int_0^{r^*} \exp[-G(r)/k_B T] dr} \quad (1)$$

ここで、 μ は、反応座標 r にそった変化に対する換算質量、 r^* は遷移状態である。

水中のイオンペアをテストケースとして、この関係式を検証した。この系の利点は、解離イベントがシミュレーション中に頻繁に

起こるため、それをカウントすることで遷移レートを直接見積もることができる点にある。これは、自由エネルギーから求めた結果と直接比較することが可能である。DNA-蛋白質の系では、通常シミュレーションで遷移イベントを観測することは難しい。

実際に、分子動力学シミュレーションにより解離イベントを観測し、Reactive Flux の手順を使って遷移レートを求めると、 $k^{\text{TST}} = 0.108 \text{ ps}^{-1}$ となった。一方、イオン間の距離 r に対する自由エネルギー地形 $G(r)$ を求めて、式(1) を使って遷移レートを計算すると、 $k^{\text{TST}} = 0.113 \text{ ps}^{-1}$ となった。両者の値は、よく一致しており、自由エネルギー地形をもとに、式(1) を使って遷移レート k^{TST} を評価できることが確認できた。

自由エネルギーと k^{TST} の関係式を使えば、エネルギー障壁の高さだけでなく、自由エネルギープロファイル全体からの寄与を考慮して、遷移レート k^{TST} を評価することができる。スライド方向と解離方向の自由エネルギー地形をもとに k^{TST} を評価すれば、蛋白質の分子カイネティクスについてより信頼性の高い議論ができる。しかし、遷移レートの絶対値について議論することは、現時点では難しい。実際の遷移レート k は、 k^{TST} の他に透過係数の項 κ を含んでおり、この部分を自由エネルギー地形から求めることができないからである。 κ の計算には、今回進めてきた自由エネルギーの計算の他に、別の手続きが必要になる。そのような取組みは、最近、海外のグループから報告されており、今後、検討していかなければならないだろう。

本研究では、蛋白質の分子動態の解明を主眼として自由エネルギー地形の計算を進めてきたが、自由エネルギーは、原子・分子集合体の安定性、カイネティクスを評価する上で重要な指標であり、様々な対象への応用が期待される。例えば、DNA - 蛋白質の部分を、蛋白質 - リガンドに置き換えることで、ドラッグ分子の分子動態解析が可能になる。図4に、本研究で開発した自由エネルギー計算の手順を、蛋白質 - リガンド系へ応用した場合を示す。蛋白質に結合したリガンド、ベンズアミジンが解離していく過程の自由エネルギー変化である。結合状態 ($\xi = \sim 2 \text{ \AA}$) では、蛋白質とリガンド間に複数の水素結合が形成されているが、リガンドが解離していくにつれてこれらの水素結合が壊れていく。それに伴って、自由エネルギーが大きく上昇する。自由エネルギーの変化を水素結合様式の変化と関連づけて解釈することで、リガンドの解離の分子論的起源、つまり、どのようなきっかけで始まり、どのように進行していくのか、を明らかにすることができるだろう。また、自由エネルギー地形をもとに、遷移レートを評価することで、分子カイネティクスをもとに、リガンド分子の働きや効能を検証することができるようになるだろう。

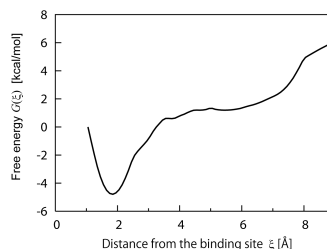


図4：開発した計算プログラムの応用例。蛋白質 - リガンド解離の自由エネルギープロファイル

DNA と蛋白質の複合体は、自由エネルギー計算の対象としては、少しサイズが大きく、これまで自由エネルギーを正しく評価するのは困難だった。しかし、近年、コンピュータの高速化やアルゴリズムの高度化により手の届く範囲に入ってきた。今回扱った計算対象は、DNA に結合するラックリプレッサーの一部分を取り出したものであり、細胞内の様子をより忠実に表現するには、さらに大きな複合体を扱う必要がある。そのような大規模系に展開していくことで、DNA と蛋白質が関係する生命現象の更なる一面を解明することができるだろう。

今回の研究課題では、全原子モデルを扱ったが、最近、粗視化モデルによる研究も盛んに行われている。粗視化モデルの場合は、蛋白質 - DNA 相互作用の自由エネルギー地形を定量的に評価することは難しいが、広い空間に対する定性的な傾向を把握することが可能になる。一方、全原子モデルでは、そのような広い探索は難しいが、特異的結合、非特異的結合など、蛋白質 - DNA 相互作用の詳細を捉えることができる。今後、それぞれのアプローチから導かれた結果をもとに蛋白質 - DNA 相互作用の全体像がみえてくると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

米谷 佳晃, DNA と蛋白質の相互作用と自由エネルギー計算, アンサンブル 17, 111-115, (2015).

<https://doi.org/10.11436/mssj.17.111>

Y. Yonetani, Distinct dissociation kinetics between ion pairs: Solvent-coordinate free-energy landscape analysis, *Journal of Chemical Physics*, **143**, 44506 (2015). 査読有
<https://doi.org/10.1063/1.4927093>

〔学会発表〕(計6件)

Y. Yonetani, Dissociation Free-Energy Profiles of Specific and Nonspecific DNA-Protein Complexes, International Symposium on Extended Molecular Dynamics and Enhanced Sampling (Nose 30), 2014年11月11日, 慶應大学三田

米谷 佳晃, 自由エネルギー計算で探る DNA 配列探索中の蛋白質の分子動態, 第 28 回分子シミュレーション討論会, 2014 年 11 月 12 日, 仙台市民会館

米谷 佳晃, DNA 配列探索中の蛋白質の分子動態: 分子動力学シミュレーションによる自由エネルギー計算からの見解, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 26 日, 徳島あわぎんホール

米谷 佳晃, Atomic-Scale View of Biomolecular Hydration: From Structure to Kinetics, 日本生物物理学会第 53 回年会 (招待講演), 2015 年 9 月 14 日, 金沢大学

米谷 佳晃, 水和イオン対解離過程の多次元自由エネルギー地形解析, 2016 年 12 月 01 日, 第 30 回分子シミュレーション討論会, 大阪大学豊中

Y. Yonetani, Free-Energy Landscape Approach for Understanding Molecular Rare Event, 光・量子ビーム科学合同シンポジウム, 2017 年 5 月, 量研機構 京都府木津川市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米谷 佳晃 (YONETANI YOSHITERU)
国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・主幹研究員
研究者番号: 80399419