

課題名 (タイトル) :

## MAPK 経路の情報伝達メカニズム解明に向けた分子シミュレーションモデルの構築

利用者氏名 : ○杉田 有治, 堀 直人, 高田 彰二

所属 : 「HPCI 戦略プログラム 分野 1 予測する生命科学・医療および創薬基盤」の戦略課題 1  
「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション」の業務参加者

1 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

MAPK 経路は細胞増殖や腫瘍の形成に関わっており、細胞間および細胞内における情報伝達システムのモデル系としても広く研究されている。しかし物理化学を基盤とした分子レベルでの理解には至っていない。本課題では、分子シミュレーションを通して、MAPK 経路上の複数の分子がどのように協同的に振舞い、情報伝達を制御しているのか調べる。

酵母において Ste7 (MAPKK)が Fus3 (MAPK)のリン酸化状態を制御している機構に着目する。これらのタンパク質は足場タンパク質 Ste5 との相互作用により、その活性を制御されていると考えられている。具体的に取り組む未解明点の一つは、MAPK に対する二度のリン酸化がどのような過程で進んでいるかである。このシステムには *intrinsically disorder* と呼ばれる非常にフレキシブルなタンパク質領域が多く含まれるため、静的な構造情報からのみの理解は難しく、分子動力学シミュレーションによる新たな知見が期待できる。

2 具体的な利用内容、計算方法

まず、分子動力学計算に先立ち、結晶構造が得られていない Ste7 ドメインについて、ホモロジーモデリングや Amber による全原子計算を実行して必要な構造モデルを構築する。

次に、粗視化分子シミュレーションソフトウェア CafeMol を用いて分子動力学計算を行う。CafeMol は、理研を中心に行われた文部科学省プロジェクト「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発」における、分子スケールチームによる「生体分子系の粗視化シミュレーション技術の開発」(研究代表者、高田彰二)で開発してきたソフトウェアで、高度に並列化されている。タンパク質分子をアミノ酸レベルの解像度で粗視化し、安定な立体構造に基づくエネルギー関数や、天然変数領域用に最適化されたエネルギー

関数を組み合わせて用いる。

3 結果

Ste7 について、立体構造が分かっているヒト MEK を用いてホモロジーモデリングを行った。さらに、Amber による全原子計算で少なくとも 400 ns 以上安定な構造を保つことを確認した。これにより、Ste7, Fus3, Ste5-VWA の立体構造を用いた計算が可能となった。

リン酸化に先立って、Ste7 の長いテールの末端が Fus3 に結合すること、さらに、両者の結合だけでは反応の進行に不十分で、足場タンパク質ドメイン Ste5-VWA との三者複合体を経由することが分かっている。しかし、その結合様式は明らかでない。そこで、足場ドメインやテールの有無を変えながら、二者または三者の結合構造をシミュレーションし、結合様式の予測と各機能ドメインの役割の考察を試みた。この際、Push-Pull-Release protocol (Ravikumar et al. Biophys. J. 2012) を用いて効率的な結合/解離の計算を行った。

シミュレーション結果から、テールが存在する場合には、Ste7 に対する Fus3 の結合可能性の高い領域の分布が変化し、特に立体障害により不適切な結合が制限されている可能性が示された。その傾向は、VWA ドメインを加えると増加した。

また、VWA ドメインで機能的に重要と予測されている C 末端について、ある場合とない場合での結果を比較した。すると、C 末端がある場合には、Ste7-Fus3 の結合様式がさらに強く制限されることが分かった。VWA と両者の結合の位置関係も C 末端の有無により顕著に変化が見られた。静電相互作用の有無を変えた計算から、C 末端の電荷アミノ酸のはたらきによるものであることが確認された。

4 まとめ

## 平成 25 年度 RICC 利用報告書

本年度は、構造のモデリングののち、様々な条件を変化させながら MAPKK-MAPK-足場ドメインの三者複合体の結合シミュレーションを行った。現在は、得られた多数の結合構造の候補から、先行研究の実験で明らかになっている情報（例えば Ste7 の Co-activation loop と Fus3 が接近していることなど）と照らし合わせつつ、適切な複合体構造について検討を進めている。

### 5 今後の計画・展望

共同研究者が行っているヒト MAPK システムの研究と知見を共有しつつ、反応制御の分子機構の理解に向けてシミュレーション研究を進める。

課題名 (タイトル) :

粗視化シミュレーションによる信号伝達経路上のリン酸化酵素複合体の動態機構の研究

利用者氏名 : ○杉田 有治, 金田 亮

所属 : 京都大学理学研究科生物科学専攻生物物理学教室

「HPCI 戦略プログラム 分野 1 予測する生命科学・医療および創薬基盤」の戦略課題 1

「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション」の業務参加者

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

【背景】 細胞外から与えられた様々な刺激は、信号伝達経路を通して核内に伝達(増幅)され、最終的には蛋白の活性や遺伝子発現を変化させる。信号伝達経路の代表的モデルの一つとして、MAPK 系のリン酸化カスケードがある。この MAPK カスケードにおいては、上流のもの(MAPKK)は下流のもの(MAPK)をリン酸化する事で活性化する。しかし、一体どの様に MAPKK が MAPK をリン酸化するのか、その分子スケールにおける動的機構の詳細については良く分かっていない。(その解明を阻む主たる原因は、MAPKK-MAPK 複合体の詳細構造が実験的に未だに明らかにされていない事にある。)特に哺乳類における MAPK カスケードは、細胞の成長、分化、アポトーシスだけでなく、癌化等の様々な細胞運命に強い関連がある事が知られている。その為、リン酸化の動的機構(分子機構)について明らかにする事は医学的にも非常に重要である。

【目的】 哺乳類の MAPK 系リン酸化カスケードにおけるリン酸化の(動的)分子機構を構造ベースの粗視化シミュレーションを適用する事で調査する。{その際、主に MEK1(MAP-kinase-kinase:MAPKK)がどの様に ERK2(MAP-kinase:MAPK)をリン酸化するのか、その動的機構に焦点を当てる。}

2. 具体的な利用内容、計算方法

シミュレーションは、我々のグループで開発している生体分子粗視化シミュレータ CafeMol を用いて行った。

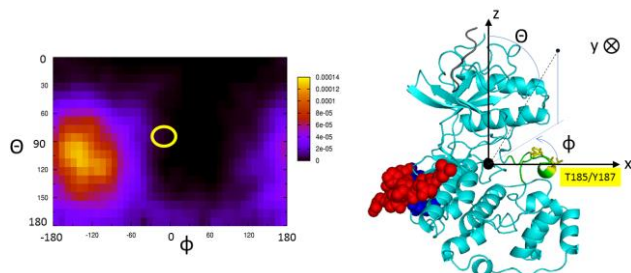
その際、MEK(MAPKK)、ERK(MAPK)の分子内相互作用については、構造依拠型の AICG2 モデル(Li, Takada et al., 2012)を適用した。この AICG2 は、

従来型の Go-like ポテンシャルよりも原子的な相互作用(効果)を考慮(反映)したポテンシャルになっている。(PDB で構造が取られていないギャップ領域については、フレキシブルローカルポテンシャル[統計ポテンシャル](Terakawa and Takada, 2011)を適用した。)一方、分子間相互作用については排除体積効果と Debye-Huckel 型[イオン濃度:0.15M]の静電相互作用を適用した。MD の時間発展については、Underdamped の Langevin ダイナミクス(温度:300K)を適用した。

3. 結果

実験(Garai et al., 2012)により、MEK(MAPKK)の N 末(D-domain)と ERK(MAPK)の CD-domain はある程度の親和性(平衡解離定数  $k_d=18.7 \mu\text{M}$ )で相互作用している事が知られている。そこで、まず D-domain と CD-domain が Go-コンタクトにより強く相互作用している条件下で MEK が ERK の周りをどの様に動くかそのダイナミクスを調査した。左図は、ERK2 固定座標上(極座標)でみた MEK1 の重心の位置分布(確率密度分布)である。ここで、極座標( $\Theta$ ,  $\Phi$ )は右図の様においた: {ERK2 の長軸方向を Z 軸方向にあわせ、リン酸化サイトを x 軸方向に合わせた。注目ベクトルの z 軸からの傾きを  $\Theta$  とし、xy 平面に射影されたベクトル成分の x 軸からの傾きを  $\Phi$  とした。} 分布図(左図)において、黄色の円で囲まれた領域が、ERK2 のリン酸化サイト(T185/Y187)の位置に相当する。本来、MEK1 が ERK2 をリン酸化する際には、MEK1 が結合している ATP( $\gamma$ -ATP)が ERK2 のリン酸化サイト(T185/Y187)に十分近づく必要がある。しかしながら、D-domain と CD-domain の間の相互作用(アンカー相互作用)が存在する場合には、MEK は ERK のリン酸化サイト(T185/Y187)に殆んど近づく事ができな

い事が分かった（左図：確率密度分布より）。これは、アンカー相互作用が存在する場合、MEK1 の N 末のフレキシブルなループ領域が ERK2 に上手く巻き付かなくては、MEK1 の ATP は ERK2 のリン酸化サイト (T185/Y187) に到達できない事が原因とな



っていると考えられる。

そこで、次に D-domain と CD-domain の間のアンカー相互作用が存在しない場合に同様シミュレーションを行った。但し、MEK と ERK が結合する前に互いの重心が拡散によって無限遠に離れてしまう事を防ぐ為に、MEK の重心と ERK の重心の間に距離拘束の調和振動子型のポテンシャル（自然長:70 Å、バネ定数:20.0kcal/mol）を印加した。その結果、アンカー相互作用が存在する場合（左図）と全く異なり、MEK1 の重心はある程度の高い確率で ERK2 のリン酸化サイト (T185/Y187) に近づく事が出来ると分かった。

以上の結果は、D-domain (MEK) と CD-domain (ERK) のアンカー相互作用が強過ぎず、ある程度の強度で存在する事が、MEK による ERK のリン酸化過程にとって重要である事を示唆している。（我々の研究グループ{高田研：堀}では、酵母の MAPKK-MAPK 系のドッキングダイナミクスも調査しているが、定性的に同様の結果が得られている。）

#### 4. まとめ

信号伝達経路 (MAPK カスケード) における MEK (MAPKK) と ERK (MAPK) のドッキングダイナミクスを Cafemol を用いた粗視化シミュレーションにより調査した。その結果、MEK の D-domain と ERK の CD-domain の間の相互作用の有無によって、ERK のリン酸化領域 (T185/Y187) へのアプローチ過程 (ダイナミクス) が定性的に大きく異なる事が分かった。

#### 5. 今後の計画・展望

今後は、MEK の ATP ( $\gamma$  リン酸) と ERK のリン酸化サイト (T185/Y187) に Push-Pull-Release (Ravikumar et al., 2012) のプロトコルに従い距離拘束のポテンシャルを適用する事で、妥当性のある MEK-ERK の複合体構造をより効率的にサンプリングする。そうして得られた複合体構造から、リン酸化過程で重要となる MEK と ERK の間のコンタクト (相互作用) の情報の抽出を目指す。更に、細胞内環境を考慮に入れた MEK-ERK の複合体形成過程についても調査する。

課題名 (タイトル) :

## The GBSA model for coarse-grained simulations of biomolecular systems

利用者氏名 : ○杉田 有治, Le Chang, 坂井 冬樹

所属 : 京都大学理学研究科生物科学専攻生物物理学教室

「HPCI 戦略プログラム 分野 1 予測する生命科学・医療および創薬基盤」の戦略課題 1  
「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション」の業務参加者

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係 【background】

The electrostatic and hydrophobic interactions are two major driving force of intra and inter conformational movements in biomolecular systems. Such movements are essential to normal functions biomolecular systems. CAFEMOL is a software developed by our group for coarse-grained simulations of biomolecular systems. In current version of CAFEMOL, the models for electrostatic and hydrophobic interactions are not accurate enough to mimic the structural movements of biomolecular systems, especially for molecules with a lot of charges, such as DNA and RNA. Therefore, we installed the Generalized Born (GB) and Surface Area (SA) models in CAFEMOL to make more accurate electrostatic and hydrophobic interactions in coarse-grained simulations. The purpose of this project is to investigate protein-DNA interactions by coarse-grained simulations, nucleosome and chromatin to be more specific. So the first step is to create GBSA model for coarse-grained simulations.

2. 具体的な利用内容、計算方法

In the last one year, based on one GB procedure used in all-atom simulations, we fit parameters for coarse-grained GB and install them in CAFEMOL. The parameters are determined by fitting solvation energies obtained from GB to those obtained by solving Poisson-Boltzmann equations. The dataset

for fitting contains 21 proteins, 20 DNAs and 14 RNAs in native conformations. The main usage of RICC this year is to show the advantage of GB type of electrostatic interaction relative to that used in previous version of CAFEMOL. To make comparison, we choose the lac repressor with DNA bound to it as a testing system. The reason for this choice is that we already have the data from all-atom simulations for it, which could be used as standard values for comparison. There are two binding modes with available structures in PDB database, the structure for specific binding (1L1M) and nonspecific binding (1OSL).

3. 結果

As for the parameters for coarse-grained GB, we tested 8 systems with complex structures including protein-protein, protein-DNA, protein-RNA, and protein-protein-DNA. The correlation coefficient between coarse-grained GB and all-atom GB is significant (0.988), even for the testing set with nearly 10 times larger energy range than that of training set. The results from coarse-grained GB simulations are also promising. In general, the electrostatic interaction between protein and DNA in coarse-grained GB simulations are more stable than that in simulations with previous version of CAFEMOL, which are inconsistent with all-atom simulations. The reason for the instability of protein-DNA complex in previous version of CAFEMOL is

from the relative weaker electrostatic interaction in protein-DNA interface.

4. まとめ

In the last one year, we developed the GB model for coarse-grained simulations of biomolecular systems and installed it in CAFEMOL. We also tested the performance of this model in the protein-DNA interactions. Comparing to the model used in previous version of CAFEMOL, GB model gives better accuracy for electrostatic interactions.

5. 今後の計画・展望

After the testing system, we will go to the main purpose of this project: nucleosome and chromatin systems. Considering they are very large systems, we will modified the code to make it faster for large systems. Then the first target will be single nucleosome. Once we have some results for the first target, we will turn to multiple nucleosomes and chromatin if possible.

平成 25 年度 RICC 利用研究成果リスト

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

【国際会議などの予稿集、proceeding】

【国際会議、学会などでの口頭発表】

【その他】

堀直人、高田彰二, “Molecular simulation study on signaling control in yeast MAPK pathway”, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013 年 10 月, 京都国際会館, ポスター発表

金田亮、高田彰二, ”粗視化シミュレーションによるリン酸化酵素複合体(MEK1-ERK2)のドッキングダイナミクス (Docking dynamics of MAP kinase:MEK1-ERK2 complex system studied by coarse-grained simulation)”, 第 51 回 日本生物物理学会年会、2013/10/28-30、 国立京都国際会館、ポスター発表

Le Chang, Wenfei Li, Naoto Hori, Shoji Takada, “The coarse grained GBSA method for simulations of biomolecular system”, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013 年 10 月, 京都国際会館, poster