

課題名 (タイトル) :

分子動力学法による分子混雑環境中の蛋白質間相互作用と立体構造解析

利用者氏名 : ○優 乙石*, 杉田 有治*, Wang Po-hung*, Galvelis Raimondas*

所属 : 杉田理論分子科学研究室(*)

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:

細胞内は様々なイオンや代謝物 (メタボライト) が蛋白質を取り囲んでいる。さらに、蛋白質は互いに近接しており、空間的な余裕の少ない非常に混雑した環境 (分子混雑環境) である。そこでは、様々な分子が絶え間なく相互作用しており、蛋白質の立体構造や、分子全体の回転・拡散運動に影響を与えている。細胞内蛋白質の、いわば「生きた」立体構造・ダイナミクスの知見は基礎科学のみならず、創薬分野においても重要な情報源となり得る。本研究はこのような背景の下、分子動力学 (MD) シミュレーションによって、蛋白質の立体構造や酵素反応性、蛋白質間の相互作用に与える分子混雑環境の影響を分子レベルで解明することを目的としている。

本課題は、理研・杉田理論分子科学研究室 (杉田有治主任) の研究テーマの一つ「細胞環境を意識した生体分子ダイナミクスの理論的研究」の一環である。さらに本課題は、生体分子構造動態研究チーム (チームリーダー: 木川隆則氏 (理研)) や in-cell NMR 法の開発を進めている伊藤隆氏 (首都大学東京) との連携研究という側面も持っている。

実験的に細胞内分子構造・ダイナミクスを調べる最も強力な手法は NMR 法である。しかし得られる情報は特定原子間の時間平均距離など、断片的かつ間接的なものである場合が多い。MD シミュレーションはそこに直接的な解釈や分子描像を与える事が出来るが、扱える現象の時空間スケールが小さいという難点を持つ。このような困難に対して、NMR 測定値を積極的に活用することで、計算すべき候補構造を大幅に減らして構造探索を効率化できる可能性がある。また、蛋白質の回転相関時間などの実験値を再現するようにシミュレーションのパラメータを調整することで、より精密な分子力場 (分子の相互作用エネルギーを与える関数とその定数) の開発も期待できる。

本課題の一部は、並行している他のスーパーコンピュータ利用課題と密接に関係している。例えば、下記に挙げる課題 A については、より大規模な細胞環境モデル (1000 万~1 億原子ほど) を HPCI 戦略プログラム (分野 1 : 細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション) の下、計算科学研究機構の京コンピュータを用いて実行している。本課題では、個々の蛋白質に注目し、溶液環境や初期条件を変えるなどして中規模 (10 万~100 万原子ほど) のシミュレーションを多数実行することを目的とした。

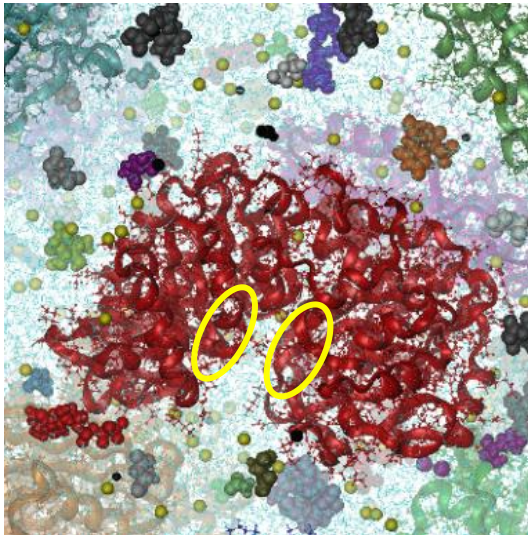
2 具体的な利用内容、計算方法

利用内容や計算方法を課題ごとに述べる

A: 解糖系酵素蛋白質 PGK の酵素活性に及ぼす細胞環境の影響 (担当者: 優乙石)

背景・目的

解糖系酵素の一つである PGK (Phosphoglycerate kinase) は二つのドメインがペプチド鎖で連結された柔軟な立体構造を持つ。二つのドメインの隙間にリガンドが結合すると、酵素反応がおき、ATP が合成される。PGK は希薄溶液中と比較して、分子混雑環境では反応速度が 20 倍ほど加速することが実験的に知られている。これは排除体積効果によって、二つのドメインが、より近づくためと考えられているが、実際の細胞環境中で立体構造にどのような変化があるのかは不明な点が多い。本課題では、PGK の全原子 MD シミュレーションを、溶液中 (代謝物やイオンの水溶液) や、細胞混雑環境中 (他の蛋白質が複数共存している系) などで実行し、細胞環境のどのような物理化学的要素が PGK の立体構造を改変しているかを定量的に調査した。

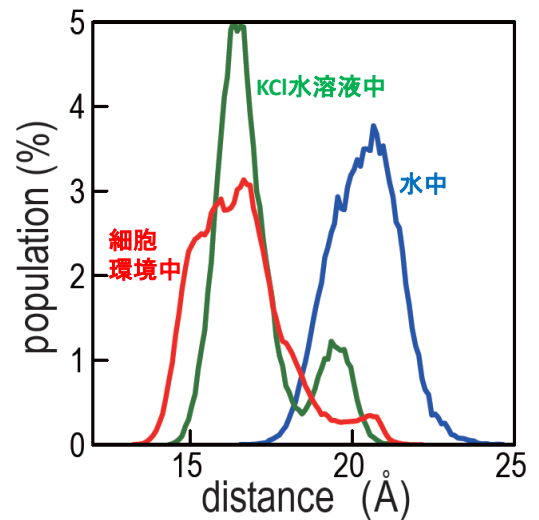


細胞環境中の PGK。周囲の蛋白質やイオン、代謝物に取り囲まれている。黄色い楕円は二つのリガンド結合サイトを示している

結果

2015 年度前半期では通常の定温 MD 法を用い、主に水中やイオン水溶液における PGK の挙動を調査し、先行している細胞環境中のシミュレーション結果と比較した。その結果、水中と比較してイオン (KCl) 水溶液中や、細胞環境中では二つのドメインに存在するリガンド結合サイト間の距離がより小さくなっており、FRET 法を用いた実験結果と一致する挙動が再現できた。

2015 年度後半期からは、水中および KCl 水溶液中において Umbrella Sampling (US) 法を用い、PGK の二つのドメイン間距離変化に対する自由エネルギープロファイルを計算中である。



リガンド結合サイト間の距離分布。赤：細胞環境中、緑：KCl 水溶液中、青：水中

今後の計画・展望

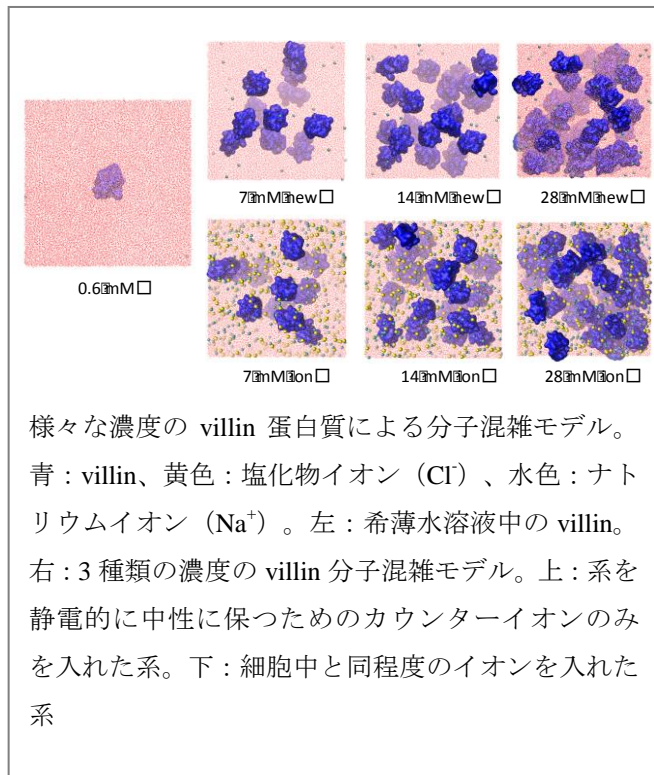
US 法による自由エネルギー計算を引き続き実行し、溶液環境や分子混雑環境が PGK 立体構造・反応性に与える影響を定量的に調査する。

B: 回転運動から考察する蛋白質間相互作用

(担当者 Po-hung Wang)

背景・目的

蛋白質の回転相関時間や、回転異方性は、蛋白質間相互作用を反映する重要な実験データである。当グループが共同研究をしている木川隆則氏（理研）らを中心とした実験グループは、小型蛋白質 villin を細胞質と同程度の混み合いで溶解させたモデルを用いてアミドプロトンの回転緩和時間解析を行っている。その結果、villin の濃度上昇とともに隣接する蛋白質間で、非接触性の引力相互作用が生じていることが示された。当サブ課題では、実験系と同様の分子混雑モデルを作成し、全原子 MD シミュレーションによって villin 回転運動の詳細を調査するとともに、隣接する蛋白質間の相互作用を考察した。



様々な濃度の villin 蛋白質による分子混雑モデル。青：villin、黄色：塩化物イオン (Cl⁻)、水色：ナトリウムイオン (Na⁺)。左：希薄水溶液中の villin。右：3 種類の濃度の villin 分子混雑モデル。上：系を静電的に中性に保つためのカウンターイオンのみを入れた系。下：細胞中と同程度のイオンを入れた系

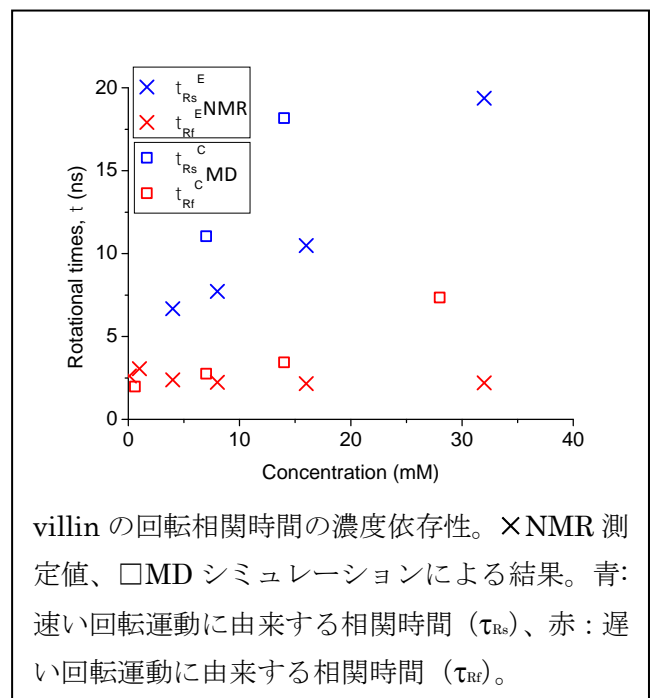
結果

シミュレーションから得られた villin のダイナミクスデータから回転運動を抽出・平均化する解析プログラムを作成し、回転相関関数を計算した。こうして得られた回転相関関数から、villin の回転相関時間の濃度依存性を調査した。その結果、分子全体の運動に由来する遅い回転相関時間と内部運動に由来する速い回転相関時間の濃度依存性について、NMR データを定性的

に再現できることが確認できた。一方で、MD シミュレーションでは高濃度 (28mM) のモデルでは villin 同士の相互作用によって凝集体を形成し、実験と比較して回転運動が大きく遅れる事が判明した。

今後の計画・展望

今後は NMR データ (回転相関関数) を定量的にも再現できるように、分子力場パラメータを調整し、再度 MD シミュレーションを実行することで、分子混雑環境における蛋白質間相互作用の微視的詳細に迫る。



villin の回転相関時間の濃度依存性。×NMR 測定値、□MD シミュレーションによる結果。青：速い回転運動に由来する相関時間 (τ_{Rs})、赤：遅い回転運動に由来する相関時間 (τ_{Rf})。

C: NMR データと連携した蛋白質立体構造予測法の開発

利用内容・計算方法

NMR 法によって得られる情報は特定の原子間距離や二面角の情報であるため、これら断片的情報を元にさらなる構造精密化が必要となる場合が多い。一方で、従来の定温 MD 法は無数のエネルギー極小構造に系が長時間留まるため、蛋白質の構造予測には不向きである。このような問題を克服するために、「NMR データ」と幅広い構造探索を可能とする「拡張アンサンブル MD 法」を併用した実験・理論の融合的手法を開発する。

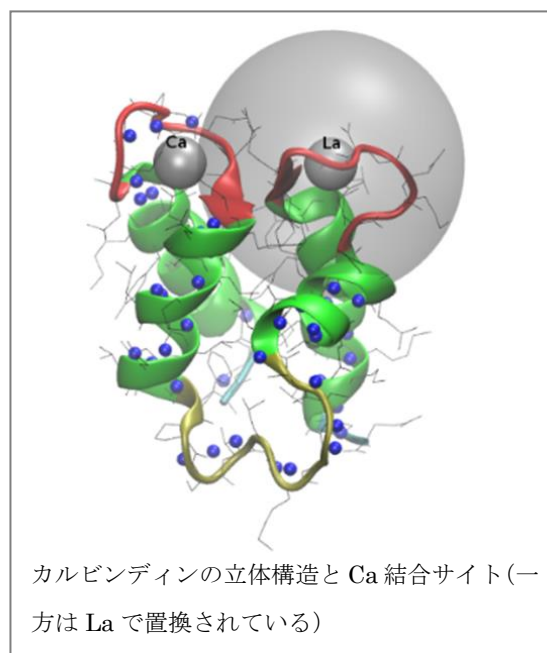
結果

2015 年度は、メタダイナミクス (Meta Dynamics: MTD) 法とレプリカ状態交換法 (Replica State Exchange: RSE) を組み合わせた RSE-MTD 法を開発し、当グループの MD シミュレーションプラットフォームである GENESIS に実装した。アラニンジペプチドや、糖鎖分子を用いた性能評価を行った結果、従来法に比べて安定構造への収束がより高速に得られる事を確認した (論文に掲載済み)。

また、カルシウム結合蛋白質：カルビンディンを対象に、常磁性緩和促進 (PRE) 法による残基間距離データ (首都大学・伊藤グループが提供) を束縛条件として焼きなまし MD シミュレーション (高温から徐々に温度を下げて構造を最適化する方法) を実行した結果、十分な予測構造が得られないことが明らかになった。

今後の計画・展望

天然構造から遠い中間状態については、蛋白質は全原子モデルではなくアミノ酸残基レベルの粗視化モデルを用い、相互作用は蛋白質立体構造データベースから構築した経験的ポテンシャルによって計算する。得られた候補構造に対し、全原子モデルを用いて RSE-MTD を接続し、さらに立体構造を精密化するマルチスケール法を開発する。



まとめ

研究計画は各サブ課題とも、概ね順調に遂行されている。分子力場パラメータの改善や粗視化モデルの併用の必要性など、新たな課題も見つかり、2015 年度は今後の発展へと結びつく積極的利用が出来たと考えている。

平成 27 年度 利用研究成果リスト

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

- ① Raimondas Galvelis, Yuji Sugita
Replica state exchange metadynamics for improving the convergence of free energy estimates
Journal of Computer Chemistry, 36, 1446–1455 (2015)
- ② Jaewoon Jung, Takaharu Mori, Chigusa Kobayashi, Yasuhiro Matsunaga, Takao Yoda,
Michael Feig, Yuji Sugita
GENESIS: a hybrid - parallel and multi - scale molecular dynamics simulator with
enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations.
WIREs Comput. Mol. Sci., (DOI: 10.1002/wcms.1220)
- ③ Michael Feig, Ryuhei Harada, Takaharu Mori, Isseki Yu, Koichi Takahashi and Yuji Sugita
Complete Atomistic Model of a Bacterial Cytoplasm for Integrating Physics, Biochemistry, and Systems
Biology Journal of Molecular Graphics and Modelling
J. Mol. Graph. Model., 58, 1–9 (2015)

【国際会議、学会などでの口頭発表】

課題 A (優乙石が担当) 全て口頭発表

- ① Isseki. Yu, Takaharu Mori, Tadashi Ando, Ryuhei Harada, Michael Feig, Yuji Sugita
Atomistic Molecular Dynamics Simulation of a Complete Model of Bacterial Cytoplasm
International Conference on Computational Methods (ICCM)
2015/7/18 (Auckland, NZ)
- ② Isseki. Yu, Takaharu Mori, Tadashi Ando, Ryuhei Harada, Michael Feig, Yuji Sugita
Dynamics, Stability, and Interactions of Proteins and Metabolites in Bacterial Cytoplasm:
All-atom Molecular Dynamics Study
53th Annual Meeting of Biophysical Society Japan
2015/9/15 (Kanazawa, Japan)
- ③ Isseki. Yu, Takaharu Mori, Tadashi Ando, Ryuhei Harada, Michael Feig, Yuji Sugita
All-atom Molecular Dynamics Simulation of Proteins and Metabolites under the Crowding
Environment of Bacterial Cytoplasm
38 回日本分子生物学会年会、88 回 日本生化学大会 合同大会
2015/12/1 (Kobe, Japan)
- ④ Isseki. Yu, Takaharu Mori, Tadashi Ando, Ryuhei Harada, Michael Feig, Yuji Sugita
バクテリア細胞質中の生体分子ダイナミクスと相互作用：大規模分子動力学計算による微視的理解
情報計算化学生物学会講演会 「京」 からポスト「京」 へー革新的創薬基盤の構築に向けた取り組み
2016/1/13 (Tokyo, Japan)

課題 B (主に Po-hung, Wang が担当) 全てポスター発表

- ① Po-hung Wang, Isseki Yu, Hideyasu Okamura, Takanori Kigawa and Yuji Sugita
Protein motions in crowded environment: NMR spectroscopy and molecular dynamics simulation
The first RIKEN-AIST joint symposium
2015/06/29 (Tokyo, Japan)
- ② Po-hung Wang, Isseki Yu, Hideyasu Okamura, Takanori Kigawa and Yuji Sugita
An extended Model-free analysis for protein motions in crowded environment: NMR spectroscopy and molecular dynamics simulation.
The International Congress on Industrial and Applied Mathematics 2015
2015/08/11 (Beijing, China)
- ③ Po-hung Wang, Isseki Yu, Hideyasu Okamura, Takanori Kigawa and Yuji Sugita
Rotational diffusion of proteins in crowded environment: NMR spectroscopy and molecular dynamics simulation
The 53rd Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
2015/09/15 (Kanazawa, Japan)
- ④ Po-hung Wang, Isseki Yu, Hideyasu Okamura, Takanori Kigawa and Yuji Sugita
Protein motions in crowded environment: NMR spectroscopy and molecular dynamics simulation
Supercomputational Life Science 2015
2015/10/20 (Tokyo, Japan)

課題 C (主に Raimondas Galvelis が担当) 全てポスター発表

- ① Raimondas Galvelis, Suyong Re, Yuji Sugita
Exploring N-glycan Conformers: Assessment of Force Fields and Enhanced Sampling Algorithms
The 53th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan
2015/10/13 (Kanazawa, Japan)
- ② Raimondas Galvelis, Suyong Re, Yuji Sugita
Exploring N-glycan Conformers: Assessment of Enhanced Sampling Algorithms
The 60th Annual Meeting of Biophysical Society
2016/03/02 (Los Angeles, US)

【その他 (プレスリリース、学術会議以外の一般向けの講演など)】

- ① Bio Super Computing Newsletter vol13
バクテリア細胞質の丸ごとモデリングと全原子分子動力学シミュレーション
- ② 理研ニュース vol.10 2015
「京」と GENESIS で細胞の中を観る (表紙)