

業績紹介：分子動力学計算と常磁性 NMR 法による糖鎖立体構造の揺らぎの検証

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Lanthanide-assisted NMR evaluation of a dynamic ensemble of oligosaccharide conformations"

著者: Sayoko Yamamoto, Ying Zhang, Takumi Yamaguchi, Tomoshi Kameda, and Koichi Kato

雑誌巻号: *Chem. Commun.* **48**, 4752–4754 (2012)

糖鎖の機能を詳細に理解するためには、その立体構造を溶液中での揺らぎを含めて明らかにする必要がある。そこで、私たちは、溶液 NMR による糖鎖の立体構造およびダイナミクス解析のための新規手法の開発に取り組んでいる。生体分子の立体構造の揺らぎを記述する有力な方法の 1 つに分子動力学 (MD) 計算があげられるが、その計算結果の検証には NMR 法が広く用いられている。糖鎖の MD 計算においても、得られた結果が実際の系の振る舞いを再現しているか否かを検証するために、NMR による核オーバーハウザー効果 (NOE) やスピン結合定数などの観測に基づく立体構造情報が利用されている。しかしながら、NOE は近傍の原子間でのみ観測されるため、プロトン密度が低い糖鎖においては十分な量の構造情報を得ることは困難である。また内部運動の自由度が大きい糖鎖では、結合の二面角を反映するスピン結合定数を定量的に解釈することは容易ではない。一方、私たちは、新たな立体構造情報として常磁性効果に着目し、ランタニドイオンの導入によって観測される擬コンタクトシフト (PCS) を利用した糖鎖の NMR 立体構造解析法を報告している[1]。本研究では、PCS を活用した糖鎖の MD 計算結果の新規評価法の確立を行った。

具体的には、神経細胞膜上に存在する糖脂質ガングリオシド GM3 の糖鎖構造 (NeuAc α 1-3Gal β 1-4Glc) について、MD 計算と常磁性 NMR 計測を実施し、PCS の理論値と実験値を比較することで MD 計算により得られた構造サンプリングの適切さを評価した。GM3 糖鎖の MD 計算を行ったところ、エネルギー差の小さな複数の安定構造が存在し、その立体構造は水溶液中で揺らいでいることが示唆された。そこで剛直な金属キレートタグとしてフェニレンジアミン四酢酸誘導体を

合成し、これを GM3 糖鎖の還元末端へ連結した後、Tm³⁺イオンを添加することで常磁性プローブを特定の位置へ導入した。調製した試料について ¹H-¹³C HSQC 測定を行い、糖鎖の各水素および炭素原子の化学シフト変化から PCS 値を求めた。一方、MD 計算によって得られた複数のコンフォーマーを考慮した立体構造モデルを作成し、PCS の理論値を算出した。このようにして得られた PCS の実験値と理論値の比較を行った。その結果、主要なコンフォメーションのみならず、存在割合の低い安定構造を考慮することで両者がよりよく一致することが判明し、これにより溶液中での糖鎖の立体構造の揺らぎを正しく記述することに成功した。以上のように、PCS と MD 計算を組み合わせることで、糖鎖の動的な立体構造解析のための体系的な方法論を構築することができた。

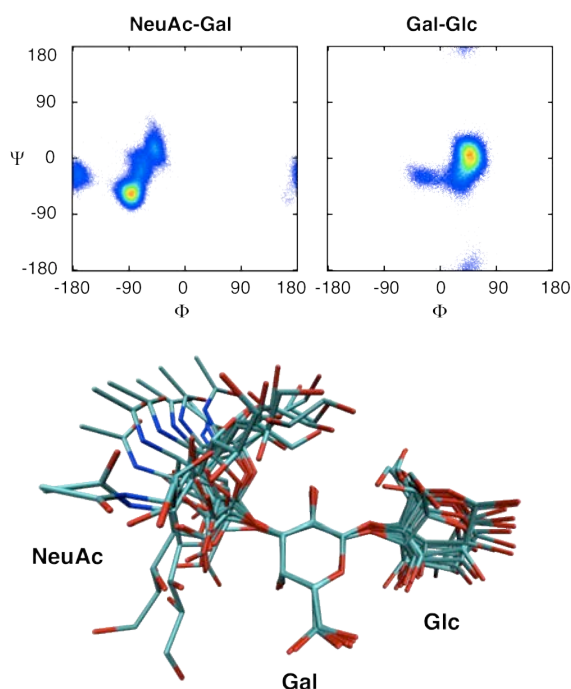


図 1. MD 計算によって得られた GM3 糖鎖のグリコシド結合の二面角の分布図 (上) および立体構造の重ね合わせ (下)。

参考文献

[1] S. Yamamoto et al., *Chem. Euro. J.* **17**, 9280–9282 (2011).

業績紹介：糖タンパク質の分解に関わるタンパク質間相互作用の構造基盤

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目: "NMR characterization of the interaction between the PUB domain of peptide:N-glycanase and ubiquitin-like domain of HR23"

著者: Yukiko Kamiya, Yoshinori Uekusa, Akira Sumiyoshi, Hiroaki Sasakawa, Takeshi Hirao, Tadashi Suzuki, and Koichi Kato

雑誌巻号: *FEBS Lett.* **586**, 1141–1146 (2012)

私たちは NMR を用いてユビキチン (Ub)-プロテアソーム系で機能する分子の構造揺らぎを探索している。Ub はその疎水表面を用いて Ub 結合ドメイン (UBA) 等を含む様々なパートナー分子と相互作用しているが、Ub 2 量体ではこの疎水性表面を露出した開構造と閉構造の動的平衡にあることを私たちは明らかにしている [1]。ところで、Ub-プロテアソーム系で働くタンパク質の中には Ub と相同性の高いドメイン (UBL) を持つものがいくつか存在する。本研究で着目しているプロテアソーム基質運搬因子 HR23 は UBL と UBA を併せ持っており、これらは分子内で相互作用していることが報告されている。また HR23 は立体構造不全の糖タンパク質から糖鎖を切り離す酵素 peptide:N-glycanase (PNGase) と結合することが知られている。PNGase の N 末端には、PUB ドメインとよばれるドメインが存在しており、このドメインは小胞体関連分解 (ERAD) マシーナリーを構成する p97 の C 末端部と結合することが知られている。Ub-プロテアソーム系のタンパク質の中には PUB と相同なドメインが同定されているがそれらの機能は明らかではない。私たちは PNGase の PUB が、p97 に加えて HR23 の UBL とも結合し得るという可能性を検証するとともに、そうした相互作用の構造基盤を明確にするために NMR 解析を実施した。

PUB と HR23-UBL を用いた化学シフト摂動実験を行い、得られた結合部位の情報に基づいてドッキングシミュレーションを実施することで複合体の 3 次元構造モデルを構築した。その結果、PUB は、HR23 の UBL 上で UBA との相互作用に関わる疎水性表面パッチ周

辺に分布する塩基性アミノ酸と静電的に相互作用することが明らかとなった (図 1)。さらに、フロントアルフィニティークロマトグラフィ実験により PUB と HR23-UBL および Ub 鎖との親和性を定量的に評価した。

以上の結果を総合して私たちが提唱する ERAD マシーナリーにおける HR23 と PUB の複合体形成モデルを図 2 に示す。すなわち、HR23 は UBL と UBA が分子内で互いに相互作用することで不活化状態にあるが、ERAD システムにリクルートされると、UBL が PNGase の PUB と優先的に相互作用し、その結果、UBA は Ub 鎖と結合可能な活性型となる。ERAD の基質である Ub 化糖タンパク質は、HR23-UBA と PNGase の C 末領域に存在するレクチンドメインによって協同的に認識され、糖鎖の脱離が起こることが考えられる。このように、HR23 の UBL は同一分子表面を介した分子内相互作用と分子間相互作用を切り替えることにより、PNGase と協同して糖タンパク質の細胞内分解を制御していることが明らかとなった。

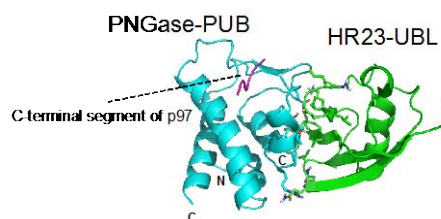


図 1. 3 者複合体の立体構造モデル

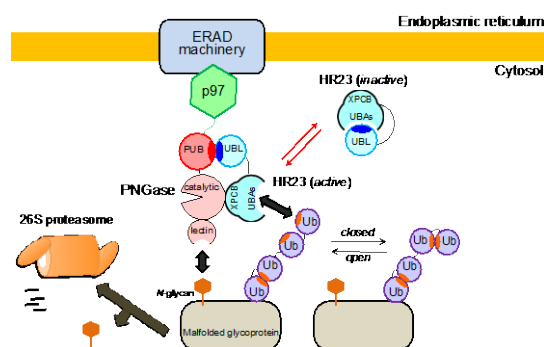


図 2. ERAD システムにおける HR23 と PNGase の相互作用モデル

参考文献

[1] T. Hirano et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 37496–37502 (2011).

業績紹介：超並列マルチスケール自由エネルギー計算 MSFEL による Villin Headpiece サブドメインのフォールディングメカニズム

北尾彰朗

(東京大学分生研・A01 公募研究代表者)

論文題目："The fast-folding mechanism of villin headpiece subdomain studied by multi-scale distributed computing"

著者：Ryuhei Harada and Akio Kitao

雑誌巻号：*J. Chem. Theory Comput.* **8** (1), 290-299 (2012).

これまでも報告してきたように、我々は大規模計算が必要な全原子シミュレーションにおいてプロセス間の通信や同期を排除し、完全に並列なシミュレーションを実行し、最終的に結果を統合して自由エネルギー地形を計算することができる MMMM (Multiple Markov transition Matrix Method, [1]) や MSFEL (Multi-Scale Free Energy Landscape analysis, [2,3]) を開発してきた。後者の MSFEL ではまず粗視化モデルなどを用いて広い構造空間をサンプリングする。次にサンプリングされた多数の構造から全原子構造(溶媒含む)を構築し、精度の高いシミュレーションを完全に独立に実行する。そして最後に WHAM (Weighted Histogram Analysis Method) などを用いて自由エネルギー地形を計算する。これまでに Met-enkephalin, Trpzip2, Chignolin において、MSFEL によって従来の分子動力学シミュレーションやレプリカ交換法よりも効率的に自由エネルギー計算が可能であることを示してきた。

今回紹介する研究で、我々は MSFEL を用いて 35 残基からなる villin headpiece サブドメイン (HP35) のフォールディング自由エネルギー地形を計算し、フォールディングのメカニズムを研究した。本研究では、これまで知られていたメジャーなフォールディング経路に加えて、マイナーなフォールディング経路も存在しうることを示した。フォールディング経路の解析と変異体の計算結果から、前者では PLWK モチーフと呼ばれる部位の構造形成がフォールディングのトリガーと考えられるのに対し、後者では Phe6, Phe10, Phe17 など形成される疎水性コアの形成がフォールディングのドライビングフォースになっていることが明らかになった。

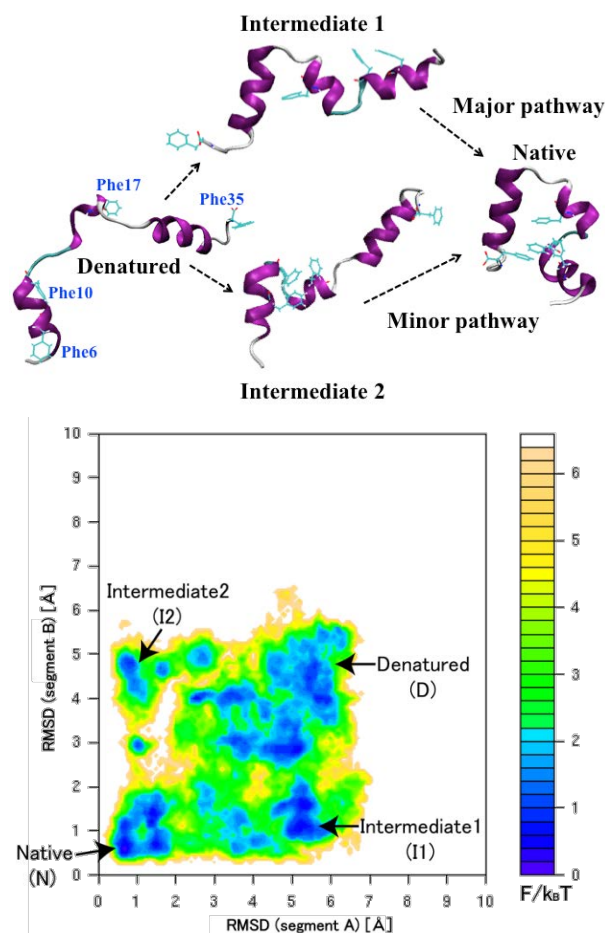


図 Villin Headpiece サブドメインの代表的なフォールディング経路 (上) とフォールディング自由エネルギー地形 (下)

参考文献

- [1] Shun Sakuraba and Akio Kitao, *J. Comp. Chem.*, **30**, 1850-1858 (2009).
- [2] Ryuhei Harada and Akio Kitao, *Chem. Phys. Lett.*, **503**(1-3), 145-152 (2011).
- [3] Ryuhei Harada and Akio Kitao, *J. Phys. Chem. B.*, **115**(27), 8806-8812 (2011).

業績紹介：蛋白質中の全チロシン残基の pKa を決定する

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

論文題目："Comprehensive determination of protein tyrosine pKa values for photoactive yellow protein using indirect ^{13}C NMR spectroscopy"

著者：N. A. Oktaviani, T. J. Pool, H. Kamikubo, J. Slager, R. M. Scek, M. Kataoka and F. A. Mulder

雑誌巻号：Biophys. J. **102**, 579-586 (2012).

蛋白質内の解離性残基の pKa は、蛋白質機能の分子機構を理解する上で重要な情報である。NMR は、解離性残基のプロトン化状態を精度良く検出することができるが、チロシンの pKa の決定例は少ない。我々は、 $\text{C}\gamma\text{-H}\beta$ 2 次元 NMR に基づき、Tyr の pKa を残基特異的に決定する方法を開発し、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識イエロープロテイン (PYP) に適用した。この方法は、変異体を用いる必要がなく、蛋白質中の Tyr を含む静電相互作用を正確に、包括的に記述することが可能である。

PYP には、5 個の Tyr 残基が含まれている。このうち、Tyr42 は、発色団 p-クマル酸 (pCA) と短距離水素結合を形成し、光反応に重要な役割を担っている。PYP の 5 個の Tyr のうち、2 つ (Tyr76、Tyr98) は、溶媒に露出している。脱プロトン化により、 $\text{C}\gamma$ のケミカルシフトは約 4ppm 低振動数側にシフトし、転移の midpoint、すなわち pKa はほぼ 10 であった。Tyr118 は、蛋白質内部にほぼ埋まっているが (図)、OH 基は、どの残基とも水素結合していない。この残基の $\text{C}\gamma$ のケミカルシフトの pH 依存性から pKa は 11.6 と決定された。Tyr42 と Tyr94 は、蛋白質内部で水素結合に関与している (図)。これらの $\text{C}\gamma$ ケミカルシフトは、pH11.24 までは、0.1ppm 未満の変化しか観測されない。この結果から、この 2 つの Tyr の pKa は 13 以上であると求められた。Tyr42 と pCA の間の短距離水素結合は、pH3 から pH11.2 の間で、安定に形成されており、PYP は、熱力学的にも化学的にも安定であることを示している。これまで知られている光反応の pH 依存性は、Tyr42 のプロトン化状態の変化によるものではないことが明らかであり、pCA のプロトン化状態は基底状態において、pH 依存的に変化しないと結論できる。

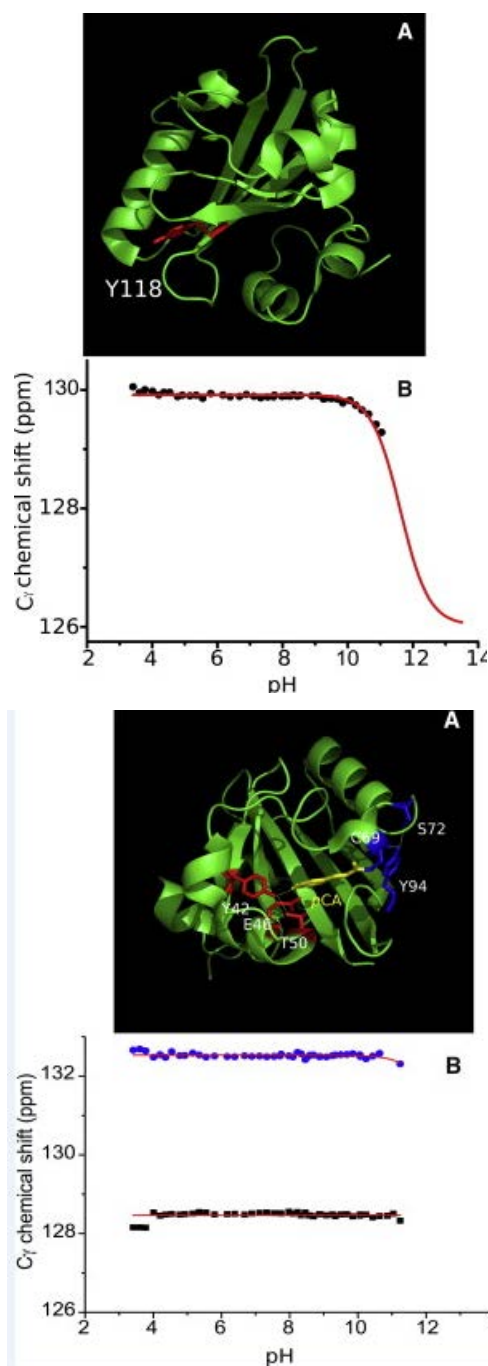


図. PYP における Tyr の位置(A)とそれぞれの $\text{C}\gamma$ ケミカルシフトの pH 依存性(B)。

(上) ほぼ内部に埋まっている Tyr118。

(下) 水素結合に関与している Tyr42 と Tyr94。関係する水素結合の相手も示されている。

業績紹介：抗凝集作用と自身の凝集という二面性を示すミニシャペロン

桑島邦博

(岡崎統合バイオサイエンスセンター・A03
計画研究代表者)

論文題目："Fibrillogenic propensity of the GroEL apical domain: A Janus-faced minichaperone"

著者：Jin Chen, Hisashi Yagi, Pietro Sormanni, Michele Vendruscolo, Koki Makabe, Takashi Nakamura, Yuji Goto, Kunihiro Kuwajima

雑誌巻号：FEBS Lett. **586**, 1120-1127 (2012)

シャペロニン GroEL は蛋白質のフォールディングを促進したり、ミスフォールディングや凝集を防ぐ働きがある。GroEL 頂上ドメインはミニシャペロンと呼ばれ、それ自身が折れ畳まり、不完全ながらも分子シャペロンとしての機能を有している。GroEL の一次配列を PASTA や TANGO、Zygggregator で解析すると、凝集能が高いと予想される領域 (残基番号 260-280) が頂上ドメインに存在した (図上)。そこで我々は GroEL 及び GroEL 頂上ドメインのアミロイド線維形成をチオフラビン T を用いた蛍光分光法や透過型電子顕微鏡観察で調べた。その結果、GroEL 及び GroEL 頂上ドメインが生理的条件下でアミロイド状線維を形成し、頂上ドメインのアミロイド線維形成は酸性条件下で加速されることを見いだした。しかしながら酸性条件下の反応初期では、頂上ドメインはβ2 ミクログロブリンのアミロイド線維成長を阻害する働きがあることもわかった (図中及び図下)。このような頂上ドメインの振る舞いは、自身の凝集とシャペロニンとしての抗凝集作用という、相反する2つの性質の間に密接な関係があることを示している。さらに、1003 種類の GroEL の相同配列の凝集能を Zygggregator で解析したところ、他のシャペロニンファミリーにも GroEL と同様に基質結合部位に凝集能が高い配列が存在した。このことはシャペロニンが、一般的に、自身の凝集とシャペロニンとしての凝集を抑える作用という2面性を有している可能性を示している。

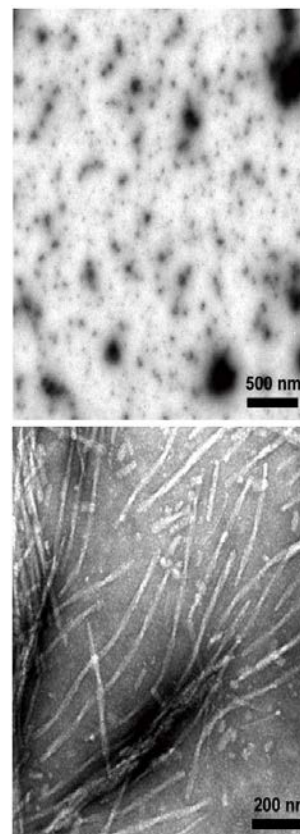
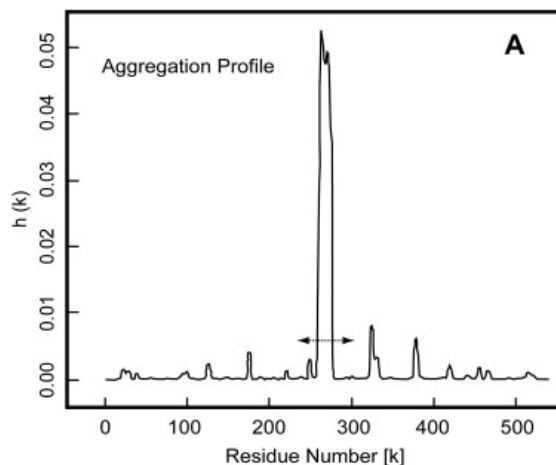


図. PASTA による GroEL の解析結果(上)と生理的条件下 (pH 7.0, 37°C で、0.1 M NaCl と 0.5 mM SDS を含む) での GroEL 頂上ドメインのアミロイド線維形成の様子 (中及び下)。(中)：攪拌しなかった場合。(下)：攪拌により線維形成を促進させた場合。

業績紹介：酵素反応に相関する大きなタンパク質揺らぎを考慮することができる新規分子シミュレーション手法の開発

林 重彦

(京都大学理学研究科・A03 公募研究代表者)

論文題目："QM/MM reweighting free energy SCF for geometry optimization on extensive free energy surface of enzymatic reaction"

著者：Takahiro Kosugi, Shigehiko Hayashi

雑誌巻号：J. Chem. Theory Comput. 8, 322-334 (2012)

酵素活性の分子機構を分子シミュレーションにより探るために、近年、広く用いられ成功を収めている手法が、QM/MM 法である。この方法は、分子軌道法や密度汎関数法などの量子化学的 (QM) 手法と、生体分子の分子シミュレーションで通常用いられている分子力場に基づく分子力学的 (MM) 手法をハイブリッドするものであり、化学反応に関わる領域を QM 法で取り扱う際に、そのまわりのタンパク質環境の影響を MM 法に基づき記述することにより、酵素反応活性に関わる触媒場を非常に効率良く考慮することを可能にする。

しかしながら、QM/MM 法の有用性の一方で、その限界も明らかになってきた。最も大きな困難は、生体分子の熱揺らぎを考慮するための十分な統計サンプルが取れないことである。多くの場合、タンパク質酵素活性や機能の発現には生体分子の大きな構造変化が伴う。このような構造変化は、通常 MM 法に基づく分子動力学 (MD) シミュレーションにより解析されるが、その構造変化に共役する酵素化学反応の計算には QM/MM 法に基づく記述が必要となる。しかしながら、QM/MM 法では、局所的な活性部位のみの適用に制限した QM 計算であっても MM 計算に比べて圧倒的に計算コストが高く、生体分子系の遅い緩和を適切に考慮できるだけの MD サンプル時間を得ることができない。

この問題を解決するために、我々は、新規な QM/MM 自由エネルギー法 (QM/MM-RWFE-SCF 法) を開発した。QM/MM 自由エネルギー法では、MD シミュレーションによりサンプルされた MM 部分の構造分布により定義される自由エネルギー曲面上で、

QM 法によって取り扱われる活性部位分子の最適自由エネルギー構造が決定される。我々は、平均場近似と統計的 reweighting の手法を組み合わせ、さらに QM-MM 間の長距離クーロン相互作用を Ewald 法を用いて適切に考慮することにより、非常に精度の高い効率的な手法を開発した。特に、本手法のスキームでは、QM/MM 法部分の計算と MM 構造サンプリングのための MD シミュレーション部分が完全に分離される。従って、MD シミュレーションに既存の洗練された MD プログラムを使用することが可能になり、計算遂行上の大きな柔軟性を達成している。

図 1 に自由エネルギー構造最適化により観測されたタンパク質構造変化を示す。反応始及び終状態ともに、基質近傍のループが、構造最適化の初期構造から大きく構造変化をしていることがわかる。この構造変化は、サブマイクロ秒程度の MD シミュレーションから得られており、直接的な QM/MM MD 法よりも 10,000 倍以上、また従来行われている QM 電子状態計算の近似の粗い QM/MM MD 法によるシミュレーションよりも、100~1,000 倍もの長時間の現象の記述に成功した。また、L2 ループが、反応の始状態と終状態において異なる構造を取っており、化学反応の進行に近傍ループの大きな構造変化が相関していることが示唆された。

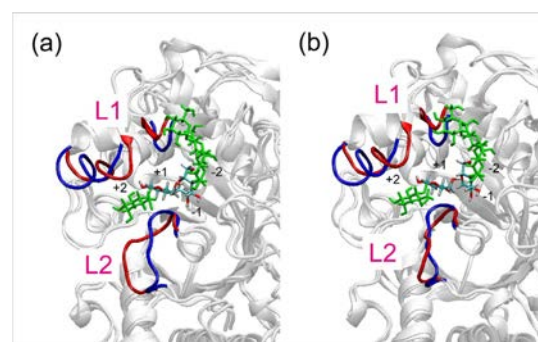


図 1：QM/MM-RWFE-SCF 自由エネルギー構造最適化により得られたタンパク質構造。(a) 反応始状態、(b) 反応終状態。青及び赤はそれぞれ構造最適化前及び後の構造。緑は基質分子でサブサイト+1 及び -1 周辺が QM 領域。