

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業

(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間: 平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 河野 秀俊

(英語) Hidetoshi Kono

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・

量子生命・医学部門量子生命科学研究所・

生体分子シミュレーショングループ・

グループリーダー

(英語) National Institutes for Quantum Science and Technology

Quantum Life and Medical Science Directorate

Institute for Quantum Life Science

Molecular Modelling and Simulation Group

Group Leader

II 補助事業の概要

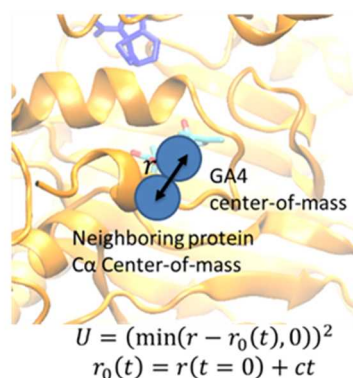
本事業では、我々が持つ分子モデリング、構造サンプリング、精密な自由エネルギー計算手法を支援に供するとともに、それらの過程で見つかった新たなニーズに対する高度化や方法の並列化及び高速化を行った。

我々のグループでは、26 件の支援を行った。そのうち、21 件が立体構造の決まっていないタンパク質やタンパク質と核酸の複合体のモデリングやダイナミクス解析であった。残りの 5 件は、支援依頼者が決定した構造や既知構造にもとづいて、タンパク質の機能発現メカニズムの解析や活性や安定性の向上化の支援を行った。以下、ここでは、論文として発表した支援のいくつかを紹介する。

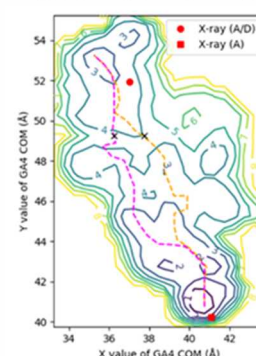
植物ホルモン、ジベレリンのジベレリン酸化酵素への結合様式の解析及び高度化

植物ホルモンであるジベレリン・オーキシンは植物内で分解(代謝)されることで、適切な濃度を維持している。名古屋大学理学部の上口教授より、ジベレリン・オーキシン代謝酵素の新規結晶構造を得たため MD による機能解析を依頼され、支援を行った。実験上の理由により結晶構造には活性中心の鉄が含まれていなかったため、まず酵素複合体中の Fe^{2+} の位置を量子化学計算から推定した。モデル結果を元にしてジベレリン代謝酵素 GA2ox3 の 4 量体およびオーキシン代謝酵素 DA04 の MD 計算を行い、ジベレリンの排出経路の探索やジベレリン移動のパスなどのダイナミクス解析を行った(右図)。計算結果と、計算から提案された重要残基への変異体実験とを合わせた機能解析により、GA2ox3・DA04 が酵素の多量体化を巧妙に活用してジベレリン・オーキシン代謝速度を制御していることを明らかにした。結果は Nature comm. に 2020 年 5 月付けで掲載されるとともに、プレス発表を行った。

ジベレリン排出経路の探索

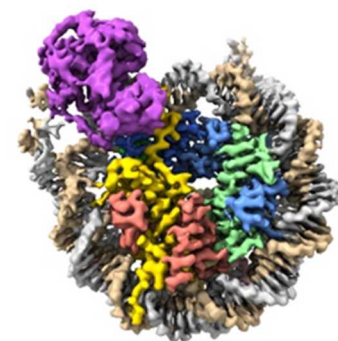


ジベレリン移動の自由エネルギー地形



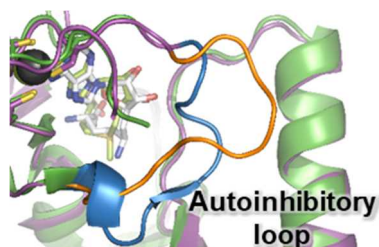
NSD2 メチル化酵素とヌクレオソーム複合体の構造解析及びメチル化機構の解析

横浜市大の仙石講師は、ヌクレオソームとヒストンメチル化酵素 (NSD2) の複合体の構造解析 (右図) に成功しつつあった。そこで、複合体構造に基づき分子動力学シミュレーションを行うことにより、ヒストンメチル化酵素によるヌクレオソーム認識機構や構造変化による活性化機構、血液がんで見られる変異が修飾酵素の活性を異常亢進する機構を詳細に解析することを依頼された。NSD2 のメチル化酵素ドメイン SET (図の紫色) について MD 計算を行い、がん細胞に見られる変異体と野生型の違いを調べた。結果、autoinhibitory loop(自己阻



害ループ)が開閉することでヒストンテールの認識 (左図のオレンジ (閉じた状態) と青

(開いた状態))が行われていることや開閉の仕組みは疎水性パッチの形成と破壊によって起こることを見出した。また、活性異常を起こす他の変異体も同じ疎水性パッチを壊し、自己阻害ループを開いた状態に保つ構造に遷移することが分かってきた。その成果をまとめて、Nat. Comm. (2021 年 11 月)に発表し、プレス発表を行った。

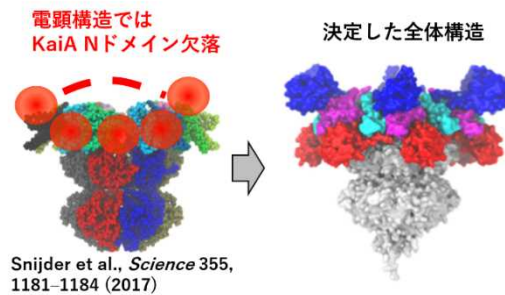


X線及び中性子小角散乱実験と連携したシミュレーションによる時計タンパク質複合体の構造解析

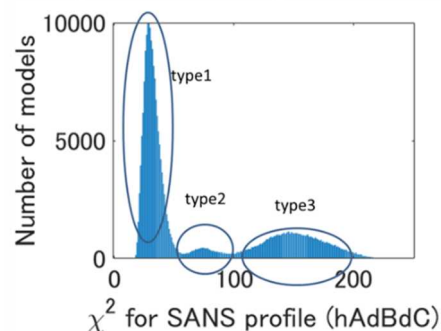
ラン藻の時計タンパク質は、KaiA, KaiB, KaiC の 3 種類のタンパク質から構成されている。ATP 存在下では、結合と乖離を繰り返すことにより、24 時間周期でその形状を変化させる。周期中に現れる 3 種類のタンパク質の複合体、すなわち、KaiABC 複合体の cryo-EM 構造が報告されてはいるが、KaiABC 複合体を形成する

KaiA ダイマーのN末ドメインが見えておらず（右図の赤○）、全体構造は依然として分かっていなかった。名古屋市・矢木教授らは、溶液中の KaiABC 複合体の SAXS 及び SANS プロファイルを取得し、既知の KaiA, KaiB, KaiC の結晶構造にもとづいて全体構造を構築しようとしたができなかった。そこで、複合体の構造解析の支援依頼があった。

我々は、cryo-EM で明らかにされた部分の構造（KaiA の N 末以外の構造）を固定し、KaiA の N 末ドメインを様々な位置・角度で配置することにより、2000 万個以上の KaiABC 複合体の構造モデルを生成し、その中から SAXS 及び SANS プロファイルを再現するモデル群を選び出した。SANS ではコントラスト変調法を使って複合体中の KaiA のみの散乱を測定できる。実際に SAXS データに合致する構造群は 3 タイプに分類されたが、さらに SANS データで評価することで、一つの構造群に絞り込むことができた（下図の type1）。最終的に絞り込んだ構造モデルに対し分子動力学シミュレーション計算を行い、長時間の間 SAXS 及び SANS プロファイルを再現する安定な構造を決定することができ（上図の右）、変異データと併せて、機能発現メカニズムに迫ることができた。この成果は、Communications Biology に 2022 年 1 月にアクセプトされ、プレス発表の準備をしている。



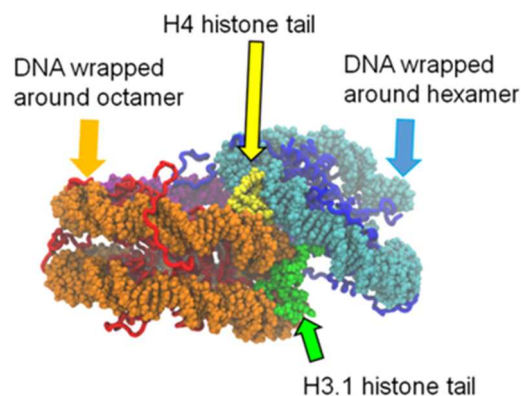
SANS χ^2 の分布（SAXS $\chi^2 < 10$ のモデルのみ）



Overlapping di-Nucleosome の溶液構造の決定支援とモデリング方法の高度化

京大杉山教授から、ヌクレオソーム 2 量体（Overlapping di-Nucleosome、ヒストン 6 量体とヒストン 8 量体の 2 つのヌクレオソーム、以下 OLDN）の溶液構造の決定の依頼を受けた。OLDN は転写開始点付近に存在していると考えられており、クロマチンのダイナミクスと転写の仕組みを明らかにするうえで重要である。依頼元では、OLDN の SAXS および SANS（X線および中性子小角散乱）プロファイルを測定しており、プロファイルに合致した原子モデル構築を支援した。OLDN の結晶構造から計算されるプロファイルは、溶液構造と合致しない。そこで、我々が開発した原子モデル構築手法を活用して、溶液での構造解析の支援を行った。

まず、OLDN 結晶構造のうち、DNA 部分に対して基準振動解析を行い、2 つのヌクレオソームをつなぐリンカー DNA を調和的に構造変形させた。そして、その DNA にヒストンコアタンパク質を伴わせることにより、100 万個以上の OLDN 構造モデルを生成した。そして、その中から散乱データを再現する構造を探したが、散乱データを再現する構造は見つからなかった。我々は、その原因が結晶構造にヒストンテール（構造決定ができない天然変性領域）が欠落していることにあることを突き止めた。そこで、焼きなまし MD 計算によりヒストンテールの構造群をあらかじめ用意し、OLDN がこのさまざまなヒストンテールを持つ構造体と考えた。この平均プロファイルを用いると、実験データに合致する構造が複数見つかった。さらに、構造モデルに対して分子動力学計算を行い、水溶液中で安定な構造を選び出した。溶液中で安定な構造では、プラスの電荷をもつテールが 2 つのヌクレオソームの間に介在し、DNA 同士の静電相互作用による反発を吸収して安定化していることが分かった（右図参照）。以上を Biophysical Journal 誌において発表し（2020 年）、支援を完了した。後日、電頭による OLDN が決定され、溶液構造とよく合致していたことが判明した。



自由エネルギー計算に基づくタンパク質構造安定性予測手法

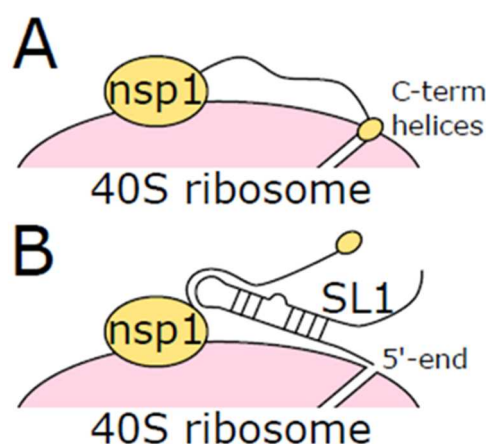
現在の高分子医薬品開発では、タンパク質のアミノ酸配列に変異を入れるなどして再設計し、タンパク質のリガンドや他タンパク質との結合能を向上させたりタンパク質自体の物性を安定化したりすることが重要な課題となりつつある。高度化では、自由エネルギー摂動法を用いてこの結合能・安定性変化を予測する手法を開発した。開発にあたり、(1) 計算プロトコルを工夫して可能な限り物理化学的な厳密性と数値的な安定性が維持されるようにすること、(2) 計算資源を効率良く利用しつつユーザーのインタラクションを最小限として最終的な計算結果を得ること、(3) GPU 等の現代的な計算システムに対応すること、の3つを重視して設計と開発を行った。本方法は、広く外部研究者等に提供するために、オープンソースソフトウェアとして github でソースコードを公開した。

また、本計算パイプラインの一部を用い、SARS-CoV-2 の構成タンパク質の一つである nonstructural protein 1 (nsp1) と RNA との結合様式を解析した。本研究では、nsp1 が宿主と Cov-2 の mRNA を選択的に認識し、Cov-2 の mRNA のみを翻訳させる仕組み、つまり、ウイルス増殖メカニズムの一端を解明した。解析の結果、nsp1 はリボソームの入り口をブロックすることで宿主の mRNA の翻訳を阻害する（右図上）が、コロナウイルスの mRNA に対してはブロックを解除し選択的にコロナウイルスのタンパク質を翻訳する（右図下）モデルを提唱した。その成果は PLoS Comp. Biol. 誌に発表した (Sakuraba *et al.*, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009804>)。

また、長崎大との共同研究により、ヒト免疫関連タンパク質の医薬応用の為の高活性化と安定化を行い、活性の高い変異体を発見し特許を出願した(特願 2021-019418)。

絶対結合自由エネルギー計算パイプラインの整備

絶対結合自由エネルギーとはリガンドとタンパク質の結合自由エネルギーである。似たような結合モードを持つリガンド同士の相対的な結合の強弱は、絶対結合自由エネルギーが分からなくても結合自由エネルギーの差として計算することができる。しかし、新規のリガンドとの結合を評価するためには、絶対結合自由エネルギー計算が必要不可欠で、精度の良い計算を行うためには様々な物理化学的な補正を加える必要がある。我々は、計算方法をパイプライン化することで、並列処理により高速かつ精度よく絶対自由エネルギーを計算する方法を開発している。計算コストの軽い、多くの場合インフォマティクスにもとづく評価関数にもとづくドッキングシミュレーションによって得られたタンパク質-リガンドの結合構造は、ほぼ決まって不安定な構造と不正確な結合自由エネルギーを含むため、「次」のフェーズとしての本計算は重要である。2020 年度は COVID-19 への対応要請に応え、ドラッグリポジショニングを念頭にタンパク質-リガンド間の結合安定性を予測するパイプラインを作成し、パイプラインの検証と SARS-CoV-2 タンパク質とリガンド間の結合構造予測ならびに結合安定性予測を行った。本パイプラインを用いた成果として、SARS-CoV-2 ならびに SARS-CoV-2 と同じ β コロナウイルスに属する MERS-CoV の nsp15 タンパク質と、SARS-CoV-2 治療薬の一つとして用いられている ciclesonide との結合様式を解析し、preprint を公開した (Sakuraba *et al.*, doi:10.26434/chemrxiv.13602731.v1)。

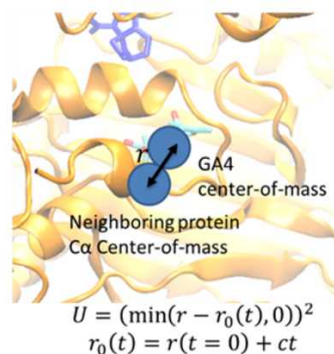


In this project, we provided our expertise in molecular modeling, molecular conformation sampling, and sophisticated free energy calculation method to support both wet and dry researchers and analyzed their molecules of interest. We emphasize that out of 26 supports, 3D structures of the target molecules were not known in the 21 collaborations. In the remaining five collaborations, we analyzed the molecular mechanism with molecular modeling and simulation based on the structure the collaborators determined. Here, we briefly report two topics out of the 26 supports.

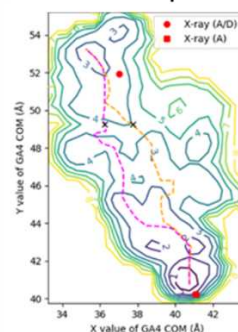
Analysis of a plant hormone, gibberellin, oxidation enzyme and our method improvement

A proper concentration of a plant hormone, gibberellin, is metabolically maintained in cells. The crystal structure of one of the key molecules, an oxidation enzyme was determined by Ueguchi et al., Nagoya Univ. Unfortunately, the essential Fe^{2+} ion for the function was not ligated in the crystal structure. So, we first determined the ion position with QM calculation. Next, we carried out molecular dynamics (MD) simulation and investigated the dynamics and gibberellin elimination path with free energy calculation (right figure). Our MD simulation and mutation

Path search of gibberellin



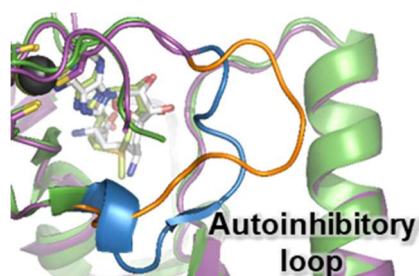
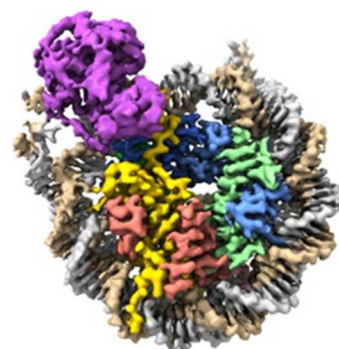
Energy landscape for the path



experiments revealed that the enzyme regulates the metabolic speed of gibberellin to auxin by changing the oligomerization states. This result was published in Nature Communications in 2020 and was press-showed.

Analysis of NSD2 methylase and nucleosome complex structure and the mechanics

Dimethylation of histone H3 Lys36 (H3K36me2) regulates gene expression by antagonizing the repressive effect of polycomb group proteins. Aberrant H3K36me2 upregulation, either by overexpression or point mutations of NSD2, an H3K36 dimethyltransferase, causes cancers. To understand how NSD2 methylates H3K36 and how its oncogenic point mutants aberrantly activate, here we report the cryo-EM structure of the catalytic fragment of NSD2 bound to nucleosome at 2.8 Å resolution (right figure, NSD2 shown in purple). The nucleosomal DNA is partially unwrapped, facilitating the NSD2 access to H3K36. NSD2 interacts with DNA and H2A in addition to H3, consistent with its robust and specific activity toward nucleosomal H3K36. Based on the determined structure, we carried out MD simulation to understand why E1099K and T1150A mutations uptake methylation. We found that the autoinhibitory loop, conserved among the NSD proteins, changes its conformation upon nucleosome binding to accommodate H3 on



its substrate-binding cleft. The two oncogenic mutations both are experimentally shown to increase the catalytic turnover. Our MD simulations suggest that both mutations change the dynamics of the autoinhibitory loop to adopt open conformations more often for the N-terminal tail of H3 and stabilize the H3 bound form cooperatively with the first α -helix of H3, the C-terminal region of H2A, and the DNA at two locations (superhelical location -1 and linker DNA position). However, the

way to change the dynamics of the autoinhibitory loop was different. E1099K changes the hydrogen bond network around the loop while T1150A changes the hydrophobic interaction. The results were published in Nature Communications in 2021 and were press-showed.