

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：分子動力学計算による各種構造生物学データを活用した生体分子構造機能解析
3. 研究開発代表者：横浜市立大学大学院生命医科学研究科 教授 池口満徳
4. 研究開発の成果

本研究は、支援研究と高度化研究からなるので、それぞれについて研究成果を記述した。

### 支援

#### 「多剤排出トランスポーターAcrB の Motion Tree 法による機能解析」

多剤排出トランスポーターは、社会問題となっている種々の病原菌の薬剤耐性化の主要因であり、その機能発現機構の解明は創薬の観点からも重要である。最近、本グループの木寺、同じくバイオインフォマティクス領域の太田らにより開発された Motion Tree 法を活用し、AcrB のタンパク質の構造変化を階層的に解析する研究を行った。さらに、統計力学を用いて水の分布を計算する 3D-RISM 法を適用し、AcrB のエネルギー源であるプロトン透過のメカニズムを解析した。先に実施した分子動力学シミュレーションの支援結果と併せて、プロトン透過から、タンパク質の構造変化、薬剤の排出に至る AcrB の機能発現メカニズムの全体のモデルを提案することができた。

#### 「膜超分子モーターの相関構造解析による分子メカニズムの解明」

V-ATPase は、骨粗鬆症やがん転移などの疾病と関係しており、重要な創薬ターゲットとして知られている膜超分子モーターである。その回転機構を明らかにするため、全原子モデルに加え、粗視化モデルでの計算も実施し、マルチスケールモデルを用いた機能メカニズム解明を行った。全原子モデルで計算したタンパク質の揺らぎデータを反映するように、粗視化モデルのパラメータを調整し、粗視化モデルでは、軸の回転運動のシミュレーションを行うことに成功した。その回転運動の様子を観察することにより、単純に構造をつなぐのでは得られない、回転過程の中間状態を発見することができた。

#### 「相同組換えに機能する活性型のリコンビナーゼの構造機能解析」

DNA 相同組換えは、家族性乳ガンやワーナー症候群、ダウン症などの多様な病気発症と密接な関係があり、その機構解明は医学的にも極めて重要である。DNA 相同組換えで中心的役割を果たすリコンビナーゼの活性型フィラメント構造について、ホモロジーモデリングと分子動力学シミュレーションを用いて構造予測し、各種実験結果により検証した。

#### 「DNA/RNA ポリメラーゼと逆方向に RNA 伸長酵素と tRNA 複合体の溶液構造解析」

生体内で 5'-3' 方向への DNA/RNA の合成は、細胞が生命を維持するために必須な反応である一方、細胞に重大な問題を引き起こしている。例えば、ショートニングあるいは直鎖状染色体の「老化」は細胞老化を誘発し、様々な加齢に関連する疾病につながっている。よって、逆方向 3'-5' へ伸長する酵素の欠如を補うための仕組みが細胞内で存在しているが、それを担うのが今回の対象蛋白質である。当研究室が有する MD-SAXS 技術を用いて、MD と SAXS の連携による RNA 結合酵素の溶液構造解析を行ったところ、tRNA と本酵素の複合体の溶液構造を提案することができた。

#### 「リガンド結合が及ぼす VDR の構造変化に関する研究」

核内受容体は、ステロイド、サイロイドホルモン、ビタミン D など、様々なリガンドが結合することで立体構造変化が起き、遺伝子転写を制御する転写因子である。ビタミン D 受容体について非結合構造やある種のリガンド結合構造は未だ未解明であり、立体構造に基づく機能メカニズムの理解に限界があった。そこで、MD-SAXS 法を用いて解析を行ったところ、非結合構造、リガンド結合構造を得ることができた。

#### 「腸管病原細菌に対する新たな分子標的治療薬の開発」

赤痢菌は、感染に際してエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞に分泌し、宿主の持つ防御機構を妨げることで感染を拡大することが知られている。そのエフェクターのうち、赤痢菌の E3 ユビキチンリガーゼは、宿主のユビキチン修飾径路を利用することにより、感染の拡大に寄与している。E3 タンパク質について MD-SAXS 法による解析を行ったところ、SAXS 実験と整合した構造モデルを得ること

ができた。

#### 「枯草菌ストレス応答蛋白質 RsbP 全長構造の MD-SAXS 解析」

微生物に普遍的なストレス応答機構は、環境適応における細胞増殖・代謝の抑制のみならず、病原性発現や二次代謝物生産に関わる機構である。本課題の対象である RsbP は、枯草菌においてエネルギーストレスを感受して、ストレス応答シグマ因子を活性化するストレス応答機構で機能している蛋白質である。RsbP は、部分構造のみ結晶構造で明らかになっているが、全長構造が未解明であったため、MD-SAXS 法による全長構造のモデリングを行った。その結果、SAXS 実験にかなり整合する構造モデルを作ることができた。

#### 「ヘテロクロマチン形成因子 HP1 クロモドメインのヒストンテイル認識機構」

Heterochromatin Protein-1 (HP1)は、ヒストン H3 テイルのメチル化リジン(H3K9me)を特異的に認識して結合することによって、ヘテロクロマチンの形成に寄与している。HP1 クロモドメインの N 末端にある連続したセリン4 残基のリン酸化が結合を安定化するということが明らかになったが、この箇所は天然変性領域であり、決まった構造を持たない。そこで、全原子 MD 計算を実施することで、N 末端天然変性領域のリン酸化セリンとヒストンテイルの非特異的静電相互作用が観察され、その相互作用が結合を強化していることが明らかとなった。

#### 「ABC 多剤排出トランスポーターの分子動力学計算」

P-glycoprotein は、ヒトの細胞膜上に局在し、多様な化合物を細胞外に排出する ABC トランスポーターで、創薬の ADMET において重要な膜タンパク質であるが、その動作メカニズムを解明するため、類縁タンパク質の大規模 MD 計算による解析を行った。その結果、薬剤を入れた MD 計算において、薬剤の挿入が分子全体の構造ゆらぎを数倍に拡大したことが観察され、薬剤輸送機構の理解を進展させることができた。

#### 「ジストログリカン糖鎖修飾酵素の立体構造解析」

筋ジストロフィー症に関わるジストログリカン糖鎖修飾酵素について、生産領域・解析領域において、結晶化スクリーニングを行い、X 線結晶構造解析に成功したが、真の基質については現時点では合成が不可能であり、複合体の構造解析ができないという問題があった。そこで、分子モデリングの方法を用いて、コンピュータ上で構造モデルを構築する研究を行った。複合体構造モデルを構築したところ、機能モデルとよく整合する立体構造を得ることができた。

### ・高度化

我々が開発している生体系分子シミュレーションソフトウェア MARBLE を軸として、高度化を行った。スーパーコンピュータ「京」などの超並列計算機の上での計算効率アップを図るとともに、構造生物学の実験データを活用した分子シミュレーションの方法開発を行った。具体的には、生産領域の横浜市大西村グループと連携して、エピゲノムなど高等生物の遺伝子の発現機構に重要な役割を果たしているヒストン多量体について、NMR の化学シフト等の実験結と分子シミュレーションを連携させ、実験データと合致する構造モデリングを行う方法を開発した。X 線小角散乱実験 (SAXS) との連携においては、様々な研究者が使いやすいようにソフトウェアを整備すると共に、大規模な構造変化のある場合に対応するために、粗視化 MD-SAXS の開発も実施した。さらに、分子シミュレーション技術の産業界への実用化に向けて、製薬企業である第一三共 RD ノバーレと共同研究を行い、創薬で大きな役割を果たす、薬剤の結合自由エネルギーの高精度計算を目標とし、新たな溶媒と自由エネルギー計算法の開発、構造エントロピー計算法の開発も行った。さらに、スパコン「京」など、多数の CPU コアがある汎用スパコンの特性を活かした計算法として、多数の個別の MD 計算を統合する計算法である、マルコフ状態遷移モデルによる長時間ダイナミクス計算法などを開発した。本ソフトウェア MARBLE については、インターネットを通じ、広く一般に公開した。