

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

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）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：(日本語) タンパク質の複合体構造・相互作用に関する総合的な予測・解析の実施と
高度化 (X線小角散乱から得られる情報の相関解析)
(英語) Prediction and analysis of protein interactions and protein complex
structures (Correlation analyses of information from Small Angle X-ray
Scattering)

補助事業担当者 (日本語) 東京薬科大学 生命科学部 教授 小島正樹
所属 役職 氏名： (英語) Masaki Kojima, Professor, School of Life Science,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

谷佳津子教授（東京薬科大学生命科学部）らのグループとともに、Abl interactor ファミリータンパク質 (Abi) の構造・機能相関の解析を行い、Abi-3 がその他のファミリーと作用機作が異なることを見出した。Abi は、チロシンキナーゼ c-Abl と相互作用してがんの転移を促進するが、Abi-3 は他の Abi ファミリーと作用機作が異なることが示唆されていた。このため、Abi-1 と Abi-3 の立体構造を予測し、さらに Abi の結合タンパク質である WASP との複合体モデルを構築したところ、Abi-1 と Abi-3 ではその立体構造が一部異なり、WASP との結合に差を生み出していることが見出された。

川上浩教授（共立女子大学家政学部）、田之倉優教授（東京大学 大学院農学生命科学研究科）らのグループとともに、鉄・ラクトフェリン複合体の会合状態の解析を X 線小角度散乱 (SAXS) 法を用いて、解析拠点解析領域である高エネルギー加速器研究機構に支援を依頼して行った。生乳中に含まれるラクトフェリン (LF) は、70 当量の鉄イオンを配位することが知られており、鉄欠乏症に対する食品開発

への応用が期待されている。SAXS 解析の結果、ラクトフェリンは鉄イオンを介して 15 量体に会合すること、また会合過程の pH 依存性より、会合には溶液中の重炭酸イオンが関与することが示唆された。

大野尚仁教授、石橋健一講師（東京薬科大学薬学部）、田代充教授（明星大学理工学部）らのグループとともに、アガリクス由来 β グルカンの構造解析を行った。*Agaricus* キノコから抽出される β グルカンは、免疫賦活作用を介して種々の生理活性を有している。その一次構造を NMR および質量分析により分析し、水溶液中の立体構造を分子動力学 (MD) シミュレーションで予測したところ、平衡状態においてらせん構造を形成していることが見出された。さらにレクチン受容体の複合体構造を構築したところ、らせん構造をとっているときに正しく結合することが示唆された。

制御拠点合成領域の藤川雄太助教（東京薬科大学生命科学部）らのグループとともに、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) に特異的に結合する蛍光プローブのデザインを行った。GST 活性検出のための有効なプローブ分子をデザインし、その結合活性値をドッキングシミュレーションによる複合体予測および 3 次元定量的構造活性相関 (3D-QSAR) の方法を用いて予測した。

増田誠司教授（京都大学大学院生命科学研究所）らのグループとともに、選択的 mRNA 核外輸送に機能する UAP56 ならびに URH49 の立体構造・複合体選択的 mRNA 輸送能の相関解析を、解析拠点解析領域である理化学研究所 (SPRING-8) と共同で行った。

SAXS と他の構造情報を組み合わせて、束縛条件付き MD 計算を行うことにより、全ての入力情報を満足するタンパク質の立体構造を系統的かつ合理的に構築するアルゴリズムを開発し、SAXS_MD プログラムとして実装した。この SAXS_MD プログラムを、種々のフォールドクラスに属する 9 個のタンパク質に対して適用して、SAXS データと NMR の二次構造情報から、タンパク質の立体構造をアミノ酸残基レベルの精度で決定することに成功した。また SAXS_MD プログラムを希望者が利用できるようにホームページに公開した。

SAXS データから *ab initio* 計算により得られたビーズモデルに対し、グラフ理論のアルゴリズムを用いて、主鎖候補をトレースするプログラムを作成してホームページに公開した。この TraceBeads プログラムを、タンパク質の結晶構造を粗視化したビーズモデルに対して適用したところ、70 例の全てのトレースに成功した。

タンパク質の X 線広角散乱 (WAXS) データから、二次構造情報を抽出して解析したところ、 α ヘリックスに関しては WAXS プロファイルと二次構造情報との間に強い相関が見出された。また真空紫外円偏光二色性 (VUV-CD) データから得られたアミノ酸残基レベルの二次構造情報を束縛条件とする MD 計算法を実装した。

英文

Abl interactor (Abi) family proteins play significant roles in actin cytoskeleton organization through forming the WAVE complex. It has been shown that Abi-3 is present in the WAVE2 complex, but neither binds to c-Abl nor promotes c-Abl-mediated phosphorylation of WAVE2. Here we characterized Abi-3 in more detail, and compared its properties with those of Abi-1. The modeling results demonstrated that the structures of the SH3 and WAB domains were quite similar in the two proteins, suggesting that the structural difference between Abi-1 and Abi-3 is mainly due to the region between the WAB domain and the SH3 domain.

Bovine lactoferrin (bLf) from bovine milk exhibits anti-microbial, anti-cancer and iron binding

functions, which could be a new antianemic edible material. We measured bLf in the presence of 70 mol ferric ions (70FeLf) at pH 1-6 by small angle X-ray scattering (SAXS). The results indicated that 70FeLf in this pH range maintained a globular shape and formed association with ca. 15 monomers. The degree of polymerization in 70FeLf showed pH-dependent.

β -glucan derived from fungus *Agaricus brasiliensis* exhibits anti-cancer activity through immunoenhancing. Its structural details, however, were unclear. Here we first analyzed primary structure of β -glucan by NMR and Mass spectroscopy. Based on the results, we performed molecular dynamics (MD) simulation in solution and predicted conformation ensemble, which indicated that the helical structure was favorable in equilibrium state. Next we constructed the structure model complexed with lectin receptor.

We designed effective fluorescent probe against glutathione-S-transferase (GST) by structure-based drug design (SBDD) and stopped-flow binding experiments. We first constructed complex structure of GST and its ligand candidate by docking simulation, and predicted the binding activity by energy calculation. We also analyzed 3D-QSAR(Quantitative Structure-Activity Relationship) in order to select appropriate candidates.

Combining SAXS with other structural methods, we developed a novel restrained-MD algorithm for with SAXS restraints, and implemented as in-house SAXS_MD program. Using this program, we succeeded in constructing the three dimensional structure of 9 proteins with various folds as accurate as at amino acid residue level (RMSD of ca. 3 Å). We published our SAXS_MD program freely downloadable on the web.

We applied graph theory in applied mathematics to coarse-grained model with bead-ensemble structure, so as to successfully detect the appropriate primary structure by tracing main chain candidate. We also published this TraceBeads program on the web.

We analyzed secondary structural information from wide angle X-ray scattering (WAXS) of proteins, and found strong correlation between helical structure and WAXS profile. We also developed amino acid residue-based structural constraints from vacuum-ultraviolet circular dichroism (VUV-CD), and implemented them into SAXS_MD program.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 3件)

1. Morimoto, Y., Nakagawa, T., Kojima, M. Small-angle X-ray scattering constraints and local geometry like secondary structures can construct a coarse-grained protein model at amino acid residue resolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, **431**, 65-69.
2. Sekino, S., Kashiwagi, Y., Kanazawa, H., Takada, K., Baba, T., Sato, S., Inoue, H., Kojima, M., Tani, K. The NESH/Abi-3-based WAVE2 complex is functionally distinct from the Abi-1 based WAVE2 complex. *Cell Communication and Signalling* 2015, **13**, 41.

3. Nishii, W., Kukimoto-Niino, M., Terada, T., Shirouzu, M., Muramatsu, T., Kojima, M., Kihara, H., Yokoyama, S., A redox switch shapes the Lon protease exit pore to facultatively regulate proteolysis. *Nature Chemical Biology* 2015, **11**, 46-51.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Computational analysis of protein structure by small-angle X-ray scattering, ポスター, Yasumasa Morimoto, Kodai Inoue, Toshitaka Syoji, Masaki Kojima, The 4th International Symposium on Slow Dynamics in Complex Systems, 2012/12, 国内
2. X線溶液散乱法を用いたタンパク質の立体構造予測とバイオインフォマティクスへの応用, 口頭, 小島正樹, 東京大学大学院アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニットセミナー, 2012/12, 国内
3. タンパク質 X線溶液散乱の最新の解析, 口頭, 小島正樹, 高エネルギー加速器研究機構第1回タンパク質 X線溶液散乱講習会, 2013/5, 国内
4. X線溶液散乱法によるタンパク質立体構造の構築と可視化, ポスター, 東海林暁貴, 森本康幹, 小島正樹, 日本バイオイメージング学会第22回学術集会, 2013/9, 国内
5. Computational analyses of protein structures by small angle X-ray scattering, 口頭, Masaki Kojima, Yasumasa Morimoto, Takashi Nakagawa, 日本生物物理学会第51回年会, 2013/10, 国内
6. Small-angle X-ray scattering and secondary-structural information can construct a coarse-grained residue-based protein model, ポスター, Yasumasa Morimoto, Masaki Kojima, 日本生物物理学会第51回年会, 2013/10, 国内
7. X線溶液散乱とバイオインフォマティクスによるタンパク質の立体構造予測, 口頭, 小島正樹, 第2回 Neutrons in Biology, 2014/3, 国内
8. X線溶液散乱法によるタンパク質の立体構造予測とバイオインフォマティクス, 口頭, 小島正樹, ワークショップ「標的タンパク質の構造と機能予測による創薬の開発」, 2015/6, 国内
9. Abl-Abi 複合体の構造モデリング, ポスター, 鈴木貴裕, 清野翔平, 加藤有介, 谷佳津子, 小島正樹, 日本バイオイメージング学会第24回学術集会, 2015/9, 国内
10. Construction of Protein Structure by Small-Angle X-ray Scattering Constraints and Secondary Structural Information, 口頭, Masaki Kojima, Yasumasa Morimoto, Takayuki Ichioka, 第53回日本生物物理学会年会, 2015/9, 国内
11. 抗貧血薬候補ウシラクトフェリンの鉄イオン会合機構, ポスター, 松村義隆, 山口智大, 清野翔平, 川上浩, 田之倉優, 小島正樹, 2015年度量子ビームサイエンスフェスタ(第7回 MLF シンポジウム/第33回 PF シンポジウム), 2016/3, 国内
12. X線溶液散乱法を用いたタンパク質の立体構造予測とバイオインフォマティクス, ポスター, 松村義隆, 市岡隆幸, 小島正樹, PF 研究会「徹底討論! 小角散乱の魅力~基礎・応用・産業利用」, 2016/3, 国内
13. 抗貧血薬候補ウシラクトフェリンの酸性 pH から中性 pH の会合機構 (Multiferric ion-induced bovine lactoferrin as a new antianemic material assembly from acidic to neutral pH),

- ポスター, 松村義隆, 山口智大, 清野翔平, 川上浩, 田之倉優, 小島正樹, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016/6, 国内
14. AMBERによるアガリクス由来 β -1,6グルカンの全原子分子動力学シミュレーション, ポスター, 松村義隆, 森本康幹, 出村茉莉子, 墨野倉誠, 久保美香子, 井上広大, 大野尚仁, 田代充, 小島正樹, 創薬懇話会 2016 in 蓼科, 2016/6, 国内
 15. All atom molecular dynamics simulations by AMBER of *Agaricus brasiliensis*-derived β -glucan, 口頭, Yoshitaka Matsumura, Yasumasa Morimoto, Mariko Demura, Makoto Suminokura, Mikako Kubo, Kodai Inoue, Naohiro Ohno, Mitsuru Tashiro and Masaki Kojima, 日本バイオイメージング学会第25回学術集会, 2016/9, 国内
 16. Ribonuclease T₁のアミノ酸残基レベルの粗視化構造の分子動力学シミュレーションによる構造精密化, ポスター, 市岡隆幸, 森本康幹, 松村義隆, 小島正樹, 日本バイオイメージング学会第25回学術集会, 2016/9, 国内
 17. Conformational analysis of β -glucans from *Agaricus brasiliensis* revealed by molecular dynamics in solution, ポスター, Yoshitaka Matsumura, Kodai Inoue, Makoto Suminokura, Mikako Kubo, Mariko Demura, Takayuki Ichioka, Yasumasa Morimoto, Mitsuru Tashiro, Ken-ichi Ishibashi, Naohito Ohno, Masaki Kojima, 第54回日本生物物理学会年会, 2016/11, 国内
 18. X線溶液散乱法によるタンパク質の立体構造予測とバイオインフォマティクス, 口頭, 小島正樹, 次世代酵素学研究セミナー, 2017/3, 国内
 19. 抗貧血薬候補鉄配位ウシラクトフェリンの pH 依存による会合機構 (pH-dependent assembly mechanism of multiferric ion-bovine lactoferrin: A new antianemic material), ポスター, 松村義隆, 山口智大, 清野翔平, 川上浩, 田之倉優, 小島正樹, 量子ビームサイエンスフェスタ, 第34回PFシンポジウム, 第8回MLFシンポジウム, 2017/3, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし