



Title	多次元仮想座標とカップルした分子動力学法を用いた mSin3複合体の立体構造探索
Author(s)	速水, 智教
Citation	サイバーメディアHPCジャーナル. 2021, 10, p. 41- 44
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/83287
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

多次元仮想座標とカップルした分子動力学法を用いた mSin3 複合体の立体構造探索

速水 智教

大阪大学大学院 生命機能研究科 生命機能専攻

1. はじめに

タンパク質-リガンド、タンパク質-タンパク質、およびタンパク質-DNA 間の相互作用、あるいはタンパク質のフォールディング過程などに対して計算機シミュレーションを用いてその詳細を研究することは、生体分子の関わる現象を明らかにする上で非常に重要である。それゆえ、様々な分子動力学(MD)シミュレーション手法が開発されてきた。

本研究は、我々の研究グループが新規に開発した Multidimensional Virtual-system coupled canonical MD (mD-VcMD)を用いて、重要な神経疾患に関与するコリプレッサー mSin3B とそれに結合する薬剤候補分子との相互作用を明らかにしようとするものである。

2. mSin3B PAH1 ドメインについて

Neural restrictive silencer factor / RE1-silencing transcription factor (NRSF/REST)は、DNA 上のサイレンサーに結合し神経特異的な遺伝子の発現を抑制するタンパク質である。NRSF/REST の N 末端領域はコリプレッサー mSin3 の Paired Amphipathic Helix 1 (PAH1) ドメインに結合し、histone deacetylase enzyme (HDAC)をリクルートする。mSin3 には結合相手のそれぞれ異なる 4 つの PAH ドメインおよび HDAC 相互作用ドメイン(HID)が含まれる。哺乳類の mSin3 には mSin3A と mSin3B の 2 つのアイソフォームが存在し、機能に若干の違いがある。Nomura らは、NMR を用いてマウスの NRSF/REST および mSin3B PAH1 複合体の立体構造を明らかにした (PDBID : 2CZY) [1]。マウスの mSin3B には PAH ドメインが 3 つ存在し、このうち NRSF/REST と結合する mSin3B PAH1 ドメインと NRSF/REST の複合体構造を図 1 に示す。mSin3B PAH1 ドメインは、4 つの両親媒性のヘリックスバンドルから成る。これらのヘリックスをこれ以降、N 末端側から順に H1、H2、H3、H4 と呼称す

る。また、NRSF/REST の N 末端側転写抑制ドメインは、非結合時では天然変性状態にあるが、mSin3B のクレフトに接近するとヘリックスを形成して mSin3B に結合する。この NRSF/REST のヘリックスは疎水性残基を多く含むアミノ酸配列をもち、また mSin3B PAH1 ドメイン側の結合クレフトも疎水性残基を多く含む。したがって、これらは疎水性相互作用によって結合し安定化している[2]。

3. 計算に使用した系

mSin3B と NRSF/REST 間の疎水性結合を阻害する化合物はダウン症、ハンチントン病、髄芽種、心筋ミオパチー、神経因性疼痛などの神経疾患に対する新規薬剤発見の重要なターゲットとなりうる[3,4]。

Fukunishi らは、in-silico スクリーニングによって NRSF/REST と mSin3B との結合を阻害する多数の化合物の候補を探索した。Nishimura らはこれらの候補分子に対して NMR 等の実験を行い mSin3B との相互作用を調査した。Chemical Shift Perturbation (CSP) の結果から候補分子中最も相互作用の強かった Acitretin を本研究のターゲットとし、シミュレーシ

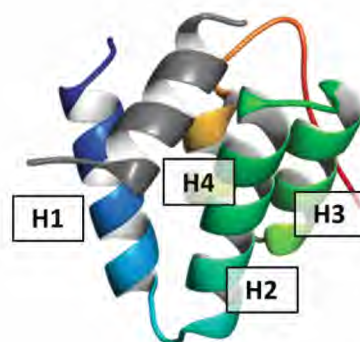


図 1 : NMR で解かれた NRSF/REST と mSin3B PAH1 ドメインとの複合体立体構造。NRSF/REST (グレー) が mSin3B (レインボー) の H1 と H2 の間にあるクレフトに結合している。

ョンを実施した。

本研究では mSin3B PAH1 ドメインとその前後の 74 の残基を使用する。アミノ酸の配列で表すと、Ace-PVHVE DALTY LDQVK IRFGS DPATY NGFLE IMKEF KSQSI DTPGV IRRVS QLFHE HPDLI VGFNA FLPLG YRID-NH₂ である。先頭の Ace と末尾の NH₂ は電荷を中和するキャップで Acetyl 基と NH₂ 基を意味する。この配列は mSin3B (UniProt ID : Q62141) 全体の 31 番から 104 番に該当する。

Acitretin と mSin3B PAH1 ドメインを含む系を、1 辺約 70Å の立方体の周期境界条件で作成した。溶媒として水分子と Na⁺および Cl⁻イオンを付加した。イオンは生理食塩水濃度になるように調節し、Na⁺を 29 個、Cl⁻を 29 個付加している。この結果、全体では 33,525 原子になった。平衡化のために NVT と NPT をそれぞれ 20.1 ps と 1.5 ns だけ行い、結果周期境界の 1 辺の長さは 68.90856 Å に変化した。タンパク質の力場は Amber-based hybrid force field ($\omega = 0.8$) を使用し、水分子は TIP3P を使用した。Acitretin の力場に関しては QM 計算をもとに作られたパラメータを使用した。平衡化のための計算にあたっては psygene-G を使用し、中心となる 3D-VcMD 計算は omegagene を使用した。

4. mD-VcMD について

一般的なカノニカル MD では、系がポテンシャルエネルギーの局所的な安定状態に捉えられやすく、実用的な計算時間内のシミュレーション結果から統計集団としての解析を行うには困難があった。そこで、マルチカノニカル MD 法、アンブレラサンプリング法、レプリカ交換法などの手法が開発されてきた。

本研究で用いる mD-VcMD 法[8]は、全原子モデルの系と相互作用する仮想的な状態変数から成る系、すなわち virtual system を導入する点に特徴がある。この virtual system を使用する手法は、Higo らによって V-McMD 法[5]、V-AUS 法[6]としてマルチカノニカル法やアンブレラサンプリング法の一に適用されてきた。

VcMD 法[7]は特定の反応座標空間をいくつかの

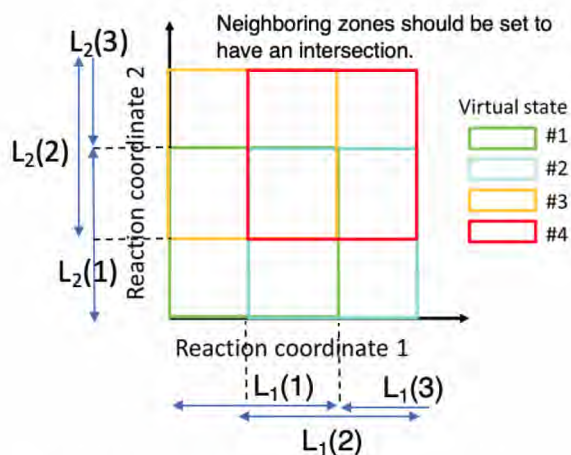


図 2 : 2D-VcMD における virtual system のイメージ。各 virtual state の重なり合う部分で virtual state 間の遷移が起こるが、実際の全原子モデルの運動状態は維持したままである。

領域に分割し、それらの領域に仮想的な系を成す状態変数 L の値を割り当てる（ここではそれを virtual state と呼称する）。ただし、隣り合う状態変数 L は実際の全原子モデルにおける反応座標においては重なり合いを持つ。シミュレーション中にこれらの virtual state 間をランダムウォークするという点ではレプリカ交換法に類似するが、VcMD 法では全ての virtual state で同じ温度のカノニカル MD が見かけ上行われている点が異なる。VcMD を通して最終的に virtual state 同士の相対的な存在比が求められ、それが熱力学的な重みに一致する。詳しくはこれらの論文を参照されたい。

V-AUS 法や VcMD 法はタンパク質の立体構造に関するパラメータを反応座標として使用している。本研究で使用した mD-VcMD 法は、図 2 のように複数の反応座標とそれに対応する仮想系の変数を導入し、VcMD 法を多次元に拡張したものである。

本研究では、図 3 に示すとおり 3 つの反応座標を導入した。反応座標を決めるにあたって、まず Acitretin と mSin3B を構成する幾つかの原子の集まりを合計で 6 つのグループにまとめている。反応座標はこれらのグループの重心間距離として定義される。第 1 反応座標 λ_1 から第 3 反応座標 λ_3 までを図 3 上の点線で示した。

λ_1 は mSin3B の表面上にある NRSF 結合部位（クレフト）の開閉に対応し、 λ_2 と λ_3 はいずれも Acitretin

と mSin3B 間の距離に対応する。Acitretin は直線的な構造をしているので、 λ_2 と λ_3 は Acitretin の head 部分（六員環部分）と tail 部分（六員環の反対）それぞれと mSin3B 間との距離に対応し、Acitretin の head 部分と tail 部分の向きを反応座標上で区別するために指定した。

本研究では 3 つの反応座標を導入したので、以下 mD-VcMD を 3D-VcMD と呼ぶことにする。

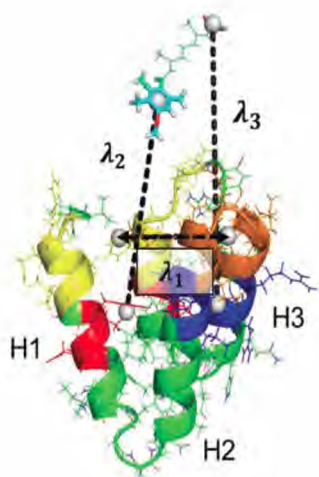


図 3 : Acitretin と mSin3B を含む系における第 1 から第 3 までの反応座標 λ_1 - λ_3 。白い sphere は各グループの重心の位置を示す。これらの重心を結ぶ点線が反応座標である。mSin3B 上のグループは黄、赤、橙、青で色分けされている。

5. 結果

Acitretin-mSin3B 複合体で 3D-VcMD を用いてサンプリングした結果、図 4 のように $(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3)$ で張られた 3 次元空間上の自由エネルギー地形が得られる。

この結果から、空間内で最も自由エネルギーの低い領域は、 λ_1 が 12~14 Å、 λ_2 と λ_3 が 10~15 Å の付近に存在していることがわかった。この領域は図 4 の赤い線で示した球状領域にある。準備的に行った mSin3B の Apo 体でのカノニカルシミュレーションでは平衡化後に λ_1 の値は 13.1 Å となり、これは複合体の最安定領域の値と一致する。したがって、Acitretin が存在するかしないかに関わらず、mSin3B はクレフトを閉じた状態が最も安定な立体構造であることがわかる。他方、NRSF-mSin3B 複合体の NMR 構造 (PDBID : 2CZY) を用いて λ_1 を計算すると 16.1

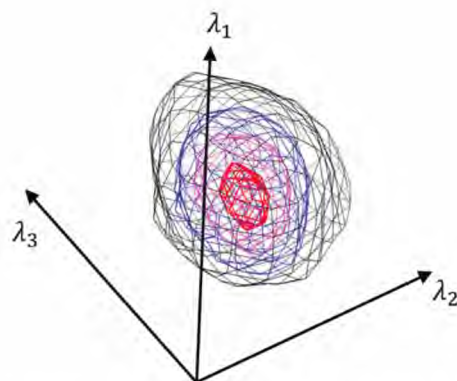


図 4: Acitretin-mSin3B 複合体の 3 次元自由エネルギー地形。黒、青、ピンク、赤の等密度線の順で自由エネルギーが低くなっていく。

Å であるが、NRSF は Acitretin よりもかなり大きな分子なので λ_1 の値が大きくなったと推測できる。

図 5 は、H1-H4 のヘリックスの軸と直交する面に対し mSin3B の N 末端側から見た図である。図 5 の黒い等密度線で囲まれた領域は、mSin3B 周辺での Acitretin 分子の重心位置の分布から、Acitretin 分子の存在比 ρ が高かった領域を示している。この存在比 ρ は、3D-VcMD で得られた構造サンプルに対しそれぞれ Acitretin の重心位置を計算し、空間上のボクセルごとに熱力学的重み付き平均をして算出した。

黒色の等密度線で示した存在比の高い Acitretin の領域が mSin3B の周辺にいくつか存在している。これらの領域を以後クラスタと呼称する。図 5 で示すように、H3-H4 が作る平面の溶媒側と、H1-H2 が作る平面の溶媒側に存在比が高く大きな容積のクラスタが存在する。また、H1-H2 間のクレフト、H3-H4 間のクレフト、H4-H1 間のクレフトにも少し小さめのクラスタが計 3 個存在している。H1-H2 間のクラスタを Cluster A、H3-H4 間のクラスタを Cluster B、H4-H1 間のクラスタを Cluster C、および H3-H4 の溶媒側の最も大きなクラスタを Cluster D と以後それぞれ呼称する。NRSF/REST の結合を阻害する位置にあるのは、Cluster A-C の 3 つのクラスタである。

CSP との比較によると、これらのクラスタは Chemical Shift 変化の大きかった mSin3B の残基周辺に存在している。したがって、3D-VcMD の結果は実験結果とも符合している。

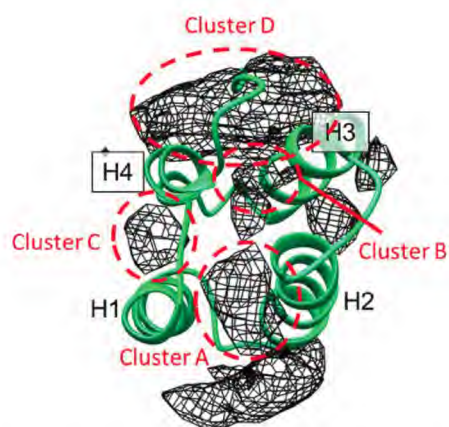


図 5 : mSin3B 近傍における存在比の高い Acitretin の重心の分布。いくつかのクラスタを形成している。

図 6A-B は mSin3B 周辺での Acitretin の向きに関する情報（平均的分子配向）を表している。Acitretin の直線的な構造を利用して、図 6 の矢印はいずれも Acitretin の head(六員環)から tail(六員環の反対側)へ向かう方向を示している。ただし、各矢印はその起点にあるボクセルに含まれる $\rho = 0.01$ 以上の Acitretin の構造を、熱力学的な重みで平均化した形で示している。矢印が長いほど、その方向を向く傾向が強いことを示している。この結果から、クラスタごとに異なる配向性をもつことがわかる。図 6A の赤い矢印と紫の矢印でそれぞれ示している Site A と Site B は、いずれも NRSF の結合部位に近い Cluster A に位置しているが配向は異なっている。したがって、Acitretin が NRSF の結合部位と相互作用する場合には、複数の結合モードが存在すると考えられる。

6. 終わりに

Acitretin-mSin3B 複合体の 3D-VcMD シミュレーション結果は、サンプリングした範囲の 3 次元空間内で極小値を有する滑らかな自由エネルギー曲面を有しており、球に近い単純な形をしている（図 4）。反応座標空間での自由エネルギー地形が単純に見えるということは、3D-VcMD を用いると立体構造サンプリングが容易になることを示している。

また、図 5 や 6 で示したように、Acitretin-mSin3B 複合体の 3D-VcMD シミュレーションの結果得られ

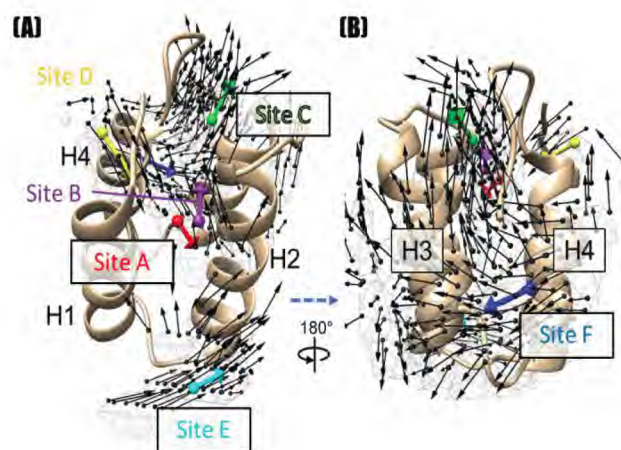


図 6 : mSin3B 近傍における Acitretin の向きの分布。矢印はその位置における熱力学的な重みに基づく平均の向きを表す。

た熱力学的構造アンサンブルを解析することで、リガンド分子が mSin3B のどの位置と相互作用しやすいかや、相互作用位置におけるリガンド分子の方向性に特徴がみられるかなどを明らかにした。

このように、mD-VcMD 法はタンパク質とリガンド（タンパク質同士や DNA など可能である）の相互作用の仕方を詳細に解析する上で非常に有用である。今後は他の薬剤候補分子との間でもシミュレーションを行い、NRSF や mSin3B の働きを阻害する薬剤候補の発見に役立てていく予定である。

文献

- [1] Nomura, M., et. al., J.Mol.Biol., **354**, 903-915, (2005).
- [2] Higo, J., et. al., J. Am. Chem. Soc., **133**, 10448–10458, (2011).
- [3] Ueda, H. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., **27**, 4705–4709, (2017).
- [4] Kurita, J., et. al., Sci. Rep., **8**, 13763, (2018).
- [5] Higo, J., et. al., J. Chem. Phys., **138**, 184106, (2013).
- [6] Higo, J. et al., J. Comput. Chem., **36**, 1489–1501, (2015).
- [7] Hayami, T., et. al., J. Comput. Chem., **39**, 1291-1299, (2018).
- [8] Hayami, T., et. al., J. Comput. Chem., **40**, 2453–2463, (2019).