



#### キーセンテンス：

1. 生体膜と膜タンパク質のダイナミクスを解明する
2. 糖鎖とタンパク質の相互作用を解明する
3. 理論化学・理論生物物理を統合した新しい理論と計算手法を開発する

#### キーワード：

生体膜、膜タンパク質、糖鎖、バイオインフォマティクス、生物物理、第一原理量子化学計算、分子シミュレーション、分子動力学計算、拡張アンサンブル計算、自由エネルギー解析

#### 研究概要

当研究室では、理論化学的手法を用いて、生体分子を含む様々な分子系の構造とダイナミクスを解明し、医療、環境、エネルギー問題に応用可能な新たな分子機能の開拓を目指している。そのために、従来の枠組みを超えて、理論化学と理論生物物理を統合した新しい計算手法や分子モデルの開発を行っている。実験研究者と活発な議論を交わしながら、タンパク質や核酸、糖鎖や生体膜などの大規模構造変化、溶液中または生体分子中でのプロトン・電子移動、分子系の電子状態と振動状態、溶媒や分子混雑などの環境が分子機能に与える影響など、幅広い研究課題に取り組んでいる。また、理論化学・計算化学の限界に挑戦し、次世代スーパーコンピュータを用いた大規模シミュレーションも積極的に行っている。

#### 1. 膜タンパク質と生体膜のダイナミクスと機能 (小林、二島、Pisliakov、Li、小室、小串、杉田)

生体膜中に存在する膜タンパク質は、生体内のエネルギー変換や生体膜を隔てた物質輸送などの重要な生体機能を担っている。近年、X線構造解析技術の進歩に伴い、膜タンパク質の立体構造が原子レベルで明らかになってきた。私達の研究室では、全原子～粗視化レベルの分子動力学シミュレーションを用いて、これら生体分子のダイナミクスを実時間スケールで解明することを目指している。具体的には、膜タンパク質中でのイオンやプロトン輸送、リガンド結合、タンパク質-タンパク質相互作用（複合体形成）、生体膜の性質など、膜タンパク質機能の根幹に関わる幅広い現象を取り扱っている。

##### a. 一酸化窒素還元酵素 (NOR) のプロトン輸送機構

一酸化窒素還元酵素は、酸素の少ない土壌や海水中に生息する細菌の ATP 合成 (嫌気呼吸) 機能を担う重要な酵素である。好気呼吸に重要なチトクロム酸化酵素(COX)の構造や機能は良く調べられているが、NOR の立体構造が明らかになったのは極最近である。本研究では、2種類の NOR (qNOR と cNOR) に対して、それらの活性化に必要なプロトンの供給経路を明らかにするために、長時間の分子動力学シミュレーションを行い膜タンパク質内部の水チャンネルを特定した。cNOR と qNOR の水チャンネルが異なることを明らかにした他、cNOR の新たな水チャンネルを見いだした。後者は COX の水チャンネルと高い類似性を示しており、分子進化過程での NOR と COX の密接な関連性を裏付ける結果と言える。

##### b. Tom20 による前駆体タンパク質のプレ配列認識機構

ミトコンドリアで機能するタンパク質のほとんどは、サイトゾルで前駆体として合成された後、ミトコンドリアに輸送される。Tom20 は、前駆体タンパク質が正しく輸送されるために、シグナルとして前駆体タンパク質に付加されたプレ配列を認識する膜タンパク質である。近年、Tom20-プレ配列の X 線結晶構造解析から、Tom20-プレ配列複合体には結合様式の異なる 3 つの状態があり、それらの動的平衡が認識で重要であることが示唆された。本研究では、動的平衡モデルによる認識機構を検証するために、レプリカ交換法を用いた分子動力学シミュレーションにより、3 状態の詳細な結合様式とその変化過程のエンジェティクスを明らかにした。計算結果は、動的平衡を利用した認識機構を支持すると同時に、実験では捉えられなかった新たな結合状態の存在を示唆する。

##### c. ウィルスタンパク質 MIR2 と B7-2 複合体の立体構造予測

ウィルスタンパク質 MIR は、膜結合型の E3 ユビキチンリガーゼである。MIR は、抗原提示に関する分子を選択的にユビキチン化し分解を促すことが知られており、ウィルスが宿主細胞の免疫を逃れる機

構と深く関わっている。MIR は二つの膜貫通ドメインを用いてユビキチン化する標的分子を認識していると考えられているが、その詳細は明らかでない。本研究では、MIR の基質認識機構を明らかにするために、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス MIR2 と B7-2 の複合体のレプリカ交換分子動力学シミュレーションを行い、複合体構造を予測し結合様式を明らかにした。MIR2 の膜貫通領域にある Phe119 と Ser120、B7-2 の膜近傍領域の Asp244 が複合体形成で重要であることがわかった。実験結果とも良く一致しており、MIR がその膜貫通領域での相互作用により基質分子をユビキチン化していると考えられる。

#### d. リン脂質二重膜中における脂質分子の垂直拡散 (flip-flop) 運動

生体膜を構成する脂質分子は、膜の種類や環境に応じて特徴的な分布をもっている。その分布変化 (脂質再分布) は、膜物性の変化を介して様々な細胞機能と関係している。本研究では、脂質再分布と深く関わる、生体膜中での脂質分子の垂直拡散 (flip-flop) 運動を解明するために、粗視化モデルを用いた分子動力学シミュレーションにより、二重膜中でのジアシルグリセロール (DAG) とセラミド (CER) の flip-flop 運動について調べた。計算による flip-flop 率は脂質の種類により異なっており (CHOL >> DAG > CER)、さらに、二重膜を構成する PC 脂質の不飽和度が高いほど、flip-flop 率が高いことも分かった。この結果は実験結果とも良く一致する。また、flip-flop 運動をポワソン過程として解析することで、flip-flop 率の違いが膜/水界面における脂質の滞在時間の違いを反映したものであることが分かった。この結果は、生体膜における膜の流動性と、膜と水の相互作用の重要性を示唆している。

## 2. 糖鎖とタンパク質の相互作用 (李、二島、渡部、杉田)

糖鎖は、核酸、タンパク質とならぶ第三の生命鎖といわれる。近年糖鎖機能の解明が急速に進み、糖鎖が細胞分化や増殖、免疫応答、癌、ウイルス感染など多様な生命現象、疾患と深く関わっていることが分かってきた。一方で、糖鎖構造の不均一性や高い柔軟性のために構造解析は困難を極めており、糖鎖機能のさらなる理解を妨げている。私たちの研究室では、分子シミュレーションにより糖鎖、糖鎖-タンパク質複合体の立体構造ダイナミクスを予測する新たな手法を開発し、実験研究者と密接に連携し、糖鎖構造-機能相関の解明を目指す。

#### a. レプリカ交換法を用いた溶液中糖鎖の立体構造予測

高い柔軟性をもつ糖鎖は、溶液中で多様なコンフォメーションをとっていると考えられている。糖鎖の理論計算・分子シミュレーションはこの数年で急速に発展しているが、十分な構造探索を行うには長時間シミュレーション必要であり、これまでの計算は比較的小さな糖鎖に限られている。本研究では、タンパク質の立体構造を効率良く探索するために開発されたレプリカ交換分子動力学法を用いることで、比較的大きな水中 N 型糖鎖のコンフォメーションを予測し、NMR と良く一致する結果を得ることに成功した。計算結果から、N 型糖鎖は溶液中で幾つかのコンフォメーションをとっていること、化学修飾によりその平衡分布がシフトすることがわかった。N 型糖鎖修飾により受容体との親和性が変化することは良く知られており、糖鎖が配座選択的に分子認識を行っていることを示唆する。

#### b. イオンモビリティ質量分析データの理論予測

質量分析は、標的タンパク質の同定を行う上で有力な手段である。糖鎖解析にも広く用いられているが、タンパク質と異なり複雑な分岐鎖をもち幾種類もの構造異性体が存在する糖鎖を同定するのは容易ではない。近年、イオンモビリティによる分離技術を組み合わせた質量分析法を用いて、同質量の異性体分離・同定が行われるようになってきた。本研究では、分子シミュレーションによりイオンモビリティ質量分析のデータ (断面積やドリフト時間) を予測する手法を開発し、簡単な N 型糖鎖異性体について実験データを良く一致する結果を得ることに成功した。さらに、異性体の分離が、糖鎖異性体間の立体構造の違いに起因していることを示した。

## 3. 新規分子シミュレーション手法の開発と応用 (八木、李、杉田)

分子シミュレーションでは、原子・分子間の相互作用を精度良く見積もることが計算結果のクオリティを大きく左右する。理論生物物理では、その相互作用は、分子力場と呼ばれる経験的ポテンシャル関数によってモデル化されている。分子力場は、物理的直観に基づき、分子振動、静電相互作用、van der Waals 相互作用などをその関数系とパラメータに巧妙に取り込み、大きな成功を収めている。しかし、分子力場は電荷移動や化学結合の交代を記述できず、従って、適用できる範囲が限られている。一方、理論化学では、非経験的に原子・分子間に働く相互作用を計算する分子軌道法や密度汎関数法が発展し

てきた。本プロジェクトでは、理論化学と理論生物物理を統合した新しい理論モデルと計算手法を開発し、従来の方法では説明できなかった現象を明らかにする。

#### **a. QM/EFPに基づくMDシミュレーション法の開発と水和イオンペアに対する応用**

生体内には、ナトリウム、カリウム、カルシウムといった数多くのイオンが存在し、神経活動やシグナル伝達、酵素反応と深く関わっており、溶液中におけるイオンの動的挙動を理解することは重要である。イオンと水の相互作用に関する理論計算は数多く行われてきたが、過去の計算の多くは分子力場を用いたもので、溶液や生体内のイオンを記述する上で欠かせない電子分極や電荷移動の効果が取り込まれていない。本研究では、韓国慶北大Choiグループと共同で、量子化学計算に基づく有効フラグメントポテンシャル（EFP）を分子動力学シミュレーションと組み合わせた新しい手法、QM/EFP-MDを構築し、水和イオンの会合ダイナミクスを解析した。計算結果は、従来の分子力場計算とは異なり、水中で $\text{Na}^+\dots\text{Na}^+$ ペアが安定に存在することを示唆した。このようなカチオンペアが安定に存在するのは水分子からイオンへの電荷移動によって大きな安定化が得られるためと分かった。分子力場では各原子の持つ電荷が固定され電荷移動を考慮できないため、結果に大きな違いが現れた。本研究で開発した手法により、溶液中のイオンに対する新しい描像を見出すことができた。

-----  
**Key Sentence:**

1. Clarify the dynamics of membrane and membrane proteins
2. Clarify the protein-glycan interactions
3. Develop new theory and computational method that integrates both theoretical chemistry and biophysics

**Key Word:**

Membrane, membrane protein, glycan, bioinformatics, biophysics, first principle quantum chemical calculation, molecular simulation, molecular dynamics, enhanced sampling method, free energy analysis

**Outline**

Research in our group employs theoretical and computational methods to elucidate the structure and dynamics of macro-molecular systems in biology and materials. The ultimate goal is to find new molecular functions relevant to medical, environmental, and new energy applications. The group, being in an interdisciplinary area of chemical and biophysical theory, involves development of new molecular model and computational algorithms. Our interest is to provide a molecular level of understanding on various phenomena such as: large-scale structure transformations in biomolecules (protein, nucleic acid, glycan, membrane, etc.); proton and electron transfer in solution or biological environment; the electronic and vibrational structure; the effect of solvent and molecular crowding on biological functions; and so on. We highly appreciate collaboration with experimentalists, in which active discussion with them helps our research stand out from others. Furthermore, we challenge the breakthrough of current limits of simulation in terms of both size and time embracing the super-computer “K”.

**1. Dynamics and function of biological membranes and membrane proteins**

Membrane proteins play important roles in a variety of biological functions, e.g. bioenergy generation and conversion and transport of materials across membranes. Recent advances in X-ray crystallography have enabled the structural studies of membrane proteins at atomic resolution. We perform extensive molecular dynamics simulations, ranging from all-atom to coarse-grained level, to explore the dynamics of membranes and membrane proteins at the biologically relevant time scales. Current topics include the ion/proton transport in membrane proteins, ligand binding, protein-protein interactions (e.g. in complex formation), and properties of membrane systems. (Kobayashi, Nishima, Pislakov, Li, Komuro, Ogushi, and Sugita)

**a. Proton transport in NOR (nitric oxide reductase)**

Nitric oxide reductases (NORs) are membrane proteins that catalyze the reduction of nitric oxide (NO) to nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), which is a critical step of the nitrate respiration process in denitrifying bacteria. Their structure has been determined only recently, while the structure and function of cytochrome oxidase (COX), important in aerobic respiration, have been well studied. Using these crystal structures, we performed extensive all-atom molecular dynamics (MD) simulations of two NORs within an explicit membrane/solvent environment to fully characterize water channels that can serve as proton transfer pathways to the catalytic center. Our simulations revealed that a water channel from the cytoplasm can serve as a proton uptake pathway in qNOR. In contrast, two possible proton transfer pathways leading from the periplasm to the active site were found in cNOR. In addition, one of the pathways in cNOR, which was newly identified in the MD simulation, is blocked in the crystal structure and requires small structural rearrangements to allow for water channel formation. That pathway is equivalent to the functional periplasmic cavity postulated in cbb3 oxidase, which illustrates that the two enzymes share some elements of the proton transfer mechanisms and confirms a close evolutionary relation between NORs and C-type oxidases.

**b. Recognition of the presequence of mitochondrial precursor proteins by Tom20**

Most of proteins in mitochondria are first synthesized as precursor proteins in cytosol, and thereafter are transported to mitochondria. Tom20 is located in the outer membrane of mitochondria and functions as a receptor for the N-terminal presequence of mitochondrial precursor proteins, ensuring the proper transport. Recently, three atomic structures of the Tom20-presequence complex were determined using X-ray crystallography and classified into A-, M-, and Y-poses in terms of their presequence binding modes. Combined with biochemical and NMR data, a dynamic equilibrium model between the three poses has been proposed. To investigate this mechanism in further detail, we performed all-atom molecular dynamics (MD) simulations and replica-exchange MD (REMD) simulations of the Tom20-presequence complex in explicit water. Simulations revealed the energetics of the multiple binding forms, suggesting that A-pose is more stable than Y-pose. A new pose, not yet obtained by X-ray crystallography, was also revealed, nicely explaining the binding affinity of the complex in previous pull-down assay experiments. The results help to detail the progressive conformational states in the dynamic equilibrium

model.

### **c. Structure prediction of the complex between virus MIR2 and B7-2**

Human tumor viruses MIR1 and MIR2 are homologous E3 ubiquitin ligases. They selectively ubiquitinate antigen presenting molecules, such as MHC, and prompt their degradation to evade host immunity. Regarding substrate recognition, it has been suggested that MIR recognizes a target molecule for ubiquitination by using two transmembrane (TM) regions, although a precise understanding of how MIR recognizes a specific antigen presenting molecule is still lacking. We performed REMD simulations of the complex formation between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus MIR2 (TM1, TM2, and intertransmembrane (ITM) regions) and B7-2 (TM and juxtamembrane (JM) regions) in a membrane environment to examine the recognition mechanism. Simulations revealed that Phe119 and Ser120 in the MIR2 ITM region and Asp244 in the B7-2 JM region contribute to the recognition of B7-2 by MIR2. This finding provides new insight into the molecular basis of substrate recognition by MIR family members.

### **d. Flip-flop motions of a lipid molecule in phospholipid bilayers**

Lipid molecules are heterogeneously distributed in biological membranes according to region and situation. A selective distribution is achieved through fast or slow diffusion along or across membranes. The transverse diffusion between bilayer leaflets (flip-flop motion) is fundamental to the lipid distribution and membrane dynamics. We performed coarse-grained molecular dynamics simulations of diacylglycerol (DAG) and ceramide (CER) in phospholipid bilayers to investigate their flip-flop motions. Simulations revealed that flip-flop rates differ among different types of lipids (namely, CHOL>>DAG>CER). The predicted rates correlate with the number of unsaturated bonds in the membrane phospholipids and hence with fluidity of membranes. These findings qualitatively agree with the corresponding experimental data. Statistical analysis of the MD trajectories suggests that flip-flop events can be approximated as a Poisson process. The rate of the transverse movement is influenced by depth of the polar head group in the membrane and extent of interaction with water.

## **2. Protein-glycan interactions**

Glycans are called the third chain of life following nucleic acids and proteins. A rapid progress on the glycan analysis revealed their functional roles in a wide range of biological phenomena and diseases: cell differentiation, multiplication, immune response, cancer, virus infection, etc. However, flexibility and heterogeneity of glycans make experimental structure determination quite difficult, thereby hampering a precise investigation of their functional roles. To predict glycan structures and their recognition by proteins, we develop and apply new methods that are based on advanced molecular simulation techniques. Our goal is to establish, in close collaboration with experimentalists, the structure-function relationships of glycans and to design new glycan functions for therapeutic purposes. (Re, Nishima, Watabe, Sugita)

### **a. Structure prediction of glycans in solution using the enhanced sampling method**

Structural diversity of glycans is essential for specific binding to their receptor proteins. All-atom molecular dynamics (MD) simulations provide the atomic details of glycan structures in solution, but fairly extensive sampling is required for simulating the transitions between different rotameric states. This difficulty limits application of conventional MD simulations to small fragments, like di- and tri-saccharides. We apply the replica-exchange molecular dynamics (REMD) simulation, which was originally developed for the protein conformational search, to predict glycan conformers in solution. REMD simulations on N-glycans successfully revealed a family of glycan conformers. The experimental NMR data are well reproduced by taking into account the multiple conformers. The results provide new insights into the conformational equilibria of N-glycans and their alteration by chemical modifications.

### **b. Prediction of IMMS (ion mobility spectrometry-mass spectrometry) data**

Mass spectrometry is an indispensable tool for the glycan analysis. However, a large number of possible isomeric forms of a glycan, all having the same mass, hampers a precise analysis. Recent advances in the mass spectrometry combined with ion mobility spectrometry (IMMS) have enabled a separation of isomeric forms, and thus a precise identification of the glycan structure. We developed a method to predict the experimental data (cross section and drift time) by using the replica-exchange MD simulation. The predicted values for two isomeric forms of N-glycan are in good agreement with the experiment. In addition, we demonstrated that the separation is due to the difference in the three-dimensional structure of two isomeric forms.

## **3. Development of new molecular simulation methods and applications (Yagi, Re, Sugita)**

The accuracy of the molecular simulation is heavily dependent on the underlying modeling of the interaction potential between atoms and molecules. In theoretical biophysics, the interaction is provided by the molecular force field, which is parameterized, empirical functions. The force field, constructed based on the physical

intuition, incorporates in its functional form the molecular vibrations, and electrostatic and van der Waals interaction, and has been widely used with a lot of successes. However, the drawback is that the force field is incapable of describing the charge transfer and the alternation of chemical bonds, which limits the range of application. On the other hand, recent progresses in theoretical chemistry have made feasible to compute the interaction from the first principles based on the molecular orbital and density functional theory. The aim of this project is to establish a new theoretical model, which integrates the concept of biophysical and chemical theories, namely, the force field and the first-principle calculations.

**a. Development of the QM/EFP-MD method and application to the hydrated ion pairs**

The dynamic behavior of ions (e.g.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Ca}^{2+}$ ) in solution is of interest in conjunction with a wide range of functionality of biological systems. There are many theoretical calculations on the ion-water dynamical interactions. However, previous calculations mostly relied on molecular mechanics force fields that do not take the effect of charge transfer and electronic polarization into account. In collaboration with Prof. Choi (Kyungbuk Nat. Univ.), we developed an effective and practical quantum mechanical molecular dynamics method that combines hybrid quantum mechanical/effective fragment potential (QM/EFP) with the well-developed traditional molecular dynamics (MD) techniques. We applied the method to analyze the formations of like ion pairs,  $\text{Na}^+-\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^--\text{Cl}^-$ , in solution. Simulations suggested a possible formation of the  $\text{Na}^+-\text{Na}^+$  pair, which is in sharp contrast to the results from the classical MD simulations. The preferred formation of the  $\text{Na}^+$  like ion pair in solution appears to come from a significant charge transfer and strong orbital overlap between ions and surrounding water molecules.

***Principal Investigator***

杉田 有治      Yuji Sugita

***Research Staff***

八木 清      Kiyoshi Yagi  
李 秀榮      Suyong Re  
小串 典子      Fumiko Ogushi  
小林 千草      Chigusa Kobayashi  
二島 渉      Wataru Nishima  
Andrei Pisliakov  
Pai-Chi Li

***Students***

小室 靖明      Yasuaki Komuro  
渡部 茂久      Shigehisa Watabe

***Assistant and Part-timer***

平良 和可代      Wakayo Taira

***Visiting Members***

石谷 隆一郎      Ryuichiro Ishitani  
天能 精一郎      Seiichiro Ten-no  
宗行 英朗      Eiro Muneyuki  
依田 隆夫      Takao Yoda  
光武 亜代理      Ayori Mitsutake  
岡本 祐幸      Yuko Okamoto  
Cheol, Ho Choi  
Michael Feig