

杉田理論生物化学研究室
Theoretical Biochemistry Laboratory



准主任研究員 杉田 有治 (博士(理学))
SUGITA, Yuji (Ph.D)

キーセンテンス:

1. 生体高分子の効率的な構造探索アルゴリズムの開発
2. 膜タンパク質と脂質二重膜の分子動力学計算
3. 階層的QM/MM計算法の開発と酵素反応の解析
4. 蛋白質複合体に関する自由エネルギー解析

キーワード:

生物物理、膜タンパク質、電子状態、バイオインフォマティクス、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、創薬、積分方程式理論、アミロイド蛋白質、生体膜

研究概要

当研究室では、蛋白質や生体膜の構造とダイナミクスから機能を理解・予測することを目的として、理論化学・計算化学による解析を行っている。統計熱力学、量子化学などの分子科学を基礎に、分子動力学計算、第一原理量子力学計算、積分方程式理論などの手法を用いて、原子・分子レベルでの理解を目指している。研究課題は、蛋白質の折れ畳みや安定性、膜蛋白質のダイナミクス、酵素反応機構、生体膜中での脂質分子のダイナミクスなどの基礎研究課題から、免疫系蛋白質、アミロイド蛋白質などの疾患と深く関係する蛋白質の機能解析や創薬に向けた新規計算手法の開発など多岐に渡っている。これらの研究課題のほとんどは、実験家との密接な共同研究・議論を通して行われる。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有効に活用するための新しい計算法やモデルの開拓、プログラム開発なども積極的に行っている。

1. 水中での小蛋白質 Villin headpiece subdomain HP36 の折れ畳みシミュレーション (依田隆夫、杉田有治)

Villin headpiece subdomain HP36 は蛋白質折れ畳み研究において最も良く調べられている蛋白質の一つである。HP36 は 36 残基のアミノ酸からなる小蛋白質であるが、安定な疎水性コアを持ち、 μ 秒で折れ畳むことが知られている。その分子機構を理解するために、我々は溶液中で完全に伸びきった構造をとる HP36 を初期構造として用いたマルチカノニカルレプリカ交換分子動力学計算を行った。マルチカノニカルレプリカ交換分子動力学計算法は、拡張アンサンブル法の一つであり、エネルギー空間を一次元酔歩することによりエネルギー極小状態に留まることなく広い構造空間の探索を実現する手法である。シミュレーションの間に、我々は少なくとも 4 回の独立に生じた天然状態への折れ畳み過程を観測した。得られた構造の中でもっとも結晶構造と類似したものは、結晶構造から主鎖原子の RMSD が 1.1 Å しかずれていなかった。また、この構造では疎水性コアの構造が完全に再現されており、疎水性コアの脱水和が折れ畳み過程の後期で生じていることが明らかになった。

2. μ 秒の MD 計算によるユビキチンの圧力変性 (今井隆志、杉田有治)

蛋白質の圧力変性は広く知られた現象であるが、その分子機構は未だに明らかではない。我々は、水溶液中のユビキチンに関する 1 μ 秒にわたる分子動力学計算を、常圧と高圧条件下で実行した。ユビキチンの立体構造は、常圧と高圧条件下で異なることが NMR を用いた解析によって報告されている。常圧の NMR 構造を出発構造として用いた高圧条件下での分子動力学計算によって、我々は常圧から高圧条件下への立体構造転移を再現することに成功した。さらに、この過程で水分子がユビキチンの疎水コア内部に浸透していることが明らかになり、水分子の浸透が圧力変性の引き金であることが明らかになった。

3. 分子動力学計算による Sec トランスロコンの構造変化 (森貴治、杉田有治)

Sec トランスロコンは膜蛋白質複合体であり、蛋白質膜透過を実現するチャンネルを提供する。Sec トランスロコン単体では閉じた構造を持つチャンネルであり、リボゾームや SecA ATPase などのチャンネルパートナーの結合によって、蛋白質膜透過を実現する。近年、SecY の結晶構造として、閉状態、プレオープン状態、SecA 結合状態が明らかになった。閉状態とプレオープン状態間の構造変化の分子機構を明らかにするために、我々は *Thermus thermophilus* SecYE と *Methanococcus janaschii* SecYeb を脂質二重膜に埋め込み溶媒を配置した系での全原子分子動力学計算を行った。その結果、SecY の閉状態は安定な構造であるが、結晶構造中でチャンネルパートナーを模した役割を果たしていた抗体分子を取り除いた計算では閉状態からプレオープン状態へ構造転移することが観測された。さらに、この構造変化は脂質分子のラテラルゲート付近への侵入 / 脱離と強く相関しており、蛋白質・脂質分子間の相互作用変化が Sec トランスロコンの構造変化を生み出す可能性が示唆された。

4. フォスフォセリン・フォスファターゼ(PSP)のリン酸化反応 (李秀栄、杉田有治)

フォスフォセリン・フォスファターゼ(PSP)は、リン酸転移酵素の一つであり、ハロ酸デハロゲナーゼ(HAD)族に分類される。この酵素の反応サイクル中には、図 1 に示すように 2 つのリン酸転移反応が含まれる。一つは、基質分子であるリン酸化セリンから PSP 中のアスパラギン酸(Asp11)へのリン酸転移反応であり、もう一つは、PSP 中の Asp11 からの脱リン酸化反応である。この酵素反応機構は、細胞質中の Ca^{2+} を小胞体内腔へと能動輸送する Ca^{2+} ATPase の酵素反応機構と類似しており、 Ca^{2+} ATPase の反応サイクルを理解するために役立つ。我々は、PSP が触媒する 2 つのリン酸転移反応を理解するために、蛋白質と周囲の溶媒を分子力学的に取り扱い、活性中心のみを量子化学的に取り扱う QM/MM 混合計算を行った。従来の計算では、リン酸転移に直接関わる距離のみを反応座標に用いた 1 次元のエネルギーサーチが行われていたが、この系では遷移状態の後で大きなエネルギーギャップが観測された。そこで、Asp13 から基質であるリン酸化セリンへのプロトン転移座標も含む 2 次元のエネルギー平面を求めることにより、スムーズなエネルギー変化と正確な遷移状態の構造を得ることに成功した(図 2)。すなわち、この酵素反応においては、PSP の Asp13 からリン酸化されたセリン分子(基質)へのプロトン移動が生じた結果、リン酸化されたセリン分子に含まれるリン酸基の脱離が生じやすくなるのである。また、QM/MM 計算で得られた遷移状態の立体構造は、コンパクトな反応中心を持つにも関わらず電子状態的には解離しやすい性質を持つことがわかった。この結果はこれまでに得られているリン酸化転移酵素の遷移状態に関する様々実験データを良く説明し、統一的な解釈を与えた。

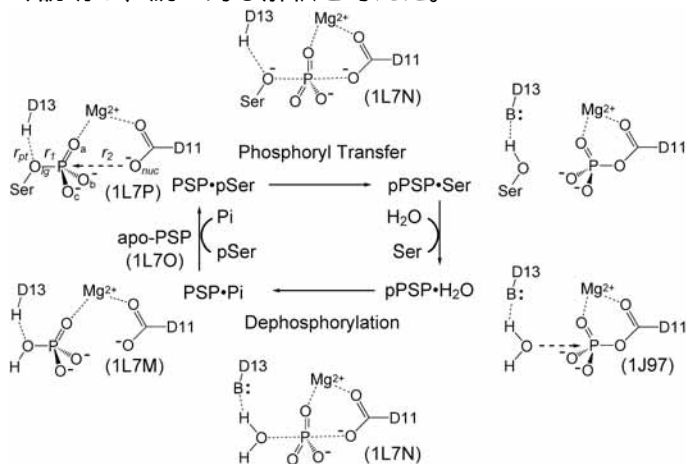


図 1 PSP が触媒する酵素反応機構

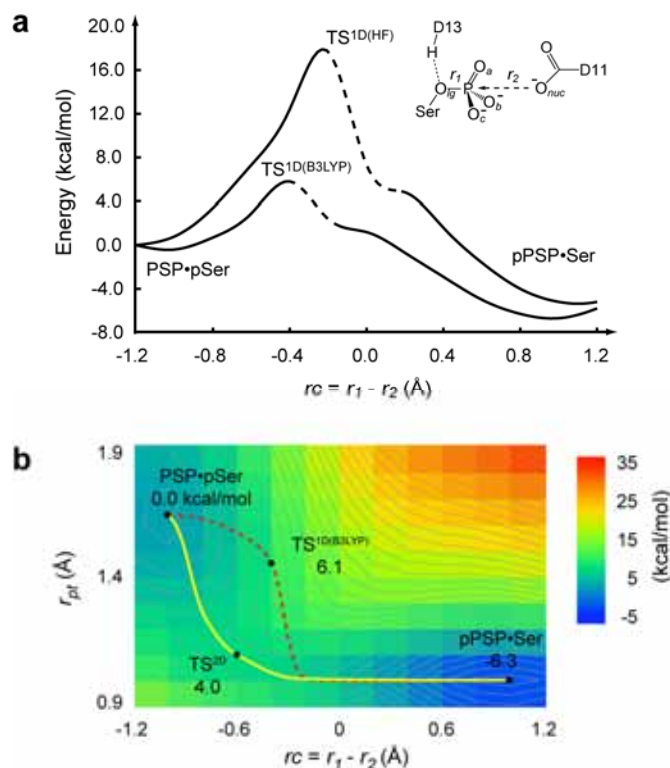


図2 QM/MM モデルを用いた1次元の構造探索(a)および2次元の構造探索(b)によって得られた PSP のリン酸化転移反応のエネルギー変化

Key Sentence:

1. Development of novel conformational sampling methods for biomolecules
2. Molecular dynamics simulations of membrane proteins and phospholipids
3. Development of hybrid QM/MM calculations and applications to enzymatic reaction
4. Free energy analysis on protein complexes

Key Word:

Biophysics, membrane proteins, electronic structure, bioinformatics, quantum chemistry, molecular simulation, molecular dynamics simulation, generalized-ensemble simulation, free energy analysis, drug design, integral equation theory, amyloid protein, biological membrane

Outline

To understand biological functions of proteins or biological membranes, we study their structures and dynamics using multi-scale simulations, which include all-atom molecular dynamics (MD) simulations, coarse-grained MD simulations, quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations, integral equation theories, and so on. By performing all-atom MD simulations with enhanced conformational sampling techniques, we investigate hydration effect on protein folding and denaturation. We also study conformational dynamics of membrane proteins and functional roles of phospholipid molecules surrounding membrane proteins by all-atom or coarse-grained MD simulations. Hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations are used to examine chemical reactions occurred in enzymes. Furthermore, we develop novel simulation algorithms and new models for biomolecules to overcome difficulties in the current computer simulations of biomolecules.

1. Folding simulations of Villin headpiece subdomain HP36 in water (Yoda, Sugita)

Chicken villin headpiece subdomain HP36 is one of the most extensively studied molecules in protein-folding research. Despite its small size (36 amino-acid residues), HP36 folds into the native structure within several microseconds, forming a stable hydrophobic core. How the small protein keeps up its conformational stability and fast folding kinetics in solution is an important issue in understanding the molecular mechanisms of protein folding. In this study, we performed multicanonical replica-exchange MD simulations of HP36 in explicit water, starting from a fully extended conformation. Within the production run, we observed at least four independent folding events toward the native-like conformations. The smallest backbone RMSD from the crystal structure of HP36 was 1.1 Å. In the most native-like conformation, the hydrophobic core is stably formed, kicking out surrounding water molecules around the core. This simulation suggests that dehydration of the hydrophobic residues has critical importance in the formation of a hydrophobic core of the protein.

2. Pressure denaturation of Ubiquitin by micro-second MD simulations (Imai, Sugita)

Water penetration into the hydrophobic interior of proteins has been postulated to be a primary force driving pressure-induced denaturation of proteins. The water penetration model is supported by several theoretical and simulation studies, although its direct evidence is lacking. In this study, 1 microsecond all-atom MD simulations of ubiquitin in explicit water at high and low pressures were performed to examine the water penetration model. The high-pressure simulation started from a crystal structure at atmospheric pressure and successfully reproduced the main characteristics of a high-pressure structure obtained by NMR. Water penetrated into a specific hydrophobic core of the protein and was ejected from the interior several times. The structural transition resulted from the relative stabilization of a preexisting metastable structure applying pressure.

3. Molecular mechanisms underlying the early stage of protein translocation through the Sec translocon. (Mori, Sugita)

The Sec translocon, a protein-conducting channel, consists of a heterotrimeric complex (SecYEG in bacteria and Sec61 in eukaryotes) that provides a pathway for secretory proteins to cross membranes, or for membrane proteins to integrate into the membrane. The Sec translocon alone is a passive channel and association with channel partners including ribosome or SecA ATPase in bacteria is needed for protein translocation. Recent three crystal structures of SecY are considered to represent the closed (resting state), pre-open (transitional state solved with bound Fab fragment mimicking SecA interaction), and SecA-bound forms. In order to elucidate mechanisms of transition between closed and pre-open forms, we performed all-atom molecular dynamics simulations for the pre-open form of *Thermus thermophilus* SecYE and the closed form of *Methanococcus janaschii* SecYE in explicit solvent and membrane. We found that the closed form of SecY is stable, while the pre-open form without Fab fragment undergoes large conformational changes towards the closed form. The pre-open form of SecY with Fab remains unchanged, suggesting that the cytosolic interaction mimicking SecA-binding stabilizes the pre-open form of SecY. Importantly, a lipid molecule at the lateral gate region appears to be required to maintain the pre-open form in the membrane. We propose that the conformational transition from closed to pre-open states of SecY upon association with SecA facilitates intercalation of phospholipids at the lateral gate, inducing initial entry of

the positively-charged signal peptide into the channel.

4. QM/MM study of phosphoryl transfer reaction in phosphoserine phosphatase (PSP) (Re, Sugita)

Phosphoserine phosphatase (PSP) is a member of the haloacid dehalogenases (HAD) family, which is one of the largest phosphotransferase families characterized to date. PSP catalyzes the hydrolysis of phospho-*L*-serine (pSer) via double phosphoryl transfer reactions: the phosphoryl group is transferred from pSer to the nucleophile Asp11 to form a phosphoenzyme intermediate (pPSP) and then there is a subsequent dephosphorylation reaction (Fig. 1). To understand molecular mechanisms underlying these two enzymatic reactions, we performed hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations of PSP. The two-dimensional energy surface along the phosphoryl and proton transfer coordinates revealed early protonation of the leaving group oxygen of pSer, prior to the transition state (TS). It triggered subsequent phosphoryl transfer reaction. The calculated TS has a compact geometry (associative TS) yet electronically metaphosphate-like (dissociative) character. These features result from the proton transfer coupled with the phosphoryl transfer in the active site and contradict neither the structural evidences nor physical organic studies.

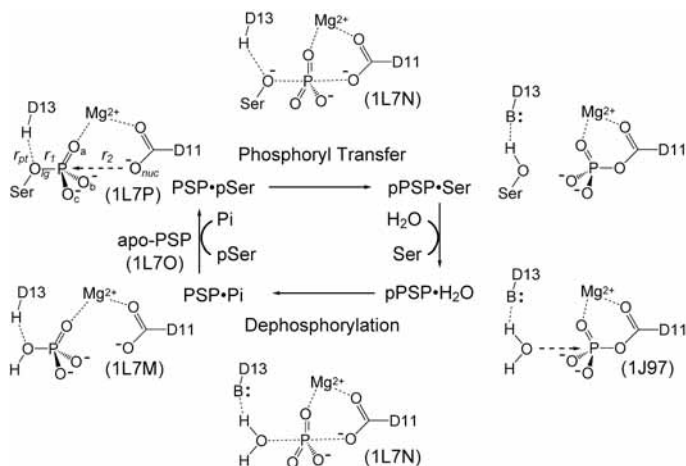


Figure 1. Schematic representation of the proposed catalytic cycle of PSP.

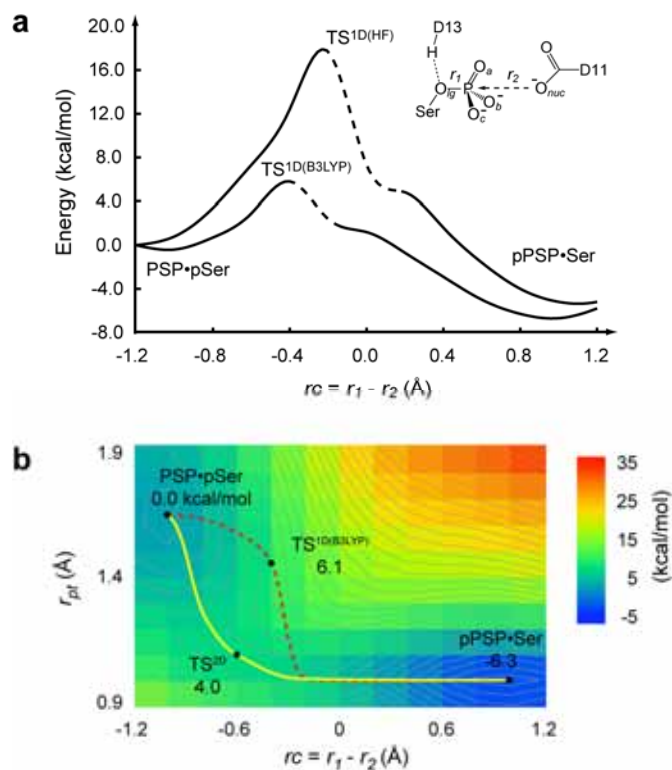


Figure 2. The potential energy curves of PSP along with the phosphoryl transfer coordinate (a) and the two-dimensional potential energy surface along with the phosphoryl and proton transfer coordinates (b).

Principal Investigator

杉田 有治 Yuji Sugita

Research Staff

李 秀荣 Suyong Re

森 貴治 Takaharu Mori

小串 典子 Fumiko Ogushi

Andrei Pisliakov

Pai-Chi Li

Students

小室 靖明 Yasuaki Komuro

Assistant and Part-timer

臼井 麻衣 Mai Usui

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