

**Theoretical Research of
Protein Functions
Picobiology Institute**

**タンパク質機能理論
ピコバイオロジー研究所**

**生物機能メカニズムの理論解析および
新規理論解析技術等の開発**

Theoretical studies of functional mechanisms based on
3D molecular and electronic structures of biological macromolecular systems

舘野 賢 ・ 姜 志始
Tateno, M. and Kang J.

本研究室では生物機能のメカニズムを、DNA、RNA、タンパク質などの生体高分子の分子構造・立体構造、電子構造などに基づいて、理論的に解明することを目的に研究を展開している。同時に、こうした研究を推進するための新規理論および解析技術の開発とその実装を進め、スーパーコンピュータなどを駆使した大規模演算 (High Performance Computing; HPC) によって、それらの応用の基盤を構築すると共に、従来は実現できなかった解析を、これらの新手法によって可能にするための統合的な技術開発を進めている。

これらの研究によって、生体高分子がどのようなアーキテクチャによって形成されているか、またそれがどのような原理に基づいて実現されてきたかなど、生命科学におけるより根源的な課題を解決することを目的としている。そのためには、生命物理学や生命情報学における理論研究が不可欠であり、それら無しには実験結果の解析も不可能な場合もあるなど、これまでに重要な寄与をもたらしてきているところである。本研究室ではさらに、それらの成果に基づいた応用も展開したいと考えている。

本年度は、生体高分子の触媒反応等における、電子構造の量子ダイナミクスおよび立体構造ダイナミクスの解析と、ゲノム DNA における転写制御メカニズム等を解析するための情報学的技術の開発とを推進した。これにより、幾つかの新手法を開発すると共に、合わせてその応用に集中的に取り組んだ。生体高分子の電子構造ダイナミクスから、ゲノム DNA トポロジーのダイナミ

クスにまで渡る、生命の多様な階層構造とその変化を解析し、マルチスケールにおける生物機能メカニズムの統合的な理解を導くことを目指して研究を推進した。

とりわけ、ゲノム DNA を反応場とする生物機能に、電子構造 ($\sim 10^{-12}$ m) のダイナミクスがどのように関連しているか、 10^6 m 以上の広大なスケールに渡る生物機能のメカニズムを統合的に解明することを初めて目指す。国際的にみても、独創的な試みといえる。本年度は、実質的にそのスタートの年度となった。今後さらに、そこで関連する多くの生物機能を統御する、システム制御メカニズムを解明するための技術開発と応用を推進する予定である。

1. 生体高分子の触媒反応メカニズムの解明: *ab initio* 電子構造計算による量子科学的解析

生体高分子の幾つかの系が担う、生体反応とその制御メカニズムの解析を推進した。すなわち、エピジェネティック制御を担う DNA メチル化酵素、ゲノム DNA のスーパーコイル構造を解くことによって転写制御を担うトポイソメラーゼ II β 、翻訳の Fidelity を保証するアミノアシル tRNA 合成酵素、細胞内シグナル情報伝達の制御を担う Ras \cdot GAP 複合体、バクテリアにおける水素代謝を担うヒドロゲナーゼ (以上、触媒反応メカニズム等の解析)、生体エネルギー変換を担うシトクローム酸化酵素 (触媒反応およびプロトン移動メカニズム) と光化学系 II (プロトン排出メカニズム)、以上の生体反応メカニズムの解析を進めた。

これらの系を系統的に解析することによって、生体反応に特有かつ特徴的な電子構造のダイナミクスおよびそのメカニズム、そしてそれらに共通する基本的な原理を導くことを目的としている。それらのほとんどの解析は、スーパーコンピュータ上で我々が独自に構築した、ハイブリッド QM/MM 分子動力学 (MD) 計算システムを駆使して推進しているものである。

さらに本年度は、より大規模な QM 領域を含む計算にも対応するために、QM/MM 境界領域における水分子のポテンシャルの精密化や相互作用項の取り扱いを、より厳密に行うための計算プロトコルの開発も推進し、その応用をスタートさせた。

2. ゲノム DNA の高次構造変化のメカニズムの解明: ゲノムワイドな情報学的解析

核内クロマチン構造を変化させることにより遺伝子転写制御を担う酵素 DNAtopoisomerase II β (topoII β) について、ChIP-seq (実験) データの情報学的処理に引き続き (昨年度)、本年度はその結果を用いて、ゲノム DNA 全体における結合部位の塩基配列の同定を推進した。いずれも大規模かつ高度な計算情報学的技術を要する。本年度の解析は、我々が 0 から開発した、転写因子結合モチーフ同定のためのシステム MODIC2 を用いて実行した。その解析精度は、国際的にも最善のものであることを、既に示したところである (*Nuc. Acids Res.*, **40** (2012), 8835-48)。

多くの転写因子の場合における特異性とは異なり、topoII β は広範なゲノム DNA の塩基配列を認識することが著しい差異である。そのため結合モチーフの全貌を知るためには、ゲノムワイドな解析が不可欠だけでなく、その実験データから結合配列モチーフを抽出すること自体が、従来は極めて困難であった。本年度はそれらを解決するために、新たな手法を MODIC2 と組合せて構築し、既知の結合モチーフに加えて、複数の新たなモチーフを系統的に同定することに成功した。

これまで 30 年以上に渡る topoII β のコンセンサス配列同定の研究の上に、ゲノムワイドな解析が本研究により初めて完遂されたといえる。その結果、topoII β がゲノム DNA の湾曲構造を認識する一方で、塩基配列は同酵素による反応性に連関することが示唆されるに至った。したがって topoII β による細胞レベルの機能（神経回路網形成等）を解明するには、その転写制御ネットワークと触媒反応メカニズム双方の統合的理解が不可欠である。量子・情報科学的手法いづれの応用も、今後より一層重要となった。

3. Supercoil dsDNA を選択的に認識するペプチドと Crossover dsDNA との複合体の立体構造の構築： 選択性発現の統計物理学および熱力学的理論の構築へ

ゲノム DNA の交差（Crossover）部位に対して、選択的に結合するペプチド（LED-GF 内の DNA 結合ドメインにおける 27 残基）について、Crossover dsDNA（2 本の dsDNA 鎖）との複合体構造のモデリングを推進した。これは Lys⁹-Glu⁹-Lys⁹ からなる、極めて単純なアミノ酸配列のペプチドであり、ここでは Supercoiled DNA Recognition（SDR）ペプチドと呼ぶ。こうした単純な系が Supercoil dsDNA を選択的に認識し得るのは驚くべき事象であり、クロマチンのリモデリングなどを始め、様々なゲノム DNA におけるダイナミクスと生物機能との連関を解明するための構造生物学および理論的基盤となり得る、重要な研究である。

他方で、こうした極めて動的でフレキシブルな複合体の立体構造は、生体高分子に特有のものであると同時に、X 線結晶構造解析などの通常の構造生物学的な解析技術が無力となっている。それらの技術の不完全な部分が、まさに生命の本質に直結しており、それ故にこれらの系では先の技術が通用しない。これらは文字通り「生きたままの生体高分子複合体」をとらえることが不可欠な系といえる。実際、従来の結晶構造解析によって得られた Crossover dsDNA は、生体内の環境においては存在し得ない不安定なコンフィギュレーションを、結晶内において無理に形成されていることが、分子動力学（MD）シミュレーションなどによって明らかにされている。したがってここでもまた、理論解析の重要性を指摘せざるを得ない。

そこで本年度は合わせて、（独）産総研や岡山大学・医学系研究科との共同研究により、複合体形成に対する分光実験および生化学実験を新たに設計し、我々の解析によって得られた立体構造モデルと、それら実験データとの比較を行った。その結果、これらの理論的および実験的

法による解析データは互いによく一致し、原子解像度における立体構造モデルの検証、および実験データの構造生物学的な意味の理解の両方を、同時に得ることに成功した。

上述の理論解析においては、溶媒を露わに含む MD シミュレーションを、以下のように系統的に実行した。すなわち、1) ペプチド単体（複数の異なる初期構造からスタートすることにより、コンフォメーション空間を広く探索した）、2) dsDNA（1本の dsDNA 鎖）とペプチド1分子との複合体、3) Crossover dsDNA（2本の dsDNA 鎖）とペプチド複数分子との複合体などについて、安定な立体構造を導くために MD シミュレーションを実行した。

これにより、Crossover dsDNA とペプチドとが空間対称性を有しながら、どのような安定複合体を形成し得るかについて、ドッキング・シミュレーションを達成した。こうして得られた Crossover dsDNA との複合体立体構造モデルを用いて、これまでの知見に関する統合的な理解を導いた。

また、このようにして得られた Crossover dsDNA とのペプチド複合体立体構造モデルにより、結合における共同性 (Cooperativity) が発現するメカニズムが明らかになった。他方で、dsDNA 鎖が Supercoil を形成する場合に、どのような Free Energy 変化がもたらされるかについては、従来より統計物理学に基づく精緻な理論が構築されてきている（例えば、*Physical Review E*, **52** (1995), 2912-37）。

そこで本研究による結果とこれらの理論とをさらに統合することによって、SDR ペプチドがその選択性を生じるための、最も本質的なメカニズム、すなわち「熱力学的メカニズム」の理論の構築をスタートした。選択性の本質的な理解は、本研究により得られた構造生物学的、分光学的、生化学的知見などを、すべて熱力学的な枠組みの中に統合して理解されたときに初めて得られる。よって、その理論の構築は今後の最重要課題である。

こうした基本原理に基づく熱力学的理論の創出によって初めて、生体高分子の機能メカニズムの根源を理解することが可能となる。本年度はその理論構築の一步手前まで、研究を推進することに成功した。

以上のように本年度は、主として量子科学（電子状態理論）などを基礎とした生命物理学と、情報科学などを基礎とした生命情報学とを融合することによって、新たな科学の領域を創出しようとする試みをさらに推進した。以って今後は、神経細胞ネットワークシステムの形成など、細胞機能に内在するシステム制御・統合メカニズムについて、分子メカニズムとその法則性に基づく真の理解を導くことを目指して研究を推進する予定である。

発表論文 List of Publications

- 1 Kim, J., Kang, J., and Tateno, M., Theoretical analysis of functional mechanisms of hydrogenases using ab initio electronic calculation and molecular mechanics calculations, 2nd International Picobiology Institute Symposium, University of Hyogo, 2014年10月9~10日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 2 Kang, J., and Tateno, M., Modulation of atomic electron densities of cytosine base through proton dislocation for catalytic enhancement by M. HhaI DNA methyltransferase, 2nd International Picobiology Institute Symposium, University of Hyogo, 2014年10月9~10日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 3 Kang, J., Matsuoka, T., and Tateno, M., Determination of configurations of ligands bound to CuB site of bovine cytochrome c oxidases by using spatial mapping technique of energy, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015年3月16~17日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 4 Tateno, M., Itagaki, T., and Kang, J., Propagation pathways of structural changes for T/R transition: Modulation mechanism of O₂ affinity of human adult haemoglobin, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015年3月16~17日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 5 Takeda, T., Kang, J., and Tateno, M., Development and application of structural analysis system of protein- protein complexes based on identifications of hydrogen bond network, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015年3月16~17日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 6 Sato, C., Kang, J., and Tateno, M., Structural modeling of negatively supercoiled DNA recognition peptide complexed with crossover double stranded DNA molecules, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015年3月16~17日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 7 Sugimoto, A., Kang, J., and Tateno, M., Identification of DNA binding motifs of topoisomerase II□ in rat whole genome DNA sequence : Mechanism of DNA recognition, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015年3月16~17日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 8 Takahashi, Y., Kang, J., and Tateno, M., Novel algorithm for identification of gene clusters in whole genome DNA sequences by combining rigorous and heuristic schemes, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015年3月16~17日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫

- 9 Nakamura, A., Kang, J., and Tateno, M., Theoretical analysis of proton transfer mechanisms of photosystem II employing hybrid quantum molecular dynamics simulation, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015 年 3 月 16~17 日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 10 Kim, J., Kang, J., and Tateno, M., Comparison of electronic structures of the proximal cluster in membrane bound hydrogenases (MBH) in the presence and absence of a hydroxide ligand, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015 年 3 月 16~17 日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫
- 11 Sakabe, K., Kang, J., and Tateno, M., Dual catalytic pathways identified in complex of oncogenic product Ras and Ras-GAP, The annual evaluation conference of the leading program, University of Hyogo for the school year of 2014, 2015 年 3 月 16~17 日, Center of Advanced Sciences and Technologies (CAST), 兵庫

科学研究費補助金等

科学研究費補助金（平成 25～27 年度）基盤研究(B)

研究課題 量子・情報科学理論の融合による生体反応場の統合的解析

研究代表者 舘野 賢