



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.88

2013年 4 月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

HIVヌクレオキャプシドタンパク質の 立体構造とRNA 認識

1. はじめに

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を発症させるウイルスである。HIVはHIV-1とHIV-2の大きく分けて2種類が存在する。HIV-1はチンパンジー、HIV-2は西アフリカに生息するマンガベイに感染するウイルスが起源であると考えられている。HIV-1は世界中に蔓延し多くの感染者が存在する。一方、HIV-2は起源であるサルの生息する西アフリカやその旧宗主国を中心に感染者が存在し、日本を含むその他の地域での感染者は稀であるが、HIV-1同様にAIDSを引き起こすウイルスである。また、起源が異なるためそのゲノム構造の一部も異なっている。

HIVの二本の-鎖RNAはヌクレオキャプシドタンパク質 (NC) に保護された状態で二量体としてウイルス粒子中に存在する。HIVが標的細胞に感染すると、NCはRNAから離れ、逆転写を促進し、宿主DNAへの組み込みを補助する。さらに、宿主細胞によってウイルスタンパク質やウイルスRNAが形成された後、NCはRNAを二量体化して新しいウイルス粒子へパッケージングする。このようにNCはHIVのライフサイクルの各段階において多様な相互作用を持つことで多機能性を発揮する。筆者らのグループは、NMR 立体構造解析を用いて、NCがウイルスRNAをウイルス粒子へパッケージングする際の構造-機能相関の解明を目指し研究を進めてきた。本稿では、HIV-2 NCの構造、機能解析からHIV-2のNCがHIV-1のNCとは異なるRNAとの相互作用機構を持つことを紹介する。



松井 崇

2. HIV-2 NC (NCp8) について

多機能性を発揮するNCはgag 遺伝子より得られるgagポリタンパク質がプロテアーゼによって切断されて得られた50残基程度の小さなタンパク質である (図1)。この小さなタンパク質には2つのZinc fingerモチーフ (ZF) が存在する。また、このZFはCX₂CX₄HX₄CからなるZnを配位する14残基の非常に小さなZFを形成する (Xは任意のアミノ酸で添字はその個数を示す)。図1はHIV-1, HIV-2, モロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV) のNCのアミノ酸配列相同性である。HIV-1とHIV-2のNCに含まれる2つのZFは塩基性に富んだ7残基からなるlinkerによってつながっている。また、HIV-2 NCp8はHIV-1のNC (NCp7) と67%の配列相同性を示すが、NCp8はNCp7に比べN末端側が6残基少ない49残基からなる。NCp7はこの長いN末端が3₁₀ helixを形成してRNAと相互作用する^{1,2)}。一方、NCp7の2nd ZFやlinkerと2nd ZFからなる部分ペプチドは1st ZFのそれとは異なり、RNAとの結合は非常に弱く、非特異的である³⁾。また、1つのZFのみを持つMoMuLVのNCp10のN末端側ペプチド鎖も、ウイルスRNAと相互作用する⁴⁾。したがって、N末端の短いNCp8はNCp7やNCp10と異なる相互作用様式を持つことが予想された。実際、NCp8の2nd ZFはRNAと特異的に相互作用することが示唆されている⁵⁾。NCp8の2nd ZFがNCp7やNCp10のN末端を持つような相互作用機構を補完するためには、2nd ZFがNCp7とは異なる2つのZF間の相対配置が必要であると仮定した。そこで、NCp8, 1st ZFを含むN末端からlinkerまでの29残基のNCp8-f1, linkerから2nd ZFを含みC末端までのNCp8-f2について、立体構造解析と相互作用解析を実施し、2nd ZFや2つのZF間の相対配置の重要性を検証した。

3. NCp8のNMR 立体構造解析

NCp8は大腸菌による異種発現系により調製した。また、各ZFを含む部分ペプチド (NCp8-f1, NCp8-f1/



図1 NCタンパク質のアミノ酸配列。HIV-2 NCp8, HIV-1 NCp7, MoMuLV NCp10のアミノ酸配列相同性を示す。Zn 配位残基, 塩基性残基, 芳香族残基はそれぞれ赤, 青, ピンクで示した。ZFは背景を灰色で示した。また、NCp8の部分ペプチド配列及び名称も図中に記載した。

N11A, NCp8-f2) は合成品を購入した。NCp8はHisタグとユビキチン (Ub) をN末端に付加した融合タンパク質として¹³Cと¹⁵N安定同位体標識可能なクローラ培地 (クローラ工業 (株)) を使用し大腸菌内に発現させた。NCp8は49残基と短いため、大腸菌由来の消化酵素によって切断されないように封入体として発現させた。NCp8は6Mグアニジン塩酸塩を含むバッファーで可溶化した。その後、Niアフィニティーカラム内でrefoldingさせたNCp8は回収後直ちに10 mM DTTと1 mM ZnCl₂を加え、57℃で1時間インキュベートした。その結果、1分子中に6残基存在するCysが形成する非特異的な分子間ジスルフィド結合を大幅に防ぐことに成功した。インキュベートしたNCp8はUb加水分解酵素で融合タンパク質のUbを切断して単離し、逆相HPLCにより単量体NCp8を高純度精製した。精製したNCp8は凍結乾燥によって有機溶媒を除去した。調製したNCp8や化学合成したNCp8部分ペプチドは、90% H₂O/10% D₂Oで溶解し、ZnCl₂ (NCp8にはモル比の2.2倍量、部分ペプチドには1.1倍量) を加え、pH 8.8で30分インキュベートしてZnを配位させ、pH 5.8に再調整してNMR測定を実施した。

施した。

NCp8-flはNMRを用いて立体構造解析した結果、ZF中のAsn11側鎖がlinker中のArg27側鎖と水素結合し、linkerが1st ZF近傍に固定化された構造を取っていた⁶⁾。このようなlinker構造はNCp7では見られず、この特徴的なlinker構造がたった1ヶ所の水素結合によって形成されているか確かめるため、NCp8-flのN11A置換体 (NCp8-fl/N11A) の立体構造解析を実施した。その結果、Asn11側鎖と相互作用していたArg27やその構造的近傍残基の化学シフトは大きく変化した (図2a)。さらに、NOESYによって各水素核間のNOE距離情報を取得し、Trp10-Arg27, Trp10-Gly29, Asn11-Arg27のNOEは消失していた。構造解析の結果、NCp8-flとは異なりNCp8-fl/N11Aのlinkerは1st ZFから離れ、その構造はdisorderしていた。したがって、Asn11側鎖とArg27側鎖との水素結合がlinkerを1st ZF近傍に固定化させるために重要であることがわかった⁷⁾。さらに、この水素結合がRNAとの結合活性に影響を及ぼすか確認するために、NCp8-fl, NCp8-fl/N11Aや他のNCp8-fl置換体とψサイト中のステムループ領域 (SL3) との相互作用解析を実施した。

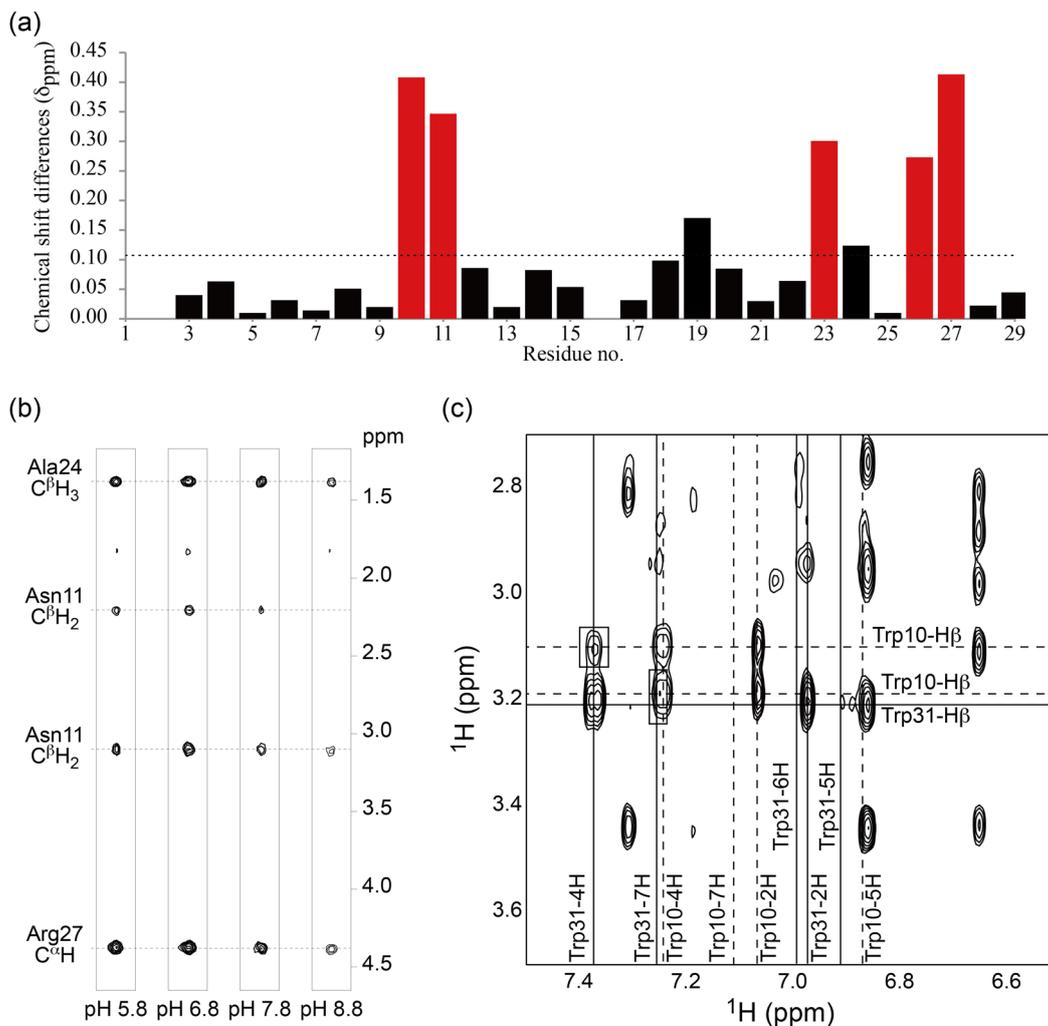


図2 ZFとの相互作用。(a) NCp8-flとNCp8-fl/N11Aとの主鎖化学シフトの変化。化学シフト変化はNHとC^αHの交差ピークの位置変化を示す。変化はピークの移動度をδNHの自乗とδC^αHの自乗の和を平方根して示した。破線は化学シフト差の平均値を示し、平均から標準偏差以上に大きく変化した残基は赤で示した。(b) NCp8をpH 5.8, 6.8, 7.8, 8.8で測定した時のAsn11 N^H (6.73 ppm) とのNOEを示した。(c) NCp8の各ZFに存在するTrp側鎖とのNOEを示した。破線はTrp10, 実線はTrp31の各水素核に対する化学シフト値を示し、四角で囲ったピークがTrp10とTrp31間の交差ピークである。

その結果, linker 中の塩基性アミノ酸であるArg26, Arg27はSL3との相互作用に重要であるが, N11A 置換体はSL3との活性に影響しなかった⁷⁾。N11A 置換体のlinkerはdisorderしているため構造に自由度を持つ。したがって, RNAと相互作用するためにNCp8-fl様の構造を取ることも可能であり, この特徴的なlinker 構造がどのように部分ペプチドの相互作用に対して機能するかは明らかにはならなかった。

一方, NCp8中でこのlinker 構造が保存されているならば, linkerが2つのZF 間の相対配置を規定するため, 2nd ZFも相互作用に参与する可能性が考えられた。そこで, NCp8の立体構造解析を実施した。図2bはAsn11側鎖 N^oHに対するNOE 交差ピークをpHを変えて測定したものである。高いpHでNMR 測定を実施すると, 分子コアに位置するか水素結合を形成する水素核のシグナルのみが観測され続ける。NCp8は非常に小さなタンパク質でほとんどの残基が分子表面に存在する。したがって, 本結果からNCp8のAsn11 N^oHはNCp8-flと異なりArg27の側鎖ではなく主鎖と水素結合していることが示唆された。さらに, NCp8は1st ZFのTrp10と2nd ZFのTrp31の側鎖間も近い位置をとることがわかった (図2c)。したがって, NCp8はlinkerと1st ZF 間に存在する水素結合により, 2nd ZFも1st ZF 近傍に存在していた (図3)。

4. RNAとの相互作用解析

RNAとの相互作用部位を決定するために, NCp8と19塩基のSL3との相互作用解析をNMRにより実施した。図4aはNCp8に0.5倍当量のSL3を加えた時のNCp8の¹⁵N HSQCスペクトルの変化で, 図4bはその移動度, 図4cは構造上に移動度をマッピングしたものである。この結果, 1st ZFのTrp10, Asn11, Ala19でシグナルが消失した。また, 1st ZFのArg20, linkerのArg27, 2nd ZFのTrp31, Lys32, Cys33, Val39, Met40, Ala41で大きな化学シフト変化を示した。これらの残基を構造上にマッピングすると, 変化のあった残基はすべて同一表面上に存在し, かつ, 2つのZFで形成される大きなクレフト間でSL3と相互作用することが示唆された (図4cに示す黄色から赤色と,

紫色で作る領域が結合サイトと推定される)⁸⁾。

さらに, SL3と22塩基から成る ψ サイト中の別のステムループ領域であるSDに対して, NCp8, NCp8-fl, NCp8-f2とのゲルシフトアッセイも実施した (図5)。その結果, 2nd ZFを含むNCp8-f2ではSL3よりもSDとの結合特異性が示された。また, 1つのZFを含む部分ペプチドだけではNCp8のような強い相互作用を示さないことがわかった^{8,9)}。

5. おわりに

NCp8の2nd ZFはHIV-1 NCp7や1つのZFしかもたないMoMuLV NCp10とは異なるRNA 結合状態を示した。特に, NCp8の2nd ZF中に存在するTrp31, Val39, Met40, Ala41からなる疎水性クレフトは, NCp7の疎水性クレフトに比べ, 大きくまた高い疎水性を示す。RNA 結合時のVal39-Met40の化学シフト変化はNCp8にのみ見られ, NCp8の2nd ZFはNCp7の2nd ZFとは異なる機能を有していることを示唆している⁸⁾。また, 2つのZFを繋ぐlinkerはHIV-1 NCp7と異なり図3aに示すような限定された可動域しか持たないため, 2つのZF 間の相対配置は一定の範囲内に束縛される⁸⁾。さらに, NCp8の2nd ZFは驚くことにRNA 配列に対する結合特異性を有することがわかった。一方, NCp8-flやNCp8-f2とRNAとの相互作用は, NCp8と比較すると弱い結合能しか示さない。以上のことから, 2nd ZFと1st ZFは協調してRNAと相互作用することでNCp8としての結合性を発揮させることが示唆された^{8,9)}。また, 各ZFが個別の配列特異性を持つことで相互作用の多様性を示す可能性も示唆された^{8,9)}。さらに, 本研究からHIVにおけるヌクレオキャプシドタンパク質のRNA 認識機構がHIV-1とHIV-2で異なることも明らかとなった。

ここで紹介した研究は北里大学の小寺義男先生, 河野俊之先生, 文京学院大学の小松博義先生のご指導のもと, 多くの共同研究者の方々, ならびに研究室で共に過ごした先輩・後輩と進めてきたものです。この場をお借りして御礼申し上げます。最後に, ペプチドニューズレターに寄稿の機会を与えてくださいました富山大学の小野慎先生に厚く御礼申し上げます。

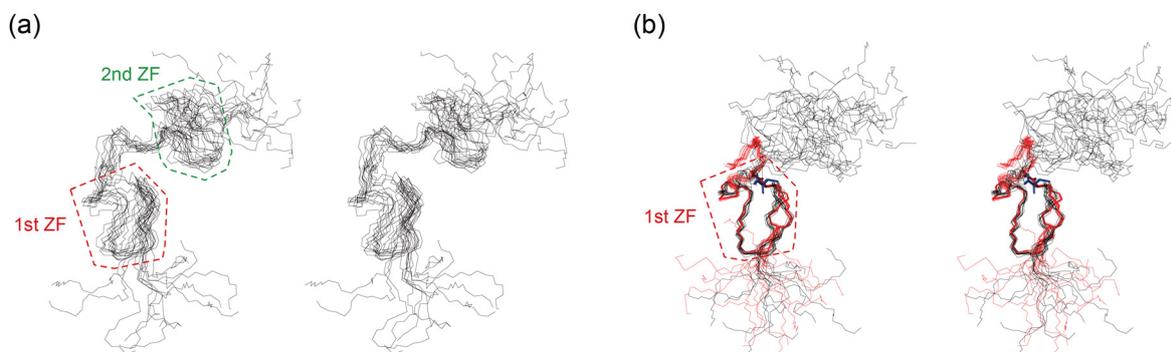


図3 NCp8のNMR 立体構造のステレオ図。(a) NCp8の主鎖のみを示し, 1st ZFのCys9から2nd ZFのCys43までで収束させた11個のNMR 構造を示す。1st ZF, 2nd ZFの領域をそれぞれ赤, 緑で示した。(b) NCp8とNCp8-flのCys9からCys22までで収束させ最もよく一致するように重ね合わせた図で, それぞれ黒線と赤線で示した。最もエネルギーの低いNCp8とNCp8-flのAsn11側鎖のみそれぞれ青と赤でスティック表示した。linkerは1st ZF 近傍で収束した構造をとるが, NCp8のlinker 末端の向く方向はNCp8-flと異なる。

Fig. 6

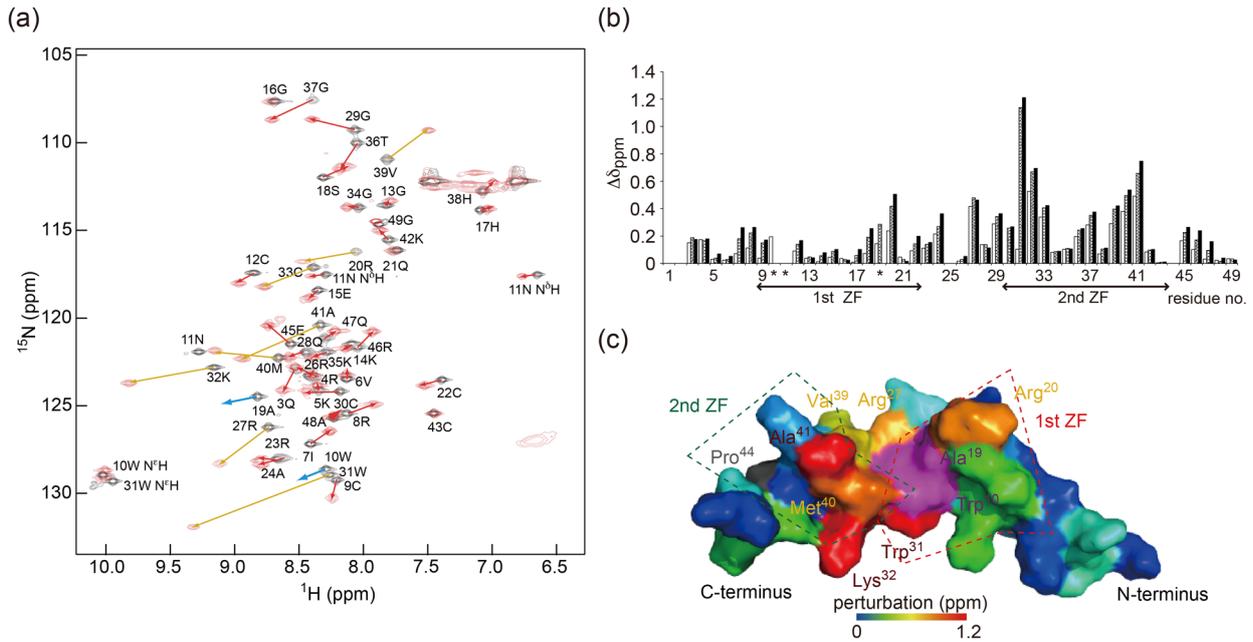


図4 SL3滴定実験の結果と、変化位置のマッピング。(a) SL3添加有無での ^{15}N HSQCを示し、黒で添加なし、赤で2 mM NCp8に対して1 mM SL3を添加した時のシグナルを示す。黄色矢印で大きく変化した残基、水色矢印で消失した残基、赤色矢印でその他の残基の移動方向を示す。(b) 各残基の化学シフト変化量。白抜きは2 mM NCp8に対して、0.5 mM SL3、斜線は1 mM SL3、黒線は2 mM SL3を添加した時の変化量である。また、*は化学シフトが消失した残基を示す。変化量は δN の自乗にスケールリングファクターを乗じた値と δNH の自乗の和を平方根して示した。(c) NCp8の平均構造に(b)の結果をマッピングした。化学シフト変化量は青→黄色→赤の順に変化量が増大していることを示し、紫で化学シフトが消失した残基を表示した。また、NHを持たず変化量を計算出来ないProは灰色で示した。

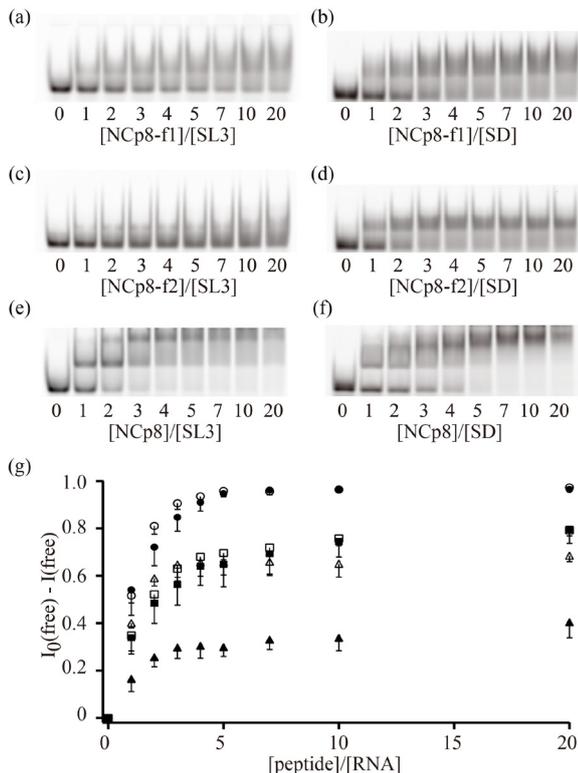


図5 NCp8, NCp8-f1, NCp8-f2と ψ サイト領域中のステムループSL3, SDとの相互作用。(a-f) 2 μM 蛍光標識RNAに対してタンパク質を0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20倍のモル比でタンパク質を加えた時のRNAの移動度を示す。(g) 結合量はRNAのみのレーンの総強度と、タンパク質を添加した時のRNAのみのバンドの強度差から得た。白抜きと黒塗りはそれぞれSD, SL3との相互作用を示す。また、丸, 四角, 三角はそれぞれNCp8, NCp8-f1, NCp8-f2との相互作用を示す。

参考文献

- 1) De Guzman, R. N. *et al.*, *Science* **279**, 384–388 (1998).
- 2) Amarasinghe, G. K. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **301**, 491–511 (2000).
- 3) Heath, M. J., Derebail, S. S., Gorelick, R. J. & DeStefano, J. J., *J. Biol. Chem.* **278**, 30755–30763 (2003).
- 4) Schuler, W., Dong, C., Wecker, K. & Roques, B. P., *Biochemistry* **38**, 12984–12994 (1999).
- 5) Komatsu, H., Tsukahara, T. & Tozawa, H., *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**, 1143–1154 (1996).
- 6) Koder, Y. *et al.*, *Biochemistry* **37**, 17704–17713 (1998).
- 7) Matsui, T. *et al.*, *J. Biochem.* **141**, 269–277 (2007).
- 8) Matsui, T. *et al.*, *Biochemistry* **48**, 4314–4323 (2009).
- 9) Matsui, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 673–678 (2007).

まつい たかし
富山大学 和漢医薬学総合研究所
天然物化学分野
matsui@inm.u-toyama.ac.jp

分子動力学シミュレーションによる ハチ毒ペプチド Sculpin の解析

はじめに

ペプチド、タンパク質、化合物、これらの相互作用、またはタンパク質のフォールディング等、原子や分子が多数集まる多自由度かつ複雑な高分子の動的な挙動は理論的に解析可能だろうか？結論から言うと、解析解（厳密解）を求めることは現実的には困難である（実際には不可能に近い）。しかしながら、コンピューターを利用して工夫することにより、数値解または近似解（納得解）を求めることは可能である。英語で“better than nothing”（「何もないよりはまし」）というフレーズがあるように（少々極端な表現だが）、求められない厳密解をただ諦めるのではなく、それ相応の納得解を少しずつ積み上げて真の解に近付けていくことも研究アプローチの一つと言える。

このコンピューターを用いて数値解を求める方法を「数値シミュレーション」と呼ぶ。よく知られているように、近年のコンピューターの進歩は目を見張るものがある。高性能化、低価格化が進み、一昔前では不可能だった数値計算も、現在の個人用デスクトップ・コンピューターで可能な時代に突入してきた。さらに、並列計算も導入され、共有メモリ型の OpenMP、および分散メモリ型の Message Passing Interface (MPI) も登場してきた。このため、おおがかりなスーパー・コンピューターを使わずとも、工夫すれば自前のコンピューターで数値シミュレーションすることができる。特に、ペプチドのような分子はアミノ酸残基数が数十と比較的少ないため、デスクトップ・コンピューターによる数値シミュレーションの格好的と言える。

ただし、注意しなければならないことは、コンピューターに任せれば求めたい結果が即座に得られるというわけではない。物理現象の着目の仕方、その現象のモデル化により、数値結果は当然異なる。また、初期条件や境界条件のみならず、計算方法（スキーム）によっても解が変わる。当然、ヒューマンエラーも考慮しなければならず、得られた数値結果が妥当であるかどうか常に検証しなければならない。（厳密には数値誤差等も含まれるが）数値シミュレーションが理論的な手法に基づいているにも関わらず、実は研究者のセンスや経験が問われる人間らしい側面があることもこの分野の特徴である。

このレターでは、改めて分子動力学¹⁾ の大変さを実感してもらい、これら難しい問題に対してコンピューターを用いた数値シミュレーションにより挑戦できることを簡単に述べる。実際に、2012年に富山大学和漢医薬学総合研究所の紺野らのグループにより、新しいハチ毒ペプチド Sculpin²⁾ が報告されたため、分子動力学シミュレーションによるこの一連の結果も披露する。



春木 孝之

物理現象を支配する微分方程式

ペプチドに限らず、一般的な物理現象を理解するためには、その物理的なルール、および数学的なルールを見つけなければならない。もし、なければ自ら構築しなければならない。特に、数学的なルールに相当するのが微分方程式である。一般的に、自然界だけでなく工学現象および社会現象における様々な現象（実在現象）は主に微分方程式で記述される。これは着目する物理量の時間的、空間的な変化が方程式に含まれるからである。独立変数 x の未知関数 $y(x)$ が含まれる単純な微分方程式であれば、

$$F\left(x, y, \frac{dy}{dx}, \frac{d^2y}{dx^2}, \dots, \frac{d^ny}{dx^n}\right) = 0$$

と記述される（ただし、 n は階数）。この場合、 F は特に常微分方程式と呼ばれる。

しかしながら、我々の世界はそれほど単純ではなく、時間 t および 3次元空間 x, y, z の独立変数があるとすれば、常微分方程式 F とはならず必然的に偏微分方程式 G が必要となる。また、微分方程式が1つとは限らず複数存在すれば、最終的には連立方程式

$$G_1 = 0, G_2 = 0, \dots, G_h = 0$$

を解かなければならない（ h は方程式の数）。このことは先にも述べたとおり、解析解を求めることが現実的には難しいことの要因の一つとなっている。従って、解析解ではなく数値解を求めるため、数値シミュレーションに頼ることになる。

分子動力学法

分子動力学 (Molecular Dynamics, MD)¹⁾ は、高分子を構成する原子の位置や速度、エネルギーの時間発展を追跡する方法である。この概要を説明するために、まず物理モデルを考える。全ての原子を質点で考え、共有結合を単純に表現するためにバネモデルを導入する。このバネの力の他にも、分子内外から様々な力が外力として各原子の質点に加わると考える。また、重力は考慮せず無視する。

続いて、数学モデルを考える。質点の粒子に質量 m 、電荷 q 、位置 \mathbf{r} 、速度 \mathbf{v} 等が与えられ、外力 \mathbf{F} が加わるとすれば、この粒子の運動はニュートンの第2法則

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(t)$$

に従う。ただし、 t は時間であり、添え字 i は粒子（原子）のインデックスを表す。さらに、この力 \mathbf{F} がポテンシャルエネルギー $V(\mathbf{r}^N)$ から求められると仮定すると、

$$\mathbf{F}_i(t) = -\nabla_i V(\mathbf{r}^N)$$

となる（ N は原子の総数）。

このポテンシャルエネルギー（または、分子力場）を次のように仮定する。

$$\begin{aligned}
V(q^N) = & \sum_{bonds} K_{ij}^R (R_{ij} - R_{ij}^0)^2 + \sum_{angles} K_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \\
& + \sum_{dihedrals} \frac{V_{ijkl}^n}{2} [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \gamma_{ijkl})] \\
& + \sum_{j=1}^{atoms} \sum_{i>j}^{atoms} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] \\
& + \sum_{j=1}^{atoms} \sum_{i>j}^{atoms} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}}
\end{aligned}$$

詳細は割愛するが、右辺の第1項は結合長の伸縮、第2項は結合角の変角、第3項は二面角のねじれ、第4項はファンデルワールス相互作用、第5項は静電相互作用を意味する。重要なことは、全ての原子ごとの多体問題を解くのではなく、2個から4個の原子における相互作用の和としてポテンシャルエネルギーを近似している点である。

さて、粒子の数だけ存在する運動方程式を連立させて解析的に解くことは可能だろうか？これは非常に難しいと言わざるをえない。そこで、このMDを数値的にシミュレーションすることのできる代表的なソフトウェアが Assisted model building with energy refinement (Amber)^{3,4)} である。これにはMDを実行する計算コードだけでなく、関連する様々な機能をもったプログラムがパッケージ化されている。このソフトウェアを使用することにより、基礎方程式(微分方程式)を立ててシミュレーションコード等を自力で作る必要がなく、調べたい高分子を指定し、初期条件を設定することでMDシミュレーションを始めることができる。

単独性のハチ毒

ハチは、社会的または単独性の2つに分類される。社会的なハチは大きな巣を作って社会生活を好み、そのハチ毒は外敵から巣や自分自身を守るために存在し、よく研究されている。一方で、単独性のハチは人間生活との関わりが希薄なことに起因するのか、その毒成分の研究はあまり行われていない。単独性のカリバチやハナバチに関しては、これまでに様々な研究成果が報告されている(表1)。

これらハチ毒の成分の多くはペプチドであり、その中には α ヘリックス構造をとるものもある。また、C末端がアミド化したものと、そうでないものが存在する。アミド化している毒ペプチドは、アミド化していない場合に比べて、その生物活性が相対的に高いことが知られている。

表1の中でも、本研究では特にEMP-AFに着目する。アミノ酸配列はINLLKIAKGIKSL-NH₂であり、アミノ酸残基数は14である。Sforcaらのグループは

表1 主な単独性のハチとその主毒成分。

ハチの種類	毒成分
Anterhynchium flavomarginatum micado ⁵⁾	Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF)
Melecta albifrons ⁶⁾	Melectin
Osmia rufa ⁷⁾	Osmin

2004年にC末端のアミド化が生物活性をどのように変化させるかについて論じた⁵⁾。MDシミュレーション GROMACS を用いて、C末端がアミド化したEMP-AF-NH₂とそうでないEMP-AF-COO-を比較し、分子的な堅さが異なることを見つけた(EMP-AF-NH₂の方が分子的に堅い)。具体的には、11番目のインロイシンと14番目のロイシンの間の水素結合の距離やその変動を考察している。彼らは、両ペプチドの生物活性の違いは、一般的に言われているペプチド全体の正の電荷によるものではなく、両親媒性 α ヘリックスの構造的な摂動が原因である、と結論づけている。

続いて、2012年に富山大学和漢医薬学総合研究所の紺野らのグループにより、日本産のオオハキリバチ (Megachile sculpturalis) から取り出されたハチ毒ペプチド Sculpin²⁾ が報告された。アミノ酸配列はGILSILKKLVPLAIKHA-NH₂である(残基数は17)。このSculpिनもEMP-AFと同じくハチ毒ペプチドであるため、その分子的な挙動が似ているのではないかという仮説のもと、本研究ではAmberによりMDシミュレーションを行う。

シミュレーションモデル

Sculpिनの立体構造はいまだ特定されていない。ハチ毒ペプチドの中には α ヘリックス構造をもつものがあるため、Sculpिनの初期状態もこのらせん状に設定する。原子間同士の角度を上手に設定すれば、新規のペプチドであっても α ヘリックスを作成することができる。

図1はSculpिनの初期構造である。図1(a)の分子モデルではアミノ酸の2次構造が分かりにくいので、リボン表示したものが図1(b)である(アミノ酸残基ごとに色を変更してある)。図1(b)から分かるように、この初期構造が α ヘリックスに設定されていることが確認できる。

また、EMP-AFのMDシミュレーションでは溶媒に水と Trifluoroethanol (TFE) の両方が使用されているため⁵⁾、本研究でもこれを使用する。TFEと水の割合が3:7であるため TFE 30%と呼ぶ。両溶媒のパラメーターから分子数を計算すると1:10となるため、TFE分子1個に対し、水分子を10個配置する。さらに、このTFEの分子力場ファイルが存在しないた

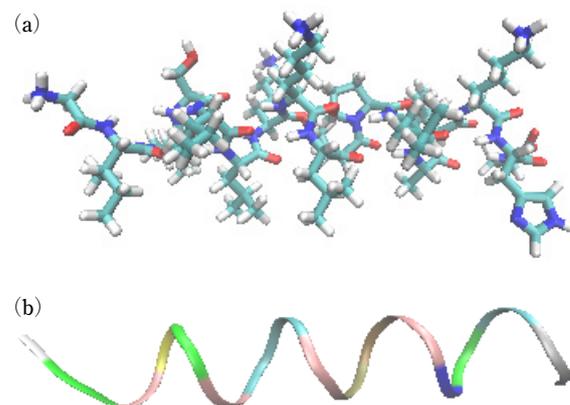


図1 Sculpिनの初期設定 ((a) 分子モデル表示と (b) リボン表示)。

め、(詳細は割愛するが) antechamber コマンドを利用して作成した。2種類のペプチド Sculpin-COO-と Sculpin-NH₂のそれぞれについて、0.1nsで300Kまで加熱し、次に低温(300K)・低压(1気圧)条件で4.9ns、つまり合計5.0nsのMDシミュレーションを行った。

シミュレーション結果

MDシミュレーションにより、ペプチドのトラジェクトリー(座標の軌跡)が得られる。この膨大な数値データをうまく加工することで、ペプチドの挙動が明らかになる。まず、Sculpin-COO-とSculpin-NH₂をマクロに比較するために、根平均二乗変動(Root Mean Square Fluctuation, RMSF)のプロットを試みる(atomicfluct コマンド)。これは平均構造からのずれを表し、構造が平均構造からどの程度変動しているかを表す指標となる。

図2はSculpin-COO- (赤色)とSculpin-NH₂ (緑色)のRMSFをそれぞれ表す。横軸はアミノ酸残基番号である。縦軸は平均構造からのずれを示し、次元は距離(単位はnm)である。図2のC末端側(16, 17番目のアミノ酸)に着目すると、Sculpin-COO-がSculpin-NH₂よりも、そのRMSF値が大きいことが分かる。これはSculpin-COO-のC末端が平均構造から大きく変動し、Sculpin-NH₂のC末端は平均構造から相対的にそれほど変動していないことを意味する。

次に、RMSF値により得られた結果(図2)が妥当かどうか、さらにマイクロに解析する。よく知られているように、 α ヘリックスはアミノ酸3.6残基で1回転する。この事実から、17番目のCa原子と、1回転前の13番目または14番目のCa原子の間の距離を解析することにより(distance コマンド)、構造の安定さ(分子的な堅さ)を考察してみる。ここでは、13番目と17番目のアミノ酸残基のCa原子に着目する。

図3はSculpinの13番目および17番目のアミノ酸残基におけるCa同士の距離の時間発展を示す。約2ns以降の時間において、図3(a)ではCa同士の距離が1.0nm付近で大きく変動していることが分かる。一方、図3(b)では、Ca同士の距離が0.6nm付近で変動している。また、その変動の度合いもSculpin-COO-がやや激しく、Sculpin-NH₂が緩やかである。つまり、C末端側の α ヘリックス1回転分において、Sculpin-NH₂がSculpin-COO-と比べて、あまり変動せず、その構造がコンパクトであることが分かる。従って、構造が安定していることから、Sculpinはアミド化した方がその生物活性が高いということが示唆される。

おわりに

物理現象を記述する微分方程式、数値シミュレーションの意味を述べ、そしてMD法、MDシミュレーションを簡単に説明した。既に報告されたハチ毒ペプチドEMP-AFの研究成果⁵⁾を踏まえ、最近発見された新たなSculpin²⁾に対してAmberを用いて同様な解析を試みた。

SculpinはEMP-AFと同様の結果が得られるのではないか、と仮説を立てた。MDシミュレーションの結果、Sculpin-NH₂のC末端側の挙動がSculpin-COO-と比べて、構造がコンパクトで変動の度合いも小さいことが

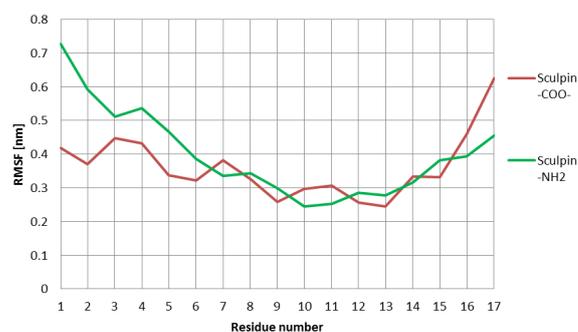


図2 Sculpin-COO- および Sculpin-NH₂における根平均二乗変動。

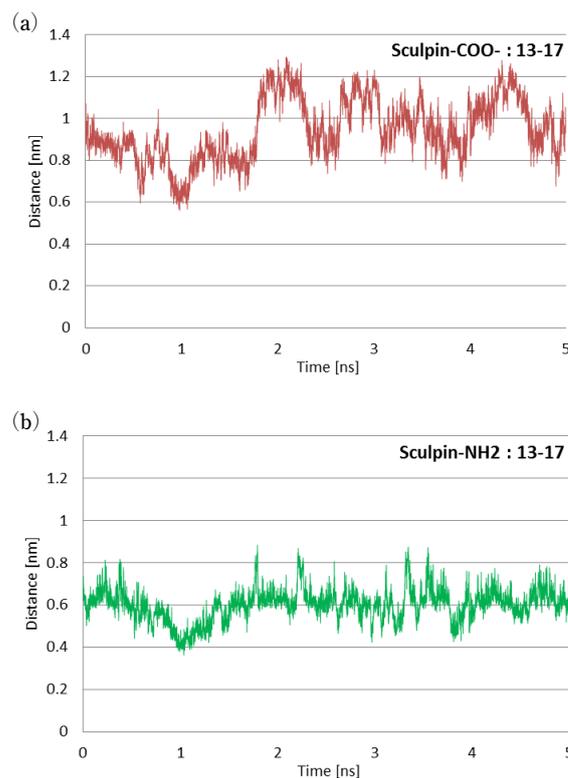


図3 (a) Sculpin-COO-と (b) Sculpin-NH₂の13番目および17番目のアミノ酸残基におけるCa間の距離の時間発展。

ら、分子的に堅いということが明らかになった。まだ解析途中ではあるものの、EMP-AFと同様の結果であり、この仮説はおおむね正しいことが確認された。従って、2つのペプチドの多様性のある生物活性が両親媒性 α ヘリックスの構造的な摂動に関係すると考えられる。

本研究は富山大学工学部4年生の井口さんが熱心にMDシミュレーションに取り組んでくれたおかげであり、富山大学和漢医薬学総合研究所の紺野教授および梅畚准教授の暖かいご支援による賜物である。改めてここに深く感謝いたします。

参考文献

- 岡崎 進, 吉井範行「コンピュータ・シミュレーションの基礎(第2版)」(化学同人, 京都, 2011)
- 紺野勝弘 *et al.*, 第54回天然有機化合物討論会, P-44

(2012)

- 3) Case, D. A. *et al.*, *J. Computat. Chem.* **26**, 1668-1688 (2005)
- 4) Amber 研究会「Amber による生体高分子シミュレーション入門」(サイエンスハウス, 東京, 2011)
- 5) Sforca, M. L. *et al.*, *Biochemistry* **43**, 5608-5617 (2004)
- 6) Cerovsky, V. *et al.*, *ChemBioChem* **9**, 2815-2821 (2008)
- 7) Stoklin, R. *et al.*, *Toxicol* **55**, 20-27 (2010)

はるき たかゆき
富山大学大学院理工学研究部 (工学)
シミュレーション工学
haruki@eng.u-toyama.ac.jp

ドッキングシミュレーションによる 酵素化学修飾分子のデザイン

はじめに

ドッキングシミュレーションは創薬研究の分野で利用されており, 製薬企業などが所有している化合物ライブラリーの中から候補化合物を絞り込む最初の段階で実施されることが多い。実際, 何百万という化合物に対して最初から実験によるスクリーニングを実施していたら, とてつもない時間がかかってしまうが, コンピュータで行うシミュレーションで, ある程度化合物候補を選択できるならばコストと時間の節約となる。ドッキングシミュレーションの手法は, このような背景のもとに盛んな研究・開発が行われてきた。また, ドッキングシミュレーションの手法を用いて, 標的タンパク質に対する膨大な種類のリガンド化合物のスクリーニングを行うことを「バーチャルスクリーニング」とも呼んでいる。コンピュータの性能が良くなり, 大学の研究室で使用できるレベルのコンピュータ能力でシミュレーションの実施が可能となったこともあり, ドッキングシミュレーションが研究手法として利用されるようになってきている。

ここでは, 手軽に使用できるようになったドッキングシミュレーションの概要を説明し, 計算化学と実験との共同研究の例として, 酵素阻害剤を利用した選択的な化学修飾 (bio-conjugation) 分子の設計を紹介する。

ドッキングシミュレーションについて

ドッキングシミュレーションは分子力学計算の応用として分類される。通常の分子力学計算においては, 分子中の原子をそれぞれの核種に対応した電荷として設定し, ある立体構造における物理化学的数値をシミュレーションするものである。それに対して, ドッキングシミュレーションでは分子中の原子は電荷として扱うが, 原子間をつなぐ共有結合を回転可能な棒として考え, その分子が取りうる様々な立体構造を再現する。さらに, 結合相手であるタンパク質分子は, PDBなどの立体構造情報をもとに電荷分布が伴った立体的分子表面として計算されることとなる。概念的

には, 標的タンパク質の分子表面上を, リガンド候補の分子が様々な構造をとりながら配位し, エネルギー的に安定な構造を求めるといったものである。

現在, 一般にドッキングシミュレーション・プログラムとして利用されているものには「DOCK¹⁾」, 「Flex²⁾」, 「GoLD³⁾」, 「AutoDock⁴⁾」などのプログラムが存在する。それぞれのプログラムには特徴があり, シミュレーションの条件によってプログラムを使い分けたり, 複数のシミュレーションプログラムを組み合わせることで研究を実施したりしている例もある。

今回の報告で利用したドッキングシミュレーション・プログラムは「AutoDock」である。このプログラムは学術機関ならば無料で利用できるプログラムであり, その概要を図1に示す。近年, このプログラムを利用した論文が多く発表されており, 現在ではAutoDockの発展版である「AutoDock Vina (<http://vina.scripps.edu/>)」も利用することが可能である⁵⁾。

キモトリプシンの化学修飾分子の開発

現在我々の研究室では, 富山大学工学部環境化学研究科小野研究室と共同で, キモトリプシンに対する機能的化学修飾剤の研究・開発を実施している。キモトリプシンの活性部位付近のLys175を選択的に化学修飾するPhe型のホスホネート修飾剤についてAutoDockを利用して設計したところ, Ala2つをスペーサーとする図2のような分子を得ることができ, 実際の実験においてもその化学修飾による効果を確認することができた⁶⁾。以下では, キモトリプシン化学修飾剤のドッキングシミュレーションによるデザインの過程について記し, コンピュータを利用した分子設計の可能性について述べる。

我々がデザインしようとしているキモトリプシン化学修飾剤は, キモトリプシン活性基のSer195と反応して酵素を失活させるが, その際に活性エステルがターゲットのLys175と反応し, 共有結合を作る (図2)。さらに2-Pyridinealdoxime methiodide (PAM) を加えると, キモトリプシンに結合した修飾分子への求核攻撃が起こり, 活性Serが再活性化する。この時, 修飾分子はターゲットLysと結合したまま残る。

本研究では, 上記のようなキモトリプシン化学修飾を実現するために, キモトリプシンのX線回折による立体構造解析データを利用した (PDB ID: 1gg6,

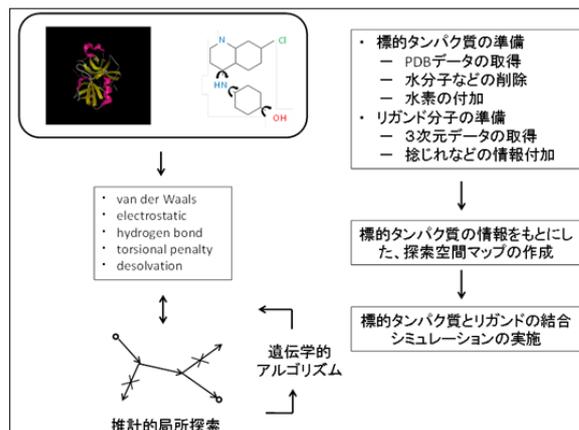


図1 AutoDockの概要。

1ab9)。両方のPDB IDモデルにおいて、Lys175はキモトリプシンの活性サイトと近接しており、かつ、1ab9の構造データではペントペプチド阻害剤 (TPGVY) が結合する方向と一致しているため、化学修飾のターゲットとした。また、化学修飾分子のもう一方の末端と相互作用するSer195と、Lys175との距離がPDBデータから約1 nmと見積もることができたので、化学修飾分子のスペーサー部分 (図2: X₁-X₂) のアミノ酸残基数を1 ~ 3残基とした。

このような条件のもとに、図3に示すような分子をデザインし、AutoDockを使ってキモトリプシン化学修飾分子のドッキングシミュレーションを実施した。ドッキングシミュレーションによる結合モデルの評価は、① Phe部分が活性ポケットに入っているか、② Ser195とそれが相互作用するリガンド原子が近接しているか、③ Lys175とそれに対する反応基にあたるSuc基が近接しているかといった、化学修飾に必要な3条件を指標として、化学修飾分子としての有用性を比較した。

その結果、Suc-Ala-Ala-L-Phe^P(OPh)₂という分子が化学修飾候補となった。この分子は、結合親和エネルギーが、デザインした分子の中では一番低い値であり、結合状態のモデルも上記3つの条件をみたすものであった (図5-A)。実際の実験においても、Suc-Ala-Ala-Phe^P(OPh)₂で化学修飾されたキモトリプシンは、*k*_{cat}は1/100程度に低下したが、*K*_mはほとんど変化がなかった。これは、キモトリプシンの化学修飾によって、基質の性質 (分子の大きさなど) に対応した酵素活性を調節できるようになったと考えられる。また、化学修飾したキモトリプシンの限定分解後の質量分析でも、Lys175に共有結合した化学修飾分子の存在が認められている。

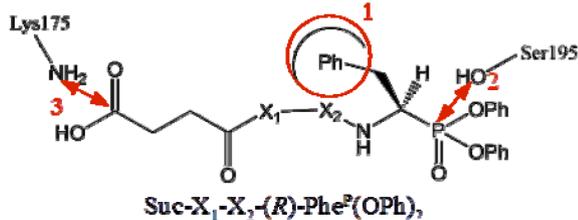


図2 キモトリプシン化学修飾分子とその機能。

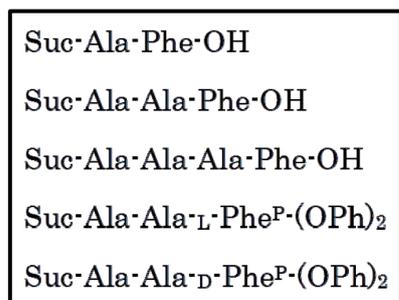


図3 ドッキングシミュレーションを実施したキモトリプシン化学修飾分子。

さらに有効な化学修飾分子を求めて

Ala以外に様々なアミノ酸残基をスペーサーに用いた場合についてドッキングシミュレーションを行うことで、より化学修飾に適した阻害剤を探索した。Ala, Gly, Val, Ser, Lys, Gluの6種類のアミノ酸を組み合わせて、2残基のスペーサーを持つ36種類のホスホネート誘導体 (図4) を候補に選んだ。

各候補についてAutoDockによるドッキングシミュレーションを行い、キモトリプシン (PDB ID: 1gg6) に対する低エネルギーの結合モデルを90通りずつ得た。1つ1つの結合モデルは、すでに記した化学修飾に必要な3条件を踏まえた上でプログラミングにより解析し、その特徴ごとに統計をとり、化学修飾分子としての有用性を比較した。

3条件を全て満たした結合モデルは、X1およびX2にそれぞれVal, Ala残基を用いた場合に多く見られた。さらにその結合エネルギーを確認したところ、Ala-Alaのスペーサーを持つリガンドでは-7.4kcal/molなのに対し、Val-Alaの方は-7.3 ~ 7.4kcal/molと差はあまり無く、Ala-Alaに比べて3条件を満たす結合モデルが多いことから、Val-Alaがより化学修飾に有効であろうことが推測できた (図5-B)。さらにキモトリプシンの化学修飾に関しては、分子動力学 (MD) シミュレーションを用い、Lys175に結合した阻害剤の様子を調べる手法の探索も行っている。

和漢薬のバーチャルシミュレーション

ここで紹介した研究の他に、我々の研究室では和漢薬の有効成分に関するデータベースを作成している (図6, 3D Structure of Natural Product Molecule: <http://wakanmovieview.inm.u-toyama.ac.jp/wakan/movieview/>)。このデータベースは、和漢薬の有効成分に関する化学的情報、生物・薬学的情報を記載したものであり、研究的データとして、ヒトゲノム全タンパク質とのドッキングシミュレーションの結果も、順次公開していく予定である。

参考文献

- 1) Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol.* 1982 Oct 25; 161(2): 269-88.
- 2) Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins.*

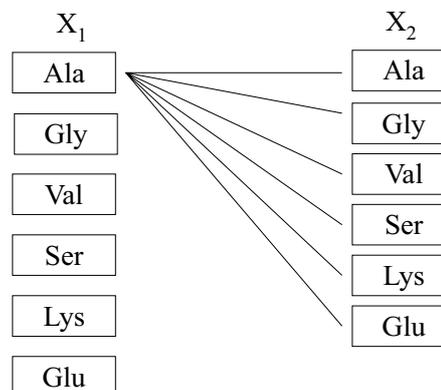


図4 シミュレーションを行ったアミノ酸の組み合わせ。

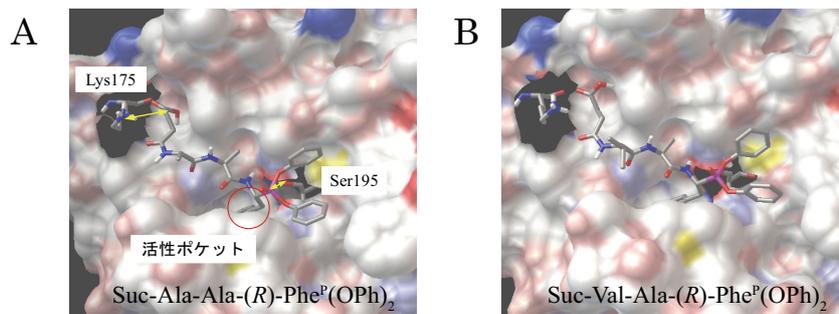


図5 AutoDockによるシミュレーション結果.

図6 和漢薬有効成分に関するデータベース：3D Structure of Natural Product Molecule.

2006 Oct 1; 65(1): 15-26.

- 3) Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.* 1997 Apr 4;267(3): 727-48.
- 4) Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, et al. (1999) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19: 1639-1662.
- 5) Chang MW, Ayeni C, Breuer S, Torbett BE. Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS One.* 2010 Aug 4;5(8).
- 6) 小野 慎, 梅壽 (多田) 雅人, 「最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用」, 161-165. メディカルドゥ大阪, 2012

日本ペプチド学会第16回ペプチドフォーラム

「ペプチドと膜とのインタープレイ：新しい視点と可能性を探る」

日時：2012年12月21日 (金)

午後1時～5時半

場所：京都大学宇治キャンパス
宇治おうぼくプラザセミナー室

主催：日本ペプチド学会

協賛：日本化学会, 日本薬学会

オーガナイザ：二木史朗 (京大化研), 松崎勝巳 (京大院薬)



二木 史朗

近年、細胞膜や脂質分野の研究の発展により、生体膜のダイナミクスやこれを誘導するタンパク質や脂質の要因が次第に明らかになって来ています。一方では、化学・計算化学分野においても膜構造とその変化を理解し、誘導する方法論の開発が試みられています。細胞生物学、脂質生化学、ペプチド化学、脂質化学、計算化学などをバックグラウンドとする関連の先生に話題を提供いただき、生体膜のダイナミクスを誘導する化学・生物学的要因やこれを制御する方法論を考える契機となることを期待し、今回のフォーラムを開催しました。年末の、かつ、アクセスが必ずしも良くない場所での開催であったにもかかわらず、大学関係者のみならず、企業からの参加者約10名を含め、計79名の方にご参加頂き、非常に盛況であったと思っております。「ペプチドフォーラム」は、広くペプチドに関連する科学やペプチド学会の活動について紹介を

うめざき まさひと
富山大学 和漢医薬学総合研究所
民族薬物研究センター 国際共同研究分野
masume@inm.u-toyama.ac.jp

行うことを目的として、学会員から企画を募っています。また、開催に当たっては日本ペプチド学会から補助金も支給されます。このようなフォーラムを開催することで、関連分野の研究者の新たな交流の機会が広がることも期待されますので、会員の皆様にはこの制度を積極的にご活用頂き、様々なフォーラムをご提案・ご企画頂ければと思っております。なお、過去のペプチドフォーラムの情報や応募方法に関しては、学会ホームページ (<http://www.peptide-soc.jp/top.html>) をご参照下さい。

講演者と講演タイトル

伊藤俊樹 (神戸大医)

「生体膜の形状変化を誘導、感知するタンパク質の機能」

梅田真郷 (京大院工)

「リン脂質結合性ペプチドの創成とその細胞生物学への応用」

中戸川仁 (東工大生命理工)

「オートファジーの分子機構：Atgタンパク質群が引き起こすダイナミックな膜形成」

村田道雄 (阪大理)

「脂肪酸結合タンパク質の不思議な基質認識機構」

松崎勝巳 (京大薬)

「ガングリオシドクラスターを介した毒性型アミロイドβペプチド凝集体の形成機構」

星野忠次 (千葉大院薬)

「アミロイドβペプチドとGM1ガングリオシド/コレステロール含有脂質膜との相互作用に関する計算機シミュレーション」

篠田 渉 (産総研)

「階層的分子シミュレーションによる脂質膜・ベシクルの研究」

二木史朗 (京大化研)

「アルギニンペプチドの細胞膜透過とその要因」



ふたき しろう
京都大学化学研究所
生体機能化学研究系 生体機能設計化学
futaki@scl.kyoto-u.ac.jp

第17回ペプチドフォーラム

「ケミカルバイオロジーを先導する明日のペプチド科学：新しい接点と可能性を探る」

ケミカルバイオロジーは化学と生物の融合による研究領域であり、最近急速に進展している。また、ケミカルバイオロジーは有機化学的概念や手法、有機化学によって得られた化合物を活用して生命現象を解明・制御する研究であり、生体機能分子の中でも重要なウェイトを占めるペプチド・タンパク質の科学と密接に関係している。今回、ペプチド科学を活用してケミカルバイオロジー研究を進めている先生方に話題を提供いただき、ペプチドを基盤とした生命志向型化学を先導する学術・方法論を考える契機となることを期待し、標記フォーラムを開催する。また、この研究領域は世界的にも注目されていることに関連し、欧米で活躍する先生にも最近のトピックスを提供いただく。

日時：2013年6月18日(火) 13:00～17:30

場所：東京医科歯科大学生体材料工学研究所

第二会議室

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/index.html>

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/access/index.html>

主催：日本ペプチド学会

共催：日本薬学会，日本化学会

後援：日本ケミカルバイオロジー学会

参加費：無料

講演予定者：

Ines Neundorf (University of Cologne)

E. James Petersson (University of Pennsylvania)

小出隆規 (早稲田大先進理工)

相馬洋平 (東大院薬)

野村 渉 (東京医歯大)

林 良雄 (東薬大)

玉村啓和 (東京医歯大)

オーガナイザー：玉村啓和 (東京医歯大)

林 良雄 (東薬大)

連絡先：〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

メディシナルケミストリー分野

Tel.: 03-5280-8036

Fax: 03-5280-8039

Email: tamamura.mr@tmd.ac.jp

URL: <http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/molb/molbj.html>

【第45回若手ペプチド夏の勉強会 開催のお知らせ】

2013年夏、第45回若手ペプチド夏の勉強会を東京にて開催いたします。

今回の会場は、あの2009年以来“再び”の東京都八王子市「八王子セミナーハウス」です。

若手ペプチド研究者からの発信を中心に、ペプチド研究の基礎からケミカルバイオロジー、創薬などの領域への広がりについて昼夜の活発な討論を通じて若手力増強を図る勉強会を目指して鋭意準備を進めていま

す。研究室で充実した日々を過ごしている方、悶々としている方、熱すぎて煙たがられている方、それぞれ集まり、お互いの研究を発表しあいペプチド研究の仲間を作りませんか？皆さまのご参加をお待ちしています。

日時：平成25年7月28日（日）～30日（火）

場所：八王子セミナーハウス

（公益財団法人 大学セミナーハウス）

〒192-0372 東京都八王子市下袖木1987-1

TEL 042-676-8511, FAX 042-676-8532

<http://www.seminarhouse.or.jp>

（JR 東京駅→JR 八王子駅：50分、

JR 八王子駅→施設：約20分（バス））

*参加方法等の詳細に関しては、追ってメール等にてお知らせ致します。

世話人：野村 渉（東京医科歯科大学・“玉村”研究室）

鳴海哲夫（東京医科歯科大学・“玉村”研究室）

（お問い合わせはE-mail: nomura.mr@tmd.ac.jp（野村）

までお願い致します）

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-8686 箕面市稲4-1-2

（株）千里インターナショナル内

編集委員

野水 基義（担当理事）

（東京薬科大学薬学部）

TEL・FAX 042-676-5662

e-mail: nomizu@toyaku.ac.jp

日高 雄二（近畿大学理工学部）

TEL 06-6721-2332, FAX 06-6723-2721

e-mail: yuji@life.kindai.ac.jp

今野 博行（山形大学大学院理工学研究科）

TEL 0238-26-3131, FAX 0238-26-3131

e-mail: konno@yz.yamagata-u.ac.jp

松島 綾美（九州大学大学院理学研究院）

TEL 092-642-4353, FAX 092-642-2607

e-mail: ayami@chem.kyushu-univ.jp

小野 慎（富山大学大学院理工学研究部（工学））

TEL 076-445-6845, FAX 076-445-6845

e-mail: shinono@eng.u-toyama.ac.jp

（本号編集担当：小野 慎）