

# 分子動力学シミュレーションで探る天然変性タンパク質の 準安定複合体構造と結合解離調節機構

梅澤 公二

信州大学大学院総合理工学研究科生命医工学専攻生命工学分野

**要約** 天然変性タンパク質は従来の折りたたまれるタンパク質とは異なり、一定の立体構造に折りたたまれない。とてもやわらかい立体構造をもつと言い換えることができる。pKID（リン酸化 kinase-inducible domain）は典型的な天然変性タンパク質である。pKID 単体は生理的条件下で折りたたまれない。しかし、pKID は結合相手タンパク質 KIX（KID-interacting domain）との結合時には安定な一つの立体構造に折りたたまれる。この現象を結合と共役した折りたたみと呼ばれる。pKID-KIX 複合体形成は実験的にもよく研究されており、pKID-KIX 複合体構造は核磁気共鳴分光法によって特定されている。しかし、その最安定な複合体構造の他に準安定な複合体構造が示唆されていたが、その準安定な複合体構造の詳細は不明なままであった。そこで、詳細な計算モデルを用いて、pKID の KIX 結合状態における自由エネルギー地形の算出を実施した。自由エネルギー地形とはある反応座標を軸にして、その軸上における自由エネルギー変化を図示したものである。ここでは、計算構造と実験構造の差を反応座標にとり、pKID-KIX 結合状態の自由エネルギー地形を求めた。その結果、準安定な領域を示し、その具体的な立体構造を示すことができた。さらに、pKID のやわらかさが pKID-KIX 間結合に与える影響を粗視化モデルを用いて明らかにした。pKID 粗視化モデルに分子のやわらかさを導入し、分子のやわらかさを変化させたときの pKID-KIX 間結合解離速度および結合自由エネルギーの変化を求めた。その結果、分子のやわらかさは結合速度よりもむしろ解離速度を上昇させる効果が強く、pKID-KIX 間結合自由エネルギーを上昇させることを示した。本稿では、ここで使用してきた計算モデルを簡単に紹介する。今後、天然変性タンパク質のような様々な立体構造を形成する“やわらかい”生体分子の立体構造集団と相互作用機構を解明する上で、分子動力学シミュレーションは役立つと思われる。

**キーワード：**タンパク質-タンパク質間相互作用、結合と共役した折れたたみ、分子認識、自由エネルギー地形

## 1. はじめに

一般的なタンパク質は天然構造と呼ばれる一つの特異的な立体構造に折りたたまれる。天然構造の多くにはその三次元構造の内部に疎水性コアと呼ばれる疎水性アミノ酸残基が豊富な空間がある。疎水性コアは折りたたみの核とも呼ばれ、二次構造形成と同様に、タンパク質が天然構造を形成するために重要な特徴である。また、タンパク質は高温や変性剤存在下で変性する。変性状態では疎水性コアは溶媒に露出し、二次構造の形成率も低下する。変性の程度が弱い可逆的変性の場合、一度変性したタンパク質は温度を室温に戻すことや変性剤を取り除くことで再び天然構造へ折りたたまれる。このことからタンパク質の天然構造は室温における自由エネルギー

的に最安定な立体構造であると考えられている。

一方で、従来のタンパク質とは異なり、生理的条件下において一つの立体構造に折りたたまれない状態で機能するタンパク質が存在する。そのようなタンパク質は、室温および変性剤非存在下において、もともと二次構造形成率が少なく、疎水性コアとなりうる疎水性アミノ酸がアミノ酸配列中に少ない。温度を上昇させても、変性状態への典型的な二状態転移（構造形成している（天然）状態と形成していない（変性）状態の二状態間の構造転移）は観察されない。これらの特徴から天然変性タンパク質と呼ばれる。天然変性タンパク質の英語表記は、Naturally unfolded protein など様々であったが、近年では Intrinsically disordered protein に統一されるようになってきた。天然変性タンパク質は構造ゆらぎが大きく、結晶化が困難であり、そのままでは X 線結晶解析による立体構造決定が適用できない。そのような、X 線結晶解析によって原子座標が決定で

受理日 2016年11月21日

採択日 2017年1月25日

きないタンパク質の一部の領域は天然変性領域 (Intrinsically disordered region) と呼ばれる。また、天然変性タンパク質の呼称は天然変性領域を切り出した断片に対しても使われる。

このようにアミノ酸配列が従来のタンパク質とは異なることから、バイオインフォマティクスの研究によってアミノ酸配列上の天然変性タンパク質/領域を予測するプログラムが開発され、公開されている (PONDR-FIT<sup>1)</sup>など)。また、天然変性タンパク質のデータベースも公開されている (Disprot<sup>2)</sup>や IDEAL<sup>3)</sup>など)。アミノ酸配列解析の研究から天然変性タンパク質/領域の生物学的な特徴が示されている<sup>4)</sup>。その特徴として、天然変性タンパク質/領域は真核生物のタンパク質に多く存在すること、従来のタンパク質と比べてシグナル伝達系や転写活性に関与する人が多いこと、タンパク質-タンパク質間相互作用ネットワークのハブとなる人が多いこと、翻訳後修飾を受ける部位に多いこと、疾患に関連していることが多いことが挙げられている。これらの特徴から、近年、天然変性タンパク質/領域の研究に注目が集まっている。

これまでのタンパク質研究では立体構造を解明することで結合相手分子との分子認識機構が示されてきた。しかし、天然変性タンパク質は単体では特異的な立体構造を形成しない。そこで、どのように結合相手と相互作用するのか、従来のタンパク質とは結合機構や分子認識機構においてどのような差異があるのかなどの疑問が上がり、構造生物学の研究者らの興味を引いている。中でも、天然変性タンパク質の pKID (phosphorylated kinase-inducible domain, cAMP-応答配列結合タンパク質 (CREB) のリン酸化 kinase-inducible domain) は結合相手タンパク質 KIX (CREB 結合タンパク質の KID-interacting domain) との複合体形成時に一つの特異的な立体構造へ折りたたまれることが核磁気共鳴分光法 (NMR) によって明らかとなり<sup>5)</sup>、結合と共役した折りたたみ現象が知られることとなった。結合と共役した折りたたみ現象は他の天然変性タンパク質でも報告されている<sup>6)</sup>。

このように天然変性タンパク質は単体では一定の立体構造を形成せず、結合相手とは複合体構造を形成する。言い換えれば、天然変性タンパク質は単体では非常にやわらかい立体構造をもち、複合体形成時にはその柔軟性が抑えられる。つまり、従来のタンパク質との差異を生み出しているのは立体構造の柔軟性であり、立体構造の柔軟性と分子認識機構の

関連性を解明できれば、天然変性タンパク質が上記の生物学的特徴を備えて生体内で効率的に働く理由の解明に繋がるだろう。

分子シミュレーションによる研究では目的に応じて分子モデルと計算アルゴリズムを適切に用いることで、実験と整合性の合う詳細な立体構造集団を算出することができる。実験から示唆された立体構造の詳細が判別できない場合に、分子シミュレーションから得られた立体構造が役に立つ。また、研究目的に関わる因子 (例えば、タンパク質のやわらかさ) を分子モデルへパラメータとして人為的に組み入れることで、パラメータを変化させたときの応答から因子がもたらす効果を対比して明確に (例えば、因子を横軸にその応答を縦軸に) 示すことができる。このように分子シミュレーションは、分子間相互作用のメカニズムを理解するための研究ツールとなっている。分子シミュレーションは最適な計算モデルを応用することで、まさに計算機を用いた“実験”を行うことが可能となる。

本総説は天然変性タンパク質の pKID を中心に分子シミュレーションを用いた2つの研究例を述べる。次節では pKID-KIX 複合体形成のこれまでの研究を概説する。第3節では、全原子モデルを用いた研究例として、pKID-KIX 複合体の準安定複合体構造の探索と自由エネルギー地形について述べる。第4節では、タンパク質の粗視化モデルを簡単に紹介する。第5節では粗視化モデルを用いた研究例として、pKIDのやわらかさと KIX 結合自由エネルギーおよび結合解離速度の関連性について述べる。最後に第6節では、本総説のまとめと分子計算の今後の展望を述べる。

## 2. 天然変性タンパク質 pKID の KIX 複合体形成

天然変性タンパク質 pKID のアミノ酸配列は CREB の100-160番残基に位置する天然変性領域に由来する。133番セリンがリン酸化されると、非リン酸体より強く相手タンパク質 KIX に結合する (解離定数  $K_d$  値で  $120\mu\text{M}$  から  $3\mu\text{M}$  へ変化<sup>7)</sup>)。KIX との最も安定な複合体構造<sup>5)</sup> (図 1.(a)) において、pKID の119-146番配列 (図 1.(b)) は  $\alpha$ -ヘリックス2つをもつ一つの立体構造へ折りたたまれる。N 末端側ヘリックスを  $\alpha A$ 、C 末端側ヘリックスを  $\alpha B$  と呼ばれる。この119-146番配列は pKID-KIX 複合体構造を形成する最小単位とされ、天然変性タンパク質の代表モデルとしてよく用いられている。

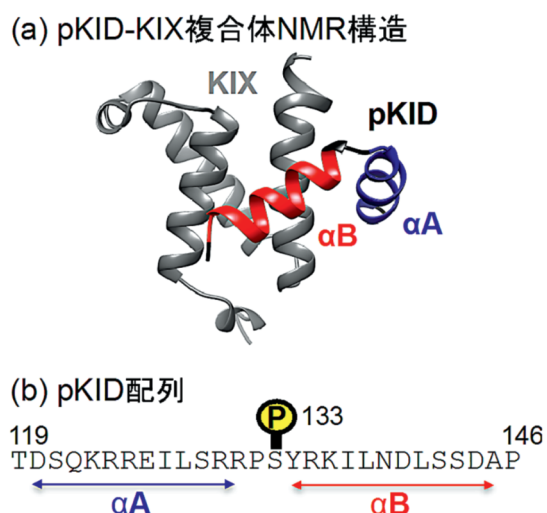


図1. 天然変性タンパク質 pKID の KIX 複合体実験構造とアミノ酸配列

(a)核磁気共鳴分光法 (NMR) によって決定された、天然変性タンパク質 pKID が KIX 結合時に折りたたまれた複合体の立体構造 (PDB ID: 1kdx) を示す。pKID はヘリックスループヘリックス構造を形成している。pKID の N 末端側ヘリックスを  $\alpha A$ 、C 末端側ヘリックスを  $\alpha B$  と記す。(b) pKID のアミノ酸配列を示す。133 番セリンのリン酸化サイト、 $\alpha A$  領域および  $\alpha B$  領域を示す。

単体では安定構造を取らない pKID はいったいどのようにして KIX 複合体構造へ折りたたまれるのであろうか? 2通りの結合様式が考えられる。一つ目は、pKID の遊離状態の構造集団に含まれる一部の複合体類似構造が KIX との複合体形成へと向かう場合である。もう一つは複合体類似構造をとらないまま、KIX との接触を経て KIX 表面上で折りたたまれる場合である。つまり、前者は結合より先に折りたたまれていることを、後者は結合後に折りたたまれていることを意味する。実際、NMR を用いた研究によって結合後にアミノ酸残基ごとに折りたたまれる結合様式が報告されており、pKID の  $\alpha B$  領域に位置するアミノ酸残基が KIX 結合の初期に関与し、その後、KIX 表面上で  $\alpha B$  ヘリックスに折りたたまれることが示された<sup>8)</sup>。しかし、pKID-KIX 結合初期において、KIX 側の pKID 初期結合領域は最終的な結合領域とは異なる位置にあり、そのような結合初期に関与する準安定な複合体構造の詳細までは明らかにならなかった。そこで、我々は KIX 表面上における pKID 結合状態の立体構造集団を詳細な分子モデルで再現することを試みた<sup>9)</sup>。

pKID は遊離状態において、 $\alpha B$  領域は  $\alpha A$  領域よりもヘリックス形成率が低く、より不規則な立体

構造を形成している<sup>10)</sup>。この  $\alpha B$  領域の高い不規則性が、KIX へのすばやい結合を可能にしていると考えられている。その理由として、フライキャスティング機構が関与していると考えられている。フライキャスティング機構は、不規則な立体構造であるほど早い結合を可能になることが提唱された理論モデルである<sup>11)</sup>。不規則な立体構造はあたかもフライフィッシングの糸のように、距離の離れた結合相手を捕まえることができるからと考えられている。しかし、素早く結合できるからと言って、天然変性タンパク質は強い結合 (高い結合親和性) を示すわけではない。むしろ、pKID-KIX の結合親和性は解離定数として  $\mu M$  程度であり、決して強い結合ではない。

天然変性タンパク質は、pKID のリン酸化のように、翻訳後修飾をうける場合が多い。pKID ではリン酸化をうけることで KIX との親和性が上昇する。その親和性上昇の機構として、リン酸基による分子間と分子内の相互作用が関与している。分子間では相手分子とのリン酸基を介した塩橋が働き、親和性上昇に寄与する。分子内ではリン酸化によって遊離状態における pKID の立体構造集団のうち KIX 複合体時の構造に近い割合が増えると考えられている<sup>12)</sup>。つまり、簡単に述べれば、リン酸化によって分子内の不規則性 (やわらかさ) が抑えられることで、KIX とより強い親和性を示すことができるようになる。このように、リン酸化によって分子内のやわらかさを変化させることで相手との結合親和性を円滑に調節しているものと考えられている。そこで、我々は分子内のやわらかさをもたらす結合親和性調節機構に着目し、粗視化モデルを用いた計算機実験を行なった。第5節にその研究例を紹介する。

### 3. 全原子モデルによる pKID-KIX 結合状態の自由エネルギー地形

本節では、pKID と KIX の結合構造集団を求めた研究例<sup>9)</sup>を紹介する。まず初めに計算モデルについて述べる。計算モデルには全原子モデルを用いた。全原子モデルとは原子1つを1つの粒子として取り扱うモデルである。その粒子には原子タイプごとにファンデルワールス半径と部分電荷などの物理化学的パラメータが割り振られている。原子タイプは、同じ原子の種類であってもその原子が含まれる官能基や結合様式ごとに異なっている。例えば、アルカンの炭素とカルボニル基の炭素はそれぞれ異なる原子タイプが割り振られている。原子タイプとその物

理化学的パラメータを記述したセットを力場と呼ぶ。力場にはタンパク質や核酸に向けて設計されたセット (AMBER 力場など) や化合物全般へ向けて設計された一般力場 (GAFF など) がある。力場の選択は計算結果を左右するため、慎重に選ぶ必要がある。本研究では、AMBER の ff94 と ff96 を混ぜ合わせ<sup>13)</sup>、二次構造形成率が実験に近い結果を与える力場を用いた。全原子モデルの粒子間の非共有結合相互作用は古典物理学に従い、ファンデルワールス相互作用 (12-6 乗型レナードジョーンズの式) と静電相互作用 (クーロンの式) が使用される。

タンパク質のような溶液中の状態をシミュレーションする場合、溶媒の取り扱いには大きく分けて2通りの方法が用いられる。一つはあらわに溶媒分子を全原子モデルとして計算系に取り入れる方法である。溶媒分子を取り入れることで、水分子を介した結合などを再現でき、タンパク質の詳細な水和状態を解析できる利点がある。しかし、欠点は計算コストがかかることである。本研究では pKID-KIX 結合状態を詳細に解析するため、この方法を採用した。水分子力場には広く用いられている TIP3P を選択し、あらわに溶媒分子を計算系に加えた全原子モデル (図2) を用いた。また一方で、あらわに溶媒分子を入れずに、一様誘電体モデルや統計物理の液体モデルとして溶媒効果を取り入れる方法がある。一般的に、このように溶媒効果を取り入れる方法はあらわに溶媒分子を取り入れる方法よりも計算コストを少なくできるため、巨大なタンパク質や長時間における分子の振る舞いを再現する計算に用いられる。

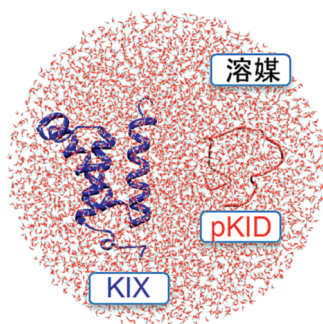


図2. pKID-KIX 全原子モデル

pKID-KIX 結合状態の自由エネルギー地形計算に使用した初期構造を示す。この計算の初期構造には pKID と KIX が離れた状態かつ pKID が変性した状態を用いた。タンパク質および溶媒分子を全原子モデルにて構築している。ここでは、pKID と KIX のタンパク質立体構造はリボン表示にて図示している。溶媒の境界条件には球境界を用い、水滴の中にタンパク質が含まれている状況を模している。

古典的な分子動力学シミュレーションでは、運動方程式に則って計算系を時間発展させる。全原子モデルを用いた場合、計算系内すべての原子ごとにエネルギーとその勾配から力を求める必要がある。その計算に大きなコストがかかってしまい、計算系の大きさ (原子の数) に依存するが、通常の分子動力学シミュレーションでは限られた時間 (数  $\mu$  秒程度) しか再現できない。その限られた時間内では、平衡状態を表す立体構造集団を得ることは難しい。特にこの pKID-KIX 複合体の計算系は、天然変性タンパク質 pKID の内部自由度および KIX との結合の自由度が大きいため、その立体構造集団を得ることは難しい。そこで、我々は拡張アンサンブル法の一つであるマルチカノニカル分子動力学法を用いた。拡張アンサンブル法は限られた時間内にも効率的に構造サンプリングを実施させることで平衡状態における立体構造集団を算出する方法である。

算出した立体構造を解析することで自由エネルギーを求めることができ、一般的にある任意の軸上に自由エネルギー変化を示したものが自由エネルギー地形と呼ばれる。本研究では二軸からなる平面上の自由エネルギー地形を解析した。具体的には、x 軸に計算構造における  $\alpha A$  領域の重心と pKID-KIX 複合体 NMR 構造における  $\alpha A$  領域の重心との距離を、y 軸に  $\alpha B$  領域の重心間距離を用いた自由エネルギー地形を作成した (図3)。x 軸と y 軸の値がゼロに近いほど pKID-KIX 複合体 NMR 構造に近いことを示す。計算結果から、x, y 値がゼロ付近に自由エネルギーが比較的低い領域が見え、計算からも実験構造のような立体構造が安定であることが示された (図3. (a)実線)。さらに、実験から示唆されていた立体構造が、自由エネルギー地形の準安定な領域に位置することを示すこと (図3. (b)破線) ができた。この結果は  $\alpha B$  領域がヘリックスを形成して、KIX の疎水性表面上に結合することを示すものであった。実験構造において  $\alpha B$  領域は KIX の疎水性表面上でヘリックスを形成していることから、この準安定な立体構造は確からしいと考えられる。しかし、この準安定な立体構造の生化学的意義などはまだ明らかではなく、今後のさらなる研究が望まれる。

#### 4. タンパク質の粗視化モデル

本節では、全原子モデルよりもシンプルな計算モデルである粗視化モデルについて、そのモデルの説

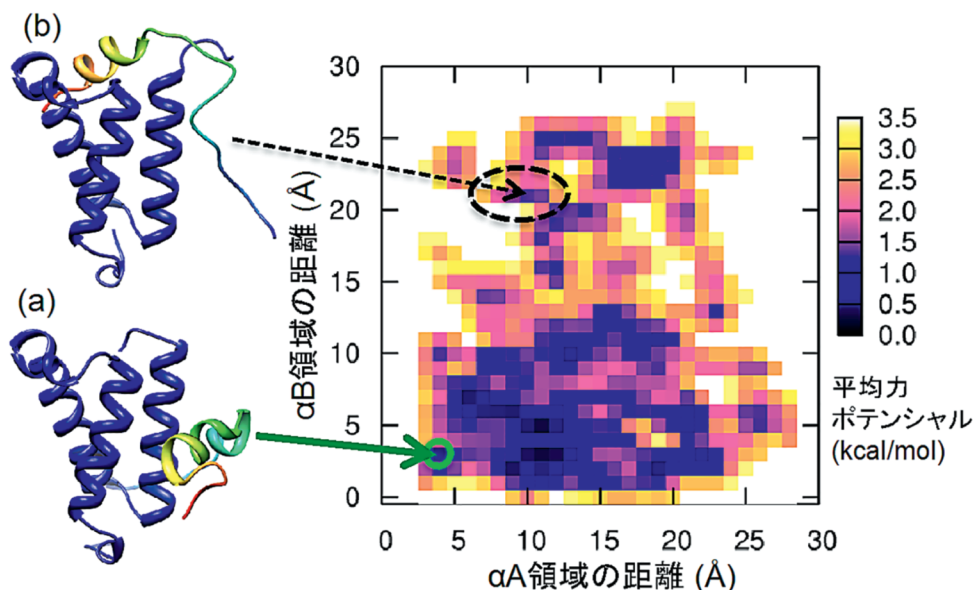


図3. pKID-KIX 結合状態の自由エネルギー地形

x 軸および y 軸には pKID-KIX 計算構造と複合体 NMR 構造のそれぞれ  $\alpha A$  領域および  $\alpha B$  領域の重心間距離を用いた。つまり、x 軸および y 軸の値がゼロに近いほど複合体 NMR 構造に近い計算構造を意味している。図中の濃淡は平均力ポテンシャルを意味しており、自由エネルギーに相当する。x と y が比較的ゼロに近い領域（図中の実線丸）は自由エネルギーが低く、その立体構造(a)は複合体 NMR 構造に類似していた。さらに、準安定な領域（図中の破線丸）として、pKID の  $\alpha B$  領域が KIX 疎水性表面に結合している立体構造(b)が得られた。この pKID 結合部位は NMR 研究から示唆があった結合部位に相当している。なお図中、pKID は虹色リボン表示（N 末を青色、C 末を赤色）で示した。

明と全原子モデルとの差を述べる。粗視化モデルとは、一般的に、全原子モデルにおける原子をあるグループごとに一つの粒子としてまとめて代表する計算モデルの総称である。例えば、タンパク質折りたたみ現象のシミュレーションによく用いられている粗視化モデルとして、郷モデル<sup>14)</sup>がある。郷モデルはアミノ酸残基を構成する原子を一つの粒子にまとめており、粒子の数が残基数に対応する（図4）。計算モデルがシンプルであるため、巨大な系や長時間の現象を再現できること、さらにモデルに変更を加えてその応答から系の挙動を調べることができる。

粗視化モデルには実験構造を鋳型に作成されるものと全原子モデルのように物理化学的なポテンシャルを模して作成されるものに大別される。前者の代表が郷モデルであり、粒子間に働くポテンシャルエネルギーは実験構造が最安定になるように設計されている。これは、タンパク質の折りたたみにおけるフォールディング・ファネル理論<sup>15)</sup>（図5）に基づいている。郷モデルを用いて、これまでにタンパク質の折りたたみ過程について多くの研究がなされ、成果があげられてきた。さらに郷モデルは、タンパク質折りたたみ現象の他にもタンパク質-タンパク質

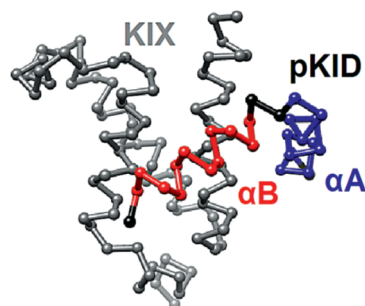


図4. pKID-KIX 粗視化モデル

pKID-KIX 複合体について、粗視化モデルの1つである郷モデルを図示する。アミノ酸1残基を1つの粒子として代表させている。計算系はアミノ酸残基の数と等しい数の粒子のみで構成されている。また、溶媒分子は計算系には入れずに、溶媒効果などは郷モデルのエネルギー関数に含まれていると見なされている。

間相互作用のシミュレーションへ応用されている。一方で、物理化学的ポテンシャルに基づく粗視化モデルは主にタンパク質の天然構造を一次構造から予測するために開発されてきた。全原子モデルのポテンシャルエネルギーを再現するように設計されたエネルギー関数や立体構造データベースの統計から導かれたエネルギー関数が用いられる<sup>16)</sup>。近年では、

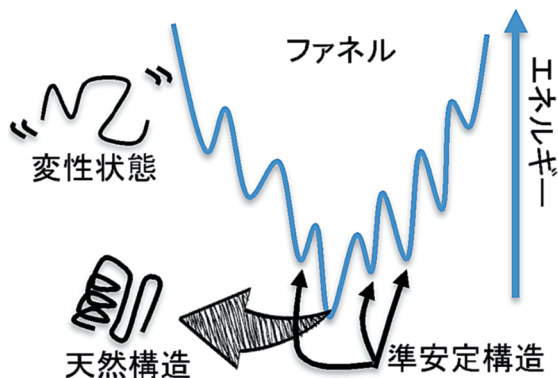


図5. エネルギーファネル理論の模式図

タンパク質の折りたたみ現象の理論モデルであるエネルギーファネルを図示する。タンパク質はエネルギーの高い状態では変性している。変性状態におけるどのような立体構造からも折りたたまれることで、最もエネルギーの低い天然構造に到達できることを示している。また、その周辺に位置する谷底も比較的安定であり、それらは準安定構造に相当する。

タンパク質分子内には郷モデルを用いて、分子間には物理化学的なモデルを用いる粗視化モデルが開発および応用されている<sup>17)18)19)</sup>。

### 5. pKID-KIX 結合解離におけるやわらかさによる調整機構：粗視化モデルの応用例

天然変性タンパク質 pKID が KIX に結合、または解離するとき分子内のやわらかさはどのように働くのだろうか。分子内のやわらかさは結合時に捕獲半径の増加によって早い結合をもたらす（上述のフライキャスティング機構）。一方で、結合時に折りたたまれる pKID は、結合時に分子内のやわらかさ（自由度）が抑えられるので鎖のエントロピーが不利に働く。つまり、結合状態はエントロピー的に損をしており、分子のやわらかさは解離に寄与すると考えられる。実際のところ、pKID のやわらかさは KIX との結合と解離のどちらに大きく作用するのであろうか？その疑問を解決するため、我々は pKID-KIX 複合体の郷モデルを構築し、モデルへ分子のやわらかさを表すパラメータを次のように導入した<sup>20)</sup>。

郷モデルにおいて立体構造を保持するためのエネルギー関数は2つある。一つは、4つの粒子が連続して形成する構造であり、二次構造の保持に寄与するエネルギーである（図6. (a)）。もう一方は、配列上4つ以上離れた粒子間に働くネイティブコンタクトエネルギーである。ネイティブコンタクトエネルギーとは、天然構造において残基間で接触してい

る場合に組み込まれるエネルギーである。具体的には、天然構造において、 $i$  番目と  $j$  番目 ( $j$  は  $j - i \geq 4$  かつ  $j > i$  の条件を満たす) の残基間距離が一定距離 (5 Å) 以内の  $ij$  ペアを特定し、そのペア間距離を平衡距離にもつ12-10乗型レナードジョーンズの式が用いられる（図6. (b)）。つまり、ネイティブコンタクトエネルギーは天然構造の残基間ペアを形成する際に構造安定化に働く引力相互作用である。これら二つのエネルギーを弱めるパラメータを導入することで分子のやわらかさを変化させ、pKID-KIX 結合計算を実施した<sup>20)</sup>。結果は、どちらのやわらかさを増加させた場合においても pKID

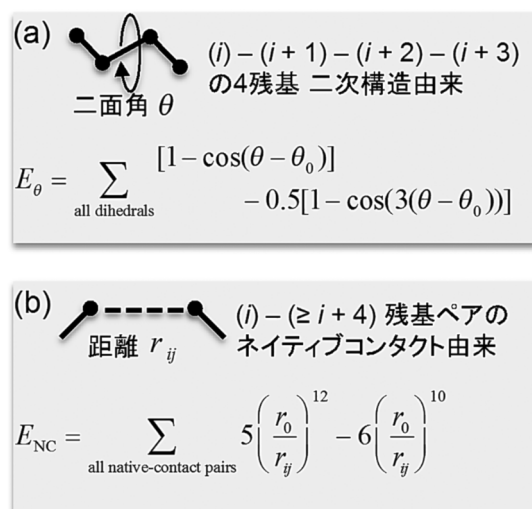


図6. 郷モデルにおける立体構造安定化（構造のかたさ）に寄与する2つのエネルギー

(a)連続した4つのアミノ酸残基が形成する立体構造を天然構造に保持するためのエネルギー  $E_{\theta}$  である。このエネルギーは天然構造の二次構造を保持するように働く。 $\theta$  は4つのアミノ酸残基がなす二面角である。下添字0は天然構造における値を意味する。このエネルギー関数の最小値は  $\theta$  が  $\theta_0$  のときであり、天然構造の二面角をとるときにエネルギーが最も低い。このエネルギーを弱める（1未満の係数をかける）ことで二面角を動きやすくさせ、pKID 分子モデルへ二次構造のやわらかさを導入した。

(b)ネイティブコンタクトのエネルギー  $E_{\text{NC}}$  を示す。 $r_{ij}$  はネイティブコンタクトペアの  $i$  と  $j$  残基間距離である。ネイティブコンタクトペアとは天然構造において残基間距離が5 Å以内の残基ペアを意味する。下添字0は天然構造における値を意味する。このエネルギーは  $r_{ij}$  が  $r_0$  に等しいとき最も小さい値を示し、天然構造のネイティブコンタクトペアの距離を保持するように働く。4残基以上離れた残基間で働き、引力としてアミノ酸残基側鎖間相互作用を模倣している。このエネルギーを弱める（1未満の係数をかける）ことで、pKID 分子内のアミノ酸側鎖間相互作用を弱め、ネイティブコンタクトにやわらかさを導入した。

の KIX への結合速度はわずかながら加速した。このことは、フライキャスティング機構が働いていることを示している。また、逆に pKID-KIX 複合体から計算を始めて、解離までに要する時間を算出した。すると、やわらかさを増すことで、解離速度は著しく加速した。特に二次構造を保持するエネルギーを弱めた（二次構造をやわらかくした）場合に顕著に解離速度が上昇した。さらに、pKID-KIX 間結合自由エネルギー地形を求めた（図 7）。この結合自由エネルギー地形では、pKID-KIX 重心間距離を軸に求めた自由エネルギー変化を示している。結合自由エネルギーの変化からも、二次構造をやわらかくさせたモデルにおいて大きな不安定化が見られた。これらの結果から、分子内のやわらかさは結合速度を加速するよりも解離速度に大きく働き、分子間結合自由エネルギーを上昇させることを示した。本研究では分子内のやわらかさを切り分けることで、特に二次構造のやわらかさを調節することで結合自由エネルギーを制御しやすいことを示した。

このように粗視化モデルは目的の因子をモデルに組み込み、その影響をあらわに示すことができる。ここでは、分子のやわらかさを因子として、分子間相互作用の結合解離速度および結合自由エネルギーへの影響を示すことができた。

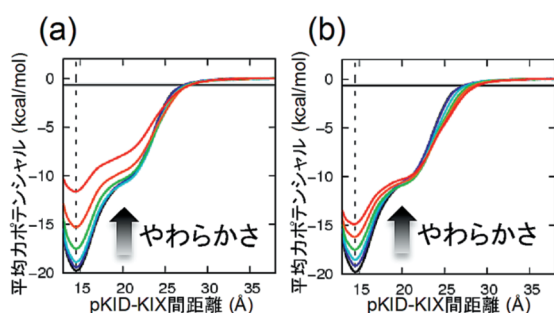


図 7. pKID 分子のやわらかさがもたらす pKID-KIX 結合自由エネルギー地形の変化

x 軸には pKID と KIX の重心間距離を用いた。y 軸には平均力ポテンシャルを図示する。図中の縦の破線は pKID-KIX 複合体 NMR 構造における距離を示す。また、横の実線は室温における熱ゆらぎのエネルギーを示す。pKID 分子のエネルギー  $E_0$  を弱めた（二次構造をやわらかく）場合(a)および pKID 分子のエネルギー  $E_{Nc}$  を弱めた（分子内のアミノ酸残基間相互作用：ネイティブコンタクトをやわらかく）場合(b)の pKID-KIX 結合自由エネルギーの変化をそれぞれ図示する。各線の色は、青色から赤色の順番に分子内のやわらかさを増加させたモデルでの計算結果を意味する。

## 6. まとめと今後の展望

本総説では、分子シミュレーションを用いて天然変性タンパク質の分子認識機構を解明するための研究を紹介した。天然変性タンパク質 pKID と KIX の分子間相互作用を取り上げ、分子シミュレーションにおける計算モデルと天然変性タンパク質の複合体形成メカニズム研究について解説した。詳細な全原子モデルを用いることで実験ではわからなかった準安定な立体構造を示すことができ、また、シンプルな粗視化モデルを用いることで pKID 分子のやわらかさが結合速度よりも解離速度に大きく寄与し、pKID-KIX 結合自由エネルギーを上昇させることが示された。pKID 以外にも天然変性タンパク質は多く存在しており、研究対象として大変興味深いタンパク質である。やわらかい立体構造のため、詳細な立体構造を実験のみでは捉えることが難しい。今後、実験データと分子シミュレーションを組み合わせ、天然変性タンパク質の構造と機能の解明が進むものと思われる。

計算機ハードウェアとソフトウェアの発展に伴い、分子シミュレーションは比較的使いやすい研究ツールになってきた。現在、分子動力学計算の専用計算機ではミリ秒オーダーの分子動力学シミュレーションが可能となっており、比較的早く折りたたまれるタンパク質の折りたたみ過程を全原子モデルで再現できるようになってきている<sup>21)</sup>。また、一般的な製品でも、グラフィックスカードやコプロセッサなどの CPU とは別の演算装置を利用することで計算スピードを上げることができ、十数年前と比較して格段に適用範囲が広がってきている。それでもまだ、現状としては、生体分子を扱うには特別な計算機環境や計算技術が必要である。超巨大な生体分子を生命現象の時間スケール（分以上）にわたって全原子モデルの分子シミュレーションを行うことは非現実的である。今後さらなる計算アルゴリズムや計算モデルの発展が望まれる。

## 7. 謝 辞

本稿に記述した研究を実施する上で、早稲田大学高野光則教授には格別なご配慮、ご助言をいただいた。同研究室の大貫隼氏にはご協力を賜り、研究推進に寄与していただいた。大阪大学蛋白質研究所中村春木教授、肥後順一教授からはご助言ならびに

計算機資源を共有していただいた。また、本研究の一部は日本学術振興会特別研究員制度の一環として実施した。厚く御礼申し上げます。

### 引用文献

- 1) Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN. PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 996-1010 (2010).
- 2) Sickmeier M, *et al.* DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Research* 35, D786-D793 (2007).
- 3) Fukuchi S, *et al.* IDEAL: Intrinsically Disordered Proteins with Extensive Annotations and Literature. *Nucleic Acids Research* 40, D507-D511 (2012).
- 4) Tompa P. Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends in Biochemical Sciences* 37, 509-516 (2012).
- 5) Radhakrishnan I, Pérez-Alvarado GC, Parker D, Dyson HJ, Montminy MR, Wright PE. Solution Structure of the KIX Domain of CBP Bound to the Transactivation Domain of CREB: A Model for Activator: Coactivator Interactions. *Cell* 91, 741-752 (1997).
- 6) Mohan A, *et al.* Analysis of Molecular Recognition Features (MoRFs). *Journal of Molecular Biology* 362, 1043-1059 (2006).
- 7) Zor T, Mayr BM, Dyson HJ, Montminy MR, Wright PE. Roles of Phosphorylation and Helix Propensity in the Binding of the KIX Domain of CREB-binding Protein by Constitutive (c-Myb) and Inducible (CREB) Activators. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42241-42248 (2002).
- 8) Sugase K, Dyson HJ, Wright PE. Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* 447, 1021-1025 (2007).
- 9) Umezawa K, Ikebe J, Takano M, Nakamura H, Higo J. Conformational ensembles of an intrinsically disordered protein Pkid with and without a KIX domain in explicit solvent investigated by all-atom multicanonical molecular dynamics. *Biomolecules* 2, 104-121 (2012).
- 10) Radhakrishnan I, Pérez-Alvarado GC, Dyson HJ, Wright PE. Conformational preferences in the Ser133-phosphorylated and non-phosphorylated forms of the kinase inducible transactivation domain of CREB. *FEBS Letters* 430, 317-322 (1998).
- 11) Shoemaker BA, Portman JJ, Wolynes PG. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: The fly-casting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8868-8873 (2000).
- 12) Ganguly D, Chen J. Atomistic Details of the Disordered States of KID and pKID. Implications in Coupled Binding and Folding. *Journal of the American Chemical Society* 131, 5214-5223 (2009).
- 13) Kamiya N, Watanabe YS, Ono S, Higo J. AMBER-based hybrid force field for conformational sampling of polypeptides. *Chemical Physics Letters* 401, 312-317 (2005).
- 14) Clementi C, Nymeyer H, Onuchic JN. Topological and energetic factors: what determines the structural details of the transition state ensemble and "en-route" intermediates for protein folding? an investigation for small globular proteins. *Journal of Molecular Biology* 298, 937-953 (2000).
- 15) Onuchic JN, Luthey-Schulten Z, Wolynes PG. THEORY OF PROTEIN FOLDING: The Energy Landscape Perspective. *Annual Review of Physical Chemistry* 48, 545-600 (1997).
- 16) Kmiecik S, Gront D, Kolinski M, Wieteska L, Dawid AE, Kolinski A. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chemical Reviews* 116, 7898-7936 (2016).
- 17) Kim YC, Hummer G. Coarse-grained Models for Simulations of Multiprotein Complexes: Application to Ubiquitin Binding. *Journal of Molecular Biology* 375, 1416-1433 (2008).
- 18) Ganguly D, Zhang W, Chen J. Electrostatically Accelerated Encounter and Folding for Facile Recognition of Intrinsically Disordered Proteins. *PLOS Computational Biology* 9, e1003363 (2013).
- 19) Okazaki K, Sato T, Takano M. Temperature-Enhanced Association of Proteins Due to Electrostatic Interaction: A Coarse-Grained Simulation of Actin-Myosin Binding. *Journal of the American Chemical Society* 134, 8918-8925 (2012).
- 20) Umezawa K, Ohnuki J, Higo J, Takano M. Intrinsic disorder accelerates dissociation rather than association. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 84, 1124-1133 (2016).
- 21) Shaw DE, *et al.* Atomic-Level Characterization of the Structural Dynamics of Proteins. *Science* 330, 341 (2010).



## Exploring Interaction Mechanism of Intrinsically Disordered Protein by Molecular Dynamics Simulation

Koji UMEZAWA

Biotechnology Division, Department of Biomedical Engineering,  
Graduate School of Science and Technology, Shinshu University

### Summary

Intrinsically disordered protein (IDP) is different from conventional protein at the point of view of conformational flexibility. IDP is so flexible not to fold into a unique stable structure. In this review, we focused on the IDP, phosphorylated kinase-inducible domain (pKID). pKID is a typical IDP and it is disordered at isolated state. However, when pKID binds to the partner protein, KID-interacting domain (KIX), pKID can fold into a stable unique complex structure, which is called as coupled folding and binding. pKID interaction with KIX has been investigated experimentally. The stable structure of pKID-KIX complex was determined by NMR. However, semi-stable conformations of pKID binding were unclear in detail. Then, free-energy landscape of pKID upon binding to KIX were calculated by molecular simulation with a fine-grained model (all-atom model) with explicit solvents. Free-energy landscape represents profile of free energy along an axis of reaction coordinate. In this case, distance between the calculated conformation and the stable pKID-KIX complex structure was chosen as the reaction coordinate. Then, the detailed conformation at the semi-stable state could be obtained from the simulation. Furthermore, effects of pKID flexibility on binding free energy were explored with a coarse-grained model. Two types of conformational flexibility were implemented into the coarse-grained model for pKID. As the flexibility increased, pKID-KIX dissociation was accelerated rather than association. The flexibility resulted in the larger binding free energy. Throughout this review, the molecular models we used were briefly described. The molecular simulation has been a useful tool to investigate the flexible conformations of IDP and its interaction mechanism.

**Key word:** Protein-protein interaction, Coupled folding and binding, Molecular recognition, Free-energy landscape