

タンパク質の複合体と相互作用を高精度に計測する計算技術の開発

筑波大学計算科学研究センター 准教授 原田 隆平

1. はじめに

タンパク質や核酸などの生体分子は、分子間相互作用により複合体を形成し、機能を発現する。ゆえに、機能を解明するためには複合体にはたらく分子間相互作用を解析することは重要である。生体機能は分子間相互作用により制御されており、その喪失が疾患のトリガーとなる。よって、疾患原因となる合理的な分子間相互作用の喪失を特定することが重要となる。しかしながら、複合体構造を高精度にモデリングするためには、生体分子が示す個々の揺らぎをあらわに考慮し、複合体形成プロセスを抽出しなければならない。計算技術として分子動力学計算(MD)は揺らぎをあらわに考慮できるが、計算技術の限界から複合体形成にいたる時間スケールまでダイナミクス(構造変化)を追跡できない。実際問題として、現状の MD が到達できる時間スケールはマイクロ秒($\mu\text{s}=10^{-6}$ 秒)程度であり、複合体形成が観測されるミリ秒($\text{ms}=10^{-3}$ 秒)以上の時間スケールに遠く及ばない。そこで、独自に開発した長時間ダイナミクス抽出法(PaCS-MD: Parallel Cascade Selection MD)^[1-3]を適用することにより複合体形成プロセスを抽出し、この困難を打開する。具体的には、PaCS-MDにより複合体形成プロセスを促進かつ抽出し、揺らぎをあらわに考慮した複合体の構造予測を実現する。さらに、予測された複合体構造の分子面にはたらく分子間相互作用ネットワークを蓄積しながらデータベースを構築することで、アミノ酸変異に起因する機能失活の原因となる相互作用ネットワークを特定できる異常検知システムを構築する。

2. 計算方法

2.1. PaCS-MD の概要

PaCS-MD は、構造変化における始状態と終状態の構造が既知である場合、状態間をつなぐ遷移パスウェイ(構造変化)を抽出できるレアイベントサンプリング法である(Fig.1)。典型的な PaCS-MD の適用例として、タンパク質に関する大規模構造変化の抽出が挙げられる。例えば、始状態として Open 構造、終状態として Closed 構造が実験構造として既知である条件のもと、PaCS-MD を適用して Open 構造から Closed 構造に向かう遷移パスウェイを抽出する場合を考える。効率的に遷移パスウェイを探索するには、Closed 構造へ向かう遷移確率が高い MD スナップショットを同定し、短時間 MD を繰り返せば良い。具体的には、遷移確率の高い重要な MD スナップショットを同定するための物理的な指標を設定する。指標の設定は任意であり、様々な物理量が考えられる。典型的な指標として、遷移先である終状態の構造から測定した平均自乗距離、root-mean-square deviation (RMSD) が考えられ、遷移先である Closed 構造から測定した RMSD が指標となる。各サイクルにおいて、短時間 MD が生成する MD スナップショットに対して RMSD を計算し、値が小さい順に並べ替え、上位にランクする N 個の MD スナップショットから短時間 MD をリスタートする。これらの手順をサイクルとして繰り返すことにより、Closed 構造に類似した MD スナップショットから短時間 MD がリスタートされるため、サイクルが進むにつれて終状態に向かって遷移していく。

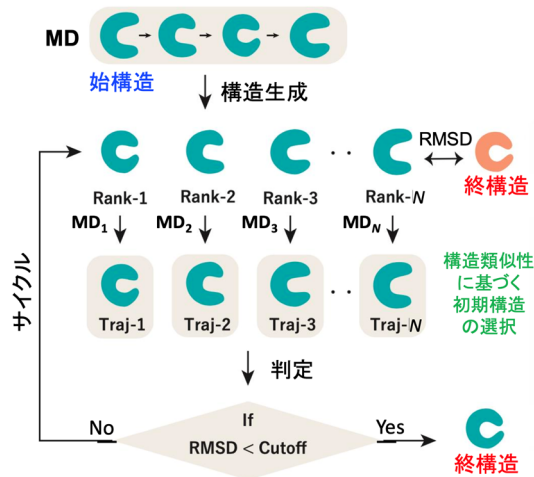


Fig. 1 PaCS-MD のフローチャート

2.2. 計算結果および性能評価

疾患原因に関係する典型例として、リボ核酸 (RNA) 結合タンパク質 (RBP: RNA Binding Protein) と RNA の複合体に着目した。生体内において RBP と RNA は互いに揺らぎながら複合体を形成し、合理的な分子間相互作用を介して機能を制御している。近年、Alpha Fold2 (AF2)^[4]に代表される人工知能 (AI) に基づく複合体予測も実績を上げつつあるが、構造予測は揺らぎの小さい生体分子のドメイン領域のみに限定される。このように、AI が発展した現在においても生体分子の

構造予測は難しく、揺らぎをあらわに考慮しなければならない RBP-RNA などの複合体構造予測はとくに難しい。事実、複合体形成では大規模な揺らぎを利用して RBP のループで連結された 2 つのドメインが RNA を掴むように結合して複合体を形成することから、構造予測の難易度は高い。そこで本研究では、PaCS-MD を適用することにより複合体形成に重要な役割を果たすループ領域の長時間ダイナミクスを抽出した。PaCS-MD の適用にあたり、長時間ダイナミクス (複合体形成プロセス) の前 (RNA 結合前) と後 (RNA 結合後) の構造を指定する必要がある。本手法では、RNA 結合前の構造を機械学習 (AF2) に基づきアミノ酸配列から予測した。RNA 結合後の構造は、タンパク質と核酸が結合した実験 (部分) 構造を利用した。これらの条件のもと、PaCS-MD により各部分構造が実験構造へ構造遷移する可能性が高い初期構造を選択しながら短時間 MD を繰り返し、合理的な分子間相互作用をもつ複合体の全体構造へモデリングした。以上により、PaCS-MD の拡張に基づく Protein-RNA フレキシブルドッキング手法を開発した (Fig.2)。

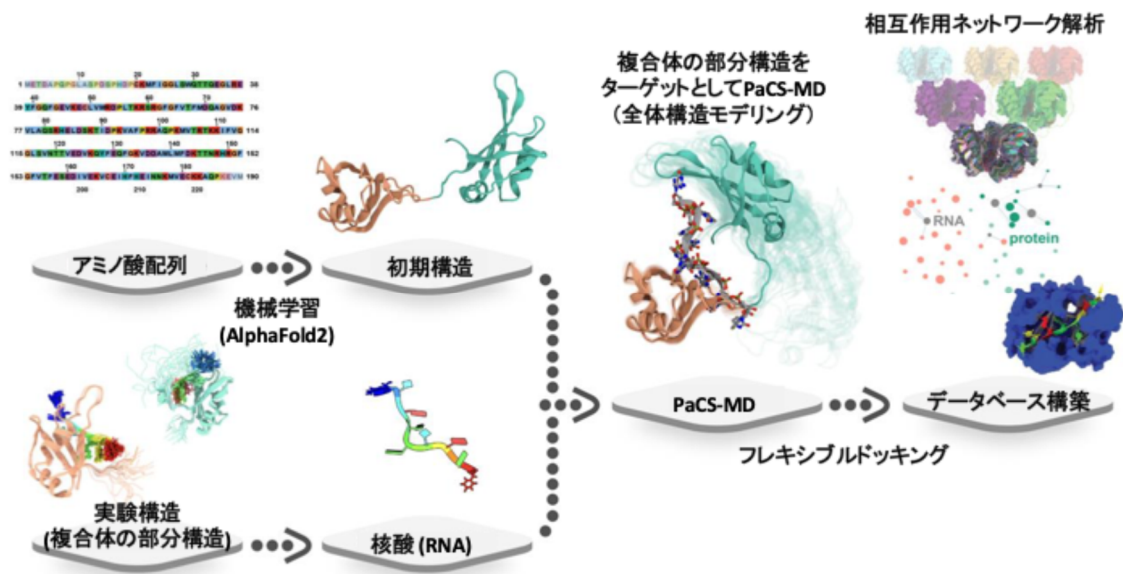


Fig. 2 PaCS-MD による複合体構造予測のフローチャート

本手法の性能評価として、Protein-RNA の複合体が部分構造として実験的に決定されている「MUSASHI1-Protein (MSI1)」^[5-6]に適用することで、複合体の全体構造を予測した。計算結果として、PaCS-MD により複合体形成プロセスの抽出に成功し、MSI1 が有する 2 つのドメインで RNA を囲んだ合理的な分子間相互作用をもつ全体構造を予測することができた。定量的な安定性評価として、既存の汎用的予測プログラム (Phyre2)^[7]により得られた全体構造と比較したところ、揺らぎをあらわに考慮しない既存手法 (Phyre2) と比較し、PaCS-MD は相対的に安定な結合自由エネルギーを示す複合体構造を予測することが分かった (Fig.3)。^[8]以上の性能評価から、本手法はタンパク質と RNA の実験構造から複合体構造を高精度に予測できることが分かった。

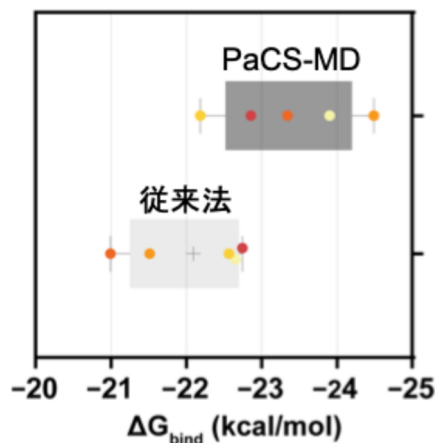


Fig. 3 MUSASHI1-Protein と RNA に関する結合自由エネルギー計算
PaCS-MD と 従来法 (Phyre2) の比較

2.3. 今後の展望

今後の展望として、多様な実験手法が明らかにするタンパク質構造を活用し、本計算スキームに基づき、複合体の分子間相互作用解析を展開していく。例えば、近年におけるエレクトロニクスの

発展に伴い、電子顕微鏡による生体超分子の構造決定が急速に進んでいることに注目する。電子顕微鏡の利点は、複数のタンパク質が会合した複合体などの生体超分子構造の電子密度を計測できる点にある。生体超分子は、従来の実験技術で構造決定が難しいケースも多かったが、電子顕微鏡の普及により生体分子単体だけでなく、分子同士が互いに会合して形成される巨大で複雑な生体超分子についても構造決定できるようになってきた。将来的には、電子密度を手がかりに PaCS-MD に基づき生体超分子の精密モデリングを実現し、タンパク質間相互作用を計測することで、分子集合体としての機能解明が期待できる。将来的には、電子顕微鏡が提供する電子密度を手がかりに生体超分子の精密モデリングを実現し、分子間相互作用をあらわに計測し、生体機能を解明する計算技術へ発展させたい。そのための戦略として、重要度が高い (実験から計測される電子密度と相関が高い) 候補構造から MD をリスタートするサイクルを繰り返す「データ駆動型 PaCS-MD」へ拡張する。具体的には、実験データと整合する合理的な候補構造から MD を繰り返す「データ駆動型」の構造探索に基づき、精密構造をモデリングする。モデリング後は、生体超分子を構成するタンパク質の分子面について残基間コンタクト=相互作用マップを計算し、生体超分子が正常 (健康) に機能する場合の分子間相互作用として蓄積する。データベースの利用価値として、疾患によるアミノ酸変異で異常が生じた相互作用解析に活用できる。最終的に、健康及び疾患の相互作用マップを比較して差分を調べることで、どの残基間において相互作用が異常であるかを特定できるようになるため、疾患原因の究明に貢献できる (Fig.4)。

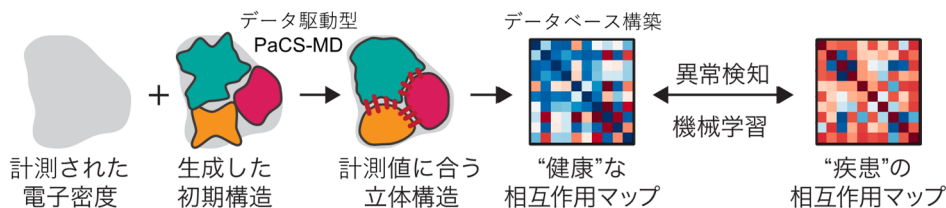


Fig. 4 疾患を引き起こす相互作用の異常検知システム構築

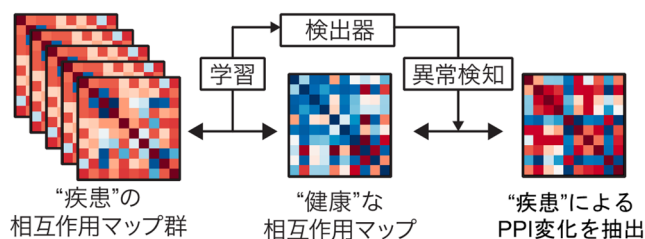


Fig. 5 異常な分子間相互作用を検知するアルゴリズム

具体的な異常検知システムの構築にむけて、データ駆動型 PaCS-MD に基づきモデリングした高解像度構造を解析し、生体超分子の分子面にはたらくタンパク質間相互作用 (PPI) を計測する。定量的には、PPI 形成に重要な分子間コンタクトを残基間距離として計算し、それらを成分とする 2 次元行列 (相互作用マップ=PPI 画像) として蓄積する。相互作用マップの利用価値として、疾患により分子面の PPI が変化した場合、健康な PPI 画像と比較して差分を調べれば、どの PPI 変化が疾患原因であるかを特定できる (Fig.5)。最終的に、蓄積された PPI 画像をもとに機械学習を進め、異常検知器を構築することで、どの PPI 異常が疾患原因になっているのかを特定できる。

3. まとめ

本研究では、PaCS-MD を適用したタンパク質の機能解析に重要な複合体予測と分子間相互作用の測定に関する方法論を開発した。本研究で開発した方法論は、従来 MD と比較して低い計算コストで複合体予測と結合自由エネルギー計算を

実現できる。このため、生体機能と密接に関係しているタンパク質相互作用を抽出できると同時に、複合体形成に重要な構造変化と共役する自由エネルギーや相互作用を定量的に評価できる。今後の展開として、本手法を医薬品の様々な標的タンパク質に適用し、機能解析に貢献していきたい。

4. 参考文献

- [1] R. Harada and A. Kitao, “Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) to Generate Conformational Transition Pathway” J. Chem. Phys., **139**-3, (2013), 035103.
- [2] R. Harada, Y. Takano, T. Baba, and Y. Shigeta, “Simple, yet Powerful Methodologies for Conformational Sampling of Proteins”, Phys. Chem. Chem. Phys., **17**-9, (2015), 6155-6173.
- [3] R. Harada, “Simple, yet Efficient Conformational Sampling Methods for Reproducing/Predicting Biologically Rare Events of Proteins”, Bull. Chem. Soc. Jpn., **91**-9, (2018), 1436-1450.

- [4] J. Jumper et al. “Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold”, *Nature*, **596**, (2021), 583–589.
- [5] R. Iwaoka et al. “Structural Insight into the Recognition of r(UAG) by Musashi-1 RBD2, and Construction of a Model of Musashi-1 RBD1-2 Bound to the Minimum Target RNA”, *Molecules*, **22**, (2017), 1207.
- [6] T. Oyama et al. “Structure of Musashi1 in a Complex with Target RNA: the Role of Aromatic Stacking Interactions”, *Nucleic Acids Res.*, **40**-7, (2012), 3218–3231.
- [7] L. A. Kelley et al. “The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis”, *Nat. Protoc.*, **10**, (2015), 845–858.
- [8] N. Darai et al. “A Structural Refinement Technique for Protein-RNA Complexes Based on a Combination of AI-based Modeling and Flexible Docking: A Study of Musashi-1 Protein”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **96**-7, (2023), 677–685.

5. その他成果発表等

- ・ 原田隆平, “生体機能を紐解く分子シミュレー

ション手法の開発と応用”, 自然科学研究機構 計算科学研究センター スーパーコンピュータ ワークショップ 2023, 分子科学研究所, 2024 年 1 月 15 日.

- ・ 原田隆平, “中分子創薬を革新する分子シミュレーション手法の開発”, 第 453 回 CBI 学会講演会, オンライン, 2024 年 2 月 26 日.
- ・ 原田隆平, “生体機能を紐解く新しい分子シミュレーション手法の開発”, 筑波ミニワークショップ 「計算・分光・情報・合成が拓く分子設計の最前線」, 筑波大学, 2024 年 2 月 26 日.
- ・ Ryuhei Harada, “Simple yet Powerful Rare-Event Sampling Methods (PaCS-MD/OFLOOD) for Elucidating Membrane Permeation Processes of Drugs”, *Pacificchem 2025 (Invited Talk)* 2025 年 12 月 18 日.
- ・ 原田隆平, 「UBE 学術振興財団 学術奨励賞」, 公益財団法人 UBE 学術振興財団, 2024 年 6 月 19 日.

6. 謝辞

本研究は、島津科学技術振興財団の助成金によって実施されたものであり、心より感謝申し上げます。