

1 はじめに

近年、タンパク質-タンパク質相互作用において天然変性タンパク質(天然変性領域)の果たす役割に大きな注目が集まっている。本研究では、細胞分裂時の有糸分裂期において、インナーキネトコアとアウターキネトコアの結合に重要な役割を果たす Ndc80 複合体と Centromere Protein T (CENP-T) の天然変性領域の結合様式を分子動力学シミュレーション (MD シミュレーション) と自由エネルギー計算を用いて明らかにすることを目的として、理論的な研究を行った。(図 1 を参照)

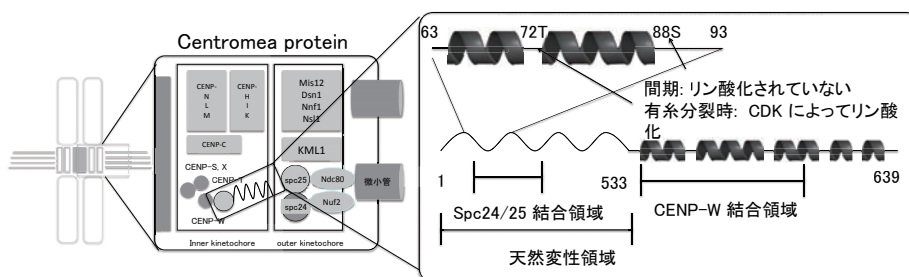


図 1 有糸分裂期におけるインナーキネトコアとアウターキネトコアの結合に関わるタンパク質の模式図と CENP-T の天然変性領域および結合領域。

有糸分裂期には、アウターキネトコアを構成する Ndc80 複合体が、微小管との複合体形成に重要な役割を果たすことが分かっている。一方で、Ndc80 複合体(アウターキネトコア)とインナーキネトコアを構成するタンパク質の相互作用については、その結合様式の詳細が不明であった。近年、西野らの研究 [4] によって、インナーキネトコア中の CENP-T の天然変性領域の一部と Ndc80 複合体を構成する Spc24/25 複合体が相互作用すること、また、Spc24/25 複合体と CENP-T の結合様式については、CENP-T への翻訳後修飾が重要な役割を果たすことが示唆された。具体的には、CENP-T のリン酸化された 72 残基が 74 残基との間に塩橋を形成して、Spc24/25 結合領域の二つのヘリックスの相対的位置を制御し、Spc24/25 複合体と安定的に結合するというメカニズムが提出された。(図 2 に変異体における T72D と R74 の間の塩橋を示した。)

本研究においては、この提示されたメカニズムの妥当性の検証および原子解像度での精緻化のため、CENP-T の天然変性領域の構造安定性を MD シミュレーションを用いて様々な条件下で計算した。即ち、CENP-T リン酸化類似体 (T72D,S88D) と Spc24/25 複合体の結晶構造 (PDB ID: 3VZA) をもとに、野生型およびリン酸化されたもの (pT72,pS88) をモデリングし、Spc24/25 と CENP-T の複合体および CENP-T 単体の 100 ns 規模の全原子 MD シミュレーションを行った。その結果、(T72D,S88D) および (pT72,pS88) において 72-74 間の塩橋は、複合体においても CENP-T 単体でも安定的に維持され、実験によって提出されたメカニズムの妥当性が示唆された。さらに、Alchemical Free Energy 法を用いて状態間の安定性の差を見積って、塩橋の存在がヘリックス間の相対位置の安定性に果たす影響についても定量的に議論する道を探った。

2 方法

本研究においては、MD シミュレーションと Alchemical Free Energy 法 (AFE) を使ってリン酸化がおよぼす CENP-T の塩橋形成や塩橋による配向制御などへの影響および Spc24/25 複合体との結合能の変化

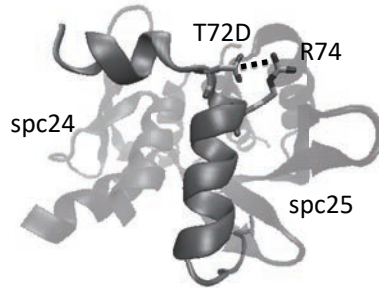


図2 CENP-T 変異体 (63-93 残基) -Spc24/25 複合体の結晶構造を図示 (PDB ID: 3VZA)。CENP-T のリン酸化を受ける残基 R74 は、直接は、Spc24/25 複合体との結合に関与していないが、結合領域の二つのヘリックスの相対的位置を制御し結合の安定化に関与すると考えられる。72-74 残基間の塩橋を点線で示した。

について検証を行なった。AFE は、結合自由エネルギー差を計算するための厳密法で、仮想的な中間状態を複数設定して、Bennet Acceptance Ratio 法 (BAR)、自由エネルギー摂動法 (FEP)、積分法 (TI) などと組み合わせてタンパク質-リガンド結合自由エネルギー差を計算する手法である。本稿の研究では AFE を変異体間でのタンパク質-タンパク質結合に応用した。

CENP-T リン酸化類似体 (T72D,S88D) と Spc24/25 複合体の結晶構造 (PDB ID: 3VZA) をもとに、野生型およびリン酸化体 (pT72,pS88) をモデリングし、初期構造を用意した。水モデルには TIP3P を、タンパク質およびイオンの力場には AMBER99SB を採用した。リン酸化残基のモデルには Homeyer らのモデル [3] を用いた。全ての系において、NaCl イオンを用いて系全体の電荷を中和した。それぞれの変異体について、CENP-T 単体の系および CENP-T-Spc24/25 複合体の系を用意した。(表 1) MD シミュレーションは、GROMACS-2018 [1, 5] を用いて、300K・1bar の定温・定圧アンサンブルで行った。熱浴および圧力浴には、それぞれ Langevin 熱浴と Berendsen 浴を用いた。溶媒をふくんだ総分子数は、CENP-T 単体の系で約 30,000、複合体の系で約 40,000 とした。

表1 計算の対象となる系の組成。順に CENP-T リン酸化類似体 (3VZA)、野生型 (WT)、リン酸化体 (phosho) で、上段は CENP-T 単体、下段は CENP-T-Spc24/25 複合体である。

	3VZA(T72D,S88S)		WT		phosho(72pT,88pS)	
	分子数	原子数	分子数	原子数	分子数	原子数
タンパク質	1	499	1	500	1	507
水	9655	28965	9636	28908	9758	29274
Na ⁺	1	1	0	0	2	2
Cl ⁻	0	0	1	1	0	0

	3VZA(T72D,S88S)		WT		phosho(72pT,88pS)	
	分子数	原子数	分子数	原子数	分子数	原子数
タンパク質	1	3159	1	3160	1	3167
水	12606	37818	12606	37818	12586	37758
Na ⁺	3	3	1	1	4	4
Cl ⁻	0	0	0	0	0	0

MD シミュレーションは、各々平衡化計算後に 100 ns の計算を行い解析に使用した。

AFE の解析計算には、Alchemical-analysis のパッケージ [2] を用いた。Alchemical-analysis は、MD のポストプロセスとして、自由エネルギー計算を行うための応用性の高いフレームワークである。厳密な自由エネルギーの計算方法として、Bennet Acceptance Ratio 法、自由エネルギー摂動法、積分法などを実行することができる。

3 結果

3.1 リン酸化による塩橋形成や塩橋による配向制御

6 つの系 (表 1) について行なった MD シミュレーションの結果を示す (図 3)。図 3(a) は、各々の計算の平衡化後の CENP-T (60-93) の平均二乗変異 (RMSD) を、(b) は、CENP-T (60-93) のヘリック構造の存在確率を、(c) は、変異型/リン酸化体について、72 残基が 74 残基との間に塩橋の時間変化を示す。

CENP-T 変異型/リン酸化体という Spc24/25 複合体との結合能が実験において高いと示されたものは、ともに、塩橋を維持しているという結果を示した。

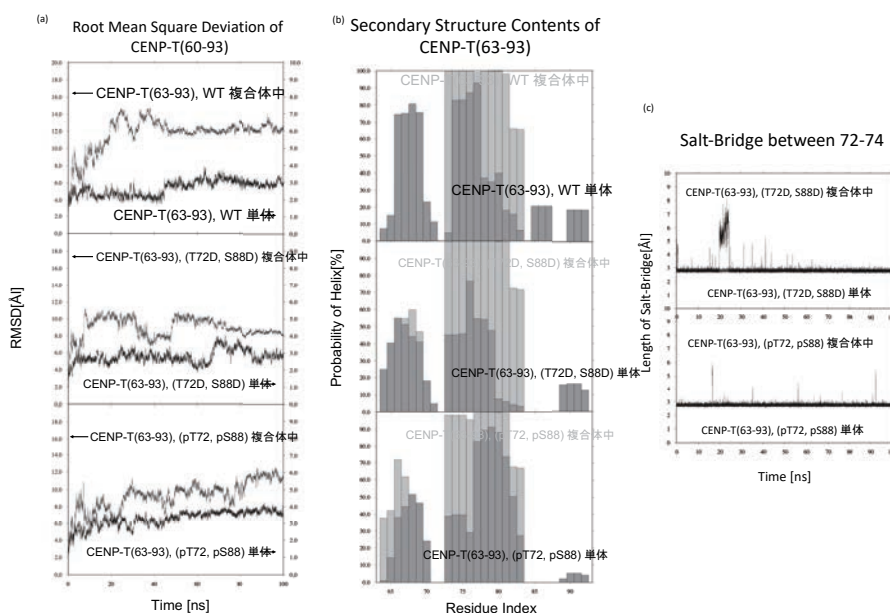


図 3 (a) 3vza/野生型/リン酸化体の平衡化後の CENP-T (60-93) の平均二乗変異 (RMSD)、(b) 3vza/野生型/リン酸化体の CENP-T (60-93) のヘリック構造の存在確率、(c) 変異型/リン酸化体について、72 残基が 74 残基との間に塩橋の時間変化。

3.2 変異/リン酸化による結合自由エネルギー差

MD シミュレーションの結果をもとに、AFE 法によって、変異およびリン酸化による結合結合自由エネルギーへの影響を調べた。この際に使用した熱力学的サイクルを図 4(b) に示す。

BAR 法を用いた計算による野生型からリン酸化類似体 (T72D,S88D) および野生型からリン酸化体 (pT72,pS88) への結合自由エネルギー差をみると (表 2) 変異やリン酸化によって、結合は安定化されることが示唆された。

このことから、実験によって提出されたメカニズムの妥当性が示唆された。

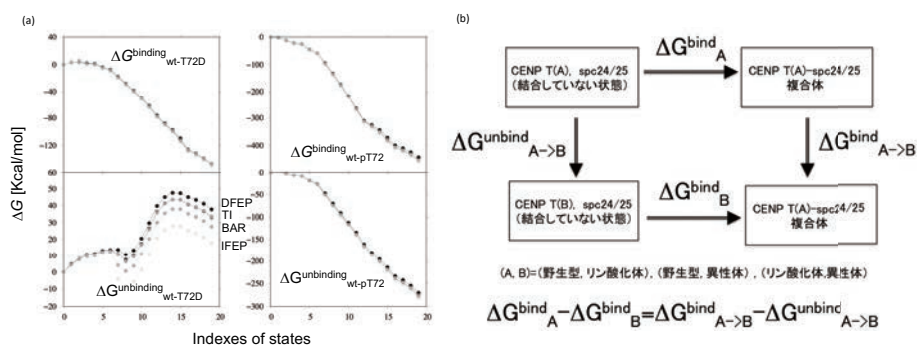


図4 (a) 各状態間の自由エネルギー変化、(b) 熱力学的サイクル。

表2 変異/リン酸化による結合自由エネルギー差。BAR 法による計算。(kcal/mol)

	$\Delta G_{\text{mut.}}^{\text{binding}}$	$\Delta G_{\text{mut.}}^{\text{unbinding}}$	$\Delta G_{\text{mut.}}^{\text{binding}} - \Delta G_{\text{wt}}^{\text{binding}}$
WT \rightarrow T72D	-148.1	27.6	-175.7
WT \rightarrow pT72	-454.9	-277.4	-177.5

4 結論

本稿の研究では、有糸分裂期におけるタンパク質の集合という生物学的に重要なテーマに対して、最近の実験的な知見をもとに、MD シミュレーション及びそれにもとづく自由エネルギー計算を行い、実験結果から示唆されたメカニズムの検証を行なうことをめざした。

本研究では、特にアウトターキネトコア中の Ndc80 複合体を構成する Spc24/25 複合体とインナーキネトコア中の CENP-T の結合について、CENP-T の翻訳後修飾が大きな役割を果たす、即ち CENP-T のリン酸化された 72 残基が 74 残基との間に塩橋を形成し天然変性領域の二つのヘリックスの相対的位置を制御することで、Spc24/25 複合体と安定的に結合するというメカニズムの妥当性の検証および原子解像度での精緻化のため、CENP-T の天然変性領域の構造安定性を様々な条件下で計算した。リン酸化類似体 (T72D,S88D) の結晶構造をもとに、野生型およびリン酸化されたもの (pT72,pS88) をモデリングし、Spc24/25 と CENP-T の複合体および CENP-T 単体の 100 ns の全原子 MD シミュレーションを行った。

その結果、(T72D,S88D) および (pT72,pS88) において 72-74 間の塩橋は、複合体においても CENP-T 単体でも安定的に維持され、実験によって提出されたメカニズムの妥当性が示唆された。また、Alchemical Free Energy 法を塩橋の存在が、ヘリックス間の相対位置安定性に及ぼす影響についても定量的に議論する道も探った。

今後は、より詳細かつ精度の高い知見を得るために、より大規模な計算および著者らの研究にもとづく実験データの参照によるシミュレーションデータの精度向上手法 [6] の適用などを検討している。

本研究は、東京大学情報基盤センター 2019 年度前期・後期若手・女性推進制度を通して使用したスーパーコンピュータ Reedbush-U (JCAHPC) で実地した成果を含む。

参考文献

- [1] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, and E. Lindahl. *J. Chem. Theory Comput.*, Vol. 4, p. 435, 2008.
- [2] P. V. Klimovich and D. L. Mobley. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, Vol. 29, p. 1007, 2015.
- [3] H. Nadine, A. H. C.Horn, L. Harald, and S. Heinrich. *J. Mol. Modeling*, Vol. 12, p. 281, 2006.
- [4] Tatsuya Nishino, Florencia Rago, Tetsuya Hori, Kentaro Tomii, Iain M Cheeseman, and Tatsuo Fukagawa. *The EMBO Journal*, Vol. 32, No. 3, pp. 424–436, 2013.
- [5] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, and E. Lindahl. *Bioinformatics*, Vol. 29, p. 845, 2013.
- [6] Y. Yamamori and K. Tomii. *Chem. Phys. Lett.*, Vol. 779, p. 138821, 2021.