

杉田理論生物化学研究室
Theoretical Biochemistry Laboratory

准主任研究員 杉田 有治 (博士 (理学))
SUGITA, Yuji (Ph.D)



キーセンテンス :

1. 生体高分子の効率的な構造探索アルゴリズムの開発
2. 膜タンパク質と脂質二重膜の分子動力学計算
3. 階層的QM/MM計算法の開発と酵素反応の解析
4. 蛋白質複合体に関する自由エネルギー解析

キーワード :

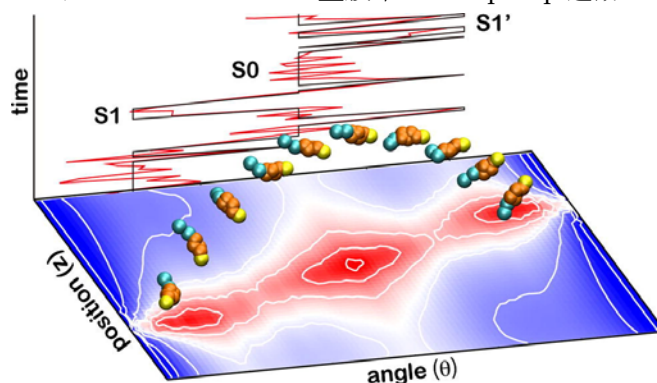
生物物理、膜タンパク質、電子状態、バイオインフォマティクス、第一原理量子化学計算、分子シミュレーション、分子動力学計算、拡張アンサンブル計算、自由エネルギー解析、創薬、積分方程式理論、アミロイド蛋白質、生体膜

研究概要

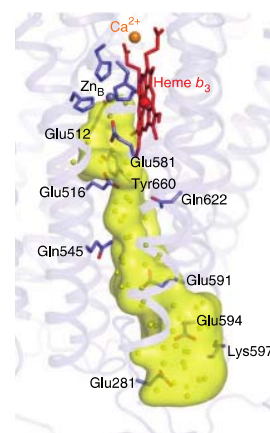
当研究室では、蛋白質や生体膜の構造とダイナミクスから機能を理解・予測することを目的として、理論化学・計算化学による解析を行っている。統計熱力学、量子化学などの分子科学を基礎に、分子動力学計算、第一原理量子力学計算、積分方程式理論などの手法を用いて、原子・分子レベルでの理解を目指している。研究課題は、蛋白質の折れ畳みや安定性、膜蛋白質のダイナミクス、水中糖鎖の立体構造、酵素反応機構、生体膜中での脂質分子のダイナミクスなどの基礎研究課題から、免疫系蛋白質、アミロイド蛋白質などの疾患と深く関係する蛋白質の機能解析や創薬に向けた新規計算手法の開発など多岐に渡っている。これらの研究課題のほとんどは、実験家との密接な共同研究・議論を通して行われる。また、理論化学・計算化学の限界に挑戦し、次世代スーパーコンピュータを有効に活用するための新しい計算手法やモデルの開拓、プログラム開発なども積極的に行っている。

1. リン脂質二重膜中におけるジアシルグリセロールおよびセラミドの垂直拡散 (flip-flop) 運動 (小串典子、杉田有治)

生体膜の特徴の一つは、小胞形成や融合を生じる膜の柔軟さである。生体膜の基本構造はリン脂質(PC)からなる二重膜構造であるが、脂質分子は膜の種類や環境に応じて特徴的な分布を持ち、状況に応じて再分布している。膜の力学的安定性は脂質分布が制御するため、脂質再分布は膜物性の変化を介して様々な細胞機能と関係している。脂質再分布において重要な運動の一つが、二重膜中における脂質分子の垂直拡散 (flip-flop) 運動である。近年実験から、flip-flop 率は脂質の種類により異なり、PC では非常に低い。ジアシルグリセロール(DAG)やセラミド(CER)は高いことが分かってきた。DAG や CER はセカンドメッセンジャー的な働きをする脂質分子として知られている。本研究では、膜中における脂質分子の運動を分子運動に基づいて理解するため、分子動力学計算を用いて DAG および CER の PC 二重膜中での flip-flop 運動について調べた。分子モデルとして、(粗視化) MARTINI モデルを用いた。計算結果より、CER に比べ DAG はより高い flip-flop 率を持つことが分かった。また、二重膜を構成する PC 脂質の不飽和度が高いほど、flip-flop 率が高いことが分かった。このことは、実験結果を定性的に一致する。また、この拡散過程はポワソン過程として近似でき、分子間の flip-flop 率の違いは膜と水の界面での脂質の滞在時間を反映していることが分かった。以上の結果は、生体膜の運動における膜の流動性と、脂質-水間の相互作用の重要性を示唆している。

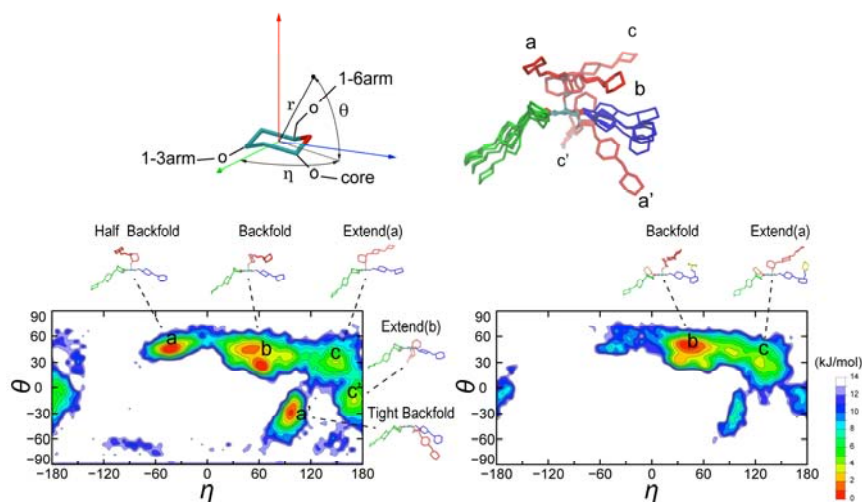


2. 一酸化窒素還元酵素 (NOR) の分子動力学計算 (Andrei V. Pisliakov, 杉田有治)
 地球上の生物の多くは、酸素を使って呼吸 (好気呼吸) し、生体エネルギーATPを得ている。一方で酸素の少ない土壌や海水中に生息する細菌では窒素酸化物を還元すること (嫌気呼吸) で生体エネルギーを得ている。好気呼吸の重要な酵素であるチトクロム酸化酵素(COX)は従来からその構造や機能が調べられてきたが、嫌気呼吸に重要な一酸化窒素還元酵素(NOR)の立体構造は最近まで明らかではなかった。我々は、近年立体構造がX線結晶構造解析によって解かれた2つのNOR (qNORとcNOR) の分子動力学計算を行い、膜タンパク質内部の水チャンネル (プロトン輸送経路の候補と考えられる) を明らかにした。その結果、cNORとqNORが異なる水チャンネルを持っていることが確認された。呼吸系酵素の分子進化の道筋を解明する新たな糸口となる。



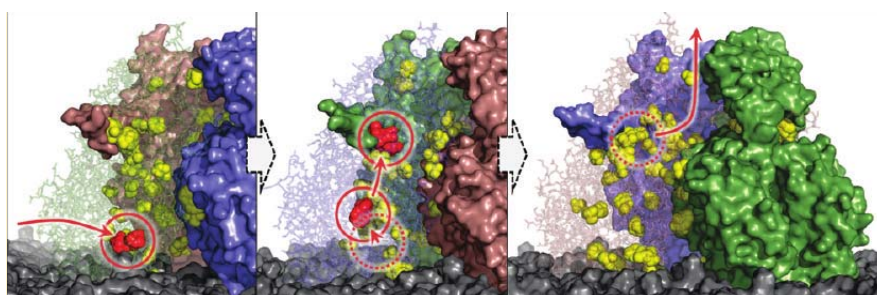
3. 水中糖鎖の立体構造予測 (李秀栄, 二島渉, 杉田有治)

タンパク質の糖鎖修飾は、細胞間コミュニケーションや免疫応答などの重要な生命現象と深く関わっている。タンパク質に結合している糖鎖の機能を解明するためには、糖鎖を立体構造の観点からとらえることが重要である。しかし、糖鎖が持つ化学的不均一性や柔軟性などが原因で、X線結晶構造解析で糖鎖基本骨格全体を原子レベルで解析することは未だに困難である。近年、NMRによって得られた化学シフトから水溶液中の立体構造に関する知見が得られつつある。我々は、タンパク質の構造空間を効率良く探索することができるレプリカ交換法に着目し、水中糖鎖の構造解析へ応用することで、これまで困難であった糖鎖構造の理論予測に成功した。典型的なN型複合型糖鎖の計算から、この糖鎖が5つの安定配座をもつことを示す。N-アセチルグルコサミンを導入すると、安定配座の相対分布が変化し構造多様性が減少する。糖鎖が複数の「鍵」をもっており、修飾基の種類や付加位置によって標的タンパク質 (鍵穴) に適した「鍵」を選択していることを意味する。糖鎖立体構造の多様性と修飾による平衡分布の変化が、糖鎖-タンパク質間に見られる結合の特異性や親和性で重要な役割を果たしていることが裏付けられた。



4. 多剤排出とランスポーターAcrB (今井隆志, 杉田有治)

AcrB は化学構造や作用の異なる多種多様な薬剤を排出することのできる膜タンパク質である。多剤排出ランスポーターがどのような仕組みで多種多様な薬剤を認識し、そして排除するのか理解することが出来れば、薬剤耐性化を克服する新薬の開発などにつながる。我々は、最近開発した分子液体論に基づいた新しいリガンドマッピング法を用いて、AcrB の薬剤排出経路の同定に成功した。その結果、ポータドメイン中に多種の薬剤を認識することの出来る「多機能結合サイト」が幾つか見つかった。「多機能結合サイト」の空間的な分布に基づき、薬剤の排出経路を提案した。さらに、タンパク質内部の



空洞は基質との弱い相互作用によりフラストレーションを受けた環境にあり、このことがタンパク質内部での潤滑な薬剤輸送を可能にしていることが示唆された。タンパク質内部での拡散誘導が薬剤排出で重要な役割を果たしていることを裏付ける。

Key Sentence:

1. Development of novel conformational sampling methods for biomolecules
2. Molecular dynamics simulations of membrane proteins and phospholipids
3. Development of hybrid QM/MM calculations and applications to enzymatic reaction
4. Free energy analysis on protein complexes

Key Word:

Biophysics, membrane proteins, electronic structure, bioinformatics, quantum chemistry, molecular simulation, molecular dynamics simulation, generalized-ensemble simulation, free energy analysis, drug design, integral equation theory, amyloid protein, biological membrane

Outline

To understand biological functions of proteins or biological membranes, we study their structures and dynamics using multi-scale simulations, which include all-atom molecular dynamics (MD) simulations, coarse-grained MD simulations, quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations, integral equation theories, and so on. By performing all-atom MD simulations with enhanced conformational sampling techniques, we investigate hydration effect on protein folding and denaturation. We also study conformational dynamics of membrane proteins and functional roles of phospholipid molecules surrounding membrane proteins by all-atom or coarse-grained MD simulations. Hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations are used to examine chemical reactions occurred in enzymes. Furthermore, we develop novel simulation algorithms and new models for biomolecules to overcome difficulties in the current computer simulations of biomolecules.

1. Rapid flip-flop motions of diacylglycerol and ceramide in phospholipid bilayers (Ogushi, Sugita)

Lipid molecules are heterogeneously distributed in biological membranes according to region and situation. Selective distribution is achieved through fast or slow diffusion along or across membranes. The transverse diffusion between bilayer leaflets (flip-flop motion) is fundamental to the lipid distribution and the membrane dynamics. We have investigated flip-flop motions of diacylglycerol and ceramide in phospholipid bilayers using coarse-grained molecular dynamics simulations. In the simulations, flip-flop motions of diacylglycerol and ceramide in the DAPC membrane are slower than cholesterol. Rates correlate with the number of unsaturated bonds in the membrane phospholipids and hence with fluidity of membranes. These findings qualitatively agree with corresponding experimental data. Statistical analysis of the trajectories suggests that flip-flop can be approximated as a Poisson process. The rate of the transverse movement is influenced by depth of the polar head group in the membrane and extent of interaction with water.

2. Proton transfer pathway of NOR (nitric oxide reductase) (Andrei, Sugita)

Nitric oxide reductase (NOR) is a membrane protein that plays an important role in anaerobic respiration. Their structure has been resolved only recently, while the structure and function of cytochrome oxidase (COX), important in aerobic respiration, have been well studied. We performed

all-atom molecular dynamics simulations of two types of NOR (qNOR and cNOR) to find water channels that can serve as a proton transfer pathway for the catalytic reaction. The simulation showed that the distribution of waters in the water channel is continuous from the entrance at the cytoplasmic side up to the binuclear center, with no critical bottlenecks or gaps. In addition, the water molecules in the channel are fairly mobile. This supports the suggestion that the hydrophilic channel from the cytoplasm functions as a proton transfer pathway for the catalytic reaction. Our simulation suggests that the qNOR hydrophilic channel is a potential catalytic proton transfer pathway.

3. Structural Diversity of oligosaccharides in solution. (Re, Nishima, Sugita)

Structural diversity of N-glycans is essential for specific binding to their receptor proteins. To gain insights into structural and dynamic aspects in atomic detail not normally accessible by experiment, we here perform extensive molecular-dynamics simulations of N-glycans in solution using the replica-exchange method. The simulations show that five distinct conformers exist in solution for the N-glycans with and without bisecting GlcNAc. Importantly, the population sizes of three of the conformers are drastically reduced upon the introduction of bisecting GlcNAc. This is caused by a local hydrogen-bond rearrangement proximal to the bisecting GlcNAc. These simulations show that an N-glycan modification like the bisecting GlcNAc selects a certain “key” (or group of “keys”) within the framework of the “bunch of keys” mechanism. Hence, the range of specific glycan-protein interactions and affinity changes need to be understood in terms of the structural diversity of glycans and the alteration of conformational equilibria by core modification.

4. Drug efflux pathway of multidrug transporter AcrB (Imai, Sugita)

AcrB is a membrane protein and a multidrug efflux transporter. Although the recently solved X-ray crystal structures of AcrB provide a rough sketch of how drugs efflux, the pathway and mechanism have not been completely elucidated. In this study, a ligand-mapping method based on the 3D-RISM molecular theory of solvation, which we recently developed, is applied to AcrB in order to identify the drug efflux pathway. We use a fragment-based approach as a strategy to map chemical functionality on the internal surfaces. A few “multifunctional” ligand-binding sites, which recognize various types of functional groups, are detected inside the porter domain. Spatial links between the multifunctional sites indicate a probable multidrug efflux pathway. The frustrated environment of the protein cavity constructed of weak interactions between ligand and protein may be a mechanism for allowing smooth transportation through the protein. Guided diffusion appears to be the main mechanism for efflux.

Principal Investigator

杉田 有治 Yuji Sugita

Research Staff

李 秀榮 Suyong Re
小串 典子 Fumiko Ogushi
小林 千草 Chigusa Kobayashi
二島 渉 Wataru Nishima
Andrei Pisliakov
Pai-Chi Li

Students

小室 靖明 Yasuaki Komuro
渡部 茂久 Shigehisa Watabe

Assistant and Part-timer

平良 和可代 Wakayo Taira
山地 香代 Kayo Yamaji

Visiting Members

石谷 隆一郎 Ryuichiro Ishitani
天能 精一郎 Seiichiro Ten-no
宗行 英朗 Eiro Muneyuki
依田 隆夫 Takao Yoda
光武 亜代理 Ayori Mitsutake
岡本 祐幸 Yuko Okamoto
Cheol, Ho Choi
Michael Feig