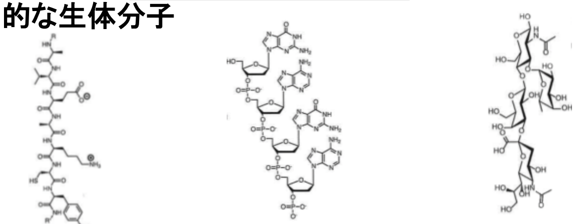
拠点課題ID：EX26202

部位特異的コアフコシル化のメカニズム解明を目指した分子動力学計算

○大野 詩歩、後藤 優輝、真鍋 法義、山口 芳樹
東北医科薬科大学
mail: s.ohno@tohoku-mpu.ac.jp

背景

代表的な生体分子

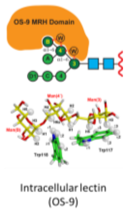


タンパク質
酵素として機能
細胞内の情報伝達

核酸
転写、タンパク質の合成
遺伝情報伝達

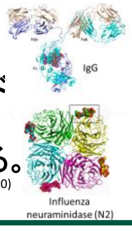
糖鎖

▼



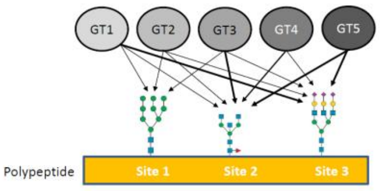
糖鎖はリガンド認識シグナルとして機能する。

Satoh et al. *Mol. Cell* (2010)



糖鎖はタンパク質の高次構造の構築、安定性の向上に関与する。

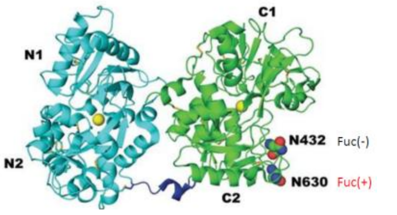
Nagae et al. *Int. J. Mol. Sci* (2012)



同一タンパク質上でも部位によって酵素は選択的に働き、糖鎖の構造は異なる。

トランスフェリンは糖鎖を2箇所に持つ。

フコースによる修飾はAsn630糖鎖のみに認められる。

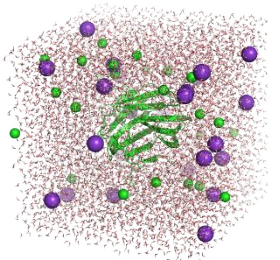


Nagae and Matsumoto et al. *Glycobiology* (2014)

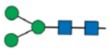
目的
部位特異的なフコース修飾のメカニズムを計算化学の手法から明らかにする。

方法

モデル: AlphaFold2
※AIによるモデリング
構造データベースPDB
(登録件数約約25万3,000件)
を学習セットとして
3D構造をモデリング



糖鎖修飾サイト: CHARMM-GUI
結合糖鎖



Box size: 118 × 118 × 118 Å³
※計算を行う空間のサイズ

力場: CHARMM36
※計算に使用する構造に
数値を割り当てる

Software: GENESIS 1.7.0
※理化学研究所が開発した
分子動力学計算ソフト

Server: 東北大 AOBA-B
システム全体 68ノード

分子動力学計算の流れ

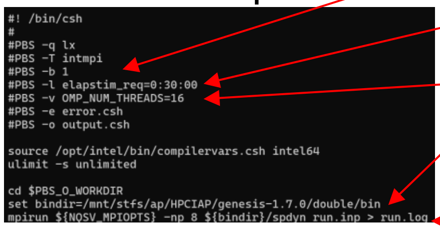
Minimization 10,000 steps
※構造の最適化
1 node 128 core
8 MPI × 16 OpenMP
実行時間：30 min

Heating 100 ps (NVT)
※計算対象が機能する温度まで昇温
1 node 128 core
8 MPI × 16 OpenMP
実行時間：30 min

Production 200 ns (NPT) × 3 runs
※計算対象の動的な構造をサンプリング
3 node 384 core
48 MPI × 8 OpenMP ×4実行時間：72 h

分子動力学計算は200 nsのシミュレーションに72時間かかる

Job script



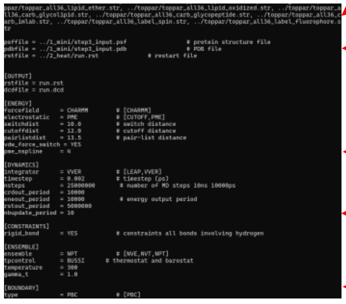
```
#! /bin/csh
#
#PBS -q lx
#PBS -T intmpi
#PBS -b 1
#PBS -l elapstim_req=0:30:00
#PBS -v OMP_NUM_THREADS=16
#PBS -e error.csh
#PBS -o output.csh

source /opt/intel/bin/compilervars.csh intel64
ulimit -s unlimited

cd $PBS_O_WORKDIR
set bindir=/mnt/stfs/ap/HPCIAP/genesis-1.7.0/double/bin
mpirun ${NQSV_MPIOPTS} -np 8 ${bindir}/spdyn run.inp > run.log
```

使用ノード数
最大実行時間
OpenMPスレッド数
GENESIS実行ファイルの指定
MPIプロセス数

GENESIS input file



```
ppar/toppar_all36_lipid_ether.str, ../toppar/toppar_all36_lipid_oxidized.str, ../toppar/toppar_a
ll36_carb_glycolipid.str, ../toppar/toppar_all36_carb_glycopeptide.str, ../toppar/toppar_all36_c
arb_imlab.str, ../toppar/toppar_all36_label_spin.str, ../toppar/toppar_all36_label_fluorophore.s
tr

psffile = ../1_mini/step3_input.psf                # protein structure file
pdbfile = ../1_mini/step3_input.pdb                # PDB file
rstfile = ../2_heat/run.rst              # restart file


[OUTPUT]
rstfile = run.rst
dcdfile = run.dcd

[ENERGY]
forcefield      = CHARMM        # [CHARMM]
electrostatic   = PME           # [CUTOFF,PME]
switchdist      = 10.0          # switch distance
cutoffdist      = 12.0          # cutoff distance
pairlistdist    = 13.5          # pair-list distance
vdw_force_switch = YES
pme_nspline     = 4

[DYNAMICS]
integrator      = VVER          # [LEAP,VVER]
timestep        = 0.002         # timestep (ps)
nsteps          = 25000000       # number of MD steps 10ns 10000ps
crdout_period   = 10000
eneout_period   = 10000          # energy output period
rstout_period   = 5000000
nbupdate_period = 10

[CONSTRAINTS]
rigid_bond      = YES           # constraints all bonds involving hydrogen

[ENSEMBLE]
ensemble        = NPT           # [NVE,NVT,MPT]
tpcontrol       = BUSSI      # thermostat and barostat
temperature     = 300
gamma_t         = 1.0

[BOUNDARY]
type            = PBC           # [PBC]
```

力場の
パラメータファイル
初期構造ファイル
各結合の定義
シミュレーション
時間
温度設定
境界設定

結果

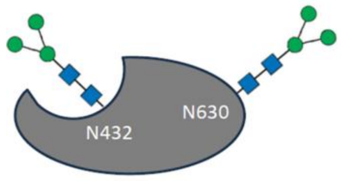
PDB構造調査

PDB ID	Resolution (Å)	Solvent-accessible surface area ($Å^2$, r = 1.4 Å)	
		Asn432	Asn630
2HAV	2.70	101	134
3QYT	2.80	96	130
3SKP	1.70	72	110
3V83	2.10	106	150
3V89	3.10	75	75
3V8X	2.60	92	93
4H0W	2.40	106	134
5DYH	2.68	95	91
6CTC	2.60	101	139
6D03	3.68	107	105
6D04	3.74	93	134
6D05	3.80	99	120
6SOY	3.00	47	-
6SOZ	3.42	111	-
7Q1L	3.00	109	151
8BRC	3.17	-	109
Average	-	94 ± 17	120 ± 23

報告されているトランスフェリンのうち糖鎖が結合している立体構造（全16個）から溶媒露出度を算出。

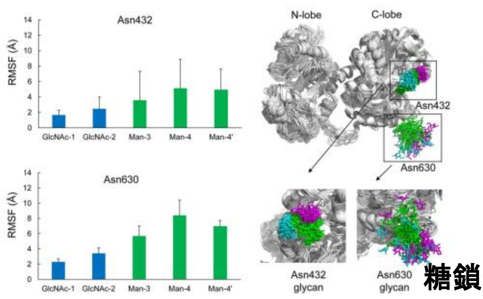
Asn630の方が溶媒に露出されている傾向があり、糖鎖がアクセスしやすい位置にあることが示唆。

酵素がアクセスしにくい



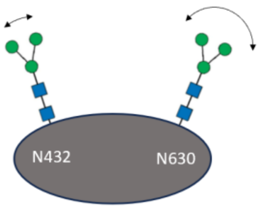
酵素がアクセスしやすい

各糖残基の揺らぎ（RMSF）



揺らぎが小さい

酵素がアクセスしにくい



揺らぎが大きい

酵素がアクセスしやすい

糖鎖ダイナミクスの差が酵素のアクセス頻度の違いを生む。

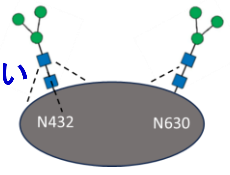
タンパク質と糖鎖の水素結合の形成頻度

Hydrogen bond formation probabilities (%)	Glycan residue	Atom	Amino acid	Atom
66	GlcNAc-1 (630)	O6	Asn630	O
22	Man-4’ (432)	O2	Glu592	Oε
20	GlcNAc-1 (432)	N	Glu442	Oε
12	Man-4’ (432)	O3	Glu592	Oε
11	GlcNAc-2 (432)	O6	Arg600	Nη
11	Man-3 (432)	O4	Asn595	Nδ

※形成頻度 ≥ 10% の水素結合のみ集計

Asn432は4か所と水素結合は → 運動を制限
Asn630は水素結合が1か所のみ → 自由度が高い

酵素がアクセスしにくい



酵素がアクセスしやすい

まとめ・謝辞

Asn630糖鎖はAsn432糖鎖に比べ溶媒露出度が高く、揺らぎも大きいため、フコース転移酵素がアクセスしやすい。

謝辞:・医薬基盤・健康・栄養研究所　李秀栄先生　・東北大学サイバーサイエンスセンター

シミュレーション動画