

令和5年度 博士論文

分子動力学シミュレーションによる

HDM2 N末端ドメインの構造ダイナミクスの解明

千葉大学大学院 医学薬学府

博士3年後期課程 先端創薬科学専攻

創薬科学講座 薬品物理化学研究室

渡邊 一樹

略語

cMD	conventional molecular dynamics
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
gREST	generalized replica exchange with solute tempering
HDM2	human double minute2
HSQC	hetero-nuclear single quantum coherence
MBAR	multistate Bennett acceptance ratio
MD	molecular dynamics
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
PCA	principal component analysis
PDB	protein data bank
REST	replica exchange with solute tempering
RMSD	root mean square deviation
SASA	solvent-accessible surface area
SPR	surface plasmon resonance

目次

1. 序論	5
1-1. がん抑制タンパク質 p53 を制御する HDM2 の機能.....	5
1-2. HDM2 についての構造的基盤.....	7
1-3. MD シミュレーションを用いた HDM2 の構造ダイナミクスの解析.....	11
1-4. 所属研究室の NMR 解析から明らかになった HDM2 の multi-state な構造平衡	14
2. 研究目的	19
3. 方法	20
3-1. シミュレーションの初期構造.....	20
3-2. シミュレーションの条件とエネルギー最小化～平衡化の手順	20
3-3. 通常の MD (conventional MD: cMD) シミュレーション	21
3-4. gREST を用いた MD シミュレーション.....	21
3-5. シミュレーションによって得られたトラジェクトリーの解析	22
3-6. HDM2 の NMR 測定.....	23
4. 結果と考察.....	24
4-1. 本研究の MD シミュレーションに最適な力場の決定	24
4-2. gREST シミュレーションによる HDM2 の多様な構造のサンプリング	26
4-2-1. cMD シミュレーションの結果と問題点	26
4-2-2. 拡張アンサンブル法を用いることの利点	29
4-2-3. REST の概要	29

4-2-4. gREST の概要	31
4-2-5. gREST 適用によるサンプリング効率向上の確認	33
4-3. <i>k</i> -means clustering によるサンプリング構造群の分類.....	34
4-4. I19 側鎖-Y100 芳香環の位置関係の解析による二つの closed 構造の特定	43
4-5. cluster 1, 2 の構造的特徴の比較.....	45
4-5-1. p53 結合サイト周辺構造の比較	45
4-5-2. lid-core 間の残基間コンタクトの比較	47
4-5-3. lid-core 間の水素結合の比較	51
4-5-4. cluster 1, 2 間の構造的特徴の比較 まとめ.....	53
4-6. 2D 自由エネルギーランドスケープを用いた各構造の安定性や構造変化に関する考察.....	54
4-7. S17 リン酸化が multi-state な構造平衡に与える影響に関する考察	58
5. 総括と展望.....	61
6. 参考文献	64
謝辞.....	70
主論文目録	72
主査、副査	73

1. 序論

1-1. がん抑制タンパク質 p53 を制御する HDM2 の機能

ヒト二重微小染色体 2 (human double minute2: HDM2) はがん抑制タンパク質 p53 を基質として認識し、proteasome による分解を促進させる役割を果たす E3 ユビキチンリガーゼである¹⁻³。通常の細胞では、HDM2 は p53 をユビキチン化して proteasome 分解を誘導することで細胞内の p53 存在量を低濃度に保ち、p53 による細胞のアポトーシスを抑制している (Figure 1a)。一方で、細胞がストレスを受けるとそれに応答して DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-dependent protein kinase: DNA-PK) などのキナーゼにより S17 などの HDM2 のセリン残基がリン酸化される^{4,5}。これにより HDM2 と p53 の相互作用が阻害され、p53 のユビキチン化や分解が抑制される。その結果、p53 が核に移行して細胞のアポトーシスを誘導する (Figure 1b)。およそ 5% の腫瘍では HDM2 は過剰発現しており⁶、細胞ストレス非依存的に p53 の機能が阻害され、細胞のがん化が進行する^{7,8}。そのため、p53 依存的なシグナル伝達機構の理解や新規抗がん剤創出といった観点から、HDM2 による p53 認識についての構造的基盤の解明は重要である。

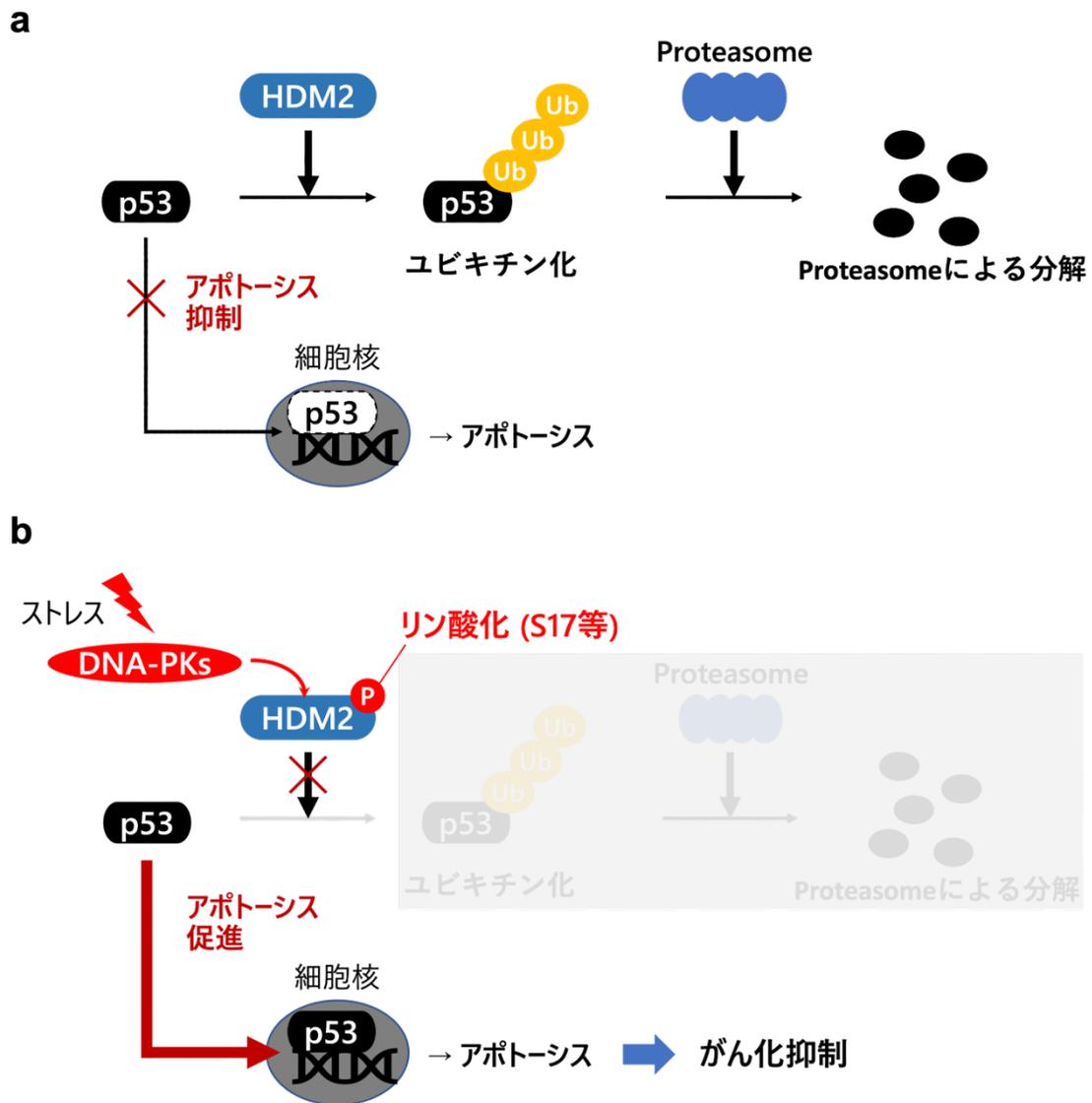


Figure 1. HDM2 によるがん抑制遺伝子 p53 の制御機構 模式図

(a) 通常細胞における制御機構 (b) 細胞ストレス応答時

1-2. HDM2 についての構造的基盤

HDM2 は 491 アミノ酸残基からなるマルチドメインタンパク質であり、N 末端 109 残基の N 末端ドメインの他、Acidic ドメイン、Zinc-finger ドメイン、およびユビキチンリガーゼ活性を持つ RING ドメインから構成されている (Figure 2a)⁹⁻¹³。これらのドメインのうち、N 末端ドメイン (Figure 2b、残基番号 1-109、今後はこのドメインのことを単に HDM2 と表記する。) は p53 と直接結合することが知られており、X 線結晶構造解析によって得られた HDM2 と p53 ペプチドの複合体構造から、HDM2 の p53 結合サイトは core (残基番号 25-109) 内に位置することが明らかになっている (Figure 2c)¹⁴。また、この複合体の結合界面の構造から、複合体形成には p53 の三つの疎水性残基 (F19, W23, L26) 側鎖が重要な役割を果たすことが明らかになっている (Figure 2d)。このような構造情報をもとに、これまでに Nutlin-3a をはじめとする HDM2-p53 相互作用を標的とする様々な阻害剤が開発されてきた^{15,16}。

HDM2 apo 体については NMR 法を用いて構造決定が行われており、N 末端 24 残基はアミドプロトンの化学シフトの分散が乏しいこと、および core 領域との間に核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect: NOE) がほとんど観測されなかったことから、一定の構造を取らないフレキシブルな天然変性領域 (Intrinsically Disordered Region: IDR) であることが示されている (Figure 2b)¹⁷。また、先行研究の表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) を用いた親和性測定実験では、HDM2 に対する p53 の親和性は N 末端 24 残基を欠損させた場合、大幅な上昇が見られた (Figure 3a)¹⁸。この結果から、HDM2 の N 末端領域は p53 結合サイトに会合することで p53 と競合して自己阻害する蓋”lid”として機能すると考えられている (Figure 3b)。

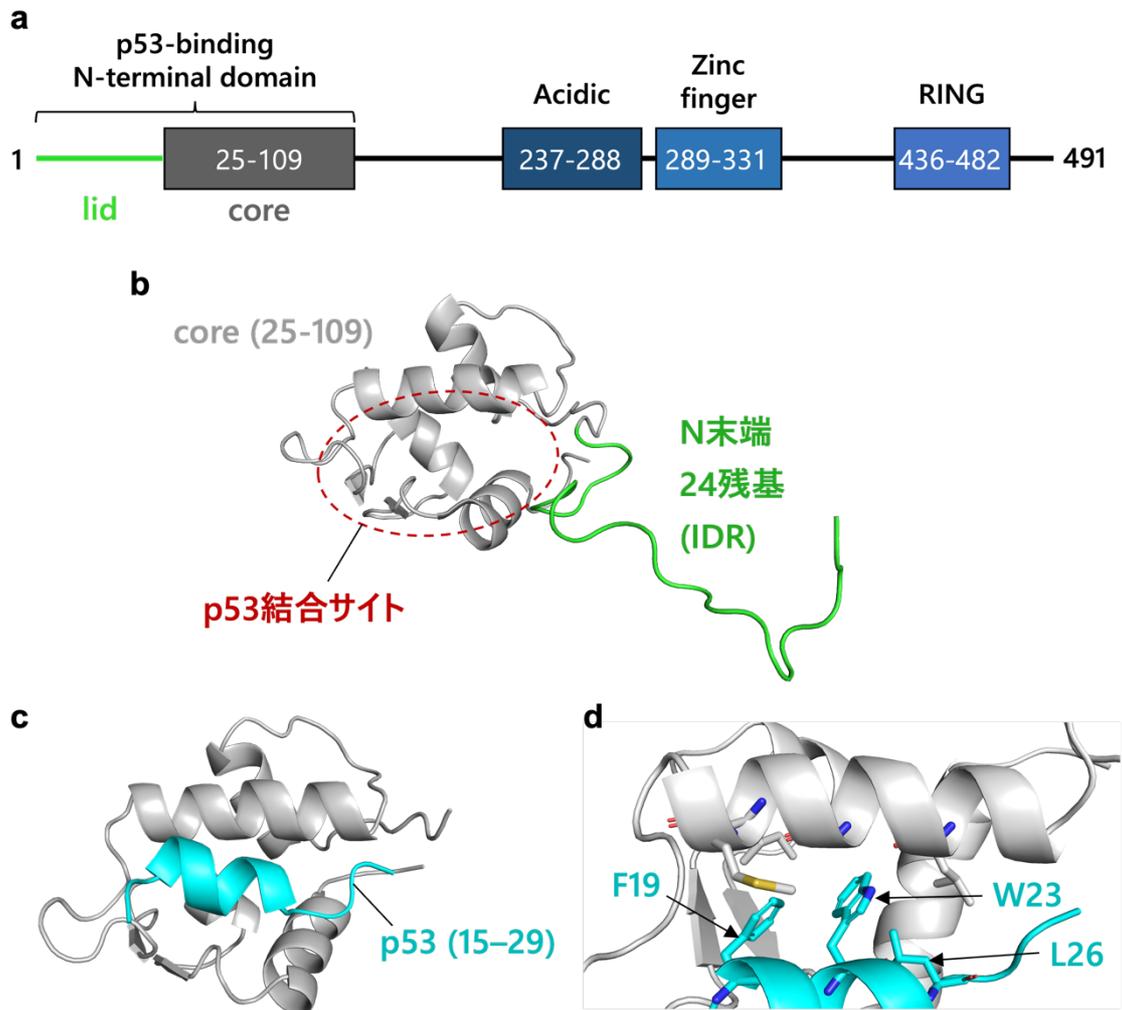
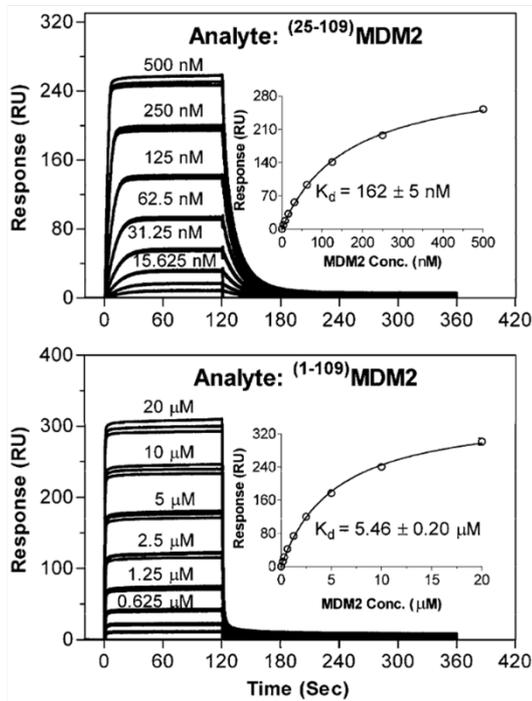


Figure 2. HDM2 のドメイン構成と HDM2-p53 複合体の立体構造

(a) HDM2 の一次構造。(b) HDM2 N 末端ドメインの立体構造 (PDB ID: 1Z1M model 4¹⁷、残基番号 1-109 のみを表示。)。 (c) HDM2-p53 複合体構造の立体構造 (PDB ID: 1YCR¹⁴) と (d) 複合体界面付近の構造。

a



b

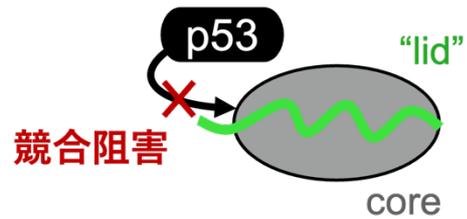


Figure 3. HDM2 の N 末端 24 残基の有無が p53 親和性に与える影響

(a) SPR を用いた N 末端 24 残基を欠損した HDM2 (上) と N 末端を有する HDM2 (下) に対する p53 ペプチド (残基番号 15–29) の親和性評価¹⁸。(b) SPR を用いた検討から考えられる HDM2 が取りうる構造や N 末端 24 残基の "lid" としての役割 模式図。

また、lidの一部(残基番号1-15)を欠損したHDM2を用いた別のNMR解析¹⁹では、I19をはじめとする複数のlidに含まれる残基の主鎖アミド基において、apo体とp53結合状態とで異なるシグナルが観測され(Figure 4a)、それぞれlidとcoreが結合した状態と、lidがcoreから解離した状態を反映していると推測される。また、apo体ではp53結合状態と同じ位置にもマイナーなシグナルが観測されたことから(Figure 4a)、apo体においても一部はp53結合状態と同様にlidがcoreから解離した構造をとることが示唆される。以上より、apo体のHDM2においては、lidがcoreから解離したopen状態とlidとcoreが結合したclosed状態の2状態構造平衡が存在し、両者のシグナル強度比からclosed構造の方が多く存在するというモデルが提唱されている(Figure 4b)。

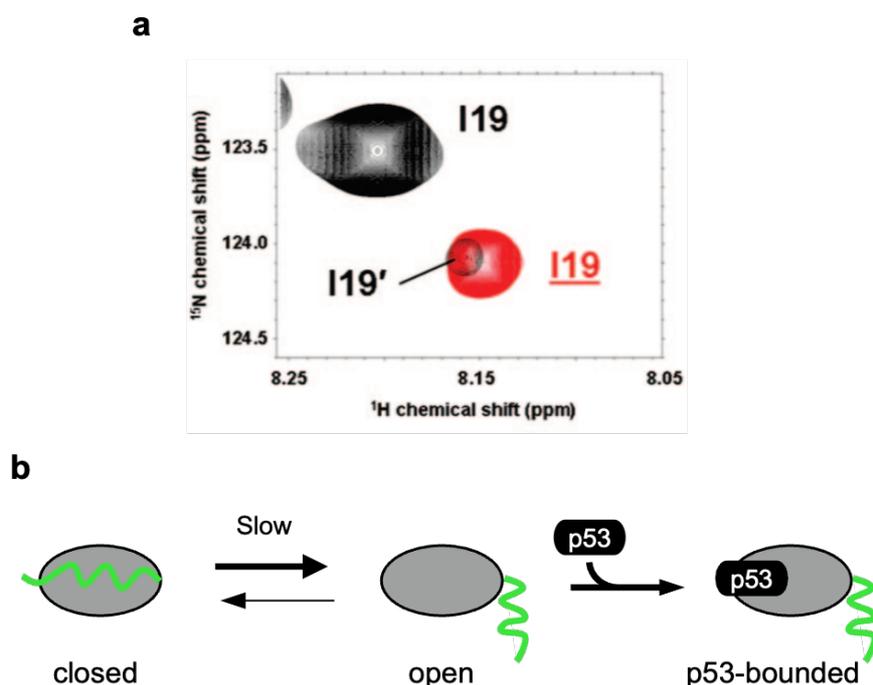


Figure 4. HDM2 の NMR 解析と apo 状態における 2 状態平衡

(a) lid に含まれる残基 I19 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル¹⁹。apo HDM2 (残基番号 16-109) と p53 結合状態のシグナルをそれぞれ黒、赤色で示している。(b) NMR を用いた先行研究から提唱された HDM2 の open-closed の二状態平衡 模式図。

1-3. MD シミュレーションを用いた HDM2 の構造ダイナミクスの解析

前述の NMR 法の他にも、タンパク質等の生体分子のダイナミクスを詳細に解析することができる分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) シミュレーションを用いた HDM2 の構造ダイナミクスの解析が多数行われている²⁰⁻²⁴。中でも、広域な構造サンプリングが可能となる拡張アンサンブル法を活用した MD シミュレーションによる先行研究では、apo 体に加えて holo 体の HDM2 の構造ダイナミクスの解析が行われた²¹。その結果、先行研究の NMR 解析から示唆された HDM2 の open-closed の構造平衡を再現することに成功したほか、p53 ペプチドや Nutlin-3a を含む 3 種類の小分子リガンドの結合によって、HDM2 の構造ダイナミクスが変化することが明らかになった (Figure 5, 6)。こうした MD シミュレーションを用いた検討から HDM2 と p53 の相互作用について、p53 は HDM2 が open 状態をとるときにのみ選択的に結合できることを示した、“conformational selection”モデルが提案されている。

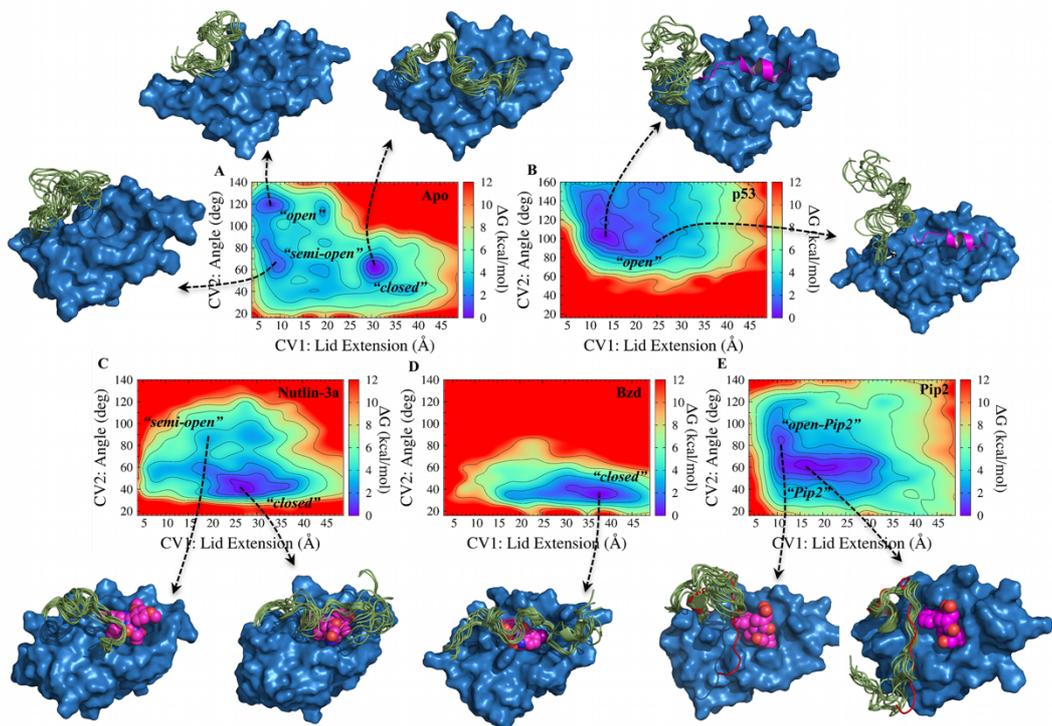


Figure 5. 先行研究における HDM2 の ligand 依存的な自由エネルギーランドスケープの変化²¹
 CV1 軸、CV2 軸の詳細は Figure 6 参照。それぞれ、(A) apo HDM2、(B) HDM2-p53 (17-29) ペプチド複合体、(C) HDM2-Nutlin-3a 複合体、(D) HDM2-Bzd 複合体、(E) HDM2-Pip2 複合体のシミュレーション結果を示している。ランドスケープ上のヒートマップ形式の色は各変数を取る構造の相対的なエネルギー安定性を表す。各ケースにおける構造は、矢印で示された領域付近の代表的な 10 構造の重ね合わせ構造を表示している。

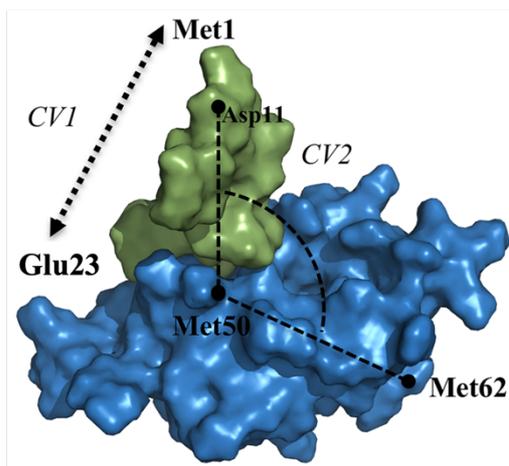


Figure 6. 先行研究における構造定義のための 2 変数²¹
 CV1: lid の伸長 (Met1 (C α)-Glu23 (C α)間の距離); CV2: lid と core によって形成される角の大きさ (Met62 (C α)-Met50 (C α)-Asp11 (C α) がなす角)

さらに、S17に対するリン酸化がHDM2の構造ダイナミクスに与える影響についてもMDシミュレーションを用いて検討されており、複数の先行研究でS17リン酸化によるclosed構造の安定化が報告されている^{20,22}。しかしながら、closed構造安定化の具体的なメカニズムについての見解は先行研究ごとに異なっている。例えば、Verkhivkerはリン酸化模倣変異S17Dとcore領域のH96との間に形成される水素結合をclosed構造の構造安定化の要因として推察した(Figure 7a)²⁰。それに対して、Bueren-CalabuigらはS17Dは直接coreと相互作用を形成しないが、S17Dの変異がlidの構造変化を引き起こし、その結果形成されたD11とH96の間の水素結合がclosed構造安定化の要因であると提唱した(Figure 7b)²²。以上のMDシミュレーションによる検討の結果を支持する実験結果が得られていないこともあり、S17リン酸化がHDM2の構造平衡に与える影響については検討の余地が残されている。

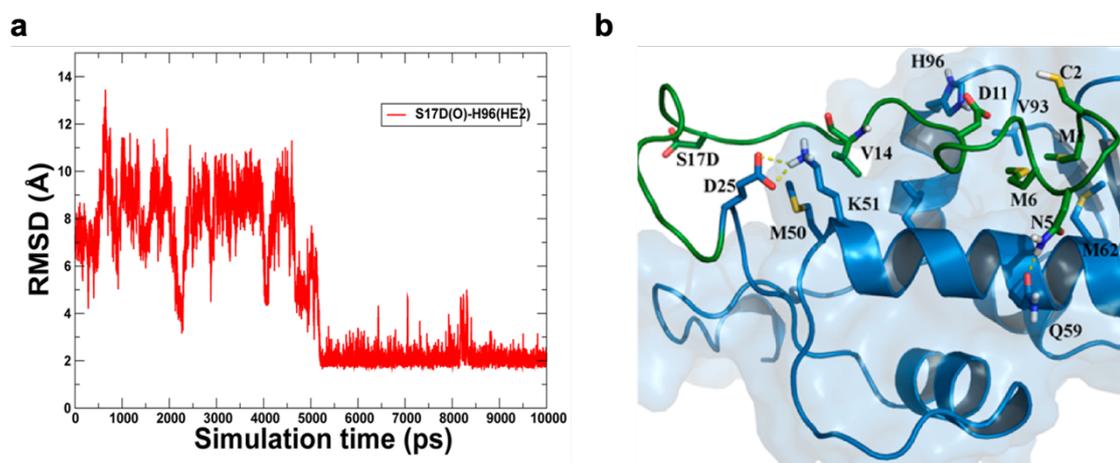


Figure 7 S17リン酸化模倣変異体S17D HDM2のMDシミュレーション結果の一部

(a) Verkhivkerらの検討でのS17DとH96の原子間距離の時間発展²⁰。時間経過と共に、(S17D O)-(H96 HE2)間の近接が観測された。(b) Bueren-Calabuigらの検討でのclosed構造の代表構造におけるlid近傍の構造²²。S17Dは溶媒側を向いており、core領域の残基との近接が観測されなかった一方で、D11-H96間では水素結合形成が観測された。

1-4. 所属研究室の NMR 解析から明らかになった HDM2 の multi-state な構造平衡

当研究室において全長の lid を有する HDM2 (残基番号 1-109) の Ile と Met の側鎖メチル基を観測対象とした NMR 解析が行われている。apo 体、p53 結合状態の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルをそれぞれ測定したところ、先行研究と同様に apo 体の I19 側鎖メチル基のシグナル強度の異なる二つのシグナルが観測され、それらのうちのマイナーなシグナルが p53 結合状態と同じ位置に観測された (Figure 8a)。この結果より、全長の lid を有する apo 体の HDM2 においても、lid の一部を欠損した HDM2 を用いた先行研究と同様に、open-closed 状態間の構造平衡を形成していることが確認された。

さらに、apo 体の HDM2 の open-closed の構造平衡についてのさらなる知見を得るために、NMR シグナルに温度変化による変化があるかどうかを検証した。その結果、open 状態のシグナルの化学シフトには変化がみられなかった一方で、I19 と M50 の closed 状態のシグナルは温度依存的に直線的な化学シフト変化を起こした (Figures 8b and 8c)。一般に、NMR シグナルは二つの状態の構造交換の速度に対応した挙動を示すことが知られている (Figure 9)^{25,26}。例えば、状態 A, B 間の構造交換の速度が msec よりも遅い (slow-exchange) 場合、各状態の量比 P_A , P_B がシグナル強度比に反映された二つのシグナルとして観測される。一方、2 状態の構造交換の速度が μsec よりも速い (fast-exchange) 場合、各状態の量比 P_A , P_B に依存した化学シフトに一つだけシグナルが観測される。このことを踏まえると、HDM2 の構造平衡はこれまでに示されていた open-closed 間の slow-exchange の構造平衡に加え、closed 構造の中においてもタイムスケールの異なる fast-exchange の構造平衡が存在することが明らかになった。さらに、open 状態の存在割合も I19 の化学シフト変化と相関して温度上昇とともに増加傾向にあることが確認され、この closed 内の fast-exchange の構

造交換が open-closed の slow-exchange の構造平衡と関連することも示唆された (Figure 10)。

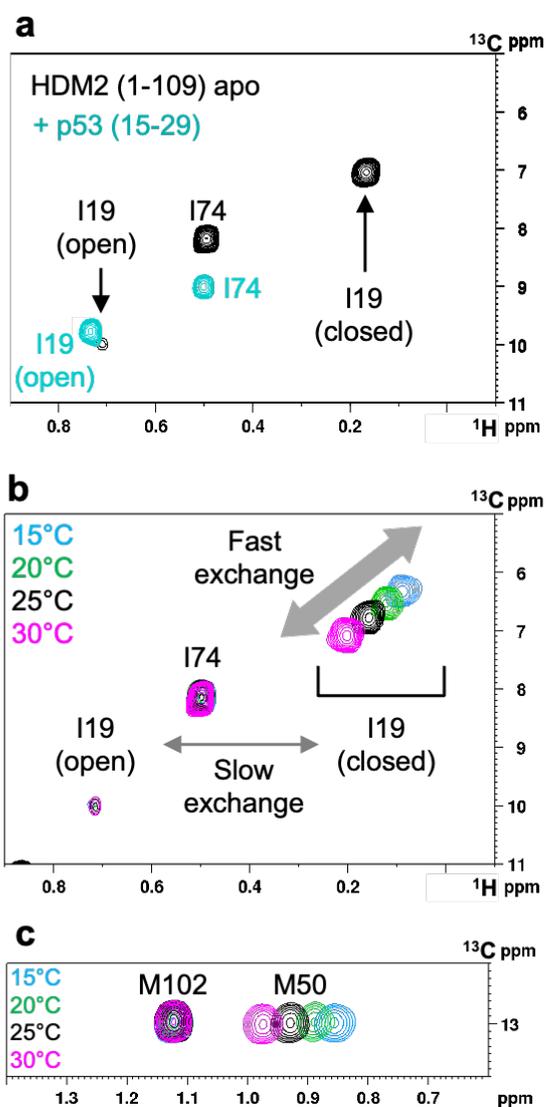
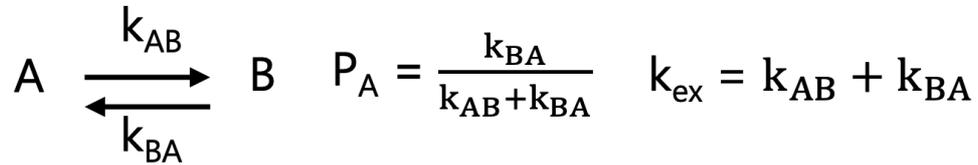


Figure 8. 当研究室におけるメチル基を観測対象としたHDM2のNMR解析

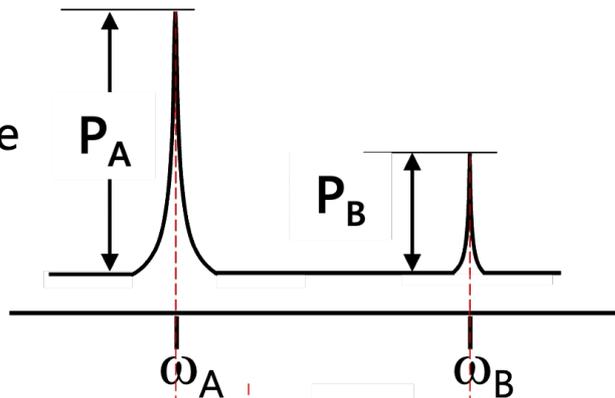
(a) lidに含まれる残基I19の ^1H - ^{13}C HSQCスペクトル。apo HDM2(残基番号1-109)とp53結合状態のシグナルをそれぞれ黒、水色で示している。(b, c) I19 (b)とM50 (c)側鎖メチル基の温度依存的な化学シフト変化、各温度。

Binding/conformational exchange



Example:

- ① slow-exchange
(msec scale)



- ② fast-exchange
(μsec scale)

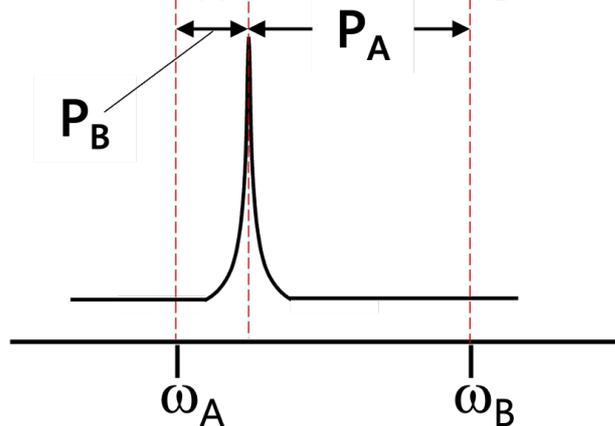


Figure 9. 2 状態 A、B の構造交換速度と各状態の NMR シグナルの関係性^{25,26}

状態 A,B が交換状態にあるとき、交換速度 k_{ex} は $k_{AB}+k_{BA}$ と定義される。この k_{ex} が状態 A と B に対応するシグナルの周波数差(化学シフト差)よりも十分に遅いとき ($k_{ex} \ll \Delta \omega$)、2つの NMR シグナルとして観測され、状態の存在量比はシグナルの強度比に対応する。

一方 k_{ex} が A,B の化学シフト差よりも十分に速いとき ($k_{ex} \gg \Delta \omega$)、2つの状態は単一のピークとして観測され、状態の存在量比はシグナルの化学シフトに対応する。

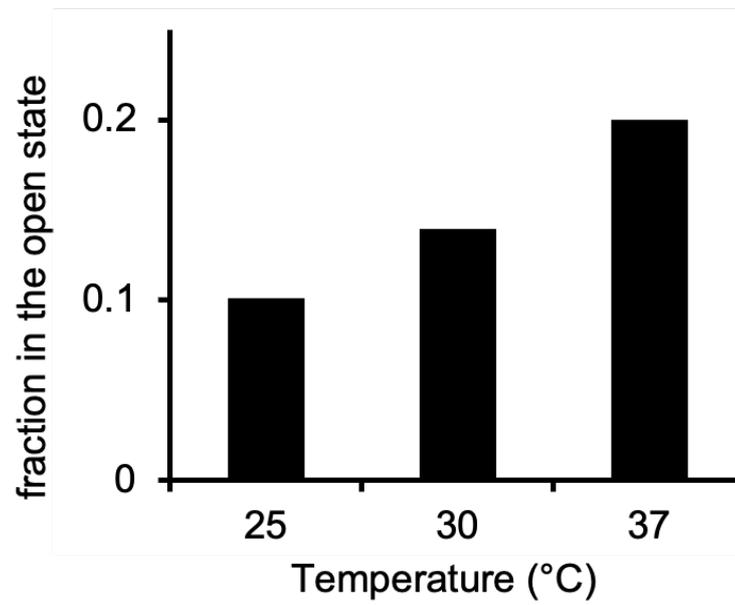


Figure 10. 温度変化による open 状態の存在割合の変化

I19 の closed 状態, open 状態に対応するシグナルのピーク体積から算出

以上のように、当研究室の NMR 解析から HDM2 は open-closed 状態間の slow-exchange の構造平衡に加えて、二つの closed 構造の間の fast-exchange の構造平衡を含む、multi-state な構造平衡状態にあることが明らかになった (Figure 11)。この multi-state な構造平衡を形成する各構造の具体的な構造は、リン酸化を含めた HDM2 による p53 の制御メカニズムにおける構造平衡の役割を検討する上で有用な情報である。しかしながら、柔軟で運動性の高い lid を含む HDM2 の構造を実験的手法で詳細に構造決定することは困難である。そこで MD シミュレーションで得られた構造に NMR 法で得られた実験情報を組み合わせた解析を行うことで、これまで不明だった HDM2 の各状態における lid の詳細なコンフォメーションを解明することができると考えた。

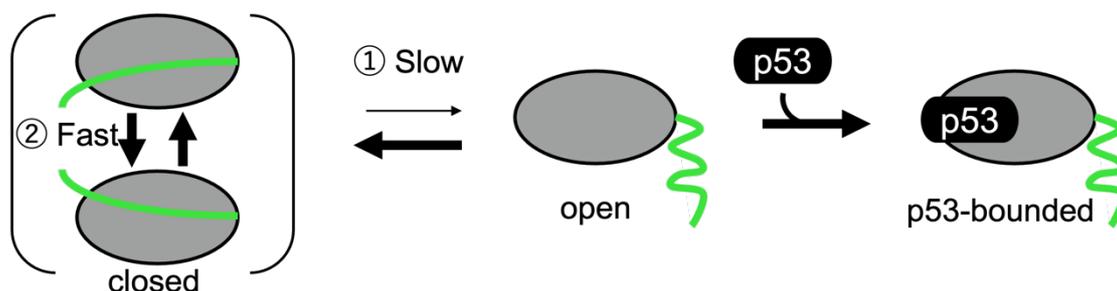


Figure 11. 当研究室の NMR 解析から示唆された HDM2 の multi-state な構造平衡 模式図

2. 研究目的

本研究では、HDM2に対するMDシミュレーションによって複数の構造を原子レベルで可視化し、HDM2が形成する multi-state な構造平衡がどのように p53 の結合を制御するのかを明らかにすることを目的とした。

戦略として、HDM2 の遅いタイムスケールで生じる open-closed の構造平衡を再現するために、拡張アンサンブル法の一つである generalized replica exchange with solute tempering (gREST)²⁷ を用いた MD シミュレーションを実施した。サンプリングされた構造群の分類、解析に NMR 解析の結果を活用することで、multi-state な構造平衡を形成する各構造を詳細に可視化することを目指した。

3. 方法

3-1. シミュレーションの初期構造

シミュレーションの初期構造として、PDB ID: 1Z1M¹⁷に含まれる 24 個の apo 体の HDM2 の NMR 溶液構造のうち、model 2 を使用した。この構造のうち、当研究室の NMR 実験で用いられたコンストラクトと同様の残基番号 1-109 のみを使用した。また、構造中の全てのヒスチジン残基 (残基番号 73, 96) の電荷は中性に保った。一辺 97 Å の立方体のシミュレーション box の中心に検討対象の構造を配置し、その周辺を 150 mM NaCl 水溶液で充填した。こうして得られた系には OPC モデル²⁸の水分子 27664 分子、Na⁺イオン 80 個、Cl⁻イオン 83 個を含む、合計 112597 個の原子が含まれていた。

3-2. シミュレーションの条件とエネルギー最小化～平衡化の手順

本研究の全てのシミュレーションは GENESIS package version 2.0^{29,30} を用いて実施された。タンパク質、水の力場としてそれぞれ AMBER ff99SB-ILDN-NMR³¹、OPC²⁸ を用いた。水素原子を含む全ての結合を SHAKE 法³² を用いて拘束し、水分子は SETTLE 法³³ で剛体化した。Van der Waals 相互作用及び静電相互作用の近距離成分の cutoff 長は 8 Å とし、長距離静電相互作用については Particle-Mesh Ewald 法^{34,35} を用いて評価した。

対象の系に対してはじめに 5000 step のエネルギー最小化を行った。次に、300 K において 3 段階に分けて平衡化を行った。はじめに Bussi 法による温度制御³⁶ とタンパク質重原子に対する 1.0 kcal/mol/Å² の位置拘束のもと、NVT アンサンブルで 50 ps の平衡化を行った。次に、Bussi 法による温度・圧力制御^{36,37} とタンパク質主鎖重原子に対する 1.0 kcal/mol/Å² の位置拘束のもと、NPT アンサンブル (1 bar) で 100 ps の平衡化を行った。この

二つの平衡化のステップでは時間積分法として速度ベルレ法を用い、時間刻み幅は 2 fs に設定した。最後に、温度制御に Bussi 法、時間積分法として Reference System Propagator Algorithm (RESPA) 積分法³⁸を用い、時間刻み幅を 2.5 fs に設定し、NVT アンサンブルで 1 ns の平衡化を行った。

3-3. 通常の MD (conventional MD: cMD) シミュレーション

前述の 3-2 の 3 段階の平衡化ののち、温度制御に Bussi 法、時間積分法として RESPA 積分法を用い、時間刻み幅を 2.5 fs に設定し、NVT アンサンブル (300 K) で 1 μ s の cMD シミュレーションを行った。

3-4. gREST を用いた MD シミュレーション

本研究の gREST 適用にあたり、lid 領域全残基 (残基番号 1–24) と K94 の Lennard-Jones 及びクーロン相互作用エネルギー項を溶質領域として定義した。また、シミュレーションは 4 つのレプリカを用いて実施し、各レプリカの溶質温度は 300.0, 320.3, 343.8, 368.3 K、溶媒の温度は 300.0 K とした。溶質温度は GENESIS の automatic parameter tuning tool を用いておよそ 0.25 の確率でレプリカ交換が生じるように決定された。全てのシミュレーションは温度制御に Bussi 法、時間積分法として RESPA 積分法を用い、時間刻み幅を 3.5 fs に設定し、NVT アンサンブルのもとで実施された。また、長い時間刻み幅でのシミュレーションを安定に行うために、Hydrogen Mass Repartitioning (HMR)³⁹ を HMR 比率 3.0⁴⁰ で適用した。production run の前に、すべてのレプリカを対象に交換なしでの 1.05 ns の平衡化を行った。その後、レプリカ交換は 10.5 ps 毎に試行しながら、1 レプリカあたり 315 ns の Production run を実施した。

3-5. シミュレーションによって得られたトラジェクトリーの解析

シミュレーションによって得られた全てのトラジェクトリーの解析は *k*-means clustering、主成分解析 (Principal component analysis: PCA) と自由エネルギープロファイルについては GENESIS analysis tool を、それ以外の解析は MDTraj パッケージ⁴¹を使用した。本論文のタンパク質の3次元構造の Figure は全て PyMOL⁴²を用いて作成した。gREST を用いたシミュレーションのうち、溶質温度 300 K のトラジェクトリーに含まれる構造群の分類を GENESIS software package に実装されている *k*-means algorithm によって行った。この時、4-3 節で後述する当研究室の NMR の実験結果に基づいて、I19, M50, Y100, Y104 の全ての原子の3次元座標情報を構造群の clustering の基準とした。また、cluster 内での open 構造と closed 構造の混在を極力避けるために、cluster の数を 8 とした (cluster 数決定の経緯については後述の 4-3 節参照)。core の各残基の溶媒露出表面積 (Solvent-Accessible Surface Area: SASA) は Shrake-Rupley algorithm⁴³を用いて計算した。PCA は溶質温度 300 K のトラジェクトリーに含まれる構造群と PDB ID: 1Z1M の全てのモデル構造の C α 原子の3次元座標情報を用いて実施した。lid の各残基の helix 形成確率は dictionary of protein secondary structure (DSSP) algorithm⁴⁴を用いて計算した。lid と core の間の contact について、残基ペアにおいて最も近接する重原子同士の距離が 4.5 Å 以下の時、残基間でコンタクトが形成されているとみなした。また、水素結合の形成については水素原子と acceptor 原子の間の距離が 2.5 Å 以下かつ acceptor、水素、donor の各原子により形成される角度が 120°以上の時、水素結合が形成されているとみなした。gREST シミュレーションによって得られた全構造を対象とする自由エネルギープロファイルは multistate Bennett acceptance ratio (MBAR) 法⁴⁵を用いて実施した。300 K 以外の溶質温度のレプリカで取得された構造群の重み因子

を計算し、基準温度を 300 K として 2 変数を軸とする平面上での相対的な自由エネルギーを計算した。

3-6. HDM2 の NMR 測定

Ile $\delta 1$ 位および Met ϵ 位メチル基選択的 ^{13}C 標識 HDM2 (1-109)は大腸菌発現系により調製した。特記しない限り、精製した HDM2 およびその変異体は 100 μM の濃度で Buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 10% D_2O)中に溶解し、Bruker Avance NEO 600MHz を用いて 25°C 条件下で ^1H - ^{13}C HSQC 2 次元 NMR スペクトルの取得を行った。

4. 結果と考察

4-1. 本研究の MD シミュレーションに最適な力場の決定

まず初めに、本研究の HDM2 の MD シミュレーションに最適な力場を決定するために、4 種類のタンパク質力場を用いた cMD シミュレーションをそれぞれ 1 μ s 行った。MD シミュレーションでは、対象の系に含まれる各原子にかかる力を力場と呼ばれるパラメータのセットを用いて計算する。タンパク質系の力場は CHARMM^{46,47} や AMBER^{48,49} といった力場が広く用いられており、現在でも開発、改良が続けられている。一方で、力場に含まれるパラメータの値はあるモデル化合物の実験値を再現するようにチューニングされていることから、他の化合物において精度良く検討が行えるとは限らない。こういった背景から、MD シミュレーションの構造サンプリングの精度に大きな影響を与えるため、対象の系にあった力場の選択は慎重に行う必要がある。

本研究では CHARMM の最新力場である CHARMM36m⁴⁷、AMBER の最新力場である AMBER ff19SB⁴⁹、HDM2 のように IDR を含む系や天然変性タンパク質 (Intrinsically Disordered Protein: IDP) の検討向けに主鎖二面角のポテンシャルエネルギーが高度にチューニングされた AMBER ff99SBws-STQ⁵⁰、HDM2 の MD シミュレーションについての先行研究で用いられていた AMBER ff99SB-ILDN-NMR³¹ の 4 種類の力場を用いた 1 μ s の cMD シミュレーションを実施し、先行研究の NMR 実験の lid-core 間の原子間距離情報との対応から最適な力場を決定した。基準となる原子間距離情報として、PDB ID: 1Z1M に座標データとともに登録されている NOE の距離情報¹⁷のうち、lid-core 間の 3 つの原子ペア、(I19 C δ 1 水素原子)-(H96 H β 2)、(I19 C δ 1 水素原子)-(R97 H α)、(I19 C γ 2 水素原子)-(Y100 H ϵ 2) に

ついでに NOE の最大値 (それぞれ 6.6、6.0、6.2 Å) を用いた。各力場を用いたシミュレーションにおける 3 つの該当原子間距離の確率分布を算出したところ、AMBER ff99SB-ILDN-NMR ではいずれの原子ペアにおいても基準値以内の値を示す構造が多く見られた (Figure 12)。対して、それ以外の力場を用いた場合は基準値以上の範囲に広い分布が見られた。以上の結果から、1 μ s の cMD シミュレーションにおいては AMBER ff99SB-ILDN-NMR が lid-core 間の原子間距離を最も精度良く再現できていると判断し、本研究では先行研究と同様、AMBER ff99SB-ILDN-NMR を用いて MD シミュレーションを行うこととした。

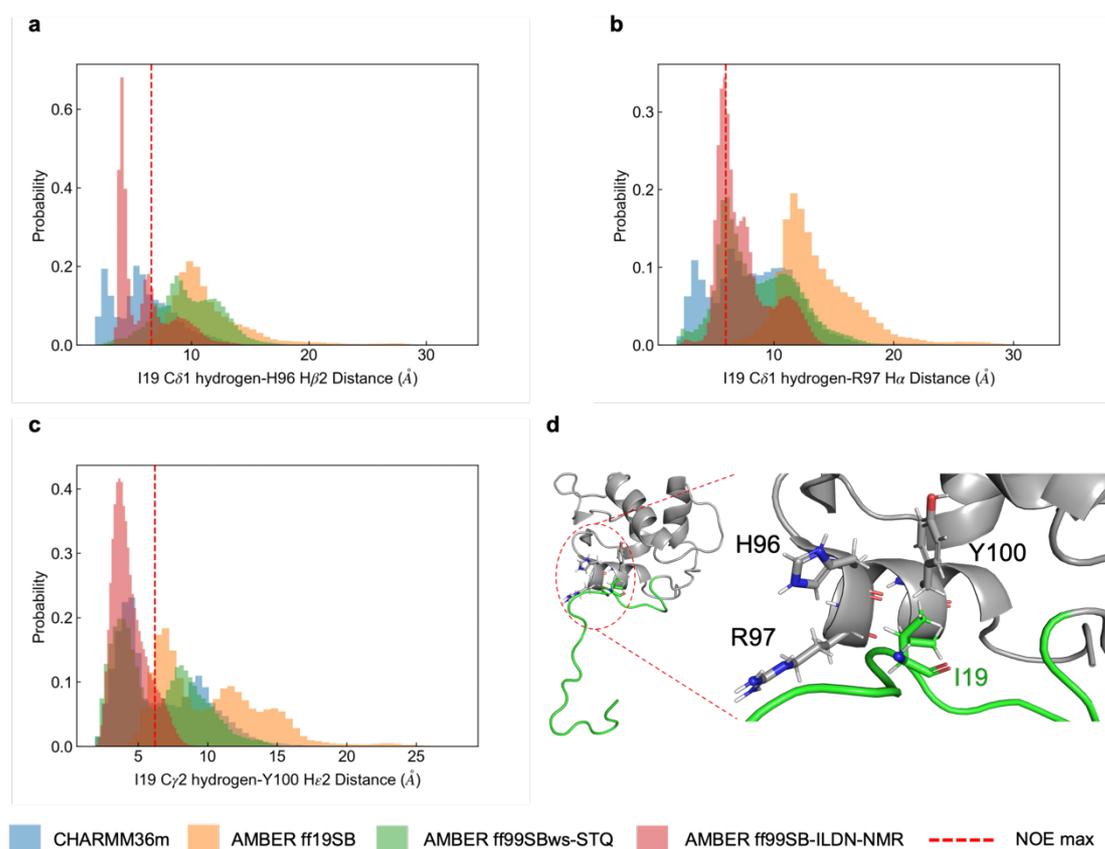


Figure 12. 着目原子間距離の解析による本研究の遂行に最適な力場の検討

(a, b, c) 4 種類の力場を用いた 1 μ s MD シミュレーションにおける着目原子間距離の確率分布と先行研究の NOE の実験値との対応。(a) (I19 C δ 1 水素原子)-(H96 H β 2)、(b) (I19 C δ 1 水素原子)-(R97 H α)、(c) (I19 C γ 2 水素原子)-(Y100 H ϵ 2) (d) 立体構造中での着目残基同士の位置関係

4-2. gREST シミュレーションによる HDM2 の多様な構造のサンプリング

NMR 実験で観測された HDM2 の multi-state な構造平衡を可視化するために、前節で決定した力場を用いた gREST シミュレーションを行った。本説では gREST シミュレーションの前段階で実施した cMD シミュレーションの結果と問題点やその解決策の一つである拡張アンサンブル法を用いることの利点、gREST の従来法にあたる replica exchange with solute tempering (REST)⁵¹、gREST の概要、gREST 適用によるサンプリング効率向上の確認について説明する。

4-2-1. cMD シミュレーションの結果と問題点

力場の検討の段階で実施した 1 μ s の cMD シミュレーションでは、およそ 300 ns 以降で lid、core の各領域の C α 炭素の平均二乗偏差 (Root Mean Square Deviation: RMSD) が一定の値に収束しており (Figure 13)、lid と core が近接して closed 様の構造をとったのちは大きな構造変化は観測されなかった。この結果は、cMD では比較的長いタイムスケールで生じる open-closed の構造平衡を再現できないことを示唆している。これは MD シミュレーションによる検討可能な時間と実際の生体分子の構造変化の時間間に存在する大きなギャップ (Figure 14a) に加え、局所安定構造に一度トラップされてしまうと別の状態への遷移に非常に長い検討時間を必要とするという、cMD 固有の問題が原因と考えられる (Figure 14b)。このことから、HDM2 の multi-state な構造平衡の可視化にあたり、何らかの工夫が必要であると考えた。

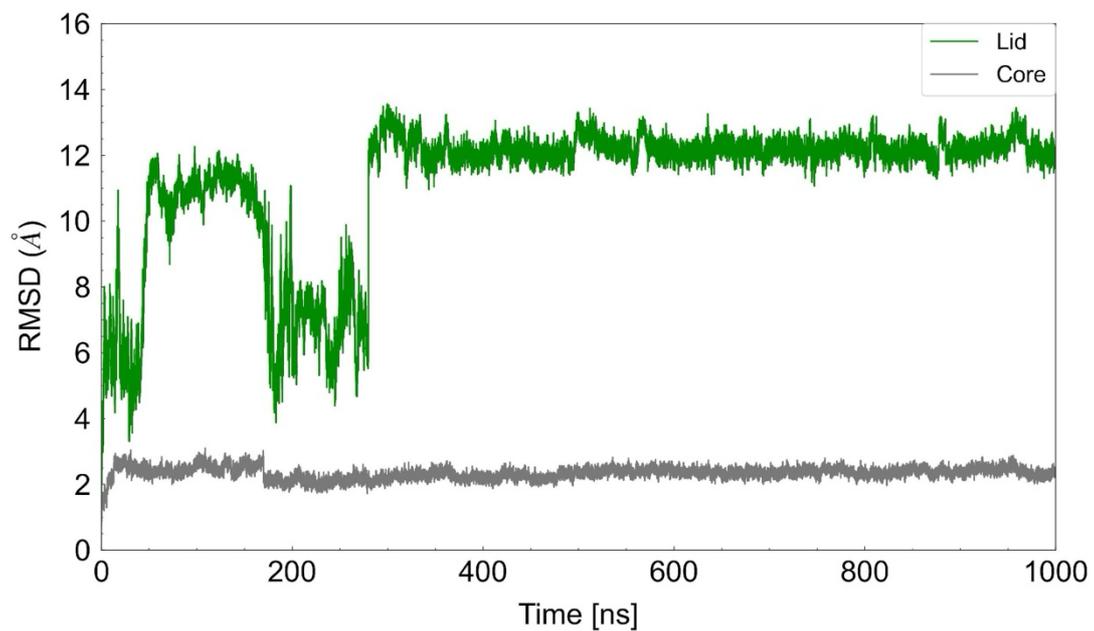


Figure 13. 1 μ s cMDにおける各領域のRMSDの時間発展

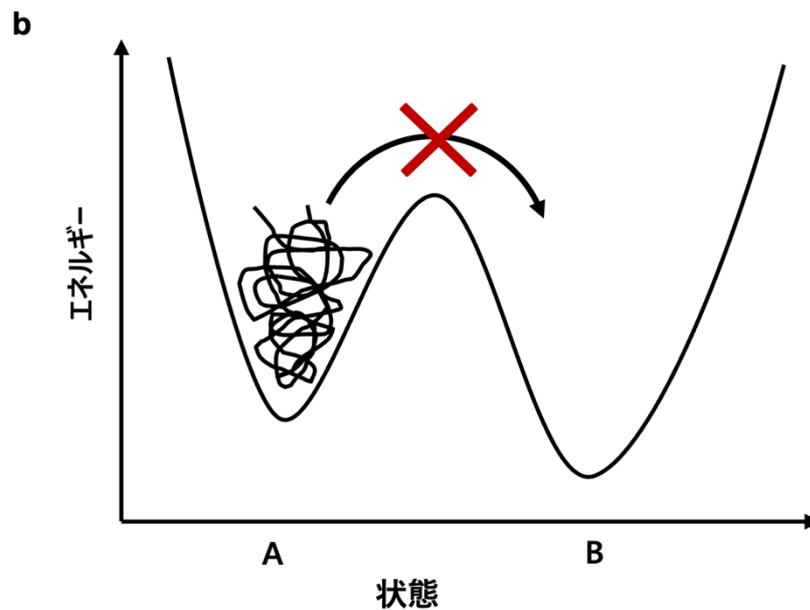
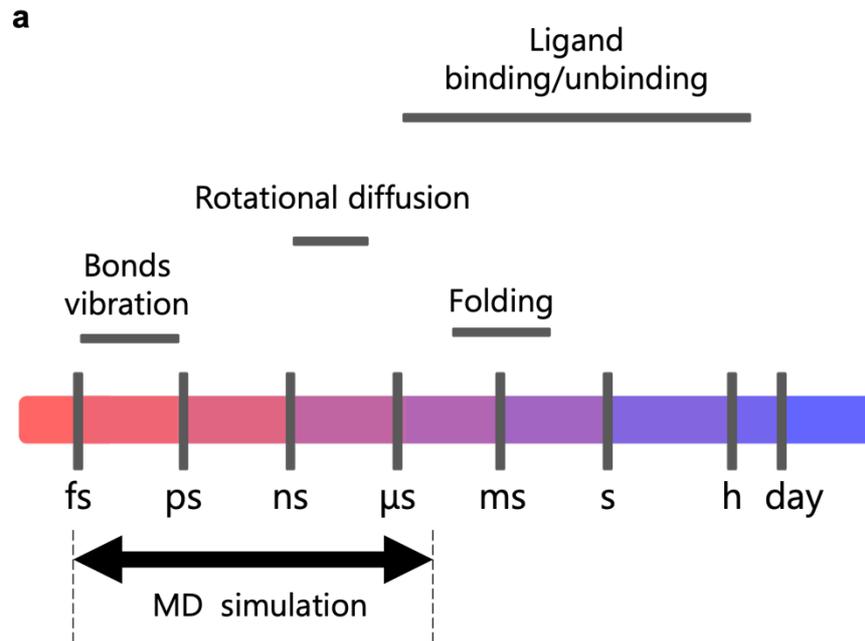


Figure 14. cMD シミュレーションの問題点

(a) MD シミュレーションによる検討可能な時間と実際の生体分子の構造変化のタイムスケール
の関係²⁶。(b) タンパク質のエネルギーと状態変化の概念図。cMD シミュレーションでは検討
時間途中でエネルギー極少状態にトラップされてしまい、現実的な検討時間で目的な構造変化
を観測できないといった事象がしばしば起こりうる。

4-2-2. 拡張アンサンブル法を用いることの利点

こういった cMD の構造サンプリングに関する課題を解決するために、これまでに様々な拡張アンサンブル法が提案されてきた。温度レプリカ交換法は拡張アンサンブル法の中でも最も応用例の多い手法の一つであり⁵²、タンパク質のフォールディング/アンフォールディングや凝集等の構造変化の検討に用いられてきた⁵³⁻⁵⁶。しかしながら、この手法では系のサイズに比例して多くのレプリカ (詳細は次節 4-2-3 で説明する。) を必要とし、結果として多くの計算資源が必要不可欠である。そのため、温度レプリカ交換法を用いた検討を現実的な時間で実施するためには、検討可能な系のサイズやモデリングに実質的に制約がある⁵⁷⁻⁶⁰。

4-2-3. REST の概要

温度レプリカ交換法の計算資源に関する問題を解決するために、REST⁵¹ 及びその派生手法⁶¹⁻⁶⁴ が開発されてきた。REST では対象の系を溶質領域と溶媒領域に分割して取り扱う。溶媒領域については検討時間中は終始室温で取り扱う一方で、溶質領域については温度を変えた複数の独立したシミュレーション (レプリカ) を並列で計算し、それぞれのレプリカの温度を入れ替えつつ計算する (Figure 15)。温度レプリカ交換法においてはこうした各レプリカの独立かつ並列な計算は対象の系全体に対して行われるのに対し、REST においては温度を交換する領域を溶質領域の定義づけによって制限する。これにより、REST では温度レプリカ交換法と比較して必要なレプリカ数が大きく減少し、結果として計算資源の削減が達成される。今日、REST の派生手法で最も用いられている REST2⁶⁵ は様々な MD ソフトウェアに実装されており、生体分子の構造サンプリングに関する応用例が多数報告されている⁶⁶⁻⁶⁸。このように REST 及びその派生手法は有用な手法として広く用いら

れている一方で、高温の溶質領域と低温の溶媒領域の間の大きな温度のギャップが原因で、RESTを用いたMDシミュレーションにおいてはしばしば溶質領域の構造が特定の安定構造にトラップされるという問題も報告されている⁶⁹。この問題は派生手法であるREST2においても解決していない。

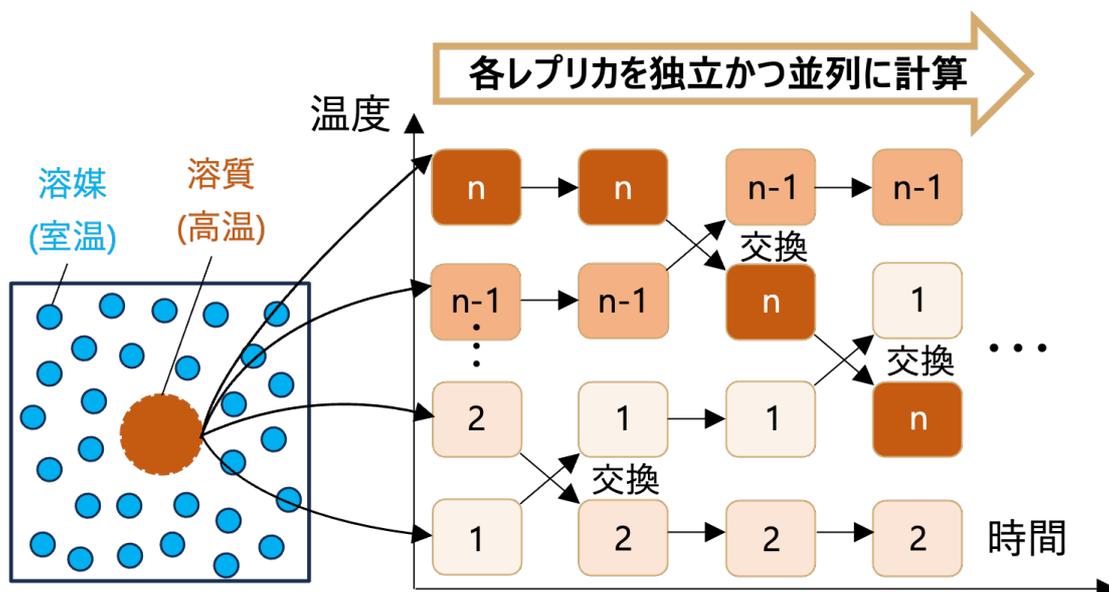


Figure 15. REST の概念図

対象の系を溶質領域 (茶色) と溶媒領域 (青色) に分割し、溶質領域については温度の異なる複数の独立したシミュレーション (レプリカ) を並列で計算し、それぞれのレプリカの温度を入れ替えて計算する。その間、溶媒領域については室温 (一つの温度空間) のみで計算が行われる。このような並列計算を行う領域の制限によって計算コストが削減され、効率的な構造サンプリングが可能となる。

4-2-4. gREST の概要

2018年に神谷と杉田は従来の REST 法と比較して柔軟な溶質領域の選択が可能な gREST を開発した²⁷。gREST ではタンパク質やリガンドなどの分子の一部を溶質領域として定義することができる。これに加えて、選択範囲のポテンシャルエネルギー項も”溶質”相互作用と”溶媒”相互作用に分割可能である。このような選択的な溶質領域の定義によって、分子全体の全てのポテンシャルエネルギー項を溶質領域として定義する必要があった従来法の REST を用いた場合よりも少ないレプリカ数でサンプリング効率の向上が可能である。Figure 16 に標的分子の二面角エネルギー項のみを溶質領域、それ以外の分子やポテンシャルエネルギー項を溶媒として定義した gREST の例を示す。

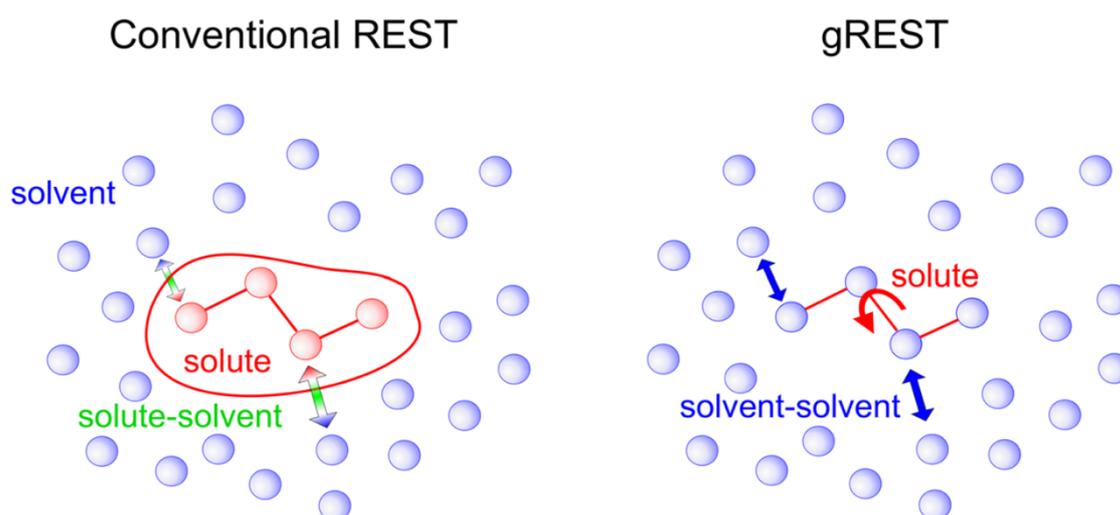


Figure 16. REST と gREST の比較 概念図²⁷

(左) 従来の REST における粒子ごとの溶質-溶媒領域の分割。

(右) ある粒子の二面角エネルギー項のみを溶質領域とした場合の gREST の適用例。gREST では REST で実行可能だった粒子ごとの領域分割に加え、エネルギー項ごとの領域分割が可能である。従来の REST では中央の粒子と周囲の他粒子間の非結合相互作用に関するエネルギー項についてレプリカ交換が行われるのに対し、右の gREST 適用例においては交換が行われない。

ある gREST シミュレーションにおいて、 m 番目の溶質温度を有するレプリカ a のポテンシャルエネルギーは次のように定義される。

$$E_m^{\text{gREST},[a]} = \frac{\beta_m}{\beta_0} E_{uu}(X^{[a]}) + \sum_i \left(\frac{\beta_m}{\beta_0}\right)^{k_i/l_i} E_{uv,i}(X^{[a]}) + E_{vv}(X^{[a]}) \quad (\text{式 1})$$

ここで、 E_{uu} , E_{uv} , E_{vv} はそれぞれ溶質-溶質間相互作用エネルギー、溶質-溶媒間相互作用エネルギー、溶媒-溶媒間相互作用エネルギーを表す。 β_0 は対象の系 (溶媒) の逆温度 $\frac{1}{k_B T_0}$ を、 β_m は m 番目の溶質温度 T_m の逆温度 $\frac{1}{k_B T_m}$ を、 $X^{[a]}$ はレプリカ a における対象の系の原子座標を表す。 l_i は i 番目の溶質-溶媒間相互作用に関与する粒子の数 (原子間結合/Lennard-Jones/クーロン相互作用エネルギーにおいては 2、結合角エネルギーにおいては 3、二面角/ねじれ角エネルギーにおいては 4) を、 k_i は i 番目の溶質-溶媒間相互作用に関与する粒子のうち、溶質領域に含まれる粒子の数を表す。また、それぞれ m, n 番目の溶質温度を有するレプリカ a と b の間の交換確率は次のように表される。

$$P(a - m \leftrightarrow b - n) = \begin{cases} 1, & \Delta_{a-m \leftrightarrow b-n} \leq 0 \\ \exp(-\Delta_{a-m \leftrightarrow b-n}), & \Delta_{a-m \leftrightarrow b-n} > 0 \end{cases} \quad (\text{式 2})$$

$$\begin{aligned} \Delta_{a-m \leftrightarrow b-n} &= (\beta_n - \beta_m) (E_{uu}(X^{[a]}) - E_{uu}(X^{[b]})) \\ &+ \sum_i \beta_0^{1-k_i/l_i} (\beta_n^{k_i/l_i} - \beta_m^{k_i/l_i}) \times (E_{uv,i}(X^{[a]}) - E_{uv,i}(X^{[b]})) \end{aligned} \quad (\text{式 3})$$

Figure 16 の適用例のように着目分子の二面角エネルギー項のみを溶質とする場合、溶質-溶媒間相互作用は 0 となるため、式 3 右辺の第 2 項は 0 となる。

以上のように、領域・エネルギー選択的な温度交換による効率的な構造サンプリングが可能な gREST を用いて、HDM2 の lid 全体の非結合相互作用エネルギー項を溶質領域に指定した MD シミュレーションを行うこととした。

4-2-5. gREST 適用によるサンプリング効率向上の確認

HDM2 の、特に lid の構造ダイナミクスを十分に促進するために、gREST シミュレーションにおいて lid 領域の全ての残基 (残基番号 1-24) を溶質領域として定義した。gREST の適用による HDM2 の構造ダイナミクスの促進を確認するために、cMD、gREST シミュレーションにおける lid、core の各領域の C α 炭素の RMSD の確率分布を算出したところ、cMD シミュレーションでは各領域の RMSD は一定の値に収束していた (Figure 17)。一方で、gREST シミュレーションでは core の RMSD が約 3 Å に収束しているのに対し、lid の RMSD は 4-16 Å の広い範囲に分布していた。この結果から、gREST 適用によって lid のダイナミクスは十分に促進され、cMD では達成されなかった様々な構造サンプリングが行えたと判断した。

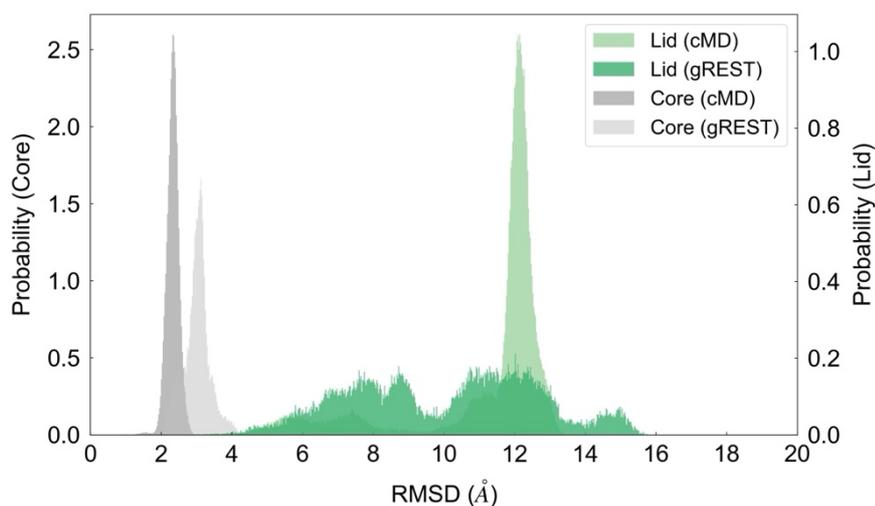


Figure 17. cMD、gREST (300 K) シミュレーションの lid、core 領域の C α 炭素の RMSD の確率分布

4-3. *k*-means clustering によるサンプリング構造群の分類

gREST シミュレーションの 300 K のレプリカで得られた 30000 個の構造群を *k*-means clustering を用いて分類した。HDM2 の NMR 構造から、I19 周辺には Y100 が位置しており I19 δ 1 メチル基のプロトンの化学シフトは Y100 の環電流効果の影響を受けると考えられる (Figure 18a)。このことは実際に I19 δ 1 メチル基と Y100 の ring- ϵ 位のプロトン間で NOE が観測されたことから支持される (Figure 18b)。さらに、NMR 構造と NOE のデータからも M50 の ϵ 位のメチル基のプロトンは Y100 と Y104 の二つの芳香環からの影響を受けると考えられる (Figures 18a, c)。したがって、HDM2 の multi-state な動的構造平衡を考える上で I19, M50, Y100, Y104 の空間的な位置関係が重要な切り口になると考えた。以上の理由から、NMR 実験の結果から構造平衡への関与が示唆された I19、M50、Y100、Y104 の 4 残基の座標情報を clustering の基準として利用した。

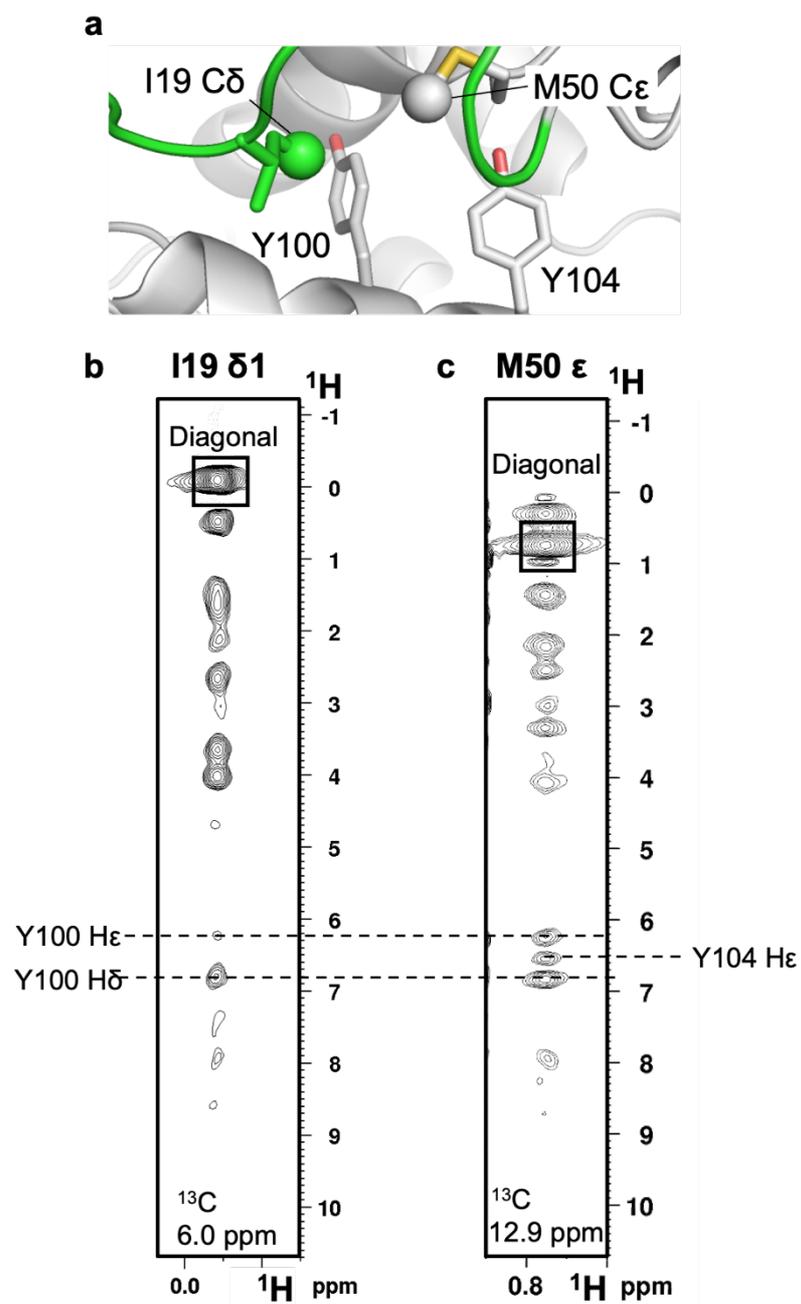


Figure 18. メチル基化学シフトに影響を与える I19, M50 の周辺環境

(a) HDM2 の立体構造中での重要残基 I19、M50、Y100、Y104 の側鎖の位置関係。I19 C δ 1 と M50 C ϵ は sphere 形式で表示している。(b, c) 3D ^1H - ^{13}C HSQC-NOESY スペクトル中における I19 H δ (b) と M50 H ϵ (c) の NOE シグナル。図中の点線は Y100 H δ 、Y100 H ϵ 、Y104 H δ の ^1H 化学シフトを表す。

k-means clustering による対象の構造群の最適な分割数 (= cluster 数) を決定するために、対象の構造群を 4、6、8 つの 3 パターンで分割し、各パターンでの open、closed 構造の分割状況を比較した。lid と core の相対的な位置関係を反映する lid 上の D11 と core 上の M62 の各 C α 炭素間の距離 (Figures 19a, b) についての確率分布を cluster ごとに算出したところ、いずれの分割パターンにおいても cluster 1 と cluster 2 では 15 Å 以下の限られた範囲に分布が集中しているのに対し、それ以外の cluster では 20 Å 以上の広い範囲に分布が見られた (Figures 20–22)。この結果は cluster 1 と cluster 2 の構造群は主に lid が比較的 core に近接した closed 構造から、その他の cluster は主に lid と core が離れた open 構造から構成されていることを示唆している。一方で、cluster 1 の確率分布については分割パターン間で相違が見られ、分割数が 4、6 の場合では 25 Å 以上の D11-M62 C α 間の距離を取るサンプリング構造の割合が分割数が 8 の場合よりも顕著に高かった (Table 1)。この結果は分割数の増加とともに cluster 1 内での open、closed 構造の混在が解消されていることを示唆している。以上の結果から、本研究での *k*-means clustering による対象の構造群の最適な分割数を 8 と決定し、以降の cluster ごとの解析を行うこととした。

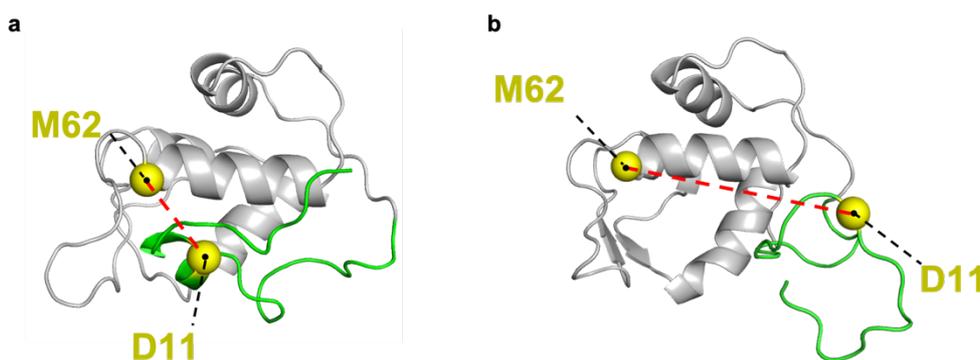


Figure 19. lid と core の相対的な位置関係を反映する lid 中盤の D11 C α と M62 C α (sphere 表示) の位置関係

(a) D11 C α と M62 C α の間の距離が小さい場合、サンプリング構造は closed 構造を取る。

(b) D11 C α と M62 C α の間の距離が大きい場合、サンプリング構造は open 構造を取る。

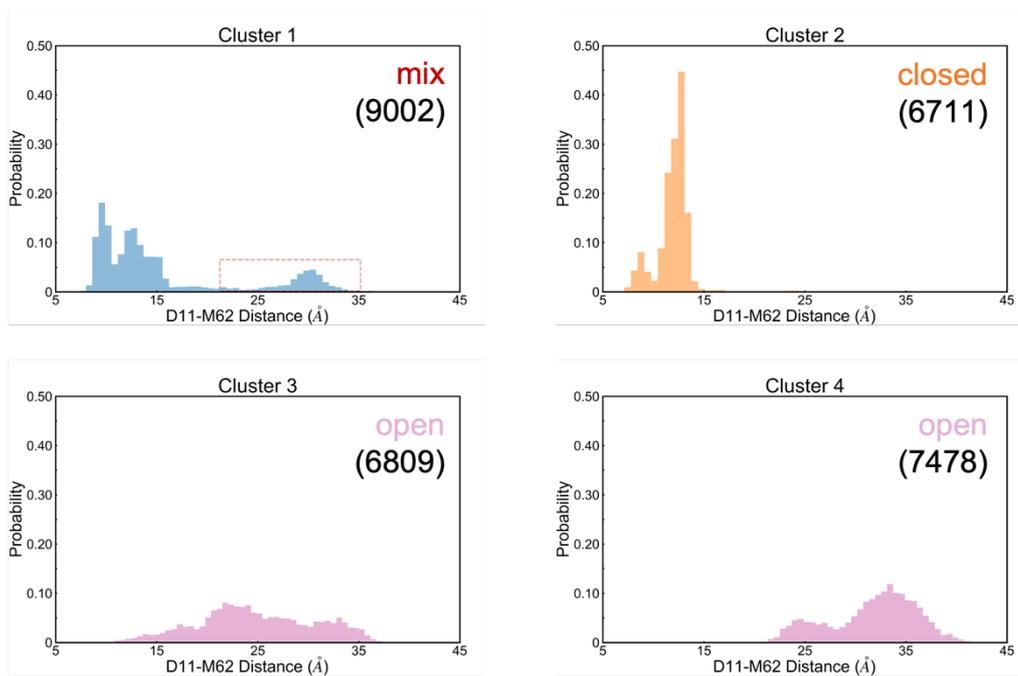


Figure 20. *k*-means clustering による構造群の分割数が 4 の場合の各 cluster の D11-M62 C α 間距離についての確率分布

各 cluster の枠内右上のかっこ内の数字は cluster に含まれるサンプリング構造数を表す。

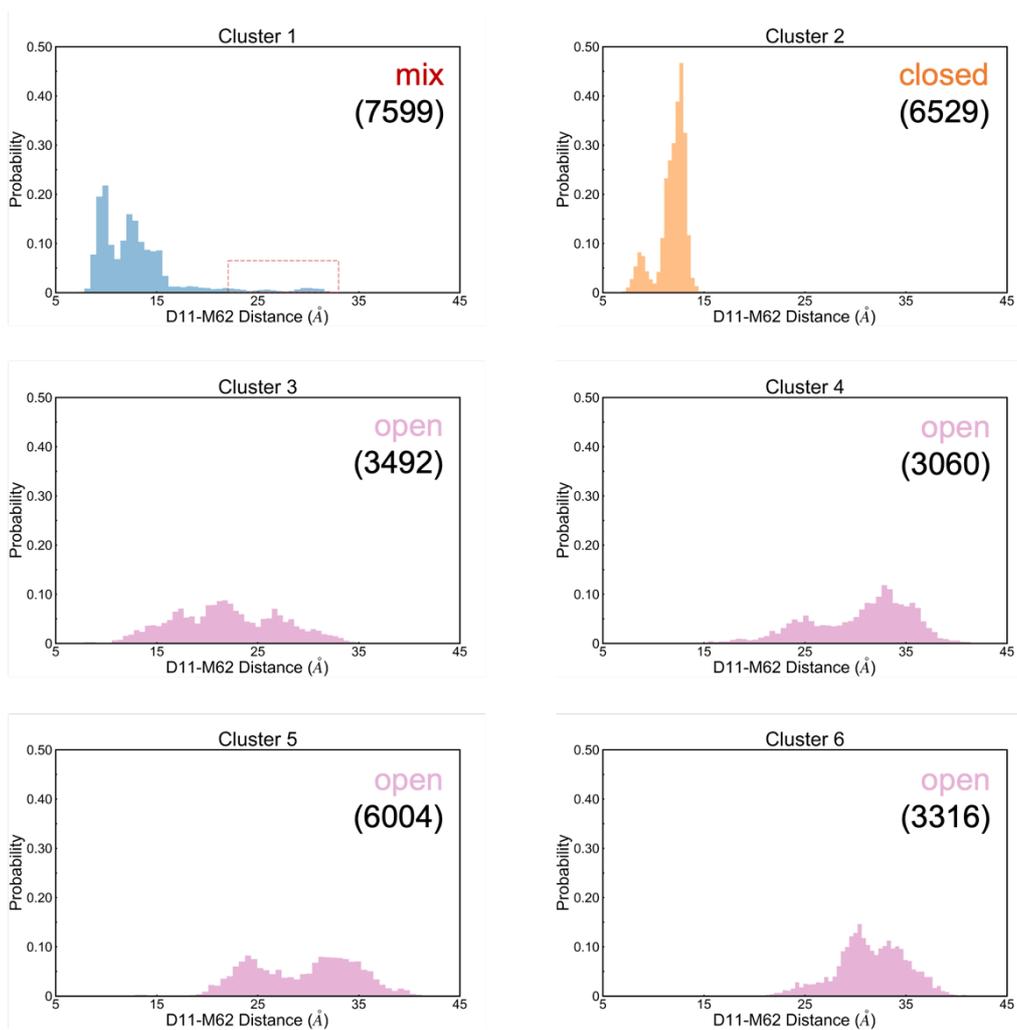


Figure 21. *k*-means clustering による構造群の分割数が 6 の場合の各 cluster の D11-M62 C α 間距離についての確率分布

各 cluster の枠内右上のかっこ内の数字は cluster に含まれるサンプリング構造数を表す。

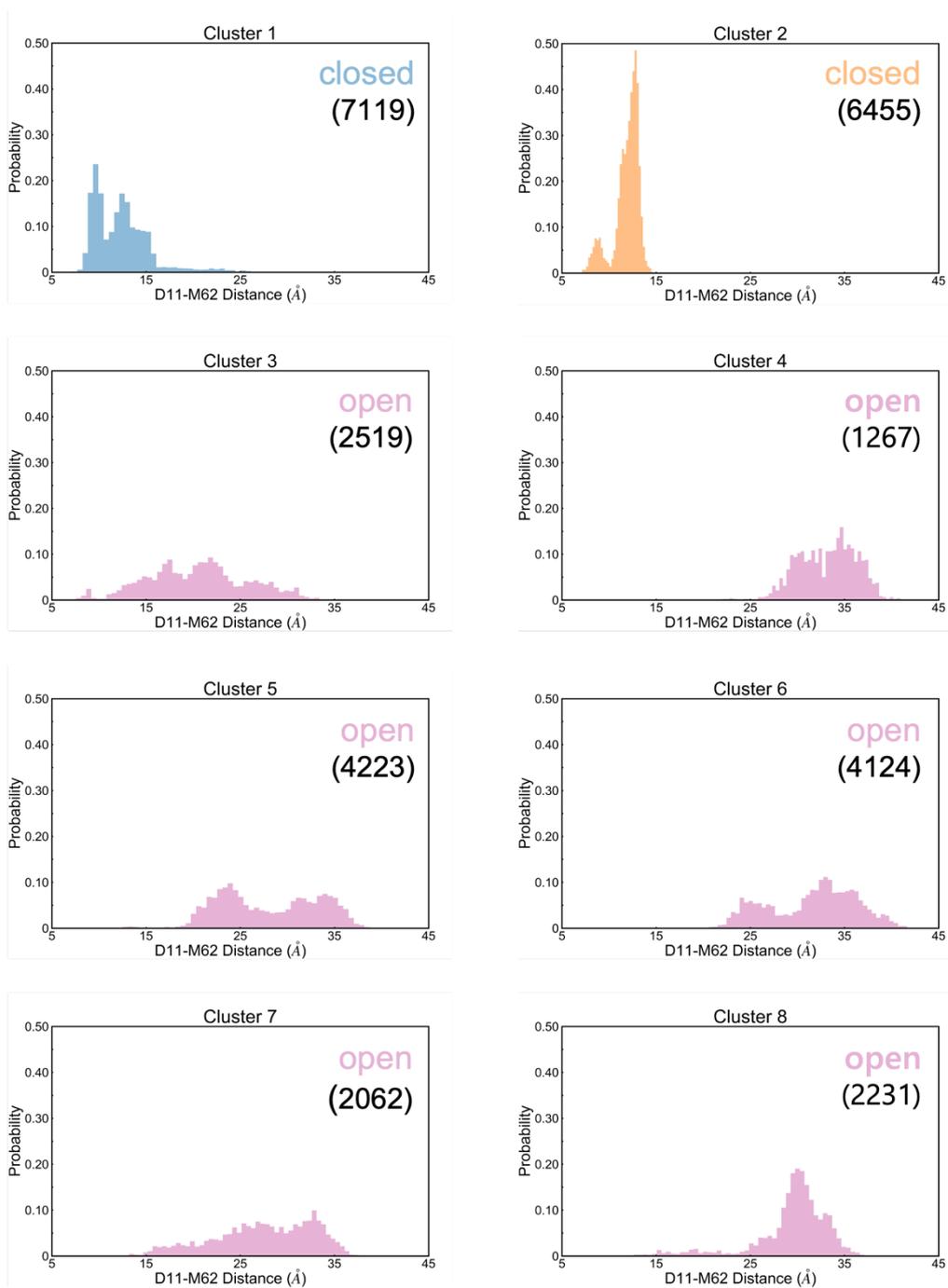


Figure 22. *k*-means clustering による構造群の分割数が 8 の場合の各 cluster の D11-M62 C α 間距離についての確率分布

各 cluster の枠内右上のかっこ内の数字は cluster に含まれるサンプリング構造数を表す。

Table 1. 分割数 (= k) ごとの cluster 1 に含まれる構造のうち、D11-M62 C α 間距離 (= X) が一定以上の値を取るサンプリング構造の数と割合 (%)

X の範囲	$k = 4$	$k = 6$	$k = 8$
$X > 25 \text{ \AA}$	1697 (18.9%)	341 (4.5 %)	43 (0.6%)
$X > 30 \text{ \AA}$	837 (9.3%)	132 (1.7%)	4 (0.056%)

原子間距離の確率分布に加えて算出した core 領域を構成する残基 (残基番号 25–109) の SASA の和についての確率分布においても、cluster 1 と 2 は他の cluster とは異なる傾向を示し、他の cluster よりも SASA が低い値を示すサンプリング構造が多く含まれていた (Figure 23)。この結果は cluster 1 と 2 を構成する多くの構造で lid-core 間で多数のコンタクトが形成されていることを示唆している。また、cluster ごとの代表構造の重ね合わせから、cluster 1 と 2 では lid と core が近接した closed 構造が、それ以外の cluster では lid と core が解離した open 構造が観測された (Figure 24)。ここまでの確率分布を用いた解析と代表構造の重ね合わせから、cluster 1 と 2 は closed 構造から構成されており、その他の cluster は open 構造から構成されていると判断した。

さらに、300 K のレプリカで得られた 30000 個の構造群と PDB ID: 1Z1M の全 24 モデル構造を対象に行った PCA 解析から得られた第一、第二主成分 (それぞれ PC1、PC2) を軸とする 2 次元平面上で、1Z1M 由来のほぼ全てのプロットとサンプリング構造群のプロットが重複していた (Figure 25)。この結果は本研究の gREST シミュレーションによって、1Z1M に収録されているモデル構造と同様の構造的特徴を有する構造のサンプリングに成功したことを示すとともに、初期構造に依存しない広域な構造サンプリングが行えたことを示唆している。

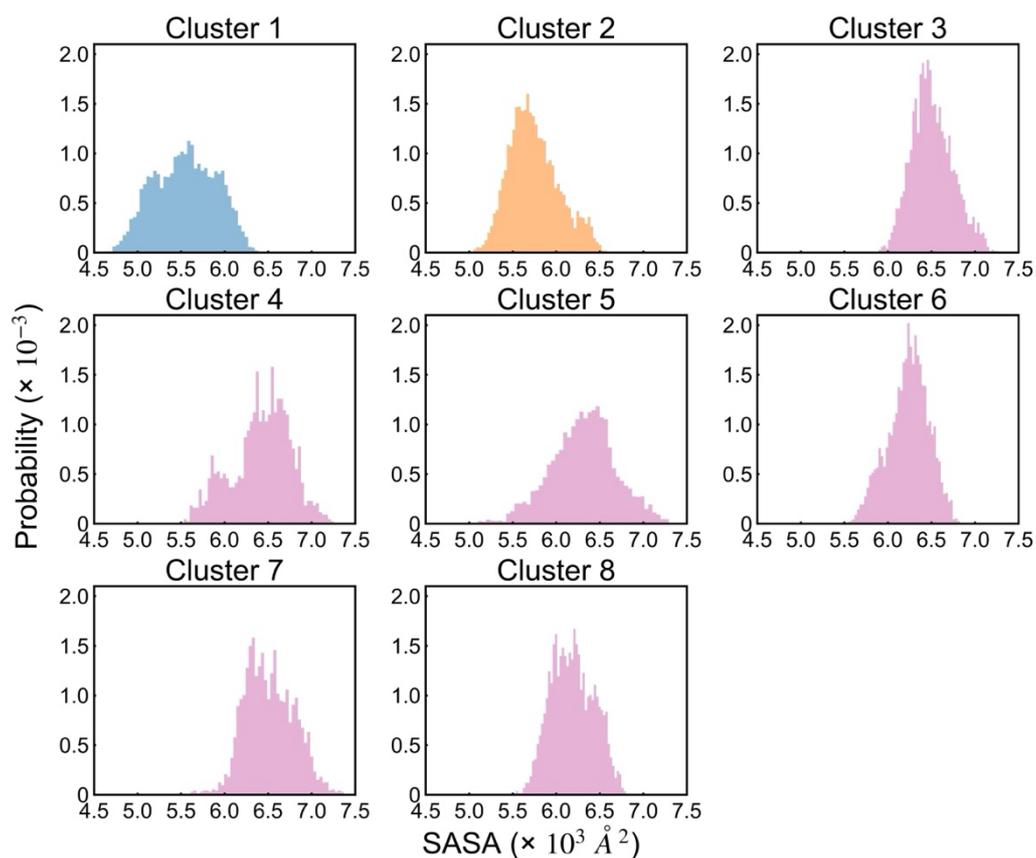


Figure 23. core 領域を構成する残基 (残基番号 25–109) の SASA の和についての確率分布

この値は lid-core 間のコンタクトの量を反映している。この値が低い値を示すとき、サンプリング構造は lid-core 間で多くのコンタクトが形成されており、closed 構造を取っている可能性が高い。

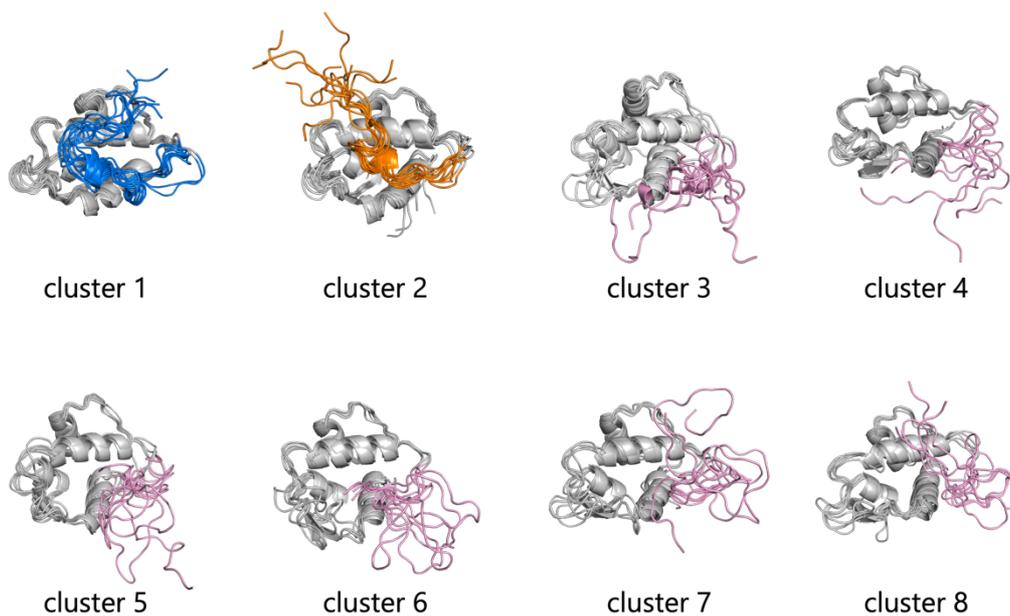


Figure 24. 各 cluster の代表構造の重ね合わせ

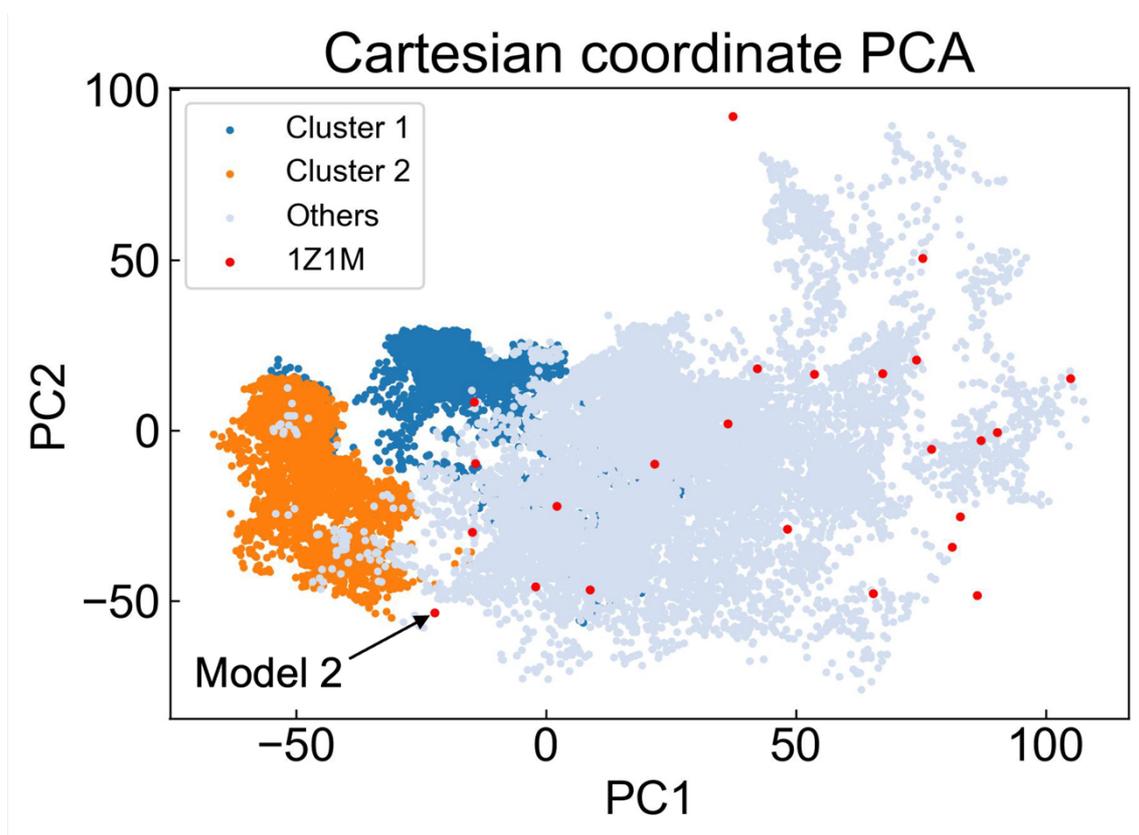


Figure 25. gREST シミュレーションにおいて 300 K のレプリカで取得された構造群と 1Z1M の全 24 モデル構造を対象とする PCA 解析から得られた、上位二つの主成分 PC1、PC2 についての散布図

cluster 1、cluster 2、その他の cluster、1Z1M の構造はそれぞれ青、オレンジ、水色、赤色の点で示している。

4-4. I19 側鎖-Y100 芳香環の位置関係の解析による二つの closed 構造の特定

次に gREST シミュレーションで確認された 2 つの closed 構造 (cluster 1 と cluster 2) の間の構造平衡が、NMR 解析で示されている closed 構造内の fast-exchange の構造平衡を反映する NMR シグナルの化学シフト変化と対応するかどうかを環電流効果に着目して検証した。I19 側鎖メチル基の化学シフト変化は主に近傍に存在する Y100 の芳香環からの環電流効果を反映する (Figures 8b and 18b)。それに対して M50 で観測された化学シフト変化は Y100 と Y104 の 2 つの芳香環からの環電流効果の影響を受けているため (Figures 8c and 18c)、その解釈は難解である。そこで、cluster 1 と cluster 2 に含まれる構造群の I19 と Y100 の位置関係を比較した。

Y100 芳香環中心からの I19 側鎖の距離と角度を反映する二つの変数、 d と ϕ (詳細を Figure 26a、定義を Figure legend 内に示した。) を用いて Y100 に対する I19 側鎖の位置関係の特徴づけを行った。cluster1, cluster2 についてこれらの 2 変数を算出して 2D ヒストグラムを用いて比較した (Figures 26b and c)。その結果、距離 d については両 cluster とともに 5-7 Å 付近に分布が集中していた一方で、 ϕ 軸方向の分布には両 cluster 間で明確な相違が見られた。Cluster 1 は 15°-45° の範囲に分布が集中していたのに対し、cluster 2 は 45°-75° の範囲に分布が集中していた。この結果から、cluster 2 に比べて cluster 1 の方が I19 側鎖が Y100 芳香環の真上に位置する傾向にあり、環電流効果をより受けやすい構造を取っていることが示唆される。これを踏まえて closed 構造の I19 の NMR シグナル変化を解釈すると、高磁場方向への化学シフト変化は cluster 1 に含まれる構造の増加と対応する一方で、低磁場方向の化学シフト変化は cluster 2 に含まれる構造の増加と対応すると解釈できる。したがって、NMR 実験において観測された closed 構造内の構造平衡は cluster 1 と cluster 2 に含まれる構

造 (これ以降、それぞれの構造を closed 1, closed 2 と表記する。) の間の構造交換を反映しており、closed 構造のシグナルの温度依存的な化学シフトは、closed 1 から closed 2 方向への平衡のシフトを反映していると考えられる。

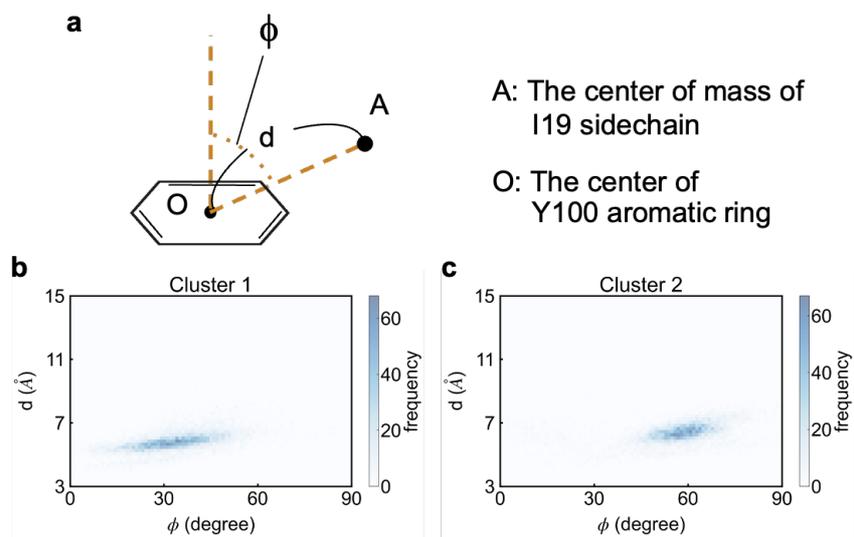


Figure 26. gREST シミュレーションの 300 K のレプリカから得られた各 cluster の I19-Y100 の位置関係

(a) 変数 d と ϕ についての概略図。点 A は I19 側鎖に含まれる重原子の重心を示している。点 O は Y100 芳香環の中心を示している。 d は AO 間の距離を、 ϕ はベクトル OA と Y100 芳香環の面と垂直なベクトルがなす角を表す。(b, c) 距離 d と角度 ϕ についての 2D ヒストグラム。

4-5. cluster 1, 2 の構造的特徴の比較

multi-state な構造平衡における二つの closed 構造の役割を明らかにするために、cluster 1 と cluster 2 の構造的特徴を比較した。具体的には、p53 結合サイト周辺構造、lid-core 間の残基間コンタクト、lid-core 間の水素結合の 3 点を比較した。

4-5-1. p53 結合サイト周辺構造の比較

lid 領域 (残基番号 1-25) の helix 形成確率を cluster ごとに算出したところ、cluster 1, 2 においては、lid 中間付近の残基、具体的には、cluster 1 では残基番号 11-13、cluster 2 では残基番号 15-18 において高い形成確率を示した (Figure 27a)。一方で、その他の cluster については cluster 3 において cluster 2 と同一箇所やや高い helix 形成確率が観測されたことを除いて、lid 領域全体に渡って非常に低い helix 形成確率を示した。cluster 1, 2 の代表構造と HDM2-p53 複合体構造 (PDB ID: 1YCR¹⁴) とを重ね合わせたところ、各 cluster の代表構造の lid 中盤の helix 構造が core 領域内の p53 結合サイトに位置し、p53 ペプチドの helix 構造と overlap していることが確認された (Figure 27b)。p53 ペプチドにおいては helix 上の 3 つの疎水性残基、F19, W23, L26 が結合サイトに入り込んでいる (Figure 27c)。それと同様に、cluster 1 代表構造においては T10, V14 の 2 残基が、cluster 2 代表構造においては T16 の 1 残基が結合サイトに入り込むような形で位置していた (Figures 27d and e)。

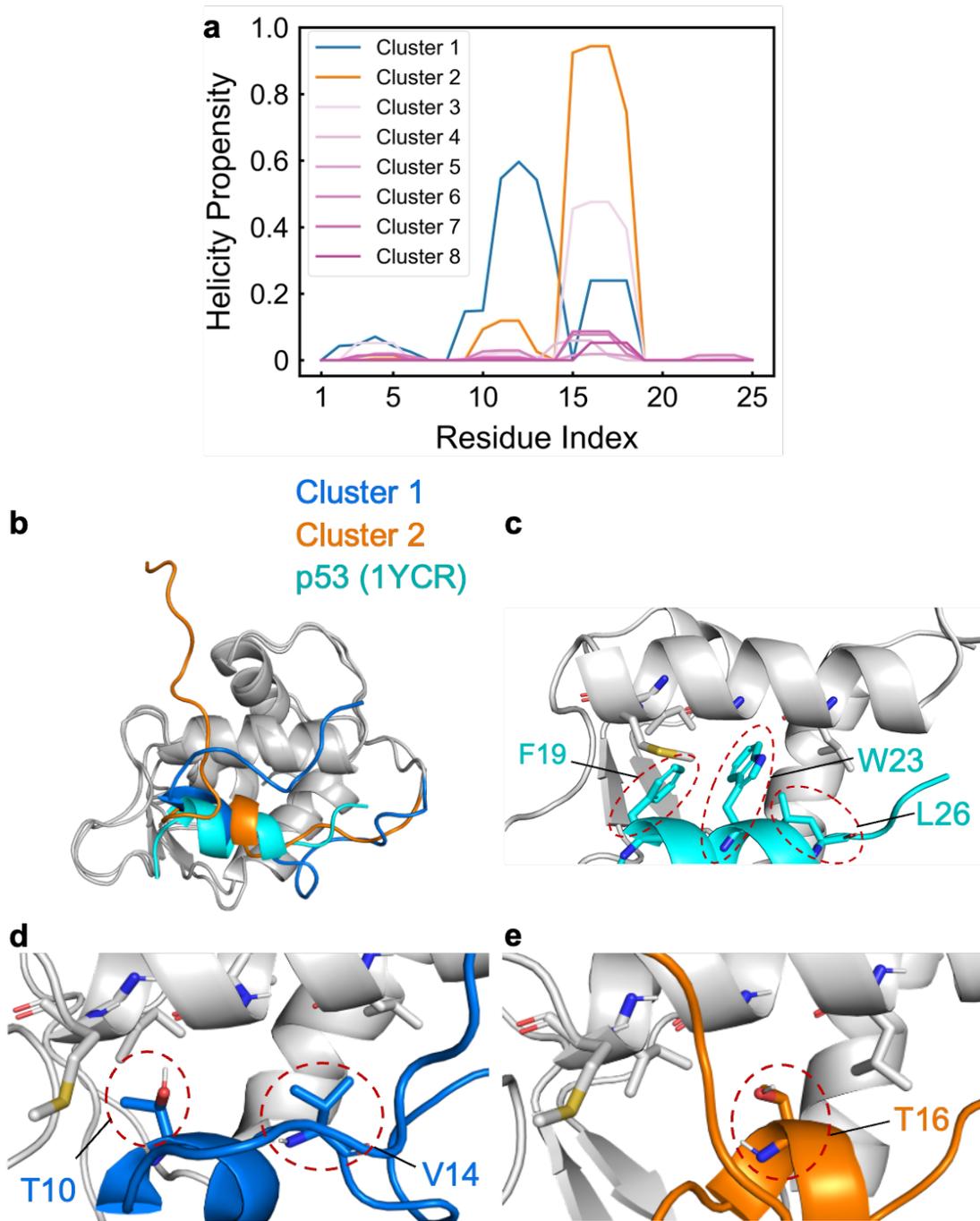


Figure 27. cluster 1 と 2 における lid 及びその周辺の構造

(a) 各 cluster の lid 領域の Helix 形成割合。(b) cluster 1、cluster 2 の代表構造と HDM2-p53 複合体構造 (PDB ID: 1YCR) の重ね合わせ構造。(c, d, e) HDM2-p53 複合体構造 (c)、cluster 1 の代表構造 (d)、cluster 2 の代表構造 (e) における p53 結合サイト周辺構造。

4-5-2. lid-core 間の残基間コンタクトの比較

lid と core との相互作用の詳細な比較を行うために、*k*-means clustering によって得られた 8 つの cluster について残基番号 1–25 と $\alpha 2$ helix (残基番号 50–62) もしくは $\alpha 2'$ helix (残基番号 96–105) との間の残基間のコンタクト確率を算出した (Figures 28-30)。中でも、lid 先端の残基 (残基番号 1–6) と $\alpha 2$ helix の一部残基 (残基番号 51–55) との間のコンタクトの有無に cluster 1 と 2 の間で明確な相違が見られ、cluster 1 ではやや高い確率でのコンタクトが観測されたのに対し、cluster 2 では全く観測されなかった (Figure 30)。この結果から、cluster 2 と比較して cluster 1 の方が lid 先端と core との間で多くのコンタクトが形成されていることが示唆される。

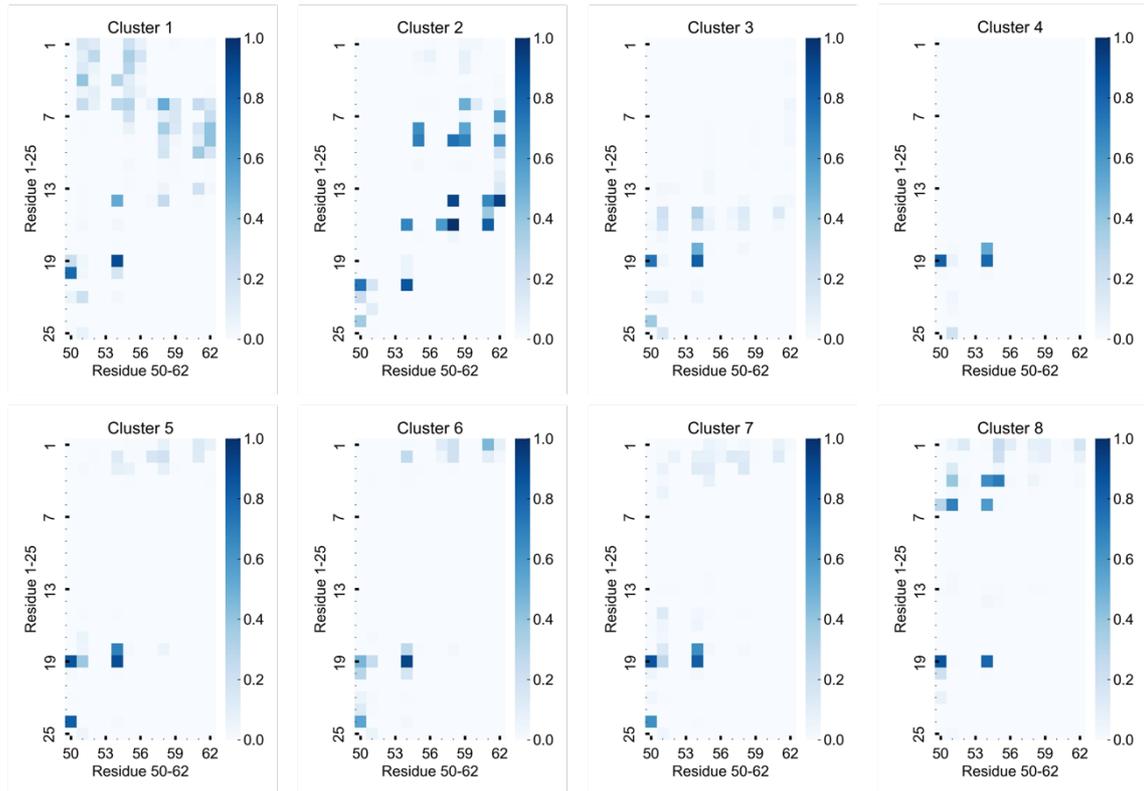
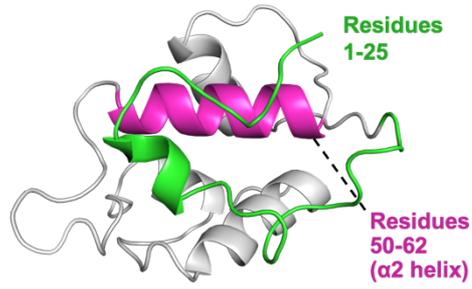


Figure 28. lid (残基番号 1–25) と α 2 helix (残基番号 50–62) の残基間コンタクト確率

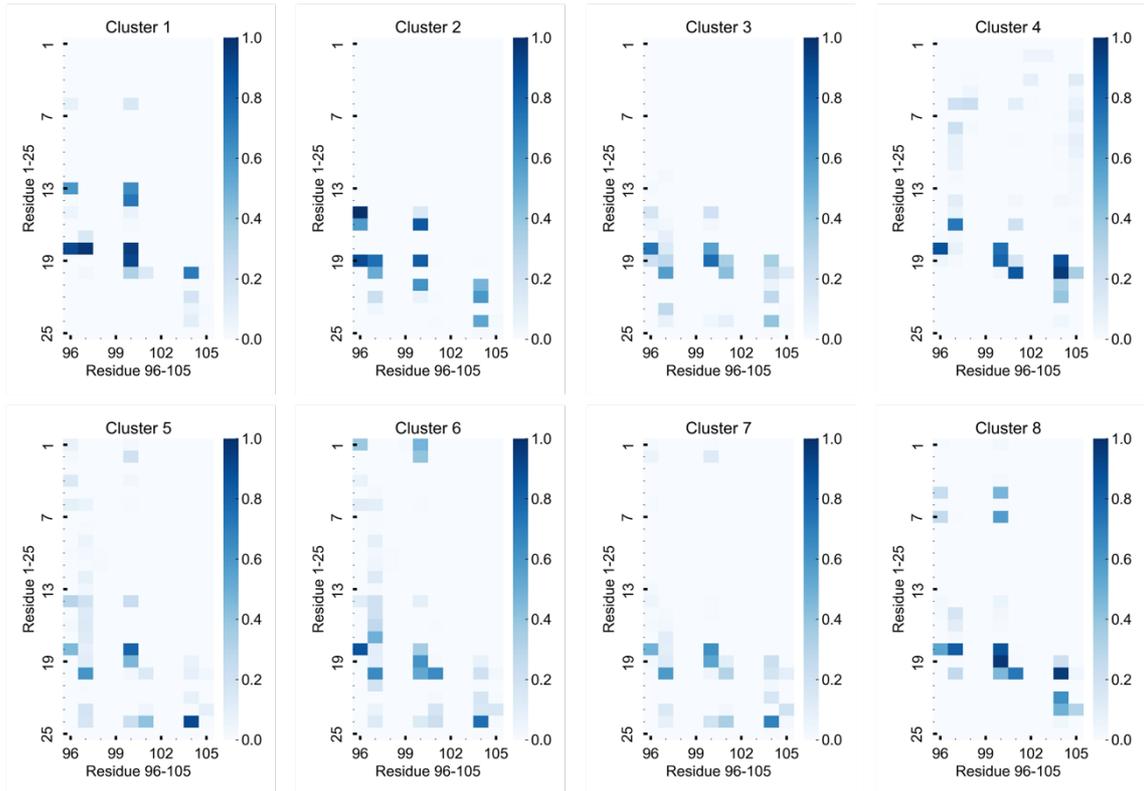
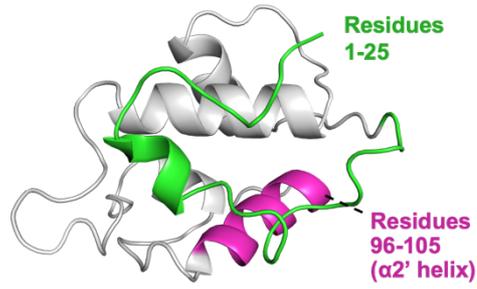


Figure 29. lid (残基番号 1–25) と $\alpha'2$ helix 基 (残基番号 96–105) の残基間コンタクト確率

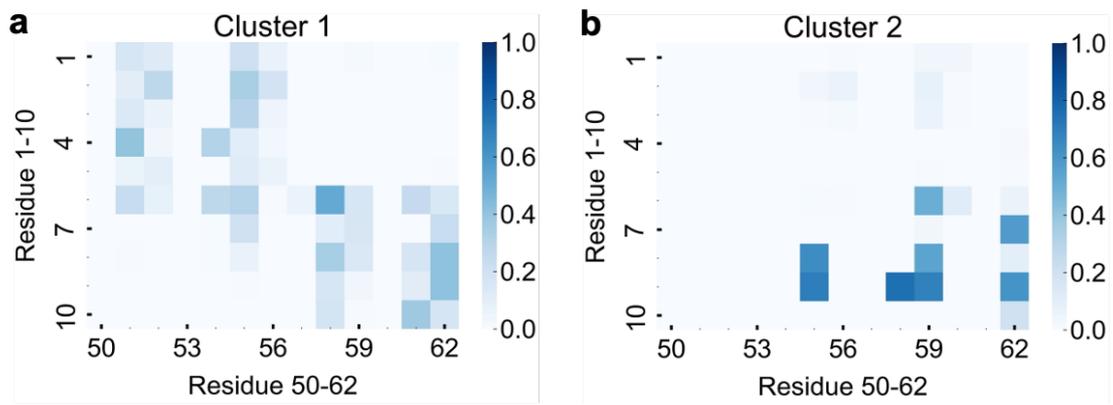


Figure 30. lid 末端 (残基番号 1-10) と $\alpha 2$ helix (残基番号 50-62) の残基間コンタクト確率 (a, b) それぞれ cluster 1 (a)、cluster 2 (b) の結果を表す。

4-5-3. lid-core 間の水素結合の比較

最後に、cluster 1 と 2 の lid-core 間の水素結合の形成状況を比較した。Table 2 に cluster 1, 2 において lid-core 間で 60%以上の確率で形成されていた水素結合に関与する原子ペアを示した。cluster 1 においては A13 O-Y100 OH (77.65%), Q18 NE2-V93 O (81.46%), Q18 OE1-R97 N (78.10%) の 3 組の原子ペアが確認されたのに対し (Figure 31a)、cluster 2 においては T15 OG1-H96 NE2 (86.62%), I19 O-Y100 OH (76.34%) の 2 組が確認された (Figure 31b)。以上の cluster 1, 2 の lid-core 間の相互作用の比較から、cluster 1 においては lid と core の間でより多くの水素結合が形成されていることが明らかとなった。

Table 2. cluster 1 と cluster 2 において高頻度で形成されている水素結合の形成割合 (%)

lid atom- core atom	A13 O- Y100 OH	T15 OG1- H96 NE2	Q18 NE2- V93 O	Q18 OE1- R97 N	I19 O- Y100 OH
cluster 1	77.65	1.99	81.46	78.1	0
cluster 2	0	86.62	0.03	0	76.34

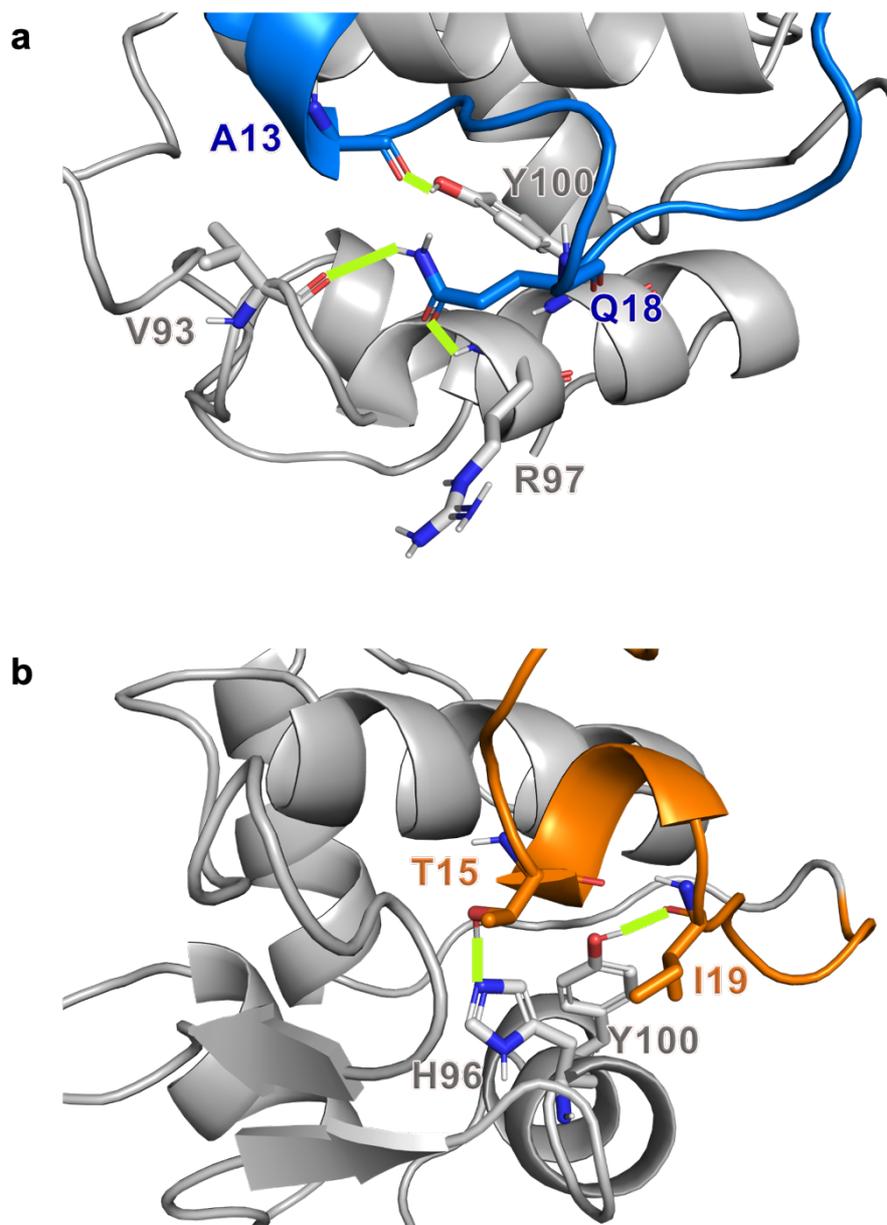


Figure 31. 各 cluster で高頻度で形成される水素結合

(a, b) cluster 1 (a), cluster 2 (b) の代表構造における水素結合に関与する残基の位置関係。該当残基は stick 表示している。水素結合形成箇所を黄緑色の線で表している。

4-5-4. cluster 1, 2 間の構造的特徴の比較 まとめ

ここまでの結果を項目ごとに Table 3 にまとめた。この結果から、cluster 2 と比較して cluster 1 の方が lid-core 間で多くの相互作用が形成されていることがわかった。この結果を踏まえると、closed 1 構造は closed 2 構造よりも lid の運動性が抑制された closed 構造をとると推測される。

Table 3. cluster 1, 2 の構造的特徴の比較 まとめ

	cluster 1	cluster 2
結合サイトに侵入する lid 残基	2 つ (T10, V14)	1 つ (T16)
lid-core のコンタクト	lid 全体が core とコンタクト	残基 1-6 はコンタクトしない
lid-core 間の水素結合	3 つ (A13, Q18 × 2)	2 つ (T15, I19)

4-6. 2D 自由エネルギーランドスケープを用いた各構造の安定性や構造変化に関する考察

ここまで主に closed 内の構造平衡を形成する 2 つの closed 構造について議論を行った。次に open 構造も含めて HDM2 の構造平衡全体を捉え、closed 1、closed 2、open の各構造の安定性や構造間の遷移を定量的に議論するために、2 変数についての 2D 自由エネルギーランドスケープ (以下、単純にエネルギーランドスケープと表記する。) を作成した。2D エネルギーランドスケープの表現に用いる 2 変数として、これまでの議論に用いていたように、二つの closed 構造 (cluster 1 と 2) の分類が可能な I19 側鎖と Y100 芳香環がなす角 ϕ (Figure 26a) と open 構造 (clusters 3-8) と closed 構造 (cluster 1 と 2) の分類が可能な D11 と M62 の C α 原子間距離 (Figure 19) を用いた。実際に、これらの 2 変数を軸とする散布図上で cluster 1、cluster 2 と open 構造を含むその他の cluster がそれぞれ異なる領域にマッピングされ (Figure 32)、2 変数によって各構造の分類が可能であることが確認された。

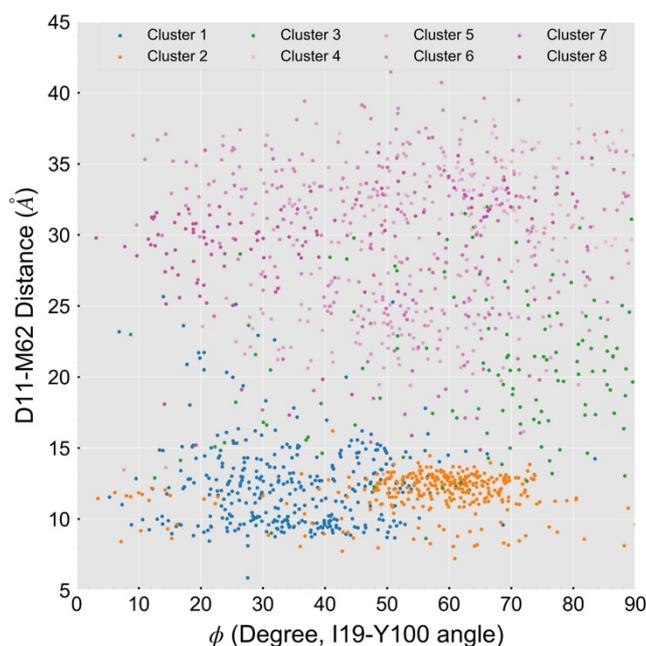


Figure 32. gREST シミュレーションの 300 K のレプリカから得られた角度 ϕ と D11 と M62 の C α 原子間距離についての散布図

cluster 1、cluster 2、cluster 3、その他の cluster の構造はそれぞれ青、オレンジ、緑、ピンク系統のグラデーション色の点で示している。

gREST シミュレーションにより得られた全 120000 構造の 2 次元平面上での分布に基づき、MBAR 法を用いて上述の 2 変数を軸とする 300 K におけるエネルギーランドスケープを作成し、各構造のエネルギーや構造間のエネルギー障壁を比較した (Figure 33)。まず、cluster 1 と cluster 2 が位置する領域の自由エネルギーは open 構造が位置する領域の自由エネルギーよりも際立って低いことがランドスケープから読み取れる。この結果から、二つの closed 構造はエネルギー的に open 構造よりも安定であることが示唆される。これは NMR 実験から明らかになっている closed 構造は open 構造より存在割合が多いという結果に対応した。次に、各構造の分布領域の境界付近のエネルギーの比較から、二つの closed 構造のエネルギー障壁は比較的低いことが読み取れる。この結果から、両 closed 構造間の構造遷移は頻繁に生じることが示唆される。対して、open-closed 間のエネルギー障壁は比較的高いことが読み取れ、open-closed 間の構造遷移の頻度は二つの closed 間の構造遷移よりも顕著に少ないことが示唆される。こういった各構造間のエネルギー障壁の大きさは、NMR 実験で観測された二つの closed 構造間の構造交換はマイクロ秒よりも速いタイムスケールで生じる fast-exchange であること、および open-closed 間の構造交換がミリ秒よりも遅いタイムスケールで生じる slow-exchange であることと定性的に対応する。

注目すべきことに、free-energy landscape 上で cluster 3 の構造は closed 2 構造 (cluster 2) と cluster 3 以外の open 構造 (clusters 4-8) の中間に分布していた。cluster 3 は D11 と M62 の $\text{C}\alpha$ 原子間距離や core 領域の SASA の総和が高い値を取っており (Figures 19 and 23)、open 構造から構成されている。一方で、cluster 3 は cluster 2 と同様、残基番号 15-18 で高い helix 形成割合を示すなど (Figure 27a)、部分的に closed 2 と構造が類似している。したがって、cluster 2 において lid が helix を形成したまま core から解離した構造が cluster 3 としてサンプリングされたと考えられる。このように cluster 1 ではなく、cluster 2 が一部の open 構

造と構造が類似していることから、open 構造への遷移は主に closed 2 を経由して生じることが示唆され、HDM2 の multi-state な構造平衡モデルとして closed 1、closed 2、open 構造が直線上に配置された Figure 34 に示すモデルの提唱に至った。

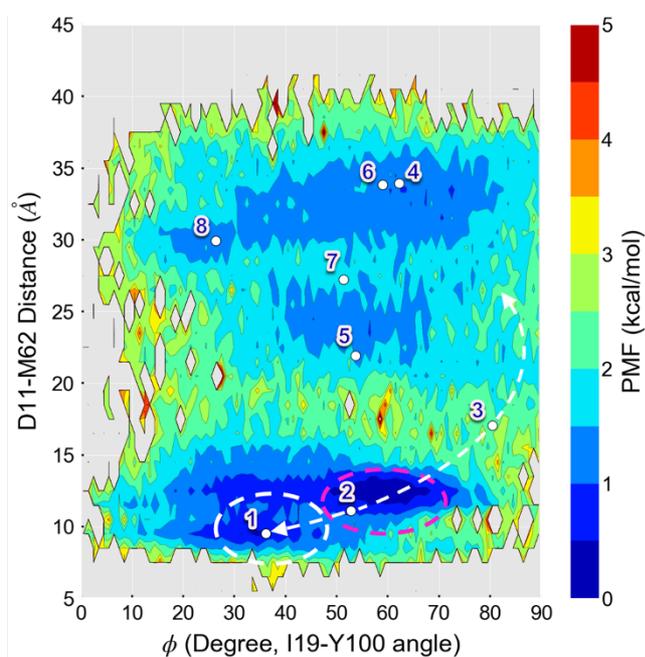


Figure 33. 300 Kにおける角度 ϕ と D11 と M62 の $C\alpha$ 原子間距離についての自由エネルギーランドスケープ

白丸は各 cluster の代表構造の位置を示している。白、マゼンタの点線で囲まれた領域には closed 1 と closed 2 がそれぞれ分布している。白の両矢印は検討結果から示唆された open-closed の構造変化の経路を示している。

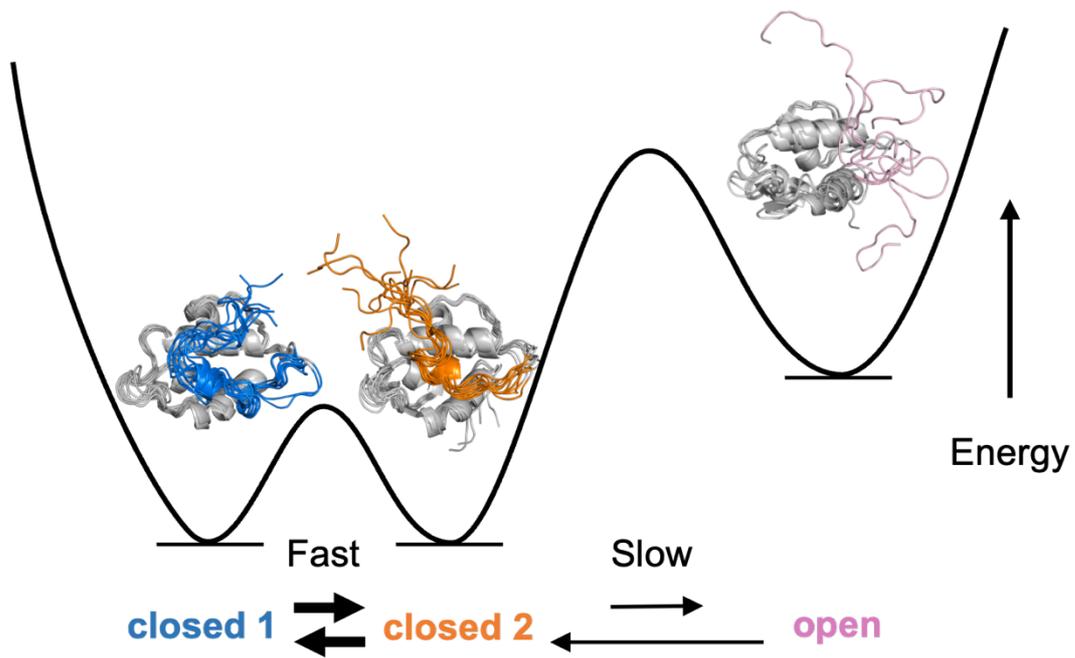


Figure 34. 各構造のエネルギー的な関係性を含めた HDM2 の multi-state な構造平衡モデル

4-7. S17 リン酸化が multi-state な構造平衡に与える影響に関する考察

最後に、前節 4-6 で提唱した **multi-state** な構造平衡のモデルに基づき、細胞のストレス応答にて生じる S17 へのリン酸化が HDM2 の **closed** 構造の安定化にどのように寄与するのかを検討した。4-5 節で述べたように、**cluster 1** と **cluster2** で **core** に結合している際の **lid** の配向が異なっており、**cluster 1** では S17 側鎖は $\alpha 2'$ helix 上の K94、R97 といった側鎖末端に正電荷を有する塩基性残基が近接する傾向にあったのに対して (Figure 35a)、**cluster 2** では S17 とこれらの塩基性残基側鎖が離れた傾向にあった (Figure 35b)。こういった傾向は **cluster 1** と 2 の S17 O γ -K94 C ϵ 及び S17 O γ -R97 C ζ 間の距離についての確率分布からも読み取れ、両残基ペアの側鎖原子間距離が **cluster 1** の方が **cluster 2** よりも顕著に小さいことが示された (Figures 35c and d)。リン酸化によりセリン側鎖が価数-2 の強い負電荷を獲得することから、S17 のリン酸化はリン酸化後の S17 と $\alpha 2'$ helix 上の正電荷残基との間で静電相互作用を形成することで **closed 1** 構造を安定化し、代わりに **open** 構造へ遷移する **closed2** 構造の存在割合を低下させるという仮説を立てた。

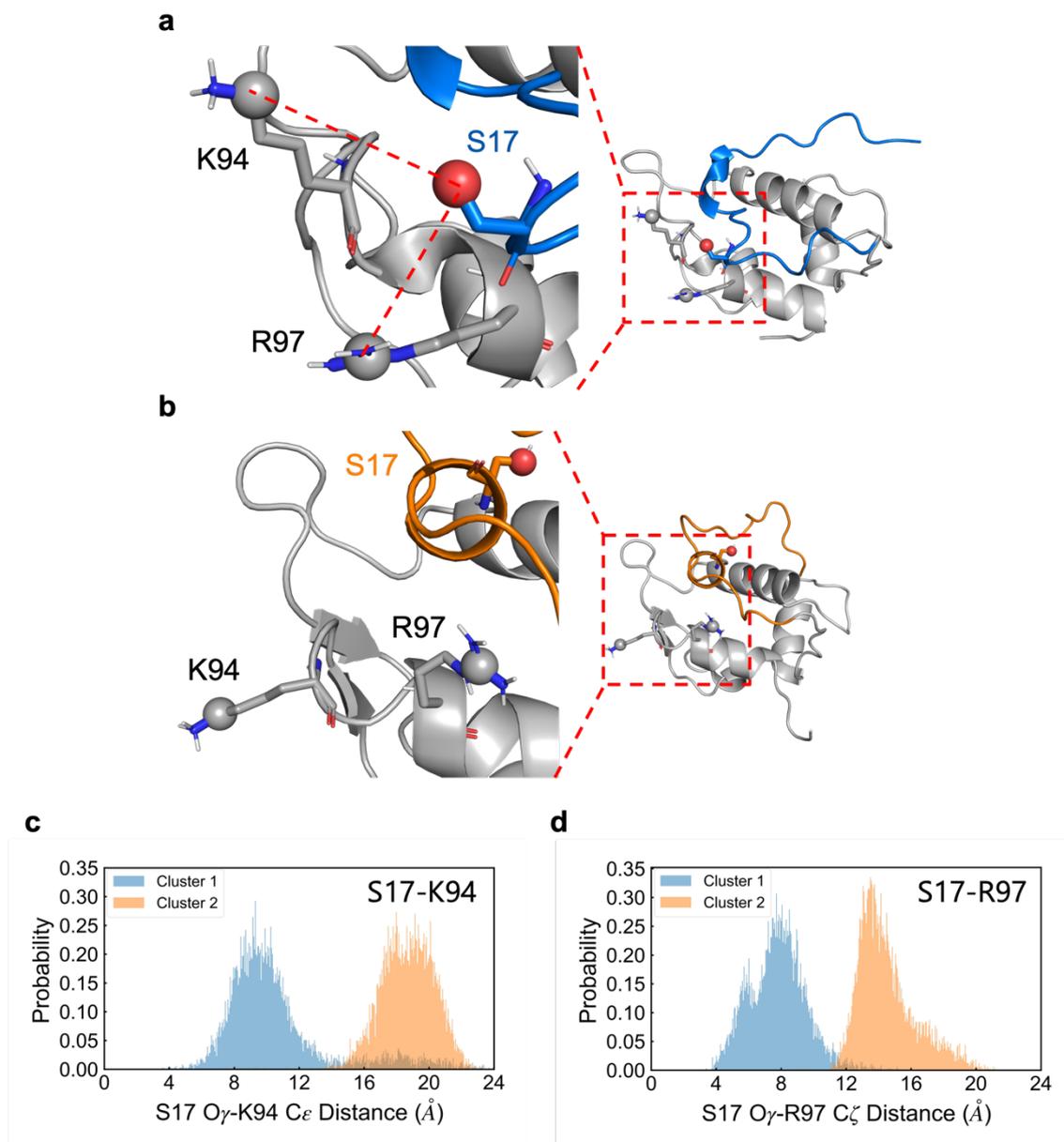


Figure 35. cluster 1 と cluster 2 の S17 側鎖の周辺環境

(a, b) cluster 1 (a) と cluster 2 (b) の構造における S17 側鎖周辺の拡大図。S17 O γ 原子は赤色の球で示している。K94 C ϵ と R97 C ζ 原子は灰色の球で示している。S17、K94 と R97 の残基は stick 表示している。(c, d) S17 O γ -K94 C ϵ 間の距離 (c) と S17 O γ -R97 C ζ 間の距離 (d) についての確率分布。

この仮説を実験的に検証するために、負電荷を有するリン酸化模倣 S17D 変異体と正電荷を有する S17K 変異体について、側鎖メチル基の NMR スペクトルを測定した。その結果、S17D 変異体の closed 構造の I19 シグナルでは高磁場側 (closed 1 方向) への化学シフト変化が観測された一方で、S17K 変異体ではそれとは逆の低磁場側 (closed 2 方向) への化学シフト変化が観測された (Figure 36a)。これは、側鎖の電荷依存的に closed 内の構造平衡が変動していることを示している。これに加えて、各変異体の open 構造の I19 シグナル強度に基づいて open 構造の存在割合を算出したところ、WT と比べて S17D 変異体では減少、S17K 変異体では増加していた (Figure 36b)。以上の結果から、S17 に対するリン酸化は lid-core 間の静電相互作用によって closed 1 構造を安定化し、open 構造への遷移が抑制されることが明らかとなった。

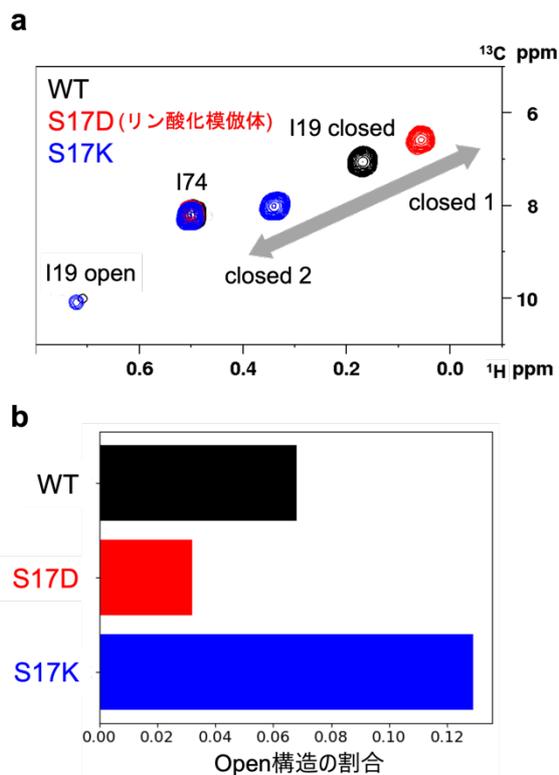


Figure 36. S17 変異体の NMR 解析

(a) 野生型(黒)、および S17D(赤),S17K 変異体(青)の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルの重ね合わせ。(b) (a) の NMR スペクトル中の I19 のシグナルから算出される open 構造の存在割合。

5. 総括と展望

本研究では、NMR 実験から示された HDM2 の multi-state な構造平衡（open-closed の slow-exchange の構造平衡と二つの closed 構造間の fast-exchange の構造平衡）について、MD シミュレーションを用いた可視化に成功した。正常細胞において、p53 は open 構造の HDM2 との結合を介して分解される (Figure 37a)。細胞ストレス環境下においては DNA-PK によって引き起こされる S17 リン酸化によって closed 1 構造が安定化されるとともに open 構造の割合が減少し、HDM2 からの影響を受けずに残った p53 によって細胞のアポトーシスが促進されることが本研究の結果から示唆された (Figure 37b)。

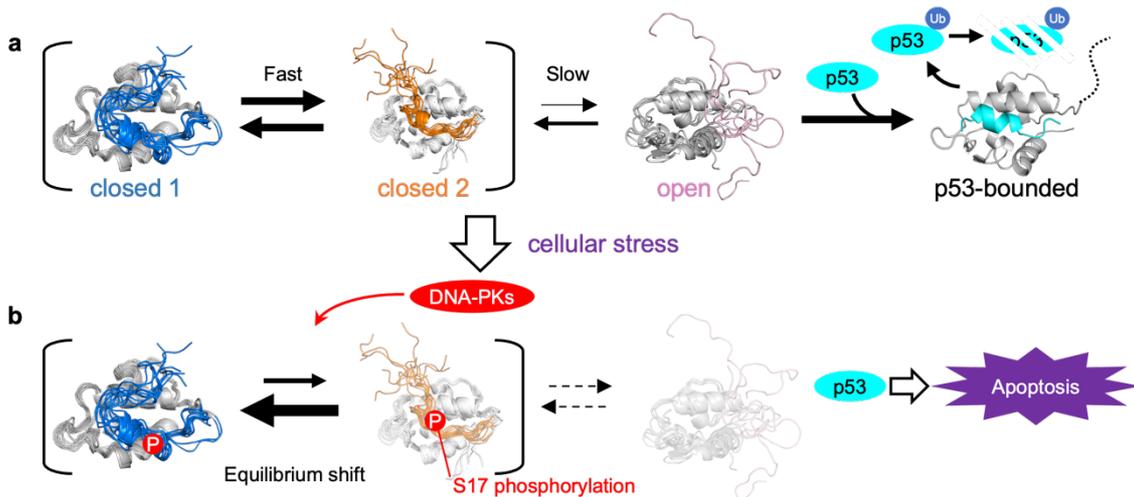


Figure 37. 本研究で提唱する apo 体 HDM2 の multi-state な構造平衡モデル

(a) apo 体 HDM2 は open-closed の slow-exchange の構造平衡と二つの closed 構造間の fast-exchange の構造平衡から構成される、HDM2 の multi-state な構造平衡状態にある。

(b) 細胞ストレス環境における S17 リン酸化によって closed 構造内の構造平衡は closed 1 方向に平衡がシフトする。

HDM2 の構造ダイナミクスに関する検討はこれまで NMR や MD シミュレーションをはじめとする様々な手法を用いて行われてきたが、本研究では NMR の実験データと MD シミュレーションの構造解析との対応づけに初めて成功した。gREST シミュレーションによって得られた二つの closed 構造、closed 1 と closed 2 は I19 や Y100 といった重要残基の空間的配向が異なっており、NMR 実験の結果から推測された Y100 芳香環の環電流効果によって引き起こされる I19 の化学シフト変化と対応していた。また、自由エネルギーランドスケープから推測された各構造間のエネルギー障壁の大きさは、open-closed 間の slow-exchange、closed 1 と closed 2 構造間の fast-exchange のそれぞれの構造平衡のタイムスケールと対応していた。

NMR の実験データとの良好な対応に加え、本研究から HDM2 の構造ダイナミクスや p53 結合制御メカニズムを理解する上で重要な知見が新たに 2 つ得られた。1 つは closed 1 構造は closed 2 構造よりも N 末端を含む lid-core 間で多くの相互作用が形成された安定な構造をとり、open 構造に遷移しにくい点である。2 つ目は S17 リン酸化による closed 構造安定化は closed 1 構造における lid-core 間の静電相互作用によって引き起こされる点である。これらの 2 つの知見から、HDM2 の構造ダイナミクスや p53 結合制御メカニズムは multi-state な構造平衡の存在を前提に検討する必要がある。

本研究では希薄溶液中で HDM2 の構造ダイナミクスを検討したが、HDM2 は細胞内に存在し、その役割を果たしている。細胞内は様々な分子が高濃度で存在する「分子混雑環境」であり、排除体積効果や非特異的相互作用などの要因が作用することでタンパク質の構造安定性やダイナミクスが変化することが知られている⁷⁰。HDM2 の阻害剤として、*N*-

acyl-*N*-alkyl sulfonamide (NASA) 基と呼ばれる反応基と Nutlin-3a、その間を linker によって繋いだ構造からなる、不可逆的共有結合阻害剤が報告されている¹⁶。先行研究において、この阻害剤の中でも短い linker を有する阻害剤が *in vitro* では活性を示さなかった一方で、細胞内では活性を示した。さらに、細胞内で NASA 基と N 末端の α -NH₂ との間の共有結合の形成を示唆する結果が得られた。この結果は希薄溶液中と細胞内とで HDM2 N 末端、つまり lid のダイナミクスが異なる可能性があることを示唆している。今後は HDM2 近傍に分子混雑環境を模倣する crowder 分子を配置した上での MD シミュレーションや *in-cell* NMR 実験によって細胞内環境における HDM2 lid の構造ダイナミクスが解明されることを期待する。

6. 参考文献

1. Michael, D. & Oren, M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* **13**, 49–58 (2003).
2. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296–299 (1997).
3. Kubbutat, M. H. G. & Vousden, K. H. Proteolytic Cleavage of Human p53 by Calpain: a Potential Regulator of Protein Stability. *Mol Cell Biol* **17**, 460–468 (1997).
4. Meek, D. W. & Knippschild, U. Posttranslational Modification of MDM2. *Molecular Cancer Research* **1**, 1017–1026 (2003).
5. Mayo, L. D., Turchi, J. J. & Berberich, S. J. Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res* **57**, 5013–5016 (1997).
6. Hou, H., Sun, D. & Zhang, X. The role of MDM2 amplification and overexpression in therapeutic resistance of malignant tumors. *Cancer Cell Int* **19**, 216 (2019).
7. Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L. & Vogelstein, B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80–83 (1992).
8. Kruse, J. P. & Gu, W. Modes of p53 Regulation. *Cell* **137**, 609–622 (2009).
9. Chen, J., Lin, J. & Levine, A. J. Regulation of Transcription Functions of the p53 Tumor Suppressor by the mdm-2 Oncogene. *Molecular Medicine* **1**, 142–152 (1995).
10. Chen, J., Marechal, V. & Levine, A. J. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* **13**, 4107–4114 (1993).
11. Argentini, M., Barboule, N. & Wasylyk, B. The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene* **20**, 1267–1275 (2001).
12. Lindström, M. S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G. & Zhang, Y. Cancer-Associated Mutations in the MDM2 Zinc Finger Domain Disrupt Ribosomal Protein Interaction and Attenuate MDM2-Induced p53 Degradation. *Mol Cell Biol* **27**, 1056–1068 (2007).
13. Itahana, K. *et al.* Targeted Inactivation of Mdm2 RING Finger E3 Ubiquitin Ligase Activity in the Mouse Reveals Mechanistic Insights into p53 Regulation. *Cancer Cell* **12**, 355–366 (2007).
14. Kussie, P. H. *et al.* Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. *Science (1979)* **274**, 948–953 (1996).
15. Zhu, H. *et al.* Targeting p53–MDM2 interaction by small-molecule inhibitors: learning from MDM2 inhibitors in clinical trials. *J Hematol Oncol* **15**, 91 (2022).

16. Ueda, T. *et al.* Enhanced Suppression of a Protein–Protein Interaction in Cells Using Small-Molecule Covalent Inhibitors Based on an N-Acyl-N-alkyl Sulfonamide Warhead. *J Am Chem Soc* **143**, 4766–4774 (2021).
17. Uhrinova, S. *et al.* Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding. *J Mol Biol* **350**, 587–598 (2005).
18. Zhan, C., Varney, K., Yuan, W., Zhao, L. & Lu, W. Interrogation of MDM2 phosphorylation in p53 activation using native chemical ligation: The functional role of Ser17 phosphorylation in MDM2 reexamined. *J Am Chem Soc* **134**, 6855–6864 (2012).
19. Showalter, S. A., Bruschiweiler-Li, L., Johnson, E., Zhang, F. & Brüschiweiler, R. Quantitative lid dynamics of MDM2 reveals differential ligand binding modes of the p53-binding cleft. *J Am Chem Soc* **130**, 6472–6478 (2008).
20. Verkhivker, G. M. Simulating molecular mechanisms of the MDM2-mediated regulatory interactions: A conformational selection model of the MDM2 lid dynamics. *PLoS One* **7**, (2012).
21. Bueren-Calabuig, J. A. & Michel, J. Elucidation of Ligand-Dependent Modulation of Disorder-Order Transitions in the Oncoprotein MDM2. *PLoS Comput Biol* **11**, 1–27 (2015).
22. Bueren-Calabuig, J. A. & Michel, J. Impact of Ser17 phosphorylation on the conformational dynamics of the oncoprotein MDM2. *Biochemistry* **55**, 2500–2509 (2016).
23. Mukherjee, S., Pantelopulos, G. A. & Voelz, V. A. Markov models of the apo-MDM2 lid region reveal diffuse yet two-state binding dynamics and receptor poses for computational docking. *Sci Rep* **6**, 1–10 (2016).
24. Mendoza-Martinez, C. *et al.* Energetics of a protein disorder–order transition in small molecule recognition. *Chem Sci* **13**, 5220–5229 (2022).
25. Mittermaier, A. K. & Kay, L. E. Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. *Trends Biochem Sci* **34**, 601–611 (2009).
26. Theillet, F.-X. In-Cell Structural Biology by NMR: The Benefits of the Atomic Scale. *Chem Rev* **122**, 9497–9570 (2022).
27. Kamiya, M. & Sugita, Y. Flexible selection of the solute region in replica exchange with solute tempering: Application to protein-folding simulations. *Journal of Chemical Physics* **149**, (2018).
28. Izadi, S., Anandakrishnan, R. & Onufriev, A. V. Building water models: A different approach. *Journal of Physical Chemistry Letters* **5**, 3863–3871 (2014).

29. Jung, J. *et al.* GENESIS: A hybrid-parallel and multi-scale molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* **5**, 310–323 (2015).
30. Kobayashi, C. *et al.* Genesis 1.1: A hybrid-parallel molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms on multiple computational platforms. *J Comput Chem* **38**, 2193–2206 (2017).
31. Li, D. W. & Brüschweiler, R. NMR-based protein potentials. *Angewandte Chemie - International Edition* **49**, 6778–6780 (2010).
32. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys* **23**, 327–341 (1977).
33. Miyamoto, S. & Kollman, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comput Chem* **13**, 952–962 (1992).
34. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* **98**, 10089–10092 (1993).
35. Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys* **103**, 8577–8593 (1995).
36. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* **126**, 014101 (2007).
37. Bussi, G., Zykova-Timan, T. & Parrinello, M. Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling. *J Chem Phys* **130**, 074101 (2009).
38. Tuckerman, M., Berne, B. J. & Martyna, G. J. Reversible multiple time scale molecular dynamics. *J Chem Phys* **97**, 1990–2001 (1992).
39. Feenstra, K. A., Hess, B. & Berendsen, H. J. C. Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems. *J Comput Chem* **20**, 786–798 (1999).
40. Jung, J. *et al.* Optimized Hydrogen Mass Repartitioning Scheme Combined with Accurate Temperature/Pressure Evaluations for Thermodynamic and Kinetic Properties of Biological Systems. *J Chem Theory Comput* **17**, 5312–5321 (2021).
41. McGibbon, R. T. *et al.* MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories. *Biophys J* **109**, 1528–1532 (2015).
42. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

43. Shrake, A. & Rupley, J. A. Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *J Mol Biol* **79**, 351–371 (1973).
44. Kabsch, W. & Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637 (1983).
45. Shirts, M. R. & Chodera, J. D. Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *J Chem Phys* **129**, 124105 (2008).
46. Best, R. B. *et al.* Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *J Chem Theory Comput* **8**, 3257–3273 (2012).
47. Huang, J. *et al.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods* **14**, 71–73 (2017).
48. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* **11**, 3696–3713 (2015).
49. Tian, C. *et al.* ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J Chem Theory Comput* **16**, 528–552 (2020).
50. Tang, W. S., Fawzi, N. L. & Mittal, J. Refining All-Atom Protein Force Fields for Polar-Rich, Prion-like, Low-Complexity Intrinsically Disordered Proteins. *J Phys Chem B* **124**, 9505–9512 (2020).
51. Liu, P., Kim, B., Friesner, R. A. & Berne, B. J. Replica exchange with solute tempering: A method for sampling biological systems in explicit water. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 13749–13754 (2005).
52. Sugita, Y. & Okamoto, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem Phys Lett* **314**, 141–151 (1999).
53. Sugita, Y. & Okamoto, Y. Molecular Mechanism for Stabilizing a Short Helical Peptide Studied by Generalized-Ensemble Simulations with Explicit Solvent. *Biophys J* **88**, 3180–3190 (2005).
54. Toyoshima, C. *et al.* Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca²⁺ ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 467–472 (2003).
55. Komuro, Y. *et al.* Energetics of the Presequence-Binding Poses in Mitochondrial Protein Import Through Tom20. *J Phys Chem B* **117**, 2864–2871 (2013).

56. Mori, T., Miyashita, N., Im, W., Feig, M. & Sugita, Y. Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1858**, 1635–1651 (2016).
57. Im, W., Feig, M. & Brooks, C. L. An Implicit Membrane Generalized Born Theory for the Study of Structure, Stability, and Interactions of Membrane Proteins. *Biophys J* **85**, 2900–2918 (2003).
58. Lee, M. S., Salsbury Jr., F. R. & Brooks III, C. L. Novel generalized Born methods. *J Chem Phys* **116**, 10606–10614 (2002).
59. Miyashita, N., Straub, J. E., Thirumalai, D. & Sugita, Y. Transmembrane Structures of Amyloid Precursor Protein Dimer Predicted by Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations. *J Am Chem Soc* **131**, 3438–3439 (2009).
60. Ganguly, D. & Chen, J. Atomistic Details of the Disordered States of KID and pKID. Implications in Coupled Binding and Folding. *J Am Chem Soc* **131**, 5214–5223 (2009).
61. Camilloni, C., Provasi, D., Tiana, G. & Broglia, R. A. Exploring the protein G helix free-energy surface by solute tempering metadynamics. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **71**, 1647–1654 (2008).
62. Terakawa, T., Kameda, T. & Takada, S. On easy implementation of a variant of the replica exchange with solute tempering in GROMACS. *J Comput Chem* **32**, 1228–1234 (2011).
63. Moors, S. L. C., Michielsens, S. & Ceulemans, A. Improved Replica Exchange Method for Native-State Protein Sampling. *J Chem Theory Comput* **7**, 231–237 (2011).
64. Best, R. B. *et al.* Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *J Chem Theory Comput* **8**, 3257–3273 (2012).
65. Wang, L., Friesner, R. A. & Berne, B. J. Replica Exchange with Solute Scaling: A More Efficient Version of Replica Exchange with Solute Tempering (REST2). *J Phys Chem B* **115**, 9431–9438 (2011).
66. Jo, S. & Jiang, W. A generic implementation of replica exchange with solute tempering (REST2) algorithm in NAMD for complex biophysical simulations. *Comput Phys Commun* **197**, 304–311 (2015).
67. Huang, K. & García, A. E. Acceleration of Lateral Equilibration in Mixed Lipid Bilayers Using Replica Exchange with Solute Tempering. *J Chem Theory Comput* **10**, 4264–4272 (2014).

68. Smith, A. K., Lockhart, C. & Klimov, D. K. Does Replica Exchange with Solute Tempering Efficiently Sample A β Peptide Conformational Ensembles? *J Chem Theory Comput* **12**, 5201–5214 (2016).
69. Huang, X. *et al.* Replica Exchange with Solute Tempering: Efficiency in Large Scale Systems. *J Phys Chem B* **111**, 5405–5410 (2007).
70. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* **26**, 597–604 (2001).

謝辞

本研究を行う機会と、本研究を進めるにあたり様々な助言、熱心な指導を賜り、また、研究者としての心構えや将来について常に親身になってご指導を賜りました 千葉大学大学院薬学研究院薬品物理化学研究室 西田紀貴教授に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、NMR 実験のデータの取得や考察、研究成果をまとめる際の議論など、多岐に渡るご支援とご指導を賜りました 千葉大学大学院薬学研究院薬品物理化学研究室 趙慶慈助教に心より感謝申し上げます。

MD シミュレーションを用いた検討を進めるにあたり、理化学研究所研修生として受け入れてくださり、研究の方向性について様々なご指導を賜りました 理化学研究所杉田理論分子科学研究室 杉田有治主任研究員に心より感謝申し上げます。

共同研究者として根気強く議論をしてくださり、gREST の適用や計算結果の解析に至るまで多くの面での的確なご助言を賜りました 理化学研究所杉田理論分子科学研究室 Weitong Ren 博士 (現 中国科学院大学 博士研究員) に心より感謝申し上げます。

本研究を完成させるにあたって必要不可欠だった実験データの取得のために、HDM2 の試料作成から NMR 測定、解析に至るまで、多岐に渡りご尽力を賜りました 千葉大学大学院薬学研究院薬品物理化学研究室 岩月亮介、福井涼太両氏に心より感謝申し上げます。

研究生生活全般にわたり、多大なご支援ご協力を賜りました 千葉大学大学院薬学研究院薬品
物理化学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を送るにあたり、経済面・精神面にて支えてくださいました、家族、友
人をはじめ身近な方々に感謝致します。

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Watanabe, K., Zhao, Q., Iwatsuki, R., Fukui, R., Ren, W., Sugita, Y., & Nishida, N. Deciphering the multi-state conformational equilibrium of HDM2 in the regulation of p53 binding: Perspectives from molecular dynamics simulation and NMR analysis *J Am Chem Soc* in press.

主査、副査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 森部久仁一

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 樋坂章博

副査 千葉大学大学院講師（薬学研究院） 薬学博士 福本泰典