

課題名 (タイトル) :

拡張アンサンブル計算によるタンパク質・リガンド結合自由エネルギー解析法の開発

利用者氏名 :

○尾嶋 拓*
李 秀栄*
新津 藍**
本村 肇**,***

理研での所属研究室名 :

*生命システム研究センター 生命モデリングコア 分子機能シミュレーション研究チーム
**杉田理論分子科学研究室
***九州大学 生体防御医学研究所 生体多階層システム研究センター 構造生物学分野

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

生体内タンパク質の多くは基質分子 (リガンド) を結合して機能を発現する。タンパク質とリガンドとの結合は生命科学の中心課題の一つであり、昨今、創薬化学での重要性も増してきている。高騰する医薬品開発費を抑えるために、標的タンパク質に強く結合する医薬品候補化合物を正確かつ高速に予測できる計算技術が強く求められている。タンパク質とリガンドとの結合はしばしば鍵と鍵穴の関係で説明されてきた。タンパク質の活性部位を鍵穴、リガンドを鍵とみたと、鍵と鍵穴の形状が一致した場合に結合する。構造ゆらぎが少ないタンパク質や低分子リガンドの結合は、鍵と鍵穴モデルで説明出来ることもある。しかし、タンパク質やリガンドを剛体とみなすモデルは現実にそぐうものではない。そこで、例えば誘導適合モデルなど、構造柔軟性を取り入れたモデルが複数提案され、実験・理論の両側面から検証が進められている (例えば、D. L. Mobley and K. A. Dill, Structure, 17, 489-498 (2009))。

申請者らはこれまで、拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換法を用いて、従来の分子動力学 (MD) 計算では困難であった柔軟性の高い生体分子の構造予測を行ってきた。一方で、タンパク質とリガンドとの結合の熱力学量計算を通じて、水和やエントロピーの寄与を含め、結合の物理化学的な起源を明らかにしてきた。本申請課題では、これらの研究経験を生かし、従来のタンパク質とリガンドの結合自由エネルギー計算を拡張アンサ

ンブル法と組み合わせ、結合予測の精度を大幅に向上するとともに、X線結晶構造データがない場合でも適用可能な新たな結合予測基盤を構築することを目的とする。

具体的には以下の2つの研究を行う。

- (1) レプリカ交換法を用いたタンパク質・リガンド結合自由エネルギー計算プロトコルの構築
- (2) タンパク質・リガンド結合自由エネルギー計算の効率化を目指した新規拡張アンサンブル計算法の開発

2. 具体的な利用内容、計算方法

- (1) レプリカ交換法を用いたタンパク質・リガンド結合自由エネルギー計算プロトコルの構築
タンパク質-リガンド結合自由エネルギーの計算に最も広く用いられている自由エネルギー摂動法 (FEP: Free Energy Perturbation) では、結合ポーズが複数ある場合、初期構造依存性を示し、計算の収束に膨大な時間を要する。また、結晶構造が存在しない場合はそもそも計算することができない。本研究では、レプリカ交換法を取り入れることで①従来の FEP 計算の問題点を克服し、②結晶構造データがない場合に結合ポーズを推定するプロトコルを構築した。具体的には、系の一部分の有効温度を交換する gREST (generalized Replica Exchange with Solute Tempering) 法を導入し、結合サイトの構造や結合様式の探索効率を向上させた。①では、分子動力学計算プログラム GENESIS に FEP 計算モジュールを新たに導入し、ア

ミノ酸側鎖アナログの水和自由エネルギー及び典型的なタンパク質・リガンド結合自由エネルギーのテスト計算及び従来の FEP 計算法との系統的な比較を行った。②に関しては、長時間 MD によるドッキング計算結果が報告されているキナーゼのリガンド結合に着目し、GENESIS を用いて gREST 法と REUS (Replica Exchange Umbrella Sampling) 法を組み合わせた計算法 (gREST/REUS) を実施し、同法の有効性を評価した。

(2) タンパク質・リガンド結合自由エネルギー計算の効率化を目指した新規拡張アンサンブル計算法の開発

レプリカ交換法では、高温のプレリカにより構造探索効率を上げる。ただし、系が大きくなるにつれて必要とするレプリカ数が急速に増えてしまうため、gREST 法のように系の一部の有効温度を交換することでレプリカ数の軽減が試みられている。本課題では、Accelerated MD (aMD) 法を導入してさらにレプリカ数を減らすことを目指した。この手法は、ポテンシャルエネルギーにバイアスを加え構造変化のエネルギー障壁を有効的に下げる手法であり、単一の MD 計算であるため計算量を抑えることができる。GENESIS に aMD 法の 1 つである Gaussian Accelerated MD (GaMD) 法を導入し有効性を評価した。

3. 結果

(1) レプリカ交換法を用いたタンパク質・リガンド結合自由エネルギー計算プロトコールの構築

アミノ酸側鎖アナログの水和自由エネルギーを同じ力場・同じ初期構造で GENESIS と NAMD で計算し比較した。GENESIS と NAMD の結果はほぼ一致し、実験結果との比較でも良好な一致を示している (Figure 1)。ずれが大きい部分は力場の影響であり、FEP 計算自体には問題がないと考えられる。

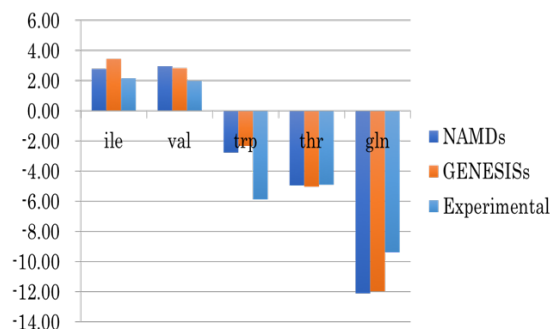


Figure 1. アミノ酸側鎖アナログの水和自由エネルギー。

また FEP 計算の典型例として、GENESIS を用いて FKBP とリガンドの結合自由エネルギーを計算した。我々の計算結果は、先行研究と同様に、実験結果を正しく再現できた (Figure 2)。以上より、GENESIS の FEP 計算モジュールは正しく実装されていることが検証され、FEP のリガンド結合自由エネルギー計算への有効性が確認できた。

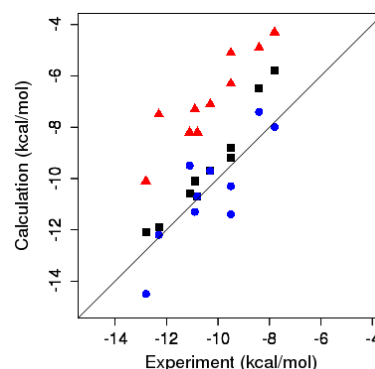


Figure 2. FKBP とリガンドの結合自由エネルギー。赤点と黒点は藤谷らの先行研究 (Fujitani et al. 2005, 2009)、青点は我々の計算結果。

結晶がない場合のポーズ探索の例として、Src kinase と阻害剤 PP1 とのドッキングに gREST/REUS 法を適用し、有効性を検討した。結合サイト内残基の柔軟性を gREST で向上させることによって、ドッキング効率が上昇し、結合自由エネルギー地形の収束性が大幅に向上した。また、結晶構造では見られない中間状態も観測された。gREST/REUS 法が結合ポーズの探索に有効であることが示された。

(2) タンパク質・リガンド結合自由エネルギー計算の効率化を目指した新規拡張アンサンブル計算法の開発

GENESIS に GaMD 法を実装し、biantennary complex-type N-glycan (Bi9) に適用し、GaMD の有効性を検証した。Bi9 の omega 角周辺の二面角の自由エネルギー地形を通常の MD で計算すると、強い初期構造依存性を示す (Figure 3 の上側)。同じ系に GaMD 法を適用すると、初期構造依存性が大きく改善した (Figure 3 の下側)。GaMD によってエネルギー障壁が下がり、広い範囲で構造探索が行えるようになったことが示された。

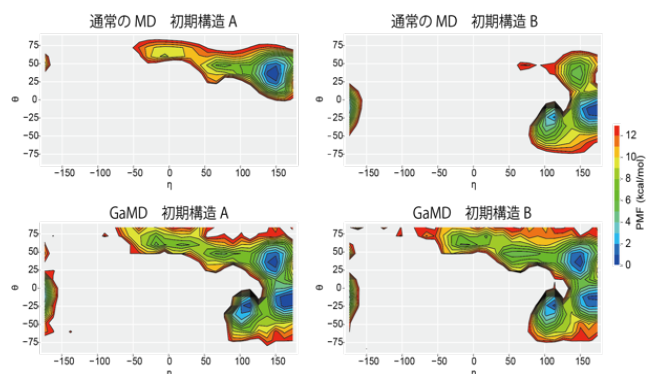


Figure 3. Bi9 の二面角の自由エネルギー地形。通常の MD では左右の結果が大きく異なるが、GaMD ではほぼ同じ自由エネルギー地形に収束している。

4. まとめ

レプリカ交換法を用いたドッキングを行うことで、X 線結晶構造データがない場合でも結合ポーズの予測が行えるようになった。また、GENESIS に実装した FEP 計算モジュールを用いることで、結合自由エネルギーの計算が出来るようになった。gREST/REUS 法によるポーズ予測、得られたポーズに対する FEP による結合自由エネルギーの高精度計算というプロトコルを構築することができた。

GENESIS に導入した GaMD 法によって、単一のシミュレーションにも関わらず、通常の MD より広い構造探索が可能であることが検証できた。

5. 今後の計画・展望

gREST/REUS 法と FEP による結合自由エネルギー計算法は、結晶構造が未知の場合でも適用できる有効な方法だと示された。しかし、この手法では多数のレプリカを必要とし、京コンピュータなどの超並列スーパーコンピュータでしか利用できない。今回 GENESIS に実装した GaMD 法ではレ

プリカ数を大きく減少できることが確認できた。GaMD 法をドッキングに適用し、さらに低資源・高効率の手法の開発を目指していく。

平成 29 年度 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの口頭発表】

1. S. Re 「Free energy-based drug discovery using MD simulation with high performance computing: Application」 RIKEN Kansai Joint Retreat 2017、淡路（2017 年 6 月）＊ポスター
2. H. Oshima 「Free energy-based drug discovery using MD simulation with high performance computing: Development」 RIKEN Kansai Joint Retreat 2017、淡路（2017 年 6 月）＊ポスター
3. 尾嶋拓、李秀栄、坂倉正義、高橋栄夫、杉田有治「AMPA 受容体リガンド結合ドメインの変異による自由エネルギー地形の変化」第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台（2017 年 6 月）＊ポスター
4. 李秀栄、二島渉、宗行英朗、山口芳樹、杉田有治「イオンモビリティ質量分析における衝突断面積の物理化学的な決定因子」第 36 回日本糖質学会、旭川（2017 年 7 月）＊口頭
5. 李秀栄「レプリカ交換分子動力学法を用いたフレキシブルドッキング」、重点課題第 3 回ワークショップ、東京（2017 年 8 月）＊口頭
6. S. Re、H. Oshima、M. Kamiya、Y. Sugita 「Incorporation of protein flexibility into ligand binding simulation」第 55 回日本生物物理学会年会、熊本（2017 年 9 月）
7. S. Re 「Flexible docking using replica-exchange molecular dynamics simulation」CBI2017 年大会、東京（2017 年 10 月）＊口頭、ポスター
8. 尾嶋拓「蛋白質構造変化を考慮したリガンド結合自由エネルギー計算法の開発」CBI2017 年大会、東京（2017 年 10 月）＊招待講演
9. 尾嶋拓「リガンド・蛋白質構造変化を考慮した自由エネルギー計算法の開発と応用」近畿化学協会コンピュータ化学部会公開講演会（第 101 回例会）、大阪（2018 年 2 月）＊招待講演
10. H. Oshima、S. Re、M. Sakakura、H. Takahashi、Y. Sugita 「Effects of T686A mutation on the structural stability of the AMPA receptor ligand-binding domain」62nd Annual Meeting of the Biophysical Society (BPS18)、米国サンフランシスコ（2018 年 2 月）＊ポスター
11. S. Re、H. Oshima、M. Kamiya、Y. Sugita 「REMD-based flexible docking」第 98 回日本化学会春季年会、東京（2018 年 3 月）
12. 尾嶋拓、李秀栄、坂倉正義、高橋栄夫、杉田有治「AMPA 受容体リガンド結合ドメインにおける隠れた安定状態と部分作動との関係」日本物理学会第 73 回年次大会（2018 年）、千葉（2018 年 3 月）＊口頭

【その他（プレスリリース、学術会議以外の一般向けの講演など）】

1. 分子動力学(MD)法ソフトウェア GENESIS チュートリアル、CBI2017 年大会、東京（2017 年 10 月 5 日）