

## 課題名(タイトル):

拡張アンサンブル法を用いた高精度・高効率タンパク質ーリガンド結合計算法の開発と応用

## 利用者氏名:

○尾嶋 拓(1), 李 秀榮(1), 笠原 健人(1)

## 理研における所属研究室名:

(1) 生命機能科学研究センター 分子機能シミュレーション研究チーム

## 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。タンパク質ーリガンド結合の理解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する計算技術が求められている。これまで、タンパク質の構造柔軟性を取り入れた「動的」な結合モデルが複数提案されている。実験的にも理論的にも検証が進められており、結合メカニズムの理解、さらには親和性の予測で本質的な進展が得られると期待されている。しかし、分子動力学 (MD) シミュレーションにより、タンパク質の構造変化とリガンド結合の両方を精度良く表すためには長時間計算が必要で、未だ「動的」な結合モデルに基づいた親和性予測法は確立されていない。長時間 MD 計算により結合予測が可能になりつつあるが、たかだか数回の結合イベントしか観測できず、熱力学的な議論には、統計量を増やす手法が必要である。また、実際の薬剤設計に役立つプロトコールにするためには、細胞環境を意識した分子混雑系でのリガンド結合も考慮しなければならない。

申請者らはこれまでに拡張アンサンブル計算によるタンパク質ーリガンド結合自由エネルギー解析法を開発した。2次元レプリカ交換 MD 計算によりタンパク質ーリガンド結合のポーズを予測し親和性を評価するもので、結合イベントの頻度が大幅に向上し、高い統計精度で自由エネルギープロファイルに基づいた結合予測を可能とした。ただし、この手法は多数のレプリカを必要とするために、このままでは、膜タンパク質や分子混雑系といった大きく複雑なシステムへの展開は困難であり、レプリカ数の軽減は喫緊の課題である。

本申請課題では、レプリカ数を大幅に軽減した高精度・高効率リガンド結合計算の実現と、高精度自由エネルギー解析プロトコール構築を目的とする。また、分子混雑によるリガンド結合への影響も調べる。

具体的には以下の3つの研究を行う。

- (1) Gaussian accelerated Molecular Dynamics (GaMD) 法を用いてレプリカ数を軽減した高効率タンパク質ーリガンド結合構造予測法の開発
- (2) 拡張アンサンブル計算による高精度結合自由エネルギー解析プロトコールの開発
- (3) 分子混雑系におけるタンパク質ーリガンド結合の分子メカニズムの解明

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

- (1) Gaussian accelerated Molecular Dynamics (GaMD) 法を用いてレプリカ数を軽減した高効率タンパク質ーリガンド結合構造予測法の開発

レプリカ交換法では、高温のレプ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 (generalized Replica Exchange with Solute Tempering) 法の様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。本研究では、前年度課題で分子動力学計算プログラム GENESIS に導入した Gaussian Accelerated MD (GaMD) 法を Replica-Exchange Umbrella Sampling (REUS) 法と組み合わせることでレプリカ数を減らすことを目指した (GaMD/REUS 法)。GaMD 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。GaMD/REUS 法を結合シミュレーションに適用し、有効性を評価した。

(2) 拡張アンサンブル計算による高精度結合自由エネルギー解析プロトコールの開発

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) は、結合ポーズが複数あるような場合に初期構造依存性や収束の問題があることが知られている。そもそも結晶構造データがない場合は計算自体が行えない。分子動力学計算ソフト GENESIS には、前年度課題で FEP 計算モジュールと、系の一部の有効温度を交換する gREST 法を導入し、正しく実装されていることを検証済みである。本研究では、高精度自由エネルギー解析プロトコールを構築するために、①結晶構造データがない場合の結合ポーズの推定、②FEP 計算モジュールの拡張を行った。具体的には、①では、gREST 法を用いてリガンド-タンパク間相互作用を弱めることでリガンドのポーズ探索効率を向上する方法を提案し、有効性を検証した。②では、以前の FEP 計算モジュールでは CHARMM 力場しか利用できなかったが、AMBER 力場でも FEP 計算が行えるように機能拡張し、水和自由エネルギー計算によって実装の検証を行った。

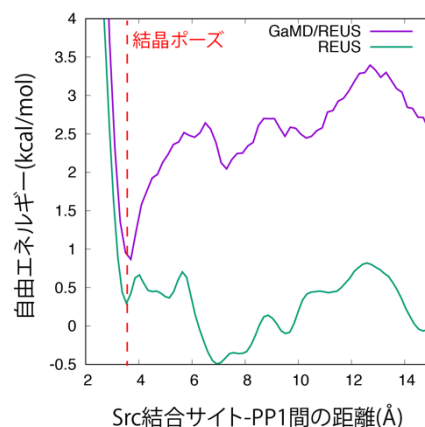
(3) 分子混雑系におけるタンパク質-リガンド結合の分子メカニズムの解明

タンパク質表面にはネイティブな結合サイト以外にもリガンドが結合しやすい場所が存在している。これらの結合サイトは親和性が低いが、多数存在しており、リガンドの結合パスウェイや結合速度に関係していると考えられる。生体内細胞中でのリガンドは、標的タンパク質の他に、さまざまなタンパク質や RNA などで非常に混み合った環境に置かれている。このような分子混雑環境はリガンドと低親和性結合サイトの結合を変化させ、結合パスウェイや速度に影響していると考えられている。本研究では、分子混雑環境におけるタンパク質-リガンド結合の分子メカニズムを調べるために、分子混雑環境のリガンド結合 MD シミュレーションを実施した。リガンドの長時間ダイナミクスを追い、リガンドの拡散とタンパクとの結合への分子混雑の影響を調べた。

## 3. 結果

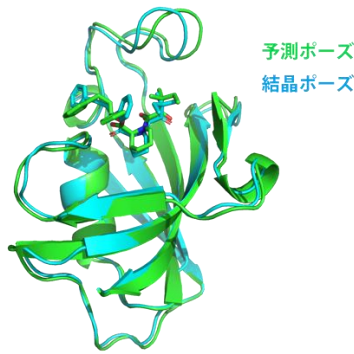
(1) Gaussian accelerated Molecular Dynamics (GaMD)法を用いてレプリカ数を軽減した高効率タンパク質・リガンド結合構造予測法の開発

GENESIS に GaMD/REUS 法を実装し、Src kinase (以下 Src と呼ぶ) とその阻害剤である PP1 の結合シミュレーションに適用し、GaMD/REUS 法の有効性を検証した。Src 結合サイトと PP1 との距離を反応座標に選び、従来の REUS 法で自由エネルギー地形を計算すると、正しい結合ポーズが自由エネルギー最小状態にはならなかった。これは正しいポーズのサンプリングが不足し、計算が収束していないことを意味している。同じ系に GaMD/REUS 法を適用すると結晶ポーズで自由エネルギーが最小になり、ポーズ再現に成功した。GaMD 法との組合せ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。

(2) 拡張アンサンブル計算による高精度結合自由エネルギー解析プロトコールの開発

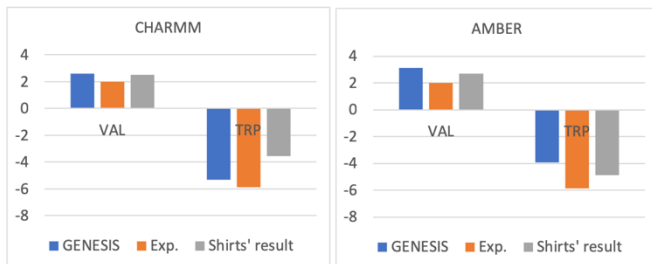
## ① 結晶構造データがない場合の結合ポーズの推定

FKBP と L8 との結合ポーズ探索に gREST 法を適用し、有効性を検討した。ドッキングソフトで初期の結合ポーズを作成した。結合サイト残基とリガンドの相互作用を gREST 法を用いて弱めることで、サイト内でリガンドが自由に動けるようにした。初期ポーズは結晶構造と全く異なっていたにもかかわらず、結晶と同じポーズを再現することができた。gREST 法が結合ポーズの探索に有効であることが示された。



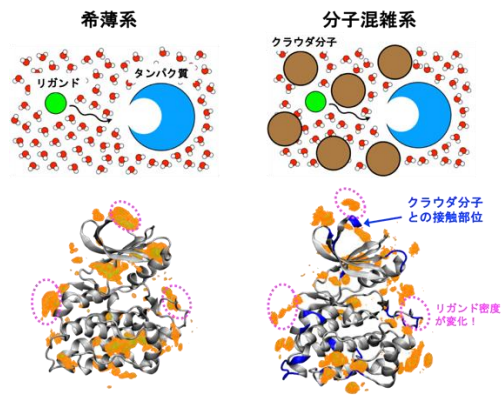
② FEP 計算モジュールの拡張

GENESIS の FEP 計算モジュールを拡張し、AMBER 力場でも計算できるようにした。アミノ酸側鎖アナログの水和自由エネルギーを CHARMM 力場と AMBER 力場の両方で計算し、先行研究(Shirts, et al., J. Chem. Phys. 119 5740 (2003))と比較した。どちらの力場でも先行研究とほぼ一致し、実験結果(Wolfenden, et al., Biochemistry 20, 849 (1981))とも良好な一致を示した。正しく実装されていることが検証できた。



(3) 分子混雑系におけるタンパク質-リガンド結合の分子メカニズムの解明

Src-PP1 系に Bovine serum albumin (BSA)を加え、分子混雑環境を構築した。この分子混雑系でのシミュレーションを水中にリガンドとタンパク質のみが存在する希薄系でのシミュレーションと比較し、分子混雑の影響を調べた。希薄系と分子混雑系とで受容体表面にある複数の結合サイトのリガンド親和性に興味深い違いが見られた。BSA と標的タンパク質、BSA とリガンドの相互作用が重要な役割を果たしていることがわかった。また、分子混雑系ではリガンドの拡散が希薄系に比べて遅くなることがわかった。これらの結果は、実際の薬剤設計に役立つプロトコルの構築には、分子混雑によるリガンド結合への影響を考慮しなければならないことを示唆している。



4. まとめ

GENESIS に導入した GaMD/REUS 法または gREST 法によって、X 線結晶構造データがない場合でも結合ポーズ予測および自由エネルギー地形計算が行えるようになった。

GENESIS の FEP 計算モジュールを AMBER 力場に対応させることで、より多様なシステムで結合自由エネルギー計算ができるようになった。

分子混雑環境でのリガンド結合 MD シミュレーションによって、分子混雑によるタンパク質結合サイトの変化とリガンドの動力学への影響を明らかにした。

5. 今後の計画・展望

本研究で GaMD/REUS 法および gREST 法は計算資源が少ない場合でもサンプリング効率を向上させることができる有効な方法であることが示された。また、生体内細胞中のような分子混雑環境ではリガンド結合の様式が希薄系とは異なることがわかってきた。より詳細な解析を行うには十分なサンプリングを行う必要があるが、分子混雑系でのリガンド結合シミュレーションは系が大きく複雑なため、通常のシミュレーション手法では困難になってくると思われる。今回開発した GaMD/REUS 法や gREST 法を分子混雑系に適用し、サンプリング効率を向上させ、分子混雑系におけるタンパク質-リガンド結合の分子メカニズムの解明を目指していく。より効率の良い計算手法の開発も並行して行っていく。

平成 30 年度 利用研究成果リスト

**【雑誌に受理された論文】**

1. Y. Sugita, M. Kamiya, H. Oshima, and S. Re, “Replica Exchange Methods for Biomolecular Simulations”, *Methods in Molecular Biology*, in press.

**【口頭発表】**

1. 李秀栄、“ダイナミックドッキングによる結合親和性予測”、CBI 学会 2018 年大会、2018 年 10 月 9 日、東京
2. S. Re, “Molecular Mechanisms for Protein-Ligand Binding studied by Molecular Dynamics Simulations”, Centre of New Technologies, 23 May 2018, Warsaw, Poland, University of Warsaw (Hosted by Prof. Joanna Trylska)
3. S. Re, H. Oshima, M. Kamiya and Y. Sugita, “Extensive molecular dynamics sampling characterizes ligand binding pathway to Src kinase”、第 56 回日本生物物理学会年会、2018 年 9 月 15 日～17 日、岡山市
4. 尾嶋拓, 李秀栄, 杉田有治、“レプリカ交換と Gaussian accelerated MD を組合せた自由エネルギー計算法の開発”、日本物理学会 2018 年秋季大会、2018 年 9 月 9 日、京田辺市
5. K. Kasahara, H. Oshima, S. Re and Y. Sugita, “Protein-ligand binding in crowded environments”、第 5 回ポスト「京」重点課題 1 ワークショップ、2018 年 8 月、東京

**【ポスター発表】**

1. K. Kasahara, H. Oshima, S. Re and Y. Sugita, “Protein-ligand binding in crowded environments: Molecular dynamics simulation study”、Joint Conference of EMLG/JMLG Meeting 2018 and 41st Symposium on Solution Chemistry of Japan、2018 年 11 月、名古屋市