

課題名(タイトル): タンパク質・核酸など生体高分子の分子シミュレーション

利用者氏名: ○森次 圭

理研における所属研究室名: 情報システム本部・計算工学応用開発ユニット

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

本研究チームは平成 24 年度までの次世代生命体統合シミュレーション研究開発プログラム・分子スケール研究において、タンパク質を中心とした生体分子のシミュレーション法とそのソフトウェアの研究開発(コード名: $\mu^2\text{lib}$, <http://www.mu2lib.org> のサイトで公開)を行った。特に、全原子シミュレーションと疎視化モデルシミュレーションとの連成手法を新規開発することを目指した。プロジェクトでの研究目的は以下の 2 点である:

- ・次世代スーパーコンピュータ「京」の全計算機資源を用いて高効率で計算することができる
- ・それによって従来の分子シミュレーションの方法ではできなかったレベルの計算をすることができる

生命活動をタンパク質や核酸などの生体分子のレベルからシミュレーションによって解こうという分野における問題は、その巨大な系の大きさと生命現象の時間スケールの大きさである。その大きさのために、全原子シミュレーション法には巨大な計算機資源を用いても多くの場合、生命現象の解明が可能な系の大きさと計算時間の長さを実現するシミュレーションは不可能である。そこで不可避免的に疎視化モデルの利用が求められるが、そこには精度の制約が生まれる。従って、その両者の利点を併せ持つ連成計算(全原子シミュレーション法の精度と疎視化モデルの効率)が必要となる。また、数十万コアという並列計算を実現するためには、不可避免的に弱連成のアルゴリズムであることが要請される。これら実現するため、応用研究として、利用者らは新規アルゴリズムである **MultiScale Enhanced Sampling (MSES)**法と最小自由エネルギー経路探索法(ストリング法)を開発し、「京」に向けたプログラム開発を行った。

MSES 法は、全原子モデルと低自由度の疎視化モデルによる連成シミュレーションである。疎視化モデルのポテンシャルが規定する運動空間に全原子モデルをド

ライブし、全原子モデルと疎視化モデルとを接続するバネ強度を 0 に外挿することで、全原子モデルの空間での分布関数を得ることができる。バネ強度の 0 への外挿は、バネ強度を変数としたハミルトニアンレプリカ交換法によって行う。従って、MSES 法はバネ強度の異なる多数のコピーを用いた弱連成のシミュレーションであり、高度の並列計算が可能である。レプリカ交換が疎視化モデルの自由度により決まることから、通常の温度レプリカ交換法と異なり全原子モデルの自由度の制限なく巨大系のサンプリングが実行可能となる画期的な方法である。昨年度までの研究において、 $\mu^2\text{lib}$ への MSES 法の実装および高度化は完了している。また応用研究として、ミニタンパク質シニョリンのフォールディング過程だけではなく、天然変性タンパク質 sortase の disorder-to-order 転移の構造探索や barnase-barster 複合体、グルタミン結合タンパク質へのリガンド結合過程の解析、また、2 型糖尿病の創薬ターゲットであるグルコキナーゼ活性化に関わる構造変化の解析、といった、従来の拡張アンサンブル法では難しかった大規模系(溶媒を陽に含んだタンパク質系という意味で)への適用も進めてきた。

ストリング法では、全原子モデルと低次元の疎視化モデルを連成させる。疎視化モデルはフラットなポテンシャルを持ち、対応する全原子モデルの自由度と調和バネで結ばれている。そのとき、バネ強度の極限で無限時間後に疎視化モデルは全原子モデルによる平均場ポテンシャル上で動くようになる。そこで、疎視化モデルを構造変化の経路(1 次元)に限定し、最小自由エネルギー経路探索を行う。具体的には多数のシステムのコピーをタンパク質の構造変化パス上に配置し、それらマルチコピーを弱連成で並列に計算することで、最適経路をサンプルする。計算科学機構 松永康佑 研究員らにより継続して研究開発が行なわれており、分子シミュレーションソフトウェア GENESIS への実装や多剤排出トランスポーター AcrB といった大規模生体分子系への応用研究が進んでいる。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究チームでは、次世代生命体統合シミュレーション研究開発プログラムの一環としてマルチコピー・マルチスケール分子動力学シミュレーションのためのクラスライブラリ (μ^2 lib) の開発を継続している。 μ^2 lib ではマルチコピーシミュレーションを行っており、異なるパラメータを与えた数十の系のコピー (レプリカ) を発生させ、それらの間の相互作用を考慮しながら並行してシミュレーション実行する。各コピーについて数十のコア、合計数百のコアを用いた並列計算を OpenMP と組み合わせたハイブリッド並列により行なう。ストリング法では、更なる高度化を実装している GENESIS を計算に用いた。今年度は下記のような応用研究を行い、これらの方法の妥当性と物理化学的意味づけを評価した。

3. 結果

(1) ポリユビキチンによる基質タンパク質の動的な分子認識機構の解析

ユビキチンは 76 個のアミノ酸からなる小さなタンパク質であり、タンパク質のポリユビキチン修飾は、タンパク質分解を始め DNA 修復、シグナル伝達など多彩な細胞機能に関わっている。ポリユビキチン鎖は 7 つの Lys 残基と N 末端残基を介して (リンケージと呼ぶ) ユビキチンが重合した多様な構造を形成することができ、それぞれの構造に対応した基質分子 (ユビキチン結合ドメイン: UBD) と特異的に結合することで分子機能を発現している。ポリユビキチン鎖がリンケージの組み合わせを駆使しいかにして様々な UBD との特異的相互作用を実現するかを理解するため、NF- κ B パスウェイに関わる K63 ジュビキチン鎖と TAK1 binding protein2 (TAB2) の Npl4 zinc finger (NZF) ドメインとの特異的相互作用をモデルとし、その複合体形成過程のシミュレーションを MSES 法により原子解像度で実行した。

K63 ジュビキチン/TAB2 NZF について、16 レプリカを用いて 200 ns の MSES 法を実行した。また、リンケージによる依存性を見るため、Linear ジュビキチン/HOIL-1L NZF と、基質を K63 のものに入れ替えた Linear ジュビキチン/TAB2 NZF についても、同様の大規模計算を実行した (図 1)。

MSES 法による構造探索により計算された K63 ジュビキチン/TAB2 NZF 複合体の自由エネルギー地形は、幅広いフラットなランドスケープを示した (図 2)。TAB2 NZF が両方のユビキチンとコンタクトした構造でも範囲は限定されず広範に動きうることから、K63 ジュビキチンで規定された 2 個のユビキチンで TAB2 NZF がダイナミックに認識される分子機構を示唆している。

また、K63 ジュビキチン/TAB2 NZF 複合体構造から始めたシミュレーションでの水和構造を観察し、従来の結晶構造研究では distal ユビキチンにある疎水性パッチが複合体の安定性に寄与すると考えられてきたが、疎水性パッチに溶媒水が速やかに侵食し distal ユビキチンと TAB2 NZF との相互作用が不安定化することを始めて示した (図 3)。さらに、UBD やそのユビキチンとの相互作用様式、また、リンケージを変えた複合体モデルについてのシミュレーションを追加し比較することで、ポリユビキチン鎖がリンケージや UBD との相互作用面を巧妙に組み合わせながら様々な UBD との特異性を実現する仕組みを見出すことができた。

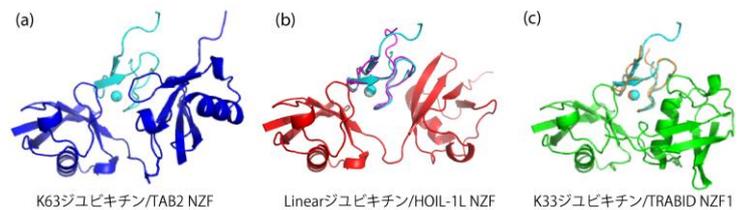


図 1. 計算対象としたジュビキチン/NZF 複合体の結晶構造。(a) K63 ジュビキチン/TAB2 NZF (PDB: 2wwz)、(b) Linear ジュビキチン/HOIL-1L NZF (PDB: 3b0a)、(c) K33 ジュビキチン/TRABID NZF1 (PDB: 5af6)。

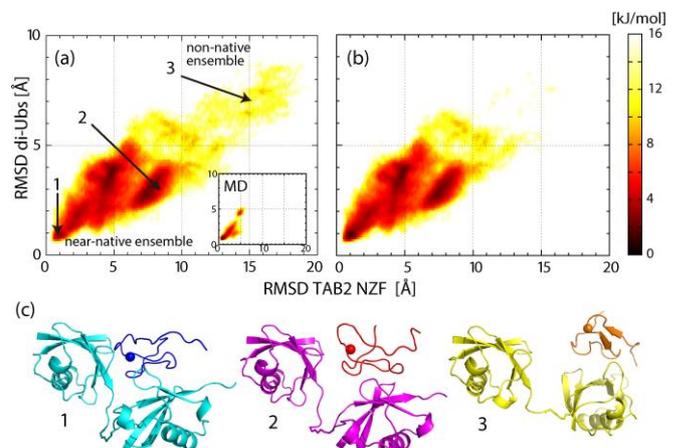


図 2. (a) MSES 法により計算された K63 ジュビキチン/TAB2 NZF 複合体の自由エネルギー地形。(b) TAB2 NZF が両方のユビキチンとコンタクトしたときの地形。(c) シミュレーションにより得られた 3 個の代表構造。

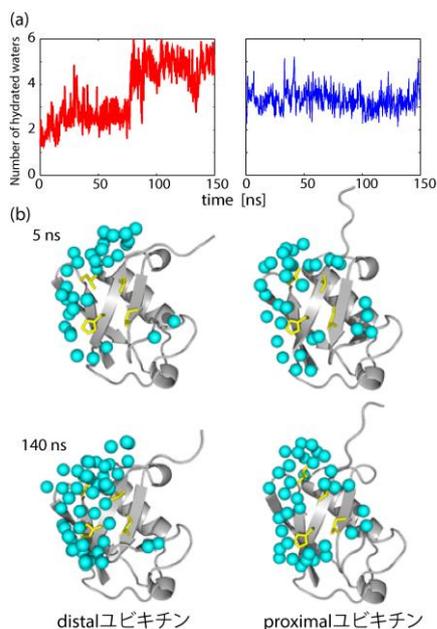


図 3. シミュレーションでの水和構造。(a) distal ユビキチン、及び proximal ユビキチンと TAB2 NZF 界面での水和水の数。(b) 5 ns/140ns での水和構造。

(2) ABC トランスポーターの最小自由エネルギー経路探索

ATP binding cassette (ABC) トランスポーターは、濃度勾配に逆らい細胞膜を通して、様々な基質（脂質、薬剤、イオン、ペプチドなど）を輸送する膜タンパク質である。多くの ABC トランスポーターについて、基質輸送につながる構造変化メカニズムが研究されてきたが、本研究では、様々な薬剤（多剤）を細胞外に排出する多剤排出 ABC トランスポーター ABCB1 を研究対象とした。inward facing および outward facing の 2 構造が結晶構造解析により解かれており、ATP 結合状態において inward facing から outward facing への大きな構造変化とカップルして薬剤が細胞内から外に輸送される。また、ある種の薬剤について薬剤濃度に対して ATP 活性の上昇を示す実験結果があり、薬剤相互作用により上記の構造変化が促進されると示唆される。

今年度の研究ではまず、ストリング法では難しい初期パス依存性に対処するため、inward facing から outward 構造をつなぐような非平衡シミュレーション (Targeted MD) を、パラメタを変えながら実行した。具体的には、ターゲットとなる構造を段階的に変える（全体か NBD ドメインのみかなど）ことで、異なるパスの生成を試みた (図 4)。そのときに薬剤（本研究では Rhodamine 6G を選択した）がうまく輸送されるかを観測した結果、NBD ドメインが閉じてから TMD ドメ

インが開くパスが最適であることを見出した (図 4)。

上記で最適であるとされたトラジェクトリをストリング法の初期パスとして、まず薬剤非結合状態についての最小自由エネルギー経路探索を実行した。得られた初期パス上で等間隔になるように 16 個のレプリカを選択し、10 ns にわたって十分に初期パス平衡化のシミュレーションを行った。十分にパス上の構造が緩和したことを確認後、2 次構造を形成する残基の C α 原子座標を反応座標(CVs)としてストリング法を 40 ns 実行し、構造変化パスの最適化を行った。最後に、MBAR によりパス上の自由エネルギーを計算し、ストリング法の収束の確認なども合わせて解析した。図 5(a)(b)は、40 ns のストリング法で ABCB1 構造変化パスが十分に収束し、自由エネルギー地形が最適化されたこと、また、自由エネルギー最小パス上に準安定な中間状態が存在することを示している。パス上に沿ってドメイン間距離などの解析を行った結果 (図 5c,d)、inward facing から中間状態に至る前半のパスでは膜貫通ドメイン、特に下部領域での開裂が起こるのに対し、後半の中間状態から outward facing へのパスでは、ATP が結合した核酸結合ドメインの相互作用がエネルギー障壁となっていることを示した。

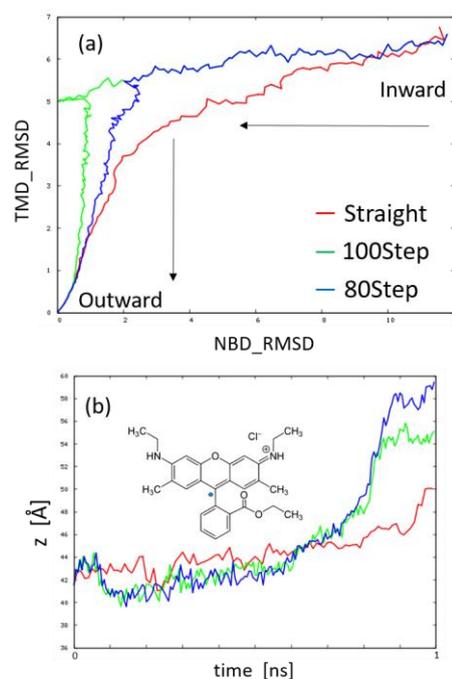


図 4: (a) ABCB1 の Targeted MD。NBD/TMD ドメインの RMSD (outward を 0 とした) でパスを描いた。(b) Rhodamine 6G の細胞外への輸送。赤は直接つないだパス、青と緑は NBD を閉じてから TMD を変化させたパス。

しかしながら、パスの更新や自由エネルギー地形、CVs 以外の側鎖運動の表現など、不十分な点が多々あることがわかり、共同研究者である計算科学機構 松永康佑 研究員らの助言を得て、パラメタの再調整を試みている最中である。現在、inward facing/outward facing 構造変化に最も寄与する CVs を限定しコピー数を 64 に増やした計算を投入しており、今年度には計算を終える予定である。

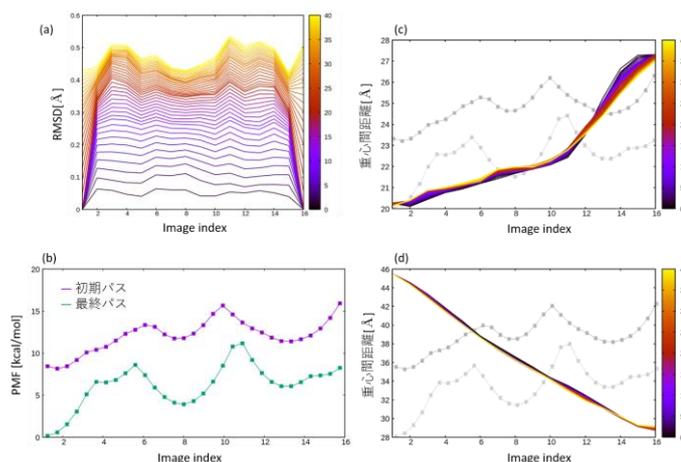


図 5 : ABCB1 のストリング法。(a) 初期パスからの RMSD。(b) 初期パスと最終パスの PMF。(c) TMD の重心間距離。(d) NBD の重心間距離。

(3) CYP の全原子構造探索

シトクロム P450(CYP) は薬剤を酸化することで水に溶けやすくし体外への排出を促す薬物代謝酵素である。基質特異性の低さから、薬剤またはその中間代謝物が薬物相互作用により CYP 機能を阻害し副作用を引き起こす可能性があり、そのため、創薬過程において CYP 阻害を判定する候補化合物のスクリーニングが必須になる。しかし現状では、10 数本の α ヘリックスから成る構造の柔らかさから、計算(インシリコ)での CYP 阻害効率の定量化が困難である。そこで、構造サンプリングにより、薬剤が結合しうる構造(薬剤結合モード)の網羅的な探索を目指した。

まず始めに、PDB にある様々な条件(薬剤結合・非結合、変異残基ある・なし、など)の CYP3A4 結晶構造(全 29 個)について、Motion Tree を作成する独自の手法により構造分類を行ったところ、4 本のヘリックス(F, F', G, I)が薬剤相互作用により構造変化し、薬剤非結合構造と微妙に異なる構造になることを見出した(図 6)。

さらに、9 個の初期構造を選択し、12 μ s の長時間 MD シミュレーション(計 108 μ s)を実行した。しかしながら、マルコフ状態モデルで解析を試みたところ、2 つの構造グループ間の遷移が現状ではまだ不十分であることが分かった。そ

ここで、状態遷移に関わる構造のリサンプリング(adaptive sampling)を現在行っている最中であり、来年度にかけて計算および解析を継続して完遂する予定である。

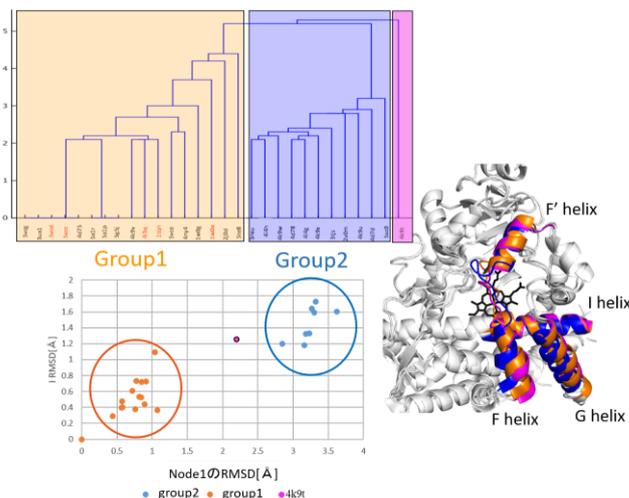


図 6 : CYP3A4 結晶構造の分類。4 本のヘリックスの微妙な構造の違いにより 2 つのグループに分けられる。

4. まとめと今後の計画・展望

次世代生命体統合シミュレーション研究開発プログラムの一環としてマルチコピー・マルチスケール分子動力学シミュレーションのためのクラスライブラリ μ^2 lib を用いた MSES 法とストリング法の応用研究を行った。系の自由度に応じて構造・構造変化パスの探索に必要なシミュレーション時間は指数関数的に増大するが、新規アルゴリズムとマルチコピー・マルチスケール手法の組み合わせにより初めて可能になったシミュレーション成果であるといえる。

ジユビキチン/TAB2 NZF 複合体の研究では、ポリユビキチン鎖の多様なリンケージにより、様々なユビキチン結合ドメインをダイナミックに認識することで特異性を実現する分子機構を見出した。今後は、K63 ジユビキチン/TAB2 NZF ドメイン複合体の研究をより発展させ、K63 と linear が混合した、細胞機能に近いリンケージを持つテトラユビキチンに UBD がダイナミックに結合する過程のシミュレーションに取り組みたい。

ABC トランスポーターのストリング法と CYP の全原子構造探索については、BW-MPC の大規模計算資源を効率的に用いることにより、来年度も計算を継続して進めていきたい。実験との関連性についても検討し、結果を早めに論文にまとめる予定である。

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. Hiroshi Fujisaki, Kei Moritsugu, Ayori Mitsutake, and Hiromichi Suetani, "Conformational change of a biomolecule studied by the weighted ensemble method: Use of the diffusion map method to extract reaction coordinates", Journal of Chemical Physics (2018) 149: 134112.
2. Hiroshi Fujisaki, Kei Moritsugu and Yasuhiro Matsunaga, "Exploring configuration space and path space of biomolecules using enhanced sampling techniques: Searching for mechanism and kinetics of biomolecular functions", International Journal of Molecular Sciences (2018) 19: 3177.
3. Kei Moritsugu, Hafumi Nishi, Keiichi Inariyama, Masanori Kobayashi and Akinori Kidera, "Dynamic recognition and linkage specificity in K63 di-ubiquitin and TAB2 NZF domain complex", Scientific Reports, (2018) 8: 16478.

【口頭発表】

4. Kei Moritsugu
"Multiscale enhanced sampling of glucokinase: Regulation of the enzymatic reaction via a large scale domain motion"
From Computational Biophysics to Systems Biology (CBSB 2018)、中国、2018 年 5 月
5. Kei Moritsugu, Tohru Terada, Ryuji Ishida and Akinori Kidera
"Multicopy/multiscale simulations and their applications using massive computing"
第 55 回生物物理学会年会、岡山、2018 年 9 月
6. 森次 圭
「MSES 法によるタンパク質の網羅的構造探索」
レア・イベントの計算科学 第 2 回ワークショップ、筑波、2018 年 12 月

【ポスター発表】

7. Kei Moritsugu, Tohru Terada, Yoshihiko Nishino, Akinori Kidera
"ENHANCED SAMPLING, KINETIC CALCULATION AND STRUCTURAL DATABASE ANALYSIS AIMING AT COMPUTATIONAL DRUG DESIGN"
63th Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore (USA)、2019 年 3 月 (予定)