

課題名(タイトル): 計算化学的手法による生体高分子の機能理解と機能制御分子に関する研究

利用者氏名:

○平野 秀典(1)、沖本 憲明(1)、大塚 教雄(1)、小松 輝久(1)、齋藤 大明(1)、大野 洋介(1)、佐藤 竜馬(1)、Elvira Tarasova(1)

理研における所属研究室名:

1. 計算分子設計研究チーム

## 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

タンパク質に代表される生体高分子は、生命活動において非常に重要な役割を果たしている。これは、多くの病気の発症が、生体高分子の機能異常に強く関係しているということからもよくわかる。近年、構造生物学の技術進歩により、疾病に関わる生体高分子の立体構造が解明されてきているが、生体高分子の機能発現の理解には、特定の立体構造情報だけでなく、その構造ダイナミクス（構造変化）情報が重要となる。

分子動力学計算などの計算機シミュレーションは、生体高分子の構造ダイナミクスを理解するための非常に有効な計算法であり、高解像度かつ高時間分解能での分子の振る舞いを解析することができる。また、生体高分子に相互作用しその機能を制御する分子（例えば、薬物分子や機能性分子等）の設計においても、計算機シミュレーションは重要視され、その実用に耐えうる技術の開発は喫緊の課題となっている。

これまで、当研究グループでは、分子動力学計算や量子力学計算を活用して、生体高分子の機能・構造・ダイナミクスや機能制御分子設計の研究を行ってきた。本研究課題では、次の2つの研究テーマについて研究を行う。

(1). 生体高分子の構造ダイナミクスの調査を行い、その機能・構造・ダイナミクスの関係性を研究する。

(2).(1)で得られた情報を活用し、生体高分子の機能を制御する分子を設計するための研究を行う。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究の目的は、(1)生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの関係性と、(2)その機能を制御する分子の設計である。この目的達成のために、以下の2つの項目に基づいて研究をすすめていく。

## (1)生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの関係性の研究

制御分子の設計には、対象となる標的生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの関係性の理解をする必要があり、様々な分子シミュレーション手法を使ってその特徴を抽出することを試みる。

### (1-a) 薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) に対する薬物代謝に関する研究 (沖本、齋藤、大塚)

薬物代謝酵素シトクロム P450(CYP)は、その薬物結合ポケットの深部にヘム分子を含み、薬物がこのポケット内に侵入後、代謝反応を引き起こす。これら CYP のポケット構造は柔軟性を有することから、薬物結合にはタンパク質構造変化を適切に考慮する必要がある。更に、結合した薬物がヘム分子と相互作用を開始し、共有結合の形成および切断を伴う化学反応により薬物代謝が生じることから、その電子状態を考慮した反応性を検討することが重要である。これらを理解するため、(I) 分子動力学計算による CYP のタンパクの構造ダイナミクスの調査、(II) 分子ドッキング計算を用いた薬物の活性部位（ヘム）への結合ポーズの予測、(III) 量子化学計算を用いた CYP による薬物の代謝反応の調査、を実施する。

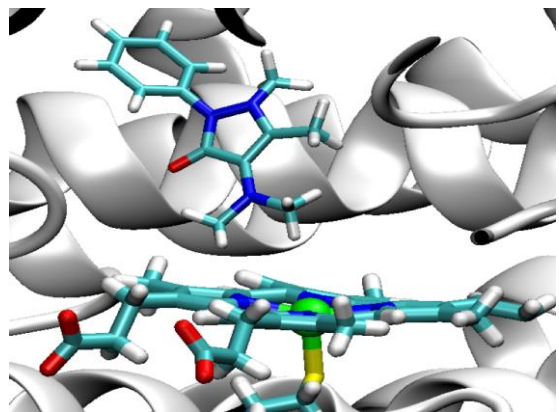


図1. 分子ドッキングによって得られた CYP1A2 活性部位における薬物の結合ポーズ

**(1-b) タンパク質の分子認識機構に関する研究** (佐藤、沖本、平野、Tarasova)

創薬標的タンパク質とリガンド分子間の相互作用を詳細に理解するために、分子動力学計算を用いて相互作用の調査を試みる。実験的に得られているタンパク質とリガンド分子（薬物分子など）の X 線結晶構造をもとに分子動力学計算を行い、リガンド分子の結合ポケットの柔軟性、タンパク質 - リガンド分子間の相互作用等を調査する。また、分子動力学計算から得られた構造ダイナミクス情報をもとに、標的タンパク質の薬物設計における新たな相互作用点の検出に向けて調査を行う。本年度は、細胞ストレス応答に関与する IRE1 $\alpha$  の機能理解と基質との相互作用の解明を目的とした分子動力学計算を実施する。特に、IRE1 $\alpha$  の多様な実験的構造とその RNase 活性の関係性を理解するため、RNase 活性をもつと考えられるダイマー構造 (back-to-back 型: 図 2) を中心にして、その構造ダイナミクスの調査を継続する。また、ダイマー構造以外 (モノマー構造やオリゴマー構造) での機能やダイナミクスについても調査を行い、比較検討を試みる。

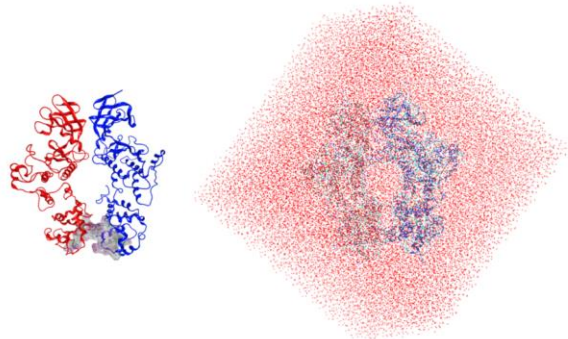


図 2. 左: 分子動力学計算に適用する IRE1 $\alpha$ ダイマー構造 (back-to-back 型)。分子表面表示は RNase 活性中心を示す。右: 分子動力学計算のモデル。水分子を含めて約 10 万原子の系

**(1-c) 生体膜の動的構造と機能解明に関する研究** (齋藤)

生体膜は脂質分子の種類やその混合割合によって、膜タンパク質の膜内安定性や分子・イオン透過性も大きく変化することが知られている。例えば、シグナル伝達に関与するタンパク質は、コレステロールリッチなマイクロドメイン (ラフト) に集積することでその機能を効率的に発現することが知られている。このことから生体膜等の機能解明には、膜タンパク質だけではなく脂質分子やコレステロールも含めた原子レベル

での動的構造や分子間相互作用特性の理解が重要となる。そこで本研究課題では、多成分の脂質 2 重層膜の分子動力学計算を実行し、膜内における重要分子の動的構造の解明を行う。さらに、膜内分子の動的構造と機能の解明を目的のための自由エネルギー計算を実行する。

**(2) 生体高分子の機能を制御する分子設計研究**

標的分子の特徴抽出後、これらのデータを基に機能制御分子の設計を行う。これには、分子ドッキング、分子動力学計算、量子化学(QM)計算を組み合わせる研究を行う。

**(2-a) 化合物スクリーニングのための分子ドッキング手法の開発** (平野)

分子ドッキングは創薬標的タンパク質に結合する低分子化合物を大規模な化合物ライブラリから探索するために用いられている。しかし、生体内のタンパク質は、そのポケット構造が柔軟で、低分子化合物を結合する際に、結合ポケット周辺構造が大きく変化するのが少なくない。このようなタンパク質については、複数のタンパク質構造を考慮した分子ドッキングによりスクリーニング性能が向上すると考えられる。本研究では、分子動力学計算により効率的に構造サンプリングを行い、その後ドッキングを行うという方法を用いて分子スクリーニング性能の向上を図る。

**(2-b) 分子動力学計算による結合親和性予測手法の開発** (小松、大野)

タンパク質・リガンド複合系における結合親和性計算をより精密に行うための指針を得る目的で、ベンチマークとなるタンパク質・リガンド複合系を用いた長時間分子動力学計算を行う。特に、タンパク質の遅い時間スケールでの運動の影響を吟味するために、これまでよりも長時間の分子動力学計算を実行するために必要な手法や親和性評価手法の開発、性能評価、改善を目指す。

**(2-c) 量子化学計算による結合親和性予測手法の開発** (大塚)

結合親和性予測法の 1 技術として、QM/MM 法を用いた電子状態計算による薬物分子とタンパク質ポケット構造の構造緩和計算を実施する。具体的な系は特許関連のため詳細には述べられないが、系全体として 3300~3500 原子系を考えている。

また、GAMESS プログラム内のフラグメント分子軌

道計算の効率的な並列計算の実行可能性調査を行い、問題点が明らかになれば、結合エネルギー計算を実施する。

### (2-d)機能性分子の特性評価と計算分子設計に関する研究 (大塚)

計算に基づいた分子設計の応用として、ナフタルイミド誘導体の系(参考論文 9)とチアゾール誘導体の系(特許関連のため構造詳細は述べる事ができない)の基底状態と光励起状態に関する計算を実施する。具体的には、ナフタルイミド誘導体の系では、ある分子との相互作用系におけるポテンシャルエネルギー曲面を求める。一方、チアゾール誘導体の系では、励起状態におけるポテンシャルエネルギー曲面を求める。

## 3. 結果

### (1)生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの関係性の研究

#### (1-a) 薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) に対する薬物代謝に関する研究 (沖本、齋藤、大塚)

##### (I) 分子動力学計算による CYP のタンパクの構造ダイナミクスの調査および (II) 分子ドッキング計算を用いた薬物の活性部位 (ヘム) への結合ポーズの予測

今年度は、CYP 種の 1 つである CYP3A4 についての薬物代謝に関する機能理解のための研究を実施した。CYP3A4 は多様な化合物を認識する柔軟な結合ポケット構造を有する。そこで本年度は CYP3A4 と化合物が結合した共結晶構造を数種類用意し、各々  $5\mu\text{s}$  程度の分子動力学計算を実施した。これら長時間の MD 計算結果から結合ポケットの形状が多様に変化していく様子を観察することができた。ここで得られた構造を使ってどのような薬物が結合するのかを評価を行っている(図 3 参照)。

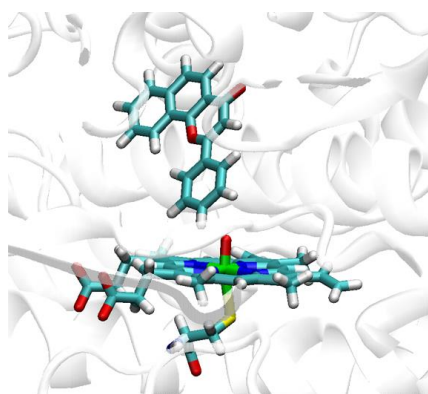


図 3. 分子ドッキングシミュレーションによって得られた CYP 活性部位における薬物の結合ポーズ。

### (III) 量子化学計算を用いた CYP による薬物の代謝反応の調査 (大塚)

今年度は、CYP による薬物の代謝反応に関して、量子化学計算から薬物分子の化学反応性について計算を行った。具体的には、福井関数法を用いて薬物分子内の各原子における反応性指標値を算出し、その指標値と実験的に分かっている代謝反応が起こる原子部位 (SOM) との比較を行い、計算による反応性指標値の有効性を議論した。また、反応性指標値を 6 つの population analysis 法からそれぞれ算出し、その数値変動のアセスメントも行った。結果の 1 例として、7-ethoxycoumarin の各原子の反応性指標を図 4 に示す。この分子の SOM は、原子 ID: 11 の炭素であるが、福井関数法による反応性指標値は非常に小さい値となった。すなわち、この分子の SOM は、分子内では化学反応性としては低く比較的安定な原子であるといえる。実験では、CYP により代謝反応が起こる原子であることから、理論計算からの反応性とは矛盾するような興味深い結果となった。他の薬物分子に対しても、CYP のある反応条件下では同様な結果が得られる事が分かった。

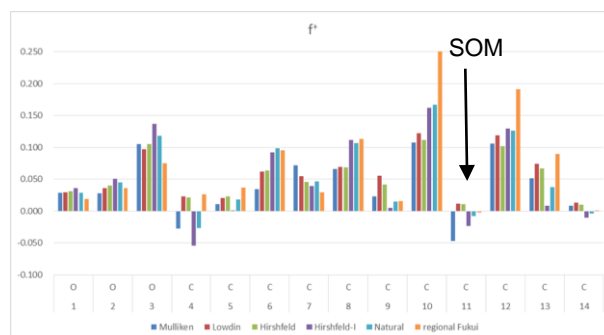


図 4. 7-ethoxycoumarin における福井関数法による反応性指標値。各原子の反応性指標値は、6 つの population analysis 法から求められている。SOM は、原子 ID: 11 の炭素原子。

#### (1-b) 創薬ターゲットタンパク質の分子認識機構に関する研究 (佐藤、沖本、平野)

IRE1 $\alpha$  に対する分子動力学計算を実行している。今年度は、3 つの Ser のリン酸化状態がタンパク質の構造ダイナミクスへ与える影響を調査するために、X 線結晶構造(PDB entry: 4YZC)をもとに作成した Ser リン酸化と非リン酸化状態の back-to-back アポ体二量体構造モデルを用いて  $1\mu\text{s}$  の分子動力学計算を複数実行し、全体構造の比較をおこなった。その結果、結晶構造の主鎖との構造のずれ(RMSD)は同程

度(約 2Å)であった(図 5)が、キナーゼドメインは局所的に異なる傾向が見られた。現在、詳細について調査を行っている。

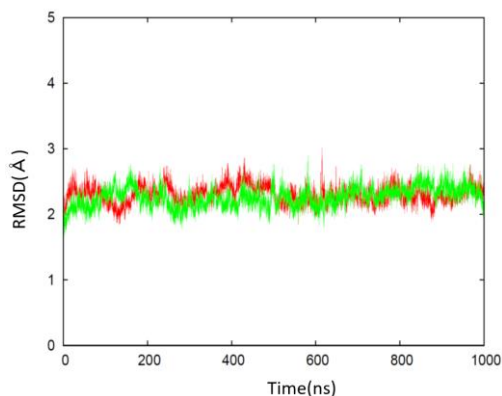


図 5. IRE1 $\alpha$  の二量体に対する RMSD。赤線は脱リン酸化状態、緑線はリン酸化状態を表す。

さらに今年度は、単量体から二量体化に向かう際の知見を得るために、IRE1 $\alpha$  の単量体に対する分子動力学計算も実行した。はじめに IRE1 $\alpha$  の二量体の X 線結晶構造 (PDB ID: 4YZC) から単量体を抜き出し、リガンドは Staurosporine(STS)が結合した状態を初期構造とし水溶液内での計算を実行した。1 $\mu$ s の分子動力学計算を複数実行し、二量体と同様にして RMSD を算出した。その結果、タンパク質の RMSD は 2.0Å 程度であることがわかった。今回の計算において二量体と同様の構造が得られた。

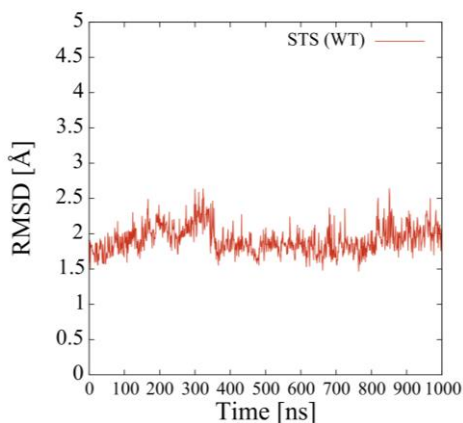


図 6. IRE1 $\alpha$  の単量体に対する RMSD。

### (1-c) 生体膜の動的構造と機能解明に関する研究 (齋藤)

本研究では、多成分の脂質 2 重層膜の分子動力学計算を実行し、膜内における重要分子の動的構造の解明を行う。今年度は、コレステロール、セラミド、ジアセルグリセロール、スフィンゴミエリンを含んだ POPC 混合脂質膜の分子動力学シミュレーションを実

行し、これら混合脂質膜の構造・ダイナミクスの詳細を解析した。MD の詳細な構造解析の結果、全ての系において分子添加により膜面積が減少し、膜厚が増加する結果が得られた。さらに、これら混合脂質膜における脂質分子の膜厚方向に対する自由エネルギー曲線を評価し、脂質の flip-flop や膜からの離脱(desorption)過程における分子添加の効果について検証した。計算結果の詳細な比較の結果、添加する分子種と濃度によって、flip-flop の自由エネルギー特性が大きく変化する結果を得た。これは分子添加により、膜内パッキングが十分に変わったことが一因と考えられる。

### (2)生体高分子の機能を制御する分子設計研究

#### (2-a) 化合物スクリーニングのための分子ドッキング手法の開発(平野)

今年度は、古典力学計算や量子化学計算を活用した創薬研究を行うための準備研究として、分子動力学(MD)計算と分子ドッキング法を使用した Tankyrase2 の薬物結合ポケットについての調査を行った。X 線結晶解析構造の調査から、Tankyrase2 の薬物結合ポケットは、主にニコチン部位とアデノシン部位の二箇所から構成され、薬物との結合様式は、ニコチン部位からアデノシン部位にわたって結合しているものや、ニコチン部位のみに結合しアデノシン部位は塞がった状態になっているものがあることが分かった。Tankyrase2 のアポ体や後者の薬物(例:XAV939)が結合した構造(両者ともアデノシン部位が塞がっている)を使用して分子ドッキングを行うと、ニコチン部位からアデノシン部位に結合する薬物(olaparib 等)を検出することは困難である。このような状況を想定し、本研究では、アポ体や後者の薬物(XAV939)が結合した複合体 X 線結晶解析構造に対して MD 計算を実行し、その構造変化の様子を観察した。現在までの結果、アポ体のシミュレーションでは創薬研究において有効と考えられるポケット構造は見出せなかったが、ニコチン部位を占有するホロ体では、短時間ではあるがアデノシン部位が出現することを確認した。また、このようなシミュレーションで生成されたポケット構造に対して分子ドッキングを行うと、olaparib が複合体 X 線結晶構造の結合ポーズを再現することも確認した。今後、より詳細にポケット構造の特徴を調査し、分子ドッキング法によるスクリーニングの実効性を調査する予定である。

## (2-b) 分子動力学計算による結合親和性予測手法の開発(小松、大野)

今年度は、水溶液中の薬物-タンパク質複合体の長時間分子動力学計算を実現するためのテスト系を設定し、予備的計算を行った。また、5 1 2 コア規模の並列計算において、長距離相互作用を効率よく計算するための手法検討を行い、CPPMD 等のコードを用いた予備的計算を行った。

## (2-c) 量子化学計算による結合親和性予測手法の開発(大塚)

結合親和性予測法の 1 技術として、電子状態計算によるタンパク質ポケット構造と薬物分子の構造緩和効果を検討した。今年度は、計算精度と計算効率の条件基準を明確にするため、これまで用いてきた古典力場 (MM) による緩和構造を出発構造として、タンパク質ポケット構造内にある薬物分子のみの構造緩和計算を実施し、結合エネルギーの変化を調べた。具体的には、我々が確立してきたテスト系、FKBP とそのリガンド分子 (10 分子) 系に対して、フラグメント分子軌道法 (FMO) 計算による構造緩和計算 (FMO-FDD) をリガンド分子のみに実施した。図 2 にその結果を示す。青丸は、MM 構造緩和による結合エネルギーの結果、茶三角は、我々が以前確立した多階層 FMO 計算による結合エネルギーの結果、緑四角が今回計算した FMO-FDD 計算によるリガンドのみ構造緩和した結合エネルギーの結果である。リガンドのみを構造緩和する事により、結合エネルギーの相関係数が上がる事が分かった。これは、リガンド分子構造がよりタンパク質ポケット構造に適合したと考える事ができる。

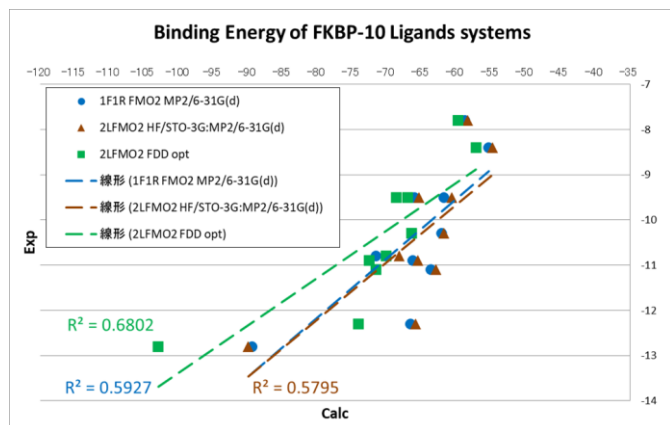


図 7. FKBP とそのリガンド分子 (10 分子) 系の結合エネルギーの実験値と計算値の相関。

## (2-d) 機能性分子の特性評価と計算分子設計に関する研究 (大塚)

今年度は、理論計算に基づいた分子設計の応用として、ナフタルイミド誘導体の系とチアゾール誘導体の系 (いずれも特許関連のため構造詳細は述べる事ができない) の基底状態と光励起状態に関する計算を実施した。具体的には、ナフタルイミド誘導体の系では、ある分子との相互作用系におけるポテンシャルエネルギー曲面を求めた。また、チアゾール誘導体の系では、励起状態におけるポテンシャルエネルギー曲面を求めた。

### 4. まとめ

本研究は「生体高分子機能を制御する分子の設計」を目標に、

- 生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの理解
- 標的分子を制御する分子の設計

について研究を行い、それぞれの成果について学術誌、国内外の会議等で発表を行ってきた。現在解析中の結果も含め、継続した研究を行う予定である。

### 5. 今後の計画・展望

タンパク質の機能解析や制御分子の設計は、生物や医薬の分野において大きな影響を与える。制御分子設計では、効率的な構造サンプリング法と精密な結合自由エネルギー計算法の開発を目指す研究を行った。ここで開発された技術は実際の創薬現場の作業効率を大幅に改善すると考えられる。また、前述の技術は、タンパク質-タンパク質間の相互作用にも応用できることから、システムバイオロジーの分野においても大きく貢献することが期待される。

## 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. Yousuke Takaoka, Mana Iwahashi, Andrea Chini, Hiroaki Saito, Yasuhiro Ishimaru, Syusuke Egoshi, Nobuki Kato, Maho Tanaka, Khurram Bashir, Motoaki Seki, Roberto Solano, Minoru Ueda, “A rationally designed JAZ subtype-selective agonist of jasmonate perception”, *Nature Communications* 9. 3654 (2018) doi: 10.1038/s41467-018-06135-y.
2. Hiroyuki Nakao, Chihiro Hayashi, Keisuke Ikeda, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Minoru Nakano, “Effects of Hydrophilic Residues and Hydrophobic Length on Flip-Flop Promotion by Transmembrane Peptides”, *J. Phys. Chem. B* 2018, 122, 4318–4324, DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b00298

### 【会議の予稿集】

1. Hiroaki Saito, Tetsuya Morishita, Taku Mizukami, Ken-ichi Nishiyama, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, “Molecular dynamics study of binary POPC bilayers: molecular condensing effects on membrane structure and dynamics ” , IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 1136 (2018) 012022 doi:10.1088/1742-6596/1136/1/012022.

### 【口頭発表】

1. Takao Otsuka, “Order-N first-principles DFT calculations for large-scale biomolecular systems: Application to DNA system”, The 37th JSST Annual International Conference on Simulation Technology (JSST2018), September 18–20, 2018, Muroran Institute of Technology, Muroran, Hokkaido. (依頼講演)
2. 齋藤大明, 大塚教雄, 沖本憲明, 泰地真弘人, “分子シミュレーションを用いたシトクロム P450(CYP)に対する薬物代謝部位予測”, 第12回分子科学討論会、2018年9月10日(月)～13日(木)、福岡国際会議場.

### 【ポスター発表】

1. Takao Otsuka, Noriaki Okimoto, Hiroaki Saito, Makoto Taiji, “Quantum chemical analysis of reaction indices and reaction path for drug molecules”, XXX IUPAP Conference on Computational Physics 2018 (CCP2018), July 29–August 2, 2018, Univ. of California, Davis, USA.
2. Takao Otsuka, Noriaki Okimoto, Makoto Taiji, “Geometry Optimization Effect of Ligand on Protein-Ligand Binding Energy Calculation Using Fragment Molecular Orbital Method”, CBI学会 2018年大会, 10月9日-11日, 船堀, 東京.
3. Hiroaki Saito, Tetsuya Morishita, Taku Mizukami, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao “Molecular dynamics study on the free energy profiles of lipid translocation across binary POPC bilayer mixtures”, XXX IUPAP Conference on Computational Physics 2018 (CCP2018), July 29–August 2, 2018, Univ. of California, Davis, USA.
4. Hiroaki Saito, Tetsuya Morishita, Taku Mizukami, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, “Free energy profiles of lipid translocation across binary POPC bilayer mixtures: a molecular dynamics study”, Joint Conference of EMLG/JMLG Annual Meeting 2018 and 41st Symposium on Solution Chemistry of Japan “Understanding of Molecular Liquids and Its Extension to New Fields” 4 – 8 November 2018, Nagoya University, Nagoya, Japan
5. Hiroaki Saito, Takao Otsuka, Noriaki Okimoto, Makoto Taiji, “Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling: 11. Prediction of sites of drug metabolism by CYP3A4 by molecular simulation”, CBI学会 2018年大会, 10月9日-11日, 船堀, 東京.
6. 齋藤大明, 森下徹也, 水上卓, 川口一朋, 長尾秀実, “混合脂質膜における脂質分子の膜透過・離脱に関する自由エネルギー曲線”, 第 32 回分子シミュレーション討論会, 2018年11月28日(水)- 2018年11月30日(金), 産業技術総合研究所.
7. Hiroaki Saito, Naoki Kanoh, “Dynamical structure and thermal stability of polyene macrolactam heronamide C and A in lipid bilayer: a molecular dynamics study”, The 1st International Symposium on Chemical Communication (ISCC2019), January 9<sup>th</sup>, 2019, Hitotsubashi University.

**【その他(著書、プレスリリースなど)】**

プレスリリース：東北大学大学院理学研究科，東北大学大学院生命科学研究科，理化学研究所，植物の病原菌感染を防ぐ画期的な植物免疫強化剤を開発 ～植物免疫の歴史的難問「生長と防御のトレードオフ」を解決～，平成30年9月18日，  
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/09/press-20180918-ueda.html>