

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 ([http://www.csrp.riken.jp/application\\_m\\_j.html](http://www.csrp.riken.jp/application_m_j.html) のサイトで公開、コード名:  $\mu^2\text{lib}$ ) 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。これらを実現するため、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 複合体やジユビキチン-基質複合体などのタンパク質間相互作用、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(溶媒を陽に含んだ)大規模系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(埼玉大)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 などといった大規模生体分子系への応用研究を進めている。

## 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 ( $\mu^2\text{lib}$ ) の開発を行った。 $\mu^2\text{lib}$  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た 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) EGFR 結晶構造の網羅的構造探索

プロテインキナーゼは基質タンパク質をリン酸化しシグナル伝達や代謝の調節因子として働く。その作用機構は、キナーゼの活性型・不活性型間の構造変化を自己リン酸化や基質結合により高度に制御する分子機序に基づいている。そのようなダイナミックな過程を理解するため、本研究では実験・計算などで研究が進んでいる上皮成長因子受容体(EGFR)キナーゼを研究対象として取り上げ、PDB の構造データベースにある全 207 個のキナーゼドメイン結晶構造を網羅的に分類した。更に、分子動力学シミュレーションによるダイナミクス計算も付加し、結晶化による artifact と切り分けながら、活性化に関わる構造変化を解析した。

名古屋大学・小池氏と共同で開発した Motion Tree (PLoS ONE, 2015) による動的ドメイン決定法を用いた構造バイオインフォマティクス手法を適用することで、結晶空間において Activation loop や  $\alpha\text{C-helix}$  といった活性に重要なローカル部位だけでなく、N-/C-ローブ間のドメイン運動が大きな寄与を占めること、また、結晶形やローブ間運動の違いにより結晶構造を計 10 個のグループに分類できることを見出した (図 1 上)。また、結晶形によりドメイン配置が規定された結果として Activation loop や  $\alpha\text{C-helix}$  といったローカルな機能部位の構造がアロステリックに決まることを示した。

さらに MSES 法によるモノマーでの溶液中の構造探索や 2 量体での長時間 MD を行うことで、モノマーでは不活性型が安定であること、非対称な二量体を形成することで活性型構造を安定化するという、EGFR 二量体化による活性制御の仕組みを明らかにした (図 1 下)。

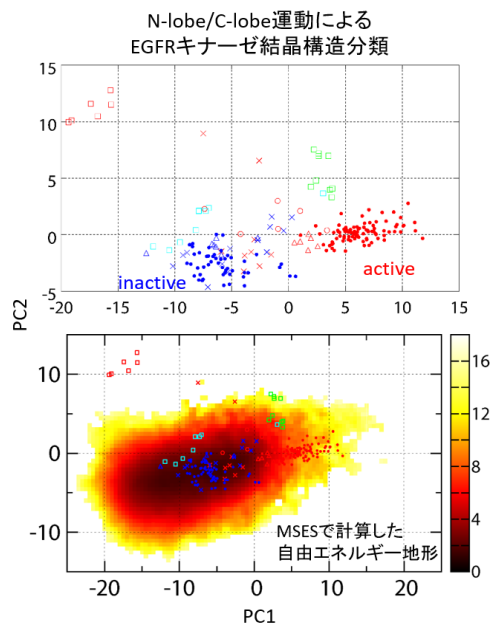


図 1. ローブ間ドメイン運動による EGFR キナーゼドメイン結晶構造の網羅的分類と MSES で計算したモノマー自由エネルギー地形。

### (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 (Rhodamine 6G) 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、ストリング法を適用するうえで問題点である、「最適化すべき初期パスをどう設定するか」、に取り組んだ。inward facing と outward

facing 構造をつなぐような非平衡シミュレーション (Targeted MD) を、ターゲットとなる構造 (全体か NBD ドメインのみかなど) や、ばね定数・シミュレーション時間などのパラメータを変えながら実行し、異なる初期パス生成をたくさん試みた。その結果として、NBD ドメインが閉じてから TMD ドメインが開くパスが (薬剤がうまく輸送されるかという点においても) 最適であること、また、両端でもリラックスした構造パスを効率的に得るため、inward facing と outward facing 構造両方から始めたパスをエネルギーの遷移状態付近でつなぎ合わせたパスがストリング法の初期パスとしては良さそうであることを見出した。

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、薬剤非結合状態および Rhodamine 6G が結合した状態について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 25 個のレプリカを選択し、30 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した後、2 次構造を形成する残基の C $\alpha$ 原子座標 (234 個) を反応座標 (CVs) としてストリング法を 30 ns (100 ps x 300 iterations) 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地形を計算した。

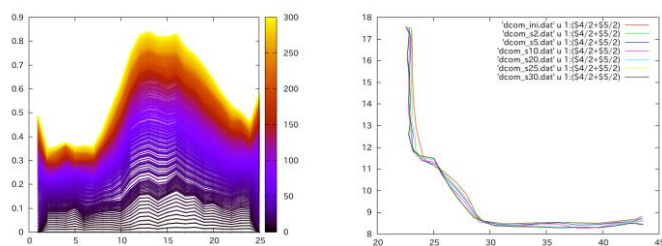


図 2. 薬剤非結合状態での ABCB1 ストリング法。(左) 初期パスからの RMSD の時間変化。(右) 膜貫通ドメインと核酸結合ドメインの運動から見たパスの更新。

ストリング法により更新されたパスが初期パスからの程度動くかを、上下にある膜貫通ドメインと拡散結合ドメインの運動により観測した結果、30 ns のストリング法で ABCB1 構造変化パスが十分に収束することが分かった (図 2)。また、得られた自由エネルギー地形を薬剤あるなしで比較することにより、薬剤により 2 量体構造がゆるむことで遷移状態でのエネルギーバリアを小さくし、inward facing から outward facing への構造変化を促進することを示した (図 3)。詳細な構

造の解析を今後進め、薬剤輸送と共役した構造変化の詳細を解析する予定である。

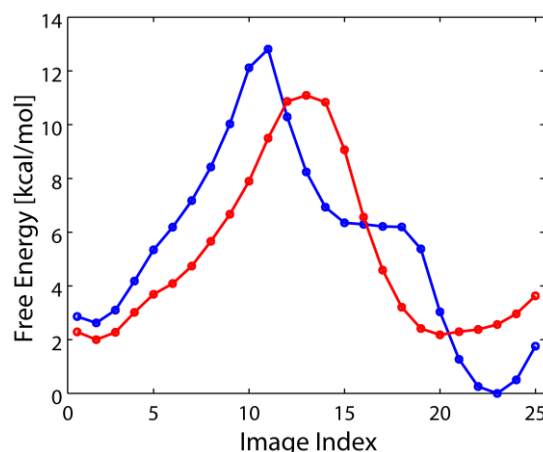


図 3. ABCB1 ストリング法により得られた薬剤非結合 (青)、Rhodamine 6G 結合 (赤) 状態での自由エネルギー地形。

### (3) IP<sub>3</sub> 受容体のアロステリックな作用機序のシミュレーション解析

イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体は膜タンパク質であり、ホモ 4 量体を形成してカルシウムイオンチャネルとして働く。細胞内のカルシウム貯蔵庫である小胞体の膜上や筋小胞体に分布し、細胞外からの刺激に応じて細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度を調整にするカルシウムシグナリングに関与する。C 末端は膜貫通領域でありチャネル孔を形成するのに対し、N 末端にはそのチャネル孔の開閉を制御する制御領域が存在する。そこでは、IP<sub>3</sub>-binding core (IBC) の間に IP<sub>3</sub> が結合することで、サプレッサードメイン (SD) と呼ばれるドメインをアロステリックに動かし、イオンチャネルの動作を制御していると示唆される (図 4)。

そのような IP<sub>3</sub> 受容体 N 末端部位の作用機序を理解するため、IP<sub>3</sub> 結合・非結合状態において長時間 MD シミュレーションを多数実行し、IBC と SD のドメイン運動が IP<sub>3</sub> 結合によりどのように制御されるかを調べた。その結果、IP<sub>3</sub>

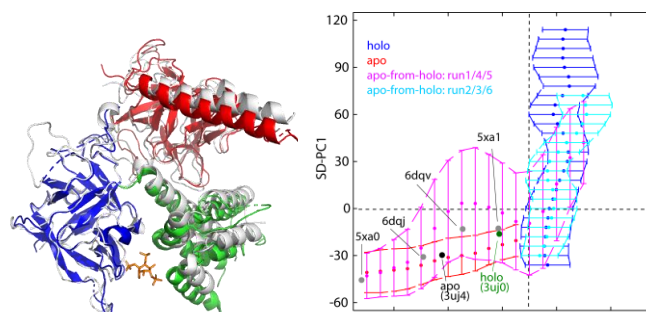


図 4. (左) IP<sub>3</sub> 受容体の立体構造。色付きの構造が IP<sub>3</sub> 結合型。(右) MD シミュレーションで計算されるドメイン配置。赤が IP<sub>3</sub> 非結合型。青が IP<sub>3</sub> 結合型。

が IBC ドメインの間に結合することで IBC を閉じた構造にし、その微妙な構造変化が遠く離れた SD ドメインを大きく閉じた構造にすること、また、そのようなシンプルな立体構造制御が、IP<sub>3</sub> 受容体の 4 量体形成によりはじめて可能になることを明らかにした。

#### 4. まとめ

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  $\mu^2\text{lib}$  を用いた MSES 法とストリング法の応用研究を行ってきた。生体分子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を組み合わせることにより実現可能にするというプロジェクトの目標を達成し、数多くの研究成果を実現することができたといえる。

最後になりましたが、長年にわたり HOKUSAI の大規模計算資源を利用させていただき、深く感謝いたします。

2019 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. Kei Moritsugu, Tsubasa Ito and Akinori Kidera, "Allosteric response to ligand binding: Molecular dynamics study of the N-terminal domains in IP<sub>3</sub> receptor ", Biophysics and Physicobiology (2019) 16: 232-239.

【口頭発表】

2. Akinori Kidera, Yoshihiko Nishino and Kei Moritsugu  
"Inter-lobe motion of EGFR kinase: Determinants of structural variation in the crystal structures"  
CBI 学会 2019 年大会、東京、2019 年 10 月
3. 森次 圭、山本 典史、米澤 康滋、楯 真一、藤崎 弘士  
「重み付きアンサンブル法による Pin1 異性化のパスサンプリング」  
日本物理学会第 75 回年次大会、名古屋、2020 年 3 月（予定）

【ポスター発表】

4. Kei Moritsugu, Yoshihiko Nishino and Akinori Kidera  
"Inter-lobe motion of EGFR kinase: Determinants of structural variation in the crystal structures"  
CBI 学会 2019 年大会、東京、2019 年 10 月
5. Kei Moritsugu, Yoshihiko Nishino and Akinori Kidera  
"Inter-lobe motions allosterically regulate the function of EGFR kinase: Comparative study of crystal structures and molecular simulations"  
64th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Diego (USA)、2020 年 2 月（予定）