

課題名(タイトル):

混雑環境におけるタンパク質—タンパク質相互作用とリガンド結合の分子動力学シミュレーション

利用者氏名:

○笠原 健人(1), 尾嶋 拓(1), 李 秀栄(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

タンパク質への基質の結合過程は最も基礎的な化学過程の1つである。その代表例として、シグナル伝達が挙げられる。この過程は、標的タンパク質への ATP や GTP といった基質分子の結合・反応によって進行する。リガンドの結合によるタンパク質の化学反応・構造変化の情報が他のタンパク質にシグナルとして順次伝わっていき、細胞増殖などの細胞・組織スケールの現象を発現する。癌化細胞の多くでは、シグナル伝達が異常進行し、過剰な細胞増殖や腫瘍形成に至る。このような異常なシグナル伝達を阻害する薬剤分子(リガンド)の開発がこれまで精力的に行われている。しかし、希薄溶液環境(Dilute)で設計された薬剤候補分子はしばしば細胞環境中で薬効を示さない。これは、標的タンパク質とその周囲の混雑タンパク質の間に働く相互作用(タンパク質—タンパク質相互作用)と混雑タンパク質—リガンド分子間の相互作用が影響していると考えられている。混雑環境のリガンド結合過程に対する効果のメカニズムを明らかにすることで、より合理的な薬剤分子設計指針の構築に貢献することが出来ると期待出来る。

申請者らは、これまでも分子動力学(MD)シミュレーション法を用いて、混雑環境下でのタンパク質とリガンド分子の動態について解析を行ってきたが、特定の混雑タンパク質濃度での計算しか行っていなかった。実際の細胞質は不均一であり、細胞内の位置によってタンパク質濃度は大きく異なる。従って、混雑環境効果の濃度変化に対する系統的な検証は重要である。また、このように複数の混雑環境の計算を効率よく行うためには、混雑環境モデルを構築する方法論やプログラムの整備も重要である。

本申請課題では、タンパク質—リガンド結合過程に

対するタンパク質混雑環境の影響を、様々な混雑タンパク濃度環境で解析した。また、粗視化 MD 計算を用いた大規模混雑環境モデルを構築するスキームの開発を行った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

(1) タンパク質混雑環境中におけるタンパク質—リガンド結合過程の MD シミュレーション

タンパク質表面における薬剤分子(リガンド)の局所濃度は、薬効において重要である。局所濃度が低い場合は、薬剤分子が薬効を示すために多量の投与が必要となる。混雑環境はタンパク質表面の環境を変化させ、リガンド分子の結合経路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系統的に解析するために、混雑具合が異なる混雑環境のリガンド結合過程の 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。

(2) 粗視化 MD 法を用いた大規模混雑環境のマルチスケールモデリング法の開発

混雑環境系の MD 計算を行うためには、多量のタンパク質などの生体高分子群の初期配置を用意する必要があるが、その際、生体高分子同士が互いに非物理的な重なりを持たないように配置しなければならない。我々が以前用いていたスキームは、(i) タンパク質をランダムに配置し、(ii) Monte-Carlo 法で重なりを解消するように高分子を並進・回転させる、というものであった。しかしこのスキームでは、細胞質のような大規模高濃度混雑環境では、重なりを取り除くのに膨大な回数のサンプリングが必要となり、完全には重なりがとれないことも多い。加えて、このようにして得られた初期配置は平衡状態からは遠く、MD 計算での平衡化を

長時間行う必要がある。本研究では、粗視化モデル MD (Coarse-Grained MD, CG-MD) 計算を用いた大規模混雑環境の構築スキーム及びプログラムを開発した。生体高分子を粗視化モデルで表現することで、系の構成要素数を 100 分の 1 まで減らすことが可能であり、大規模系であっても長時間スケールの MD 計算が可能である。これにより、非物理的な重なりを取りつつ系の平衡化が可能である。さらに、低濃度混雑環境のシミュレーションボックスを徐々に縮小しながら CG-MD 計算を行うことで、より高効率に高濃度混雑環境を構築出来るようにした。一連のスキームを、粒子系生物物理研究チーム (R-CCS) の Jeong Jung 博士, 小林千種博士, Cheng Tan 博士と協力し、大規模 MD 計算プログラム GENESIS に実装した。

3. 結果

(1) タンパク質混雑環境中におけるタンパク質-リガンド結合過程の MD シミュレーション

本研究では、c-Src キナーゼへの PP1 リガンド分子の結合過程のマイクロ秒スケールの MD 計算を行った。c-Src キナーゼは ATP が結合することで機能発現するタンパク質であり、PP1 分子は c-Src キナーゼの ATP 結合サイト(ネイティブ結合サイト)に結合して機能を阻害する。混雑タンパク質として bovine serum albumin (BSA)を用い、0 個(Dilute), 2 個(Src2BSA), 4 個(Src4BSA), 及び 8 個(Src8BSA) 含んだ系での計算を行った。また、それぞれの系でのタンパク質体積分率は 0%, 11%, 17%, 30%である。

Fig. 1(a)に c-Src キナーゼ周囲の PP1 の空間分布を示す。Dilute 条件では、ネイティブ結合サイトに対応するピークに加えて、多数のピークが現れており、これらは弱結合サイトに対応する。同様の結果は、サブミリ秒スケールの MD 計算を行っている Shan らの先行研究でも現れている[Y. Shan et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9181 (2011)]. タンパク質体積分率が高くなると、これらの弱結合サイトのピーク数は顕著に減少しているのが分かる。一方で、体積分率の増加に伴って、c-Src キナーゼの表面を覆う BSA の割合が増加している。従って、c-Src キナーゼと BSA の間のタンパク質-タンパク質相互作用によって、弱結合サイトが立体障害的に塞がれたことが、混雑化に伴うピーク減少の原因であると考えられる。また、c-Src 表面での PP1 の存在確率を求めると、Dilute, Src2BSA, Src4BSA, Src8BSA でそれぞれ 26%, 20%, 13%, 8%であり、混雑環境による薬効低下を示唆し

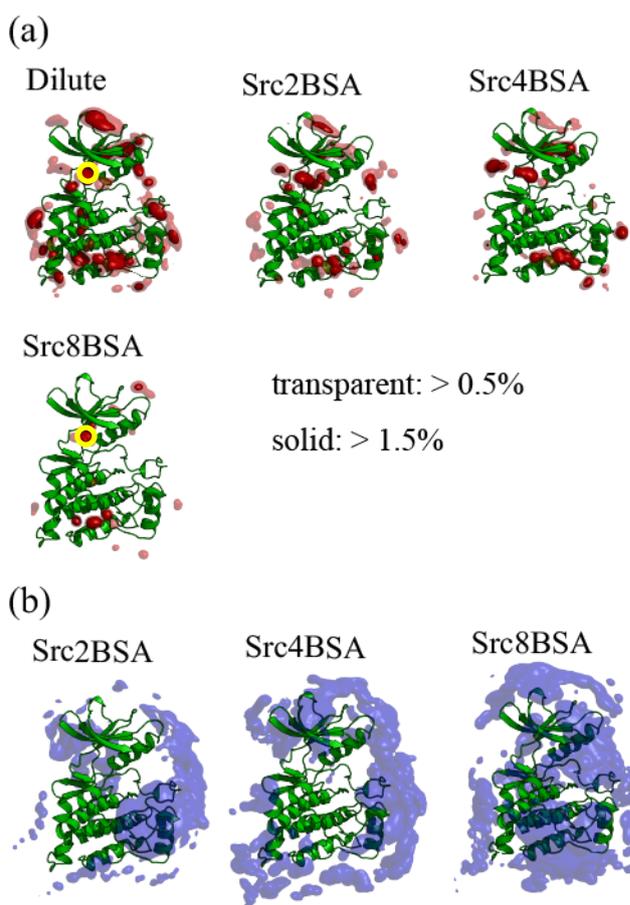


Figure 1: (a) c-Src キナーゼ周囲の PP1 分子分布。黄色の丸は ATP 結合サイトの位置を表している。 (b) c-Src キナーゼ周囲の BSA 分布。

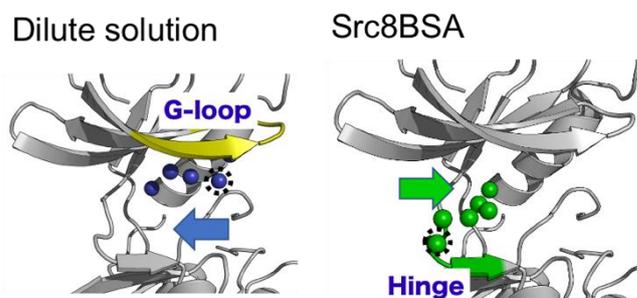


Figure 2: Dilute 環境と混雑環境(Src8BSA)の PP1 結合経路。

ている。

次に、PP1 の c-Src キナーゼへのネイティブ結合サイトへの結合経路について述べる。我々が行った MD 計算では、Dilute 条件で 4 回、Src8BSA 条件で 2 回の結合イベントを観測し、混雑環境効果によって結合経路が変化することが分かった。Fig. 2 に、Dilute 条件と Src8BSA 条件で観測された結合経路を示す。Dilute 条件では、G-loop から結合が進行するのに対し、Src8BSA では hinge 領域から進行する。

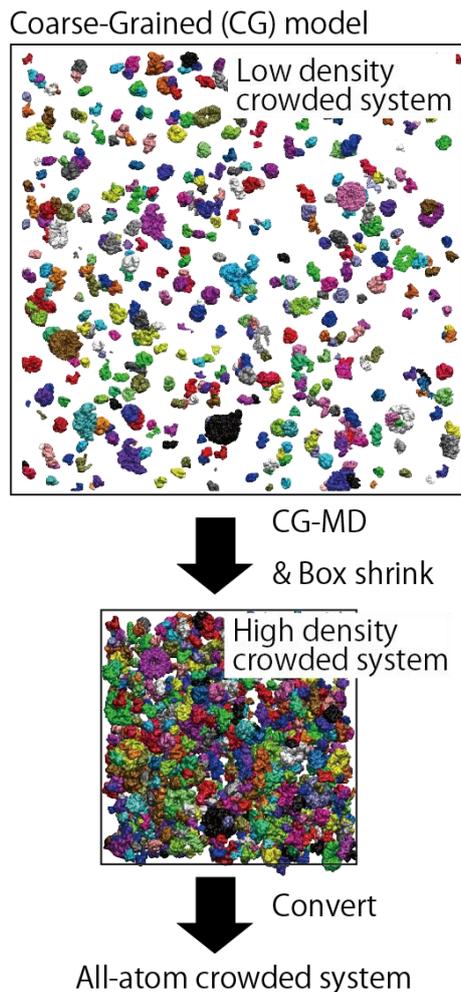


Figure 3: 混雑環境モデルの構築スキーム.

(2) 粗視化 MD 法を用いた大規模混雑環境のマルチスケールモデリング法の開発

新規スキームを用いて, Yuらが行った約1億原子から構成されるマイコプラズマジェニタリウムの細胞質環境(1億原子) [I. Yu et al., *eLife*, **5**, e19274 (2016)]の構築を行った. タンパク質の粗視化モデルとして, Clementi によって提案された $C\alpha$ -Go モデルを用いた. これにより, 系の構成要素数は 100 万原子程度となる. 2000^3 \AA^3 のシミュレーションボックスから出発して, GENESIS (spdyn) を用いてナノ秒スケールの CG-MD 計算を実行し, 1000^3 \AA^3 の濃厚混雑環境を構築した. さらに, 原子解像度の生体高分子モデルに変換し, 電解質溶液と ATP 等の代謝物質分子を加えることで, 生体高分子同士が非物理的な重なりを持たず, 直ちに原子解像度の細胞混雑環境の MD 計算を実行することが可能なモデルを構築出来た.

(3) まとめ

タンパク質混雑環境におけるタンパク質-リガンド結合

の MD シミュレーションを様々な混雑具合の系で行うことで, (i) 混雑化により標的タンパク質周囲の環境が大きく変化し, リガンド濃度が減少すること, (ii) タンパク質-タンパク質相互作用がリガンド結合過程へ影響すること, (iii) ネイティブ結合サイトへの結合過程が混雑化によって異なることを明らかにした.

粗視化 MD シミュレーション法を用いた混雑環境のマルチスケールモデリング法を開発した. 従来の原子解像度モデルを構築する際に生じる, 生体高分子同士の非物理的な重なりを解消及び, 平衡化の問題を改良することが出来た.

(4) 今後の計画・展望

本研究では, タンパク質-タンパク質相互作用がリガンド結合過程に及ぼす影響について主に解析を行ってきたが, タンパク質-タンパク質相互作用そのものも細胞内におけるシグナル伝達で重要である. 今後は, 生体高分子同士の会合・解離の熱力学的・動力学的性質の解析を実現する拡張アンサンブル等の効率の良い計算手法の開発を行っていく.

2019 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. Masayoshi Sakakura, Yumi Ohkubo, Hiraku Oshima, Suyong Re, Masahiro Ito, Yuji Sugita, and Hideo Takahashi, Structural mechanisms underlying activity changes in an AMPA-type glutamate receptor induced by substitutions in its ligand-binding domain, *Structure*, **27**, 1698–1709 (2019)
2. Hiraku Oshima, Suyong Re, Yuji Sugita, Replica-exchange umbrella sampling combined with Gaussian accelerated molecular dynamics for free-energy calculation of biomolecules, *J. Chem. Theory Comput.*, **15**, 5199-5208 (2019)
3. Suyong Re, Hiraku Oshima, Kento Kasahara, Motoshi Kamiya, and Yuji Sugita, Encounter complexes and hidden poses of kinase-inhibitor binding on the free-energy landscape, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 18404-18409 (2019)
4. Ai Niitsu, Suyong Re, Hiraku Oshima, Motoshi Kamiya, Yuji Sugita, De Novo Prediction of Binders and Nonbinders for T4 Lysozyme by gREST Simulations, *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 3879-3888 (2019)

【口頭発表】

1. Suyong Re, "Protein-ligand binding simulations using enhanced sampling methods in GENESIS", Theoretical chemistry group, École Normale Supérieure (Hosted by Prof. Damien Laage), Nov. 27, 2019, Paris, France.
2. Suyong Re, "An application of GENESIS: Simulating protein-ligand bindings", Workshop on molecular dynamics based binding free energy calculations, post-processing of trajectories and force field development, Nov. 21, 2019, Warsaw, Poland.
3. Suyong Re, Ai Niitsu, Hiraku Oshima, Motoshi Kamiya, and Yuji Sugita, "De Novo Binding Prediction using gREST", CBI2019 (Selected Oral Presentations), Oct. 23, 2019, Tokyo, Japan (講演番号 FS-22 P1-21)
4. 杉田有治, 李秀榮, 「ポスト京のメイン MD エンジン : GENESIS」の紹介, KBDD シミュレーション WG 会議, 大阪 (2019 年 7 月 12 日)
5. "On the Supercomputer-Aided Drug Compound Design using GENESIS", Suyong Re and Yuji Sugita, NIBIOHN (Hosted by Dr. Kenji Mizuguchi), Apr. 12, 2019, Osaka, Japan
6. "Revealing Drug-Target Binding Pathway using Two-dimensional Replica-Exchange Molecular Dynamics Method", Suyong Re, Hiraku Oshima, Kento Kasahara, Motoshi Kamiya and Yuji Sugita, The 1st R-CCS International Symposium, Feb. 19, 2019, Kobe, Japan.
7. 尾嶋拓, 李秀榮, 杉田有治, "拡張アンサンブル法を用いたタンパク質-リガンド結合ポーズおよび親和性の高精度予測", 日本物理学会 2019 年秋季大会, 岐阜 (2019 年 9 月 10 日)
8. 尾嶋拓, 李秀榮, 杉田有治, "Free-energy analysis of protein-ligand binding pose using generalized ensemble methods", 第 57 回日本生物物理学会年会, 宮崎 (2019 年 9 月 24)
9. 尾嶋拓, 李秀榮, 杉田有治, "2 つの拡張アンサンブル法を組合せた生体分子の自由エネルギー計算法の開発", 第 33 回分子シミュレーション討論会, 名古屋 (2019 年 12 月 9 日)
10. 笠原健人, 李秀榮, 尾嶋拓, 優乙石, Grzegorz Nawrocki, Michael Feig, 杉田, "Molecular dynamics analysis of the crowding effects on protein-ligand binding mechanism", 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡 (12 月 4 日).
11. 笠原健人, "混雑環境がタンパク質-リガンド結合に及ぼす影響の分子動力学解析", 九州大学中野研セミナー, 12 月 (福岡).

【ポスター発表】

1. 尾嶋拓 李秀栄, 杉田有治, “低計算量の拡張アンサンブル法の開発: レプリカ交換と Gaussian accelerated Molecular Dynamics の組合せ”, 第 19 回日本蛋白質科学会年会, 神戸国際会議場, 神戸市, 2019/6/24
2. 笠原健人, 尾嶋拓, 李秀栄, Nawrocki, Feig, 杉田, 混雑環境がタンパク質-リガンド結合に及ぼす効果, 第 19 回日本蛋白質科学会, 6 月 (兵庫)
3. 笠原, 李秀栄, 尾嶋拓, 優乙石, Grzegorz Nawrocki, Michael Feig, 杉田有治, 混雑環境系におけるタンパク質-リガンド結合機構の速度論的解析, 第 57 回日本生物物理学会年会, 宮崎 (2019 年 9 月 26 日)

【その他(著書、プレスリリースなど)】

1. Suyong Re, Yoshiki Yamaguchi, Yuji Sugita, Molecular Dynamics Simulation of Glycan. Trends Glycosci. Glycotechnol., published May 7, 2019, DOI:10.4052/tigg.1616.1
2. Yuji Sugita, Motoshi Kamiya, Hiraku Oshima, Suyong Re, Replica Exchange Methods for Biomolecular Simulation. In: Bonomi M., Camilloni C. (eds) Biomolecular Simulations. Methods in Molecular Biology (155-177, Chapter 7).
3. 「スパコンが拓く！未来創薬」、第 66 回理研イブニングセミナー (2019 年 6 月 5 日)
(<http://c3d.riken.jp/pdf/evesemi66.pdf>) (登録済)
4. Faster modeling of interactions between ligands and proteins, RIKEN Research highlight (2019 年 11 月 29 日)
(https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/rr/20191129_3/index.html)
5. プレスリリース: 「酵素-阻害剤結合の初期会合体を予測 - 初期結合過程を標的とした新たな創薬分子設計の可能性を拓く -」、理化学研究所 (2019 年 9 月 6 日)
(https://www.riken.jp/press/2019/20190906_2/)