

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)、Fan Li(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 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、当研究チームでは、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・ダイナミクスを明らかにする理論計算的研究や生体機能を制御する分子設計技術の開発を行ってきた。本研究課題では、以下の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技術開発を行う。

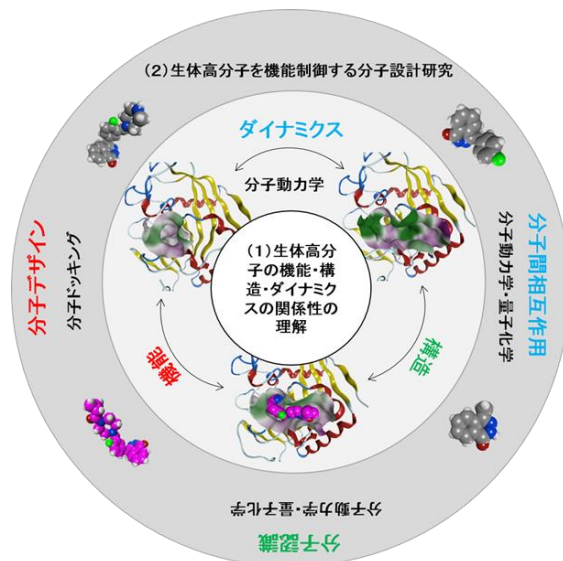


図1. 本研究課題の2つの研究テーマとその関連性

2. 具体的な利用内容、計算方法

前項に示したように、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に着目した研究と、(2)その機能を制御する分子の設計やその技術開発である。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、本研究では、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。具体的な各課題項目を以下に示す:

(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。

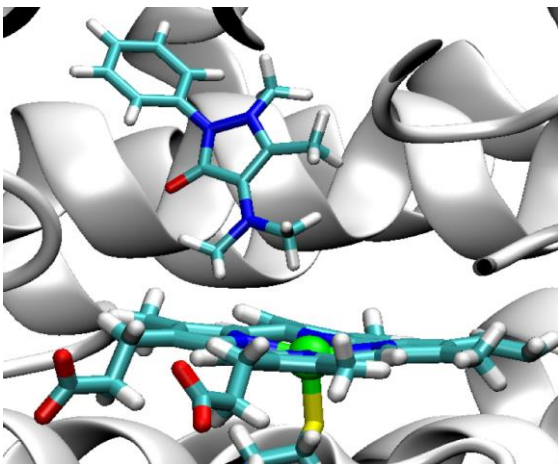


図2. 分子ドッキングによって得られた CYP1A2 活性部位における薬物の結合ポーズ

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

タンパク質は、創薬研究の重要なターゲット分子の1つである。タンパク質とリガンド分子間の認識機構を理解するために、分子動力学計算を用いて相互作用の調査を行う。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の情報をもとに、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、酵素タンパク質とリガンド分子の分子認識機構の理解を目的とした分子動力学計算を実施する。研

究ターゲットとして IRE1 α 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。特に、キナーゼドメインと RNase ドメインの構造変化に着目し、計算を実施する。それ以外に、炭酸酵素等の基質分子の認識機構を理解するため、長時間の分子動力学計算を実施する。

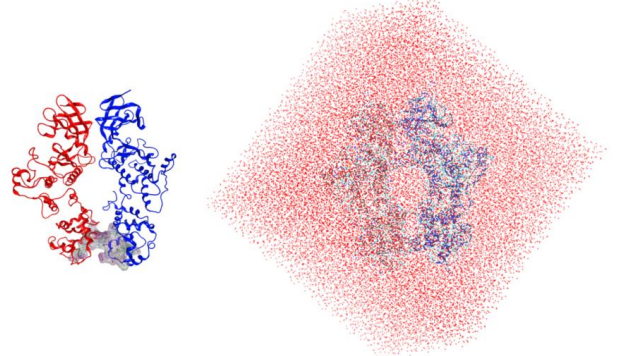


図3. 左: 分子動力学計算に適用する IRE1 α ダイマー構造 (back-to-back 型)。分子表面表示は RNase 活性中心を示す。右: 分子動力学計算のモデル。水分子を含めて約 10 万原子の系。

また、新たなタンパク質を用いた研究を遂行するため、今年度後期に次の内容で計算時間の追加申請を行った。

芳香族アミノ基を酸化的にニトロ基へと変換する放線菌由来の酵素である p-aminobenzoate N-oxygenase (AurF) の基質分子の認識機構および B 型肝炎ウイルスカプシド (HBc) の阻害分子認識機構を理解するために分子動力学計算を行う。AurF の数種の基質分子の認識機構を理解することにより、AurF の機能改変につながると考えている。また、HBc の阻害分子認識機構の理解は、抗 B 型肝炎ウイルス薬開発につながる。新たに標的としたこれらタンパク質の分子シミュレーションを実行することにより、タンパク質の機能改変やタンパク質の機能を制御する薬物研究への発展が期待できる。

(1-c) 生体膜の動的構造と機能解明に関する研究 (齋藤)

生体膜での脂質ダイナミクスの重要特性の一つに脂質のフリップ運動がある。脂質フリップは脂質二重層膜の上下の層間を脂質分子が転移・移動する運動であり、これにより脂質膜の曲率や上下の層における脂質組成 (分子種や分子密度) が変化する。これら膜構造の変化は脂質小胞 (ベシクル) の形成や、ベシクルの細胞膜への融合 (エンドサイ

トーション)を決定する重要特性である。本年度は分子動力学(MD)法と自由エネルギー計算を用いて膜貫通(TM)ペプチドによる脂質フリップ誘起の分子メカニズムを解明に取り組む。脂質フリップを誘起するペプチドや脂質の動的構造や相互作用、脂質フリップ能を脂質の動的構造解析や自由エネルギー計算を用いて具体的に明らかにする。TMペプチドの長さやアミノ酸配列を系統的に変化させた系のMDシミュレーションと構造解析を実施し、得られた計算データを集積・解析することによって脂質フリップを誘起するTMペプチドの新たな分子設計指針を与える。

(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必要がある。

(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 (沖本、齋藤、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もの少なくない。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、昨年度に引き続きQM/QM法を用いた電子状態計算による薬物分子とタンパク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2000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、引き続きナフト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、ナフト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CYP2D6とCYP2C9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。CYP2D6とCYP2C9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。そこでこれらCYPの10 μ s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4参照)。

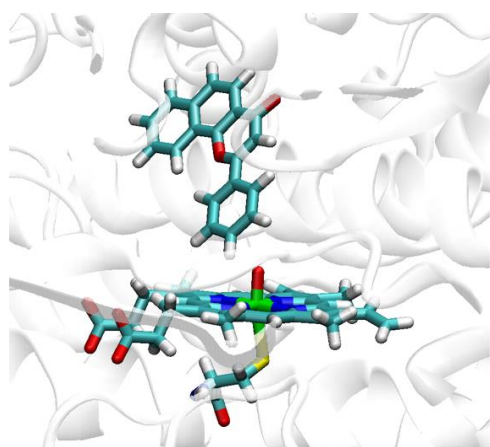


図 4. 分子ドッキングシミュレーションによって得られた CYP 活性部位における薬物の結合ポーズ。

(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

昨年度の成果内容をプロシーディングスとして発表した。また、その結果を基に他の薬物分子系にも適用し、その有効性を確認した。

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

IRE1 α にアミノ酸変異を加えることで RNase 活性に影響を与えることが実験的に示唆されているが、どのような影響により RNase 活性が失活するのかの分子メカニズムは定かではない。そこで変異による影響を調査するために、我々は野生型 (pWT) の IRE1 α 二量体 (back-to-back) と IRE1 α に変異を加えた変異体 (IRE1-mutant1, IRE1-mutant2) に対する分子動力学計算を実施した。初期構造として X 線結晶構造 (PDB ID: 4YZC) を用いてこの構造に変異を加えた。pWT に関して 3 μ s の、二つの変異体に対しては 2 μ s の分子動力学計算を複数回実行し X 線結晶構造との比較を行った。X 線結晶構造の主鎖との構造のずれ (root-mean-square deviation; RMSD) を算出した結果、それぞれの RMSD の平均値は pWT が 2.13 ± 0.21 , IRE1 α -mutant1 が 2.23 ± 0.28 , IRE1 α -mutant2 が 2.64 ± 0.32 Å であり、IRE1 α -mutant2 が他と比べて全体構造が変化していることがわかった (図 5)。

加えて、RNase ドメインに着目したところ顕著な違いが観測できた。

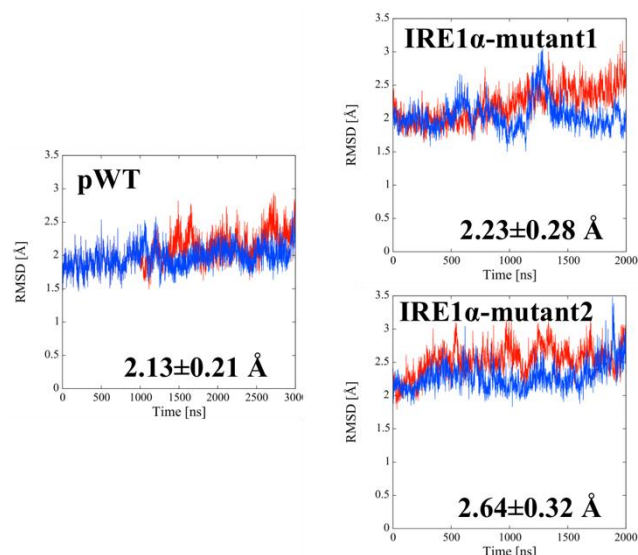


図 5. IRE1 α の野生型と各変異体の RMSD。

芳香族アミノ基を酸化的にニトロ基へと変換する放線菌由来の酵素である p-aminobenzoate N-oxygenase (AurF) の基質分子の認識機構においては、野生型の AurF に対して触媒活性の異なる数種の基質 (p-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸等) の複合体構造の分子動力学計算を実行した。この結果、触媒活性の高い p-アミノ安息香酸は安定にポケット内部で反応始状態の構造を維持したが、触媒活性の低いリガンド (m-アミノ安息香酸等) では解離し、反応始状態の構造を安定に維持できないことがわかった。現在、詳細な解析を進めている。

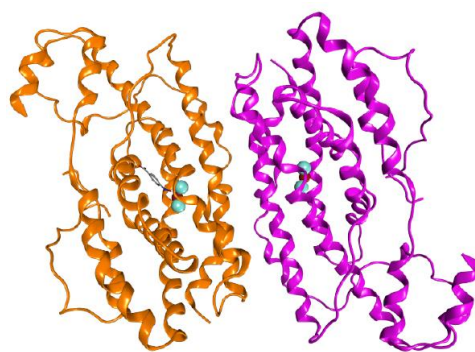


図 6. AurF のダイマー構造。活性部位にある金属分子を水色の球で示している。

B 型肝炎ウイルス Hepatitis B virus (HBV) core/capsid protein (HBc) に関しては、変異がタンパク質の構造や薬物の認識に与える影響を調べるために、X 線結晶解析構造からリガンド複合体 (ホロ体) モデルとアポ体モデルを構築し、分子動力学計算を実行した。その結果、アポ体とホロ体では構造が異なる傾向を示すことが分かつ

た。現在、詳細な解析を進めている。

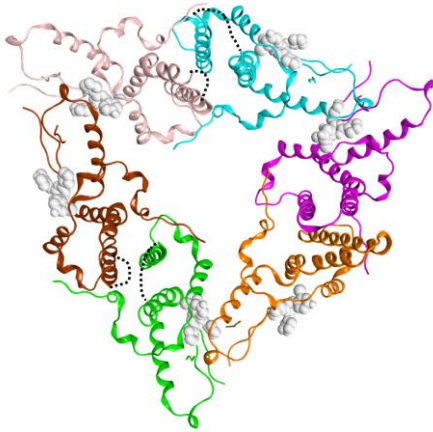


図 7. B 型肝炎ウイルス Hepatitis B virus (HBV) core/capsid protein (HBc)の6量体結晶解析構造。

(1-c) 生体膜の動的構造と機能解明に関する研究 (齋藤)

昨年度の成果内容をプロシーディングスとして発表した。また脂質分子の膜厚方向に対する自由エネルギー曲線を新規の自由エネルギー計算法を用いて評価し、その有効性について検証した。

(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 (沖本、齋藤、平野)

昨年度に引き続き、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ている Tankyrase2 のアポ体や薬物(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ている。その結果、一般的なアポ体のシミュレーションから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いことが分かった。一方、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、ある条件下で MD 計算をすることでも、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。このようなシミュレ-

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。現在、研究結果をまとめて投稿準備を進めている。

(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、512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)

前年度に残した計算結果を追加し、現在、結果をまとめている。

(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)

今年度は、理論計算に基づいた分子設計の応用として、理論計算に基づいた蛍光プローブ分子の設計を行った。具体的には、実験より提案された置換基や骨格構造持つ複数のチアゾール誘導体に対し、可視光吸収スペクトルと蛍光スペクトルの理論計算から、有効な蛍光プローブとなる分子設計を行い、最適な構造を持つ分子を提案した。実験的に提案した構造を持つ分子の蛍光特性の有効性が認められた。特許関連もあり構造は公開できない。

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

2019年度 利用報告書

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。

2019年度 利用研究成果リスト

【会議の予稿集】

- (1) Takao Otsuka, Noriaki Okimoto, Hiroaki Saito, Makoto Taiji, “Quantum chemical analysis of reaction indices and reaction path for drug molecules”, J. Phys. Conf. Ser. 1290, 012021 (2019).
- (2) Hiroaki Saito, Tetsuya Morishita, Taku Mizukami, Ken-ichi Nishiyama, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, “Free energy profiles of lipid translocation across pure POPC and POPC/CHOL bilayer: all-atom molecular dynamics study”, IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 1290 (2019) 012020

【ポスター発表】

- (1) 沖本憲明、平野秀典、泰地真弘人「リガンド結合に伴うタンパク質結合ポケット変化の分子動力的研究」第33回分子シミュレーション討論会、名古屋、2019年12月
- (2) 沖本憲明、平野秀典、泰地真弘人「Computational study on conformational transition of protein binding pocket upon ligand binding」情報計算化学生物(CBI)学会2019年大会、東京、2018年10月
- (3) 大塚教雄、沖本憲明、齋藤大明、泰地真弘人、“量子化学計算による薬物分子の代謝反応部位と初期反応過程に関する考察”、第13回分子科学討論会2019、名古屋、2019年9月
- (4) 齋藤大明、叶直樹、“分子動力学シミュレーションを用いたヘロナミド類の細胞膜内挙動解析”，新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第5回公開シンポジウム、大阪大学、2019年6月
- (5) Hiroaki Saito, Tetsuya Morishita, “Potential of mean force calculation of lipid translocation across the POPC bilayer by logarithmic mean-force dynamics”, XXXI IUPAP Conference on Computational Physics July 28 – August 1, 2019 The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR
- (6) 齋藤大明、森下徹也、“LogMFDによる脂質分子の膜透過自由エネルギー曲線”，第13回分子科学討論会2019、名古屋、2019年9月
- (7) Hiroaki Saito, Takao Otsuka, Noriaki Okimoto, “Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling:16. Prediction of sites of metabolism of drug by CYP2D6 by molecular simulation”, CBI学会2019年大会、タワーホール船堀(東京)、2019年10月
- (8) Hiroaki Saito, Naoki Kanoh, “Dynamical structure and thermal stability of polyene macrolactam heronamide in lipid bilayer: a molecular dynamics study” The 5th International Conference on Molecular Simulation (ICMS 2019), Korea, November 3rd -6th, 2019
- (9) 齋藤大明、叶直樹、“分子動力学シミュレーションを用いたヘロナミド類の膜内構造と濃度依存性”，新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第6回公開シンポジウム、慶應大学(日吉キャンパス)、2019年12月
- (10) 平野秀典、沖本憲明、藤田茂雄、泰地真弘人「MD simulationによるtankyrase2のポケット構造変化の調査」第33回分子シミュレーション討論会、名古屋、2019年12月

【その他(著書、プレスリリースなど)】

(日本語総説)

- (1) 上田実、高岡洋輔、齋藤大明、“有機化学者が計算化学者に助けってもらってリガンド-受容体間ドッキングシミュレーションによる分子設計に成功するまで”、分子シミュレーション学会誌 “アンサンブル” Vol. 21, No. 3, July 2019 (通巻87号), p196-203.