

## 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)、大野 洋介(1)、佐藤 竜馬(1)、齋藤 大明(1)、Fan Li(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、それぞれが決まった固有の働き(機能)を持ち、我々の生命活動を支える最も重要な物質である。近年の立体構造解析技術の進歩により、生命活動に関与している生体高分子やその薬物複合体の立体構造情報が利用できるようになってきている。しかし、生体高分子の構造は柔軟なため、その機能発現を理解するためには、特定の立体構造情報の利用だけでは不十分で、その構造ダイナミクス(構造変化)情報の利用も重要となる。

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情報を得るために非常に有効な手法で、高解像度かつ高時間分解能で分子・原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)の設計においては、その実用に耐えうる計算技術の開発も必要である。

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、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し得る分子の設計技術の開発を行ってきた。そこで、次の2つの研究テーマを設定し、HOKUSAI で実施するための申請を行う。

(1) 生体高分子の機能・構造ダイナミクスの関係性の理解

(2) (1)で得られた情報を活用し、生体高分子を機能制御する分子設計研究

本研究を実施することで、生体高分子の機能制御機構の理解や機能制御分子設計の発展に貢献できると考えている。

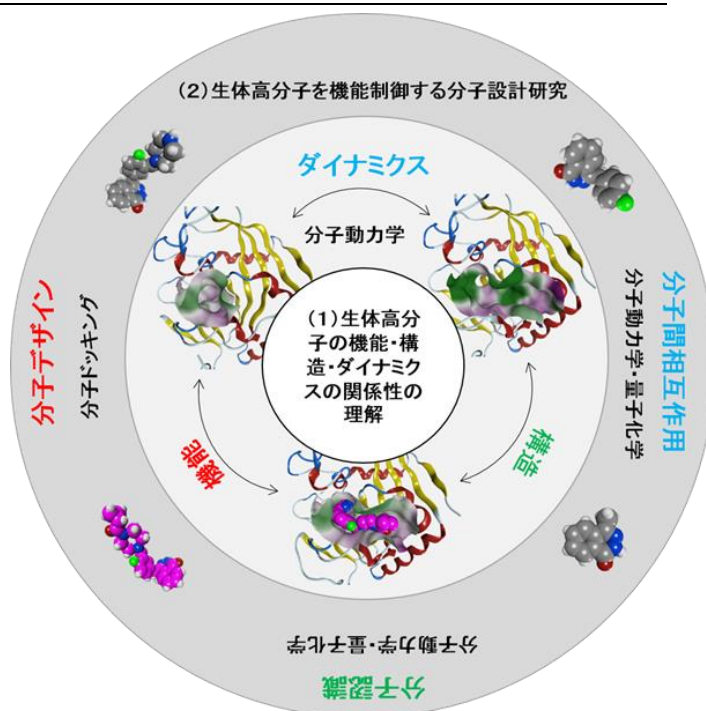


図1. 本研究課題の2つの研究テーマとその関連性

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

前項で示したように、本研究は、(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、(2) その機能を制御する分子の設計やその技術開発、の2つの項目に基づいてすすめていく。以下に各項目で研究対象とするタンパク質と実施内容を説明する。

### (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

生体高分子を制御する分子の設計には、対象となる生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの関係性の理解が必要である。そこで様々な分子シミュレーション手法により、その特徴を抽出することを試みる。具体的な各課題を 1-a から 1-c で説明する。

### (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の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。

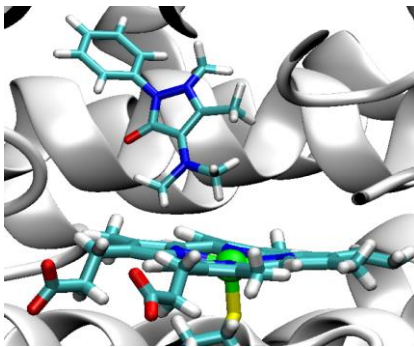


図 2. 分子ドッキングによって得られた CYP1A2 活性部位における薬物の結合ポーズ

### (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、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。薬物とターゲットとなるタンパク質の結合様式や相互作用解析は創薬において重要である。近年のコンピュータ技術の発展によりコンピュータ上で長時間におよぶ薬物とタンパク質の挙動を追跡することが可能になり、それにより薬物がどのようにタンパク質に結合するのか、結合後どのような変化がタンパク質に生じるのかなどが予測できるようになってきた。

本研究では研究ターゲットとして inositol requiring enzyme-1 (IRE1) を選択する。IRE1 は小胞体ストレスセンサーのひとつであり、細胞内で小胞体ストレスが生じると細胞は状態を改善するために unfolded protein response (UPR) を発動し折りたたみ不全の不良タンパク質を排除する。IRE1 は RNase domain を有しており、活性化した IRE1

は細胞質側に存在する RNase domain によって基質である転写因子 XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA をスプライシングする。スプライシングされた XBP1-mRNA によって UPR に必要な標的分子の転写を誘導する。実験により、ある部位に変異を加えた IRE1 は RNase 活性が消失することが示唆された。本年度は実験的に得られている IRE1 とリガンド分子の X線結晶解析構造から構築したモデル系を用いて分子動力学計算を実施し、得られた構造ダイナミクス情報から薬物がどのようにタンパク質の構造変化を誘起しその機能を阻害しているのかを明らかにすることを試みる。さらに実験的に示唆されている酵素タンパク質へのアミノ酸変異による活性阻害がどのようにして引き起こされているのかを理解することを目的とした分子動力学計算も実施する。

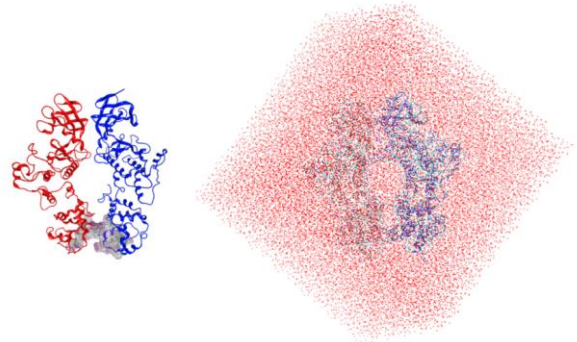


図 3. 左：分子動力学計算に適用する IRE1 $\alpha$ ダイマー構造 (back-to-back 型)。分子表面表示は RNase 活性中心を示す。右：分子動力学計算のモデル。水分子を含めて約 10 万原子の系。

更に、主に芳香族アミノ基をニトロ基へと変換する酵素である AurF の機能を理解するために分子動力学計算を実施する。AurF のアミノ基のニトロ化の効率 (触媒活性能) を調査するため、触媒活性能の異なる様々な基質分子 (p-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸等) を対象に、それらのリガンド分子が薬物結合ポケット内でどのように相互作用しているのかを調査し、その触媒活性能および分子認識の違いを調査する。

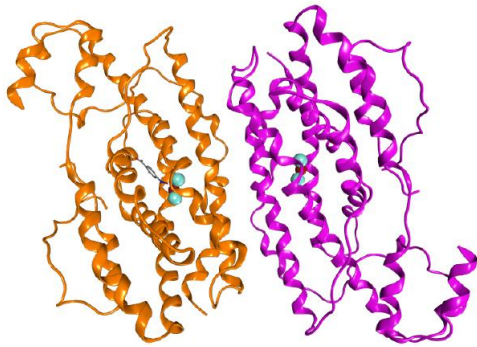


図4: AurFのダイマー構造。活性部位にある金属分子を水色の球で示している。

B型肝炎ウイルスカプシド(HBc)の薬物に対する安定性を理解するための分子動力学計算を実施する。実験により明らかになっているカプシド形成阻害薬とタンパク質の相互作用や変異によるHBcの構造ダイナミクスの違いを調査する。

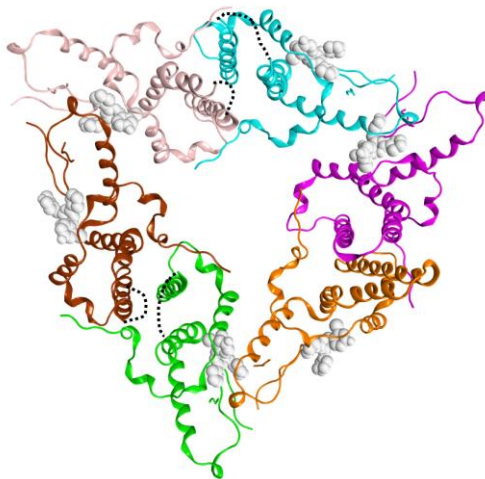


図5: B型肝炎ウイルス Hepatitis B virus (HBV) core/capsid protein (HBc)の6量体結晶解析構造。

### (1-c) 生体膜の動的構造と機能解明に関する研究 (齋藤)

本課題では以下の2課題についての研究を進める。一つ目は昨年度からの継続課題で、2つ目は今年度からの課題である。

(I) 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

サイトーシス)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。

(II) ヘロナミド (Heronamide) C および A は、放線菌が生産するマクロラクタム化合物で、細胞膜への結合による抗真菌作用がある。先行研究によると、ヘロナミド C は DMPC のような飽和型脂質膜にはタイトに結合する一方で、POPC や DOPC のような不飽和型脂質膜には弱く結合することが報告されている。また一方でヘロナミド A はヘロナミド C に比べて脂質膜への結合特性が非常に弱いことも示されている。このようなヘロナミドの脂質膜への結合特異性の違いは、ヘロナミド C および A の脂質膜内における結合構造や相互作用特性の違いによるものと考えられるが、膜内分子構造の観測の難しさにより未だ明らかとされていない。本研究では、これら実験により合成・評価されているヘロナミド類の脂質膜における分子動力学(MD)シミュレーションを実施し、ヘロナミド類の膜内結合特性を具体的に明らかにする。各々の化合物の膜内における結合位置や分子配向の違いを詳細に解析し、その構造や相互作用特性の違いについて議論する。さらに、ヘロナミドの膜内濃度変化に対する膜構造や相互作用特性の変化についても言及する。

### (2) 生体高分子の機能を制御する分子設計研究

標的分子の特徴を抽出後、これらの情報を基に機能制御分子の設計を行う。その為に、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。具体的な各課題を2-aから2-dで説明する。

#### (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る効率的に構造サンプリングと分子ドッキングを組み合わせた手法により、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。

また新型コロナウイルスの発生に伴い、緊急課題として SARS-CoV-2 のメインプロテアーゼと薬分子の結合過程の分子動力学計算を実行する。

### (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)

計算による分子設計の応用として、物性値予測に基づいた分子設計を実施する。具体的な系として、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)の蛍光特性の設計と類似骨格構造を持つ分子における酸解離特性の設計を行う。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。類似骨格構造を持つ分子系では、脱プロトン化に関する反応指数を求める。

## 3. 結果

### (I) 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、昨年度に引き続き、CYP 種(CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, 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継続している。CYP タンパク質は、多様な化合物を認識する柔軟な結合ポケット構造を持っており、これらのポケット動体解析調査のため、幾つかの CYP 種について追加の MD 計算を実施した。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)。本研究結果の一部を、以下の website(CypSOM predictor: [https://www.id3inst.org/cypsom\\_predictor/index\\_ja.html](https://www.id3inst.org/cypsom_predictor/index_ja.html))で公開した。

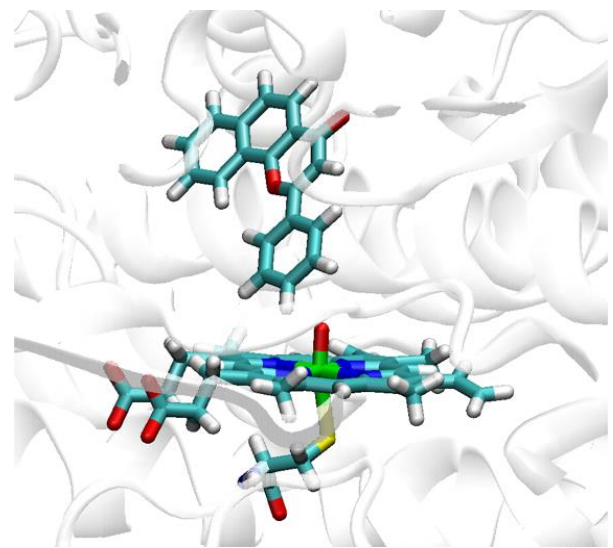


図 6. 分子ドッキングシミュレーションによって得られた CYP 活性部位における薬物の結合ポーズ。

#### (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

これまでの成果内容を論文化している途中である。

#### (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)

IRE1 $\alpha$  に関しては、今年度は、昨年度実施した計算を再検討するため、これまで実施した計算を延長し、そ

の結果を確認した。また、今年度は、緊急に covid-19 関連の研究(論文1)を実行したため、IRE1 $\alpha$ に割り当てていた計算リソースの大部分を covid-19 関連の研究に振り替えた。

AurF に関しては、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)の基質認識能について調査を実施した。天然型 AurF に対して多様な実験的触媒反応性能を示す数種の基質分子(p-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸等)を対象にし、AurF 内で各基質の構造安定性について分子動力学シミュレーションにより評価した。これらのシミュレーションの結果、実験的に触媒反応性の高い p-アミノ安息香酸は活性部位近傍で安定に存在していることがわかったが、その他の触媒反応性が低い基質分子は、活性部位近傍から脱離したり、反応が起きにくい非生産的な構造で安定化する傾向が示された。これらのシミュレーション結果を基に、低反応性基質が高触媒反応性能を獲得することを目的とし、活性部位近傍のアミノ酸残基の変異モデルを構築した。これらの変異モデルと上記の反応性の低い基質複合体のシミュレーションを実施し変異候補を選定している。現在、詳細な解析を進めている。

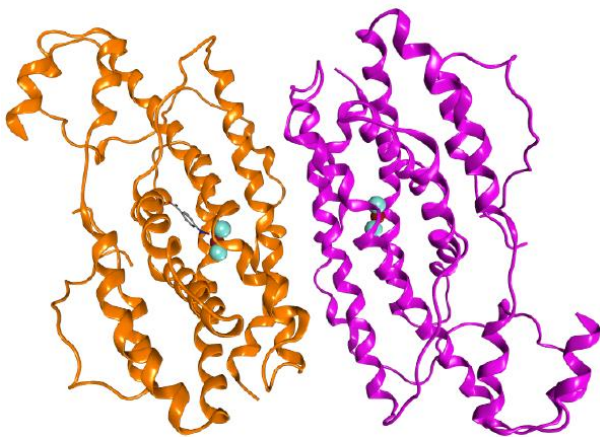


図 7. AurF のダイマー構造。活性部位にある金属分子を水色の球で示している。

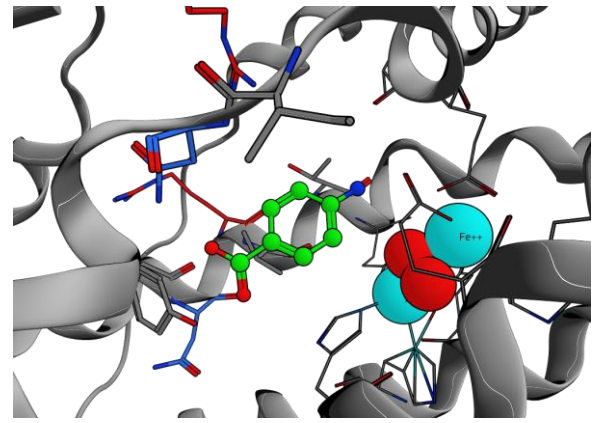


図 8. AurF と p-アミノ安息香酸複合体構造のシミュレーション構造。非常に安定に反応性可能な構造が維持されていることがわかった。

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)モデルとアポ体の 18 量体モデルを構築し、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った。現在、詳細な解析を進めている。

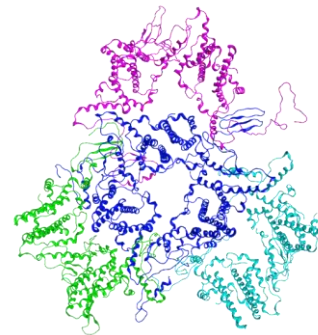


図 9. B 型肝炎ウイルス Hepatitis B virus (HBV) core/capsid protein (HBc)の18量体結晶解析構造。

#### (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 J. Phys. Chem. Lett. 誌に発表した(利用研究成果リスト2)。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)**

これまでの、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、主に新型コロナウイルスのコードするタンパクの一つであるメインプロテアーゼと薬分子の分子動力学計算を行った。メインプロテアーゼ2量体の結晶構造(6LU7)を元に薬分子(7種類の HIV 治療薬)との結合過程の分子動力学計算を行うことで、メインプロテアーゼ表面に分布する薬分子結合部位の探索と、メインプロテアーゼ活性部位への薬分子結合状態を調査した。7つの薬分子それぞれについて初期に解離した状態から始めて 200ns のシミュレーションを28回ずつ行った。得られた軌道からタンパク表面原子と薬分子原子間の接触情報からクラスタリングを行うことでタンパク表面にある薬分子の着きやすいサイトを同定した。タンパク活性部位の運動を解析し、薬分子結合において大事な役割を果たすと思われる残基を調査した。薬分子が活性部位へ結合した軌道の計算をさらに先まで計算時間を伸ばすことで結合状態の変化を観察し、典型的と思われる結合状態の候補を複数提示した。ここで得られた結果は論文として発表し、計算の生データはリポジトリにて一般に公開した。

**(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)**

現在、結果をまとめ論文化している途中である。

**(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)**

昨年度引き続き、理論計算に基づいた蛍光プローブ分子の設計を行った。文献情報と理論計算を基に有効な構造を持つ分子を提案した。

**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。

**6. 利用がなかった場合の理由**

該当なし

2020年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. Komatsu, T. S., Okimoto, N., Koyama, Y. M., Hirano, Y., Morimoto, G., Ohno Y., and Taiji, M., “Drug binding dynamics of the dimeric SARS-CoV-2 main protease, determined by molecular dynamics simulation”, Scientific Reports (10), Article number: 16986, 2020
2. Hiroyuki Nakao, Yuta Sugimoto, Keisuke Ikeda, Hiroaki Saito, and Minoru Nakano, “Structural Feature of Lipid Scrambling Model Transmembrane Peptides: Same-Side Positioning of Hydrophilic Residues and Their Deeper Position”, J. Phys. Chem. Lett. 2020, 11, 1662–1667.

【ポスター発表】

1. Komatsu, T. S., Okimoto, N., Koyama, Y. M., Hirano, Y., Morimoto, G., Ohno Y., and Taiji, M., “Molecular dynamics study of the dimeric SARS-CoV-2 main protease with 7 HIV inhibitors” RIKEN BDR symposium 2021, Structuring Biosystems: Functions Emerging from Molecules

【その他(著書、プレスリリースなど)】

1. 計算データリポジトリ: Komatsu, T.S., Okimoto, N., Koyama, Y.M. et al. Molecular dynamics trajectories for SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> with 7 HIV inhibitors. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3766083> (2020).
2. 理化学研究所プレスリリース: 2020年11月10日 新型コロナウイルスタンパク質の柔らかい構造 –薬分子結合過程の分子動力学シミュレーション– [https://www.riken.jp/press/2020/20201110\\_3/index.html](https://www.riken.jp/press/2020/20201110_3/index.html)
3. CypSOM predictor: [https://www.id3inst.org/cypsom\\_predictor/index\\_ja.html](https://www.id3inst.org/cypsom_predictor/index_ja.html)