

プロジェクト名(タイトル):

自由エネルギー摂動法と拡張アンサンブル法を用いた高精度タンパク質-リガンド結合親和性予測

利用者氏名:

○信夫 愛(1)、鄭 誠虎(1)、尾嶋 拓(1)、松原 大貴(1)、笠原 健人(1,2)

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

(2) 大阪大学大学院基礎工学研究科

1. 本プロジェクトの研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

タンパク質-リガンド結合の理解は生命科学の中心課題の一つであり、創薬化学での重要性も増している。特に、プロテインキナーゼは基質となるタンパク質やペプチドに ATP のリン酸基を転移する酵素であり、細胞内シグナル伝達系において中心的な役割を果たしている。キナーゼの異常はがんを始めとする様々な疾病の原因となっており、創薬における重要なターゲットである。高騰する医薬品開発費を抑えるために、標的タンパク質に強く結合する医薬品候補化合物を正確かつ高速に予測する計算技術が必要とされている。近年ではさらに、実験で得ることが難しいタンパク質-リガンドの結合経路および中間状態の予測も求められるようになってきている。

これまで、我々は分子動力学(Molecular Dynamics:MD)計算と拡張アンサンブル法を用いたタンパク質-リガンド結合自由エネルギー解析法を開発し、リガンドの結合ポーズ・親和性の予測やリガンドの結合メカニズムの解明を行ってきた。しかし、これらの研究では分子サイズの小さいリガンドのみを扱っており、大きなリガンドの結合については理解が限られていた。実際の抗がん剤では分子サイズが大きく柔軟性が高い化合物が多く、柔軟性の高いリガンドやペプチドとの結合を正確に予測できる計算プロトコルが求められている。

また、これまで標的タンパク質とリガンドのみの希薄溶液環境を主に扱ってきたが、実際の細胞内は様々な生体分子が高密度で存在している混雑環境となっている。薬剤設計に役立つプロトコルにするためには、細胞内環境を意識した分子混雑系でのリガンド結合も考慮しなければならない。リガンドの結合親和性予測に用いられる自由エネルギー摂動法(Free-Energy Perturbation: FEP)は計算コストが高く、分子混雑系への応用が限られていた。また、タンパク質同士が密に接

する分子混雑系では力場パラメータの精度が著しく低下することが知られており、混雑環境を正確に再現する力場パラメータが求められている。

本課題では、柔軟性の高いリガンドやペプチドとの結合の計算プロトコルの構築および結合メカニズムの解明、FEP 法の高速度化、分子混雑系での力場パラメータの改良を目的として、以下の4つの研究を行った。

(1) Src キナーゼと基質ペプチドの結合ポーズ探索

キナーゼと基質蛋白質の結合ポーズに対する正確な知見は、特異性の高い阻害剤の創出において不可欠であるが、多くのキナーゼ、特にチロシンキナーゼと基質蛋白質の複合体の構造は、実験的にも知られていない。本研究では、gREST 法 (Generalized Replica Exchange with solute Tempering) と呼ばれる効率的な構造サンプリング法を用いることにより、Src チロシンキナーゼと基質ペプチドの結合ポーズの特定を目指した。

(2) cAbl キナーゼと Imatinib 阻害剤の gREST/REUS 法のパラメータ調整

gREST 法と REUS 法 (Replica Exchange Umbrella Sampling) を組み合わせた gREST/REUS 法を用いることで、様々な中間状態や結合経路を効率的にサンプリングできる。gREST 法で系の一部の有効温度を向上させ、系のコピー (レプリカ) 間で有効温度を交換させる。REUS 法でタンパク質-リガンドの距離空間でレプリカ間で交換させる。二次元レプリカ交換を行うことにより、自由エネルギー地形の収束性を大幅に向上させることができる。柔軟性が高い Imatinib 阻害剤と cAbl キナーゼとの結合経路予測に gREST/REUS 法を応用し、最も効率よくサンプリングできる gREST/REUS 法のパラメータの探索を行った。

(3) 静電相互作用計算を高速化した FEP の開発

従来の FEP 法では、静電相互作用計算で PME 法を用いた場合、高速フーリエ変換 (FFT) が余分に必要となるため、通常の分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) 計算よりも計算コストが高くなる。計算コストを削減するため、本研究では部分電荷に非線形なスケーリングを導入した FEP 法を提案する。このスケーリングは REST2 法等で用いられているものと同様で、FFT の計算回数を抑えることで静電相互作用計算を高速化できる。非線形スケーリング FEP 法を MD 計算ソフト「GENESIS」に実装し、タンパク質-タンパク質結合親和性の予測に応用した。

(4) 溶媒-溶質の LJ 相互作用と水和自由エネルギーの関係の調査

細胞内環境における水和自由エネルギーの計算は、周囲を十分に水が満たしているバルク環境とは全く異なり、分子混雑系を考慮することが必要となる。しかし、分子混雑系では力場の精度が著しく低下することが知られている。これは、そのような混雑環境においては、溶質が凝集しすぎる問題があるからである。そこで溶媒-溶質間の Lennard-Jones (LJ) 相互作用を強めることでこの問題に対処する方法があり、これらは NBFIX (Non-bonded Fix) と呼ばれる。本研究では実験値が知られており、かつ構造の単純な低分子であるメタンとメタノールに対して、異なる NBFIX パラメータを使用して水和自由エネルギーを計算した。これにより、NBFIX の値がどのように水和自由エネルギーに影響するかを理解を目指した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

(1) Src キナーゼと基質ペプチドの結合ポーズ探索

Src チロシンキナーゼに対して、これまで2つの結合ポーズが提案されてきた (図 1)。1つは cleft orientation、もう1つは C-lobe orientation と呼ばれており、これらの結合ポーズはセリン/スレオニンキナーゼやレセプター型のキナーゼで散見される。一方、最近になって、ディープラーニングを用いた構造予測法である AlphaFold2 が複合体の構造予測にも適用できるようになったが、それを用いたところ、cleft orientation と C-lobe orientation のちょうど中間に位置するような結合ポーズを予測した。しかし、この結合ポーズの信頼性スコアはかなり低く、この予測をそ

のまま鵜呑みにすることはできない。本研究では、まず基質ペプチドとその周囲にある Src キナーゼの Activation loop を solute region として gREST シミュレーションを実行し、結合ポーズに関するサンプリングを行った。次に、サンプリングの結果得られた結合ポーズに対して $1\mu\text{s}$ の分子シミュレーションを行い、その構造安定性について調べた。最後に、NMR (paramagnetic relaxation enhancement) の結果と比較することにより、得られた結合ポーズが実験結果とコンシステントであるかについて調べた。

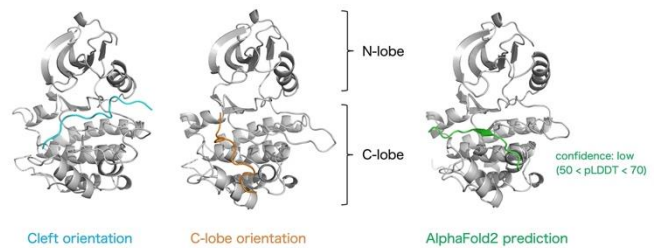


図 1: Src キナーゼと基質ペプチドの結合ポーズ

(2) cAbl キナーゼと Imatinib 阻害剤の gREST/REUS 法計算のパラメータ調整

cAbl キナーゼと Imatinib 阻害剤の gREST/REUS シミュレーションを行い、結合経路のサンプリングを行う。そのために、gREST 法と REUS 法のそれぞれのパラメータ調整を行い、サンプリング効率の向上を確認した。

(3) 静電相互作用計算を高速化した FEP の開発

タンパク質-タンパク質間の相互作用を理解するため、境界面のアミノ酸をアラニンに置換する実験が多数行われている。従来の FEP 法と非線形スケーリング FEP 法を比較するため、タンパク質-タンパク質の結合面のアミノ酸に摂動を与えて別のアミノ酸に置換し、その際の自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$) を求め、実験データと比較した。結合状態での計算 (図 2) と解離状態での計算 (図 3) を行うことで、熱力学サイクルからタンパク質-タンパク質結合自由エネルギーの変化 ($\Delta\Delta G$) を計算した。計算対象として、Barnase と Barstar の複合体における Tyr29 から Ala への置換 (Y29A 変異) を用いた。

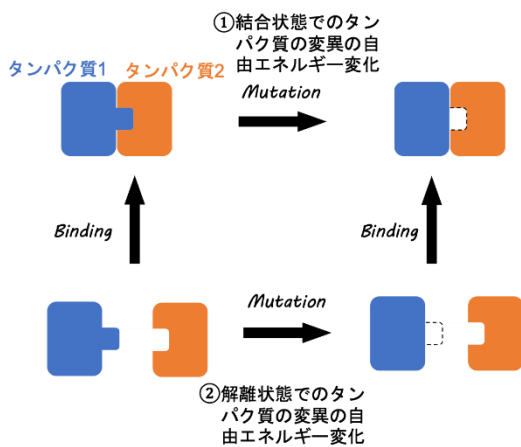


図2：タンパク質-タンパク質結合とアミノ酸置換の熱力学サイクル

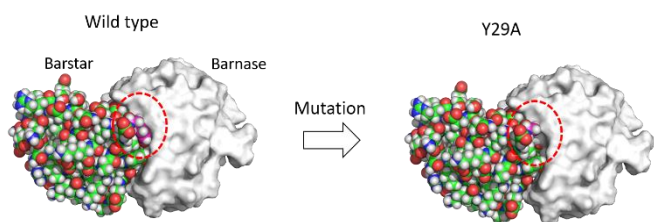


図3：Barnase-BarstarのY29A変異。

(4) 溶媒-溶質のLJ相互作用と水和自由エネルギーの関係の調査

力場を構成するポテンシャル項(距離、角度、二面角、LJ相互作用、クーロン相互作用)の内、溶質-溶媒間のLJ相互作用に対してのみスケール係数 λ をNBFIXパラメータとして掛ける(図4)。この補正により、溶質-溶媒間のLJ相互作用の力が強まることになる。本研究ではCHARMM力場の1つであるc36m力場に対してこの補正を行い、NBFIXパラメータの異なる力場それぞれに対してFEP法を用いて水和自由エネルギー ΔG_{solv} を計算した。

Force field

$$V = V_{bond} + V_{angle} + V_{dihedral} + V_{LJ} + V_{elec}$$

LJ potential with NBFIX parameter λ

$$V_{LJ}(r_{ij}) = \lambda \epsilon_{ij} \left(\left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right)$$

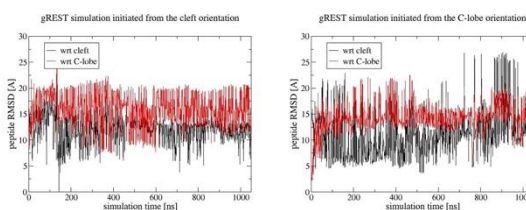
図4：NBFIXパラメータの式と概念図

3. 結果

(1) Srcキナーゼと基質ペプチドの結合ポーズ探索

Cleft orientation及びC-lobe orientationを持つ構造を初期構造としてgRESTシミュレーションを行い、Srcキナーゼと基質ペプチドの複合体の構造サンプリングを行った。その結果、初期構造に関わりなく、cleft orientationがよくサンプリングされること(RMSDの値が5 Å以下)がわかった(図5上)。一方、C-lobe orientationは、ほとんどサンプリングされなかった。これはC-lobe orientationが結合ポーズとして不适当であることを意味する。また、初期構造に用いていないにも関わらず、gRESTシミュレーションでAlphaFold2 orientationに近い構造がサンプリングされていることがわかった(図5下)。

Cleft orientation is more likely than C-lobe orientation



AlphaFold2-like orientation is also sampled

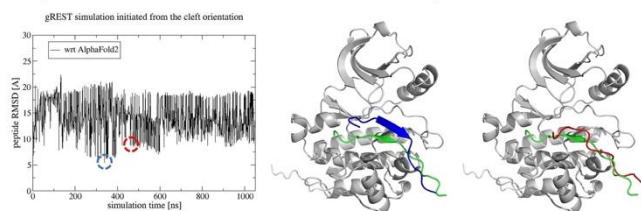


図5：gREST法による構造サンプリング

次に、サンプリングされた結合ポーズの構造安定性を調べるために、3本の独立な1 μ sの分子シミュレーションを行った(図6)。その結果、cleft orientationは、100 nsの時間スケールでは比較的安定しているが、1 μ sの時間スケールでは不安定であることがわかった。これは、cleft orientationが結合ポーズとして不适当であることを意味する。一方、AlphaFold2 orientationは1 μ sの時間スケールにわたって安定していた。

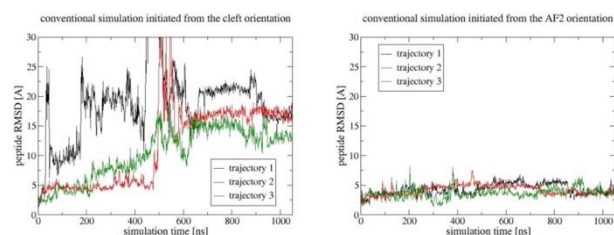


図6：結合ポーズの構造安定性

最後に、AlphaFold2 orientation が NMR の結果とコンシステントであるかを調べた。最近の NMR 実験 (paramagnetic relaxation enhancement) によると、基質ペプチドの P+5 番目のアミノ酸残基 (P はリン酸化されるアミノ酸残基の番号) に PROXYL と呼ばれるプローブを取り付けると、それが図 7 左に示した Src キナーゼの領域に近づく (15 Å 以内) ことが明らかになった。AlphaFold2 orientation に対する分子シミュレーションの結果を用いて、これらの領域と P+5 番目のアミノ酸残基との距離の分布を求めたところ、確かに 15 Å 以内に近づいていることを示すことができた (図 7 右)。これは、AlphaFold2 orientation が実験結果とコンシステントであることを意味する。

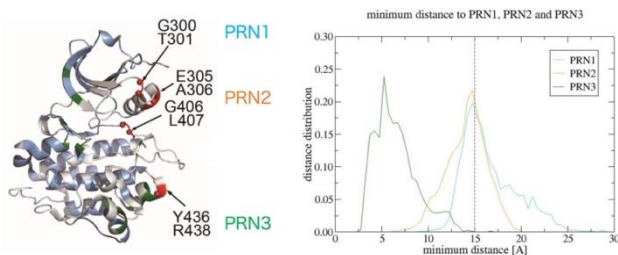


図 7 : Paramagnetic relaxation enhancement の結果とシミュレーション結果の比較

これらの結果により、Src キナーゼと基質ペプチドの結合ポーズが AlphaFold2 orientation であると結論づけることができる。

(2) cAbl キナーゼと Imatinib 阻害剤の gREST/REUS 法計算のパラメータ調整

最初に、結合構造から Umbrella sampling シミュレーションを用いてリガンドを徐々に引っ張り、REUS レプリカを作成した (図 8)。

次に、1 次元で gREST の温度調整を GENESIS の Automatic Tuning 機能を用いて、5 つのラウンドを通して 8 個の温度を決めた。1-5 ラウンドで温度が収束していくのが見られる。

最後に、REUS のタンパク質-リガンド距離の調整を 1 次元で行った。数回のラウンドを通して、距離分布を確認しながら、距離、Force constant を調整しながら決めた。

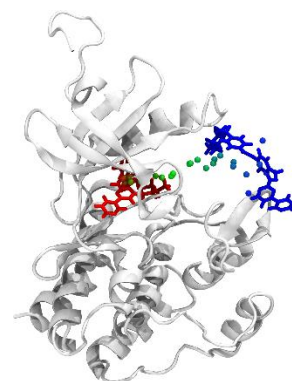


図 8 : Abl-Imatinib リガンドの REUS レプリカ初期構造作成

(3) 静電相互作用計算を高速化した FEP の開発

Barnase-Barstar の複合体の Tyr29 を Ala に置換したときの自由エネルギー変化を計算した。結果は下表のようになり、非線形スケーリング FEP 法は従来の FEP 法の結果をよく再現できた。しかし、両結果とも実験データから 1kcal/mol 以上小さくなった。先行研究において、CHARMM 力場は Barnase-Barstar の結合自由エネルギーを過小評価することが知られており、FEP 計算結果と実験値とのずれは力場パラメータに由来するものだと考えられる。非線形スケーリング FEP 法は、タンパク質の変異に対して従来法と同程度に正しく計算できることが確認できた。

アミノ酸置換	非線形スケーリング FEP 法 (kcal/mol)	従来の FEP 法 (kcal/mol)	実験結果 (kcal/mol)
Y29A	1.67	1.34	3.4

(4) 溶媒-溶質の LJ 相互作用と水和自由エネルギーの関係の調査

NBFIX パラメータと水和自由エネルギーには負の相関が確認された。溶媒-溶質間の LJ 相互作用と強化することは、溶質の溶媒に対する親和性を高めることでもあるので、この結果は定性的に妥当である。本研究で使用した溶質はメタンとメタノールであるが、その水和自由エネルギーの実験値はそれぞれ 1.93 (kcal/mol) と -4.86 (kcal/mol) である。図 9 では実験値はそれぞれい横線で表示してある。実験値を再現するためには、おおよそ NBFIX が 1.2 程度必要であることが確認できる。ただしメタンとメタノールでは必要な値が異なることからわかるように、統一的なパラ

メータを1つ決定することは困難であることもわかった。しかし厳密に一致させることは困難であっても、比較的小さい NBFIX パラメータを設定することで実験値に近づくこと、すなわち水和に関する力場の精度が向上することが確認された。

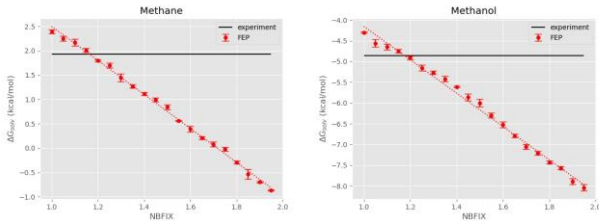


図 9 : NBFIX と水和自由エネルギーの関係

4. まとめ

Src キナーゼと基質ペプチドの拡張アンサンブル g REST 法、 $1\mu\text{s}$ 従来 MD シミュレーション、NMR 実験データとの比較を行うことにより、AlphaFold2 で得られた cleft orientation と C-lobe orientation の中間構造が適切な結合構造であることを明らかにした。

cAbl キナーゼと Imatinib リガンドの結合経路を2次元拡張アンサンブル gREST/REUS 法でサンプリングするためのパラメータ調整を行い、レプリカ空間の交換率が高い、効率的な構造サンプリングができることを確認した。

従来 FEP 法より計算コストが低い非線形スケーリング FEP 法を GENESIS に導入した。タンパク質-タンパク質結合自由エネルギーをアミノ酸残基の変異に対して計算し ($\Delta\Delta G$)、非線形スケーリング FEP は従来法と同程度に正しく計算できることが確認できた。

溶媒-溶質間の LJ 相互作用に対して NBFIX スケーリングを掛け、CHARMM の C36m 力場を用いてメタンとメタノール溶質の水和自由エネルギーを計算した。1.2 程度の比較的小さいパラメータを使うことによりが実験値

に近い値が計算で再現されることがわかった。

5. 今後の計画・展望

(1) Src キナーゼと基質ペプチドの結合

今後は、Src キナーゼと基質ペプチドの結合が、Src キナーゼとリガンド (ATP や阻害剤) の結合に与える影響を明らかにすることを目標とする研究を行う。より具体的には、(i) 基質ペプチドとの結合がリガンド結合部位の構造に与える影響を調べる、(ii) Src キナーゼとリガンドの結合自由エネルギーが、基質ペプチドの存在によりどのように変化するかを FEP 法を用いて調べる、という研究課題を遂行する計画である。

(2) cAbl キナーゼと Abl リガンドの g REST/REUS 法計算のパラメータ調整

今後は、Abl キナーゼの変異体が、リガンド結合経路、構造分布にどのような影響を与えるか明らかにすることを目標とする。Abl の変異体の gREST/REUS シミュレーションのパラメータ調整を行う。

(3) 静電相互作用計算を高速化した FEP の開発

系が大きくなるほど FFT が律速になるため、非線形スケーリング FEP 法は大きな生体系で特に有効になる。実際の細胞内では様々な生体分子が高密度で存在している混雑した環境となっている。混雑環境での FEP 計算は計算コストが大きいため行われてこなかったが、本手法を用いて結合自由エネルギー計算などを行っていきたい。

(4) 溶媒-溶質の LJ 相互作用と水和自由エネルギーの関係の調査

NBFIX 導入の目的は分子混雑系でのシミュレーションの精度を高めることである。本研究では適切な NBFIX パラメータは、水和に関する力場の精度を高めることが確認された。この見地を元に次は混雑系での自由エネルギーを求めることを行っていきたい。

2021 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. J. Jung, K. Kasahara, C. Kobayashi, H. Oshima, T. Mori, Y. Sugita, "Optimized hydrogen mass repartitioning scheme combined with accurate temperature/pressure evaluations for thermodynamic and kinetic properties of biological systems", *J. Chem. Theory Comput.* **17**, 5312-5321 (2021)
2. W. Ren, H. Dokainish, A. Shinobu, H. Oshima, Y. Sugita, "Unraveling the coupling between conformational changes and ligand-binding in ribose binding protein using multi-scale molecular dynamics and free-energy calculations", *J. Phys. Chem. B*, **125**, 2898-2909 (2021)
3. A. Shinobu, C. Kobayashi, Y. Matsunaga, Y. Sugita, "Coarse-Grained Modeling of Multiple Pathways in Conformational Transitions of Multi-Domain Proteins", *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 2427-2443 (2021)
4. K. Kasahara, S. Re, G. Nawrocki, H. Oshima, C. Mishima-Tsumagari, Y. Miyata-Yabuki, M. Kukimoto-Niino, I. Yu, M. Shirouzu, M. Feig, Y. Sugita, "Reduced Efficacy of a Src Kinase Inhibitor in Crowded Protein Solution", *Nat. Commun.* **12**, 4099 (2021)

【口頭発表】

1. 尾嶋拓, "Development of a new free-energy perturbation method for reducing the computational cost of electrostatic interactions", 第 59 回日本生物物理学会年会, 2021 年 11 月 25-27 日, オンライン
2. 信夫愛, "Coarse-grained simulations of multiple intermediates along conformational transition pathways of multi-domain proteins", 第 59 回日本生物物理学会年会, 2021 年 11 月 25-27 日, オンライン

【ポスター発表】

1. 尾嶋拓 李秀榮, 杉田有治, "GENESIS と CHARMM-GUI を用いたリガンド結合自由エネルギー計算", 第 21 回日本蛋白質科学会年会, 2021 年 6 月 17 日, オンライン
2. Ai Shinobu, Chigusa Kobayashi, Yasuhiro Matsunaga, and Yuji Sugita, "Coarse grained simulations of multiple intermediates along conformational transition pathways of multi domain proteins", 第 21 回日本蛋白質科学会年会, 2021 年 6 月 17 日, オンライン
3. Song-Ho Chong and Yuji Sugita, "Molecular Modeling of Kinase-Peptide Substrate Bound Structure Based on Generalized Replica Exchange with Solute Tempering", The 4th R-CCS International Symposium, February 2-7 2022, Online
4. Daiki Matsubara, Kento Kasahara, Hisham Dokainish, Hiraku Oshima and Yuji Sugita, "Changes in peptide stability by increasing protein-water interactions", The 4th R-CCS International Symposium, February 2-7 2022, Online
5. Ai Shinobu, Suyong Re and Yuji Sugita, "Characterizing the binding mechanism of c-Src Kinase to its inhibitors using molecular dynamics simulations", The 4th R-CCS International Symposium, February 2-7 2022, Online