

課題名 (タイトル) :

計算科学的手法を用いたタンパク質の動態と機能・制御分子の研究

利用者氏名 : ○平野秀典, 二木紀行, 沖本憲明, 末永敦, 野内涼子, 森本元太郎,
大塚教雄, 近藤寛子, 山岸純也, 新保雄大, 曾田邦嗣,
井阪悠太, ムハメドアブヅルマウヅウザヘド, 泰地真弘人

所属 : 神戸研究所 生命システム研究センター 計算分子設計研究グループ

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

近年の構造生物学の進歩により、膨大な生体高分子の立体構造が解明されてきている。これらの生体高分子の機能・構造・ダイナミクスをより深く理解するためには、計算機シミュレーションは必須である。特に、分子シミュレーション(分子動力学(MD)計算や量子力学(QM)計算)は、この研究において非常に効果的である。これまで、当研究チームでは、MD 計算や QM 計算を使って、生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの研究を行ってきた。そこで、従来の研究を踏まえて、生体高分子機能を制御する分子を設計する研究を行う。

本研究の目的は「生体高分子機能を制御する分子の設計」であり、

- 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
- 計算の効率化のためのソフトウェアの拡張・性能向上

の3つの研究を行う。以下に3つの研究の詳細を記す。

- 生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの理解については、特に、対象分子の柔軟性を理解することは非常に重要なことであり、様々な分子シミュレーション技法を使ってその特徴を抽出することを試みる。
- 標的分子を制御する分子の設計については、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、MD 計算、QM 計算を組み合わせる必要がある。
- 計算の効率化のためのソフトウェアの拡張・性能向上については、前述の作業効率を向上する

ため、使用するソフトウェアの機能向上を行う必要がある。

2. 具体的な利用内容、計算方法

生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの理解

拡張アンサンブルの手法を用いた構造サンプリング
(平野、末永、沖本、近藤)

タンパク質などの構造サンプリングの効率を上げるため、新たな拡張アンサンブル法を開発、評価する。現在、新規レプリカ交換法を開発中で、その試行錯誤のために膨大な MD 計算を実行する必要がある。

実際の標的タンパク質に対し拡張アンサンブルの手法を試み、機能制御分子設計のための構造サンプリングを行う(沖本、森本)。分子ドッキングが失敗する大きな要因は、タンパク質の柔軟性を考慮していないことにある。そこで、拡張アンサンブルなどの計算によりタンパク構造をあらかじめサンプリングし、これらを使用し分子ドッキングを行う。ここでは、レプリカ交換等の MD 計算を実行する。

酵素タンパクの機能は基質特異性と触媒反応を伴う。これらの現象の理解には電子状態を考慮した化学反応を追跡することが必要とされる(大塚)。特に、円滑に化学反応を遂行するための重要なアミノ酸などを原子レベルで同定することは、制御分子設計において非常に重要な情報となる。ここでは、膨大な QM 計算を実行する。(大塚)

タンパク質分子の水溶液について分 MD シミュレーションを行う。このとき、いくつかの異なる圧力条件でシミュレーションし、圧力依存性を議論する。次に、得られたトラジェクトリーについて分子体積及び、残基毎及び原子毎の占有体積を評価し、その動力学特性を解析する。解析の主な手法は、離散フーリエ解析及び相関関数解析である。さらに、それぞれのタンパク

質分子について約 1 マイクロ秒のシミュレーションから得られたトラジェクトリーから、構造転移の有無や体積揺らぎの解析を行う(新保)。

生理的溶液条件下にある蛋白質分子について、 μs 域に近い長時間の分子動力学シミュレーション (MDS) を実行した。幾つかの異なる圧力条件下で MDS を行い、溶媒水を含む非水素原子の時系列座標データを得た。得られた蛋白分子・溶媒水の原子座標データを用いて、蛋白質の分子体積、全残基、及び全原子の占有体積を評価すると共に、蛋白分子の水和サイトの構造と、水和水の構造揺らぎを解析した。解析の手法としては、主に主成分分析、最小自乗適合法、離散的フーリエ変換による緩和スペクトル解析及び相関関数解析である。(曾田・新保)。

また、V1-ATPase b の回転機構に関する研究も行う。Grubmuller らはイオン輸送性 ATPase の一種である F 型 ATPase の触媒頭部部分について、回転軸にトルクを掛けて分子動力学シミュレーションを行い、ATP 加水分解に伴う回転機構の原子レベルでの解析を行った (Nature Struct. Biol., 9, 198-202 (2002))。そこで、V 型 ATPase の立体構造が最近解明されたことに伴い、F 型 ATPase 同様分子動力学シミュレーションにより、ATP 加水分解の化学結合のエネルギーから回転の力学的エネルギーへの生体エネルギー変換機構を解明することを目的とした V1-ATPase の回転機構に関する研究も行う。(ムハメドアブズルマウヅウザヘド、井阪)

標的分子を制御する分子の設計

前述した方法でサンプリングを行った複数のタンパク構造に対し分子ドッキングを行い評価検討する(沖本、森本)。ここでは、膨大な分子ドッキングによる試行錯誤を行う。

化合物最適化では非常に厳密な精度結合自由エネルギーの予測が要求される。これらの精度を満たすような薬剤最適化向け計算手法の評価と開発を行う(沖本、末永、森本、ムハメドアブズルマウヅウザヘド、井阪)。ここでは、タンパク質と阻害剤の相互作用の強さをパラメータとして変えながら多数の MD を実行し、幅広いサンプリングによって結合自由エネルギーを評価する手法である自由エネルギー摂動計などの MD 計算を行う。この際、薬剤の電荷決定等で Gaussian などを使用する(二木、平野)。また、MD 計算による結合自由

エネルギー予測に加えて、大規模生体分子系のための量子化学計算手法によるタンパク質と制御分子複合体間の相互作用エネルギーの評価、さらに個々と複合体における電子状態の解析も行う(大塚)。

機能制御分子の副作用の研究

これまでに述べた方法により確立された方法を応用し、複数のタンパク質に対して薬剤候補の副作用を予測するシステムを開発する。ターゲットとなるタンパク質はキナーゼとし、主に抗がん剤における副作用を調査する。キナーゼ・薬剤候補それぞれについて複数種を組み合わせた計算を行う。

情報伝達系タンパク-タンパク間相互作用の構造予測とその解析

細胞内情報伝達系において最も広く研究されている膜受容体型チロシンキナーゼ (RTK) に関して、網羅的なタンパク質複合体モデル構造構築を行う。RTK の代表的な受容体である ErbB ファミリー (EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4) に対し、それら受容体と結合するタンパク質群 (約 100 種類) をドッキングさせる。タンパク質の構造が明らかでない場合、ホモロジーモデリングによりモデル構造を構築しておく。それらタンパク質複合体においては、結合部位が良く研究され分かっている場合が多い。そのため、タンパク質ドッキングにおいては、より精度を高めるために、2 つのタンパク質 (結合部位) の距離を徐々に近くしていく分子動力学シミュレーションを行う。分子動力学シミュレーションを行うことで、通常 (市販) のドッキングソフトでは取り入れられないタンパク質の揺らぎを陽に取り扱うことができる。

前述の計算の効率化のためのソフトウェアの拡張・性能向上

これまでに述べた拡張アンサンブルの MD 計算や自由エネルギー予測法にはソフトウェアの改変・性能向上が必須である。改変ソフトウェアの動作確認、スピード評価を行う(泰地)。

3. 結果

生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの理解**拡張アンサンブルの手法を用いた構造サンプリング
実際の標的タンパク質に対し拡張アンサンブルの手法
について**

Amber10 に MDGRAPE3 を対応させ、レプリカ交換法による計算を行った。(森本)

既存の拡張アンサンブル手法の 1 つであるレプリカ交換法 (REMD) を使って、数種のタンパク質の構造変化を観察した。DHFR の野生型と変異型を対象とした計算結果 (300-400K/40 レプリカ) から、構造変化の違いを効果的に抽出できた。これらのデータを今後創薬研究に適用していく予定である。(沖本)

BPTI タンパク質の各種変異体について拡張アンサンブル MD シミュレーションにより検証した。その結果、熱安定性を獲得した BPTI 変異体の原子レベルでのメカニズムを解析が可能となる。(末永)

タンパク質分子の水溶液について

水溶液中の蛋白質 lysozyme について、加圧条件で 300 ns の MDS を実行し、動的特性を予備解析した。水和効果を取り込んだ解析を行う為に、MDS の結果から蛋白質の水和サイトを自動同定する手法を開発し、これを本計算で得た時系列データに適用した。その結果、蛋白質の水和状態は、極性基と水の水の多様な配置に関する加重平均であることを見出した。更に、水和水数の揺らぎに対する蛋白質と水の水の構造揺らぎの寄与を定量した結果、両方が水和水数の揺らぎに重要であり、其々同程度の大きさの寄与をもつことを明らかにした。(曾田・新保)

V型ATPaseについて

東京理科大学の山登研究室の西條らにより構造決定が行われた V 型 ATPase の立体構造を基に、分子動力学法によるシミュレーションを行った。シミュレーションソフトは Amber10 を用いた。

タンパク質に球形の水を発生させ、生体内の環境に類似させた状態で、回転軸周りに外力を発生させ強制回転シミュレーションを行った。今後はそのトラジェクトリーを解析することにより、強制回転に伴う触媒頭部分の構造変化を調べ、そこからエネルギー変換機構について考察する予定である。また、ヌクレオチドの結合の際の自由エネルギー計算を行った。

まず回転シミュレーションの前段階として、安定なシミュレーションが可能であるか確認した。平衡化を約 1ns 行ない、RMSD 値は約 2.3Å 付近であったことから、安定なシミュレーションが可能である。来年度も引き続きシミュレーションを行う。(井阪) 自由エネルギー計算に関しては、実験値と相関のとれた値が得られつつあるため、来年度も引き続き計算を行う必要がある。(ムハメドアブズルマウヅウザヘド)

標的分子を制御する分子の設計**複数のタンパク構造に対し分子ドッキングを行い評価
検討することについて**

今年度は、複数の実験構造 (X 線構造) を使って分子ドッキングによる評価を行った。ここで、構造の選択の仕方によって結果が変わってくるのがわかった。今後はシミュレーションによる構造サンプリングも含めて構造選択の方法について検討していく予定である。

(沖本、森本)

薬剤最適化向け計算手法の評価と開発について

藤谷らによる MP-CAFEE 法を取り入れた GROMACS-3.1.4 を利用し、2009 年新型インフルエンザノイラミニダーゼとその変異体に対するタミフル、リレンザの結合自由エネルギー計算を行った。また、リボヌクレアーゼを用いて万単位のドッキングシミュレーションが可能であることを確認した。その際、ライブラリの分割、バルクジョブの機能を使った。ドッキングソフトは GOLD を使用した。(森本)

薬剤の電荷決定等で Gaussian などを使用する

分子ドッキングを行うための薬剤候補化合物について、電荷やパラメータ決定のために Gaussian を使用した。各個の分子ドッキングの際に必要な応じた計算を行った。(二木、平野)

MD 計算による結合自由エネルギー予測に加えて、大規模生体分子系のための量子化学計算手法によるタンパク質と制御分子複合体間の相互作用エネルギーの評価、さらに個々と複合体における電子状態の解析も行う (大塚)。

これまでにリガンド分子とタンパク質分割法の指針、基底関数の依存性、MP2 による電子相関計算による精度検証から、FMO2-MP2/6-31G(d)の計算レベルを用いる事で実験値との相関が強く得られる事を報告してい

る。

今年度は、1 フラグメント 1 残基(1F1R)のフラグメント分割を基準とし、6-311G(d)基底関数を用いた結果を得た。

図 1 は、FMO-HF 法による相互作用エネルギーの計算値と実験値との比較である。基底関数のサイズを大きくしても相関係数の改善は見られない事が分かる。

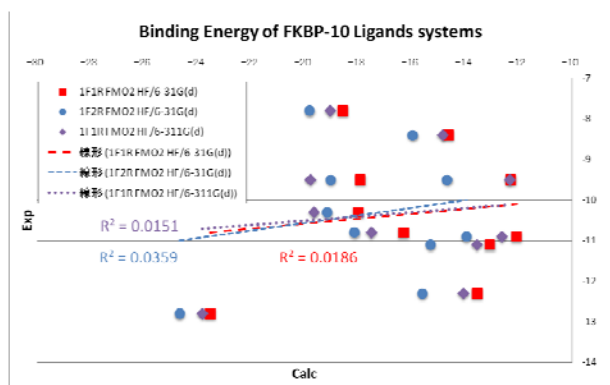


図 1. FKBP-10 ligands 系の FMO-HF 法による相互作用エネルギー計算値と実験値の相関

図 2 は、FMO-MP2 法による結果を示している。これまでの知見通り、HF 計算よりも MP2 計算の方が実験値との相関が強い結果を示した。1F1R による MP2/6-311(d)計算と MP2/6-31G(d)計算の相関係数 R はそれぞれ、0.80、0.76 であり、基底関数を大きくする事で相関係数を改善する結果が得られた。これは、1F2R による MP2/6-31G(d)計算の R = 0.79 とほぼ同等であった。しかしエネルギーは 4-8 kcal/mol 程度、いずれも負値へシフトしている。各手法と基底関数の組み合わせに対する計算値と誤差の評価は重要である事が分かる。

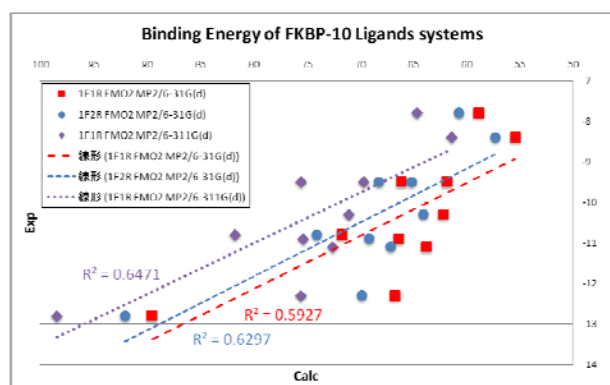


図 2. FKBP-10 ligands 系の FMO-MP2 法による相互作用エネルギー計算値と実験値の相関

(大塚)

機能制御分子の副作用の研究

今年度は 4 種のキナーゼに対して分子動力学シミュレーションにより結合親和性を評価した。しかし、タンパク構造の違いや計算精度の問題から薬剤選択性を判別することが困難であることがわかった。計算手法の見直しを含めて再検討する必要があると思われる (二木)

情報伝達系タンパク-タンパク間相互作用の構造予測とその解析

情報伝達系、特に膜受容体チロシンキナーゼ系に関するタンパク質の構造未決定のものについて構造モデリングを行い、さらにタンパク質-タンパク質複合体モデリング構築のための網羅的なドッキングシミュレーションを行った。これにより、実験では得ることの困難な構造データベースおよびタンパク質間相互作用データベースの構築整備を目指している。(末永)

前述の計算の効率化のためのソフトウェアの拡張・性能向上

現在、拡張アンサンブルの MD 計算や自由エネルギー予測法の効率化のためのソフトウェアの拡張・性能向上に向けて開発・チューニングを行っている。(泰地)

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・ダイナミクスを理解
- 標的分子を制御する分子の設計
- 計算の効率化のためのソフトウェアの拡張・性能向上

について研究を行った。

それらの結果は、学術会議等で発表された。

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。制御分子の設計では、特に、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

平成 22 年度 RICC 利用報告書

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. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況（どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか）や、継続して利用する際に行う具体的な内容

当研究チームでは、MD 計算や QM 計算を使って、生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの研究や生体高分子機能を制御する分子を設計する研究を行っている。その結果は学会会議等で報告してきた。しかしながら、生体高分子の機能・構造・ダイナミクスの理解や標的分子を制御する分子の設計については、その対象となる分子が多岐にわたるため、さらなる研究を遂行する必要があり、来年度の継続使用を強く希望する。

7. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由

今年度は研究室が横浜から神戸への移動やそれに伴う人の異動もあり、当初の計画通りに研究を遂行することが困難となったため、計算時間を使いきるができなかった。

平成 22 年度 RICC 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの発表】

1. 沖本 憲明, 山岸 淳也, 末永 敦, 星野 忠治, 泰地 真弘人 「計算機支援による合理的ペプチド設計手法の開発」 日本薬学第 131 年会 静岡、2011 年 3 月
2. 沖本 憲明, 山岸 淳也, 末永 敦, 岡田 眞里子, 今本 公, 星野 忠治, 泰地 真弘人「Computer-Aided Peptide Design: Application to Biomolecules」, 第 3 回 バイオスーパーコンピューティングシンポジウム、神戸、2011 年 2 月
3. 沖本憲明 「ハイパフォーマンスコンピュータを利用した次世代創薬研究」 近畿化学協会コンピュータ化学部会 (ハイパフォーマンスコンピューティングによるバイオ・創薬シミュレーションの新展開)、大阪、2011 年 1 月 31 日 (招待講演)
4. 沖本 憲明, 山岸 淳也, 末永 敦, 星野 忠治, 泰地 真弘人 「計算機支援による合理的ペプチド設計手法の開発」 第 24 回分子シミュレーション討論会 福井、2010 年 11 月 25 日
5. 沖本 憲明, 山岸 淳也, 末永 敦, 岡田 眞里子, 今本 公, 星野 忠治, 泰地 真弘人「Computer-Aided Peptide Design: Application to Biomolecules」, 第 48 回日本生物物理学会年会、仙台、2010 年 9 月
6. Kunitsugu Soda, Yudai Shimbo, Yasutaka Seki and Makoto Taiji, “Dynamic Behavior of Internal Hydration Waters of Lysozyme”, International Symposium on Solvation and Ionic Effects in Biomolecular Recognition, (May 18, 2010, Tsakhkadzor, Armenia)
7. Yudai Shimbo, Kunitsugu Soda and Makoto Taiji, “Fluctuation of the Number of Hydration Waters in Lysozyme”, The 3rd Biosupercomputing Symposium, (2011 年 2 月 21-22 日, 神戸)
8. Yudai Shimbo, Yasutaka Seki, Makoto Taiji, and Kunitsugu Soda, “Physical Properties of Protein Hydration. I. Statistics of Hydration Sites”, 第 48 回日本生物物理学会年会, (2010 年 9 月 20-22 日, 仙台)
9. Kunitsugu Soda, Yudai Shimbo, Yasutaka Seki, and Makoto Taiji, “Physical Properties of Protein Hydration. II. Dynamics of Hydration Sites”, 第 48 回日本生物物理学会年会, (2010 年 9 月 20-22 日, 仙台)
10. 新保 雄大, 関 安孝, 泰地 真弘人, 曾田 邦嗣: 「水和によるリゾチーム構造の緩和と再生の分子機構」, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, (2010 年 6 月 16-18 日, 札幌)
11. 曾田 邦嗣, 新保 雄大, 関 安孝, 泰地 真弘人: 「脱水蛋白質の構造揺らき動力学の温度依存性とその分子機構」, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, (2010 年 6 月 16-18 日, 札幌)
12. 大塚教雄, “オーダーN 法第一原理計算による DNA 系の大規模計算”, 日本化学会第 4 回関東支部大会, つくば, 2010 年 8 月, (依頼講演)
13. T. Otsuka, T. Miyazaki, N. Okimoto, M. Taiji, D. R. Bowler, and M. J. Gillan, “Structure relaxation of FKBP (FK506 binding protein) complexes using the order-N DFT code CONQUEST”, Psi-k conference 2010, Berlin、2010 年 9 月
14. 大塚 教雄, 宮崎 剛, 沖本 憲明, 泰地 真弘人, David R. Bowler, Michael J. Gillan, “Binding energy calculations of FKBP complexes using the order-N DFT code CONQUEST”, 第 3 回バイオスーパーコンピューティングシンポジウム, 神戸, 2011 年 2 月