

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18520

研究課題名(和文)全原子構造探索によるリガンド結合過程の解析

研究課題名(英文)Multiscale enhanced sampling for ligand binding

研究代表者

森次 圭(Moritsugu, Kei)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任准教授

研究者番号：80599506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質などの生体分子は、他のタンパク質や低分子化合物(リガンド)と特異的に相互作用することにより構造を変化させ、シグナル伝達や転写制御といった機能を発揮する。本研究では、研究代表者が開発したMulti-scale Enhanced Sampling法の適用によりリガンド結合過程の計算機シミュレーションに取り組み、生理学的環境に沿った溶媒中での網羅的な全原子構造探索に成功した。得られた構造アンサンブルから自由エネルギー地形を計算し、受容体タンパク質の大きな構造変化とカップルしたリガンド結合過程の最適パスウェイを、側鎖相互作用形成や脱水和過程といった観点から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Biomacromolecules such as proteins realize the molecular functions such as signal transduction and transcriptional regulation through the structural changes which are highly regulated by the specific interactions with other proteins or ligand molecules. In this study, computer simulations of protein-ligand complexes were performed by applying our newly developed Multi-scale Enhanced Sampling, allowing all-atom structural sampling of the protein-ligand interaction processes in solution to be successfully achieved. The free-energy landscape was calculated using the derived structural ensemble and revealed the most probable pathway of the protein-ligand binding coupled with the protein structural change by way of the native side-chain interaction formations and the desolvation at atomistic resolution.

研究分野：計算生物物理

キーワード：リガンド結合 グルタミン結合タンパク質 グルタミン酸受容体 分子動力学シミュレーション MSES  
法 全原子空間探索

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質などの生体分子は、他のタンパク質や低分子化合物(リガンド)と特異的に相互作用することにより構造を変化させ、シグナル伝達や転写制御といった機能を発揮する。受容体タンパク質が揺らぎのなかでリガンド分子を認識・結合しそれをスイッチとして構造変化する「リガンド結合」のダイナミックな分子メカニズムを解明することは、細胞内における生命現象の素過程の物理化学的理解、さらに、立体構造に基づいた機能性分子の効率的な新規設計につながる。

リガンド結合は代謝系や細胞内外の情報伝達系などで見られる生命現象を特徴づける重要な化学過程の一つであり、従来から数多くの実験・計算的手法により解析が行われてきた。マクロな現象論としてまず速度論に基づいた解離定数や結合自由エネルギーの測定があり、構造生物学の発展に伴い、数多くのタンパク質-リガンド複合体の立体構造がX線結晶解析実験やNMRにより解かれ、リガンド結合・非結合構造データベースの構築やアナログ分子が結合した遷移・中間構造の同定も行われた。また、X線小角散乱(SAXS)や蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)などの一分子計測によりリガンド結合によるタンパク質構造や揺らぎの変化が測定された。さらに応用研究として、ドッキングシミュレーションによるタンパク質-リガンド複合体の立体構造予測、また、例えば酵素反応阻害剤といった薬剤の分子設計を立体構造に基づき行う手法の開発も進められた。しかしながら、リガンド相互作用に伴い基質ポケットの構造が変化(誘導適合が起きる)ことがよく知られており、そのようなタンパク質の動的な効果を考慮するためには分子動力学(MD)といった計算手法を併用する必要がある。例えば、リガンド結合における自由エネルギー変化がMDで計算されており、最近では、大規模計算資源を用いて(例えば反応座標に沿ったたくさんのレプリカで)計算を行うような統計力学的アプローチにより精密な結合自由エネルギーを計算することも試みられている。このような応用研究はスパコンを活用した「インシリコ創薬」として重要になっているが、ある特定の計算可能な経路に沿った過程、例えば、リガンド・タンパク質間距離をある一方向に遠ざけたときの自由エネルギー変化のみに注目しており、リガンドの結合とタンパク質の構造変化が共役した過程を直接観測していない点に不満が残る。そこで本研究では、計算機手法を適用し、生理学的環境下でのリガンド結合過程を原子レベルの解像度で直接シミュレートすることを目指した。

## 2. 研究の目的

生理学的環境下でのリガンド結合過程のシミュレーションを原子レベルの解像度で

実現し、複雑なリガンド-タンパク質側鎖間相互作用や水の脱水和過程が絡み合った環境で実体としての全原子立体構造に基づいたリガンド結合のイメージを構築することを研究目的とした。

従来の分子動力学シミュレーションでは、ミリ秒に及ぶ長時間のリガンド結合過程を直接シミュレートすることが困難であり、マルチカノニカル法や温度レプリカ交換法といった拡張アンサンブル法の導入が必須である。これらはタンパク質のフォールディング経路計算など幅広く用いられてきた手法であるが、自由度の大きな系、特に、溶媒をたくさん含んだ系への適用が難しく、また、構造変化とリガンド結合両方の自由度を拡張させるのは困難である。そこで、本研究代表者らが開発した新規の拡張アンサンブル法である MultiScale Enhanced Sampling (MSES)法を適用する。この MSES 法では、全原子自由度モデル(MM)とタンパク質自由度を粗視化したモデル(CG)両方の自由度で個々にシミュレーションを実行し、高速かつ広範に動くCGモデルがMMをドライブすることにより高解像度な全原子構造を効率的に得ることができる。本研究では、リガンド結合モデルとして実験や計算で研究が進んでいるグルタミン結合タンパク質と多くのアゴニスト・アンタゴニスト結合構造が解かれているイオンチャネル共役型グルタミン酸受容体に対して MSES 法を適用し、リガンドがタンパク質の基質ポケットに結合する経路を網羅的に探索した。また、リガンド結合経路上でリガンドが遷移・中間的に結合する立体構造を同定し、アゴニスト・アンタゴニスト構造との比較から新規薬剤の設計を試みた。

## 3. 研究の方法

リガンド結合モデルとして実験や計算が行われているグルタミン結合タンパク質(GlnBP)と多くのアゴニスト・アンタゴニスト結合構造が解かれているイオンチャネル共役型グルタミン酸受容体(iGluR)に対して、全原子構造サンプリングを MSES 法を用いて行った。GlnBPの研究では、得られた構造アンサンブルからグルタミンが GlnBP 基質ポケットに結合する経路を決定し、リガンド相互作用が誘起する GlnBP 構造変化過程、また、結合経路上でのグルタミン-基質間水素結合の形成過程を明らかにした。iGluRの研究では、グルタミン酸結合経路上の立体構造を遷移・中間状態を含めて決定し、カイニン酸などのアゴニスト・アンタゴニスト結合構造との比較を行った。

## グルタミン結合タンパク質(GlnBP)

MSES法では、全原子モデル( $V_{MM}$ )粗視化モデル( $V_{CG}$ )とそのカップリング( $V_{MMCG}$ )の力場を必要とする。 $V_{MM}$ としては初期構造

モデルとして結合構造 (PDB: 1WDN) の結晶構造を用い、溶媒水を陽に含んだモデル (約 3 万原子系) を構築した。力場は AMBER ff99SBildn を用いた。粗視化モデルの自由度としては  $C\alpha$  原子を用いる。全原子モデルの運動をドライブするための粗視化力場は、タンパク質構造変化を表現するタンパク質内相互作用とリガンド結合を表現するリガンド・タンパク質相互作用に分割し、タンパク質内相互作用としてはリガンド結合・非結合の 2 構造をつないだ (タンパク質の粗視化 MD 研究でよく用いられる) double-well 弾性ネットワークモデル、リガンド・タンパク質相互作用はリガンド結合構造において相互作用エネルギーが最安定になるような Lennard Jones 型ポテンシャルを用い、リガンドが結合サイト近傍をゆるやかに遷移できるようにした。 $V_{MMCG}$  としては、タンパク質内 (2 つのドメイン間) およびリガンド・タンパク質間の  $C\alpha$  原子ペアの距離を拘束した。ハミルトニアンレプリカ交換 MSES シミュレーションは、理化学研究所の自チームで独自に開発したマルチスケールシミュレーションプログラム  $\mu^2lib$  により実行した。

イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体リガンド結合ドメイン (iGluR)

初期構造としては、X 線結晶解析の構造モデル (PDB: 1FTJ) を用いた。MSES での力場は GlnBP 研究と同様に作成した。アゴニスト・アンタゴニスト複合体構造との比較を目的とすることから、リガンド運動をより広範に見る必要があるため、 $V_{CG}$  のリガンド・タンパク質相互作用を調整することで基質の結合サイトから 15 Å 程度の解離を可能にした。

#### 4. 研究成果

##### MSES 拡張手法の開発

MSES 法を巨大タンパク質のような広範な構造探索を必要とする系に適用するにあたり、全原子モデル (MM) の運動を効率的に高速化できるかという問題が生じる。本研究では、拡張手法として、断熱分離 (adiabatic separation) の考え方にに基づき粗視化モデルを運動エネルギー的に全原子モデルから切り離すことで粗視化モデルに高い運動エネルギーを与える近似を提案した。この拡張法では、Gibbs サンプルングに基づき CG シミュレーションを MM によらず単独で実行するため、従来法では時間を要した CG パラメタ決定が容易になる点においても、大規模系への応用に適していると考えられる。

この拡張法を溶媒中シニョリンのフォールディング過程に適用し、手法の妥当性を示した。折れ畳み構造からの RMSD 分布を見るとほぼ同じアンサンブルを生成することから、この近似手法でも十分な精度で正しい構造分布が得られることを示した (図 1)。また、CG 質量が小さいような近似適用範囲外の場

合には、得られる分布も正しくないことを実証した。

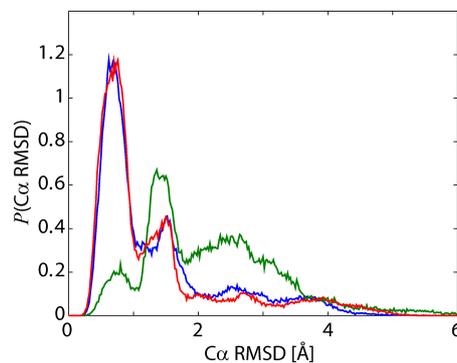


図 1: シニョリン折れ畳み構造からの RMSD 分布。従来法 (青) と拡張法 (赤、 $m_{CG} = 20000$ )、緑は拡張法で  $m_{CG} = 200$  の場合。

##### グルタミン結合タンパク質 (GlnBP)

タンパク質への低分子化合物 (リガンド) の結合は、代謝系や細胞内・外のシグナル伝達系に数多くみられる、生命活動を特徴づける重要な化学過程の 1 つである。タンパク質とリガンドの複合体の立体構造は数多く決定されているが、そのリガンドがタンパク質に結合する過程に関する知見は、実験の困難さから、ほとんど得られていない。また、分子シミュレーション研究でも、タンパク質の立体構造変化を伴うようなリガンド結合過程に関する知見は得られていない。

本研究では、リガンド結合過程の物理化学的理解を目指し、リガンド結合タンパク質のモデルとして実験・理論で用いられている GlnBP に対して MSES 法を適用し全原子構造探索を行った。16 個のレプリカを用いたハミルトニアンレプリカ交換 MSES により、計 250 ns のプロダクトランを実行した。

得られた全原子トラジェクトリについてまず GlnBP の結合構造からの RMSD と GlnBP/グルタミン間の native な原子コンタクトの割合 ( $Q$ ) を計算した結果、タンパク質構造・リガンド相互作用の両方に対して従来の brute-force MD に比べて広範なサンプリングが実現されることが示された。2 次元の自由エネルギー地形を見ると、概してリガンド結合構造を中心とした downhill なランドスケープであることがわかる (図 2)。

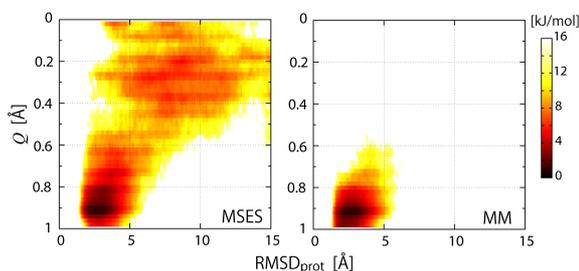


図 2: GlnBP 構造変化とグルタミン相互作用を軸にした自由エネルギー地形

さらに、得られた構造アンサンブルについてタンパク質構造・リガンド相互作用を軸としてクラスタリングを実行した結果、図3のような6つの状態に分けられることがわかった。つまり、S3U → S3L → S2L → S2LS → S1のようなリガンドが先に左側のドメインに結合してから GlnBP の構造が閉じるといったリガンド結合過程のパスウェイが得られると同時に、GlnBP の構造が閉じつつもリガンド相互作用が正しくない S2U の状態が dead-end であることを見出した。また、S2L と S2LS の間に rate-limiting な状態変化があり、その間に脱水をしつつリガンド相互作用が完成することを明らかにした。

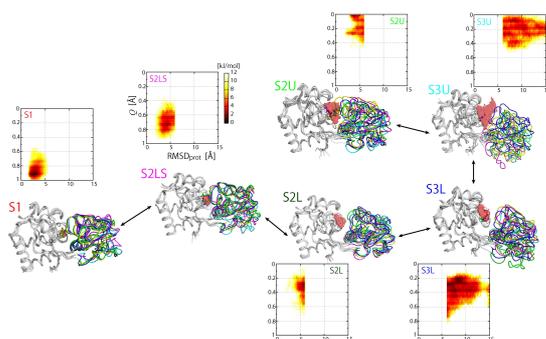


図3: GlnBP リガンド結合過程における6つの状態とその代表構造

イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体リガンド結合ドメイン(iGluR)

iGluR はグルタミン酸結合を介してイオンチャネルの開閉を制御しており、中枢神経系における記憶や学習等の脳の高次機能に重要な役割を果たしている。グルタミン酸結合・非結合の X 線結晶構造が解かれており、グルタミン酸の結合と受容体タンパク質の大きなドメイン運動がカップルしている。本研究では、MSES 法により広範な全原子構造サンプリングを iGluR のグルタミン酸結合構造近傍で行うことで、グルタミン酸の結合解離経路を明らかにし、その分子認識機構を原子レベルで理解することを目的とした。

MSES 法による全原子構造サンプリングを実行し、iGluR グルタミン酸複合体の 300 ns にわたる複合体形成シミュレーションを実行した。得られた構造アンサンブルから自由エネルギーランドスケープを計算した結果、MSES 法により複合体構造近傍だけではなく、グルタミン酸の結合解離と iGluR のドメイン運動両方の自由度について、広範な構造サンプリングが実現できた(図4)。また、複合体構造を最安定とするファネル状のランドスケープであることを示した。この結果は、iGluR グルタミン酸複合体のリガンド選択性の大きさを表していると言える。

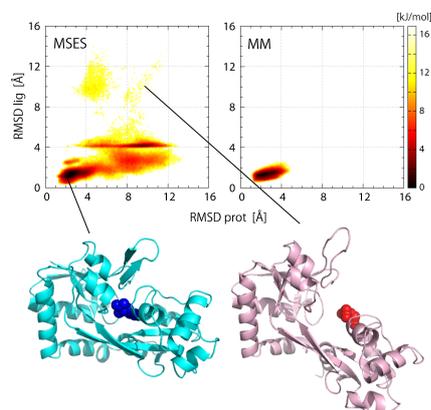


図4: iGluR グルタミン酸複合体の自由エネルギーランドスケープ。100 ns 全原子 MD からの結果を上図右に示した。下図は、複合体近傍とグルタミン酸解離/iGluR open 状態での代表構造。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Kei Moritsugu, Ryotaro Koike, Kouki Yamada, Hiroaki Kato and Akinori Kidera, "Motion Tree delineates hierarchical structure of protein dynamics observed in molecular dynamics simulation", PLoS ONE (2015) 10: e0131583.

DOI: 10.1371/journal.pone.0131583

Ikuo Fukuda and Kei Moritsugu, "Coupled Nosé-Hoover Equations of Motions: coupling the physical system Nosé-Hoover equation and temperature system Nosé-Hoover equation", Physics Reviews E, (2016) 93: 033306.

DOI: 10.1103/PhysRevE.93.033306

Kei Moritsugu, Tohru Terada and Akinori Kidera, "Multiscale enhanced sampling for protein systems: An extension via adiabatic separation", Chemical Physics Letters (2016) 661: 279-283.

DOI: 10.1016/j.cplett.2016.08.075

Kei Moritsugu, Tohru Terada and Akinori Kidera, "Free-Energy Landscape of Protein-Ligand Interactions Coupled with Protein Structural Changes", Journal of Physical Chemistry B (2017) 121: 731-740.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b11696

Ikuo Fukuda and Kei Moritsugu, "Coupled Nosé-Hoover equations of motions without time scaling", Journal of Physics A (2016) 50: 015002.

DOI: 10.1088/1751-8113/50/1/015002

Satoshi Ishiyama, Atsuya Nishiyama, Yasushi Saeki, Kei Moritsugu, Daichi Morimoto, Luna Yamaguchi, Naoko Arai, Rumie Matsumura, Toru Kawakami, Yuichi Mishima, Hironobu Hojo, Shintaro Shimamura, Fuyuki Ishikawa, Shoji Tajima, Keiji Tanaka, Mariko Ariyoshi, Masahiro Shirakawa, Mitsunori Ikeguchi, Akinori Kidera,

Isao Suetake, Kyohei Arita, and Makoto Nakanishi. "Structure of the H3 ubiquitin code/Dnmt1 reader module complex reveals the basis for DNA methylation maintenance", Molecular Cell. (2017) 68: 350-360. DOI:10.1016/j.molcel.2017.09.037

Kei Moritsugu, Tohru Terada, Hironori Kokubo, Satoshi Endo, Toshimasa Tanaka, and Akinori Kidera, "Multiscale enhanced sampling of glucokinase: Regulation of the enzymatic reaction via a large scale domain motion", Journal of Chemical Physics. (2018) 149:072314. DOI: 10.1063/1.5027444

〔学会発表〕(計 9 件)

Kei Moritsugu, "Energy Landscape of Protein-protein and Protein-ligand Interactions Revealed by Multiscale Enhanced Sampling", The 4th IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems (招待講演), Nagoya (Japan), August - September 2015.

Kei Moritsugu, "Energy landscape of protein-ligand Interaction revealed by multiscale enhanced sampling", Rare Event Sampling and Related Topics III (招待講演), Tachikawa (Japan), November 2015.

森次 圭, 「MSES シミュレーションとその応用」 計算統計物理学研究会第 6 回研究会 (招待講演), 名古屋, 2015 年 11 月

森次 圭, 寺田 透, 木寺 詔紀, 「MSES 法による EGFR キナーゼドメイン活性化の全原子構造解析」第 54 回日本生物物理学会年会、つくば市, 2016 年 11 月

森次 圭, 西野 圭彦, 木寺 詔紀, 「プロテインキナーゼの立体構造データベース解析」第 17 回蛋白質科学学会年会, 仙台, 2017 年 6 月

Kei Moritsugu, Tohru Terada and Akinori Kidera, "MULTISCALE ENHANCED SAMPLING FOR GLUCOKINASE", Conformational Ensembles from Experimental Data and Computer Simulations, ベルリン, 2017 年 8 月

森次 圭, 西野 圭彦, 木寺 詔紀, 「プロテインキナーゼの立体構造データベース解析」CBI 学会 2017 年大会, 東京, 2017 年 9 月

森次 圭, 「大規模計算によるマルチコピーマルチスケールシミュレーションとその応用研究」第 1 回近畿大学生物理工学部 HPC シンポジウム (招待講演), 和歌山, 2018 年 3 月

森次 圭, 寺田 透, 木寺 詔紀, 「大規模シミュレーションによるグルコキナーゼ活性化機構の解析」日本物理学会第 73 回年次大会, 野田, 2018 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
該当しない

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森次 圭 (MORITSUGU, Kei)

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科  
特任准教授

研究者番号: 80599506