

令和元年8月28日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14714

研究課題名（和文）アロステリック薬設計にむけた網羅的サンプリング

研究課題名（英文）Enhanced structural sampling for allosteric drug design

研究代表者

木寺 詔紀 (Kidera, Akinori)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：00186280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質リン酸化酵素は、著名な抗がん薬の標的タンパク質である。しかし、多くの薬剤は、共通したATP結合部位に結合するため、薬剤の特異性が低くなる。そこで、ATP結合部位でないところに結合する「アロステリック薬剤」を大規模なシミュレーションを使って探索する研究を行った。まず、MEK1では、大規模なシミュレーションを行っても、その柔軟性が低いために、すでに知られているアロステリックサイトしか見つからなかった。次に、より大きな柔軟性を持つEGFR kinaseの計算を行ったところ、より多様な薬剤結合様式を持つことが示され、アロステリック薬剤の設計でのシミュレーションの有効性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR kinaseは、様々な薬剤を結合した147この立体構造情報がある。これらの構造多様性は、そのほとんどが結合している薬剤ではなく、結晶場、アミノ酸変異によって引き起こされており、それぞれの構造に適した薬剤が結合していることが分かり、薬剤設計における柔軟性の考慮が重要であることが示された。また、そのような薬剤結合部位の構造多様性が、局所的な構造変化では必ずしもなく、lobe間運動という全体構造によって起こっていることが示された。これによって、タンパク質リン酸化酵素における合理的薬剤設計の基本的枠組みができたものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The rational design of allosteric drugs for protein kinase was attempted using a large-scale computational sampling method. The first target was MEK1, a Ser/Thr kinase. The docking study of all exhaustively sampled MEK1 structures revealed that a possible binding site was localized only at the back pocket of a known allosteric site. Since the limited variety of the binding mode was considered to be due to small flexibility of MEK1, we chose EGFR kinase for the second target, a receptor Tyr kinase exhibiting significantly large flexibility of the arrangement of the two lobes. The enhanced sampling of both apo and ATP-bound forms showed that ATP binding did not constrain the lobe motion. The ATP-bound form of EGFR kinase has a larger variety of binding modes depending on the lobe configuration, even though the sites are mostly in the back pocket. It was clearly demonstrated that large scale sampling method for the rational drug design.

研究分野：計算生物学

キーワード：タンパク質 アロステリック相互作用 分子シミュレーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非拮抗的な作用機序を持つ薬剤(アロステリック薬)が、1)サブタイプに対するより大きな特異性を与える、2)活性をオン・オフでなく中間レベルに調節する、3)基質と競合しないため基質より強い親和性を要求しない、などというメリットのために注目されている。しかしながら、アロステリック薬のモデリングは、アロステリック相互作用というタンパク質の協動的ダイナミクスに関わる複雑なものである上に、どこがアロステリック部位であるかを事前を知ることが困難であるという課題を抱えている。また、リガンドと拮抗的に結合する拮抗薬の場合でも、結合が大きな構造変化と共役するときには、ほぼ同様の困難さがある。

ここで対象として選択するタンパク質リン酸化酵素は、抗がん剤の創薬ターゲットとして最も多くの研究が蓄積されているものである。タンパク質リン酸化酵素の立体構造を基盤とする研究は、3,000 種にも達する薬剤が結合した 4,600 を越える PDB entry を蓄積されてきている。そのような構造ベースの薬剤設計研究が多くなされてきたことは、この酵素に特異的な事情によっている。500 種類ほどのヒトタンパク質リン酸化酵素は、ほぼひとつの superfamily に属しており、相同な配列、構造を持っている。また、最も主要な薬剤結合部位である ATP 結合部位はすべての酵素で共通の相互作用基盤によっていることから、結合部位はより顕著な配列、構造相同性がある。そのことは薬剤特異性の獲得を困難にし、アロステリック薬の必要性も著しく高い。一方、抗がん剤は常にがん細胞におけるアミノ酸変異による耐性の問題に直面しており、変異に対応した薬剤設計がなされなければならない。さらに、これら大量の立体構造は、タンパク質リン酸化酵素には著しく高い柔軟性があることを示していることから、それぞれの結合する薬剤ごとの結晶構造解析が求められてきた。これらのことから、タンパク質リン酸化酵素の薬剤設計では大量の構造情報が蓄積されることとなった。

### 2. 研究の目的

これらの多様なタンパク質リン酸化酵素の立体構造は、それぞれの薬剤結合状態の結晶構造であり、それらはタンパク質の種類によって決まるのか、薬剤に誘導されているのか、結晶場に制約された構造なのか、アミノ酸変異が重要な役割を担っているのか、などの問いに対して、個別の結晶構造を観察するだけでは答えることはできない。そこで、タンパク質リン酸化酵素のタンパク質ダイナミクスを分子シミュレーションと網羅的な立体構造情報を解析することで、原子レベルで同定し、タンパク質リン酸化酵素の薬剤設計の基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

分子シミュレーションと大量の立体構造情報解析を同時に用いることで、立体構造情報を分子シミュレーションの結果に基づいて説明するという方法を最終的に用いる。そのために、以下の 3 段階の研究を行った。

#### (1) Ser/Thr kinase MEK1 のシミュレーション研究

Ser/Thr kinase の典型例として MEK1 (MAP2K1; Family: STE7; PDB: 3eqd) を選び、シミュレーションによってそのダイナミクスを解析した。結晶構造はすべて非活性型であるため、活性型を同じ STE group ではあるが family が STE20 である STK24 (PDB: 4eml; homology 34%) を template にしてモデリングして得た。その二つの構造をつなぐ経路上でサンプリングを行った。

#### (2) Tyrosine kinase と CMGC kinase の立体構造データベース解析

上記の特殊例では、その全体像は明らかにならないことから、データベース中にある最大の二つのヒトタンパク質リン酸化酵素グループ、Tyrosine kinase と CMGC kinase の立体構造分類を行った。Tyrosine kinase と CMGC kinase の立体構造は、それぞれ PDB 中に 849、933 あるが、構造分類上重要な activation loop は多くの entry で欠失しており、全長の情報があるものは、それぞれ 299、311 のみであり、それらを扱う。さらに、構造類似性を指標に、それぞれ 150、85 個の代表構造を選択し、解析を行った。グループが同一でも配列は著しく異なるため、立体構造アラインメントを併用してアラインメントを作成した。その結果を主成分解析に供した。

#### (3) EGFR の拡張サンプリングと立体構造データベース解析

上記の解析から、全体像の複雑さと kinase の種類の依存性の大きさが明らかとなったため、立体構造の多様性が大きく、最もよく研究されている EGFR を選択し、その構造分布をシミュレーションによって獲得し、立体構造情報と比較することでそれぞれの構造決定因子を同定する試みを行った。EGFR kinase は PDB に格納されている 146 entries すべてを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) Ser/Thr kinase MEK1 のシミュレーション研究

最初の試みとして、アロステリック薬剤を結合した立体構造がある Ser/Thr kinase である MEK1 (MAP2K1) を対象として選んだ。この kinase には、活性型構造が解かれていないところから、配列類似性の高い STE20 である STK24 をテンプレートにして活性型をモデリングした(図 1)。それら二つを結ぶ経路上でサンプリングを行うことで、構造分布の全体像を見ようとした。まず、構造変化経路は activation loop が活性型に変化した後に  $\alpha$ C-helix が N-lobe 側に傾くという順序で起こることが示され、既報のシミュレーション結果と同様であった。ここで、中間状態は不安定であり、それぞれ不活性型、活性型に戻ることを示され、経路上に高い自由エネ

ルギー障壁があることが示唆された。これは、本来 activation loop にある S222 がリン酸化されることで非活性型から活性型への変化が起こるのだが、ここではそれを導入していないことによるものと考えられる(図2)。ここに現れるエネルギー障壁は、R-spineとして活性型構造の特徴として知られている疎水性残基が一行に並ぶ構造の形成において、 $\alpha$ C-helix 上にある E114 が最後に R-spine に格納される際に起こることが示された。この E114 は活性型で、K97 と活性型の特徴である塩橋を形成する。

この経路に沿った全ての構造で、MEK1 の結晶構造に現れるアロステリック薬剤 (BBM; PDB:1s9j; 非活性型) のドッキングシミュレーションを行った。その結果、非活性型で結晶構造を再現するところに BBM を置くことはできたが、それ以外の構造では他の部位を含めてなにとつ結合サイトの候補を見いだすことができなかった。BBM は分子量として 500 程度のものであり、必ずしも薬剤として大きなものとはいえない。それにもかかわらず、ここで結晶構造位置以外の結合サイト候補を見いだせなかったことは、(2)で示すように、通常の活性型では、N-lobe と C-lobe が開いてクレフトの容積が大きくなり  $\alpha$ C-helix 近傍のアロステリックサイトに結合を許すものと考えられるが、この STE20 の構造は、活性型になっても lobe 間が開くことがない。この活性型構造にはそのような特徴があるため、限定された空間のみに薬剤結合部位が存在したと考えられる。このような kinase 間の構造の違いの問題を解決するために、(2)においてデータベース全体の状況を明らかにする研究を行うこととした。

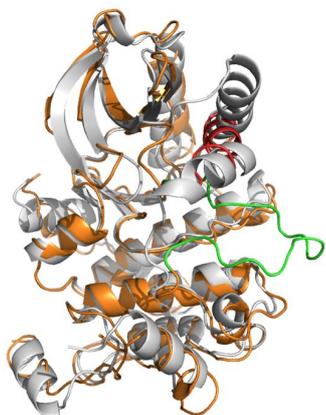


図1 MEK1 不活性型構造 (3eqd ; gray) と活性型構造 (model ; brown)。両者とも結合している ATP は表記していない。構造変化部位である  $\alpha$ C-helix(赤)と activation loop (緑)を活性型構造において示した。これらの構造はともに長時間の分子動力学計算で安定性を確認している。

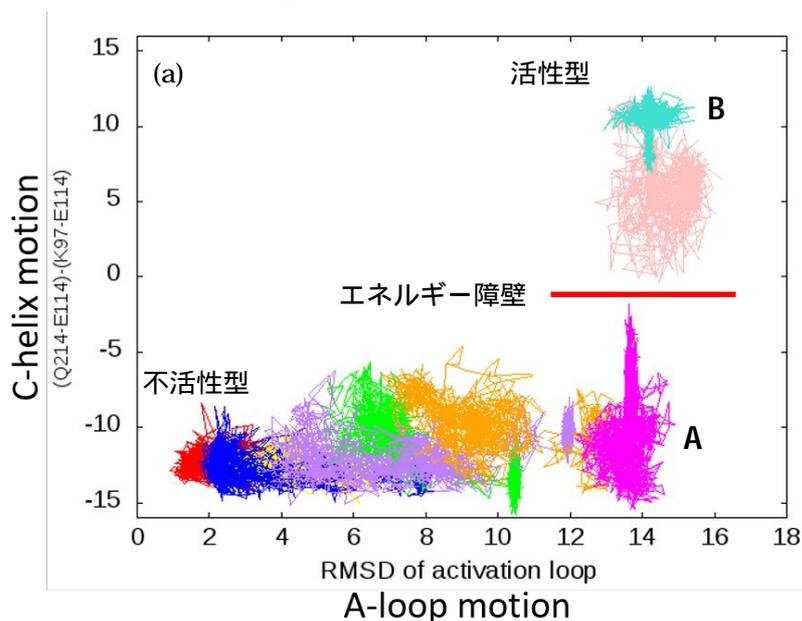


図2 活性型から不活性型への経路に沿って多数の初期構造を置き、そこからサンプリングを行った。ふたつの構造変化をする部位、A-loop と  $\alpha$ C-helix に対して分布をプロットした。

(2) Tyrosine kinase、CMGC kinase の立体構造データベース解析

解析の結果を Motion Tree で表現した(図3)。Motion Tree は剛体的に動く部分を類似した部分として認識する構造ダイナミクスの表示方法であり、どの部分がどこと協調して運動しているかを示すものである。この結果から、両者の kinase group で共通して、小さな部分を除き、最大の構造変化が activation loop にあり、次いで C-helix、lobe 間運動となることが示された。これらの運動の程度も二つの kinase group で同程度であることがわかる。ここで、これまでに注目されてこなかった lobe 間運動が十分に有意に起こっていることが示された。それぞれの kinase group 全体の分布としては著しく大きな多様性が見られるが、それを主成分で見たときに、それぞれの kinase は局在化して分布の上で異なった形を取っていることが示された。これは、それぞれの kinase が特異的な構造の傾向を持つことを示しているのか、それとも結晶化条件などの偏りによるアーティファクトであるのかは、この段

階では分からない。そこで、次の段階として構造多様性が最大である EGFR kinase について、さらなる詳細な解析を試みることにした。

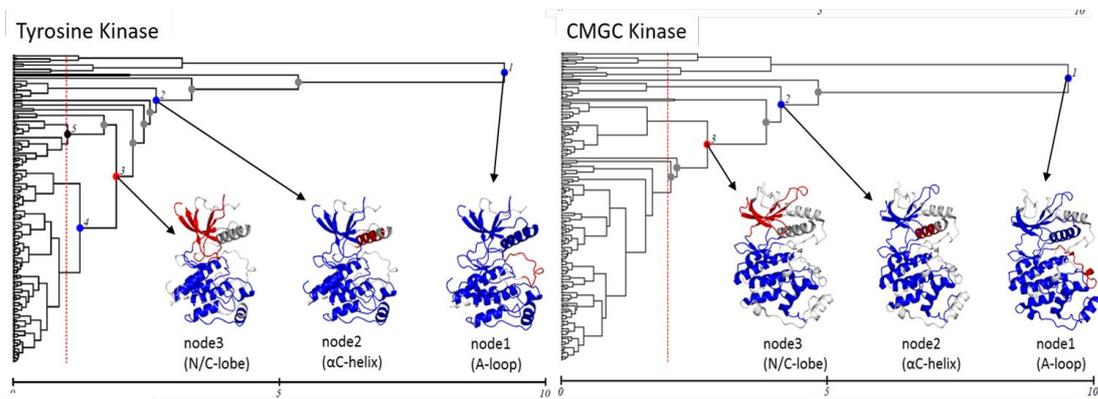


図 3 Tyrosine kinase と CMGC kinase の立体構造の分布の Motion Tree。小さな部分を除き、ふたつの kinase group とともに最大の構造変化が activation loop にあり、次いで  $\alpha$ C-helix、lobe 間運動となることが示されている。それらの運動の程度も二つの kinase group で同程度であることがわかる。

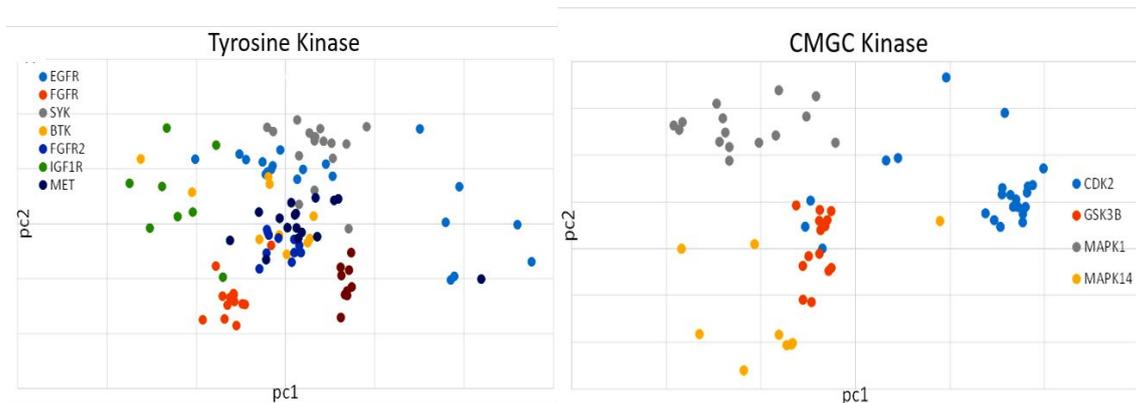


図 4 Tyrosine kinase と CMGC kinase の lobe 間運動の分布の主成分解析。ここで示されたように、多くの場合 family ごとに分布が局在していることがわかる。activation loop と  $\alpha$ C-helix も同様に、kinase の種類ごとに偏った構造分布があった。

### (3) EGFR の拡張サンプリングと立体構造データベース解析

図 5 に、146 entry の EGFR kinase の分類結果を示す。Asymmetric dimer は活性型 (Crystal form A) の他に非活性型の多様な結晶構造を持つ variation が存在する。これらの variation はまったく head-to-tail 型の chain を結晶中で形成することで結晶構造が決定するものである。Non-asymmetric dimer は、代表的な Crystal form B を含む多様な非活性型構造を含む。さらに、その中に DFG/out の構造が存在する。

これらの分類結果について、構造上の特徴をあらわに表現するために、N-lobe の  $\beta$ -sheet の開閉 (PC1) と回転 (PC2) を用いて主成分空間で表現した。このふたつの主成分は、ATP 結合サイトにあたる hinge-linker 部分の動きも表現することができ、lobe の開閉に伴って、薬剤の結合方向が C-lobe 側に偏移することが示された (図 6)。またこの分布は、MSES 法という拡張サンプリングによる構造分布の計算と整合的であり、monomer では、非活性型の Non-asymmetric dimer 構造が安定化し、Asymmetric dimer 形成時のみシグナル伝達が起こる機構となっていることが説明できる。さらに図 6 では、薬剤結合の影響を示しているが、ATP の結合は若干分布が狭くなるだけで、apo 状態と定性的には変わらない構造分布を示している。ATP 結合部位の front pocket のみの結合は lobe 間運動に影響を与えないことが示されている。しかし、back pocket にまで及ぶ大きな薬剤を結合すると、閉状態をさらに安定化させる相互作用が働き、その分布は非活性状態に限定されることとなる。Asymmetric dimer における  $\alpha$ C-helix と lobe 間運動の相関は、N-lobe の一部であるにもかかわらず、C-lobe に挟み込まれて共同的に運動する back loop の制約によって Asymmetric dimer の receiver では  $\alpha$ C-helix in に限局されることが、分子動力学計算で示された。Activation loop は、その N 末端側での  $\alpha$ -helix の形成によって閉構造 (非活性構造) を安定化することによって共役している。

このように、simulation とデータベース解析によって、ほぼすべての EGFR kinase の構造について合理的に構造決定因子を明らかにすることが可能となり、hinge-linker 部分の運動の lobe 間運動との相関が薬剤結合方向を決定することが示されてことから薬剤設計の大きな指針を得ることができたといえる。

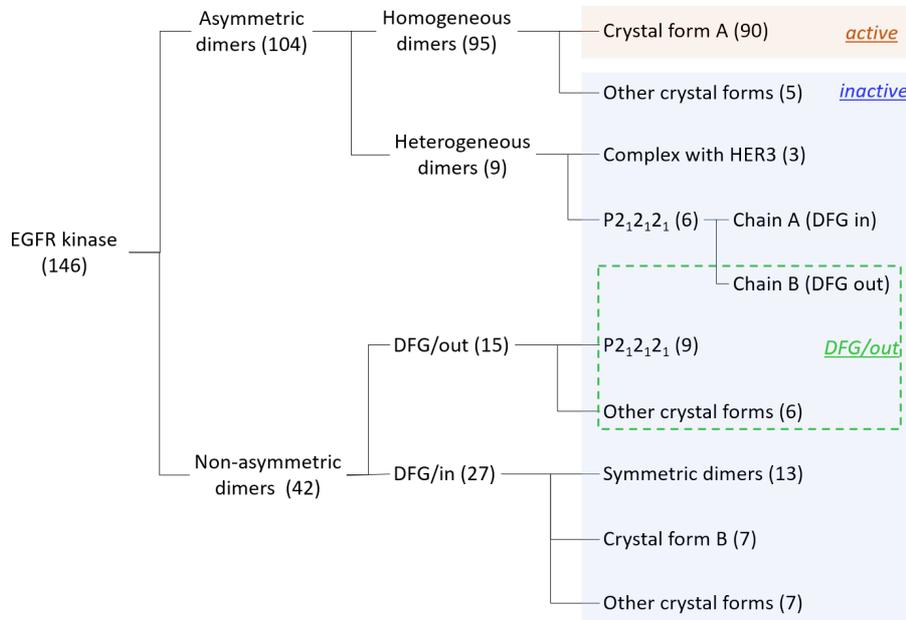


図 5 EGFR kinase の分類結果

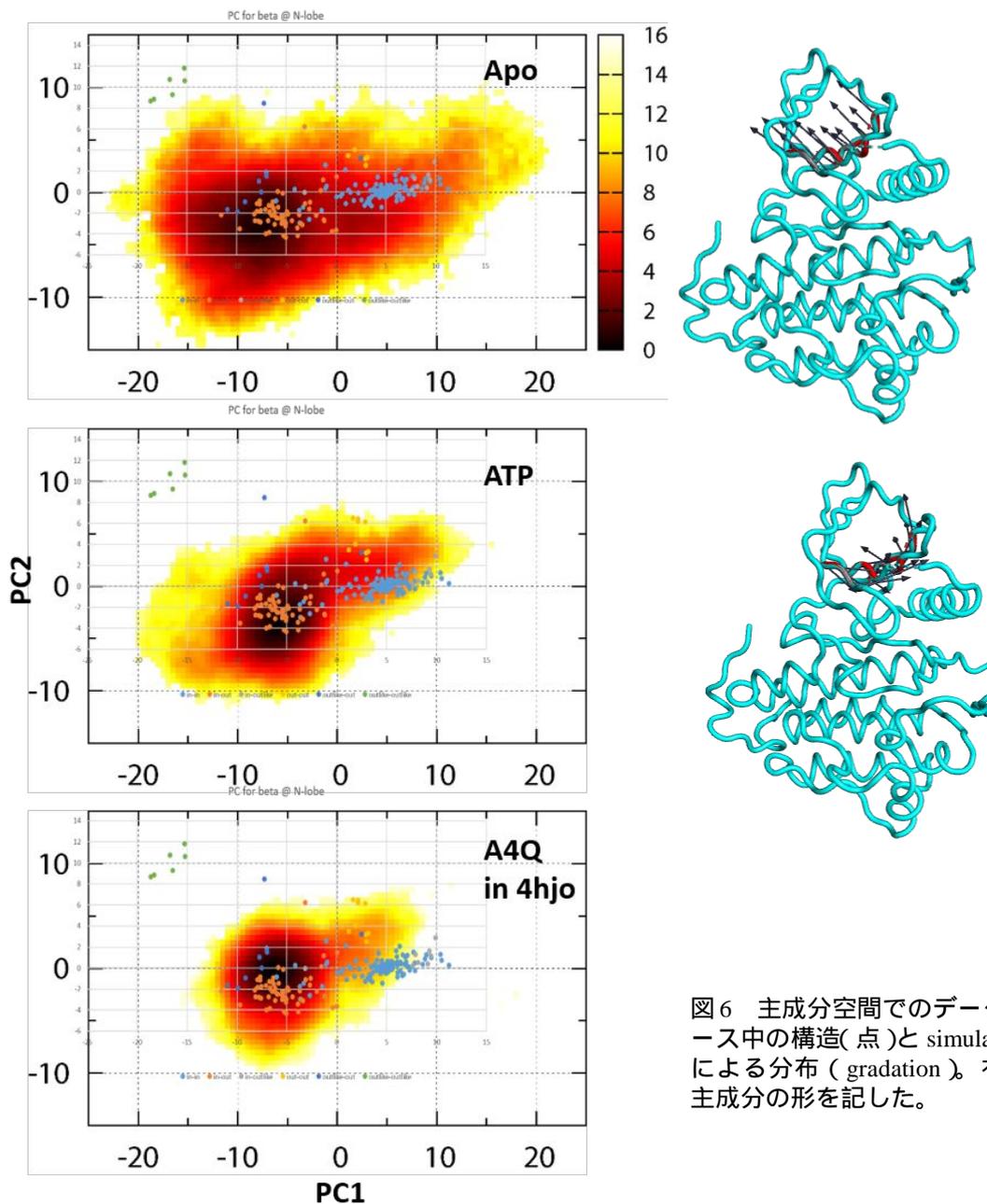


図 6 主成分空間でのデータベース中の構造(点)と simulation による分布 (gradation)。右に主成分の形を記した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- K. Moritsugu, T. Terada, and A. Kidera, Multiscale enhanced sampling for protein systems: An extension via adiabatic separation. *Chem. Phys. Lett.* 661, 279-283 (2016).
- K. Moritsugu, T. Terada, and A. Kidera, Free energy landscape of protein-ligand interactions coupled with protein structural changes. *J. Phys. Chem. B* 121, 731-740 (2017).
- S. Ishiyama, A. Nishiyama, Y. Saeki, K. Moritsugu, D. Morimoto, L. Yamaguchi, N. Arai, R. Matsumura, T. Kawakami, Y. Mishima, H. Hojo, S. Shimamura, F. Ishikawa, S. Tajima, K. Tanaka, M. Ariyoshi, M. Shirakawa, M. Ikeguchi, A. Kidera, I. Suetake, K. Arita, and M. Nakanishi, Structure of the Dnmt1 reader module complexed with a unique two-mono-ubiquitin mark on histone H3 reveals the basis for DNA methylation maintenance. *Mol. Cell*, 68, 350–360 (2017).
- Y. Matsunaga, T. Yamane, T. Terada, K. Moritsugu, H. Fujisaki, S. Murakami, M. Ikeguchi, and A. Kidera, Energetics and conformational pathways of functional rotation in the multidrug transporter AcrB. *ELife* 7, e31715 1-19 (2018).
- K. Moritsugu, T. Terada, H. Kokubo, S. Endo, T. Tanaka, and A. Kidera, Multiscale enhanced sampling of glucokinase: Regulation of the enzymatic reaction via a large scale domain motion. *J. Chem. Phys.* 149, 072314 1-12 (2018).
- K. Moritsugu, H. Nishi, K. Inariyama, M. Kobayashi, and A. Kidera, Dynamic recognition and linkage specificity in K63 di-ubiquitin and TAB2 NZF domain complex. *Scientific Reports*, 8, 16478 1-13 (2018).

〔学会発表〕(計4件)

- 第54回日本生物物理学会年会 2016年11月25日-27日 つくば国際会議場  
2Pos030 Structural dynamics of MEK1 activation through phosphorylation  
Minami Ando, Kei Moritsugu, Akinori Kidera  
2Pos035 Structural basis for activation of EGFR kinase domain at atomistic resolution revealed by multiscale enhanced sampling  
Kei Moritsugu, Tohru Terada, Akinori Kidera
- 第17回日本蛋白質科学会年会 2017年6月20日 - 22日 仙台国際センター  
3P-072 プロテインキナーゼの立体構造データベース解析  
森次 圭、西野 圭彦、木寺 詔紀
- CBI学会2017年大会 2017年10月3日 - 5日 タワーホール船堀  
P1-11 Comprehensive database analysis of protein kinase structures  
Kei Moritsugu, Yoshihiko Nishino, Akinori Kidera

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森次圭

ローマ字氏名：Moritsugu, Kei

研究協力者氏名：安藤美波

ローマ字氏名：Ando, Minami

研究協力者氏名：西野圭彦

ローマ字氏名：Nishino, Yoshihiko