

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26600154

研究課題名(和文) リガンド-受容体相互作用の高精度統計熱力学モデルの構築

研究課題名(英文) Development of high-precision statistical thermodynamic model of ligand-receptor interactions

研究代表者

三上 益弘 (Mikami, Masuhiro)

慶應義塾大学・理工学研究科(矢上)・特任教授

研究者番号：50358074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：水溶液中におけるリガンド-受容体相互作用の高精度・高速計算を実現するために、原子モデルに比べて大規模系を高速に計算できる粗視化モデル力場関数:MARTINIの適用可能性を検証した。その結果、MARTINIは、インフルエンザウイルスの表面上に存在するヘマグルチニン分子とヒト糖脂質分子間のリガンド-受容体相互作用の実験結果を定性的に再現することを明らかにした。また、コロイド懸濁液での分子動力学法と古典密度汎関数法のハイブリッド法の先行研究を調査し、系の中で大多数を占める水分子を古典密度汎関数法の一つであるSAFT理論で扱うことにより、さらに計算を高速に実現できる可能性を得た。

研究成果の概要(英文)：In order to realize high-precision and high-speed calculation of ligand-receptor interactions in aqueous solution, we examined the applicability of coarse-grained model force field function: MARTINI which can calculate a large scale system faster than atomic model. As a result, we obtained that MARTINI qualitatively reproduce experimental results of ligand-receptor interaction between hemagglutinin molecule on the surface of influenza virus and human type glycolipid molecules. In addition, we investigated the previous studies on hybrid method of molecular dynamics method and classical density functional theory method in colloidal suspension, we obtained the possibility to calculate the whole system at further high speed by handling the water molecules which are the majority of the system with the SAFT theory which is one kind of classical density functional theory.

研究分野：物理化学

キーワード：リガンド 受容体 分子間相互作用 分子動力学法 ハイブリッド法 粗視化モデル 古典密度汎関数法 統計熱力学

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、戦略的創造研究推進事業 GREST 研究領域「マルチスケール・マルチフィジックス現象の統合シミュレーション」において、研究課題「DDS シミュレータの研究開発」(平成 18 年 10 月～平成 24 年 3 月、研究代表者 三上益弘、研究終了報告書 [http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/sh\\_heisei18.html#R06](http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/sh_heisei18.html#R06))を実施した。CREST プロジェクトでは、能動的標的指向性 DDS の有力な候補として注目されているリポソームシステムを対象にして、DDS ナノ粒子設計(製剤設計)、糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析(ターゲティング)、血管内における DDS ナノ粒子の流動解析(吸収促進)を可能にするマルチスケールシミュレーション技術の開発と DDS 設計技術の確立を目的とし、研究開発を実施した。その結果、  
 については、リポソーム・脂質二重層膜の安定性や低分子の膜透過性を高精度で計算する分子シミュレーション技術を開発し、DDS ナノ粒子設計に必要な、脂質二重膜の水分子の膜透過自由エネルギー計算、脂質二重層膜へのコレステロール添加効果、リポソームの付着と融合の機構の解明、リポソームの形成過程の解明を行い、原子モデルに基づいて DDS ナノ粒子を設計することが可能になった。また、  
 については、DDS ナノ粒子表面の糖鎖分子とガン細胞近傍などの血管壁細胞表面に存在するレクチンの相互作用を高速分子軌道法により解析して、実験事実を説明することに成功した。  
 については、毛細血管内における DDS ナノ粒子の搬送過程を解析する流体力学モデルを開発し、血管内皮細胞の間隙吸収を支配するパラメータを明らかにした。これらの成果の中で、  
 については、十分なアンサンブル平均を取るには膨大な計算時間が必要なため、現実の DDS 開発に役立てることが難しいという課題が残った。そこで、広義の意味でのリガンド-受容体相互作用を現実の分子生物学的環境下で評価する方法論が必要であるとの認識に至った。

### 2. 研究の目的

リガンド-受容体相互作用は、狭義的には蛋白質とそれに特異的に結合する低分子物質との相互作用を指すが、広義的には、細胞膜上に存在する種々の受容体蛋白質分子と特異的に結合するレクチン、抗原、抗体、ホルモン、神経伝達物質などとの相互作用を指し、生体中において重要な役割を果たしている。狭義的な蛋白質と低分子の相互作用は、実験的・理論的に解明が進んだが、インフルエンザと糖鎖分子を含む細胞の認識や細胞間接続分子を含む細胞-細胞系は、規模が大きいこと、自由度が大きいことなどからその理論的解明は進んでいない。

本研究では、水溶液媒質中のリガンド-受容体相互作用を対象とした、高精度な粗視化モ

デルを用いた力場関数の適用を検討するとともに、分子シミュレーションに比べて、桁違いのサイズを扱える古典密度汎関数に基づいた溶媒中でのリガンド-受容体相互作用の高精度な統計熱力学モデルの開発を検討し、その本質の解明を行い、将来の再生医療や DDS・分子標的薬・インフルエンザ感染機構に資する知見を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

これまで、リガンド-受容体相互作用の評価は、熱力学積分法や摂動法を用いた分子シミュレーションから得られた自由エネルギー値により行われてきた。自由エネルギーは、分子集合体や生体高分子のような多くの内部自由度と分子配置の自由度を持つ系の安定構造や相互作用を議論するうえで最も基本となる物理量である。しかしながら、分子シミュレーションにより自由エネルギーの絶対値を精度高く決定することは困難なため、二つの系又は二つの配置の間の相対的な自由エネルギー計算が行われている。例えば、図 1 に示すような系の場合、本来、糖鎖分子は、細胞表面の生体膜上にあり、その影響も考慮しなければならないが、計算時間の制約から、生体膜を無視して、計算が行われている。<sup>1)</sup>



図 1. リガンド-受容体相互作用の例(ウイルス上のヘマグルチニン蛋白質と細胞表面の糖鎖分子)

#### (1)粗視化モデル力場の溶媒中のリガンド-受容体相互作用計算への適用可能性の検証

そこで、本研究では、現実の生体環境に近いモデル系(数十万個以上の原子からなる系)によるリガンド-受容体相互作用解析を平均的な計算機環境でも容易に出来るようにするため、原子レベルの力場の結果を正確に再現できると定評のある粗視化モデル力場:MARTINI<sup>2),3),4)</sup>の本研究で対象とするモデル系への適用可能性を検証した。図 2 に示す

ようなモデル系を構築した。POPC 脂質分子と GM3 糖脂質分子の脂質二重膜をモデルで作成し、その上部にヘマグルチニン(HA)を配置し、その周辺に水分子をランダムに配置した。

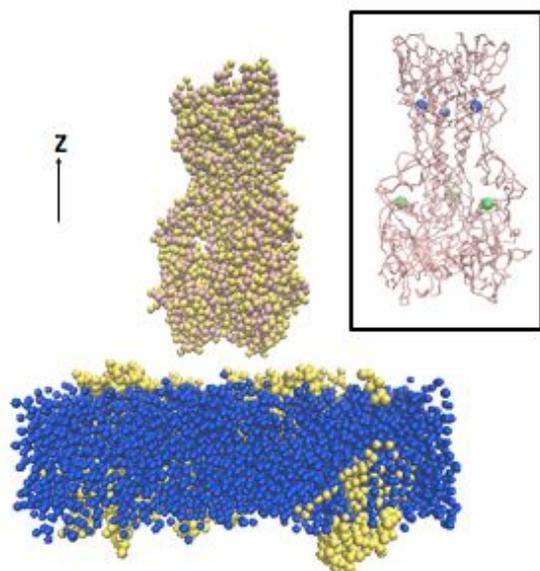


図 2. 現実の生体環境に近いモデル系。上部の独立した分子はリガンドであるヘマグルチニン分子、その右の挿入図はヘマグルチニンのリボン表示図である。下部の青い分子は POPC 脂質分子、表面に出ている黄色い分子は受容体である GM3 糖脂質分子である。水分子は、このモデル系の中で最も多いのであるが、表示するとそれ以外の分子が見えなくなるため、表示していない。

MARTINI 力場のモデル系への適用可能性の検証は、実験結果<sup>5)</sup>との定性的な比較により行った。山田らは、鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの遺伝子に突然変異をおこし、そのアミノ酸配列を変更すると、ヒトの細胞上にある糖脂質分子と強く相互作用することを報告している。本研究でも、鳥インフルエンザのヘマグルチニンとアミノ酸配列の一部を変更した変異ヘマグルチニンの両者にたいする人細胞上の糖脂質分子 GM3 との相互作用を解析し、実験結果と比較することにより検証した。また、定量的に相互作用の結合自由エネルギーを計算する方法として、WHAM(重みつきヒストグラム解析法)<sup>6)</sup>を採用し、計算した。

WHAM 法では、HA の配置を制御するために、(1)式に示すバイアスポテンシャルを用いる。

$$V_i(\xi) = \frac{1}{2} k(\xi - \xi_i)^2 \quad (1)$$

ここで、 $\xi$  は反応座標であり、ヘマグルチニンと GM3 分子の重心の平均座標との距離である。 $k$  の値として  $100 \text{ kJ mol}^{-1}$  を用いた。分子動力学シミュレーションから得られた反応座標の確率分布  $P(\xi)$  を再重付け法によ

り、バイアスのない状態での確率分布  $P_0(\xi)$  を得て、(2)式により自由エネルギーを求めた。

$$F(\xi) = -k_B T \ln P_0(\xi) \quad (2)$$

ここで  $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は温度である。

分子動力学シミュレーションには GROMACS5.1.3<sup>10)</sup>を用いた。統計アンサンブルは等圧等温アンサンブル(NPT)とし、温度  $T=310\text{K}$ 、圧力  $P=0.1 \text{ MPa}$  とした。また時間刻みを  $20\text{fs}$  とした。計算に用いた分子は HA を 1 分子、GM3 分子を 62 分子、POPC 分子を 718 分子、 $\text{Na}^+$  分子を 286 分子、 $\text{Cl}^-$  分子を 218 分子、水分子を 43042 分子であり、系全体の粗視化粒子数の合計は 57713 分子であった。

図 2 の挿入図のヘマグルチニンのリボン図に示したように、三量体から上下一つずつ粗視化粒子(球で示した。合計 6 個)を選び、これらに対して、 $x$  軸及び  $y$  軸方向に調和振動子型のポテンシャルをかけて、ヘマグルチニンが  $z$  軸と並行になるように制御した。

## (2)古典密度汎関数/分子動力学法ハイブリッド法に基づいた溶媒中でのリガンド-受容体相互作用の解析方法の先導的調査研究

工業的に重要な系(アルカン、アルカン混合系、フッ化アルカン、フッ化水素、フッ化ボロン、水、冷却剤、二酸化炭素、電解質溶液)の自由エネルギーの実験値を良く再現する SAFT<sup>8)</sup>(Statistical Association Fluid Theory)により電解質水溶液を扱い、蛋白質分子、脂質分子を分子動力学法で扱う、古典密度汎関数/分子動力学法ハイブリッド法を適用すれば、図 2 のような大規模系の分子動力学法では、最も多くの計算時間が使われている水分子間相互作用の計算を古典密度汎関数法で行うことが出来るようになり、これまで最高速スーパーコンピュータを利用して計算していたリガンド-受容体相互作用をクラスター又は PC により容易に高精度で計算できる可能性がある。本研究では、このことに関する調査研究と理論的な検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1)粗視化モデル MARTINI のインフルエンザウイルスの感染におけるリガンド-受容体相互への適用可能性についての検証

トリインフルエンザのヘマグルチニンは、三量体からなる分子であり、糖脂質分子と 3 つの相互作用サイトがある。山田ら<sup>5)</sup>の研究では、残基番号 192 の Gln(グルタミン)を正電荷アミノ酸:Arg(アルギニン)に、残基番号 223 の Ser を負電荷アミノ酸:Asn(アスパラギン)に二点変異させたヘマグルチニンを作り、ヒト型糖脂質分子に感染することを確認した。

本研究では、同様の変異体ヘマグルチニンをモデリングにより作成し、トリインフルエンザのヘマグルチニンとともに MARTINI

力場を用いた分子動力学シミュレーションを行い、二つのヘマグルチニンとヒト型糖脂質分子のリガンド-受容体相互作用を調べた。

図 3 には、二種類の脂質分子の分子配置図を脂質分子膜面に垂直な方向から表示した。左図は、脂質分子系 (GM3/POPC/水系) だけの MD の結果である。一方、右図は脂質分子系 (GM3/POPC/水系) とヘマグルチニンの MD の結果である。右図では、GM3 分子の配置を見やすくするためにヘマグルチニンは表示していない。ヘマグルチニンがない左図では GM3 分子は分散しているが、ヘマグルチニンを加えた右図では、ヘマグルチニン分子と GM3 分子のリガンド-受容体相互作用により、GM3 分子がヘマグルチニンの真下に集合していることが分かった。

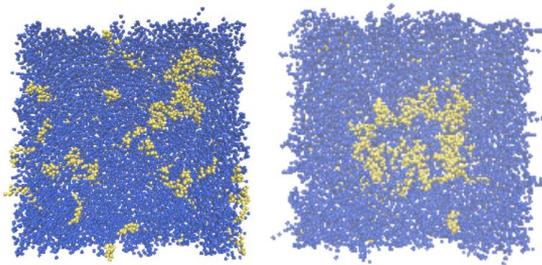


図 3 GM3 分子とヘマグルチニン分子のリガンド-受容体相互作用。青色は POPC 分子、黄色は GM3 分子である。

このリガンド-受容体相互作用を詳細に解析するために、変異体 HA と HA の相互作用サイトの残基 192Arg, 682Arg, 1172Arg とその近傍に存在する GM3 分子の分布図を求めた。

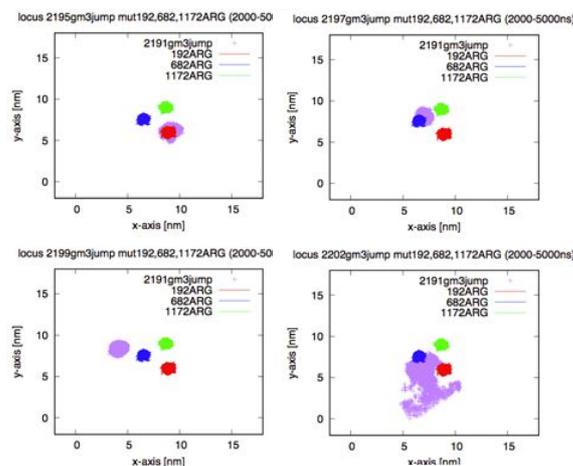


図 4. 変異体 HA の相互作用サイトの 3 つ残基 (赤、緑、青色で表示) とその近傍に存在する 4 つの GM3 分子 (紫色) の分布図

図 4 から分かるように、変異体 HA の相互作用サイトの近傍に存在する GM3 分子は、3  $\mu$ s 以上にその位置を変えずに、変異体 HA と GM3 分子のリガンド-受容体相互作用が強くことが分かった。

一方、HA 相互作用サイトの残基と GM3 分

子の分布図を図 5 に示した。この場合、4 つのうち 2 つの GM3 分子は 3  $\mu$ s の間にその位置を大きく変えて、HA と GM3 分子のリガンド-受容体相互作用が弱いことが分かる。これらの結果は、定性的に、実験結果と一致しており、本研究で採用した粗視化モデル力場:MARTINI は、HA と GM3 分子のリガンド-受容体相互作用の解析に、適用できることが分かった。

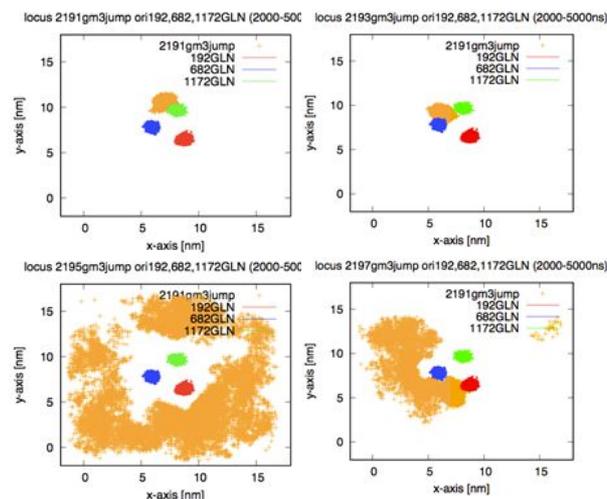


図 5. HA の相互作用サイトの 3 つ残基 (赤、緑、青色で表示) とその近傍に存在する 4 つの GM3 分子 (橙色) の分布図

現在、定性的な一致を得るために、WHAM 法を用いた HA と GM3 分子間のリガンド-受容体相互作用の結合自由エネルギー計算を行っている。

## (2)古典密度汎関数法と分子動力学法のハイブリッド法を用いた溶媒中におけるリガンド-受容体相互作用の高精度・高速解析法の先導研究

Lowden ら<sup>7)</sup>は、ミセル溶液やコロイド懸濁液のような様々なレベルの電荷粒子からなる系のシミュレーションでできるような新しい非経験的方法を提案した。このハイブリッド法では、マクロイオンは粒子として取り扱われ、一方、微細なカウンターイオンは、古典密度汎関数理論で取り扱われる。カウンターイオンの密度は、マクロイオンの位置座標に連動した動的変数として取り扱われ、その運動方程式は、不均一なカウンターイオンの密度とカウンターイオンが最低の自由エネルギー局面に留まるように選ばれた仮想質量に関係した仮想的な運動エネルギー項を含むラグランジェアンから導かれる。

本研究では、水溶液溶媒中のヘマグルチニンと糖脂質分子の系に、同じようなスキームが適用できることを見出した。ただし、水分子間の相互作用の自由エネルギーは、古典密度汎関数法の一つである SAFT 理論<sup>8), 9)</sup>を適用することにより、さらに高精度・高速に計算できることを見出した。すなわち、分子動

力学シミュレーションのみで全系の計算をおこなうと、水分子間の相互作用は、系の中で最も多くの数を含むため、計算が膨大になる。水分子を SAFT 理論により取り扱うことにより、計算時間の大幅な削減が可能になることを理論的に明らかにした。

<引用文献>

- T. Sawada, D. G. Fedorov, K. Kitaura, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 16862(2010).  
Siewert J. Marrink et. al., *J. Chem. Phys. B* **111**, 7812(2007).  
L. Monticelli, et al., *J. Chem. Theory and Comput.* **4**, 819(2008).  
Cesar A. Lopez et. al., *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 3195(2009).  
S. Yamada, et al., *Nature*, **444**, 378(2006).  
B. Roux, *Comput. Phys. Commu.* **91**, 272 (1995)  
H. Lowen, J.-P Hansen, P. A. Madden, *J. Chem. Phys.* **98**, 3275(1993).  
W. J. Chapman et al., *Ind. Eng. Chem. Res.* **29**, 1709 (1990)  
J. Hughes, E. J. Krebs, and D. Roundy, *J. Chem. Phys.* **138**, 024509 (2013).  
<http://www.gromacs.org/>

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 1 件)

三上益弘, “高分子の原子間・分子間相互作用エネルギー関数”, アンサンブル, 査読無, Vol.17, No.2, 2015, pp.137~142.

〔学会発表〕(計 13 件)

九十九慶之, 山本詠士, 井上堅斗, 泰岡顕治, 三上益弘, ヘマグルチニンと GM3 分子間のリガンド-受容体相互作用の解析, 第 30 回分子シミュレーション討論会, 平成 28 年 12 月 1 日, 大阪大学基礎工学国際棟シグマホール(大阪府豊中市)  
三上益弘, 原子間・分子間相互作用エネルギー関数と長距離力計算法, 第 11 回分子シミュレーションスクール (招待講演), 平成 28 年 10 月 21 日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Kento Inoue, Eiji Yamamoto, Daisuke Takaiwa, Kenji Yasuoka, Masuhiko Mikami, Molecular Dynamics Study of Ganglioside GM3/DPPC Membrane by Using Coarse-Grained Model,

Biophysical Society Annual Meeting 69<sup>th</sup>, 平成 28 年 3 月 3 日, ロサンゼルスコンベンションセンター(USA)

井上堅斗, 山本詠士, 高岩大輔, 泰岡顕治, 三上益弘, 粗視化分子動力学シミュレーションを用いた GM3/DPPC 膜の解

析, 第 29 回分子シミュレーション討論会, 平成 27 年 11 月 30 日, 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

井上堅斗, 山本詠士, 高岩大輔, 泰岡顕治, 三上益弘, Structure-property of ganglioside GM3/DPPC membranes

using coarse-grained molecular dynamics simulation, 第 53 回生物物理学会年会, 平成 27 年 9 月 13 日, 金沢大学(石川県金沢市)

Kento Inoue, Eiji Yamamoto, Daisuke Takaiwa, Kenji Yasuoka, Masuhiko Mikami, Molecular dynamics

simulations of GM3/DPPC membrane with coarse-grained model, 2<sup>nd</sup>

International Symposium on

Computational Materials and

Biological Sciences, 平成 27 年 9 月 1 日

名古屋大学(愛知県名古屋市)

三上益弘, 分子シミュレーションの発展と挑戦, 計算科学連携センターセミナー~分子シミュレーションの産学利用のこれから~, 平成 27 年 11 月 12 日, 兵庫県立大学神戸情報科学キャンパス大講義室

(兵庫県神戸市)

三上益弘, 原子間・分子間相互作用エネルギー関数と長距離力計算法, 第 9 回分子シミュレーションスクール (招待講演), 平成 27 年 10 月 14 日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Kento Inoue, Eiji Yamamoto, Daisuke Takaiwa, Kenji Yasuoka, Masuhiko Mikami, Molecular dynamics study of GM3/DPPC

membrane with Coarse-Grained Model, Global Environmental System Leaders (GESL) Workshop on Molecular Simulation,

平成 27 年 3 月 17 日, 慶應義塾大学矢上キャンパスセミナー(神奈川県横浜

市)

井上 堅斗, 高岩 大輔, 泰岡顕治, 三上益弘, ヘマグルチニン/糖脂質分子を含む脂質膜系の粗視化モデルによるモデリング, 第 28 回分子シミュレーション討論会,

平成 26 年 11 月 12 日, 仙台市民会館(宮城県仙台市)

Kento Inoue, Daisuke Takaiwa, Kenji Yasuoka, Masuhiko Mikami, Molecular dynamics study of glycolipids/lipids

membrane with Coarse-Grained Model, International Symposium on Extended Molecular Dynamics and Enhanced

Sampling:Nosé Dynamics 30 Years

(NOSE30), 平成 26 年 11 月 10 日, 慶應義塾大学三田キャンパス北館ホール(東京都港区)

三上益弘, 原子間・分子間相互作用エネルギー関数と長距離力計算法, 第 8 回分子シミュレーションスクール (招待講演), 平成 26 年 10 月 15 日, 岡崎コン

ファレンスセンター(愛知県岡崎市)

三上益弘、原子間・分子間相互作用エネルギー関数と長距離力計算法、第19回高分子学会計算機科学研究会(招待講演)、平成26年6月16日、東京工業大学蔵前会館(東京都目黒区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三上益弘 (Masuhiro Mikami)  
慶應義塾大学大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：50358074

### (2) 研究分担者

泰岡顕治 (Kenji Yasuoka)  
慶應義塾大学理工学部・教授  
研究者番号：40306874

秋元拓磨

慶應義塾大学大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：30454044

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

山本詠士 (Eiji Yamamoto)  
井上堅斗 (Kento Inoue)  
高岩大輔 (Daisuke Takaiwa)  
九十九慶之 (Keishi Tsukumo)