

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07021

研究課題名(和文) リガンド結合パスウェイ仮説の理論的検証

研究課題名(英文) A theoretical verification of the ligand-binding-pathway hypothesis

研究代表者

寺田 透 (Terada, Tohru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：40359641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の周囲にリガンドをランダムに配置し、リガンドのタンパク質への結合過程を追跡する粗視化分子動力学シミュレーションを多数回実施し、このトラジェクトリからマルコフ状態モデルを構築した。さらに、transition path theoryに基づき、マルコフ状態モデルから遷移状態とリガンド結合パスウェイを求めた。その結果、遷移状態は基質ポケットの縁に存在し、寄与の大きなパスウェイは、タンパク質表面の溝に沿う傾向があることが示された。これは、研究代表者らが提唱している「リガンド結合パスウェイ仮説」を支持する結果であると言える。

研究成果の概要(英文)：I performed many runs of a coarse-grained molecular dynamics simulation for a protein-ligand system, where the ligand molecules were randomly placed around the protein. I constructed a Markov state model from the trajectories. Furthermore, I analyzed the model based on the transition path theory to find the transition state and ligand-binding pathways. As a result, it was shown that the transition state is located around the rim of the substrate-binding pocket and the ligand-binding pathways that have large contributions to the ligand binding tend to go along the grooves on the protein surface. This result supports the ligand-binding-pathway hypothesis we have proposed.

研究分野：計算生物物理学

キーワード：分子動力学シミュレーション タンパク質 リガンド パスウェイ 粗視化モデル 自由エネルギープロファイル マルコフ状態モデル transition path theory

1. 研究開始当初の背景

タンパク質と低分子化合物 (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。研究代表者らは、分子動力学 (molecular dynamics; MD) シミュレーションを用いて、タンパク質の周囲にランダムに配置したリガンドの運動を追跡することで、タンパク質にリガンドが結合する過程を明らかにする研究に取り組んでいる。

リガンド結合は確率過程であるため、統計的に有意な情報を得るためには、長時間のシミュレーションを多数回繰り返す必要がある。しかし、通常の全原子 MD 法では計算量が膨大になり、実施が困難である。そこで研究代表者らは、計算量が少なく効率的な粗視化 MD 法を用いてリガンド結合シミュレーションを行った。まず、基質ポケットの形状とリガンドの物理化学的性質が異なるタンパク質-リガンドペアを 2 つ選定し、粗視化 MD シミュレーションをそれぞれ行った。これらの結果の比較から、以下の知見を得た [1]。

- リガンドは本来のリガンド結合部位以外にも結合しうる
- リガンドは本来のリガンド結合部位に最も強く結合する
- 解離定数は実験値と良く一致する
- 結合・解離速度定数は実験値より 10 倍程度大きいが、粗視化モデルでは粒子の拡散が加速されることを考慮すれば、実験値と良く一致すると言える
- リガンドは、特定の (複数の) パスウェイを経由して基質ポケットに入る
- このパスウェイは、タンパク質の表面上の溝に沿う傾向がある

続いて研究代表者は、全原子モデルに基づいて最小自由エネルギー経路を求める string 法 [2] を用いて、リガンド結合パスウェイの最適化を行った。この結果、粗視化 MD シミュレーションから得られた初期パスウェイから大きく逸脱しないことが示された。一般に粗視化モデルは、全原子モデルより精度が低いとされているが、解離定数や速度定数が実験値と良く一致したことも考慮すれば、粗視化モデルは、リガンド結合過程の再現に十分な精度を持っているといえる。これらの結果に基づき、研究代表者らは、リガンドが特定のパスウェイを経由して基質ポケットに入るという「リガンド結合パスウェイ仮説」を提唱した [1]。

さらに研究代表者らは、リガンド結合パスウェイの存在の一般性を確認するため、基質ポケットの形状とリガンドの物理化学的性質の異なる 10 のタンパク質-リガンドペアについて、同様のシミュレーションを実施した。いずれのペアにおいても、リガンドが特定のパスウェイを経由して基質ポケットに入る傾向があることが確認された。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが提唱している「リガンド結合パスウェイ仮説」を、理論的側面から検証することを目的とする。このために以下を実施する。

- (1) リガンド結合パスウェイの最適化と自由エネルギープロファイル計算
- (2) リガンド結合パスウェイに影響を与える変異体の設計
- (3) リガンド結合過程を記述するマルコフ状態モデルの構築

前述の通り、平成 24 年度～平成 26 年度に実施した基盤研究 (C) 「マルチスケールシミュレーションによるタンパク質へのリガンド結合過程の研究」においても、リガンド結合パスウェイの最適化を行っている。しかしここではタンパク質側の自由度を考慮していなかったため、(1) ではこれを考慮したより精度の高い計算を行う。また、(2) に関しては、リガンド結合パスウェイ近傍に位置するアミノ酸に変異を導入し、リガンドの流束や、結合・解離速度定数への影響を解析する。この結果に基づき、「リガンド結合パスウェイ仮説」の実験的検証の可能性を検討する。(3) に関しては、MD シミュレーションのトラジェクトリの全体を用いて、リガンドの運動を包括的に記述するマルコフ状態モデルを構築する。さらに、transition path theory に基づき、遷移状態とリガンド結合パスウェイを求め、より直接的にリガンド結合パスウェイ仮説の検証を試みる。

3. 研究の方法

- (1) リガンド結合パスウェイの最適化と自由エネルギープロファイル計算

研究対象とするタンパク質-リガンド系には、文献 [1] で扱った levansucrase-sucrose 系を選定した。文献 [1] で実施した粗視化 MD シミュレーションの結果、主に 3 つのリガンド結合パスウェイの存在が示唆された。この中から最も長いパスウェイ (Pathway A) について、全原子モデルと string 法 [2] を用いて、最小自由エネルギー経路への最適化を行った。

① 初期パスウェイの構築

ここではまず、粗視化 MD シミュレーションの結果得られた流束ベクトルから、最適化の対象となるパスウェイに沿った一連の流束ベクトルを選択した。次いでこれらをつなぐ経路を 16 の点に離散化し、これをガイドとして、基質ポケットに結合したリガンドの重心をけん引して移動させる targeted MD を実施した。ここでは、リガンドが結合した結晶構造 (PDB ID: 1PT2) に対し、水溶液中の環境で 100 ns の全原子 MD シミュレーション (平衡化 MD) を行い、この最終構造を targeted MD の初期構造とした。この構造と、リガンドの重心を 1 つの点から次の点に移動させる targeted MD の各ステップ

の最終構造 (15 個) を用いて、リガンドの酸素原子と近接 (5 Å 以内) するタンパク質の原子 (ただし、酸素原子、窒素原子、 γ 位の炭素または硫黄原子、 ζ 位の炭素原子、およびメチル基の炭素原子に限る) を選択した。このような原子ペアは 232 あり、この原子間距離を string 法の集団変数とした。この 16 組の集団変数から成る経路を、32 の点 (イメージ) に離散化した。それぞれのイメージの座標は 232 の原子ペアの原子間距離を表している。平衡化 MD の最終構造から出発して、リガンド結合状態に近いイメージから順に、このイメージの原子間距離に近くなるよう、当該原子ペアの原子間距離を束縛した MD を行った。各イメージに対するこの MD の最終構造を、初期パスウェイにおける、このイメージに共役した初期構造とした。平衡化 MD と targeted MD には Gromacs 4.6.5 を、それ以外の MD には NAMD 2.11 を用いた。タンパク質、リガンドの力場パラメータにはそれぞれ Amber ff12SB、GLYCAM 06j を、水のモデルには TIP3P を用いた。

② パスウェイの最適化

String 法[2]により初期パスウェイの最適化を行った。ここでは、パスウェイを構成する各イメージに共役した全原子モデルについて、集団変数を構成する原子ペアの原子間距離を集団変数の座標の値に強く束縛した MD を行い、集団変数の座標の値からのずれを用いて、集団変数の空間における自由エネルギー勾配を求めた。各イメージ間の距離が等しくなるようにしながら、この自由エネルギー勾配を下る向きにイメージの座標を更新することでパスウェイの最適化を行った。自由エネルギー勾配を求める MD は 20 ps 行い、自由エネルギー勾配の計算とイメージの座標の更新を 3000 回繰り返した。

③ 自由エネルギープロファイルの計算

String 法による最適化後のパスウェイのイメージの集団変数の値に、原子ペアの原子間距離を弱く束縛する umbrella sampling 法により、最適化パスウェイに沿った自由エネルギープロファイルを計算した。ここでは集団変数に原子間距離を用いているため、サンプルされる位相空間の体積は、イメージごとに異なるという問題がある。このため、リガンドとタンパク質の間に働く相互作用をゼロにしたシミュレーションを実施して自由エネルギープロファイルを計算し、これを差し引くことで補正した。各イメージについて 2 ns のシミュレーションを行い、初速を変えて 10 回繰り返した。2 ns のトラジェクトリの最後の 1.5 ns 分を用いて、multistate Bennett acceptance ratio (MBAR) 法[3]を用いて自由エネルギープロファイルを計算した。

(2) リガンド結合パスウェイに影響を与える変異体の設計

Pathway A はタンパク質表面にある長い溝に沿っており、この周辺に存在するアミノ酸残基を置換して溝の形状を変えることで、リガンド結合パスウェイに影響を与えることができる。そこで、Pathway A の周辺に存在する残基、D117、T160、G184 をいずれも Trp に置換してリガンド結合シミュレーションを行った。ここでは、タンパク質の粗視化モデルの周囲にリガンドの粗視化モデルをランダムに 10 分子配置し、5 μ s の粗視化 MD シミュレーションを、初速とリガンドの初期配置を変えながら 50~300 回繰り返した。粗視化 MD には、力場パラメータに MARTINI 2.2 を用いたことを除き、文献[1]と同じ条件を用いた。得られたトラジェクトリから、文献[1]の方法に従って、結合速度定数、解離速度定数、解離定数、リガンドの流束ベクトルを求めた。

(3) リガンド結合過程を記述するマルコフ状態モデルの構築

野生型に対する粗視化 MD シミュレーションのトラジェクトリの各スナップショットに含まれるリガンドの構造を、以下の手順により microstate に分類した。

- ① タンパク質の主鎖構造が重なるように系全体を並進・回転
- ② 系を 1 辺 4 Å の立方体状のセルに分割し、タンパク質表面から 10 Å 以内のセルを表面セルとする
- ③ リガンドの重心が表面セルより外側のセルに属するリガンドは、そのセルを microstate とする
- ④ 表面セルに属するリガンドは、クラスタに分類し、その構造が属するクラスタを microstate とする

Microstate 間の遷移の時系列データから、lag time を 6.4 ns とした遷移確率行列 \mathbf{T} を計算した。さらに、transition path theory [4] に基づき、committor と基質ポケットへの probability current を計算した。ここで committor q_n^+ は、状態 n から出て解離状態に達する前に結合状態に到達する確率であり、 $q_n^+ = 0.5$ が遷移状態に対応する。ここでは、リガンドの重心が表面セルより外側のセルに属する状態を解離状態とし、結合構造からの RMSD が最も小さい microstate を結合状態とした。Probability current f_{nm}^+ は、 $q_m^+ > q_n^+$ の時 $f_{nm}^+ = \pi_n T_{nm}(q_m^+ - q_n^+)$ 、 $q_m^+ \leq q_n^+$ の時 $f_{nm}^+ = 0$ で与えられる。ここで、 π_n は状態 n の存在確率である。解離状態から結合状態をつなぐ経路の中で、 f_{nm}^+ が最も小さな値をとるエッジをボトルネックとすると、ボトルネックの f_{nm}^+ の値が大きな経路が、結合への寄与が大きな経路であると言える。このような経路を探索し、リガンド結合パスウェイとして同定した。

4. 研究成果

(1) リガンド結合パスウェイの最適化と自由エネルギープロファイル計算

初めに、32 のイメージからなる初期パスウェイについて、string 法を用いて最適化を行った。パスウェイを記述する集団変数は 232 次元あり、その値は原子間距離であるため、これを可視化するために、パスウェイを構成する各イメージに共役した全原子モデルのタンパク質構造を、平衡化 MD の最終スナップショットのタンパク質構造に重ね合わせ、リガンド(sucrose)の glucose 部分と fructose 部分の重心位置を線でつないだ (図 1)。ここからわかるように、緑色で示す初期パスウェイには大きく湾曲した部分があるが、最適化された赤色のパスウェイは概ね滑らかになっている。しかし、この中でも、image 11 に対応する点がパスウェイから大きく逸脱していた。このため、このイメージを除いて image 10 と image 12 をつないだパスウェイを作成し、これを初期パスウェイとして再度最適化を行った。この結果、全体的に滑らかなパスウェイ (青色) を得ることに成功した。

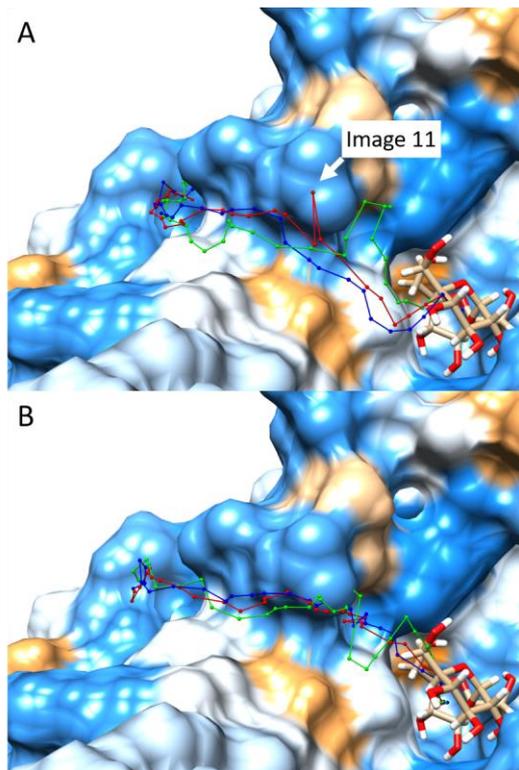


図 1: リガンド (sucrose) の glucose 部分 (A) と fructose 部分 (B) の重心位置から計算されたパスウェイ。初期パスウェイを緑色、32 イメージを用いた最適化後のパスウェイを赤色、image 11 を除いて再度実施した最適化後のパスウェイを青色で示す。平衡化 MD の最終構造のタンパク質の分子表面 (親水性残基: 青、疎水性残基: 橙、その他: 白) とリガンドのスティックモデル (炭素原子: 茶、酸素原子: 赤、水素原子: 白) を示した。

次いで、最適化後のリガンド結合パスウェイに沿った自由エネルギープロファイルの計算を行った (図 2)。

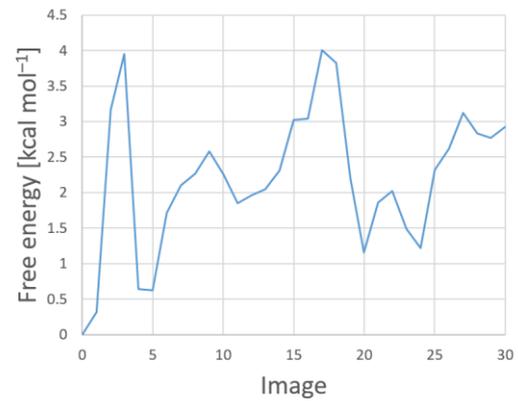


図 2: 最適化後のリガンド結合パスウェイに沿った自由エネルギープロファイル

ここで、image 0 は結合状態に相当する。ここから、image 4 および 5 は準安定状態であり、結合状態との間にエネルギー障壁 (image 2 および 3) が存在することが示された。準安定状態では、リガンドは、R246、K363 との水素結合に加えて、W163 との疎水相互作用を形成していた (図 3)。Image 3 では W163 から離れていることから、疎水相互作用が失われることが、高いエネルギー障壁の原因となっていると言える。

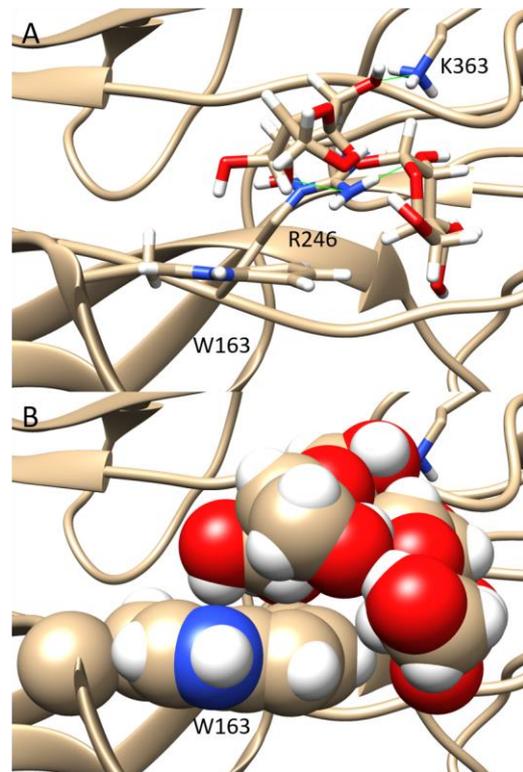


図 3: Image 5 と共役した全原子モデル。最適化後の最終構造を示す。(A) W163、R246、K363、リガンドをスティックモデルで示した。また、R246、K363 とリガンドとの間の水素結合を緑色の線で示した。(B) W163 とリガンドを空間充填モデルで示した。

(2) リガンド結合パスウェイに影響を与える変異体の設計

野生型と変異体に対する、粗視化 MD シミュレーションのトラジェクトリを解析した

結果得られた、結合・解離速度定数および解離定数を表1に示す。

表1: 結合・解離速度定数および解離定数

Protein	k_{on} [$10^7 M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [$10^4 s^{-1}$]	K_d [mM]
野生型	1.81	3.85	2.13
D117W	0.574	11.1	19.3
T160W	1.66	3.58	2.16
G184W	1.03	3.94	3.83

D117W 変異体を除き、変異は速度定数や解離定数に大きく影響しなかった。D117W 変異体では置換した Trp 側鎖が結合部位近くに存在するため、リガンドの結合や解離に直接影響していると考えられる。したがって、D117W 変異は、結合パスウェイに影響する変異とは言えない。

単変異体では影響が小さい可能性が考えられたため、2重変異体から9重変異体まで5種類の変異体を設計した。また、これまでのシミュレーションでは、側鎖の粗視化粒子同士が衝突する距離にある場合は、距離拘束をかけていたが、表面残基の側鎖については、その運動性を考慮に入れるために、距離拘束をかけずにシミュレーションを行った。シミュレーションは野生型と T160W 変異体を含めて50回行った。シミュレーションの結果得られた、結合・解離速度定数と解離定数は以下の通りである。

表2: 結合・解離速度定数および解離定数

Protein	k_{on} [$10^7 M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [$10^4 s^{-1}$]	K_d [mM]
野生型	1.25	0.808	0.646
T160W	1.06	3.67	3.45
2重変異体	1.86	4.26	2.29
6重変異体	1.75	3.43	1.96
7重変異体	2.73	3.50	1.29
8重変異体	2.78	1.72	0.619
9重変異体	2.28	4.25	1.86

ここで、2重変異体は D117E/T160R である。6重変異体では2重変異体の D301、K302、S362、S371 を Arg に、7重変異体では2重変異体の D301、K302、R304、S362、S371 を Trp に、8重変異体では6重変異体の Y237 を Arg、F435 を Glu に、9重変異体では8重変異体の A116 を Glu に置換した。しかし、変異によって結合・解離速度定数もしくは解離定数が大きく変化するものはなかった。そこで、これらの変異がリガンドの結合に本当に影響を与えないのかどうか確認するために、シミュレーションのトラジェクトリから、リガンドの流束ベクトルを求めた(図4)。この結果、野生型では遠くから基質ポケットに向かうリガンドの流れが観測されるのに対し、2重変異体では嵩高い残基によってこれが妨害されていることが明らかとなった。

このように、変異はリガンドの流束には影響を与えるものの、速度定数への影響は小さく、実験で検証可能なレベルの速度定数の変化を示す変異体は得られなかった。

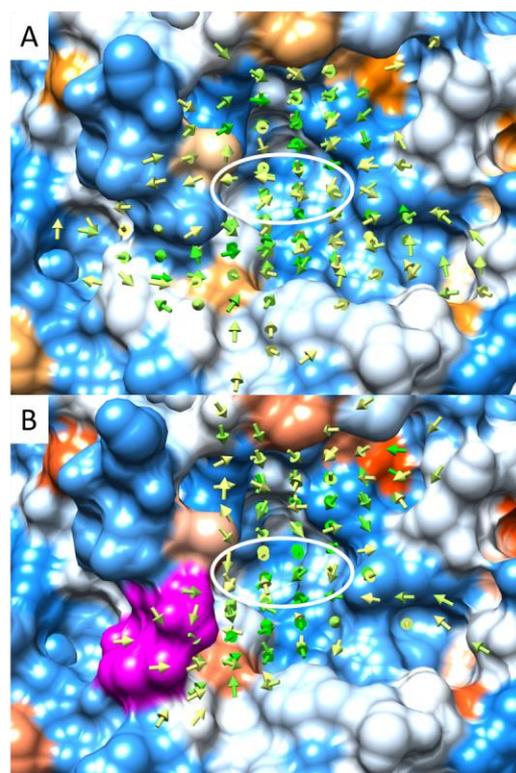


図4: 野生型(A)および2重変異体(B)に対するシミュレーションの結果得られた、リガンドの流束ベクトル。リガンド結合ポケットの位置を白い楕円で示した。(B)では置換したアミノ酸の分子表面を紫色で示した。

(3) リガンド結合過程を記述するマルコフ状態モデルの構築

「リガンド結合パスウェイ仮説」をより直接的に検証するため、野生型に対するシミュレーションのトラジェクトリ全体を使ってマルコフ状態モデルを構築した。さらに、得られたモデルに transition path theory [4] を適用し、遷移状態と結合パスウェイを解析した(図5)。図5A、5Bはそれぞれ $q_n^+ \geq 0.5$ 、 $q_n^+ \geq 0.3$ となる microstate に属するリガンドの代表構造を示している。ここから遷移状態は基質ポケットの縁に存在することと、この外側に結合状態に至る確率の高い領域が存在することが示唆された。上述の通り、全原子モデルを用いたリガンド結合パスウェイの最適化と自由エネルギープロファイル計算の結果、リガンドは基質ポケットに入ると、一旦基質ポケットの縁にある W163 と疎水相互作用を形成して準安定状態となり、ここから離れて結合状態に向かう際に大きな自由エネルギー障壁を経験することが明らかとなった。遷移状態が基質ポケットの縁にあるという粗視化 MD の結果は、全原子 MD の結果とよく一致していると言える。また、図5Cは、結合への寄与が大きな上位6つのリガンド結合パスウェイを示している。ここから、寄与の大きなリガンド結合パスウェイは、タンパク質表面の溝に沿う傾向があることが確かめられた。これは「リガンド結合パスウェイ仮説」を支持する結果である。同時に、

結合パスウェイが多数存在することも明らかとなった。したがって、1つのパスウェイに注目してこれを妨害する変異体を設計しても、実験で検証可能なレベルで速度定数を変化させる変異体を得ることは困難であると言える。

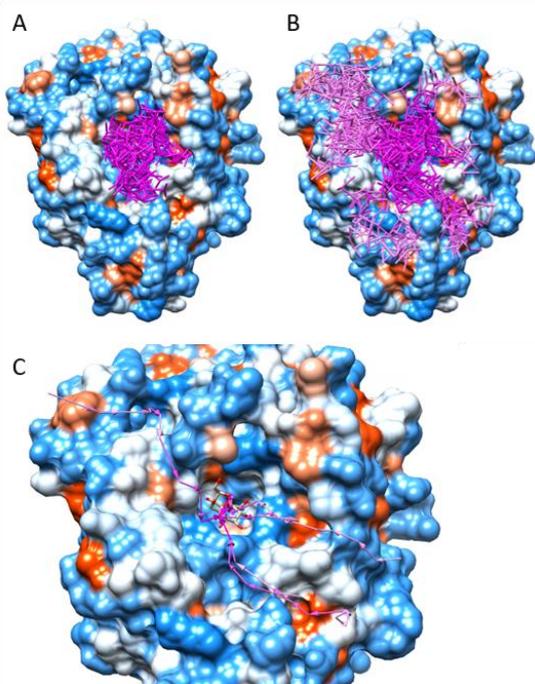


図5: Transition path theory によるマルコフ状態モデルの解析結果。(A) $q_n^* \geq 0.5$ となる microstate に属するリガンドの代表構造。(B) $q_n^* \geq 0.3$ となる microstate に属するリガンドの代表構造。リガンドの粗視化モデルを紫色のスティックモデルで示した。(C) 結合への寄与が大きな上位6つのリガンド結合パスウェイを、microstate 間をつなぐ矢印で示した。

<引用文献>

- [1] Negami, T., Shimizu, K., Terada, T., *J. Comput. Chem.* **35**, 1835–1845 (2014).
- [2] Maragliano, L., Vanden-Eijnden, E. *Chem. Phys. Lett.* **446**, 182–190 (2007).
- [3] Shirts, M. R. and Chodera, J. D. *J. Chem. Phys.* **129**, 124105 (2008).
- [4] Metzner, P., Schütte, C., Vanden-Eijnden, E. *Multiscale Model. Simul.* **7**, 1192–1219 (2009).

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 寺田 透, 分子動力学シミュレーションで探るタンパク質-リガンド相互作用, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年.

- ② Tatsuki Negami, Tohru Terada, Kentaro Shimizu, Coarse-grained simulations of protein–ligand binding: effect of mutations near the ligand-binding pathways, 日本生物物理学会第 54 回年会, 2016 年.
- ③ Tohru Terada, Yoshitaka Moriwaki, Tatsuki Negami, Kentaro Shimizu, Protein–ligand interactions studied by molecular simulations, The 44th Symposium on Structure-Activity Relationship & the 31st Assembly for Pesticide Design Research, 2016 年.
- ④ 寺田 透, 森脇由隆, 根上 樹, 吉野龍ノ介, 清水謙多郎, 分子シミュレーションで探るタンパク質-リガンド相互作用, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年.
- ⑤ Tohru Terada, Tatsuki Negami, Kentaro Shimizu, A multiscale approach to understanding protein ligand binding process, Biophysical Society 60th Annual Meeting, 2016 年.
- ⑥ 寺田 透, 粗視化分子動力学シミュレーションで探るタンパク質・リガンド結合過程, CBI 学会 2015 年大会, 2015 年.
- ⑦ Tatsuki Negami, Kentaro Shimizu, Tohru Terada, Protein–ligand binding pathways revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations, CBI 学会 2015 年大会, 2015 年.
- ⑧ Tatsuki Negami, Tohru Terada, Kentaro Shimizu, A comparative study of protein–ligand binding processes coupled to protein conformational change in coarse-grained simulation, 日本生物物理学会第 53 回年会, 2015 年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 透 (TERADA, Tohru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号: 40359641

(2) 研究協力者

根上 樹 (NEGAMI, Tatsuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員