

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16084

研究課題名(和文) 様々なプロトン化状態を取り入れた新規結合自由エネルギー計算に関する研究

研究課題名(英文) Binding free energy calculation based on various protonation states

研究代表者

藤原 伸一 (Fujiwara, Shin-ichi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：00362880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、タンパク質とリガンドの結合親和性を予測する計算法の正確度向上である。そのために、プロトン化状態が異なる立体配座を、一度に複数発生させることができる分子シミュレーションを利用した手法を考案し、本手法の有用性について検討した。モデルタンパク質を対象とした計算実験では、プロトン化状態を変えない従来法と比べて、本手法では結合親和性の予測値が大きく異なり、様々なプロトン化状態を計算に取り入れたことに伴う影響が確認された。ただし、この予測値は実験から求めた値と比べて依然としてずれがあり、例えばプロトン化状態を考慮すべきアミノ酸残基数を絞るなどの工夫が、正確度改善のために必要と推察された。

研究成果の概要(英文)：Information on binding affinity is important for understanding the functions of protein-ligand binding. Although various computational approaches have been used to predict binding free energy, accurate prediction remains difficult. To improve the quality of molecular mechanics/generalized Born surface area (MM/GBSA) binding free energy calculations, we here propose the use of trajectory data on protonation states along with the coordinates generated by constant pH molecular dynamics simulations. Compared with the conventional method using fixed protonation states, the inclusion of information pertaining to flexible protonation states markedly lowered the calculated binding free energies of the hMTH1-8-oxo-dGMP complex. This study demonstrated an approach to calculating the binding free energy based on reasonable protonation states of amino acids at various pH values.

研究分野：生命分子計算

キーワード：結合自由エネルギー 分子動力学 タンパク質 リガンド プロトン化状態 pH MM/GBSA

## 1. 研究開始当初の背景

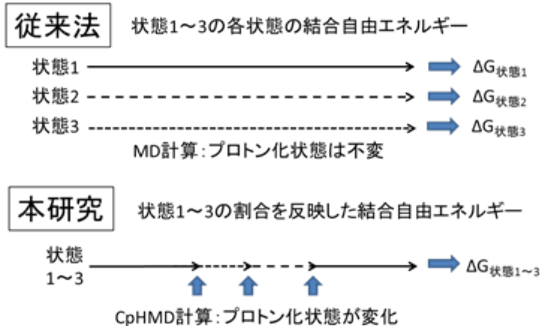
結合定数はタンパク質-リガンド間相互作用の強さを考える上で極めて重要であり、理論的に求められる結合自由エネルギーと密接な関係がある。結合自由エネルギーは、結合前後のエンタルピー差、エントロピー差、絶対温度から求めることができる。そのうちエンタルピー差とエントロピー差は、タンパク質、リガンド、複合体それぞれの立体配座から算出される。従来、分子動力学 (molecular dynamics; MD) シミュレーションなどにより多数の立体配座を発生させ、その各々から求めた結合自由エネルギーの平均をとる手法が採られている。

我々は、上述の手法を用いて、ヒト血清アルブミンとリガンド(脂肪酸)との結合自由エネルギー計算を行ったが (Fujiwara and Amisaki, 2008)、その計算値が、実験値(実験で求めた結合定数から算出したもの)と大きくずれる場合があった。この原因として、我々は、MD 計算で立体配座を発生させる際、タンパク質分子内の、酸性/塩基性アミノ酸のプロトン化状態が軽視されていることに着目した。プロトン化状態は、アミノ酸の配置やその周辺環境に応じて変化しうるが、通常の MD 計算(以下従来法と記す)では、最初にプロトン化状態を設定すると、途中でその状態が変化しないため、プロトン化状態が単一の立体配座しか得ることができない。

また、我々は、単独のヌクレオチド分子について MD 計算を行い、ヌクレオチド分子が取りうる立体配座が、リン酸のプロトンの有無で異なることを見出した (Fujiwara and Amisaki, 2014)。これは、プロトン化状態が途中で変化しない従来法では、別のプロトン化状態において取りうる立体配座を見逃してしまう可能性があることを示唆するものである。仮に、見逃した立体配座が、タンパク質-リガンド間相互作用の観点から十分に起こりうるものである場合、この見逃しが、結合自由エネルギー計算の正確度に重大な影響を及ぼしうると考えられる。

そこで我々は、結合自由エネルギー計算用の立体配座の発生に、pH 一定の MD シミュレーション(constant pH MD; CpHMD)を用いることを提案する。CpHMD 計算では、従来法とは異なり、その途中でアミノ酸のプロトン化状態を変化させることができるため、様々なプロトン化状態を持つ立体配座を得ることができる。さらに、シミュレーションが定常状態に達していれば、得られた多数の立体配座において、各アミノ酸残基のプロトン化状態の割合が、実際の現象に則したものになっている。したがって、CpHMD 計算により発生させる、様々なプロトン化状態を持つ立体配座を用いて結合自由エネルギーを計算すれば、

エンタルピー差とエントロピー差の値が共に改善され、結合自由エネルギー計算の正確度の向上が見込めると考えた。以下、従来法と本研究の違いを図に示した。



## 2. 研究の目的

CpHMD 計算により発生させた、様々なアミノ酸のプロトン化状態を持つ立体配座を用いることにより、結合自由エネルギー計算の正確度が従来法に比べてどの程度向上するかを検討する。この点について、ヌクレオチドプール浄化酵素 hMTH1 への酸化ヌクレオチド 8-oxo-dGMP (8OG) の結合をモデルタンパク質-リガンド複合体とし、立体配座の発生における従来の MD 計算と CpHMD 計算の比較検討を通して、本研究で提案している手法の有用性と限界を明らかにする。

## 3. 研究の方法

## (1) 結合自由エネルギー計算の手法

これまで複数の手法が報告されているが、本研究では MM/GBSA 法ベースとして計算を行うことにした。この手法は結合自由エネルギー計算においてよく用いられており、計算精度は多少粗いものの、計算コストは比較的少ないといった特徴がある。

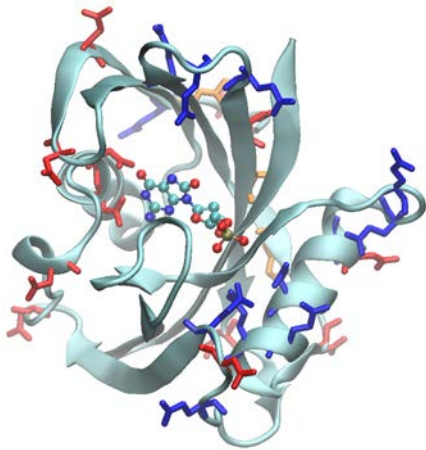
## (2) モデルタンパク質と計算実験

## ① hMTH1-8OG 複合体

hMTH1 は 156 個のアミノ酸残基からなるヌクレオチドプール浄化酵素であり、アスパラギン酸 12 残基、グルタミン酸 12 残基、ヒスチジン 3 残基が含まれている(次ページ図)。

## ② hMTH1 のプロトン化状態と MD 計算

従来法の MD 計算においては、pH=7 でのデフォルトのプロトン化状態を適用した。すなわち、酸性アミノ酸では側鎖のプロトンが外れた状態、ヒスチジンでは□位にプロトンが結合した状態、塩基性アミノ酸では側鎖のプロトンが結合した状態であった。一方、CpHMD 計算では、pH=7 の条件で、①で示した 27 残基のプロトン化状態を可変とした。



また、結合自由エネルギー計算用の立体配座サンプリングには、複数の MD シミュレーションを短時間行って得る手法 (Genheden et al., 2010) を用いて、計算値の極端なばらつきを防ぐことにより、従来法と本研究の手法の比較を行えるようにした。

### ③ 水の扱い方

水の扱い方には、a. 連続体とみなして (implicit solvent として) 扱う方法と、b. 水を分子として明示的に (explicit solvent として) 扱う方法がある。a は b に比べて計算量は少ないものの、シミュレーション自体の精度が低下する可能性がある。この点について、両者を比較検討した。

## (3) ソースコードの改変による本研究の実装

一連の MD 計算には AMBER14 および AMBER16 を用いた。本研究で提案している CpHMD 計算と MM/GBSA 計算を組み合わせた手法を行うためには、CpHMD 計算で得られる、各時間におけるプロトン化状態の情報を計算に取り入れる必要がある。そこで、以下の部分についてソースコードを改変し、実装した。

### ① MM/GBSA 計算本体

MM/GBSA 法を行えるプログラムのうち perl スクリプト `mm_pbsa.pl` を改変した。具体的には、エネルギー計算時 (`sander`) において、`-cpin` フラグが有効になるようにした。並行して、CpHMD 計算により得られたプロトン化状態ファイル (`cpout`) から、各時間ステップにおけるプロトン化状態ファイル (`cpin`) を作成した。このファイルを `-cpin` フラグを介して読み込めるよう改変した。

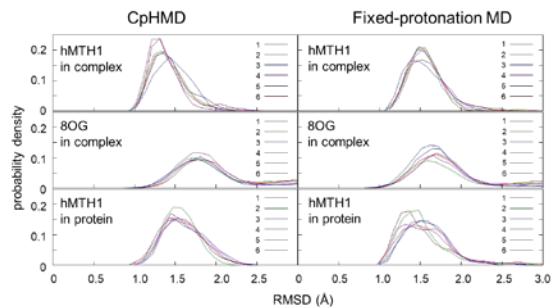
### ② 基準振動解析によるエントロピー計算

基準振動解析に基づくエントロピー計算を行うプログラム `nmode` のソースコードについて、`-cpin` フラグを介して `cpin` ファイルを読み込むことができるようにした。

## 4. 研究成果

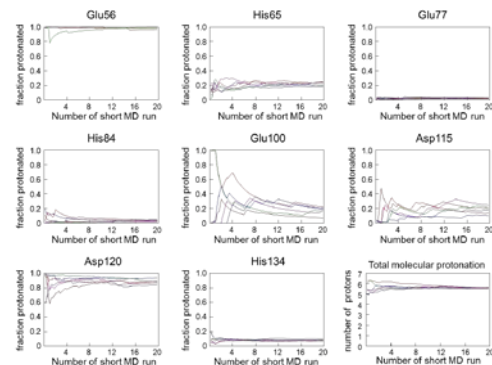
## (1) 分子動力学シミュレーションの検証

### ① 初期構造からのずれ



この図は、CpHMD 計算、従来の MD 計算 (fixed-protonation) それぞれについて、初期構造からの構造のずれ (RMSD) の確率密度を描いたものである。それぞれ同じ計算を 6 回行ったところ、おおむね曲線は重なっており、RMSD の観点から計算の再現性を確認した。また、いずれの計算においても、RMSD は 2 Å 未満で、MD 計算の途中で立体構造に大きな変化はないことを確認した。CpHMD では従来法に比べて RMSD 値のピークが小さかった。

### ② プロトン化状態の平衡



この図は、hMTH1-8OG 複合体の CpHMD 計算において、シミュレーション時間 (横軸) における各アミノ酸残基プロトン化の割合 (縦軸) を示したものである。プロトン化状態を可変とした 27 残基のうち、その大半はシミュレーションの過程でプロトン化状態の変化がなく、脱プロトン化状態を維持していた。図にはプロトン化の割合に特徴が見られた残基を示した。プロトン化状態はおおむね平衡状態に達していると考えられる。Glu100 や Asp115 など、一部のアミノ酸残基では、プロトン化の割合が、6 回のシミュレーション間で異なっている残基が見られた。

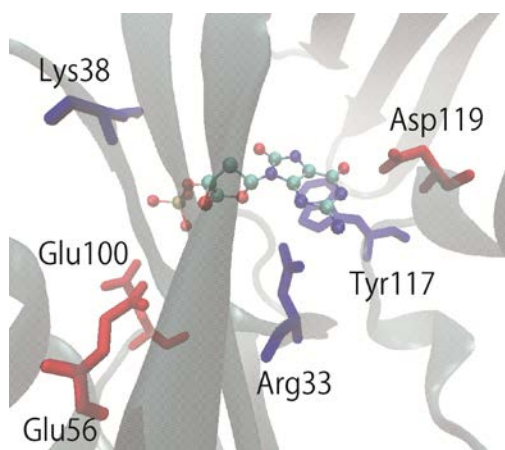
## (2) 結合自由エネルギー計算の検証

### ① implicit solvent

以下の表は、implicit solvent 条件において、CpHMD 計算、従来の MD 計算それぞれで

発生させたトラジェクトリデータに基づいて、MM/GBSA 法により結合自由エネルギーを求めた結果である(表の単位は kcal/mol, 括弧内の数値は標準誤差)。CpHMD 計算で発生させたトラジェクトリデータでは、従来の MD 計算で発生させたもの比べて、結合自由エネルギーの値が 10 kcal/mol 程度低い値となっていた。これは、CpHMD 計算により各アミノ酸残基のプロトン化状態が変化したことによるものと考えられた。

	CpHMD-based	fixed-protonation
Set1	-18.1 (0.8)	-6.1 (0.6)
Set2	-17.0 (0.9)	-4.7 (0.8)
Set3	-17.3 (0.9)	-6.9 (0.7)
Set4	-18.4 (0.8)	-6.0 (0.8)
Set5	-18.3 (0.9)	-6.4 (0.7)
Set6	-14.5 (0.8)	-3.1 (0.6)



MM/GBSA 法で求めた結合自由エネルギー値における各残基の影響を解析した。従来法に比べて本手法での結合自由エネルギー計算値に大きく影響を及ぼしたアミノ酸残基を示したのが上図である。赤色で示した残基は、CpHMD 計算においてプロトン化状態を可変とした残基であり、CpHMD 計算によりアミノ酸のプロトン化状態が、その周囲の環境に応じて変化していることが確認できた。

この結合自由エネルギー値をミカエリス定数から求まる結合自由エネルギーの実測値と比較した。実測値(-6.7 kcal/mol)に比べて、本手法で得られた値は大きくずれていた。implicit solvent 条件では強固な塩橋ができやすいことが指摘されており(Okur et al., 2008)、これが結合自由エネルギー値が低くなりすぎる原因と推察された。そこで、explicit solvent 条件での CpHMD 計算により、この問題の解決を試みた。

## ②explicit solvent

以下の表は、explicit solvent 条件において、CpHMD 計算、従来の MD 計算それぞれで

発生させたトラジェクトリデータに基づいて、MM/GBSA 法により結合自由エネルギーを求めた結果である(表の単位は kcal/mol, 括弧内の数値は標準誤差)。implicit solvent 条件の場合に比べて、結合自由エネルギーの値が高くなった。また、CpHMD 計算から求めた結合自由エネルギーは、結合自由エネルギーの実測値により近い値となった。これより、水分子を明示的に扱うことにより、implicit solvent 条件で見られた強固な塩橋の問題が軽減され、より正確な値が得られたと推察された。

	CpHMD-based	fixed-protonation
Set1	-11.1 (0.9)	0.6 (0.5)
Set2	-10.9 (0.9)	-6.8 (0.7)
Set3	-10.0 (1.0)	-0.7 (0.7)
Set4	-7.2 (0.9)	0.4 (0.7)
Set5	-12.1 (0.8)	0.5 (0.7)
Set6	-7.7 (0.8)	6.2 (0.8)

## (3)今後の課題

本研究で提案した手法において、解消すべき課題の一つに、サンプリングの問題がある。これは、プロトン化状態の平衡のデータにおいて議論したが、特に、explicit solvent 条件での CpHMD 計算では、シミュレーションごとにプロトン化状態が異なっており、現時点での計算実験では、プロトン化状態の割合が適切に求まった状態とは言いがたい。この点が、シミュレーションごとに結合自由エネルギー値のばらつき大きい原因の一つと推察される。プロトン化状態を可変とするアミノ酸残基の個数を減らし、より効率的なプロトン化状態のサンプリングを行う必要があると考えている。また、結合自由エネルギーの絶対値ではなく、相対値について他のモデルタンパク質を対象とした計算実験により、本手法の正確度をより議論できると思われる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

藤原 伸一、網崎 孝志、pH 一定の分子動力学シミュレーションによって発生させたアミノ酸の様々なプロトン化状態に基づく結合自由エネルギー計算、第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤原 伸一 (FUJIWARA, Shin-ichi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：00362880

### (4)研究協力者

網崎 孝志 (AMISAKI, Takashi)