

令和元年6月6日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07331

研究課題名(和文) タンパク質と薬剤の複合体構造予測法と結合自由エネルギー計算法の開発

研究課題名(英文) Accurate predictions of complex structure and affinity between proteins and drugs

研究代表者

神谷 成敏 (Kamiya, Narutoshi)

兵庫県立大学・シミュレーション学研究所・特任教授

研究者番号：80420462

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)：タンパク質と薬剤の結合構造や親和性を高精度で予測する方法を開発した。本法は、高い構造探索能力を有するマルチカノニカル分子動力学シミュレーションによる複合体構造探索と、アンブレラサンプリングによる親和性予測から成る。本法をノイラミニダーゼとタミフル、セクレターゼとその中分子阻害薬、抗体薬ソラネズマブとアミロイドペプチドの系に適用し、方法論の妥当性を評価した。全ての系において、マルチカノニカルMDによる構造予測は成功し、また、予測構造から出発して結合/解離経路を求めることができた。この経路上でアンブレラサンプリングを行ったところ、得られた結合自由エネルギーは実験値を良好に再現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬の現場で用いられてきたタンパク質と薬剤の複合体構造や親和性の予測法は、その精度に問題である。本申請で開発した方法は、最先端のシミュレーション技術を適用し、タンパク質と薬剤の結合構造や親和性を高精度で予測可能である。本研究の対象は、インフルエンザウイルスの酵素ノイラミニダーゼとタミフル、アルツハイマー型認知症の原因として考えられているアミロイドペプチドの生成に関わる酵素セクレターゼとその中分子阻害薬、アミロイドペプチドと高い親和性を持つ抗体薬ソラネズマブとアミロイドペプチドであり、本法が感染症や認知症関連の薬剤の開発に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The author has developed methods to predict the binding structure between proteins and drugs and to accurately calculate the binding affinity between them. These methods consist of multicanonical molecular dynamics simulation with a high sampling efficiency for the complex structure prediction and of umbrella sampling for the affinity prediction. To validate these methods, the author applied them to the systems, neuraminidase-tamiflu, -secretase-mid-sized drug, antibody drug of solanezmab-amyloid peptide. In all of the systems, the author succeeded in accurately generating the binding structures and association/dissociation path starting from the binding structures. The umbrella sampling along these path successfully reproduced the experimentally-obtained binding free energy.

研究分野：生物物理学

キーワード：自由エネルギー 分子動力学シミュレーション 構造予測

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

これまで、タンパク質の立体構造に基づく創薬 (Structure Guided Drug Design, SGDD) により、立体構造既知のタンパク質を標的としたインシリコ創薬が行われ、AIDS や慢性骨髄性白血病、肺ガン、インフルエンザ等の治療薬が製品化され始めた。ところが SGDD で用いられている手法には、(1) ターゲットタンパク質と薬剤の候補となるリガンドを剛体ドッキングの手法で取り扱うため、複合体形成時にアミノ酸主鎖の大きな構造変化がある場合は、天然の複合体構造を発生させることは極めて困難である探索空間の問題や、(2) 静電相互作用や溶媒和エネルギー、形状の一致度などの経験的なパラメータをスコアとして候補構造をランキングするため、ドッキングで天然構造に近いデコイを発生できたとしても、必ずしもその構造が上位にくるとは限らない評価関数の精度が低い問題、(3) 抗体薬などの巨大分子の配座生成とドッキングは自由度が大きすぎるためリガンドの大きさに制限がある問題がある。

申請者は、これまで、Non-Newtonian 分子動力学法の一つであるマルチカノニカル分子動力学 (molecular dynamics, MD) 法による分子構造探索手法を用い、対象とする温度領域における正確なアンサンブルを作ることによって、エントロピーを含めた自由エネルギーを高い精度で得る手法を、ペプチドのフォールディングやタンパク質-リガンド間のドッキング研究に適用してきた [N. Kamiya et al. *Protein Sci.* **261**, 470-489 (2002); N. Kamiya et al. *Proteins* **70**, 41-53 (2008)]. 特筆すべきは、これらの研究から得られた自由エネルギー最安定構造が、ペプチドやタンパク質-低分子リガンド複合体の天然構造と一致していた点である。即ち、ドッキング研究に関しては、自由エネルギーによるスコアを用いれば、従来のドッキング手法に比べ高精度の複合体予測が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質-薬剤複合体の構造や親和性を高速かつ高精度で予測する効率的な計算方法を開発することに加えて、実験では観測不可能な薬剤のタンパク質への結合過程を予測する方法を開発することである。本法では、エネルギー空間 (または温度空間) をランダムウォークすることで広い分子構造空間を探索することが可能なマルチカノニカル MD 法やあらかじめ定められた反応座標に沿って高精度に自由エネルギー計算が可能な Umbrella Sampling 法 (以後 US 法と略す) をタンパク質と薬剤のドッキングシミュレーションや親和性予測に適用する。US 法は、アンブレラポテンシャルと呼ばれる調和ポテンシャルによって構造をローカルな領域に拘束しその領域内を詳細に探索する方法である。タンパク質のリガンド結合部位と溶媒領域の間を結ぶ経路をあらかじめマルチカノニカル MD で反応座標として決定し、この反応座標に沿って US を実施すれば、結合状態と解離状態の平均力の差から結合自由エネルギーが得られる。

計算対象として、インフルエンザウイルスの酵素であるノイラミニダーゼとこれを阻害する薬剤タミフル、アルツハイマー型認知症の原因として考えられているペプチド (アミロイド β ペプチド) の生成に関わる酵素である β セクレターゼとその中分子阻害剤 3MR、アミロイド β ペプチドと高い親和性を持つ抗体薬ソラネズマブとアミロイド β ペプチドを扱う。これらの中で、認知症に関しては有力な治療薬がこれまで見つかっていないため、迅速な開発が望まれている。

本法から得られた反応座標に沿ったタンパク質や薬剤の構造と自由エネルギーから、ターゲットタンパク質の薬剤認識過程における作用機序を原子レベルで理解する。本研究により従来の結合状態構造のみに注目した薬剤デザインから、結合過程を考慮した薬剤デザインが可能となり創薬の幅が大きく広がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ノイラミニダーゼとタミフルのマルチカノニカル MD シミュレーション

マルチカノニカル MD の計算コストを低減するために、ノイラミニダーゼのリガンド結合ポケットからバルク領域に円柱を生成し、円柱内にリガンドの重心が存在するようにリガンドを拘束した (図 1)。ここで、リガンドの重心が円柱の外部に出た際に円柱内に戻す力をかけることで、拘束した。リガンドの初期構造は、タンパク質と十分離れたバルク領域とした。最小温度、最大温度をそれぞれ、280 K、700 K に設定した。

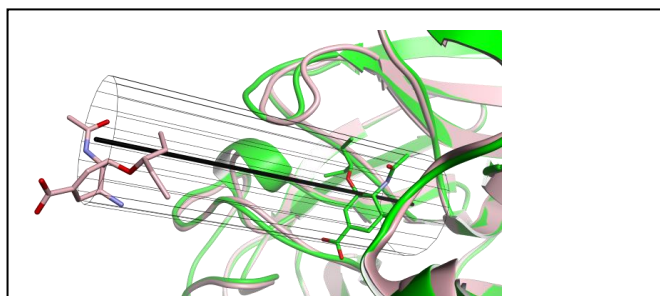


図1 ノイラミニダーゼ-タミフルの計算系
ノイラミニダーゼをリボン、タミフルをスティックモデルで示す。天然構造を緑、初期構造を紫で、円柱 (半径 4 Å) とその中心軸を図中に示す。

(2) β セクレターゼと 3MR のマルチカノニカル MD シミュレーション

マルチカノニカル MD の計算コストを低減するために、ノイラミニダーゼ計算と同様な円柱 (半

径 4 Å) を生成し、円柱内にリガンドの重心が存在するようにリガンドを拘束した。US シミュレーションに使用するため、得られた構造をクラスタリングし、代表構造として 10 個を抽出した。これらの構造の精密化を行うため、100 ns の温度一定のシミュレーション (カノニカル MD シミュレーション) を 300 K で実施した。

(3) β セクレターゼと 3MR の US シミュレーション

各初期構造において、常温 300 K で 100 ns の US シミュレーションを行った。各シミュレーションの初期構造は、マルチカノニカル MD のトラジェクトリから抽出した。Grossfield のプログラム WHAM によって解析し、自由エネルギープロファイルを得た。自由エネルギープロファイルの結合状態と非結合状態の自由エネルギー差から結合自由エネルギーを計算した。

(4) 抗体薬ソラネズマブとアミロイド β ペプチドのマルチカノニカル MD シミュレーション

アミロイド β ペプチドは、全長 (42 残基) のペプチド断片 (Lys16-Leu17-Val18-Phe19-Phe20-Ala21-Glu22-Asp23-Val24-Gly25-Ser26) が結合している。抗体薬へのドッキングには、このペプチド断片を用いた。マルチカノニカル MD の計算コストを低減するために、ノイラミニダーゼ計算と同様な円柱 (半径 4 Å) を生成し、円柱内にリガンドの重心が存在するようにリガンドを拘束した。得られた常温の構造をクラスタリングし、代表構造として 10 個を抽出した。

(5) 抗体薬ソラネズマブとアミロイド β ペプチドの US シミュレーション

3 と同様に Grossfield のプログラムによって解析し、自由エネルギープロファイルを得た。

(6) 全長のアミロイド β ペプチドが抗体薬ソラネズマブに結合したモデル

マルチカノニカル MD の代表構造を精密化することで得られた 10 個の精密化代表構造の中で、2 個の安定構造を選択し、これらに結合している 11 残基のペプチド断片を伸ばすことで全長 42 残基の結合モデルを作成した。

4. 研究成果

(1) ノイラミニダーゼとタミフルのマルチカノニカル MD シミュレーション

代表著者らが開発したマルチカノニカル MD によるドッキングステーション法の妥当性を検証するため、複合体構造が解かれている低分子薬剤のタミフルとノイラミニダーゼのシミュレーションを実施し、複合体構造が計算によって再現するかどうかを試した。マルチカノニカル MD によって得られた、常温の自由エネルギー地形は、マルチカノニカル MD トラジェクトリを主成分分析 (Principal component analysis, PCA) し、得られた結果を第 1 主成分軸 (PC1)、第 2 主成分軸 (PC2) に射影することで、作成した。構造の分布は、対角線に帯状に広がりがあり、空間全体には及んでいない。これは、あらかじめ、シリンダーでリガンドの空間を拘束した (図 1) ためである。平均力ポテンシャル (Potential of mean force, PMF) の最小点が、天然構造の分布位置と一致している。この結果は、シミュレーションから得られた自由エネルギー最小点が天然構造の分布位置と一致することを意味する。従って、マルチカノニカル MD でドッキングシミュレーションを行い、系の自由エネルギー地形を評価すれば、天然の複合体構造を正確に予測できることが示された。

(2) β セクレターゼと 3MR のマルチカノニカル MD シミュレーション

低分子のタミフルでは複合体構造を再現することができたが、構造自由度が高いため、より難易度の高い、中分子薬剤 3MR と大きな薬剤結合部位を持つ酵素 β セクレターゼを対象として、複合体構造が計算によって再現するかどうかを検証した。図 2 にマルチカノニカル MD によって得られた、常温の自由エネルギー地形を示す。PMF の安定領域 (PMF < 5 kcal/mol) は単一の大きな領域から構成されている (図 2 A)。常温の構造アンサンブルをクラスタリングし 10 個

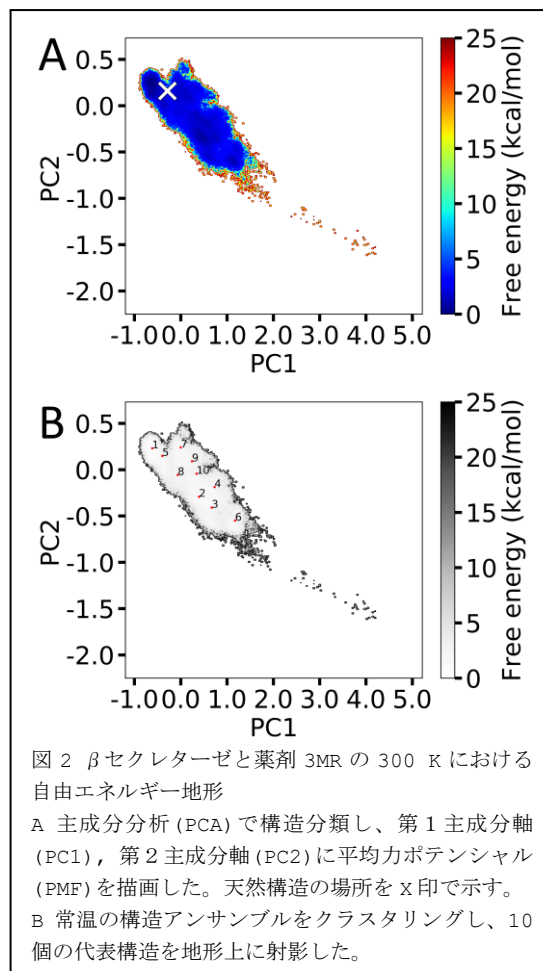


図 2 β セクレターゼと薬剤 3MR の 300 K における自由エネルギー地形

A 主成分分析 (PCA) で構造分類し、第 1 主成分軸 (PC1)、第 2 主成分軸 (PC2) に平均力ポテンシャル (PMF) を描画した。天然構造の場所を X 印で示す。
B 常温の構造アンサンブルをクラスタリングし、10 個の代表構造を地形上に射影した。

得られた、常温の自由エネルギー地形を示す。PMF の安定領域 (PMF < 5 kcal/mol) は単一の大きな領域から構成されている (図 2 A)。常温の構造アンサンブルをクラスタリングし 10 個

の代表構造を抽出すると (図 2B)、全ての構造は安定領域に分布している。自由エネルギーが安定な構造から順に 1 から番号付けすると、天然構造の分布位置は構造 5 と一致している (図 2)。また、最安定な構造 (構造 1) に近い。これらの結果は、シミュレーションから得られた自由エネルギー最小点が天然構造の分布位置と近接することを意味する。構造 1 を詳細に解析するため構造の R 値を計算した。ここで、R 値は天然構造のタンパク質と薬剤のコンタクトの保持率で、天然構造では 1、完全にリガンドが解離した構造では 0 である。構造 1 の R 値は、0.918 となり、天然構造のコンタクトの大部分が保存されていた。

クラスタリングにより抽出した 10 個の構造安定性を評価するために、それぞれの構造を初期構造として、常温 (300 K) と高温 (400 K) のカノニカル MD シミュレーションを実施した。初期構造を参照構造とした R 値を解析したところ、構造 1 が常温と高温のシミュレーションの両方で 0.9 程度の大きな R 値を持つことが分かった (R=0.932 at 300 K; R=0.897 at 400 K)。構造 1 の常温のシミュレーションにおいて、天然構造との root-mean-square deviation (rmsd) を解析すると 1.23 Å となり、天然構造に極めて近いことが明らかになった。マルチカノニカル MD では、シリンダーの拘束をリガンドにかけていて、今回の中分子薬剤のシミュレーションではシリンダーの半径 4 Å が小さすぎたために、薬剤が安定な場所に結合できないことが判明した。マルチカノニカル MD 後の安定性の評価の MD では全ての拘束をかけていないため、中分子薬剤が安定な場所に結合できたと解釈できる。従って、マルチカノニカル MD でドッキングシミュレーションを行い、系の自由エネルギー地形を評価すれば天然の複合体構造を正確に予測できるが、その後に構造安定性の評価を実施すれば更に計算精度が向上することが示された。

(3) β セクレターゼと 3MR の US シミュレーション

代表者らが開発したマルチカノニカル MD から得られた薬剤の結合経路に沿った US シミュレーションを検証するため、親和性の実験値が得られている β セクレターゼと 3MR の系に適用し、親和性の計算を実施した。マルチカノニカル MD で結合状態や解離状態、中間状態を全て探索済みなので、マルチカノニカル MD トrajジェクトリを利用する。結合状態 (構造 1 のリファイン後の構造) から始めて、 λ 軸に沿ってリガンドの重心を解析し、構造の類似性から抽出した。構造の類似性は、上で用いた R 値で測定した。

図 3 に β セクレターゼと薬剤の常温における自由エネルギープロファイルを示す。 λ' が約 5 Å で PMF が約 13 kcal/mol 上昇し、その後、定常状態に到達する。薬剤とタンパク質のコンタクトが消滅し始める状態 (約 20 Å) でわずかに PMF が上昇し、完全に解離した状態 (λ' 約 25 Å) で完全にプラトーになる。このプロファイルから結合状態と解離状態の自由エネルギー差は、-16.43 kcal/mol となる。実験値と比較するためには、結合状態の体積の補正が必要で、これを算出すると、-5.09 kcal/mol となる。結果として、標準結合自由エネルギーは、-16.43 - (-5.09) = -11.34 kcal/mol となり、実験値 -10.92 kcal/mol を非常によく一致した。以上から代表者らが開発した US シミュレーション法は、結合自由エネルギーを高精度で求めるために有用であると結論した。

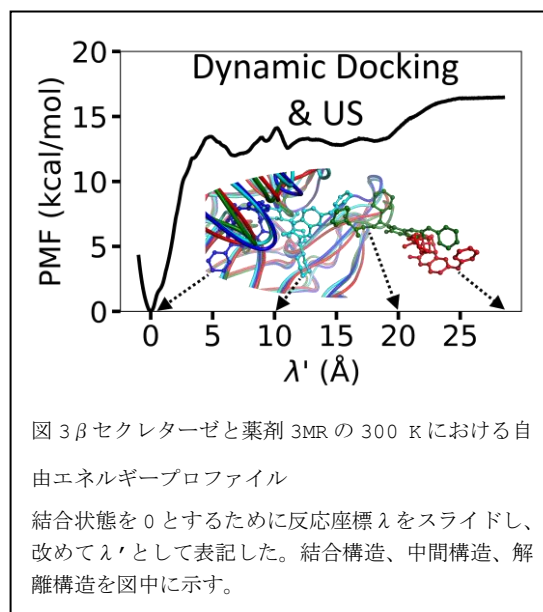


図 3 β セクレターゼと薬剤 3MR の 300 K における自由エネルギープロファイル
結合状態を 0 とするために反応座標 λ をスライドし、改めて λ' として表記した。結合構造、中間構造、解離構造を図中に示す。

(4) 抗体薬ソラネズマブとアミロイド β ペプチドのマルチカノニカル MD シミュレーション

11 残基のアミロイド β ペプチドと大きな抗原結合部位を持つ抗体薬ソラネズマブを対象として、複合体構造が計算によって再現するかどうかを検証した。ペプチドとソラネズマブ、水、イオンから成る系のマルチカノニカル MD を実行した。天然構造が自由エネルギー最小領域 (構造 1 : PMF=0.04 kcal/mol) に分布し、PMF によって評価することで、複合体構造を正確に予測できることが明らかになった。また、自由エネルギーが二番目に安定な構造 (構造 2 : PMF=0.36 kcal/mol) においてもペプチドの N 末端が構造 1 と類似な結合様式を取っていた。構造 2 の C 末端は、ソラネズマブの溝に入っており、安定な構造を取っていた。

(5) 抗体薬ソラネズマブとアミロイド β ペプチドの US シミュレーション

マルチカノニカル MD から得られた薬剤の結合経路に沿った US シミュレーションを構造自由度が高くより難易度の高い、11 残基のアミロイド β ペプチドと抗体薬ソラネズマブ親和性の計算に適用した。自由エネルギー最小領域に分布した構造 1 と構造 2 をそれぞれの初期構造として、マルチカノニカル MD トrajジェクトリから抽出することで、US シミュレーションに用いる解離経路を求めた。これらの経路に沿った US 法による自由エネルギー計算を実施した。結合自由エネルギーは、両者共に約 20 kcal/mol であり、実験で報告されているピコ M オーダーの強い親和性があることが示され、実験値を良く再現することが確かめられた。

(6)全長のアミロイドβペプチドが抗体薬ソラネズマブに結合したモデル
自由エネルギー最小領域に分布した2構造をそれぞれの初期構造として、全長のアミロイドβペプチド(42アミノ酸残基)が結合したモデルを作成した。作成した構造をカノニカルMDシミュレーションにより精密化し、最終構造を得た。得られた2種類のモデルから、アミロイドβペプチドC末端側はフレキシブルな状態でN末端側が抗体と強く結合することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- 1) G.-J. Bekker, M. Araki, K. Oshima, Y. Okuno, N. Kamiya *J. Phys. Chem. B* **123**, 2479-2490 (2019). DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b12419
- 2) G.-J. Bekker, B. Ma, N. Kamiya *Protein Sci.* **28**, 429-438 (2019). DOI: 10.1002/pro.3546
- 3) S. Inaba, N. Kamiya, G.-J. Bekker, F. Kawai, M. Oda *J. Therm. Anal. Calorim.* **135**, 2655-2663 (2019). DOI: 10.1007/s10973-018-7447-9
- 4) M. Araki, H. Iwata, B. Ma, A. Fujita, K. Terayama, Y. Sagae, F. Ono, K. Tsuda, N. Kamiya, Y. Okuno " *J. Comput. Chem.* **39**, 2679-2689 (2018). DOI: 10.1002/jcc.25715
- 5) N. Numoto, N. Kamiya, G.-J. Bekker, Y. Yamagami, S. Inaba, K. Ishii, S. Uchiyama, F. Kawai, N. Ito, M. Oda *Biochemistry* **57**, 5289-5300 (2018). DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00624
- 6) R. Kawai, M. Araki, M. Yoshimura, N. Kamiya, M. Ono, H. Saji, Y. Okuno *ACS Chem. Neurosci.* **9**, 957-966 (2018). DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00389
- 7) M. Oda, S. Inaba, N. Kamiya, G.-J. Bekker, B. Mikami *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **1866**, 415-425 (2018). DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.12.004
- 8) G.-J. Bekker, N. Kamiya, M. Araki, I. Fukuda, Y. Okuno, H. Nakamura *J. Chem. Theory Comput.* **13**, 2389-2399 (2017). DOI: 10.1021/acs.jctc.6b01127
- 9) M. Araki, N. Kamiya, M. Sato, M. Nakatsui, T. Hirokawa, Y. Okuno *J. Chem. Inf. Model.* **56**, 2445-2456 (2016). DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00398
- 10) N. Shimba, N. Kamiya, H. Nakamura *J. Chem. Inf. Model.* **56**, 2005-2012 (2016). DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00066
- 11) H. Nishigami, N. Kamiya, H. Nakamura " *Protein Eng. Des. Sel.* **29**, 477-484 (2016). DOI: 10.1093/protein/gzw028
- 12) N. Kamiya, T. Mashimo, Y. Takano, T. Kon, G. Kurisu, H. Nakamura *Protein Eng. Des. Sel.* **29**, 317-326 (2016). DOI: 10.1093/protein/gzw022

[学会発表] (計8件)

- ① 神谷 成敏 "クチナーゼの分子動力学計算による反応機構解析" 日本農芸化学会 2019年度東京大会, 東京農業大学 世田谷キャンパス, 東京, 2019年3月27日.
- ② N. Kamiya, B. Ma, G.-J. Bekker. "Thermal stability of single domain antibodies estimated by MD simulations" The 63rd annual meeting of Biophysical Society, Baltimore Convention Center, Baltimore, USA, 2019年3月3日.
- ③ G.-J. Bekker, B. Ma, N. Kamiya. "Estimation of single domain antibody stability by MD simulations" 第56回日本生物物理学会年会, 岡山大学 津島キャンパス, 岡山, 2018年9月16日.
- ④ N. Kamiya, B. Ma, G.-J. Bekker "Stability of single domain antibodies by molecular dynamics simulation" The 32nd annual symposium of the Protein Society, Boston Marriott Copley Place, Boston, USA, 2018年7月11日.
- ⑤ N. Kamiya, G.-J. Bekker, S. Inaba, B. Mikami, M. Oda. "Binding mechanism of laminarihexaose to endo-1,3-βglucanase analyzed using molecular dynamics simulations" The 62nd annual meeting of Biophysical Society, Moscone Center, San

Francisco, USA, 2018年2月19日.

- ⑥ 神谷 成敏. “マルチカノニカル分子動力学法によるタンパク質・リガンドのフレキシブルドッキング” 近畿化学協会コンピュータ化学部会公開講演会第101回例会, 大阪科学技術センター, 大阪市西区, 2018年2月1日.
- ⑦ N. Kamiya. “Tackling drug design challenges by advanced molecular dynamics simulations” University of Hyogo Leading Program International Symposium 2017, Center for Advanced Science & Technology Hyogo (CAST), Ako, Japan, 2017年12月5日.
- ⑧ G.-J. Bekker, N. Kamiya, M. Araki, I. Fukuda, Y. Okuno, H. Nakamura. “Flexible docking and affinity calculation between CDK2 and its inhibitor CS3 using multicanonical MD and thermodynamic integration” 第55回日本生物物理学会年会, 熊本大学 黒髪北地区, 熊本, 2017年9月21日.

[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:
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:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/cvofnkamiya/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 無し

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 無し

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。