

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570160

研究課題名（和文）

タンパク質と薬剤の結合自由エネルギー評価法の開発

研究課題名（英文）

Development of the free-energy evaluation method between protein and drug molecules

研究代表者

神谷 成敏（KAMIYA NARUTOSHI）

大阪大学・蛋白質研究所・招へい研究員

研究者番号：80420462

研究成果の概要（和文）：効率的に薬剤をデザインするために、タンパク質と薬剤の結合自由エネルギー評価法の開発を行った。本法は分子動力学シミュレーションから得られた結合自由エネルギーを評価関数とするため、高精度なタンパク質-薬剤複合体の予測が可能である。複数のタンパク質とリガンドの複合体構造予測を行った。その結果、自由エネルギーが安定な複数のクラスターが得られ、全ての系において天然構造が安定なクラスターに含まれることが確認された。以上から、本法は高精度でタンパク質-薬剤複合体構造が予測可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：The author developed the binding free-energy evaluation method between protein and drug molecules to design drugs effectively. Since our method uses binding free-energy as a score function, the method is able to predict protein-ligand complexes with high accuracy. We obtained some stable clusters which have low free-energy values, and native complex structures were included in one of these clusters for all of the protein-ligand systems. Thus our method predicts protein-drug complexes with high accuracy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：構造・機能予測

1. 研究開始当初の背景

薬剤の開発には膨大な費用や時間がかかり、これらは年々増えていることをよく耳にする。開発コストを軽減するためには理論的なアプローチが必須であるが、年々増加する開発費や開発期間から察すると理論的研究の創薬への貢献度は低いと思われる。近年、タンパク質の立体構造に基づく創薬（Structure Based Drug Design, SBDD）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。SBDDでは、ターゲットタンパク質と薬剤の候補となる多くの低分子リガンドのスクリーニングのためのドッキングが主要なプロセスである。従来から使われている、DOCK [I. D. Kunz et al. J. Mol. Biol. (1982) 161, 269-288] や FlexX [M.

Rarey et al. J. Mol. Biol. (1996) 261, 470-489], GOLD [G. Jones et al. J. Mol. Biol. (1997) 267, 727-748]等のドッキングプログラムは、幾何学ハッシングや遺伝アルゴリズム等の採用により短時間で多くのリガンドの配座や配置(以後、ポーズと呼ぶ。)を求め、経験的なスコア関数により各ポーズの順位付けをする。従来のドッキング法は、計算時間を優先した作りになっているため、正しいリガンドのポーズを高精度で予測するのは困難である。例えば、タンパク-リガンド複合体が既知のペアに対してドッキングを行った場合、スコアの上位10番までに答えを見出すことは稀である。また、従来法の多くは、タンパク質を剛体として扱い、リガンドが結合する際にタンパク質の誘導適合が起きることは考慮されてないため、誘導結合が起こる系では予測精度が大きく低下する。以上から、SBDDが発展するためには、その基盤技術であるドッキング法の精度の向上が必須である。

2. 研究の目的

タンパク質と薬剤との複合体構造や結合自由エネルギーを高速かつ高精度で予測するドッキング計算方法を開発する。ドラッグターゲットとして注目されている複数のタンパク質に対して本法を適用し、本法の薬剤スクリーニング手法としての有効性をテストする。本法から得られたタンパク質と薬剤との結合自由エネルギー地形から、分子認識過程におけるタンパク質と薬剤の構造変化や構造安定性を解析し、薬剤の作用機序を原子レベルで理解する。

具体的には、タンパク-リガンド間のドッキング研究にマルチカノニカル分子動力学(McMD)による分子構造探索手法を適用し、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値や自由エネルギー地形を高い精度で得る手法を開発する。ところが、本手法には次に示す3つの問題点がある。第1の問題点は計算時間であり、プログラムを高度に並列化する必要がある。第2の問題点は、適用例が少ないことであり、リゾチームとその阻害剤の系への適用にとどまっており、より多くのタンパク-リガンドのペアに適用し、方法論の妥当性を試す必要がある。第3の問題点は、自由エネルギーの評価法であり、構造アンサンブルをリガンドの溶媒露出表面積等の軸にマッピングし、平均力ポテンシャルとして自由エネルギーを評価するが、マッピングする軸によって解(自由エネルギー最安定構造)が異なる場合があるので、正解を得るためのマッピング法を確立する必要がある。本研究課題は、上記問題点を克服し、創薬や分子認識の研究の基盤となるドッキング手法を構築するこ

とである。

3. 研究の方法

(1) MPIによる presto プログラムの並列化
一連のドッキング手法の中で最も時間がかかる、McMD法によるドッキングシミュレーションが実装された presto プログラム[K. Morikami et al. (1992) Comput. Chem. 16, 243-248]を高速化する。presto プログラムは並列化されていないため、並列言語 MPIにより、最も計算時間がかかる非結合相互作用部分を並列化することで、ドッキングシミュレーションの高速化を実現する。

(2) Factor Xa とそのリガンドのドッキングシミュレーション

血液凝固因子 Factor Xa (FXa)の阻害剤は、抗血液凝固剤として外科手術等に用いられている。本研究課題では、FXaの阻害剤として、22から110 nMのIC50を持つ複数のN-(6-Chloronaphthalen-2-yl)sulfonylpiperazine 誘導体 [N. Haginoya et al. J. Med. Chem. (2004) 47, 5167-5182]を研究対象とする。これらの中で、リガンド1(図1)は、FXaと高いアフィニティ(IC50 = 24 nM)を持ち、FXaとの複合体構造は既知である。リガンド2(図1)は、立体構造は未知であるが、リガンド1に比べてIC50が約5倍大きいことが知られている。

自由エネルギーの評価は、次に示す手順で実施する。第1に、分子軌道計算で求めた高精度のリガンド電荷をシミュレーションに用いるとドッキングの精度を上げることができるので、シミュレーションを行う前に、分子軌道計算プログラム Gaussian 03でリガンドの電荷を求める。第2に、FXaとリガンドのドッキングシミュレーションを実施する。その際、タンパクの二次構造を維持するために、特定の原子ペアに対して距離拘束をかける[N. Kamiya et al. Proteins (2008) 70, 41-53]。第3に、結果の妥当性の評価として、天然構造が予測した構造アンサンブルの中に含まれているかどうかを確認する。含まれている場合は、次のステップに進み、含まれていない場合は、タンパクやリガンドのパラメータや、距離拘束法を検討し、天然構造が得られるまで、シミュレーションを実行する。第4に、自由エネルギーの評価法の検討を行う。リガンド結合自由エネルギーは、シミュレーションから得られた構造アンサンブルある軸(x)にマッピングすることで、平均力ポテンシャル(F)として求める(式1)。

$$F(x) = -RT \ln(P(x)) \quad (1)$$

ここで、Rは気体定数、Tは温度(300 K)、Pは存在確率である。軸として、通常の研究では、リガンドの溶媒露出表面積やリガンドの天然構造との root-mean-square-deviation

(rmsd)が用いられているが、近年の我々のグループの研究から、これらのパラメータよりも、構造群の主成分分析から得られた、第1主成分軸や第2主成分軸、第3主成分軸にマッピングした結果が、より正しい自由エネルギーを与えることが明らかにされているので [N. Kamiya et al. Protein Sci. (2002) 11, 2297-2307; N. Kamiya et al. J. Phys. Chem. B (2007) 111, 5351-5356; N. Kamiya et al. Proteins (2008) 70, 41-53]、通常のパラメータに加えて主成分のパラメータに対してもマッピングし、天然構造が自由エネルギー最小点に分布するか否かを検討する。また、リガンドの結合定数を求めて、文献値と比較する。

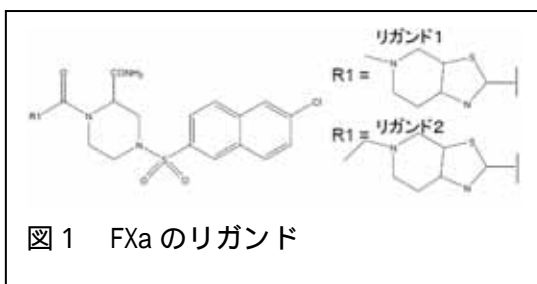


図1 FXaのリガンド

(3) 抗ダンシルリシン抗体と抗原のドッキングシミュレーション

抗体には抗原認識に重要な6個のループ(CDRH1-3, CDRL1-3)があり、これらはフレキシブルである。抗原のダンシルリシン(5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonic lysine)は、抗体のCDRH3とCDRH1を認識する。抗原-抗体の複合体構造を正しく予測するためにはループの構造を正しく予測する必要がある。FXaの系では全ペプチド主鎖に緩い拘束をかけたが、抗体の系ではCDRループの拘束を外して探索する必要があるため、より予測の難易度が高い。自由エネルギーの評価はFXaと同様な手法で行う。

(4) PPAR とそのリガンドのドッキングシミュレーション

核内受容体 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) は糖尿病や高血圧に関わるタンパク質で、そのアゴニストは糖尿病や高血圧の治療薬になりうる。PPARのリガンド結合ドメインにはリガンド結合ポケットがあり、そこにリガンドが結合する。リガンド結合ポケットは、ほとんど溶媒に露出しておらず、タンパク内部に埋もれた形状をしている。PPARがリガンドと結合するためには、リガンドをポケット内部に通すための構造変化が必要であるが、その機構は解明されていない。

まず、アポ体のPPARを対象として水溶液中における常温の分子動力学シミュレーション

を実施し、ポケットを形成するアミノ酸残基の構造変化や熱揺らぎを解析する。次に複合体構造既知のPPARとリガンドに対してMcMD法によるドッキングシミュレーションを実施する。ここで、PPARの主鎖や炭素は高温状態での崩壊をさけるために拘束するが、リガンドがポケットに入り込むための構造変化を許容するために、アポ体のシミュレーションで得た知見を基にポケットに柔軟性を持たせる。リガンドとしては、脂肪酸のアナログであるC8-BODIPYを対象とする。自由エネルギーの評価はFXaと同様な手法で行う。

4. 研究成果

(1) MPIによるprestoプログラムの並列化 prestoプログラム

表1にGPCR、脂質、イオン、水の系における1ステップの分子動力学シミュレーションに要する計算時間を示す [N. Kamiya et al. (2013) Chem. Phys. Lett. 568-569, 26-32]。カットオフ距離にかかわらず、並列数(n)が1から32までは、計算時間が並列数を増やすにつれて短縮することがわかる。また、32並列を超えると計算速度は頭打ちになる。これらの結果から、今回のMPIによる並列化で作成したプログラムは、数千ものプロセッサを用いた超並列計算には向かないが、数十のプロセッサを用いた小規模な計算では10倍程度の計算時間の短縮が実現した。

表1 GPCR、脂質、イオン、水の系における1ステップの分子動力学シミュレーションに要する計算時間 (sec)

cutoff	n=1	n=8	n=16	n=32	n=64
12	5.21	0.96	0.64	0.48	0.41
14	6.03	1.07	0.68	0.50	0.42

(2) FXaとそのリガンドのドッキングシミュレーション

図1に示したリガンド1, 2に対して、分子軌道計算を実施し、それぞれの電子状態を求めた。これらの電子状態をRESPプログラムでフィッティングすることで部分原子電荷を求め、分子動力学シミュレーションのパラメータとした。

FXaとリガンド1, 2のMcMDが完了し、高温(700 K)から常温における構造アンサンブルを得た。リガンド1についてはX線結晶構造が報告されているので、結晶構造とシミュレーションから得られた予測構造のrmsdを求めたところ、常温のアンサンブル中には、報告されている複合体の結晶構造に非常に近い(リガンドのrmsd < 1)の構造が含まれ、複合体予測に成功した。

常温の構造アンサンブルを主成分分析し、自由エネルギー地形を得た(図2)。少なくとも

も 1 2 個の極小点が存在し、図中の 1 から 6 が FXa とリガンド 1 が結合した状態、それ以外が非結合状態だった。結合状態を詳しく見ると、図中の 1 が自由エネルギー最安定な結合状態で、天然構造から構成された。以上から、McMD シミュレーションにより広い構造領域を探索し、得られたアンサンブルを第一、第二主成分軸に射影することにより得られた自由エネルギー地形は、実験を再現することが確かめられた。構造予測の観点からみると、自由エネルギーをスコア関数とすれば、高い精度で複合体構造が可能であることが示された。次に、リガンド 1 と 2 のシミュレーションからえられた結合自由エネルギー差を算出したところ、1.115 kcal/mol となり、文献値(0.908 kcal/mol)に非常に良く一致した。この結果から、リガンド 1 だけでなくリガンド 2 に対しても本方法は正しく自由エネルギーを評価していることが示された。

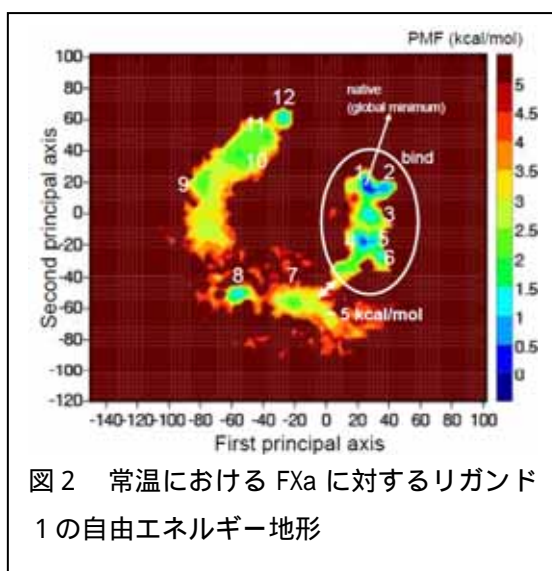


図 2 常温における FXa に対するリガンド 1 の自由エネルギー地形

(3) 抗ダンシルリシン抗体と抗原のドッキングシミュレーション

抗原のダンシルリシンに対して、分子軌道計算を実施し、得られた電子状態を RESP プログラムでフィッティングすることで部分原子電荷を求め、分子動力学シミュレーションのパラメータとした。

抗ダンシル抗体-ダンシルリシン抗原の McMD シミュレーションが完了し、高温(700 k)から常温における構造アンサンブルを得た。図 3 左に 300 K の構造アンサンブルを抗原の rmsd と抗体の CDRH3 の rmsd 軸にプロットした図を示す。抗原の rmsd は 5 から 30 の広い範囲に分布し、天然構造に近い構造や非天然構造、非結合構造が含まれていた。抗体の CDRH3 の rmsd は 2 から 9 に分布し、天然の複合体構造に近い閉じた構造や開いた構造が含まれていた。抗原の rmsd が 5

、抗体の CDRH3 の rmsd が 2 の位置に複合体の結晶構造に近い構造クラスターが得られ、これらの中には抗体の CDRH3 ループ構造が天然構造に近い構造を含んでいた。この結果から、抗体の位置と抗原のループがフレキシブルな FXa に比べてより予測の難易度が高い系において、本法は天然構造を予測できることが示された。この天然構造に近いクラスターは、抗原の rmsd と抗原の溶媒露出表面積(ASA)で分類した際に見られた 5 個のクラスター(図 3 右)のうちの 1 個に対応しており、構造予測としては上位 5 位以内の構造中に天然構造が含まれる良好な結果が得られた。

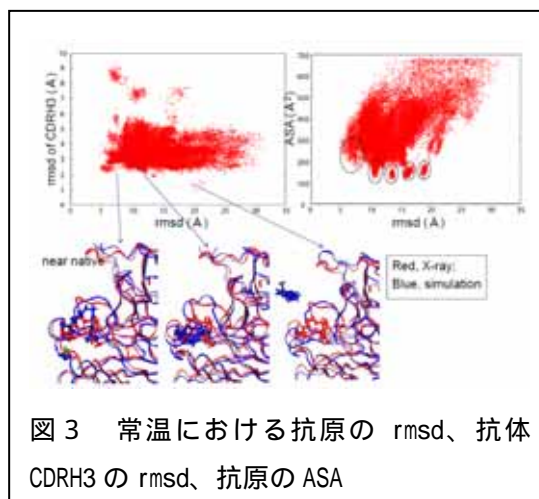


図 3 常温における抗原の rmsd、抗体 CDRH3 の rmsd、抗原の ASA

(4) PPAR とそのリガンドのドッキングシミュレーション

低分子リガンド C8-BODIPY はホウ素を含む化合物で、既知のホウ素のパラメータが分子力場データベース中に存在しないため、量子化学計算と基準振動解析によってホウ素を含む結合長や結合角、二面角のパラメータを作成した。また、分子軌道計算を実施し、得られた電子状態を RESP プログラムでフィッティングすることで部分原子電荷を求め、分子動力学シミュレーションのパラメータを決めた。

アポ体の PPAR を対象として水溶液中における常温の分子動力学シミュレーションが完了し、ポケットを形成するアミノ酸残基の構造変化や熱揺らぎを解析した。

上で得たアポ体の水溶液中の構造を PPAR の初期構造として PPAR と C8-BODIPY の McMD シミュレーションが完了し、高温(700 k)から常温における構造アンサンブルを得た。なお、PPAR の主鎖や炭素は高温状態での崩壊をさけるために拘束するが、リガンドがポケットに入り込むための構造変化を許容するために、アポ体のシミュレーションで得た熱揺らぎの情報を基にポケットに柔軟性を持たせた。

常温の構造アンサンブルを主成分分析し、第一主成分(PC1)と第二主成分(PC2)に対して平均力ポテンシャルを求めることにより自由エネルギー地形を得た(図4中央)。自由エネルギー最安定点を0 kcal/mol とすると、最小点との自由エネルギー差が0.5 kcal/mol 以下の10個の極小点が存在した。これらの極小点の中で、図中の点1から4にPPAR のリガンド結合に重要な構造が含まれていた。点1の構造(図4左上)において、リガンドの環の部分がPPAR の表面に接触し、それ以外の部分は溶媒に露出していた。リガンドのASAは181²で、天然構造のASA(36²)に比べて大きな値であることから露出していることがわかる。点2の構造(図4左下)では、リガンドはPPAR のリガンド結合ポケット内部に存在し(ASA=52²)、天然構造とは近い位置に存在した(rmsd of ligand = 6.5^o)。点3の構造(図4右下)は点2の構造と同様に、リガンドは結合ポケットに入り込み天然構造に近い位置に存在した(ASA=16², rmsd of ligand = 8.5^o)。点4の構造(図4右上)では、リガンドは結合ポケットに入り込み、天然構造に極めて近い位置に結合していた(ASA=44², rmsd of ligand = 5.5^o)。特に環の部分は、天然構造にほぼ重なっていた。

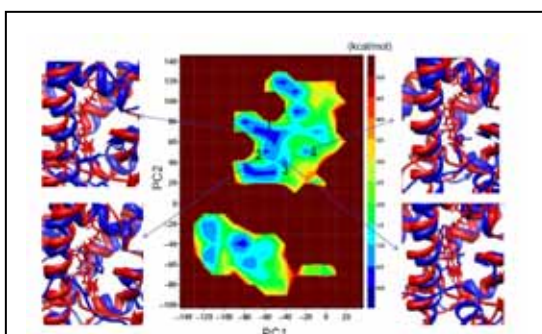


図4 常温における PPAR に対する C8-BODIPY の自由エネルギー地形と構造スナップショット(赤: X線構造、青: 予測構造)。図中に主要な自由エネルギー極小点を数字で示した。

図4に示した自由エネルギー地形と構造スナップショットの結果から、PPAR とそのリガンド C8-BODIPY の作用機序は次のようになる。溶媒中のリガンドは PPAR のポケットを認識し、環部分がポケットの表面に結合する(図4左上)。PPAR のポケットは構造揺らぎが大きく、そのポケットは開閉しており、リガンドはポケットが開いた際に環の部分からタンパク内部に入り込む。ポケットに入り込んだリガンドは、ポケット内部を動き回

ることで 0.5 kcal/mol 以下の自由エネルギー差の天然構造を含む3個の安定点(点2から4)に到達し、安定な複合体を形成する。

以上から、PPAR のようなリガンド結合部位が蛋白の内部に存在する予測の難易度が高い系において、本法は天然構造を予測できることが示された。また、自由エネルギーからリガンド結合の機構を原子レベルで議論した。リガンドの分子認識機構を知ることによって、今後の効率的な薬剤のデザインにつながるものと期待される。

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3件)

N. Kamiya, I. Fukuda, H. Nakamura *Chem. Phys. Lett.* **568-569**, 26-32 (2013). 査読有

I. Fukuda, N. Kamiya, Y. Yonezawa, H. Nakamura *J. Chem. Phys.* **137**, 054314 (2012). 査読有

J. Higo, J. Ikebe, N. Kamiya, H. Nakamura *Biophys. Rev.* **4**, 27-44 (2012). 査読有

[学会発表](計4件)

N. Kamiya, T. Mashimo, Y. Takano, T. Kon, G. Kurisu, H. Nakamura “Molecular dynamics simulations of dynein motor domain in explicit water”、日本生物物理学会年会、2012年9月24日、愛知県名古屋市

N. Kamiya, J. Higo, H. Nakamura “Flexible docking between antigen and antibody by multicanonical molecular dynamics simulation”、日本生物物理学会年会、2011年9月18日、兵庫県姫路市
神谷成敏、肥後順一、中村春木、「抗原-抗体間のフレキシブルドッキング・マルチカノニカル分子動力学シミュレーション」、日本蛋白質科学会年会、2011年6月9日、大阪府吹田市

N. Kamiya, J. Ikebe, K. Umezawa, Y. Yonezawa, J. Higo, H. Nakamura “Conformational transitions in the CDRH3 region of the antidansyl monoclonal antibody by molecular dynamics simulations”、日本生物物理学会年会、2010年9月20日、宮城県仙台市

6. 研究組織

(1)研究代表者

神谷 成敏 (KAMIYA NARUTOSHI)

大阪大学・蛋白質研究所・招へい研究員

研究者番号: 80420462