

共同利用(産業利用トライアルユース:先端研究施設共用促進事業『みんなのスパコン』TSUBAMEによるペタスケールへの飛翔) 成果報告書 平成 21 年度 課題種別 戦略分野利用推進

拡張アンサンブルシミュレーションによるタンパク質とリガンドの結合構造予測法の開発  
Development of Prediction Method of Protein-ligand Binding Modes by Generalized-ensemble Simulations

田中 稔祐  
Toshimasa Tanaka

武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 探索研究センター  
Discovery Research Center, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Limited  
<http://www.takeda.co.jp>

邦文抄録 タンパク質と結合するリガンドの結合構造の予測法を開発した。我々の方法は拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換アンブレラサンプリング法と、平均力ポテンシャル、主成分軸上のリガンド自由エネルギー地形解析に基づいた方法である。テストケースとして5つのタンパク質リガンド複合体系に適用したところ、タンパク質とリガンドが完全に離れた状態からシミュレーションを始めて、PDB に登録された実験構造と類似した結合構造を予測することに成功した。これは、タンパク質-リガンド結合過程におけるタンパク質、リガンド及び溶媒水のエンタルピー・エントロピー効果や結合に伴う構造変化を原子レベルで取り入れた初めての計算であり、水分子を含んだ安定な水素結合ネットワークを予測することができた。

英文抄録 We have developed a prediction method for the binding structures of ligands with proteins. Our method is based on replica-exchange umbrella sampling method, potential of mean force, and free energy landscape along principal component axes. Starting from the configuration in which the protein and the ligand are far away from each other in each system, our method predicted the ligand binding structures in excellent agreement with the experimental data from PDB.

*Keywords: replica-exchange umbrella sampling, molecular dynamics, protein-ligand binding, structure prediction, computer-aided drug design.*

## 背景と目的

近年、さまざまなタンパク質の立体構造が急速に明らかにされた。そのタンパク質立体構造に基づいて疾患をタンパク質とリガンド(=受容体タンパク質に特異的に結合する分子)の結合(ドッキング)という分子レベルで理解し、合理的に医薬品を分子設計することが可能になってきている。

しかしながら、既存のドッキングソフト(=タンパク質とリガンドの結合構造を予測するコンピュータソフト)では随所に経験的手法や補完が使われており、

1. リガンドの自由度が増加すると急速に予測精度が悪くなる、
2. タンパク質の構造変化がほとんど考慮されていない、
3. たとえ予測が成功したとしても相互作用の物理化学的背景が不明であり活性向上や選択性向上を目指す

した科学的な方針を立てにくい、

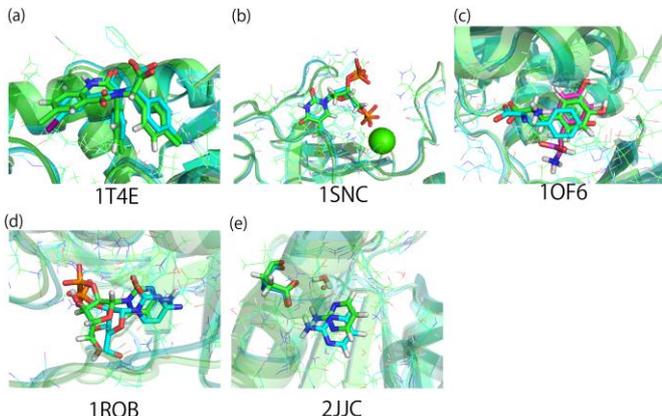
という問題がある。このように計算化学技術はいまだ発展途上であり、大幅な向上が必要とされている。

本プロジェクトでは、相互作用の物理化学的背景の理解に基づいた科学的な医薬品分子設計を達成するために、拡張アンサンブル分子シミュレーションによるタンパク質とリガンドの結合構造予測法を開発した。開発した手法を5つのテスト系に適用したところ既存のドッキングソフトで予測困難なケースでも結合構造予測に成功する成果を得た。

## 概要

本課題で我々はタンパク質と結合するリガンドの結合構造を予測するための手法を開発した。我々の手法は3つのステップからなる。初めに、タンパク質ポケットとリガンドの距離を反応座標としたレプリカ交換アンブレラサンプリングシミュレーションを実行する。次に、平

均力ポテンシャルの最小距離を得て、最小距離と平均ポテンシャルエネルギー付近の構造を集め、主成分解析する。最後に、主成分軸上の自由エネルギー地形の最小自由エネルギー状態の構造からリガンド結合構造を予測する。下記に本手法により得られた予測構造と実験構造との比較を示す。予測構造は実験構造と良く一致していた。



結晶構造: 水色、計算による予測: 緑

結果および考察

我々は開発した計算手法を検証するために 5 つのタンパク質—リガンド複合体系に方法を適用した。

図 1 は計算の初期構造であり、リガンド分子はタンパク質の結合ポケットから完全に離れた溶媒中に存在している。space-fill で描かれた分子は、実際にはシミュレーション中に存在しないが参照として表示したもので、結晶構造でのリガンド結合位置を表す。

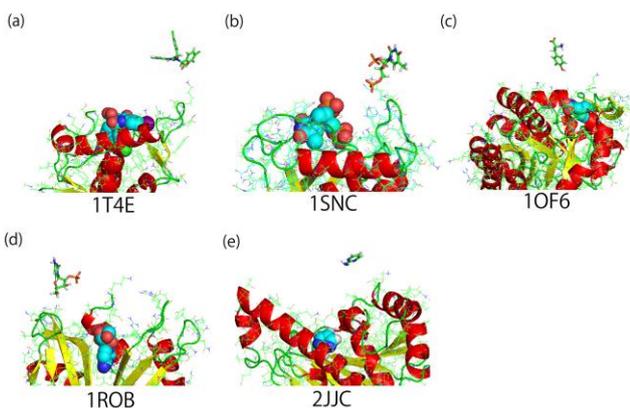


図 1

これらの構造を初期構造として用い、タンパク質ポケットとリガンドの距離を反応座標としたレプリカ交換アンブレラサンプリング法を実行した。

図 2 にシミュレーションの概念図を示す。

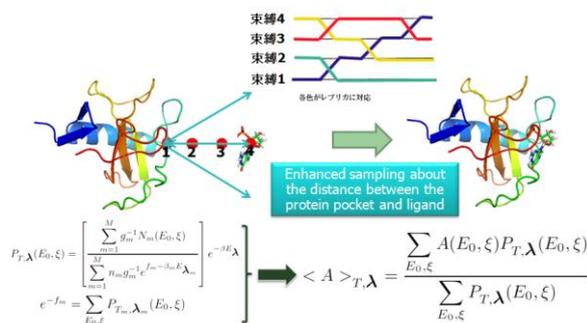


図 2

図 2 のようにレプリカ交換を通してリガンドのポケットへの出入りのサンプリングを加速することができ、シミュレーション結果は再重法によりバイアスの無いカノニカル分布を再現することができる。

図 3 に実際のシミュレーション例を示す (2JJC の系)。

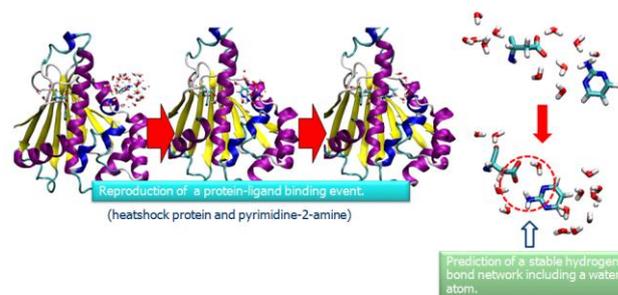


図 3

見やすくするためリガンド周辺以外の水は表示を省略した。図 3 の左側はリガンド分子が溶媒側からポケットに結合していく過程を表している。また図の右側ではリガンドがタンパク質や水と安定な水素結合 (赤い丸で囲まれたところ) を形成することを示している。この水の位置は結晶構造での水分子の酸素の位置と一致していた。

図 4 では 1T4E の系での計算例を示す。

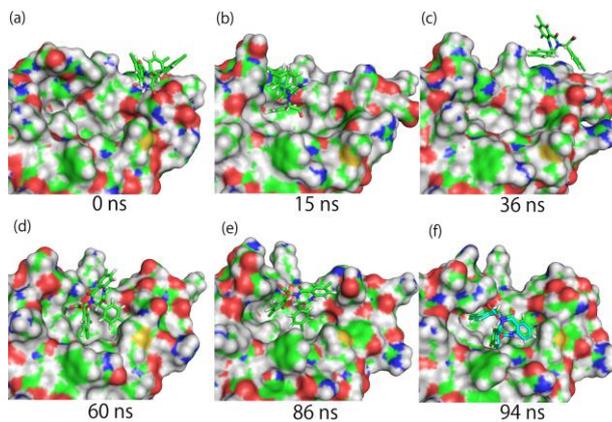


図 4

## (様式第 20) 成果報告書

(a)から(b)にかけてリガンド分子は結合ポケットに近づくが、リガンドの向きが悪く安定な結合を形成できずに(c)で再度溶媒側に離れた。その後より良い向きで近づくことで(d)から(f)にかけてタンパク質と安定な結合を形成した。この図 4 ではタンパク質表面の形が揺らいでいる様子やリガンドが近づくとき induced-fit を起こして結合している様子が分かる。

これらのシミュレーション結果から再重法を用いて平均力ポテンシャルを計算することで、タンパク質とリガンドの最安定距離が分かる。最安定距離付近であり、かつ全ポテンシャルエネルギーが平均に近いときのリガンド構造をトラジェクトリから抜き出し主成分解析することで、リガンドの自由エネルギー地形を描いた。その自由エネルギー地形上の最小自由エネルギー状態からリガンドの結合構造を予測する。

図 5 に一例として 1OF6 の系での自由エネルギー地形を示す。

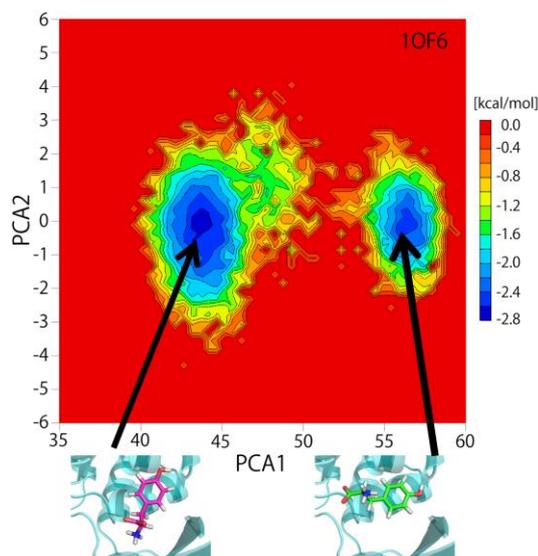


図 5

今回テストした他の 4 つの系では一つだけの予測結合構造が得られたが、この系では 2 つの異なるリガンドの予測結合構造が得られた。そのうち右側の緑の構造は結晶構造とよく一致した。左側のピンクの構造は実験では確認されていないが、計算からは同程度に安定な構造として予測された。

図 6 に再掲するのは今回計算した 5 つの系の実験構造と予測構造の比較である。

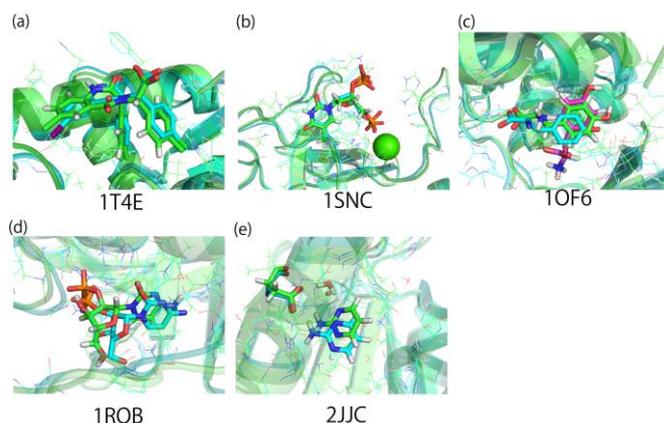


図 6

結晶構造: 水色、計算による予測: 緑

我々の予測構造は実験により決定された構造と良く一致していた。このうち 1SNC と 1ROB はドッキングソフト *GOLD* では significant error に分類される予測困難なものであり、このような例でも予測できたのは特筆できる。また 2JJC の系では水分子を含む安定な水素結合ネットワークを再現しており、このように水の位置を含めて予測することは既存のドッキングソフトでは困難であり、我々の手法の有効性を示す例である。

まとめ、今後の課題

我々は拡張アンサンブル分子シミュレーションによるタンパク質とリガンドの結合構造予測法を開発した。我々の方法は拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換アンブレラサンプリング法と、平均力ポテンシャル、主成分軸上のリガンド自由エネルギー地形解析に基づいた方法である。テストケースとして 5 つのタンパク質リガンド複合体系に適用したところ、タンパク質とリガンドが完全に離れた状態からシミュレーションを始めて、PDB に登録された結晶構造と類似した結合構造を予測することに成功した。これは、タンパク質-リガンド結合過程におけるタンパク質、リガンド及び溶媒水のエンタルピー・エントロピー効果や結合に伴う構造変化を原子レベルで取り入れた初めての計算であり、水分子を含んだ安定な水素結合ネットワークを予測することもできた。

今後の課題としては、より良いサンプリング手法の開発が上げられる。今回の計算は TSUBAME の計算パワーにより実行可能であったが、それでも重い計算であり、多数の化合物で実行するのは困難である。しかしながら、本プロジェクトを通して、従来は

困難と考えられてきた水分子をあらわに含みタンパク質やリガンドの揺らぎをあらわに取り入れた高精度な計算により、タンパク質とリガンドの結合構造予測が実行可能であることが分かったのは重大な進歩である。今後さらに計算効率のよい高精度な手法を開発することで着実に適用範囲を拡げていきたい。

参考文献

1. Y. Okamoto, T. Tanaka, H. Kokubo, Dependency of ligand free energy landscapes on charge parameters and solvent models. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2010;24:699-712.
2. H. Kokubo, T. Tanaka, Y. Okamoto, *Ab initio* prediction of protein-ligand binding structures by replica-exchange umbrella sampling simulations, to be submitted.