

TSUBAME 共同利用 平成 26 年度 産業利用 成果報告書

利用課題名 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の展開
 英文: Applications of Prediction Method of Protein-ligand Binding Modes by Generalized-ensemble Simulations

利用課題責任者 田中 稔祐
 Toshimasa Tanaka

所属 武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 化学研究所
 Medicinal Chemistry Research Laboratories, Pharmaceutical Research Division,
 Takeda Pharmaceutical Company Limited
<http://www.takeda.co.jp>

邦文抄録 二次元レプリカ交換法を膜タンパク質(GPCR の一つである $\beta 2$ adrenergic receptor)に対して適用したところ、予測構造は実験構造とよく類似しており、結合モードを再現できることが分かった。このことは本課題を通して開発した手法が水溶性タンパク質だけでなく膜タンパク質に対しても適用可能であることを示唆している。一方で、新たな課題として膜タンパク質の系ではリガンドが脂質二重膜の膜面にトラップされてしまう場合があることが分かった。これはサンプリング上必ずしも好ましくないため、今後さらに改良と検証を進めていきたい。さらに JNK3 に対して結合自由エネルギー計算を実施したところ、複数の異なる結合モードから正しい結合モードを計算により判別できた。

英文抄録 We applied two-dimensional replica-exchange method for the prediction of a membrane protein ($\beta 2$ adrenergic receptor) system, and found that our method successfully predicted the structure close to the experimental one. This indicates that the method developed through this research might be applied not only to soluble proteins but also membrane proteins. However, we encountered a new difficulty that a ligand tends to be trapped around the membrane surface. We also performed binding free energy calculations for the JNK3 system, and found that the correct binding mode was distinguished computationally.

Keywords: replica-exchange umbrella sampling, molecular dynamics, protein-ligand binding, computer-aided drug design, free energy calculation.

背景と目的

タンパク質に結合する分子(リガンド)の結合構造や結合の強さを予測することは、様々な生体反応を理解し制御するために極めて重要であり、ドラッグデザインにとっても有用性が高い。

そこで我々はこれまでにレプリカ交換法に基づく高精度なリガンド結合モードの予測法を開発してきた[1-4]。本課題では、特に膜タンパク質の一つである $\beta 2$ adrenergic receptor に対して、開発した手法を適用し、膜タンパク質系に対する適用可能性と課題を調査すると共に、結合自由エネルギー計算との連携を強化することを目的として研究を実施した。

概要

従来の手法では実験を置き換えるレベルに至っておらず、それを目指したシミュレーション手法のさらなる高

精度化と検証が必要とされている。本利用課題では相互作用の物理化学的背景の理解に基づいた論理的な医薬品の分子設計を可能とするために、昨年度までに開発した二次元レプリカ交換法を膜タンパク質に対して適用し、結晶構造解析が困難な膜タンパク質に対しての有効性を一例で示した。図 1 は膜タンパク質の一つである $\beta 2$ adrenergic receptor に対して開発した手法を適用した結果であり、図 1 左のようにリガンドが溶媒側にいる構造から始めて、図 1 右のように実験と近い構造を安定構造として検出できた。

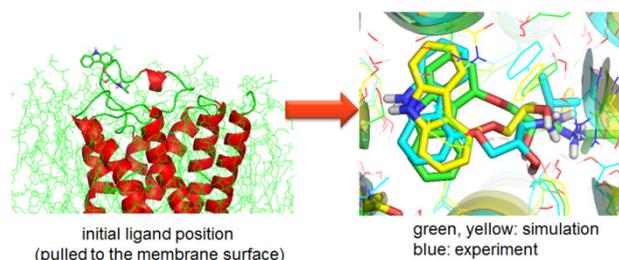


図 1 $\beta 2$ adrenergic receptor に対する結合モード予測計算の初期構造(左)と予測結合モード(右)

また、自由エネルギー計算との連携を強化に取り組んだ。図 2 はドッキングから予測されるリガンドの 4 つの異なる結合モードであり、それぞれに対して結合自由エネルギー計算を実施したところ、実験と近い正しい結合モードが最安定であった。

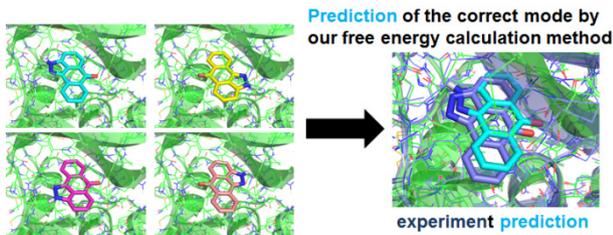


図 2 JNK3 に結合するリガンドの結合モードの結合自由エネルギー計算による判別

さらに主成分解析などの手法を用いた機能性ダイナミクスの解析をめざし、GPU を効率的に使用した長時間分子動力学計算を実施した。現在、構造の安定性、長時間運動モード、構造変異のしやすさ、などについて実験データと比較しながら解析を鋭意進めている。

結果および考察

最初に、開発した手法を膜タンパク質の一つである $\beta 2$ adrenergic receptor の系 (PDB ID: 2RH1) に対して適用した(手法の詳細については[1-4]を参照)。

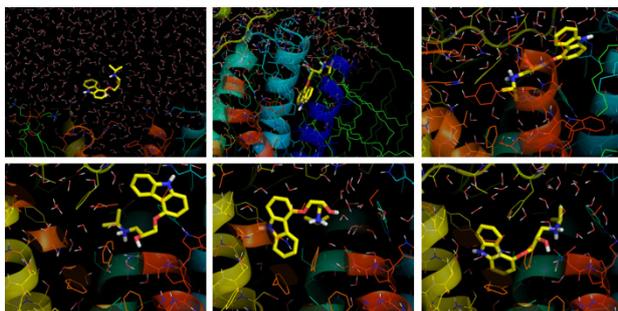


図 3 $\beta 2$ adrenergic receptor の系のスナップショット

図 3 はシミュレーションの代表的なスナップショットを示しており、リガンドが溶媒側にある場合や、膜面付近にある場合、タンパク質のヘリックス間にある場合など様々な構造を探索していることが分かる。全てのレプリカの情報を集めてタンパク質とリガンドの距離につい

ての平均力ポテンシャルを計算し、安定な結合距離を予測することができる。図 1 左に、予測されたりガンドの結合モードと実験の結合モードとの比較を示す。完全ではないものの、計算により予測された構造は概ね位置向き共に実験構造と一致していることが分かる。

次に、JNK3 の系 (PDB ID: 1PMV) でドッキングにより予測した 4 つの異なる結合モード(図 2 左)から正しいモードを結合自由エネルギー計算により識別できるか調べた。図 4 は複合対中での $\langle dU/d\lambda \rangle$ の静電項と vdW 項をそれぞれ示す。共に収束にとって必要な滑らかな曲線となっている。

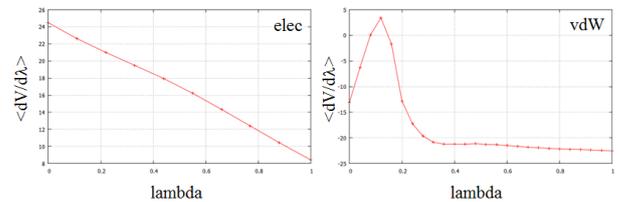


図 4

計算から予測された結合自由エネルギーは、図 2 の左上、右上、左下、右下の結合モードで、それぞれ -11.9, -8.9, -8.9, -8.0 kcal/mol であり、左上の結合モードが安定性が高いと予測された。図 2 右に示すように実験の結合モードと予測モードを比較したところよく一致していた。また、予測された値 -11.9 kcal/mol は実験の結合自由エネルギー -10.5 kcal/mol とも数値的に近かった。

まとめ、今後の課題

二次元レプリカ交換法を膜タンパク質 (GPCR の一つである $\beta 2$ adrenergic receptor) に対して適用し、実験と近い結合モードを予測できるという有望な結果を得た。このことは開発した手法が水溶性タンパク質だけでなく膜タンパク質に対しても適用可能であることを示唆している。特に膜タンパク質は結晶化が一般的に困難であり、計算によりリガンドの結合モードを高精度に予測できれば、大きなインパクトになると考えられるため、今後さらに改良と検証を進めて行きたい。また、JNK3 の系に対して結合自由エネルギー計算を実施したところ、複数の異なる結合モードから正しい結合モードを計算により判別できることが分かった。さらに、GPU を使用した長時間ダイナミクスを調べる計算も開始し、いくつかのターゲットタンパク質に対して 1 マイクロ秒程度

の長時間計算を、比較のため異なる複数の初期構造や初期速度を用いて実施した。構造の安定性、長時間運動モード、構造変異のしやすさ、などのタンパク質による違いの知られている実験データと比較しながら解析を鋭意進めている。

参考文献

1. H. Kokubo, T. Tanaka, Y. Okamoto, Ab initio prediction of protein-ligand binding structures by replica-exchange umbrella sampling simulations, *J. Comput. Chem.* **32**, 2810–2821 (2011).
2. H. Kokubo, T. Tanaka, Y. Okamoto, Two-dimensional replica-exchange method for predicting protein–ligand binding structures, *J. Comput. Chem.* **34**, 2601-2614 (2013).
3. H. Kokubo, T. Tanaka, Y. Okamoto, Prediction of Protein–Ligand Binding Structures by Replica-Exchange Umbrella Sampling Simulations: Application to Kinase Systems, *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 4660-4671 (2013).
4. Y. Okamoto, H. Kokubo, T. Tanaka, Prediction of Ligand Binding Affinity by the Combination of Replica-Exchange Method and Double-Decoupling Method, *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 3563-3569 (2014)