

TSUBAME 共同利用 平成 23 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法の開発
英文: Development 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 探索研究所
Discovery Research Laboratories, Pharmaceutical Research Division,
Takeda Pharmaceutical Company Limited
<http://www.takeda.co.jp>

邦文抄録 我々はこれまでに開発した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の適用範囲の拡大、および、より高精度化・高効率化した手法の開発に取り組んだ。最初に、異なる 4 つのキナーゼの系に対して手法を適用したところ、予測構造は PDB の実験構造と良く一致しており、手法の汎用性が高いことが示された。次に、サンプリング効率の改善を目指して REST 法と組み合わせた手法の開発に成功した。その結果、リガンドがよりアンブレラポテンシャルに追従するようになり、サンプリング効率が向上することが複数の適用例から分かってきた。今後さらに長時間計算を実行することで有効性を確認し、適用範囲を確実に広げていきたい。

英文抄録 We have tackled to extend the range of application of our prediction method of protein-ligand binding structures by generalized-ensemble simulations and also to develop the new method with improved accuracy and efficiency. First, we applied our method to four kinase systems. Our method predicted the ligand binding structures in excellent agreement with the experimental data from PDB. Second, we have developed the new method in combination with REST method. In our new method, ligands tended to follow the umbrella potential more easily, which implied the improved sampling efficiency. We would like to demonstrate high availability of our method by performing longer calculations and to enlarge its applicable range.

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

背景と目的

「認知症」「がん」など多くの病を克服する新薬開発のニーズが高まっており、誰もが健康に生涯を過ごすために、新しい医薬品を一日でも早くより多くの患者さんの元に届けることが製薬会社に求められている。近年タンパク質の立体構造が急速に明らかにされ、そのタンパク質構造に基づいて疾病を分子レベルで理解し合理的に医薬品の分子設計ができるようになってきた。一方で、各社の計算資源が不足していることや高精度な物理化学的手法が未確立なため、依然として随所に経験的手法や補完が使われており、統計熱力学的に正確な方法で予測・解析されることは極めて少ない。本利用課題は、科学的な方針に基づいた医薬品の分子設計を行うために、最近我々が開発した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モード予測法

の適用範囲の拡大と計算効率の向上を目指して実施した。

我々がこれまでに開発した手法[1]は、タンパク質-リガンド結合過程におけるタンパク質、リガンドおよび、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。しかしながら、適用例は 5 つの異なるタンパク質-リガンド複合体系に限られ、より適用範囲を拡大させて有効性を確認することが求められており、また、計算効率の改善が必要であった。

そこで、本年度は異なる 2 つのタンパク質に結合するそれぞれ 2 つのリガンド(合計 4 つの系)に対して我々の手法を適用した。その結果、リガンドが水中にある構造からシミュレーションを始めて、我々の手法により正

しい結合構造が予測可能であることが示され、広範な適用ができることが明らかになった。また、結合活性の強さが平均力ポテンシャルから説明できることも示唆された。さらに REST 法、および、vdWREM と組み合わせた手法を開発することで計算効率を改善し、その有効性を確認するという成果を得た。

概要

我々は、最初に異なる 2 つのタンパク質に結合するそれぞれ 2 つのリガンド(合計 4 つの系)に対して手法を適用した。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位置向き共に良く一致しており、手法の汎用性が高いことが示された。

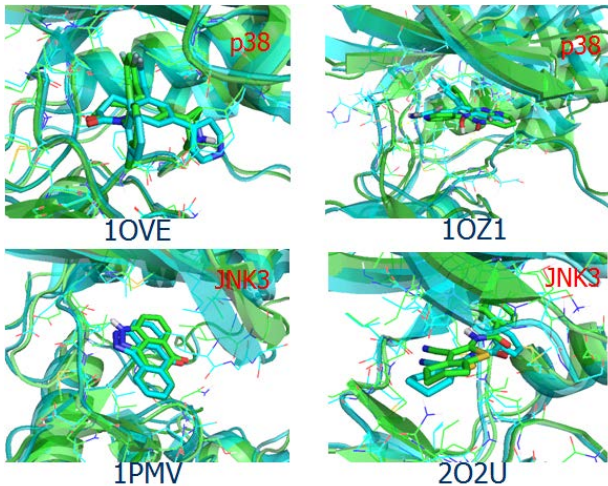


図 1

結晶構造: 水色、計算による予測: 緑

次に、計算効率の改善を目指して REST 法、および、vdWREM と REUS 法を組み合わせた手法を開発し、その有効性を調べた。その結果 REST 法との組み合わせにより、リガンドがアンブレラポテンシャルに追従するようになり、サンプリング効率を改善できるという結果が得られた。来年度は、これらの新たに開発した手法を適用してより大規模な検証を行い、そのパフォーマンスを調べたい。

結果および考察

我々は異なる 2 つのタンパク質に結合するそれぞれ 2 つのリガンドに開発した手法を適用した(PDB ID: 1OVE, 1OZ1, 1PMV, 2O2U)。計算の初期構造として、リガンド分子が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構造を用いた。そして、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。

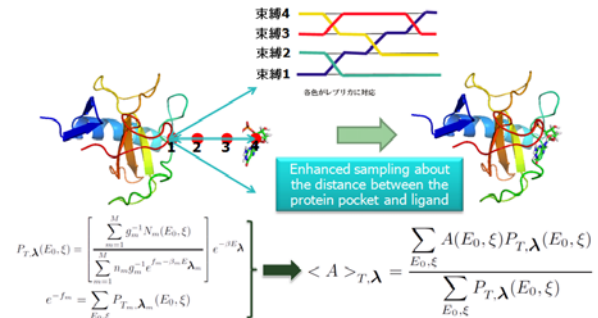


図 2

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。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。

図 3 に得られた平均力ポテンシャルを示す。

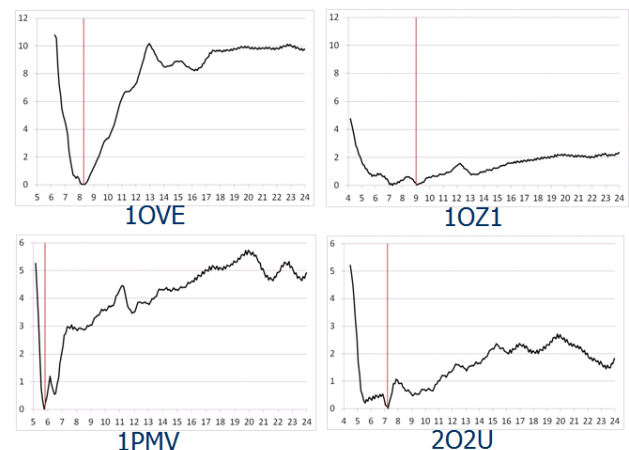


図 3

図 3 の X 軸はタンパク質の結合ポケットとリガンドとの距離、Y 軸は平均力ポテンシャルである。赤の線は実験構造(PDB)での結合距離で、実験での最安定距離とシミュレーションから予測された最安定距離が近いことが分かる。また図 3 の上側の 1OVE と 1OZ1 は共に p38 という同じタンパク質に結合する異なるリガンドであり、1OVE のほうがタンパク質と強く結合することが実験的に分かっている。完全に収束した結果を得るにはさらに長時間の計算が必要であるが、平均力ポテンシャルの形は 1OVE のリガンドの方が高い結合活性であることを示唆しており、実験と矛盾がない。同様に図

3 下側の 1PMV と 2O2U の計算結果も 1PMV のリガンドの方が高い結合活性を示すという実験データと整合性がある。

次に、結合距離が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が予測できる。概要に示した図 1 は今回計算した 4 つの系の実験構造と予測構造の比較である。確かに結合距離だけでなく、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。これらの構造を予測するにはリガンドに応じた周辺のタンパク質のループ領域やアミノ酸側鎖の動きが必要であることが結晶構造から分かる。既存のドッキングソフトでタンパク質の構造変化を再現することは困難であり、通常は複数の結晶構造が得られたあとで、初めて、タンパク質の動きを考慮できる。すなわち、異なる鑄型構造を用意してドッキングモデルを構築することになり、一般にドッキングソフトの予測精度は低くなる。一方で、我々の手法ではリガンドに応じた induced fit の効果がシミュレーションを通して自ずから取り入れられる。したがってこれらの系で実験構造を再現できたことは手法の有効性を示す例と考えられる。現在これらの結果をまとめたものを投稿準備中である[2]。

次に、さらに高効率な手法の開発を目指して我々が今年度取り組んできたことについて述べる。我々は最初に REST (replica exchange with solute tempering)、および、vdWREM (vdW replica exchange method) という手法について検討した。REST 法は指定した部分の温度を部分的に上げる、言い換えると、指定した部分の相互作用を弱める手法であり、我々の開発した手法と組み合わせることでアンブレラポテンシャルにより追従するようになり効率が上がると期待される。一方で vdWREM は指定した部分の vdW 半径を小さくする手法であり、空間的に充填された結合ポケットへ、より出入りしやすくなる効果が期待される。我々はこれを適用する部分としてリガンドを選択した。次の図 4 に従来法と REST 法と組み合わせた手法の典型的な 1 つのレプリカの timeseries を示す。

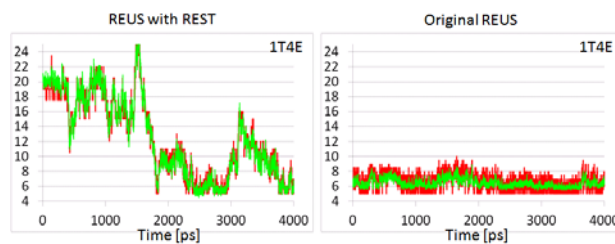


図 4

X 軸は timeseries、Y 軸はタンパク質ポケットとリガンドとの距離を表す。赤い線はアンブレラポテンシャルの中心距離を示し、緑の線は実際の距離を示す。左図は REST 法によりリガンドとそれ以外との相互作用を 0.3 倍程度にまで弱めた場合であり、赤い線のアンブレラポテンシャルに緑で示した実際の距離が良く追従していることが分かる。右図は[1]で開発したオリジナルの REUS 法の time series であり、赤い線のアンブレラポテンシャルの中心距離に実際の距離がうまく追従できておらず、結果としてポケットからの出入りが起こりにくいことが分かる。他のレプリカでも同様の振る舞いが見られ、また[1]において調べた 5 つの系いずれでも同様の傾向が見られた。これらの結果は、REST 法との組み合わせにより、リガンドのポケットからの出入りが加速され、サンプリング効率が上がることを示している。一方で vdWREM では期待した振る舞いが得られず、むしろ、かえってリガンドが動きにくくなってしまいう例も複数判明した。来年度は、開発した新手法を複数の系に適用して、より大規模な検証を行い、そのパフォーマンスを調べることを計画している。

まとめ、今後の課題

我々は、これまでに開発した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の適用範囲の拡大、および、さらに高精度化・高効率化した手法の開発を目標として研究に取り組んだ。

初めに、新たに異なる 2 つのタンパク質に結合するそれぞれ 2 つのリガンド(合計 4 つの系)に対して手法を適用したところ、予測構造は実験構造と位置向き共に良く一致しており、手法の汎用性が高いことが示された。これらの構造を予測するには同じタンパク質であってもリガンドに応じた周辺のループ領域やアミノ酸側鎖の動きが必要であることが結晶構造から示唆されてお

り、我々の手法の既存のドッキングソフトに対する優位性を示すと考える。さらに活性が平均力ポテンシャルから予測できることが分かってきた。今後この点についてさらに検証を進めていきたい。

次にサンプリング効率の改善を目指して REST 法、および vdWREM を導入し、これまでの手法と組み合わせた手法を開発し、その効果を調べた。その結果、vdWREM では期待していた効果が得られず、REST 法では期待していたサンプリングの向上が複数の適用例から分かってきた。

今後の課題としては、今年度開発した新手法を多くの系に対して適用して長時間計算をし、そのパフォーマンスを示すことが挙げられる。しかしながら、これまでの手法では TSUBAME の計算パワーを用いてもかなり重い計算であり適用可能数に限界があったので、本プロジェクトを通してサンプリング効率の改善に目処がついてきたことは大きな進歩である。今後さらに計算効率のよい高精度な手法を開発の検討も含めて着実に適用範囲を拡げていきたい。

参考文献

1. Kokubo H., Tanaka T, Okamoto Y. Ab initio prediction of protein-ligand binding structures by replica-exchange umbrella sampling simulations, *Journal of Computational Chemistry*. 2011;32:2810–2821.
2. Kokubo H., Tanaka T, Okamoto Y., in preparation.