

TSUBAME 共同利用 平成 25 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 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 我々は二次元レプリカ交換法を MDM2 のタンパク質-リガンド複合体に適用した。計算から予測された結合モードは、実験で得られた構造と非常に類似していた。結合自由エネルギー計算と連携して、MDM2 の系でシミュレーションから予測した結合モードを用いて Double Decoupling 法によりリガンドの結合自由エネルギーを計算したところ、実験値と近い値を得た。さらに膜タンパク質の一例として GPCR である  $\beta_2$  adrenergic receptor にも適用中である。本課題を通して開発・検討した二次元レプリカ交換法による結合モード予測と、得られた予測モードを用いた結合自由エネルギー計算は近い将来の IT 創薬の有力な手法となりえるものである。

英文抄録 We have applied a two-dimensional replica-exchange method for the prediction of protein-ligand binding structure of a MDM2 system. The predicted structure was in excellent agreement with experimental data from PDB. We have also performed an absolute binding free energy calculation by Double Decoupling method using the predicted binding mode, and obtained the reasonable agreement with the experimental affinity data. We are applying our prediction method to  $\beta_2$  adrenergic receptor system as an example of GPCR systems.

*Keywords: replica-exchange umbrella sampling, replica exchange with solute tempering, molecular dynamics, protein-ligand binding, computer-aided drug design.*

## 背景と目的

タンパク質とリガンドの結合構造を分子レベルで明らかにすることは、創薬初期過程でのドラッグデザインにとって極めて有用性が高い。一方で、比較的容易に結晶構造解析が可能な場合であっても、すべての化合物に対して、実験的に構造を決めるのは現実的ではなく、また、結晶構造解析が困難なケースも多数存在する。

そこで、計算から結合構造を予測するツールとしてドッキングソフトが広く使われている。ドッキングソフトはタンパク質の立体構造情報を用いてリガンドの結合構造を予測するソフトであり、短い計算時間で多数の化合物の結合構造を予測できる。しかしながら、水 1 分子の効果やエントロピー効果が重要な場合、あるいは、induced-fit と呼ばれるリガンドに応じたタンパク質の構造変化が伴う場合にはその予測精度が著しく下がるという課題がある。また、通常一つのリガンドに対して

複数の予測構造が出力されるが、その中でどれが正しい結合構造であるかを推測することは難しく、結晶構造解析を置き換えるレベルには至っていない。そこで我々は、分子シミュレーションを用いてタンパク質とリガンドの結合構造を高精度に予測する手法を独自に開発してきた。

これまでに我々が開発したレプリカ交換アンブレラサンプリング法[1]に基づくタンパク質-リガンド構造予測法[2]は、水 1 分子レベルの溶媒効果やエントロピー効果を厳密に考慮して自由エネルギー最安定構造から結合構造を予測できる強力な手法である。しかし、タンパク質-リガンド間の相互作用が強い領域ではリガンドが動きにくくなり、すなわち、アンブレラポテンシャルに追従しにくいいため著しくサンプリング効率が落ちる傾向にあった。そのため、いったん安定構造を見つけるとそこに留まってしまい、レプリカ交換法の利点が失われる

問題があった。

そこで、タンパク質とリガンドの結合構造予測シミュレーションにおいて、リガンドとその周辺との相互作用を減弱させる仮想次元を取り入れて、新たに二次元レプリカ交換法を開発した[3]。その結果、従来法と比べてリガンドがより迅速に結合ポケットから出入りするようになり、大幅にサンプリング効率を向上させることに成功した。さらに、kinase 系への適用を実施して、ドッキングソフトでは予測困難な場合でも予測に成功するという良好な結果を得た[4]。

これらの結果に基づき、実践的な適用を見据えて初期構造準備から解析までの計算プロトコルを整理して、MDM2 のターゲットに適用したところ、実験と類似した構造を予測することが出来た。また、予測された構造に基づき結合自由エネルギー計算を実施したところ、実験値と近い値を予測できた。最近は膜タンパク質の一例として GPCR である  $\beta 2$  adrenergic receptor にも適用を検討している。

#### 概要

我々は、開発した二次元レプリカ交換法 [3] を MDM2 のタンパク質-リガンド複合体系 (PDB ID: 4ERF) に適用した。より厳密な手法の検証のため、リガンドは PDB ID: 4ERF のものを用い、一方でタンパク質は同じ MDM2 であるが他の化合物との結晶構造である PDB ID: 1T4E からの初期構造を利用した。そして、最初に水中にリガンドを配置して計算を開始した (図 1)。その結果、図 2 のように実験と近い構造を予測することに成功した。

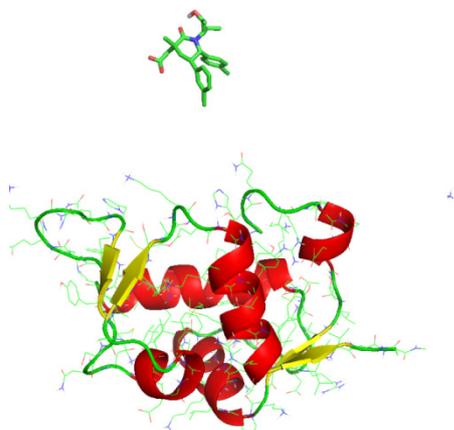


図 1 初期構造

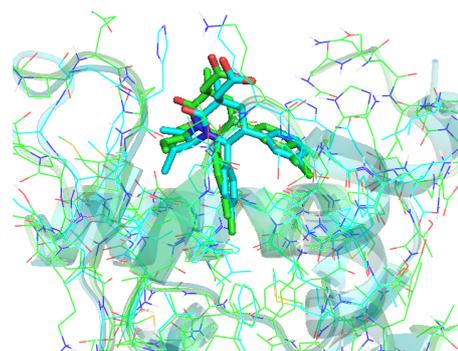


図 2 予測構造 (緑色)、実験構造 (青色)

予測された構造を用いて、結合自由エネルギーを Double Decoupling 法により計算したところ、 $-11.4$  kcal/mol となり、実験値  $-12.3$  kcal/mol と近い値を予測できた。今後更なる検証が必要ではあるが、二次元レプリカ交換法による結合モード予測と、得られた予測モードを用いた結合自由エネルギー計算は近い将来の計算創薬の有力な手法になりえると考えられる。

#### 結果および考察

我々は最初に開発した二次元レプリカ交換法を MDM2 の系に適用した。計算の初期構造は、図 1 のようにリガンドが水中に置かれた状態であり、またタンパク質の構造は別の化合物が結合した状態の構造を初期構造として用いた。図 3 にシミュレーションのスナップショットを示す。リガンドがタンパク質ポケットから出入りしている様子やタンパク質構造の揺らぎの様子を確認することが出来る。

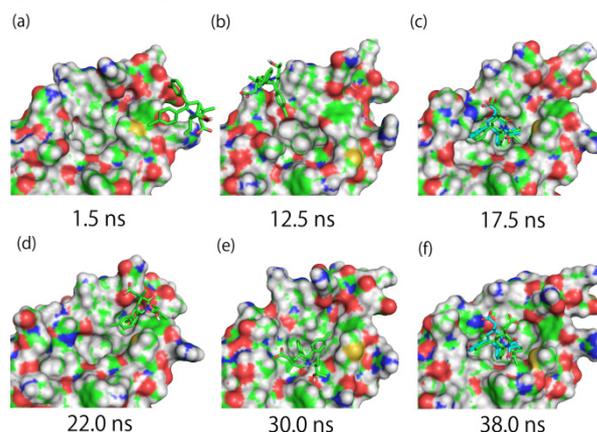


図 3 スナップショット

図 4 はシミュレーションから求めた平均力ポテンシャルである。X 軸はタンパク質とリガンドの距離、Y 軸は PMF の値を示し、PMF の値が小さいところが安定な結合距離であることを意味している。縦の破線は実験の結合距離であり、完全ではないもののシミュレーション

ンで最安定と予測された距離と概ね一致していることが分かる。

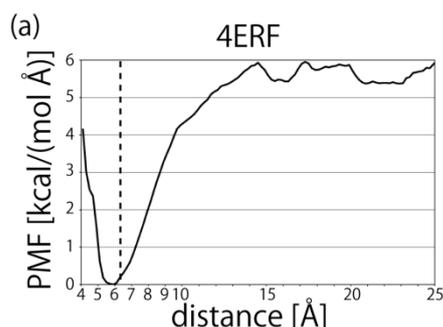


図 4

図 2 はシミュレーションによる予測構造(緑色)と実験構造(青色)を示しており、両者が良く一致していた。

次に、得られた予測構造を用いて Double Decoupling 法により結合自由エネルギーを計算した。リガンドの重心付近の一つの重原子と結合ポケットから 12 Å 以上離れたタンパク質のアミノ酸を初期構造に束縛した上で、独立した初速度を用いた 5 つシミュレーションを実施し、その平均から結合自由エネルギーを計算した。図 5 に複合体中での  $\langle dU/d\lambda \rangle$  の静電項と vdW 項をそれぞれ示す。

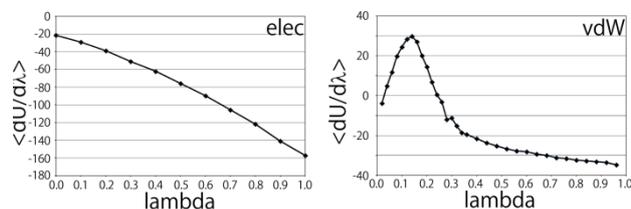


図 5

計算から予測された結合自由エネルギーは -11.4 kcal/mol となり、実験値 -12.3 kcal/mol と近い値を得ることが出来た。

また、膜タンパク質系への適用拡大を目指して、一例として GPCR である  $\beta 2$  adrenergic receptor にも適用している。図 6 に AMBER の最新の脂質パラメータである LIPID14 を用いた  $\beta 2$  adrenergic receptor の 80 ns の平衡化後の構造を示す。結合構造予測シミュレーションを現在実行中である。

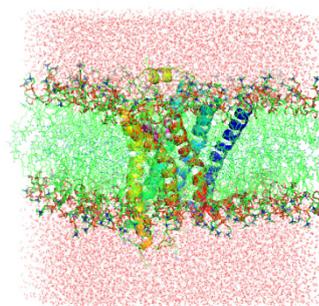


図 6

まとめ、今後の課題

我々は最初に二次元レプリカ交換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 MDM2 に適用した。異なるリガンドが結合したタンパク質の初期構造として用いるなど、より厳密な検証を実施したが、シミュレーションから得られた予測構造は PDB の実験構造と良く一致しており、手法の有効性を確認できた。次に得られた予測構造を用いて、結合自由エネルギー計算を実行した。予測された値は実験値と近い値であり、実用に耐えうる精度であった。開発した結合モード予測と、得られた予測モードを用いた結合自由エネルギー計算を近い将来の計算創薬の有力な手法にすべく、今後更なる検証を重ねていきたい。

これらの溶媒を原子レベルであらわに含んだ高精度・長時間のシミュレーションは TSUBAME を使うことによりはじめて可能となったものであり、今後も TSUBAME の産業利用枠制度を是非有効活用したい。

来年度は、現在実行中の膜タンパク質系の結果解析、自由エネルギー計算との連携強化、に加えて、TSUBAME の GPU を有効活用して機能ダイナミクス解析についても検討したい。

参考文献

1. Y. Sugita, A. Kitao, Y. Okamoto, Multidimensional replica-exchange method for free-energy calculations. *J. Chem. Phys.* **113**, 6042–6051 (2000).
2. 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).
3. H. Kokubo, T. Tanaka, Y. Okamoto,

Two-dimensional replica-exchange method for predicting protein–ligand binding structures, *J. Comput. Chem.* **34**, 2601-2614 (2013).

4. 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).