

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 24 年度博士課程進学  
氏 名 根上 樹  
指導教員名 清水 謙多郎

### 論文題目

粗視化分子動力学シミュレーションを用いたタンパク質-リガンド結合過程  
の網羅的解析

#### 背景・目的

タンパク質とリガンドの相互作用を理解することは生命現象を解明する上で重要であり、これに関して様々な研究が行われている。しかしながら、こうした研究の多くはエネルギー的に安定な結合状態を理解することに主眼が置かれており、リガンドの結合過程に関しては未解明な部分が多い。タンパク質-リガンド結合過程を原子レベルで詳細に解明することは実験的手法では困難であり、分子動力学シミュレーションを用いた計算科学的手法によりリガンドの結合過程を直接見ることが一つの有効な方法と考えられる。しかしながら、タンパク質とリガンドの結合の過程の追跡には巨大な系に対する長時間スケールの解析が必要となるため、通常の分子動力学シミュレーションの適用は計算コストが高いことが問題となる。

この問題に対し、いくつかの原子をひとまとめにすることで系を単純化する粗視化と呼ばれる手法を用いることで計算時間を削減することが可能となる。本研究では、**MARTINI (S. J. Marrink *et al.*, *JPC-B*, 2007)** と呼ばれる粗視化力場を用いたシミュレーションを行うことで、タンパク質-リガンド結合過程を明らかとすることを目的とし、以下の 2 つの解析を行った。1 つはタンパク質-リガンド結合過程の比較解析であり、基質結合ポケットやリガンドが異なる性質を持つような様々なタンパク質-リガンドペアに対するシミュレーションを行い、それらの性質と結合過程の関係性を調べた。もう 1 つは、構造変化を扱うための **MARTINI** 力場の拡張である。**MARTINI** 力場を用いた従来のシミュレーションでは大きな構造変化を扱うことができないという制約があり、これを解決するためのシミュレーション手法の実装を行い、タンパク質の構造変化に対して適用した。

## タンパク質-リガンド結合過程の比較シミュレーション

基質結合ポケットやリガンドの物理化学的性質に基づいた結合過程の比較を行うため、はじめにタンパク質とリガンドのペアの分類を行った。生物学的に意味のあるリガンドを含む構造だけを集めたタンパク質-リガンド複合体結晶構造データベースである **BindingMOAD** をもとにデータセットを作成し、結合ポケットの形状（広い、狭い）、結合ポケットの物理化学的性質（親水性、疎水性）リガンドの物理化学的性質（親水性、疎水性）、およびタンパク質とリガンドの間の塩橋の有無について分類を行った（表 1）。分類の結果、タンパク質とリガンドは親水性同士、疎水性同士で結合する傾向が高いことが見出された（分類①～⑥）。一般的なケースと考えられるこれら①～⑥の分類の中から、それぞれ 2 つずつ例を選び出し、粗視化シミュレーションによる結合過程の解析を行った。選定したタンパク質およびシミュレーション条件を表 2 に示す。シミュレーションの系はタンパク質の周りに少数のリガンド分子をランダムに配置し、水溶媒に溶かすことで構成した。それぞれの系について 1~5  $\mu$ s のシミュレーションをリガンドの初期配置を変えて 50~100 回行い、結果を統計的に解析した。

リガンド結合シミュレーションの結果、全ての例において複合体結晶構造におけるリガンド位置と同等の箇所へのリガンドの結合が複数回確認できた。シミュレーションにおけるリガンド分子の 3 次元密度分布を調べたところ、いずれのタンパク質でもポケット内部でリガンドの密度が高く、その他にも数箇所密度の高い領域が確認された。各領域について、リガンドの結合および解離速度を調べたところ、結合位置における解離速度は他の箇所より小さい傾向が見られた。また、解離定数の結果から 12 個中 5 個の例において結合位置付近で最も親和性が高く、結合位置付近ではリガンドが長く滞在しやすいことが示唆された。また、解離定数が実験的にわかっている **AST**、**HAP**、**PNP**、**Levansucrase**、**PAL**、**LinB**、**PGA**、**KSI**、**PDE4D** について計算した値を比較すると、**AST**、**PNP**、**Levansucrase**、**KSI**、**PDE4D** の 5 つの系について実験結果と同程度のオーダーの値を得ることができた。実験結果を再現できなかった例のうち、**PGA** については解離の観測回数が少ないため、さらに長時間シミュレーションを行うことにより改善されるものと考えられる。**PAL**、**LinB** については、**MARTINI** 粗視化力場の相互作用パラメータを実験結果や全原子シミュレーションの結果に基づいて調整することにより実験値を再現することに成功した。このことから、**MARTINI** の枠組みの中でエネ

表 1. タンパク質・リガンドペアの分類結果

基質結合ポケット		リガンド				
		親水性・塩橋あり		親水性・塩橋なし		疎水性
親水性	狭い	179	...①	46	...③	11
	広い	260	...②	132	...④	37
疎水性	狭い	26		12		142 ...⑤
	広い	39		21		105 ...⑥

表 2. シミュレーション条件

分類	タンパク質 <sup>a</sup>	PDB ID		シミュレーション		
		リガンド無	複合体	リガンド <sup>b</sup>	時間	
①	DAHPS	1OFB	1HFB	PEP	×10	5 μs×50
	AST	1AAW	1ASM	Maleic acid	×50	2 μs×50
②	6PGL	2J0E	3EB9	Citric acid	×10	5 μs×50
	HAP	3IT2	3IT1	Tartaric acid	×30	2 μs×50
③	PNP	1ODL	1ODJ	Guanosine	×10	5 μs×50
	NdRT	1F8X	1F8Y	2'-deoxycytidine	×15	5 μs×50
④	Levansucrase	1OYG	1PT2	Sucrose	×5	4 μs×50
	PAL	1S1A	2ARE	Glucose	×5	1 μs×100
⑤	LinB	1IZ7	1G5F	Dichloroethane	×10	1 μs×100
	PGA	1PNK	1AI7	Phenol	×30	5 μs×50
⑥	KSI	3VSY	2PZV	Phenol	×10	2 μs×50
	PDE4D	3SL3	1Y2B	DEE	×5	5 μs×50

<sup>a</sup>DAHPS: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase; AST: Aspartate aminotransferase; 6PGL: 6-phosphogluconolactonase; HAP: Histidine acid phosphatase; PNP: Purine nucleoside phosphorylase; NdRT: Nucleoside deoxyribosyltransferase; PAL: Pterocarpus angolensis lectin; LinB: Haloalkane dehalogenase LinB; PGA: Penicillin G acylase; KSI: Ketosteroid isomerase; PDE4D: Human phosphodiesterase 4D;

<sup>b</sup>PEP: Phosphoenol pyruvate; DEE: Ethyl 3,5- dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate;

ルギー的な観点において妥当性の高いシミュレーションが可能であると考えられる。

また、シミュレーションデータよりリガンドの結合経路を抽出し、3次元流束密度分布を計算したところ、タンパク質表面付近においてリガンド流量が多い箇所を見出すことができ、リガンドは結合過程においてある程度特異的な経路を通過することが明らかとなった。さらに、結合経路と基質結合ポケットの形状や物理化学的性質との関係を調べるため、タンパク質構造から検出した溝と結合経路の位置関係およびリガンド結合経路の周囲の残基の疎水性に関する解析を行ったところ、タンパク質表面やリガンドの性質によってそれぞれ異なる傾向が確認された。このことから、リガンドや結合ポケットの性質をリガンドの結合経路と結びつけられる可能性が示唆された。

### Dual-basin potential を用いた MARTINI 粗視化シミュレーションの拡張

MARTINI 粗視化力場を用いたシミュレーションにおいては、タンパク質構造を保存するため一定距離以内に存在する粒子同士をばねで束縛する必要があり、タンパク質の大きな構造変化を扱うことができないという制約が存在する。この問題を解決するため、MARTINI 力場に dual-basin potential (Okazaki *et al.*, *PNAS*, 2006) を組み合わせた拡張を行った。タンパク質が異なる 2 つの立体構造の間を変化するとき、それぞれの構造を基準とした束縛ポテンシャルを  $V_1(\mathbf{x})$  および  $V_2(\mathbf{x})$  ( $\mathbf{x}$ : タンパク質の座標) とする。これらのポテンシャルから、次の

式で表される dual-basin potential を計算することで構造の変化を扱った。

$$V(\mathbf{x}) = \frac{V_1(\mathbf{x}) + V_2(\mathbf{x}) + \Delta V}{2} - \sqrt{\left(\frac{V_1(\mathbf{x}) - V_2(\mathbf{x}) - \Delta V}{2}\right)^2 + \Delta^2}$$

ここで、 $\Delta V$  は 2 つの状態の出現確率を、 $\Delta$  は 2 つの状態間のエネルギー障壁の高さを調節するパラメータである。このポテンシャルはそれぞれの束縛ポテンシャルの間でなめらかにつながった形をしており、構造間での遷移が可能となる。

Dual-basin potential を用いたシミュレーションを ribose binding protein および adenylate kinase の 2 種類のタンパク質について行った。これらのタンパク質はリガンドが結合した状態で閉じた構造、結合していない状態で開いた構造をとることが分かっている。それぞれのタンパク質を水に溶解し、1  $\mu$ s のシミュレーションを  $\Delta$  および  $\Delta V$  を変えながら行ったところ、1  $\mu$ s のシミュレーション中で相互の立体構造遷移を複数観測できるような  $\Delta$  および  $\Delta V$  の条件を見つけることができた。続いて、ribose binding protein について、タンパク質の周りに 2 分子のリガンドをランダムに配置した結合シミュレーションを行った。結果、タンパク質の開閉を伴うリガンドの結合が確認でき、複合体構造と同様の構造を再現できることが分かった。また、タンパク質の構造変化に対して、遷移速度の解析を行ったところ、リガンドが結合した状態においてタンパク質が開いた構造をとりやすくなることが示された。

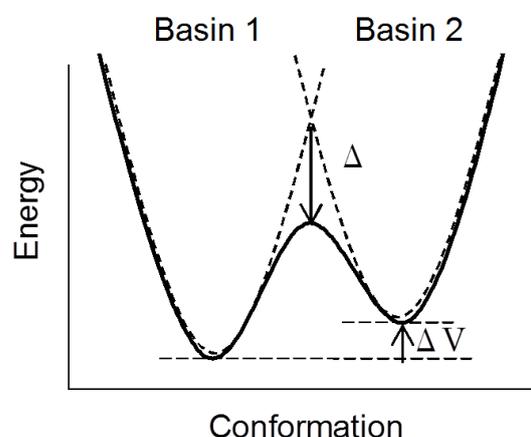


図 1. Dual-basin potential の形状

## まとめ

MARTINI 粗視化シミュレーションを用いることによりタンパク質-リガンド結合状態を安定に再現することに成功した。速度パラメータについては MARTINI 力場の枠組みの中で実験値を再現することが可能であり、妥当性の高い解析ができると考えられる。さらに結合経路の解析から、リガンドや基質結合ポケットの性質が経路を決定づける要因の 1 つとなっていることが示唆された。このような解析をさらに一般化し、結合経路に関する汎用性の高い知見を得ることができれば、結合経路の予測などにもつながると期待される。また、dual-basin potential を用いて MARTINI の拡張を行うことにより、タンパク質の大きな構造変化を再現することに成功した。さらに、リガンド結合シミュレーションにおいて、タンパク質の開閉を伴うリガンド結合を再現することができ、構造変化を伴うリガンド結合過程の解析への有効性が示唆された。