

生体分子の動きを効率的に捉えるシミュレーション技術を開発

—超高周波超音波照射によってタンパク質と医薬品の結合計算を加速—

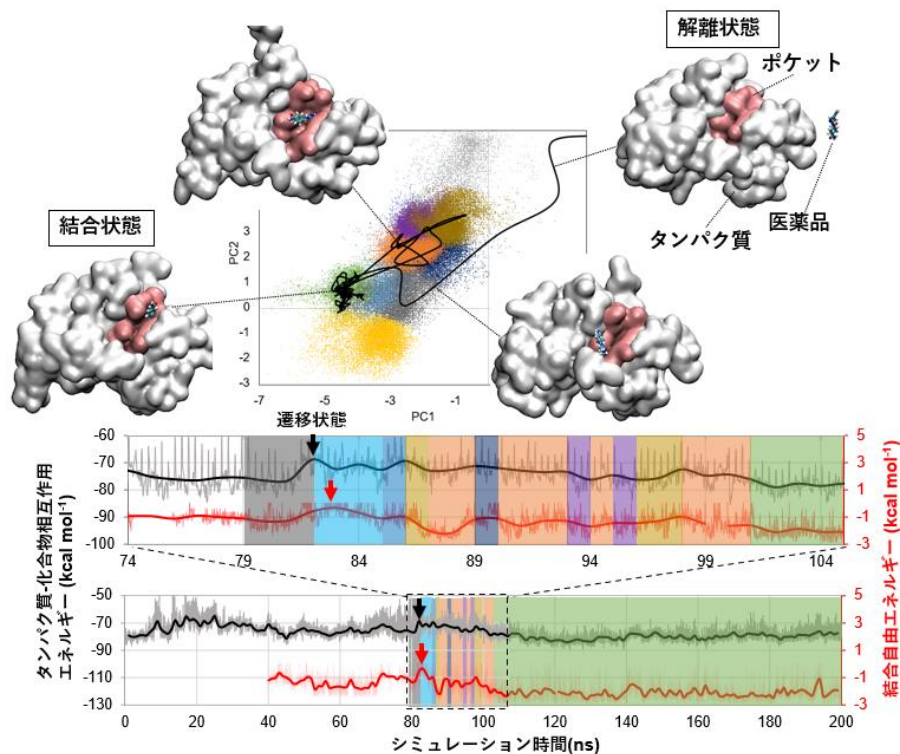
概要

京都大学大学院医学研究科 奥野恭史 教授、荒木望嗣 特定准教授、松本篤幸 特定准教授、理化学研究所計算科学研究センター 井阪悠太 特別研究員、兵庫県立大学 神谷成敏 教授、大阪大学 Gert-Jan Bekker 准教授らの研究グループは、病気の原因タンパク質と医薬品の結合過程を、汎用コンピュータでも高速にシミュレーションできる新たな計算技術の開発に成功しました。

近年、生体分子の立体構造解析技術は目覚ましい進歩をとげていますが、タンパク質の動きや医薬品との結合などの動的プロセスを分子レベルで捉えることは、依然としてチャレンジングな課題となっています。例えば、米国では専用のスーパーコンピュータが開発され、我が国でも「富岳」を用いて新型コロナウイルスの治療薬候補探索のシミュレーションがされています。

今回、本研究グループは、超高周波超音波の照射によって生体分子の動的プロセスを加速する新しいシミュレーション技術(Hypersound-Perturbed Molecular Dynamics Simulation)を開発し、タンパク質 CDK2 と低分子化合物を用いて検証したところ、両者の結合速度を 10-20 倍に上昇させることに成功し、タンパク質ポケットに対する多様な結合経路の存在が明らかになりました。将来、本手法をスーパーコンピュータ「富岳」に適用することで、「京」の 300 倍の速度向上が見込まれ、治療薬探索など、医薬品開発のスピードアップに貢献することが期待されます。

本研究成果は、2021 年 5 月 14 日に、国際学術誌「Nature Communications」に発表されました。



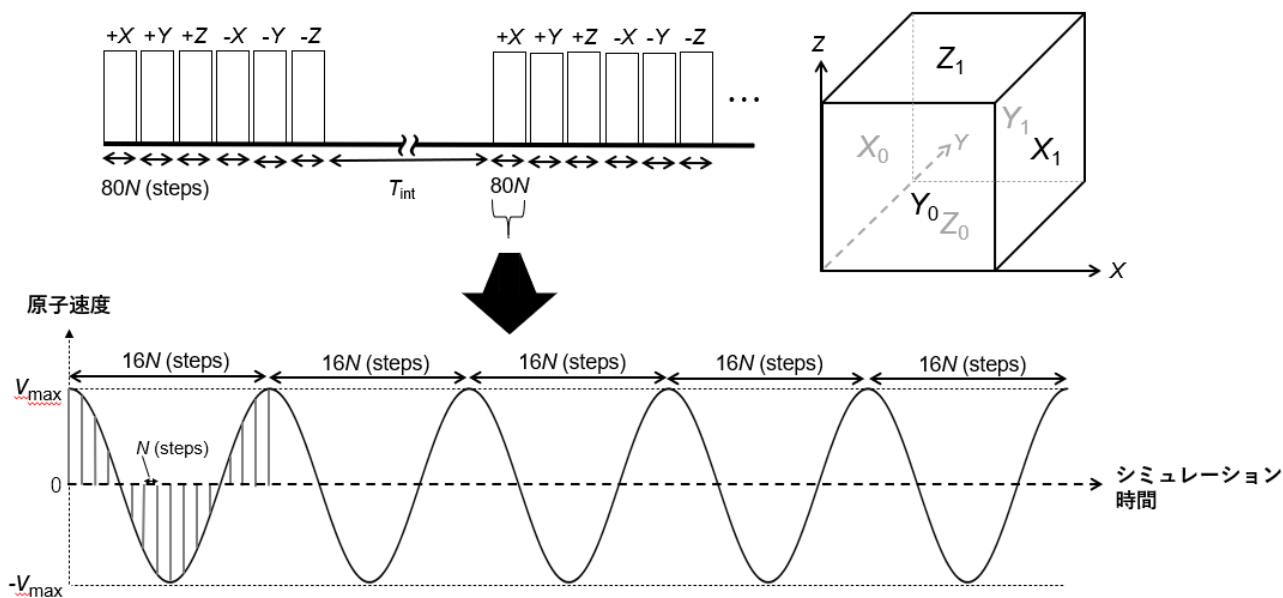
Hypersound-Perturbed Molecular Dynamics Simulation によって捉えたタンパク質-化合物結合パスウェイ

1. 背景

タンパク質の折り畳み過程、タンパク質と医薬品の結合、酵素反応といった生体分子プロセスの多くは、マイクロ秒よりも長いタイムスケールで起こっています。近年、生体分子の立体構造解析技術は目覚ましい進歩をとげていますが、現在のところ、これらの動的プロセスを分子レベルで観測することは、実験科学技術・計算科学技術のどちらを用いても容易ではありません。計算科学的アプローチの一種である分子動力学 (MD) シミュレーション^[1]は生体分子の動きを分子レベルで観測できますが、通常の汎用大型コンピュータでは数マイクロ秒のシミュレーションが限界であるため、タイムスケールが比較的短い動的プロセスしか捉えることができませんでした。この問題を克服するために、米国では MD シミュレーション専用スーパーコンピュータが開発され、我が国でもスーパーコンピュータ「富岳」の活躍が期待されています。

2. 研究手法・成果

今回、我々は、汎用コンピュータでも比較的遅い動的分子プロセスを捉えられるようにするために、分子サイズの波長をもつ超高周波超音波 (hypersound shock waves)^[2]を利用して動的プロセスを加速する新しい MD シミュレーション手法を開発しました。実験科学の分野においては、様々な種類の化学反応や分子集合体形成が超音波照射によって加速されることが分かっています。我々は、これらの実験事実をヒントにして、溶液に対して超音波を照射できるように MD シミュレーションプログラムを改良し(図 1)、サイクリン依存性キナーゼ 2 (CDK2)^[3]と低分子阻害剤の結合を題材として、生体分子プロセスに対する超音波の影響を調べました。



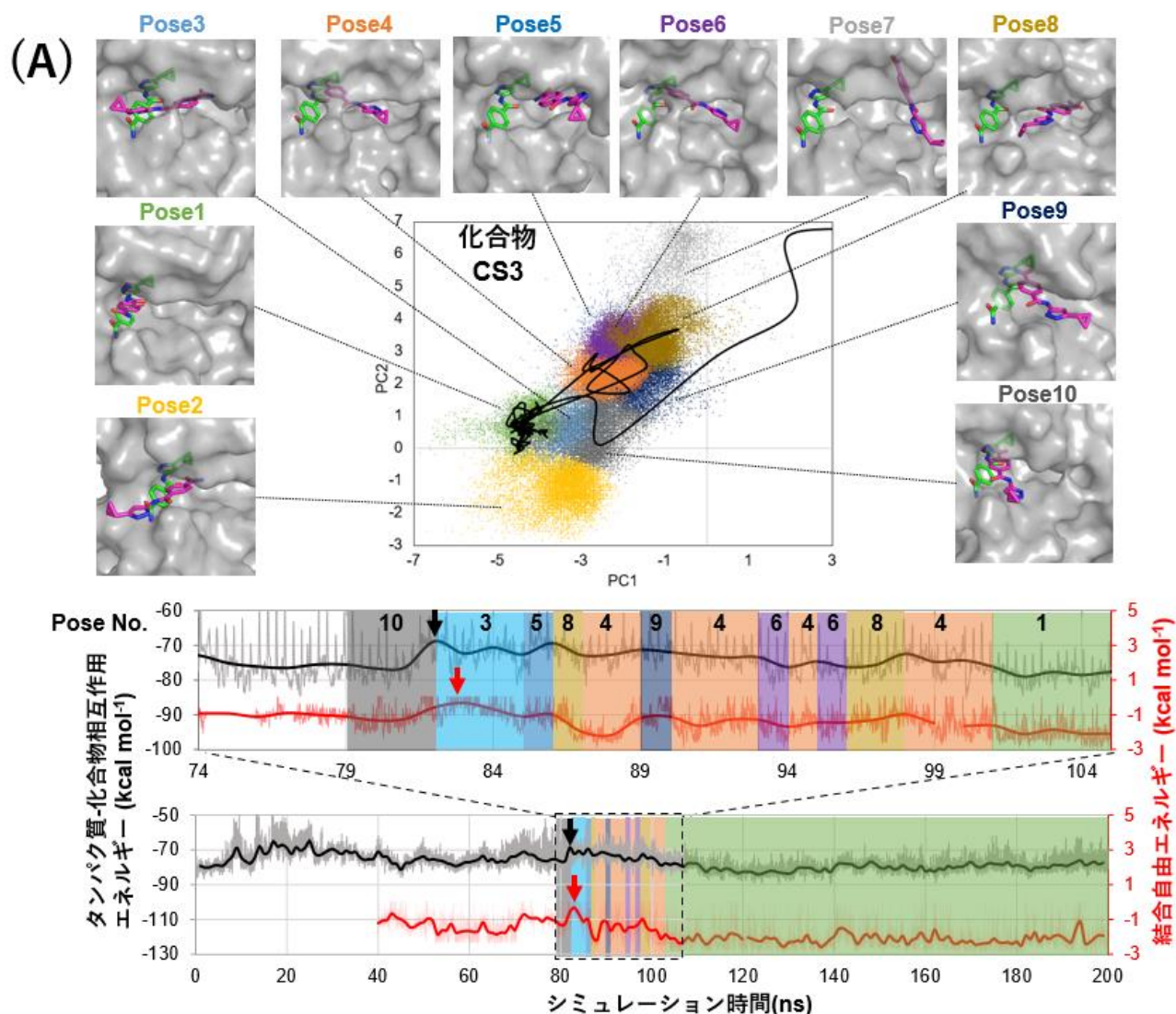
(図 1) MD シミュレーションにおける超高周波超音波の照射方法

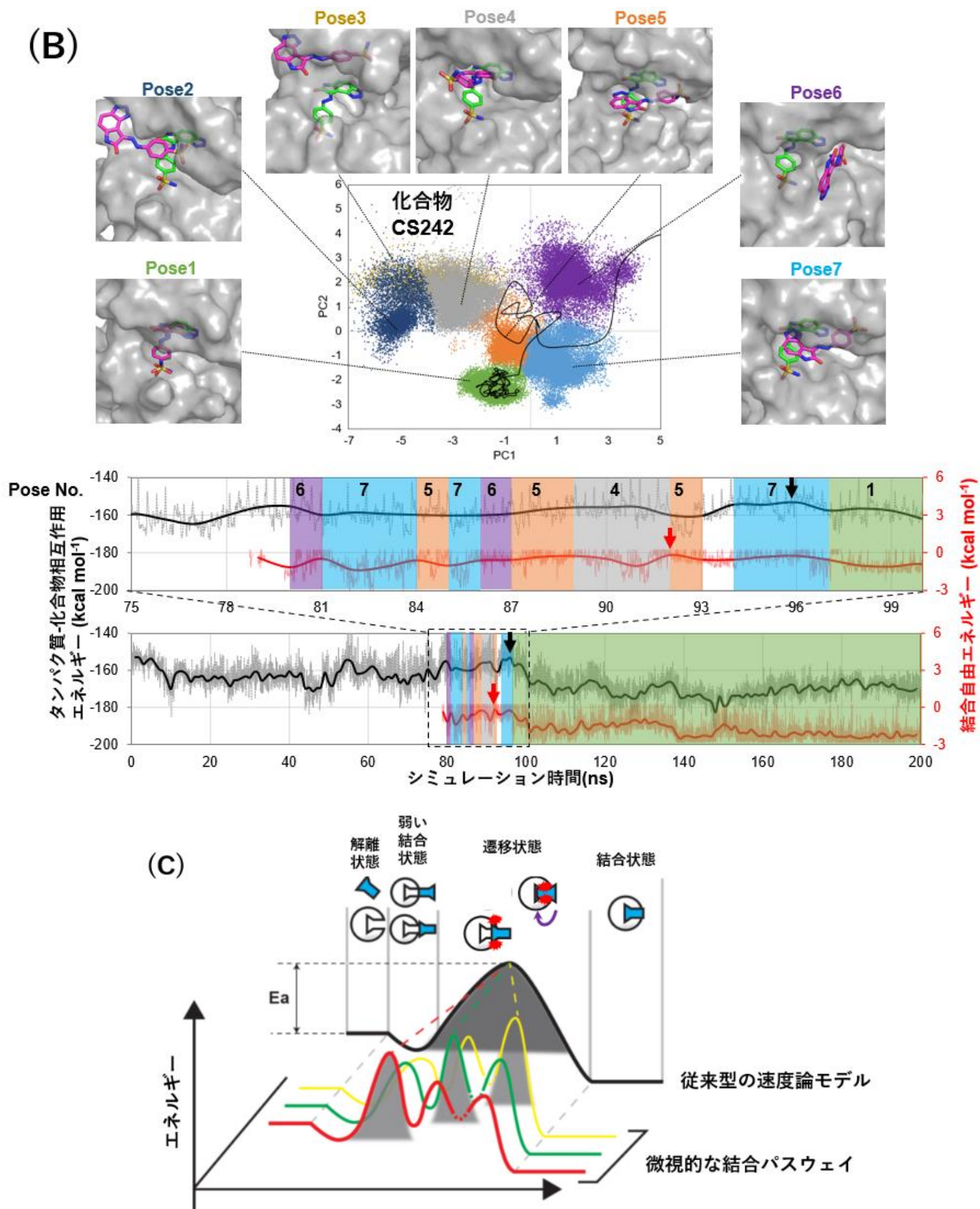
(上) タンパク質・化合物・水が入っているシミュレーションボックスを構成する各面 (X_0 , Y_0 , Z_0 , X_1 , Y_1 , Z_1) から、壁面の水分子に付加的な速度を与える形で、衝撃波を中心方向 (+X, +Y, +Z, -X, -Y, -Z 方向) に向かって順次照射する。(下) 各衝撃波は、合計 80 の速度パルス (16×5 周期、垂直方向のバーで表示) で構成されている。

まず、CDK2 の ATP 競合阻害剤^[4]として知られている CS3 と CS242 を用いて、これらの化合物の標的部である ATP ポケットへの結合を評価しました。CDK2 と化合物がお互いに離れた状態を初期状態として、100 ns という短いシミュレーションを独立に複数回実施したところ、超音波を照射しない従来型の MD シミュレーションでは、化合物の結合イベントが観測される割合は 0.7% (CS3)、0.5% (CS242) に留まりました。一方、超音波照射条件下のシミュレーションでは、12.4% (CS3) 及び 4.8% (CS242) まで上昇し、結合プ

ロセスが 10-20 倍加速される結果となりました。シミュレーションデータを詳しく解析したところ、超音波照射は、化合物とタンパク質ポケットとの衝突頻度を上昇させる効果があることに加えて、ポケットに入り込む際のエネルギー障壁（活性化エネルギー）を乗り越えやすくしていることが分かりました。その一方で、CDK2 タンパク質の立体構造は、シミュレーション中に壊れることなく安定して維持されていました。これらの結果は、溶媒（水）の協調的分子運動を局所的に誘起する超音波照射が、タンパク質の立体構造に大きな影響を与えることなく、タンパク質と化合物の結合プロセスを加速することを示唆しています。

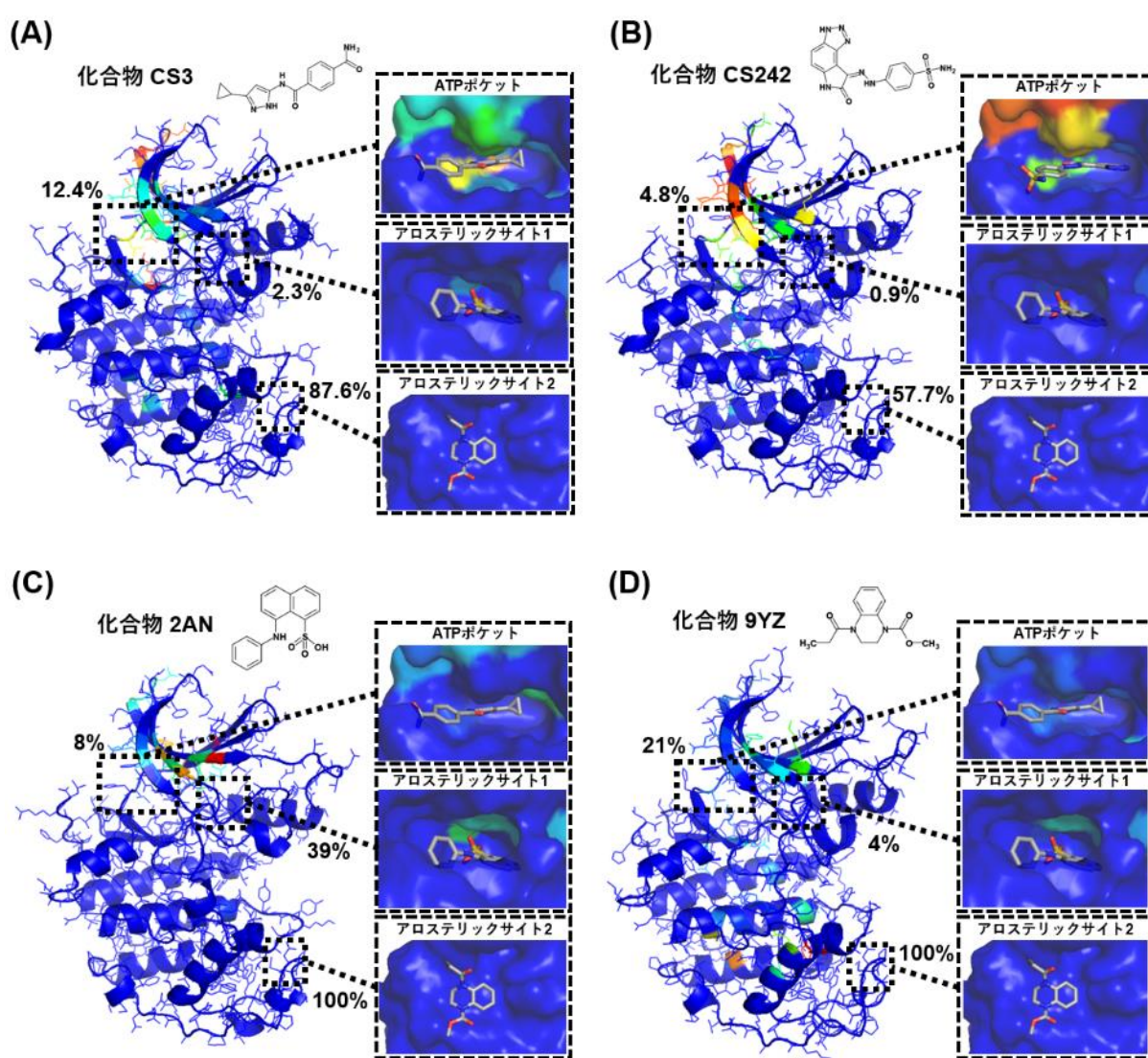
超音波照射条件下のシミュレーションによって捉えられた複数の化合物結合経路を詳細に分析したところ、化合物がタンパク質ポケットに入った後、様々な結合ポーズを経由し、最終的に安定な結合ポーズにたどり着いていることが明らかになりました（図 2A、B）。また、結合経路によって、化合物がタンパク質ポケットに入り込む瞬間がエネルギー的に最も不安定（遷移状態）になる場合と（図 2A）、ポケットに入った後にポケットの中で化合物が向きを変える瞬間が遷移状態に位置づけられる場合とが見られました（図 2B）。これまでの、医薬品はタンパク質ポケットに対して単一の経路で結合すると考えられてきましたが、実際には多様な結合経路が存在する可能性が示されました（図 2C）。





(図2)CDK2-化合物結合経路の微視像。(A、B) CDK2 のATP ポケットに対する (A) CS3 および (B) CS242 の代表的な結合経路。(上) 超音波照射下のシミュレーションで捉えた全ての化合物結合ポーズを10色(CS3)、7色(CS242)の点で示し、代表的な一つの結合経路を黒線で示した。各色の点に対応する結合ポーズを図の上部に示した(CDK2: 灰色の表面モデル、化合物: ピンク色のスティック)。ここで、pose1が実験的に観測されている結合ポーズ(緑色のスティック)に最も近い。(下) 結合経路に沿ったCDK2-化合物相互作用エネルギー(黒色)及び結合自由エネルギー(赤色)の軌跡。結合経路上で最もエネルギーが高い遷移状態を矢印で示した。(C) 巨視的および微視的速度論モデルの概略図。従来の巨視的速度論モデルでは、同一の遷移状態を経由する単一の結合経路を想定している。一方、1分子レベルでは、化合物は遷移状態がそれぞれ異なる複数の経路を通過してタンパク質に結合する。

更に、ATP ポケット以外の部位に対する結合特性を調べるために、ATP 阻害剤(CS3, CS242)に加えて、ATP ポケットとは別の部位に結合することが分かっているアロステリック阻害剤^[5]2AN と 9YZ の結合シミュレーションを実施しました。その結果、4 種類の化合物全てにおいて、ATP ポケット/アロステリック部位への結合プロセスが超音波照射によって加速されました。浅いポケット形状をしているアロステリック部位 2 はすべての化合物によって頻繁にアクセスされた事から (図 3A-D)、この部位は非特異的な結合サイトであることを示唆しています。対照的に、CS3 と CS242 は ATP ポケットに優先的に結合した一方で (図 3A および B)、2AN はアロステリック部位 1 に優先的に結合しており (図 3C)、CS3/CS242 と 2AN がそれぞれ ATP ポケットとアロステリック部位 1 に安定に結合するという共結晶構造データに矛盾しない結果となりました。このように、複数の化合物の結合シミュレーションデータを統合することで、特異的・非特異的結合サイトの選別、化合物ごとの結合部位選択性の予測、およびタンパク質の機能活性をアロステリックに調節できる新たな薬剤結合部位の探索に役立つ可能性が示されました。



(図 3) (A-D) 4 種類の化合物 (A) CS3, (B)CS242, (C)2AN, (D)9YZ の各々に対する CDK2 表面上の結合部位。各化合物の化学構造を図の上部に示している。CDK2 主鎖・側鎖をそれぞれリボンモデル・スティックモデルで表示し、結合頻度が高い/低いアミノ酸を暖色/冷色で着色した。ここで、4 種類すべての化合物が高頻度にアクセスしたアミノ酸残基は非特異的サイトとして冷色で着色している。右側に、代表的な結合サイトの拡大図を表面モデルで表示し、実験的に結合が観測されている化合物[CS3/CS242(ATP ポケット)、2AN (アロステリックサイト 1)、および 9YZ (アロステリックサイト 2)]の結合ポーズと共に示した。図中に記載されているパーセンテージは、超音波照射下のシミュレーションによって結合プロセスを捉えた割合を示す。

3. 波及効果、今後の予定

本研究では、分子サイズの波長をもつ超音波を照射することで、タンパク質の立体構造に影響を与えることなく、タンパク質-医薬品の結合プロセスを加速できる可能性を示しました。本シミュレーション研究で使用する数ナノメートルの波長をもつ超高周波超音波は現実世界では未だ実現されていないため、その実験的検証が待たれます。私たちは、このシミュレーション技術を創薬プロセスに適用することで、医薬品候補の結合活性を上昇させるための分子設計や、タンパク質表面上の新たな薬剤結合部位の探索に役立つと考えています。今後、私たちは、タンパク質-医薬品結合だけでなく、タンパク質の活性型・不活性型状態の間の立体構造転換やタンパク質同士の結合といった様々な生体分子プロセスに本法を適用し、その有効性・汎用性を検証していく予定です。

4. 研究プロジェクトについて

研究体制

京都大学大学院医学研究科

教授 奥野恭史

特定准教授 荒木望嗣

特定准教授 松本篤幸

研究員 寒河江由香里

理化学研究所 計算科学研究センター HPC/AI 駆動型医薬プラットフォーム部門

部門長 奥野恭史

AI 創薬連携基盤ユニット

特別研究員 井阪悠太

兵庫県立大学

教授 神谷成敏

大阪大学

准教授 Gert-Jan Bekker

研究費

本研究は、文部科学省「富岳」成果創出加速プログラム「プレジジョンメディスンを加速する創薬ビッグデータ統合システムの推進」、ポスト「京」重点課題1「生体分子システムの機能制御による革新的創薬基盤の構築」、公益財団法人計算科学振興財団 研究教育拠点（COE）形成推進事業、JSPS 科研費（課題番号：JP18K06594, JP21K06510）の助成を受けたものです。また、本研究の結果の一部は、理化学研究所のスーパーコンピュータ「京」及び「京」以外の HPCI システムを利用して得られたものです（課題番号：hp140042, hp150025, hp150272, hp160213, hp170275, hp180186, hp190154, hp200011, hp200129, ra000018）。

<用語解説>

[1]分子動力学（MD）シミュレーション

分子（群）を構成する原子を「質量を持つ粒子」とみなし、ニュートンの運動方程式を解くことで各原子位置の経時変化を計算する手法。これにより、分子の動きをシミュレーションすることが可能である。MD は Molecular Dynamics の略。

[2]超音波

人の耳で聞こえる音よりも高い振動数(20kHz 以上)をもつ音波と定義される。本シミュレーション研究では、分子サイズの波長(約 3nm)をもつ超音波を照射しており、これは約 600GHz という極めて高い振動数に相当する。

[3]サイクリン依存性キナーゼ 2(CDK2)

サイクリン依存性キナーゼ(CDK)ファミリーに属し、補酵素である ATP を利用して、基質タンパク質に含まれるセリン残基やスレオニン残基をリン酸化する機能を持つ。

[4]ATP 競合阻害剤

キナーゼの表面上に存在する補酵素(ATP)を取り込むためのポケットに結合し、ATP の結合を妨げることで、リン酸化機能を阻害する役割がある。

[5]アロステリック阻害剤

タンパク質上の活性部位から遠く離れた部位に結合することで、タンパク質の広域的な立体構造変化を誘起し、酵素活性を調節する役割がある。

<研究者のコメント：荒木望嗣>

タンパク質、DNA や医薬品などの生体内の作用を知る上で、分子の動きを捉えることは極めて重要です。その有力な手段としてコンピュータによる分子動力学シミュレーションがありますが、「富岳」などのスーパーコンピュータを用いてもミリ秒の分子の動きを捉えることが精一杯です。本手法はスーパーコンピュータのようなハードウェア技術ではなく、ソフトウェア技術であることから、「富岳」に適用することで、「京」の 300 倍の速度向上が見込まれます。これにより、治療薬探索や病気の解明などに役立てたいと思っております。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Exploring ligand binding pathways on proteins using hypersound-accelerated molecular dynamics

超高周波超音波加速型分子動力学シミュレーションによるタンパク質表面上の化合物結合経路の探索

著 者：Mitsugu Araki, Shigeyuki Matsumoto, Gert-Jan Bekker, Yuta Isaka, Yukari Sagae, Narutoshi Kamiya, and Yasushi Okuno

掲 載 誌：Nature Communications

DOI： <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23157-1>