

タンパク質の基質特異性発現メカニズムを 解明する分子シミュレーション手法の開発： 新規基質の合理的デザイン実現にむけて

原 田 隆 平*

Development of a Molecular Simulation Method for Elucidating the Substrate Specificity of Protein Toward Rational Design of New Substrates

Ryuhei HARADA*

Proteins specifically recognize several ligands to make their biological functions. To design a new ligand, its specificity is important, i.e., the interaction between the active site of a target protein and the ligand plays an essential role of controlling the binding affinity. Computationally, molecular dynamics simulation (MD) is powerful to investigate the interaction. However, the ligand-binding process is induced over the accessible timescale of MD. Therefore, it is difficult to sample the ligand-binding processes as a rare event. To tackle this issue, a rare event sampling method called parallel cascade selection MD (PaCS-MD) was applied to sample the ligand-binding process instead of the conventional MD. Finally, we analyzed the protein-ligand interaction of the complex sampled by PaCS-MD to obtain information on the design of a new ligand.

1. 研究背景と目的

タンパク質は基質を特異的に認識・結合して複合体を形成する「基質特異性」をもつ。標的タンパク質と特異的に結合する新規基質を設計するうえで、基質特異性発現メカニズムを解明することは重要である。分子動力学計算（MD）は標的分子の構造変化を原子レベルの分解能で追跡できるが、計算技術の限界から基質結合の時間スケールまで

到達できないという問題を抱えている（図1）。一般的に、特異性発現メカニズムをはじめとする生体機能に重要な構造変化は長時間スケールで観測される「レアイベント」であるため抽出が難しく、現状の計算技術ではタンパク質の基質特異性発現メカニズムの解明は困難であるため、計算手法の開発が不可欠である。本研究では、従来の MD では抽出が難しい標的分子（タンパク質）と基質（リガンド）の結合プロセスを独自開発のレアイベントサンプリング法（Parallel Cascade Selection MD: PaCS-MD）(1) を適用することで抽出して複合体構造を予測する。さらに、基質結合に伴う相互作用の変化をエネルギー移動ネットワークに基づき解析し、特異性発現メカニズムを解明する。

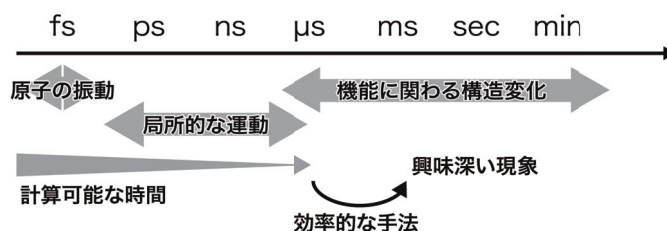


図1 MDの到達時間スケール問題。

2. 計算手法

PaCS-MD による長時間ダイナミクス抽出では、単一構造から長時間 MD を実行するのではなく、初期条件が異なる MD を独立に実行する「分散型 MD」を駆使する。タンパク質ダイナミクスは確率的であるため、長時間 MD を実行しても、基質結合プロセスを観測できる保証はない。そこで、基質結合の可能性が高い（結合確率が高い）複数の初期構造から短時間 MD を再開（リスタート）する分散型 MD を「サイクル」として繰り返せば、結合プロセスを効率的に抽出できる。本研究では PaCS-MD を活用して基質結合の「前」と「後」の構造間を結ぶ結合プロセスを抽出する。具体的には、標的分子の結合サイトと基質の重心間距離が小さい順に MD スナップショットをランキングし、値が小さいものから集中的に MD をリスタートするサイクルを繰り返す（図2）。サイクルを十分繰り返すことにより、基質が結合サイトに近

づき、複合体を形成するプロセスを抽出できる。具体的には、重心間距離が小さい上位 N 個の MD スナップショットから短時間 MD を独立に実行するサイクルを繰り返す。サイクル毎にランキングを繰り返す。より重心間距離が小さい MD スナップショットを選択し続ける。最終的に重心間距離が閾値よりも小さくなったならばサイクルを停止し、各サイクルで生成された MD スナップショットをつなぎ合わせることで、基質結合プロセスが得られる。

本研究では PaCS-MD を独立に複数回実行して統計をとり、結合プロセスと複合体構造を予測した。PaCS-MD の適用例として、神経疾患に関与する「アセチルコリン分解酵素」の再活性化に伴う基質（活性化剤）結合プロセス抽出と複合体予測に関する計算を進めた。

3. 計算結果および考察

本計算の最終目的は、阻害されたアセチルコリン分解酵素の活性部位と特異的に結合する活性化剤をデザインすることに設定した。図 3 は、アセチルコリン分解酵素の活性部位（S203）と共有結合している阻害剤（Paraoxon）を切断するため、PaCS-MD を適用して活性化剤

（2-PAM）の結合パスウェイを探索した計算結果である。図 3 に示すように、結合パスウェイが PaCS-MD が自動探索され、活性部位における様々な結合ポーズが複合体構造として予測された。構造解析からアセチルコリン分解酵素は結合サイトに至る 3 つのドア（Omega Loop, Acyl Door, Back Door）が存在しており、どのドアを通過するのが結合確率を高められるかが活性化剤を設計する鍵となる。本研究において PaCS-MD を適用することにより全てのドアを通過する結合プロセスが得られ、確率的に Acyl Door を通過する場合が結合確率が高いことが示唆された。

次の段階として、活性化剤の結合の前後で活性サイトと基質の分子間相互作用がどのように変化しているか調べてみると、結合前後で活性サイトの近傍のみならず、遠隔の残基も動的に相互作用を組み替えながら段階的に結合していく様子が観察された。解析結果から明かなように、PaCS-MD を適用して基質結合プロセスを抽出することにより、静的構造だけでは抽出が難しい動的な相互作用変化を抽出できることが示唆された。本計算結果は、標的分子と特異性の高い基質デザインに有益な情報として活用が期待される。

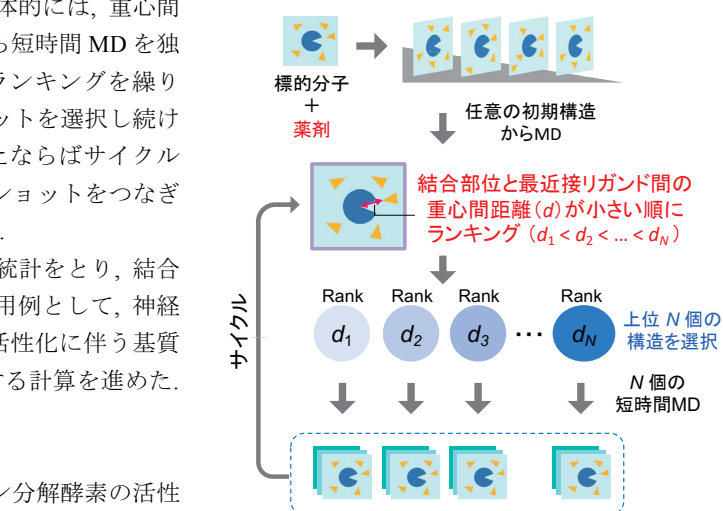


図2 PaCS-MDによるリガンド結合プロセス抽出。

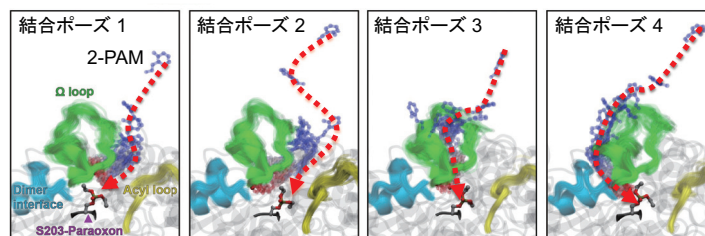


図3 アセチルコリン分解酵素活性化プロセス。
(PaCS-MDにより抽出した活性化剤の結合ポーズ)

4. 今後の展望

本研究において、PaCS-MD を適用することにより標的分子と基質の結合プロセス抽出と複合体予測が実現できることが示された。今後の展望として、様々な標的分子と基質のペアに対して PaCS-MD を適用し、結合プロセスを探索しつつ複合体構造を予測し、基質結合に伴うタンパク質の構造変化と共役するエネルギーネットワーク（ENN）の組み替えを追跡することにより、基質特異性発現メカニズムをより定量的に解析していく予定である。また、現状で得られている計算結果に基づき、アセチルコリン分解酵素に関する活性化メカニズムの解明及び合理的な活性化剤の提案について論文投稿を進めていく予定である。

REFERENCE

- 1) R. Harada and A. Kitao, *J. Chem. Phys.*, **139** (2013) 035103.