

博士論文(要約)

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

指導教官 清水 謙多郎 教授

応用生命工学専攻
生物情報工学研究室

根上 樹

目次

第1章	序論	3
第2章	MARTINI 粗視化力場	5
2.1	MARTINI における粗視化モデル	5
2.2	相互作用ポテンシャル	6
2.3	時間スケール	7
2.4	タンパク質への適用	7
第3章	MARTINI 粗視化力場を用いたタンパク質-リガンド結合過程の比較シミュレーション	10
3.1	タンパク質-リガンド複合体の分類および計算対象	10
3.1.1	タンパク質-リガンドペアの分類手法	10
3.1.2	分類結果	10
3.1.3	計算対象	11
3.2	計算手法	13
3.2.1	シミュレーション条件	13
3.2.2	粗視化モデルのマッピングおよびパラメータ	15
3.2.2.1	タンパク質	15
3.2.2.2	リガンド	15
3.3	結果	18
3.4	まとめ	18
第4章	Dual-basin potential による MARTINI 粗視化シミュレーションの拡張	20
4.1	Dual-basin potential	20
4.2	タンパク質の構造変化シミュレーション	20
4.3	タンパク質-リガンド結合シミュレーションへの適用	21
4.4	まとめ	21
第5章	総括	22

付録 A	化合物の MARTINI 粗視化力場パラメータの決定	24
A.1	力場決定の手順	24
A.2	結合パラメータの比較	25
A.3	水-オクタノール分配係数の比較	29
付録 B	結合、解離速度定数の推定	31
B.1	ベイズ推定による速度定数の推定	31
B.2	結合、解離の定義による速度定数の依存性	33
参考文献		34

第1章 序論

生体内で起こる代謝、免疫、運動などのさまざまな現象は、タンパク質による反応がその多くを担っており、生命現象を解明する上ではタンパク質の構造、機能の理解は不可欠なものとなる。近年、分子生物学の分野におけるさまざまな実験技術の発達によりタンパク質構造の解明は加速度的に進んでいる。こうした知見の蓄積が進むことにより、タンパク質構造をもとに薬剤設計を行う structure based drug design[1, 2]などの情報科学的手法は応用の幅が広まり、さらに重要性を増すことが予想される。このような創薬へ応用を行う上で、薬剤分子(リガンド)とタンパク質の相互作用の理解は不可欠であり、これまでに様々な研究が行われてきた。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着目した研究は少ない。しかしながら、リガンドの受容体への結合速度が薬効に大きく寄与することが明らかになってきており [3, 4, 5]、結合メカニズムの解明も重要な研究課題のひとつとなる。

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きわめて困難であり、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結合メカニズムを解明する上で非常に有効な方法となると考えられる。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。これまでタンパク質-リガンド結合に関する分子動力学シミュレーションを用いた研究としては、実験では見出せなかった thioflavin-T と β -リッチペプチドの結合をシミュレーションにより明らかにした例 [6] や、nicotinic acetylcholine receptor への isoflurane の結合に関して複数の結合状態を見出した研究 [7] などが報告されているが、過去のこうした研究では結合状態の予測にとどまっていた。最近になって、複数のグループにより、trypsin への benzamide の結合過程 [8] や β -adrenergic receptor に対する agonist や antagonist の結合過程 [9] を長時間のシミュレーションにより再現した研究が報告されている。しかしながら、これらの研究においても、結合過程の追跡は μ s のオーダーであるため、リガンドの結合過程の時間スケールがミリ秒に及ぶ場合もあることを考慮すると、依然として計算コストの問題が存在するといえる。また、リガンドの結合過程はリガンド結合ポケットやリガンドの形状、物理化学的性質によって異なると考えられ、結合過程を一般的に理解するためには様々な性質を持つ多数のタンパク質-リガンドのペアにつ

いて計算を行う必要があり、計算の効率化が望まれる。

分子動力学シミュレーションにおいて計算時間を削減するための方法として、粗視化と呼ばれるものがある。粗視化とは、いくつかの原子をひとまとめにすることで系を単純化し、巨大な系に対する長時間のダイナミクスを解析する手法である。生体分子に関しては、脂質二重膜の系に対する研究が数多くなされているほか [10, 11]、タンパク質においてもフォールディングなどのダイナミクスに関する研究が行われており [12, 13]、粗視化手法は様々な対象に対して適用されている。タンパク質-リガンド結合に関しては、HIV-1 Protease に対して結合過程を解析した研究などがある [14] が、このような例で用いられている力場は特定の対象に対して最適化されたものであり、一般的なタンパク質-リガンド結合への適用はまだなされていない。

本研究では、タンパク質-リガンド結合における計算コストの問題を克服し幅広い対象について調べるため、熱力学パラメータに基づく半定量的な力場である MARTINI 粗視化力場を用いたシミュレーションによりタンパク質-リガンド結合過程を解析した。様々な性質をもつ多数のタンパク質-リガンドのペアに対して粗視化シミュレーションによる解析を行い、結合経路とそれぞれの性質の間関係性を調べることで結合過程について一般的な知見を得ることを試みた。また一方で、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の構造を保持するために束縛をかける必要があることから、大きな構造変化を扱えないという制約が存在し、この問題を克服するためのシミュレーション手法の拡張を行った。

本論文では第 2 章において MARTINI の概要に触れた後、第 3 章においてタンパク質-リガンド結合過程の比較シミュレーションについて記述する。タンパク質-リガンドの結合過程について一般的な知見を得るため、タンパク質-リガンドペアを物理化学的性質に基づいて分類し、異なる性質を持つ多数のタンパク質-リガンドペアについてリガンド結合シミュレーションを実行し、結合過程の傾向に関する解析を行った。第 3 章ではタンパク質の大きな構造変化を扱うための MARTINI 粗視化シミュレーションの拡張について記述する。タンパク質の構造変化を可能とするため、束縛ポテンシャルに対して dual-basin potential と呼ばれるポテンシャルを適用し、タンパク質の構造変化を再現することを可能とした。さらに、この手法をタンパク質-リガンドの系に適用し、構造変化を伴うタンパク質-リガンド結合過程を解析した。

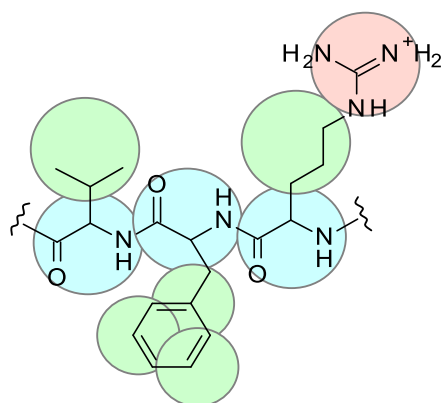
第2章 MARTINI粗視化力場

粗視化とは、巨大な系においていくつかの原子をまとめて一つの粒子とみなすことにより系を単純化し計算時間を削減する手法であり、脂質膜をはじめとしてタンパク質のフォールディングなど、生体分子のさまざまな系に関して粗視化シミュレーションを適用した研究が行われている [10, 13]。本研究では、Marrink らによって開発された MARTINI 粗視化力場 [15, 16, 17] を用いた。従来用いられてきた粗視化モデルには様々なものが存在するが、その多くは特定の対象とする系に対し、運動や相互作用を適切に近似するようにモデル化しパラメータを決定するものである。これに対し、MARTINI 力場では分配自由エネルギーなどの熱力学的データを基準とした共通のパラメータを設定することで一般的な適用が可能となっている。MARTINI 力場では脂質やアミノ酸といった生体分子についてある程度力場が整備されており、様々なリガンドとタンパク質の相互作用を調べるという本研究の目的に対し、この力場は適していると考えられる。以下では MARTINI 力場の概要について触れる。

2.1 MARTINIにおける粗視化モデル

MARTINI による粗視化シミュレーションでは、原則として4つの重原子を一つの粒子(粗視化原子)とみなして計算を行う。水分子に関しては4分子を一つの粗視化粒子として扱い、分子として実際に系に含めて計算を行う。ただし、ベンゼンなどの小さい環構造は2原子を一つの粗視化原子とすることにより、3員環のような環状構造とする。各粗視化原子はそれぞれの部分構造の極性によって大まかに charged (Q)、polar (P)、nonpolar (N)、apolar (C) の4種類に分類され、さらにその中で極性の強さによる分類が行われ、1 (非極性) から 5 (極性) の5種類、あるいは水素結合形成能に基づいて d (donor)、a (accepter)、da (donor/accepter)、0 (none) の4種類に分類される。一例として、図 2.1 にペプチド (Val-Phe-Arg) および水の MARTINI 粗視化モデルを示した。

Peptide (Val-Phe-Arg) :



Water :

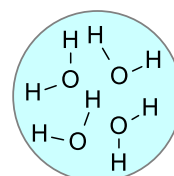


図 2.1: MARTINI 粗視化モデルの一例：ペプチド (Val-Phe-Arg) および水の粗視化マッピング [15, 17]。

2.2 相互作用ポテンシャル

非結合粗視化原子間の相互作用は Lennard-Jones ポテンシャルおよび静電相互作用によって決まる。粗視化原子 i , j 間の LJ ポテンシャルは 12-6 ポテンシャルにより以下のように定義される。

$$V_{\text{LJ}}(r) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] \quad (2.2.1)$$

σ_{ij} は粗視化原子間の距離に関するパラメータであり、通常 $\sigma_{ij} = 0.47$ nm として計算される。 ε_{ij} は相互作用の強さに関するパラメータであり、相互作用する粗視化原子種の組み合わせに対応して 2.0 kJ mol^{-1} から 5.6 kJ mol^{-1} の異なる値をとる。ただし、環状構造同士の相互作用においては、細かいマッピングを行っているため、小さい原子間距離 ($\sigma_{ij} = 0.43$ nm) およびスケールされた相互作用パラメータ (75 %) が用いられる。

荷電している原子 (Q) に関しては静電相互作用がクーロンポテンシャルにより定義される。

$$V_{\text{el}}(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r} \quad (2.2.2)$$

q_i , q_j は粗視化原子 i , j それぞれの電荷であり、 ε_0 は真空の誘電率を表す。比誘電率は $\varepsilon_r = 15$ として計算される。LJ ポテンシャルおよび静電相互作用のカットオフ半径は 1.2 nm であり、LJ ポテンシャルでは 0.9-1.2 nm、静電相互作用では 0-1.2 nm でシフトするポテンシャルが用いられる。

結合原子間の相互作用は結合長、結合角、二面角に関する以下のような調和ポテンシ

ルにより計算される。

$$V_{\text{bond}}(R) = \frac{1}{2}K_{\text{bond}}(R - R_0)^2 \quad (2.2.3)$$

$$V_{\text{angle}}(\theta) = \frac{1}{2}K_{\text{angle}} \{ \cos(\theta) - \cos(\theta_0) \}^2 \quad (2.2.4)$$

$$V_{\text{dih}}(\psi) = K_{\text{dih}}(\psi - \psi_0)^2 \quad (2.2.5)$$

ここで、 $R - R_0$ 、 $\cos(\theta) - \cos(\theta_0)$ 、 $\psi - \psi_0$ は結合長、結合角、二面角の平衡状態からのずれを表し、 K_{bond} 、 K_{angle} 、 K_{dih} は力の定数を表す。これらの値は、全原子シミュレーションにおける構造、運動との比較により決定される。

2.3 時間スケール

分子の運動には、並進、回転、振動の3つの自由度が存在し、回転、振動は並進に比べ非常に速い時間スケールでの運動となる。粗視化力場では、複数の原子を一つの粗視化原子とみなしており、分子内の振動や回転などの自由度は小さくなる。したがって、粗視化シミュレーションでは運動の時間スケールが遅くなると考えられ、これによって大きな時間刻みを用いることができる。MARTINI 力場では通常 20 fs から 40 fs 程度の時間刻みが用いられ、これは全原子シミュレーションのおよそ 10 倍程度の値となる。一方、粗視化により分子内運動の自由度が失われることから、その自由エネルギー地形は滑らかとなる。これにより、粗視化シミュレーションにおける分子の運動は実際よりも速くなるという性質を持つ。全原子シミュレーションとの拡散係数の比較から、粗視化におけるダイナミクスはおよそ 2-10 倍速くなることが知られている。したがって、粗視化におけるシミュレーション時間は実際の時間の数倍に対応することになり、サンプリング効率が上昇することが期待される。また、結合速度定数などの運動速度に関する値は実験値に比べ大きく見積もられることになる。標準的には、水の拡散速度に基づき時間を 4 倍にスケールリングすることで実際の系と対応させる。以下、本論文ではシミュレーション時間の記述は粗視化における時間をそのまま表すものとする。

2.4 タンパク質への適用

ペプチドの MARTINI 力場は Montecelli らにより整備されている [17]。アミノ酸分子は主鎖に対応する一つの骨格原子と側鎖に対応するいくつかの原子によりモデル化されており、各アミノ酸側鎖に対してパラメータが決められている。ペプチド分子はアミノ酸分子が連なったものとして扱われ (図 2.1)、全原子構造から機械的に構築することができる。しかしながら、タンパク質のような複雑な構造を持つものに対してはシミュレーション

において構造が不安定となり、通常の MARTINI 力場のみでは計算ができない。したがって、一定の距離に存在する原子同士を調和ポテンシャルで繋げる elastic network モデルを用いることにより構造を束縛することが必要となる。

水中の HIV-1 Protease に対してシミュレーションを行った例を図 2.2 に示す。このタンパク質は対照的な二量体を形成しており、中央に結合ポケットを有する。このタンパク質に対し、通常の MARTINI 力場のみにより 200 ns のシミュレーションを行ったものが図 2.2 の下段左の図であり、中央のポケットが崩れ、タンパク質構造が壊れていることがわかる。これに対し、elastic network model により主鎖原子に束縛を行ったものが図 2.2 の下段右の図であり、初期構造が保存されていることがわかる。

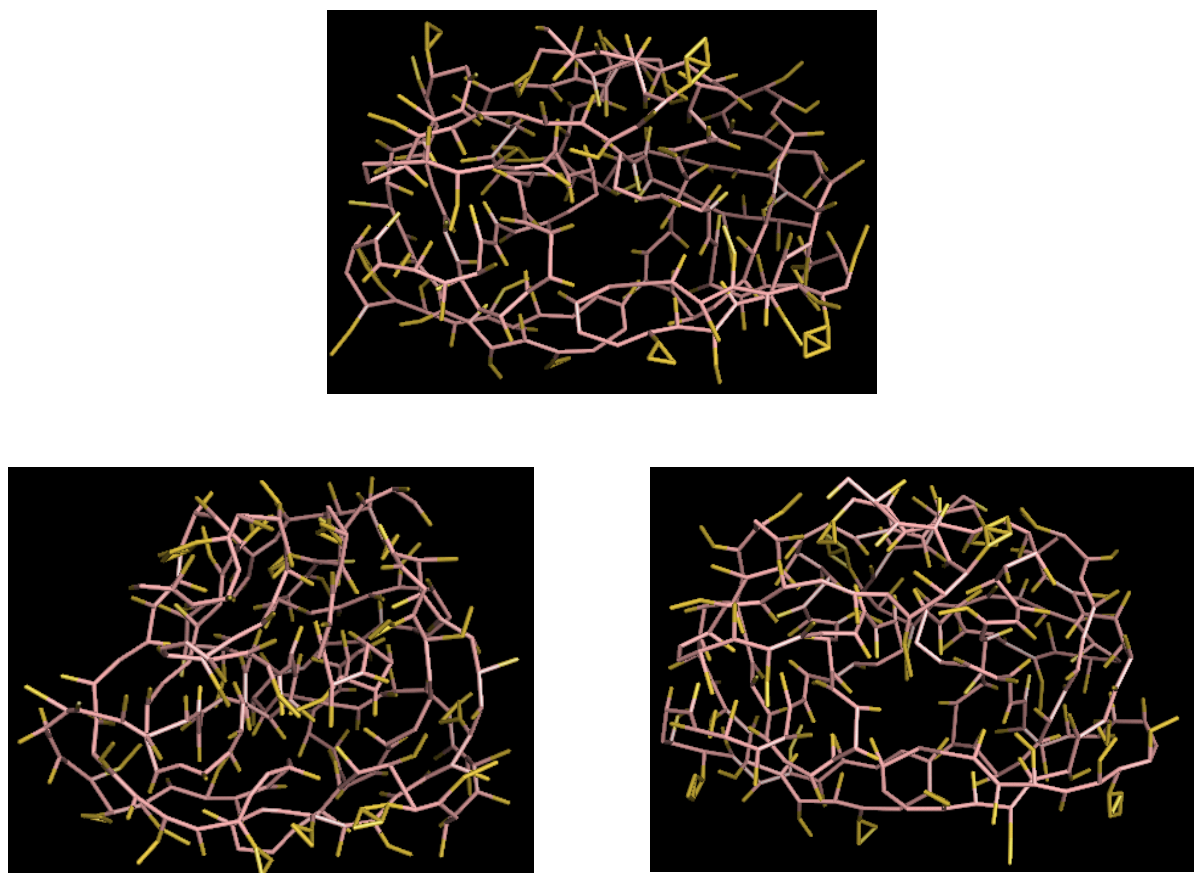


図 2.2: 水中の HIV-1 Protease に対する MARTINI 粗視化シミュレーションにおけるタンパク質の粗視化構造。ベージュおよび黄色の部分はそれぞれタンパク質の主鎖、側鎖に対応する。上段は初期構造を表し、下段は 200 ns のシミュレーション後における構造を表す。左は通常の MARTINI 力場のみを用いた場合、右はそれに加えて elastic network model により構造の束縛をかけたときの構造を表す。

このように現段階では、MARTINI力場によるシミュレーションにおいてはタンパク質構造の束縛を行う必要があり、そのためタンパク質の大きな構造変化を伴う現象を取り扱うことができないという制約が存在する。

第3章 MARTINI粗視化力場を用いたタンパク質-リガンド結合過程の比較シミュレーション

タンパク質-リガンド結合過程に関する一般的な知見を得るために、様々な種類のタンパク質-リガンドのペアについて粗視化シミュレーションを行い、結合過程の傾向の解析を行った。本研究では、結合ポケットおよびリガンドについて異なる性質を持つ様々なタンパク質-リガンドペアを選んで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について見出すというアプローチをとることとした。はじめにタンパク質-リガンドペアをリガンド結合ポケットおよびリガンドの性質に基づいて分類し、その後各分類について具体例を選択してリガンド結合シミュレーションを行い、結合過程を解析した。

本章ではまずはじめに3.1節においてタンパク質-リガンドペアの分類について触れた後、3.2節でリガンド結合シミュレーションの方法論について述べる。その後、3.3節において結合経路や速度定数などに関する解析結果、考察を述べる。

3.1 タンパク質-リガンド複合体の分類および計算対象

3.1.1 タンパク質-リガンドペアの分類手法

本項の内容は、共著論文 (Journal of Computational Chemistry, Vol. 35, No. 25, pp. 1835-1845) として学術雑誌に掲載された内容に関連しており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

3.1.2 分類結果

データセットの分類結果は表3.1のようになった。分類結果から、リガンド結合ポケットの疎水性、親水性のリガンドは親水性の基質結合ポケットに結合し、疎水性のリガンド

は疎水性の基質結合ポケットに結合する傾向を見出すことができた。タンパク質-リガンドペアの数が多く一般的なものと考えられるこれらの分類を表に示したように分類 I~VI とし、これらの分類に属するものに対して粗視化シミュレーションによる解析を行うこととした。

表 3.1: タンパク質-リガンド複合体の分類結果。表の数は、90 パーセント以上の相同性を持つものに関して BLASTClust[18] によるクラスタリングを行い、冗長性を排除した後の値を示している。

		リガンド		
		親水性・ 静電相互作用あり	親水性・ 静電相互作用なし	疎水性
親水性	狭い	179 ...I	46 ...III	11
	広い	260 ...II	132 ...IV	37
疎水性	狭い	26	12	142 ...V
	広い	39	21	105 ...VI

3.1.3 計算対象

3.1 における分類 I~VI から 2 組ずつタンパク質-リガンドペアを選び、それぞれについてタンパク質-リガンド結合シミュレーションを行った。表 3.2 に選択したタンパク質を示す。

表 3.2: 計算対象に選択したタンパク質

Class	Protein	PDB ID	
		ligand-free	complex (ligand)
I	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (DAHPS)	1OFB[19]	1HFB (phosphoenol pyruvate)[19]
	Aspartate aminotransferase from <i>Escherichia coli</i> (AST)	1AAW[20]	1ASM (maleic acid)[20]
II	6-phosphogluconolactonase from <i>Trypanosoma brucei</i> (6PGL)	2J0E [21]	3EB9 (citric acid)[22]
	Histidine acid phosphatase from <i>Francisella tularensis</i> subsp. holarctica LVS (HAP)	3IT2 [23]	3IT1 (tartaric acid)[23]
III	Purine nucleoside phosphorylase from <i>Thermus thermophilus</i> HB8 (PNP)	1ODL[24]	1ODJ (guanosine)[24]
	Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase from <i>Lactobacillus leichmannii</i> (NdRT)	1F8X [25]	1F8Y (5-methyl-2'- deoxypseudouridine)[25]
IV	Levansucrase from <i>Bacillus subtilis</i> (Lev)	1OYG [26]	1PT2 (sucrose)[26]
	Pterocarpus angolensis Lectin from <i>Pterocarpus angolensis</i> (PAL)	1S1A [27]	2ARE (mannose)[28]
V	Haloalkane dehalogenase LinB from <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (LinB)	1IZ7 [29]	1G5F (dichloroethane)[29]
	Penicillin G acylase from <i>Escherichia coli</i> (PGA)	1PNK [30]	1AI7 (phenol)[31]
VI	Ketosteroid isomerase from <i>Pseudomonas putida</i> (KSI)	3VSY[32]	2PZV (phenol) [33]
	Catalytic domain of human phosphodiesterase 4D (PDE4D)	3SL3 [34]	1Y2B (Ethyl 3,5- dimethyl-1H-pyrazole- 4-carboxylate)[35]

MARTINIにおいて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のため、以上の計算対象はいずれもリガンド結合状態と非結合状態において構造変化の小さいもの(主鎖構造のRMSD < 1 Å)を選び、リガンドの運動に着目して解析を進めることとした。

3.2 計算手法

3.2.1 シミュレーション条件

MARTINI 粗視化力場を用いたシミュレーションにより、リガンドが溶液中からタンパク質の結合部位に進入する様子を追跡することを試みた。一般に、粗視化シミュレーションは通常的全原子シミュレーションに比べ精度が劣るため、多数のシミュレーションを行ってそれらの結果を統計的に解析するというアプローチをとることとした。

シミュレーションの系の構成およびシミュレーション時間はそれぞれの計算対象について以下の表 3.3 のような条件で行った。これらの系はタンパク質分子の周りに少数のリガンド分子をランダムに配置し、水溶媒中に溶解することにより構築した(図 3.1)。シミュレーションは、それぞれ異なるリガンドの初期配置に対し数十回から百回のシミュレーションを行った。時間刻みは 20 fs を使い、温度および圧力は 1 bar、310 K で一定とした。シミュレーションにはプログラムパッケージ GROMACS 4.0.7[36] を用いた。

表 3.3: シミュレーション条件

計算対象	リガンド		濃度 (c_{lig}) / mM	シミュレーション時間
DAHPS	Phosphoenolpyruvate	×10	15	5 μ s ×50
AST	Maleic acid	×50	45	2 μ s ×50
6PGL	Citric acid	×10	17	5 μ s ×50
HAP	Tartaric acid	×30	33	2 μ s ×50
PNP	Guanosine	×10	9.4	5 μ s ×50
NdRT	2'-deoxycytidine	×15	23	5 μ s ×50
Lev	Sucrose	×5	14	4 μ s ×50
PAL	Glucose	×5	18	1 μ s ×100
LinB	Dichloroethane	×10	41	1 μ s ×100
PGA	Phenol	×30	39	5 μ s ×50
KSI	Phenol	×10	10	2 μ s ×50
PDE4D	Ethyl 3,5-dimethyl- 1H-pyrazole-4- carboxylate	×5	12	5 μ s ×50

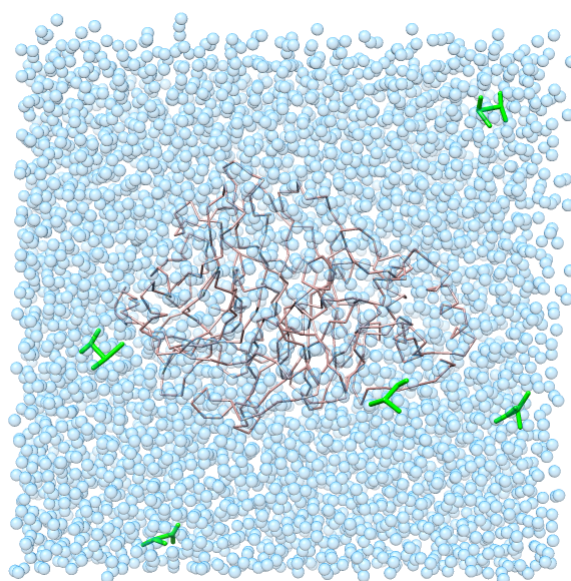


図 3.1: Levansucrase(Lev)-sucrose のシミュレーションにおける初期配置の例。茶色はタンパク質分子の主鎖構造、緑色はリガンド分子、水色は粗視化水分子 (通常の水分子 4 分子に相当) を表す。

3.2.2 粗視化モデルのマッピングおよびパラメータ

3.2.2.1 タンパク質

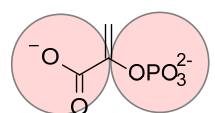
タンパク質構造の MARTINI モデルは既存のプロトコルにより X 線結晶構造から生成し、タンパク質形状は ELNEDYN[37] と呼ばれる elastic network モデルを用いて束縛した。束縛は 0.9 nm 以内にある主鎖原子同士に対して力の定数 $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ 、0.43 nm 以内の距離にある側鎖原子同士に対して力の定数 $50 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ の調和ポテンシャルを用いた。

3.2.2.2 リガンド

結合シミュレーションに用いたリガンドのマッピングおよび結合パラメータを図 3.2 および表 3.4 に示した。Glucose および sucrose の粗視化モデルは Lopez らによって設計されたものを用いた [38]。また、phenol については tyrosine の側鎖の類縁体と見なし、tyrosine の粗視化構造の側鎖部分を phenol として用いることとした。アミノ酸側鎖のパラメータの決定は、側鎖部分のみの構造に対して、全原子シミュレーションと粗視化シミュレーションにおける物理化学的性質の比較を行うことによりなされている [17] ため、phenol の性質を再現できるものと考えられる。Dichloroethane は 4 つの重原子からなるため、一つの

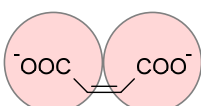
粗視化原子により表すこととした。粗視化原子の種類は、dichloroethane の水-オクタノール分配自由エネルギーの実験値 $\Delta G_{\text{part}} = -8.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ [39] に基づき、それに最も近い値を持つ C4 粗視化原子 ($\Delta G_{\text{part}} = 9 \text{ kJ mol}^{-1}$ [16]) を選んだ。それ以外の分子に関しては、付録 A のプロトコルの通りに決定した。

Phosphoenolpyruvate



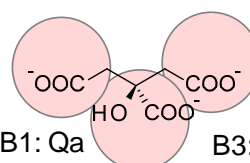
B1: Qa B2: Qa

Maleic acid



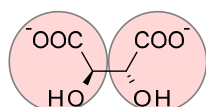
B1: Qa B2: Qa

Citric acid



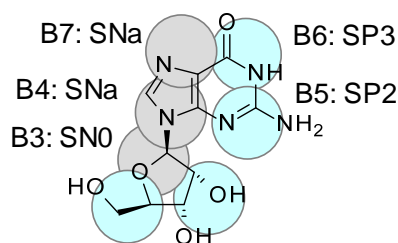
B1: Qa B3: Qa
B2: Qa

Tartalic acid



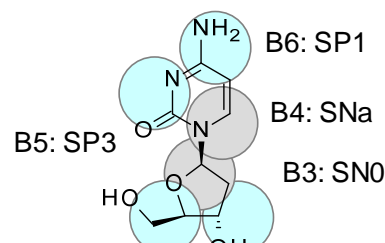
B1: Qa B2: Qa

Guanosine



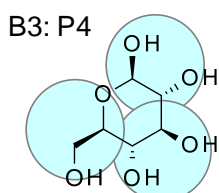
B1: SP2 B2: SP4

2-Deoxycytidine



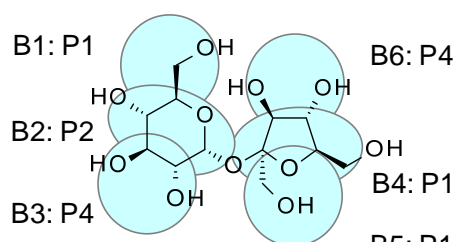
B1: SP2 B2: SP2

Glucose



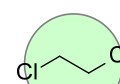
B1: P1 B2: P4

Sucrose



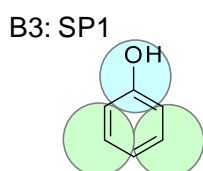
B5: P1

1,2-dichloroethane



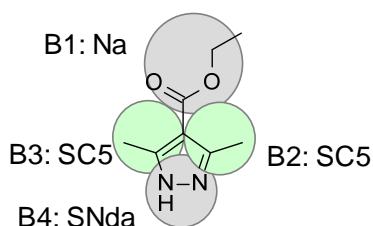
B1: C4

Phenol



B1: SC5 B2: SC5

Ethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate



B2: SC5

図 3.2: リガンドの MARTINI 粗視化マッピング。水素原子以外の原子に対して 3~5 個程度のグループに分け、粗視化粒子 (B1, B2, ...) を割り当てた。

表 3.4: リガンドの結合パラメータ。 K_{bond} が const. であるものについては、距離を一定と見なし、シミュレーション時に LINCS アルゴリズム [40] により結合長を固定した。

リガンド	bonds	R_0 / nm	$K_{\text{bond}} / \text{kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-2}$	angles	θ_0 / deg	$K_{\text{angle}} / \text{kJ mol}^{-1}$	dihedrals	φ_0 / deg	$K_{\text{dih}} / \text{kJ mol}^{-1}$
Phosphoenol-pyruvate	B1-B2	0.290	const.						
Maleic acid	B1-B2	0.323	const.						
Citric acid	B1-B2	0.300	18000	B1-B2-B3	95	170			
	B2-B3	0.300	18000						
Tartaric acid	B1-B2	0.313	const.						
Guanosine	B1-B2	0.353	30000	B1-B3-B4	150	200	B1-B2-B3-B4	155	60
	B1-B3	0.257	30000	B2-B3-B4	103	300	B2-B3-B4-B5	78	25
	B2-B3	0.241	const.	B3-B4-B5	128	300	B4-B5-B7-B6	180	200
	B3-B4	0.244	const.	B3-B4-B7	120	400			
	B4-B5	0.295	const.	B4-B5-B6	69	200			
	B4-B7	0.161	const.	B5-B4-B7	125	200			
	B5-B6	0.294	const.	B5-B6-B7	84	200			
	B5-B7	0.390	const.	B6-B7-B4	94	200			
	B6-B7	0.290	const.						
	2-deoxycytidine	B1-B2	0.317	const.	B1-B3-B4	123	400	B1-B3-B4-B5	-145
B1-B3		0.280	const.	B2-B3-B4	150	400	B2-B1-B3-B4	-157	30
B2-B3		0.244	const.	B3-B4-B5	104	500	B3-B4-B5-B6	-177	150
B3-B4		0.219	const.						
B4-B5		0.220	const.						
B4-B6		0.268	const.						
Glucose	B5-B6	0.285	const.						
	B1-B2	0.375	35000						
	B1-B3	0.331	35000						
Sucrose	B2-B3	0.322	50000						
	B1-B2	0.222	30000	B1-B2-B4	130	10	B1-B3-B4-B5	130	25
	B2-B3	0.247	30000	B3-B2-B4	110	150	B2-B1-B3-B4	80	2
	B2-B4	0.429	30000	B5-B4-B2	20	50	B3-B4-B5-B6	-70	20
	B4-B5	0.293	30000	B6-B4-B2	85	150			
Phenol	B4-B6	0.372	30000						
	B1-B2	0.270	const.						
	B1-B3	0.270	const.						
Ethyl	B2-B3	0.270	const.						
	B1-B2	0.303	const.	B1-B2-B4	136	500			
3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate	B1-B3	0.355	const.	B1-B3-B4	110	500			
	B2-B3	0.244	const.						
	B2-B4	0.206	const.						
	B3-B4	0.213	const.						

3.3 結果

本項の内容は、共著論文 (Journal of Computational Chemistry, Vol. 35, No. 25, pp. 1835-1845) として学術雑誌に掲載された内容に関連しており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

3.4 まとめ

それぞれ異なる性質を持つ多数のタンパク質-リガンドペアの系に対して MARTINI 粗視化力場を用いたリガンド結合シミュレーションを行った結果、いずれの系においてもリガンドが溶液中に溶解している状態から基質結合ポケットへ結合した状態を再現することに成功した。その後、3次元密度分布による解析および結合親和性に関する解析から、リガンドは基質結合ポケット内部で比較的安定に存在することを見出した。また、結合、解離の速度や結合親和性について実験値との比較を行った結果、エネルギー的、速度的な性質を概ね正しく表現できていることが示された。一部の系については従来の MARTINI の力場のままでは実験結果と一致しないものが存在したが、MARTINI では扱われない相互作用や、全原子シミュレーションにおける結果を考慮してパラメータを修正することにより、MARTINI の枠組みの中で実験結果の再現が可能であることを示した。これらのことから、MARTINI 粗視化力場によるリガンド結合シミュレーションによって、実験結果を再現できる妥当性の高い解析を行うことができることが示唆された。ただ一方では、解離に関するサンプリングが十分でなく、親和性が正しく評価できない系も存在した。このような例に対してはさらに長時間のシミュレーションが必要になることが考えられるが、タンパク質-リガンドの系によっては結合、解離時間スケールが非常に遅いことが考えられ、効率的なサンプリング手法の開発が必要になると考えられる。

さらに、結合経路に関して解析を行った結果、リガンドが特異的な経路を通過して基質結合ポケットに侵入することが見出された。さらに、タンパク質表面における形状や物理化学的性質との関係を見ることで、リガンドの性質によって異なる特徴を持つ結合経路を通過していることが明らかとなった。親水性のリガンドは親水性のタンパク質表面、疎水性のリガンドは疎水性の表面付近を通過する傾向にあることを見出し、リガンドの疎水性は結合位置周辺のみで無くタンパク質表面付近におけるリガンドの経路についても影響していることが分かった。また、タンパク質における溝との位置関係を解析することで、リガンドはタンパク質表面における溝に沿って結合する傾向にあることが示唆された。ただし、電荷を持ったリガンドについては電荷による相互作用が強く働くため、電荷を持つア

ミノ酸残基に強く影響を受けることが示唆された。これらの結果より、タンパク質の表面における溝や疎水性といった一般的な性質とリガンドの結合経路の関係性を結びつけることができる可能性が示唆された。

また、今回のシミュレーション結果から、基質結合ポケットにおける水とリガンドの交換がタンパク質によって異なるメカニズムで生じていることが確認された。これは基質結合ポケットの広さによる違いによる生じるものであると予想され、また速度定数の解析結果から水とリガンドの交換メカニズムの違いが結合、解離速度の時間スケールに影響していると考えられる。今後は、こうしたポケットの広さによる水の挙動の違いや、それが速度定数に与える影響などについても詳しく解析していきたいと考えている。

第4章 Dual-basin potential による MARTINI 粗視化シミュレーション の拡張

2.4 節において述べたように、MARTINI におけるシミュレーションにおいてはタンパク質の構造を束縛する必要があり、そのためにタンパク質の大きな構造変化を伴う系については適用不可能となる。一方、タンパク質とリガンドの結合の過程でタンパク質の大きな構造変化を伴うような例は数多く知られており、一般的にタンパク質-リガンド結合過程を調べる上ではタンパク質の構造変化を扱うことが必要となる。この問題を克服するため、dual-basin potential[41, 42] の手法を MARTINI 粗視化力場と組み合わせた拡張を行うことで、構造変化を表現することを試みた。この章では、dual-basin potential による MARTINI 粗視化シミュレーションの拡張方法について触れた後、この手法を用いたタンパク質の構造変化シミュレーションおよび構造変化を伴うタンパク質-リガンド結合の解析について述べる。

4.1 Dual-basin potential

本項の内容は、共著論文 (Journal of Computational Chemistry, Vol. 35, No. 25, pp. 1835-1845) として学術雑誌に掲載された内容に関連しており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

4.2 タンパク質の構造変化シミュレーション

本項の内容は、共著論文 (Journal of Computational Chemistry, Vol. 35, No. 25, pp. 1835-1845) として学術雑誌に掲載された内容に関連しており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

4.3 タンパク質-リガンド結合シミュレーションへの適用

本項の内容は、共著論文 (Journal of Computational Chemistry, Vol. 35, No. 25, pp. 1835-1845) として学術雑誌に掲載された内容に関連しており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

4.4 まとめ

MARTINI 粗視化力場においてタンパク質の構造変化を扱うため、dual-basin potential と組み合わせた手法の開発を行った。MARTINI における束縛ポテンシャルを dual-basin potential に適用することで、タンパク質構造が開閉する大きな構造変化を扱うことに成功した。さらに、構造変化を伴うタンパク質とリガンドの系に適用し、リガンド結合シミュレーションを行ったところ、リガンドの結合に伴って構造が変化し、結晶構造と同様の構造を再現することに成功した。また、状態遷移に関する解析から、リガンドが結合することによりタンパク質が閉じた構造で安定となることが見出された。

第5章 総括

本研究では、タンパク質とリガンドの結合過程に対する一般的な知見を得ることを目的として、様々な性質を持つ多数のタンパク質-リガンドの系を対象に MARTINI 粗視化力場を用いた分子動力学シミュレーションを行い、リガンド結合過程の比較解析を行った。さらに、MARTINI 粗視化シミュレーションの適用の幅を広げることを目的とし、構造変化を扱うことができるようなシミュレーション手法の拡張にも取り組んだ。

リガンド結合過程の比較解析においては、タンパク質-リガンドペアをリガンドおよび基質結合ポケットの性質に基づいて分類し、異なる性質を持つ多数の例に対して解析を行った。リガンド結合シミュレーションによる解析の結果、リガンドが結晶構造と同様の基質結合ポケットに比較的安定に結合することが明らかとなった。また、結合速度や結合親和性のパラメータに関する解析より、MARTINI 粗視化力場の枠組みの中で実際の性質を再現することが可能であることを示した。したがって、MARTINI 粗視化力場を用いた解析により妥当性の高い結果が得られるものと考えられる。しかし一方で、十分な結合、解離が確認されず、結合親和性の評価ができなかった例なども存在した。このような例は結合、解離の時間スケールが長くなると考えられるため、効率的なサンプリング手法の開発が必要となる。現在、解離過程のシミュレーションにおいて、結合位置にエネルギー的なペナルティを与えることによるサンプリングの効率化を検討している。

さらに、結合経路に関する解析から、タンパク質-リガンド結合過程において特異的な経路を通過して結合することが見出され、タンパク質表面における溝などの形状や、疎水性などの物理化学的性質がリガンドの結合過程に関係していることが示唆された。こうした解析をさらに進めて一般化し、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、リガンドの結合過程の予測などにもつなげることができると期待される。今回の解析からは、タンパク質の基質結合ポケットの広さによるリガンドの結合過程における大きな違いは見出されなかったが、リガンドの結合過程においては水とリガンドの交換を伴うことから、ポケットの広さが水とリガンドの交換メカニズムや結合、解離の時間スケールなどに影響する可能性が考えられ、今後の研究課題となる。

また、MARTINI 粗視化力場と dual-basin potential を組み合わせた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適用することで、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。この結果から、構造変化を伴うタンパク質-リガンドの系についてもリガンド結合過程のシミュレーションが可能になり、さらに一般的な解析を行うことができると期待される。

付録A

化合物のMARTINI粗視化力場パラメータの決定

A.1 力場決定の手順

MARTINI 力場においてはタンパク質のほか、糖や脂質などのいくつかの一般的な生体分子に関してパラメータが整備されている。しかしながら、パラメータが作成されていない分子に関してはパラメータの作成を手動で行う必要がある。

新たにパラメータを作成する場合、実験データや全原子シミュレーションの結果を再現するように決定する。本研究では、MARTINI の論文 [16] に記されている手順に従い、最初に全原子シミュレーションとの比較により粗視化粒子の割り当て (マッピング) および結合長や結合角などの構造に関するポテンシャルを決定し、その後水-オクタノール分配係数 (LogP) を実験値や全原子シミュレーションなどの結果を再現するように粗視化粒子の種類を決定した。ただし、電荷を持つリガンドについては、論文で示されている標準的な対応付けに基づいて決定することとした。以下に本研究でのパラメータ決定の手順を示した。

結合パラメータの決定：

1. 全原子力場のパラメータが存在していない場合、量子化学計算により構造最適化、電荷の計算を行い、全原子のパラメータを決定する
2. 水中での化合物単体の全原子シミュレーションを行う
3. 粗視化粒子のマッピングを行う結合パラメータを設定する
4. 水中での化合物単体の粗視化シミュレーションを行う
5. 結合距離の分布などに関して全原子の結果との比較を行い、一致していれば決定し、一致していなければ2 から再度行う

粗視化粒子種の決定 (電荷を持たないリガンド)：

1. 実験値ががわかっていない場合、全原子シミュレーションまたは予測プログラムによる LogP の予測を行う
2. 粗視化粒子種を設定する
3. 粗視化シミュレーションにより LogP を計算する
4. LogP について実験値または 1 による推定値と粗視化シミュレーションの結果との比較を行い、一致していれば決定し、一致していなければ 2 から再度行う

A.2 結合パラメータの比較

結合パラメータは、水中の化合物のシミュレーションを全原子力場および粗視化力場それぞれで行い、シミュレーション中における分子の形状(結合距離、結合角)を比較することで決定した。本研究では先行研究に倣い、MARTINI 粗視化パラメータを決定する際に比較に用いる力場に OPLS 力場 [43] を用いた。化合物の全原子力場パラメータが存在しない場合、はじめに全原子パラメータの作成を行った。まず、目的化合物の構造を PDBechem より取得し、Openbabel[44] を用いて PH = 7 の条件で水素を負荷した。この構造を初期構造として HF/6-31G* レベルでの量子計算による構造最適化をプログラムパッケージ gaussian09[45] を用いて行った。その後、antechamber[46] および ACPYPE[47] を用いて RESP 電荷の計算、OPLS 力場パラメータの割り当てを行った。全原子力場および粗視化力場それぞれにおけるシミュレーション条件を表 A.1 に示した。

表 A.1: 水中における化合物のシミュレーションの条件。AA は全原子シミュレーション、CG は粗視化シミュレーションを表す

Simulation	system		
	compound	SPC water	simulation time / ns
AA	1	1500	200
CG	1	490	200

全原子シミュレーションにおいては水分子に Single point charge (SPC) モデル [48] を用いた。それぞれのシミュレーションは、310 K、1 bar の定温定圧条件下で行った。

これらのシミュレーション結果から、全原子モデルと粗視化モデルの結合距離、結合角の分布の比較を行った。まず、全原子シミュレーション結果から、マッピングに従って化合物の各粗視化粒子に対応する原子のグループの重心位置を計算し、仮想的な粗視化モデ

ルのトラジェクトリを作成した。次に、このように作成した全原子のトラジェクトリと、粗視化シミュレーションにより得られたトラジェクトリについて、粗視化粒子における結合長や結合角等の分布を計算し、比較を行った。

本研究においてパラメータを作成したリガンドについて、最終的に決定した粗視化分子と全原子分子の比較を図 A.1~A.5 に示した。

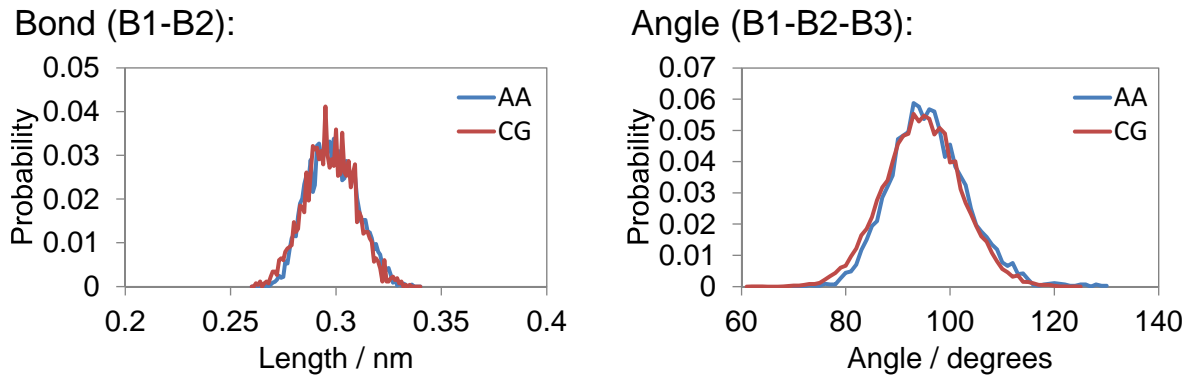


図 A.1: Citrate anion 分子のダイナミクスの比較 (結合長、結合角)。

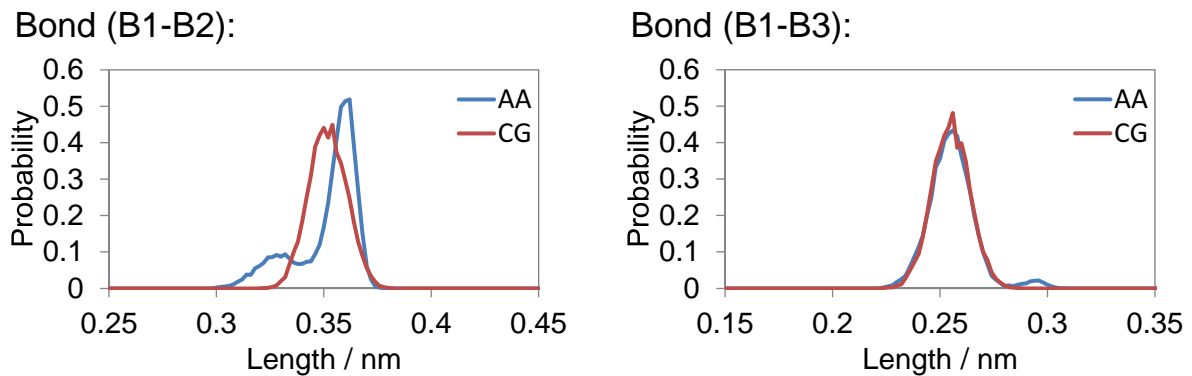


図 A.2: Guanosine 分子のダイナミクスの比較 (結合長)。

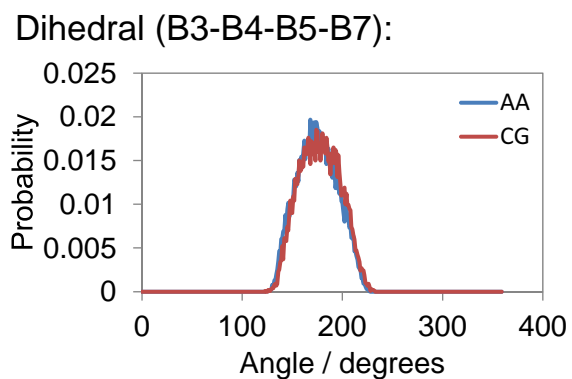
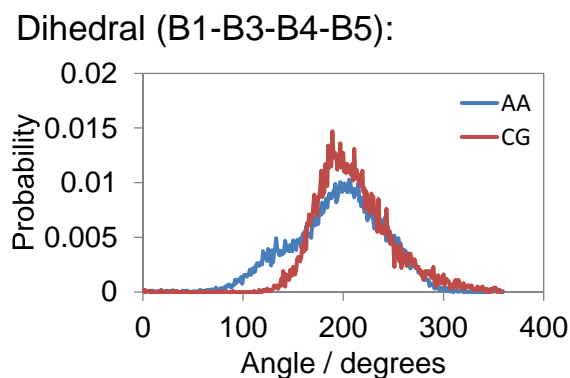
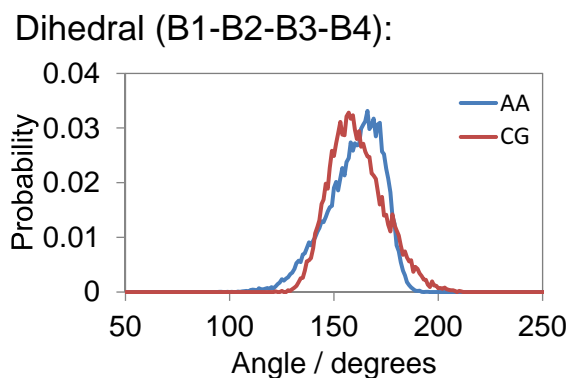
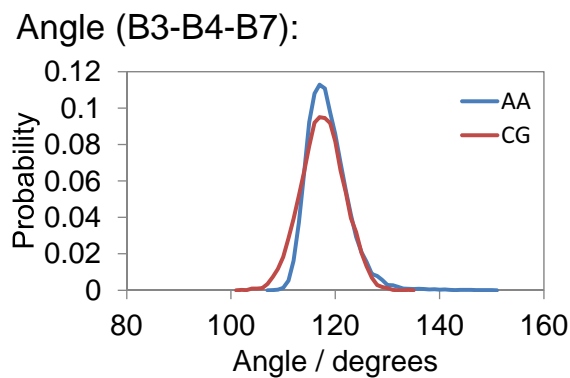
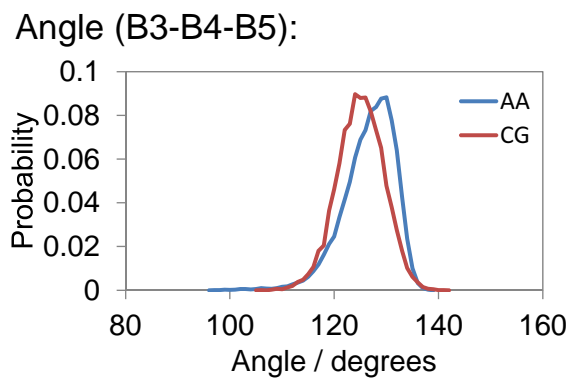
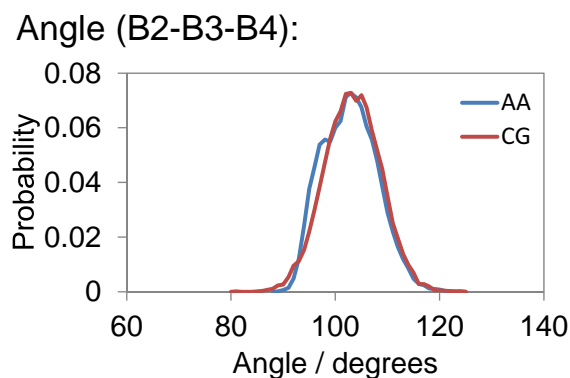
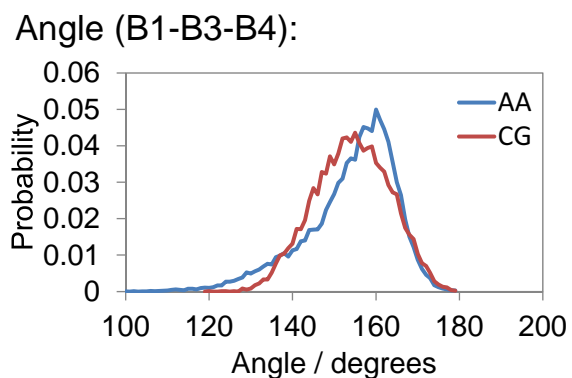


図 A.3: Guanosine 分子のダイナミクスの比較 (結合角、二面角)。

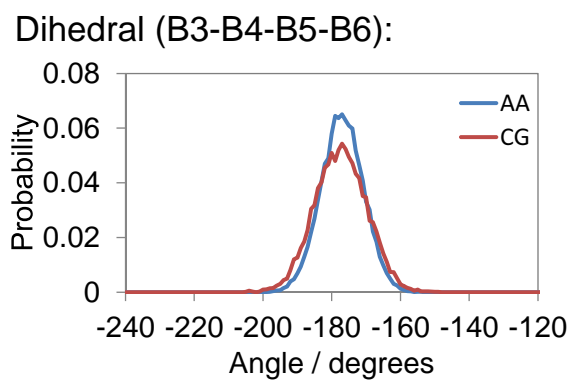
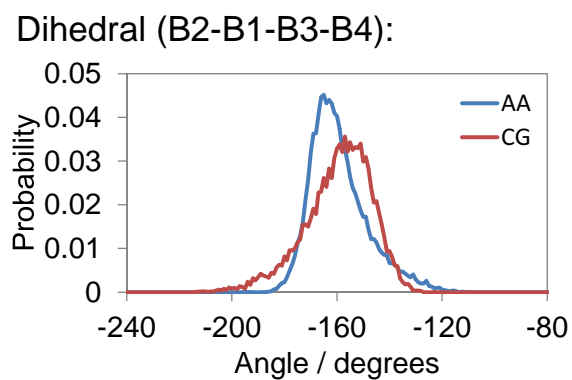
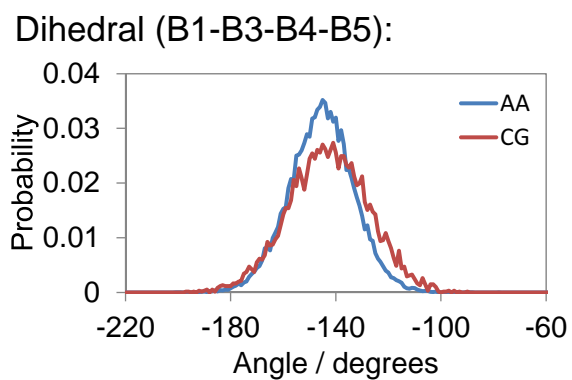
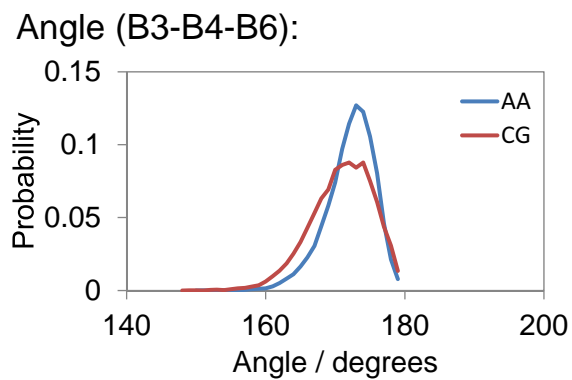
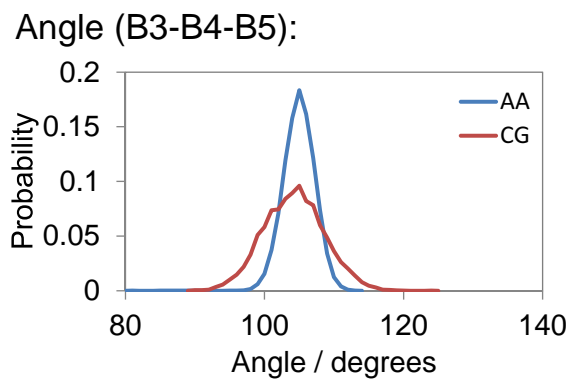
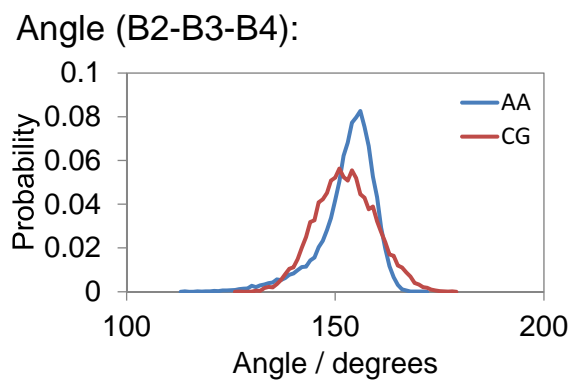
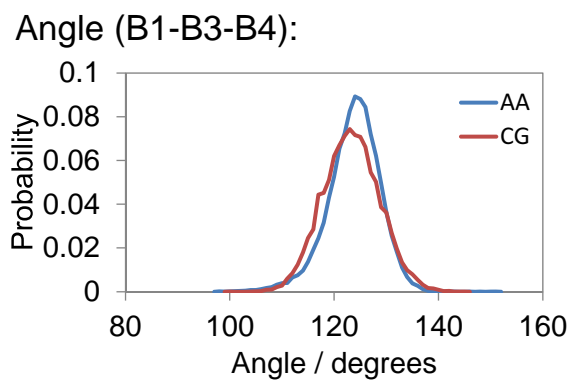


図 A.4: 2'-deoxycytidine 分子のダイナミクスの比較 (結合角、二面角)。

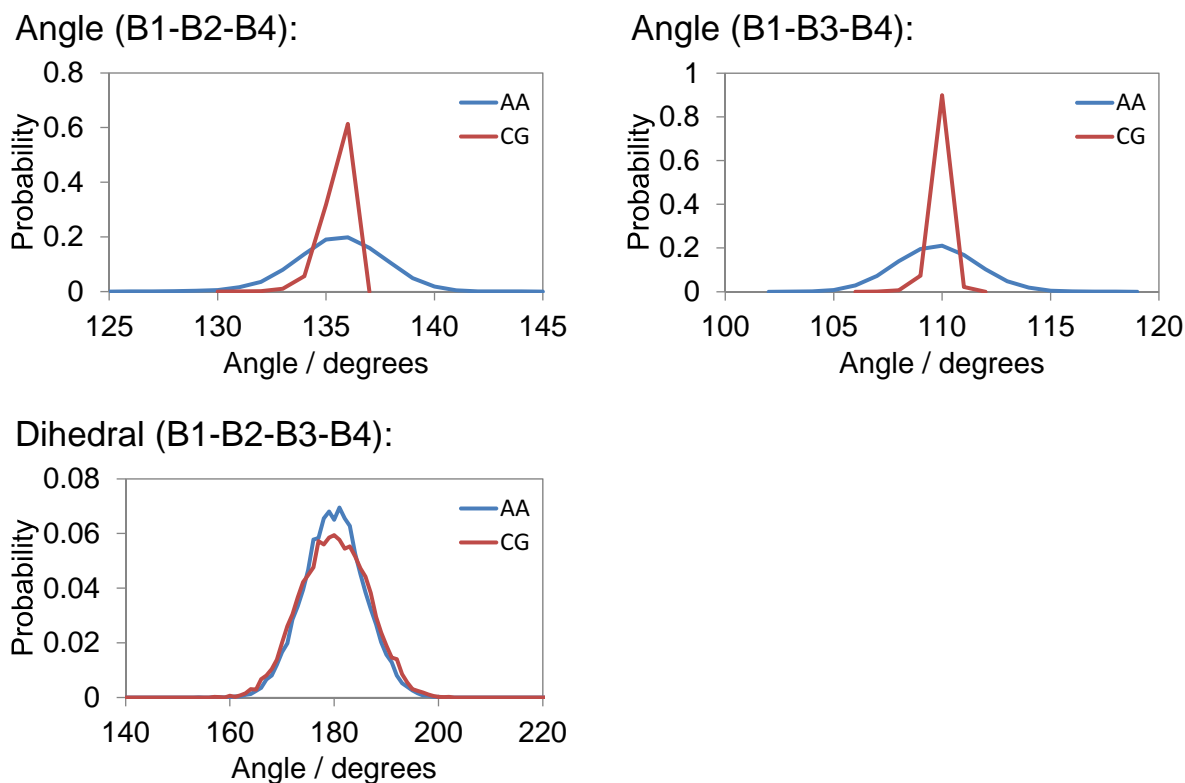


図 A.5: Ethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 分子のダイナミクスの比較 (結合角、二面角)。

A.3 水-オクタノール分配係数の比較

水-オクタノール分配係数 LogP は、水およびオクタノールに対する溶媒和自由エネルギーを ΔG_w 、 ΔG_{oct} として、

$$\text{logP} = \log \left(\exp \left(\frac{\Delta G_w - \Delta G_{oct}}{RT} \right) \right) = \frac{\Delta G_w - \Delta G_{oct}}{2.303RT} \quad (\text{A.3.1})$$

と求められる。本研究では、シミュレーションにより水およびオクタノールに対する化合物の溶媒和自由エネルギーを求め、そこから式に従って LogP を計算することとした。溶媒和自由エネルギーの算出は、化合物と周りの溶媒の相互作用が存在しない状態 ($\lambda = 0$: 真空中と同様) から相互作用が完全に存在する状態 ($\lambda = 1$) の間の遷移を考え、この間のエネルギー差を求めることにより行う。エネルギー差を計算するにあたって、 $\lambda = 0 \sim 1$ の間を 0.05 刻みで変化させ、それぞれの中状態についてシミュレーションを行った。その後、各段階のエネルギー差を Bennett acceptance ratio (BAR) 法 [49] により計算し、その和を求めることによって最終的な値を得た。

粗視化力場について LogP を計算し、実験データを再現するように原子種の割り当てを行った。実験データが存在しない場合には、全原子についても同様の計算を行うことによ

り LogP を算出し、粗視化シミュレーションと全原子シミュレーションの結果を比較した。

全原子および粗視化モデルによるシミュレーションの系およびシミュレーション時間はそれぞれ表 A.2 のように設定した。オクタノールの系については水分子を飽和濃度分だけ含めた。各シミュレーションにおける温度、圧力はいずれも 310 K、1 bar とした。本研究においてパラメータを決定した電荷を持たないリガンドについて、最終的に決定した粗視化分子と全原子分子の LogP の比較を表 A.3 に示した。

表 A.2: シミュレーション条件

		system			
Simulation	compound	water	octanol	simulation time	
AA	octanol	1	66	199	6 ns×20
	water	1	1400		6 ns×20
CG	octanol	1	43	519	10 ns×20
	water	1	1000		10 ns×20

表 A.3: 水-オクタノール分配係数の比較。CG および AA はそれぞれ粗視化シミュレーション、全原子シミュレーションから推定した値を表す。Exp. は実験値を表し、AlogPS はソフトウェア AlogPS 3.0 による推定値を表す。

リガンド	LogP			
	CG	Exp.	AA	AlogPS
Guanosine	-2.18	-2.461[50]		
2'-deoxycytidine	-1.59		-1.06	-1.9
Ethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate	1.58		2.89	1.1

付録B 結合、解離速度定数の推定

B.1 ベイズ推定による速度定数の推定

速度定数の解析においては、ベイズ推定により速度定数の確率分布を求め、その平均値を推定値として用いた。

リガンド結合がポアソン分布に従って生じると仮定する。結合の速度定数を k_{on} 、系全体のリガンド濃度を c_{lig} とすると、時間 T の間にリガンドが n_{bind} 回だけ結合する確率は次のように表せる。

$$p(n_{\text{bind}}|k_{\text{on}}, T) = \frac{(k_{\text{on}}c_{\text{lig}}T)^{n_{\text{bind}}}}{n_{\text{bind}}!} e^{-k_{\text{on}}c_{\text{lig}}T} \quad (\text{B.1.1})$$

いま、 k_{on} の事前確率分布を $p(k_{\text{on}})$ とする。これに対しシミュレーションを行い、シミュレーション i において観測された結合回数を n_i 、結合にかかった時間の総和を T_i とし、観測を行った後の事後確率分布 $p(k_{\text{on}}|\{n_i\}, \{T_i\})$ を求める。ベイズの定理 $P(X|Y) \propto P(Y|X)P(X)$ において、尤度関数 $P(Y|X)$ を $p(\{n_i\}|k_{\text{on}}, \{T_i\})$ 、とすることで、事後分布 $p(k_{\text{on}}|\{n_i\}, \{T_i\})$ は次のように表すことができる。

$$p(k_{\text{on}}|\{n_i\}, \{T_i\}) \propto p(\{n_i\}|k_{\text{on}}, \{T_i\})p(k_{\text{on}}) \quad (\text{B.1.2})$$

シミュレーションを全 N 回実行した後の事後分布 $p(k_{\text{on}}|\{n_1, n_2, \dots, n_N\}, \{T_1, T_2, \dots, T_N\})$ を考えると、同様の計算を繰り返すことで

$$p(k_{\text{on}}|\{n_1, n_2, \dots, n_N\}, \{T_1, T_2, \dots, T_N\}) \propto \prod_{i=1}^N p(\{n_i\}|k_{\text{on}}, \{T_i\})p(k_{\text{on}}) \quad (\text{B.1.3})$$

のように求められる。速度定数に関する事前情報は一切無く、シミュレーションを行う前の事前分布 $p(k_{\text{on}})$ を一様な分布とすれば、シミュレーション後の事後確率分布は最終的に次のように表現できる。

$$p(k_{\text{on}}|\{n_1, n_2, \dots, n_N\}, \{T_1, T_2, \dots, T_N\}) = \frac{\prod_{i=1}^N p(\{n_i\}|k_{\text{on}}, \{T_i\})}{\int_0^{\infty} \prod_{i=1}^N p(\{n_i\}|k_{\text{on}}, \{T_i\}) dk_{\text{on}}} \quad (\text{B.1.4})$$

したがって、この事後分布における k_{on} の平均値 $\langle k_{\text{on}} \rangle$ は

$$\begin{aligned}
\langle k_{\text{on}} \rangle &= \int_0^\infty k_{\text{on}} p(k_{\text{on}} | \{n_1, n_2, \dots, n_N\}, \{T_1, T_2, \dots, T_N\}) dk_{\text{on}} \\
&= \frac{\int_0^\infty k_{\text{on}} \prod_{i=1}^N p(\{n_i\} | k_{\text{on}}, \{T_i\}) dk_{\text{on}}}{\int_0^\infty \prod_{i=1}^N p(\{n_i\} | k_{\text{on}}, \{T_i\}) dk_{\text{on}}} \quad (\because \text{式 B.1.4}) \\
&= \frac{\int_0^\infty k_{\text{on}} \prod_{i=1}^N \frac{(k_{\text{on}} c_{\text{lig}} T_i)^{n_i}}{n_i!} e^{-k_{\text{on}} c_{\text{lig}} T_i} dk_{\text{on}}}{\int_0^\infty \prod_{i=1}^N \frac{(k_{\text{on}} c_{\text{lig}} T_i)^{n_i}}{n_i!} e^{-k_{\text{on}} c_{\text{lig}} T_i} dk_{\text{on}}} \quad (\because \text{式 B.1.1}) \\
&= \frac{\int_0^\infty k_{\text{on}}^{(\sum n_i + 1)} e^{-k_{\text{on}} c_{\text{lig}} \sum T_i} dk_{\text{on}}}{\int_0^\infty k_{\text{on}}^{(\sum n_i)} e^{-k_{\text{on}} c_{\text{lig}} \sum T_i} dk_{\text{on}}} \\
&= \frac{\sum n_i + 1}{c_{\text{lig}} \sum T_i} \tag{B.1.5}
\end{aligned}$$

のように求められ、これを推定値とした。また、分散 σ_{on}^2 は

$$\begin{aligned}
\sigma_{\text{on}}^2 &= \langle k_{\text{on}}^2 \rangle - \langle k_{\text{on}} \rangle^2 \\
&= \int_0^\infty k_{\text{on}}^2 p(k_{\text{on}} | \{n_1, n_2, \dots, n_N\}, \{T_1, T_2, \dots, T_N\}) dk_{\text{on}} - \langle k_{\text{on}} \rangle^2 \\
&= \frac{\int_0^\infty k_{\text{on}}^{(\sum n_i + 2)} e^{-k_{\text{on}} c_{\text{lig}} \sum T_i} dk_{\text{on}}}{\int_0^\infty k_{\text{on}}^{(\sum n_i)} e^{-k_{\text{on}} c_{\text{lig}} \sum T_i} dk_{\text{on}}} - \left(\frac{\sum n_i + 1}{c_{\text{lig}} \sum T_i} \right)^2 \quad (\because \text{式 B.1.1}) \\
&= \frac{\sum n_i + 1}{(c_{\text{lig}} \sum T_i)^2} \tag{B.1.6}
\end{aligned}$$

と求められる。

リガンドの解離についても同様にポアソン分布に従うとすると、解離の速度定数を k_{off} としたとき、時間 T の間にリガンドが n_{unbind} 回だけ解離する確率は

$$p(n_{\text{unbind}} | k_{\text{off}}, T) = \frac{(k_{\text{off}} T)^{n_{\text{unbind}}}}{n_{\text{unbind}}!} e^{-k_{\text{off}} T} \tag{B.1.7}$$

と求められる。結合速度との違いは濃度への依存の有無のみであり、結合定数のときと同様の計算を行うことで平均値 $\langle k_{\text{off}} \rangle$ および分散 σ_{off}^2 は

$$\langle k_{\text{off}} \rangle = \frac{\sum n_i + 1}{\sum T_i} \tag{B.1.8}$$

$$\sigma_{\text{off}}^2 = \frac{\sum n_i + 1}{(\sum T_i)^2} \quad (\text{B.1.9})$$

と推定できる。

B.2 結合、解離の定義による速度定数の依存性

本項の内容は、共著論文 (Journal of Computational Chemistry, Vol. 35, No. 25, pp. 1835-1845) として学術雑誌に掲載された内容に関連しており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

参考文献

- [1] Whittle, P. J.; Blundell, T. L. Protein structure-based drug design. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 349–75.
- [2] Shailza, S.; Balwant, K. M.; Durlabh, K. S. Molecular drug targets and structure based drug design: A holistic approach. *Bioinformation* **2006**, *1*, 314–320.
- [3] Swinney, D. C. Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 801–8.
- [4] Swinney, D. C. Applications of binding kinetics to drug discovery therapeutic responses. *Pharmaceut. Med.* **2008**, *22*, 23–34.
- [5] Zhang, R.; Monsma, F. Binding kinetics and mechanism of action: toward the discovery and development of better and best in class drugs. *Expert Opin. Drug. Discov.* **2010**, 1–7.
- [6] Wu, C.; Biancalana, M.; Koide, S.; Shea, J.-E. Binding modes of thioflavin-T to the single-layer beta-sheet of the peptide self-assembly mimics. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 627–33.
- [7] Brannigan, G.; LeBard, D. N.; Hénin, J.; Eckenhoff, R. G.; Klein, M. L. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14122–14127.
- [8] Buch, I.; Giorgino, T.; De Fabritiis, G. Complete reconstruction of an enzyme-inhibitor binding process by molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 10184–10189.
- [9] Vanni, S.; Neri, M.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U. Predicting novel binding modes of agonists to β adrenergic receptors using all-atom molecular dynamics simulations. *PLoS computational biology* **2011**, *7*, e1001053.
- [10] Venturoli, M.; Maddalenasperotto, M.; Kranenburg, M.; Smit, B. Mesoscopic models of biological membranes. *Phys. Rep.* **2006**, *437*, 1–54.

- [11] Bennun, S. V.; Hoopes, M. I.; Xing, C.; Faller, R. Coarse-grained modeling of lipids. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *159*, 59–66.
- [12] Tozzini, V. Coarse-grained models for proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 144–50.
- [13] Kamerlin, S. C. L.; Vicatos, S.; Dryga, A.; Warshel, A. Coarse-grained (multiscale) simulations in studies of biophysical and chemical systems. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 41–64.
- [14] Li, D.; Liu, M. S.; Ji, B.; Hwang, K.; Huang, Y. Coarse-grained molecular dynamics of ligands binding into protein: The case of HIV-1 protease inhibitors. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 215102.
- [15] Marrink, S. J.; De Vries, A. H.; Mark, A. E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 750–760.
- [16] Marrink, S. J.; Risselada, H. J.; Yefimov, S.; Tieleman, D. P.; de Vries, A. H. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7812–24.
- [17] Monticelli, L.; Kandasamy, S. K.; Periole, X.; Larson, R. G.; Tieleman, D. P.; Marrink, S.-J. The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 819–834.
- [18] <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/blastclust>.
- [19] König, V.; Pfeil, A.; Braus, G. H.; Schneider, T. R. Substrate and metal complexes of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* provide new insights into the catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 675–690.
- [20] Jäger, J.; Moser, M.; Sauder, U.; Jansonius, J. N. Crystal structures of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase in two conformations. Comparison of an unliganded open and two liganded closed forms. *J. Mol. Biol.* **1994**, *239*, 285–305.
- [21] Delarue, M.; Duclert-Savatier, N.; Miclet, E.; Haouz, A.; Giganti, D.; Ouazzani, J.; Lopez, P.; Nilges, M.; Stoven, V. Three Dimensional Structure and Implications for the Catalytic Mechanism of 6-Phosphogluconolactonase from *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 868–881.

- [22] Duclert-Savatier, N.; Poggi, L.; Miclet, E.; Lopes, P.; Ouazzani, J.; Chevalier, N.; Nilges, M.; Delarue, M.; Stoven, V. Insights Into the Enzymatic Mechanism of 6-Phosphogluconolactonase from *Trypanosoma brucei* Using Structural Data and Molecular Dynamics Simulation. *J. Mol. Biol.* **2009**, *388*, 1009–1021.
- [23] Singh, H.; Felts, R. L.; Schuermann, J. P.; Reilly, T. J.; Tanner, J. J. Crystal Structures of the Histidine Acid Phosphatase from *Francisella tularensis* Provide Insight into Substrate Recognition. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 893–904.
- [24] Tahirov, T. H.; Inagaki, E.; Ohshima, N.; Kitao, T.; Kuroishi, C.; Ukita, Y.; Takio, K.; Kobayashi, M.; Kuramitsu, S.; Yokoyama, S.; Miyano, M. Crystal structure of purine nucleoside phosphorylase from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 1149–1160.
- [25] Armstrong, S. R.; Cook, W. J.; Short, S. A.; Ealick, S. E. Crystal structures of nucleoside 2-deoxyribosyltransferase in native and ligand-bound forms reveal architecture of the active site. *Structure* **1996**, *4*, 97–107.
- [26] Meng, G.; Fütterer, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 935–41.
- [27] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1s1a>.
- [28] Buts, L.; Garcia-Pino, A.; Imberty, A.; Amiot, N.; Boons, G. J.; Beeckmans, S.; Versées, W.; Wyns, L.; Loris, R. Structural basis for the recognition of complex-type biantennary oligosaccharides by *Pterocarpus angolensis* lectin. *FEBS Journal* **2006**, *273*, 2407–2420.
- [29] Streltsov, V. a.; Prokop, Z.; Damborský, J.; Nagata, Y.; Oakley, A.; Wilce, M. C. J. Haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: X-ray crystallographic studies of dehalogenation of brominated substrates. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10104–12.
- [30] Duggleby, H. J.; Tolley, S. P.; Hill, C. P.; Dodson, E. J.; Dodson, G.; Moody, P. C. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* **1995**, *373*, 264–268.
- [31] Done, S. H.; Brannigan, J. A.; Moody, P. C.; Hubbard, R. E. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase. *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 463–475.

- [32] Kobe, A.; Caaveiro, J. M. M.; Tashiro, S.; Kajihara, D.; Kikkawa, M.; Mitani, T.; Tsumoto, K. Incorporation of rapid thermodynamic data in fragment-based drug discovery. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2155–2159.
- [33] Kraut, D. A.; Sigala, P. A.; Pybus, B.; Liu, C. W.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Herschlag, D. Testing electrostatic complementarity in enzyme catalysis: Hydrogen bonding in the ketosteroid isomerase oxyanion hole. *PLoS Biology* **2006**, *4*, 501–519.
- [34] Nankervis, J. L.; Feil, S. C.; Hancock, N. C.; Zheng, Z.; Ng, H. L.; Morton, C. J.; Holien, J. K.; Ho, P. W. M.; Frazzetto, M. M.; Jennings, I. G.; Manallack, D. T.; John Martin, T.; Thompson, P. E.; Parker, M. W. Thiophene inhibitors of PDE4: Crystal structures show a second binding mode at the catalytic domain of PDE4D2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7089–7093.
- [35] Card, G. L.; Blasdel, L.; England, B. P.; Zhang, C.; Suzuki, Y.; Gillette, S.; Fong, D.; Ibrahim, P. N.; Artis, D. R.; Bollag, G.; Milburn, M. V.; Kim, S.-H.; Schlessinger, J.; Zhang, K. Y. J. A family of phosphodiesterase inhibitors discovered by cocrystallography and scaffold-based drug design. *Nature biotechnology* **2005**, *23*, 201–207.
- [36] Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free 2005.
- [37] Periolo, X.; Cavalli, M.; Marrink, S.-J.; Ceruso, M. A. Combining an elastic network with a coarse-grained molecular force field: structure, dynamics, and intermolecular recognition. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 2531–2543.
- [38] López, C. A.; Rzepiela, A. J.; De Vries, A. H.; Dijkhuizen, L.; Hünenberger, P. H.; Marrink, S. J. Martini coarse-grained force field: extension to carbohydrates. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 3195–3210.
- [39] Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D. H. *Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants.*; American Chemical Society, 1995.
- [40] Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
- [41] Okazaki, K.-i.; Koga, N.; Takada, S.; Onuchic, J. N.; Wolynes, P. G. Multiple-basin energy landscapes for large-amplitude conformational motions of proteins: Structure-based molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 11844–11849.

- [42] Maragakis, P.; Karplus, M. Large amplitude conformational change in proteins explored with a plastic network model: Adenylate kinase. *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 807–822.
- [43] Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.
- [44] O’Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An Open chemical toolbox. *J. Cheminformatics* **2011**, *3*, .
- [45] et al Frisch, M. Gaussian 09, Revision A.02 2009.
- [46] Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 247–260.
- [47] Sousa, A. W.; Vranken, W. F. Open Access ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Research Notes* **2012**, 1–8.
- [48] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction Models For Water In Relation To Protein Hydration. *Intermolecular Forces* **1981**, *31*, 331–338.
- [49] Bennett, C. H. Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data. *J. Comput. Phys.* **1976**, *22*, 245–268.
- [50] <http://kaken.nii.ac.jp/pdf/2011/seika/C-19/32659/21590047seika.pdf>.