

研究終了報告書

「量子構造生物学におけるプロトン:相乗的効果と構造」

研究期間: 2018年10月~2022年3月

研究者: 渡邊 千鶴

1. 研究のねらい

タンパク質の活性中心で繰り広げられるリガンド結合および酵素触媒反応を正確に理解する上で、水素原子(プロトン)の位置情報を含めた精密な分子挙動を明らかにすることは重要な課題の一つである。研究提案者は、本課題を解決するためには、溶媒分子や周辺環境に依存して変化する荷電アミノ酸残基のプロトン化状態を決定する手法の開発が第一であると考えている。しかしながら、Protein Data Bank(PDB)に登録されている多くのX線結晶構造は水素原子の情報が欠落しているのが現状である。その理由としては、実験的に水素原子の位置を決定するには、1Åを超える超高分解能を持つ解析手法が必要であり、通常の分解能でのX線結晶解析では水素原子の電子密度が不明瞭なため、水素原子の位置を特定することが出来ないことに起因している。本提案では、近年目覚ましく演算効率が向上した計算機技術、それに加え大規模並列計算により可能となった生体高分子の量子化学計算技術に、中性子線構造解析データや高分解能X線構造解析データといった高分解能構造解析技術で得られた知見を融合させ「量子構造生物学」として実験構造データの第一原理的拡張を試みる。これにより、従来法では特定することが困難な水素原子の位置を決定出来る新規な高精度構造決定手法を開発する。

タンパク質の活性中心のプロトン化状態の特定が困難な例として、アスパラギン酸プロテアーゼが挙げられる。広く知られている創薬ターゲットであるHIV-1プロテアーゼを代表とするアスパラギン酸プロテアーゼは、活性中心ポケットに隣り合う二つのアスパラギン酸を有する構造を持つ。このようにタンパク質ポケット内でアスパラギン酸が隣り合うような環境下では、水溶液中における $pK_a=3.9$ のアスパラギン酸分子とは異なり、様々なプロトン化状態が考えられるため2Å程度の通常の分解能のX線実験データだけでは、水素原子の位置は決められない。また、プロトン化状態の違いは、化学結合や反応性の解釈においてクリティカルであるため、水素原子の有無や位置が決定されないと相互作用解析や化学反応予測は成立しない。本研究では、HIV-1プロテアーゼについて中性子線構造解析で得られた構造を用いて量子化学計算による水素原子の位置を決定するための構造解析手法の開発を行い、水素原子位置の解釈を量子論的な観点から明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、主に研究テーマA「全電子エネルギー及びIFIE解析による水素原子位置の最安定構造の探索」、研究テーマB「様々な水素原子位置に基づくFMO電子密度とX線電子密度類似性評価」、研究テーマC「プロトン化状態の信頼性評価と pK_a 予測に向けた検討」を実施した。また、コロナ禍において当初計画にはなかった追加研究提案として、研究テーマD「プロ

トン化状態を考慮したタンパク質構造と薬剤候補分子の結合能予測評価」も実施した。

構造ベース創薬(structure based drug design: SBDD)を行う上で、リガンドポケットの性質(荷電状態, 親水性, 疎水性等)を明らかにすることは、精緻な相互作用解析に基づく論理創薬の実現において重要である。よって、タンパク質の活性中心に対して水素原子(プロトン)構造も含めた精密な量子化学計算による三次元立体構造決定手法の確立が求められている。特に、HIV-1 プロテアーゼなどの活性中心に隣接する二つのアスパラギン酸が存在する場合(図1)、X線結晶構造ではプロトン化状態を決定することが難しく、中性線構造解析と同等な結果を導出するプロトン構造決定手法の確立が求められる。

本研究で構築する方法(研究テーマ A, B, C)は、フラグメント分子軌道(FMO)法によるタンパク質の量子化学計算より全電子エネルギーによる構造安定性、相互作用エネルギー解析による化学結合の安定性の評価(IFIE, PIEDA 等)や、FMO 電子密度と X 線電子密度の比較によるプロトン構造の妥当性を評価する関数の開発を行う。すなわち、従来の古典的手法では特定が難しいタンパク質ポケット内部のプロトン構造を含んだ微細構造を量子化学計算と実験データに基づき、決定することを目指す。活性中心の微細構造を解明することは、創薬においては精緻な化合物設計に有用であり、化学反応解析では原子レベルでの病態メカニズムの理解に繋がる。このように量子化学計算と実験データを融合させることで相補的にタンパク質の活性中心の水素原子の有無や位置を決定することは世界初の試みであり、精緻な pKa 予測を導入したインシリコ創薬の実現、AI創薬等に向けた量子化学計算に基づくタンパク質相互作用データベース(FMO database, URL: <http://drugdesign.riken.jp>)の構成データの高精度化にも繋がり、量子構造生物学に基づく次世代の超分解能構造解析の基盤技術となることが期待される。

また、荷電状態(例:プロトン化状態、アミノ酸残基構成)の異なるタンパク質同士の結合能予測を行う手法の確立を目指し(研究テーマ D)、麻疹ウイルスやコロナウイルスの受容体タンパク質との分子認識に重要な相互作用、及び結合能の評価手法の開発を行った。その際、荷電状態の違いを統計的補正相互作用エネルギー(SCIFIE)による遮蔽効果や、暗溶媒効果を組み込むことで、電荷の違いを考慮した相互作用エネルギー補正手法を開発し、結合能の強度予測、分子認識に重要なアミノ酸残基を明らかにした。

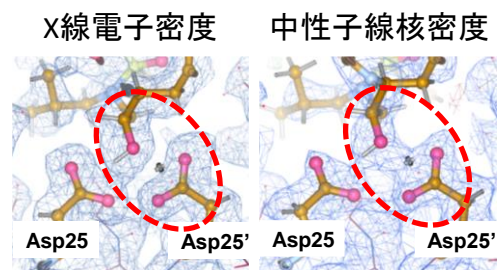


図1 X線電子密度、及び中性子線密度

(2) 詳細

研究テーマ A「全電子エネルギー及び IFIE 解析による水素原子位置の最安定構造の探索」

創薬ターゲットタンパク質のリガンドポケットのプロトン化状態を決定する上で、HIV-1 プロテアーゼのような二つのアスパラギン酸が隣り合う場合には、従来の古典論による手法では、プロトン化状態予測が難しく、より高精度な予測手法の開発が望まれている。そこで、立体構造に基づいた FMO 法による電子状態計算によって評価する手法の検討を行った。HIV-1 プロ

テアーゼの中性子線構造(図1)を基に、活性ポケットの二つのアスパラギン酸に対して空間的な GRID を作成し、格子点上に水素原子を配置した水素原子 GRID を作成した(図2)。量子化学計算による全電子エネルギー解析により着目するプロトンの安定構造を探索した。また、リガンドとタンパク質間の相互作用エネルギー解析を行うことでリガンド結合能評価した。これに

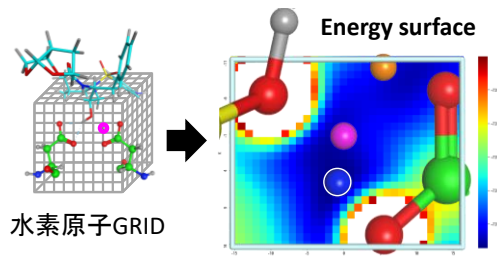


図2 水素原子 GRID を用いたエネルギー曲

より構造安定性及びリガンド結合能の両方の観点からプロトン構造を評価したところ、中性子線構造とは異なる位置にプロトンは最安定構造をとることを確認した(図2)。また、複数の準安定構造も検出したが、エネルギーポテンシャル障壁の高さを鑑みて、絶対零度の真空計算ではそのポテンシャル障壁を超えることは困難だと考察されたため、当初計画になかった構造揺らぎを考慮したプロトン座標の解析も行った。その結果、中性子線構造で観測されているプロトン構造についてその妥当性については、構造揺らぎを考慮する必要があることを示唆する結果が得られた。

研究テーマ B「様々な水素原子位置に基づく FMO 電子密度と X 線電子密度類似性評価」

量子化学計算に基づく FMO 電子密度と実験の電子密度(X 線電子密度)等を直接比較することにより、実験データに即したプロトン構造が決定出来ることが期待される。そこで、本研究では、テーマ A で得られた複数の妥当なプロトン構造を用いて FMO 電子密度解析、その平均電子密度の解析を行うことで、実験と計算の相補的な解析手法の確立を目指した。本研究期間では、研究テーマ A で得られた最安定構造、及び準安定構造等を基に電子密度解析を実施し、プロトン構造の違いに敏感に反応して FMO 電子密度が変化することを確認した(図3)。また、複数の準安定構造の単純な FMO 電子密度の線形結合では中性子線核密度と同等の位置に電子密度は観測出来ないことも確認した。そこで、テーマ A と同様に構造揺らぎの検討に基づき、FMO 電子密度に揺らぎの効果を考慮することが今後の研究開発で臨まれる。

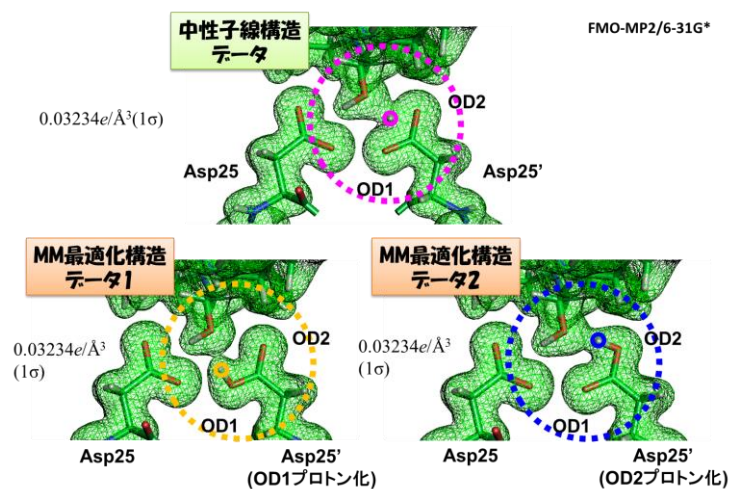


図3 FMO 電子密度解析のプロトン構造依存性

研究テーマ C「プロトン化状態の信頼性評価と pKa 予測に向けた検討」

プロトン構造の信頼性評価として pKa 予測に向けた検討を行った。本研究で得られた量子化学計算による全電子エネルギーを用いて検討を行った。比較対象としては既存の古典論ベースの手法を用いたプロトン化状態予測も実施した。プロトン構造の信頼性評価として一般的な指標として pKa が挙げられる。pKa 評価を行うため、取りうる全てのプロトン化状態の構造を用いて FMO 計算を実行し、エネルギー安定性を調査した。主に、創薬ターゲットの MTH1 タンパク質のリガンドポケットの二つのアスパラギン酸とその基質分子についてプロトン化状態を検討した。隣り合う二つのアスパラギン酸に対して9つのプロトン化、脱プロトン化状態を考慮した。また、基質分子については考える7つ互変異性状態を考慮し、計63構造について構造安定性と基質の結合能を量子化学計算により評価した。ここで異なるプロトン化状態は構成する原子数が異なるため、直接全電子エネルギー比較することが難しい。そこで本研究では、リガンドの結合エネルギー解析(図4)に加えて、リファレンス分子を導入したホモデスミック反応による構造安定性を評価するアプローチを取り入れた。その結果、高分解能実験構造で示唆されていたプロトン化状態が妥当であることを本計算からも示すことが出来た。この手法の妥当性を示すため、今後は水素原子情報のある中性子線データを用いた解析も引き続き行う。

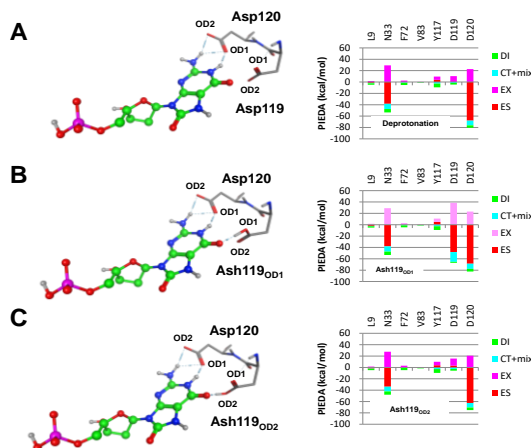


図4 MTH1 のリガンド結合エネルギー解析 (脱プロトン化状態(A)、Asp119 モノプロトン化状態(B,C))

研究テーマ D「プロトン化状態を考慮したタンパク質構造と薬剤候補分子の結合能予測評価」

一般的にタンパク質は、20 種類のアミノ酸を基に構成されている。ウイルスの分子認識に代表されるようなタンパク質—タンパク質間相互作用を理解することは、薬剤、抗体設計の上重要な知見である。特にターゲットとなるタンパク質に対して、結合相手となるタンパク質の種類に応じて、ターゲットタンパク質の表面の荷電アミノ酸残基のプロトン化状態が変化する場合も良くある。このプロトン化状態の違いによって引き起こされる荷電状態の違いは、FMO 計算ではタンパク質に対する相互作用エネルギー解析に大きく影響し、結合能予測を難しくしている。そこで、麻疹ウイルス、及び 2020 年初頭にパンデミックを起こしたコロナウイルス等の荷電アミノ酸残基の多いウイルスタンパク質を例に、ヒトの細胞侵入過程における分子認識や、抗体の分子認識において、タンパク質が異なる荷電状態の場合でも結合能予測可能な手法の開発を行った。麻疹ウイルスとヒト SLAM の分子認識については、分子間の IFIE に対して特異値分解を実行することで、協調的な相互作用ネットワークを包括的に効率良く解析することが出来た [代表論文 1]。また、コロナウイルスについては、感染に重要な SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2、及び抗体について IFIE/PIEDA によるエピトープ解析、及び結合能解析を行った。特に荷電状態の異なる複数のスパイクタンパク質 (SARS-CoV-2、

SARS-CoV 等)とACE2との結合能に関しては、静電相互作用の遮蔽効果や脱溶媒和効果を考慮することで電荷の異なるタンパク質同士の結合能比較に成功した(図5)[代表論文 2]。

これらの FMO 計算結果を様々な研究者が広く活用するため、FMO データベース(<https://drugdesign.riken.jp/FMODB/>)を構築し、公開した。FMO データベースを構成する基盤データについて相互作用

エネルギーの統計解析を行うことで、水素結合、XH/ π 相互作用などの相互作用の有無を判定するためのエネルギー指標を示した[代表論文 3]。また、テーマ D のデータについては計算データベースを既に公開し、テーマ A~C についても今後公開する予定である。

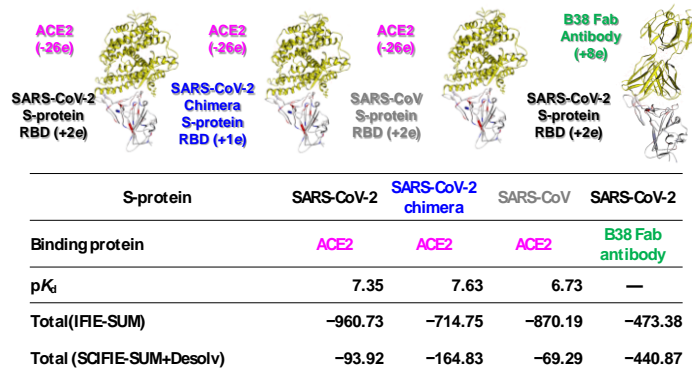


図5 各種スパイクタンパク質とACE2、抗体との結合能評価

3. 今後の展開

この研究を通して、エネルギー曲面解析、及び FMO 電子密度解析を用いたプロトン構造の妥当性を評価するための解析手法を確立することを目指しているが、残念ながら研究機期間内での全ての機能について十分な検討に至らなかった。しかしながら、現時点ではエネルギー曲面解析に関する機能は完成し、揺らぎの効果を取り込むなど当初の予定よりも高度な解析が出来たと言える。一方で、FMO 電子密度解析に関する機能は基本実装を終えたが、実験データとの比較するための機能開発が途中段階であり、今後も引き続き研究開発を行うことで、当初の目標であったプロトン構造の妥当性評価解析手法の確立を目指し開発を進める。

コロナ禍において社会的関心の高いウイルス抗原-抗体の結合能予測のため、本研究に関連し追加提案した「荷電状態の異なる分子系に対する結合能予測手法」は FMO 計算結果の特異値分解、遮蔽効果、脱溶媒和効果などを取り込むことで実験データと相関のある結果を引き出すことに成功した。今後は、この手法の有効性を示すため、コロナウイルス変異株と抗体の結合能などの解析事例の蓄積に努め、対象となる分子系に応じて手法の更なる改良を図る予定である。

これまで水素原子情報を観測する手法としては中性子線解析、高分解能X線解析などが主であったが、最近クライオ電子顕微鏡による構造解析においても水素原子の観測が報告されており、水素原子位置の観測が未だ多くの研究者の関心のある研究テーマの一つであることが伺える。よって、本研究で得られた生体高分子の量子化学計算に基づくエネルギー解析、電子密度解析技術をさらに改良・発展させ、高分解能構造解析技術で得られた知見を融合させることで「量子構造生物学」として実験構造データの第一原理的拡張を推進することが期待される。

4. 自己評価

本研究の大きな目標であった、古典論では説明のできない HIV-1 プロテアーゼの活性中心のアスパラギン酸のプロトン構造(図1)の妥当性とその解釈について、当初計画していた静的な量子化学計算によるエネルギー、電子密度解析手法だけでは、実験結果を十分に説明することが出来なかった。しかしながら、揺らぎの効果などを取り込む等の試行錯誤を行うことで、より現実的なプロトン構造を評価する手法の開発に繋がったと考えられる。また、コロナ禍における創薬開発の一助とすべく、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質とヒト受容体/抗体を題材とした異なる荷電状態の分子間の結合能予測手法の開発にも取り組むことが出来た。これらのデータについては、FMO データベース(FMODB: <https://drugdesign.riken.jp/FMODB/>)を介して二次利用可能なよう成果公開することで科学・社会への波及効果が見込まれる。以上のプロトン構造のエネルギー的な検討に試行錯誤や、コロナ対応のための追加課題の発案により、当初の計画で予定していた FMO 電子密度解析については基本機能を実装が完了した段階であり、本研究の目標である HIV-1 プロテアーゼの実験の X 線電子密度データと FMO 電子密度データの比較・検証が直近の大きな課題として残る。この FMO 電子密度機能を完成させることで、本研究を通して得られた成果と共に、量子化学計算と実験データを融合させた生体高分子のプロトン構造の同定、すなわち構造精密化の基盤技術のパーツとなり、第一原理に基づく次世代の構造精密化技術の拡張による「量子構造生物学」へと発展させることを目標とする。

本研究における分子シミュレーション、プログラム開発などはさきがけ研究者の渡邊千鶴が主に行った。プログラムの開発には、FMO 計算専用プログラム ABINIT-MP、及びその解析用ソフト BioStationViewer への実装と公開を見据え、適宜業務委託を行うことでユーザーフレンドリーなプログラム開発に努めた。研究期間の途中、コロナウイルスに対する創薬知見に繋がるよう研究計画を一部修正したが、JST および領域アドバイザーの指導のもと実施し、当初の想定以上の社会的貢献に繋がったと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. S. Tanaka, C. Watanabe, T. Honma, K. Fukuzawa, K. Ohishi, T. Maruyama, Identification of correlated inter-residue interactions in protein complex based on the fragment molecular orbital method. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2020, 100, 107650–107650.

FMO 計算によって得られたフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)行列を特異値分解(SVD)することで、分子認識におけるタンパク質間相互作用を包括的な記述を試みた。本研究では、提案した方法を麻疹ウイルスとヒト SLAM 受容体の複合体に適用し、2つのタンパク質に関与するアミノ酸残基間の鍵となる協調的相互作用ネットワークを包括的に効率良く解析することが出来ることを示した。

2. C. Watanabe, Y. Okiyama, S. Tanaka, K. Fukuzawa, T. Honma, Molecular recognition of

SARS-CoV-2 spike glycoprotein: quantum chemical hot spot and epitope analyses. Chemical Science. 2021, 12, 4722-4739 (Inside cover art)

コロナウイルス感染メカニズムに重要な SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の分子認識メカニズムに重要なアミノ酸残基の特定をフラグメント分子軌道(FMO)計算による IFIE 解析で行った。特にヒト細胞上のアンジオテンシン変換酵素(ACE2)と SARS-CoV-2、SARS-CoV-2 キメラ、SARS-CoV スパイクタンパク質の分子認識の鍵となるアミノ酸残基を特定した。加えて、タンパク質間の結合エネルギーに対して、静電相互作用の遮蔽効果や脱溶媒和効果を考慮することで妥当な結合能評価を行うことが出来た。感染阻害に関与する B38 Fab 抗体に対するエピトープも明らかにし、ACE2 との違いを議論した。

3. D. Takaya, C. Watanabe, S. Nagase, K. Kamisaka, Y. Okiyama, H. Moriwaki, H. Yuki, T. Sato, N. Kurita, Y. Yagi, T. Takagi, N. Kawashita, K. Takaba, T. Ozawa, M. T-Kamimura, S. Tanaka, K. Fukuzawa, T. Honma. FMO DB: The World's First Database of Quantum Mechanical Calculations for Biomacromolecules Based on the Fragment Molecular Orbital Method. Journal of Chemical Information and Modeling. 2021, 61, 777-794. (Cover art)

フラグメント分子軌道法を用いた量子化学計算結果を集約したデータベースを構築し、Web インターフェイスを介して FMO データベース(FMODB: <https://drugdesign.riken.jp/FMODB/>)として公開した。様々な創薬ターゲットに対する FMO 計算データを FMO 計算自動化プロトコル利用して実施した。それらの格納したフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)について、水素結合、イオン相互作用、XH/ π 相互作用等に分類し統計解析を行い、IFIE やそのエネルギー成分(例: 静電相互作用、電荷移動相互作用、分散力)における典型的な相互作用をしている場合のエネルギー指標を示した。

(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

1. C. Watanabe, T. Honma, "QUANTUM CHEMICAL ANALYSIS OF PROTONATION STATES OF ASP119/120 IN THE MTH1 LIGAND-BINDING POCKET USING FRAGMENT MOLECULAR ORBITAL METHOD", Poster presentation, Biophysical Society 64th Annual Meeting (アメリカ、サンディエゴ).
2. 渡邊千鶴、「量子化学計算に基づくリガンド結合ポケット周辺の水素原子の構造解析」、口頭発表、第 20 回 FMO 研究会「生命現象を量子構造生物学で解き明かす」(CBI 学会 2019 年大会(東京)、フォーカストセッション FS-14)
3. 渡邊千鶴、「量子化学計算が導く高分解能X線結晶構造データの討究」、口頭発表、25 回 FMO 研究会(第 2 回量子構造生命科学研究所シンポジウム)「金属タンパク質解析における構造生物学と量子化学計算の融合」(CBI 学会 2021 大会(オンライン)、フォーカストセッション FS-05)

【受賞】

1. 第12回理研桜舞賞(研究奨励賞)

渡邊千鶴 (Chiduru Watanabe), “FMO DB: The world’s first database of quantum mechanical calculations for biomacromolecules based on the fragment molecular orbital method”, 2021.

【論文表紙】

1. Journal of Chemical Information and Modeling. 2021, 61, 777–794 (Cover art)
2. Chemical Science. 2021, 12, 4722–4739 (Inside cover art)
3. Bulletin of the Chemical Society of Japan. 2021, 94, 1794–1798 (Selected paper, Cover art)

【著書】

1. K. Fukuzawa, C. Watanabe, Y. Okiyama, T. Nakano, 6. How to Perform FMO Calculation in Drug Discovery, Recent Advances of the Fragment Molecular Orbital Method: Enhanced Performance and Applicability; Mochizuki, Y., Tanaka, S., Fukuzawa, K., Eds.; Springer: Singapore, 2021; p93–125. (査読付き)
2. C. Watanabe, H. Watanabe, Y. Okiyama, D. Takaya, Development of an Automated FMO Calculation Protocol to Construction of FMO Database, Recent Advances of the Fragment Molecular Orbital Method: Enhanced Performance and Applicability; Mochizuki, Y., Tanaka, S., Fukuzawa, K., Eds.; Springer: Singapore, 2021; p183–203. (査読付き)