

# カスケード選択型分子動力学シミュレーションで実現する環状ペプチドの膜透過シミュレーション

原田 隆平

筑波大学計算科学研究センター

## 1. はじめに

平成 31 年度 (前期) スーパーコンピューター若手・女性利用者推薦制度の採択課題「カスケード選択型分子動力学シミュレーションで実現する環状ペプチドの膜透過シミュレーション」の研究成果を報告する。報告内容は、採択期間において開発を進めた膜透過シミュレーション実現の計算手法の紹介と、モデル環状ペプチドへの適用である。

## 2. イントロダクション

生体膜から薬剤分子を生体内に取り込み、疾患原因となる標的分子と相互作用して活性阻害した後、生体外へ排出されるプロセスにおいて、膜透過に伴う薬剤分子の構造変化を解析することは、有益な設計情報を提供する。薬剤設計の主流は、抗体医薬をはじめとするバイオ医薬である。しかしながら抗体医薬にも、(1) タンパク質であるため経口投与が困難、(2) サイズの大ききから細胞内に侵入困難など、今後解決すべき問題点が存在する。近年、抗体医薬の問題点を打開すべく、「中分子医薬」が注目を浴びている。中分子医薬は分子量が 500~2000 であり、低分子医薬と抗体医薬の中間に位置する。中分子医薬の中でもペプチド医薬は、アミノ酸を線形に連結することが容易であり、経口投与可能な薬剤を合成できる。しかし、線形ペプチドのサイズは大きく、生体膜を透過して生体内へ侵入することが困難であり、抗体医薬の問題点(2)を依然として解決していない。問題を解決する化合物として、「中分子環状ペプチド」が注目を浴びている。中分子環状ペプチドは、アミノ酸が環状骨格を形成したペプチドであり、アミノ酸を環状につなぐことでサイズを小さくできる。また、親水性と疎水性のアミノ酸を調整して設計すれば、環状構造の特性を活かすことで、生体膜外では親水性のアミノ酸を外側に、生体膜内では疎水性のアミノ酸を外側に配置した立体配座を選択できるので両親媒となり、生体膜の内外を容易に透過できる。更に、環状構造であるため、線形ペプチドと比較して生体内で分解し難くなるため、活性効率が上昇する。以上より中分子医薬は、低分子医薬と抗体医薬に代わるブレイクスルーとして期待されている。しかし、環状ペプチドを実験的に合成可能でも、生体膜透過時の構造変化を追跡することは困難な場合が多い。そこで、膜透過プロセスの詳細な遷移過程を抽出できれば、薬剤設計に有益な構造情報を提供できる。膜透過プロセスを抽出する計算科学的なアプローチとして、分子動力学シミュレーション (MD) は中分子環状ペプチドの構造変化を原子レベルの高分解能で追跡できる。しかし、現状の MD を用いて低い計算コストで膜透過プロセスを抽出することは技術的な面から難しい。何故ならば、中分子環状ペプチドが膜透過するために要する時間

スケールと比較し、現状のMDが追跡可能な時間スケールが極めて短いからである。本研究では、現実的な計算コストで膜透過プロセスを抽出するために我々が開発した生体分子のレアイベントサンプリング法である「Parallel Cascade Selection MD (PaCS-MD)」[1]を適用する。PaCS-MDは、生体分子の機能発現に重要な長時間ダイナミクス（レアイベント）を効率的に抽出する分子シミュレーション技術である。本研究では、中分子環状ペプチドの膜透過プロセスをレアイベントと見なし、PaCS-MDを適用して抽出することを立案した。将来的にPaCS-MDを適用し、膜透過に伴う中分子環状ペプチドの透過性を見積もることができれば、中分子医療において、どの様にアミノ酸配列を設計すれば効率的に膜透過を実現するかに関する配列情報を提供できる点において重要性がある。また、技術的な観点から、PaCS-MDを用いた膜透過性の評価スキームを構築後、開発した分子シミュレーション技術をパッケージ化し、理論・実験研究者に利用可能な形で公開を目指す。

### 3. 計算手法の構築

#### 3.1 Parallel Cascade Selection MD (PaCS-MD)

カスケード型超並列シミュレーションは、「初期構造の選択」と「選択した初期構造からリスタートする短時間MDシミュレーション」による「構造リサンプリング」を繰り返すことにより遷移経路を探索する。これまでに我々が開発してきた計算手法に関しては、レビュー論文 [2, 3] を参照にされたい。本手法は、バイアスをかけることなく構造間の遷移経路を探索する。従来法では、構造遷移を促進するため系の温度を高温にしてMDシミュレーションを実行するか、系の特定の部分に外力や外部ポテンシャルといった「バイアス」を付加することがほとんどである [4, 5]。従来法に対して本手法は、反応座標を設定してしまえば、遷移確率が高い初期構造を選択し、短時間MDシミュレーションにより構造リサンプリングを繰り返していただけなので、バイアスは使用しない。更に、パラメータを最適化するための準備計算も必要としない。本手法により効率的に構造探索が可能であるのは、構造リサンプリングを通して「稀にしか発生しない分子構造」の出現確率を選択的に上昇させているからである。図1に本手法の概念図を示す。図1に示す様に、始構造からスタートして終構造へ遷移する可能性が高い候補構造を反応座標に基づき選択し、短時間MDシミュレーションをリ

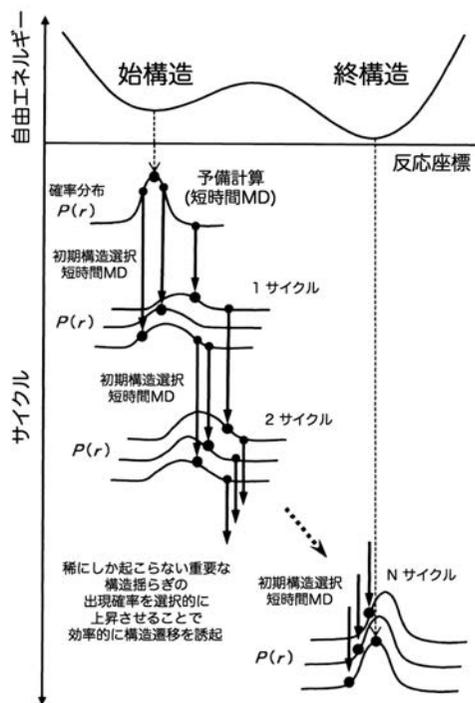


図1: カスケード型超並列シミュレーション

スタートさせるサイクルを繰り返すことで、徐々に構造分布が終構造近傍に近づいていく。手法適用にあたり様々な反応座標が考えられるが、終構造が分かっている場合に関して、終構造に対する平均自乗距離 (root-mean square deviation: RMSD) が考えられる。例えば、構造リサンプリングにより得られるトラジェクトリを RMSD の値でランキングし、値の小さい順にスナップショットを複数個選択し、短時間 MD シミュレーションの初期構造として構造探索していくことにより、徐々に終構造へ近づいていき、レアイベントを抽出することができる。ここで、反応座標は任意に指定可能であり、RMSD に限らず指定できる。実際の適用では、抽出したいレアイベントを的確に記述する合理的な反応座標を指定することが重要になることに注意されたい。

### 3.2 PaCS-MD による環状ペプチドの膜透過プロセス抽出

中分子環状ペプチドの膜透過プロセスは、現状の MD が到達可能な時間スケールより遥かに長時間の時間スケールで起こるレアイベントであるため、レアイベントサンプリング法である PaCS-MD を適用し、膜透過プロセスを抽出する。具体的には、PaCS-MD を中分子環状ペプチドの膜透過プロセス抽出に適用し、膜透過時の構造遷移を解析する。

デモンストレーションとして、脂質二重膜 (POPC) で生体膜を模し、環状ペプチドと共に計算機上にモデリングする。ここで、図2に示す様に PaCS-MD の始構造を (膜透過前)、終構造を (膜透過後) に設定する。また、初期構造を選択する指標として透過方向に Z 軸を定義し、環状ペプチドの Z 座標に注目する。膜透過に関する遷移経路を抽出するため、PaCS-MD のサイクル毎に、常

に Z 座標が大きな値を持つ中分子環状ペプチドの構造を初期構造に選択し、短時間 MD をリスタートする。上述のサイクルを繰り返すことで、常に膜内部に透過する確率が高いスナップショットから優先的に短時間 MD をリスタートすることになるので、抽出確率を上昇させることができる。最終的に、サイクルを十分繰り返した後、環状ペプチドの膜透過プロセスを抽出できる。ターゲットとして、簡単なモデル環状ペプチドを用いて POPC の膜透過プロセスを抽出できるか検証し、本計算手法の妥当性を評価する。

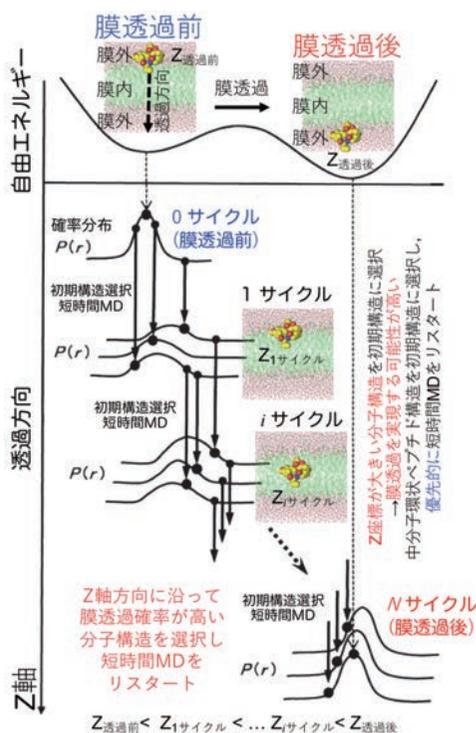


図2: PaCS-MD による膜透過プロセス抽出

### 3.3 PaCS-MD を用いたモデル環状ペプチドの膜透過プロセスの抽出

デモンストレーションとして、計算手法をモデル環状ペプチドの POPC の膜透過プロセス抽出に適用した。計算手順として、モデル環状ペプチドを POPC の上方にモデリングし、膜透過方向を Z 方向と定義し、PaCS-MD のサイクル毎に一番 Z 座標が大きいスナップショットを次のサイクルの初期構造に選択し、構造リサンプリングを繰り返した。図 3

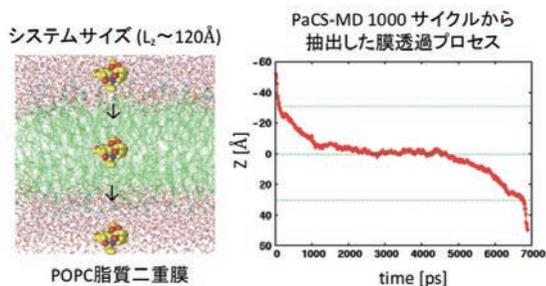


図 3: PaCS-MD による抽出した膜透過プロファイル

に PaCS-MD を 1,000 サイクル繰り返した後に得られた膜透過プロセスの Z 軸方向への射影 (モデル環状ペプチドの透過プロファイル)を示す。図 3 に示す様に、PaCS-MD を用いることで POPC の上方から下方へモデル環状ペプチドの膜透過プロセスを抽出できていることが分かる。次に、モデル環状ペプチドが膜表面から膜内部へ透過する際の構造変化を調べてみると、モデル環状ペプチドの分子構造が大きく構造変化していることが分かった (図 4 を参照)。具体的には、水中から膜内部へ透過する際に、疎水性官能基であるメチル基 ( $\text{CH}_3$ -) 部分を内側の疎水コアから外側へフリップする構造変化が観測された。具体的には、図 4 に示す様に、膜表面で水中から膜内部へ透過時のモデル環状ペプチドの慣性半径と露出表面積を調べてみると、いずれも値が急激に大きくなる傾向を示した。この現象は、モデル環状ペプチドの疎水基が水中では内側の疎水コアにコンパクトにパックされた状態にあるが、膜内部は疎水環境であるので、親和性を高めるために、疎水官能基が外側へ押し出さ、フリップすることで安定化するためだと考えることができる。環状ペプチドは、親水基と疎水基を両方持ち合わせることで細胞内外との親和性を調節できる点から判断して、PaCS-MD が抽出したモデル環状ペプチドの構造変化は妥当である。本研究成果が示す様に、環状ペプチド

の親水性と疎水性の調節を、疎水官能基のフリップに基づく構造変化として計算化学的に観測できた点において、将来的に中分子創薬への応用が期待できる。今後は、PaCS-MD で抽出した膜透過プロセスの自由エネルギープロファイルを計算するスキームを PaCS-MD とマルコフ状態モデル [6-8] を組み合わせること

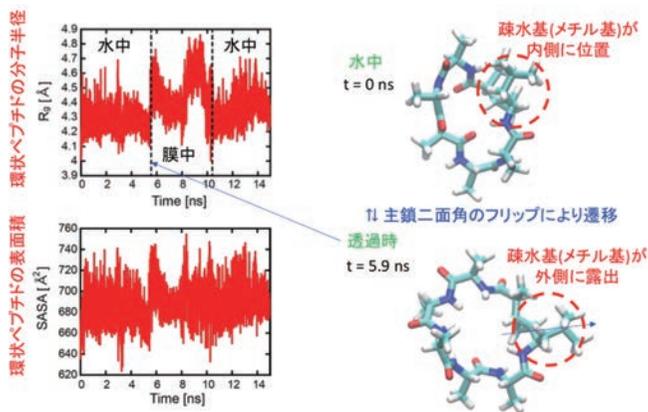


図 4: 膜透過時のモデル環状ペプチドの構造変化 (分子半径と表面積)

で構築し、定量的な膜透過性評価を実現したい。

#### 4. まとめと今後の展望

本研究では、PaCS-MD を環状ペプチドの膜透過プロセスの抽出に適用し、実際にその素過程の抽出に成功した。今後の課題としては、PaCS-MD で抽出した膜透過トラジェクトリを自由エネルギー上で定量的に評価することである。自由エネルギー計算は様々なアプローチが考えられるが、出来るだけ計算コストが少ない方法論を構築していきたい。例えばマルコフ状態モデルの構築と PaCS-MD を併用することで、比較的低い計算コストで自由エネルギープロファイルを計算可能かもしれない。しかし、1 回の膜透過プロセスだけでは統計量が足りず、信頼性の高いマルコフ状態モデルを構築できないかもしれない。故に、PaCS-MD に加えて他のサンプリング手法を併用することで最小自由エネルギープロファイルを計算するスキームなどが必要になるかもしれない。具体的には、既存のパスサンプリング法 [9, 10] との併用が考えられる。具体的には、最初に PaCS-MD で数本膜透過プロセスを効率的に生成しておき、パスサンプリング法により最適な透過経路かどうか判定するスキームである。今後は、PaCS-MD が生成するレアイベントの定量的評価を見据え、より強力な計算手法に発展させていく予定である。

#### 5. 謝辞

本研究は、東京大学情報基盤センター「若手・女性利用者推薦」2019 年度 (前期) の採択課題として、Reedbush-H を用いて行われた。

#### 参考文献

1. Harada, R. & Kitao, A. (2013) Parallel cascade selection molecular dynamics (PaCS-MD) to generate conformational transition pathway, *J. Chem. Phys.* **139**, 035103-1-10.
2. Harada, R., Takano, Y., Baba, T. & Shigeta, Y. (2015) Simple, yet powerful methodologies for conformational sampling of proteins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 6155-6173.
3. Harada, R. (2018) Simple, yet Efficient Conformational Sampling Methods for Reproducing/Predicting Biologically Rare Events of Proteins, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **91**, 1436-1450.
4. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. (1977) Non-Physical Sampling Distributions in Monte-Carlo Free-Energy Estimation - Umbrella Sampling, *J. Comput. Phys.* **23**, 187-199.
5. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. (1977) Monte-Carlo Study of a Phase-Separating Liquid-Mixture by Umbrella Sampling, *J. Chem. Phys.* **66**, 1402-1408.
6. Lane, T. J., Bowman, G. R., Beauchamp, K., Voelz, V. A. & Pande, V. S. (2011) Markov State Model Reveals Folding and Functional Dynamics in Ultra-Long MD Trajectories, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18413-18419.
7. Weber, J. K. & Pande, V. S. (2011) Characterization and Rapid Sampling of Protein Folding Markov

State Model Topologies, *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 3405-3411.

8. Husic, B. E. & Pande, V. S. (2018) Markov State Models: From an Art to a Science, *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 2386-2396.

9. Maragliano, L., Fischer, A., Vanden-Eijnden, E. & Ciccotti, G. (2006) String method in collective variables: Minimum free energy paths and isocommittor surfaces, *J. Chem. Phys.* **125**, 024106-1-15.

10. Maragliano, L. & Vanden-Eijnden, E. (2007) On-the-fly string method for minimum free energy paths calculation, *Chem. Phys. Lett.* **446**, 182-190.