

平成 31 年 5 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06164

研究課題名(和文) Gタンパク質共役受容体におけるシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Signal Transduction Process of G-Protein Coupled Receptor (GPCR) Studied by Molecular Dynamics Simulation

研究代表者

原田 隆平 (HARADA, Ryuhei)

筑波大学・計算科学研究センター・准教授

研究者番号：60612174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外シグナルを細胞内に伝達する機能を担う生理現象に重要であるGタンパク質共役受容体(GPCR)のシグナル伝達経路を解析するための計算手法を開発・適用することで、メカニズム解明に挑んだ。経路探索法として、研究代表者が開発したPaCS-MDとOFLOODを併用したハイブリッド型の遷移経路探索法、及び自動反応座標探索法を開発し、複雑なシグナル伝達経路へ適用可能な堅牢な方法論へ深化させた。また、手法適用により得られたシグナル伝達経路に関する原子座標トラジェクトリを解析し、GPCRがリガンドと結合して膜貫通ヘリックスにどの様に構造変化が伝播するのかを考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、GPCRなどの巨大システムの反応経路探索に適用可能な計算手法を開発したことで、GPCR以外の重要な生体分子にも適用可能な堅牢な方法論を提供することができた。開発手法は、様々な研究者に利用可能な様に一般公開を進めており、今後社会還元していく予定である。また、GPCRは創薬設計においてレセプターとしても注目されている重要なタンパク質であり、細胞内外におけるシグナル伝達経路のメカニズムの解明が進むことは、合理的な新薬設計に与える影響も大きいと考えられ、更なる社会還元が期待される。

研究成果の概要(英文)：G Protein Couple Receptor (GPCR) is an important membrane protein that transfers several signals from the outer to inner membrane upon the ligand binding. However, its mechanism of signal transduction process has not revealed yet. In the present study, We have developed a set of computational methods (path sampling methods) to address the signal transduction process of GPCR. In more detail, a set of two enhanced sampling methods called "Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD)" and "Outlier Flooding Method (OFLOOD)" has been combined as a hybrid path search method and it was applied to the GPCR system. In the current status, we are now analyzing trajectories (transition path trajectories related to the signal transduction of GPCR) generated by the hybrid conformational sampling method.

研究分野：計算生物物理学

キーワード：Gタンパク質共役受容体 分子動力学シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役受容体(GPCR: G-Protein-Coupled Receptor)は、細胞外リガンドを受容し G タンパク質の活性化を介してシグナルを細胞内へ伝達する機能を担う生理現象に不可欠な 7 回膜貫通型受容体である。(図 1 を参照) 細胞表面には様々な受容体が存在しているが、GPCR ファミリーはあらゆる生体細胞に存在しており、生命維持に不可欠な様々な機能に関与しているため、シグナル伝達機構を解明することは生理現象を理解する上で極めて重要である。近年、結晶構造として GPCR のモデルタンパク質である $\beta 2$ アドレナリン受容体の活性型構造が決定され、結晶構造解析に基づく分子レベルでのシグナル伝達モデルが提案された。このシグナル伝達モデルによると、膜貫通ヘリックスや細胞内領域に結合する G タンパク質と相互作用するループ領域は伝達過程で重要な役割を果たしていると予想されるが、構造領域は揺らぎが大きいため実験的な構造決定が難しい。故に、結晶化において運動性を抑えるためヘリックス領域に変異を導入し、ループ領域を削除することで結晶構造が決定されてきた。しかし、これらの改変は野生型構造のリガンドに対する親和性や活性能に影響を与える可能性があるため、詳細な伝達機構は依然として不明な点が多い。本研究では、改変を取り除いた理想的システムを全原子モデルで構築し、実験的探索が困難な揺らぎの大きい膜貫通領域、及び細胞内ループ領域に存在する伝達経路を計算機シミュレーションにより明らかにする。

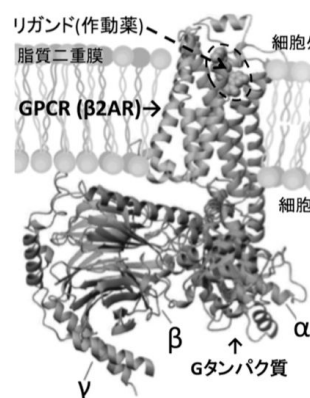


図 1 GPCR の構造

2. 研究の目的

GPCR は、細胞外シグナルを細胞内に伝達する機能を担う生理現象に重要な膜タンパク質であるが、依然として原子レベルでの詳細な伝達機構は不明な点が多い。何故ならば、GPCR は細胞外シグナルを膜貫通領域の揺らぎを通して細胞内へ伝達すると予想されるが、これら運動性の高い構造領域の結晶構造決定が難しいからである。本研究では、研究代表者が開発した遷移経路探索法である「Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD)」を用いた計算機シミュレーションにより、実験的探索が困難な伝達経路を探索することで、大規模構造変化により伝播すると予想されるシグナル伝達機構の全容を原子レベルでの解明を目指す。

3. 研究の方法

シグナル伝達経路を原子解像度の分解能で探索する手段として、分子動力学シミュレーション(MD)は強力なツールである。しかし、研究室レベルの計算機を用いた MD で到達可能な時間スケールはナノ秒~マイクロ秒程度であり、機能発現の時間スケールであるミリ秒~秒と比較して非常に短いため、伝達経路探索は困難である。故に、有限の計算コストで伝達経路を探索するためには、通常の MD とは別のアプローチが必要となる。この問題に対して研究代表者は、

長時間 MD の代わりに初期構造の異なる複数の短時間 MD を同時並列に実行することで遷移経路を効率的に探索する PaCS-MD(前述)を開発した。タンパク質の遷移経路探索法として PaCS-MD は、2 構造間をつなぐ遷移経路を効率的に探索可能であり、様々な生体系に適用されてきた。具体的には、遷移経路における始・終構造が与えられた条件下で終構造へ至る遷移経路を探索する場合、終構造に類似した構造を反応座標(例えば、終構造に対する平均自乗距離:RMSD)に基づき初期構造として選択し、短時間 MD をリスタートさせ経路探索することで終構造へ遷移するために必要な「稀にしか起こらない構造揺らぎ」の出現確率を選択的に上昇させる。つまり、遷移確率の高い初期構造を選択し短時間 MD を再開していくことで、探索領域(構造分布)が徐々に終構造に近づいていく。十分なサイクルを繰り返すことで、始構造から終構造へ到る遷移経路を探索可能となる。

4. 研究成果

PaCS-MD を適用研究として、GPCR のモデルタンパク質である「 $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$)」に関して、不活性型(*Science*, 318, 1258 (2007))・活性型(*Nature*, 469, 175 (2011))の結晶構造が決定されているため、これらの結晶構造を PaCS-MD の始・終構造として用いて不活性型から活性型に遷移する伝達経路の探索を試みた。

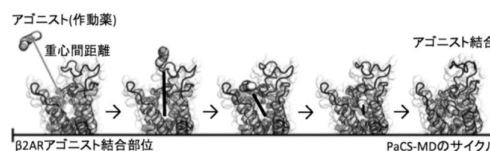


図 2: 重心間距離を反応座標に指定した PaCS-MD

予備計算では、図 2 に示す様にリガンドと GPCR の結合部位(活性中心)の重心間距離を反応座標を最初に採用したが、PaCS-MD の収束判定に問題があることが分かった。計算結果を解析してみると、GPCR の巨大システムの場合、リガンドがタンパク質に結合して構造変化するにあたり、これまでの比較的小さい残基数の球状タンパク質に関する Open-Closed 構造変化の抽出などで指定していた単変数の反応座標(例えば、RMSD や重心間距離)では、効率的にリガンド結合過程を抽出できないという困難に直面した。これは、PaCS-MD において、リガンド結合と GPCR の結合過程は GPCR 単体の構造変化のみならず、リガンドの構造変化を適切に評価しなければならないことを示唆している。この問題点を打開するため、適用にあたり最初に方法論の拡張に取りかかった。

(1) PaCS-MD 反応座標の自動探索法の開発

反応座標の指定問題を打開するため、これまでの PaCS-MD で採用してきた単純な反応座標の指定方法から脱却し、拡張した構造サンプリング法を開発した。PaCS-MD では、遷移経路を記述する反応座標として全体構造の RMSD を選択してきた。GPCR のリガンド結合過程を効率的に抽出するため、PaCS-MD の反応座標を RMSD に決め打ちすることなく、反応座標の候補(慣性半径, 露出表面積, 主成分座標など)を複数用意し、経路探索の過程で最適な反応座標を逐次的に探索・選択していく戦略を採用した。具体的には、PaCS-MD の経路探索の途中でそれぞれの

反応座標軸方向の勾配を計算し、一番勾配が小さい(勾配の絶対値が一番大きく符号が負 = 終構造へ一番大きく変化した)反応座標軸を最適と見なし、その方向へ経路探索を継続する。サイクル毎に(逐次的に)反応座標の勾配を計算し、一番勾配が小さい反応座標方向軸へ経路探索を繰り返すことで、効率的な構造遷移を誘起する。本法論を用いることで、指定反応座標の多次元化を実現し、GPCR とリガンド結合の結合に必要な本質的な構造変化を適切に記述する自由度 = 反応座標を on-the-fly で指定することが可能になった。

(2) GPCR に関するシグナル伝達経路に関する自由エネルギー計算手法の開発

当初、PaCS-MD で抽出したシグナル伝達経路に関する自由エネルギーを計算する方法として遷移経路の最適化法(ストリング法)との併用を予定していた。しかし、PaCS-MD の欠点として、得られる初期の遷移経路が始構造と終構造に依存してしまうことが示唆され、ストリング法に十分信頼性の高い初期パスを提供することが困難な場合が存在することが示唆された。これは、PaCS-MD で生成した遷移経路の妥当性評価が難しいことを意味している。この問題を打開するため、研究代表者が開発した他の構造サンプリング法との併用を検討した。具体的には、研究代表者が開発した”Outlier flooding method (OFLOOD)”を PaCS-MD と併用したハイブリッド型の構造探索法を開発した。OFLOOD は、出現確率が小さい状態(構造分布におけるスパースな領域 = 情報科学的に”外れ値”)に該当する構造を初期構造に選択し、短時間 MD を再開するサイクルを繰り返して探索領域を拡大する。更に、PaCS-MD と OFLOOD を併用したハイブリッド型の構造探索法をマルコフ状態モデルと組み合わせることで、リガンドと GPCR の結合過程に関する広い構造空間を探索可能な自由エネルギー計算を探索可能になった。最終的に、(1)と(2)で開発した拡張型 PaCS-MD と OFLOOD を融合したハイブリッド型の構造探索法を構築することで、効率的かつ高精度にシグナル伝達過程を定量的に評価可能な自由エネルギー計算法を確立した。

(3) 方法論を適用した GPCR シグナル伝達経路の解析

GPCR のシグナル伝達過程に PaCS-MD を適用することで直面した問題点を克服していくことで、計算手法を深化させることができた。GPCR はこれまで適用経験のない巨大システムであった為、計算手法の改良に時間がかかってしまったが、現在は上述の拡張した計算手法を適用し、抽出した遷移経路の解析に取り掛かっている。最終的に、生体膜を隔てた細胞外領域のリガンド結合による結合部位の小さな構造変化が膜貫通領域のヘリックス再配向を誘起し、ヘリックスの再配向が細胞内領域の結合表面ポケットをどの様に形成するかを考察し、論文投稿する予定である。

5.主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Ryuhei Harada, Ryunosuke Yoshino, Hiroaki Nishizawa, Yasuteru Shigeta, Temperature-Pressure Shuffling Outlier Flooding Method Enhances the Conformational Sampling of Proteins, *Journal of Computational Chemistry*, volume 40, pages 1530-1537 (2019), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Simulations for Transition Pathway Sampling of Biomolecules, *Advances in Quantum Chemistry*, volume 78, pages 129-147 (2019), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Cascade-Type Molecular Dynamics Combined with Markov State Model Efficiency Calculates Free Energy Landscapes of Proteins, *Journal of Chemical Theory and Computation*, volume 15, pages 680-687 (2019), 査読有.

Ryuhei Harada, Simple, yet Efficient Conformational Sampling Methods for Reproducing/Predicting Biologically Relevant Rare Events of Proteins, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, volume 91, pages 1436-1450 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Effect of Initial Structures Rules in Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Affect conformational Sampling Efficiency, *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, volume 85, pages 153-159 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Hayato Aida, Yasuteru Shigeta, The Formation of Central Hydrophobic Core Regulates the Protein Folding of Villin Elucidated with Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics, *Chemistry Letters*, volume 47, pages 1300-1303 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, How does Friction Constant Affect the Conformational Sampling Efficiency of Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics?, *Chemistry Letters*, volume 47 pages 1119-1122 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Temperature Shuffled Structural Dissimilarity Sampling Based on a Root-Mean Square Deviation, *Journal of Chemical Information and Modeling*, volume 58, pages 1397-1405 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, How Low-Resolution Structure Data Predict the Conformational Changes of a Protein: A study on Data-Driven Molecular Dynamics Simulations, *Physical Chemistry Chemical Physics*, volume 20, pages 17790-17798 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, On-the-Fly Specifications of Reaction Coordinates in Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Accelerates the Conformational Transitions of Proteins, *Journal of Chemical Theory and Computation*, volume 14, pages 3332-3341 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Takako Mashiko, Masanori Tachikawa, Shuichi Hiraoka, Yasuteru Shigeta, Programed Dynamics Ordering in the Self-Organization Processes of a Nanocube, *Physical Chemistry Chemical Physics*, volume 20, pages 9115-9122 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, An Assessment of Optimal Time Scale of Conformational Resampling for Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics, *Molecular Simulation*, volume 44, pages 206-212 (2018), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Temperature-Shuffled Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Accelerates the Structural Transition of Proteins, *Journal of Computational Chemistry*, volume 38, pages 2671-2674 (2017), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Self-Avoiding Conformational Sampling Based on Histories of Past Conformational Searches, *Journal of Chemical Information and Modeling*, volume 57, pages 3070-3078 (2017), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Dynamics Specification of Initial Structures in Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) Efficiently Promotes Biologically Rare Events, *Bulletin Chemistry of Society of Japan*, volume 90, pages 1236-1243 (2017), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Structural Dissimilarity Sampling with Dynamically Self-Guiding Selection, *Journal of Computational Chemistry*, volume 38, pages 1921-1929 (2017), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, How Does the Number of Initial Structures Affect the Conformational Sampling Efficiency and Quality in Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD)?, *Chemistry Letters*, volume 46, pages 862-865 (2017), 査読有.

Ryuhei Harada, Yu Takano, Yasuteru Shigeta, Common Folding Processes of Mini-Proteins: Partial Formations of Secondary Structures Initiate the Immediate Protein Folding, *Journal of Computational Chemistry*, pages 38, pages 790-797 (2017), 査読有.

Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Efficient Conformational Search Based on Structural Dissimilarity Sampling: Applications for Reproducing Structural Transitions of Proteins, *Journal of Chemical Theory and Computation*, volume 13, pages 1411-1423 (2017), 査読有.

Ryuhei Harada, Tomotake Nakamura, Yasuteru Shigeta, “A Fast Convergent Simulated Annealing Algorithm for Proein-Folding: Simulated Annealing Outlier FLOODing (SA-OFLOOD) method”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, volume 89, pages 1361-1367 (2016), 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

原田隆平, 分子混雑のシミュレーション研究とカスケード選択型分子動力学シミュレーションの開発, 日本物理学会 第 13 回 若手奨励賞 (領域 12) 受賞記念講演, 2019 年春季大会, 九州大学伊都キャンパス (2019 年 3 月 14 日)

原田隆平, タンパク質の機能発現を解明する分子混雑シミュレーション手法およびカスケード型超並列シミュレーション手法の開発, 日本化学会 第 76 回 進歩賞受賞記念講演, 2018 年春季大会, 日本大学船橋キャンパス (2018 年 3 月 20 日)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。