

# 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



## I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業  
(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間: 平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 池口 満徳  
(英語) Mitsunori Ikeguchi

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 公立大学法人横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授  
(英語) Yokohama City University, Graduate School of Medical Life Science, Professor

## II 補助事業の概要

X線結晶構造解析・クライオ電顕・NMRで得られたスナップショット構造に基づき、スーパーコンピュータ等を用いた分子動力学(MD)シミュレーションによって機能に関わる構造ダイナミクス研究を実施した。期間中に20件の支援研究と高度化研究を実施した。

### (1) 支援

支援研究のうち、代表的な例を記載する。

### DNA 維持メチル化に関わるタンパク質の分子動力学計算とインシリコスクリーニング

(横浜市立大学・有田恭平先生への支援)

DNAメチル化は、細胞固有の遺伝子発現パターンを定義し、分化した細胞の形質を決定づける。その細胞の分化状態を維持するために、ゲノム配列と同様に、DNAメチル化もDNA複製後に正確に継承される。支援先では、このDNA維持メチル化に関わる構造生物学研究を行っており、それに関わるタンパク質 DNA methyltransferase 1 (DNMT1), ubiquitin-like containing PHD and RING finger domain 1 (UHRF1)の立体構造を決定している。それらのタンパク質では、構造ダイナミクスが機能に重要な役割を果たしており、支援研究では、分子動力学(MD)計算を行うことで、その構造ダイナミクスを明らかにすることができた (Molecular Cell

2017, J. Mol. Biol. 2020)。さらに、がん細胞において、がん抑制遺伝子の発現は、異常な DNA メチル化によって抑制されており、そこで過剰発現している DNA 維持メチル化関連因子の阻害薬は抗がん剤の候補になりうる。そこで、DNA 維持メチル化で働くタンパク質に対し、東大創薬機構の化合物ライブラリからのインシリコスクリーニングを行い、検証実験の結果、結合能を持つ化合物を見つけることができた。このインシリコスクリーニングでは、MD 計算、および、MD による結合自由エネルギー計算が有効に機能することがわかった。(Bioorg. Med. Chem. 2021)

### Toll 様受容体に対する分子動力学シミュレーションと結合自由エネルギー計算

(東京大学・清水敏之先生への支援)

Toll 様受容体は、自然免疫に関わり、ウイルス等の外敵を認識する受容体で、創薬標的として研究されているタンパク質である。Toll 様受容体 7 (TLR7) のアンタゴニストの作用機序に関わる研究を東京大学・大日本住友製薬との共同研究として行った。TLR7 は一本鎖 RNA の受容体であり、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルスおよびコロナウイルスなどによる自然免疫に関与している。TLR7 が誤って自己 RNA を認識することで、喘息、全身性エリテマトーデス (SLE) および関節リウマチなどの自己免疫疾患に関係することが知られており、その阻害剤開発がなされている。大日本住友製薬ではメドケム研究にて、上図のように化合物の一部分の変換でアゴニストからアンタゴニストに変換することを見出していたが、その作用機序はよくわかっていなかった。当初、東京大学で、アンタゴニスト (Cpd-6) が結合した X 線結晶構造が解かれたが、その構造はアゴニスト結合型構造と類似しており、アンタゴニストの作用機序はよくわからなかった。そこで、アンタゴニストの作用機序の解明のため MD 計算の依頼があった。いくつかのリガンド複合体に対し MD を行い、相互作用の様子を解析したが、アンタゴニスト作用機序の明快な説明は得られず、~1  $\mu$ s 程度の MD も実施したが大きな構造変化は観測できなかった。そうしているうちに、東京大学にて、BINDS で導入したクライオ電子顕微鏡を用いて TLR7 の解析を行うことに成功し、その結果、驚くことに、強いアンタゴニスト (Cpd-7) 結合構造では、アゴニスト結合型構造 (クローズド構造) でなく、オープン構造をとっていることがわかった。さらに、アンタゴニスト (Cpd-6) 結合構造では、クローズド構造とオープン構造の両方が観察され、動的平衡にあることがわかってきた。それらの構造に対するアンタゴニスト (Cpd-6) と強いアンタゴニスト (Cpd-7) の結合自由エネルギーを計算したところ、アンタゴニスト (Cpd-6) ではクローズド構造とオープン構造が同程度の値であったが、強いアンタゴニスト (Cpd-7) は、オープン構造に強く結合することがわかった。この結果は、論文として発表した (Nature Comm. 2020)。

### DNA 修復に働く TFIIH 全長の動的構造モデル構築 (横浜市立大学・西村善文先生への支援)

転写反応や DNA 修復反応に必須な転写因子 TFIIH 複合体は、10 個の異なるタンパク質から構成されている。その中の、p62 タンパク質の PH ドメインは様々な転写因子や修復因子と特異的に相互作用するが、クライオ電子顕微鏡による構造解析においても非解像であり、TFIIH 複合体における PH ドメインの構造は未解明であった。西村教授らにより、NMR で PH ドメイン単体の溶液構造が得られたため、電顕の構造データと組み合わせた TFIIH 全長構造モデルを作成し、全原子 MD により構造最適化を実施した。PH ドメインの相対配置の異なる 6 個の全長構造 (水分子こみで約 50 万原子) の MD を東工大 TSUBAME3 で実施した。その結果、PH ドメインのリンカー部位のフレキシブル性を反映した、PH ドメインが揺らぐ動的構造モデルを得ることに成功した。TFIIH 複合体中、PH ドメインは自由に揺らぐものの、位置は、リンカー部位によって特定の範囲内に限られていることがわかった。リンカー部位の揺らぎと二次構造形成を解析した結果、NMR のデータと矛盾がなかった。さらに、PH ドメインに転写因子が結合した状態での全長構造モデルの最適化も実施した。この成果は、論文として発表し (Nucl. Acids Res. 2021)、雑誌の表紙にも採用された。

### 構造解析に向けた標的タンパク質へのタグ挿入方法の最適化 (横浜市立大学・禾晃和先生への支援)

構造解析対象のタンパク質を抗体断片でラベリングし、疑似的な対称性や見かけの分子量を大きくすることで、X線結晶構造解析やクライオ電顕単粒子解析で高分解能な構造決定をすることができる。しかし、対象タンパク質へ挿入した抗体認識部位（PA タグ）と抗体間に配向の揺らぎがあると、高分解能構造決定をする妨げとなってしまう。禾准教授らは、PA タグ配列の挿入位置や、挿入部位の長さを最適化することで、強固な複合体の形成プロトコルの確立を目指している。14 残基のタグ（PA14）を挿入した、挿入位置の異なる複合体 2 種類の結晶構造と、ネガティブ染色電顕像を比較すると両者が一致せず、また、挿入位置で複合体の揺らぎ方が異なることが実験的に示唆されたが、揺らぎの原因となる構造的な理由が明らかではなかった。PA14 タグ挿入タンパク質—抗体の複合体の MD を実施し、溶液構造サンプリングを実施したところ、電顕像と一致した構造モデルを得ることに成功した。また、抗体に対する PA14 タグの揺らぎを解析したところ、挿入位置によって揺らぎの大きさが異なることがわかり、PA14 内の揺らぎの情報を得ることもできた。この成果は、論文として発表した (ACTA Crystallogr. D 2021)。

### 脱ユビキチン化酵素 USP8 の分子内相互作用の解析（東京工業大学・福嶋俊明先生への支援）

脱ユビキチン化酵素は基質タンパク質に結合したユビキチンを切断する酵素であり、その 1 つのクラスである USP8 は増殖因子受容体エンドサイトーシスの制御に関連している。福嶋先生らの生理学的実験により、USP8 では WW ドメインが USP ドメインと分子内相互作用することにより活性を自己抑制することを示唆する結果が得られた。その分子基盤をインシリコにより理解するため、WW ドメインと USP ドメインとのドッキングシミュレーションを網羅的に行い、更に分子動力学シミュレーションにより複合体の安定性を調べた。その結果として、安定に存在しうる複数のパターンの複合体構造を提示でき、USP ドメイン変異体に対する FRET の相互作用解析でも、それをサポートする実験結果が得られた。この成果は、論文として成果公開した (Commun. Biol. 2021)

#### (2) 高度化

MD シミュレーションの制約の一つは、計算可能な時間スケールに限界があり、そのためにサンプリングできる構造空間に限界があることである。現在、単独の通常 MD では、スパコンを用いても ~  $\mu\text{s}$  程度の計算が限界である。そこで、本高度化研究では、そのような通常 MD を超えたシミュレーション技術の開発を目的とした。具体的には、通常の MD では到達できない広範囲な構造サンプリング法として、MultiScale Enhanced Sampling (MSES) 法や coupled Nosé Hoover (cNH) 法による全原子構造探索、および、短時間 MD を多数・繰返し計算することで構造変化のパスとキネティクスを効率的に計算できる重み付きアンサンブル法の研究開発を行った。これらの方法を、糖尿病や低血糖症に向けた創薬ターゲットとなっているグルコキナーゼやポリユビキチン鎖とユビキチン結合ドメイン複合体、EGFR キナーゼ、プロリン異性化酵素 Pin1、環状ペプチドであるシクロラシンに対して適用し、創薬研究への展開を試みた。

また、SARS-CoV-2 関連タンパク質の構造ダイナミクス研究を行った。SARS-CoV-2 3CL protease を標的とした創薬の過程で、大量の結晶構造情報が産出されている。それらを一つに集めて「結晶構造アンサンブル」を構成し解析することで、構造ダイナミクスを明らかにする研究を行った。

#### (英文)

Based on snapshot structures obtained by X-ray crystallography, cryo-EM, and NMR, molecular dynamics (MD) simulation studies were conducted using supercomputers. Twenty research projects were supported by our group during the research period, and in the “sophistication” research, our MD simulation techniques

were improved using enhanced sampling methods.

### (1) Support

Here, a representative research project supported by us is as follows:

Molecular dynamics simulation and *in silico* screening for proteins involved in DNA methylation maintenance

(Support for Prof. Kyohei Arita, Yokohama City University)

DNA methylation in mammals is an essential epigenetic mark and is inherited through cell division to retain the cell identity. DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and ubiquitin-like containing PHD and RING finger domain 1 (UHRF1) are important factors for the DNA methylation maintenance. Prof. Arita's group has revealed the 3D structures of DNMT1 and UHRF1 using x-ray crystallography. However, in those proteins, conformational dynamics play an important role in their functions, and therefore we performed MD simulations to investigate conformational dynamics of those proteins. Furthermore, in cancer cells, tumor suppressor genes are suppressed by aberrant DNA methylation, and inhibitors of the factors involving the DNA methylation maintenance could be candidates for anticancer drugs. Therefore, we conducted *in silico* screening for UHRF1 from a compound library. We found compounds exhibiting binding affinity to UHRF1 in validation experiments. In this *in silico* screening, MD simulations and binding free energy calculations were found to be effective.

### (2) Sophistication

One of the limitations of MD simulations is the accessible time scale, which limits the structural space that can be sampled. Therefore, the objective of this study was to develop a simulation technique that goes beyond a conventional MD. Specifically, the MultiScale Enhanced Sampling (MSES) method and coupled Nosé Hoover (cNH) method were developed for enhanced sampling of proteins. The structural-change paths and kinetics can be efficiently calculated by performing numerous short-time MD calculations. The weighted ensemble method was used to estimate kinetics of structural changes in proteins from many short-time MDs. These methods were applied to glucokinase, a drug target for diabetes and hypoglycemia, polyubiquitin chain and ubiquitin binding domain complex, EGFR kinase, proline isomerase Pin1, and cyclorasin, a cyclic peptide, for application to drug discovery research.

We also studied structural dynamics of SARS-CoV-2 proteins. In the process of drug discovery targeting SARS-CoV-2 3CL protease, a large amount of crystal structure information has been produced. We collected these structures into "crystal structure ensemble" and analyzed them to clarify the structural dynamics.