

解 説

# 分子動力学シミュレーションによる 単一ドメイン抗体の熱安定性の評価

神谷 成敏

兵庫県立大学 大学院 シミュレーション学研究所

(受取日：2020年7月6日，受理日：2020年7月27日)

## Thermal Stability Estimation of Single-Domain Antibodies by Molecular Dynamics Simulations

Narutoshi Kamiya

Graduate School of Simulation Studies, University of Hyogo

(Received July 6, 2020, Accepted July 27, 2020)

Single-domain antibodies (sdAbs) function like regular antibodies, but they consist of only one domain. Because of their low molecular weight, sdAbs have advantages with respect to production and delivery to their targets and for applications such as antibody drugs and biosensors. Hence, sdAbs with high thermal stability are required. In this work, we chose seven sdAbs, which have a wide range of melting temperature ( $T_m$ ) values and known structures. We applied molecular dynamics (MD) simulations to estimate their relative stability and compared them with the experimental data. High-temperature MD simulations at 400 K and 500 K were executed with simulations at 300 K as a control. The fraction of native atomic contacts,  $Q$ , measured for the 400 K simulations showed a fairly good correlation with the  $T_m$  values. Interestingly, when the residues were classified by their hydrophobicity and size, the  $Q$  values of hydrophilic residues exhibited an even better correlation, suggesting that stabilization is correlated with favorable interactions of hydrophilic residues. Measuring the  $Q$  value on a per-residue level enabled us to identify residues that contribute significantly to the instability and thus demonstrating how our analysis can be used in a mutant case study.

Keywords: molecular dynamics simulation, single-domain antibody, melting temperature,  $Q$  value, point mutation.

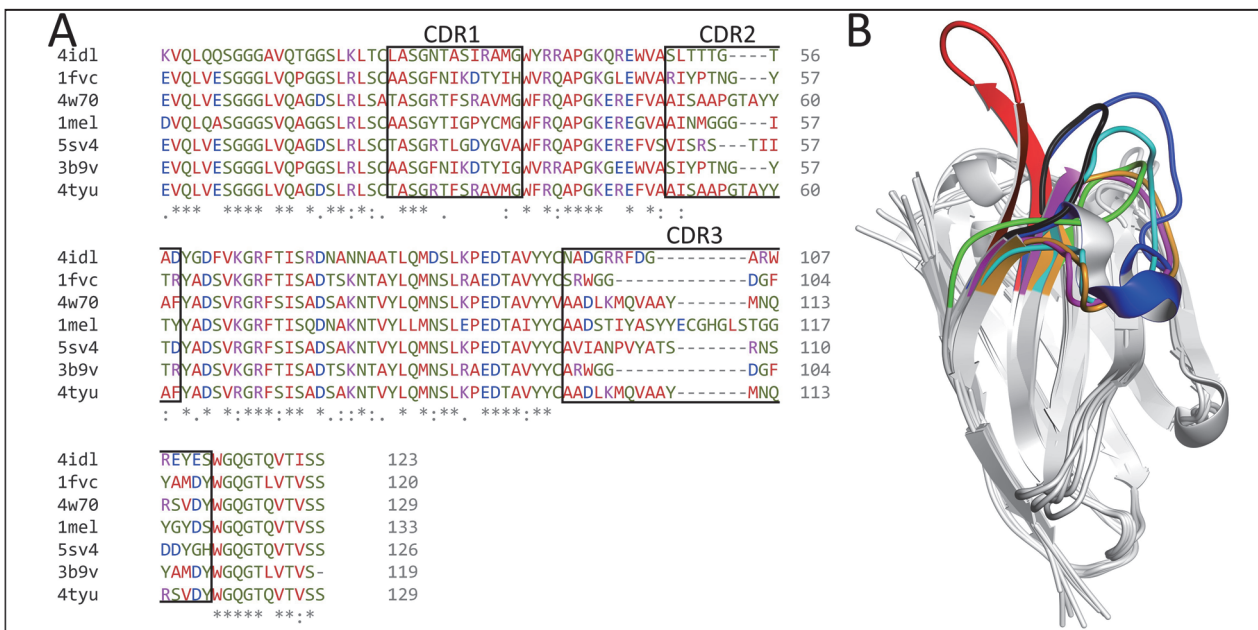
### 1. はじめに

著者らが発表したシミュレーションによる単一ドメイン抗体の熱安定性の評価に関する論文<sup>1)</sup>と Zabetakis らによる著者らの計算結果に対する実験による検証に関する論文<sup>2)</sup>について解説する。

抗体の可変フラグメント ( $F_v$ ) は、重鎖 ( $V_H$ ) および軽鎖 ( $V_L$ ) から成り、高い特異性および親和性で抗原に結合する。各鎖は、それぞれ 3 つの相補性決定領域 (complementarity determining region, CDR) ループ ( $V_H$  は CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3,  $V_L$  は CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) を有し、これらは抗原結合における重要な役割を果たす。中でも、CDR-H3 ループは、配列の長さや組成の両方に多様性があり、抗原を認識に最も重要な役割を果たす。 $F_v$  の CDR 以外の部分はフレームワークと呼ばれ、鎖間および鎖内の相互作用により構造の安定化に寄与する。 $F_v$  は 2 つのドメインで構成されているため、高温 (>60 °C) でアンフォールドして凝集する。<sup>3)</sup>

重鎖抗体は通常の抗体とは異なり、その可変ドメインは重鎖 ( $V_H$ ) のみで構成される単一ドメイン抗体 (single domain antibody, sdAb) で、ラマ、ラクダ、サメで同定・発現されている。<sup>4,5)</sup> sdAb は、従来の抗体よりも安定であり、加熱することにより変性された後、天然の構造にリフォールディングする能力を有する。<sup>6)</sup> また、sdAb は従来の抗体の  $V_H$  および  $V_L$  から得られる。sdAb はサイズが小さいため、生産性、溶解性、およびターゲットへの輸送に関して利点があり、有望な治療や検査ツールになり得る。<sup>7)</sup> sdAb を抗体薬やバイオセンサーに応用するためには、sdAb の熱安定性に影響する要因を理解することが重要である。

分子動力学 (MD) シミュレーションは原子分解能でタンパク質の動きとタンパク質とターゲットの相互作用を再現できるため、特に合理的な抗体設計のために抗体システムに広く適用されている。<sup>8,9)</sup> 例えば、著者らは、MD シミュレーションを用いて、抗体の CDR-H3 ループの構造予測、<sup>10)</sup> 抗体と抗原の剛体ドッキングによって生成されるデコイの改良とランキング、<sup>11)</sup> 抗体とアミロイド  $\beta$  ペプチド



**Fig. 1** (A) Multiple sequence alignment of 4id1, 1fvc, 4w70, 1me1, 5sv4, 3b9v, and 4tyu performed by Clustal Omega,<sup>32)</sup> where the consensus symbols shown below the alignment and the residue colors are the defaults by Clustal Omega. The location of the CDR loops is indicated in the figure. (B) Superposition of 4id1, 1fvc, 4w70, 1me1, 5sv4, 3b9v, and 4tyu with the CDR3 loop in red, black, orange, blue, cyan, green, and magenta, respectively. The image was drawn by Molmil<sup>33)</sup> and taken from ref. 1, where the full color version of the figure is available free of charge online.

の複合体構造や親和性予測<sup>12)</sup>を行ってきた。Olsonらは、溶媒を暗に取り扱ったモデルではあるが、sdAbの熱安定性を評価し、実験値との間の定性的な一致を示すことができた。<sup>13)</sup>  $T_m$ は折り畳まれたタンパク質とアンフォールドされたタンパク質が平衡状態になる温度として定義され、実験的方法を使用して原子分解能で折り畳まれた状態とほぐれた状態の両方を測定することは困難である。他方、MDシミュレーションでは構造の温度依存性を直接測定できるが、高スループットのプロトコルで扱うのは困難である。

結果として、実験値の $T_m$ またはその近くの温度(例えば50℃)でMDシミュレーションによって $T_m$ を求めることは、構造転移に膨大な計算時間を要するため、現実的ではない。他方で、高温のMDシミュレーション(例えば400K)は、アミノ酸残基の揺らぎやすさや、天然構造の相互作用が保持されているかどうかなど、タンパク質の分子設計に役立つ情報が得られる。<sup>14)</sup> 著者らは、以前、このような高温のMDシミュレーションを行い、創薬ターゲットであるサイクリン依存性キナーゼ2とその阻害剤や、<sup>15)</sup>βセクレターゼと中分子化合物、<sup>16)</sup>抗体とアミロイドβペプチド<sup>12)</sup>の構造安定性を定性的に推定した。さらに、加水分解酵素であるクチナーゼのカルシウムイオン濃度依存的な安定性を高温のMDシミュレーションから得られた天然コンタクトの割合を表すQ値(式1)によって解析し、実験結果と良く一致することを示した。<sup>17)</sup> 以上から、高温におけるMDシミュレーションと、それに続くQ値による解析の組み合わせにより、タンパク質の安定性に関する情報が得られることが期待される。

本研究では、sdAbの立体構造から $T_m$ を予測するための方法を開発する。Protein Data Bank Japan(PDBj)には、<sup>18,19)</sup>多くのsdAbの構造が登録されているが、 $T_m$ が測られているものは少ない。ここでは、 $T_m$ が既知で、結晶構造が得られ、 $V_{HH}$ または $V_H$ を持つ7個のsdAbをデータセットとして用いる(Fig.1)。これらのデータセットに対して、複数の温度でMDシミュレーションを実施し、相対的な安定性を

予測し実験データと比較する。安定性を評価するパラメータとして、MDの初期構造に対する平均二乗偏差(RMSD)と天然構造とのコンタクトの割合を表すQ値を用い、Q値と $T_m$ の間に良好な相関があることを示す。続いてアミノ酸残基毎にQ値を算出し、不安定性に寄与する残基を特定する。この情報を用いて、アミノ酸残基の変異による安定性の高いsdAbの分子設計を実証するために、いくつかの仮想変異構造を設計する。設計したsdAbに対して、400Kで追加のMDシミュレーションを実行し、熱安定性が向上することを示す。最後に、著者らが仮想で設計した変異体の $T_m$ が著者らの予想通りに向上した実験結果を挙げる。

## 2. データセットとMDシミュレーション

7個のsdAb(PDB ID=4id1[47℃],<sup>20)</sup>1fvc[58℃],<sup>21)</sup>4w70[60℃],<sup>22)</sup>1me1[69℃],<sup>23)</sup>5sv4[71℃],<sup>24)</sup>3b9v[79℃],<sup>25)</sup>4tyu[85℃]<sup>22)</sup>をデータセットとして用いた(Fig.1)。ここで、[]内の数値は $T_m$ で、47℃から85℃と広い範囲に分布している。なお、これらのsdAbの中で、5つは $V_{HH}$ (4id1, 4w70, 1me1, 5sv4, および4tyu)で、2つは $V_H$ (1fvc, 3b9v)である。sdAbが持つ3個のCDRループをCDR1, CDR2, CDR3と記すことにする。これらのCDRループの中で、CDR3は長さやアミノ酸配列に多様性がある(Fig.1A)。

MDシミュレーションのために、個々のsdAbに対して計算系を作成した。カノニカルMDシミュレーション(粒子数、体積、温度一定)を実施し、温度を300K, 400K, 500Kとした。計算時間を各100ns、統計性を得るため初期速度の異なる10個のシミュレーションを実施し、合計21マイクロ秒(100ns×7sdAb×3 temperatures×10 velocities)の計算を実施した。計算にはGromacs 2016プログラムを使用し、十二面体の箱にsdAbを入れ、タンパク質と箱の角の間に少なくとも15Åのマージンを取り、箱の中を0.1Mの食塩水で満たした。

MDシミュレーションの結果をRMSDやQ値<sup>26)</sup>により解析した。Q値は、次式で与えられる。

$$Q = \frac{1}{N} \sum_{(i,j)} \frac{1}{1 + \exp(\beta(r_{i,j}(X) - \lambda r_{i,j}(X^0)))} \quad (1)$$

ここで、 $N$ はアミノ酸残基  $i, j$  の天然構造のコンタクトペアの総数（原子間距離が  $4.5 \text{ \AA}$  以内でコンタクトすると定義する。）、 $r$ は距離、 $X$ はMDトラジェクトリ中のある構造、 $X^0$ は天然構造、 $\beta (=5 \text{ \AA}^{-1})$ はスムージング項、 $\lambda (=1.8 \text{ \AA})$ はコンタクトの揺らぎ項である。構造  $X$  のコンタクトが天然構造に近いほど  $Q$  値は 1 に近く、天然構造のコンタクトが皆無の場合  $Q$  値は 0 となる。なお、 $Q$  値の解析には最終の 30 ns (70 ns から 100 ns) のトラジェクトリデータを用いた。

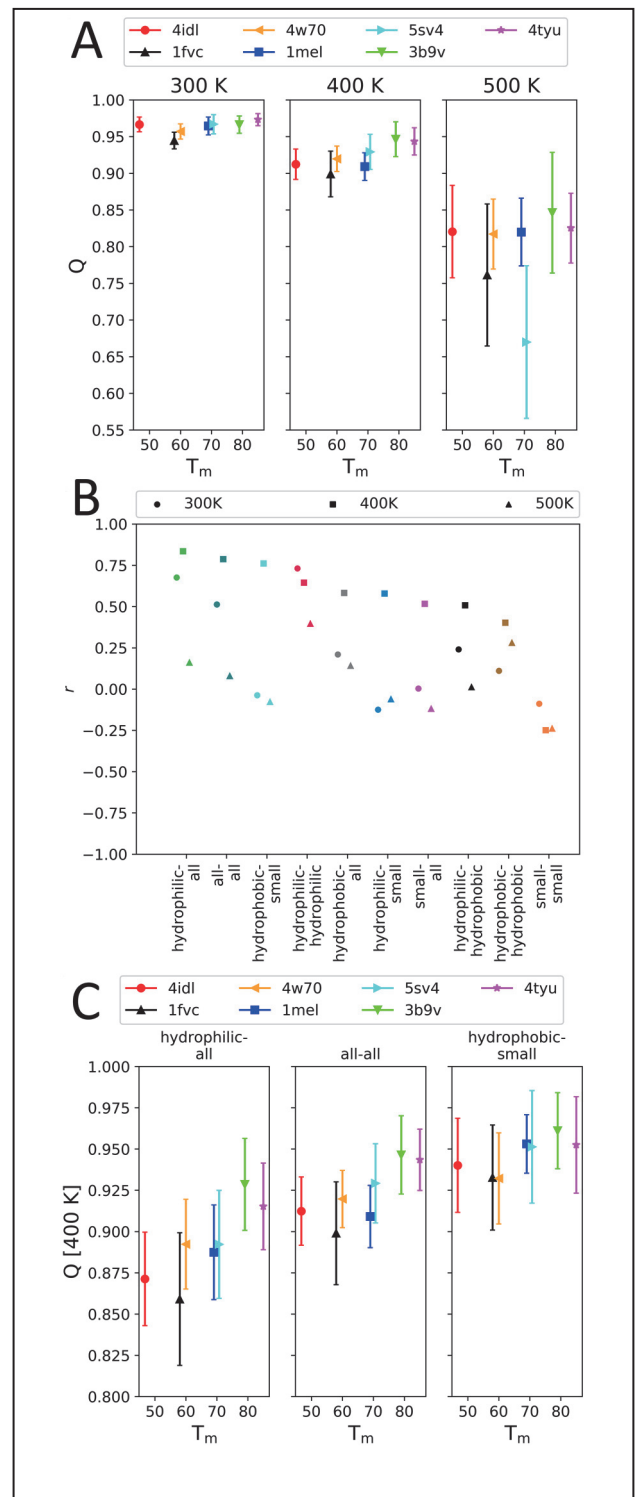
### 3. RMSD と $T_m$ との相関

MD シミュレーションの解析には、初期構造からのずれを解析するために RMSD が良く用いられる。各温度、各 sdAb に対する平均 RMSD を解析し、実験で決定された  $T_m$  と比較した。<sup>1)</sup> 構造は 300 K で結晶構造の周りで揺らぎ、500 K で大きく変化した。RMSD 値は 400 K で 300 K と 500 K の間にあり、中程度の構造変化の誘発していた。しかし、各シミュレーション温度において、抗体間の平均 RMSD の有意差は観察されず、RMSD は  $T_m$  を見積もるための最適なパラメータではないことが示唆された。

### 4. $Q$ 値と $T_m$ との相関

タンパク質のアンフォールディングの程度の測定値である  $Q$  値を計算して、それが  $T_m$  とよく相関するかどうかを判断した。Fig.2A に、各トラジェクトリの最後の 30 ns に対する平均  $Q$  値と標準偏差を、各 sdAb について実験的に決定された  $T_m$  に対してプロットした。シミュレーション温度が高くなると、平均  $Q$  値は小さくなり、偏差は大きくなる。300 K では  $Q$  値と  $T_m$  との間に弱い相関（ピアソン相関係数  $r = 0.51$ ）、400 K では良い相関関係にあり ( $r = 0.79$ )、500 K では無相関 ( $r = 0.08$ ) となった。 $Q$  値による解析と組み合わせた 400 K での MD シミュレーションは、sdAb の熱安定性の良い尺度を提供するように見えるので、以降、400 K でのシミュレーションから得られた結果に焦点を当てる。

熱安定性への寄与をアミノ酸の種類毎に詳細に解析した。Barthelemy らの定義に従って、全アミノ酸残基 all を 3 個のグループ (i-親水性 (Asp, Glu, Gln, Asn, Arg, Lys, His), (ii) 疎水性 (Phe, Tyr, Trp, Leu, Val, Ile, Met, Cys, Pro), (iii) 小型 (Gly, Ala, Ser, Thr) に分類した。<sup>25)</sup> Fig.2B に、各温度での MD シミュレーションから得られた各平均  $Q$  値と実験から得られた  $T_m$  の間の相関係数を示す。ここで、「all-all」はすべての残基のペアの相関係数で、Fig.2A の  $Q$  値と  $T_m$  の相関に対応する。ほとんどのグループでは、400 K シミュレーションから得られた平均  $Q$  値は、他の温度の  $Q$  値よりも実験の  $T_m$  との相関が優れている。親水性-all ペアの  $Q$  値が最良の相関係数を示し、次に all-all ペア、疎水性-小型ペアが続いている。Fig.2C は 400 K のシミュレーションの解析から得られた平均  $Q$  値と標準偏差の  $T_m$  に対するプロットで、親水性残基-all ペアにおいて最良の相関 ( $r = 0.84$ ) を示している。ここでは、1fvc の平均  $Q$  値が低く見積もられたように見える。2 番目に高い相関ペアである all-all ペアは、最も高いペアと同様の傾向を示し、 $r = 0.79$  の相関がある。ここでは、1fvc と 1mel が低く見積もられたように見える。3 番目に高い相関ペアである疎水性-小型ペアは、 $r = 0.76$  の相関がある。これらの 3 つのペアの  $Q$  値の大きさに注目すると、相関が低下するにつれて  $Q$  値が大きくなり、親水性-all ペアが最も小さな平均  $Q$  値を持つことがわかる。



**Fig.2** (A) Average  $Q$  value over the final 30 ns with standard deviation against the experimental  $T_m$  per simulation temperature (300 K, 400 K, 500 K). The data for 4idl, 1fvc, 4w70, 1mel, 5sv4, 3b9v and 4tyu are shown in red circle, black upper triangle, orange leftward triangle, blue square, cyan rightward triangle, green lower triangle and magenta star, respectively, with error bars. (B) Pearson correlation coefficient ( $r$ ) of each average  $Q$  value of the described group pairs to the experimental  $T_m$  for different group combinations and temperatures (300 K, 400 K, 500 K). (C) Average  $Q$  value over the final 30 ns with standard deviation against the experimental  $T_m$  per group pair (top 3 in (B)) for the 400 K simulations. This figure was taken from ref. 1, where the full color version of the figure is available free of charge online.

1fvc と 1mel の 2 つが低く見積もられたが、1fvc の場合は元の結晶構造は V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> の両方で構成され、1mel の場合は元の結晶構造は V<sub>H</sub> と抗原で構成されていた。従って、V<sub>L</sub> や抗原の除去により、1fvc および 1mel は、それぞれの結晶構造に関して安定性に悪影響を与える可能性が高いと考えられる。今回は利用可能なデータセットに限りがあるため、複合体を形成している構造 (1fvc, 1mel) を含めたが、Q 値による解析には孤立した sdAb を使用することが望ましい。

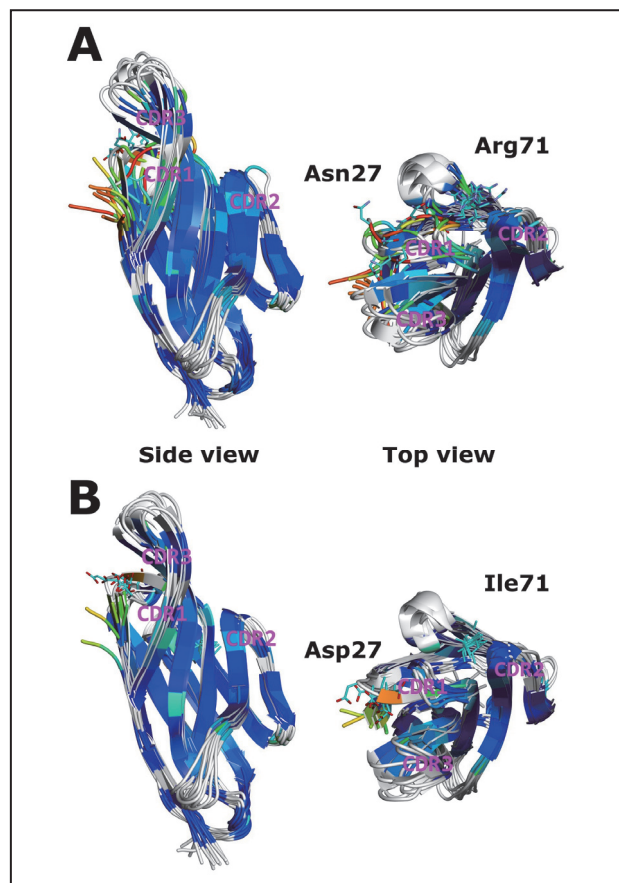
熱安定性への寄与をより詳細に解析するために、アミノ酸残基毎に Q 値を計算した。こうすることで、不安定化に関与する残基を特定することが可能となる。ここでは、400 K の MD シミュレーションの最後の 30 ns で測定された平均 Q 値が 0.6 未満の不安定な残基、つまり、X 線構造に関する天然コンタクトの少なくとも 4 割を失った残基として定義した。4idl を例に説明すると、残基毎に安定性の指標となる Q 値を色分けした結果を Fig.3A に示す。4idl では、16 個の不安定化に関与する残基が同定され、N 末端とその近傍 (Lys1-Gln3), CDR1 (Ala24, Ser25, Asn27, Thr28, Ser30, Ile31), CDR3 (Phe102, Trp107, Tyr110, Glu111) および非 CDR 領域 (Phe62, Arg71, Asn76) が該当した。該当する残基数は T<sub>m</sub> が高いほど減る傾向にあり、最も不安定な 4idl が上記の 16 個となり、最も安定な 3b9v では 7 個にまで減少した。

### 5. パーチャル変異体の作成と熱安定性の評価

ケーススタディとして、最も不安定な 4idl を安定化するパーチャル変異体を作成し、パーチャル変異体の熱安定性の評価を行った。Fig.3A に示した 4idl の構造と安定性の情報に基づいて、熱安定性の向上につながると考えられる 2 つの変異を特定した。Fig.3A に示すように、1 つは非 CDR ループの (Arg71Ile, R71I) であり、もう 1 つは CDR1 の (Asn27Asp, N27D) である。ここで、27 番残基が Arg101 と塩橋を形成するように Asp を、71 番残基が Leu51 と疎水性コンタクトを形成するように Ile を選択した。Q 値による解析を行うため、3 種類のパーチャル変異体を作成した。そのうちの 2 つは単一変異体 (R71I および N27D) で、3 つ目は二重変異体 (R71I/N27D) である。これらに対して、野生株と同じプロトコルを使用して 400 K の MD シミュレーションを実行した。結果として、R71I 変異体は、13 の不安定な残基を持ち、野生型よりも減少した。不安定な残基は、N 末端残基とその近傍 (Lys1-Gln3), CDR1 (Ala24, Ser25, Asn27, Thr28, Ser30, Ile31), CDR3 (Tyr110, Glu111), および非 CDR 領域 (Phe62, Asn76) となった。N27D 変異体では、12 個の不安定な残基が見られ、R71I 変異体と同様に野生型よりも減少した。不安定な残基は、N 末端残基とその近傍 (Lys1-Gln3), CDR1 (Ala24, Ser25, Thr28, Ile31), CDR3 (Tyr110), 非 CDR 領域 (Phe62, Arg71, Asn76, Trp113) となった。N27D/R71I 二重変異体では、9 つの不安定な残基のみが観察され、不安定な残基は N 末端残基とその近傍 (Lys1 と Val2), CDR1 (Thr28 と Ser30), CDR3 (Phe102 と Trp107), および非 CDR 領域 (Arg45, Phe62, Trp113) となった (Fig.3B)。N27D と R71I は野生株に比べて Q 値がわずかに増加したこと (Table 1), 安定性はわずかに増すと予測された。二重変異体では、野生株に比べて Q 値がはるかに増加し (Table 1), T<sub>m</sub> 値が 3m9v や 4tyu の安定性に匹敵する約 80 °C にまで増加すると見積もられた。

### 6. Q 値による熱安定性の解析の意味

上記の通り、MD シミュレーションから得られたトラジェクトリから Q 値を解析し、Q 値と T<sub>m</sub> の間に良い相関



**Fig.3** Average structures obtained during each of the 10 parallel MD trajectories at 400 K for (A) wild type of 4idl and (B) N27D/R71I double mutant, colored by the average per-residue Q-value (0 to 1: red to blue). The CDR regions are indicated in magenta denoted as CDR1, CDR2 and CDR3 and are placed at the top of each loop. The residues involved in our mutations (Asn27 or Asp27, Arg71 or Ile71) are shown. This figure was taken from ref. 1, where the full color version of the figure is available free of charge online.

があることを見出した。T<sub>m</sub> はタンパク質集団の半分が折り畳まれ、もう半分は折り畳まれない状態下の温度に対応するのに対し、Q 値は原子相互作用の観点からタンパク質の構造揺らぎに対応するので、もちろん両者は異なる。最近、Katava らが、構造揺らぎと熱変性の関係を解析し、高速ダイナミクス、すなわち局所的なサブナノ秒の時間スケールの構造揺らぎが立体構造エントロピーに大きく寄与し、タンパク質の熱安定性に影響することを発見した。<sup>27)</sup> さらに、彼らは、ある限られた局所的な部分の構造揺らぎがタンパク質の熱変性を引き起こすことを示唆した。本研究における Q 値を使用した解析により、どの残基が局所的な不安定性に影響するかについての情報が得られ、これを緩和する変異体を実験的に設計した。この局所的な不安定性の改善により、構造揺らぎが全体的に減少し、タンパク質が熱変性を引き起こすのを防いだ。以上から、我々は全体的なタンパク質の安定性と、変異が熱安定性にどの程度影響を与える可能性があるかについて評価する方法を確立した。

### 7. 親水性残基の Q 値

親水性残基から計算された Q 値は、実験の T<sub>m</sub> と高い相関関係を示した (Fig.2B における親水性-all の相関係数 r = 0.84)。全データセットから、不安定な残基の統計を取ると、

**Table 1** Stability statistics of mutation case study with respect to the wild type<sup>1)</sup> and experimental validation results<sup>2)</sup>.

Computational system	Q: hphyl-all	Q: all-all	Q: hphob-small	Experimental $T_m$ (°C)	Experimental folding percentage
4idl WT	0.87 (0.03)	0.91 (0.02)	0.94 (0.03)	48	38
R71I mutant	0.89 (0.03)	0.93 (0.02)	0.95 (0.03)	55	66
N27D mutant	0.89 (0.03)	0.93 (0.02)	0.97 (0.03)	52	69
Double mutant	0.92 (0.02)	0.95 (0.01)	0.97 (0.02)	58	86

Comparison of the 4idl wild type system and our engineered virtual mutants as used in our case study and Zabetakis's validation. Shown are the measured average Q of hydrophilic-all, all-all and hydrophobic-small pairs with their standard deviations in parenthesis and experimental  $T_m$  and folding percentage.

30.5%が親水性残基に、42.1%が疎水性残基に、27.4%が小型残基に対応していた。ただし、高い相関関係を理解するには、各 sdAb 毎に不安定な親水性残基の寄与を比較する必要がある。そうすると、4idl, 1fvc, 4w70, 1mel, 5sv4, 3b9v, 4tyu について、それぞれ 47.2%, 39.7%, 21.5%, 11.8%, 39.2%, 4.5%, 28.1%が親水性である。残基毎、トラジェクトリ毎に算出した安定な親水性残基の割合を見ると、86.9%, 86.8%, 91.5%, 97.1%, 91.7%, 99.4%, 95.7%がそれぞれ 4idl, 1fvc, 4w70, 1mel, 5sv4, 3b9v, 4tyu に対応する。この安定な親水性残基の割合と  $T_m$  の序列から、親水性残基が好ましい相互作用をしているほど、安定性が増すと解釈できる。

## 8. 計算コスト

300 K, 400 K, 500 K で MD シミュレーションを実行した。その結果から、400 K が最も生産的な温度であることが示唆されたため、バーチャル変異体のケーススタディを 400 K のみ実行した。この 400 K におけるシミュレーションは、構造を大きく乱すことなくダイナミクスを加速する方法として機能していたと解釈できる。今後の研究では、400 K のシミュレーションのみに焦点を当てることができる。これにより、計算負荷が軽減され、産業応用が可能になる。計算環境として小規模な GPU ボードを 10 枚搭載した PC クラスタを用いれば、これらのシミュレーションは各変異体について 1 日未満で完了し、sdAb の相対的な安定性とその改善方法に関する知見を迅速に得ることができる。実験的に決定された構造が利用できず Q 値を計算できない場合は、最初に正確なモデルを作成する必要がある。その際の戦略としては、抗体モデリングツールを用いて初期モデルを作成し、<sup>28,29)</sup> 続いて、マルチカノニカル MD のような構造予測精度が高い方法で質の高いモデルを作成する<sup>10)</sup> ことを推奨する。

## 9. 実験による計算結果の検証

本研究の出版後まもなく、Zabetakis らが本研究の計算結果の実験による検証に関する論文を出版した。<sup>2)</sup> Zabetakis らは、4idl 構造に対応する A9 抗体の WT と我々が提案した N27D 変異体、R71I 変異体、N27D/R71I 二重変異体の  $T_m$  とリフォールディングの割合を測定した (Table 1)。 $T_m$  は、WT が 48 °C に対して、N27D 変異体が 55 °C、R71I 変異体が 52 °C、N27D/R71I 二重変異体が 58 °C となり、全ての変異体において  $T_m$  が増加し、安定性が向上した。この安定性の向上は我々の計算結果と一致しており、我々の予測結果が正しいことが示された。特筆すべきは変異体のリフォールディングの割合で、WT が 38% に対して、N27D 変異体が 66%、R71I 変異体が 69%、N27D/R71I 二重変異体が 86% となった。この結果は、我々が提案した変異により、熱変性に強い抗体が生産されたことを示す。以上から我々

の計算結果の妥当性が第三者の Zabetakis らにより確かめられた。もちろん、抗体のデザインにおいては、熱安定性だけではなく抗原との親和性を向上することが必要であるので、<sup>30)</sup> 変異の作成の際には安定性以外の要素にも注意を払う必要がある。

## 10. Q 値による解析の適用範囲と今後の展望

sdAb を対象とした熱安定性の評価法を記したが、このアプローチは広範囲のシステムにも適用できると考えている。我々は実際に、MD によるドッキングシミュレーション (ダイナミック・ドッキング) から得られた、キナーゼと低分子化合物、 $\beta$ セクレターゼと中分子化合物および抗体薬と抗原ペプチドの複合体構造を対象として、それらの安定性の評価に本法を適用し、天然の複合体構造に近い予測構造が最も安定であることを示すことができた。<sup>12,15,16)</sup> また、PET 加水分解酵素クチナーゼのカルシウムイオン濃度に依存する熱安定性を、Q 値ベースの解析手法によって、評価することに成功した。<sup>17)</sup> 従って、我々のプロトコルは、この研究で説明した範囲を超えて、安定性推定のための幅広い用途があると確信しており、将来の研究でこのプロトコルを多くの系に適用し、より良いものにするつもりである。なお、本研究の研究結果は、The Biological Structure Model Archive<sup>31)</sup> に公開されている (<https://bsma.pdbj.org/entry/1>)。

## 謝 辞

本研究は、大阪大学蛋白質研究所の Gert-Jan Bekker 特任助教とアメリカ合衆国ジョージア工科大学の Benson Ma 修士との共同で行った (大阪大学蛋白質研究所共同利用番号 CR-19-05, CR-20-05)。本研究を実施する上で、HPCI の計算機リソースを使用し (課題番号 hp190027, hp200025)、科研費基盤研究 B (課題番号 JP20H03229) の支援を受けた。

## 文 献

- 1) G.-J. Bekker, B. Ma, and N. Kamiya, *Protein Sci.* **28**, 429–438 (2019).
- 2) D. Zabetakis, L. C. Shriver-Lake, M. A. Olson, E. R. Goldman, and G. P. Anderson, *Protein Sci.* **28**, 1909–1912 (2019).
- 3) A. W. P. Vermeer and W. Norde, *Biophys. J.* **78**, 394–404 (2000).
- 4) E. R. Goldman, G. P. Anderson, J. L. Liu, J. B. Delehanty, L. J. Sherwood, L. E. Osborn, L. B. Cummins, and A. Hayhurst, *Anal. Chem.* **78**, 8245–8255 (2006).
- 5) R. H. J. van der Linden, L. G. J. Frenken, B. de Geus, M. M. Harmsen, R. C. Ruuls, W. Stok, L. de Ron, S. Wilson, P. Davis, and C. T. Verrips, *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1431**, 37–46 (1999).

- 6) J. M. J. Perez, J. G. Renisio, J. J. Prompers, C. J. van Platerink, C. Cambillau, H. Darbon, and L. G. J. Frenken, *Biochemistry*. **40**, 74–83 (2001).
- 7) J. Wesolowski, V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D. V Serreze, F. A. Goldbaum, F. Haag, and F. Koch-Nolte, *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 157–174 (2009).
- 8) D. Kuroda, H. Shirai, M. P. Jacobson, and H. Nakamura, *Protein Eng. Des. Sel.* **25**, 507–522 (2012).
- 9) T. Yamashita, *Int. Immunol.* **30**, 133–140 (2018).
- 10) H. Nishigami, N. Kamiya, and H. Nakamura, *Protein Eng. Des. Sel.* **29**, 477–484 (2016).
- 11) N. Shimba, N. Kamiya, and H. Nakamura, *J. Chem. Inf. Model.* **56**, 2005–2012 (2016).
- 12) G.-J. Bekker, I. Fukuda, J. Higo, and N. Kamiya, *Sci. Rep.* **10**, 1406 (2020).
- 13) M. A. Olson, D. Zabetakis, P. M. Legler, K. B. Turner, G. P. Anderson, and E. R. Goldman, *Protein Eng. Des. Sel.* **28**, 395–402 (2015).
- 14) M. C. Childers, and V. Daggett, *Mol. Syst. Des. Eng.* **2**, 9–33 (2017).
- 15) G.-J. Bekker, N. Kamiya, M. Araki, I. Fukuda, Y. Okuno, and H. Nakamura, *J. Chem. Theory Comput.* **13**, 2389–2399 (2017).
- 16) G.-J. Bekker, M. Araki, K. Oshima, Y. Okuno, and N. Kamiya, *J. Phys. Chem. B.* **123**, 2479–2490 (2019).
- 17) S. Inaba, N. Kamiya, G.-J. Bekker, F. Kawai, and M. Oda, *J. Therm. Anal. Calorim.* **135**, 2655–2663 (2019).
- 18) A. R. Kinjo, G.-J. Bekker, H. Suzuki, Y. Tsuchiya, T. Kawabata, Y. Ikegawa, and H. Nakamura, *Nucleic Acids Res.* **45**, D282–D288 (2017).
- 19) A. R. Kinjo, G.-J. Bekker, H. Wako, S. Endo, Y. Tsuchiya, H. Sato, H. Nishi, K. Kinoshita, H. Suzuki, T. Kawabata, M. Yokochi, T. Iwata, N. Kobayashi, T. Fujiwara, G. Kurisu, and H. Nakamura, *Protein Sci.* **27**, 95–102 (2018).
- 20) P. M. Legler, D. Zabetakis, G. P. Anderson, A. Lam, W. G. J. Hol, and E. R. Goldman, *Acta Crystallogr. Sect. F-Structural Biol. Cryst. Commun.* **F69**, 90–93 (2013).
- 21) C. Eigenbrot, M. Randal, L. Presta, P. Carter, and A. A. Kossiakoff, *J. Mol. Biol.* **229**, 969–995 (1993).
- 22) J. George, J. R. Compton, D. H. Leary, M. A. Olson, and P. M. Legler, *Proteins-Structure Funct. Bioinforma.* **82**, 3101–3116 (2014).
- 23) A. Desmyter, T. R. Transue, M. A. Ghahroudi, M. H. D. Thi, F. Poortmans, R. Hamers, S. Muyltermans, and L. Wyns, *Nat. Struct. Biol.* **3**, 803–811 (1996).
- 24) P. M. Legler, J. R. Compton, M. L. Hale, G. P. Anderson, M. A. Olson, C. B. Millard, and E. R. Goldman, *MAbs.* **9**, 43–57 (2017).
- 25) P. A. Barthelemy, H. Raab, B. A. Appleton, C. J. Bond, P. Wu, C. Wiesmann, and S. S. Sidhu, *J. Biol. Chem.* **283**, 3639–3654 (2008).
- 26) R. B. Best, G. Hummer, and W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 17874–17879 (2013).
- 27) M. Katava, G. Stirnemann, M. Zanatta, S. Capaccioli, M. Pachetti, K. L. Ngai, F. Sterpone, and A. Paciaroni, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 9361–9366 (2017).
- 28) B. D. Weitzner, D. Kuroda, N. Marze, J. Q. Xu, and J. J. Gray, *Proteins-Structure Funct. Bioinforma.* **82**, 1611–1623 (2014).
- 29) K. Yamashita, K. Ikeda, K. Amada, S. D. Liang, Y. Tsuchiya, H. Nakamura, H. Shirai, and D. M. Standley, *Bioinformatics.* **30**, 3279–3280 (2014).
- 30) M. C. Julian, L. Li, S. Garde, R. Wilen, and P. M. Tessier, *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
- 31) G.-J. Bekker, T. Kawabata, and G. Kurisu, *Biophys. Rev.* **12**, 371–375 (2020).
- 32) F. Sievers, and D. G. Higgins, in *Multiple Sequence Alignment Methods*, D. J. Russell, Ed. (Humana Press Inc, [Sievers, Fabian; Higgins, Desmond G.] Univ Coll Dublin, Conway Inst, Dublin 2, Ireland. Sievers, F (reprint author), Univ Coll Dublin, Conway Inst, Dublin 2, Ireland., 2014), vol. 1079 of *Methods in Molecular Biology*, pp. 105–116.
- 33) G.-J. Bekker, H. Nakamura, and A. R. Kinjo, *J. Cheminform.* **8**, 42 (2016).



神谷 成敏  
Narutoshi Kamiya  
E-mail: n.kamiya@sim.u-hyogo.ac.jp