

Winmostar チュートリアル

Fragment ER法による結合自由エネルギー計算

V7.024

株式会社クロスアビリティ

question@winmostar.com

2017/8/2

動作環境設定(1)

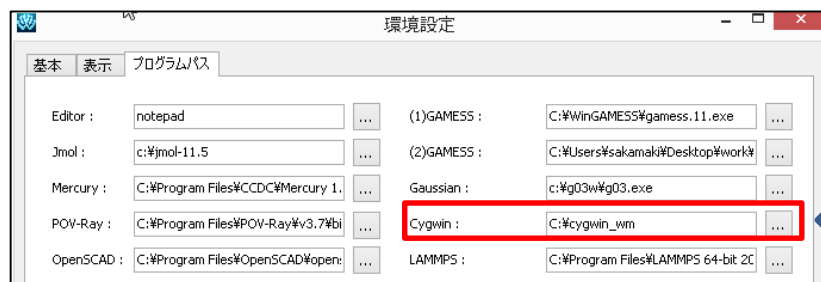
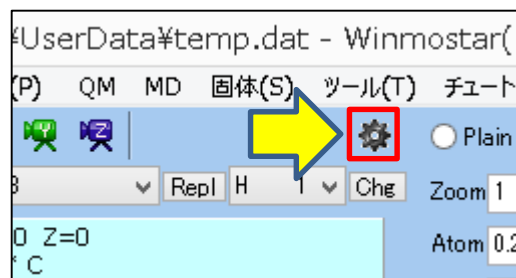
本機能を用いるためには、Cygwin及びNAMDのセットアップが必要です。

- https://winmostar.com/jp/gmx4wm_jp.htmlから、Cygwinの自己解凍書庫(exe)を入手し実行してください。

1. 簡易インストール方法(Windows)

下記リンクから各パッケージがコンパイル済のCygwinの自己解凍書庫をダウンロードし、実行します。
cygwin_wm_v7_20170510.exe(463MB)
これにより、GROMACS, Amber(sander)の実行に必要な環境(Cygwin,Acypypeなど)が全て整います。
※ダウンロードや実行が上手くいかない場合は、他のブラウザをお試しください。

- デフォルトではC:¥直下にインストールされますが、Winmostarの環境設定の[プログラムパス]>[Cygwin]を変更することで任意の場所にインストール可能です。



動作環境設定(2)

本機能を用いるためには、Cygwin及びNAMDのセットアップが必要です。

NAMDのインストールマニュアル

https://winmostar.com/jp/NAMD_install_manual_jp_win.pdf

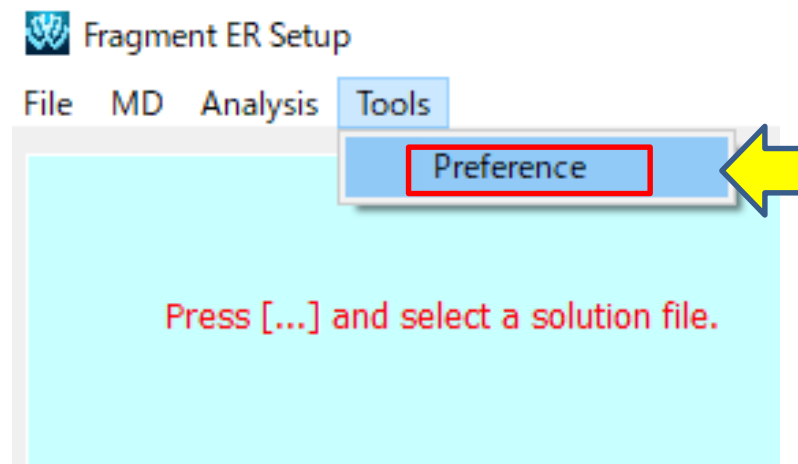
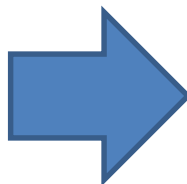
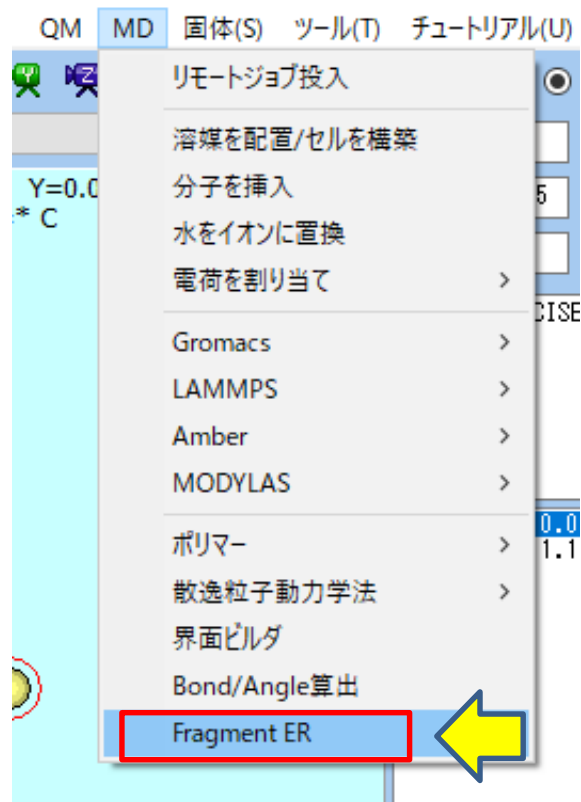
に従い、NAMDをインストールします。

※PCにNVIDIAのGPUが付属している場合は、Win64-CUDAを使用するとGPUを使った高速計算が可能です。ただし、その場合計算が不安定になりやすいため、パラメータの調整等が必要になる場合があります。そのため、ここではWin64を使用してください。

動作環境設定(3)

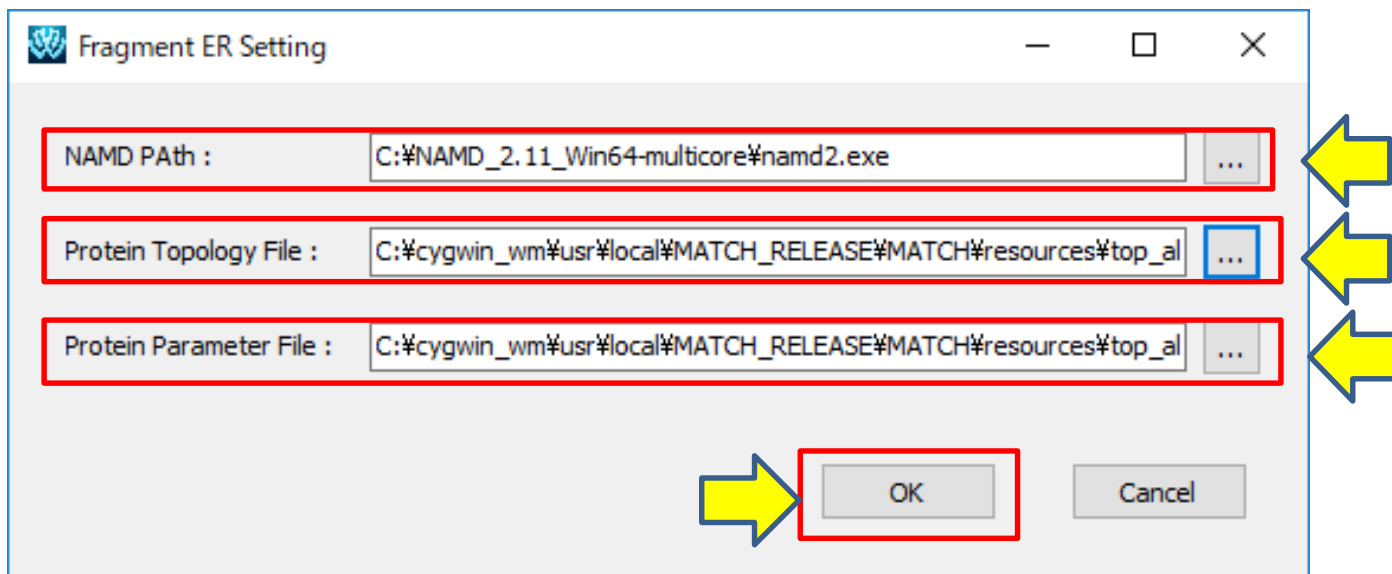
1. Winmostarで[MD]>[Fragment ER]を選択します。
2. Fragment ER画面で[Tool]>[Preference]を選択します。

star (QM/MD/SOLID/FER) V7.020



動作環境設定(4)

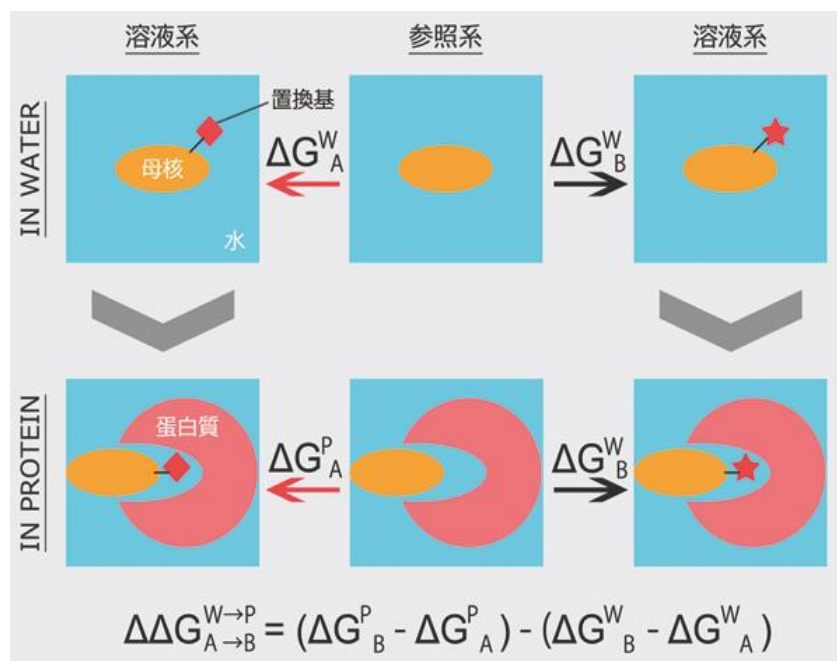
3. Fragment ER Setting画面でインストールしたNAMDの実行ファイルを[NAMD Path]に設定します。
4. Cygwinのインストール場所がデフォルトと違う場合は、タンパク質用のトポロジーとパラメータファイルのパスを修正します。
5. [OK]をクリックします。



Fragment ER法について

- Fragment ER法[1]はリガンド・タンパク質複合体において、リガンドの置換基の変更に伴う結合自由エネルギー差を計算する手法です。

$$\Delta G = \int \phi P(\phi) d\phi + k_B T \int P(\phi) \log \left(\frac{P(\phi)}{P_0(\phi)} \right) d\phi + \int \Delta v(\phi) P(\phi) d\phi$$



この項の計算には一部改変したエネルギー表示法(ER法[2])を用います。

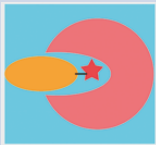
[1] 増田友秀, 谷村隆次, 松林伸幸 "拡張エネルギー表示法による結合自由エネルギー計算方法の開発" 第29回分子シミュレーション討論会(2015).

[2] N. Matubayasi et al., J.Chem.Phys..113, 6070(2000); 117, 3605 (2002); 119, 9686(2003).

処理フロー

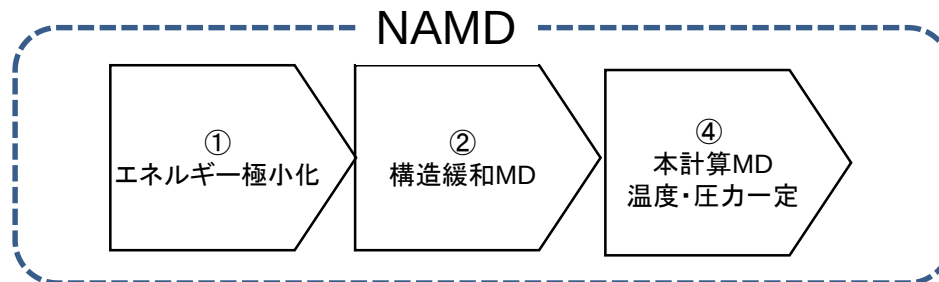
	操作手順	内容
I. モデル作成	Winmostarメイン画面での操作	不要なデータの削除 水素付加
II. 計算設定	Fragment ER画面での操作	モデルの読み込み 置換基の設定 原子タイプのチェック、MD入力ファイルの作成
III. MD計算	[MD]> [NAMD Keywords Setup] [Run NAMD]	各系のMD計算を実行して、分子の時々刻々の位置・速度(スナップショット)を取得
IV. 自由エネルギー計算	[Analysis]> [Calculate Free Energy]	スナップショットから結合自由エネルギーを計算
V. 結果の表示	[Analysis]> [Edit .log file] [Import Result]	計算した結合自由エネルギーやエネルギー分布関数を表示

MD計算を行う系

	リガンド	母核のみ
水＋タンパク＋リガンド (In-protein)		
水＋リガンド (In-aqua)		
リガンド (In-vacuo)		計算不要

MD計算は各リガンドについて、タンパクがある場合(In-protein)とない場合(In-aqua)の他、参照用に母核のみの計算をする必要があります。また、真空中でのリガンドのみのMD計算(In-vacuo)もする必要があります。置換基の種類が2つの場合は合計8回のMD計算が必要です。置換基の種類数に応じて、3回ずつ必要な計算が増えていきます。

各MD計算の手順



① エネルギー極小化計算

In-aqua, In-vacuoではすべての原子を一度に極小化しますが、In-proteinでは(1)水分子と水素原子、(2)水分子と水素原子と側鎖、(3)全ての原子、の順に少しずつ極小化を行います。

② 構造緩和MD(温度・圧力一定)

In-aquaではすべて等温でMD計算しますが、In-proteinでは低温から徐々に温度を増加させて最終的に目標の温度でMD計算を行います。

In-vacuoでは構造緩和は行いません。

③ 本計算MD(温度・圧力一定)

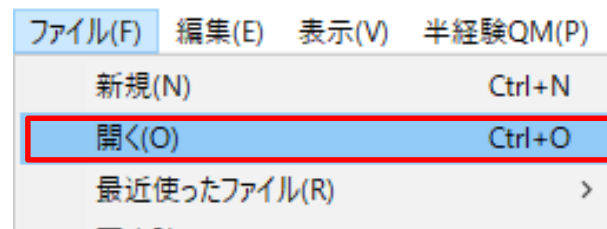
高精度に計算するためには大量のスナップショットが必要です。そのため、ステップ数も多くなります。

※Fragment ER自体はこのような手順を必ず踏まなければならないわけではありませんが、標準的な方法の一つとして上記の手順のUIが用意されています。

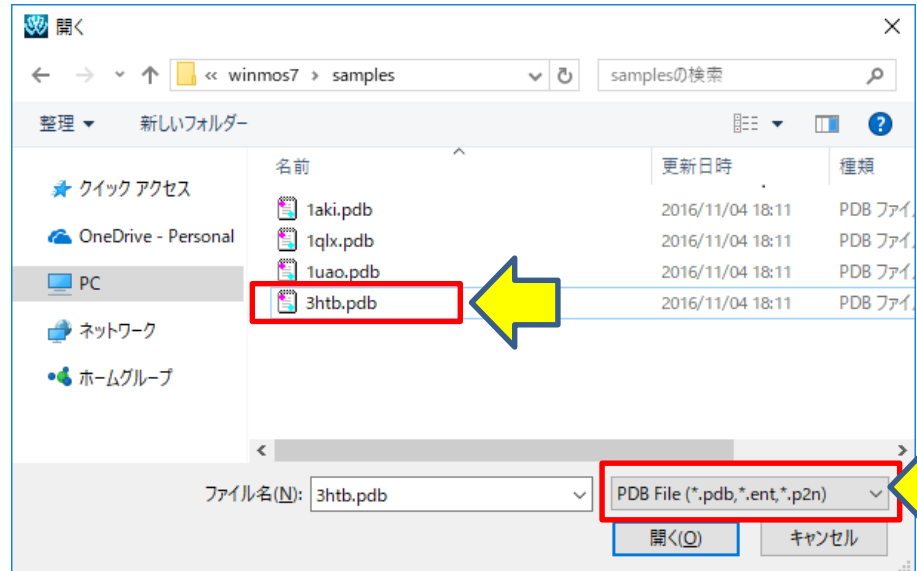
I. モデル作成(1)

計算対象となるタンパク質とリガンドのモデルを作成します。

1. Winmostarメイン画面にて[ファイル]
>[開く]メニューを選択します。



2. [ファイルの種類]を[PDB
File(*.pdb,*ent,*p2n)]に変更してから
C:¥winmos7¥samples¥3htb.pdbを選
択します。



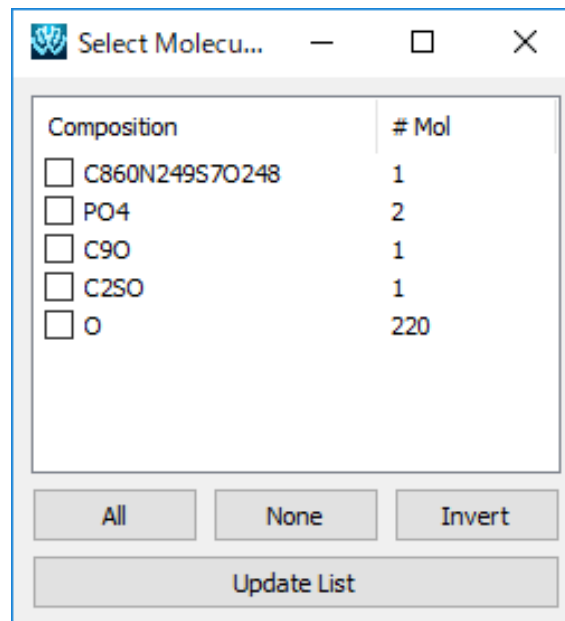
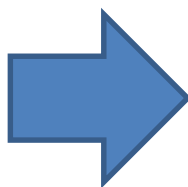
I. モデル作成(2)

3. [編集]>[分子種単位で選択]を選択します。

分子の組成式と数が表示されます。

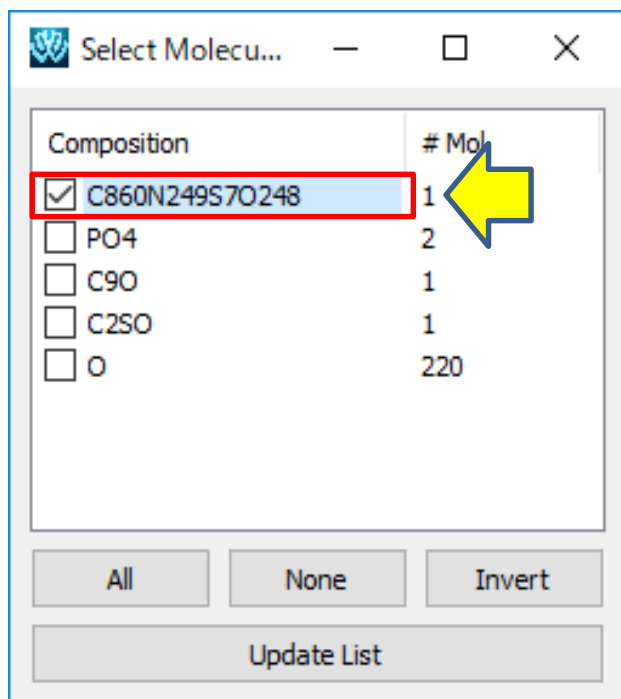
C860N249S7O248がタンパクで、PO4が2つとC9O、C2SO、O(水素原子のない水分子)が220個含まれていることがわかります。

タンパクとC9Oをリガンドとして使用するため、それぞれを分けて保存することにします。

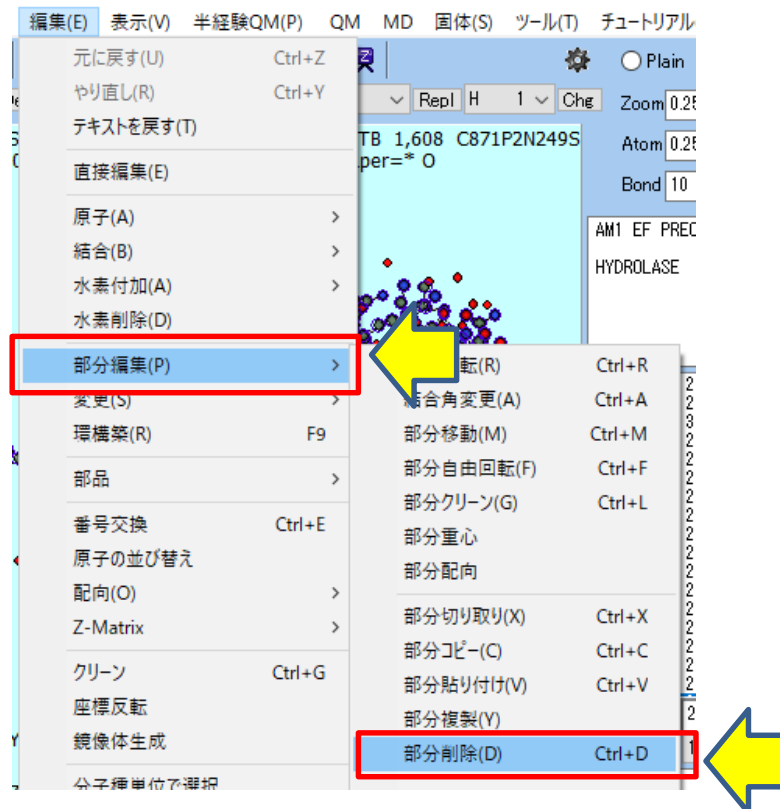


I. モデル作成(3)

4. まずはタンパクのデータを作成します。
C860N249S7O248をチェックします。

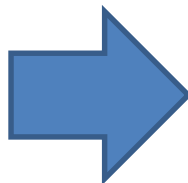
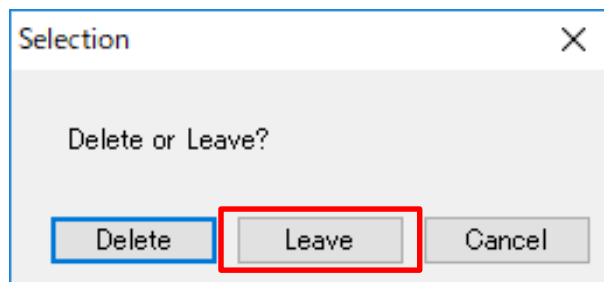


5. Select Molecules画面を開いたまま、メインメニューの[編集]>[部分編集]>[部分削除]を選択します。

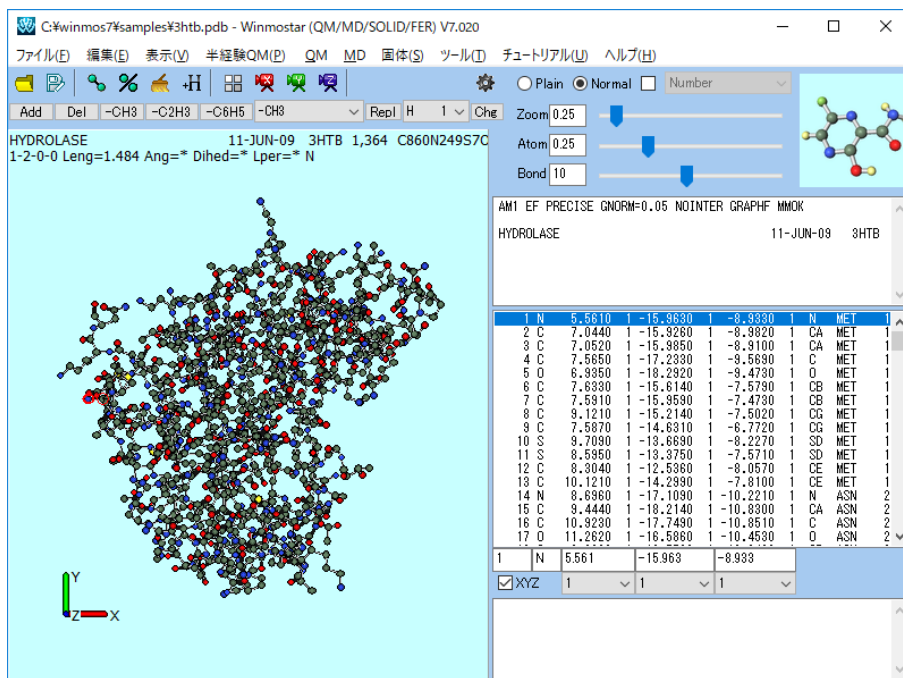


I. モデル作成(4)

6. Selection画面で[Leave]をクリックします。



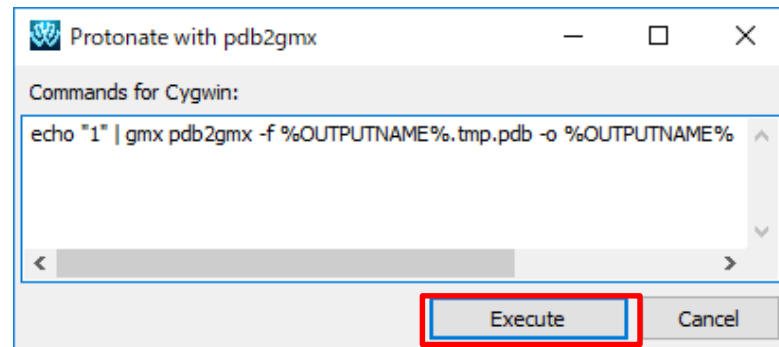
7. タンパクのみが残ります。
Select Molecules画面を閉じます。



I. モデル作成(5)

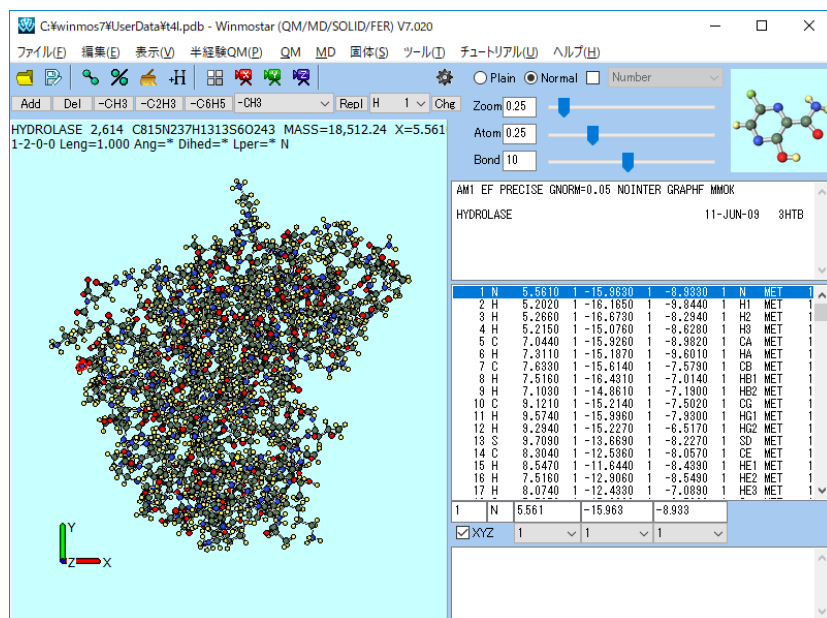
8. このままでは水素がありません。
[編集]>[水素付加]>[pdb2gmxを使用]
[使用]を選択します。

9. [Execute]をクリックします。

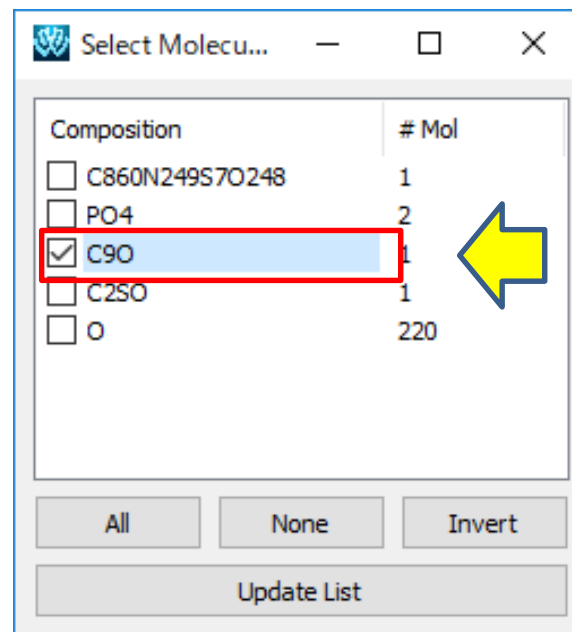


I. モデル作成(6)

10. 水素が付加されます。
[ファイル]>[名前をつけて保存]で
C:\¥winmos7¥UserData¥t4l.pdbとして
保存しておきます。



11. 次にリガンドのデータを作成します。
C:\¥winmos7¥samples¥3htb.pdbを開
き直して、[編集]>[分子種単位で選択]
を選択し、C9Oをチェックします。

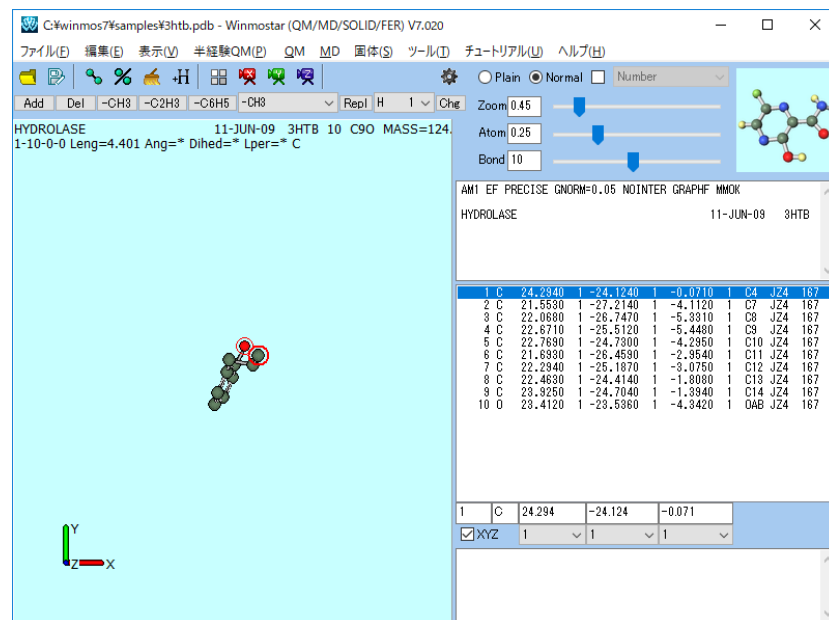
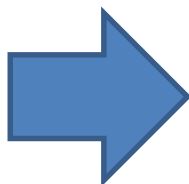
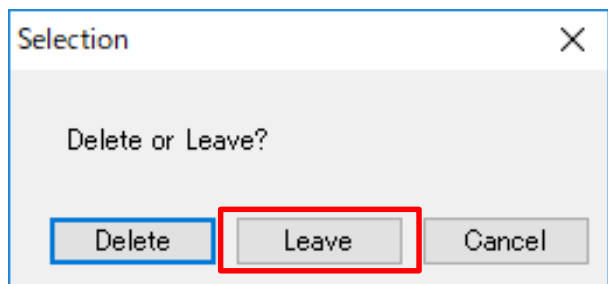


I. モデル作成(7)

12. 先ほどと同様に、Select Molecules画面を開いたまま、メインメニューの[編集]>[部分編集]>[部分削除]を選択します。

13. Selection画面で[Leave]をクリックします。

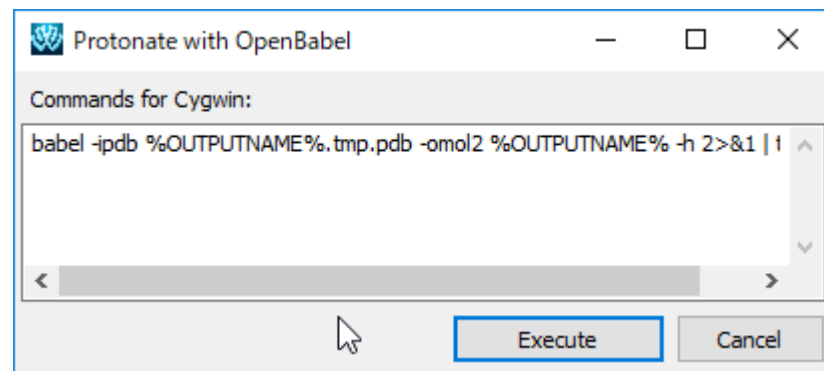
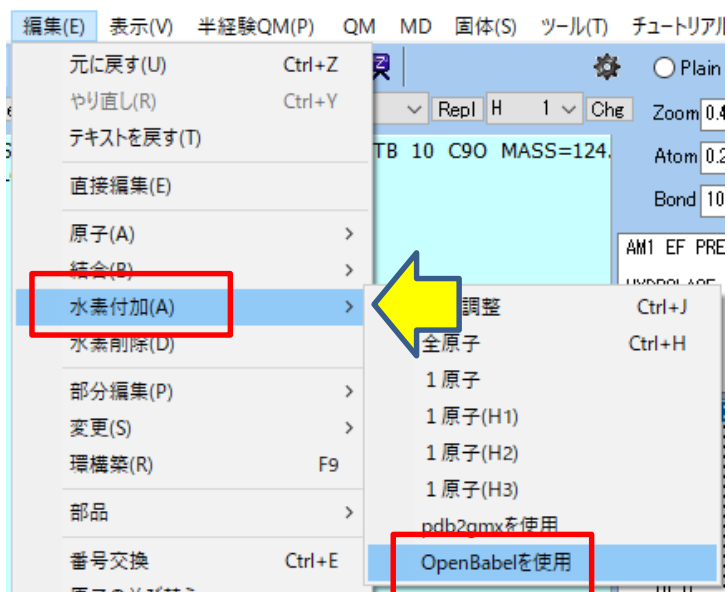
14. リガンドのみが残ります。
Select Molecules画面を閉じます。



I. モデル作成(8)

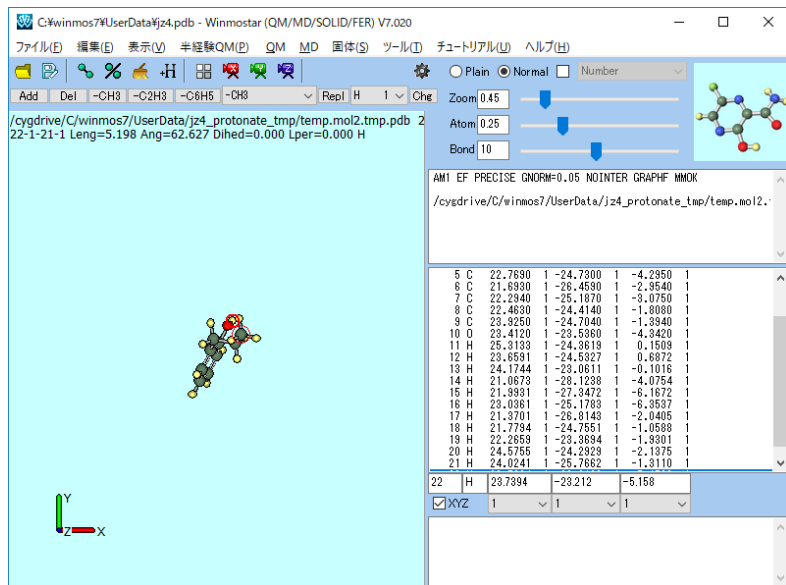
15. このままでは水素がありません。
[編集]>[水素付加]>[OpenBabelを使用]
を使用]を選択します。

16. [Execute]をクリックします。



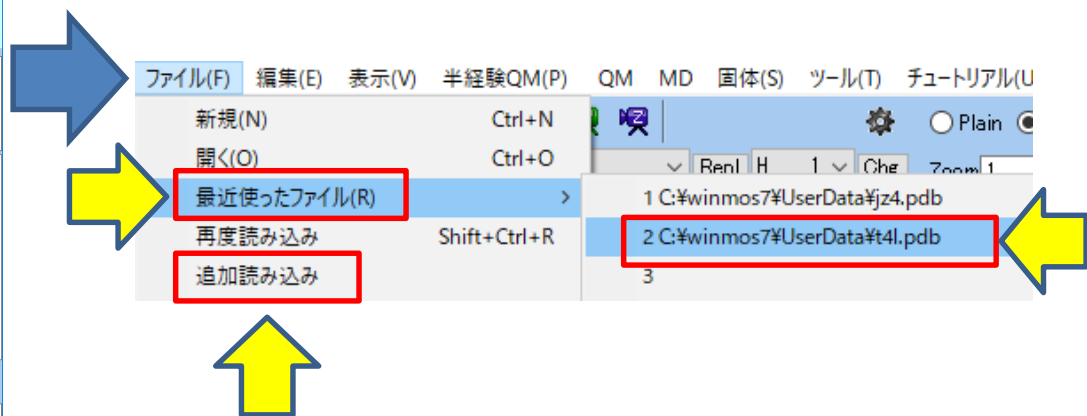
I. モデル作成(9)

17. 水素が付加されます。
[ファイル]>[名前をつけて保存]で
C:¥winmos7¥UserData¥jz4.pdbとし
て保存しておきます。



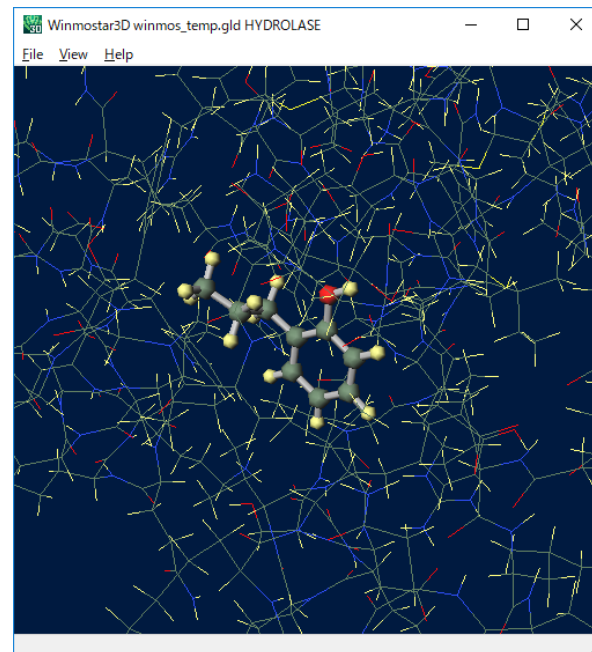
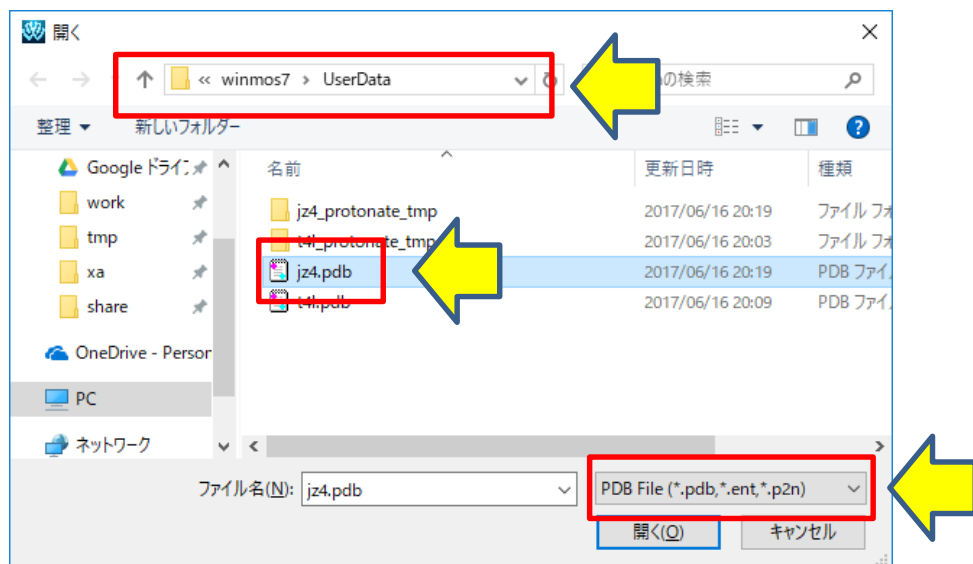
18. タンパクとリガンドを結合した系を作成
します。

[ファイル]>[最近使ったファイル]>
[C:¥winmos7¥UserData¥t4l.pdb]を選択
した後、
[ファイル]>[追加読み込み]を選択します。



I. モデル作成(10)

19. C:\winmos7\UserData\jz4.pdbを選択します。



20. タンパクにリガンドが付加されます。

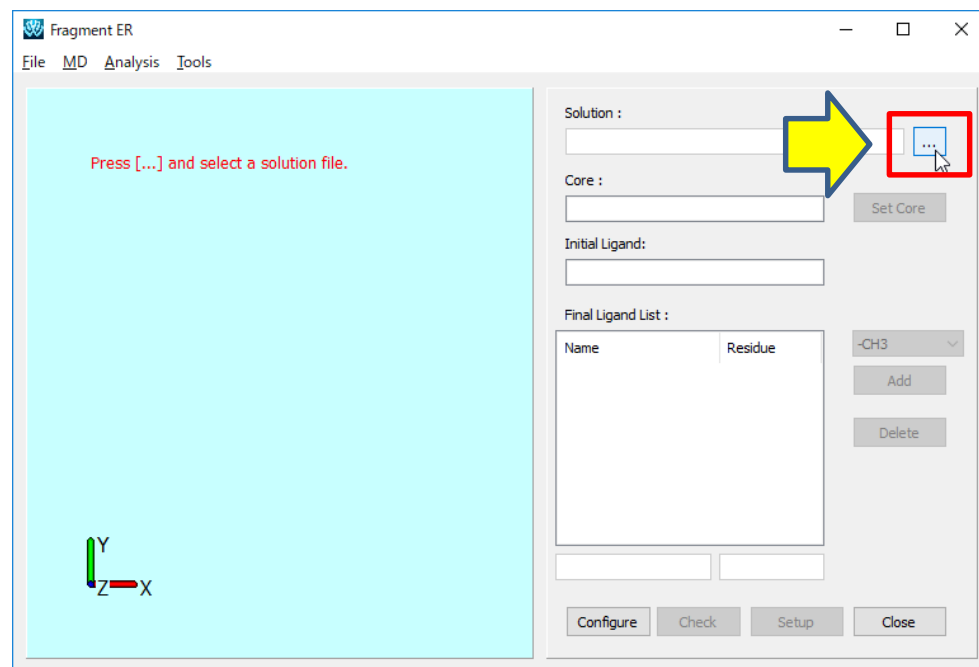
右上図は3D表示でタンパクのみワイヤースケルトンで描画したものです。

[ファイル]>[名前をつけて保存]でC:\winmos7\UserData\t4l_jz4.pdbとして保存します。

II. 計算設定(1)

1. メインメニューの[MD]>
[Fragment ER]を選択します。

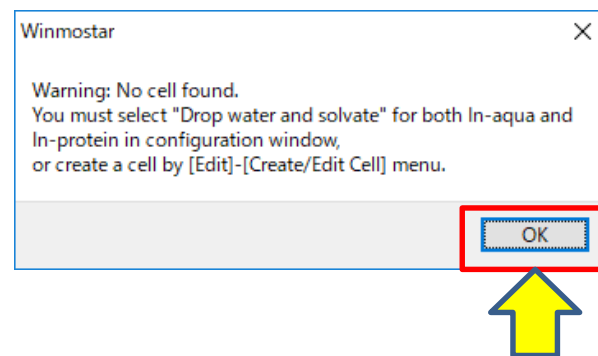
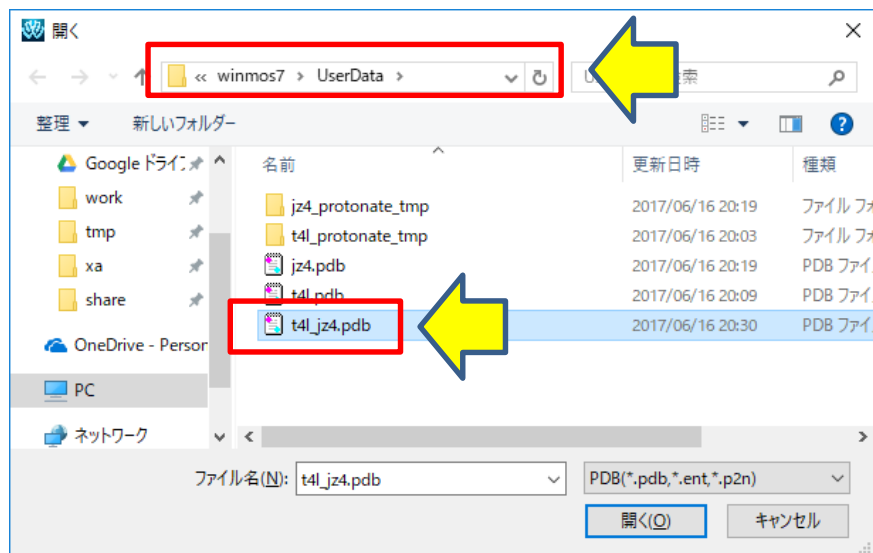
2. Fragment ER画面のSolutionの[...]ボタンをクリックします。



II. 計算設定(2)

3. C:\¥winmos7¥UserData¥t4l_jw4.pdbを選択します。

4. 読み込んだファイルに周期境界セルがないため警告がでますが、後ほど作成するため問題ありません。
[OK]をクリックして先に進みます。



II. 計算設定(3)

5. 水素付加の際に残基情報が欠落したため、初期リガンドがMOLとして読み込まれます。
わかりづらいので、[Name]と[Residue]を共にJZ4に変更します。

Solution :
C:\winmos7\UserData\4l_jz4.pdb ...

Core :
[] Set Core

Initial Ligand:
JZ4 JZ4

Final Ligand List :

Name	Residue
JZ4	JZ4

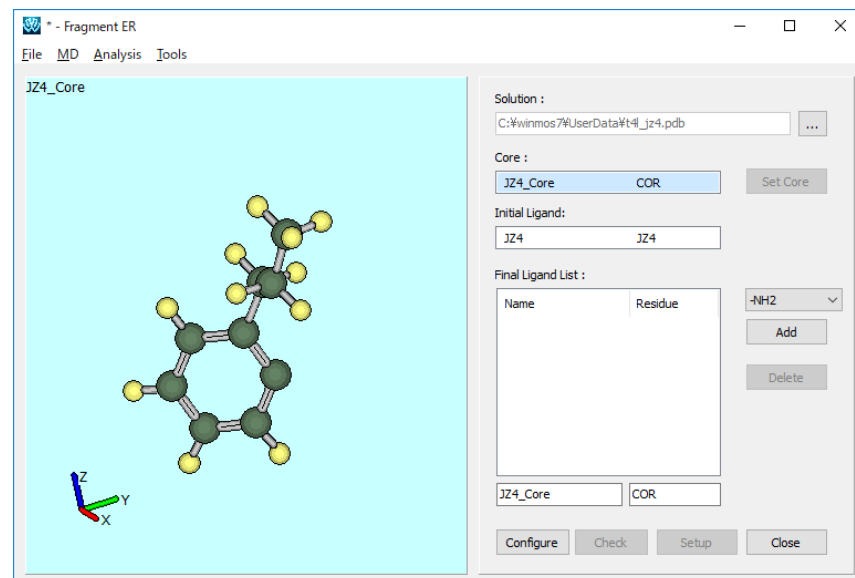
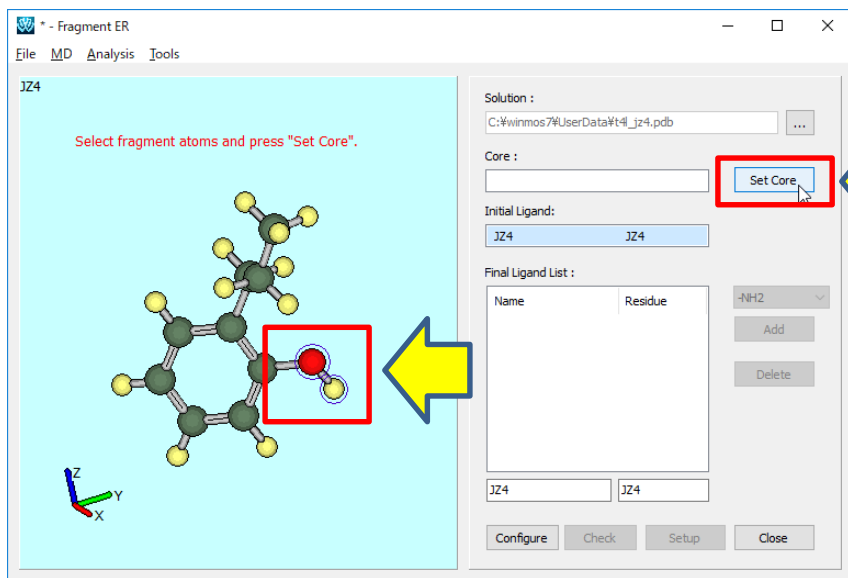
-NH2 ▾
Add
Delete

Configure Check Setup Close

II. 計算設定(4)

6. 水酸基を置換基として設定します。
酸素原子と水素原子をクリックして青丸
で囲い、[Set Core]をクリックします。

水酸基以外の部分が母核として設
定されます。



II. 計算設定(4)

7. 新しい置換基に-NH2基を設定します。
コンボボックスでNH2を選択して、[Add]をクリックします。

The image shows two screenshots of the X-Ability software interface. The left screenshot shows the 'Final Ligand List' table with the following structure:

Name	Residue
-	

The '-NH2' dropdown menu is highlighted with a red box, and the 'Add' button is highlighted with a yellow arrow. A blue arrow points to the right screenshot, which shows the resulting 3D molecular model of JZ4_Core-NH2. The right screenshot shows the 'Final Ligand List' table with the following structure:

Name	Residue
JZ4_Core-NH2	LG1

The 'Add' button is highlighted with a blue box in the right screenshot.

比較したい置換基は[Add]で追加することができます。(ここではNH2のみにします)
また、Core、Initial Lingad、Final Ligand Listのエディットボックスなどを選択することによって画面に表示される分子を切り替えることができます。

II. 計算設定(5)

8. [Configure]をクリックします。

Solution :
C:\winmos7\UserData\t4\jz4.pdb

Core :
JZ4_Core COR Set Core

Initial Ligand:
JZ4 JZ4

Final Ligand List :

Name	Residue
JZ4_Core-NH2	LG1

-NH2 Add Delete

JZ4_Core-NH2 LG1

Configure Check Setup Close

9. [Drop water and solvate for In-protein]を選択します。
[OK]をクリックします。

Fragment ER Configuration

Solvation

☒ Drop water and solvate for In-protein

☒ Drop water and solvate for In-aqua

Distance from solute to cell boundaries [Å] 10

Forcefield for Ligands : top_all36_cgenff_new

N-terminal modification Default

C-terminal modification Default

Import Trajectory Interval 1

ERmod

of bins for binding energy 10

of insertions for solute (maxins) 1

of divisions of the simulation (engdiv) 10

of OpenMP threads (for local run) 1

of MPI processes (for remote run) 1

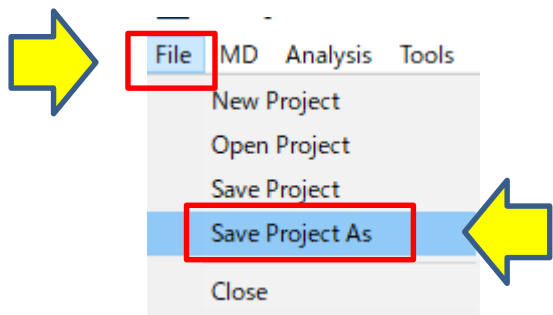
OK Cancel

[Drop water and solvate for In-protein]を選択した場合、In-proteinでは新たに水を付加し直して周期境界セルを作成します。

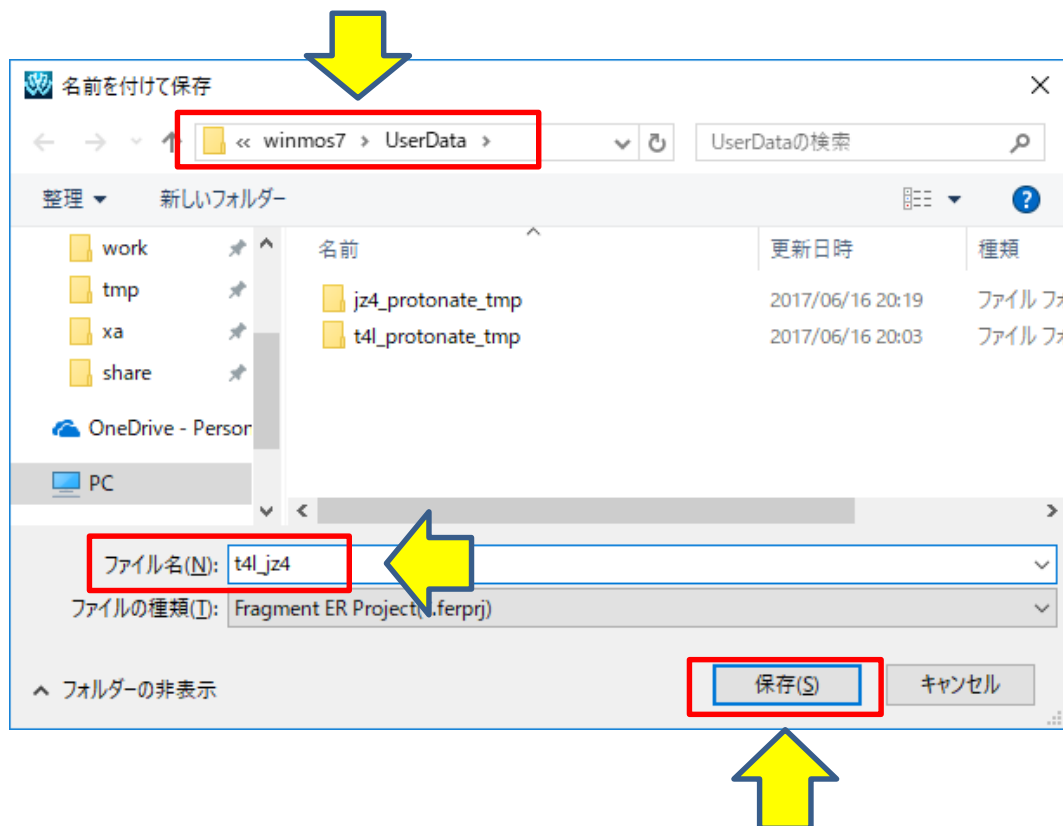
予め水分子を付加してある場合は、それをそのまま使用することもできます。

II. 計算設定(6)

10. ここで一旦プロジェクトを保存します。
[File]>[Save Project As]メニューを選択
します。



11. C:\¥winmos7¥UserData¥t4l_jz4.ferprj
として保存します。



II. 計算設定(7)

12. [Check]をクリックします。

Solution :
C:\winmos7\UserData\t4l_jz4.pdb ...

Core :
JZ4_Core COR Set Core

Initial Ligand:
JZ4 JZ4

Final Ligand List :

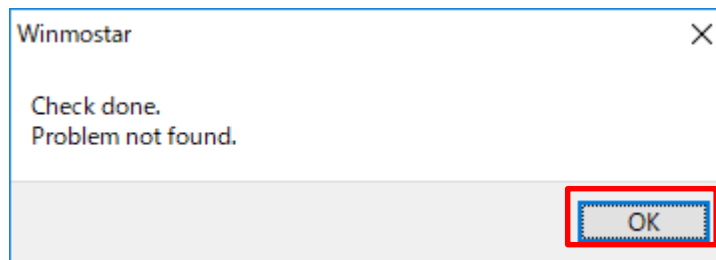
Name	Residue
JZ4_Core-NH2	LG1

-NH2 ▼
Add
Delete

JZ4_Core-NH2 LG1

Configure **Check** Setup Close

問題なければ、下のようなメッセージが表示されます。
[OK]をクリックして閉じます。



Fragment ERでは全てのリガンドの共通部分(母核部分)の原子タイプが一致している必要がありますが、付加される置換基によって変わる可能性があります。
[Check]では、各リガンドの力場ファイルが3htb_jz4_fer\CHECKフォルダに生成されます。
生成した力場ファイルから原子タイプの整合性をチェックします。

II. 計算設定(8)

13. [Setup]をクリックします。

Solution :
C:\winmos7\UserData\t4\jz4.pdb ...

Core :
JZ4_Core COR Set Core

Initial Ligand:
JZ4 JZ4

Final Ligand List :

Name	Residue
JZ4_Core-NH2	LG1

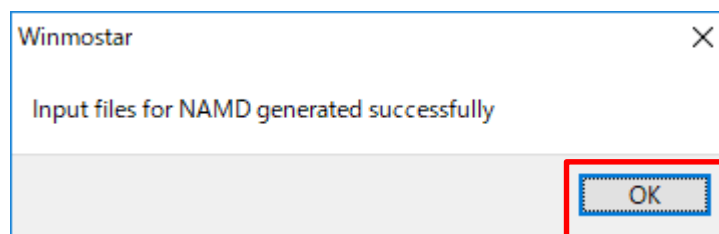
-NH2 ▾
Add
Delete

JZ4_Core-NH2 LG1

Configure Check **Setup** Close



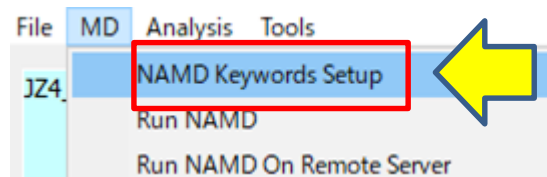
問題なければ、下のようなメッセージが表示されます。
[OK]をクリックして閉じます。



[Setup]では、各系のNAMD用の入力ファイル(PDB,PSFファイル)が生成されます。

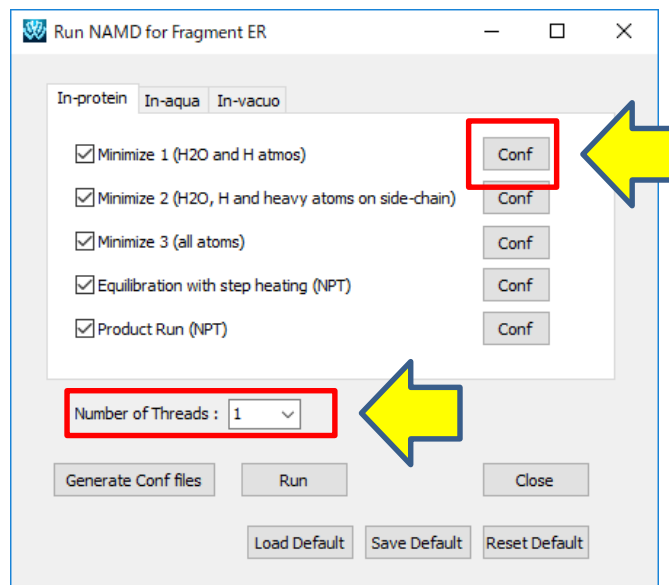
III. MD計算(1)

1. NAMDによるMD計算の設定をします。
[MD]>[NAMD Keywords Setup]を選択します。



2. [Number of Threads]をCPUコア数に応じて設定します。

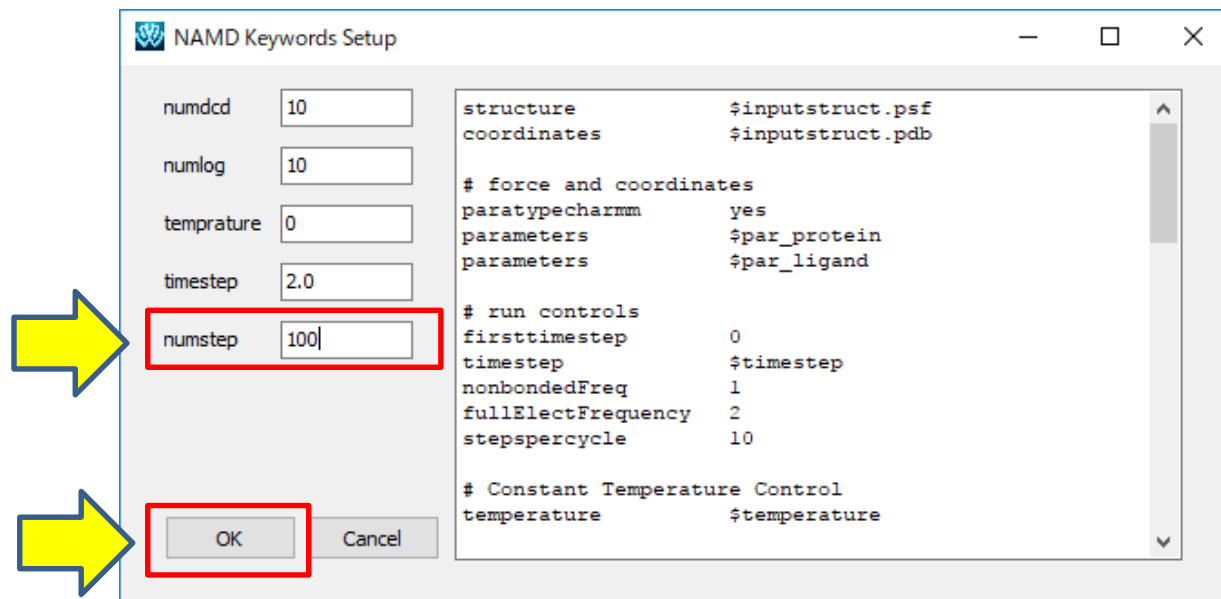
3. [Conf]ボタンをクリックすると、各MD計算の条件を変更することができます。



III. MD計算(2)

4. 今回は、時間短縮のために、[numstep]を「100」に設定して[OK]をクリックします。

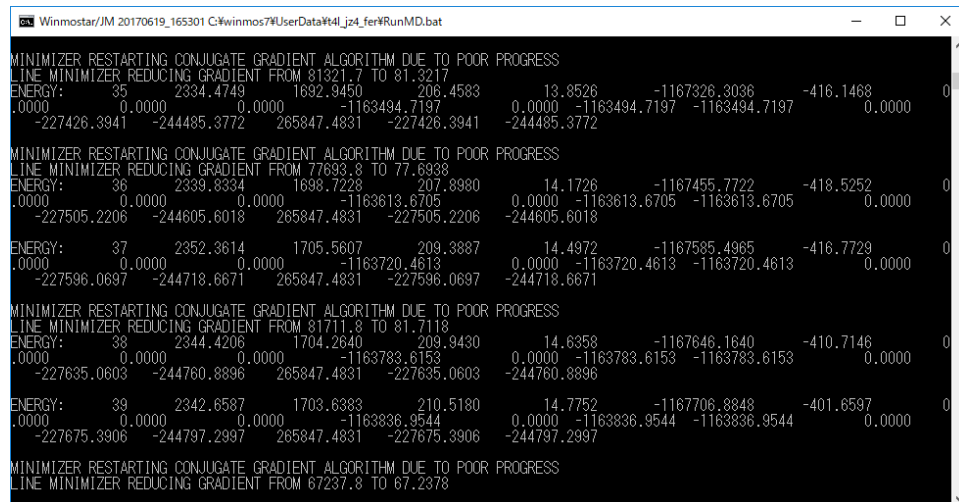
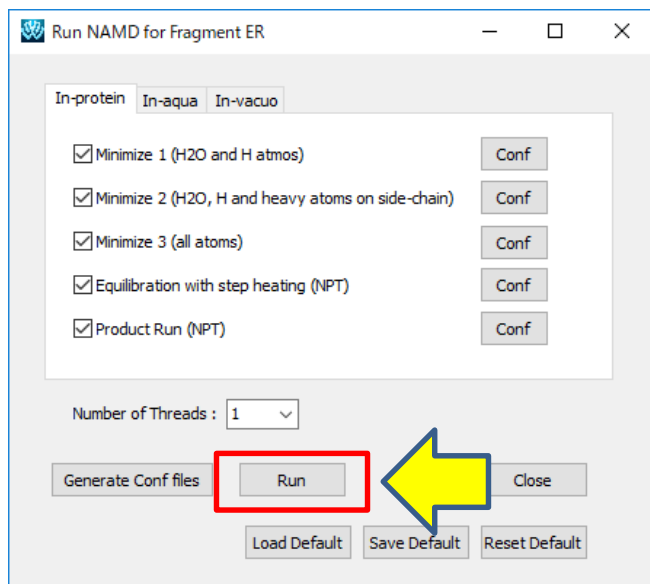
同様に全てのタブの全ての[Conf]ボタンについてnumstepを100にします。



実際に正確なエネルギー値を計算するためには、ステップ数を大幅に増やす必要がありますが、はじめは少ないステップ数で安定に計算できることを確認してから、ステップ数を増やすことをおすすめします。

III. MD計算(3)

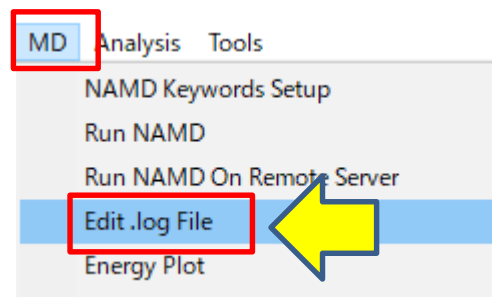
5. [Run]ボタンをクリックすると、MD計算が始まります。
計算には数分かかります。
Winmostarを終了しても計算は止まりません。



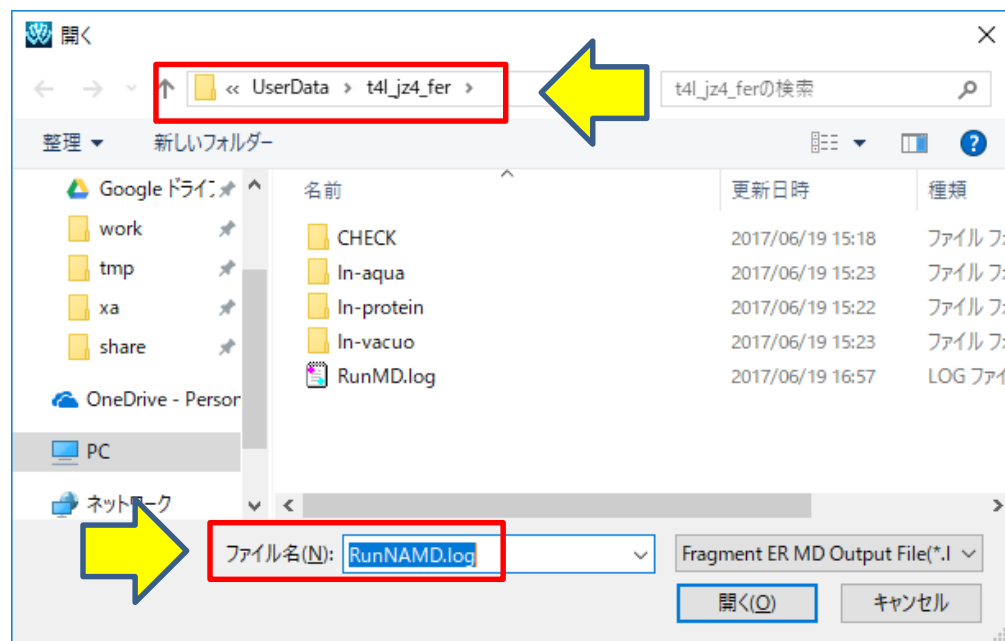
III. MD計算(4)

6. MD計算が終了したら、結果の確認を行います。

[MD]>[Edit .log File]を選択します。

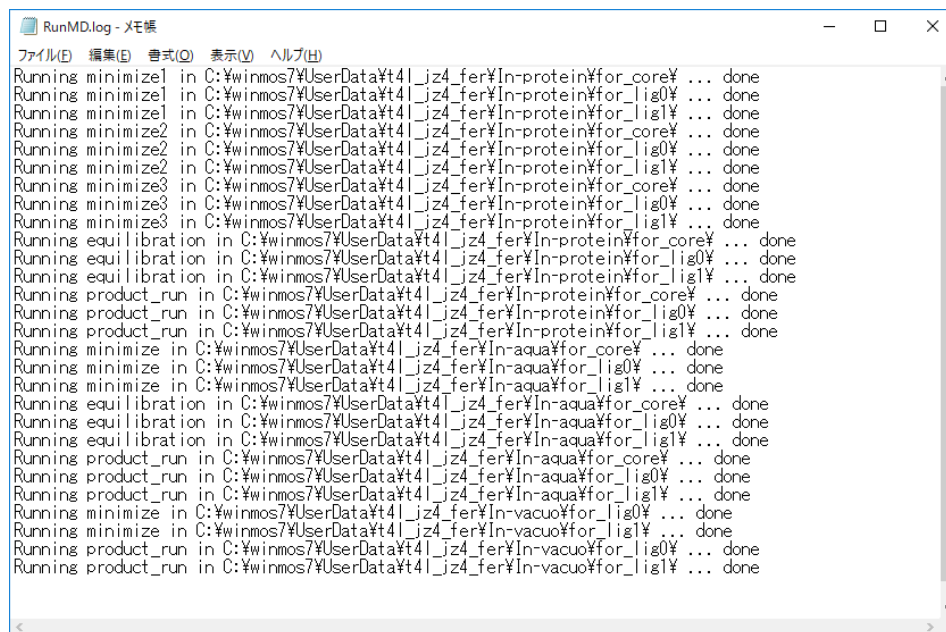


7. C:¥winmos7¥UserData¥t4l_jz4_fer¥RunNAMD.logを選択します。



III. MD計算(5)

計算が正常終了している場合、エディタで下のようなログファイルが開かれます。
各系のNAMDの出力ファイルは、それぞれのフォルダの下に出力されます。



```

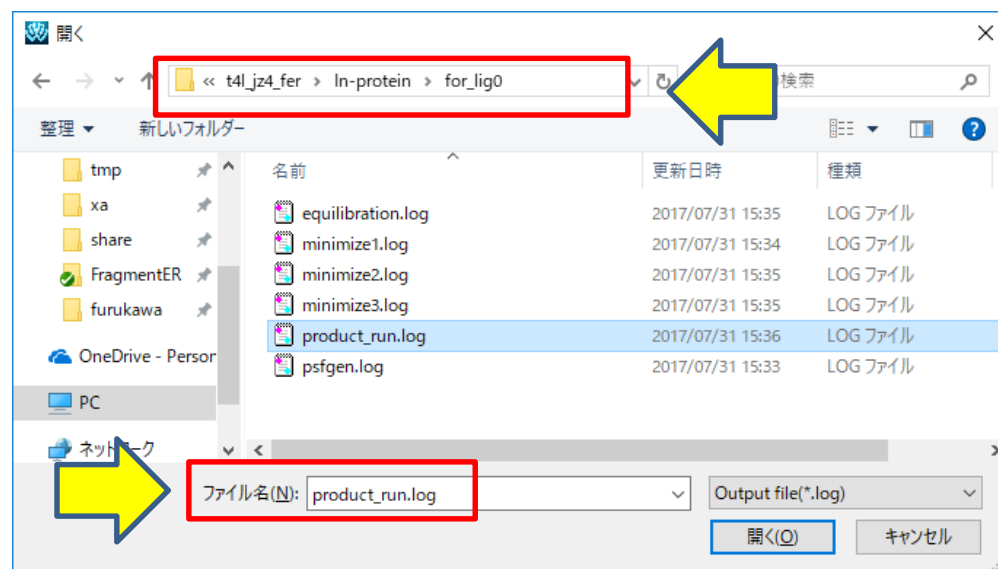
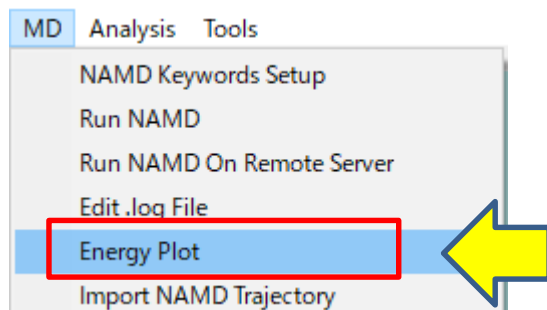
RunMD.log - メモ帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)
Running minimize1 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_core\ ... done
Running minimize1 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig0\ ... done
Running minimize1 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig1\ ... done
Running minimize2 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_core\ ... done
Running minimize2 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig0\ ... done
Running minimize2 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig1\ ... done
Running minimize3 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_core\ ... done
Running minimize3 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig0\ ... done
Running minimize3 in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig1\ ... done
Running equilibrium in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_core\ ... done
Running equilibrium in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig0\ ... done
Running equilibrium in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig1\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_core\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig0\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-protein\for_lig1\ ... done
Running minimize in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_core\ ... done
Running minimize in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_lig0\ ... done
Running minimize in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_lig1\ ... done
Running equilibrium in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_core\ ... done
Running equilibrium in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_lig0\ ... done
Running equilibrium in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_lig1\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_core\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_lig0\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-aqua\for_lig1\ ... done
Running minimize in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-vacuo\for_lig0\ ... done
Running minimize in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-vacuo\for_lig1\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-vacuo\for_lig0\ ... done
Running product_run in C:\winmos7\UserData\t4\jz4_fer\In-vacuo\for_lig1\ ... done

```

III. MD計算(6)

8. エネルギー等の変化を確認しておきます。

9. 3回ファイル選択画面が出るので、
C:¥winmos7¥UserData¥t4l_jz4_fer¥In-protein¥for_lig0のproduct_run.logを選択します。



III. MD計算(7)

10. 下のような画面が表示されます。
[TOTAL]にチェックを入れて[Draw]をクリックします。

Energy Plot

Energy terms

- ☐ BOND
- ☐ ANGLE
- ☐ DIHED
- ☐ IMPRP
- ☐ ELECT
- ☐ VDW
- ☐ BOUNDARY
- ☐ MISC
- ☐ KINETIC
- ☒ TOTAL
- ☐ TEMP
- ☐ POTENTIAL
- ☐ TOTAL3

☐ Block Average Size: 10

Draw Calc Ave

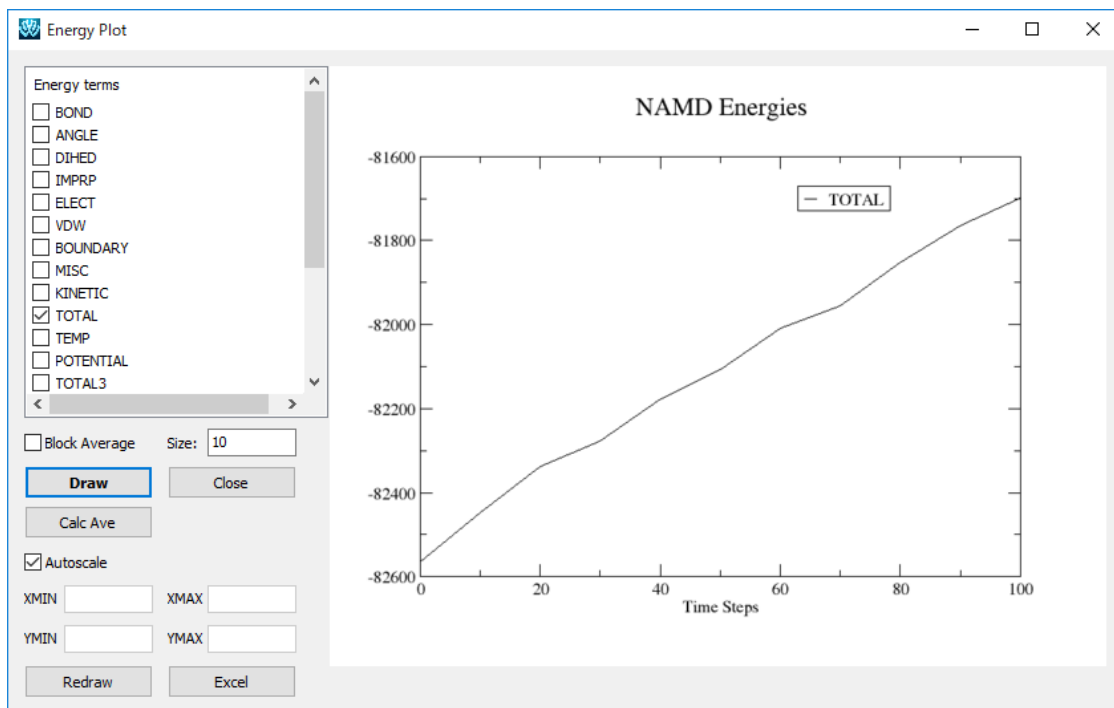
☒ Autoscale

XMIN XMAX

YMIN YMAX

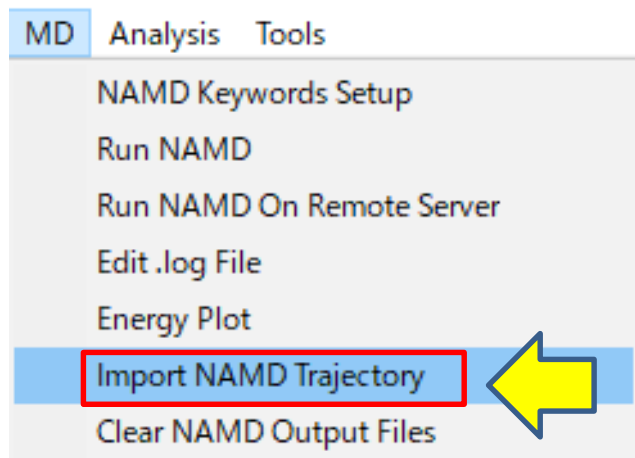
Redraw Excel

下のようなグラフが表示されます。
長時間MDの後に計算の安定性や平衡状態などを確認できます。

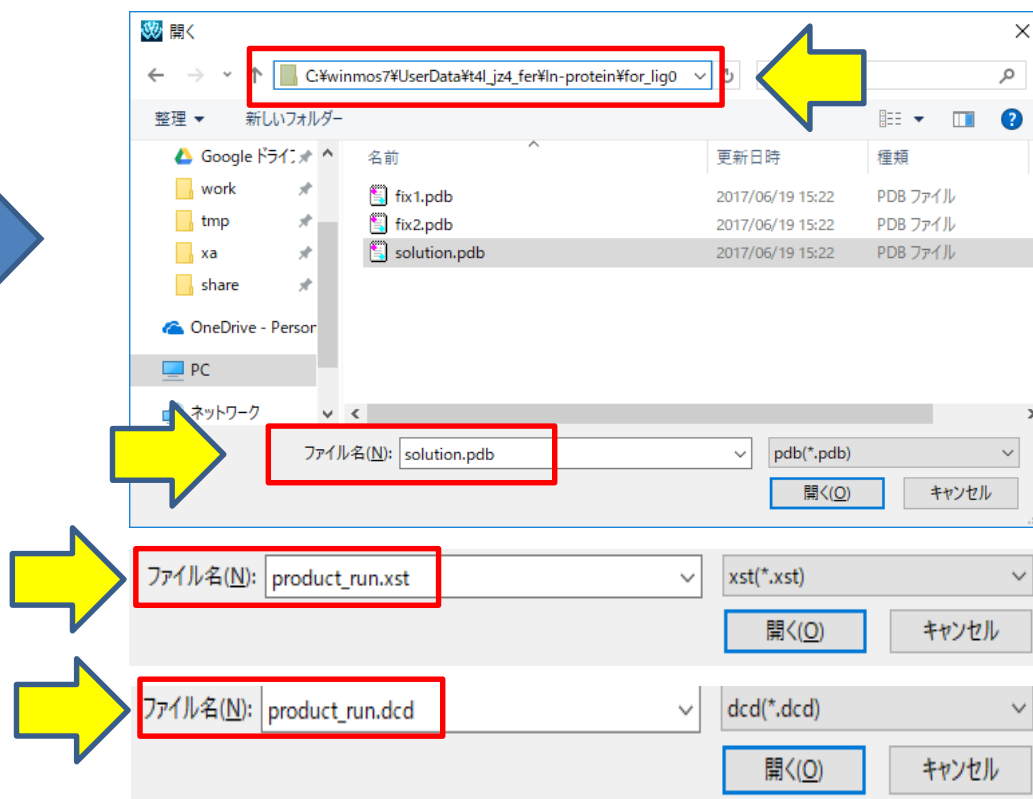


III. MD計算(8)

8. トラジェクトリの出力も確認しておきます。
[MD]>[Import NAMD Trajectory]を選択します。

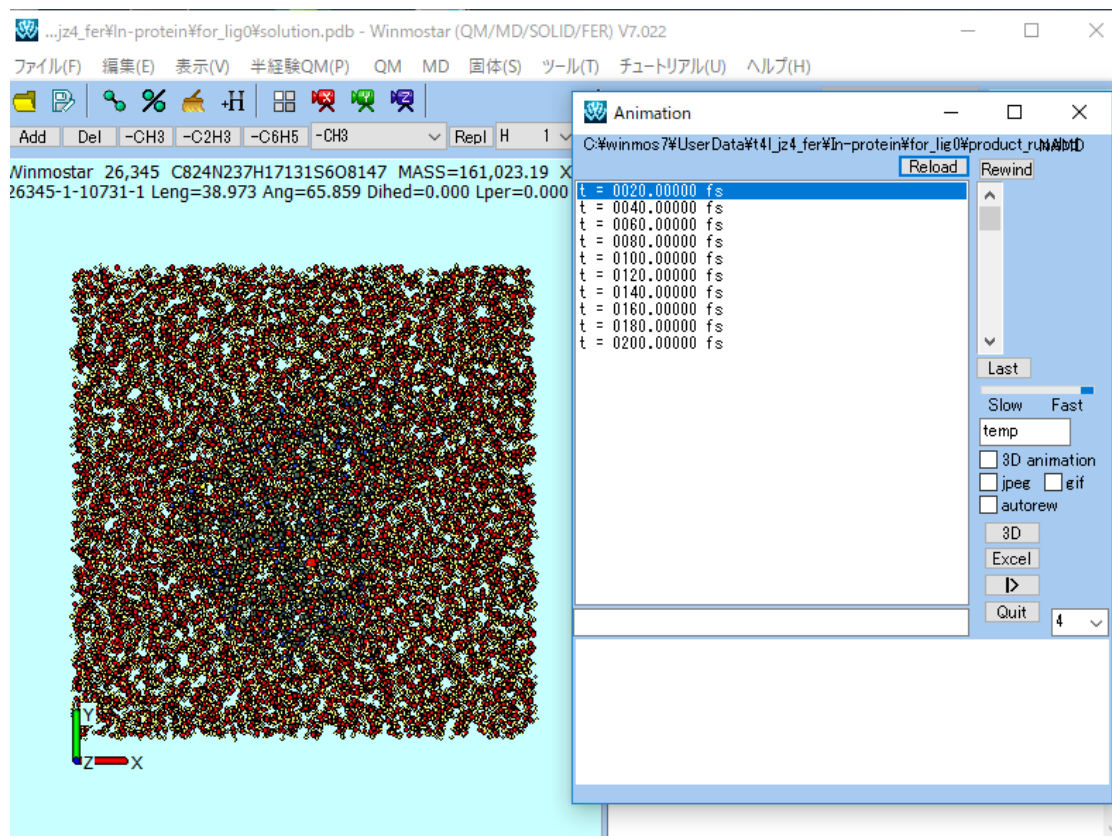


9. 3回ファイル選択画面が出るので、
C:\¥winmos7¥UserData¥t4l_jz4_fer¥In-protein¥for_lig0のsolution.pdb,
product_run.xst, product_run.dcdを選択します。



III. MD計算(9)

トラジェクトリが読み込まれます。



トラジェクトリのフレーム数が多い場合は、読み込みや再生に時間がかかります。
その場合は、[Configure]画面の[Import Trajectory Interval]を増やして、数を間引くようにしてください。

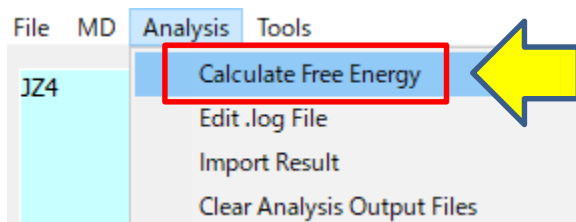
III. MD計算(補足)

実際に長時間MDを行う際には、Windowsでの実行では時間がかかってしまいます。

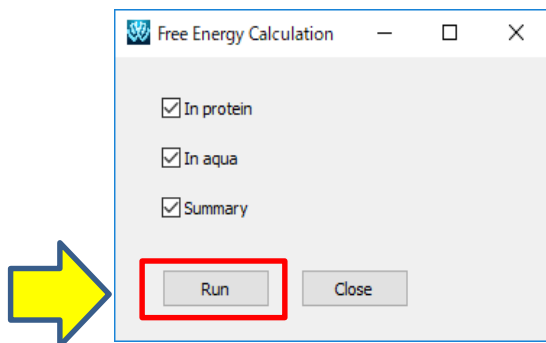
リモートジョブ実行機能やGPGPU版のNAMDの利用をご検討ください。

IV. 自由エネルギー計算

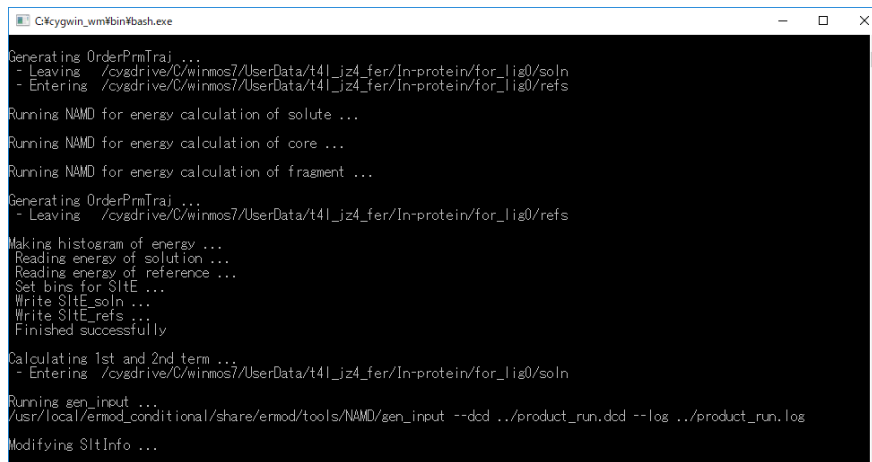
1. [Analysis]>[Calculate Free Energy]を選択します。



2. [Run]をクリックします。

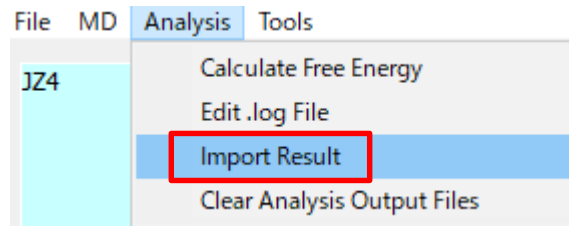


自由エネルギー計算が始まります。
計算は数分で終了します。

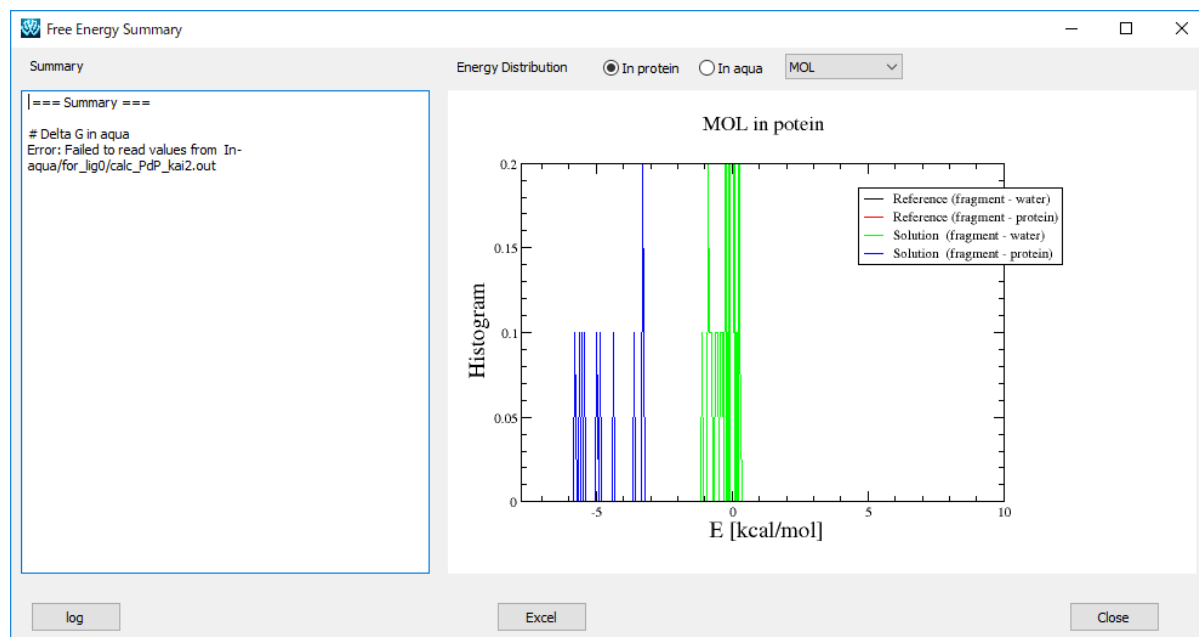


V. 結果の表示(1)

1. [Analysis]>[Import Result]を選択します。



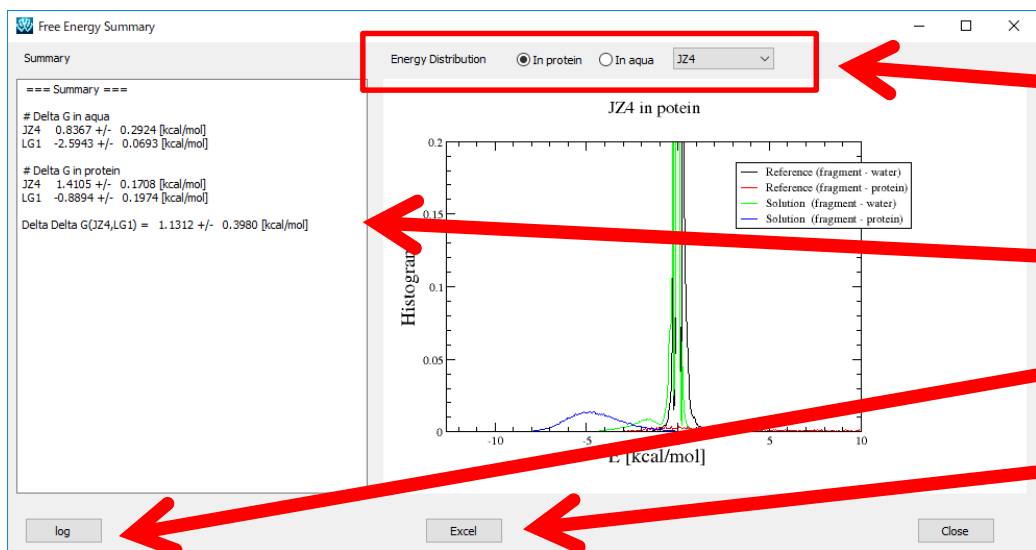
結果が表示されます。
ただし、この場合はMDのステップ数が少なすぎたため、正しく計算ができていません。



V.結果の表示(2)

下図は下記の条件で行った場合の結果です。

- ・In-protein, In-aquaの平衡化計算を10万ステップ
- ・In-protein, In-aquaの本計算を100万ステップ
- ・In-vacuoの本計算を1000万ステップ
- ・Configuration画面で[# of insertions for solute (maxins)]を10



描画するエネルギー分布関数を切り替えます。

ΔG , $\Delta\Delta G$ 等の値が表示されます。

ログファイルをエディタで開きます。

表示されているグラフのCSVファイルを開きます。