

# フラグメント分子軌道 (FMO) 法の創薬における分子シミュレーションへの応用

プロジェクト責任者

岡崎 浩輔 キッセイ薬品工業株式会社

著者

小沢 知永<sup>\*1</sup>、小澤 基裕<sup>\*1</sup>、半田 千彰<sup>\*1</sup>、神原 実季恵<sup>\*1</sup>、辻 英一<sup>\*1</sup>、岡崎 浩輔<sup>\*1</sup>、  
上原 均<sup>\*2</sup>、新宮 哲<sup>\*2</sup>、数納 広哉<sup>\*2</sup>

\*1 キッセイ薬品工業株式会社 創薬研究部創薬設計研究所

\*2 独立行政法人海洋研究開発機構

利用施設： 独立行政法人海洋研究開発機構 地球シミュレータ

利用機関： 平成 20 年 4 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日

アブストラクト

近年、数多くのタンパク質とリガンドの複合体構造が明らかになっている。医薬品の創薬研究においてタンパク質の構造情報を利用して、医薬品をデザインする手法は SBDD (ストラクチャーベースド・ドラッグデザイン) といわれ、有用な手法の 1 つである。SBDD において、タンパク質とリガンドの相互作用解析が行われるが、現状ではいくつかの問題点がある。それらの問題点の中で (1) 通常、解析は経験的力場で評価される、(2) 生理学的条件とは異なる真空中で行われる、の 2 点に注目し課題として取り上げた。この SBDD の 2 つの課題に、我々は北浦らによって開発されたフラグメント分子軌道 (FMO) 法と大規模計算が可能な地球シミュレータ (ES) を利用して取り組んだ。FMO 法プログラムは、中野らによって開発され、山下らによって ES に移植された ABINIT-MP を使用した。

ABINIT-MP で LCK タンパクとその阻害剤の複合体に対して FMO 計算を行ったところ、FMO 法で求めた相互作用エネルギーと実験で求めた IC<sub>50</sub> 値の間に良い相関関係が得られた。このことは FMO 法の信頼性と有用性を示すものである。水溶液中での相互作用を調べるために、SH3 タンパクとリガンドペプチドの相互作用を周囲に置く水の数を変化させて、FMO 計算を実行した。その結果水溶液中でのタンパクとリガンドの相互作用を議論する場合、複合体の周囲 8 Å に水を置いて計算する必要があることが分かった。水溶液中の計算は ES の豊富なメモリーと高速計算があいまって、現実的な時間で達成されたものである。

キーワード： 分子間相互作用 フラグメント分子軌道法 溶媒効果 SBDD

## 1. イントロ

医薬品はヒトの疾病の治療あるいは診断・予防に使用される事を目的としている。医薬品には、(1) 生体に対して有効な生物活性 (有効性)、(2) 物理的・化学的に規定できる物質性、(3) 社会的機能をもつ交換価値のある財貨として経済性、(4) 生命関連物質としての倫理性 (安全性)、といった性

質が求められている<sup>1)</sup>。これら4つの要素をもつ医薬品を市場に出すには、多額の費用と長い年月が必要とされる。

一般に医薬品は標的タンパク質に結合する事によりその薬効（効き目）を発現する（図1）。近年タンパク質の発現・精製技術の進歩、ならびにX線・NMR等の構造解析技術の発達により、構造解析されるタンパク質の数が大変な勢いで増加している（図2）。タンパク質の構造情報を基に医薬品化合物のデザインを行う手法はStructure Based Drug Design（SBDD）と呼ばれ最近では創薬手法として定着しつつある<sup>2)</sup>。



図1 薬のタンパク質への結合

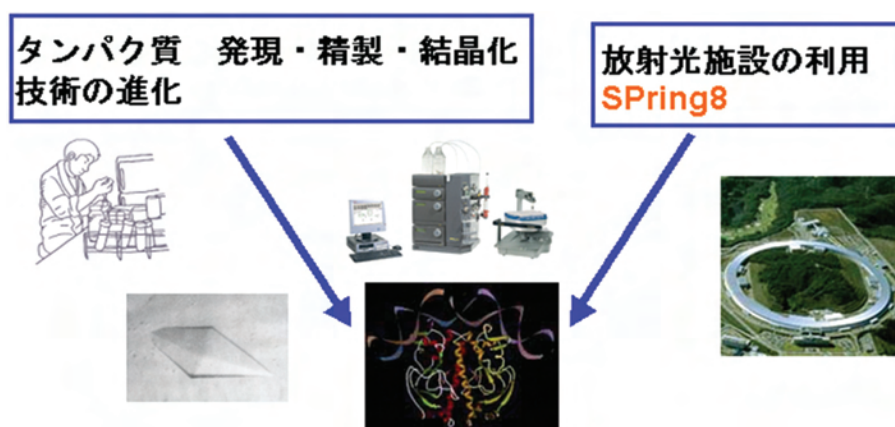


図2 タンパク質の構造情報の増加

SBDDではタンパク質と低分子化合物の複合体構造解析を行い、その結果を基に新しい化合物群をデザインし活性評価を行い、得られた興味深い化合物に関してはさらにタンパク質との複合体構造解析を行う。この一連のサイクルを如何に効率良く回すかが、SBDDの成功の鍵を握っている。SBDDのサイクルにおいて、低分子化合物とタンパク質の相互作用情報は新しい化合物をデザインするための重要な情報である。

最近では量子化学計算・構造解析等により、低分子とタンパク質の相互作用には古典的な水素結合・静電相互作用だけではなく、“弱い相互作用あるいは非古典的相互作用”も古典的相互作用と同様に重要な働きをしている事が明らかになり、ドラッグデザインにも応用されている<sup>3)</sup>。弱い相互作用あ

るいは非古典的相互作用としては、CH/ $\pi$ , NH/ $\pi$ , OH/ $\pi$ , Halogen/ $\pi$ , CH/O, Halogen 相互作用等が挙げられる<sup>4)</sup>。

低分子化合物とタンパク質の相互作用解析は一般には経験的パラメータを用いた分子力場 (MM) 法が使われるが、汎用性が低く、低分子化合物とタンパク質の相互作用解析においては高い精度は期待できない。一方経験的パラメータを用いない *ab initio* 分子軌道 (MO) 法は高いレベルの近似計算を行えば、高精度の計算が期待できる。しかしながら MO 法は対象とする計算の系が大きくなる程その計算時間は膨大になり、巨大分子であるタンパク質に対してはいくつかの例外を除いて、計算は実質不可能な状況であった。

北浦らによって開発されたフラグメント分子軌道法 (FMO 法) は分子をフラグメントに分割し計算の高速化を図りつつ、かつフラグメント分割を工夫し、計算精度は大きく落とさず、タンパク質の *ab initio* 計算を可能にした手法である<sup>5)</sup>。また FMO 法の特徴としてフラグメント間の相互作用エネルギーが計算できるので分子設計には大変有用である (例えばリガンドとタンパク質の相互作用エネルギーをアミノ酸単位で計算することが可能である)。FMO 法は実際にタンパク質とリガンドの相互作用解析に応用されている<sup>6)</sup>。

FMO 法と ES を活用した創薬研究におけるシミュレーションの題材として我々は次の 2 点を検討した。

- 1 FMO 法で求めたリガンド-タンパクの相互作用エネルギーと活性値 (実験値) との比較。題材としては LCK タンパクとその阻害剤を使用。
- 2 タンパク質とリガンドの相互作用エネルギーに対する水和の影響。題材としては Gads-SH3 とそのペプチドリガンド SLP-76 を使用。

## 2. 計算方法

### 2.1 計算座標の用意

#### 2.1.1 LCK タンパクの座標

自社で解析した 15 個の LCK タンパク-阻害剤複合体に対して Quanta2006 (Accelrys, Inc., San Diego, CA) を用いて水素原子を付与した。座標の最適化は Quanta2006 の CHARMM 力場を用いて行った、このとき、最適化法は SD 法、誘電率は 4R を採用した。最適化は次のような手順で行った、(1) 水素以外の原子を固定し、水素のみを最適化、(2) タンパクの主鎖を固定し、側鎖のみを最適化、(3) 全原子にハーモニックコンストレインをかけて最適化。コンストレインの強さは 100 から始め、10、1 と段階的に弱くしていった。こうして得られた座標に対して、FMO 計算を行った。この LCK タンパクの系では計算は全て真空中で実行した。

#### 2.1.2 水溶液中の LCK タンパク-阻害剤複合体

前節で得た LCK の座標に対して DiscoveryStudio (Accelrys, Inc., San Diego, CA) で周囲 8 Å に水を置いた。さらに周期的境界条件下でモレキュラーダイナミクス (MD) 計算を 2.5n 秒実行した。MD トrajекトリーから座標を抽出し、SD 法で最適化し、複合体周囲 5 Å の水を含んだ座標に対して FMO 計算を実行した。

### 2.1.3 水溶液中の Gads-SLP76 複合体

公共のタンパク構造のデータベースである PDB から構造をダウンロードした (PDB code 1oem)。その後、LCK と全く同じ方法で構造を構築した。ここで得られたタンパク構造に DiscoveryStudio で、周囲 10 Å 水を付与した構造を用意した。さらに周期的境界条件下でモレキュラーダイナミクス (MD) 計算を 2.5n 秒実行した。2.5n 秒後の MD トラジェクトリーから座標を取り出し SD 法で最適化し、複合体周囲 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Å の水を含んだ座標を抽出しこれらの座標に対して FMO 計算を実行した。

## 2.2 FMO 計算

本研究では FMO 計算に文部科学省次世代 IT 基盤構築のための研究開発「革新的シミュレーションソフトウェアの研究開発」にて開発された ABINIT-MP を使用した<sup>7)</sup>。ABINIT-MP は既に山下らによって地球シミュレータに移植済みである<sup>8)</sup>。本研究では基底関数は 6-31G、を使用し計算方法は分散力も見積もる事が可能な MP2 法を用いた。

## 2.3 実行情報

代表的な系の実行情報を表 1 に記す。

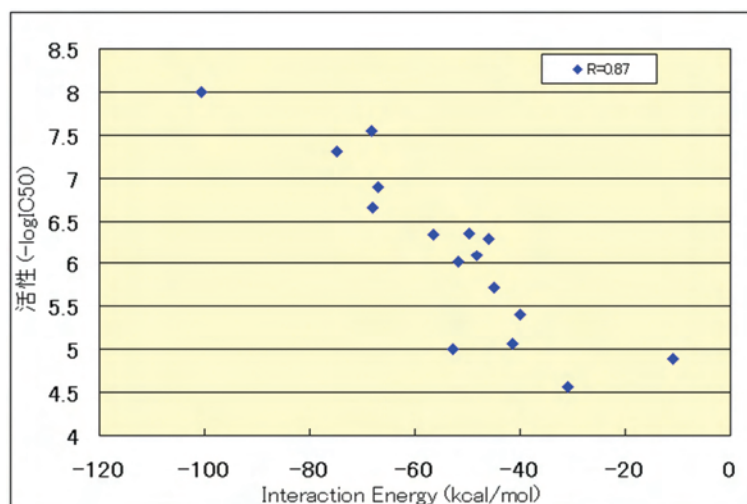
表 1 代表的な系の実行情報

	利用ノード	全原子数	全原子軌道数	計算時間 (分)
真空中 LCK	16	4,427	24,524	199
水溶液中 LCK	128	8,574	42,479	88
水溶液中 SH3	128	5,691	26,005	31

## 3. LCK タンパクとリガンドの相互作用

### 3.1 真空中での LCK タンパクとリガンド複合体

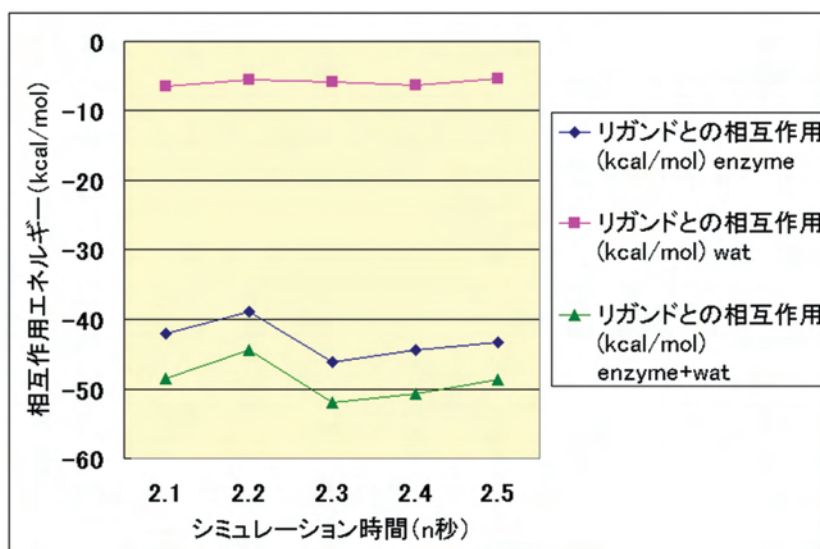
まず計算負荷が軽い系として 15 種類の LCK タンパクと阻害剤の複合体に対して FMO-MP2/6-31G 計算を実行した。FMO 計算から求まるタンパク質と阻害剤の相互作用は、阻害剤とタンパク質の結合の強さに関連し、生物学的活性と相関する事が期待される。今回の系では生物活性を表す IC<sub>50</sub> 値と FMO エネルギーの間には相関係数で 0.87 という良い相関が得られた (グラフ 1)。また計算時間は表 1 に示したように 1 つの複合体で 16 ノードでも 3 時間以内であり、実用上十分な計算時間である。同じ系を小規模クラスター (20CPU Pentium IV 3.4GHz) で行くと 2 日程度かかる。活性値との相関は充分満足行くものであったが、エネルギーの絶対値の幅が非常に大きく出ている。実際のタンパクとリガンドの結合は水溶液中で起きるので、次に実際に複体の周囲に水を置いた状態での相互作用計算を検討した。



グラフ 1 FMO 計算で求めた相互作用エネルギーと生物活性の相関

### 3.2 水溶液中での LCK タンパクとリガンドの相互作用

水溶液中でのシミュレーションでは、複合体周囲に水を配置し MD シミュレーションにより水、タンパク、阻害剤の座標を追跡する。タンパクと阻害剤の相互作用は当然、座標が変化する事によりそのエネルギーが変化する。今回 MD の 2-2.5 n 秒のトラジェクトリーから等間隔に 5 座標を抽出し、CHARMm で最適化後 FMO 計算を実行した。その結果をグラフ 2 に示す。相互作用エネルギー（阻害剤とタンパク+水）は座標により約 8kcal/mol の幅で変動する事が分かる。この値は、阻害剤間の相互作用エネルギーを比較する時には、無視できない大きさであり、今後さらに MD のシミュレーション時間を延ばす、サンプリング数を増やす等の検討が必要である。今回の計算では複合体の周囲 5 Å に水を配置したが、周囲に置く水の影響を検討するため、次に比較的小さなタンパクである SH3 に対して、検討を行った。



グラフ 2 座標の違いが相互作用に及ぼす影響

### 3.3 SH3 タンパク-リガンドペプチド複合体における、水の数の影響

複合体周囲の水の数が、SH3 タンパク-リガンドペプチド複合体の相互作用エネルギーにどのような影響を与えるか検討を行った。複合体の周囲 10 Å に水を配置し MD 計算を実行した。そこから複合体の周囲 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Å の範囲内に存在する分子を取り出し、FMO 計算により相互作用エネルギーを計算した。その結果をグラフに示す。SH3 タンパクとリガンドペプチドの相互作用エネルギーは 8 Å で平衡に達し、またリガンドペプチドと水との相互作用エネルギーも 8 Å で平衡に達している。このことは、水溶液中でタンパクとリガンドの相互作用を論ずる場合、複合体の周囲には少なくとも 8 Å の水を配置して、シミュレーションを実行する必要があることを示している。

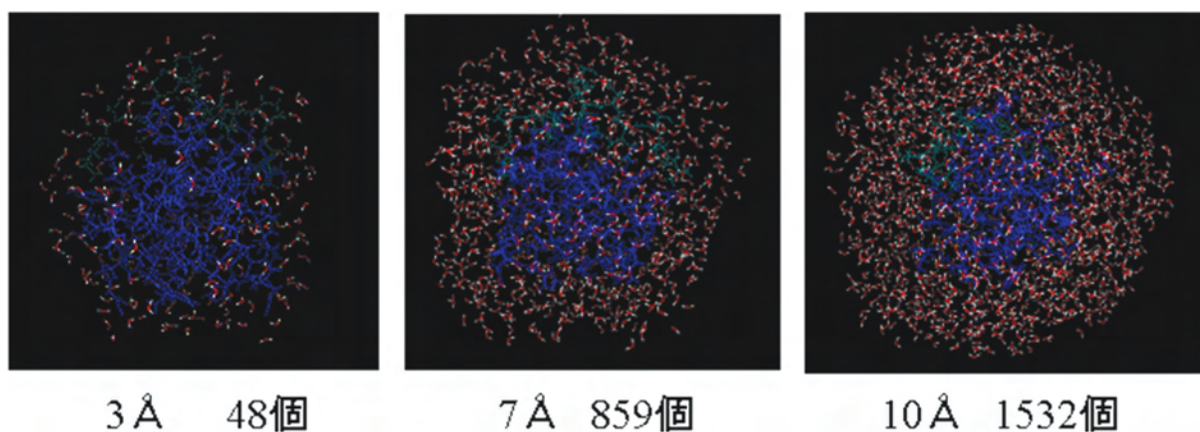
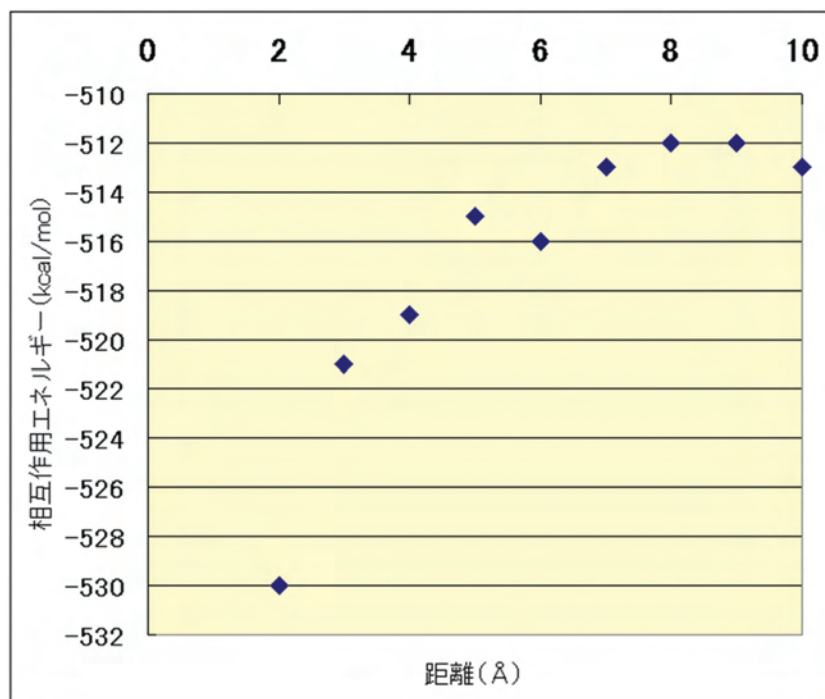
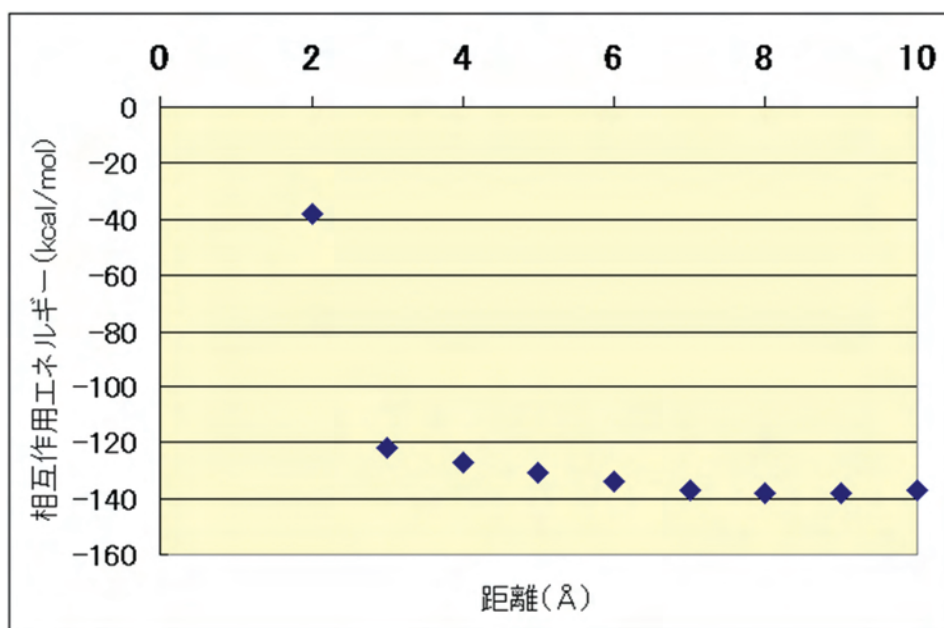


図3 SH3 複合体周囲の水の数



グラフ3 ペプチドリガンドと SH3 タンパク質の相互作用



グラフ4 ペプチドリガンドと水との相互作用

#### 4. まとめ

本研究ではタンパク質—リガンド複合体に対して、FMO法を真空中、水溶液中でそれぞれ計算した。真空中の計算では、活性とFMOで求めた相互作用エネルギーの間に良好な相関が見られ、FMO法がSBDDの重要なツールになる事を示した。一方水溶液中の計算に関しては活性値との相関等を論ずる段階には達していない。今回の検討により、1. MDの座標間で8kcal/mol程度のエネルギーの振動がある、2. タンパクとリガンドの相互作用を論ずるには少なくとも複合体周囲8 Åに水を置く必要がある、という2点が明らかになった。

今後の課題としては、1. サンプル数を増やす 2. タンパク質とリガンドの結合に由来する脱水和の影響 3. リガンド結合に付随するキャピテーションの扱い 4. エントロピー項の扱い 5. タンパク質、リガンドそれぞれの、相互作用形成における内部エネルギー変化の扱い等、未解決の課題が多くある。今後はこういった課題の解決も重要である。近い将来、地球シミュレータのような大規模計算機を活用してデザインされた医薬品が人類の健康に貢献する事が期待される。

#### 謝辞

計算コードABINIT-MPは文部科学省次世代IT基盤構築のための研究開発「革新的シミュレーションソフトウェアの研究開発」プロジェクトの一環として東京大学生産技術研究所で開発されたものを使用させて頂きました。

ABINIT-MPの計算、解析に関して御指導、御助言を頂いた国立医薬食品衛生研究所・中野達也博士、ABINIT-MPの地球シミュレータでの実行に関して、御指導いただいたNECソフト株式会社・山下勝美氏に感謝いたします。

地球シミュレータ利用に関しては、独立行政法人海洋研究開発機構・計算システム計画・運用部 平野哲 部長、北脇 調査役、福井義成 技術主幹から御指導、御協力を頂きましたことを、感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 製薬協 HP <http://www.jpma.or.jp/>
- 2) Klebe, G., “Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations” *Drug Discovery Today*, 11 (2006) 580-594.
- 3) Ozawa, T., Tsuji, E., Ozawa, M., Handa, C., Mukaiyama, H., Nishimura, T., Kobayashi, S., Okazaki, K. “The importance of CH/ $\pi$  hydrogen bonds in rational drug design: An ab initio fragment molecular orbital study to leukocyte-specific protein tyrosine (LCK) kinase” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (2008) 10311-10318.
- 4) Nishio, M. “CH/ $\pi$  hydrogen bonds in crystals” *CrystEngComm*, 6 (2004) 130-158.
- 5) Fedorov, D., Kitaura, K. “Extending the power of quantum chemistry to large systems with the fragment molecular orbital method” *J. Phys. Chem. A*, 111 (2007) 6904-6914.
- 6) Fedorov, D., Kitaura, K. “The Fragment Molecular Orbital Method: Practical Applications to Large Molecular Systems” Taylor & Francis (Atlanta) 2009.
- 7) ABINIT-MP. Available at [http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/rss21/result/download/index.php#download\\_2](http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/rss21/result/download/index.php#download_2)
- 8) Mochizuki, Y., Yamashita, K., Murase, T., Nakano, T., Fukuzawa, K., Takematsu, K., Watanabe, H., Tanaka, S. “Large scale FMO-MP2 calculations on a massively parallel-vector computer” *Chem. Phys. Lett.*, 457 (2008) 396-403.