

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^{*1}、小澤 基裕^{*1}、半田 千彰^{*1}、神原 実季恵^{*1}、辻 英一^{*1}、岡崎 浩輔^{*1}、
新宮 哲^{*2}、数納 広哉^{*2}、上原 均^{*2}

*1 キッセイ薬品工業株式会社 創薬研究部創薬基盤研究所

*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 21 年 4 月 1 日～平成 22 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。より精度の高い SBDD を達成するために、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 (ES2) 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 ES2 に移植された ABINIT-MP を使用した。

ABINIT-MP による真空中の FMO 計算でドッキングモードを予測したところ、8 種類のリガンドのうち 5 種類のリガンドの結合モードを予測することができた。また、16 種類の LCK-リガンド複合体における MP2/6-31G* の FMO 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得られた。これらは FMO 法の有用性と信頼性を示すものである。水中 MD と FMO を組み合わせた計算においては、アミノ酸の 1 変異が周囲のアミノ酸の相互作用に影響を与えていることが分かり、アロステリック効果を考慮にいれた考察・ドラッグデザインの可能性が期待される。今回の計算は ES2 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の経済性、(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る¹⁾。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²⁾。

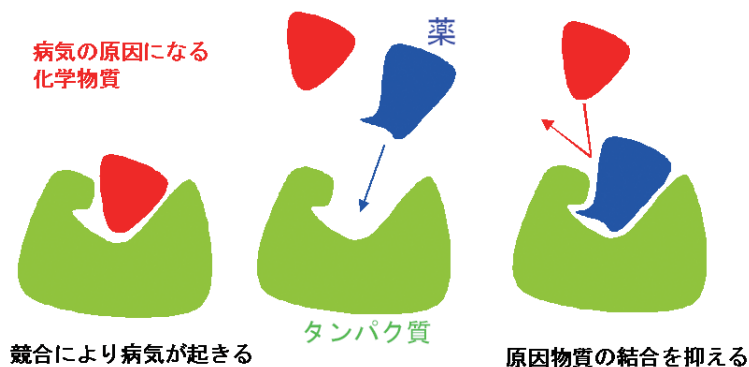


図1 薬のタンパク質への結合

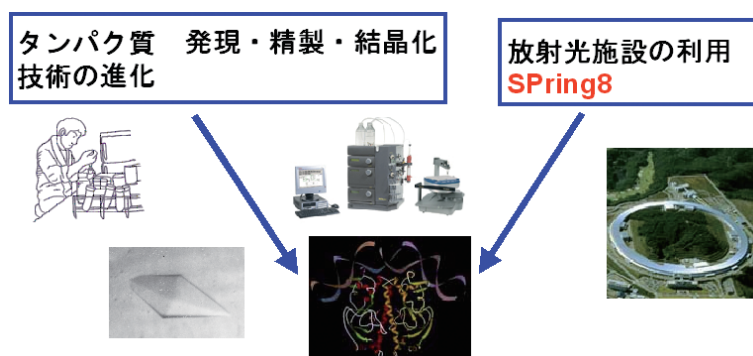


図2 タンパク質の構造情報の増加

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³⁾。弱い相互作用あるいは非古典的相互作用としては、CH/ π ,NH/ π ,OH/ π ,Halogen/ π ,CH/O, Halogen 相互作用等が挙げられる⁴⁾。

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。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⁵⁾。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⁶⁾。

平成 20 年度の「地球シミュレータ産業戦略利用プログラム」で我々は真空中、水溶液中での FMO 計算を行い 2 つの結果を得た。① LCK カイネースの阻害剤とタンパク質の複合体において、FMO で求めた相互作用エネルギーと実験から求めた阻害剤とタンパク質の親和性に良い相関が見られた (相関係数 0.87)。② 水溶液中のリガンドとタンパク質の相互作用エネルギーを評価する場合には、少なくとも複合体の周囲 8 Å に水を配置する必要がある。

我々は、平成 20 年度の成果に基づき創薬現場の要望、実際の系に近づける事を目的として平成 21 年度は以下の 3 つを課題として取り上げた。① LCK タンパクに対して、阻害剤とタンパク質の結合様式を予測する。② SH3 タンパクに対して、水を露わに取り入れた MD 計算を実行し、リガンドとタンパク質の相互作用を解析する。また変異体における親和性の変化について考察する。③ 創薬標的タンパクに対して MP2/6-31G* の FMO 計算を行い、相互作用を解析する。

2. 計算方法

2.1 計算座標の用意

2.1.1 タンパクの座標

自社で解析したタンパク-阻害剤複合体あるいは、PDB からダウンロードした座標に対して Discovery Studio 2.5 (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 Discovery Studio 2.5 の CHARM m 力場を用いて行った。このとき、最適化法は SD 法、誘電率は 4 R 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。

2.1.2. 水溶液中の SH3 タンパク-リガンドペプチド複合体

2.1.1 で、作成したタンパク構造の周囲 8 Å に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 6-12n 秒実行した。MD 計算のトラジェクトリーから座標を複数取り出した。

2.2. FMO 計算

本研究では FMO 計算に中野らによって開発された ABINIT-MP を使用した⁷⁾。本研究では基底関数は 6-31G (一部の系では 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(6-31G)	16	4434	24526	150
水溶液中 SH3	16	3692	20505	52
真空中 LCK(6-31G*)	40	4434	24526	243

3.1 ドッキングコンフォメーションの予測

ドッキングシミュレーションでは、通常複数のドッキングモードが出力され、真のドッキングモードを決めることが難しい場合がある。今回、LCK タンパク質において結合モードが既知である8種類のリガンドのドッキングを行い、既知結合モードを含む複数のドッキングモードの真空中でのFMO計算(MP2/6-31G)を行い、タンパク質-リガンドの相互作用エネルギー値で真の(既知の)ドッキングモードを選択可能かどうかを検討した。ドッキングはAccelrys社DiscoveryStudioのCDockerを用いた。

8種類のリガンドそれぞれでFMO計算の相互作用エネルギー値が最良のドッキングモードを選択した結果、5種類のリガンドで既知(X線解析座標)の結合モードに近いドッキングモードを選択できた。(表2)。一方で、CharmM力場で同様の計算を行ったところ、5種類のリガンドで既知の結合モードに近いドッキングモードを選択でき、今回の計算では力場に対するFMOの優位性を示すには至らなかった。

FMOで真のドッキングモードを予測できなかった例では、間違った結合モードのヘテロ原子とタンパク質の極性アミノ酸との相互作用が特になくなっていったことが、真の結合モードを選択できていなかった原因の1つと考えられる。今後、ドッキングモード予測において脱溶媒等の水の影響を考慮した検討や3体効果を取り入れたFMOによる評価を検討していきたい。

表2 ドッキングコンフォメーション予測

ドッキングモード数	エネルギー値トップモードと既知モードの一致		
	CDocker	FMO	CharmM($\epsilon=1$)
リガンドA 5	○	○	○
リガンドB 5	×	×	×
リガンドC 5	×	○	×
リガンドD 5	×	○	○
リガンドE 4	×	×	○
リガンドF 5	×	○	○
リガンドG 5	×	○	×
リガンドH 6	×	×	○

3.2 水溶液中の SH3 タンパク質

SH3 タンパク質は、シグナル伝達に関与するタンパク質である。自身は分解や合成といった機能を持たないが、異なる種類のタンパク質を近接させるアダプタータンパク質として働く。SH3 タンパク質はヒトゲノムの中で大きなファミリーを形成しており、保存されているトリプトファン (Trp) が重要な役割をしている。今回は天然体、Trp と相互作用するリガンドのアミノ酸変異体 (V* → A*)、Trp の変異体 (W → A)、の 3 種類に対して MD 実行後、FMO 計算を行い Trp 周辺の相互作用を検討した。なお 2 つの変異体は X 線結晶解析の結果がなかったので、モデリングにより構造を構築した。以下リガンドペプチドのアミノ酸には*をつけて区別する。

3.2.1 Cads-SLP76 複合体 (天然体)

Gads-SH3 とリガンドペプチド (SLP-76) の複合体構造に対して FMO 計算を行うと、SLP-76 の配列 (Ala2*-Pro3*-Ser4*-Ile5*-Asp6*-Arg7*-Ser8*-Thr9*-Lys10*-Pro11*) で Pro3*、Ile5*、Arg7*、Lys10* がタンパク質への結合に重要なことが示された。これらのアミノ酸の相互作用は MD 実行後も維持されていた。

3.2.2 Gads-SLP76(I5*A) 複合体

SLP76 の変異体 I5*A は SLP76 に比べて Gads への親和性が 1/10 になる。この原因を探るために 10.5ns の MD を実行し、トラジェクトリーを抽出し FMO によりアミノ酸間の相互作用を調べた。その結果 SLP76 と Gads の Trp36 の相互作用が大きく変化する事がわかった。図 3 に相互作用の変化を示す。ここで注目すべきは変異した I5*A のエネルギー差が 2kcal/mol 程度であるのに比べて (図 3 の右図)、自身は変異していない Lys10* の相互作用が変異の前後で 10kcal/mol と大きく変化している事である (図 3 の左図)。Lys10* と Trp36 は CH/ π 水素結合により結合している事が FMO 計算から示唆されている。これらの事から変異による活性の低下を以下のように考察した。Ile5* は Trp36 を固定する働きがあり、Ile5* の Ala 変異により Trp36 の運動性が大きくなり、Lys10* と Trp36 の CH/ π 水素結合が弱まり結果として SLP76 変異体の Gads に対する親和性が弱くなる。

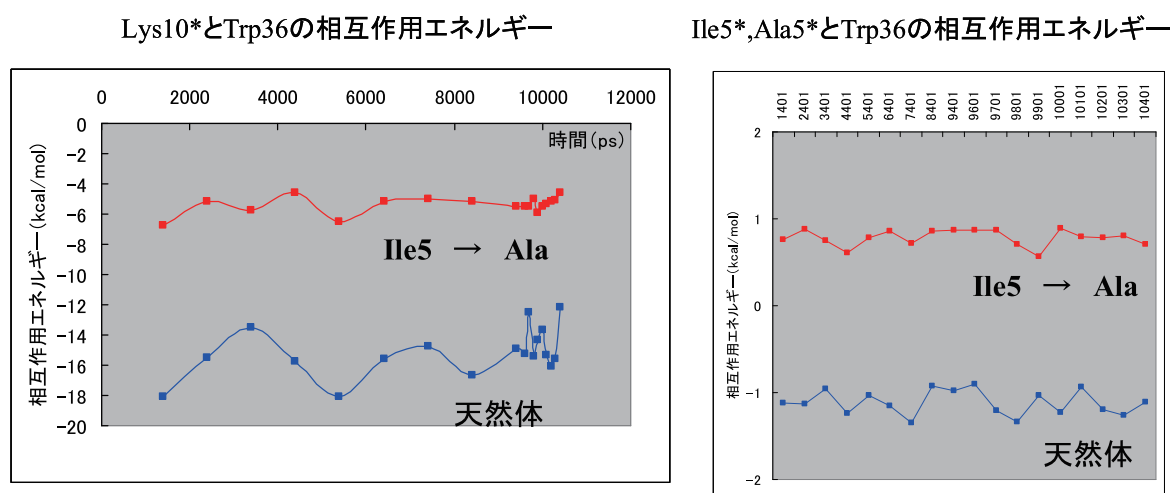


図3 相互作用の変化

3.2.3 Gads (W36A) –SLP76複合体

Gads(W36A)の変異体はSLP76との親和性が失われる事が知られている。MDから得られたトラジェクトリーのFMO計算からTrp36を変異させたAla36とSLP76との相互作用は大きく減弱している。さらに親和性に大きく寄与するArg7*、Lys10*と酸性アミノ酸(Flu14,Asp16,Glu17)の相互作用変化を天然体と比較した。W36A変異体とI5*A変異体の相互作用エネルギー変化を比較すると、活性が消失するW36A変異体のエネルギー変化が大きかった(表3)。以上のことからTrp36はSLP76との直接の相互作用の他にArg7*、Lys10*といった活性に重要なアミノ酸の相互作用を規定する働きがあることが推測される。

以上をまとめると、FMOとMDを組み合わせた今回のシミュレーションによりアミノ酸の1変異が周囲のアミノ酸の相互作用に影響を与える協動的挙動が垣間見えた。変異体の親和性情報はドラッグデザインに有用な情報を与えてきた。さらに今回のようなシミュレーションを行う事により、周囲のアミノ酸への影響も考慮に入れた考察が可能になり、ドラッグデザインに役立つ事が期待される。

表3 Arg7*、Lys10*とタンパクアミノ酸との相互作用

Arg7*の主要アミノ酸との相互作用の平均値(kcal/mol)			
	天然体	Ile5*Ala(天然体との差)	Trp36Ala(天然体との差)
Glu14	-46.3	-36.0 (10.0)	-81.7 (-35.4)
Glu17	-109.4	-122 (-13)	-88.0 (21.4)
Trp36	-7.2	-6.1 (1.1)	-0.1 (7.1)

Lys10*の主要アミノ酸との相互作用平均値(kcal/mol)			
	天然体	Ile5*Ala(天然体との差)	Trp36Ala(天然体との差)
GLU14	-117.22	-88.7 (28.5)	-108.3 (9.0)
ASP16	-133.086	-136.6 (-3.5)	-113.5 (19.6)
GLU17	-90.7458	-99.4 (-8.7)	-114.6(-23.8)
TRP36	-15.1153	-5.4 (9.7)	-1.2(13.9)

3.3 真空中でのLCKタンパクとリガンド複合体：6-31G*による計算

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。平成20年度、16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、生物活性を表すIC₅₀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ことを報告した(図4左)。今回、同じLCKタンパクと阻害剤の複合体において高次の基底関数によるFMO-MP2/6-31G*計算を行った結果、IC₅₀値とFMOエネルギーとで0.88の良い相関が得られた(図4右)。

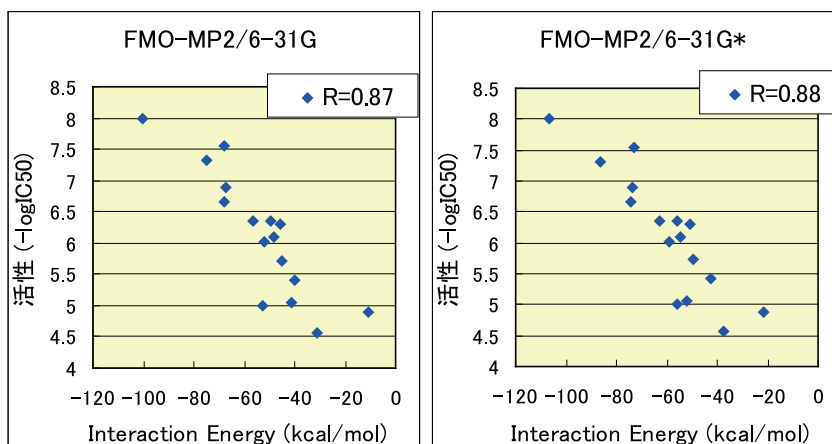


図4：FMO計算で求めた相互作用エネルギーと生物活性の相関

16 複合体の計算時間の合計は、20 年度 (6-31G) が 1130 ノード時間、今回 (6-31G*) が 2920 ノード時間であった。また、本計算は小規模クラスター (20CPU Pentium IV 3.4GHz) では出来なかった系であり、ES2 のような大規模計算機の有用性を示す結果である。

4. まとめ

真空中の FMO において、ドッキングモード予測では、8 種類のリガンドのうち 5 種類のリガンドの結合モードを予測することができた。今後、予測できなかった系の詳細な解析と、水の影響や 3 体効果を取り入れた FMO の検討が必要である。また、16 種類の LCK-リガンド複合体での MP2/6-31G* の FMO 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得られた。水中 MD と FMO を組み合わせた計算において、アミノ酸の 1 変異が周囲のアミノ酸の相互作用に影響を与えていることを示唆する結果となり、アロステリック効果を考慮にいたした考察・ドラッグデザインの可能性が期待される。

今後の課題として、1. タンパク質とリガンドの結合に由来する脱水和の影響、2. エントロピー項の扱い、3. 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、未解決の課題が多数あり、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「イノベーション基盤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、解析に関してご指導、ご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ご指導いただいた 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・地球シミュレータセンターの関係者各位からご指導、ご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/ π 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/ π 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