

タンパク質－阻害剤の結合エンタルピー予測法の開発

プロジェクト責任者

宮川 博夫 大正製薬株式会社

著者

宮川 博夫^{*1}、遠藤 真弓^{*1}、西川 憲明^{*2}

* 1 大正製薬株式会社

* 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

利用期間： 平成 21 年 4 月 1 日～平成 22 年 3 月 31 日

アブストラクト

世界に先駆けた日本独自の研究開発によってタンパク質の量子化学計算が可能になってきた。しかし、阻害剤の活性値と直接比較できるタンパク質－阻害剤結合自由エネルギー ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) の量子力学的計算は、現在のスーパーコンピュータを用いても困難である。ところが、近年、Structure Based Drug Design (SBDD) において、結合自由エネルギーのエンタルピー成分 (ΔH) が注目されており、それは量子力学的に高精度で計算できる可能性がある。そこで、地球シミュレータによるタンパク質－阻害剤の量子化学計算を利用した結合エンタルピー予測法を開発し、創薬研究における実用性を検討する。タンパク質－水系と複合体－水系、阻害剤－水系と純水系について、それぞれ、相互作用エネルギーマトリックスの差から得られる DIEM (Difference mean Interaction Energy Matrix) を用いると、量子化学計算を行う分子系を小さくすることが可能で、地球シミュレータを利用すれば、結合エンタルピーを現実的な計算時間で算出できる。平成 21 年度は、予測法の考案、プレ・ポスト処理プログラム開発を行い、小さなタンパク質モデル系で動作、計算時間を検証した。平成 22 年度は、実験値のあるタンパク質で予測値の精度検証、手法の最適化を行う。

キーワード： 結合エンタルピー、フラグメント分子軌道法、SBDD、相互作用エネルギー行列

1. 本プロジェクトの目的

X 線解析や NMR の技術発展により、創薬研究において Structure Based Drug Design (SBDD) 手法は盛んに用いられるようになってきた。しかし、複合体立体構造を 3D グラフィックス表示し、計算化学者や合成化学者がその結合様式を観察しながら経験や勘に頼って分子設計しているのが現状であり、合理的な分子設計とは言えない。

高齢化社会が加速するなか、社会保障費、中でも医療費の増大が国家的・社会的課題である。薬剤の低価格化が望まれる。しかし、副作用の少ない安全で治療効果の高い新薬を開発するために製薬業界の研究開発費は増大し、世界規模での製薬会社の合併・吸収が進んでいる。新薬の開発期間短縮に

より薬剤の低価格化を目指すため、また、欧米の巨大製薬企業に対する日本の製薬会社の競争力強化のためにも、創薬技術の合理化が必要である。

これまで創薬研究においては、コンピュータの高性能化とタンパク質立体構造解析技術の発展を利用し、数百万個の市販化合物から薬理評価実験（HTS）に供する化合物群を選抜するシミュレーション技術を発展させ、その有効性を示している。しかし、冒頭で述べたように、その次のステージ（薬物候補化合物の最適化）で用いる技術は合理的でない。これまで考案されたタンパク質-阻害剤の結合自由エネルギー予測法のパフォーマンスが悪く、実用に適さないからである。計算量が少なく現実的な時間で計算できるものは予測精度が悪く、予測精度が比較的良いとされるものは膨大な計算量が必要で現実的な時間では計算出来ない。相互作用エネルギーを経験的関数で算出する影響も大きい。近年、副作用の少ない薬物では、結合自由エネルギーにおけるエンタルピー成分の寄与が大きいという説が発表され¹⁾、結合エンタルピーが注目されている。そこで、本プロジェクトでは、薬物候補化合物の最適化の指針を結合自由エネルギーではなく結合エンタルピーとし、エントロピー算出の複雑さを回避する。また、相互作用エネルギーは量子化学的に算出し、計算精度を向上させる。タンパク質のような巨大分子の量子化学計算は、日本独自の研究開発^{2,3)}によって可能になってきており、それを利用したタンパク質-阻害剤の結合エンタルピー予測法を開発し、地球シミュレータを用いれば、現実的な時間で計算できる。そして、この手法を実用化することにより、創薬における分子設計技術の合理化を目指す。

尚、本プロジェクトは医療用医薬品の研究開発期間短縮を目指したもので、純粋に平和利用を目的とする。

2. 結合エンタルピー算出法、DIEM(Difference mean Interaction Energy Matrix)

2.1 結合エンタルピー算出 (ΔH_{Bind})

結合エンタルピー (ΔH_{Bind}) は、図 1 に示すような 4 つの独立な分子系の周期的境界条件による温度・圧力一定の分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、系の内部エネルギーの平均値 $\langle E \rangle$ 、体積の平均値 $\langle V \rangle$ により定義されるエンタルピー $H = \langle E \rangle + P_{EX} \langle V \rangle$ 、ここで P_{EX} は設定圧力 (1 気圧)、を用いて

$$\Delta H_{Bind} = (H_{Wat} + H_{Comp}) - (H_{Lig} + H_{Prot}) \quad (1)$$

で求められる。ここで、添え字 Lig は阻害剤-水系、Prot は単体タンパク質-水系、Wat は純水系、Comp は (タンパク質-阻害剤) 複合体-水系を表す。Lig, Wat 系の水分子数、Prot, Comp 系の水分子数は、それぞれ等しいとする。また、Lig 系と Prot 系に含まれるイオン数の和と Wat 系と Comp 系に含まれるイオン数の和も等しいとする。

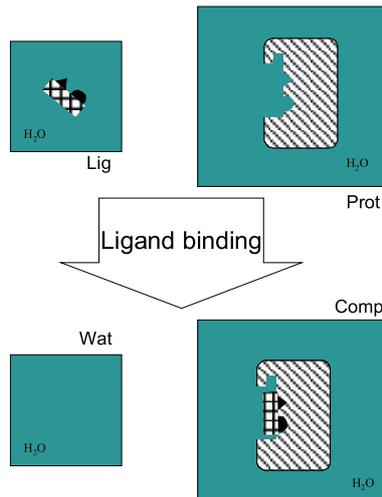


図1. 結合エンタルピー算出のための4つのMDシミュレーション

2.2 DIEM(Difference mean Interaction Energy Matrix)

温度一定のMDでは、(1)式の内部エネルギーの運動エネルギーの寄与は差引きゼロとなるので、系のポテンシャルエネルギー U を用いてエンタルピーを $H = \langle U \rangle + P_{EX} \langle V \rangle$ と書き換えても等価である。MDがAMBER⁴⁾等原子間相互作用関数のセット(力場)で解かれたとすると、 U は系の部分系 I のポテンシャルエネルギー U_I の和で、 U_I は部分系間相互作用 U_{IJ} の和として書ける。

$$U = \frac{1}{2} \sum_I U_I = \frac{1}{2} \sum_I \sum_J U_{IJ} \quad (2)$$

部分系は、タンパク質についてはアミノ酸1残基毎、或は、結合した2残基毎の様にとり、阻害剤は、1部分系とする。水分子は、系をセルに分割し、そのセル内の水分子をまとめて1部分系とする(図2)。セル内の水分子は、絶えず入れ替わる。

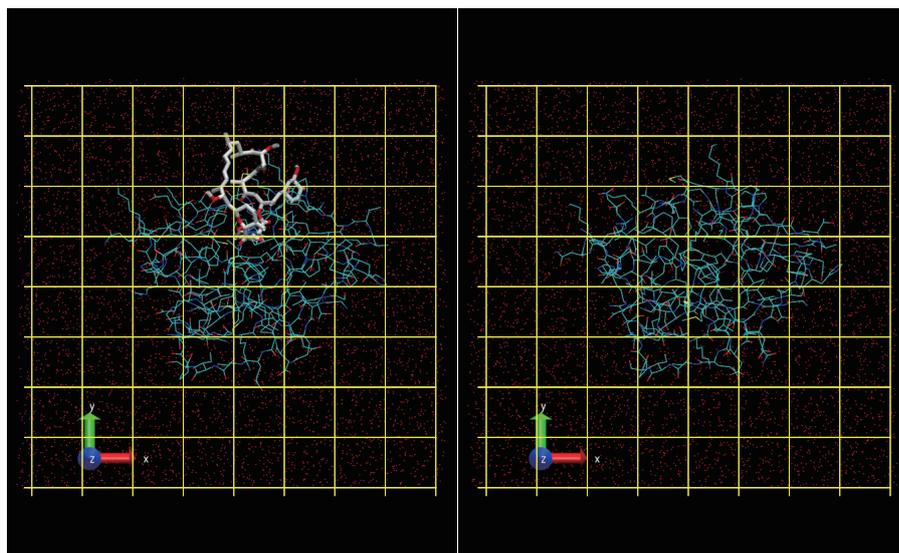


図2. 水分子部分系のためのセル分割

Lig, Wat系のセル分割数、Prot, Comp系のセル分割数は、それぞれ等しいとする。また、部分系I, Jは、Lig, Wat系、Prot, Comp系について、それぞれ、対応させる。即ち、Prot, Comp系のタンパク質については、アミノ酸残基で対応させ、阻害剤は、Lig, Comp系の阻害剤が存在する水分子セルと同位置のWat, Prot系の水分子セルを対応させる。次に、各部分系間相互作用を平均し、 $\langle U_{IJ} \rangle$ 、対応する $\langle U_{IJ} \rangle$ の差 $\Delta U_{IJ}^{Comp-Prot} = \langle U_{IJ}^{Comp} \rangle - \langle U_{IJ}^{Prot} \rangle$ 、 $\Delta U_{IJ}^{Wat-Lig} = \langle U_{IJ}^{Wat} \rangle - \langle U_{IJ}^{Lig} \rangle$ からなる行列を考える。阻害剤から離れた位置にある部分系に関する $\Delta U_{IJ}^{Comp-Prot}$ 、 $\Delta U_{IJ}^{Wat-Lig}$ はゼロになることが期待される。そこで、各行列要素の絶対値が閾値 ΔE 未満のものをゼロと見なし、 ΔE 以上のものと分け、図3、図4のように並べ替える。

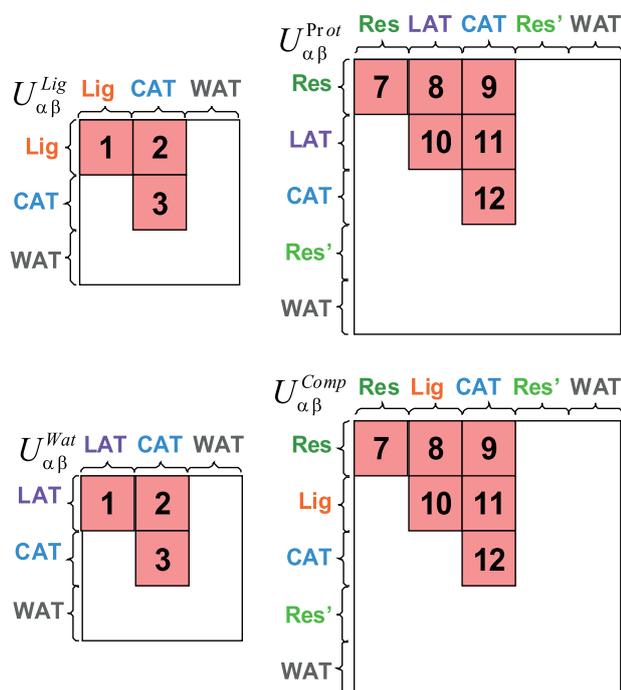


図3. Difference Interaction Energy Matrix

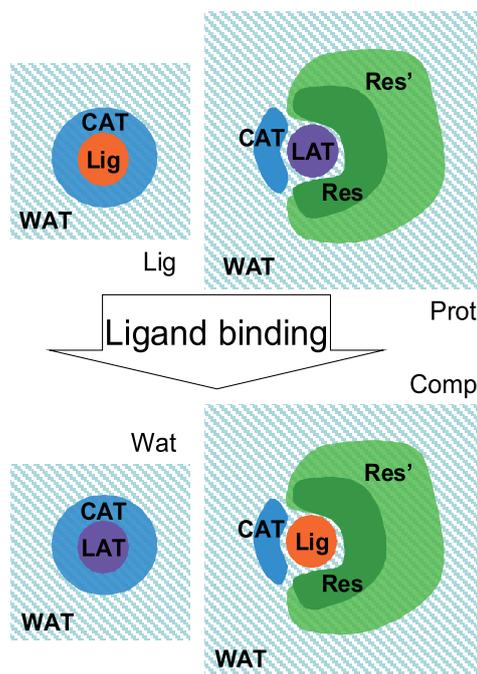


図4. DIEMの分子部分系概念図

この並べ替えられたゼロでない要素からなる行列をDIEM(Difference mean Interaction Energy) Matrixと呼ぶことにする。DIEMは対称行列であるので、図3は上三角部分のみ描いている。ただし、図3は、DIEMを定義した後、それぞれ、 $\langle U_{\alpha\beta}^{Comp} \rangle$, $\langle U_{\alpha\beta}^{Prot} \rangle$, $\langle U_{\alpha\beta}^{Wat} \rangle$, $\langle U_{\alpha\beta}^{Lig} \rangle$ に戻した行列である。色の付いた部分がDIEMに相当し、対応するセルに同じ番号をつけた。図3、図4において、Ligは阻害剤、LATは阻害剤位置に対応する水部分系であり、CAT, Resは、それぞれ、DIEMに属する水部分系、アミノ酸残基部分系である。また、WAT, Res' は、それぞれ、DIEMに入らなかった水部分系、アミノ酸残基部分系である。

以上を式で書くと(3)式のようなになる。

$$\begin{aligned}
\Delta H_{Bind} &= (H_{Comp} - H_{Prot}) + (H_{Wat} - H_{Lig}) \\
&= \left\{ \left(\sum_{I \geq J} \langle U_{IJ}^{Comp} \rangle + P_{EX} \langle V_{Comp} \rangle \right) - \left(\sum_{I \geq J} \langle U_{IJ}^{Prot} \rangle + P_{EX} \langle V_{Prot} \rangle \right) \right\} \\
&\quad + \left\{ \left(\sum_{I \geq J} \langle U_{IJ}^{Wat} \rangle + P_{EX} \langle V_{Wat} \rangle \right) - \left(\sum_{I \geq J} \langle U_{IJ}^{Lig} \rangle + P_{EX} \langle V_{Lig} \rangle \right) \right\} \\
&= \sum_{I \geq J} \left(\langle U_{IJ}^{Comp} \rangle - \langle U_{IJ}^{Prot} \rangle \right) + \sum_{I \geq J} \left(\langle U_{IJ}^{Wat} \rangle - \langle U_{IJ}^{Lig} \rangle \right) \\
&\quad + P_{EX} \left(\langle V_{Comp} \rangle - \langle V_{Prot} \rangle + \langle V_{Wat} \rangle - \langle V_{Lig} \rangle \right) \\
&= \sum_{\alpha\beta} \Delta U_{\alpha\beta}^{Comp-Prot} + \sum_{\alpha\beta} \Delta U_{\alpha\beta}^{Wat-Lig} \\
&\quad + P_{EX} \left(\langle V_{Comp} \rangle - \langle V_{Prot} \rangle + \langle V_{Wat} \rangle - \langle V_{Lig} \rangle \right)
\end{aligned} \tag{3}$$

2.3 FMO 法による分子軌道法計算による ΔH_{Bind} の高精度化

AMBER 力場を用いると (3) 式の計算は、直ちにできる。

$$\begin{aligned}
\Delta H_{Bind} &= \sum_{\alpha\beta} \Delta U_{\alpha\beta}^{Comp-Prot} + \sum_{\alpha\beta} \Delta U_{\alpha\beta}^{Wat-Lig} \\
&\quad + P_{EX} \left(\langle V_{Comp} \rangle - \langle V_{Prot} \rangle + \langle V_{Wat} \rangle - \langle V_{Lig} \rangle \right) \\
&= \sum_{\alpha\beta} \left(\langle U_{\alpha\beta}^{Comp} \rangle - \langle U_{\alpha\beta}^{Prot} \rangle \right) + \sum_{\alpha\beta} \left(\langle U_{\alpha\beta}^{Wat} \rangle - \langle U_{\alpha\beta}^{Lig} \rangle \right) \\
&\quad + P_{EX} \left(\langle V_{Comp} \rangle - \langle V_{Prot} \rangle + \langle V_{Wat} \rangle - \langle V_{Lig} \rangle \right) \\
&= \left(\langle \sum_{\alpha\beta} U_{\alpha\beta}^{Comp} \rangle - \langle \sum_{\alpha\beta} U_{\alpha\beta}^{Prot} \rangle + \langle \sum_{\alpha\beta} U_{\alpha\beta}^{Wat} \rangle - \langle \sum_{\alpha\beta} U_{\alpha\beta}^{Lig} \rangle \right) \\
&\quad + P_{EX} \left(\langle V_{Comp} \rangle - \langle V_{Prot} \rangle + \langle V_{Wat} \rangle - \langle V_{Lig} \rangle \right)
\end{aligned} \tag{4}$$

(3) 式を (4) 式のように書き換え、DIEM の成分である部分系群を MD の各スナップショットから切り出し (図 5)、原子間相互作用関数を用いて部分系間相互作用エネルギーを計算し、平均すれば良い。次に、フラグメント分子軌道 (FMO) 法³⁾ による分子軌道計算により、部分系間相互作用エネルギーを高精度化することを考える。プログラムは ABINIT-MP⁵⁾ を使い、IFIE (Inter-Fragment Interaction Energy) を利用すると部分系間相互作用エネルギーが計算できる。しかし、分子軌道法による相互作用エネルギー計算では、原子間相互作用関数の場合のように計算したい部分系のみ切出した系では、正確な相互作用エネルギーを得ることが出来ない。図 6 に示すように、計算したい部分系の周囲に存在する水分子やアミノ酸残基が存在する部分系を切出さなければならない。どの程度の分子を周囲に存在させれば正確な部分系間相互作用エネルギーが計算できるかを周囲の分子層の厚さを変更して、解析した。詳細は省略し結果のみ示す。周囲の水分子層は 6 Å 必要 (図 6 の WAT) であり、タンパク質は全体を取り込むことにした。また、FMO 法のフラグメント分割が部分系間相互作用エネルギーに与える影響も解析した。アミノ酸残基の分割や阻害剤の分割により、約 1.5kcal/mol の誤差が生じることがわかった。これにより、DIEM の定義に用いる閾値 ΔE は 1.5kcal/mol 以下にとれば良い。

地球シミュレータを用いても、タンパク質や複合体の FMO 法の計算は時間がかかる。平均値を得るためのスナップショットの数は、原子間相互作用関数を用いる場合のように数千〜数万は不可能である。そこで、原子間相互作用関数を用いて部分系間相互作用エネルギー $\sum U_{\alpha\beta}^{***}$ を計算し、その結果を用いて FMO 計算のためのスナップショットを選抜することにした。

$\sum U_{\alpha\beta}^{***}$ のヒストグラムを作り、その平均値を中心に±標準偏差の幅に入るスナップショットからランダムに選抜する方法を採用する（図7）。

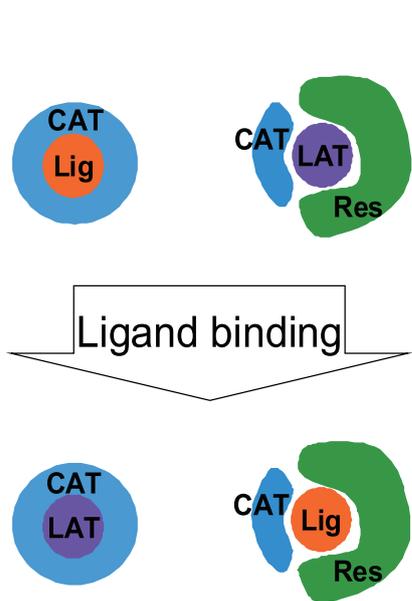


図5. 原子間相互作用関数計算用部分系切出し

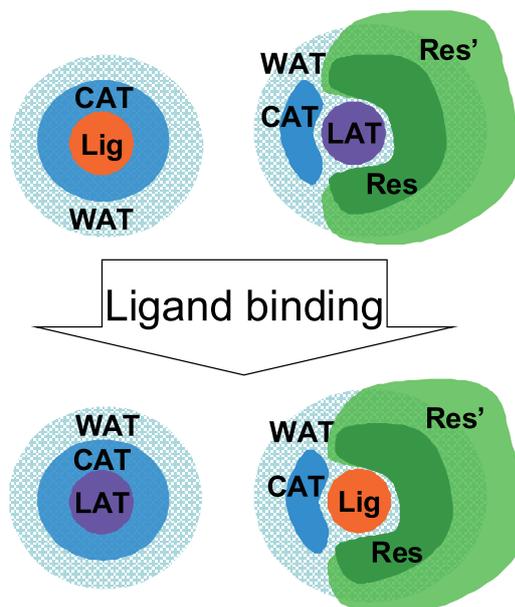


図6. FMO法IFIE計算用部分系の切出し

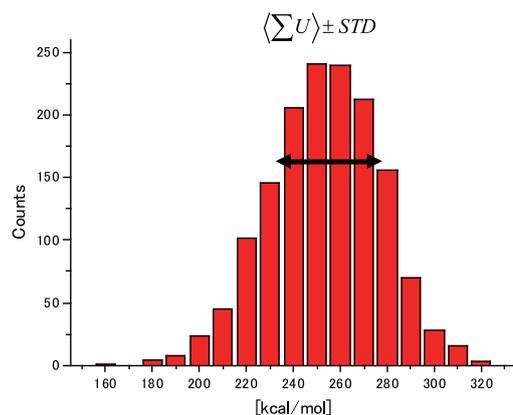


図7. 原子間相互作用関数による部分系間相互作用エネルギーのヒストグラム

3. 小さなタンパク質-阻害剤による試計算

結合エンタルピーの実験値は無いが、小型（100 残基程度）で阻害剤との複合体 X 線解析構造のあるものを用いて、開発したプレ、ポスト処理プログラムの動作確認、DIEM 部分系の FMO 法による IFIE 計算の計算時間確認のための試計算を行った。

まず、図1のLig, Wat, Prot, Compの4つの独立のMDシミュレーションをプログラムAMBER9.0/sanderをNEC社MD Server⁶⁾上で動かし、Lig, Watは1 ns、Prot, Compは2ns行った。タンパク質、阻害剤の並進、回転運動を止めるため、タンパク質のC α 原子、阻害剤の水素原子以外にX線解析構造の座標をリファレンスとして、係数0.1kcal/mol拘束をかけた。これら4つのMDシミュレーション

より、(1)式で得られる結合エンタルピーは-15.0kcal/molであった。この阻害剤の結合自由エネルギーの実験値は約-10kcal/molなので、現実的な結合エンタルピー値のオーダーであるといえる。次に、4つのMDの結果を解析し、DIEMを求めた。FMO法ABINIT-MP計算のサンプルスナップショットを選抜するため、AMBER原子間相互作用関数でDIEMに対応する部分系の部分系間相互作用エネルギーを計算した。この結果を用いた結合エンタルピーは-21.0kcal/molであった。また、2.3節の方法で、スナップショットは、それぞれ、25個選抜し、DIEMの部分系及び周囲の水分子、アミノ酸残基(タンパク質全体)を切出した。基底関数はMP2/6-31G(d,p)、阻害剤は3つにフラグメント分割し、FMO法ABINIT-MP/IFIE計算を行った。LigとWatは、弊社PCクラスタ、Xeon X5570 2.8GHz x 2CPU(2P8C) (32GBメモリ) 4ノード (32コア並列)で行った。計算時間は、Ligが1.4時間、Watは1.0時間であった。ProtとCompは、地球シミュレータ(ES2)で行った。ES2上のABINIT-MPは、NECソフトの山下らによって最適化されたものである。Protは約17ノード時間、Compは約20ノード時間であった。それぞれ、25スナップショットについて計算し、平均値を得た。結合エンタルピーは-30.2kcal/molであった。

4. まとめ

タンパク質-阻害剤の結合エンタルピーを、フラグメント分子軌道(FMO)法プログラムABINIT-MPを用いて量子化学的に算出するための計算手法を考案した。タンパク質-水系と複合体-水系、阻害剤-水系と純水系について、それぞれ、相互作用エネルギーマトリックスの差から得られるDIEMを定義する。DIEMを用いると、量子化学的に計算する分子系を小さくすることが可能で、ES2上で最適化されたABINIT-MPにより、相互作用エネルギーが分子軌道法で計算された結合エンタルピーを現実的な時間で算出できた。

平成22年度は、この手法を実験値のあるタンパク質-阻害剤に適用し、結合エンタルピーの計算精度を検証する計画である。

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いただきました。

ABINIT-MPの計算に関してご指導頂いた国立医薬品食品衛生研究所・中野達也博士、また、地球シミュレータ上での計算、実行法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。

参考文献

- 1) E. Freire, "Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class?", *Drug Discovery Today*, vol.13, pp.869-873, October 2008.
- 2) F. Sato, T. Yoshihiro, M. Era, H. Kashiwagi, "Calculation of all-electron wavefunction of hemoprotein cytochrome c by density functional theory", *Chem. Phys. Lett.*, vol.341, pp. 645-651, June 2001.,

- 3) K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayasi, “Fragment Molecular Orbital Method: An Approximation Computational Method for Large Molecules” , Chem. Phys. Lett., vol.313, pp.701-706, 1999.
- D. G. Fedorov, K. Kitaura, “Extending the Power of Quantum Chemistry to Large Systems with the Fragment Molecular Orbital Method” , J. Phys. Chem. A, vol.111, pp.6904-6914, 2007.
- 4) D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, K.M. Merz, D.A. Pearlman, M. Crowley, R.C. Walker, W. Zhang, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, K.F. Wong, F. Paesani, X. Wu, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, D.H. Mathews, C. Schafmeister, W.S. Ross, and P.A. Kollman (2006), AMBER 9, University of California, San Francisco.
- 5) ABINIT-MP 2008 Ver. 4.2, Available at <http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/dl/>
- T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura, “Fragment Molecular Orbital Method: Application to polypeptides” , Chem. Phys. Lett., vol.318, pp. 614-618, 2000.
- T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, K. Fukuzawa, Y. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura, Chem. Phys. Lett., vol.351, pp. 475-480, 2002.
- 6) <http://www.nec.co.jp/press/ja/0511/2901.html>