

フラグメント MO 法による ノイラミニダーゼ阻害薬の結合性解析

尾 渡 裕 成^{†1} 関 嶋 政 和^{†1,†2} 秋 山 泰^{†1}

フラグメント MO 法では、タンパク質等の大型分子を残基単位などのフラグメントに分けることにより現実的な時間内での *ab initio* 分子軌道計算が可能となり、フラグメント間の相互作用解析を行うことができる。我々は、フラグメント MO 法プログラムを利用して、インフルエンザウィルスの持つノイラミニダーゼ酵素に対する、DANA、ザナミビル (リレンザ)、オセルタミビル (タミフル)、ペラミビルの 4 種の薬剤との結合能力の強弱の見積もりを試みた。薬剤間の比較や、耐性株に関する検討結果も紹介する。

Binding analysis of neuraminidase inhibitors by fragment MO calculation

YUSEI OWATARI,^{†1} MASAKAZU SEKIJIMA ^{†1,†2}
and YUTAKA AKIYAMA^{†1}

The fragment MO method can perform molecular orbital calculation by dividing protein into fragments such as residue composition in realistic time, and can analyze interactions between fragments. We calculated binding energy of DANA, zanamivir, oseltamivir and peramivir by using a fragment MO software called Advance/BioStation. In this report, we also show comparison among medicines and potential application to the analysis of a drug-resistant strain.

^{†1} 東京工業大学 大学院情報理工学専攻

Graduate School of Information Science and Engineer, Tokyo Institute of Technology

^{†2} 東京工業大学 学術国際情報センター

Global Scientific Information and Computing Center, Tokyo Institute of Technology

1. はじめに

ゲノム解析が急速に進展している現在、ゲノム情報を有効に活用した医薬品の開発は非常に重要な課題となっている。これまでタンパク質や DNA といった生体高分子の機能を分子計算で解析するには、分子を構成する原子の間に働く力を古典的なポテンシャル関数 (力場) で近似した分子力学法 (MM 法) や分子動力学法 (MD 法) が用いられてきた。しかし分子間の相互作用は古典力場関数では精度よく記述できない場合が多く、第一原理 (量子力学) に基づいた巨大分子計算法の実現が待たれていた。現在はタンパク質 - リガンドの相互作用エネルギーを量子論に基づき高精度で解析するシステムがいくつか開発されている¹⁾。

本稿では、市販ソフトである Advance/BioStation²⁾ を用い、フラグメント MO 法によりタンパク質 - リガンドの相互作用エネルギーを解析した。タンパク質のターゲットとしてインフルエンザウィルスの持つノイラミニダーゼ酵素を選び、リガンドの候補として DANA、ザナミビル (リレンザ)、オセルタミビル (タミフル)、ペラミビルの 4 つのノイラミニダーゼ阻害薬を選択し、各々の結合能力の強弱の見積もりを試みた。

2. フラグメント MO 法

非経験的分子軌道 (*ab initio* MO) 法は、低分子化合物の電子状態、物性、構造の計算などに大きな成果を挙げてきた。しかしながら、この方法は計算時間やメモリーが膨大かつ、並列化も難しいため生体分子への応用は、数が限られていた。近年非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* Fragment Molecular Orbital; 以下 FMO) 法³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾ の登場により比較的小規模な PC クラスターでも実用的な計算時間で計算可能となった。*ab initio* FMO 法は、分子を適当なサイズのフラグメントに分割し、フラグメント (モノマー) とフラグメントペア (ダイマー) について MO 計算を行うだけで、分子全体のエネルギーや電子密度を計算する方法である。この方法は、

- ・フラグメント間の相互作用エネルギーを計算可能
- ・各モノマー及びダイマーの計算は独立して行うことが可能であるため、並列処理による大幅な高速化が可能
- ・各モノマー及びダイマーと周囲のモノマー間の静電相互作用に近似を導入することで高速化可能
- ・離れたフラグメントペアから構成されるダイマーを、静電的に相互作用するモノマーの和として近似することでさらに高速化可能

といった特徴がある。*ab initio* FMO法を用いることで低分子化合物で成功を収めた *ab initio* MO法を、精度を落とさずにタンパク質のような巨大分子へ適用することが可能となる。特に最初にあげた特徴により、従来は困難であった残基 - リガンド分子間の相互作用等を定量的に解析することが可能になり、医薬品などの分子設計に大きく役立つことが期待される¹⁾⁷⁾。

FMO法の計算手順を図1に示した。

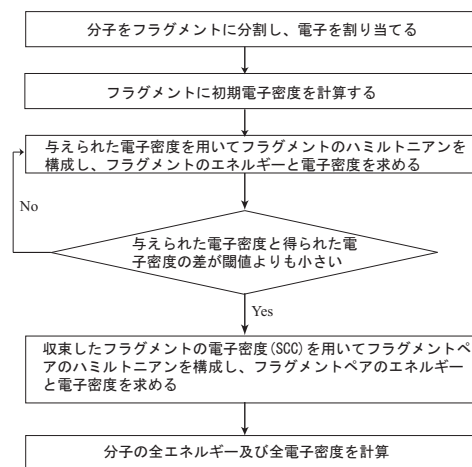


図1 FMO法の計算手順
Fig.1 calculation procedure of FMO

3. QM/MM法

量子力学計算は精度の高い結果を与える一方で、タンパク質のような巨大分子を取り扱う場合には非常に計算時間がかかってしまう。一方、分子力学計算は量子力学計算よりも精度は落ちるものの量子力学計算に比べて計算時間はあまりかからない。そこで巨大分子について構造をシミュレートする場合、この二つの長所を取り入れ、詳細に知りたい部分については量子化学計算を用い、その他の部分については分子力学計算を利用するという方法で計算を行うことで、計算時間を抑えつつ精度を保つことができる。これをQM/MM(Quantum Mechanics/Molecular Mechanics)法と呼ぶ。QM/MM法を実際に用いる場合、リガンド付近をQM領域として指定し、それ以外をMM領域として指定する。本研究ではQM領域を

FMO計算で、MM領域をXUFF(eXtended Universal Force Field)力場で計算する。XUFF力場とは、Universal Force Field(UFF)⁸⁾を拡張したもので、金属を含むなど幅広いリガンド-タンパク複合体に対応でき、可変電荷の利用により静電相互作用を高い精度で取り扱うことができるという特徴を持つ。またQM領域とMM領域の中間的領域にBuffer領域と呼ばれる、エネルギーの精度向上のため一部FMO計算を行う領域を設ける。

またAdvance/BioStationではQM/MM法を用いるにあたり、リガンドを中心にQM領域の範囲を指定することができる。この範囲が小さいほど量子化学計算による高精度な計算の範囲が小さくなるので精度が下がるが計算時間は短縮でき、この範囲を大きくすると精度が高くなる代わりに計算時間が長くなる。

4. ターゲット薬剤

本研究では解析するターゲットの薬剤としてインフルエンザのノイラミニダーゼ阻害薬を選択した。インフルエンザウイルスの体内での増殖の仕組みとして、まずウイルスがヘマグルチニンにより細胞表面に吸着、細胞内に侵入する。その後細胞内部で増殖したあとに、細胞外に脱出するにあたり、シアル酸(ニイラミン誘導体)を糖タンパク質や糖脂質から切り離す作用をもつノイラミニダーゼ酵素により細胞との結合を切断し脱出する。またヘマグルチニンは16種類(H1~H16)の亜型に分類され、ノイラミニダーゼは9種類(N1~N9)の亜型に分類されている。この二つの酵素の種類によりインフルエンザウイルスはH5N1型、H1N1型などのように表記される。

また現在多くの抗インフルエンザウイルス薬として、このノイラミニダーゼの働きを阻害するものが使われている。ノイラミニダーゼの働きを阻害することにより、インフルエンザウイルス表面にあるヘマグルチニンと宿主細胞表面のシアル酸の結合を維持することで、インフルエンザウイルスの体内での増加を防ぐ。

今回はノイラミニダーゼ阻害薬の中でもDANA、ザナミビル(商品名:リレンザ)、オセルタミビル(商品名:タミフル)、ペラミビルの4つを選択し、比較検討を試みた。

5. ザナミビルの解析

まず最初にザナミビル(リレンザ)の解析を行った。計算手法はFMO-HartreeFockとし、基底関数は6-31Gとした。また計算は表1に示す環境で行った。この後の全ての計算も同じ条件で行った。ノイラミニダーゼとザナミビルが結合しているPDB⁹⁾データのついでに2HTQがあり、本研究ではこれを使用した。2HTQはH5N1型鳥インフルエンザのノイラミニダー

表 1 使用した計算機環境
Table 1 Computing Environment

CPU	Opteron 8216 (2.4GHz) dual x 4way (8 core)
メモリ	32GB
ハードディスク	250GB*4
OS	SuSE Linux 9 SP3

表 2 QM/MM 法の QM 半径と精度, 計算時間の比較
Table 2 comparison of precision and computation time by changing radius of QM/MM method

QM 半径 ()	1.5	3	4.5	6	7.5	9	FMO
結合エネルギー (kcal/mol)	-203.120	-190.627	-176.365	-174.184	-171.97	-171.52	-170.071
計算時間 (h)	26.0	24.0	58.5	77.9	81.1	83.7	262.0
FMO 法との誤差	19 %	11 %	3.50 %	2.35 %	1.12 %	0.88 %	0

ゼとザナミビルが結合した構造体である。しかしこの構造体は 390 残基と FMO 計算を行うにはやや大きく、実際に全範囲で FMO 法を用い結合エネルギーの計算を行った場合、使用している計算機の環境では 274 時間かかった。

そこで計算時間の短縮のため QM/MM 法の検討を行った。

5.1 QM/MM 法の半径

QM/MM 法を用いるにあたって、先述のようにリガンドを中心にどの範囲まで QM 計算を行うかを半径を指定することができるので、リガンドから実際に QM 計算を行う領域の半径 (QM 半径) の大きさを変えながらリガンドとタンパク質の結合エネルギーを解析することにより、QM 半径の大きさと計算精度の関係を調べた。ここでは構造体としてさきほどの 2HTQ を用い、QM 半径を 1.5 ずつ変化させたときの結合エネルギーと計算時間を測定し表 2 に記した。ここで結合エネルギーはプラスは斥力、マイナスは引力を示しており、それぞれ値が大きいほどエネルギーが大きいことを示している。

これにより QM 半径 4.5 の時、全体を FMO 計算した場合の 1/5 程度に計算時間を短縮でき、FMO 法との誤差を 3.5 % に抑えることができた。そこで次に QM 半径 4.5 の場合と FMO 法の場合で結合プロファイルの詳細な比較を行った。これを図 2 と図 3 に示す。

両者の結合プロファイルと比較すると引力のピークはそれぞれ GLU119, GLU227, ARG371 に見ることができ、斥力のピークは ARG156 にあり、エネルギーもそれぞれ非常に近い値を

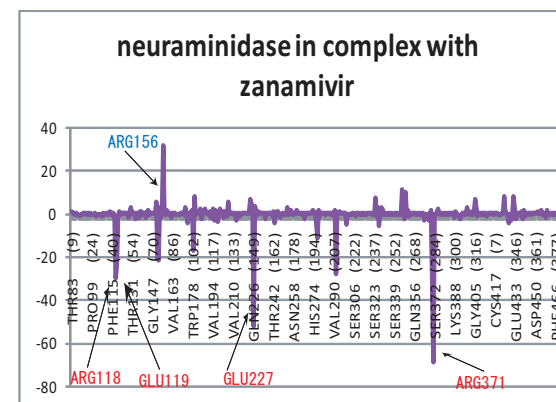


図 2 QM/MM 法 (QM 半径 4.5) による相互作用プロファイル
Fig. 2 interaction analysis by using QM/MM method (radius=4.5)

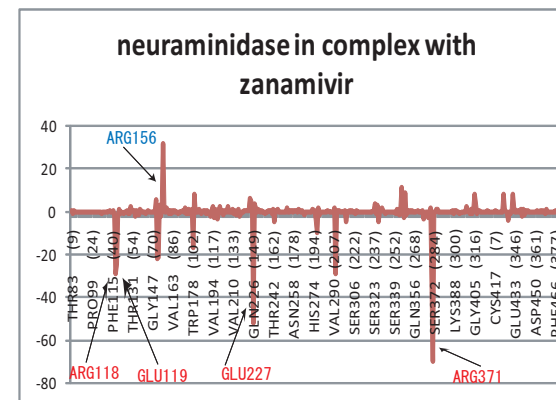


図 3 FMO 法による相互作用プロファイル
Fig. 3 interaction analysis by using FMO method

とることから、半径 4.5 の QM/MM 法でも信頼できる結合プロファイルを得ることができると考えられる。よって本稿の今後の解析は計算時間を抑えつつ精度の高い解析を行うため、全て半径 4.5 の QM/MM 法で行うものとする。またここで図 4 は結合プロファイルを生 BioStation Viewer を使用し可視化したもので、赤は引力、青は斥力を示している。

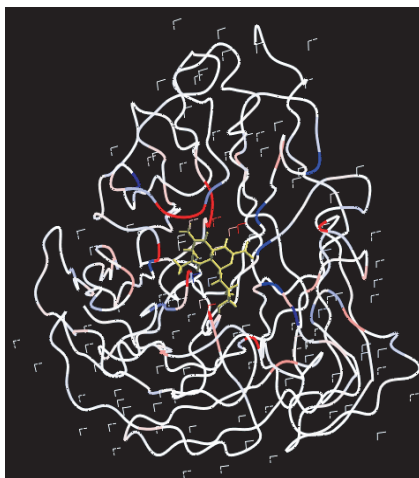


図 4 QM/MM 法 (QM 半径 4.5) による相互作用解析の可視化
Fig. 4 visualization of interaction analysis by using QM/MM method(radius=4.5)

6. 各種ノイラミニダーゼ阻害薬の結合エネルギー比較

6.1 解析した薬剤

今回はインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害薬として

- ・ DANA: (2HTR N8 neuraminidase in complex with DANA)
- ・ ザナミビル: (2HTQ N8 neuraminidase in complex with zanamivir)
- ・ オセルタミビル: (2HT7 N8 neuraminidase in open complex with oseltamivir)
- ・ ペラミビル: (2HTU N8 neuraminidase in complex with peramivir)

の 4 薬剤について解析を行った。DANA (2HTR) はシアル酸の類似体で、リレンザ (2HTQ) は 1989 年にビオタ社により DANA (2HTR) の構造を基礎としてコンピュータ支援により分子を設計することによって作られた。またタミフル (2HT7) は 1996 年にギリアド・サイ

表 3 結合エネルギーと計算時間比較

Table 3 comparison of binding energy and computation time

薬剤名	DANA	ザナミビル (リレンザ)	オセルタミビル (タミフル)	ペラミビル
PDB ID	2HTR	2HTQ	2HT7	2HTU
リガンド部分分子量	291 ($C_{11}H_{17}NO_8$)	331 ($C_{12}H_{20}N_4O_7$)	284 ($C_{14}H_{24}N_2O_4$)	328 ($C_{15}H_{28}N_4O_4$)
結合エネルギー (kcal/mol)	-96.84	-176.37	-203.58	計算中
計算時間 (h)	41.1	58.5	47.1	計算中

エンス社が、経口投与ができるノイラミニダーゼ阻害薬として開発し、ペラミビル (2HTU) はバイオクリスト社によって開発された注射型の新薬である。

6.2 解析結果

これらの薬剤を、QM 半径 4.5 の QM/MM 法を用いて計算し、ノイラミニダーゼと薬剤の結合エネルギー及び結合プロファイルと比較した。ペラミビルは現在計算中のため発表時に示す。

表 3 は各ノイラミニダーゼ阻害薬のリガンド部の分子量と、ノイラミニダーゼと各阻害薬の結合エネルギー及び計算時間を比較したものである。また表 4 は各阻害薬とアミノ酸残基の引力及び斥力の大きな残基に限定して結合プロファイルを示したもので、単位は kcal/mol である。

ノイラミニダーゼにはシアル酸 (ノイラミン誘導体) を糖タンパク質や糖脂質から切り離す作用があるが、その活性部位はノイラミニダーゼのくぼみの中にあり、特に ARG118, ASP151, ARG152, ARG224, GLU227, GLU276, ARG292, ARG371 などの残基が作用していることが知られている¹⁰⁾。表 4 で各阻害薬の結合プロファイルと比較し、強く力が働いている残基とその結合エネルギーを記した。これより ARG や GLU など電荷をもつアミノ酸がピークに多く現れていることから、クーロン力が影響していることが分かる。

各結合プロファイルと比較すると、ザナミビル (2HTQ) とオセルタミビル (2HT7) のピークの現れ方が似ており、DANA (2HTR) は異なるピークの現れ方をしていることが分かる。ザナミビル (2HTQ) とオセルタミビル (2HT7) はアミノ基とカルボキシル基の両方を持つが、DANA (2HTR) はカルボキシル基しかないことより得られる結合エネルギーが少ないことが考えられる。

またザナミビル (2HTQ) とオセルタミビル (2HT7) の二つを比較するとピークの現れる

表 4 重要な残基との結合プロファイル比較
Table 4 Binding profile for important residues

残基	ARG118	GLU119	ARG156	ARG224	GLU227	ARG292	ARG371	ILE468
DANA	-78.06	29.30	-32.82	-33.34	21.74	-79.22	-113.55	-62.39
ザナミビル	-29.058	-26.27	32.73	5.30	-56.80	-29.18	-69.21	-0.12
オセルタミビル	-22.31	-60.31	22.07	15.52	-31.86	-23.75	-66.69	-0.11
ペラミビル	計算中							

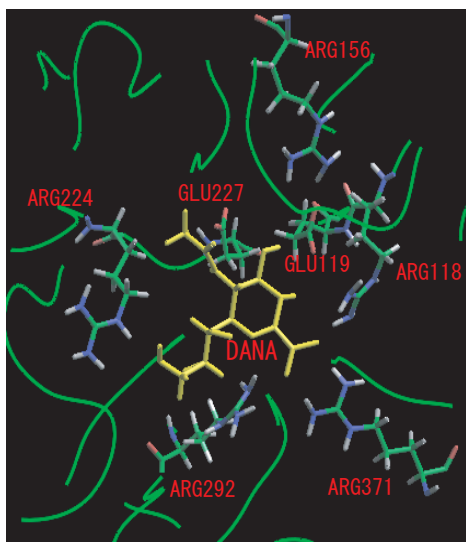


図 5 DANA(2HTR) の結合に関する周辺残基
Fig. 5 Binding residues for DANA(2HTR)

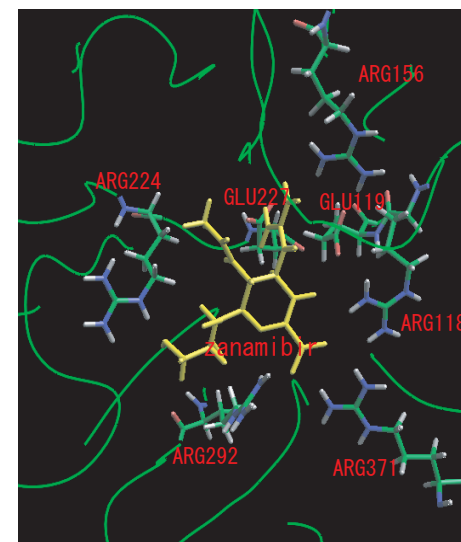


図 6 ザナミビル (2HTQ) の結合に関する周辺残基
Fig. 6 Binding residues for zanamivir(2HTQ)

残基は似ているがそれぞれ値が異なる。これは結合エネルギーがクーロン力に多く起因していることから、リガンドと残基のカルボキシル基とアミノ基との位置関係の差が関係していると考えられる。

まず ARG224 に注目するとザナミビル (2HTQ) では ARG224 のアミノ基とザナミビルのアミノ基の距離は 10.2 であり、カルボキシル基との距離は 11.0 である。またオセルタミビル (2HT7) では ARG224 のアミノ基とオセルタミビルのアミノ基の距離は 9.6 であり、カルボキシル基との距離は 11.2 である。

同様に GLU227 に注目するとザナミビル (2HTQ) では GLU227 のアミノ基とザナミビルのアミノ基の距離は 8.7 であり、カルボキシル基との距離は 3.6 である。またオセルタミビル (2HT7) では GLU227 のアミノ基とオセルタミビルのアミノ基の距離は 9.0 であり、カルボキシル基との距離は 5.5 である。

また表 4 より、どの阻害薬も先ほど挙げたアミノ酸の中で ARG118, ARG292, ARG371 にはそれぞれ引力が働き、また DANA(2HTR) は ARG224 と、ザナミビル (2HTQ) とオセルタミビル (2HT7) は GLU227 と引力が働いていることが分かる。

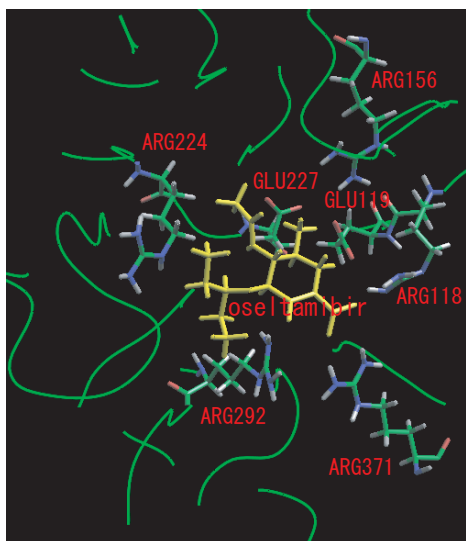


図 7 ザナミビル (2HT7) の結合に関する周辺残基
Fig. 7 Binding residues for oseltamivir(2HT7)

ここで図 5~図 7 は各阻害薬の結合に関する周辺残基とリガンドの位置関係を示した図で、図 8~図 10 は各ノイラミニダーゼ阻害薬の結合プロファイルを示している。

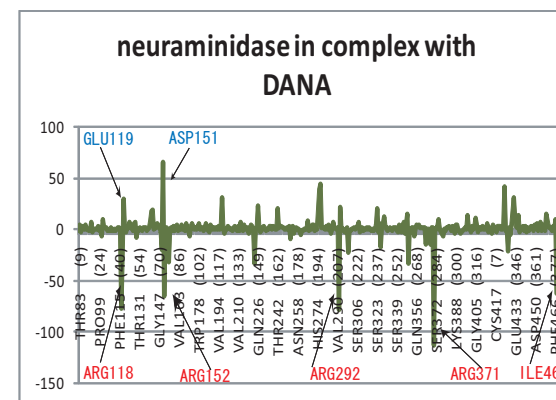


図 8 DANA(2HTR) の相互作用プロファイル
Fig. 8 interaction analysis of DANA(2HTR)

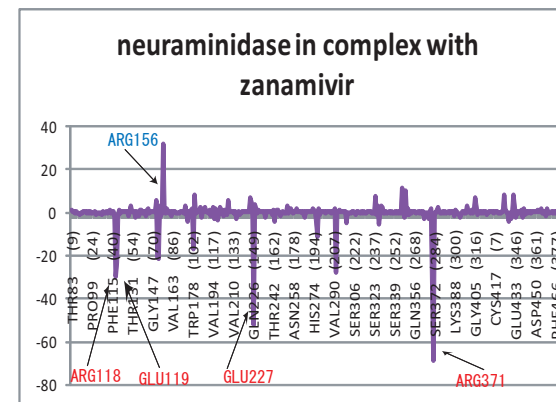


図 9 ザナミビル (2HTQ) の相互作用プロファイル
Fig. 9 interaction analysis of zanamivir(2HTQ)

7. 耐性株に対する各種阻害薬の解析

近年様々なノイラミニダーゼ阻害薬の耐性株がいくつか報告されている。今回解析した H5N1 型のノイラミニダーゼにもオセルタミビル (タミフル) に対する耐性株が報告されている。これはノイラミニダーゼの 274 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに変異 (H274Y) することにより生じる¹¹⁾。

そこでオセルタミビルとの複合体である 2HT7 の PDB データに対し,Discovery Studio を用いて 274 番目のヒスチジンをチロシンに変異体を作成する際には、アミノ酸残基の置換を行った。置換後の構造に TIP3P モデルの水 10 を付加した後,AMBER10 の pmemd モジュールを用い、エネルギー最小化後に 0K から 300K まで温度上昇を行った後に,300K で NTP アンサンブルのシミュレーションを行い構造を最適化した。現在は、ノイラミニダー

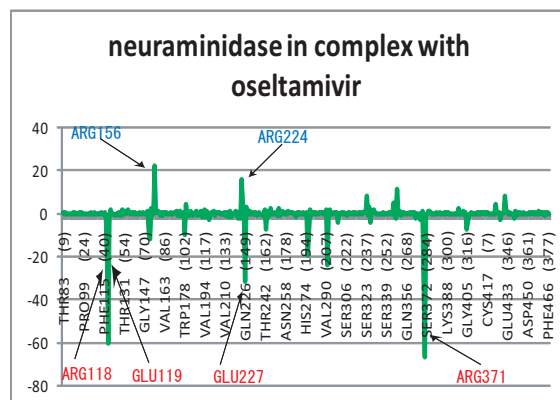


図 10 オセルタミビル (2HT7) の相互作用プロファイル
Fig. 10 interaction analysis of oseltamivir(2HT7)

ぜと各種阻害薬の結合エネルギーの解析及び結合プロファイルの比較を行っている。本稿の提出時点で計算が進行中であるため、結果は発表時に示す。

8. ま と め

フラグメント MO 法プログラムを利用して、インフルエンザウィルスの持つノイラミニダーゼ酵素と、DANA、ザナミビル (リレンザ)、オセルタミビル (タミフル)、ペラミビルの 4 種の薬剤との結合能力の強弱の見積もりを試み、また薬剤間の結合プロファイルの比較を行った。

今後は当手法の自動パイプライン化を進めるとともに、東工大の TUBAME などの並列計算機環境等を利用して、より大規模な解析を目指している。

謝辞 本稿を書くにあたり、有益なコメントと適切なアドバイスを与えて頂いた、アドバンスソフト株式会社的小林将人氏、日野理氏、長谷川浩司氏に心からの感謝を表す。本研究は、科学研究費補助金 (基盤研究 (B) 19300102) の支援を受けて行われたものである。

参 考 文 献

- 1) 中野 達也, 望月 祐志, 甘利 真司, 小林 将人, 福澤 薫, 田中 成典: フラグメント分子軌道法に基づいた生体巨大分子の電子状態計算の現状と今後の展望., J. Comput. Chem. Jpn., 6, 173-184 (2007).
- 2) http://www.advancesoft.jp/product/advance_biostation/.
- 3) K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayasi: Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules., Chem. Phys. Lett., 313, 701-706 (1999).
- 4) T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M Uebayasi, K Kitaura: Fragment molecular orbital method: application to polypeptides., Chem. Phys. Lett, 318, 614-618 (2000).
- 5) K. Kitaura, S. I. Sugiki, T. Nakano, Y. Komeiji, M. Uebayasi: Fragment molecular orbital method: analytical energy gradients., Chem. Phys. Lett., 336, 163-170 (2001).
- 6) T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, K. Fukuzawa, Y. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura: Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential., Chem. Phys. Lett., 351, 475-480 (2002).
- 7) 中野 達也, 加藤 昭史, 谷森 泰一郎, 小池上 繁, 雨宮 克樹, 福澤 薫: フラグメント分子軌道法入門., アドバンスソフト (2006).
- 8) A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard III, W. M. Skiff: UFF, a rule-based full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations., J. Am. Chem. Soc., 114, 10024-10035 (1992).
- 9) F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer Jr, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, J. Mol. Biol., 112, 535(1977). <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- 10) H.-L. Yen, E. Hoffmann, G. Taylor, C. Scholtissek, A. S. Monto, R. G. Webster, E. A. Govorkova: Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses., J. Virol., 80, 8787-8795 (2006).
- 11) M. D. De Jong, T. T. Thanh, T.H. Khanh, *et al*: Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection., N Engl J Med 353, 2667-2672 (2005).
- 12) T. Iwata, K. Fukuzawa, K. Nakajima, S. Aida-Hyugaji, Y. Mochizuki, H. Watanabe, S. Tanaka: Theoretical analysis of binding specificity of influenza viral hemagglutinin to avian and human receptors based on the fragment molecular orbital method., Comput. Biol. Chem., 32, 198-211 (2008).