

# 分子動力学法を用いたタンパク質・リガンドの相互作用解析

池田 潤一<sup>\*+</sup>、関嶋 政和<sup>+‡</sup>、村岡 洋一<sup>‡</sup>、野口 保<sup>+‡</sup>、

<sup>\*</sup> 早稲田大学 理工学部 コンピュータネットワーク工学科

<sup>+</sup> 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター

<sup>‡</sup> 早稲田大学 理工学術院

## 概要

タンパク質とリガンドの相互作用の度合いを数値化した結合自由エネルギーは、タンパク質・リガンド間の機能解析、最近では特に薬を設計する上で重要な情報である。本研究では、汎用的な PC クラスタを用いて、タンパク質とリガンド間の結合自由エネルギー値を求めるシステムを開発する。このシステムは、結合自由エネルギーを求める際に Shirts のアルゴリズム、Jarzynski の等式とベネット受容比法を用いる方法を用いることで大規模分子動力学シミュレーションを行い、計算結果が定量比較可能になることを目指している。

## Interaction analysis of Protein - Ligand by molecular dynamics method

Junichi Ikeda<sup>\*+</sup>, Masakazu Sekijima<sup>+‡</sup>, Muraoka Youichi<sup>‡</sup>, Tamotsu Noguchi<sup>+‡</sup>

<sup>\*</sup> The Department of Computer Science, Department of Science and Engineering,  
Waseda University

<sup>+</sup> Computational Biology Reserch Center, Natinal Institute of Advanced Industrial Science  
and Technology

<sup>‡</sup> Faculty of Science and Engineering, Waseda University

## Abstract

The binding free energy is important information to understand interaction between protein and ligand. Developing a lead chemical compound which established target of medicine is important to design drug. In this paper, we develop the evaluation system of the binding free energy of protein and ligand which applied Shirts algorithm on PC cluster. We also use Jarzynski equation and the Benett reception ratio.

## 1 はじめに

様々な疾病に関与するタンパク質が、遺伝子解析などの手法により明らかになってきている。また、たんぱく 3000 のようなプロジェクトや、タンパク質立体構造予測技術の進歩により、多くのタンパク質の構造情報が得られるようになってきている。そこで、これらの構造を考慮した創薬に関する研究が進められている。創薬とは、疾病の原因になっているタンパク質の疾病に関与する機能を抑える化合物

を発見することである。さまざまなアプローチがあるが、例えばヒトゲノム解析以前から現在まで医薬品の開発はターゲットとなるタンパク質に結合するリード化合物を天然物から様々なスクリーニングにより探索されてきた。候補化合物を分離・精製、構造研究を進めて派生する化合物を含めて合成し、臨床試験を通じて医薬品としての効果があるかを確認していく。医薬品の研究開発には、研究開始から承認取得まで 15 年～17 年の年月を要し、候補化合物

でみた成功確率はわずか 11,300 分の 1 (=0.009%) であり、候補化合物を見つけ前臨床をスタートさせてから上市までの成功確率は 0.13%、1 品目上市のために費やす開発費は 260~360 億円、必要な期間は 11~12 年と言われている [1]。

そこで、このような欠点を補うためにバイオインフォマティクスを用いてゲノム情報を利用して疾病に関連するタンパク質の情報を分析し、創薬に活用しようという試みが為されている。これは過去の研究により積み上げられてきたゲノム配列やタンパク質立体構造などのデータベース、またそれに伴うソフトウェアを駆使することにより、効率よく目的のリード化合物（薬物候補）を設計するというものである。現在までに、タンパク質とリガンドの結合可能性を求める様々なドッキングシミュレーションプログラムが開発されており、それらは一定の評価が得られている [2]。一方で、タンパク質とリガンドの結合部位が求められた後に、タンパク質とリガンド間の結合自由エネルギー値を求めたり、リード最適化と呼ばれるより高い薬としての効果を得るためのリガンド改変を行った際の結合自由エネルギー値の変化を求めることが必要とされている。

タンパク質とリガンド間の結合自由エネルギー値は、MM-PBSA 法 [3] などを用いて求められてきた。MM-PBSA 法では、タンパク質 A,B 間の結合自由エネルギー ( $\Delta G_{bind}$ ) は次のように表される。 $\Delta G_{bind} = G(\text{複合体}) - G(\text{タンパク質 A 単独}) - G(\text{タンパク質 B 単独})$  それぞれの分子の自由エネルギー ( $G(\text{分子})$ ) は次のように計算される。 $G(\text{分子}) = E_{MM} + G_{solv} - TS(\text{分子})$ 。  $E_{MM}$  は真空中での分子力場エネルギー、 $G_{solv}$  は水和自由エネルギー、 $TS(\text{分子})$  は分子についてのエントロピーである。この方法では、複合体、タンパク質 A,B それぞれに対して長時間の分子動力学シミュレーションが必要とされる。計算機リソースの問題から、連続した数十ナノ秒の分子動力学シミュレーションを実行するのが一般的であり、このような時間では初期構造依存性を始めとしてサンプリングが十分に行われないう問題がある。また、エントロピー値を基準振動解析を用いて求めるのは容易ではない。

本研究では、この問題を解決するために Shirts のアルゴリズムを採用し、汎用的な並列計算機においてより高速で正確に結合自由エネルギーを求めるシステムを開発する。

## 2 結合自由エネルギー計算方法

### 2.1 計算手法

本研究では、結合自由エネルギーを求めるために、Shirts が考案したアルゴリズム [4] を用いる。

タンパク質とリガンドが相互作用していない状態 [ $\lambda = 0$ ] と、タンパク質とリガンドが相互作用し合っている状態 [ $\lambda = 1$ ] を考える。この相互作用が働いている状態において、パラメータ  $\lambda$  を 0 から 1 で変化させる。この一つ一つの変化の前後の状態の差、つまりポテンシャルエネルギー差を求める。 $W = U(\lambda_j, x) - U(\lambda_i, x)$  で表わされる。この式により遷移に必要な仕事量が定まる。分子動力学法を用いる場合、Shirts のアルゴリズムは分子同士に働く二力であるクーロン力とファン・デル・ワールスカの二つがどの程度寄与しているかを求めることで、その分子間の自由エネルギーを求める。このアルゴリズムは Jarzynski の等式とベネット受容比法 (BAR 法) に基づく。

### 2.2 Jarzynski の等式

Jarzynski の等式 [6] を利用する。Jarzynski の等式とは、非平衡下での総仕事量と平衡状態での自由エネルギー差の間に成り立つ。2 つの状態の間の自由エネルギーの差とそれらの間の遷移に必要な仕事の有限時間でのアンサンブル平均との間の関係式である。Jarzynski の等式は、 $\exp(-\Delta G/k_B T) = \langle \exp(-W/k_B T) \rangle$  で表わされる。この等式が成り立つのは準静的過程の場合である。この等式により、任意の非平衡状態で系になされた仕事から、平衡状態における自由エネルギーとして得ることができる。

### 2.3 ベネット受容比法 (BAR 法)

Jarzynski の等式に加え、ベネット受容比法 (Bennet Acceptance Ratio:BAR)[7] を用いる。

BAR 法は、FEP (free energy perturbation) 法と比較して同じデータ量から明確に統計的な不確かさを減少することが可能であり、量子化学計算による quasi-chemical 法 [8] から求めた自由エネルギー、Schmid [9] による理論的な評価によく一致することが示されている [10]。

### 2.4 Shirts のアルゴリズム

Shirts のアルゴリズムを、タンパク質とリガンド間に働く相互作用の力であるクーロン力とファン・デ

ル・ワールス力の二つの力について考える。それぞれの力の寄与を求めるために、 $\lambda$  を  $\lambda^C$  と  $\lambda^{LJ}$  とに分ける。タンパク質とリガンドが結合していない状態を ( $\lambda^C = 0, \lambda^{LJ} = 0$ )、タンパク質とリガンドが結合している状態 ( $\lambda^C = 1, \lambda^{LJ} = 1$ ) とし、クーロン力の寄与を調べる状態 ( $\lambda^C = 1 \rightarrow 0, \lambda^{LJ} = 1$ )、ファン・デル・ワールス力の寄与を調べる状態 ( $\lambda^C = 1, \lambda^{LJ} = 0 \rightarrow 1$ ) のシミュレーションを行う。この  $\lambda$  の変化の刻みの間隔を小さく調節することにより、高い精度で結合自由エネルギーを求めることができる。それぞれの  $\lambda$  において独立の分子力学シミュレーションを実行することで得られた仕事量から Jarzynski の等式に従いクーロン力とファン・デル・ワールス力それぞれの、 $\Delta G_{Complex}^C$  と  $\Delta G_{Complex}^{LJ}$  を求める。これによって、タンパク質とリガンド間におけるクーロン力とファン・デル・ワールス力それぞれが寄与する自由エネルギーが求まる。さらに、タンパク質・リガンド間の結合力を求めるために、水の影響を排除する。そこで同じ要領で、タンパク質と水の間を Shirts のアルゴリズムに従ってシミュレーションする。そうすることで  $\Delta G_{solv}^C$  と  $\Delta G_{solv}^{LJ}$  を求める。

以上から、 $\Delta G = \Delta G_{Complex}^C + \Delta G_{Complex}^{LJ} - \Delta G_{solv}^C - \Delta G_{solv}^{LJ}$  としてタンパク質とリガンドの自由エネルギーからタンパク質と水の影響を除くことで、水の影響を除いたタンパク質とリガンドの結合自由エネルギーを求めることができる。

### 3 実験

本研究では、産業技術総合研究所の Magi クラスタ (PentiumIII 933MHz  $\times$  1040) を使用する。また、分子力学シミュレーションプログラムある Tinker[11] に Shirts のアルゴリズムを適用したプログラムを用いてシミュレーションを行う。

本研究における計算対象として、FK506 と FKBP 結合体を用いる (図 1)。FK506 (別名 Tacrolimus、Tsukuba macrolide immunosuppressant) は、1984 年に筑波山の土壌の放射菌から抽出された免疫抑制剤である [12]。FK506 は、細胞内の FKBP (FK506 binding protein) に結合した後、カルシニューリン (CN) と呼ばれるプロテインフォスファターゼに結合する。CN はサイトカインの発現に必要な T 細胞特異的転写因子 (NFAT) を脱リン酸化する事により核内へ移行させ、かつ核内に持続させる役割を担っている。FK506-FKBP 複合体はさらに CN に結合

し、その NFAT 脱リン酸化反応を阻害する事により、IL-2 に代表される種々のサイトカインの発現を抑制する [13]。

シミュレーションに用いる構造は、PDB (Protein Data Bank) から 1FKF [14] を用い、ポテンシャル関数には AMBER の ff99 を用い、二面角には Simmerling の補正を行っている。

Jarzynski の等式、BAR 法、Shirts のアルゴリズムを用いる手法では、クーロン力とファン・デル・ワールス力に関して  $\lambda$  を係数とする独立のシミュレーションとして扱うことができる。本研究においても、PC クラスタ上で網羅的に実行している。



図 1: FK506 と FKBP の結合

### 4 まとめ

本研究では、汎用的なクラスタを用いて特定のタンパク質とリガンドの結合自由エネルギーを高い精度で求めるために、Shirts のアルゴリズムを分子力学シミュレーションプログラムに適用するシステムの開発を行った。

シミュレーションの流れや算出値の正確さを確認するために、比較的残基数の少ないタンパク質とリガンドを対象としたが、今後は残基数の多いものを含めて、表面電荷の与える影響なども解析を進めていく。また、アルゴリズムの改良、対象とするタンパク質やリガンドに対する  $\lambda$  変数設定の自動最適化、などの汎用性を高めていきたいと考えている。

本研究では汎用的な PC クラスタを用いたが、将来的には分散コンピューティング環境を組み合わせたオープンな創薬環境を実現することで、PC クラスタにおける計算以上に大規模で効率的なシステムの

開発を目指している。また、そのようなシステムは、一般の製薬企業では扱われにくい Neglected Disease に関するタンパク質の創薬支援に適していると考えている。

## 参考文献

- [1] 厚生労働省、「生命の世紀」を支える医薬品産業の国際競争力強化に向けて、2002
- [2] Chen R, Weng Z, Docking Unbound Proteins Using Shape Complementarity, Desolvation, and Electrostatics. *Proteins*, 2002, 47, 281-294
- [3] Schafer H, Mark AE, van Gunsteren WF, Absolute entropies from molecular dynamics simulation trajectories, 2000, 113, 7809-7817
- [4] M.R. Shirts and V.S. Pande, Comparison of efficiency and bias of free energies computed by exponential averaging, the Bennett acceptance ratio, and thermodynamic integration, *J. Chem. Phys.* 122 (2005), 144107-144116
- [5] Yoshiaki Tanida, Masakatsu Ito, Hideaki Fujitani, Calculation of absolute free energy of binding for theophylline and its analogs to RNA aptamer using nonequilibrium work values, *Chemical Physics*, 337, 135-143
- [6] C. Jarzynski, *Phys. Rev. Lett.*, Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences, 78, 2690 - 2693
- [7] Bennett, C. H., Efficient Estimation of Free Energy Differences from Monte Carlo Data, *J. Comput. Phys.* 1976, 22, 245
- [8] D. Asthagiri, L. R. Pratt, M. E. Paulaitis and S. B. Rempe, Hydration structure and free energy of biomolecularly specific aqueous dications, including Zn and first-transition-row metals, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 1285-1289, 2004
- [9] Schmid, R.; Miah, A. M.; Sapunov, V. N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* A new table of the thermodynamic quantities of ionic hydration: values and some applications (enthalpy-entropy compensation and Born radii), 2000, 2, 97
- [10] D. Jiao, C. King, A. Grossfield, T. A. Darden, and P. Ren, Simulation of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> Solvation Using Polarizable Atomic Multipole Potential, *J. Phys. Chem. B*, 110 (37), 18553-18559, 2006
- [11] J. W. Ponder and F. M. Richards, *J. Comput. Chem.* 8, 1016
- [12] Nakagawa H, Etoh T, Ishibashi Y, Higaki Y, Kawashima M, Torii H, Harada S., Tacrolimus ointment for atopic dermatitis, *Lancet*, 1994, 344, 883
- [13] 橋本道真、免疫抑制剤 FK506 (タクロリムス) の発見と開発、2001
- [14] Van Duyne GD, Standaert RF, Karplus PA, Schreiber SL, Clardy J., Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex, *Science*, 1991, 252, 839-42