

情報創薬を指向した生体分子シミュレーションと可視化技術の展開 (第2報)

工業材料科 主任研究員 重光保博

近年、バイオ分野へのシミュレーション技術の応用を通じて、*in vitro* (試験管内) / *in vivo* (生体内) 試験を経る実験的手法を *in silico* (コンピューター上) で補完する次世代創薬技術が模索されている。長崎県工業技術センターでは、材料設計・創薬に関するシミュレーション環境を整備しつつ、この分野での産学官連携を進めている。本報告では、タンパク質・薬物相互作用ダイナミクスを詳細に解析するため、化学反応の定性的記述が可能な第一原理 MD 法 (Car-Parinello 法) を導入し、ベンチマークテストを行った。

1. 緒言

創薬の出発点となるリード化合物の探索・選択は、構造最適化、*in vitro* スクリーニング、臨床試験、市場化に至る一連のプロセスにおいて、成否を決める大きな要因である。コンビナトリアルケミストリ+ハイスループットスクリーニングによる網羅的探索は、必ずしも化学的多様性を十分に反映したケミカルスペース探索に結びつかないケースも多いため、構造基盤薬物設計(SDBB)やインフォマティクス解析との融合によって、リード化合物の合理的選択が試みられている。SDBB はリード化合物の最適化手法として広く普及しており創薬現場で活用されている。

前段研究「シミュレーション技術を活用した分子構造基盤薬物設計の研究(平成 21 年度-平成 23 年度)」では、タンパク質サイズの巨大高分子のスナップショット電子状態を第一原理的に求める手法・ソフトウェアを使用し、原子電子レベルでの生体高分子の諸性質解明に繋げることを目的とした。タンパク質・薬物相互作用の目安である結合自由エネルギーの定量的予測を目指して、分子シミュレーションに基づき結合自由エネルギー計算の評価を行った。分子動力学(MD)計算とフラグメント分子軌道法 (Fragment Molecular Orbital : FMO 法) を組み合わせて、計算の高速化と定量的計算精度の両立を企図した。具体的適用例として、小タンパク質 DJ-1 に対して、FMO

法を用いて全電子計算を実行し、「鍵穴」近傍のアミノ酸残基相互作用解析を行った。さらに、DJ-1 と 3 種の化合物についてドッキングスタディおよび MM(QM)・PBSA 法による結合自由エネルギー計算を行い、実験値と比較検討した[1] (図 1)。

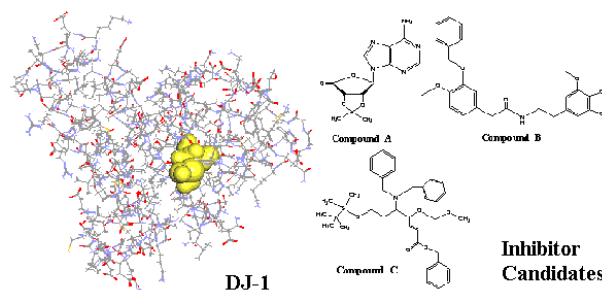


図 1 DJ-1 とドッキング化合物

本報告では、タンパク質・薬物相互作用の溶媒和ダイナミクスに注目し、その描像を詳細に解析することを目的として、溶質・溶媒系の時間発展を追跡する実用的手法について検討した。系の時間発展法として、Car-Parinello(CP)法[2]を採用し、高速化を図るため、古典的分子動力学法(CMD)と組み合わせた QM/MM-MD 法を用いた。ベンチマークとして、ピロロキノリチン誘導体の電子スペクトルを計算予測し、実験値と比較検討を行った。

2. 手 法

2.1 系のマクロ物性の予測について：確率論的方法と決定論的方法

多粒子系のマクロ物性 $F(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t)$ をシミュレートする手法は、(1) 確率論的方法 (モンテカルロ法) と (2) 決定論的方法 (分子動力学法) に大別される[3]。

確率論的方法では、Liouville方程式に従う分布関数 $f(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t)$ をまず求める。

$$\frac{\partial f}{\partial t} + \sum_i^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial \hat{H}}{\partial p_i} - \frac{\partial f}{\partial p_i} \frac{\partial \hat{H}}{\partial x_i} \right) = 0$$

$$\hat{H} = \sum_i \frac{p_i^2}{2m} + U(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

$F(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t)$ の期待値は、座標-運動量位相空間内の $f(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t)$ による重み付平均値として算出する。

$$\langle F \rangle_t = \frac{\iint F(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t) f(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t) d\mathbf{x} d\mathbf{p}}{\iint f(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t) d\mathbf{x} d\mathbf{p}}$$

一般的には、Liouville方程式の解 $f(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t)$ を求め、時刻 t におけるスナップショット期待値 $\langle F \rangle_t$ を得ることは難しい。

系の平衡状態として、カノニカルアンサンブル (N, P, T) を仮定すると、分布関数 $f(\mathbf{x}, \mathbf{p})$ は

$$f(\mathbf{x}, \mathbf{p}) = \exp\left(-\frac{\hat{H}}{k_B T}\right)$$

で与えられ、期待値 $\langle F \rangle$ は、

$$\langle F \rangle = \frac{\int F(\mathbf{x}, \mathbf{p}) \exp\left(-\frac{\hat{H}}{k_B T}\right) d\mathbf{x}}{\int \exp\left(-\frac{\hat{H}}{k_B T}\right) d\mathbf{x}}$$

のように、温度一定条件を用いて運動量空間積分を相殺することができ、結果的に位置空間のみの3N次元多重積分で求めることができる (メトロポ

リスのモンテカルロ法)。

決定論的方法では、運動方程式の時間発展に対する各スナップショットの時間平均として、エルゴード仮定の下で $F(\mathbf{x}, \mathbf{p}, t)$ の期待値 $\langle F \rangle$ を得る。

$$\langle F \rangle = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{(t - t_0)} \int_{t_0}^t F(\mathbf{x}(\tau), \mathbf{p}(\tau)) d\tau$$

2.2 第一原理MD法 (Car-Parrinello法) [3] [4]

Hartree-Fock法やDFT法のような量子化学計算手法は、電子状態や化学反応の記述に必須となるが、系の時間発展を追跡する計算量が膨大となり、統計的に十分なサンプリングが事実上困難である。CP法では、核と電子の運動方程式を連立して求解するによって、系の時間発展を効率よく追跡することができる。

多粒子系として、多原子分子 (原子核と電子の集合系) をCP法の具体例として考える。

系のLagrangianは、電子に仮想質量を与えて波動関数の運動エネルギーを導入し、波動関数の規格直交条件を束縛条件として以下で表現される。

$$L = \sum_i \frac{1}{2} \mu \int dr |\Psi_i|^2 + \sum_I \frac{1}{2} M_I |R_I|^2 - E + \sum_k \Lambda_{ik} \{ \int \Psi_i^* \Psi_k dr - \delta_{ik} \}$$

Lagrangianの変分極小化操作から、電子 (波動関数) と原子核の運動方程式は、それぞれ以下で表現される。

$$\mu \frac{\partial^2 \Psi}{\partial t^2} = \frac{\delta L}{\delta \Psi^*} = -\frac{\partial E}{\partial \Psi^*} + \sum_k \Lambda_{ik} \Psi_k$$

$$M_I \frac{\partial^2 R_I}{\partial t^2} = \frac{\delta L}{\delta R_I} = -\nabla_{R_I} E$$

電子の運動方程式は、 $\mu \frac{\partial^2 \Psi}{\partial t^2} = 0$ の時、

Kohn-Sham方程式に帰着し、電子は厳密な断熱ポテンシャルを構成し、原子核はその断熱ポテンシャル上を運動する正しい物理描像となる。CP法の実用上の制御は、電子に与える仮想的な運動エネルギーを調整することで、断熱ポテンシャル

曲面からの逸脱を抑制する点にある。適切に断熱ポテンシャルへの回帰を実行すれば (simulated quenching)、CP法は計算コストの軽減と計算精度の両立を実現することができる。

2.3 計算環境 (ハードウェア : 図2)

古典MD計算(CMD)には、GPU高速化コードを使用した。GPUマシンは、NVIDIA @ GTX570/GTX580/GTX570x2/GTX Titan on Intel@i7 2700Kを使用した。Car-Parinello MDおよび各種電子状態計算は、通常のCPU並列コードを用いた。CPUマシンは、Intel @ Xeon X5650x2(2.66GHz:6x2=12core)、AMD@Opteron 6376x3 (2.3 GHz: 16x3=48core)を使用した。



図2 使用したクラスター計算機

2.4 計算環境(ソフトウェア)

萩森らが合成した1,3-dioxo-4-imino-pyrrolo [3,4-b]quinolizine (図3) [5]とEtOHを10 Åのcubic boxに入れ、周期的境界条件を課した。最初に、系をNPT平衡化するCMDをAMBER 12で10ns実行した。この初期配置から出発して、CMD

にはGROMACS 4.6.5[6]、Car-Parinello MDにはCPMD 3.17.1[7]を用い、両者のドッキングにはリンクモジュール「GMX-QMMM」[8]を用いた。QM(Born-Oppenheimer)/MM-MDは1ps (500 steps)実行した。基底関数は、ビルトインされたVanderbilt ultrasoft potentialを用いた。トラジェクトリー解析と可視化はVMD[9]で行った。Gromacs用トポロジーファイル(top)の生成の際、ビルトインされたpdb2gmxでは一般分子に対応していない。Gromacs用トポロジーファイルの生成法として、PRODRGサーバー[10]を用いた変換もあるが、精度が悪いという報告がある[11]。そこで、AMBERから生成したinpcrdファイルとprmtopファイルから、ユーティリティamb2gmxを用いて、topファイルを生成した。CPMD入力座標生成には、当初はCif2Cell ver.4.11[12]を用いてPDBから変換したが、変換された座標に誤りがあったため、ChemCraft[13]のBohr座標表示を利用して再生成した。

スナップショットに対するONIOM、FMO-TDDFT計算は、それぞれGaussian09, GAMESS 2012を用いた。溶媒を無視した孤立系に対するCASSCF/MS-CASPT2計算には、MOLCAS ver.7.4を用いた。

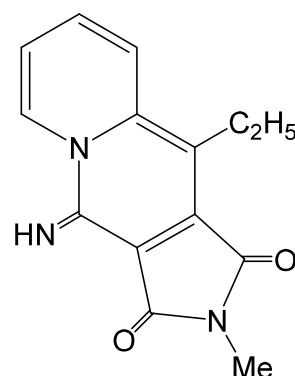


図3 1,3-dioxo-4-imino-pyrrolo[3,4-b]quinolizine

3. 結果と考察

新規化合物 pyrrolo [3,4-*b*] quinolizineはmethyl thiomareimide と 2-pyridylacetonitrile/methyl/ethyl 2-pyridylacetatesとのone pot合成で得た。imino体とoxo体で蛍光強度が大きく異なり、溶液中と固体状態でも顕著な変化を示す点で興味深い[5][14]。1,3-dioxo-4-imino-pyrrolo[3,4-*b*]quinolizine(DIPQ)の吸収/発光スペクトルデータをベンチマークとして用いた。DIPQのUV-Visスペクトル極大値 ($\lambda_{\max}(S_0-S_1)$) は、Ethanol中ではCH₂Cl₂(DCM)と比較して70nm程度短波長シフトする。これは4-imino基への水素結合がスペクトル極大位置に特異的に関与していることを示唆する。有機結晶中では、さらに100nm以上短波長シフトする(ただし、結晶では極大値ではなく励起スペクトル極大値を測定)。

TD-DFT(XC:6-31G*)/DFT(B3LYP:6-311G(2d,p))スキームによるDIPQの吸収スペクトル極大位置予測 ($\lambda_{\max}(S_0-S_1)$) を行った(表 1)。B3LYPを用いた場合、in vacuo > LR(Linear Response)-PCM > SS(State Specific)-PCMの順に $\lambda_{\max}(S_0-S_1)$ が長波長シフトを示す。これは、Franck-Condon S₁状態が、S₀と比較してPCM溶媒効果でより安定化されることを示唆している。しかし、EtOHと比較したDCM中での長波長シフトはPCMでは明確には再現されず、PCMで欠落している近傍溶媒からの近接相互作用の影響が考えられる。3種類の交換相関ポテンシャル (B3LYP, PBE0,CAM-B3LYP)では、この順に長波長を予測した。MS-CASPT2はCAM-B3LYPよりさらに9nm短波長側に予測された。

TD-DFT(XC:6-31G*)/DFT(B3LYP:6-311G(2d,p))スキームによるDIPQの発光スペクトル極大位置予測 ($\lambda_{\max}(S_1-S_0)$) を行った(表 2)。計算と実験の乖離は吸収スペクトルの場合と良く似た傾向を示している。 $\lambda_{\max}(S_1-S_0)$ についても、DCMと比較したEtOH中での約100nmの短波長シフトが

みられるが、PCMではこの溶媒効果を明確に再現することはできなかった。結晶中の発光計算は、frozen molecule近似[15]により、中心分子のみをONIOM計算でTDDFT(for S₁)構造最適化し、周辺分子はPM3で考慮した。B3LYPを用いたONIOM計算では、結晶中での発光位置との一致は非常によく、誤差はわずか3nmとなった。しかし、SS-PCMによるEtOH中の $\lambda_{\max}(S_1-S_0)$ から短波長シフトしており、実験で観測されている100nm以上の長波長シフトを再現できなかった。FMO-2レベルのTDDFTでは、ONIOMから20nm以上の長波長シフトが予測され、このことから近傍の分子との特異的分子間相互作用が長波長シフトに重要な役割を果たしていることが示唆される。CAM-B3LYPを用いたONIOM, FMO2-TDDFTでは、B3LYPから約100nmの短波長シフトが算出され、実験との一致は悪化した。

表 1 吸収スペクトル極大(nm) (PCM)

TD/6-31G(d)						
B3LYP			PBE0		CAM-B3LYP	
Vac	EtOH	DCM	Vac		Vac	
	LR	SS	LR	SS		
497	498	516	500	513	492	467
MOLCAS(12,12)/ANO-L					Expl.(nm)	
CAS MS-CASPT2			f		EtOH	DCM solid
442	458	0.216			457	529 319

表 2 発光スペクトル極大(nm) (溶液、結晶)

TD(B3LYP)/6-31G(d)						MOLCAS(12,12)/ANO-L		
in vacuo	f	EtOH		DCM		CAS	MS-CASPT2	f
		LR	SS	LR	SS			
649	0.0754	627	649	632	649	513	541	0.167
ONIOM (solid state)		FMO(FMO-2) (solid state)				Expl.		
B3LYP CAM		B3LYP		CAM		(EtOH)(CH ₂ Cl ₂)(solid)		
635	535	629(656)		554(567)		509	602	638

次に、ETOHをDIPQ周辺に配置した溶液系について、QM/MM-MDを1ps走らせたスナップショットに対する吸収スペクトル極大値 ($\lambda_{\max}(S_0-S_1)$) の計算結果を示す(表 3)。シミュレーションboxを含むPCM-ONIOM計算は、メモリ不足のため(100GW以上が必要)実行できなかった。また、シミュレーションboxを含むPCM-FMO-TDDFTは実行中である。ONIOMの結果は、SS-PCMの結果を約10nm長波長シフトさせ、DIPQ-EtOHの近接相互作用は長波長シフトに寄与する結果となった。これは、実験と相反する結果となり、スナップショットの妥当性を検討する余地がある。FMO-2とONIOMの差は7nmの短波長シフトとなり、DIPQ-EtOHの近接相互作用による短波長シフトの一部を再現していると考えられるものの、その寄与は小さく、大部分の短波長シフトを考慮しているとは言い難い。スナップショットの妥当性、クラスターサイズの妥当性、遠距離からの静電場(PCM)を再検討する必要があると考えられる。CAM-B3LYPを用いると、実験値との一致は向上し、15nmの差となった。

表 3 吸収スペクトル極大値 (溶液: QM/MM-MD geometry at 1ps in EtOH)

ONIOM		FMO-1 (FMO-2)	
B3LYP	CAM-B3LYP	B3LYP	CAM-B3LYP
528	479	519(521)	472(474)

次に、ETOHをDIPQ周辺に配置した溶液系について、QM/MM-MDを1ps走らせたスナップショットに対する発光スペクトル極大値 ($\lambda_{\max}(S_1-S_0)$) に対する計算結果について述べる(表 4)。スナップショットに対して、frozen molecule 近似の下に、中心のDIPQのみをONIOM構造最適化し、TDDFT計算を行った。吸収スペクトルの場合とは逆に、ONIOMの結果

は、SS-PCMの結果を約30nm短波長シフトさせ、DIPQ-EtOHの近接相互作用は短波長シフトに寄与する結果となった。これは、実験と一致する結果である。FMO-2とONIOMの差は8nmの短波長シフトとなり、DIPQ-EtOHの近接相互作用による短波長シフトをさらに強めている結果となり、実験を再現した。ただし、吸収スペクトルの場合と同様、その寄与は小さく、大部分の短波長シフトを考慮しているとは言い難い結果となった。CAM-B3LYPを用いると、実験値との一致は向上し、FMO2(CAM-B3LYP)-TDDFTと実験値の差は、28nmとなった。

表 4 発光スペクトル極大値 (溶液: QM/MM-MD geometry at 1ps in EtOH)

ONIOM		FMO-1 (FMO-2)	
B3LYP	CAM-B3LYP	B3LYP	CAM-B3LYP
611	522	605(603)	537(537)

DIPQ-EtOHスナップショットを示す(図4, 図5)

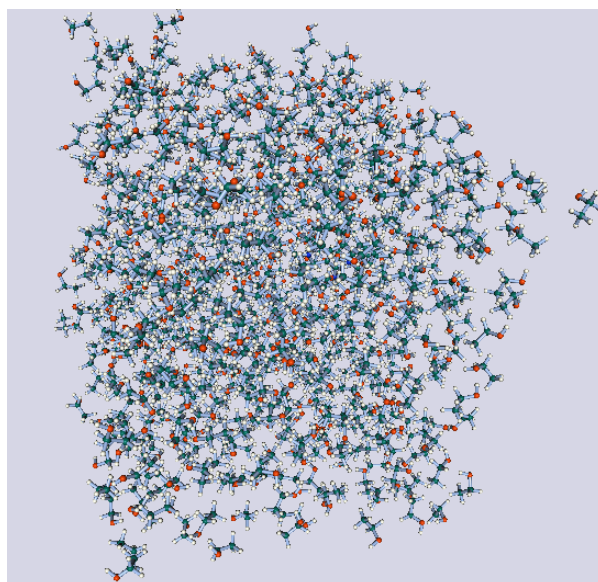


図4 DIPQ-EtOH シミュレーションbox(at 2ps)

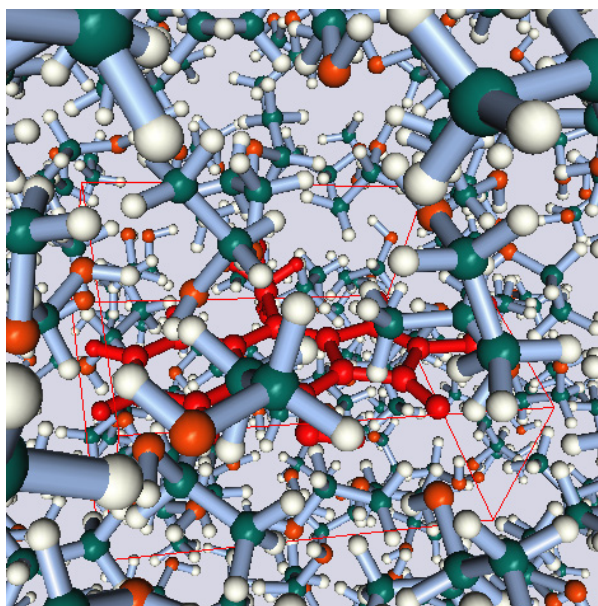


図5 DIPQ(red)-EtOH スナップショット拡大図

4. 結 言

古典的分子動力学法と第一原理分子動力学法を組み合わせたQM/MM-MD法を導入し、ピロロキノリチン誘導体の吸収/発光スペクトルをベンチマークとして検証を行った。

PCMで考慮されない溶質-溶媒間の近接相互作用がスペクトルピークに及ぼす影響をONIOM法およびFMO-TDDFT法で解析し、吸収スペクトルでは実験傾向と不一致（長波長シフト）、発光スペクトルでは一致する結果（短波長シフト）が予測された。しかし、いずれの場合も、FMO-2とONIOMの差は10nm以内であり、EtOH中の大幅な短波長シフトを再現することはできなかった。選択したスナップショットは、DIPQ-EtOH間の水素結合に不利なポーズであり、十分に多数のスナップショット平均が必要であると考えられる。

今回のベンチマークテストで得られた結果を出発点として、今後はタンパク質-薬物相互作用への展開を予定している。

参考文献

- [1] Y.Shigemitsu, *Int.J.Quant.Chem.* 113(4), 574 (2013).
- [2] R. Car and M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.*, **55**, 2471 (1985).
- [3] 日本機械学会編、原子分子を用いる数値シミュレーション（コロナ社、1996）。
- [4] D.Marx and J.Hutter, *ab initio Molecular Dynamics. Basic theory and advanced methods.* (Cambridge University Press, 2009).
- [5] M.Hagimori, N.Mizuyama, et al, *Heterocycles*, **83**, 1983 (2011).
- [6] Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., Lindahl, E., *J. Chem. Theory Comp.* 4(3):435 (2008).
- [7] CPMD; <http://www.cpmc.org/>, Copyright IBM Corp 1990-2008.
- [8] GROMACS-CPMD QM/MM; <https://www.tougaloo.edu/academics/divisions/natural-science/research/gromacs-cpmd-qmmm>
- [9] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., *J. Molec. Graphics*, **14**, 33 (1996).
- [10] The GlycoBioChem PRODRG2 Server; <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr>
- [11] Lemkul JA, Allen WJ, Bevan DR, *J Chem Inf Model.* 50(12), 2221 (2010).
- [12] Cif2Cell; Björkman, T., *Comput. Phys. Commun.*, **182**, 1183 (2011).
- [13] ChemCraft; <http://www.chemcraftprog.com/>
- [14] Y.Shigemitsu et al., in Proceedings of 17th International Conference on Quantum Chemistry and Physics (2012).
- [15] Li M-C, Hayashi M, Lin S-H., *J Phys Chem A*, **115**, 14531 (2011).