

# 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3報)

工業材料科 主任研究員 重光保博

創薬分野でのシミュレーション技術では、*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、進展著しいシミュレーション技術の導入・環境整備を進めつつ、材料設計・創薬分野との研究融合を進めている。本報告では、タンパク質-薬物相互作用とそのダイナミクスの精密解析を実行する計算機技術およびシミュレーション手法を導入してその有効性を検証し、創薬分野における実験とシミュレーションの融合を目指した取組みを総括する。

## 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)に至る一連の創薬プロセスの成否を決める重要なポイントである。大規模な化合物ライブラリを使った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大規模網羅的探索は、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。そのため、化合物データベースをもとに、Hansch-Fujita法に代表される定量的構造活性相関(QSAR)・ファーマコフォアモデリング・構造基盤薬物設計(Structural Based Drug Design: SBDD)等の*in silico*バーチャルスクリーニングとの併用によって、リード化合物の合理的探索・選択が試みられている。タンパク質-薬物の親和性指標である結合自由エネルギー予測に基づくSBDDは、手法の汎用性と厳密性の利点から、創薬開発現場で定着しつつある。

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、創薬シミュレーション実現に向けた技術調査・蓄積を目的とした一連の予備的研究を実施した。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標とした。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。具体的には、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、計算の高速化と定量的計算精度の両立を企図した。適用例として、遺

伝性パーキンソン病に関係する小タンパク質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<sup>1)</sup>(図1)。

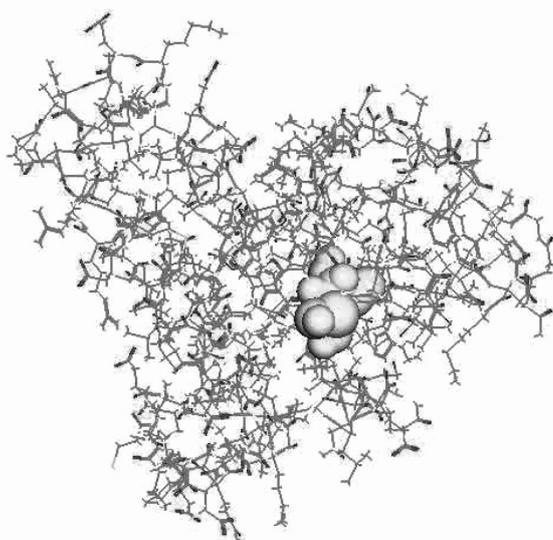


図1 DJ-1(1UCF:chain A)の活性サイト[1]

この前段研究を引き継ぎ、その発展型として本研究を3年間実施した。その総括として、各年度に達成した研究内容およびその意義について報告する。

- (1)平成24年度: GPGPU技術(General-Purpose for Graphical Processing Units)を創薬シミュレーションに適用して、古典的分子動力学法(CMD)のベンチマークテストを行った。
- (2)平成25年度: (タンパク質+薬物)の水和状態ダイナミ

クスを高精度解析する手法として、CP(Car-Parinello)法<sup>2)</sup>を検討した。ピロロキノリチン誘導体をテスト系として選び、CMD法と組み合わせた第一原理分子動力学法(QM/MM-MD)を実行した。

(3)平成26年度：創薬シミュレーションの具体例として、プロテインキナーゼCDK-2と薬理活性化合物ラメラリン<sup>3)</sup>のドッキングシミュレーションを行った。可視化モデルとして三次元造形装置(3Dプリンター)を用いた分子模型を製作し、ドッキング部位の複雑な3次元構造把握に対する有効性を確認した。

## 2. 手法・結果・考察

### 2.1 GPGPUを用いたCMDシミュレーションの高速化ベンチマーク<sup>[2]</sup>

タンパク質-薬物複合体の構造ダイナミズムを的確に把握するためには、小さな置換基揺らぎから大きなドメイン揺らぎまで含めた解析が必要となる。このため、マイクロ秒～ミリ秒の超長時間CMDシミュレーションが必要となるが、CPUのみで構成された汎用計算機では困難である。

そこで、NVIDIA @GeForce GTXシリーズを用いて、コストパフォーマンスの高いCMDシミュレーションの実現に向けたベンチマークテストを行った(図2)(表1)。グラフィック処理用コプロセッサとして主としてゲーム市場から浸透したGPUは、近年科学技術計算等の汎用用途に急速に普及している。CMDシミュレーションは、GPGPUの先駆的導入分野であり、各種MDソフトウェアがGPGPUに対応している<sup>[4][5][6]</sup>。



図2 クラスタ計算機(一部)

表1 計算環境

AMBER version	Version. 12 (patch 2 level)
MD mode	SPFP/SPDP/DPDP
CPU	Intel @ core i7 2700K / Xeon E5470x2/X5650x2
GPU	NVIDIA @ GeForce GTX 570/580/570x2
OS	CentOS 6.2
Compiler,Library	Gcc 4.4.6
MPI	Mpich 2.1-5
NVCC	version 4.2
CUDA Driver	version 4.2

4-ジメチルアミノ-4'-ニトロアゾベンゼン(DNAB)のCis-Trans異性化反応をCMDシミュレーションで追跡した(図3)。DNAB分子を含むcubic box内に1566個のTIP3P水分子を配置し、NPTアンサンブル(1atm 300K)でのMDシミュレーションを実行した。NPT制御にはLangevin thermostatを使用した。

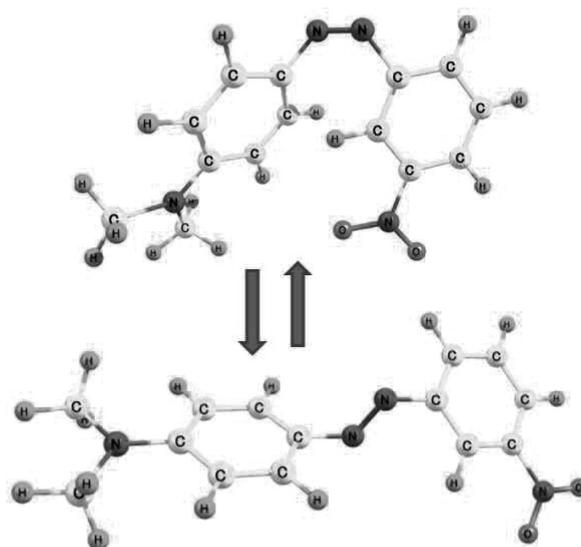


図3 DNABのCis-Trans異性化反応

タイミングデータ(表2)のとおり、GPGPUによって大きな高速化が得られた。全倍精度計算(DPDP)では約2倍、単精度・倍精度混合計算(SPFP, SPDP)では、GPUの長所である単精度計算の高速処理効果のため7-8倍の高速化が得られた。

表2 Cis-Trans異性化タイミングデータ(ns/day)

	SPFP	SPDP	DPDP
i7-2700K	-	-	33.4
E5620 x 2	-	-	30.0
X5650 x 2	-	-	41.4
GTX570	172.5	197.4	70.8
GTX580	167.3	202.4	78.1
GTX570 x 2	234.6	207.4	107.6

SPFPおよびSPDPモードでの長時間計算には注意が必要である。Cis-Trans異性化に伴う-C=N=N-C-振り角変化の20000ステップ(400ns)まで追跡した結果、系が崩壊して温度や圧力が発散した。DPDPモードではこの現象は生じなかった。

DPDPモードのGPGPU計算を用いて、DNABのCis-Trans異性化反応速度定数をCMDシミュレーションから直接求めることを試みた。加速CMD法による biased potential CMDから求めた仮想的反応速度定数を外挿することによって、non-biased potentialでの反応速度定数を求める方法が提案されている<sup>[7]</sup>。この方法に従い、Cis-Trans異性化反応速度定数を算出し、実験値と定性的な一致を得た<sup>[8]</sup>。

## 2.2 MDシミュレーションの高精度化に向けた QM/MM-MD計算<sup>[9]</sup>

CMDシミュレーションは、電子状態変化や化学結合組み合わせの記述ができない限界がある。この限界はHartree-Fock法やDFT法のような量子化学計算法で解決できるが、時間発展を追跡する計算量が膨大になるため統計的に十分なサンプリングが困難である。タンパク質-薬物複合体の電子状態変化を考慮しつつ時間追跡を行うことが可能な高精度手法を検討した。活性サイト近傍には第一原理MD法であるCar-Parinello(CP)法<sup>[10]</sup>を用い、残りの周辺部位をCMDで扱うQM/MM-MD法を検討した。CP法では、核と電子の運動方程式を連立して求解することによって、系の時間発展を効率よく追跡することができる<sup>[11][12]</sup>。

ベンチマーク対象として、エタノール(EtOH)中のピロロキノリチン誘導体(DIPQ)<sup>[13]</sup>(図4)の電子スペクトルを予測し、実験値と比較検討を行った。CMDにはGROMACS 4.6.5<sup>[14]</sup>、CPにはCPMD 3.17.1<sup>[15]</sup>を用い、両者のドッキングにはリンクモジュール「GMX-QMMM」<sup>[16]</sup>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<sup>[17]</sup>で行った。各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(図5)。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。

ONIOM、FMO-TDDFT計算によって、PCMで考慮されない溶質-溶媒間の近接相互作用を考慮した。その結果、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、十分なスナップショット平均が必要である。

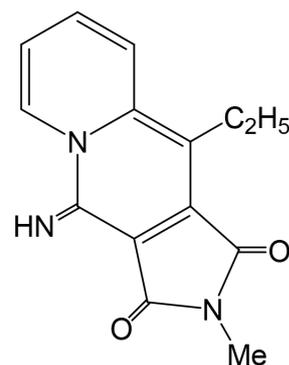


図4 1,3-dioxo-4-imino-pyrrolo[3,4-b]quinolizine

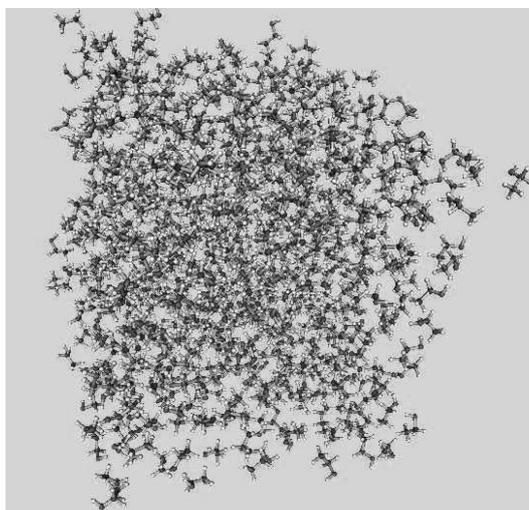


図5 DIPQ-EtOH シミュレーションbox(at 2ps)

## 2.3 プロテインキナーゼCDK-2とラメラリンのドッキング解析とその可視化モデル

海産天然化合物であるラメラリンは、14-phenyl-6H-[1]benzopyrano[4':3:4,5]-pyrrolo[2.1-a]isoquinolin-6-on骨格を有する化合物の総称であり、抗腫瘍活性をはじめとした種々の生理活性を示す<sup>[3]</sup>。C1-C11回転障壁を増大させた16-メチルラメラリンN誘導体は光学分割が可能となり、(aS)-16-メチルラメラリン(23a)と(aR)-16-メチルラメラリン(23b)がそれぞれ合成されている<sup>[3]</sup>(図6)。

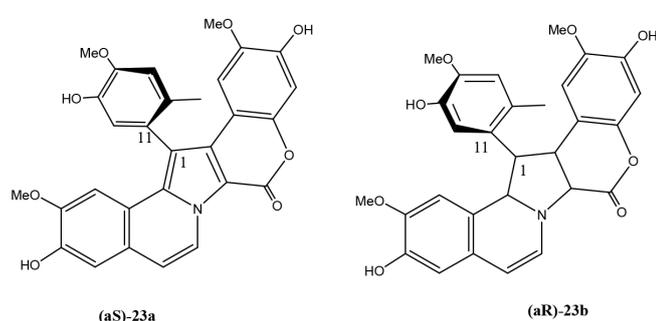


図6 (aS)-16-メチルラメラリン(23a)と(aR)-16-メチルラメラリン(23b)

軸不斉のみが異なる(aS)-(23a)と(aR)-(23b)において、各種プロテインキナーゼ阻害活性が異なることが報告されている。CDK-2に関しては、(aR)-(23b)のみが阻害活性を示し(IC<sub>50</sub>(nM)=0.067)、(aS)-(23a)は活性がない(IC<sub>50</sub>(nM)>10)ことが明らかにされている<sup>[3]</sup>。この実験的知見の違いに関して、力場計算とドッキングシミュレーションによる解析も併せて行われており、ドッキングサイト形状に基づく定性的な考察が行われている<sup>[3]</sup>。

本研究は、これらの知見に基づき、CDK-2と(aS)-(23a)/(aR)-(23b)との相互作用様相を定量的に明確にするため、第一原理分子軌道計算法による高精度計算を行った。計算にはFMO法を用いた(HF-FMO/6-31G(d))。

分子構造はX線構造解析から得られた構造をソフトウェアMOE<sup>[3]</sup>で最適化した構造を用いて、一点計算を行った。

まず、(aS)-(23a)とCDK-2の複合体では、結合安定化に寄与するアミノ酸残基が存在しない。逆に、Lys-121はrepulsiveに作用し不安定化に寄与すると考えら

れる(図7)。

次に、(aS)-(23b)とCDK-2の複合体では、Asp-137, Asp-78, Lys-81, Lys-75が安定化に大きく寄与している。その一方、(aS)-(23a)と同様にLys-143はrepulsiveに作用し不安定化に寄与すると考えられる。

フラグメント相互作用解析から、(23b)とCDK-2の相互作用が顕著に大きいことが明白であり、この結果は実験的知見<sup>[3]</sup>とも一致している(図8)。

## 3. 結言

本研究において、創薬分野におけるシミュレーション技術の導入を企図して、計算環境整備・基盤技術習得・学術研究を同時進行的に推進した。

本研究を通じて、創薬分野におけるシミュレーション研究とその活用に関する産学官ネットワーク構築を推進し、創薬分野のシミュレーション技術支援を行う環境構築・技術知見を蓄積することができた。今後、学術機関・情報関連ベンチャー企業等との連携を進めつつ、学術・産業の両面から創薬シミュレーションの展開を図る。

## 謝辞

GPGPUを用いたCMD計算の高速化は長崎大学先端計算研究センターの濱田剛准教授に、CDK-2とラメラリンの構造データ・実験的知見は長崎大学工学部の岩尾正倫教授・福田勉助教に、それぞれアドバイスを受けた。

3Dプリンターを用いたCDK-2とラメラリンのドッキング分子模型作製には、当技術センターの小笠原耕太郎専門研究員(電子情報科)・大田剛大研究員(工業材料科)の助力を得た。

本研究の一部は、科学研究費補助金基盤(C)「動的溶媒効果が及ぼす凝縮系の化学反応についての理論および実験化学的研究」(Grant No. 24550058)により実施した。

## 参考文献

- [1] Y. Shigemitsu, Int. J. Quant. Chem. 113(4), 574 (2013)
- [2] 重光保博、長崎県工業技術センター研究報告、No.42, 23-25 (2013)
- [3] 吉田賢佑、福田勉、石橋郁人、岩尾正倫、Luarent Meijer, Medichem News, 2, 36-41 (2013)
- [4] AMBER 12 Benchmarks by M. Wu and R. Walker. URL: <http://ambermd.org/gpus/benchmarks.htm>

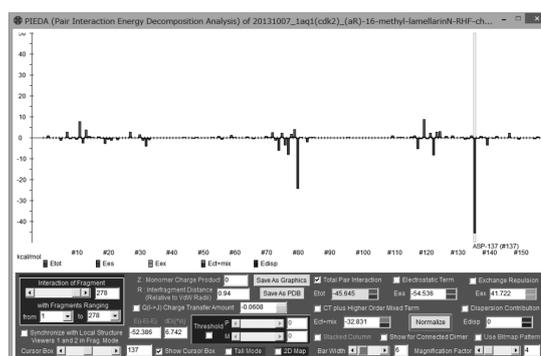
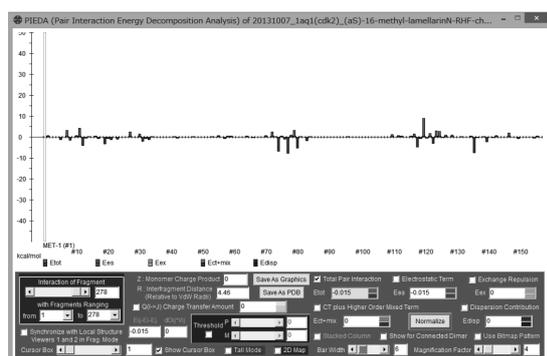
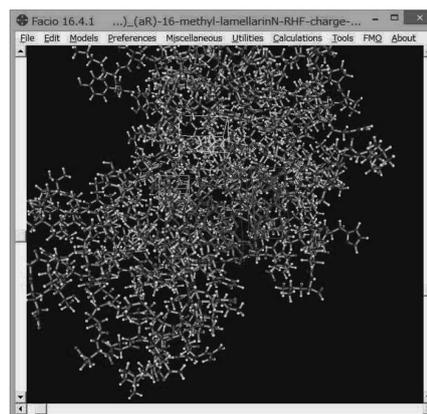
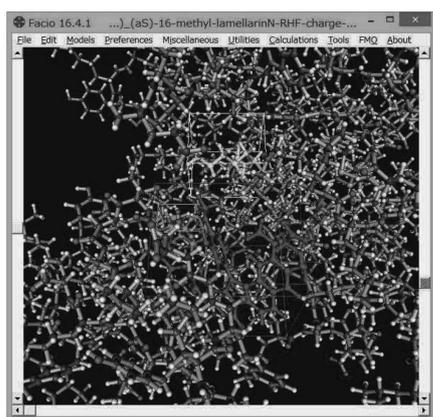


図 7 (aS)-16-メチルラメラリン (23a) と CDK-2  
(上図) : (23a) と結合ポケット近傍様相  
(下図) : (23a) と各アミノ酸残基間の相互作用

図 8 (aR)-16-メチルラメラリン (23b) と CDK-2  
(上図) : (23b) と結合ポケット近傍様相  
(下図) : (23b) と各アミノ酸残基間の相互作用

- [5] Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., Lindahl, E., J. Chem. Theory Comp. 4(3):435 (2008)
- [6] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. Journal of Computational Chemistry, 26:1781-1802, 2005.  
URL: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
- [7] D. Hamelberg, J. A. McCammon, Ann. Rep. in Comp. Chem., Vo. 2, 221-232 (2006)
- [8] Y. Shigemitsu and Y. Ohga, J. Sol. Chem., Vol. 43, Issue 9-10, 1746-1754 (2014)
- [9] 重光保博、長崎県工業技術センター研究報告、No. 43, 36-41 (2014)
- [10] R. Car and M. Parrinello, Phys. Rev. Lett., 55, 2471 (1985)
- [11] 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)
- [12] D. Marx and J. Hutter, ab initio Molecular Dynamics. Basic theory and advanced methods. (Cambridge University Press, 2009)
- [13] M. Hagimori, N. Mizuyama, et al, Heterocycles, 83, 1983 (2011)
- [14] Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., Lindahl, E., J. Chem. Theory Comp. 4(3):435 (2008)
- [15] CPMD; <http://www.cpmc.org/>, Copyright IBM Corp 1990-2008.
- [16] GROMACS-CPMD QM/MM; <https://www.tougaloo.edu/academics/divisions/natural-science/research/gromacs-cpmd-qmmm>
- [17] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., J. Molec. Graphics, 14, 33 (1996)
- [18] Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015.