

解説

フラグメント分子軌道法により得られた
相互作用エネルギーとエンタルピー変化との相関

川下 理日人

近畿大学 理工学部 エネルギー物質学科

(受取日: 2022年9月8日, 受理日: 2022年9月27日)

Correlation between Interaction Energy by Fragment Molecular
Orbital Method and Enthalpy Change

Norihito Kawashita

Faculty of Science and Engineering, Kindai University

(Received Sep. 8, 2022; Accepted Sep. 27, 2022)

Fragment molecular orbital (FMO) method has recently been used to analyze interactions between proteins and inhibitors for the purpose of drug discovery research. Unlike methods that use force field such as docking simulations, FMO method considered electrons. Therefore, it is characterized by the ability to analyze interactions involving electron correlation such as dispersion force. Furthermore, if a strong correlation can be obtained between the sum of inter-fragment interaction energy (IFIE-sum) and the enthalpy change between the protein and the inhibitor, we have also devised a method to predict free energy changes only by obtaining fragment interaction energies. As part of this research, we investigated the correlation between IFIE-sum and the enthalpy change in HIV protease inhibitors, and obtained a good correlation by appropriately classifying the target structures.

Keywords: fragment molecular orbital method, inter-fragment interaction energy, entropy-enthalpy compensation

1. はじめに

創薬研究において、近年では抗体医薬やペプチド、核酸などの中分子医薬などが脚光を浴び、その探索が精力的に行われている。一方、低分子医薬は今でもなお最も多くを占める創薬モダリティであることから、それらの探索も引き続き行われているのが現状である。¹⁾ 創薬分子のスクリーニングでは、標的蛋白質に結合する化合物を同定後、化合物と蛋白質間の相互作用を解析して相互作用に重要な残基を同定し、その部位を中心により強く結合する分子を設計する必要がある。

この分野においては、以前より *in silico* での探索が進められており、阻害剤探索法の1つとして、コンピュータ上でタンパク質に対して種々の配座のリガンドを結合させるドッキングシミュレーションが行われている。²⁾ ドッキングシミュレーションでは分子力場をもとに、経験的な関数を用いて、化合物と蛋白質間の結合エネルギーを予測している。近年では、機械学習を導入した試みも進められている。³⁾ しかしながら、ドッキングシミュレーションではパラメータとして分子力場を用いていることから、電子を考

慮しておらず、分散力などの分極による相互作用を評価することが困難という問題がある。

ドッキングシミュレーション以外の蛋白質と阻害剤との相互作用解析法として、近年フラグメント分子軌道 (Fragment Molecular Orbital: FMO) 法が用いられている。⁴⁻⁶⁾ FMO法は北浦らにより1999年に考案された手法であり、蛋白質などの巨大分子をアミノ酸残基単位のフラグメントに分割し (Fig.1), このフラグメント単位で分子軌道計算を行うことで、並列化が容易となり、計算時間を大幅に短縮することが可能となった。

ハートリー・フォック法によるFMO計算では、全系のエネルギー E_{total} は式(1)のように計算される。

$$E_{total} = \sum_{I>J} E_{IJ} - (N_f - 2) \sum_I E_I \\ = \sum_I E'_I + \sum_{I>J} \Delta \tilde{E}_{IJ} \quad (1)$$

ここで、 E_I はフラグメント I におけるモノマーのエネルギー、 E_{IJ} は、フラグメント I, J におけるダイマーのエネルギー、 N_f はフラグメント (モノマー) の個数である。全系

のエネルギーはダイマーのエネルギーとモノマーのエネルギーとの差で得られ、これを書き換えることで、モノマーのエネルギー E_I から周囲のフラグメントとの静電相互作用を除いたエネルギー E'_I と、フラグメント間相互作用エネルギー (Inter-fragment Interaction Energy: IFIE) $\Delta\tilde{E}_{IJ}$ の和で表すことができる。さらに、電子相関を考慮した Møller-Plesset 法などによる補正を行うことで、van der Waals 相互作用を含めた結果も得ることが可能である。

また、ここから阻害剤と蛋白質の全フラグメントについて、この IFIE の和 (IFIE-sum) を取ると、阻害剤と蛋白質の相互作用エネルギーとなる。これを阻害剤-蛋白質間の親和性の評価として用いることで、創薬分子のスクリーニングや分子設計に利用できる。現在、FMO 創薬コンソーシアム (FMO Drug Design Consortium: FMOOD) など創薬研究に向けた検討が進められている。

IFIE-sum を用いた評価の利点として、ドッキングシミュレーションにおける分子力場を用いた評価と異なり、FMO 法では電子を扱っていることから、電子間相互作用を考慮したうえで静的な相互作用を評価することができること、また、IFIE を静電相互作用、交換反発、分散相互作用、電荷移動相互作用の成分に分割する手法である PIEDA (Pair Interaction Decomposition Analysis) を利用することで、各 IFIE が具体的にどの相互作用によって支配されているのかも明確となる。⁷⁻⁸⁾ たえば、水素結合による場合は、静電相互作用と電荷移動相互作用が、CH- π 相互作用では分散力と電荷移動相互作用の値から数値として同定することが可能である。⁹⁾

さらに、我々は FMO 計算による IFIE を利用して、エントロピー変化を考慮しない結合自由エネルギーの予測法を考案した。その詳細を以下に述べる。もし FMO 計算による IFIE-sum と ΔH に高い相関関係があるならば、 ΔH と IFIE との関係式を式(2)のように構築することができる。また、 ΔH と $T\Delta S$ にはエンタルピー-エントロピー補償則¹⁰⁾が成立し、両者の相関は高いことが知られているため、これらについても回帰式を式(3)のように作成することが可能である。また、 ΔG と ΔH 、 $T\Delta S$ との関係は、式(4)のように表されることから、 ΔH と IFIE との相関が高い場合は、式(2)~(4)の関係を用いることで、最終的に式(5)のように ΔG を IFIE-sum のみで予測できる。

$$\Delta H = a_1(IFIE) + a_2 \quad (2)$$

$$T\Delta S = b_1(\Delta H) + b_2 \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \Delta G &= a_1(IFIE) + a_2 - (b_1(\Delta H) + b_2) \\ &= a_1(IFIE) + a_2 - (b_1(a_1(IFIE) + a_2) + b_2) \quad (5) \\ &= a_1(1 - b_1)(IFIE) + (a_2 - a_2b_1 - b_2) \end{aligned}$$

ここで、IFIE は IFIE-sum を意味し、 a 、 b は定数である。

本予測法が種々の阻害剤系で適用可能であることが示されたならば、これまでエントロピーの寄与が大きく探索が困難だった蛋白質間相互作用系における効率的な阻害剤探索法としての応用が期待できる。また、現在 FMOOD で運用している FMO データベースに計算データが登録されていれば、FMO 計算を行うことなく、蛋白質-化合物間の ΔG の予測が可能となるため、創薬分子スクリーニングの一助となる可能性が高い。¹¹⁾ 本研究では、その検証の前段階として、HIV プロテアーゼ阻害剤の系における、IFIE と ΔH の間の相関に関して検討を行った。

2. 研究材料および計算方法

タンパク質構造データベース (PDB) から、文献で ΔH の報告がある HIV プロテアーゼ-阻害剤複合体の構造をダウンロードした。¹²⁻¹⁴⁾ 今回の計算で用いた HIV プロテアーゼ阻害剤 5 種の構造式を Fig.1 に示す。また、PDB より入手した複合体 14 個の阻害剤の種類と PDB ID、HIV プロテアーゼの変異部位および ΔH の値を Table 1 に示す。変異部位については、WT は野生型、Flap+ は Flap+ 変異体 (L10I / G48V / I54V / V82A)、Act は Act 変異体 (V82T / I84V) を表す。また、WT* は文献 12 の野生型とは別のタイプの野生型 (K7Q / R14K / K41R / P63L / V64I) であり、文献 13 の複合体は文献 14 における WT* からの変異である。

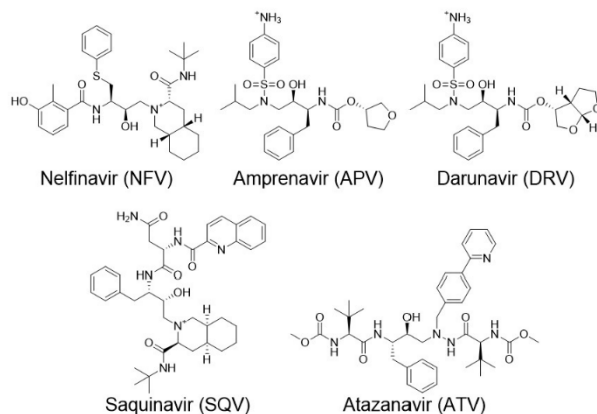


Fig.1 Structure of HIV protease inhibitors.

Table 1 Information of calculated 14 complexes.

阻害剤	PDB ID	変異部位	ΔH (kcal mol ⁻¹)
APV	3EKV ¹²⁾	WT	-7.3
APV	3EKP ¹²⁾	Flap+	3.3
ATV	3EKY ¹²⁾	WT	-1.1
ATV	3EL1 ¹²⁾	WT	-1.1
ATV	3EKW ¹²⁾	Flap+	4.5
ATV	3EL9 ¹²⁾	Act	-0.3
SQV	3EL4 ¹²⁾	Act	9.5
SQV	3EKQ ¹²⁾	Flap+	12.9
DRV	3EKT ¹²⁾	Flap+	2.0
NFV	3EKX ¹²⁾	WT	4.4
NFV	3EL0 ¹²⁾	Flap+	10.8
NFV	3EL5 ¹²⁾	Act	7.1
NFV	2Q64 ¹³⁾	D30N, N37S, R41A	2.2
DRV	4LL3 ¹⁴⁾	WT*	-16.4

次に、BioStationViewer, DiscoveryStudioViewer を用いて構造修正を行い、一部複合体の残基欠損については MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc.) により構造修正を行った。構造修正は、水素付加、リガンド以外の低分子の除去、重原子を固定した構造最適化を行った。構造最適化では分子力場として CHARMm を用いた。なお、本研究では構造中の水分子を全て含めて計算を行った。使用した計算機はスーパーコン

ピュータ「京」で、ソフトウェアに ABINIT-MP 6.0+を用い、MP2/6-31G の計算レベルの下、計算を実施した。

計算後、阻害剤-蛋白質間のフラグメント間相互作用エネルギーの和(IFIE-sum)と文献中の実験値(ΔH)との相関を計算した。また、HIV プロテアーゼ阻害剤複合体の各阻害剤とアミノ酸残基ごとの IFIE の比較も行った。

3. 計算結果と実験値との相関および考察

文献 12-14 中の複合体 14 個の HIV プロテアーゼ-阻害剤複合体の FMO 計算を行い、計算によって得られた IFIE-sum と ΔH との相関を計算したところ、 $R^2 = 0.268$ であった (Fig.2)。また、全ての阻害剤複合体の分布を確認すると、group 1 と group 2 に分類することが出来るのではないかと考えた。FMO 計算では、IFIE は阻害剤や蛋白質の電荷状態に影響を受けることが大きいので、当初は複合体毎の阻害剤や変異による電荷の影響が考えられたが、複合体間の IFIE-sum を比較したところ、同じ阻害剤間でも異なる group に属していることや、必ずしも電荷や変異による影響だけではないことがわかった。

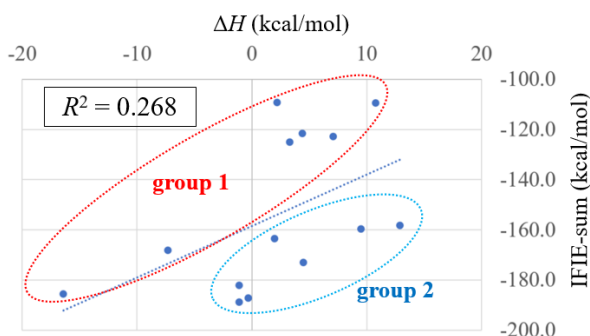


Fig.2 Overall correlation between IFIE-sum and ΔH .

そこで、group 1 と group 2 におけるアミノ酸残基ごとの IFIE を確認すると、3EL5 のように group 2 と近い IFIE を示した複合体もあったものの、Gly49 (Chain A)のフラグメントにおける IFIE について、全体的に group 1 と group 2 との間で差があることがわかった (Table 2)。

Table 2 IFIE between inhibitors and Gly49 (Chain A) of HIV protease.

Group 1	IFIE / kcal mol ⁻¹	Group 2	IFIE / kcal mol ⁻¹
3EKV	-7.981	3EKY	-11.683
3EKP	1.557	3EL1	-13.740
3EKX	-0.328	3EKW	-12.554
3EL0	-0.914	3EL9	-13.478
3EL5	-14.586	3EKQ	-12.513
2Q64	-2.119	3EL4	-17.766
4LL3	-6.997	3EKT	-5.101

この原因を調べるべく、group 1 と group 2 の Gly49 (Chain A)と阻害剤との周辺構造を確認したところ、group 1 ではフラグメント分割により Gly49 (Chain A)のフラグメントに含まれる Gly48 (Chain A)のカルボニル基と阻害剤との間に水分子が存在し、group 2 には水分子が存在しないことがわかった (Fig.3)。

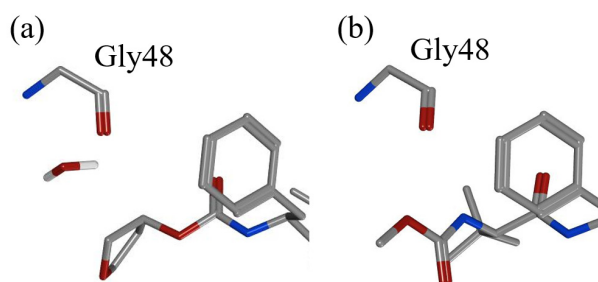


Fig.3 Structure of inhibitor and Gly48 (Chain A). (a) Group 1 (3EKV.pdb), (b) Group 2 (3EKY.pdb).

蛋白質や阻害剤は、水分子との間に水素結合を生じて安定化する。水素結合の有無は主として静電相互作用エネルギーや電荷移動エネルギーに影響し、IFIE の値にも大きな変化が生じる。ここでは、group 1 の複合体中に存在する水分子の影響により、group 1 では阻害剤と Gly48 (Chain A)の直接的な相互作用が一部緩和されたため、group 1 と group 2 との間に差が生じたものと考えられる。

上記の結果から、group 1 と group 2 に分けて、HIV プロテアーゼ阻害剤複合体における IFIE-sum と ΔH との相関を再度計算したところ、group 1 は $R^2 = 0.886$ 、group 2 は $R^2 = 0.745$ と非常に良好な相関が得られた (Fig.4)。FMO 計算は電子状態を計算することから、電荷や周辺環境の影響が大きく影響するため、それらをよく確認して計算を行うことで、我々が考案した ΔG 予測法に適用可能となる相関関係を得ることができると示唆された。

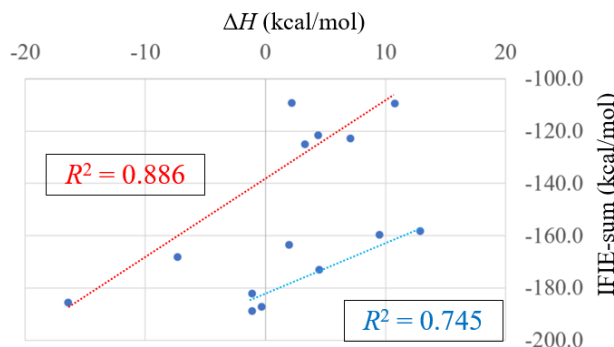


Fig.4 Correlation between IFIE-sum and ΔH in the group presented in Table 2.

4. まとめ

本研究では、フラグメント分子軌道法を利用した HIV プロテアーゼ阻害剤における、IFIE とエンタルピー変化に関する相関解析を行った。ここでは、Gly48 (Chain A)と阻害剤間に存在する水分子に着目してグループ分けすることにより、それぞれのグループで良い相関を得ることができた。

各 group の相関が示すように、複合体の構造が周辺環境を含めてある程度統一されていれば、FMO 計算を用いることで理想的には ΔH と良い相関が得られると考えられる。しかしながら、複合体の FMO 一点計算では、阻害剤結合前後の脱溶媒和を考慮できないことから、静電相互作用エネルギーが過大に評価されるため、静電相互作用エネルギーに関与する電荷や水分子などの影響を大きく受けることになるため、今回のように電荷や周辺環境が複合体により異なる場合は、より良好な相関を得るためにこのような group 分けが必要な場合もある。

また、本研究では、X線結晶構造解析による結果と、ITC測定による ΔH の結果をそのまま用いて計算を行った。X線結晶構造はある1つの状態のスナップショットであることや、それらの解像度の問題から、配座や水和状態が同一の阻害剤においても不明瞭であることもしばしばあるため、それらにFMO計算の結果が影響されるなど、解決すべき点はまだ多い。

また、著者が所属しているFMO創薬コンソーシアム(FMODD)では、高分解能のX線結晶構造を用いたFMO計算による解析も進められているが、ここでも1つの構造中に複数の配座が考えられるコンフォマーの問題があり、現在これをどう処理すべきかを検討中である。

これらの問題を解決するための1つの方法として、分子動力学シミュレーションにより得られた動的構造から複数サンプリングした複合体を用いてFMO計算を行い、その平均値を利用して実験値との相関を解析する研究が行われている。¹⁵⁾ この文献では良い結果が得られているが、サンプリングする構造によっては実験値との良い相関が全く得られないなど、サンプリング方法に関してはまだまだ検討の余地がある。

本研究で得られたIFIEと ΔH との相関から関係式を構築し、他のHIVプロテアーゼ阻害剤複合体の計算により得られたIFIEを代入することで複合体の ΔH を予測できる。さらに、式(5)に示したように ΔG の予測も理論的には可能であるが、それを行うには現状ITCで得られた実験値がある程度検証セットとして必要であるため、これらの実験値をどう入手するかが今後の一つの問題となる。さらに、HIVプロテアーゼ-阻害剤系のみでなく、他の蛋白質-阻害剤複合体の系で同様の検討を行うことで、幅広い蛋白質-阻害剤複合体系で適応可能かどうかを検証することが可能となり、創薬分子探索の一手法として利用できればと期待している。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、近畿大学大学院総合理工学研究科理学専攻の大学院生および近畿大学理工学部生命科学科の学部生の方々にご協力をいただきました。ここに感謝申し上げます。

また、本研究は、FMO創薬コンソーシアム(FMODD)の活動の一環として実施され、スーパーコンピュータ「京」を利用させていただきました(課題番号: hp180147)。

PIEDA計算にはMIZUHO/BioStationを利用させていただきました。また、本研究はJSPS科研費18K06615の助成を受けたものです。

文 献

- 1) 鍵井英之, 政策研ニュース **61**, 41-47 (2020).
- 2) D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, and J. Bajorath, *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 935-949 (2004).
- 3) K. Crampon, A. Giorkallos, M. Deldossi, S. Baud, and L. A. Steffanel, *Drug Discov. Today* **27**, 151-164 (2022).
- 4) K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, and M. Uebayasi, *Chem. Phys. Lett.* **313**, 701-706 (1999).
- 5) T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M. Uebayasi, and K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.* **318**, 614-618 (2000).
- 6) T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, K. Fukuzawa, Y. Akiyama, M. Uebayasi, and K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.* **351**, 475-480 (2002).
- 7) K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano, and M. Uebayasi, *Chem. Phys. Lett.* **312**, 319-324 (1999).
- 8) D. G. Fedorov and K. Kitaura, *J. Comput. Chem.* **28**, 222-237 (2007).
- 9) M. Nishio, Y. Umezawa, and M. Hirota, *ファルマシア* **30**, 1154-1159 (1994).
- 10) J. D. Chodera and D. L. Mobley, *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 121-142 (2013).
- 11) D. Takaya, C. Watanabe, S. Nagase, K. Kamisaka, Y. Okiyama, H. Moriwaki, H. Yuki, T. Sato, N. Kurita, Y. Yagi, T. Takagi, N. Kawashita, K. Takaba, T. Ozawa, M. Takimoto-Kamimura, S. Tanaka, K. Fukuzawa, and T. Honma, *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 777-794 (2021).
- 12) N. M. King, M. Prabu-Jeyabalan, R. M. Bandaranayake, M. N. L. Nalam, E. A. Nalivaika, A. Özen, T. Haliloğlu, N. K. Yilmaz, and C. A. Schiffer, *ACS Chem. Biol.* **7**, 1536-1546 (2012).
- 13) K. Milan, B. Jenelle, Ř. Pavlína, Š. Klára, B. Jiří, P. Jana, M. Fabrizio, R. Lubomír, and K. Jan, *J. Mol. Biol.* **374**, 1005-1016 (2007).
- 14) K. Milan, L. Martin, G. Š. Klára, B. Jiří, K. Jan, and Ř. Pavlína, *FEBS J.* **281**, 1834-1847 (2014).
- 15) K. Takaba, C. Watanabe, A. Tokuhisa, Y. Akinaga, B. Ma, R. Kanada, M. Araki, Y. Okuno, Y. Kawashita, H. Moriwaki, N. Kawashita, T. Honma, K. Fukuzawa, and S. Tanaka, *J. Comput. Chem.* **43**, 1362-1371 (2022).



川下 理日人

Norihito Kawashita

E-mail: nkawashita@emat.kindai.ac.jp