

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05397

研究課題名(和文) 量子化学計算に基づく生体高分子の超分解能構造解析技術の開発と創薬への応用

研究課題名(英文) Development of super-resolution structure analysis techniques for bio-macromolecules based on a quantum chemical calculation

研究代表者

福澤 薫(秋葉薫)(Fukuzawa, Kaori)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50718244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、X線結晶構造解析と量子化学計算を融合した、タンパク質-リガンド複合体の新しい精密構造決定手法を開発している。フラグメント分子軌道法に基づいて、エネルギー計算、構造最適化、相互作用解析、および電子密度解析を駆使し、実験による構造解析の分解能を実質的に上げることを試みた。結果として、Pim1キナーゼ阻害剤の高精度活性予測や抗インフルエンザ薬の水和、またエストロゲン受容体の低分解能結晶構造からの高分解能構造の予測、特徴量の抽出、などにおいて、量子化学計算が極めて有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we are developing a new precise structure determination method of protein-ligand complex by using X-ray crystal structure analysis and quantum chemical calculation. Based on the fragment molecular orbital method, we attempted to use the energy calculation, structure optimization, interaction analysis, and electron density analysis to substantially increase the resolution of structural analysis by experiment. It was shown that quantum chemical calculations are quite useful in predicting high-precision activity of Pim 1 kinase inhibitors, hydration of anti-influenza drugs, prediction of high-resolution structures from low-resolution crystal structures of estrogen receptors.

研究分野：量子化学計算を用いた、計算生命科学、計算構造生物学および創薬等分子設計への応用

キーワード：フラグメント分子軌道法 創薬分子設計 計算構造生物学 電子密度解析 構造精密化 超分解能解析  
量子化学計算 タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

構造生物学の重要な基盤技術である X 線結晶構造解析では、結晶の分解能が事実上の制限となっており (一般的な分解能は 2 程度)、タンパク質のプロトン化状態やリガンドの精密配座を決定することは依然として困難である。現実的には、実験で得られる分解能に計算からの情報を加味し、実質的に分解能を上げる「超分解能」の達成が実用上の課題と言える。

一方で、フラグメント分子軌道(FMO)法は、北浦教授らによって提案された日本初の理論手法であり、タンパク質の高速高精度な電子状態計算が可能であることから、主に創薬分野において相互作用エネルギー解析ツールとしての利用が進んでいる。本研究では、X 線結晶学と FMO 量子化学計算を融合した新しい超分解能構造決定手法を開発する。

### 2. 研究の目的

本研究は、X 線結晶構造解析の分解能を量子化学計算によって実質的に上げ、世界中の構造生物学者が精密な分子解析をするための新規基盤技術の開発を目的とする。要素技術として研究代表者らが長年開発を行っている FMO 法を用いて構造最適化および電子密度計算を行い、X 線結晶構造解析による構造や電子密度との数値比較を行う。対象系は、酵素反応や創薬分子設計に重要なタンパク質-リガンド複合系について検討する。結果として得られる分子構造 (原子座標) は化学的に精度の高いものであり、またリガンド-アミノ酸残基間の精密な相互作用情報が同時に得られる。量子化学 (QM) 計算に基づいて、X 線結晶構造解析の分解能を補完し、化学的な議論に耐えうる構造を作成することを目的とする。

### 3. 研究の方法

応用計算の対象タンパク質としては、エストロゲン受容体(ER)、Pim1 キナーゼ、p38 MAP キナーゼ、クラウンを用いた。また水和リガンドの系では、oseltamivir, zanamivir およびシアル酸を用いた。

FMO 計算では、エネルギー計算は FMO2-MP2/6-31G\*法を標準的に使用し、高精度計算においては FMO3 および FMO4 法を用いた。部分構造最適化計算では、リガンドと周辺の数アミノ酸残基最適化領域とした FMO2-HF/6-31G\*計算を基準とし、高精度化のための FMO2-MP2/6-31G\* 計算や ONIOM-HF/6-31G\*:UFF 法による QM/MM 計算も行った。また、溶媒効果の考慮は Poisson-Boltzmann 法を付加的に用いた。構造モデリングにおける古典力学(MM)計算には Amber10:EHT 力場を用いた。

電子密度計算は、FMO2-HF/6-31G\*レベルで行った。通常の電子密度計算に加えて、本研究で開発した、熱揺らぎを考慮した電子密度の計算も行った。

全ての FMO 計算は、専用プログラムである ABINIT-MP を用いて行い、結果の可視化には専用 GUI システムである BioStation Viewer を用いた。またタンパク質複合体の分子モデリングは統合計算化学システム MOE を用いて行った。

### 4. 研究成果

(1) QM 構造最適化を用いた X 線結晶構造の精密化と高精度活性予測 (発表論文、 )

セリン/スレオニンキナーゼ Pim1 阻害剤の開発において、Benzofuranone 骨格への窒素の導入位置のわずかな違いにおける優位な活性変化 (いわゆる "activity cliff") が観測されている (図 1)。このような微小な構造変化の扱いは古典的手法では極めて困難であることから、FMO 法を用いた活性予測を試みた。

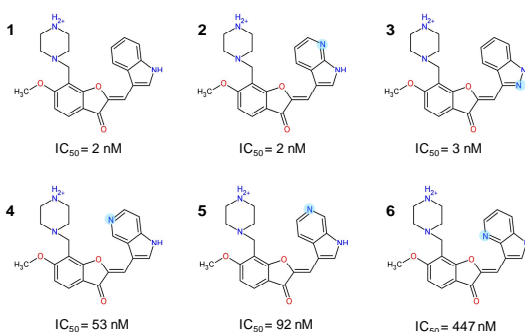


図 1 Pim1 阻害剤と活性値

結果として、QM/MM 構造最適化と FMO 計算、さらに MM-PBSA による溶媒効果を組み合わせることで、MM 法による構造を用いた場合と比べて、活性値との相関が劇的に改善した (図 2)。

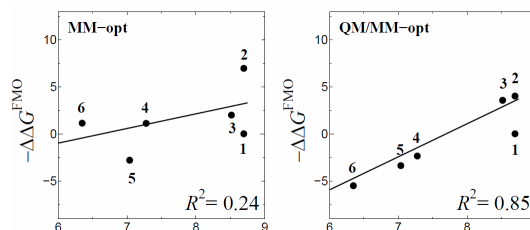


図 2 FMO 計算値と活性値との相関 (左: 古典手法、右: 量子化学手法を用いた構造最適化による)。

次に、抗インフルエンザ薬である oseltamivir, zanamivir および基質のシアル酸の水和構造および水和エネルギーを、QM/MM 最適化構造と MM 最適化構造を用いた FMO2, FMO3, FMO4 計算によって評価した。MM 構造では過剰な電荷移動が観測され、QM による適切な水和構造の作成が必要であることが明らかとなった。

また ER の例では、同一のリガンド (17 estradiol) との複合体構造におけるリガンド相互作用エネルギーを評価したところ、低い分解能 (PDBID: 1ERE, 3.1 ) の構造に対する

FMO 構造最適化によって、高い分解能 (PDBID: 2YJA, 1.8 Å) の結果に近づくことが明らかとなった。さらに、FMO-MP2 レベルの構造最適化計算によって、リガンドと Glu353 間のプロトン共有構造が得られた。これによって X 線結晶構造解析から推測される、異常に短い水素結合距離を説明することができ、X 線の電子密度分布とも一致した。また FMO 計算による電子密度解析からもこの結果を裏付けることができた。

## (2) 熱揺らぎを考慮した電子密度解析法の開発

X 線結晶構造解析による電子密度と FMO 電子密度を数値比較する際に問題となるのが、熱揺らぎの影響である。X 線結晶構造解析では、温度因子(B-factor) を熱揺らぎの指標としており、温度因子を考慮することによって、静的構造に対する FMO 電子密度分布にも熱揺らぎの効果を取り込むことができると考えられる。そこで本研究では、温度因子を考慮した電子密度計算機能を ABINIT-MP プログラムに組み込んだ。

X 線結晶構造解析の電子密度データは、Electron Density Server (EDS) のサイトから得られる、CNS 形式のグリッドデータを用いた。FMO 電子密度計算では、同一の CNS グリッド点上に計算値をマッピングし、数値比較を行った。電子密度の計算手順としては、まず温度因子から各原子の位置揺らぎの確率密度分布を算定し、それと電子密度分布  $\rho(x,y,z)$  とから熱揺らぎを取り込んだ電子密度分布  $\rho_{\text{thermal}}(x,y,z)$  を計算した。クランピンの例 (PDBID: 3NIR) では、電子密度に反映されており、タンパク質の内側よりも外側の方が大きく揺らいでいる様子が見られる (図 3)。

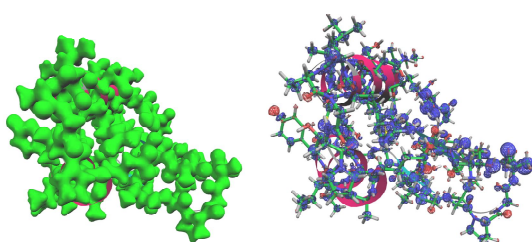


図 3 クランピンの FMO 電子密度分布 (0.1 e/borh<sup>3</sup>)。左：熱揺らぎなし、右：熱揺らぎありとなしの差分。

この機能を用いて、ER - リガンド複合体 (PDBID: 2QTU) における実験値と FMO 計算値の数値比較を行った。Fo - Fc map における信頼度因子(R 因子)の評価を行ったところ、熱揺らぎ補正前は 2.60 だったのに対して、補正後には 1.79 にまで減少し、双方の数値比較が容易になった。

## (3) FMO 法による、タンパク質 - リガンド相互作用解析手法の開発 (発表論文)

福澤が代表を務める FMO 創薬コンソーシアムや HPCI 課題と連携したスーパーコンピュータ「京」の活用によって (課題番号 hp170183)、多くのタンパク質 - リガンド複合体構造に対する FMO 計算の実行や、計算結果を活用した解析手法の開発が可能となっている。そこで、PDB で公開されている複合体構造の FMO 計算を網羅的に行い、リガンドとアミノ酸残基とのフラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) のパターンに基づいて化合物のクラスタリングを行う VISCANA 解析を行った。図 4 は ER と 22 種のリガンドとの VISCANA 結果であるが、アゴニストとアンタゴニストが明確に分離され、それぞれのタイプの相互作用に重要な水素結合などの特徴を抽出することができた。

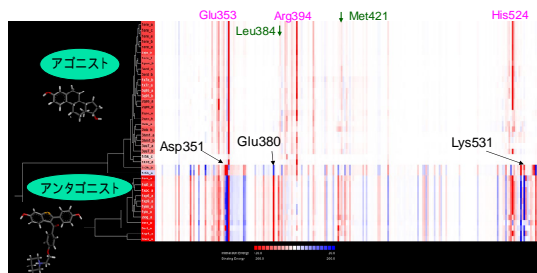


図 4 ER とリガンドとの相互作用パターンに基づくクラスタリング解析

次にもう一つのデータ解析手法として、活性値をより良く再現するための特異値分解を行った。対象データとして、P38 MAP キナーゼの 60 複合体構造や図 4 で用いた ER の 22 複合体構造の FMO 計算結果を用いた。FMO 計算結果から得られる IFIE の生データは、特に静電的な相互作用が過大評価されることが課題となっている。ここでは特異値分解によって、ノイズとなる成分を検出・除去することを目的として検討を行った。

結果として、過剰な静電相互作用の影響を受けやすい、第一特異ベクトルを棄却することで、活性値との相関がよくなることや、DFG ループのように特徴的なコンフォメーション変化に係る相互作用が第二特異ベクトルに現れるなどの興味深い結果が得られた。今後は IFIE を 4 つのエネルギー成分 (静電項、交換反発項、電荷移動項、分散項) に分割する PIEDA を用いることでより精密な検討を進める。

計算機の発展に伴って可能となるこれらのデータ解析技術は今後益々発展すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

K. Maruyama, Y. Sheng, H. Watanabe, K. Fukuzawa, S. Tanaka “Application of singular value decomposition to the inter-fragment interaction energy analysis

for ligand screening” 査読有、Comp. Theor. Chem, 1132, 23-34 (2018). DOI: 10.1016/j.comptc.2018.04.001.

C. Watanabe, H. Watanabe, K. Fukuzawa\*, L. J. Parker, Y. Okiyama, H. Yuki, S. Yokoyama, H. Nakano, S. Tanaka, and T. Honma “Theoretical analysis of activity cliffs among benzofuranone class Pim1 inhibitors using the fragment molecular orbital with molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area (FMO+MM-PBSA) method” 査読有、J. Chem Info Model, 57, 2996-3010 (2017). DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00110.

K. Tokuda, C. Watanabe, Y. Okiyama, Y. Mochizuki, K. Fukuzawa\* and Y. Komeiji “Hydration of Ligands of Influenza Virus Neuraminidase Studied by the Fragment Molecular Orbital Method” 査読有、J. Mol. Graph. Model., 69., 144-153 (2016). DOI: 10.1016/j.jmgm.2016.08.004.

#### 〔学会発表〕(計 17 件)

K. Fukuzawa “In silico Drug Discovery Based on the Fragment Molecular Orbital method” Joint symposium for Zhejiang University (2017). 招待講演

福澤薫「FMO 創薬コンソーシアムにおける活動」FMOODD・KBDD 合同公開シンポジウム CBI 学会 2017 年大会 (2017).

K. Fukuzawa, “Development of In Silico Drug Design Techniques Based on the Fragment Molecular Orbital Method” 11th Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemist (WATOC2017), (2017).

K. Fukuzawa “Towards realizing FMO based drug design” 構造科学と計算科学の融合ワークショップ (2017). 招待講演

福澤薫「フラグメント分子軌道法を用いたインシリコ創薬基盤技術の開発」日本薬学会第 137 年会(2017).

福澤薫「FMO 創薬の実現に向けた取り組み」CBI 学会 2016 年次大会 (2016) 招待講演

福澤薫「フラグメント分子軌道法の創薬への応用」第 43 回 構造活性相関シンポジウム SAR2015 (2015) 招待講演

#### 〔図書〕(計 1 件)

福澤薫、技術情報協会、2018、In silico 創薬におけるスクリーニングの高速化・効率化技術、pp222-234.

#### 〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 〔その他〕

FMO 創薬コンソーシアムのホームページ：  
<http://eniac.scitec.kobe-u.ac.jp/fmodd/>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

福澤 薫 (FUKUZAWA, Kaori)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50718244

##### (2)研究分担者

##### (3)連携研究者

本間光貴 (HONMA, Teruki)

理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤  
研究センター・チームリーダー

研究者番号：10466039

田中成典(TANAKA, Shigenori)

神戸大学・システム情報学研究科・教授

研究者番号：10379480

鶴田宏樹(TSURUTA, Hiroki)

神戸大学・学術・産業イノベーション創造  
本部・准教授

研究者番号：20346282

##### (4)研究協力者

渡邊千鶴 (WATANABE, Chiduru)

理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤  
研究センター・研究員