

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34315  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K12130  
研究課題名(和文)自由エネルギー不等式に基づくタンパク質-リガンド結合自由エネルギー予測法の開発  
  
研究課題名(英文)Development of protein-ligand binding free energy prediction technique based on free energy inequality  
  
研究代表者  
菊地 武司(KIKUCHI, Takeshi)  
  
立命館大学・生命科学部・教授  
  
研究者番号：90195206  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ファインマンの自由エネルギー不等式に基づく相対的結合自由エネルギーの予測法にreference interaction site model (RISM) 理論による陽溶媒効果を取り入れることである。Pim-1キナーゼの阻害剤の6個のリガンドに対し、相対的結合自由エネルギー計算を試みた。その結果、決定係数 $r^2=0.72$ 、 $G_{\text{error}}=1.04\text{kcal/mol}$ という従来の結果を大幅に改善することができた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の基本的目標は、様々な疾病に関わるタンパク質とリガンドの相対的結合自由エネルギーを精度よく予測することである。それは、新薬開発の一番最初の重要な過程である。本研究では、ファインマンの自由エネルギー不等式に基づいた従来の方法に陽溶媒を取り入れることにより大幅な精度の向上を示す事ができた。このことは、将来創薬の現場において、結合自由エネルギーの高い精度での予測を可能とし、創薬過程を大きく効率化できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present research is to incorporate the effect of explicit solvent based on reference interaction site model (RISM) theory into the prediction method of the relative binding free energy based on Feynman free energy inequality (T. Ashida and T. Kikuchi, J. Comput-Aided Mol. Des. 27, 479 (2013), T. Ashida and T. Kikuchi, J. Comput-Aided Mol. Des.34, 647 (2020)). In the previous studies, we used the implicit solvent model (MM-GB/SA method) for the calculation of the relative binding free energy and we obtained the results of the coefficient of determination,  $r^2=0.72$ ,  $G_{\text{error}}=1.04\text{kcal/mol}$ . The predictions of relative binding free energy were attempted for six inhibitors of Pim-1 kinase. The results indicate,  $r^2=0.96$ ,  $G_{\text{error}}=0.32\text{kcal/mol}$ , that is, the results were widely improved compared with the previous studies in which the results show  $r^2=0.72$ ,  $G_{\text{error}}=1.04\text{kcal/mol}$ .

研究分野：生物物理

キーワード：結合自由エネルギー ファインマン自由エネルギー不等式 RISM理論 陽溶媒

## 1. 研究開始当初の背景

創薬は開発に非常に時間を要する過程である。まず疾病のターゲットとなるタンパク質の特定から始まり、そのタンパク質の特性、立体構造等を解明した上で、そのタンパク質に強く結合する化合物の探索、設計を行う所からスタートする。その際、化合物が対象タンパク質にどの程度強く結合するかを知ることが肝要である。それを実験的に求めることが最も信頼性が高いことは言を俟たないが、多大な時間と予算を必要とする。そのため、コンピュータを用いて、計算コストを低くした上で、結合自由エネルギーを精度よく予測することが望まれる。これまで標準的な予測法として、自由エネルギー摂動法 (FEP 法)、MM-PB(GB)/SA 法、線形相互作用エネルギー (LIE) 法があり、すでに広く用いられている。これらの方法は、系にもよるが、決定係数  $r^2$  として、0.8 程度、予測結合エネルギーと実験値との誤差が、3-5cal/mol の精度を与えることが知られている。今のところ、結合自由エネルギー予測にはこれらの方法が用いられている。これらの予測法には、予測精度か計算コストの面でいろいろ問題があるのが実情で、今でも新しい結合自由エネルギー予測法の開発が望まれる。

2019 年より、大きなパンデミックを引き起こした Covid-19 も、現在ではワクチンの開発が奏功し、現在では一見大きな脅威ではなくなっている。しかしながら、2024 年の段階でも感染は広くおこっており、まだ脅威が消えたわけではない。治療薬の開発も試みられているが、高い有効性がある治療薬はまだ開発段階である。Covid-19 治療薬の開発は、現在でも喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

報告者はファインマンの自由エネルギー不等式に基づく相対的結合自由エネルギーの予測法を開発し、FKBP (免疫抑制剤結合タンパク質) と Pim-1 キナーゼへ応用した (T. Ashida and T. Kikuchi, J. Comput-Aided Mol. Des. 27, 479 (2013), T. Ashida and T. Kikuchi, J. Comput-Aided Mol. Des. 34, 647 (2020))。その結果、精度においては、従来法と同程度か、よりよい結果を与えることを示した (概ね決定係数  $r^2 = 0.7-0.8$ , 誤差平均 0.95 -1.9kcal/mol 程度)。計算コストについては、FEP 法に比べ 1/10 のオーダー、MM/GB(PB)-SA 法に比べ 70% 程度であることを示した。本方法ではパラメータの調整は必要ない。すなわち、代表者らは、比較的計算コストは低いが、精度は従来法と同程度かそれ以上である方法を開発した。本方法は「ファインマンの自由エネルギー不等式に基づく方法 (Method based on free energy inequality of Feynman (Method based on FEIF))」と呼ぶことにする。しかしながら、この方法では、最終的な結合エネルギーの予測の計算過程において、溶媒和エネルギーとして、接触表面積を用いた溶媒和自由エネルギー (すなわち陰溶媒) で代用している。精度の高い結合自由エネルギーを得るためには、溶媒和自由エネルギーの計算に、精度の高い方法、すなわち陽溶媒による方法、を用いるべきである。そこで本研究においては、溶媒和自由エネルギーを Reference interaction site model (以下、RISM) 理論に基づいて計算する方法を組み込むことを試みる。計算コストは高くなることが予測されるが、溶媒和自由エネルギーの精度が格段に高くなることが期待される。どの程度、計算精度が改善されるかは、これまで本方法に基づく計算実績のある Pim-1 キナーゼを用いて確認する。

さらに、現在において喫緊の課題になっている新型コロナウイルスの治療法を目指し、その方法を SARS-CoV-2 阻害剤のリード化合物の探索に応用することも本研究の目的である。まず SARS-CoV-2 タンパク質と angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) との相互作用を阻害する化合物の探索を試みる。

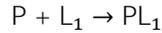
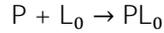
## 3. 研究の方法

### (1) FEIE 法の概要

「2. 研究の目的」でも記した通り、代表者は FEIF 法を提案し、FKBP (免疫抑制剤結合タンパク質) と Pim-1 キナーゼへ応用した。その結果、今まで広く用いられている方法、FEP 法、LIE 法、MM-GB(PB)-SA 法、と同程度かそれ以上の精度であることを示した。しかしながら、FEIF 法は、いわゆる陰溶媒を用いているので、どうしてもその部分で精度が低くなる。そこで、結合自由エネルギー計算の部分の溶媒の取り込み法として、そこで本研究においては、溶媒和自由エネルギーを RISM 理論に基づいて計算する方法を組み込むことを試みる。FEIE は次式で与えられる<sup>3)</sup>。

$$\langle H_1 - H_0 \rangle_1 \leq G_1 - G_0 \leq \langle H_1 - H_0 \rangle_0$$

ここで、 $H_0$ ,  $G_0$ ,  $H_1$ ,  $G_1$  はそれぞれ、非摂動系と摂動系のハミルトニアンと自由エネルギーを表す。 $\langle \rangle_0$  は無摂動系、 $\langle \rangle_1$  は摂動系におけるポテンシャル面上での集団平均を表す。今、タンパク質 P と 2 つのリガンド L0, L1 との相対的結合自由エネルギーを考える。次反応を考慮して、



それぞれの結合自由エネルギーは、

$$\Delta G_{\text{bind}_L0} = G_{\text{PL0}} - G_P - G_{L0}$$

$$\Delta G_{\text{bind}_L1} = G_{\text{PL1}} - G_P - G_{L1}$$

と書ける。ただし、 $\Delta G_{\text{bind}_L1}$ ,  $G_{\text{PL1}}$ ,  $G_{L1}$ ,  $\Delta G_{\text{bind}_L0}$ ,  $G_{\text{PL0}}$ ,  $G_{L0}$  はそれぞれリガンド 1 あるいはリガンド 0 の結合自由エネルギー、複合体、リガンドの自由エネルギーを示している。 $G_P$  はタンパク質の自由エネルギーである。この系の相対的結合自由エネルギーは

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{bind}_L1} - \Delta G_{\text{bind}_L0} = G_{\text{PL1}} - G_{\text{PL0}} - (G_{L1} - G_{L0})$$

と書ける。式を考慮すれば、

$$\langle H_{\text{PL1}} - H_{\text{PL0}} \rangle_{\text{PL1}} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L1} \leq \Delta\Delta G_{\text{bind}} \leq \langle H_{\text{PL1}} - H_{\text{PL0}} \rangle_{\text{PL0}} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L0}$$

となる。このままでは、相対的結合自由エネルギーの上限と下限を予測することができないので、本研究では、相対的自由エネルギーを Zwanzig の自由エネルギー式<sup>1), 4)</sup>の展開式の第一項で次のように近似する。

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}} = \frac{1}{2} [\langle H_{\text{PL1}} - H_{\text{PL0}} \rangle_{\text{PL1}} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L1} + \langle H_{\text{PL1}} - H_{\text{PL0}} \rangle_{\text{PL0}} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L0}]$$

以上が相対的結合自由エネルギー計算の基礎である。

実際に相対的結合自由エネルギーをどのように求めるかであるが、それは以下の手順で行う。

式によれば、相対的結合自由エネルギーを求めるには、複合体とリガンドのハミルトニアン<sup>1)</sup>の平均値を計算する必要がある。これらは、分子動力学シミュレーション(以下、MDシミュレーション)を行いエネルギーの平均値を計算する。分子動力学計算には AMBER (ver.18) を用い、300K, 10nsec のシミュレーションをそれぞれの系で行った。水モデルとして、TIP3P を用いた。詳細は文献 1), 2) に掲載した通りである。式にあるとおり、FEIE 法では、 $\langle H_{\text{PL1}} - H_{\text{PL0}} \rangle_{\text{PL1}}$ 、 $\langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L1}$ 、 $\langle H_{\text{PL1}} - H_{\text{PL0}} \rangle_{\text{PL0}}$ 、 $\langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L0}$  といった量を計算しなければならない。これらの量は、PL1 のエネルギー地形図上での PL0 のエネルギーの平均値、L1 のエネルギー地形図での L0 のエネルギーの平均値、PL0 のエネルギー地形図上での PL1 のエネルギーの平均値、L0 のエネルギー地形図での L0 のエネルギーの平均値、を含んでいる。これらの量は、以下のようにして計算する。MD トラジェクトリーから 100 個のスナップショットを取り出し、PL0 と PL1 のスナップショットに注目し、PL0 のリガンドと PL1 のリガンドを入れ替える。その操作を 10 個のスナップショットに対して行い、その平均値をとることにより、 $\langle H_{\text{PL1}} - H_{\text{PL0}} \rangle_{\text{PL1}}$  とする。同様のことを PL0 についても行う<sup>1), 2)</sup>。平均エネルギーの計算においては、水和エネルギーの計算に、RISM 理論を用いた。RISM 計算は、AMBER(ver. 18) に実装されているモジュール、すなわち sander 中の 3D-RISM 部分を提要した。パラメータとして closure として ucoeff を用いた。

## (2) 用いるタンパク質 - リガンド系

これまで、報告者が取り扱ってきた Pim-1 キナーゼ阻害剤を用いて、本方法の検証を行った。PDB コード、3BGQ 中にあるリガンドを無摂動系として取り扱う。表 1 に本研究で扱ったリガンドの構造を示す。L1 が 3BGQ 中に存在するリガンドである。

また図 1 に無摂動系として扱い L1 の構造と全リガンドとの共通部分を示す。赤で示した部分が共通部分である。FEIE 計算を行う際、リガンドの入れ替えを行うときに構造を重ね合わせる部分である。図 2 には、Pim-1 キナーゼ-阻害剤複合体の立体構造を示す。

表1 本研究で扱った Pim-1 キナーゼ阻害剤と活性値

化合物番号	構造	Ki(nM)	化合物番号	構造	Ki(nM)
L1		11	L5		160
L2		44	L6		320
L3		94	L7		430
L4		21			

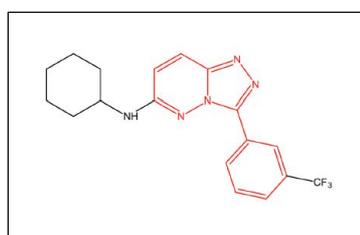


図1 : L1 の構造。赤で示した部分が全リガンドに共通する部分

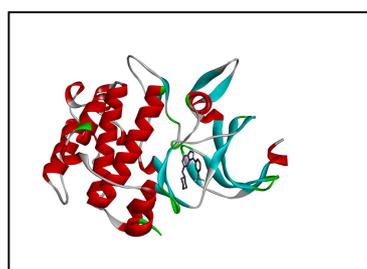


図2 : Pim-1 キナーゼ阻害剤(L1)の立体構造

#### 4. 研究成果

##### (1) RISM 理論を溶媒効果に取り入れた計算の結果

図3 に $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$  値の予測値と実験値を示す。決定係数,  $r^2$ , は 0.96、両者の絶対誤差は 0.32 とすこぶるよい結果が得られた。従来の FEIE 法<sup>2)</sup>により得られた結果を図4 に示す。この計算においては、水和エネルギーの計算に MM/PB-SA 法 (陰溶媒) を用いている。この結果の  $r^2$  と絶対誤差が 0.72, 1.04 であるので、本方法の精度が著しく改善されたことがわかる。

当初予想していたとおり、陽溶媒を考慮することにより、陰溶媒による計算に比べ、少なくとも現在対象としているリガンドに関する限り、単純計算ではあるが決定係数において 1.3 倍、絶対誤差で 3 倍精度が改善されている。RISM 理論を考慮することにより、水和エネルギーの計算値の精度が飛躍的に上がったことを意味すると思われる。

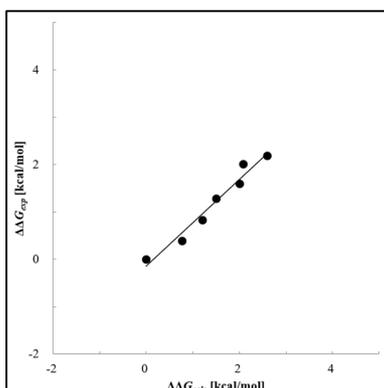
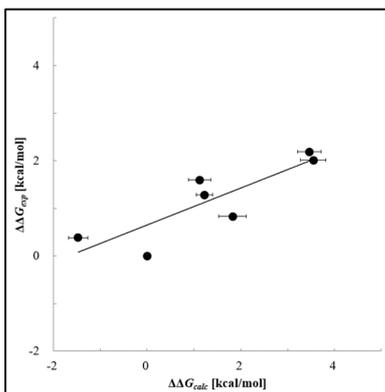


図3 : RISM 法を用いた相対的結合エネルギーの予測値 $\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ と実験値 $\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ のプロット。(陽溶媒)  
 $r^2=0.96$ ,  $\Delta G_{\text{error}}=0.32$ .



**図3：従来法を用いた場合の相対的結合エネルギーの予測値 $\Delta\Delta G_{calc}$ と実験値 $\Delta\Delta G_{exp}$ のプロット。**  
MM/PB-SA 法により溶媒を考慮している。(除溶媒)  
 $r^2=0.72$ ,  $\Delta G_{error}=01.04$ .

## (2) Covid - 19 治療薬の開発への展望

本研究においては、AMBER(ver. 18) に実装されている RISM 計算の最適なパラメータを探すのに想定以上の時間がかかり、研究期間(2021年度 - 2023年度)に Covid-19 治療薬への応用へ研究を進めることができなかった。一応展望のみ記す。

SARS-CoV-2タンパク質-ACE2複合体構造はすでにProtein Data Bank(PDB)に登録されており(PDBコード：6VW1)、その界面部分に結合可能な化合物を探索し、探索した化合物の結合自由エネルギーを計算することが可能な状況である。タンパク質に結合しうる化合物の探索はオープンソースの化合物データベースを探索する。ドッキングポーズの予測並びに結合能スコアを予備的に計算することは、計算ツールのGLIDEを用いれば可能であろう。

## 文献

- 1) Takeshi Ashida and Takeshi Kikuchi, "Estimation of relative binding free energy based on a free energy variational principle for the FKBP-ligand system" J. Comp-Aided Mol. Des. 27, 479-490, 2013.
- 2) Takeshi Ashida and Takeshi Kikuchi, "A new method for estimating the relative binding free energy, derived from a free energy variational principle for the Pim-1-kinase-ligand and FKBP-ligand systems" J. Comp-Aided Mol. Des. 34, 647-658, 2020.
- 3) Feynman RP (1982) Statistical Mechanics. The Benjamin/cummings publishing company, Massachusetts, A Set of Lectures
- 4) Robert W. Zwanzig, "High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases" J. Chem. Phys., 22, 1420, 1954.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kikuchi Takeshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Decoding an Amino Acid Sequence to Extract Information on Protein Folding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3020 ~ 3020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27093020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝原慶太 菊地武司
2. 発表標題 Estimation of relative binding free energy based on a free energy inequality for the Checkpoint kinase1-ligand system
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新大樹 菊地武司
2. 発表標題 Estimation of relative binding free energy based on a free energy for the cyclin dependent kinase2- ligand system
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------