

分子動力学法とNMRを組み合わせた計算化学手法 - ドラッグデザインのための方法論 -

北里大学薬学部 創薬物理化学教室
広野修一 合田浩明

1. はじめに

計算機の進歩（高速化、低価格化）により、物理学・化学の多くの分野において計算機シミュレーション^{1,2,3)}は今や1つの確立された手法になっている。シミュレーションで位相空間の中に系の状態を実現する方法には確率論的方法と決定論的方法の2つがあるが、確率論的手法の代表であるモンテカルロ法（Monte Carlo method、略してMC法）は、系のミクロの状態を確率法則（マルコフ過程）に従って出現させるものである。一方、分子動力学法（Molecular Dynamics、以下ではMD法と略する）は、古典力学の運動法則に従って分子を構成している原子を動かしていくことにより、分子系（多粒子系）のマクロな性質、系で起こる現象の特徴を調べる決定論的計算機シミュレーションの一手法である。MC法とMD法はそれぞれ、（力学的量の集団平均）=（同じ量の時間平均）というエルゴード仮説の左辺、右辺に対応するシミュレーションを実行するものと言える。

計算機シミュレーションでは、近似をあまり使わずに複雑な系（高分子系や生体分子系など）の性質を研究できるので、それによって得られたデータを使って近似理論から導かれた結論をチェックすることが可能である。また、種々の数学的モデルに基づいた理論的結論をシミュレーションによって導き、実験結果と比較することによって使用したモデルの妥当性を確かめることができる。さらに大きな利点としては、実験で実際求めることのできないような物理量を、シミュレーションで計算し理論値と比較したり予測したりすることができるという点あげられる。

X線結晶解析やNMR溶液構造解析法の発展に伴い、それらの手法で得られた蛋白質や核酸の座標を基に、生体高分子系の計算機シミュレーションが構造生物学の一分野として盛んになってきているが、ここではコンピュータによるドラッグデザイン（合理的薬物分子設計）研究における分子動力学シミュレーションの活用法とNMR実験を組み合わせた新しい手法に関して、基礎的事項（分子力場、分子動力学法）を簡単に説明した後、

「酵素・受容体蛋白質の立体構造が既知である場合のシミュレーション」、すなわち、structure-based drug design に役立つ分子シミュレーションの例として、分子動力学 / 自由エネルギー計算を紹介する。

次に、「酵素・受容体蛋白質の立体構造が未知である場合のシミュレーション」、すなわち、ligand-based drug design に役立つシミュレーションの例として、分子動力学計算による配座解析とTRNOEデータを組み合わせたリガンド分子の蛋白質結合

配座決定、NMR測定と水溶液中の分子動力学計算による生理活性ペプチドの溶液構造解析、の2例について詳しく解説する。

分子力場

分子シミュレーションを始めるには、まず系を構成する粒子間に働くポテンシャルを決定しなければならない。いわゆる「分子力場」を決めることである。高分子系のMC、MD法では、一般にポテンシャルエネルギー V は、分子の構造や挙動を正しく記述できるような経験的古典力学関数によって表される。分子を電荷をもった質点とバネで形成される力学系と考え、分子内に働く力を結合の伸び縮み(1-2相互作用)、変角(1-3相互作用)、ねじれ(1-4相互作用)、ファン・デル・ワールス相互作用(1-N:N+5相互作用)および静電相互作用(1-N:N+5相互作用)の5種類の原子間相互作用からなる立体エネルギーで表す(図1参照)。この中で、伸び縮み(1-2相互作用)、変角(1-3相互作用)、ねじれ(1-4相互作用)の3つは結合を通した(through bond)相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用(1-N:N+5相互作用)および静電相互作用(1-N:N+5相互作用)は空間を通した(through space)とよばれる。

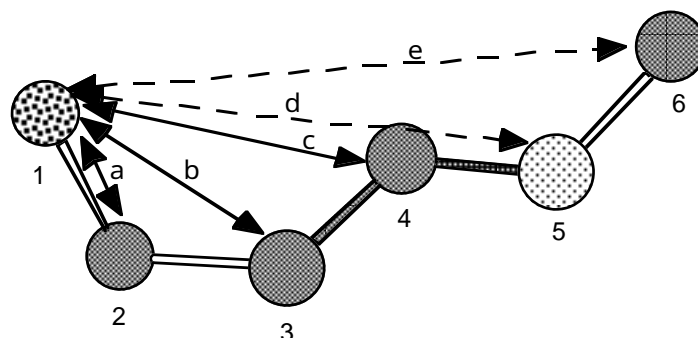


図1 図では例として、原子1と他の原子との相互作用を矢印で示した。それらの相互作用は以下のように分類される。

結合を通した相互作用 - - - a (1-2相互作用), b (1-3相互作用), c (1-4相互作用)
空間を通した相互作用 - - - d (1-N:N+5相互作用), e (1-N:N+5相互作用)

伸び縮みや変角を表すエネルギー関数にはフックの法則に従った調和関数がいられる。ねじれのエネルギー関数は分子内部回転障壁の研究から求められた $B(1 + \cos nf)$ 型の近似式がいられる。また非結合原子間のファン・デル・ワールスエネルギー関数としては、非常に近い距離での強い反発と遠い距離にある弱い吸引を表す $(A/r^{12} - B/r^6)$ 型のレナード-ジョーンズ式を用いている。また水素結合には特に12-10型の関数がいられる場合もある。ここで用いられているA、Bなどのパラメータは実測値に合うように経験的に定められる。静電相互作用にはクーロンの法則が適用される。次式に、生体高分子系で使われる典型的なポテンシャル関数の例 (Amber Potential) を示す。

$$\begin{aligned}
 V_{\text{total}} = & \sum_{n=1}^{N_r} K_{r_n} (\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_{eq_n})^2 && \dots \text{伸縮} \\
 & + \sum_{n=1}^{N_q} K_{q_n} (\mathbf{q}_n - \mathbf{q}_{eq_n})^2 && \dots \text{変角} \\
 & + \sum_{n=1}^{N_f} \sum_{m=1}^{N_h} \frac{V_{mn}}{2} [1 + \cos(\mathbf{h}_{mn} \mathbf{f}_{mn} - \mathbf{g}_{mn})] && \dots \text{ねじれ} \\
 & + \sum_{j=1}^{N_{\text{atoms}}} \sum_{i>j}^{N_{\text{atoms}}} e_{ij}^* \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^6 \right] && \dots \text{ファン・デル・ワールス} \\
 & + \sum_{j=1}^{N_{\text{atoms}}} \sum_{i>j}^{N_{\text{atoms}}} \frac{q_i q_j}{e R_{ij}} && \dots \text{静電} \quad (1)
 \end{aligned}$$

分子動力学法⁴⁾

MD法において、N粒子系のニュートンの運動方程式は、デカルト座標での粒子の位置ベクトルを \mathbf{r}_i 、質量を m_i とすると、次のようになる。

$$d^2 \mathbf{r}_i(t) / dt^2 = \mathbf{F}_i(t) / m_i \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (2)$$

ここで粒子iに働く力 $\mathbf{F}_i(t)$ は、粒子iの座標に関するポテンシャルエネルギー関数の勾配に負符号をつけたものに等しい。

$$\mathbf{F}_i(t) = - \nabla V(\mathbf{r}_1(t), \mathbf{r}_2(t), \dots, \mathbf{r}_n(t)) / \mathbf{r}_i \quad (3)$$

これらの方程式は（系中の最短振動周期よりもずっと）小さいMDタイムステップ t で数値積分され、系のトラジェクトリ（時間の関数としての粒子の位置）を与える。

式(1)を積分するための簡単なアルゴリズムは、速度ベクトル $\mathbf{v}_i(t)$ に対して $\mathbf{v}_i(t_n + Dt/2)$ と $\mathbf{v}_i(t_n - Dt/2)$ の双方を時刻 t_n のまわりでテイラー展開して得られる。

$$\mathbf{v}_i(t_n + Dt/2) = \mathbf{v}_i(t_n) + \dot{\mathbf{v}}_i(t_n) Dt/2 + \dot{\dot{\mathbf{v}}}_i(t_n) [Dt/2]^2 / 2! + \dots \quad (4)$$

$$\mathbf{v}_i(t_n - Dt/2) = \mathbf{v}_i(t_n) - \dot{\mathbf{v}}_i(t_n) Dt/2 + \dot{\dot{\mathbf{v}}}_i(t_n) [Dt/2]^2 / 2! - \dots \quad (5)$$

(4) から (5) を引いて並べ替え、次の関係を使うと、

$$\dot{\mathbf{v}}_i(t_n) = d\mathbf{v}_i(t_n) / dt = d^2 \mathbf{r}_i(t_n) / dt^2 = \mathbf{F}_i(t_n) / m_i \quad (6)$$

以下の式を得る。

$$\mathbf{v}_i(t_n+Dt/2) = \mathbf{v}_i(t_n-Dt/2) + Dt\mathbf{F}_i(t_n)/m_i \quad (7)$$

位置ベクトル $\mathbf{r}_i(t)$ に対しても、時刻 $t_n+Dt/2$ のまわりで $+Dt/2$ と $-Dt/2$ の双方向にテイラー展開して同様の手続きを踏むと、以下の式を得る。

$$\mathbf{r}_i(t_n+Dt) = \mathbf{r}_i(t_n) + \mathbf{v}_i(t_n+Dt/2)Dt \quad (8)$$

式(7)と(8)は、蛙跳び法という、古典力学の運動方程式(2)の積分でよく使われる方法の一種である。

式(7)、(8)を用いて実際に分子動力学シミュレーションを開始する際には、分子の構成原子の初期座標と初速度を与えなければならないが、初期座標としてはX線結晶解析の座標やその分子の標準的な構造の座標などが使われる。原子の初速度は、ある設定温度 T (絶対温度)のマックスウェル分布からサンプリングされることが多い。平衡状態にある系の粒子の速度は、マックスウェル分布に従うので、速度が \mathbf{v}_i と $\mathbf{v}_i+d\mathbf{v}_i$ の間にある確率は次式で与えられる。

$$P(\mathbf{v}_i) = [2\pi k_B T/m_i]^{3/2} \exp[-m_i \mathbf{v}_i^2 / (2k_B T)] d\mathbf{v}_i \quad (9)$$

ここで k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 m_i は粒子の質量である。

高分子、特に生体高分子系のMD計算を行う場合、分子はコンピュータ上で実現される適当な溶媒(水、有機溶媒など)の箱の中に置かれるのが一般的である(図2)。

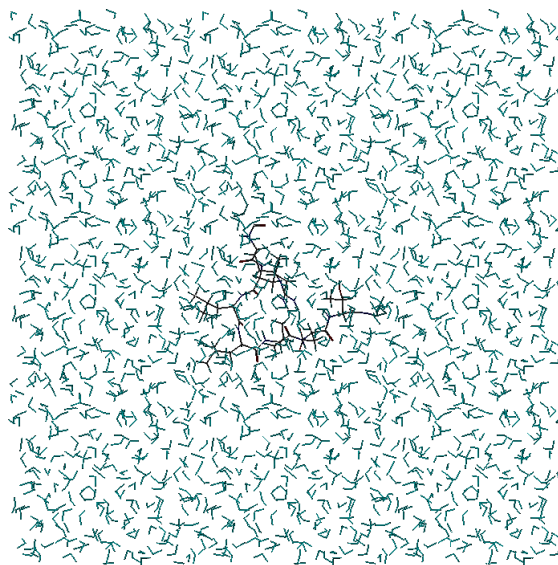


図2 水の箱の中に置かれた溶質分子

しかし、コンピュータは現実の系に比べてはるかに少ない数の粒子しか取り扱えないので、溶媒の箱をあまり大きなものにするにはできない。有限な系で派生する境界の影響を最小に押さえ、分子の微視的、巨視的な性質を有効に調べるために周期境界条件が用いられる。シミュレートされる分子は周期的に空間を埋め尽くす形

の箱に入れられる。さらに、その箱（基本セル）は前後、左右、上下に積み重ねた26個の箱（イメージセル）で取り囲まれている。中央の基本セル中の粒子*i*に働く力を計算する場合、粒子*j*に対して実粒子とその鏡像粒子のうち最も近い粒子との相互作用だけが考慮される（最近接鏡像法、図3）。

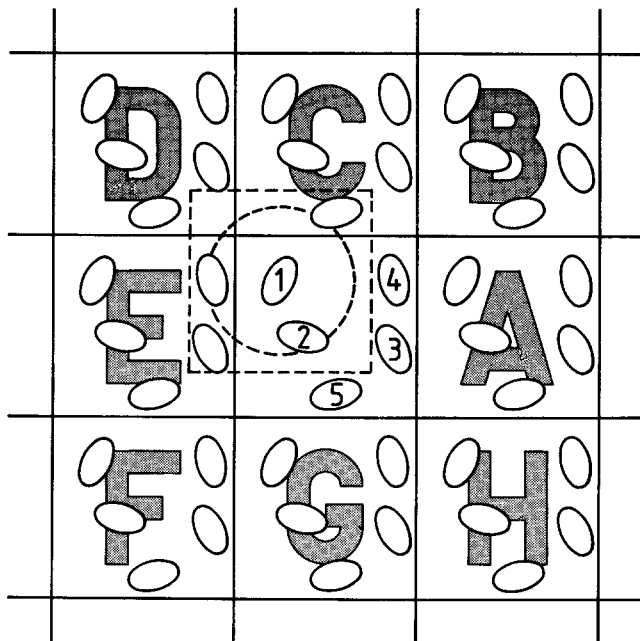


図3 最近接鏡像法（2次元）中央の箱は5個の分子を含んでいる。分子1のまわりの点線の箱も5個の分子を含んでいる。点線の円はポテンシャルのカットオフを表している。

蛋白質や核酸などの生体高分子系では、系が大きすぎて周期境界条件が適用できない場合がある。そのようなときには、次善の策としてCap WaterやShell Waterなどで溶質分子を覆うという方法が取られ、溶媒は簡易的に取り扱われる（図4）。

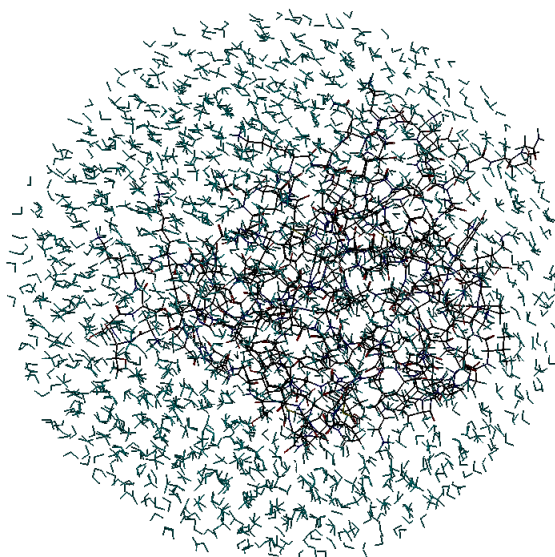


図4 Cap Water で包まれた蛋白質分子

高分子系のシミュレーションで有用なアンサンブルは、実験測定との比較に便利な NVT アンサンブル (N (粒子数)、 V (体積)、 T (温度) を一定に保つ系) や NPT アンサンブル (N 、 P (圧力)、 T を一定に保つ系) である。 NVT アンサンブルのシミュレーションでは熱浴と接触して温度を一定に保つ分子動力学計算、 NPT アンサンブルのシミュレーションでは圧力溜と接触して圧力を一定に保つ分子動力学計算が行われ、種々の熱力学量が求められる。

2. 蛋白質の立体構造が既知の場合：分子動力学 / 自由エネルギー計算^{5,6,7)}

蛋白質の立体構造がX線結晶解析やNMR溶液構造解析から得られている場合には、比較的容易に合理的医薬分子設計が可能であり、そのためのソフトウェアパッケージも優れたものが数多く市販されている。当研究室でもTripos社のSybylという分子設計支援ソフトを使用して薬物候補化合物の*de novo*デザインを行っているが、かなり効率よく蛋白質(酵素) - リガンド複合体を生成できることを実感している。ただ、ここで得られる複合体構造は、蛋白側を剛体として取り扱っているため、エネルギー極小化を行って最適構造を得たとしても、精細なドラッグデザインを行えるほど厳密な複合体構造ではない。この構造は、次の精密化ステップへの初期構造にすぎないという点に注意しなければならない。この初期構造を基に、水溶液中の分子動力学計算を行って、蛋白 - リガンド全体をリラックスさせ、最終的に精密な蛋白質 - リガンド複合体の立体構造を得るのである。初期構造のリガンドの蛋白に対する配向が正しければ、水溶液中の分子動力学計算は正確な蛋白質 - リガンド複合体の構造を与えることができる。このように、蛋白質(単独)の立体構造が既知の場合には、比較的容易にリガンドとの複合体の立体構造を得ることが可能であり、これを基に合理的医薬分子設計のための分子シミュレーションに進むことができる。

生体高分子系の分子動力学シミュレーションの中でも、自由エネルギー摂動法を利用した水溶液中の分子動力学計算は、蛋白質や核酸などの生体高分子に対する薬物などリガンドの結合自由エネルギーをシミュレートできるという点で、計算機による(薬物)分子設計や蛋白質デザインの有力な手法になりつつある。この方法の原理は、図5に示す様な熱力学的サイクルに基づいている(酵素 - 阻害剤複合体の形成反応を例にとる)。

図5 複合体形成反応の熱力学的サイクル

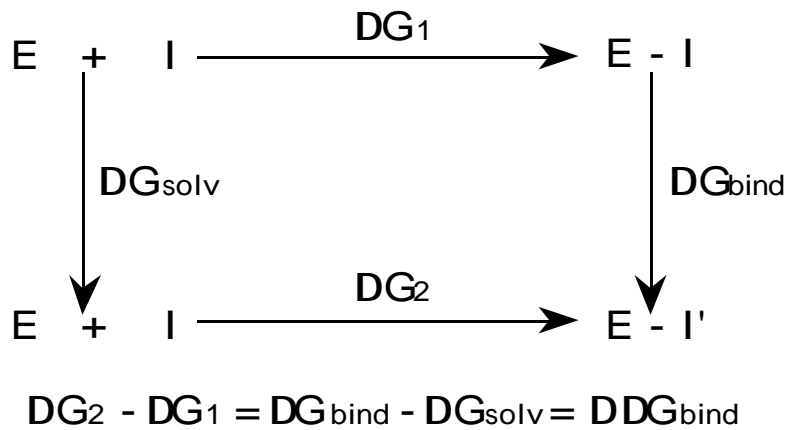


図5の上横矢印の過程は、酵素(E)と阻害剤(I)がミカエリス複合体(E-I)を形成する過程を示している。下横矢印の過程は、酵素(E)と別の阻害剤(I')がやはり複合体(E-I')を形成する過程を示している。横矢印の過程は、実際に実験を行える過程で、結合自由エネルギーGは阻害定数や解離定数等の測定から得ることができる。一方、縦矢印の過程の方は、計算機の中だけで実現できる仮想的な過程で、摂動法によりある阻害剤を別の阻害剤に変える過程である。この過程の自由エネルギー変化は分子動力学法を使って次の式で求めることができる。

$$H(I) = (1-I)H_a + I H_b + H_{\text{env}} \quad (10)$$

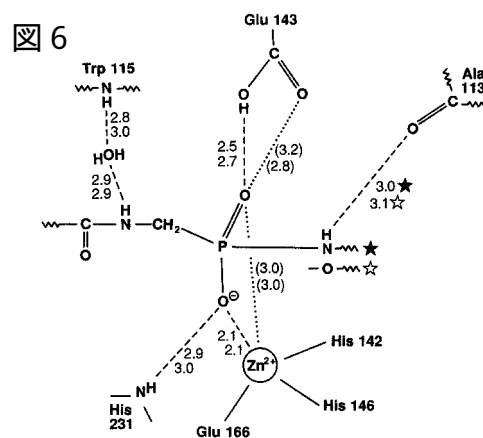
$$DG(I, I') = -k_B T \ln \left\langle \exp \left[\frac{H(I') - H(I)}{k_B T} \right] \right\rangle_I \quad (11)$$

状態aからbへの摂動法による自由エネルギー変化を求める場合、系のハミルトニアンHは状態パラメータの関数として式(10)のようにあらわされる。ここでH_aは系の中で摂動を受けるグループのa状態のハミルトニアン、H_bは摂動を受けるグループのb状態のハミルトニアン、H_{env}は摂動を受けないグループのハミルトニアンである。系全体では、 $\lambda = 0$ の時状態a、 $\lambda = 1$ の時状態bを表すことになり、

λ を0から1まで少しずつ変化させることで摂動による系の状態変化を記述するわけである。微小な状態変化($\lambda' - \lambda$)による系の自由エネルギー変化は、分子動力学シミュレーションによる全エネルギー(H)のサンプリングを行ない、そのエネルギーの時間平均($\langle \dots \rangle$)を取ることで求めることができる(式(11))。状態パラメータ λ は、分子力場(ポテンシャル関数)のパラメータに対して導入される。例えば、結合の伸縮ポテンシャル($V_r = K_r(r - r_0)^2$)のパラメータK_rに対しては、K_r(λ) = (1 - λ)K_r^a + λ K_r^bのように使用される。つまり、状態aからbへの摂動を行なう場合、分子動力学/自由エネルギー摂動法では両状態のミックスしたポテンシャルエネルギーをサンプリングすることでa → bという仮想的な過程の自由エネルギー変化を求めるわけである。図5で、横矢印の自由エネルギーは実験から得ることのできる値で、縦矢印の方は、コンピュータシミュレーションから計算される値であ

る。図の熱力学的サイクルは閉じており、自由エネルギーは状態量であるから、 $G_2 - G_1 = G_{\text{bind}} - G_{\text{solv}}$ の等式が成り立つ。こうして、実験値（左辺）と計算値（右辺）が比較でき、この方法の有効性を確かめることが出来る。また、 G_1 が既知で G_2 が未知の場合、このようなシミュレーションを行なうことにより、 $G_2 = G_{\text{bind}} - G_{\text{solv}} + G_1$ の関係から、未知の阻害剤の結合自由エネルギーを定量的に予測できることになる。この方法はサーモライシン酵素阻害剤のデザインに適用されて成功をおさめ、有効性が実証された⁸⁾。

P.A.Kollman らによる、この分子動力学 / 自由エネルギー計算に基づいたサーモライシン酵素阻害剤のデザインについて詳しく説明しよう。まずサーモライシン系では、酵素と2種の阻害剤 (Cbz-GlyP-NH-Leu-Leu : I(NH) と略す、Cbz-GlyP-O-Leu-Leu : I(O) と略す) との複合体のX線結晶解析が報告されている⁹⁾。図6はこれら阻害剤とサーモライシンのアミノ酸残基との相互作用を模式的に表したものである。図中の数字は原子間距離 (Å) であり、上段の数字が I(NH)、下段の数字が I(O) についてのものである。

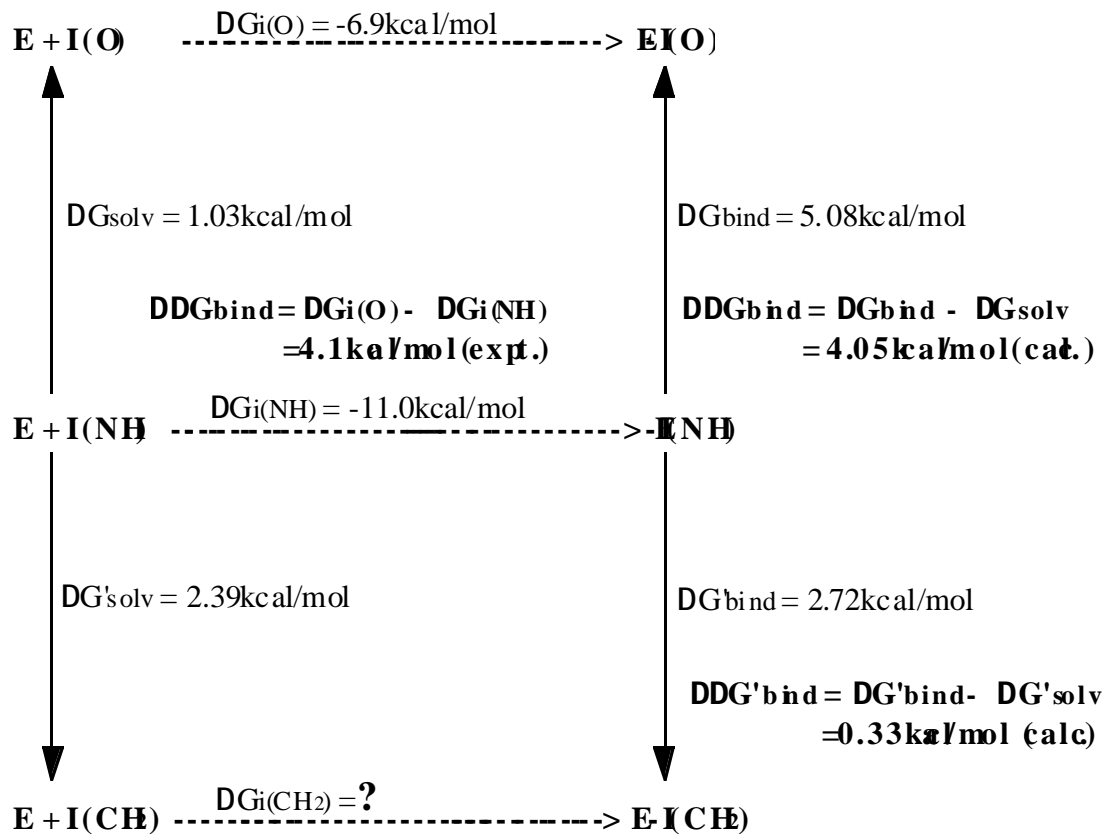
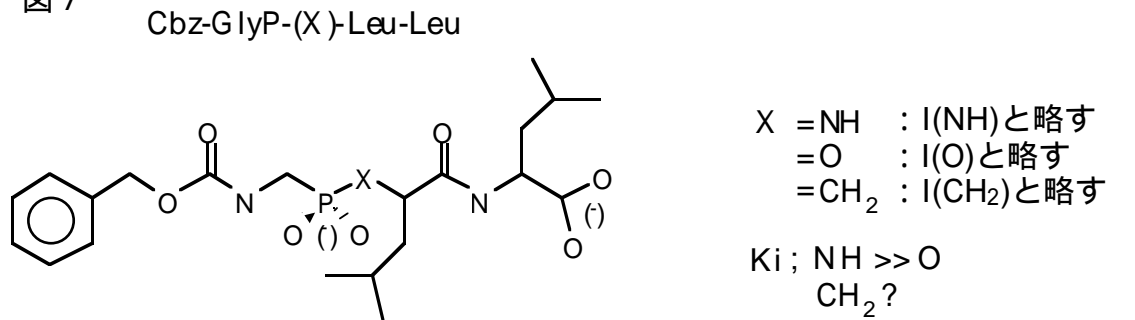


I(NH) と I(O) の阻害活性 (結合自由エネルギー) はそれぞれ、-11kcal/mol、-6.9kcal/mol とかなり異なっているが、上図の複合体の結晶構造を見る限りでは、結合様式に立体構造上の大きな差は見られない。I(NH) ではAla113と水素結合しているのに対し、I(O) ではむしろ静電的な反発が考えられるが、距離の差はわずか0.1である。

Kollman らはまず、I(NH) と I(O) の阻害機構を詳細に解析するために、溶液中と酵素中での I(NH) → I(O) 変換を分子動力学 / 自由エネルギー摂動法を用いて行った (図7 熱力学的サイクル中の上向き矢印)。シミュレーションから得られた $DDG_{\text{bind}} (=DG_{\text{bind}} - DG_{\text{solv}})$ は 4.05kcal/mol で、実験から得られている $DDG_{\text{bind}} (=DG_i(\text{NH}) - DG_i(\text{O}))$ の値 4.1kcal/mol と良く一致した。ここで DG_{bind} の値が +5.08kcal/mol ということは、酵素中で I(NH) から I(O) への変換がかなりしにくい、すなわち、I(O) と酵素との相互作用がかなり弱いということを意味している。これは、Ala113 のカルボニル酸素と I(O) の酸素原子との静電反発に由来するものと思われる。

一方、 DG_{solv} の値が $+1.03\text{kcal/mol}$ ということは、水溶液中で $I(\text{NH})$ から $I(\text{O})$ への変換がしにくい、すなわち、 $I(\text{O})$ のほうが $I(\text{NH})$ に比べて脱水和 (desolvation) しやすいということを意味している。阻害剤の酵素との結合親和性は、酵素との相互作用と阻害剤の脱水和の2つのエネルギーのバランスで決まり、結果として、約 4.1kcal/mol の結合自由エネルギー (阻害活性) 差が生まれることになる。続いて、Kollmanらは Ala113のカルボニル酸素との静電反発を無くした $I(\text{CH}_2)$ について、同様のシミュレーションを行い、 $I(\text{CH}_2)$ の阻害活性 (結合自由エネルギー) を予測した (図7 熱力学的サイクル中の下向き矢印)。

図7



$\searrow DG_i(\text{CH}_2) = DG_i(\text{NH}) + DDG'_{bind} = -107\text{kcal/mol (calc.)}$

$[DG_i(\text{CH}_2) = -109\text{kcal/mol (expt.) }]$

I(CH₂)はこの時点ではまだ合成されておらず、完全にコンピュータ上でデザインされた仮想の化合物であった。シミュレーションから得られた $DDG_{bind}(=DG_{bind}-DG_{solv})$ は0.33kcal/molで、この値と実験から得られている $DG_i(NH)$ の値-11.0kcal/molとの和から、I(CH₂)の結合自由エネルギー $DG_i(CH_2)$ は-10.7kcal/molとなり、阻害活性がI(NH)とそれほど変わらないと予測された。

以上のことは、次のように理解される。

” DG_{bind} が $+2.72$ kcal/molであることから、酵素との相互作用は、Ala113との水素結合が有る分、I(NH)のほうが強い。しかし、静電反発が無い分、I(O)よりはI(CH₂)のほうが酵素との相互作用は強い。 ”

一方、” DG_{solv} が $+2.39$ kcal/molであることから、脱水和はI(CH₂)のほうがI(NH)よりもはるかに容易である。 ” 従って、I(NH)と比べて遜色のないI(CH₂)の阻害活性の強さは、脱水和の容易さに由来し、酵素との相互作用の弱い分を補った結果だと考えられる。

この研究では、既知の阻害剤 (Cbz-GlyP-NH-Leu-Leu) を基に酵素との相互作用は弱い脱水和の容易な候補阻害剤 (Cbz-GlyP-CH₂-Leu-Leu) をデザインし、それが、Cbz-GlyP-NH-Leu-Leuと同程度に強い阻害剤であると予測した。その後、その候補阻害剤は別のグループで実際に合成され、結合自由エネルギーを測定したところ、-10.9 kcal/mol となり、計算値と非常によく一致したのである。受容体蛋白質や酵素の立体構造が既知である場合には、分子動力学 / 自由エネルギー計算は structure-based drug design にとって、非常に有効な手法であると言える。

図5で、リガンドの代わりに酵素側を変換の対象に選べば、部位指定アミノ酸改変酵素のシミュレーションが可能となる。そのような計算例^{10,11)}が実際にいくつか報告されており、蛋白質工学の分野でもこの方法の有効性が確認されている。MD法による自由エネルギー計算は、蛋白質の立体構造が既知である場合のルーチン的なシミュレーション技法の1つになると思われる。

3 . 蛋白質の立体構造が未知の場合

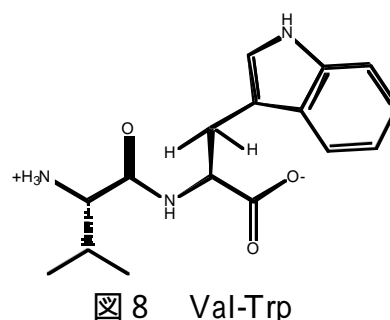
3 1 . 高温分子動力学計算による配座解析と転移核オーバーハウザー効果 (TRNOE) の測定を組み合わせたリガンド化合物の結合配座決定 (サーモライシン阻害剤を例として)

薬物の合理的ドラッグデザインにおいて、標的蛋白質とそのリガンドであるリード化合物の複合体構造を知ることは非常に重要である。それにはNMR解析あるいはX線解析により、直接標的蛋白質-リード化合物複合体の立体構造決定を行うのが最もよい。複合体の立体構造決定を行うことにより、リード化合物の結合配座およびリード化合物と標的蛋白質の相互作用様式を知ることができる。しかし、NMR解析においては分子量の大きさの問題、X線解析においては結晶化における

問題等により、複合体構造の直接的な決定が困難な場合がある。そういった場合に対して我々の研究室では次のようなアプローチを考案している。

- (1) あるリード化合物を用いて、NMR 測定の中で比較的容易に実行できる TRNOE^{12,13)} の測定を行い、そのリード化合物の結合配座に関する構造情報を得る。一方、高温分子動力学計算を用いてそのリード化合物の配座解析を行い、そのリード化合物がエネルギー的にとりうる多数の異なる配座を得る。そして、これらの配座の中から NMR 情報を満たす配座を選択し、そのリード化合物の結合配座候補とする。
- (2) (1) で決定されたあるリード化合物の結合配座候補に対して、同じ標的蛋白質に結合するその他のリード化合物の重ね合わせ (アライメント) を行う。これについて、三次元構造活性相関解析の1手法である CoMFA 解析¹⁴⁾ を行い、リード化合物-標的蛋白質の相互作用様式を推定する。

ここでは、(1) の “高温分子動力学計算による配座解析と TRNOE の測定を組み合わせたリガンド化合物の結合配座決定” について紹介する。(1) の手法の有効性を確かめるために、既に X 線解析により標的蛋白質との複合体構造が明らかとなっているサーモライシン阻害剤 Val-Trp (図8) に適用した (PDB 名: 3TMN)。



転移核オーバーハウザー効果 (TRNOE) の測定

まず、Val-Trp のサーモライシンへの結合配座に関する情報を得るために TRNOE の測定を行った。測定は、リガンド化合物に対して少量の標的蛋白質 (通常モル比でリガンド化合物の 1/10 ~ 1/20) を混ぜたサンプルを調製し、通常の NOESY スペクトルを得るだけである。また比較のために、リガンド化合物だけのサンプルについても同条件で NOESY スペクトルを測定しておく。ここで、TRNOE について簡単に説明する。リガ

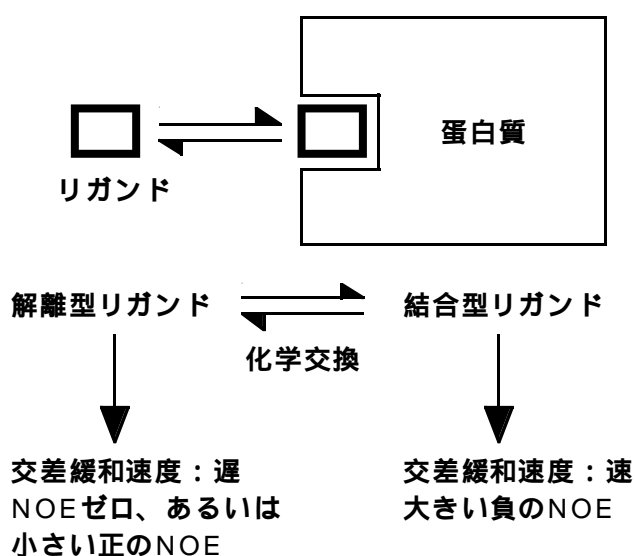


図9 TRNOEの測定のためのサンプル

ンド化合物のみのサンプルの NOESY スペクトルの場合、リガンド化合物のプロトンシグナル間にはほとんど NOE クロスピークが観測されないか、あるいは小さな正の NOE のクロスピーク（対角ピークと逆符号）が観測される。一方、リガンド化合物に対して少量の標的蛋白質を混ぜたサンプルにおいては、図9のようにリガンド化合物は解離型と結合型の状態の間を移り変わるようになる（化学交換）。このとき、結合型リガンドのプロトンシグナルは著しくブロードになり強度も低く検出できないが、解離型リガンドのプロトンシグナルは過剰に加えていることもあり明瞭に区別して観測できる。ここで、解離型と結合型の間の交換がある程度速ければ、解離型リガンドのシグナルは蛋白質非存在下の時に比べてややブロードになり、解離型リガンドのシグナルに結合状態の影響があらわれるようになる。すなわち、結合型での交差緩和が解離型での交差緩和および他の緩和より圧倒的に速いために、それが系全体において実質的に支配な緩和機構となる。この結果、この系で通常の NOESY スペクトルを測定すると、解離型リガンドのプロトンシグナルの間に結合配座由来の負の NOE のクロスピーク（対角ピークと同符号）を与えるようになる。このように、低分子リガンドに関して解離状態と結合状態が共存し、ある程度速い交換を行っているときには、解離型リガンドのプロトンシグナルを用いて結合配座の NOE 情報を得ることができる。この効果を TRNOE と呼ぶ。

具体的には、1mM の濃度の Val-Trp のサンプルを用意して、サーモライシン非存在下およびサーモライシン存在下（サーモライシンの濃度：0.1mM）において、温度：37℃、混合時間：100ms あるいは 200ms の条件で NOESY スペクトルを測定した。測定の結果、サーモライシン非存在下の Val-Trp の NOESY スペクトルにおいては、Trp のメチレンプロトン間などに小さい正の NOE クロスピークが数個観測されたただけであった。一方、サーモライシン存在下での NOESY スペクトル

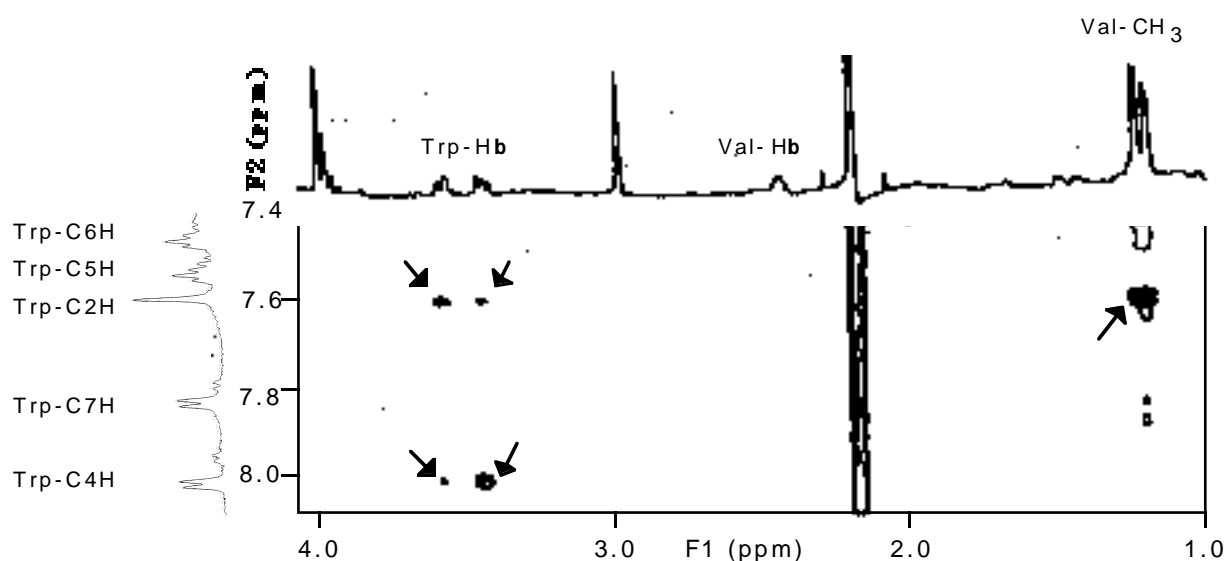


図10 サーモライシン存在下でのNOESYスペクトル
TRNOEを矢印で示す。

を図10に示す。矢印で示されたように、解離型 Val-Trp のプロトンシグナルの間にクロスピークが観測された。これらのクロスピークは、サーモライシン非存在下では観測されなかったものであり、その符号はいずれも対角ピークと同符号で負の NOE であることが確認された。したがって、これら観測されたクロスピークは、Val-Trp の結合配座に関する TRNOE である。これより、例えば、Val-Trp の結合配座において、Val のメチル基と Trp のインドール環の C2 プロトンの距離が少なくとも 5 Å 以下であることが推測される。さらに、図10で観測されたクロスピークの強度を、固定距離を持つ

プロトン間（例えば、メチレンプロトン間の距離は約 1.8 Å）の強度と比較することで、それぞれのプロトン間の距離の上限値をおおよそ見積もることが可能である。図11に、TRNOE の測定の結果得られた Val-Trp の結合配座に関するプロトン間の距離情報をまとめている。全部で9個の距離拘束条件が得られた。

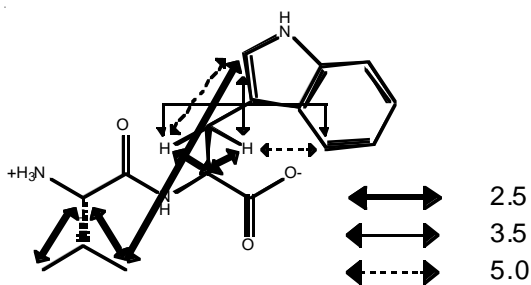


図11 TRNOE測定より得られた結合配座に関する距離拘束情報

高温分子動力学計算によるリガンド化合物の配座解析

Val-Trp の配座解析には、当研究室で開発したプログラム CAMDAS (Conformational Analyzer with Molecular Dynamics And Sampling) を使用した¹⁵⁾。

CAMDAS の大きな特徴は、リガンド化合物の任意の初期構造を与えるだけで、そのリガンド化合物がエネルギー的にとりうる多数の異なる配座を自動的に生成してくれる点である。また、CAMDAS は真空中の高温分子動力学計算を行うことにより効率的な配座探索を可能にしている。図12に CAMDAS を用いた配座解析の概略を示す。

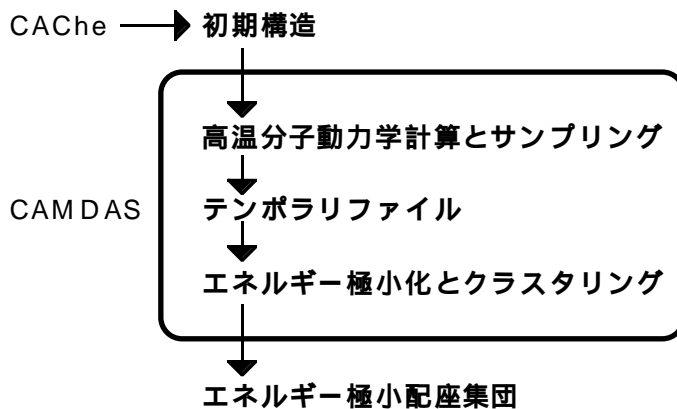


図12 CAMDASを用いた配座解析の概略

- (1) 先ず、CACHe というモデリングソフトを用いて、リガンド化合物の初期構造と分子力場ファイルを構築する。分子力場は MM2¹⁶⁾ およびその拡張力場である。

- (2) 構築した初期構造と分子力場ファイルを CAMDAS に渡すと、CAMDAS は先ず高温分子動力学計算を行い、ある一定時間毎に配座をサンプリングする。サンプリングされた配座は、直前にサンプリングされた配座と比較される。あらかじめ定義した二面角のうち1つでもある指定した閾値以上差があった場合、直前にサンプリングされた配座がテンポラリーファイルに保存され、サンプリングされた配座が次の比較に使用される。これを繰り返すことで、トラジェクトリに沿って、大きな二面角変化が起きた配座を次々にテンポラリーファイルに保存していくことになる。
- (3) CAMDAS は次に、テンポラリーファイルに保存された全配座についてエネルギー極小化を行い、さらに総当たりに比較を行う。これは、高温分子動力学計算中の配座のサンプリングでは、直前にサンプリングされた配座としか比較していないためである。比較にはやはりあらかじめ定義した二面角を使用する。比較された2つの配座の二面角の1つがある指定した閾値以上差がある場合、2つの配座は異なる配座として2つとも出力される。もし差がない場合には、全エネルギー値の低い配座のみが出力される。こうして、最終的に、多数の異なるエネルギー極小配座を得ることができる。

Val-Trp の配座解析で使用した具体的な条件は次の通りである。

[1] 二面角の定義

図 1 3 に示された6 個の二面角を定義した。

[2] 高温分子動力学計算とサンプリングの段階

真空中、静電相互作用項をカット（計算を真空中で行うので分子内相互作用を過剰に評価しないため）、SHAKE、結合角と二面角項の係数を 0.8 に減少、初期構造数：10 個、温度：1200K、トラジェクトリの計算時間：500ps、タイムステップ：1fs、van der Waals 相互作用のためのカットオフ：999、配座のサンプリング時間：100fs 毎、二面角比較の際の閾値：20 度

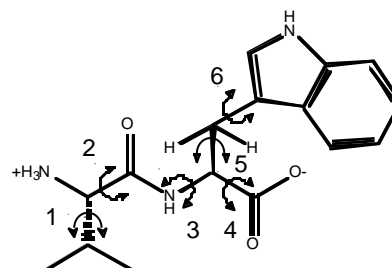


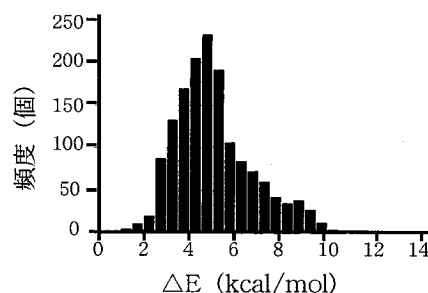
図 1 3 Val-Trp において定義した二面角

[3] エネルギー極小化とクラスタリングの段階

エネルギー極小化終了の基準：0.008 kcal mol⁻¹、
二面角比較の際の閾値：20 度

すなわち、10 個の初期構造に対して、それぞれ 500ps の高温分子動力学計算を行い、計 50000 個の配座をサンプリングした。テンポラリーファイルには 15221 個の配座が保存され、クラスタリングの結果、最終的に 1543 個の異なるエネルギー

極小配座が得られた。図 1 4 に最終的に得られた 1543 個の配座のエネルギー分布を示す（計算されたエネルギーは、結合長、結合角、二面角、面外変角、van der Waals 相互作用である）。



結合配座候補の抽出と X 線構造との比較

TRNOE 測定を行うことにより、Val-Trp の結合配座に関する距離拘束情報を得た（図 1 1）。また Val-Trp の配座解析を行い、全 1543 個の配座を得た（図 1 4）。そこで、全 1543 個の配座の中から距離拘束条件を満足する配座を抽出し、それを結合配座候補とした。その結果、2 個の結合配座候補が選択された。それぞれの最安定配座からの E は、3.15 および 5.40 kcal/mol であった。その 2 個の結合配座候補と答えである X 線解析での結合配座の重ね合わせを図 1 5 に示す。得られた 2 個の結合配座候補のうち 1 つは、答えである X 線解析での結合配座とほとんど同一であることがわかった（図 1 5 A）。

図 1 4 最終的に得られた全1543配座のエネルギー分布
横軸：最安定配座のエネルギーとの差
縦軸：頻度

このように本手法を用いることで、すくなくとも、実際の答えである結合配座を含んだ少数の結合配座候補を決定することができる。さらに、この少数の結合配座候補は、我々が次の段階として考えている CoMFA 解析において、非常に重要な鑄型となる。したがって、本手法は標的蛋白質-リード化合物複合体の立体構造を直接決定できない場合において非常に有効であることが結論できる。

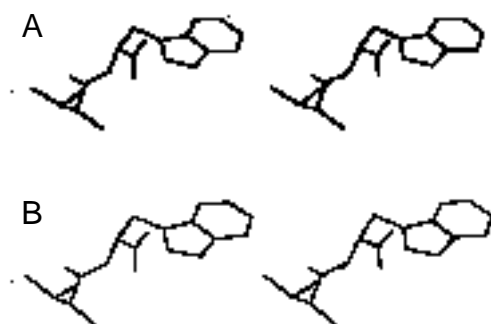


図 1 5 最終的に得られたVal-Trpの結合配座候補（太線）とX線結合構造（細線）の比較
A：最安定配座からの Eが3.15 kcal/molの結合候補配座
B：最安定配座からの Eが5.40 kcal/molの結合候補配座

3 2 . 水溶液中の分子動力学シミュレーションを用いた a-conotoxin MI の NMR 構造の精密化

生命現象を解明するために、ある受容体に特異的に作用する生理活性ペプチドが多数発見され使用されている。このような生理活性ペプチドの溶液構造情報は、生命現象解明のための一助になるだけでなく、新薬の設計を目指すドラッグデザイン

ンの分野においても非常に重要である。α-conotoxin MI は、イモ貝由来のアミノ酸 14 残基からなる神経毒で神経筋接合部に存在するニコチン性アセチルコリン受容体に特異的に作用することが知られている。既に NMR 解析および Simulated Annealing (SA) 計算によりそのおおまかな立体構造が明らかになり、2つのターン構造が存在することが示唆されていた(図16)。しかし、得られた構造の収束がよくないため、その二次構造を特徴づけることはできなかった。

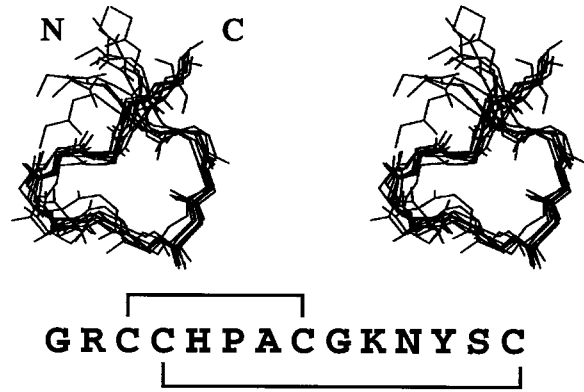


図16 α-conotoxin MIのアミノ酸配列と10個のNMR構造の重ね合わせ主鎖原子のみ表示。

図17に、SA計算が行われたプログラムX-PLORにおいて通常使用されるポテンシャル関数を示す。その大きな特徴は、計算を真空中で行うため、分子内相互作用が過剰にならないように静電相互作用を考慮しないこと、および van der Waals 相互作用は図17Aに示されているような反発項のみを考慮することである。それゆえ、分子の形を決定づけるのはNMR解析により得られた拘束条件のポテンシャル項(図17B)のみである。α-conotoxin MIのNMR解析の場合、得られた拘束条件が48個と少数だった。そのため構造の収束がよくなかったと推測できる。

ところで、SA計算のような真空中での分子動力学計算手法は、前節で紹介し

$$E_{total} = E_{bond} + E_{angle} + E_{dihedral} + E_{improper} + E_{nmr} + E_{vdw}$$

($E_{nmr} = E_{noe} + E_{J-coupling}$)

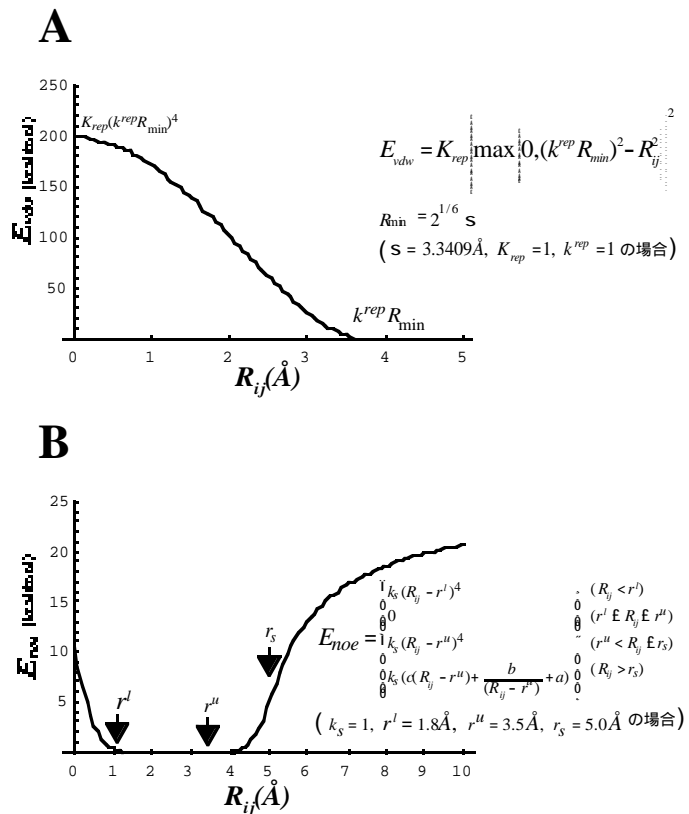


図17 SA計算で使用されるポテンシャル関数
A : van der Waalsポテンシャル関数。
B : NOE由来の距離拘束ポテンシャル関数。

たCAMDASのように配座解析を目的とする場合には非常に効果的で有効であるが、用いられる分子力場の不完全さなどにより真空中の計算で得られた構造が溶液構造を正しく反映しているとは限らない。すでに Lewit らは、真空中と水溶液中でのBPTIの分子動力学計算の比較を行い、より正確な溶液構造を得るには溶媒分子をあらわに含む系、すなわち水溶液中、での分子動力学シミュレーションが必要であることを報告している¹⁷⁾。そこで、通常の静電相互作用および van der Waals 相互作用を含んだ分子力場を用いて水溶液中での分子動力学シミュレーションを行い、 α -conotoxin MI の NMR 構造の精密化を試みた。

計算方法

計算は分子動力学計算プログラム AMBER4.1¹⁸⁾ および分子力場パラメータとして parm94¹⁹⁾ を使用して行った。まず、図 16 の 10 個の NMR 構造の中から SA 計算のポテンシャル関数でエネルギーの低い 3 個を初期構造とした。次に、3 つの初期構造をそれぞれ三次元的な周期性を持った約 3000 分子から成る水の箱に入れた(図 18)。この 3 つの系について、温度：300K、タイムステップ：1fs、静電相互作用のための誘電率：1、第 1 カットオフ：9、第 2 カットオフ：14 の条件下で分子動力学シミュレーションを行った。また、トラジェクトリが NMR で得られた実験情報を満足するように、ハーモニックな形の拘束ポテンシャルを加えた。

シミュレーションの結果

シミュレーションは 3 つの系(以後、MD1、MD2、MD3 とする)についてそれぞれ 650、800、850ps 行った。それぞれの系において、それぞれの初期構造からの主鎖原子に関する RMSD を計算したところ、MD1 では約 150ps 以降、MD2 では約 500ps 以降、MD3 では約 600ps 以降に、収束構造が得られたことがわかった(図 19)。そこで、それぞれのトラジェクトリの最後の 200ps を使用し、シミュレーションの結果得られた 3 つの収束構造とした。図 20 に、シミュレーション

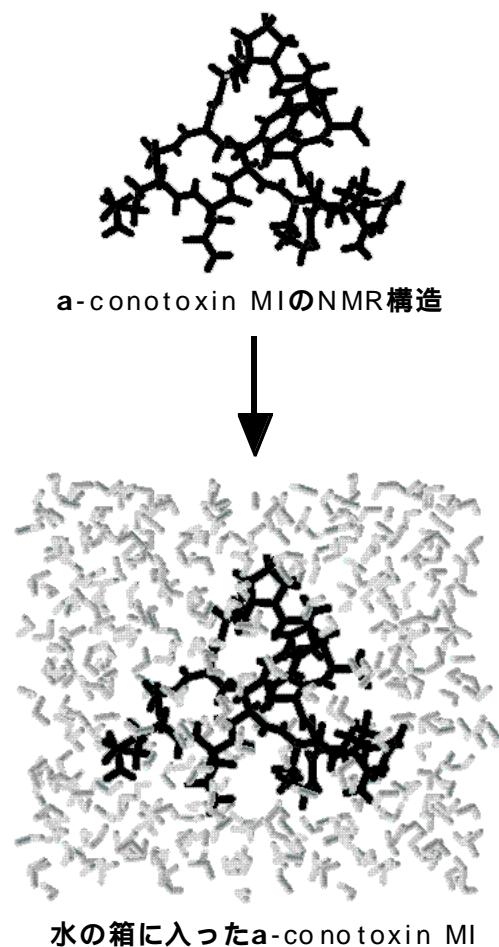


図 18 水溶液中の分子動力学シミュレーションのための系の構築

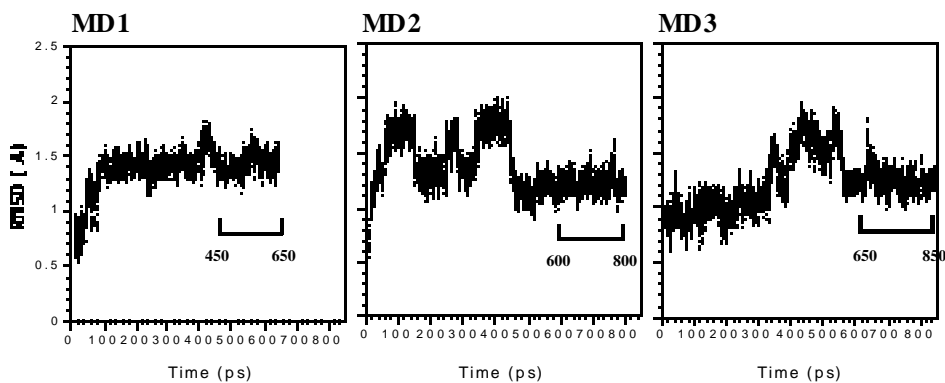


図 1 9 3つのシミュレーションについての初期構造からの RMSDに関する時間プロファイル。Cys3-Cys14の主鎖原子を使用。

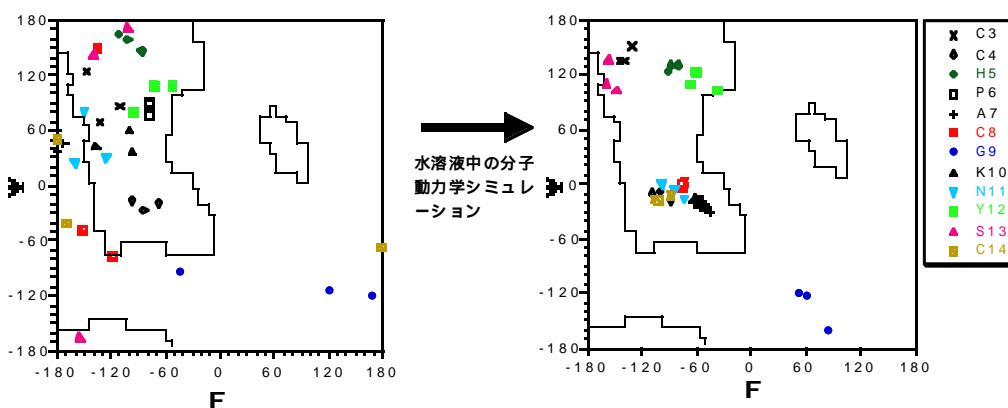


図 2 0 Cys3からTyr12における主鎖二面角のramachandran plot
A : 3つの初期構造。
B : 3つのシミュレーションの最後200psにおける平均値。

前の3つの初期構造(図20A)およびシミュレーションで得られた3つの収束構造(図20B)の主鎖二面角のramachandran plotを示す。図20Aよりわかるように、使用した3つの初期構造ではCys8の主鎖二面角のようにばらばらに分布するものが多数見られる。

しかし水溶液中の分子力学シミュレーションを行った結果、Cys3-Tyr12の領域において3つの初期構造が同一のコンホメーションに収束していることがわかる(図20B)。さらに、図21には、3つのシミュレーションの最後200psの平均構造の重ね合わせ

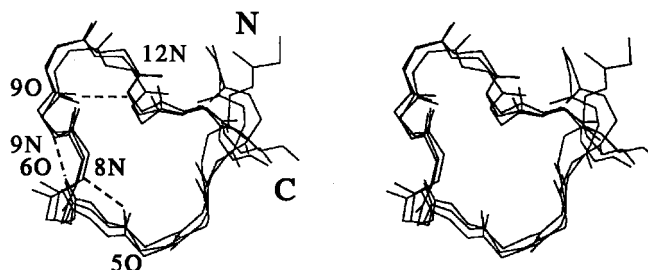


図 2 1 3つのシミュレーションの最後200ps平均構造の重ね合わせ主鎖原子のみ表示。

せを示す。主鎖原子に関する平均 RMSD は 0.78 であり、酸素原子の向きもよく一致していることがわかる。また O(His5)-NH(Cys8)、O(Pro6)-NH(Gly9)、O(Gly9)-NH(Tyr12) の水素結合が 3 つのシミュレーションに共通して観測されることがわかった。以上、3 つの異なる初期構造を使用したシミュレーションがすべてほぼ同一のコンホメーションに収束したので、得られた収束構造は非常に確からしいと考えた。そこで、水溶液中での a-conotoxin MI の立体構造の特徴を明らかにした。すなわち、主鎖二面角の値と観測された水素結合情報により、Pro6-Cys8 の領域が 3(10)-ヘリックスで、Gly9-Tyr12 領域はタイプ I 型 b-ターンで記述できることがわかった²⁰⁾。また最近、a-conotoxin MI の仲間である a-conotoxin GI の X 線構造²¹⁾ が報告された。それによると、a-conotoxin GI の X 線構造はシミュレーションで得られた a-conotoxin MI の構造と対応する領域において全く同一のコンホメーションをとっている。このことも、a-conotoxin MI の溶液構造に関して、シミュレーションの結果が妥当であることを示唆している。

このように、水溶液中の分子動力学シミュレーションを行うことにより、真空中の SA 計算で得られた NMR 構造を精密化できた。したがって、より確からしい溶液構造を得るために水溶液中の分子動力学シミュレーションが非常に有効であることがわかる。また近年、水溶液中の分子動力学シミュレーションを用いた蛋白質のダイナミクスおよび水和構造の研究がさかんに行われるようになってきている。今後さらに、NMR 構造あるいは X 線構造を初期構造とした水溶液中の分子動力学シミュレーションの重要性が増すであろう。

4 . 参考文献

- 1) 上田顯 : " コンピュータシミュレーション " (1990)、(朝倉書店)
- 2) 田中實、山本良一編 " 計算物理学と計算化学 " (1988)、(海文堂出版)
- 3) M.P.Allen, D.J.Tildesley : "**Computer Simulation of Liquids**" (1987), (Oxford Science Publications)
- 4) W.G.Hoover: 田中實監訳 " フーヴァー分子動力学入門 " (1998)、(共立出版)
- 5) J.A.McCammon,S.C.Harvey : "**Dynamics of proteins and nucleic acids**" (1987), (Cambridge University Press)
- 6) C.L.Brooks III, M.Karplus, B.M.Pettitt : "**PROTEINS:A THEORETICAL PERSPECTIVE OF DYNAMICS,STRUCTURE AND THERMODYNAMICS**" ADVACES IN CHEMICAL PHYSICS VOLUME LXXI (1988) , (John Wiley & Sons, Inc)
- 7) W.F.van Gunsteren, P.K.Weiner ed."**COMPUTER SIMULATION OF BIOMOLECULAR SYSTEMS**" (1989), (ESCOM Science Publishers B.V.)
- 8) K.M.Merz, P.A.Kollman: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5649 (1989)
- 9) D.E.Tronrud, H.M.Holden, B.W.Matthews: *Science*, **235**, 571 (1987)

- 10) S. Hirono, P. A. Kollman: *J.Mol.Biol.*, **212**, 197 (1990)
- 11) S. Hirono, P. A. Kollman: *Protein Engineering*, **4**, 233 (1991)
- 12) G.M. Clore, A.M. Gronenborn: *J. Magn. Reson.*, **48**, 402 (1982)
- 13) G.M. Clore, A.M. Gronenborn: *J. Magn. Reson.*, **53**, 423 (1983)
- 14) R.D. Cramer III, D.E. Patterson, J.D. Bunce: *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5959 (1988)
- 15) H. Tsujishita, S. Hirono: *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **11**, 305 (1997)
- 16) N.L. Allinger: *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8127 (1977)
- 17) M. Levitt, R. Sharon: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7557 (1988)
- 18) D.A. Pearlman, D.A. Case, J.W. Caldwell, W.S. Ross, T.E. Cheatham III, D.M. Ferguson, G.L. Seibel, U.C. Singh, P.K. Weiner, P.A. Kollman: AMBER 4.1, University of California, San Francisco, 1995.
- 19) W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz Jr, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179 (1995)
- 20) H. Gouda, K. Yamazaki, J. Hasegawa, Y. Kobayashi, Y. Nishiuchi, S. Sakakibara, S. Hirono: *Biochim. Biophys. Acta* **1343**, 327 (1997)
- 21) L.W. Guddat, J.A. Martin, L. Shan, A.B. Edmundson, W.R. Gray: *Biochemistry* **35**, 11329 (1996)