

Class II/III CPD光回復酵素の電子移動反応の理論研究

¹JSTさきがけ, ²筑波大・計算セ, ³理研BDR

○鬼頭(西岡)宏任^{1,2}, 原田隆平², 佐藤竜馬³, 重田育照²

Theoretical Study on Electron Transfer Reactions in Class II/III CPD Photolyases

○Hiroataka Kitoh-Nishioka^{1,2}, Ryuhei Harada², Ryuma Sato³, Yasuteru Shigeta²

¹Japan Science and Technology Agency (JST)-PRESTO

²Center for Computational Sciences, University of Tsukuba, Japan

³RIKEN-BDR, Japan

【Abstract】 We study the photoactivation process in a “class III CPD” photolyase termed photolyase-related protein A (PhrA) of *Agrobacterium tumefaciens* by using molecular dynamics (MD) simulations. It has been believed that the photoactivation processes in DNA photolyases and cryptochromes involve the electron transfer (ET) reactions through a conserved triad of tryptophan (W) residues between a fully oxidized flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor and protein surface. Recent X-ray crystal structure analysis revealed that PhrA possesses an alternative W triad in addition to the conserved W triad. Our simulation examines how and whether the alternative W triad works as the ET pathways.

【序】 クリプトクロム・DNA 光回復酵素ファミリー(cryptochrome/photolyase family, CPF)では、補欠分子の FAD が光還元される際、まず FAD と近接するトリプトファン (W)の間でサブピコ秒の電子移動(ET)反応がおこる。次に、最初の電荷分離で生じたホール(正孔)を、遺伝的に高く保存された三つ組トリプトファン(Trp-triad)を使って、蛋白質表面に高速(数百ピコ秒)で移動させ、最終的に細胞液中の還元物質によって還元されると考えられている。一方、Trp-triad を別のアミノ酸に置換した変異株を作成した場合でも、種によっては FAD が光還元され、生体機能も阻害されないことが報告されており、Trp-triad の ET 経路としての役割については未だ不明な部分が多い。

2015 年に X 線結晶構造が報告された[1]アグロバクテリアの photolyase-related protein A (PhrA)は、CPF を大きく 7 つ分類した場合に唯一 X 線結晶構造が解かれていなかった “class III CPD”光回復酵素に属している。PhrA の構造解析から、従来から知られている Trp-triad(W384-W361-W308)とは別の Trp-triad(W384-W318-W367)が、活性中心から蛋白質表面に存在することが分かり、代替の電子移動経路としての役割が注目されている。(図 1 (a)) 本講演では、これら 2 つの Trp-triad が ET 経路としてどのように機能するのか、計算機シミュレーションを用いて解析した結果を報告する。

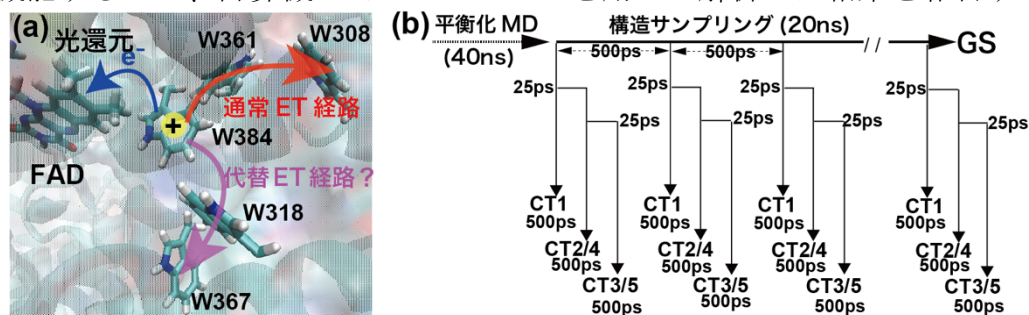


Figure 1 (a) Plausible ETs through two Trp-triads. (b) Simulation protocol for sampling

【方法】 Trp-triad 中の各電子移動(ET)反応を Marcus の速度式(1)を基に解析する。

$$k_{i,j} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} |T_{i,j}|^2 \exp \left[-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_B T} \right] \quad (1)$$

酸化還元中心の電荷状態が、FAD-W neutral、FAD⁻·-W384⁺、FAD⁻·-W361⁺、FAD⁻·-W308⁺、FAD⁻·-W318⁺、FAD⁻·-W367⁺の場合をそれぞれ、GS、CT1、CT2、CT3、CT4、CT5 と呼ぶ。また、W384-W361 間、W361-W308 間、W384-W318 間、W318-W367 間の電子移動を ET12, ET23, ET14, ET45 と名付ける。

式(1)中の自由エネルギーギャップ(ΔG)と再配置エネルギー(λ)は、電子移動による分極変化に対する線形応答を仮定すると、分子動力学(MD)シミュレーションから得られるエネルギーギャップの揺らぎのアンサンブルから以下の式(2)(3)を使って評価することができる。[2,3]

$$\Delta G = \frac{1}{2} (\langle \Delta E \rangle_i + \langle \Delta E \rangle_j) \quad (2),$$

$$\lambda = \frac{1}{2} (\langle \Delta E \rangle_i - \langle \Delta E \rangle_j) \quad (3)$$

ここで $\langle \Delta E \rangle_x = \langle E_j - E_i \rangle_x$ で、 $\langle \rangle_x$ は電荷状態 x での MD トラジェクトリー上のアンサンブル平均を意味する。 E_i は電荷状態 i での系のポテンシャルエネルギーである。

PhrA 結晶構造を一辺 105 Å の TIP3P water cubic box に配置し、T=300K の NPT アンサンブルで、東工大スパコン TUBAME3.0 上の GPU 版 NAMD プログラムによる MD シミュレーションを実行した。蛋白質には CHARMM36 力場を、FAD の力定数、平衡長パラメータは過去の文献[4]のものを採用し、酸化/還元型 FAD と W カチオンラジカルの電荷は B3LYP/cc-pVDZ 計算から得られた RESP 電荷により決定した。

Trp-triad 中の ET 反応は数百ピコ秒と高速であるため、一部の遅い蛋白質の振動モードは、反応の終了までに緩和しきることができず、光誘起電荷分離直後から凍結されていると考えられる。そのような効果を有効的に取り込むため、文献[3]を参考にし、式(2)(3)で用いる電荷状態(CT1~CT5)のサンプリング構造を図 1(b)で示したように作成した[3]。光誘起電荷分離はサブピコ秒と非常に高速なため、GS の MD トラジェクトリーで代用し、500ps 間隔の 41 点で位置と速度はそのままに、電荷のみを GS から CT1 へと切り替えた。そのため、五つの各電荷状態で 41×500 ps の NPT アンサンブル MD シミュレーションを行ったことになる。

【結果・考察】

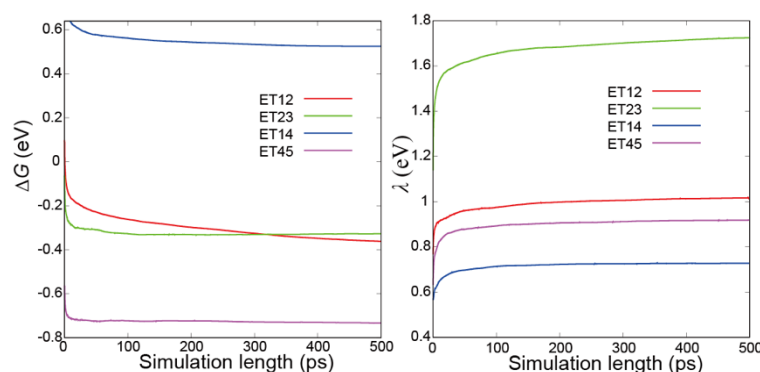


Figure 2 ET parameters of ΔG and λ as a function of simulation length.

シミュレーション時間長に対して ΔG と λ を式(2)(3)を用いて計算し、41 個のトラジェクトリーで平均したものを図(2)にプロットしている。ET12、E23、ET45 では ΔG が負の値を持つ発熱反応になるが、ET14 は ΔG が正の値を持つ吸熱反応になり、代替経路の入り口の ET 反応は起きづらくなっている。両経路とも蛋白質表面に近い ET 反応が、極性の高い水分子から影響を受け大きな λ 値を持つ。また、従来の Trp-triad ET 経路と比べ、代替 Trp-triad ET 経路では λ が小さくなっていることが分かった。

【参考文献】 [1] P. Scheerer *et al.* *J. Biol. Chem.* **290**, 11514 (2015).

[2] G. King and A. Warshel *J. Chem. Phys.* **93**, 8682 (1990).

[3] F. Cailliez *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1904 (2016).

[4] P. L. Freddolino *et al.* *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 1158 (2013).

多階層Elongation構造最適化法による DNAバルジ／ミスマッチ認識分子の効率探索と理論設計

¹九大院総理工, ²サンクトペテルブルク大学, ³阪大・産研
○折本裕一¹, Pomogaeva Anna^{1,2}, 矢野綾香³, 中谷和彦³, 青木百合子¹

Multi-layered elongation optimization method and its application to the molecular design for DNA bulge/mismatch recognition

○Yuuichi Orimoto¹, Anna Pomogaeva^{1,2},
Ayaka Yano³, Kazuhiko Nakatani³, Yuriko Aoki¹
¹ Department of Material Sciences, Faculty of Engineering Sciences,
Kyushu University, Japan
² Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, Russia
³ The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Japan

【Abstract】 Elongation (ELG) method was developed to calculate electronic structures of huge molecules with keeping both linear-scaling efficiency and chemical accuracy. The method was upgraded to perform multi-layered ELG optimization, in which the focused region is calculated at higher level than the other uninterested regions. In this study, the method was applied to the molecular design for DNA bulge/mismatch recognition using DNA model with 31 base pairs. Electronic structures of the DNA model were elongated from both terminals to the central bulge/mismatch region. In the ELG process, regions near both terminals are calculated using small basis set. When the process reaches to the central region including a bulge with recognition molecule, the calculation increases its level by using larger basis set and/or correlation effects, etc. ELG “restart” calculations only for the central region make us possible to very efficient molecular exploration for the bulge/mismatch recognition.

【序】 様々な疾病に関する DNA 特異構造（バルジ／ミスマッチ等）を認識・結合する有機分子が創薬リード化合物として期待されている。認識能を持った有機分子の探索に電子状態を考慮する量子化学計算は有効と考えられるが、系のサイズの 3~4 乗に比例して爆発的に増大する計算コストのため量子化学的手法の本分野への貢献は限定的であり、認識分子探索は専ら実験に依存しているのが現状である。電子論に基づく計算アプローチが実用的になれば、分子探索の高速化とともにミクロレベルの機構解明による革新的創薬も期待できる。本研究では、巨大系の電子状態／安定構造を高速演算可能な当グループ開発の Elongation 構造最適化 (ELG-OPT)法を発展させ、着目領域をそれ以外の領域よりも高精度に演算する多階層

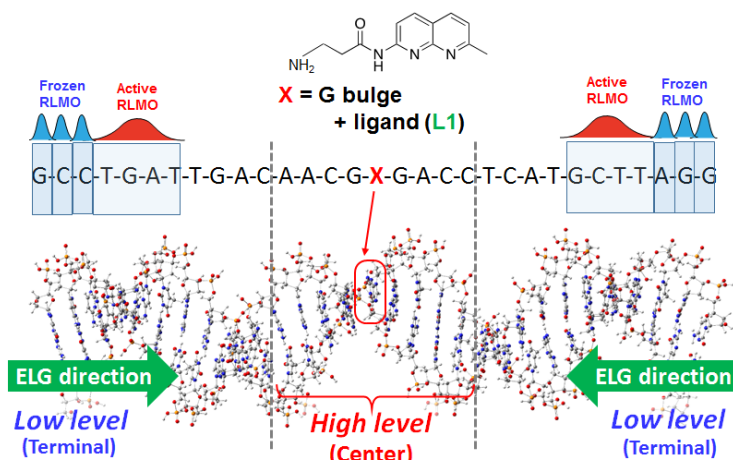


Fig. 1. Multi-layered elongation optimization method.

ELG-OPT 法 (Fig.1) を開発し、バルジ/ミスマッチ塩基認識分子の探索・設計に応用した。

【方法】 Elongation(ELG)法[1-4]は、重合反応を模倣するように反応末端にモノマーを次々と付加させ、反応末端付近のみ固有値問題を解くことで高速計算を可能にする。その際、ユニタリ変換によってモノマーから離れた領域に局在化させた Frozen 領域局在化軌道(RLMO)を固有値問題から外すが、モノマーと Frozen 軌道は相互作用がないため計算精度に影響しない。軌道局在化と部分固有値問題を繰り返すことで高速・高精度に巨大系の電子状態が得られる。今回、巨大系中の着目している重要部位を周囲よりも高精度に取り扱う多階層 ELG 構造最適化(OPT)法を開発し、ナノチューブ表面の局所反応解析 (ポスター発表: 4P112) や DNA 特異構造の認識分子探索への応用を試みている。DNA を例にすると (Fig.1)、本方法ではまずモデル両末端から中央に向かって低計算レベルで ELG 演算を進め、注目しているモデル中央の特異構造付近でより大きな基底関数、電子相関・相対論効果の取り込み等による高計算レベルに切り替わるよう開発を進めた。これにより周囲の正常 DNA 部の電子状態や構造の影響を取り込みつつ着目部分のみ様々なリガンド分子や特異構造に置き換え ELG 計算をリスタートすることで、高精度かつ高効率な認識分子探索が可能となる。

【結果・考察】 多階層 ELG-OPT 法の応用として、31 塩基対からなる DNA 中のグアニンバルジと、リガンド分子としてのナフチリジン誘導体の複合体モデル系に適用した (Fig.2)。第一段階テストとして、系の中心部以外については通常の一方向伸長の ELG-OPT 法で事前に得た最適化構造を用いた 1 点計算で ELG 演算を進め、中央部位に到達したところで

Active 領域の領域局在化軌道を含めた構造最適化を行った (HF/3-21G)。この際、全系で同じ基底関数を用いたが、DNA の別のテスト計算では基底関数の切り替えにも成功している。中央のリガンド分子を様々なナフチリジン誘導体に替え、複合体形成エネルギーを算出した。現時点では小さな基底関数系を用いているため定量的な議論は難しいが、グアニンバルジとの複合体形成エネルギーからバルジ認識能の序列が効率的に得られることが分かった。今後、中央着目部分について分極関数等を含むより大きな基底関数系への切り替え、および電子相関効果等の取り込みによる結果の定量化を目指す。

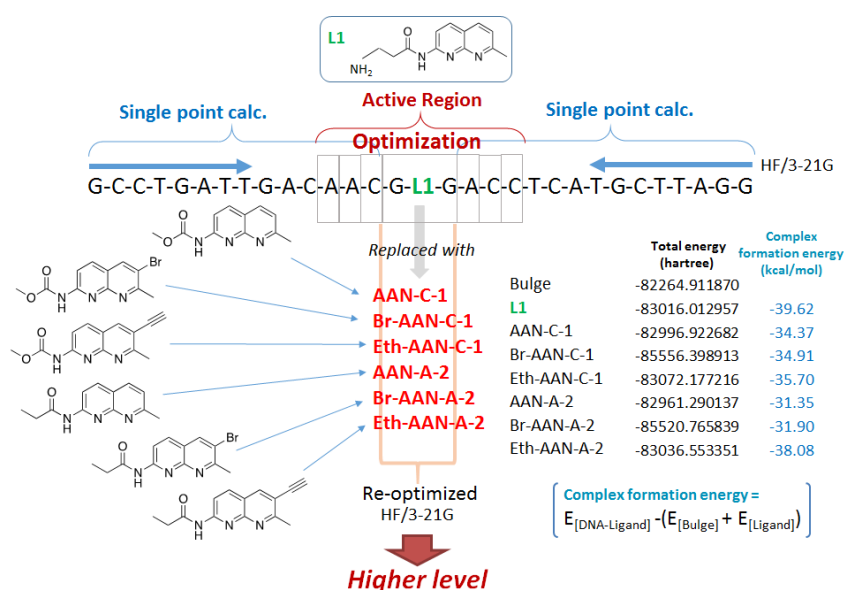


Fig. 2. Molecular exploration for DNA G-bulge recognition.

Active 領域の領域局在化軌道を含めた構造最適化を行った (HF/3-21G)。この際、全系で同じ基底関数を用いたが、DNA の別のテスト計算では基底関数の切り替えにも成功している。中央のリガンド分子を様々なナフチリジン誘導体に替え、複合体形成エネルギーを算出した。現時点では小さな基底関数系を用いているため定量的な議論は難しいが、グアニンバルジとの複合体形成エネルギーからバルジ認識能の序列が効率的に得られることが分かった。今後、中央着目部分について分極関数等を含むより大きな基底関数系への切り替え、および電子相関効果等の取り込みによる結果の定量化を目指す。

【参考文献】

- [1] A. Imamura, Y. Aoki and K. Maekawa, *J. Chem. Phys.*, **95**, 5419 (1991). [2] Y. Aoki and F. L. Gu, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 7640 (2012). [3] F. L. Gu, Y. Aoki, M. Springborg, and B. Kirtman, SPRINGER BRIEFS IN MOLECULAR SCIENCE, ELECTRICAL AND MAGNETIC PROPERTIES OF ATOMS, MOLECULES, AND CLUSTERS, Springer International Publishing, XVI, 93, 2015. [4] Y. Orimoto and Y. Aoki, *J. Chem. Phys.*, **145**, 024107 (2016).

2D05

B型肝炎ウイルスの薬剤の吸収に関する自由エネルギー計算

¹名大院工

○浦野 諒¹, 吉井 範行¹, 篠田 渉¹, 岡崎 進¹

Free energy evaluation of drug absorption on Hepatitis B virus capsid

○Ryo Urano¹, Noriyuki Yoshii¹, Wataru Shinoda¹, Susumu Okazaki¹

¹Department of Materials Chemistry, Nagoya University, Japan

【Abstract】

Hepatitis B virus (HBV) causes liver disease, and drugs for HBV such as entecavir can render the virus inactive. A new and more effective drug is required for HBV treatment to prevent HBV recurrence. For this purpose, researchers have made an effort to understand the fundamental mechanism of drug. For example, they confirmed the entecavir inhibits reverse transcription. On the other hand, molecular understanding for drug and HBV has been developed less. In this work, computer simulation is used to explore the mechanism of how drug interacts with HBV capsid. Using the free energy evaluation, we explore a possible mechanism of efficient drug adsorption into the HBV capsid. Counterion treatment in a charged drug is important for efficiency and accuracy. We will report the results on the day.

【序】

B型肝炎は、世界で年間約100万人近くの死者と、2億人近くの患者を引き起こしている[1]。一方で、この病に対する現在の市販薬では、ウイルスを消滅させる能力はなく、薬剤耐性が起きる前にその活性化がなくなるようにする治療法となっている。そのため、より有効で効果が高く、また薬剤耐性が起きにくい薬の開発が急がれている。現在の薬は、HBVの逆転写を阻害することで増殖を減少させていることがわかっているがその分子メカニズムの違いは不明瞭である。さらに、薬剤毎に必要な摂取量の違いがどのように生じているかなども不明である。そこで、当研究グループでは、コンピュータシミュレーションを用いて、全原子のウイルスシミュレーションを行い、既存薬剤に対する知見を得て、新薬の開発に対する指針を得ることを目標としている。本研究では自由エネルギー計算を行うことで、まずカプシド内と肝細胞内での濃度差を求めることで各薬剤の必要な量がどのように決まっているかを考察することを目的としている。この目的を達成するため、図1のように、移動の自由エネルギー差 $\Delta\Delta G$ を求める必要があるがここでは、 ΔG_1 と ΔG_2 より求める。

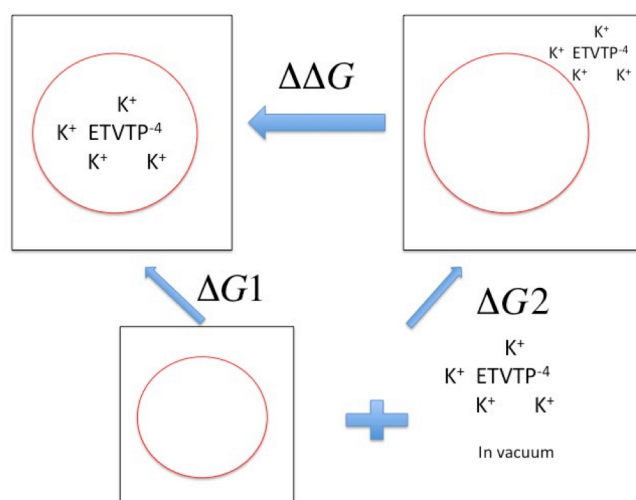


Fig. 1: Transfer free energy of a charged drug (ETV) with 4 counterions (K) from liver cell to capsid core

まず肝細胞水溶液条件中でカプシドが存在しない場合にカウンターイオンに関する取扱いについて複数の方法で求めることで、効率のよい計算過程を検討する。検討後、カプシド全体系(800万原子系)において自由エネルギー計算を行う。

【方法 (実験・理論)】

プログラムパッケージ MODYLAS[2]により、全原子分子動力学法を用いて熱力学積分法により自由エネルギー計算を行う。静電相互作用は高速多重極子展開法(FMM)に荷電系の取扱いを拡張した方法で取り扱っている。そこで用いる方法は homogenous background charge density (BCD)と呼ばれる様な電荷を挿入することで、系から荷電薬剤が抜けた場合の電荷の変化を相殺し、溶媒系を中性化する。

最も単純な計算過程は、一つずつ薬剤とカウンターイオンを引き抜く次の過程である

$$1. (ETVTP + 4K) \xrightarrow{\Delta G_{ETVTP}} ETVTP^{(vac)} + 4K^{solution}$$

$$2. 4K \xrightarrow{\Delta G_{4K}} 1K^{vac} + 3K^{solution}$$

$$3. 3K \xrightarrow{\Delta G_{3K}} 1K^{vac} + 2K^{solution}$$

$$4. 2K \xrightarrow{\Delta G_{2K}} 1K^{vac} + 1K^{solution}$$

$$5. 1K \xrightarrow{\Delta G_{1K}} 1K^{vac} + pure\ solution$$

これらにより

$$\Delta G_2 = \Delta G_{ETVTP} + \Delta G_{4K} + \Delta G_{3K} + \Delta G_{2K} + \Delta G_{1K}$$

と上の結果を与える。

【結果・考察】

実際に上の過程でそれぞれ計算した値が表1に与えられている。このシミュレーションにおいては、各中間状態は 2ns 以内の計算で累積平均が収束しており、最終的に得られた誤差は 4kJ/mol 程度と精度の良い値が得られた。この計算時間と収束精度を基準として他の過程を計算して、比較している。

本手法では、BCD を用いることで、溶質とカウンターイオンを一つずつ引き抜く計算によって、計算過程の1つで上記の精度と収束が達成できた。もう一つのカプシド系の過程において、必要な精度も同程度であり、こちらについては当日に報告する予定である。

Table 1. Free energy of each process calculated in liver cell environment

	ΔG_2	ΔG_{ETVTP}	ΔG_{4K}	ΔG_{3K}	ΔG_{2K}	ΔG_{1K}
[kJ/mol]	3449 ± 4	1774	264	367	470	574

上記の方法は上のように5つの独立な自由エネルギー計算が必要となっており、多くの計算が必要となる。

そのため、荷電溶質とカウンターイオンを同時に引き抜く過程で同等の収束が得られる方法が存在するかを考えている。このような場合に、複数のカウンターイオンの取扱いに関して適切な方法を検討した前例が少ないため、いろいろなやり方を検討する必要がある。これらは今後多くの薬剤の自由エネルギー計算が行われる場合にも興味深い事例となるであろう。

【参考文献】

[1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>

[2] Andoh, Yoshimichi et al. (2013). Journal of Chemical Theory and Computation 9.7, pp. 3201–3209.

インシリコ創薬の手法を用いた 超強力な抗サイトメガロウイルス薬の開発

¹北陸大薬, ²岐阜大工

○藤本和宏¹, 根間大貴¹, 二ノ宮真之², 瀨瀬守², 定成秀貴¹, 武本眞清¹, 大黒徹¹, 村山次哉¹

In silico structure-based design of novel anti-human cytomegalovirus compounds

○Kazuhiro J. Fujimoto¹, Daiki Nema¹, Masayuki Ninomiya², Mamoru Koketsu², Hidetaka Sadanari¹, Masaya Takemoto¹, Tohru Daikoku¹, Tsugiya Murayama¹

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Japan

² Department of Chemistry and Biomolecular Science, Gifu University, Japan

【Abstract】 A novel type of antiviral agent for human cytomegalovirus (HCMV) is required, because the appearance of ganciclovir (GCV) resistant viruses has been reported. Tricin has been shown to suppress HCMV replication. However, its anti-HCMV potency is not greater than that of GCV. We tried to develop novel compounds with much greater anti-HCMV activity than GCV. A molecular docking study predicted that 6F-tricin binds to cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) much stronger than triclin. Based on these results, 6F-tricin was synthesized, and then its anti-HCMV effect was analyzed. As a result, the 50% effective concentration (EC₅₀) of 6F-tricin was 0.126 nM, corresponding to about 1/200 and 1/400 of EC₅₀ of GCV (27.5 nM) and triclin (54.3 nM), respectively. Moreover, 6F-tricin had no cytotoxicity against HEL cells at concentrations up to 10 μM. We also found that the strong binding affinity of 6F-tricin is attributed to its specific binding orientation in the binding site.

【序】 ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は臓器移植患者や免疫不全患者に対して重篤な日和見感染症を引き起こすウイルスである。HCMV に対して最も使用されている薬剤はガンシクロビル (GCV) であるが、近年、GCV 耐性を獲得したウイルスの出現が頻繁に報告されており、GCV とは作用機序の異なる新薬の開発が喫緊の課題となっている。これに対し、イネ科植物、特にクマザサに多く含まれるトリシン (Fig. 1a) は GCV とは異なる作用機序で抗 HCMV 効果を発揮するため、新薬の候補として期待されている。しかしながら、トリシンの抗 HCMV 効果は GCV と比較して低いことが分かっているため、トリシンそのものを抗 HCMV 薬として利用することは適切ではないと考えられる。そこで本研究ではトリシンの構造を改変することによって GCV よりも強力な抗 HCMV 薬を作成することを試みた。

【方法 (実験・理論)】 本研究では人工蜂コロニーアルゴリズムを基盤としたドッキングシミュレーション法 (FIABCps 法[1]) を用いてトリシン誘導体の設計を行った。FIABCps 法は、多くのドッキングシミュレーションソフトで採用されている遺伝的アルゴリズムと比べ、高

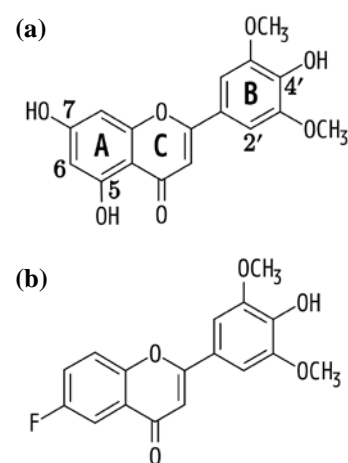


Fig. 1. Chemical structures of (a) triclin and (b) 6F-tricin.

精度でリガンドの結合様式を予測できることが示されている[1]。本研究では、まずトリシンに対してフッ素を導入することで構造の改変を行った。次にデザインしたトリシン誘導体とサイクリン依存性キナーゼ9 (CDK9) とのドッキングシミュレーションを実施し、CDK9 に対する親和性の評価を行った[2]。さらに、ドッキングシミュレーションの結果において結合エネルギー (相互作用) が負に大きなものに対しては100ns の分子動力学 (MD) シミュレーションを実行した。これにより、タンパク質の動き (誘導適合) の効果を考慮した形でリガンドの結合に関する評価を行った。

【結果・考察】 ドッキングシミュレーションの結果、本研究で設計したトリシン誘導体の中で 6F-トリシン (Fig. 1b) の親和性が最も高くなることが予測された[3]。Table 1 に示すように、6F-トリシンの結合エネルギー (-7.04 kcal/mol) はトリシン (-5.77 kcal/mol) よりも負に大きくなることが分かった。また 1000 回のシミュレーションの平均値においても同様の結果が得られた。

これらの計算結果に基づいて、実際に 6F-トリシンの合成を行い、さらに HCMV 感染細胞を用いた評価実験を行った。その結果、6F-トリシンの 50%効果濃度 (EC₅₀) は 0.126 nM であった。またトリシンについても EC₅₀ 測定したところ 54.3 nM であった。したがって、6F-トリシンはトリシンより約 400 倍も強力な抗 HCMV 効果を有することが分かった。さらに GCV についても測定を行ったところ、EC₅₀ は 27.5 nM となった。したがって、6F-トリシンの抗 HCMV 効果は GCV と比べて約 200 倍強いことが明らかとなった。次に 6F-トリシンの細胞毒性に関する評価を行った。その結果、6F-トリシンの濃度を 10 μM まで上昇させても細胞毒性が現れないことが確認できた。以上の結果から、インシリコ創薬の手法を用いて設計された 6F-トリシンは強い抗 HCMV 効果を発揮することが細胞実験で示され、さらに 6F-トリシンの細胞毒性は極めて低いことが分かった。

なぜ 6F-トリシンは CDK9 に対して親和性が高いのかを理解するため、相互作用エネルギーをアミノ酸毎に分割して解析を行った。その結果、Asp167 に対して 6F-トリシンはトリシンよりも強く相互作用していることが分かった。また Lys48 に対する相互作用エネルギーは 6F-トリシンの場合では負の値になるのに対し、トリシンの場合では正の値になることが分かった。次に各リガンドの結合様式を解析したところ (Fig. 2)、結合ポケット中での 6F-トリシンの向きはトリシンとは異なっており、さらに 6F-トリシンと Asp167 の間で形成される特異的な水素結合が相互作用エネルギーの違いを生成していることが分かった。

【参考文献】

- [1] S. Uehara, K. J. Fujimoto, S. Tanaka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 16412-16417 (2015).
 [2] H. Sadanari, K. J. Fujimoto, Y. Sugihara, T. Ishida, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama, *FEBS Open Bio* **8**, 646-654 (2018).
 [3] K. J. Fujimoto, D. Nema, M. Ninomiya, M. Koketsu, H. Sadanari, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama, *Antivir. Res.* **154**, 10-16 (2018).

Table 1. CDK9-ligand binding energies (kcal/mol).

Compound	Lowest value ^a	Mean value ^b
Tricin	-5.77	-5.56
6F-tricin	-7.04	-6.56

^aThe lowest value of the 1,000 runs. ^bMean value calculated with the 1,000 binding energies.

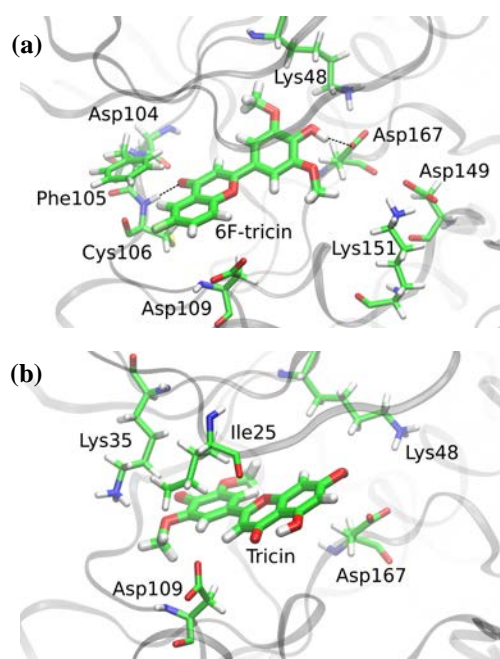


Fig. 2. Binding conformations of (a) 6F-tricin and (b) tricin in the binding site of CDK9.

分子シミュレーションを用いたシトクロムP450 (CYP) に対する薬物代謝部位予測

理研・生命機能科学研究センター

○齋藤大明, 大塚教雄, 沖本憲明, 泰地真弘人

Prediction of sites of drug metabolism by cytochrome P450 by molecular simulation

○Hiroaki Saito, Takao Otsuka, Noriaki Okimoto, Makoto Taiji
RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

【Abstract】 We present a molecular simulation based method to predict sites of metabolism (SOMs) of compounds metabolized by Cytochrome P450s (CYPs). In this method, a new score function composed of accessibility and reactivity of compounds is defined. The accessibility scores for the sites (atoms) of compounds are evaluated by ensemble docking simulation, and the activation energies of the sites (atoms) of compounds estimated from the SAMRTcyp software were used as reactivity scores. In this study, the top three ranked atoms by the score function are defined as possible SOMs for each compound, and the success rates of SOM prediction of the test set compounds for CYP1A2 and CYP3A4 were 94% and 86%, respectively.

【序】 薬物の代謝部位予測は、代謝プロセスにおける分子機構の解明が重要である。特に薬物の代謝酵素（シトクロム P450, CYP）の活性部位への結合性（アクセシビリティ）と代謝反応性（リアクティビティ）の評価は、薬物の代謝部位予測の重要因子である。これら薬物の代謝因子の計算による評価と、これらを用いた代謝部位予測モデルの構築は、インシリコによる創薬支援のための重要課題である。

本研究では、分子シミュレーションを用いて薬物の代謝部位を予測する手法を開発し、その評価を行う。対象 CYP 種は CYP1A2 と CYP3A4 とし、各々の CYP で代謝される化合物セットを用いて代謝部位の予測能を評価する。

【方法】 本研究では、(1) CYP で代謝される化合物セットを用意し、(2) 化合物の CYP 活性部位への結合性（アクセシビリティ）を分子動力学（MD）シミュレーションと分子ドッキング計算を用いて評価する。(3) 化合物の代謝反応性（リアクティビティ）は量子化学ベースの手法により評価する。(4) これら計算によって評価した化合物の結合性と反応性の2つの因子を考慮したスコア関数を用いて化合物中の代謝部位を予測する。

CYP1A2 の X 線構造解析 (PDB ID: 2HI4) [1]からリガンド分子を取り除き、レセプターの周りに水分子を配置させて初期構造を作成した。定温・定圧の長時間 MD 計算を実行し、水溶液中の CYP 構造の多様なサンプリングし、これをドッキングのレセプター構造とした。ヘムの力場は Shahrokh 等が開発した Amber 力場を用い[2], 水分子のモデルは TIP3P を用いた。MD 計算には GROACS5.2.1 を用いた。CYP3A4 の PDB 構造は 1W0E を用い、同様の手順で MD 計算を実行した。化合物のアクセシビリティは、CYP の活性部位における化合物の結合ポーズのサンプリングから評価する。ドッ

キング計算は DOCK6.6 を用い、スコア関数は Grid-Score を用いた。化合物のリアクティビティは SMARTCyp で計算される化合物原子の活性化エネルギー値を用いて評価した[3]。

開発した代謝部位予測法の評価は用意した化合物セットの代謝部位の予測成功率によって評価する。本研究では CYP1A2 の場合に 42 化合物、CYP3A4 は 47 化合物用意した。

【結果・考察】表 1 に本手法を用いて評価された CYP1A2 (42 化合物) と CYP3A4 (47 化合物) で代謝される化合物セットの代謝部位予測の成功率の結果を示す。この表での Top2 及び Top3 予測率は、実験的に既知である代謝部位がスコア上位 2 および 3 位までに予測できた場合の平均正解率である。これらの結果が示すように、CYP1A2, CYP3A4 とともに Top3 までに 9 割程度の精度で化合物の代謝部位を予測する結果が示され、本手法が概ね適切な反応部位を予測できることを確認した。CYP3A4 と CYP1A2 の比較では、CYP3A4 の予測能が若干減少する結果が示された。これは CYP3A4 で代謝される化合物の構造が CYP1A2 に比べて非常に多様である事と、CYP3A4 の結合ポケットが CYP1A2 よりも十分に大きい事に起因すると考える。詳細は当日報告する。

表 1. 化合物セット(CYP1A2: 42 化合物, CYP3A4: 47 化合物)の代謝部位予測率

CYP 分子	Top1	Top2	Top3
CYP1A2	79 %	90 %	94 %
CYP3A4	52 %	85 %	86 %

【参考文献】

- [1] J. Biol. Chem., 282, 14348–14355(2007).
- [2] J. Comput. Chem. 33, 119-33, (2012).
- [3] J. Chem. Inf. Model., 52, 1698–1712, (2012).

謝辞

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の【創薬支援推進事業—創薬支援インフォマティクスシステム構築—】の支援によって行われた。

脂質組成に非対称性をもつモデル脂質二重膜の分子動力学計算

¹分子研 理論・計算, ²名大院工 応物化

○安藤 嘉倫¹, 早川 志保², 岡崎 進²

Molecular Dynamics Calculations of Lipid Bilayers with Asymmetric Lipid Composition between Leaflets

○Yoshimichi Andoh¹, Shiho Hayakawa², Susumu Okazaki²

¹ *Department of Theoretical and Computational Molecular Science, Institute for Molecular Science, Japan*

² *Department of Materials Chemistry, Nagoya University, Japan*

【Abstract】 Recently, we performed all-atomistic molecular dynamics (MD) calculations of two kinds of lipid bilayers which modeled lipid compositions of outer and inner leaflets of plasma membranes of hepatocytes with taking into account difference in lipid composition between them^[1]. Based on the MD results, we constructed model lipid bilayers which have an asymmetric lipid composition explicitly between two monolayers, and carried out long-time MD calculations under a physiological condition. We found that membrane properties differ significantly between outer and inner monolayers in one bilayer. Correlation of membrane properties between leaflets is discussed.

【序】 昨年の討論会において、肝臓細胞の細胞膜を例にその外単層膜と内単層膜の脂質組成をそれぞれ模倣した 2 種類の脂質二重層モデル膜を対象とした分子動力学 (MD) 計算の結果を報告した^[1]。その成果を元に、本研究では外単層膜と内単層膜とで非対称な脂質組成をあらわに持つ脂質二重層モデル膜を構築し、生体温度・圧力条件下での MD 計算を行った。脂質組成に非対称をもつ脂質二重層膜の単層膜間で生じる物性の違い、単層膜間での物性の相関、および特定脂質分子の側方凝集形態の実際を明らかにすることを研究の目的とする。

【計算方法】 昨年肝臓細胞膜の外単層膜および内単層膜それぞれ 2 つからなる二重層モデル膜について温度 310.15K、圧力 1 atm 条件下での MD 計算を行った結果^[1]、脂質 1 分子あたりの平衡膜面積に 25%ほどの違いが生じた。したがってそのまま両者を張合わせた際には隙間が生じてしまったため、膜面積のより小さな外単層膜に対してその脂質種比率を保ちつつ膜面積値が内単層膜と同じになるように脂質分子を追加した。その上で両者を張り合わせ 1 つの二重層膜とした。表 1 には構築したモデル二重層膜の詳細を示す。脂質種としては先行研究^[1,2]と同じくグリセロリン脂質 (PC, PE, PS および PI)、スフィンゴミエリン (SM) およびコレステロールを考慮した。リン脂質についてはその尾部の炭素数、不飽和度およびそれらの割合についても実験値を参考に決定した。計算の基本セル内に 1 つの二重層膜を設置した系 I、および 2 つの二重層膜を向かい合わせに設置した系 II を用意した。系 I については膜の上下に生理食塩水濃度での NaCl 水溶液を、系 II については図 1 にあるように細胞内外でのイオン濃度 (Na⁺, K⁺, Cl⁻) の違いを反映させた電解質水溶液を設置することで細胞内外環境を再現した。三次元周期境界条件のもと NPT 一定条件 (温度 $T=310.15\text{K}$ 、圧力 $P=1\text{ atm}$) での MD 計算を系 I については $1\ \mu\text{ sec}$ 、系 II については $300\ \text{ns}$ 行った。力場などの計算条件の詳細については先行研究^[1]と同じとした。

Table 1. Detail of the lipid bilayers which model hepatocytes' plasma membranes with an asymmetric lipid composition between outer and inner leaflets. Mole fraction values are calculated independently for each leaflet.

	N_{lipid}	Lipid composition / mol%							
		CH	PC	SM	PE	PS	PI	LPC	LPS
Outer leaflet	320	50	23	20	0	0	0	7	0
Inner leaflet	256	30	0	0	36	24	7	0	3

N_{lipid} : number of lipid molecules, CH: cholesterol, PC: phosphatidyl-choline, SM: sphingomyelin, PE: phosphatidyl-ethanolamine, PS: phosphatidyl-serine, PI: phosphatidyl-inositol, LPC: lyso-PC, LPS: lyso-PS.

【結果・考察】 解析は膜構造, 膜の静的および動的物性について行った. 膜垂直方向 (z 軸) に沿った電子密度プロファイル $d_e(z)$ (図 2) の形状がミエリン鞘細胞膜での X 線回折実験での測定値^[3]と定性的に一致すること, 内単層モデル膜は外単層モデル膜に比べ乱れた脂質尾部構造を持つこと, 脂質分子の側方拡散係数が内単層膜でより大きいことなど, 先行研究^[1]で見出された特徴が非対称性をあらわに持った脂質二重層膜でも観測された. 脂質分子重心についての二次元動径分布関数 $g_{2D}(r)$ の解析から, コレステロール分子重心配置の側方相関が同じ単層膜内だけでなく反対の単層膜にもおよんでいることを明らかにした. さらに $g_{2D}(r)$ に第一極小値での r を基準にコレステロール分子間に結合を定義することでコレステロールクラスターの解析を行なった. 結合数密度の二次元マップ (図 3(a), (b)) から内外単層においてコレステロールクラスターの形成が確認され, さらに興味深いことにその形成位置に単層膜間で負の相関があることを明らかにした(図 3(c)). さらなる解析結果をもとに相関の生じるメカニズムについても議論する.

【結言】 本研究により肝臓細胞膜の内外単層モデル膜間での物性の違いについてその実際を明らかにした. 特にコレステロール分子の側方凝集が単層膜間でその発生位置に相関を持ちつつ生じていることを明らかにした.

謝辞: 本研究は **JSPS 科研費 16K21094** の助成を受けたものです.

【参考文献】 [1] 早川, 安藤, 岡崎, 第 11 回分子科学討論会予稿集, **2D13, 3P073** 仙台 (2017). [2] Y. Andoh *et al.* *J. Chem. Phys.* **144**, 085104 (2016). [3] D. L. D. Caspar *et al.* *Nature New Biology.* **231**, 46 (1971).

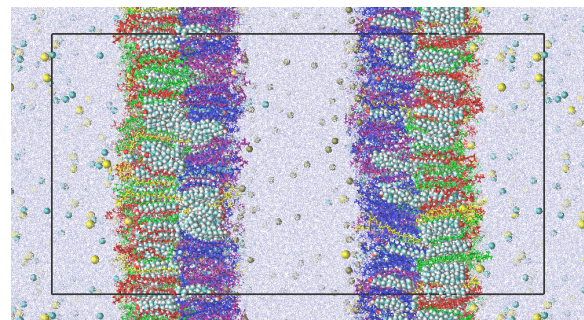


Fig. 1 A unit cell of a MD calculation for the calculation system II. A size of unit cell is 114 x 114 x 213 Å³ on average shown as a solid line.

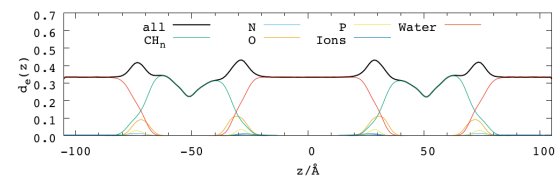


Fig. 2 Calculated number density profile $d_e(z)$ along the z axis in a unit of number of electrons / Å³ for the system II. All (solid thick line), and partial profiles (thin lines) are shown.

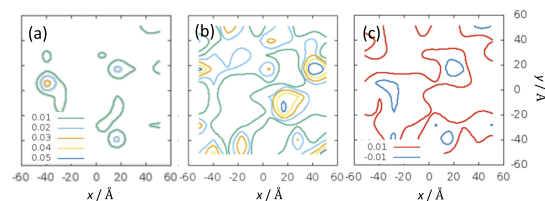


Fig. 3 Calculated two dimensional map of number density of connections between cholesterol molecules within the same monolayer (panels (a) inner, and (b) outer leaflets), and their difference (panel (c)) for the system I.