

# 共溶媒分子動力学における薬剤設計向け共溶媒セットの構築

柳澤 溪甫

東京大学農学生命科学研究科（現：東京工業大学情報理工学院情報工学系）

## 1. はじめに

共溶媒分子動力学 (cosolvent molecular dynamics; CMD) 法はタンパク質の立体構造を用いた薬剤開発 (structure-based drug design; SBDD) において近年利用されつつある手法である。通常、分子動力学 (molecular dynamics; MD) 法では溶媒として水分子を多量に配置した空間の中でシミュレーションを行うが、CMD 法では水に加えて共溶媒 (cosolvent) と呼ばれるごく小さな有機化合物を溶媒として混ぜることで、薬剤標的となるタンパク質の立体構造変化を誘発させたり [1]、あるいは共溶媒分子のタンパク質表面における存在確率を算出し、この結果をタンパク質表面における薬剤結合部位の推定 [2]、薬剤の結合親和性の推定 [3] などに応用している。このようなことから、CMD 法は mixed-solvent MD (MSMD) 法とも呼ばれる。CMD 法は通常短時間 (20-100 ns) のシミュレーションを多数 (10-20 回)、独立に行うことで、共溶媒の初期位置依存性を低減させ、結果の再現性や安定性を高める。これは長時間 (10  $\mu$ s 以上) のシミュレーションを通して事象を解明する場合より並列計算効率が良く、スパコンに適した計算である。

共溶媒の種類は、タンパク質と化合物の結合の要素である水素結合や電荷、芳香性、親水性、疎水性などを考慮して人力で決められてきた。例えば、負電荷をもつ共溶媒として酢酸イオンが、芳香環を持つ共溶媒としてベンゼンやピリミジンが、親水的な共溶媒としてアルコール (イソプロパノール、エタノール、メタノール) がよく用いられる。しかし、これらの選択は極めて恣意的であり、手法間で共通性に乏しいというのが現状である。

そこで本研究では、薬剤設計における CMD 法の共溶媒の選択に一貫性を持たせるため、既知薬剤の部分構造を抽出し、この部分構造を共溶媒とした CMD シミュレーションを実施することで、各共溶媒のシミュレーション中の挙動の類似性を評価し、薬剤設計に特化した共溶媒セットを構築した。なお、本研究は共溶媒セットを構築する手法 **EXPRORER** (**EX**tended **PRO**bes set construction by **RE**presentative **RE**trieval) として Journal of Chemical Information and Modeling 誌に採択、公開済みであり [4]、本稿では概要を記す。詳細は公開済みの論文を参照されたい。

## 2. 共溶媒セットの構築

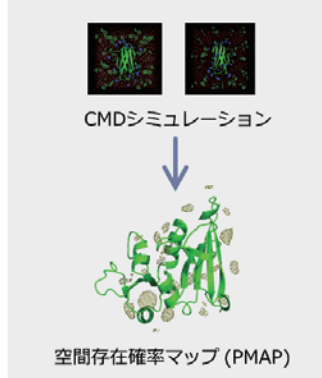
本研究では、I. 共溶媒候補群の作成、II. 網羅的な CMD シミュレーションの実施、III. シミュレーション結果の類似度を用いた代表構造の選出、の3つの手順を通して、創薬に適した共溶媒セットの構築を実施する (図 1)。

**I. 共溶媒候補群の作成**：薬剤に頻出する部分構造を列挙し、共溶媒候補群を作成した。ここでは、ZINC データベース [5] に公開されている FDA (米国食品医薬品局) に承認された 1,615 件の薬剤分子構造を、著者が開発した Spresso [6] の分割手法を用いて部分構造に分割し、5 つ以上の薬剤分子に出現する部分構造を列挙した。このうち、共溶媒として適した性質を持つものをルールベースで抜き出し、最終的に 138 件からなる共溶媒候補群を作成した。

### I. 共溶媒候補群の作成



### II. 候補共溶媒の網羅的CMD



### III. CMD結果を用いた代表構造選出



図1 EXPRORERのワークフロー

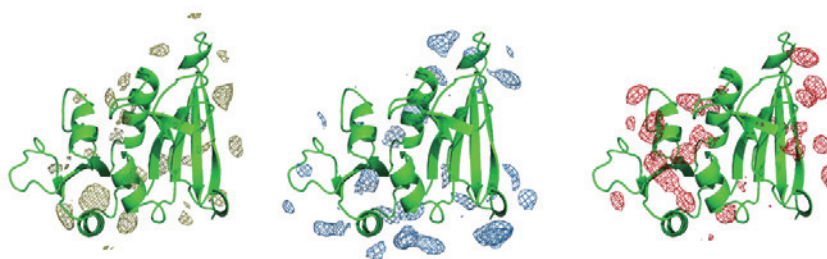


図2 空間存在確率マップ (PMAP) の例

II. 網羅的なCMDシミュレーションの実施：選出した138件からなる共溶媒候補群について、実際に4種のタンパク質を対象としたCMDシミュレーションを実施した。各シミュレーションは20 nsの計算を20回実施したため、1つの共溶媒-タンパク質ペアについて400 nsのCMDシミュレーション、全体としては延べ約220  $\mu$ sのシミュレーションを実施し<sup>1</sup>、それぞれの共溶媒のタンパク質表面における存在確率を計算、空間存在確率マップ (spatial probability distribution map; PMAP) を生成した (図2)。

III. シミュレーション結果の類似度を用いた代表構造の選出：II. で作成したPMAPについて、共溶媒間の類似度を算出し、類似度に基づいて代表構造の選出を行った。この際、類似度の閾値を変化させ、共溶媒10件からなるセット (小セット)、共溶媒18件からなるセット (大セット) をそれぞれ構築した。なお、閾値を自由に変化させることで任意の共溶媒数からなるセットを構築可能である。

### 3. 構築された共溶媒セット

前章に説明した方法によって構築された小セットおよび大セットを図3A、図3Bに示す。先行研究の共溶媒は図3Cに示すように重原子 (水素以外の原子) が6つ以下からなる構造が多い。一方、我々が作成した共溶媒セットには重原子が8つ以上の構造も多数含まれている。分子認識においては単一の相互作用だけではなく、複数の相互作用が同時に行われることが重要であるとされていることから、このような共溶媒を選択することには意義がある。

<sup>1</sup> 東京大学情報基盤センター 若手・女性利用者推薦に基づく計算資源貸与 (Reedbush-H) を受けて一部の計算が実行された。

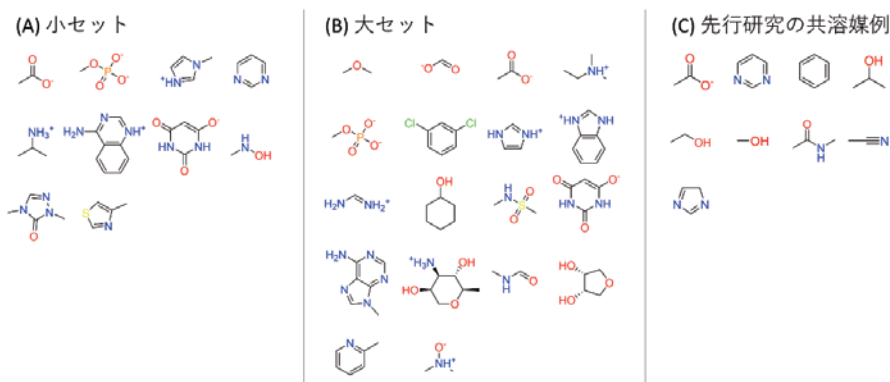


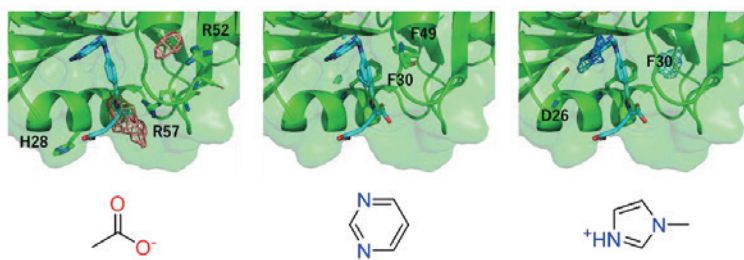
図3 構築された共溶媒セットと先行研究の共溶媒例

また、従来の方法では全く利用されてこなかった2つの共溶媒が選択されていることにも注目したい。すなわち、**双性イオン**（正の形式電荷と負の形式電荷を同時に持つような構造）と**単糖状の構造**である。双性イオンは中性状態と比べてPMAPが大幅に異なることが筆者らの実験により判明しており、新たに用いることで電荷の偏りに適したタンパク質表面を見つけることが期待される。単糖状の構造は従来、環の自由度や多数のヒドロキシ（-OH）基によって初期構造依存性が顕在化しやすいと考えられていた。しかし後述するタンパク質の薬剤結合部位解析の結果から、この構造を用いることで薬剤結合部位をより詳細に発見することができており、このような構造を共溶媒として用いることが重要であることが判明した。

#### 4. 共溶媒セットを用いたタンパク質の薬剤結合部位解析

最後に、本研究で構築した共溶媒セットを用いて、タンパク質の化合物結合部位の解析を実施した。まず、ジヒドロ葉酸還元酵素（dihydrofolate reductase; DHFR）と、その阻害剤であるmethotrexateの結合部位についてみると、構築した共溶媒セットのうち、小セットで結合すべき部分構造を含めて判別できることが分かった（図4A）。一方、DNA ジャイレース B（DNA gyrase B; GyrB）については、阻害剤の単糖状の構造が結合するタンパク質表面に単糖状共溶媒が存在しやすい（図4B）という結果が得られた。このことから、**本研究で提案した共溶媒セットは、単に結合部位を推定するだけではなく、その部位にどのような構造が結合するかまで適切に推定している。**

(A) DHFR



(B) GyrB

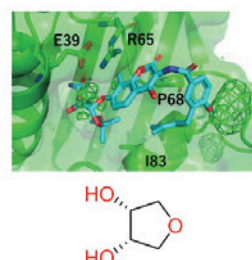


図4 タンパク質の薬剤結合部位解析

(A) ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）の結合部位周辺における、小セットに含まれる3種類の共溶媒のPMAP

(B) DNA ジャイレース（GyrB）の結合部位周辺における、大セットに含まれる単糖状の共溶媒のPMAP

## 5. まとめ

本研究では、薬剤分子構造の部分構造を共溶媒候補として、網羅的な CMD シミュレーションによってシミュレーション結果の類似度を定義、薬剤設計に特化した共溶媒セットを構築した。さらに、その共溶媒セットが薬剤結合部位解析に活用できることを確認した。

薬剤分子に頻出する、毒性を示しにくい部分構造に本研究では着目して解析を行ったが、一方で毒性を持つ部分構造について同様の共溶媒シミュレーションを実施、PMAP を作成し、本研究で用いた部分構造の PMAP との類似度を評価することで、毒性を持つ部分構造の置換を提案することができる可能性がある。このような利用法を含めて、本研究で提案した共溶媒セットを利用した応用例を提案していくことが今後の展望である。

なお、本研究で用いられたコードは <https://github.com/keisuke-yanagisawa/explorer> に GPL v3 ライセンスの下で公開されている。

## 謝 辞

本研究は東京大学情報基盤センター 若手・女性利用者推薦 (『大規模な共溶媒分子動力学シミュレーションによる至適共溶媒セットの構築』)、日本学術振興会 科学研究費 (19J00878, 20K19917)、および日本医療研究開発機構 (AMED) 『創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業』 (20am0101107) の支援を受けて実施された。また、東京大学農学生命科学研究科の清水謙多郎教授、寺田透准教授、森脇由隆助教には、本研究を進める上で極めて多くの助言をいただいた。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

## 参 考 文 献

- [1] Kimura, S. R., et al. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, 57, 1388-1401.
- [2] Ghanakota, P., et al. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, 58, 784-793.
- [3] Ustach, V. D., et al. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, 59, 3018-3035.
- [4] Yanagisawa, K., Moriwaki, Y., Terada, T., Shimizu, K. *J. Chem. Inf. Model.* (Epub ahead of print, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00134)
- [5] Sterling, T.; Irwin, J. J. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, 55, 2324-2337.
- [6] Yanagisawa, K., et al. *Bioinformatics* **2017**, 33, 3836-3843.