

# 博士論文

自由エネルギー変分原理に基づくタンパク質-  
リガンドの相対的な結合自由エネルギーの予測  
(Prediction of Relative Binding Free Energy for  
Protein-Ligand Systems Based on a Free Energy  
Variational Principle)

2020年9月

芦田 剛士

立命館大学審査博士論文

自由エネルギー変分原理に基づくタンパク質-  
リガンドの相対的な結合自由エネルギーの予測  
(Prediction of Relative Binding Free Energy for  
Protein-Ligand Systems Based on a Free Energy  
Variational Principle)

2020年9月

September 2020

芦田 剛士

ASHIDA Takeshi

主査：高橋 卓也教授

Principal referee: Professor TAKAHASHI Takuya

## 略語

FEP : Free Energy Perturbation

MM-PB/SA : Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area

MM-GB/SA : Molecular Mechanics Generalized -Boltzmann Surface Area

GB/SA : Generalized -Boltzmann Surface Area

PB/SA : Poisson-Boltzmann Surface Area

FEVP : Free Energy Variational Principle

LIE : Linier Interaction Energy

FKBP: FK506 Binding Protein

DHFR: Dihydrofolate Reductase

QM : Quantum Mechanics

QM/MM: Quantum Mechanics/Molecular Mechanics

MD : Molecular Dynamics

RMSD : Root Mean Square Deviation

# 目次

|      |                                 |    |
|------|---------------------------------|----|
| 第1章  | 序論 .....                        | 1  |
| 1.1. | <i>in silico</i> を用いた創薬 .....   | 1  |
| 1.2. | 本研究の目的 .....                    | 2  |
| 1.3. | 参考文献 .....                      | 3  |
| 第2章  | FKBP 阻害剤の相対的な結合自由エネルギーの算出 ..... | 6  |
| 2.1. | 緒言 .....                        | 6  |
| 2.2. | 方法 .....                        | 8  |
| 2.3. | 結果 .....                        | 16 |
| 2.4. | 考察 .....                        | 26 |
| 2.5. | 結論 .....                        | 29 |
| 2.6. | 参考文献 .....                      | 30 |
| 第3章  | 新しい相対的な結合自由エネルギーの予測 .....       | 34 |
| 3.1. | 緒言 .....                        | 34 |
| 3.2. | 方法 .....                        | 35 |
| 3.3. | 結果 .....                        | 40 |
| 3.4. | 考察 .....                        | 50 |
| 3.5. | 結論 .....                        | 52 |
| 3.1. | 参考文献 .....                      | 53 |
| 第4章  | 結論 .....                        | 55 |
| 第5章  | 謝辞 .....                        | 56 |
| 第6章  | 公表論文 .....                      | 57 |

## 第1章 序論

### 1.1. *in silico* を用いた創薬

新薬の開発は大きく探索と開発の 2 つのフェーズに分かれる。それぞれのフェーズで物性・薬物動態・安全性・製剤などの評価を行い、数万～数十万の化合物から 1 つの新薬が上市される。開発段階で物性・薬効・安全性に問題があることが分かり、開発を中止することになれば膨大な損失が発生するので、探索段階で物性・薬効・安全性などが十分な化合物を選定することは重要である。また、探索段階で早期に候補化合物を絞り込むことが出来れば、開発期間の短縮と開発コストを下げるのが可能になる。探索では薬物の大元となる化合物を探す創薬のフェーズとそこで見つかった化合物の置換基などを変更して、より薬になる可能性が高い化合物（リード化合物）を作り出す 2 つのフェーズに分かれる。これらのフェーズは従来 *in vivo* や *in vitro* で行われてきたが、コストと時間がかかるため、計算機の発達とともに *in silico* の手法が取り入れられるようになってきた[1-6]。

*in silico* の創薬フェーズでは、ターゲット受容体（タンパク質）と薬剤候補（リガンド）の相互作用（結合自由エネルギー、水素結合、静電相互作用など）を見るために、*structure-based drug design* や *structure-based virtual screening* などの手法が取り入れられ、これらの手法を使って開発された薬剤も複数上市されている[5-6]。リード化合物の最適化のフェーズでは、リード化合物の候補を絞り込むために構造活性相関(QSAR)などの手法が取り入れられている[1]。

*structure-based drug design* や *structure-based virtual screening* などの手法でタンパク質-リガンド間の結合自由エネルギーを求めるには様々な方法がある[6]。従来からある代表的な手法は自由エネルギー摂動法 (FEP 法) である[7]。FEP 法は中間状態のサンプリングが必要であり、計算コストが膨大になるので、多数の候補化合物をスクリーニングするには向いていない[8-10]。FEP 法の問題点を解決するために、中間状態のサンプリングが不要である *One-Step Perturbation* 法が開発された[11]。この手法は、小さな化合物の溶媒和自由エネルギーの計算[12]、化合物の結合自由エネルギーの計算[13-15]、DNA の自由エネルギー計算[16]などに適用されてきた。しかし、計算値と実験値の誤差が大きい問題があった。

中間状態のサンプリングが不要な方法として MM-PB/SA、MM-GB/SA 法が開発され、良

い結果が得られている[17-20]。MM-PB/SA、MM-GB/SA 法は結合自由エネルギーを分子力学エネルギー、溶媒和エネルギー、エントロピーの3つで表す方法で、FEP法とは異なり中間状態のサンプリングが不要なのが特徴である。しかし、一方でエントロピーを求める計算コストが高い点や溶媒和エネルギーを求める際にパラメータ調整を行った方が良い結果が得られると指摘されている[21-23]。

同じく中間状態のサンプリングが不要な方法としてLIE法が開発され、良い結果が得られている[24-27]。LIE法はリガンドが結合した状態と、結合していない状態の静電相互作用とファンデルワールス相互作用の変化を考慮して、結合自由エネルギーを求める方法である[28-29]。FEP法のように中間状態のサンプリングが不要で、またMM-PB/SA、MM-GB/SA法のようにエントロピーを計算する必要が無く、計算コストは非常に少ない。一方、パラメータを決定する際の訓練データの数と種類によって結果が変わる問題が指摘されている[21]。

上記のように *in silico* を用いた創薬が進んできたが、計算コストが大きかったり、またはパラメータ調整が必要だったり、様々なタンパク質や化合物に適用するにはまだ課題がある。

## 1.2. 本研究の目的

計算機の発達に伴い、*in silico* での創薬も一般的になってきたが、代表的な手法で数万から数十万の化合物をスクリーニングする場合、計算コストや経験的パラメータ調整など克服すべき点がある。本研究では従来手法より計算コストを抑え、かつ経験的パラメータ調整が不要な自由エネルギー変分原理(FEVP法)に基づく相対的な結合自由エネルギーの新しい計算方法を提案し、FEP法、MM-PB/SA法、MM-GB/SA法、LIE法などの従来手法との比較を行い、その有用性を検証する。

### 1.3. 参考文献

1. SELASSIE CD (2003) History of Quantitative Structure–Activity Relationships. In: Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. pp 1-96.
2. Åqvist J, Medina C, Samuelsson JE (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein engineering* 7 :385-391.
3. Bohm HJ (1994) The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des* 8:243-256.
4. Apostolakis J, Caflisch A (1999) Computational ligand design. *Comb Chem High Throughput Screen* 2 :91-104.
5. Talele TT, Khedkar SA, Rigby AC (2010) Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. *Curr Top Med Chem* 10 :127-141.
6. Kapetanovic IM (2008) Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chem Biol Interact* 171 :165-176.
7. Reddy MR, Erion MD, Agarwal A (2000) in: K.B. Lipkowitz, D.B. Boyd(Eds.), *Reviews in Computational Chemistry*, vol 16. Wiley-VCH, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ
8. Jayachandran G, Shirts MR, Park S, Pande VS (2006) Parallelized-over-parts computation of absolute binding free energy with docking and molecular dynamics. *J Chem Phys* 125 :084901.
9. Xu Y, Wang R (2006) A computational analysis of the binding affinities of FKBP12 inhibitors using the MM-PB/SA method. *Proteins* 64:1058-1068.
10. Meng Y, Sabri Dashti D, Roitberg AE (2011) Computing Alchemical Free Energy Differences with Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics (H-REMD) Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation* 7:2721-2727.
11. Zwanzig RW (1954) High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J Chem Phys* 22:1420 - 1426.
12. Schäfer H, van Gunsteren WF, Mark AE (1999) Estimating relative free energies from a single ensemble: Hydration free energies. *J Comput Chem* 20 :1604-1617.
13. Oostenbrink BC, Pitera JW, van Lipzig MM, Meerman JH, van Gunsteren WF (2000) Simulations of the estrogen receptor ligand-binding domain: affinity of natural ligands and xenoestrogens. *J Med Chem* 43 :4594-4605.
14. Oostenbrink C, van Gunsteren WF (2004) Free energies of binding of polychlorinated biphenyls to the estrogen receptor from a single simulation. *Proteins* 54 :237-246.
15. Oostenbrink C, van Gunsteren WF (2005) Free energies of ligand binding for structurally diverse

- compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 :6750-6754.
16. Oostenbrink C, van Gunsteren WF (2005) Efficient calculation of many stacking and pairing free energies in DNA from a few molecular dynamics simulations. *Chemistry* 11 :4340-4348.
  17. Genheden S, Ryde U (2015) The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery* 10 :449-461.
  18. Sun H, Li Y, Tian S, Xu L, Hou T (2014) Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 4. Accuracies of MM/PBSA and MM/GBSA methodologies evaluated by various simulation protocols using PDBbind data set. *Phys Chem Chem Phys* 16 :16719-16729.
  19. Maffucci I, Contini A (2016) Improved Computation of Protein-Protein Relative Binding Energies with the Nwat-MMGBSA Method. *Journal of Chemical Information and Modeling* 56 :1692-1704.
  20. Cui YL, Zheng QC, Zhang JL, Xue Q, Wang Y, Zhang HX (2013) Molecular dynamic investigations of the mutational effects on structural characteristics and tunnel geometry in CYP17A1. *J Chem Inf Model* 53 :3308-3317.
  21. Wallnoefer HG, Liedl KR, Fox T (2011) A challenging system: free energy prediction for factor Xa. *Journal of computational chemistry* 32:1743-1752.
  22. Genheden S, Ryde U (2012) Comparison of end-point continuum-solvation methods for the calculation of protein-ligand binding free energies. *Proteins* 80 :1326-1342.
  23. Sun H, Duan L, Chen F, Liu H, Wang Z, Pan P, Zhu F, Zhang JZH, Hou T (2018) Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 7. Entropy effects on the performance of end-point binding free energy calculation approaches. *Physical Chemistry Chemical Physics* 20 :14450-14460.
  24. Wallnoefer HG, Liedl KR, Fox T (2011) A challenging system: free energy prediction for factor Xa. *J Comput Chem* 32 :1743-1752.
  25. Chen SL, Zhao DX, Yang ZZ (2011) An estimation method of binding free energy in terms of ABEEmsigmap/MM and continuum electrostatics fused into LIE method. *J Comput Chem* 32 :338-348.
  26. Valiente PA, Gil A, Batista PR, Caffarena ER, Pons T, Pascutti PG (2010) New parameterization approaches of the LIE method to improve free energy calculations of PlmII-Inhibitors complexes. *J Comput Chem* 31 :2723-2734.
  27. Singh N, Warshel A (2010) Absolute binding free energy calculations: on the accuracy of computational scoring of protein-ligand interactions. *Proteins* 78 :1705-1723.
  28. Åqvist J (1995) Calculation of Absolute Binding Free Energies for Charged Ligands and Effects of Long-Range Electrostatic Interactions. *J Comput Chem* 17 :1587-1597.



29. Åqvist J, Medina C, Samuelsson JE (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng* 7 :385-391.

## 第2章 FKBP 阻害剤の相対的な結合自由エネルギーの算出

### 2.1. 緒言

*in silico* のドラッグデザインにおいて結合自由エネルギーを予測することは重要である。タンパク質とリガンド間の結合自由エネルギーを求める代表的な方法は自由エネルギー摂動法(FEP 法)である[1]。Jayachandran らは[2]FEP 法を用いて、FK506 結合タンパク質(FKBP)において、誤差平均が 1.30 kcal/mol の結果を得たが、200 ns と非常に長いシミュレーションが必要であった。Fujitani らは[3]同じ系で FEP 法を用いて計算を行い、計算時間は 1 ns で rms エラーは 0.40 kcal/mol とよい結果を示したが、結果のスケール変換が必要であった。FEP 法は中間状態のサンプリングが必要なので計算コストが膨大になり、多数の化合物をスクリーニングするには向いていない。

MM-GB/SA、MM-PB/SA 法は様々な用途に使われ、良い結果を収めている[4-17]。MM-GB/SA、MM-PB/SA 法は結合自由エネルギーを分子力学エネルギー、溶媒和自由エネルギー、エントロピーで表す方法である[18]。FEP 法とは異なり中間状態のサンプリングは不要で、リガンド-タンパク質複合体の水を散布したシミュレーションのみで結果を求めることができる。Xu と Wang は[6]MM-PB/SA 法を FKBP に適用して、相関係数が  $r^2=0.92$ 、計算値の標準偏差が 0.30 kcal/mol と良い結果を得た。しかし、エントロピーを求める際の計算コストが高いことと、溶媒和自由エネルギーを求める際のパラメータ調整が重要であることが明らかになった[6]。

LIE 法もタンパク質とリガンドの結合自由エネルギーを計算するのによく用いられる手法である[19-22]。LIE 法はリガンドが結合した状態と、結合していない状態の静電相互作用とファンデルワールス相互作用の変化を考慮して、結合自由エネルギーを求める方法である[23, 24]。Lamb らは[25]LIE 法を FKBP に適用して、誤差平均が 0.50 kcal/mol と良い結果を得たが、Wallnoefer らは[19]訓練データの数と種類によって結果が変わる問題を指摘した。

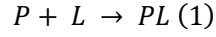
自由エネルギー変分原理は FEP 法のような中間状態のサンプリング、MM-GB/SA、MM-PB/SA 法のようなエントロピー計算や LIE 法のような経験的なパラメータ調整が不要な方法である[26]。Shine らは自由エネルギー変分原理を DHFR 阻害剤に適用し、高い相関係数を得ることができたが、計算値が実験値から大きくずれる問題があった[26]。本章では先行研究[26]より正確な計算方法を確立し、それを FKBP に適用する。また、本手法の有効性を

確認するために MM-GB/SA 法と LIE 法との比較を行う。

## 2.2. 方法

### 自由エネルギー変分原理

リガンドとタンパク質との結合プロセスは以下の式で表せる。



$P$  : タンパク質

$L$  : リガンド

$PL$  : 複合体

結合自由エネルギーは以下の式で表せる。

$$\Delta G_{bind} = G_{PL} - G_P - G_L \quad (2)$$

$G_{PL}$  : 複合体の自由エネルギー

$G_P$  : タンパク質の自由エネルギー

$G_L$  : リガンドの自由エネルギー

自由エネルギー変分原理は下記の式で表される[27]。

$$\langle H_1 - H_0 \rangle_1 \leq G_1 - G_0 \leq \langle H_1 - H_0 \rangle_0 \quad (3)$$

$G_0$  : 非摂動系における自由エネルギー

$H_0$  : 非摂動系におけるハミルトニアン

$G_1$  : 摂動系における自由エネルギー

$H_1$  : 摂動系におけるハミルトニアン

$\langle \rangle_1$  : 摂動系のポテンシャルサーフェイスにおけるアンサンブル平均

$\langle \rangle_0$  : 非摂動系のポテンシャルサーフェイスにおけるアンサンブル平均

2つのリガンドの差異を摂動と見なし、自由エネルギー変分原理を用いて2つのリガンド  $L_0$ 、 $L_1$ の結合自由エネルギーの差を表す。

非摂動系ならびに摂動系の結合自由エネルギーは以下の式で表せる。

$$\Delta G_{bind_{L_0}} = G_{PL_0} - G_P - G_{L_0} \quad (4)$$

$$\Delta G_{bind\_L1} = G_{PL1} - G_p - G_{L1} \quad (5)$$

相対的な結合自由エネルギーは以下の式で表せる。

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{bind} &= \Delta G_{bind\_L1} - \Delta G_{bind\_L0} \\ &= G_{PL1} - G_{PL0} - (G_{L1} - G_{L0}) \quad (6) \end{aligned}$$

ここで自由エネルギー変分原理を適用すると、相対的な結合自由エネルギーに対してハミルトニアンで上限と下限が設定できる。

$$\langle H_{PL1} - H_{PL0} \rangle_{PL1} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L1} \leq \Delta\Delta G_{bind} \leq \langle H_{PL1} - H_{PL0} \rangle_{PL0} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L0} \quad (7)$$

自由エネルギー変分原理は上限と下限の間に真の値が存在することを示すが、その値を直接示すことはできない。そこで、我々は Zwanzig の式[28]の一次項で相対的な結合自由エネルギーを近似した。

$$\Delta\Delta G_{bind} = \frac{1}{2} [\langle H_{PL1} - H_{PL0} \rangle_{PL1} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L1} + \langle H_{PL1} - H_{PL0} \rangle_{PL0} - \langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L0}] \quad (8)$$

### **FKBP のモデル作成**

本章では FK506 結合タンパク質 (FKBP) を対象とした。FK506 は免疫抑制剤の一種で、慢性関節リウマチなど自己免疫、疾患治療薬や臓器移植後の拒絶反応抑制剤、アトピー性皮膚炎の治療薬としてよく用いられる。FK506 から派生した化合物の阻害定数は実験によって多く求められており、今回はその中から 18 個を使用した[29,30] (表 2.1 参照) リガンド 13 が含まれる複合体の結晶構造を鋳型として用いた[30] (PDBID : 1FKG)。1FKG は図 2.1 に示すピペコリルがタンパク質との結合に重要である。1FKG を非摂動系として、残りの 17 個のリガンドを摂動系として Discovery Studio ver2.1(Accelrys Inc.)を使用し、モデリングした。この際に非摂動系との共通の構造は変更せず、異なる部位のみモデリングした。

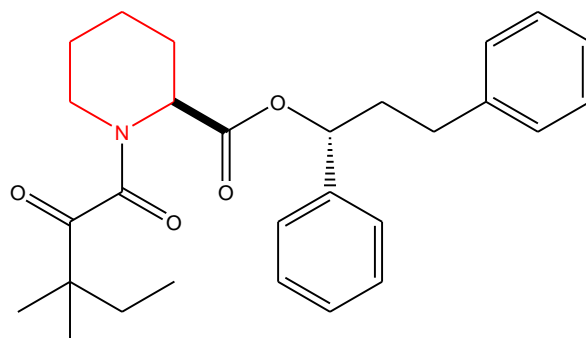
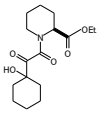
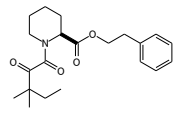
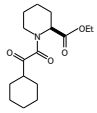
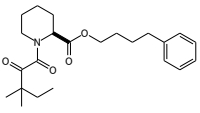
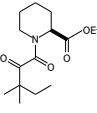
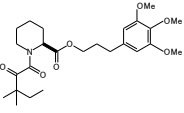
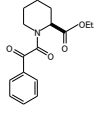
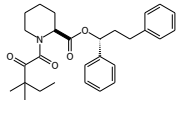
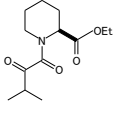
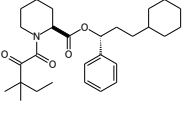
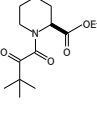
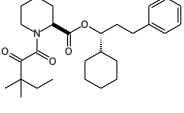
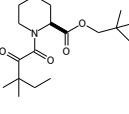
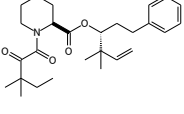
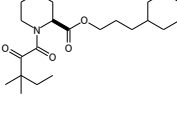
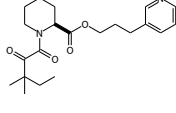
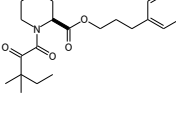
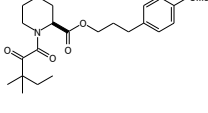


図 2.1 1FKG の含まれるリガンドの構造。赤色で示された部分はピペコリルで、タンパク質との結合に重要な部位である。このピペコリルを重ね合わせて、計算を行った。

リガンドの各種パラメータは `antechamber`[31]を使用して割り振った。リガンドの電荷は AM1-BCC 電荷[32,33]を割り振った。タンパク質には `ff99SB` 力場[34]を適用した。

表 2.1 18 個のリガンドの構造式と阻害定数

| No. | 構造式   | $K_i$ (nM) | No. | 構造式  | $K_i$ (nM) |
|-----|---|------------|-----|--|------------|
| L1  |    | 1600       | L10 |    | 340        |
| L2  |    | 2000       | L11 |    | 100        |
| L3  |    | 660        | L12 |    | 12         |
| L4  |    | 8000       | L13 |    | 10         |
| L5  |   | 6000       | L14 |   | 10         |
| L6  |  | 2000       | L15 |  | 7          |
| L7  |  | 410        | L16 |  | 250        |
| L8  |  | 186        | L17 |  | 165        |
| L9  |  | 110        | L18 |  | 70         |

## MD シミュレーションのプロトコル

全てのシミュレーションで AMBER11[35]を使用した。複合体並びにリガンド単体共に waterbox のマージンは 10 Å に設定した。waterbox の形状は切頂八面体を使用した。溶媒モデルは TIP3P[36]を使用した。複合体ではカウンターイオンとして塩化物イオンを配置した。

まず、2000 ステップの最急降下法と 1000 ステップの共役勾配法の QM/MM[37-39]極小化を 1 セットとして 4 セット行った。極小化の各セットで初期構造を拘束条件としてタンパク質に調和拘束をかけ、その強さを各セットで変化させた。500, 50, 5, 0 kcal/(mol · Å<sup>2</sup>)。リガンドの QM 計算には AM1 ハミルトニアンを使用した。

次に 20 ps で 0-300 K の昇温過程を行い、その後、20 ps の 300 K、1 atm の定温・定圧下で平衡処理を行った。昇温過程と平衡処理ではタンパク質に 20 kcal/(mol · Å<sup>2</sup>)の調和拘束をかけた。最後に 5.2 ns の 300 K、1 atm の NPT シミュレーションを行った。シミュレーションの刻み幅は SHAKE 法[40]を適用して 2 fs にし、長距離静電相互作用は周期境界条件を適用し、Particle Mesh Ewald (PME)法[41]を使用した。カットオフ距離は 8 Å とした。この過程では調和拘束はかけなかった。

リガンド単体のシミュレーションも同様のプロトコルで行ったが、極小化は 1000 ステップの最急降下法と 1000 ステップの共役勾配法を 1 回のみで、全ての過程で調和拘束はかけなかった。

## 自由エネルギー変分原理の計算

相対的な結合自由エネルギーの値を求めるには  $\langle H_{com\_1} - H_{com\_0} \rangle_{com\_0}$ 、 $\langle H_{com\_1} - H_{com\_0} \rangle_{com\_1}$ 、 $\langle H_{lig\_1} - H_{lig\_0} \rangle_{lig\_0}$ 、 $\langle H_{lig\_1} - H_{lig\_0} \rangle_{lig\_1}$  すなわち、摂動系と非摂動系の複合体のハミルトニアン差の非摂動系の複合体のポテンシャルサーフェイスを用いて計算したアンサンブル平均、摂動系と非摂動系の複合体のハミルトニアン差の摂動系の複合体のポテンシャルサーフェイスを用いて計算したアンサンブル平均、摂動系と非摂動系のリガンドのハミルトニアン差の非摂動系のリガンドのポテンシャルサーフェイスを用いて計算したアンサンブル平均、摂動系と非摂動系のリガンドのハミルトニアン差の摂動系のリガンドのポテンシャルサーフェイスを用いて計算したアンサンブル平均を求める必要がある。具体的な操作は以下に示す。



各複合体のシミュレーションから 200-5200 ps の間で 5 ps 間隔ごとに複合体、タンパク質単体、リガンド単体の構造を抽出した。結晶構造であるリガンド 13 を非摂動系として、他の構造を摂動系とした。非摂動系の複合体に含まれるリガンドに摂動系のリガンドを重ね合わせた。重ね合わせる原子は図 2.1 に示す。このピペコリルは結合に重要な部位と報告されている[6]。非摂動系のタンパク質に先ほど重ね合わせた摂動系のリガンドを挿入した。ポテンシャルエネルギーを真空と GB/SA モデルで計算した。GB/SA モデルにおいて、溶質の誘電率は 4、溶媒の誘電率は 80 を用いた。Surface Area の計算には LCPO アルゴリズムを使用し、パラメータはデフォルトの値を用いた。

摂動系と非摂動系の複合体のポテンシャルエネルギー差がリガンド単体のエネルギー差  $\pm 25$  kcal/mol であれば結果として用い、それ以外の範囲であればアンサンブル平均に寄与しないとして、無視した。リガンド単体のエネルギー差  $\pm 25$  kcal/mol の基準は、タンパク質を固定してシミュレーションをかけた際に、非摂動系と摂動系での複合体のポテンシャルエネルギー差のほとんどがこの範囲に収まったからである (図 2.2 参照)。 $|H_{com1} - H_{com0}|$  の差が  $\pm 25$  kcal/mol 以上のものは原子同士の衝突が生じていたり、結合様式が違っていたりすると考えられる。上記の操作を 1000 個の構造に対して行い、 $\langle H_{com1} - H_{com0} \rangle_{com0}$  を算出。同様に  $\langle H_{com1} - H_{com0} \rangle_{com1}$  も算出した。 $\langle H_{lig1} - H_{lig0} \rangle_{lig0}$  ,  $\langle H_{lig1} - H_{lig0} \rangle_{lig1}$  の値は本研究では値が非常に近いと仮定して  $\langle H_{lig1} \rangle_{lig1} - \langle H_{lig0} \rangle_{lig0}$  で近似した。

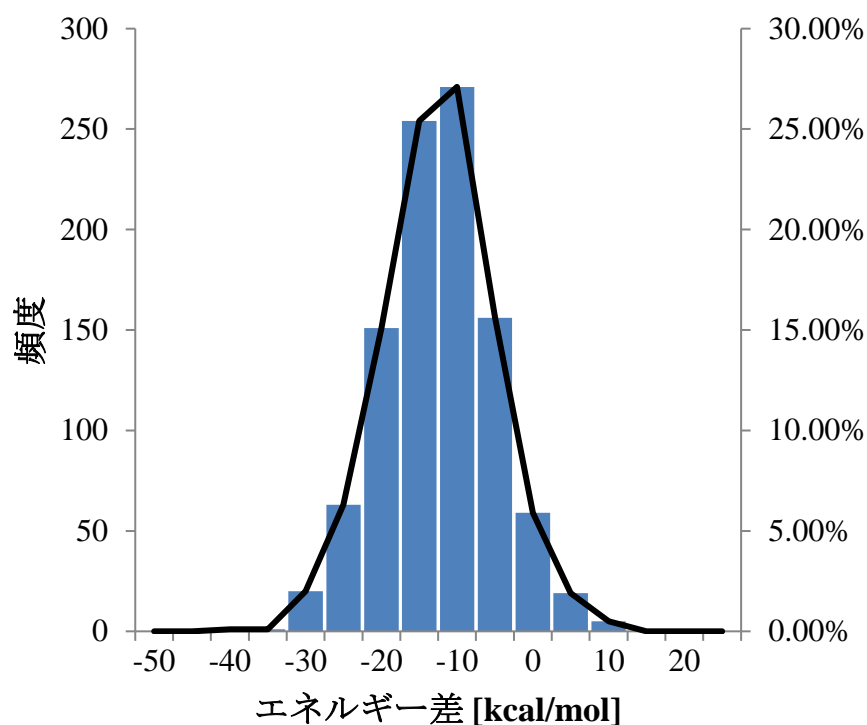


図 2.2 非摂動系リガンド(リガンド 13)と摂動系リガンド(リガンド 1)の複合体のシミュレーション中のポテンシャルエネルギー差のヒストグラム。非摂動系と摂動系のタンパク質の構造を fix した MD シミュレーションのトラジェクトリーからスナップショット抽出し、ポテンシャルエネルギー差を算出した。

### MM-GB/SA 法の計算

MM-GB/SA 法[18]は以下のように要約される

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - (G_{protein} + G_{ligand}) \quad (9)$$

$$G = E_{gas} + G_{sol} - TS \quad (10)$$

$$E_{gas} = E_{bond} + E_{angle} + E_{torsion} + E_{vdw} + E_{ele} \quad (11)$$

$$G_{sol} = G_{GB} + G_S \quad (12)$$

$$G_{SA} = \beta \times SASA + \gamma \quad (13)$$

$G_{complex}$  : 複合体の自由エネルギー

$G_{protein}$  : タンパク質の自由エネルギー

$G_{ligand}$  : リガンドの自由エネルギー

$E_{gas}$  : 真空中の力場のポテンシャルエネルギー

$G_{sol}$  : 溶媒和自由エネルギー

$S$  : エントロピー

$G_{GB}$  : 溶媒の静電的寄与

$G_{SA}$  : 溶媒の非静電項寄与

SASA : 溶媒接触可能表面積

MM-GB/SA における  $\beta$  ならびに  $\gamma$  の標準的な値は 0.0072 kcal/(mol  $\cdot$  Å<sup>2</sup>)、0 kcal/mol で、本研究ではその値を用いた。溶質の誘電率は 4、溶媒の誘電率は 80 に設定した。接触可能表面積を求める際のプローブのサイズは 1.4 Å に設定した。エントロピー項は AMBER プログラムの NMODE にて算出した。構造極小化は距離依存型誘電率モデル ( $\epsilon=4r$ ) を使用し、最大サイクル 10000 ステップ、RMSG は 0.1 に設定した。各複合体のシミュレーションから 200-5200 ps の間で 5 ps 間隔ごとに 1000 個の構造を抽出し、計算を行った。

### LIE 法の計算

LIE 法は以下の式で要約できる

$$\Delta G_{bind} = \alpha(\langle V_{vdW} \rangle_{bound} - \langle V_{vdW} \rangle_{free}) + \beta(\langle V_{elec} \rangle_{bound} - \langle V_{elec} \rangle_{free}) + \gamma \quad (14)$$

$\langle V_{vdW} \rangle_{bound}$  : 結合状態のファンデルワールスエネルギーのアンサンブル平均

$\langle V_{vdW} \rangle_{free}$  : リガンド単体のファンデルワールスエネルギーのアンサンブル平均

$\langle V_{elec} \rangle_{bound}$  : 結合状態の静電相互作用エネルギーのアンサンブル平均

$\langle V_{elec} \rangle_{free}$  : リガンド単体の静電相互作用エネルギーのアンサンブル平均

各複合体のシミュレーション、各リガンド単体のシミュレーション、それぞれから 200-5200 ps の間で 5 ps 間隔ごとに 1000 個の構造を抽出し、計算を行った。そして、18 個のリガンドを訓練データとして入力し、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の値を決定した。

## 2.3. 結果

### 自由エネルギー変分原理における結果

自由エネルギー変分原理の最終計算時に溶媒モデルを用いなかった場合（真空中）の相対的な結合自由エネルギーの値は表 2.2 に示す。縦軸に実験値を横軸に計算値をプロットした図は図 2.3 に示す。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.78、誤差平均は 1.29 kcal/mol と良い結果を示した。

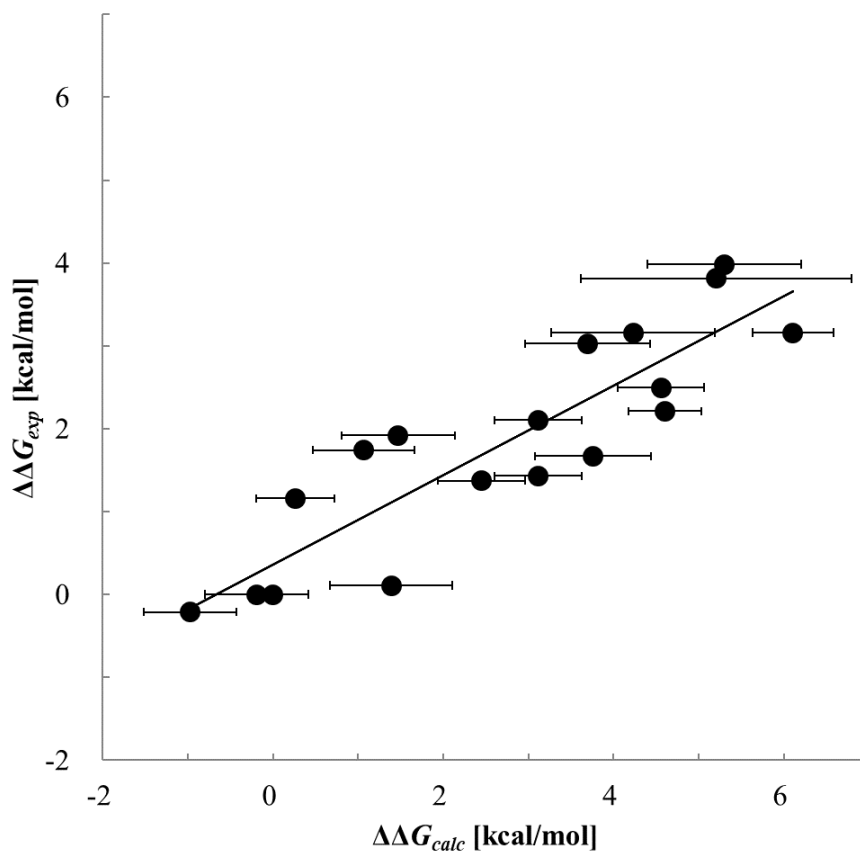


図 2.3 真空中における自由エネルギー変分原理の結果。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数 $r^2$ は 0.78、誤差平均は 1.29 kcal/mol

表 2.2 自由エネルギー変分原理の真空中における結果。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.78、誤差平均は 1.29 kcal/mol

| No. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ | n.s.l. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ | n.s.u. | $\Delta\Delta G_{calc}$ | $\Delta\Delta G_{exp}$ | $\Delta G_{exp}$ | $\Delta\Delta G_{error}$ |
|-----|-------------------------------|--------|-------------------------------|--------|-------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
| L1  | -7.24                         | 47     | 14.63                         | 47     | $3.70 \pm 0.73$         | 3.03                   | -7.96            | 0.67                     |
| L2  | -6.90                         | 20     | 15.37                         | 39     | $4.23 \pm 0.96$         | 3.16                   | -7.82            | 1.07                     |
| L3  | -5.52                         | 117    | 14.63                         | 154    | $4.56 \pm 0.51$         | 2.50                   | -8.48            | 2.06                     |
| L4  | -5.66                         | 36     | 16.26                         | 72     | $5.30 \pm 0.90$         | 3.99                   | -7.00            | 1.32                     |
| L5  | -5.97                         | 11     | 16.38                         | 109    | $5.20 \pm 1.59$         | 3.81                   | -7.17            | 1.39                     |
| L6  | -3.81                         | 156    | 16.02                         | 232    | $6.11 \pm 0.48$         | 3.16                   | -7.82            | 2.95                     |
| L7  | -4.19                         | 221    | 13.40                         | 176    | $4.61 \pm 0.43$         | 2.21                   | -8.77            | 2.39                     |
| L8  | -10.37                        | 87     | 12.50                         | 90     | $1.06 \pm 0.60$         | 1.74                   | -9.24            | 0.68                     |
| L9  | -7.19                         | 135    | 13.41                         | 121    | $3.11 \pm 0.51$         | 1.43                   | -9.55            | 1.68                     |
| L10 | -7.44                         | 100    | 13.66                         | 170    | $3.11 \pm 0.51$         | 2.10                   | -8.88            | 1.01                     |
| L11 | -9.20                         | 111    | 14.09                         | 98     | $2.45 \pm 0.52$         | 1.37                   | -9.61            | 1.07                     |
| L12 | -10.39                        | 58     | 13.16                         | 72     | $1.39 \pm 0.72$         | 0.11                   | -10.87           | 1.28                     |
| L13 | 0.00                          | —      | 0.00                          | —      | 0.00                    | 0.00                   | -10.98           | —                        |
| L14 | -10.36                        | 138    | 9.97                          | 73     | $-0.19 \pm 0.61$        | 0.00                   | -10.98           | 0.19                     |
| L15 | -11.93                        | 81     | 9.98                          | 91     | $-0.97 \pm 0.54$        | -0.21                  | -11.19           | 0.76                     |
| L16 | -10.64                        | 133    | 13.57                         | 39     | $1.47 \pm 0.67$         | 1.92                   | -9.06            | 0.45                     |
| L17 | -6.54                         | 82     | 14.05                         | 74     | $3.75 \pm 0.68$         | 1.67                   | -9.31            | 2.08                     |
| L18 | -12.06                        | 84     | 12.58                         | 197    | $0.26 \pm 0.46$         | 1.16                   | -9.82            | 0.90                     |

$\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ : 下限の値

n.s.l. : 下限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ : 上限の値

n.s.u. : 上限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\Delta\Delta G_{calc}$  : 自由エネルギー変分原理に基づいて計算された相対的な結合自由エネルギー。エラーバーはブートストラップ標準偏差から算出した。

$\Delta\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた相対的な結合自由エネルギー

$\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた結合自由エネルギー

$\Delta\Delta G_{error}$  :  $|\Delta\Delta G_{calc} - \Delta\Delta G_{exp}|$

自由エネルギー変分原理の最終計算時に GB/SA を用いた場合の相対的な結合自由エネルギーの値は表 2.3 に示す。縦軸に実験値を横軸に計算値をプロットした図は図 2.4 に示す。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.80、誤差平均は 0.70 kcal/mol と真空中と同程度の結果を示した。

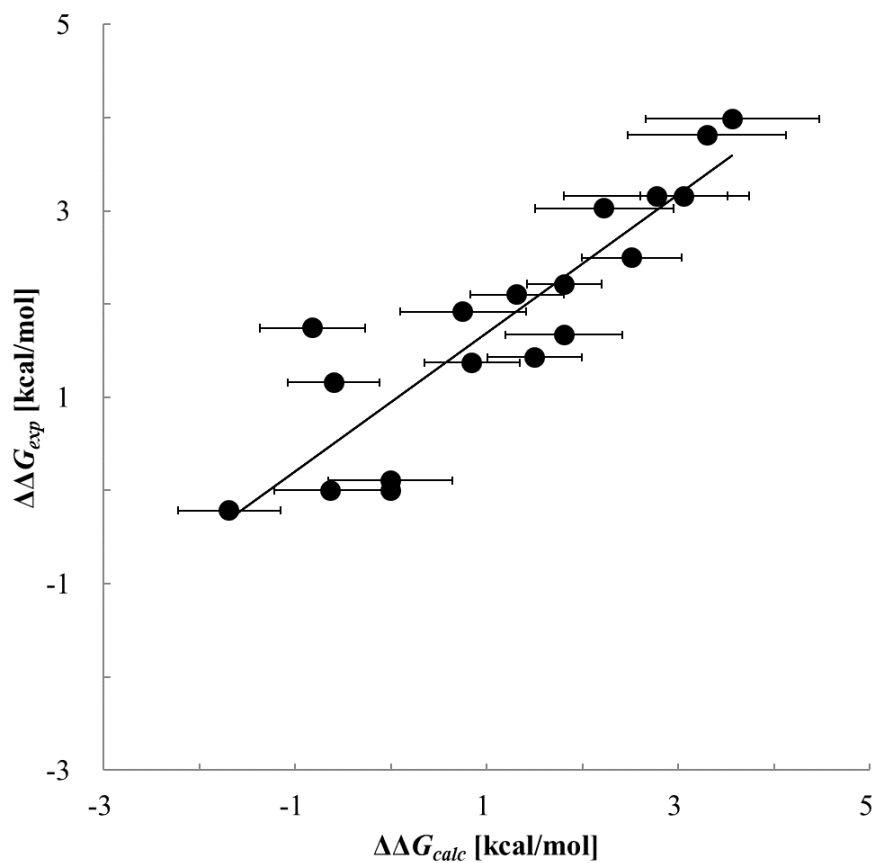


図 2.4 GB 中における自由エネルギー変分原理の結果。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数 $r^2$ は 0.80、誤差平均は 0.70 kcal/mol

表 2.3 自由エネルギー変分原理の GB/SA 中における結果。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.80、誤差平均は 0.70 kcal/mol

| No. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ | n.s.l. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ | n.s.u. | $\Delta\Delta G_{calc}$ | $\Delta\Delta G_{exp}$ | $\Delta G_{exp}$ | $\Delta\Delta G_{error}$ |
|-----|-------------------------------|--------|-------------------------------|--------|-------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
| L1  | -8.54                         | 44     | 12.99                         | 68     | $2.22 \pm 0.72$         | 3.03                   | -7.96            | 0.80                     |
| L2  | -7.29                         | 16     | 12.83                         | 68     | $2.77 \pm 0.97$         | 3.16                   | -7.82            | 0.39                     |
| L3  | -7.49                         | 97     | 12.51                         | 255    | $2.51 \pm 0.52$         | 2.50                   | -8.48            | 0.02                     |
| L4  | -6.67                         | 35     | 13.80                         | 124    | $3.56 \pm 0.91$         | 3.99                   | -7.00            | 0.42                     |
| L5  | -7.30                         | 8      | 13.90                         | 235    | $3.30 \pm 0.83$         | 3.81                   | -7.17            | 0.51                     |
| L6  | -6.46                         | 132    | 12.57                         | 397    | $3.06 \pm 0.45$         | 3.16                   | -7.82            | 0.10                     |
| L7  | -6.90                         | 196    | 10.51                         | 231    | $1.81 \pm 0.39$         | 2.21                   | -8.77            | 0.41                     |
| L8  | -11.99                        | 81     | 10.34                         | 107    | $-0.82 \pm 0.55$        | 1.74                   | -9.24            | 2.56                     |
| L9  | -7.94                         | 122    | 10.94                         | 146    | $1.50 \pm 0.49$         | 1.43                   | -9.55            | 0.07                     |
| L10 | -8.86                         | 84     | 11.48                         | 245    | $1.31 \pm 0.49$         | 2.10                   | -8.88            | 0.79                     |
| L11 | -10.22                        | 92     | 11.91                         | 132    | $0.85 \pm 0.50$         | 1.37                   | -9.61            | 0.53                     |
| L12 | -11.56                        | 60     | 11.55                         | 84     | $-0.01 \pm 0.65$        | 0.11                   | -10.87           | 0.11                     |
| L13 | 0.00                          | —      | 0.00                          | —      | 0.00                    | 0.00                   | -10.98           | —                        |
| L14 | -10.57                        | 129    | 9.30                          | 85     | $-0.63 \pm 0.58$        | 0.00                   | -10.98           | 0.63                     |
| L15 | -11.79                        | 76     | 8.41                          | 95     | $-1.69 \pm 0.53$        | -0.21                  | -11.19           | 1.48                     |
| L16 | -10.71                        | 130    | 12.21                         | 43     | $0.75 \pm 0.66$         | 1.92                   | -9.06            | 1.17                     |
| L17 | -8.07                         | 81     | 11.68                         | 96     | $1.81 \pm 0.61$         | 1.67                   | -9.31            | 0.14                     |
| L18 | -12.41                        | 80     | 11.21                         | 226    | $-0.60 \pm 0.48$        | 1.16                   | -9.82            | 1.76                     |

$\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ : 下限の値

n.s.l. : 下限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ : 上限の値

n.s.u. : 上限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\Delta\Delta G_{calc}$  : 自由エネルギー変分原理に基づいて計算された相対的な結合自由エネルギー。エラーバーはブートストラップ標準偏差から算出した。

$\Delta\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた相対的な結合自由エネルギー

$\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた結合自由エネルギー

$\Delta\Delta G_{error}$  :  $|\Delta\Delta G_{calc} - \Delta\Delta G_{exp}|$

シミュレーション前後での結合様式を確認したが、結合様式は保たれていた。FKBP の結合様式は図 2.5 に示す。真空中ならびに GB/SA 中の両モデルにおいて、全てのリガンドで上限と下限の間に真の相対的な結合自由エネルギー（実験値）が存在することが確認できた。

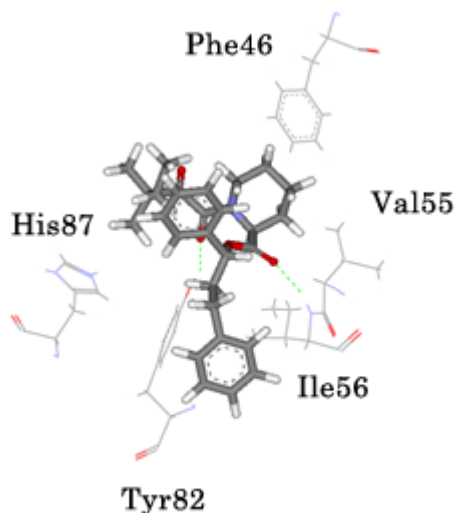


図 2.5 リガンド 13 とタンパク質間の結合様式

### MM-GB/SA 法における結果

MM-GB/SA 法において、計算によって求められた相対的な結合自由エネルギーの値は表 2.4 に示す。縦軸に実験値を横軸に計算値をプロットした図は図 2.6 に示す。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.81、誤差平均は 3.84 kcal/mol となった。相関係数は同程度であったが、誤差平均は自由エネルギー変分原理で求めた結果よりも大きかった。計算コストが大きいエントロピーの計算を省いた場合、実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.71、誤差平均は 5.00 kcal/mol と結果は悪くなった。



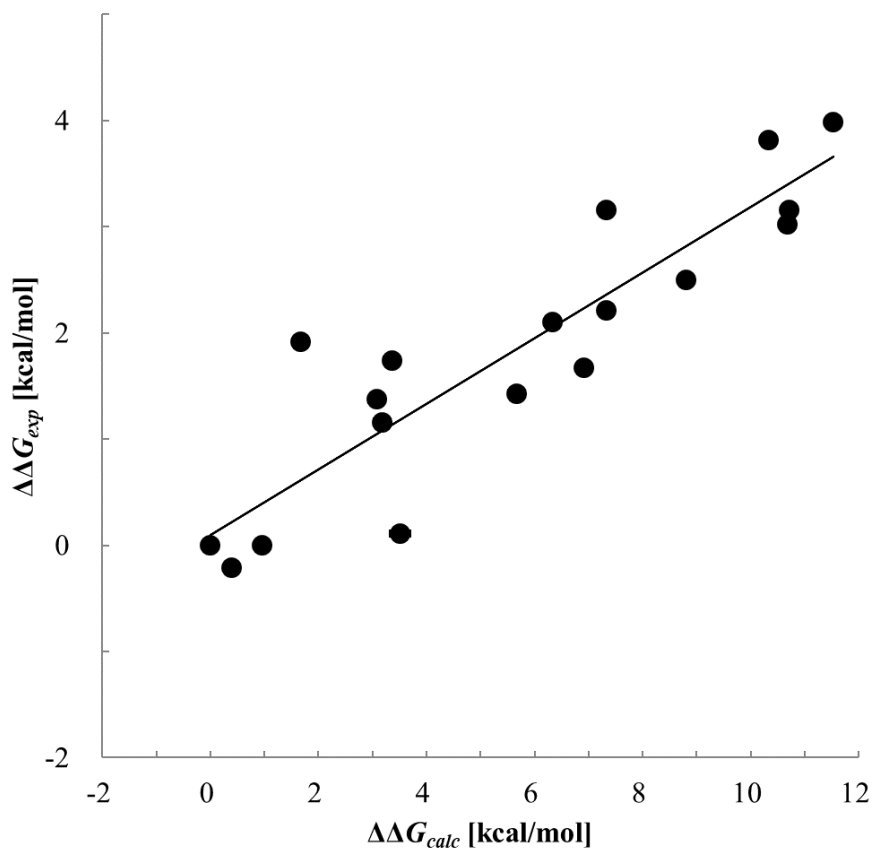


図 2.6 MM-GB/SA 法の結果。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数 $r^2$ は 0.81、誤差平均は 3.84 kcal/mol

表 2.4 MM-GB/SA における結果。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.81、誤差平均は 3.84 kcal/mol

| No. | $\Delta E_{elec}$ | $\Delta E_{vdw}$ | $\Delta G_{GB}$ | $\Delta G_{SA}$ | $\Delta G_{GAS/SOL}$ | $T\Delta S$ | $\Delta G_{calc}$ | $\Delta\Delta G_{calc}$ |
|-----|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------|-------------------|-------------------------|
| L1  | -4.37             | -30.19           | 6.19            | -5.50           | -33.87               | -19.85      | -14.02±0.14       | 10.68                   |
| L2  | -2.90             | -32.58           | 4.98            | -5.75           | -36.25               | -18.89      | -17.36±0.13       | 7.33                    |
| L3  | -4.14             | -29.53           | 5.58            | -5.43           | -33.52               | -17.64      | -15.88±0.15       | 8.81                    |
| L4  | -3.47             | -27.30           | 5.45            | -5.29           | -30.61               | -17.44      | -13.17±0.13       | 11.53                   |
| L5  | -2.89             | -29.28           | 4.86            | -5.43           | -32.74               | -18.38      | -14.36±0.14       | 10.33                   |
| L6  | -3.99             | -27.98           | 5.44            | -5.33           | -31.86               | -17.87      | -13.99±0.15       | 10.71                   |
| L7  | -3.85             | -31.66           | 5.59            | -5.71           | -35.63               | -18.27      | -17.36±0.14       | 7.33                    |
| L8  | -4.11             | -37.31           | 6.04            | -6.38           | -41.76               | -20.42      | -21.34±0.16       | 3.36                    |
| L9  | -4.65             | -36.05           | 6.45            | -6.35           | -40.60               | -21.57      | -19.03±0.15       | 5.67                    |
| L10 | -4.69             | -33.92           | 6.46            | -5.82           | -37.97               | -19.60      | -18.37±0.15       | 6.33                    |
| L11 | -5.29             | -37.59           | 7.12            | -6.36           | -42.12               | -20.50      | -21.62±0.14       | 3.07                    |
| L12 | -5.51             | -38.93           | 7.72            | -6.56           | -43.28               | -22.10      | -21.18±0.19       | 3.51                    |
| L13 | -4.92             | -41.44           | 7.18            | -6.77           | -45.95               | -21.26      | -24.69±0.14       | 0.00                    |
| L14 | -4.51             | -39.71           | 6.54            | -6.79           | -44.47               | -20.73      | -23.74±0.15       | 0.96                    |
| L15 | -4.95             | -39.91           | 6.95            | -6.71           | -44.62               | -20.31      | -24.31±0.15       | 0.39                    |
| L16 | -4.44             | -39.06           | 6.63            | -6.60           | -43.47               | -20.45      | -23.02±0.15       | 1.67                    |
| L17 | -4.31             | -34.00           | 6.33            | -6.06           | -38.04               | -20.26      | -17.78±0.15       | 6.92                    |
| L18 | -4.72             | -39.84           | 7.16            | -6.80           | -44.20               | -22.68      | -21.52±0.16       | 3.17                    |

$$\Delta G_{GAS/SOL} = \Delta E_{elec} + \Delta E_{vdw} + \Delta G_{GB} + \Delta G_{SA}$$

$$\Delta G_{calc} = \Delta G_{GAS/SOL} - T\Delta S$$

$\Delta\Delta G_{calc}$ : 相対的な結合自由エネルギー

## LIE 法における結果

LIE 法において、計算によって求められた相対的な結合自由エネルギーの値は表 2.5 に示す。縦軸に実験値を横軸に計算値をプロットした図は図 2.7 に示す。18 個のリガンドを訓練データとして用いた結果、下記の計算式が算出された。

$$\Delta G_{bind} = 1.81(\langle V_{vdw} \rangle_{bound} - \langle V_{vdw} \rangle_{free}) + 0.38(\langle V_{elec} \rangle_{bound} - \langle V_{elec} \rangle_{free}) + 0.98 \quad (15)$$

実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.81、誤差平均は 0.44 kcal/mol になった。実験値と計算値との誤差平均は自由エネルギー変分原理で求めた結果よりも小さかったが、相関係数は同程度であった。 $\alpha, \beta, \gamma$  のデフォルト値は 0.16, 0.50, 0 であるが、今回最適化したパラメータは 1.81, 0.38, 0.98 とデフォルト値からは大きく異なっている。デフォルト値で計算値を算出した場合、相関係数 $r^2$ は 0.71、誤差平均は 0.54 kcal/mol と結果が悪くなった。

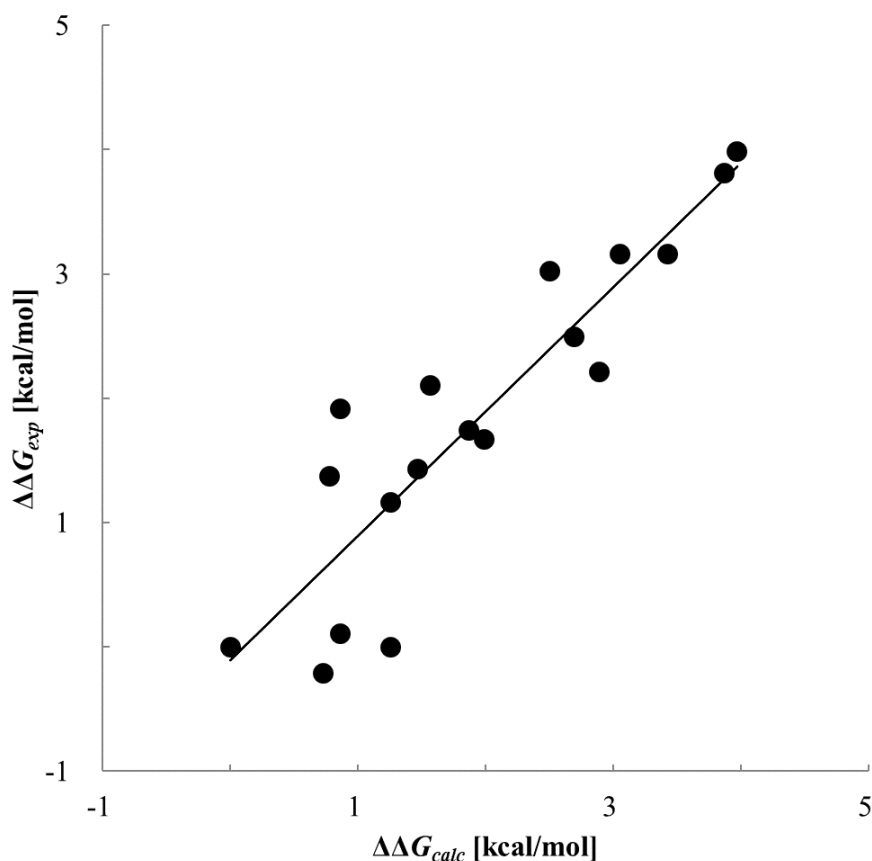


図 2.7 LIE 法における自由エネルギー変分原理の結果。横軸は計算値( $\Delta\Delta G_{calc}$ )、縦軸は実験値( $\Delta\Delta G_{exp}$ )。実値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.81、誤差平均は 0.44 kcal/mol。

表 2.5 LIE 法における結果。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.81、誤差平均は 0.44 kcal/mol

| No. | $\langle E_{vdw} \rangle_{bound}$ | $\langle E_{elec} \rangle_{bound}$ | $\langle E_{vdw} \rangle_{free}$ | $\langle E_{elec} \rangle_{free}$ | $\Delta\Delta G_{LIE}$ | $\Delta\Delta G_{def}$ | $\Delta\Delta G_{exp}$ |
|-----|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| L1  | 14.42                             | -8.38                              | 16.69                            | 6.06                              | $2.50 \pm 0.07$        | $2.88 \pm 0.04$        | 3.03                   |
| L2  | 12.38                             | -10.51                             | 13.93                            | 5.93                              | $3.05 \pm 0.06$        | $1.99 \pm 0.03$        | 3.16                   |
| L3  | 14.09                             | -7.85                              | 16.18                            | 6.96                              | $2.69 \pm 0.06$        | $2.72 \pm 0.04$        | 2.50                   |
| L4  | 13.84                             | -4.92                              | 15.63                            | 7.92                              | $3.97 \pm 0.06$        | $3.76 \pm 0.03$        | 3.99                   |
| L5  | 13.20                             | -9.88                              | 14.67                            | 4.76                              | $3.87 \pm 0.06$        | $2.90 \pm 0.03$        | 3.81                   |
| L6  | 13.90                             | -7.61                              | 15.86                            | 5.88                              | $3.43 \pm 0.06$        | $3.40 \pm 0.03$        | 3.16                   |
| L7  | 14.55                             | -7.37                              | 16.44                            | 7.84                              | $2.89 \pm 0.06$        | $2.55 \pm 0.04$        | 2.21                   |
| L8  | 14.49                             | -8.90                              | 16.52                            | 8.37                              | $1.86 \pm 0.07$        | $1.50 \pm 0.04$        | 1.74                   |
| L9  | 13.95                             | -7.81                              | 16.08                            | 10.04                             | $1.46 \pm 0.06$        | $1.20 \pm 0.04$        | 1.43                   |
| L10 | 14.02                             | -8.16                              | 16.29                            | 8.78                              | $1.56 \pm 0.06$        | $1.63 \pm 0.04$        | 2.10                   |
| L11 | 13.52                             | -8.83                              | 15.99                            | 9.26                              | $0.78 \pm 0.06$        | $1.02 \pm 0.04$        | 1.37                   |
| L12 | 12.65                             | -9.18                              | 15.11                            | 8.73                              | $0.86 \pm 0.07$        | $1.11 \pm 0.05$        | 0.11                   |
| L13 | 13.09                             | -8.87                              | 15.56                            | 11.26                             | 0.00                   | 0.00                   | 0.00                   |
| L14 | 11.51                             | -8.73                              | 13.67                            | 9.51                              | $1.26 \pm 0.07$        | $0.99 \pm 0.04$        | 0.00                   |
| L15 | 13.01                             | -9.03                              | 15.30                            | 10.05                             | $0.73 \pm 0.06$        | $0.56 \pm 0.04$        | -0.21                  |
| L16 | 13.69                             | -8.21                              | 15.81                            | 11.28                             | $0.86 \pm 0.07$        | $0.38 \pm 0.04$        | 1.92                   |
| L17 | 11.58                             | -5.96                              | 13.89                            | 9.65                              | $1.99 \pm 0.07$        | $2.28 \pm 0.04$        | 1.67                   |
| L18 | 11.51                             | -8.73                              | 13.67                            | 9.51                              | $1.26 \pm 0.07$        | $0.99 \pm 0.04$        | 1.16                   |

$\Delta\Delta G_{LIE}$  :  $\alpha = 1.81, \beta = 0.38, \gamma = 0.98$  で算出した相対的な結合自由エネルギー

$\Delta\Delta G_{def}$  :  $\alpha = 0.16, \beta = 0.50, \gamma = 0$  のデフォルト値で算出した相対的な結合自由エネルギー

標準誤差はブートストラップ標準偏差から算出

### 各手法における結果のまとめ

自由エネルギー変分原理、MM-GB/SA 法、LIE 法の結果のまとめは表 2.6 に示す。自由エネルギー変分原理は、相関係数は MM-GB/SA、LIE 法と同程度の結果を示した一方、誤差平均は MM-GB/SA 法よりも良く、LIE 法より若干悪い結果となった。

表 2.6 自由エネルギー変分原理、MM-GB/SA 法、LIE 法の結果のまとめ

| 計算方法        | 相関係数 ( $r^2$ ) | 相対的な結合自由エネルギー(kcal/mol) |
|-------------|----------------|-------------------------|
| FEVP(vac)   | 0.78           | 1.29                    |
| FEVP(GB/SA) | 0.80           | 0.70                    |
| MM-GB/SA    | 0.81           | 3.84                    |
| LIE         | 0.81           | 0.44                    |

## 2.4. 考察

FKBPにおいて、自由エネルギー変分原理に基づく手法は従来の手法と同程度の結果を得ることができた。真の結合自由エネルギーが上限と下限の平均値として近似されるにも関わらず、FKBPでは良い結果を得ることができた。MM-GB/SA法やLIE法は結合自由エネルギー自体を得ることができるが、自由エネルギー変分原理は異なるリガンド間で共通の構造があれば(すなわち摂動の範囲内であれば)相対的な結合自由エネルギーを予測できることを示した。

本手法ではMM-GB/SA法よりも誤差平均が大幅に改善された。その理由としてMM-GB/SAは溶媒和自由エネルギーを求める際にパラメータの設定を慎重に行わなければならないことが挙げられる。本研究のMM-GB/SA法では溶媒和自由エネルギーを求める際のパラメータはデフォルト値を用いた。しかし、デフォルト値では実験値と計算値の誤差が大きい問題があった。XuとWangはFK506結合タンパク質では別の値を用いる方が良い結果を与えると述べた[6]。つまり、MM-GB/SA法でより正確な結果を求めるには、溶媒和自由エネルギーを求める際のパラメータを調整する必要がある。これは様々な系で計算を行うという実用的な観点からは望ましくない。一方で本手法はパラメータの最適化が不要なので、様々な系に適用することが期待されるが、摂動系と非摂動系のリガンドは摂動の範囲内に収まっているかを考慮する必要がある。

LIE法の結果は本手法と同程度の結果となった。本研究ではパラメータをチューニングしたLIE法と標準のパラメータのLIE法では相関係数に差が出た。このように、LIE法はターゲットする系に応じてパラメータをチューニングするのが一般的とされている。一方自由エネルギー変分原理はリガンド挿入後のポテンシャルエネルギーのカットオフが25 kcal/molという部分に依存するが、パラメータをチューニングする必要は無い。

今回の結果をFEP法と比較すると面白い結果が得られた。我々はJayachandranらの結果と比較を行った。相対的な結合自由エネルギーはJayachandranらと我々で共通のリガンド2、3、9、12、13、15で算出し、自由エネルギー変分原理では相関係数 $r^2$ は0.89、誤差平均は0.41 kcal/molとなり、FEP法では相関係数 $r^2$ は0.96、誤差平均0.48 kcal/molと同程度の結果となった。よって、自由エネルギー変分原理はFEP法より少ない計算コストで同程度の結果を得ることができると思われる。

MM-GB/SA 法、LIE 法、自由エネルギー変分原理は MD の結果から 3D 構造をサンプリングして計算を行うのは共通している。しかし、MM-GB/SA 法はエントロピー計算が必要な手法である。一方、LIE 法と自由エネルギー変分原理はリガンド単体の MD シミュレーションが必要である。また、自由エネルギー変分原理はリガンドの入れ替えとエネルギー計算が必要だが、エントロピー計算に比べると計算コストは非常に小さい。リガンド単体の MD シミュレーションはその中間ぐらいの計算コストになる。従って、LIE 法が最も計算コストが少なく、次に自由エネルギー変分原理の計算コストが少ない。

本手法はリガンドの摂動が小さければ、タンパク質の構造はほとんど変化しないことを前提としている。つまり、摂動が大きければ、タンパク質の構造は変化し、リガンドを入れ替えた場合に正確な結果が出ない。構造が非摂動系と摂動系で極端に変わった場合には、リガンドを入れ替えた際に原子衝突が生じ、エネルギーが極端に高くなるので、本手法が適用できるかどうかは判断できる。一方で構造はほとんど変わらないが、静電相互作用や水素結合の状態などの結合様式が変化する場合は、本手法の結果が妥当であるかどうかを慎重に確かめる必要がある。FKBP の結合様式は図 2.5 に示したが、全てのリガンドでこの結合様式は保たれていたが、一方でリガンド 18 ではメトキシ基と ILE56, ALA81, TYR82 間で安定的な相互作用を形成していることが確認できた (図 2.6, 2.7 参照)。その結果、リガンド 18 は実験値に比べて計算値が低く出ていると考えられる。従ってリガンド 18 は非摂動系のリガンド 13 に比べて摂動系の範囲をやや逸脱していると考えられる。

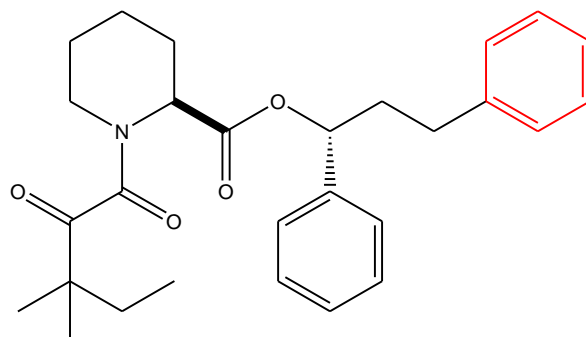


図 2.6 リガンド 13 の構造。赤色で示した部分の RMSF (root mean square fluctuation) は 3.88 Å。

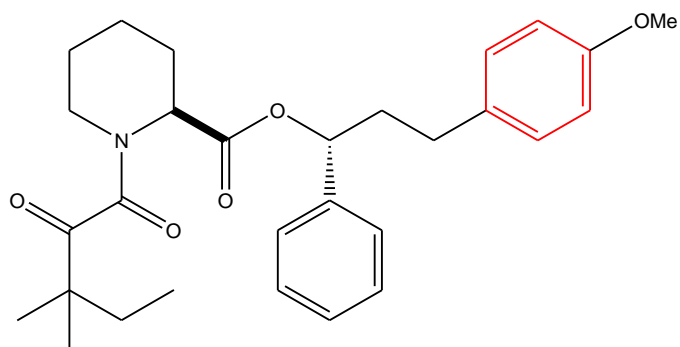


図 2.7 リガンド 18 の構造。赤色で示した部分の RMSF (root mean square fluctuation) は  $3.59 \text{ \AA}$ 。非摂動系に比べ、ベンゼン環の動きが小さい。

本手法は結合様式が同じものでなければ正確な結果を出すことは難しい。しかし、摂動系と非摂動系の結合様式が異なっても、結合様式が同じになるようなリガンドを新たに非摂動系と定義し、再度計算を行えば良い結果が得られるだろう。



## 2.5. 結論

我々は自由エネルギー変分原理に基づく方法を用いて、FKBP の相対的な結合自由エネルギー計算を行った。その結果、真空中では計算値との相関係数  $r^2$  は 0.78、誤差平均は 1.29 kcal/mol、GB/SA 中では実験値と計算値との相関係数  $r^2$  は 0.80、誤差平均は 0.70 kcal/mol という結果が得られた。この結果は MM-GB/SA 法の相関係数  $r^2=0.81$ 、誤差平均 3.84 kcal/mol よりも誤差平均を大幅に縮めることができた。また、本手法ではエントロピー計算が不要であり、計算コストを大幅に抑えることができる。LIE 法の相関係数  $r^2=0.81$ 、誤差平均が 0.44 kcal/mol とは同程度であったものの、LIE 法のように系に応じたパラメータ調整が不要である。本手法は 1 つの阻害剤の結合様式、リガンド間の摂動の範囲が分かっているならば、相対的な結合自由エネルギーを計算することができる。本手法は中間状態のサンプリング、エントロピー計算や経験的なパラメータ調整が不要であるにも関わらず良い結果を示した。一方、上限と下限の差が大きかったり、相対的な結合自由エネルギー算出時のサンプリング数が少なかったりと一部で課題が確認された。

## 2.6. 参考文献

1. Reddy MR, Erion MD, Agarwal A (2000) in: K.B. Lipkowitz, D.B. Boyd (Eds.), *Reviews in Computational Chemistry*, vol 16. Wiley-VCH, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ
2. Jayachandran G, Shirts MR, Park S, Pande VS (2006) Parallelized-over-parts computation of absolute binding free energy with docking and molecular dynamics. *J Chem Phys* 125 :084901
3. Fujitani H, Tanida Y, Ito M, Jayachandran G, Snow CD, Shirts MR, Sorin EJ, Pande VS (2005) Direct calculation of the binding free energies of FKBP ligands. *J Chem Phys* 123 :084108
4. Jena NR (2011) Binding of BIS like and other ligands with the GSK-3beta kinase: a combined docking and MM-PBSA study. *J Mol Model* 18 :631-644.
5. Rastelli G, Del Rio A, Degliesposti G, Sgobba M (2010) Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA. *J Comput Chem* 31 :797-810.
6. Xu Y, Wang R (2006) A computational analysis of the binding affinities of FKBP12 inhibitors using the MM-PB/SA method. *Proteins* 64 :1058-1068.
7. Luo C, Xu L, Zheng S, Luo X, Shen J, Jiang H, Liu X, Zhou M (2005) Computational analysis of molecular basis of 1:1 interactions of NRG-1beta wild-type and variants with ErbB3 and ErbB4. *Proteins* 59 :742-756.
8. Kuhn B, Gerber P, Schulz-Gasch T, Stahl M (2005) Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery. *J Med Chem* 48 :4040-4048.
9. Swanson JM, Henchman RH, McCammon JA (2004) Revisiting free energy calculations: a theoretical connection to MM/PBSA and direct calculation of the association free energy. *Biophys J* 86 :67-74.
10. Gouda H, Kuntz ID, Case DA, Kollman PA (2003) Free energy calculations for theophylline binding to an RNA aptamer: Comparison of MM-PBSA and thermodynamic integration methods. *Biopolymers* 68 :16-34.
11. Fogolari F, Brigo A, Molinari H (2003) Protocol for MM/PBSA molecular dynamics simulations of proteins. *Biophys J* 85 :159-166.
12. Huo S, Massova I, Kollman PA (2002) Computational alanine scanning of the 1:1 human growth hormone-receptor complex. *J Comput Chem* 23 :15-27.
13. Wang W, Lim WA, Jakalian A, Wang J, Luo R, Bayly CI, Kollman PA (2001) An analysis of the interactions between the Sem-5 SH3 domain and its ligands using molecular dynamics, free energy calculations, and sequence analysis. *J Am Chem Soc* 123 :3986-3994.
14. Wang J, Morin P, Wang W, Kollman PA (2001) Use of MM-PBSA in reproducing the binding

- free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of efavirenz by docking and MM-PBSA. *J Am Chem Soc* 123 :5221-5230.
15. Wang W, Kollman PA (2000) Free energy calculations on dimer stability of the HIV protease using molecular dynamics and a continuum solvent model. *J Mol Biol* 303 :567-582.
  16. Reyes CM, Kollman PA (2000) Structure and thermodynamics of RNA-protein binding: using molecular dynamics and free energy analyses to calculate the free energies of binding and conformational change. *J Mol Biol* 297 :1145-1158.
  17. Srinivasan J, Miller J, Kollman P, Case D (1998) Continuum solvent studies of the stability of RNA hairpin loops and helices. *J Biomol Struct Dyn* 16:671-682.
  18. Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case DA, Cheatham TE, III (2000) Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res* 33 :889-897.
  19. Wallnoefer HG, Liedl KR, Fox T (2011) A challenging system: free energy prediction for factor Xa. *J Comput Chem* 32 :1743-1752.
  20. Chen SL, Zhao DX, Yang ZZ (2011) An estimation method of binding free energy in terms of ABEEmsigmap/MM and continuum electrostatics fused into LIE method. *J Comput Chem* 32 :338-348.
  21. Valiente PA, Gil A, Batista PR, Caffarena ER, Pons T, Pascutti PG (2010) New parameterization approaches of the LIE method to improve free energy calculations of PlmII-Inhibitors complexes. *J Comput Chem* 31 :2723-2734.
  22. Singh N, Warshel A (2010) Absolute binding free energy calculations: on the accuracy of computational scoring of protein-ligand interactions. *Proteins* 78 :1705-1723.
  23. Åqvist J (1995) Calculation of Absolute Binding Free Energies for Charged Ligands and Effects of Long-Range Electrostatic Interactions. *J Comput Chem* 17 :1587-1597.
  24. Åqvist J, Medina C, Samuelsson JE (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng* 7 :385-391.
  25. Lamb ML, Tirado-Rives J, Jorgensen WL (1999) Estimation of the binding affinities of FKBP12 inhibitors using a linear response method. *Bioorg Med Chem* 7 :851-860.
  26. Shine Y, Kikuchi T (2009) Estimation of relative binding free energy based on a free energy variational principle for quantitative structure activity relationship analyses. *Chemical Physics* 365:53-59.
  27. Feynman RP (1982) *Statistical Mechanics. A Set of Lectures*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Massachusetts

28. Zwanzig RW (1954) High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J Chem Phys* 22:1420 - 1426.
29. Holt DA, Konialian AL, Oh HJ, Yen HK, Rozamus LW, Krog AJ, Erhard KF, Ortiz E, Levy MA, Brandt M, Bossard MJ, Luenogo JI (1994) Structure–activity studies of synthetic FKBP ligands as peptidylprolyl isomerase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 4:315-320.
30. Holt DA, Luengo JI, Yamashita DS, Oh HJ, Konialian AL, Yen HK, Rozamus LW, Brandt M, Bossard MJ, Levy MA, Eggleston DS, Liang J, Schultz LW, Stout TJ, Clardy J (1993) Design, synthesis, and kinetic evaluation of high-affinity FKBP ligands and the X-ray crystal structures of their complexes with FKBP12. *J Am Chem Soc* 115:9925-9938.
31. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004) Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* 25 :1157-1174.
32. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI (2002) Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J Comput Chem* 23 :1623-1641.
33. Wang J, Kollman PA (2001) Automatic parameterization of force field by systematic search and genetic algorithms. *J Comput Chem* 22:1219-1228.
34. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C (2006) Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 65 :712-725.
35. Case DA, Darden TA, T.E. Cheatham III, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Walker RC, Zhang W, Merz KM, Roberts BP, Wang B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Kolossvai I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Liu J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Cai Q, Ye X, Wang J, Hsieh MJ, Cui G, Roe DR, Mathews DH, Seetin MG, Sagui C, Babin V, Luchko T, Gusarov S, Kovalenko A, Kollman PA (2010) AMBER 11. University of California, San Francisco,
36. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madurs J, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79 :926-935.
37. Walker RC, Crowley MF, Case DA (2008) The implementation of a fast and accurate QM/MM potential method in Amber. *J Comput Chem* 29 :1019-1031.
38. Nam K, Gao J, York DM (2005) An Efficient Linear-Scaling Ewald Method for Long-Range Electrostatic Interactions in Combined QM/MM Calculations. *J Chem Theory Comput* 1:2-13.
39. Pellegrini E, Field MJ (2002) A Generalized-Born Solvation Model for Macromolecular Hybrid-Potential Calculations. *J Phys Chem A* 106:1316-1326.
40. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen JC (1977) Numerical integration of the Cartesian equation of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Chem Phys* 23:327–341.

41. Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: an  $N\log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98:10089-10092.
42. Efron B. (1981). Nonparametric estimates of standard error: The jackknife, the bootstrap and other methods. *Biometrika*, 68, 589-599.

## 第3章 新しい相対的な結合自由エネルギーの予測

### 3.1. 緒言

自由エネルギー変分原理は FEP 法のような中間状態のサンプリング、MM-GB/SA 法、MM-PB/SA 法のようなエントロピー計算、LIE 法のような経験的なパラメータ調整が不要な方法である。2 章では自由エネルギー変分原理を FKBP に適用し、良好な相関係数と平均誤差を得ることができたが、上限と下限の差が大きい問題や、サンプリング数が少なく、エラーバーが大きくなる問題があった。本章では 2 章における問題点の改善を試み、それを Pim1 キナーゼ阻害剤に適用する。また、本手法の有効性を確認するために 2 章の手法、MM-PB/SA 法、LIE 法との比較も行う。更に改良した手法を FKBP にも適用し、汎用性を確認する。

Pim キナーゼはアポトーシスや細胞周期制御に関わるタンパク質をリン酸化することで活性を調節し、細胞生存や細胞増殖に関与していることが知られている[1]。Pim キナーゼファミリーはセリン/スレオニンキナーゼの一種であり、Pim-1、Pim-2、Pim-3 の 3 つのメンバーからなる。Pim-1、Pim-2 キナーゼは前立腺がんやリンパ腫で高発現していることや Pim-3 は膵臓がんや肝がんで高発現していることが報告されており、Pim キナーゼが高発現することで癌細胞が増殖することが分かっている[2-4]。Pim キナーゼの活性を阻害することで癌細胞の増殖を阻害することが可能であり、様々な Pim キナーゼ阻害剤の開発が行われている[5-8]。Pim-1 キナーゼは既に立体構造が既知であり、阻害活性を持つ低分子が分かっているため本研究の対象とした[9]。本研究で取り扱うリガンドは triazolo[4, 3-b]pyridazine を骨格に持つリガンドを使用した。この特徴をもつ多くのリガンドが Pim-1 キナーゼに対して阻害活性を持つことが報告されており、それらの阻害定数も実験によって求められている[10]。しかしながら、結合自由エネルギーの予測はほとんどなされていない。

## 3.2. 方法

### Pim-1 キナーゼ複合体のモデル作成

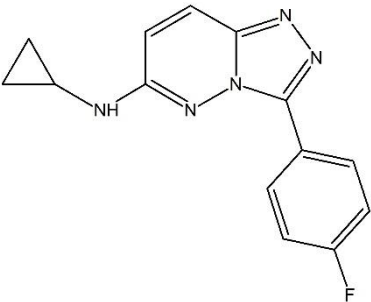
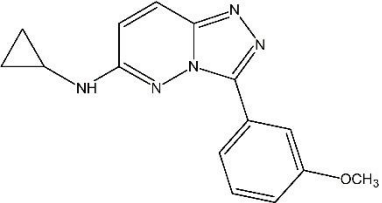
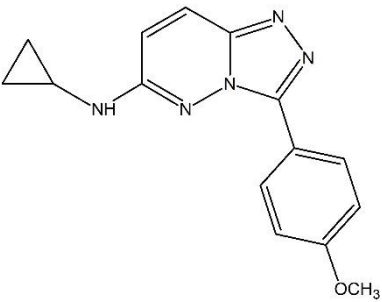
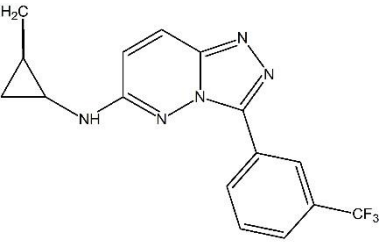
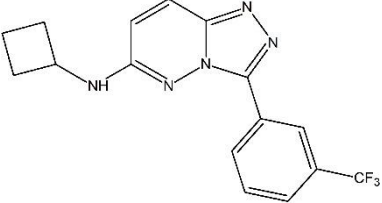
リガンドは阻害定数が実験によって求められている 15 個を使用した[9]。リガンド 1 が含まれる複合体の結晶構造を鋳型として用いた (PDB : 3BGQ)。3BGQ を非摂動系として、残りの 14 個のリガンドを摂動系として Discovery Studio Ver.16.1 (Dassault Systems Biovia Corp.) を使用し、モデリングした。この際に非摂動系との共通の構造は変更せず、異なる部位のみモデリングした。リガンドの各種パラメータは antechamber を使用して割り振った[11]。リガンドの電荷は AM1-BCC 電荷[12]を割り振った。タンパク質には ff14SB 力場[13]を適用した。

表 2.1 使用した 15 個のリガンドの構造式と阻害定数

| No. | 構造式 | $K_i$<br>( $\mu\text{M}$ ) | No. | 構造式 | $K_i$<br>( $\mu\text{M}$ ) |
|-----|-----|----------------------------|-----|-----|----------------------------|
| L1  |     | 11                         | L2  |     | 44                         |
| L3  |     | 94                         | L4  |     | 21                         |
| L5  |     | 160                        | L6  |     | 49                         |
| L7  |     | 100                        | L8  |     | 1800                       |
| L9  |     | 320                        | L10 |     | 430                        |



表 2.1 使用した 15 個のリガンドの構造式と阻害定数

| No. | 構造式   | $K_i$<br>( $\mu\text{M}$ ) | No. | 構造式   | $K_i$<br>( $\mu\text{M}$ ) |
|-----|---|----------------------------|-----|---|----------------------------|
| L11 |    | 210                        | L12 |   | 410                        |
| L13 |   | 980                        | L14 |  | 50                         |
| L15 |  | 54                         |     |   |                            |

すべてのシミュレーションで AMBER14[14]を使用した。複合体並びにリガンド単体共に *waterbox* のマージンは  $9 \text{ \AA}$  に設定した。*waterbox* の形状は切頂八面体を使用した。溶媒モデルは TIP3P[12]を使用した。複合体ではカウンターイオンとしてナトリウムイオンを配置した。まず、QM 法を用いて 2000 ステップの最急降下法と 1000 ステップの共役勾配法の極小化を 1 セットとして 4 セット行った。極小化の各セットで初期構造を拘束条件としてタンパク質に調和拘束をかけた。その強さを各セットで変化させた ( $500$ 、 $50$ 、 $5$ 、 $0 \text{ kcal/ \AA}^2$ )。QM 計算には AM1 ハミルトニアンを使用した。

次に  $20 \text{ ps}$  で  $0\text{-}300 \text{ K}$  の昇温過程を行い、その後、 $20 \text{ ps}$  の  $300 \text{ K}$ 、 $1 \text{ atm}$  の定温・定圧下で平衡処理を行った。昇温過程と平衡処理ではタンパク質に  $20 \text{ kcal/ \AA}^2$  の調和拘束をかけた。最後に  $10 \text{ ns}$  の  $300 \text{ K}$ 、 $1 \text{ atm}$  の NPT シミュレーションを行った。シミュレーションの

刻み幅は SHAKE 法[15]を適用して 2 fs にし、長距離静電相互作用は周期境界条件を適用し、PME 法[16]を使用した。カットオフ距離は 8 Å とした。ファンデルワールスのカットオフ距離も 8 Å とした。この過程では調和拘束はかけなかった。リガンド単体のシミュレーションも同様のプロトコルで行ったが、極小化は 1000 ステップの最急降下法と 1000 ステップの共役勾配法を 1 回、全ての過程で調和拘束はかけなかった。

### 自由エネルギー変分原理の計算

今回改良した自由エネルギー変分原理の計算方法の具体的な操作は以下に示す。

各複合体のシミュレーションから 1.2-10.2 ns の間で 90ps 間隔ごとに複合体、タンパク質単体、リガンド単体の構造を抽出した。この時水分子は取り除く。結晶構造であるリガンド 1 を非摂動系として、他の構造を摂動系とした。非摂動系の複合体に含まれるリガンドに摂動系のリガンドを重ね合わせた。重ね合わせた原子は図 3.1 に示す。非摂動系のタンパク質に先ほど重ね合わせた摂動系のリガンドを挿入する。

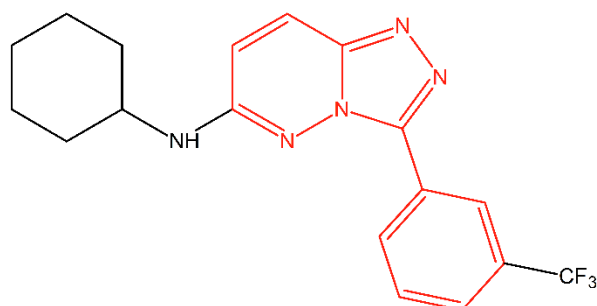


図 3.1 非摂動系のリガンド構造式。赤色の部分が自由エネルギー変分原理の過程で摂動系リガンドと重ね合わせる部分

従来の手法は重ね合わせ後に立体障害が生じ、サンプル数が十分確保できず、エラーバーが大きい問題があったので、本手法では以下の手順を追加した。リガンド挿入後、150 ステップの最急降下法と 100 ステップの共役勾配法で極小化を行い、0.3 ps の 300 K、1 atm の NPT シミュレーションを行った。極小化と NTP シミュレーションではタンパク質に 1000 kcal/Å<sup>2</sup> の調和拘束をかけた。ポテンシャルエネルギーすなわち  $\langle H_1 - H_0 \rangle_1$  と  $\langle H_1 - H_0 \rangle_0$  の計算時には PB/SA モデルを用いて、溶媒効果を考慮した。PB/SA モデルにおいて、溶質の誘

電率は 4、溶媒の誘電率は 78.5 を用いた。同様にして  $\langle H_{PL1} - H_{PL0} \rangle_{PL1}$  も算出した。

$\langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L0}$ 、 $\langle H_{L1} - H_{L0} \rangle_{L0}$  の値は本研究では値が非常に近いと仮定して  $\langle H_{L1} \rangle_{L1} - \langle H_{L0} \rangle_{L0}$  で近似した。ただし、リガンドのポテンシャルエネルギーを算出する際に 150 ステップの最急降下法と 100 ステップの共役勾配法で極小化を行い、0.3 ps の 300 K、1 atm の NPT シミュレーションを行った。この時、調和拘束はかけなかった。

### MM-PB/SA 法を用いた結合自由エネルギーの計算

MM-PB/SA 法は結合自由エネルギーを分子力学エネルギー、溶媒和エネルギー、エントロピーで表す方法である[17]。計算には Amber14 の MMPBSA.py プログラムを使用した[18]。MM-PB/SA 法における  $\beta$  ならびに  $\gamma$  の標準的な値は  $0.00542 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{\AA}^2)$ 、 $0.92 \text{ kcal/mol}$  で、本研究ではその値を用いた。極小化時の誘電率は ( $\epsilon = 4r$ ) を使用し、最適化のステップ数は 5000 回、RMSD は  $0.0001 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{\AA}^2)$  に設定した。各複合体のシミュレーション、タンパク質単体のシミュレーション、それぞれから 1.2 ns – 10.2 ns の間で 90 ps 間隔ごとに 100 個の構造を抽出し、計算を行った。

### LIE 法を用いた結合自由エネルギーの計算

Åqvist らによって提唱された LIE 法[18]と自由エネルギー変分原理の結果の比較も行った。アンサンブルの平均エネルギーは MD の 1.2 ns – 10.2 ns の間で 90 ps 間隔ごとに 100 個の構造を抽出し算出した。LIE のパラメータは 15 個のリガンドをデータセットにして決定した。

### 3.3. 結果

#### Pim-1 キナーゼの自由エネルギー変分原理の結果

本章で改良した自由エネルギー変分原理の結果は表 3.2 と図 3.2 に示す。実験値と計算値との相関係数  $r^2$  は 0.74、誤差平均は 0.95 kcal/mol になった。全てのリガンドで上限と下限の間に真の相対的な結合自由エネルギー（実験値）が存在した。14 個のリガンドの内 13 個は 80%以上の化合物でサンプリングが行えた（100 個の構造に対してエネルギー計算が行えた構造は 80 個以上）。新しい手法では短い時間の極小化と MD を使うことによって、非摂動系のリガンドとタンパク質間の相互作用におけるサンプリング効率が改善された。以前の手法ではサンプル数は 1000 個以上必要だったが、本手法では 100 個で十分である。

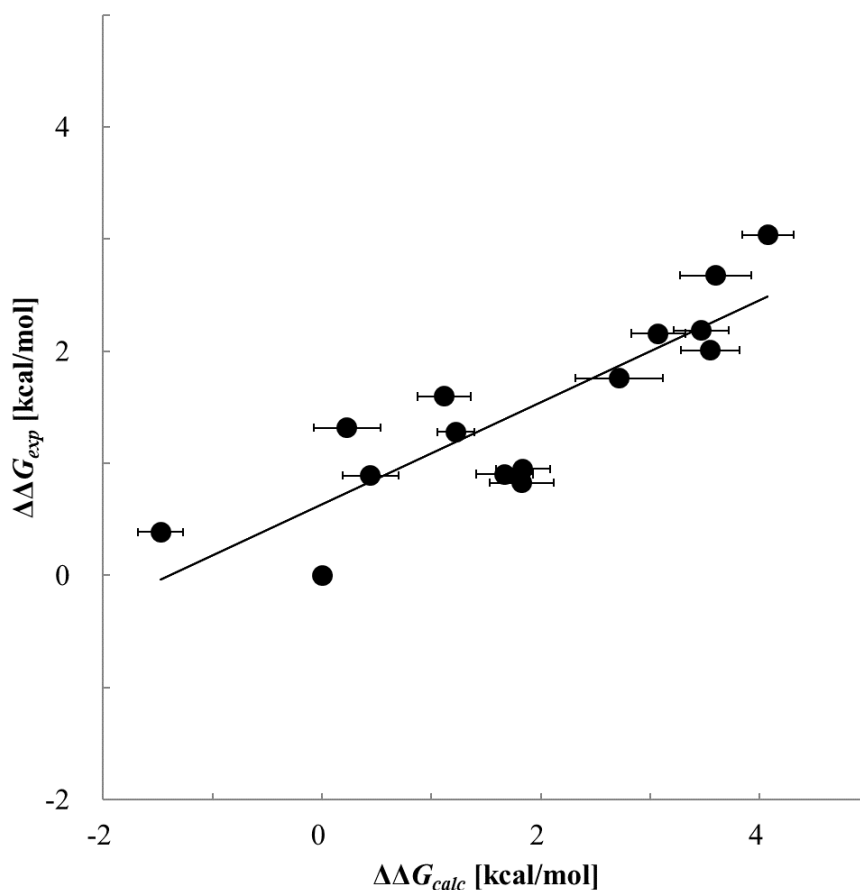


図 3.2 本手法を用いた Pim-1 キナーゼにおける、相対的な結合自由エネルギーの実験値と計算値のプロット図。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数  $r^2$  は 0.74、誤差平均は 0.95 kcal/mol。

表 3.2 本章で改良した自由エネルギー変分原理に基づく Pim-1 キナーゼの結果。相関係数 $r^2$ は 0.74、相対的な結合自由エネルギーの誤差平均は 0.95 kcal/mol

| No. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_l$ | n.s.l | $\langle H_1 - H_0 \rangle_o$ | n.s.u | $\Delta\Delta G_{calc}$ | $\Delta\Delta G_{exp}$ | $\Delta G_{exp}$ | $\Delta\Delta G_{error}$ |
|-----|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|-------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
| L1  | 0                             | -     | 0                             | -     | 0.00                    | 0.00                   | -10.92           | -                        |
| L2  | -1.69                         | 98    | 5.33                          | 99    | $1.82 \pm 0.29$         | 0.83                   | -10.10           | 1.00                     |
| L3  | 0.21                          | 100   | 2.24                          | 100   | $1.22 \pm 0.17$         | 1.28                   | -9.65            | 0.06                     |
| L4  | -3.63                         | 100   | 0.68                          | 100   | $-1.47 \pm 0.21$        | 0.39                   | -10.54           | 1.86                     |
| L5  | -0.52                         | 100   | 2.75                          | 100   | $1.12 \pm 0.24$         | 1.60                   | -9.33            | 0.48                     |
| L6  | -3.47                         | 100   | 4.36                          | 100   | $0.44 \pm 0.26$         | 0.89                   | -10.03           | 0.45                     |
| L7  | -3.52                         | 99    | 3.97                          | 99    | $0.23 \pm 0.31$         | 1.32                   | -9.61            | 1.09                     |
| L8  | -2.09                         | 80    | 10.24                         | 96    | $4.07 \pm 0.24$         | 3.04                   | -7.89            | 1.03                     |
| L9  | -3.29                         | 86    | 10.39                         | 95    | $3.55 \pm 0.27$         | 2.01                   | -8.92            | 1.54                     |
| L10 | -1.02                         | 99    | 7.95                          | 100   | $3.47 \pm 0.25$         | 2.19                   | -8.74            | 1.28                     |
| L11 | -4.39                         | 85    | 9.81                          | 99    | $2.71 \pm 0.40$         | 1.76                   | -9.17            | 0.95                     |
| L12 | -1.88                         | 100   | 8.02                          | 100   | $3.07 \pm 0.25$         | 2.16                   | -8.77            | 0.92                     |
| L13 | -3.61                         | 90    | 10.81                         | 89    | $3.60 \pm 0.33$         | 2.68                   | -8.25            | 0.92                     |
| L14 | -1.88                         | 98    | 5.21                          | 100   | $1.67 \pm 0.26$         | 0.90                   | -10.02           | 0.77                     |
| L15 | -1.64                         | 100   | 5.31                          | 100   | $1.83 \pm 0.25$         | 0.95                   | -9.98            | 0.89                     |

$\langle H_1 - H_0 \rangle_l$ : 下限の値

n.s.l. : 下限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\langle H_1 - H_0 \rangle_o$ : 上限の値

n.s.u. : 上限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\Delta\Delta G_{calc}$  : 自由エネルギー変分原理に基づいて計算された相対的な結合自由エネルギー。エラーバーはブートストラップ標準偏差から算出した。

$\Delta\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた相対的な結合自由エネルギー

$\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた結合自由エネルギー

$\Delta\Delta G_{error}$  :  $|\Delta\Delta G_{calc} - \Delta\Delta G_{exp}|$

2章の手法の結果は表 3.3 と図 3.3 に示す。実験値と計算値との相関係数 $r^2$ は 0.38、誤差平均は 1.43 kcal/mol になった。全てのリガンドで上限と下限の間に真の相対的な結合自由エネルギー（実験値）が存在したが、リガンド 8-13 ではリガンド 1 からの構造の差異が大きくサンプリング数が十分でなかった。

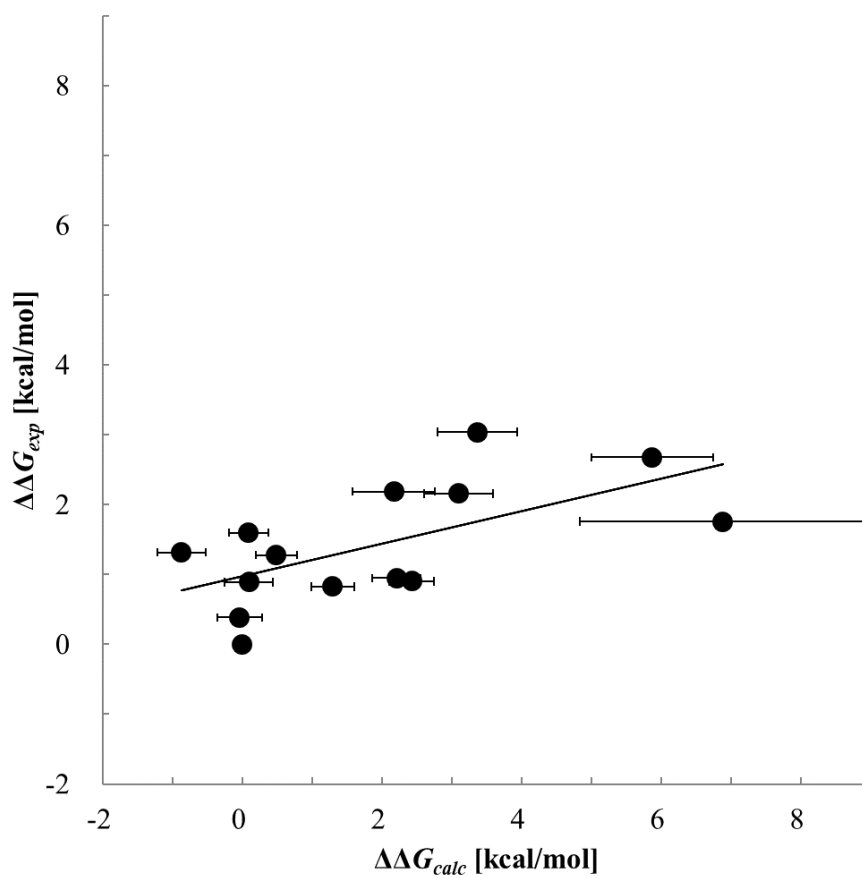


図 3.3.2 章の手法を用いた Pim1 キナーゼにおける、相対的な結合自由エネルギーの実験値と計算値のプロット図。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数 $r^2$  は 0.38、誤差平均は 1.43 kcal/mol。

表 3.3 2章の手法を用いた Pim-1 キナーゼの結果。相関係数 $r^2$ は 0.38、相対的な結合自由エネルギーの誤差平均は 1.43 kcal/mol.

| No. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ | n.s.l. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ | n.s.u. | $\Delta\Delta G_{calc}$ | $\Delta\Delta G_{exp}$ | $\Delta G_{exp}$ | $\Delta\Delta G_{error}$ |
|-----|-------------------------------|--------|-------------------------------|--------|-------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
| L1  | 0                             | -      | 0                             | -      | 0.00                    | 0.00                   | -10.92           | -                        |
| L2  | -5.76                         | 286    | 8.35                          | 280    | $1.29 \pm 0.31$         | 0.83                   | -10.10           | 0.47                     |
| L3  | -6.93                         | 289    | 7.90                          | 416    | $0.48 \pm 0.30$         | 1.28                   | -9.65            | 0.80                     |
| L4  | -8.17                         | 216    | 8.09                          | 395    | $-0.04 \pm 0.32$        | 0.39                   | -10.54           | 0.43                     |
| L5  | -7.04                         | 374    | 7.21                          | 325    | $0.09 \pm 0.28$         | 1.60                   | -9.33            | 1.51                     |
| L6  | -7.51                         | 326    | 7.69                          | 219    | $0.09 \pm 0.35$         | 0.89                   | -10.03           | 0.80                     |
| L7  | -8.51                         | 301    | 6.76                          | 222    | $-0.88 \pm 0.35$        | 1.32                   | -9.61            | 2.19                     |
| L8  | -6.12                         | 41     | 12.84                         | 336    | $3.36 \pm 0.57$         | 3.04                   | -7.89            | 0.32                     |
| L9  | -8.52                         | 44     | -                             | 0      | -                       | 2.01                   | -8.92            | -                        |
| L10 | -7.87                         | 45     | 12.21                         | 366    | $2.17 \pm 0.59$         | 2.19                   | -8.74            | 0.02                     |
| L11 | 0.39                          | 9      | 13.38                         | 121    | $6.89 \pm 2.06$         | 1.76                   | -9.17            | 5.13                     |
| L12 | -6.14                         | 95     | 12.34                         | 91     | $3.10 \pm 0.50$         | 2.16                   | -8.77            | 0.94                     |
| L13 | -3.97                         | 17     | 15.72                         | 1      | $5.87 \pm 0.87$         | 2.68                   | -8.25            | 3.20                     |
| L14 | -5.04                         | 202    | 9.89                          | 439    | $2.43 \pm 0.32$         | 0.90                   | -10.02           | 1.52                     |
| L15 | -5.26                         | 188    | 9.64                          | 286    | $2.21 \pm 0.35$         | 0.95                   | -9.98            | 1.26                     |

$\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ : 下限の値

n.s.l. : 下限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ : 上限の値

n.s.u. : 上限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\Delta\Delta G_{calc}$  : 自由エネルギー変分原理に基づいて計算された相対的な結合自由エネルギー。エラーバーはブートストラップ標準偏差から算出した。

$\Delta\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた相対的な結合自由エネルギー

$\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた結合自由エネルギー

$\Delta\Delta G_{error}$  :  $|\Delta\Delta G_{calc} - \Delta\Delta G_{exp}|$

### MM-PB/SA 法の結果

MM-PB/SA 法の結果は表 3.4 と図 3.4 に示す。実験値と計算値との相関係数  $r^2$  は 0.32、誤差平均は 1.93 kcal/mol になった。計算コストが大きいエントロピーの計算を省いた場合、実験値と計算値との相関係数  $r^2$  は 0.39、誤差平均は 2.24 kcal/mol と相関係数は改善されたが、誤差平均は悪くなった。これらの結果は従来の自由エネルギー変分原理と結果は近いが、MM-PB/SA 法の方が誤差平均は大きい。この結果からも Pim-1 キナーゼは相対的結合自由エネルギーを予測するのが難しい系である。

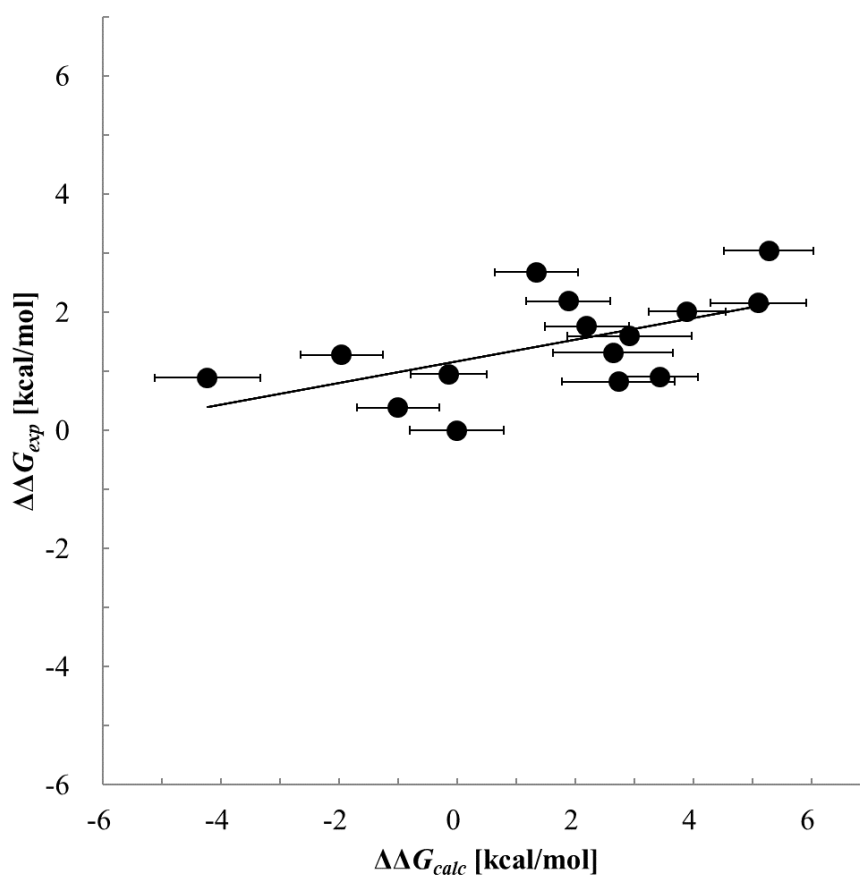


図 3.4 MM-PB/SA 法を用いた Pim-1 キナーゼにおける、相対的な結合自由エネルギーの実験値と計算値のプロット図。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数  $r^2$  は 0.32、誤差平均は 1.93 kcal/mol



表 3.4 MM-PB/SA 法に基づく Pim-1 キナーゼの結果。相関係数 $r^2$ は 0.32、相対的な結合自由エネルギーの誤差平均は 1.93 kcal/mol

| No. | $\Delta E_{elec}$ | $\Delta E_{vdw}$ | $\Delta G_{PB}$ | $\Delta G_{SA}$ | $\Delta G_{GAS/SOL}$ | $T\Delta S$ | $\Delta G_{calcl}$ | $\Delta\Delta G_{calc}$ |
|-----|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------|--------------------|-------------------------|
| L1  | -12.56            | -38.56           | 29.38           | -5.06           | -26.80               | -12.32      | -14.48 ± 0.79      | 0.00                    |
| L2  | -13.96            | -40.52           | 36.82           | -5.22           | -22.88               | -11.14      | -11.74 ± 0.96      | 2.73                    |
| L3  | -25.71            | -43.60           | 44.27           | -5.17           | -30.21               | -13.78      | -16.43 ± 0.99      | -1.95                   |
| L4  | -17.57            | -41.74           | 38.32           | -5.10           | -26.09               | -10.61      | -15.48 ± 0.70      | -1.00                   |
| L5  | -11.82            | -45.08           | 39.19           | -5.39           | -23.10               | -11.54      | -11.56 ± 1.05      | 2.92                    |
| L6  | -20.79            | -45.85           | 42.98           | -5.37           | -29.03               | -10.33      | -18.70 ± 0.90      | -4.23                   |
| L7  | -12.74            | -47.57           | 44.49           | -5.52           | -21.34               | -9.51       | -11.83 ± 1.01      | 2.64                    |
| L8  | -16.51            | -32.31           | 34.25           | -4.56           | -19.13               | -9.93       | -9.20 ± 0.76       | 5.28                    |
| L9  | -17.77            | -36.43           | 36.26           | -4.92           | -22.87               | -12.29      | -10.58 ± 0.65      | 3.89                    |
| L10 | -13.32            | -34.03           | 29.06           | -4.49           | -22.77               | -10.19      | -12.59 ± 0.71      | 1.89                    |
| L11 | -13.65            | -34.33           | 30.15           | -4.71           | -24.15               | -12.95      | -11.20 ± 0.85      | 3.28                    |
| L12 | -12.26            | -35.04           | 31.00           | -4.76           | -21.06               | -11.69      | -9.37 ± 0.81       | 5.11                    |
| L13 | -18.79            | -37.72           | 37.33           | -4.86           | -24.03               | -10.90      | -13.13 ± 0.71      | 1.35                    |
| L14 | -25.01            | -39.90           | 45.11           | -4.99           | -24.79               | -13.75      | -11.04 ± 0.64      | 3.44                    |
| L15 | -16.75            | -38.22           | 33.77           | -5.00           | -26.19               | -11.58      | -14.61 ± 0.64      | -0.14                   |

$$\Delta G_{GAS/SOL} = \Delta E_{elec} + \Delta E_{vdw} + \Delta G_{GB} + \Delta G_{SA}$$

$$\Delta G_{calc} = \Delta G_{GAS/SOL} - T\Delta S$$

$\Delta\Delta G_{calc}$  :相対的な結合自由エネルギー

### LIE 法の結果

LIE 法の結果は表 3.5 と図 3.5 に示す。今回  $\alpha, \beta, \gamma$  の値は全リガンドから算出し、 $\alpha = -0.04$ ,  $\beta = -0.181$ ,  $\gamma = -12.94$  の値を用いた。実験値と計算値との相関係数  $r^2$  は 0.74、誤差平均は 0.63 kcal/mol となった。また、図 3.5 から分かるようにプロットが 2 つのクラスターに分かれた。またのデフォルトの  $\alpha = 0.16, \beta = 0.50, \gamma = 0$  を用いて計算値を算出すると、相関係数  $r$  は -0.85、誤差平均は 3.87 kcal/mol と大幅に結果が悪化した。

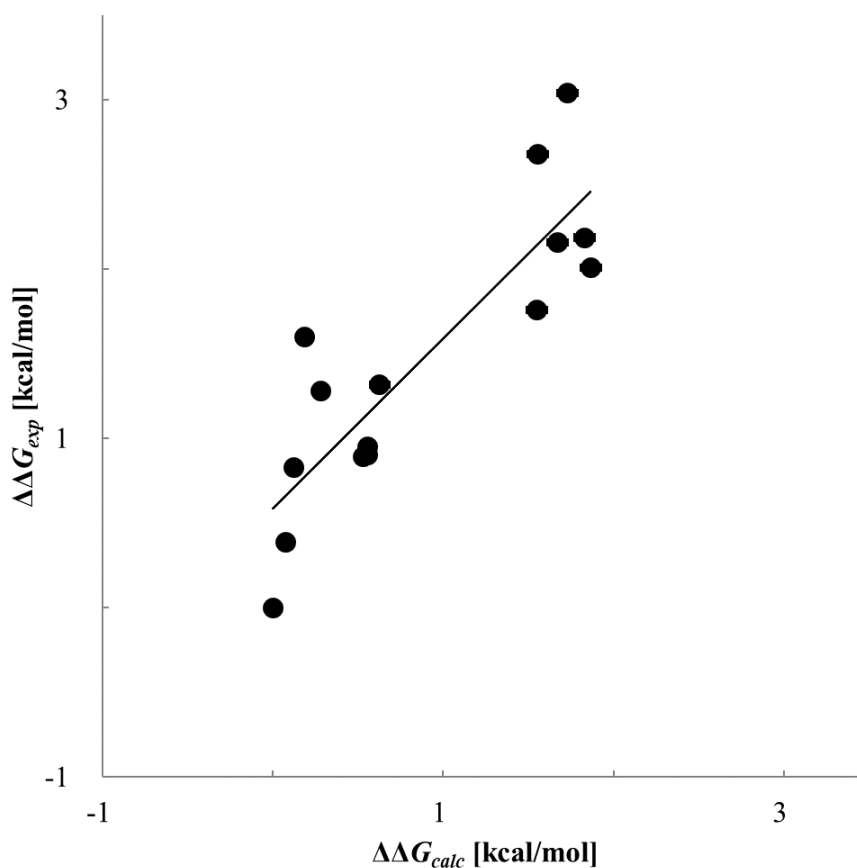


図 3.5 LIE 法を用いた Pim-1 キナーゼにおける、相対的な結合自由エネルギーの実験値と計算値のプロット図。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数  $r^2$  は 0.74、誤差平均は 0.63 kcal/mol。

表 3.5 LIE 法に基づく Pim-1 キナーゼの結果。相関係数 $r^2$ は 0.74、相対的な結合自由エネルギーの誤差平均は 0.63 kcal/mol.

| No. | $\langle E_{vdw} \rangle_{bound}$ | $\langle E_{elec} \rangle_{bound}$ | $\langle E_{vdw} \rangle_{free}$ | $\langle E_{elec} \rangle_{free}$ | $\Delta\Delta G_{LIE}$ | $\Delta\Delta G_{def}$ | $\Delta\Delta G_{exp}$ |
|-----|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| L1  | -17.45                            | -1.81                              | -11.37                           | 11.19                             | 0.00                   | 0.00                   | 0.00                   |
| L2  | -17.88                            | -3.06                              | -14.67                           | 11.26                             | $0.12 \pm 0.04$        | $-0.20 \pm 0.03$       | 0.83                   |
| L3  | -17.47                            | -2.32                              | -5.31                            | 10.87                             | $0.28 \pm 0.04$        | $-1.07 \pm 0.03$       | 1.28                   |
| L4  | -17.71                            | -2.71                              | -14.68                           | 11.40                             | $0.08 \pm 0.05$        | $-0.07 \pm 0.03$       | 0.39                   |
| L5  | -17.74                            | -2.88                              | -13.40                           | 11.53                             | $0.19 \pm 0.04$        | $-0.43 \pm 0.04$       | 1.60                   |
| L6  | -18.06                            | -1.98                              | -4.80                            | 12.35                             | $0.53 \pm 0.05$        | $-1.82 \pm 0.04$       | 0.89                   |
| L7  | -17.82                            | -2.27                              | -8.70                            | 13.52                             | $0.63 \pm 0.05$        | $-1.88 \pm 0.03$       | 1.32                   |
| L8  | -18.39                            | -2.61                              | -12.03                           | 19.88                             | $1.73 \pm 0.06$        | $-4.79 \pm 0.03$       | 3.04                   |
| L9  | -17.41                            | -2.22                              | -11.39                           | 21.09                             | $1.87 \pm 0.06$        | $-5.15 \pm 0.05$       | 2.01                   |
| L10 | -18.83                            | -3.01                              | -14.00                           | 20.37                             | $1.83 \pm 0.06$        | $-4.99 \pm 0.04$       | 2.19                   |
| L11 | -17.56                            | -2.39                              | -14.54                           | 19.86                             | $1.55 \pm 0.06$        | $-4.13 \pm 0.03$       | 1.76                   |
| L12 | -17.18                            | -2.28                              | -15.36                           | 20.90                             | $1.67 \pm 0.06$        | $-4.41 \pm 0.04$       | 2.16                   |
| L13 | -17.56                            | -2.03                              | -16.00                           | 20.56                             | $1.55 \pm 0.06$        | $-4.07 \pm 0.05$       | 2.68                   |
| L14 | -17.73                            | -1.97                              | -12.19                           | 14.21                             | $0.55 \pm 0.05$        | $-1.50 \pm 0.04$       | 0.90                   |
| L15 | -17.91                            | -3.50                              | -11.43                           | 12.49                             | $0.56 \pm 0.04$        | $-1.56 \pm 0.03$       | 0.95                   |

$\Delta\Delta G_{LIE}$  :  $\alpha = -0.040, \beta = -0.181, \gamma = -12.94$  で算出した相対的な結合自由エネルギー

$\Delta\Delta G_{def}$  :  $\alpha = 0.16, \beta = 0.50, \gamma = 0$  のデフォルト値で算出した相対的な結合自由エネルギー

標準誤差はブートストラップ標準偏差から算出

LIE 法は自由エネルギー変分原理と相関係数、誤差平均ともにほぼ同じ結果だった。しかし、LIE 法は図 3.5 のように実験値と計算値のプロットが 2 つのクラスターに分かれている。一方、自由エネルギー変分原理は図 3.2 のように 2 つのクラスターに分かれていない。その点では我々は自由エネルギー変分原理の方が良い結果だと考えている。

### FKBP 複合体の自由エネルギー変分原理の結果

我々は本章の手法を FKBP-リガンドシステムにも適用し、2章の手法との比較を行った。リガンドは2章と同じものを使用した。結果は表 3.6 と図 3.6 に示す。実験値と計算値との相関係数  $r^2$  は 0.87、誤差平均は 1.86 kcal/mol になった。相関係数とサンプリング数は改善した一方で誤差平均の結果は悪くなった。

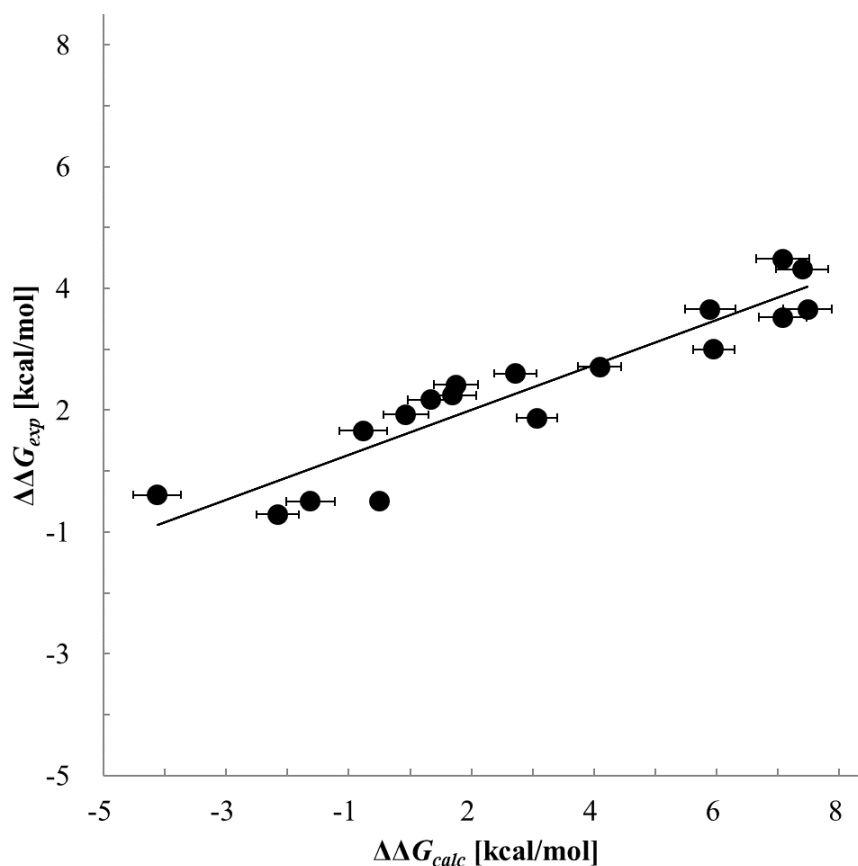


図 3.6 新しい自由エネルギー変分原理を用いた FKBP-リガンドシステムにおける、相対的な結合自由エネルギーの実験値と計算値のプロット図。横軸は計算値、縦軸は実験値。相関係数  $r^2$  は 0.87、誤差平均は 1.86 kcal/mol。

表 3.6 本章で改良した自由エネルギー変分原理に基づく FKBP-リガンド複合体の結果。相関係数 $r^2$ は 0.87  
 相対的な結合自由エネルギーの誤差平均は 1.86 kcal/mol。

| No. | $\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ | n.s.l | $\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ | n.s.u | $\Delta\Delta G_{calc}$ | $\Delta\Delta G_{exp}$ | $\Delta G_{exp}$ | $\Delta\Delta G_{error}$ |
|-----|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|-------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
| L1  | -0.92                         | 94    | 14.07                         | 94    | $6.57 \pm 0.39$         | 3.03                   | -7.96            | 3.55                     |
| L2  | -1.33                         | 95    | 12.11                         | 91    | $5.39 \pm 0.41$         | 3.16                   | -7.82            | 2.23                     |
| L3  | 1.44                          | 97    | 9.46                          | 98    | $5.45 \pm 0.34$         | 2.50                   | -8.48            | 2.95                     |
| L4  | -1.65                         | 88    | 14.81                         | 92    | $6.58 \pm 0.43$         | 3.99                   | -7.00            | 2.59                     |
| L5  | 0.13                          | 92    | 13.66                         | 98    | $6.90 \pm 0.43$         | 3.81                   | -7.17            | 3.08                     |
| L6  | 2.87                          | 97    | 11.10                         | 98    | $6.98 \pm 0.40$         | 3.16                   | -7.82            | 3.82                     |
| L7  | -0.74                         | 100   | 7.92                          | 100   | $3.59 \pm 0.35$         | 2.21                   | -8.77            | 1.38                     |
| L8  | -5.70                         | 98    | 8.09                          | 99    | $1.19 \pm 0.38$         | 1.74                   | -9.24            | 0.55                     |
| L9  | -6.38                         | 95    | 7.24                          | 100   | $0.43 \pm 0.37$         | 1.43                   | -9.55            | 1.00                     |
| L10 | -3.65                         | 95    | 8.09                          | 99    | $2.22 \pm 0.35$         | 2.10                   | -8.88            | 0.12                     |
| L11 | -3.77                         | 99    | 8.90                          | 99    | $2.56 \pm 0.33$         | 1.37                   | -9.61            | 1.19                     |
| L12 | -10.34                        | 97    | 3.09                          | 99    | $-3.62 \pm 0.39$        | 0.11                   | -10.87           | 3.73                     |
| L13 | 0.00                          | -     | 0.00                          | -     | 0.00                    | 0.00                   | -10.98           | -                        |
| L14 | -7.84                         | 95    | 5.60                          | 99    | $-1.12 \pm 0.40$        | 0.00                   | -10.98           | 1.12                     |
| L15 | -6.95                         | 98    | 3.63                          | 99    | $-1.66 \pm 0.34$        | -0.21                  | -11.19           | 1.44                     |
| L16 | -3.85                         | 96    | 6.35                          | 100   | $1.25 \pm 0.36$         | 1.92                   | -9.06            | 0.67                     |
| L17 | -4.57                         | 100   | 6.24                          | 100   | $0.83 \pm 0.37$         | 1.67                   | -9.31            | 0.84                     |
| L18 | -6.25                         | 96    | 5.71                          | 100   | $-0.27 \pm 0.39$        | 1.16                   | -9.82            | 1.43                     |

$\langle H_1 - H_0 \rangle_1$ : 下限の値

n.s.l. : 下限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\langle H_1 - H_0 \rangle_0$ : 上限の値

n.s.u. : 上限の値を計算するのに使用したサンプル数

$\Delta\Delta G_{calc}$  : 自由エネルギー変分原理に基づいて計算された相対的な結合自由エネルギー。エラーバーはブートストラップ標準偏差から算出した。

$\Delta\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた相対的な結合自由エネルギー

$\Delta G_{exp}$  : 実験値から求められた結合自由エネルギー

$\Delta\Delta G_{error}$  :  $|\Delta\Delta G_{calc} - \Delta\Delta G_{exp}|$

### 3.4. 考察

今回の改良では自由エネルギー変分原理の計算の際に、複合体にリガンドを挿入後、短いエネルギー極小化と MD を実施した。この方法は自由エネルギー変分原理の計算時に許容されるサンプル数を大幅に改善し、相対的な結合自由エネルギーの精度を向上させた。つまり、摂動系と非摂動系の複合体のエネルギー差が $\pm 20$  kcal/mol 以下の場合のみ考慮されることになる。2章の手法だと二つのリガンドのポテンシャルエネルギー差 $\pm 20$  kcal/mol 以下の複合体のスナップショット数の比率は下限では平均 25%、上限では平均 17%であったのに対し、今回の手法では下限では平均 95%、上限では 98%となり、大幅にサンプリング効率が高くなった。さらに、ハミルトニアンの上限值と下限値の幅、すなわち $\langle H_1 - H_0 \rangle_1$  と  $\langle H_1 - H_0 \rangle_0$  の差が従来法では平均 15.77 kcal/mol であったのに対し、本手法では平均 8.11 kcal/mol と半分程度になった。これはサンプリング構造のばらつきが本手法において小さくなっているからだと考えられる。このことは予測値の誤差が小さくなっていることを示す。

MM-PB/SA はタンパク質-リガンド間の結合自由エネルギーの予測について通常良い結果を与えることが知られているが、Pim-1 キナーゼは MM-PB/SA による結合自由エネルギーの予測が難しい系であることが分かった。しかしながら自由エネルギー変分原理では相関係数  $r^2=0.74$  と良い結果を得られた。

本手法で時間がかかるステップは MD 計算と、 $\langle H_1 - H_0 \rangle_1$  と  $\langle H_1 - H_0 \rangle_0$  のアンサンブル平均を求めることであり、MD の計算コストは LIE 法や MM-PB/SA 方とほぼ同じである。一方、MM-PB/SA や MM-GB/SA で最も計算コストがかかるのはエントロピー計算で、この点では我々の手法はエントロピー計算が不要で計算コストが少ない。更に、中間状態の計算のために複数回の MD が必要な FEP 法とは異なり、1 回の MD だけで済む。

我々は NI-i5GH (CPU : Intel(R) Core(TM) i5-7400 @ 3.00GHz, メモリ : 32 GB, マザーボード: intel H170 chip set) の計算機を用い、自由エネルギー変分原理, MM-PB/SA 法と LIE 法の計算コストを算出した。各手法にかかる計算コストは表 3.7 に示す。 $\Delta\Delta G_{calc}$  の計算に必要な時間は 1 つのリガンドで自由エネルギー変分原理は 18,766 分, MM-PB/SA 法は 25,766 分, LIE 法は 17,451 分となった。従って、計算コストに関しては LIE の方が優れているが、MM-PB/SA よりは大幅に減らすことが出来た。

表 3.7 各手法の計算コストの比較

| 手法       | MD コスト (分) | FEVP コスト (分) | MM-PB/SA コスト (分) | LIE コスト (分) |
|----------|------------|--------------|------------------|-------------|
| FEVP     | 17436      | 1330         | -                | -           |
| MM-PB/SA | 17436      | -            | 8330             | -           |
| LIE      | 17436      | -            | -                | 15          |

MD コスト: 10 ns の MD を行うのにかかる時間

FEVP コスト :自由エネルギー変分原理の計算にかかる時間

MM-PB/SA コスト :エントロピーとエンタルピーを計算するのにかかる時間。計算コストの大半はエントロピー計算が占める。

LIE コスト:エンタルピーを計算するのにかかるコスト

今回の結果においてリガンド 4 の相対的結合自由エネルギーが他のリガンドに比べて実験値より大幅に小さい値になった。これは図 3.7 のように 4 位の NH と 96-Asp との水素結合の効果が強く出ているためと考えられる。この傾向は FKBP でも同様に見られた。

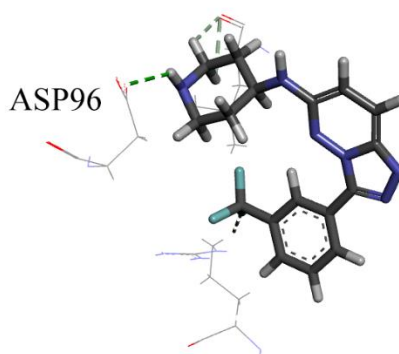


図 3.7 リガンド 4 と周辺のアミノ酸との結合様式

今回取り扱っているリガンドの違いは、シクロヘキサンの部分が NH、NMe に置換されているかシクロプロパンになっている、もしくはフェニル基の置換基が異なっているかである。この程度の違いは摂動の範囲に収まることが分かった。摂動の範囲をどう定義するかは決める必要があるが、構造が分かっているリード化合物を基にして、新しいリード化合物を設計する場合、この程度の化合物の違いであれば自由エネルギー変分原理によって相対的な結合自由エネルギーが予測でき、ドラッグデザインに有効であることが示された。リード化合物の最適化には本手法は適用できる。

### 3.5. 結論

我々は自由エネルギー変分原理に基づく方法で Pim-1 キナーゼ阻害剤の相対的結合自由エネルギーの計算を行った。その結果、従来の方法では相関係数  $r^2$  は 0.38、誤差平均は 1.43 kcal/mol だったが、本手法では相関係数  $r^2$  は 0.74、誤差平均は 0.95 kcal/mol と改善され、本手法は有効であることが示された。相関係数に関しては FKBP 複合体でも同様の傾向が見られた。本手法では自由エネルギー変分原理における上限値・下限値の差が従来法よりも狭まった。これは、相対的結合自由エネルギーの実際の値をより正確に特定しやすくなったことを示している。今回の結果は MM-PB/SA 法の相関係数  $r^2=0.32$ 、誤差平均 1.93 kcal/mol よりも非常に良かった。また、LIE 法とほぼ同等の結果を得ることもできた。本手法は 1 つの阻害剤の結合様式と阻害定数が分かっているならば、相対的な結合自由エネルギーを計算することができ、リード最適化に使えることが大いに期待される。



### 3.1. 参考文献

1. Merkel AL, Meggers E, Ocker M (2012) PIM1 kinase as a target for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 21 :425-436.
2. Bachmann M, Moroy T (2005) The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37 :726-730.
3. Zhukova Iu N, Alekseeva MG, Zakharevich NV, Shtil AA, Danilenko VN (2011) [The Pim family of protein kinases: structure, functions and roles in hematopoietic malignancies]. *Mol Biol (Mosk)* 45 :755-764.
4. Liang C, Li YY (2014) Use of regulators and inhibitors of Pim-1, a serine/threonine kinase, for tumour therapy (review). *Mol Med Rep* 9:2051-2060.
5. Swords R, Kelly K, Carew J, Nawrocki S, Mahalingam D, Sarantopoulos J, Bearss D, Giles F (2011) The Pim kinases: new targets for drug development. *Curr Drug Targets* 12 :2059-2066.
6. Tursynbay Y, Zhang J, Li Z, Tokay T, Zhumadilov Z, Wu D, Xie Y (2016) Pim-1 kinase as cancer drug target: An update. *Biomed Rep* 4 :140-146.
7. Shah N, Pang B, Yeoh KG, Thorn S, Chen CS, Lilly MB, Salto-Tellez M (2008) Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer - a molecular and therapeutic appraisal. *Eur J Cancer* 44:2144-2151.
8. Burger MT, Nishiguchi G, Han W, Lan J, Simmons R, Atallah G, Ding Y, Tamez V, Zhang Y, Mathur M, Muller K, Bellamacina C, Lindvall MK, Zang R, Huh K, Feucht P, Zavorotinskaya T, Dai Y, Basham S, Chan J, Ginn E, Aycinena A, Holash J, Castillo J, Langowski JL, Wang Y, Chen MY, Lambert A, Fritsch C, Kauffmann A, Pfister E, Vanasse KG, Garcia PD (2015) Identification of N-(4-((1R,3S,5S)-3-Amino-5-methylcyclohexyl)pyridin-3-yl)-6-(2,6-difluorophenyl)-5-fluoropicolinamide (PIM447), a Potent and Selective Proviral Insertion Site of Moloney Murine Leukemia (PIM) 1, 2, and 3 Kinase Inhibitor in Clinical Trials for Hematological Malignancies. *J Med Chem* 58:8373-8386.
9. Grey R, Pierce AC, Bemis GW, Jacobs MD, Moody CS, Jajoo R, Mohal N, Green J (2009) Structure-based design of 3-aryl-6-amino-triazolo[4,3-b]pyridazine inhibitors of Pim-1 kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 19:3019-3022.
10. Zuckerman DM (2010) *Statistical Physics of Biomolecules*. CRC Press,
11. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004) Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry* 25:1157-1174.
12. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI (2002) Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of computational chemistry* 23 :1623-1641.

13. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C (2015) ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* 11:3696-3713.
14. D.A. Case VB, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E., Duke HG, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee SL, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer GS, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X., Kollman WaPA (2014) AMBER 14. University of California, San Francisco
15. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen JC (1977) Numerical integration of the Cartesian equation of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Chem Phys* 23:327-341.
16. Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: an NLog(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98:10089-10092.
17. Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case DA, Cheatham TE, 3rd (2000) Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research* 33:889-897.
18. Miller BR, McGee TD, Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE (2012) MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation* 8:3314-3321.
19. Åqvist J, Medina C, Samuelsson JE (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein engineering* 7:385-391.

## 第4章 結論

本研究では、自由エネルギー変分原理に基づく相対的な結合自由エネルギー算出の改良を行い、FEP法、MM-PB/SA、MM-GB/SA法、LIE法との比較を行った。相対的な結合自由エネルギー算出の改良は2段階で行い、1段階目の改良はFKBPを対象とし、2段階目の改良をPim-1キナーゼに適用した。

1段階目の改良では、自由エネルギー変分原理の結果（相関係数  $r^2 = 0.80$ 、誤差平均 0.70 kcal/mol）はMM-GB/SA法の結果（相関係数  $r^2 = 0.81$ 、誤差平均 3.84 kcal/mol）、LIE法結果（相関係数  $r^2 = 0.81$ 、誤差平均 0.44 kcal/mol）とほぼ同程度の結果を得ることが出来た。また、リガンドの数は6個になるが、自由エネルギー変分原理の結果（相関係数  $r^2 = 0.89$ 、誤差平均は 0.41 kcal/mol）はFEP法の結果（相関係数  $r^2 = 0.96$ 、誤差平均 0.48 kcal/mol）と同等の結果となった。つまり、中間状態のサンプリング、エントロピー計算、経験的なパラメータ調整無しで従来の手法と同程度の結果を得ることができた。一方で、計算値は下限と上限の間に必ず入っていたものの、上限と下限の差が大きく、またサンプリング数が少なく誤差平均が大きい課題が明らかになった。

2段階目の改良では、自由エネルギー変分原理の結果は（相関係数  $r^2 = 0.74$ 、誤差平均 0.95 kcal/mol）、LIE法の結果（相関係数  $r^2 = 0.74$ 、誤差平均 0.63 kcal/mol）と同等、MM-PB/SA法の結果（相関係数  $r^2 = 0.32$ 、誤差平均 1.93 kcal/mol）より優れた結果を得ることができた。また、計算コストはLIE法と比較すると7.5%程度大きいですが、MM-PB/SAより27%減らすことができた。1段階目の改良で問題であった、上限と下限の差は半分程度になり、サンプリングの効率は20%程度から95%程度まで大幅に改善した。

2段階目までの改良を行うことで、LIE法とほぼ同等の計算コストでLIE法と同等の結果が得られ、MM-PB/SA法よりは良い結果を得られることが分かった。LIE法のように経験的なパラメータ調整は不要であるが、一方で摂動の範囲を超えると正確な結果が出ないことも示唆され、今後は摂動の範囲をどう定義するかが課題となる。

## 第5章 謝辞

本研究を行うにあたってご指導いただいた立命館大学生命科学部元教授・菊地武司先生に厚く御礼申し上げます。また、日々の研究活動を通じて色々な意見交換やアドバイスを頂いた、計算生命化学研究室の元メンバーの皆様に感謝致します。

在学時代から貴重なご意見を頂き、また本論文の作成にご尽力いただいた立命館大学生命科学部教授・高橋卓也先生に心から御礼申し上げます。

## 第6章 公表論文

1. Ashida T, Kikuchi T (2013) Estimation of relative binding free energy based on a free energy variational principle for the FKBP-ligand system. *J Comput Aided Mol Des* 27:479-490.
2. Ashida T, Kikuchi T (2015) Overview of Binding Free Energy Calculation Techniques for Elucidation of Biological Processes and For Drug Discovery. *Medicinal Chemistry* 11: 248-253.
3. Ashida T, Kikuchi T (2020) 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 Comput Aided Mol Des* 34: 647-658.