

Theophylline/Caffeine 分子と RNA アプタマーの結合自由エネルギー計算

○谷田 義明¹、三井 崇志²、松浦 東¹

¹富士通研究所(〒243-0197 厚木市森の里若宮 10-1)

²富士通(〒144-8588 東京都大田区新蒲田 1-17-25)

【緒言】

計算機システムの高速化、計算手法の進展によって「計算機を用いて、標的タンパク質に対するドラッグライク化合物を設計すること」が現実味を帯びてきた。我々は、既存の受容体・リガンド分子の複合体構造に基づいて設計したリガンド類似分子の定量的結合活性予測の可能性について、距離拘束ポテンシャル付アルケミカル経路計算方法の検討を行った。対象として、テオフィリン分子/RNA 複合体 (PDB: 1O15) を用い、リガンド類似分子としてカフェイン分子を用いた。その結果、どちらの場合も同一結合サイト領域に、複数の準安定構造が存在した。また、カフェイン分子の場合、テオフィリン分子の向きと異なった最安定構造が存在することが分かった。各準安定構造間を室温で自由に行き来できるため、得られた結合自由エネルギーは実験値を非常によく再現した。

【方法】

定量的に結合活性値を予測するために、仮想的な (アルケミカル) 経路に沿った熱力学サイクル (図 1) を用いた。また、サイクル中で標準状態との関係を維持する (および結合状態を定義する) ために、距離拘束ポテンシャルを用いた。

求める標準結合自由エネルギーは、

$$\Delta G_{bind}^{\circ} = (\Delta G_{Solv}^C + \Delta G_{Solv}^{LJ} + \Delta G_{Solv}^R) - (\Delta G_{Cmplx}^R + \Delta G_{Cmplx}^C + \Delta G_{Cmplx}^{LJ})$$

で与えられる。右辺第 1, 2, 4, 5, 6 項は Bennett Acceptance Ratio (BAR)法で評価し、第 3 項は解析的に評価した。

テオフィリン分子/RNA 複合体構造は 1O15 (PDB) [1]、ユニットセルをドデカヘドロン、壁までの距離を 13Å にとってモデル化した。RNA の力場は AMBER99/parmbsc0[2]を使った。また、テオフィリン分子およびカフェイン分子 (図 2) は、6-31G*基底を用いて真空中で構造最適化し、点電荷に RESP、力場に general amber force field (GAFF)を用いた。ユニットセル中に 3 個の Mg²⁺イオンを Gouda ら[3]のモデルに従って配置し、セルを中性化するように 26 個の Na⁺イオンを導入した。最初に水分子の緩和を行うために、溶質に位置拘束ポテンシャルを印加したまま、エネルギー極小化の後、温度 10 K、時間刻み 1 fs で 20 ps の分子動力学計算 (NVT) を行ったところ、Mg²⁺イオンの周りに正四面体方向に 6 個の水分子が囲んで安定化した。その後、溶質の位置拘束ポテンシャルを取り除いて、室温 298 K における複合体構造を分子動力学計算で作成した (図 3)。リガンド分子を結合サイト領域に拘束するために、結合サイトとリガンド分子の重心の距離を調和ポテンシャルで拘束した。このポテンシャルのバネ定数を決定するために、時間刻み 2 fs で分子動力学計算 (NPT) を 6 ns 行い、最後の 2 ns のデータを用いた。また、自由エネルギー評価のために構造サンプリングは、ストキャスティック動力学計算を用いて時間刻み 2 fs で 100 fs ごと構造をサンプリングした。なお、統計誤差を小さくするために、各原子の初期運動量を乱数で 4 種類発生させて解析に用いた。計算に用いたアルケミカル径路は、結合パラメーター λ で結ばれており、次のように表される。

$$U(x, \lambda^R, \lambda^C, \lambda^{LJ}) = U_0(x) + U^R(x; \lambda^R) + U^C(x; \lambda^C) + U^{LJ}(x; \lambda^{LJ})$$

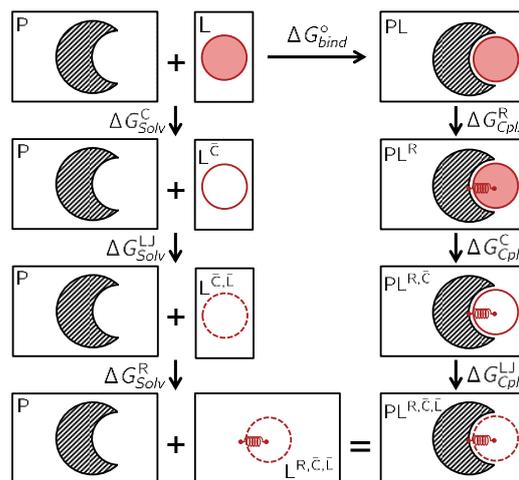


図 1. アルケミカル自由エネルギー計算に用いた熱力学サイクル

ここで、 λ^R 、 λ^C 、 λ^{LJ} はそれぞれ不等間隔に 8 点、8 点、14 点とった。バネ定数は、分散が熱揺らぎ程度 (kBT) になるように、テオフィリン分子-RNA

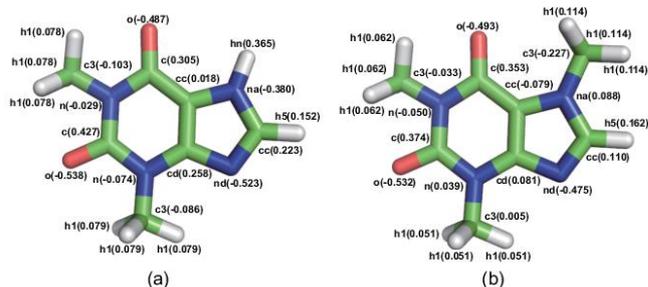


図 2. GAFF 原子種と RESP 電荷 (a) テオフィリン分子、(b) カフェイン分子

に対して、 $1.3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 、カフェイン分子-RNA に対して、 $4.2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ を用いた。なお、全ての計算は Gromacs-4.6.5 を用いて実行した。

【結果】

どちらのリガンド分子も結合サイト領域内に複数の準安定構造を持つことが分かった。さらに、実験の構造データのないカフェイン分子の場合の最安定構造は、テオフィリン分子の実験結果から類推した図 4 (a)ではなく、図 4 (b)であった。図 4 (c)で示したように、これら複数の準安定構造間は室温で十分に行き来することができる。そのため、複数の準安定構造をもつにもかかわらず、特定の準安定構造に長時間トラップされることがない。その結果、カフェイン分子の結合自由エネルギー計算の収束は非常に速い (1 ns 程度)。一方、テオフィリン分子の場合、最安定構造と

他の準安定構造とのエネルギー障壁が高い (かつ、最安定構造と準安定構造のエネルギー差が小さい) ため、構造サンプリングに非常に長い時間を要した。表 1 に、テオフィリン分子およびカフェイン分子の RNA アプタマーに対する結合活性予測の結果を示す。得られた値は実験値を非常によく再現した。

表 1. 各自由エネルギー成分の計算値 (単位 : kcal/mol、括弧内は誤差)

Compound	ΔG_{Cplx}^R	ΔG_{Cplx}^C	ΔG_{Cplx}^{LJ}	ΔG_{Solv}^{LJ}	ΔG_{Solv}^C	ΔG_{Solv}^R	ΔG_{bind}^o	Expt.
Theophylline	0.5 (0.1)	15.7 (0.3)	11.7 (0.1)	2.1 (0.0)	14.0 (0.0)	3.5	-8.2 (0.3)	-8.9
Caffeine	0.9 (0.1)	10.9 (0.1)	9.7 (0.2)	1.8 (0.0)	12.1 (0.0)	4.5	-3.1 (0.3)	-3.4

参考文献

- [1] G. M. Clore and J. Kuszewski, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 1518 (2003).
- [2] A. Perez *et al.*, *Biophys. J.*, 92, 3817 (2007).
- [3] H. Gouda *et al.*, *Biopolymers*, 68, 16 (2003).

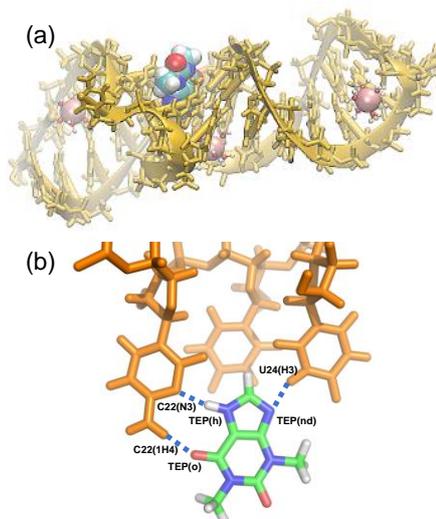


図 3. (a) テオフィリン分子-RNA 複合体構造、(b) 結合サイト領域

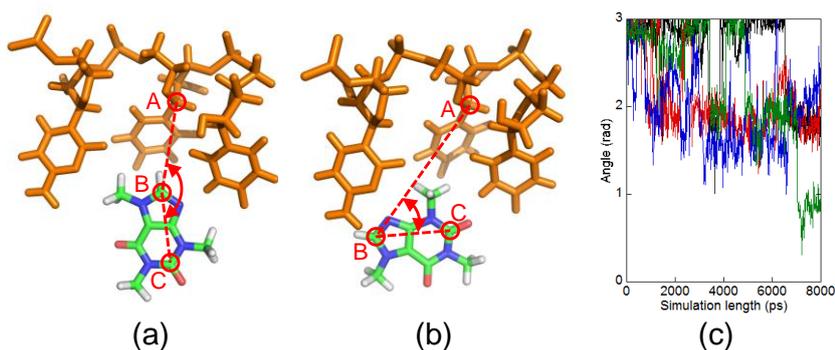


図 4. カフェイン分子-RNA: (a) 初期構造、(b) 最安定構造、(c) 状態 PL^Rにおける角度 A-B-C のシミュレーション時間依存性

と他の準安定構造とのエネルギー障壁が高い (かつ、最安定構造と準安定構造のエネルギー差が小さい) ため、構造サンプリングに非常に長い時間を要した。表 1 に、テオフィリン分子およびカフェイン分子の RNA アプタマーに対する結合活性予測の結果を示す。得られた値は実験値を非常によく再現した。