

# タンパク質-リガンド結合自由エネルギーにおける共溶媒濃度依存性の解明

肥喜里 志門

大阪大学 大学院基礎工学研究科

## 1. はじめに

生体分子の自己組織化過程（タンパク質の折り畳み、会合、凝集及びタンパク質による低分子認識等）を理論的に解析する方法が求められている。特にタンパク質-リガンド結合に伴う自由エネルギー変化（結合自由エネルギー(BFE)）は、結合親和性の指標を示す重要な熱力学量である。分子動力学シミュレーション(MD)により BFE を計算する際、生体分子の周りを囲む溶媒分子は、主要成分のみが考慮される事が多く、水溶性タンパク質とリガンドとの BFE 計算の例であれば、水分子のみが考慮される[1]。しかしながら、生体内（または試験管内）は多種多様な分子が入り乱れる空間であり、水以外の共溶媒分子の影響も受ける。実際、8M 尿素添加による Lysozyme と (GlcNac)<sub>3</sub> の結合親和性低下が実験で観測されており [2]、共溶媒分子をあらわに取り入れた計算が今後求められる。

そこで本研究では、8M 尿素添加による Lysozyme と (GlcNac)<sub>3</sub> の結合親和性低下を MD による自由エネルギー計算によって再現できるか検討した上で、その物理起源を求めることを目的とした。尿素添加前後で異なるのは溶媒環境であり、重要な鍵を握るのは溶媒和自由エネルギー(SFE)である。純水中における SFE 計算であれば、積分方程式理論と形態熱力学的アプローチを駆使した高速かつ正確な計算法がある[3]。しかしながら、この手法は水以外の溶媒分子を取り扱うのが難しいため、他の SFE 計算法を必要とした。よって現実的な時間で共溶媒分子存在下での正確な SFE 計算を可能とするエネルギー表示法 (ER 法) を採用し、自由エネルギー成分の相関解析により、結合親和性低下の物理起源の特定を試みた。

## 2. 計算方法

Lysozyme-(GlcNac)<sub>3</sub> 複合体(PDB ID: 1HEW), Lysozyme 単量体(PDB ID: 193L)及び(GlcNac)<sub>3</sub> の構造サンプリング MD 計算を水分子 20000 個から成る純水中にて実行した。水モデルには SPC/E を使用し、Lysozyme 及び(GlcNac)<sub>3</sub>

の力場には AMBER99SB 及び GLYCAM06 を使用した。GROMACS 2019.5 を用いて、温度 298.15 K の NVT 条件下で 25 ns の平衡化 MD を実行し、その後同条件下で 100ns のプロダクション MD を行い 5 ns 毎の溶質構造をサンプリングした。

次に SFE 計算を実施した。サンプリング後の各溶質構造を固定し、純水中及び濃度 8M 尿素水溶液における SFE を ER 法により計算した。ER 法による SFE 計算では MD を利用するため、溶媒の初期配置依存性がある。よって SEF 計算を溶質 1 構造当たり 4 度行った。純水中及び 8M 尿素水溶液中で溶質構造が共通であることから、結合に伴う溶質の構造エネルギーや膨大なサンプリング MD を必要とする溶質構造エントロピー[4]の変化の差がゼロとなる。よって、両者の溶媒中での BFE の差を、結合に伴う SFE 変化( $\Delta$ SFE)の差( $\Delta\Delta$ SFE)により評価した。

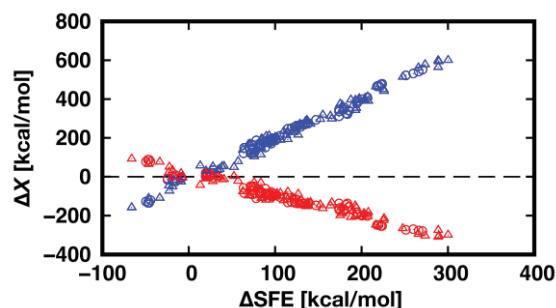


図 1 :  $\Delta$ SFE とその成分( $\Delta$ X)の相関。青が  $\Delta U_{uv}$ 、赤が  $\Delta U_{vm}$ 。丸が純水中環境下、三角が 8M 尿素水溶液環境下。

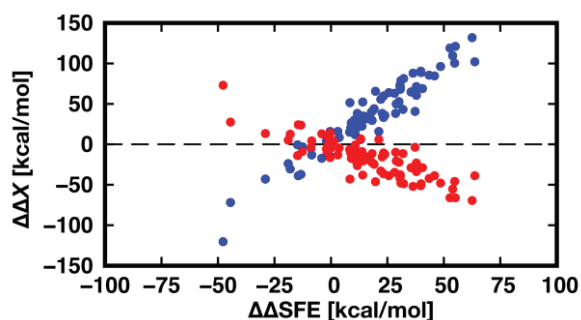


図 2 :  $\Delta\Delta$ SFE とその成分( $\Delta\Delta$ X)の相関。青が  $\Delta\Delta U_{uv}$ 、赤が  $\Delta\Delta U_{vm}$ 。丸が純水中環境下、三角が 8M 尿素水溶液環境下。

### 3. 計算結果

$\Delta\Delta\text{SFE}$  の計算値は  $16.7 \pm 1.8 \text{ kcal/mol}$  であった。8M 尿素添加前後の BFE の差の実験値が  $1.6 \text{ kcal/mol}$  であること [2] から、 $\Delta\Delta\text{SFE}$  のみの計算でも尿素添加による Lysozyme-(GlcNac)<sub>3</sub> の結合親和性低下を定性的に再現できることがまず明らかとなった。

次に Lysozyme と (GlcNac)<sub>3</sub> の結合の駆動及び阻害力を特定するため、 $\Delta\text{SFE}$  を溶質-溶媒相互作用項 ( $\Delta U_{\text{uv}}$ ) と溶媒再配向項 ( $\Delta U_{\text{vo}}$ ) に分割した。図 1 に示すように、純水中及び 8M 尿素水溶液中において、 $\Delta U_{\text{vo}}$  が Lysozyme と (GlcNac)<sub>3</sub> の結合を駆動し、逆に  $\Delta U_{\text{uv}}$  は結合を阻害する傾向にあることが明らかとなった。 $\Delta\Delta\text{SFE}$  を同様に分割すると (図 2)、8M 尿素水溶液中では純水中に比べ、結合に伴う溶媒再配向の利得が多い一方で、溶質-溶媒相互作用が結合を阻害する傾向にあることにより、結合親和性低下が起こることが明らかとなった。

### 4. 今後の展望

8M 尿素添加による Lysozyme と (GlcNac)<sub>3</sub> の結合親和性低下を MD と ER 法による自由エネルギー計算によって定性的に再現し、共溶媒濃度依存性の暫定的な結果を得ることが出来た。今後は 2M, 6M 及び 4M 尿素水溶液中での  $\Delta\text{SFE}$  計算を実施し、結合親和性低下の濃度依存性の物理起源の解明を目指していく。

### 参考文献

- [1]: T. Yamada, T. Hayashi, S. Hikiri, N. Kobayashi, H. Yanagawa, M. Ikeguchi, M. Katahira, T. Nagata and M. Kinoshita *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 8, 3533–3544, (2019).
- [2]: L. Stepanian, I. Son, and T. V. Chalikian *Biophys. Chem.*, **231**, 15–19, (2017).
- [3]: S Hikiri, T Hayashi, M Inoue, T Ekimoto, M Ikeguchi, M Kinoshita. *J. Chem. Phys.*, **150**, 175101, (2019).
- [4]: S. Hikiri, T. Yoshidome and M. Ikeguchi *J. Chem. Theory Comput.*, **12**, 5990–6000, (2016).