

薬用低分子構造に着目したインスリン解離における 共溶媒和自由エネルギー解析

肥喜里 志門

大阪大学 大学院基礎工学研究科 (現所属: 立命館大学生命科学部生命情報学科)

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)は、結合親和性の指標であり、創薬の現場でも用いられ、重要な熱力学量である事は論を俟たない。系を全原子レベルで取り扱った分子動力学シミュレーション(以降 MD とする)を用いてこの熱力学量を計算する際、着目する分子(水溶性タンパク質、膜タンパク質及びこれらに結合する低分子等)の周りを囲む溶媒として、水分子や脂質二重膜分子のみが考慮されることが多い[1]。一方で、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、水分子や脂質二重膜以外の分子(共溶媒分子)も自己組織化過程に影響を与える[2]。

実験における創薬研究の一例として、インスリン速攻化のために、添加分子に着目した超速効化インスリン製剤の開発が試みられている[3]。一方で、この様な添加剤によるインスリン解離への理論的な知識の蓄積が少ないのが現状であり、共溶媒添加効果を取り入れた結合自由エネルギー計算が求められる。

本研究では生体分子の自己組織化過程の内、ペプチド解離に着目し、具体的な対象としてインスリン2量体の解離を取り扱った。自由エネルギー計算を実施し、共溶媒分子添加による影響及びその物理起源を求めることを目的とした。共溶媒分子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[4]。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) [5]を採用した。

2. 計算方法

インスリン 2 量体(PDB ID: 2JV1)及び単体(PDB ID: 5BTS)の構造サンプリング MD 計算を水分子 40000 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、インスリンの力場には AMBER99SB を使用した。GROMACS 2019.5 を用いて、系のエネルギーミニマイズの後、温度 298.15 K 及び圧力 1.0 bar の NPT 条件下で平衡化 MD を実行し、その後 100ns のプロダクション MD を行い 2 ns 毎の溶質構造(構造数 50)をサンプリングした。

次に ER 法[5]における SFE 計算を実施した。この計算において、溶媒のみの系(Refs 系)及び溶質と溶媒からなる系(Soln 系)の溶媒構造の MD サンプリングが必要である。この MD はいずれも NVT 条件下で 5 ns 実施した。Refs 系は純水系及び濃度 1M の共溶媒水溶液系についての MD 計算、Soln 系においてはインスリン 2 量体及び単量体の構造サンプリング MD 計算により得た溶質構造を固定し、溶媒分子のみを動かす MD を実施した。対象とする共溶媒分子は小さく基本的な構造を持つメタノール、エタノール、フェノール、エチレングリコール、尿素、トリメチルアミン-N-オキシド、薬用低分子構造を持つベンズニトリル、ベンズアミド、アセトアミノフェン及びサリチルアミドを検討対象とした。これらの共溶媒分子の力場には GAFF を適用した。MD 計算により得た Soln 系及び Ref 系の MD トrajекトリーを用いて SFE 計算を行った。この SFE 計算では MD を用いるため溶媒分子の初期配置依存性が生じることから、1 溶質構造に対して 4 回実施した。純水中及び 1M 共溶媒での溶質構造を固定して SFE 計算を実施している。よって両溶媒中での溶質構造が共通であるため、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[6]の変化の差がゼロとなる。よって、両者の溶媒中での結合自由エネルギーの差を、結合に伴う SFE 変化(Δ SFE)の差($\Delta\Delta$ SFE)により評価した。

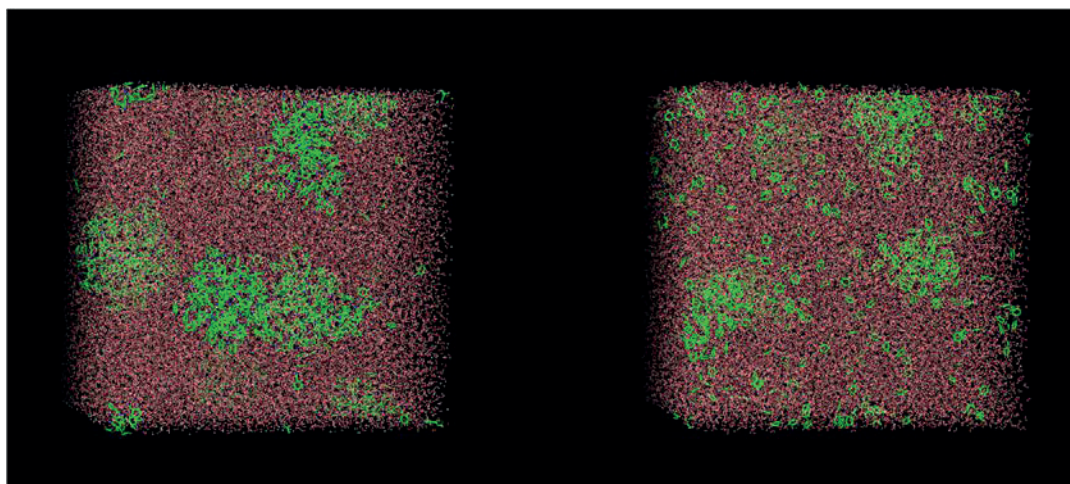


図1. 水分子-1M 共溶媒分子系における共溶媒分子の凝集度合い。構造はいずれも 5ns 後の MD 構造である。左がベンゾニトリルの場合であり、右がフェノールにおける溶媒構造。アセトアミノフェンにおいては強い凝集が存在、フェノールにおいても部分的に凝集構造が存在するが分散している分子も存在。

3. 計算結果

今回検討した共溶媒水溶液の内、メタノール、エタノール、フェノール、エチレングリコール、尿素、トリメチルアミン-N-オキシドについて SFE 計算までの計算を実施し、薬用低分子構造を持つベンゾニトリル、ベンズアミド、アセトアミノフェン及びサリチルアミドについては Refs 系の MD 計算 5 ns までを行い、SFE 計算を実施しなかった。その理由は図1に示す通り、これら薬用低分子は水中で強く凝集してしまうため、SFE 計算における溶媒構造の依存性が強く生じると判断されたためである。よって、メタノール、エタノール、フェノール(ただし部分的な凝集は存在(図1))、エチレングリコール、

表1. インスリン二量体と単量体の SFE 及び $\Delta\Delta$ SFE の計算値。単位はいずれも kcal/mol. UREA, MOH, EOH, PHE, EGL 及び TMAO はそれぞれ尿素, メタノール, エタノール, フェノール, エチレングリコール, トリメチルアミン-N-オキシドを意味する。

	SFE _{二量体}	SFE _{単体}	$\Delta\Delta$ SFE
純水中	-879.01±1.78	-582.74±2.02	
UREA	-878.23±1.77	-585.80±2.04	6.89±0.48
MOH	-889.68±1.78	-587.95±2.01	-0.24±0.44
EOH	-902.33±1.79	-593.84±2.02	-1.11±0.47
PHE	-960.97±1.83	-622.42±2.03	-2.59±0.684
EGL	-911.18±1.78	-600.48±2.03	3.31±0.45
TMAO	-909.33±1.77	-599.19±2.03	2.58±0.46

尿素、トリメチルアミン-N-オキシドについての結果について示す。

SFE 計算値の 95%誤差が二量体及び単量体において、5kcal/mol を下回っており、どの共溶媒分子においても、概ね収束した値が得られている(表1)。また、 $\Delta\Delta$ SFE 計算の結果、尿素、エチレングリコール及びトリメチルアミン-N-オキシド水溶液中においてインスリン解離が促進され、エタノール及びフェノールにおいて解離阻害されることが示唆された(表1)。メタノールに関しては計算誤差の観点から純水中と解離の程度は変わらないと判断される。解離の促進及び阻害の起源を求めるため、駆動及び阻害力を特定するため、SFE を溶質-溶媒相互作用項(SFE_{UV})と溶媒再配向項(SFE_{VV})に分割し、結合に伴

表2. $\Delta\Delta$ SFE, $\Delta\Delta$ SFE_{UV} 及び $\Delta\Delta$ SFE_{VV} の計算値。単位はいずれも kcal/mol. UREA, MOH, EOH, PHE, EGL 及び TMAO はそれぞれ尿素, メタノール, エタノール, フェノール, エチレングリコール, トリメチルアミン-N-オキシドを意味する。

	$\Delta\Delta$ SFE	$\Delta\Delta$ SFE _{UV}	$\Delta\Delta$ SFE _{VV}
UREA	6.89±0.48	16.82±0.85	-9.92±0.58
MOH	-0.24±0.44	-0.22±0.70	-0.01±0.45
EOH	-1.11±0.47	-1.85±0.72	0.73±0.48
PHE	-2.59±0.684	-5.44±1.20	2.85±0.79
EGL	3.31±0.45	5.66±0.19	-2.34±0.47
TMAO	2.58±0.46	1.57±0.70	1.00±0.59

うこれらの変化の純水中からの差($\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV}}$ 及び $\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{VV}}$)を求めた(表 2)。全体として $\Delta\Delta\text{SFE}$ の符号と $\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV}}$ が同じで強い相関であり、対する $\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV}}$ では逆である傾向である傾向が強く、各共溶媒の特徴的な効果を弱めることが示唆される。さらに、 $\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV}}$ を静電項($\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV,elec}}$)及び非静電項($\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV,noelec}}$)へと分割すると(表 3)、どの共溶媒に関しても非静電項が解離促進、静電項が解離阻害に寄与しており、その打ち消し合いの程度により共溶媒添加効果の特徴が生まれていることが示された。

表 3. $\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV}}$, $\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV,noelec}}$ 及び $\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV,elec}}$ の計算値。単位はいずれも kcal/mol. UREA, MOH, EOH, PHE, EGL 及び TMAO はそれぞれ尿素, メタノール, エタノール, フェノール, エチレングリコール, トリメチルアミン-N-オキシドを意味する。

	$\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV}}$	$\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV,noelec}}$	$\Delta\Delta\text{SFE}_{\text{UV,elec}}$
UREA	16.82±0.85	17.97±0.88	-1.14±0.72
MOH	-0.22±0.70	4.10± 0.34	-4.33±0.83
EOH	-1.85±0.72	8.51±0.50	-10.36±0.96
PHE	-5.44±1.20	30.01± 1.21	-35.46±1.97
EGL	5.66±0.19	10.40±0.59	-4.74±0.73
TMAO	1.57±0.70	8.59±0.53	-7.01±0.84

4. 今後の展望

本課題研究において、小さく基本的な構造を持つ低分子及び薬用低分子の構造を持つものを共溶媒分子としてインスリン2量体解離における共溶媒和自由エネルギー解析を実施した。前者の低分子群においては、解析を実施することで共通の物理起源を得ることができた。その一方で後者の低分子群においては凝集が起こることから SFE 計算における溶媒構造の依存性が強く生じることが示唆された。今回は共溶媒分子の濃度を 1M に固定して検討をおこなっており、今後より低濃度の共溶媒条件下での検討を行うことで、凝集の問題が解決されると期待される。

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]: Mann *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, **12**, eaba6676 (2020).
 [4]: S. Hikiri, T. Hayashi, M. Inoue, T. Ekimoto, M. Ikeguchi, M. Kinoshita. *J. Chem. Phys.*, **150**, 175101, (2019).
 [5]: S. Sakuraba; Matubayasi *J. Comput. Chem.*, **35**, 1592–1608, (2014).
 [6]: S. Hikiri, T. Yoshidome and M. Ikeguchi *J. Chem. Theory Comput.*, **12**, 5990–6000, (2016).