

シミュレーション技術を活用した分子構造基盤薬物設計の研究(第2報)

工業材料科 主任研究員 重光保博

本研究の目的は、電子レベルの第一原理シミュレーションを中核技術として「鍵と鍵穴モデル」に基づくモデル計算を実行し、創薬技術としての有効性を検証することである。第1報では、小タンパク質 DJ-1 をターゲットとした予備計算を行い、(1) Cys106 近傍の残基配置の解析 (2) 活性 / 非活性化合物 Compound A,B/C の電子状態計算の結果、鍵 - 鍵穴フィッティングの重要な情報である HOMO/LUMO 軌道分布や静電ポテンシャル分布を求めた。第2報では、FMO(Fragment Molecular Orbital) 法を用いて DJ-1 に対する全電子計算を実行し、「鍵穴」近傍のアミノ酸残基相互作用解析を行った。

1. 緒言

新薬開発の最初のステップは候補化合物を効率よく発見することであるが、特定分子種に偏らないよう化学的多様性を有する候補化合物をバランス良く選出することが後の最適化ステップにおいて重要となる。創薬の現場では、大規模な化合物ライブラリをコンビナトリアルケミストリ (CC) で合成し、その活性をハイスループットスクリーニング (HTS) によって高速に判定する手法が普及している。しかし偶発的発見に頼る絨毯爆撃的探索では、膨大なコストに見合う成果を出すことがしだいに困難になっている。コンビナトリアルケミストリでは、ケミカルスペース内の化学的多様性を十分に反映させることが難しいことが原因と考えられ、この問題解決のためケモインフォマティクスやシミュレーション手法の導入によるケミカルスペース内探索の均等化・効率化が模索されている。

標的タンパク質や候補化合物の立体構造情報に基づいた創薬 (Structure Based Drug Design: SDBB) は、探索の有力な手法であり、高精度な第一原理シミュレーションの活用が期待されている。薬効発現は複雑な代謝系を構成する高度に組織化された化学反応群から構成されており、各反応に関与する化合物の分子原子レベルの知見によって記述されるため、信頼性の高い創薬技術には量子力学に基づく第一原理シミュレーションが必要となる。現代の量子力学計算は、以前はアプローチ不可能であった生体高分子をその解析ターゲットとしつつある。SDBB の現場では、候補化合物の構造情報 (Ligand-base) や標的タンパク質の構造情報 (Structure-base) を用いて、化合物ライブラリの精密化が試みられている。実際 G タンパク質共役受容体 (GPCR) に対する Structure-base フォーカストラライブラリが構築され、探索効率化が実証されている^[1]。

疾病の標的タンパク質やリガンドの多くはその構造が未知であるが、第一原理生体分子シミュレーションはこのような場合において SDBB を可能にする汎用的手法として期待される。

2. 手法

2.1 Fragment MO(FMO) 法^[2]

従来の古典的計算法では、計算精度が不十分なため SDBB には信頼性限界がある。一方、高精度な第一原理計算は計算負荷が大きいため、巨大系に対応した理論と計算手法が必要となる。FMO 法はこの問題を解決する有力な手段であり、巨大分子を小さな構造単位 (Fragment) で分割し、各 Fragment の個別エネルギーを用いて、全系のエネルギーを外挿する手法である。計算コストを大きく軽減しつつ、従来の第一原理計算と同等の定量精度を保持しているため、水素結合や CH/π 結合などの弱い相互作用が重要となる生体高分子の計算にも適応可能である。Fragment 間の相互作用も解析でき、タンパク質 - リガンド結合をアミノ酸残基単位で求めることができる利点もある。インフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質 - 受容体の相互作用解析^[3]などに適用され、生体分子を対象にした大規模高精度シミュレーションの有効性検証が進んでいる。

2.2 DJ-1 タンパク質^[4]

ChainA/B からなる小タンパク質 DJ-1 (約 22kDa, 378 残基) (図 1) は、家族性パーキンソン病 PARK7 因子をはじめ、活性酸素制御、生殖機能、乳がんバイオマーカーなど様々な機能に関与していることが報告されている。Chain A 中に存在する Cys106 の酸化による変異が重要な役割を果たしていると考えられ (図 2)、このサイトに結合するアンタゴニストを *in silico* スクリーニングを用いて化合物ライブラリから絞り込み、水晶振動子マイクロバランス法で求めた結合親和性と一致した結果が得られている^[4]。酸化型/還元型 DJ-1 のそれぞれに対して、約 30000 個の化合物ライブラリから、酸化型/還元型の Cys106 サイトとのドッキングスコアが高い化合物 (Compound A, Compound B)、酸化型とのドッキングスコアが低い化合物 (Compound C) のバーチャルスクリーニングを実行し、それらのサイト親和性が実験結果と一致することが示されている^[4]。

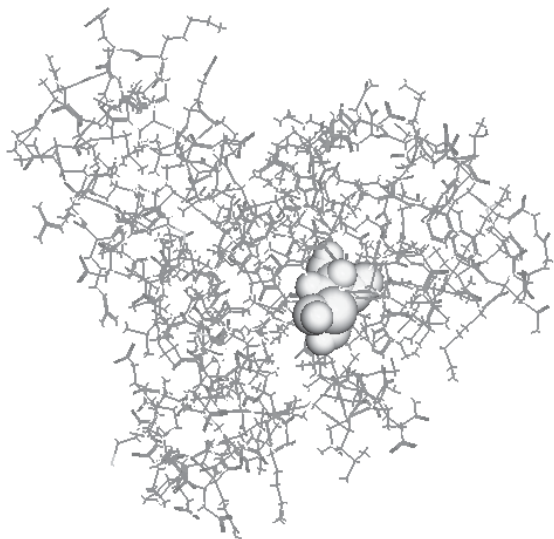


図 1 DJ-1 タンパク質 (3EZG: Chain A) の構造と活性サイト C106 (酸化型)

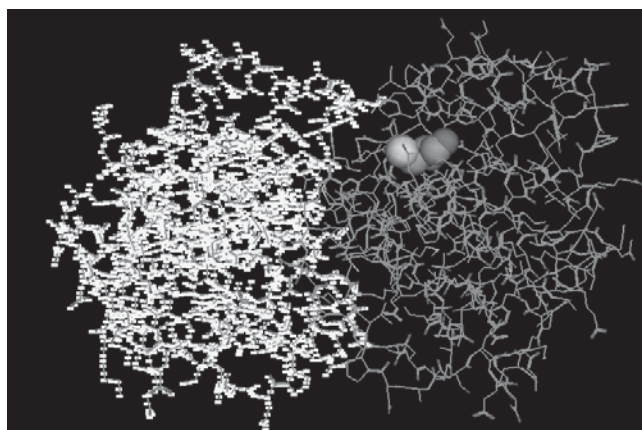


図 2 DJ-1 の Chain A (stick 表示) と Chain B (黄色標記) および活性サイト C106 (CPK 表示) (還元型)

3. 解析結果

還元型 DJ-1 は Honbou らによる dimer データ (IUCF)^[5]、酸化型 DJ-1 は Blackinton らによる monomer データ (3EGZ)^[6] をそれぞれ用い、分子動力学法 (AMBER ver.11 amber03 力場) によりエネルギー極小化の後、Ins の MD 平衡化によって構造を決定した。還元型 DJ-1 の Chain A について Hartree-Fock レベルで FMO/6-31G(d) 計算を実行し、PIEDA 解析 (Pair Interaction Energy Decomposition Analysis) によって Cys106 付近のアミノ酸残基相互作用を解析した。FMO 計算には GAMESS-US を使用し、FMO 計算の入力作成および PIEDA 解析の可視化には FACIO を用いた。HF-FMO 計算は、2 体近似までで打ち切った。計算プラットフォームは、HPC-5000WS および FUJITSU PRIMEQUEST580/HITACHI SR-16000 (九州大学情報基盤研究開発センター) を使用した。

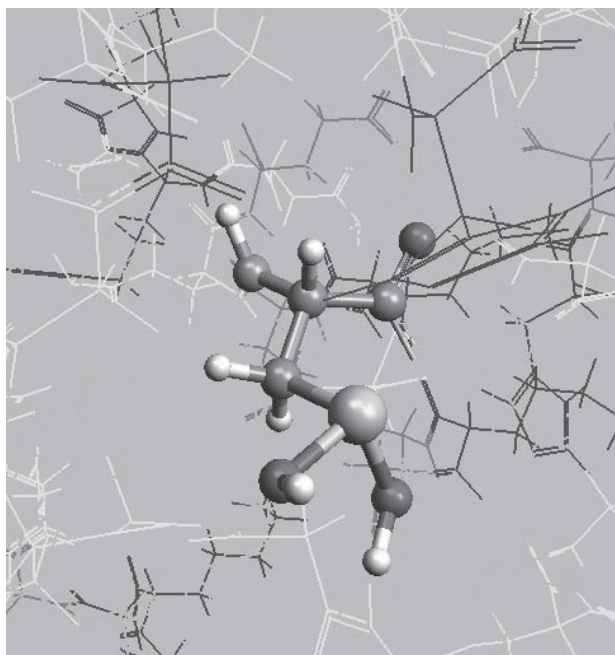


図3 DJ-1 活性サイト C106 の拡大図 (酸化型)

MDによって得られた平衡構造では、活性中心 Cys106 の硫黄原子 (S764) 近傍 3.5 オングストローム以内に存在するアミノ酸残基は、それぞれ GLU18/

HIS126/ARG156 (還元型)、GLU18/GLY75/HIS126/ARG156 (酸化型) であった (図3)。酸化に伴う大きな構造変化は起こっていないと考えられるが、酸化型では GLY75 の O536 が近接領域に入ってくる。これはスルフィン化に伴う微妙な構造変化を反映していると考えられる。還元型においては、Cys106 近傍には Chain B は存在せず、Chain 間の相互作用が及ぼす影響は無視できると考えられる。Cys106 は Chain A の表層部に位置しており、ちょうど HIS126 のイミダゾール基が「蓋をする」構造をとっている。S764 との主要な相互作用は HIS126 (N899) と推定され、硫黄原子のソフト性を考慮すると静電力のみではなく、 $\pi - \pi$ や $\sigma - \pi$ といった軌道相互作用が大きな役割を果たしていると推定される。

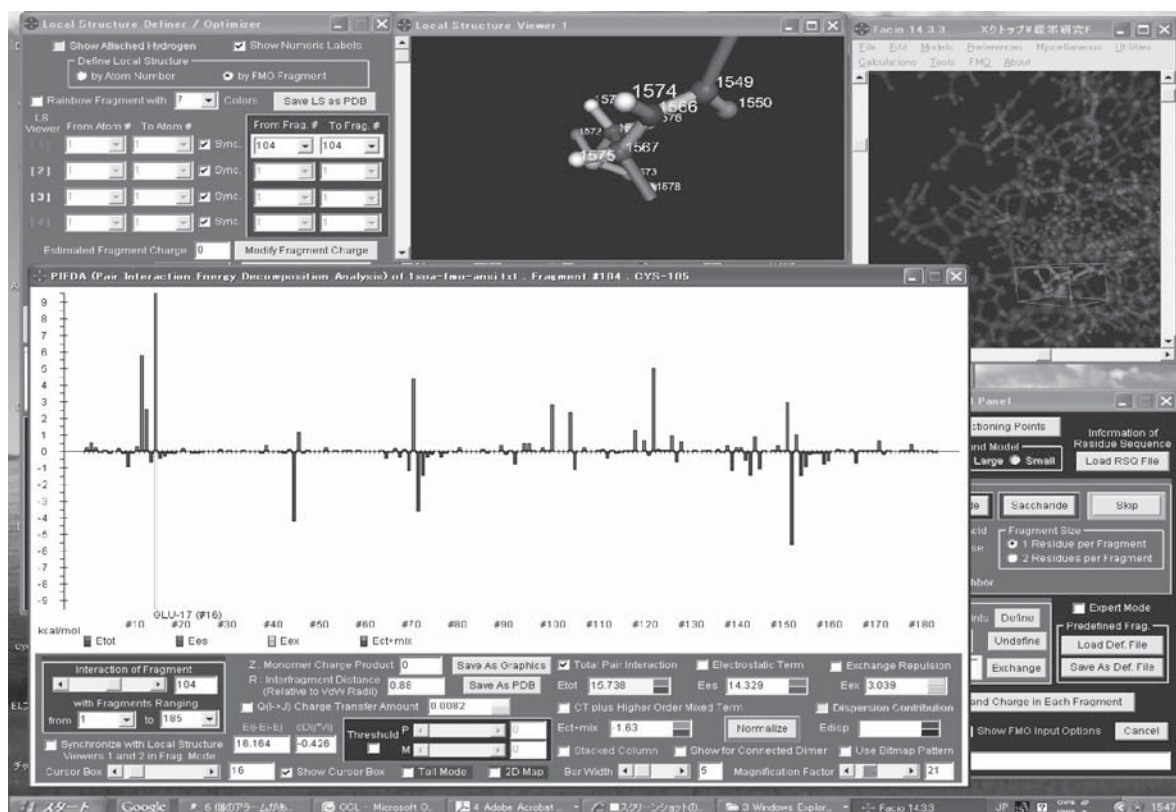


図4 還元型 DJ-1(1-UCF:Chain A) の HF-FMO/6-31G(d) 計算と PIEDA 解析

1-UCF(Chain A) に対する PIEDA 解析の結果、Cys106 との間で、GLU18 および HIS126 の強いクーロン相互作用、ARG156 との間で強い交換相互作用が見出された (図 4)。これらの結果は、MD 計算によって得られた Cys106 近傍のアミノ酸配置と良い一致を示している。

4. 結 言

本研究では、第一原理計算に基づく高精度 *in silico* スクリーニングの有効性の確認、すなわち予測結果の改善を検証することが最終目的である。DJ-1 をターゲットとした FMO 計算を行い、PIEDA 解析を用いて受容体近傍のアミノ酸残基相互作用を解析した。今後、受容体近傍を切りだし、メラプレセット 2 次摂動計算によってさらに高精度な FMO 計算を実行する。今後、受容体近傍の知見を基にして、Compound A,B,C の安定配座の数種類についてドッキングシミュレーションを実行し、タンパク質 - リガンド間の相互作用を詳細に分析する (図 5)。

参考文献

- [1] 古谷利夫、CICSJ Bulletin, 23, 143 (2005)
- [2] 北浦和夫、近畿化学協会コンピューター化学部会例会資料 (2007)
- [3] T.Iwata, U.Mocihzuki, S.Tanaka et al., Comp.Biol. Chem., 32, 198 (2008)
- [4] S.Miyazaki, T.Yanagida, M.Ariga et al, J.Neurochemistry, 105, 2418-2434 (2008)
- [5] K.Honbou, N.N.Suzuki, M.Horiuchi et al., J.Biol. Chem. 278,31380 (2003)
- [6] J.Blackinton et al, J.Biol.Chem. 284,6476 (2009)

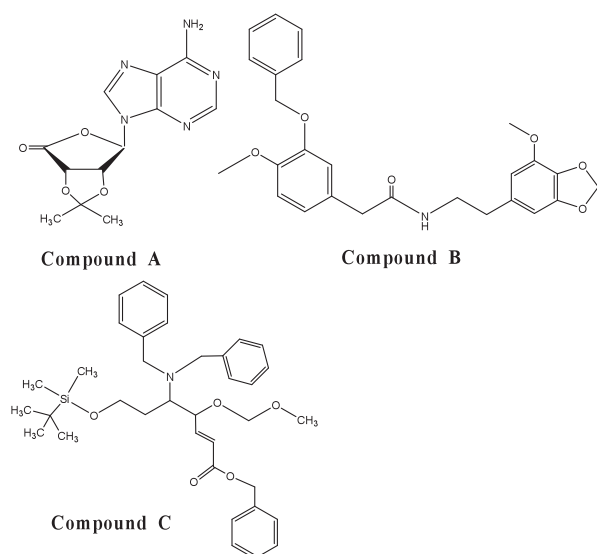


図 5 リガンド化合物