

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3報)

工業材料科 主任研究員 重光保博

標記研究課題(平成21-23年度)の総括として、研究目標・達成項目・今後の課題について報告する。本課題の目的は、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」に基づく創薬技術の有効性を検証することであった。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。本第3報では、DJ-1とCompound A,B/CについてドッキングスタディおよびMM(QM)-PBSA法による結合自由エネルギー計算を行い、実験値と比較検討した。

1. 緒言

近年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)に対して、高精度な第一原理シミュレーションの導入が活発に研究されている。これは、計算インフラやソフトウェアの発展の結果、従来は不可能であった高コスト計算をタンパク質へ適用する環境が整ってきたことが大きい。

創薬の出発点となるリード化合物の探索・選択は、構造最適化、in vitroスクリーニング、臨床試験、市場化に至る一連のプロセスにおいて、成否を決める大きな要因である。コンビナトリアルケミストリ+ハイスループットスクリーニングによる網羅的探索は、必ずしも化学的多様性を十分に反映したケミカルスペース探索に結びつかないケースも多いため、SDBBやインフォマティクス解析との融合によって、リード化合物の合理的選択が試みられている。また、インシリコSDBBはリード化合物の最適化手法として広く普及しており創薬現場で活用されている。

本研究では、インシリコSDBB創薬の有効性検証を目的として、小タンパク質DJ-1(図1)と3種類のリガンドCompound A,B/C(図2)に対して、実験的に求められている結合自由エネルギーと理論計算値との比較検討を行った^[1]。

2. 手法

2.1 Fragment MO(FMO)法^[2]

FMO法は、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

を保持しているうえに、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間の相互作用解析によって、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。

2.2 DJ-1タンパク質

神経細胞の消失に従って序々に進行するパーキンソン病(家族性PARK7因子)は、Chain A/Bからなるタンパク質DJ-1(約22kDa, 378残基)の酸化変性による機能喪失が一因と考えられている^[3]。

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、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]。

2.3 シミュレーションおよび評価

還元型(正常)DJ-1の初期構造として、Protein Data Bankの1UCF^[5]を用いた。1UCFはchain A,Bからなる2量体であるが、本研究にはCYS106が属するChain Aのみを用いた(CYS106周辺サイトはChain Bから十分離れており相互作用が小さいことを確認)。

リガンドとして、CYS106に特異的に結合する化合物2種(Compound A, Compound B)および結合しない1種(Compound C)^[4]を用いた。DFT(B3LYP)/6-31G(d)レベルで構造最適化後、RESP電荷を求めてGAFF力場と共に割り付けた。compound C中のケイ素原子にはGAFF力場パラメーターがないため、sp³炭素で代用した。

1UCFから結晶水を省き、CYS106周辺20Å以内をbinding siteとして選択し、Compound A,B,Cとのドッキング計算を行い、最安定ポーズをMD計算の初期構造とした。

MD計算は、12x12x12 cubic cell中に上記構造を浸して周辺に水(TIP3P)を配置して周期境界条件を課し、AMBER03力場によるエネルギー極小化、昇温(50ps)、密度平衡化(50ps)、平衡化(500ps)の後、1atm、300Kで10nsのNPT-production runを実行した。

ドッキング計算にはArguslab ver.4 (スコア関数 Argusdock, flexible docking)、MD計算・トラジェクトリー解析・MM-PBSAにはAMBER ver.11、FMO計算(one-layer RHF,MP2/6-31G(d): 2体相互作用近似)にはGAMESS-US ver.2009を用いた。

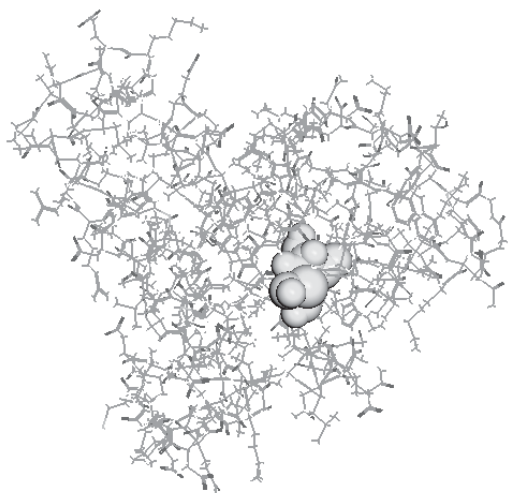


図1 DJ-1タンパク質(3EZG: Chain A)の構造と活性サイトC106(CPK表示)

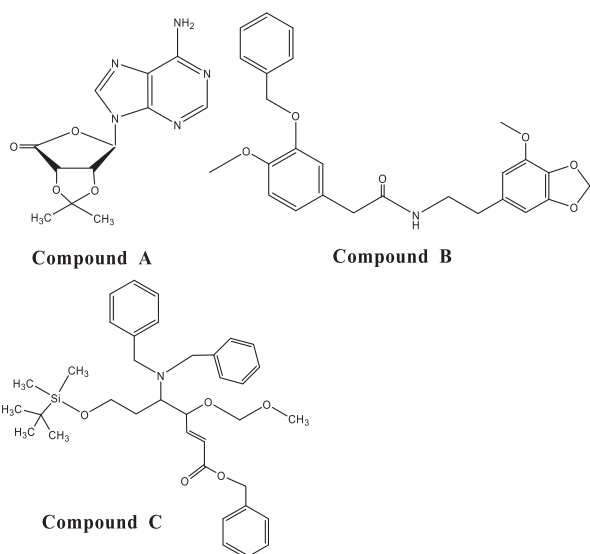


図2 使用した3種のリガンド化合物

3. 解析結果と議論

約30000個の化合物ライブラリから、DJ-1のCys106サイト近傍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の結果、それらのサイト親和性が実験結果と一致することが報告されている^[4]。

まず、この検証を目的として、Arguslab ver.4によるドッキングスタディを行った。

1UCF結晶構造を用いたドッキング計算では、Compound A,BはCompound Cよりも大きなスコア値(結合エネルギー)が算出され、実験結果を定性的に再現するが、スコア値の差は小さい(3kcal/mol以内)。1UCFとcompound Aとのドッキングスコアについて構造変化の影響を調べるため、結晶構造I(水分子を全て除去)/結晶構造II(ポケット内の4つの水分子を残す)/最適化構造(AMBER03力場)/MDスナップショット(2 ns)の各4ケースを比較すると、相対差は2kcal/mol以内に収まっており、ドラスティックな構造変化は起きていないことが示唆される。

1UCF+Compound A/B/Cの3ケースについて、MD計算のトラジェクトリー解析を行い、backbone C α 炭素のRMSDを計算した結果、3つとも2.5 nsでほぼ平衡化が達成されていると判断された(図3)。1UCF+Compound A系について、compound Aと近傍アミノ酸残基との重心距離の時間発展を解析した。5-15 Åの範囲で比較的大きな揺らぎが観測され、2.5ns以降に重心距離が全体的に大きくなって乖離の兆候が観測された(図4)。

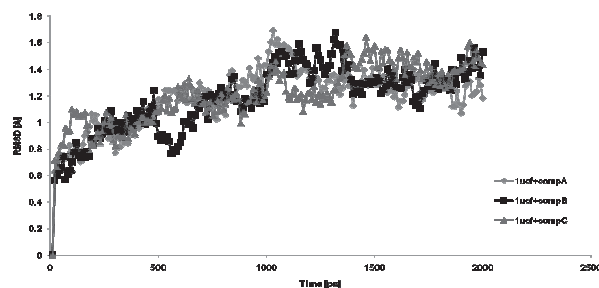


図3 1UCFとCompound A,B,C系に対するBackbone CのRMSD値の時間変化

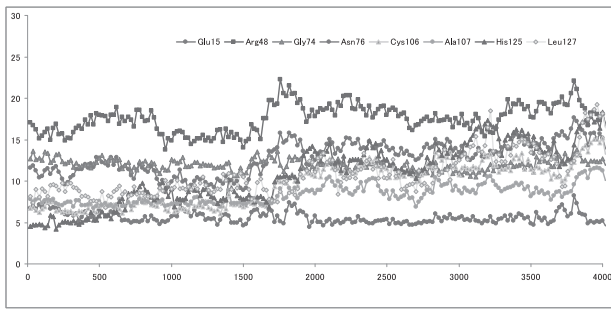


図4 compound Aと1UCF各近傍フラグメントとの重心距離時間変化

次に2-2.5 nsのスナップショット100枚を用いて、MM-PBSA計算を行った。MM-PBSA計算では、力場項・溶媒和項・エントロピー項のスナップショット平均和として結合自由エネルギーを算出した。力場項については、FMOによっても別途算出した(QM-PBSA)。溶媒和項のうち、非分極項についてはSCRF法ではなく、従来のsolvent accessible surface area (SASA)を用いて計算した。エントロピー項はAMBER ver.11のNABモジュールを用いて計算した。

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{Solv}^{PBSA} - T\Delta S$$

$$G_{Solv} = G_{Solv}^{polar} + G_{Solv}^{non-polar}$$

結合エネルギーが正になった原因として、エントロピー項の問題と推定される。QMによる力場項の再評価の結果、MMより大きな安定化エネルギーが得られるが、MP2によるdispersion項の考慮が必須であり、HFレベルではMMよりも悪化する(表1)。

表1 MM(QM)-PBSA による結合自由エネルギー計算値と実験値の比較

	ΔE_{MM}		ΔE_{MM}^{QM}		ΔG_{Solv}^{polar}		$\Delta G_{Solv}^{non-polar}$		$-T\Delta S$	ΔG (kcal/mol)				
	ΔE_{MM}	ΔE_{MM}^{QM}	$\Delta E(MP2)$	$\Delta E(HF)$	GBSA	PBSA	GBSA	PBSA		GBSA		PBSA		Exp ^(a)
										MM	MP2	MM	MP2	
CompA	-24.2	-33.0	-20.7	-6.90	38.3	40.1	-1.73	-2.99	18.8	-3.25	34.6	-0.14	35.2	-9.37
CompB	-10.7	-32.1	-5.15	-7.14	23.2	26.8	-3.16	-3.94	25.6	2.02	40.5	6.36	43.3	-8.02
CompC	-7.01	-31.1	-24.0	-4.56	20.0	29.2	-3.26	-4.65	34.3	11.4	27.0	20.6	35.1	—

^(a) $\Delta G = RT \ln(K_i) = 1.364 \log(K_i)$ (at 298.15K)

次に、1UCF+compound A,Cについて、フラグメント相互作用解析(IFIE)および結合サイト近傍図を示す。結合自由エネルギーが大きいcompound Aのケースでは近傍アミノ酸残基との特異的相互作用が現れるいっぽう(図5、図6)、親和性が観測されないcompound Cのケースでは特異的IFIEが現れず全体に分散していることが明瞭である(図7、図8)。

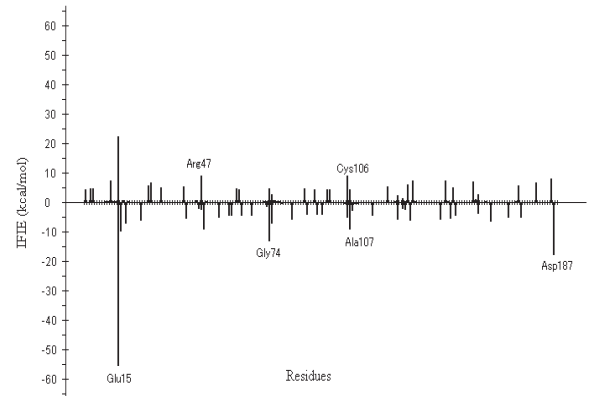


図5 compound Aと1UCFのIFIE

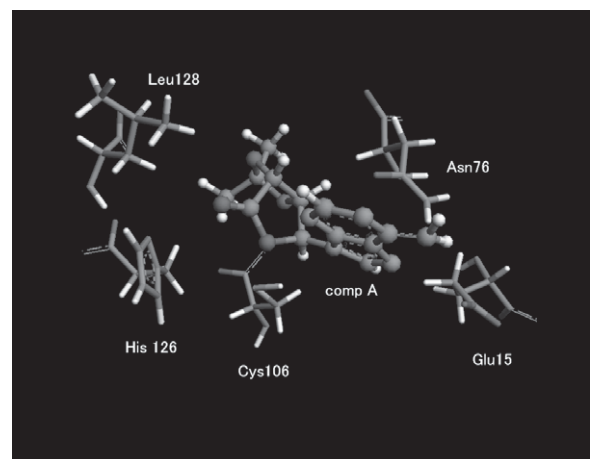


図6 compound Aと近傍アミノ酸残基

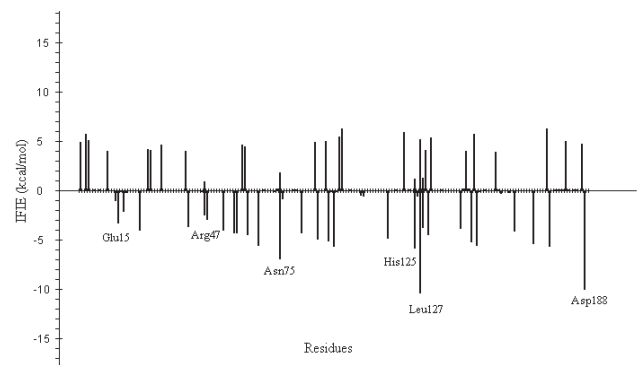


図7 compound Cと1UCFのIFIE

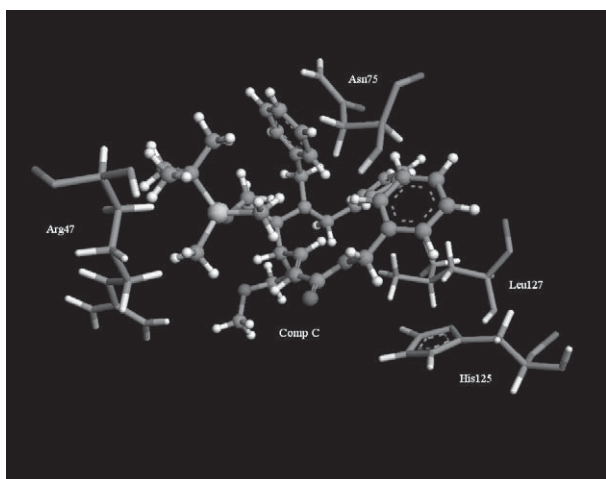


図8 compound Cと近傍アミノ酸残基

4. 結言

本研究課題では、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検証が目標であった。DJ-1のCys106近傍を受容体ターゲットとしてCompound A,B,Cとのドッキングスタディを行い、力場・MM-PBSA・QM(FMO)-PBSAによる結合親和性を評価した。MM-PBSAとQM(FMO)-PBSAにおいて顕著な結合自由エネルギー改善は得られなかったが、これは各寄与項の誤差相殺がMM-PBSAレベルで良好に働いたためと推測される。エントロピー項はDJ-1の振動解析(力場レベル)に基づいて評価したために大きな誤差を内包していることに加えて、PBSAスキームに基づく溶媒項の定量性にも限界があると考えられる。

今後の課題として、結合自由エネルギーに対する上記各寄与項の計算精度向上が挙げられる。現在のリガンド-タンパク質相互作用の定量的評価手法は、相互作用部位の量子力学的評価に加えて、溶媒効果やエントロピー項の定量的評価が障害になっている。この問題を解決できれば真に実用レベルのIT創薬が期待される。また、Induced-Fitのようにターゲットタンパク質の構造揺らぎが本質的である場合には、ms～sスケールの超長時間MD計算も必要となる。本研究課題の最終ミッションである長崎県内でのIT創薬振興へ貢献するため、最先端の計算インフラを用いた先駆的研究手法を今後も積極的に導入してゆく予定である。

5. 謝辞

本研究課題のうち、FMO計算の一部は九州大学情報基盤研究開発センターの計算機システムで実行した。

本研究課題の遂行にあたり、以下の関係各位のご厚意とアドバイスに感謝する。

有賀寛芳教授(北海道大学薬学研究院)：DJ-1に関する生化学データ

山邊時雄特任教授(長崎総合科学大学)：創薬シミュレーションの展望

北浦和夫教授(京都大学大学院薬学研究科)：FMO法の使用法

末永正彦講師(九州大学理学部)：フラグメント分子軌道法GUI「FACIO」の使用法

参考文献

- [1] Shigemitsu, Y.; *Int.J.Quant.Chem.* (in press 2012)
- [2] Kitaura, K.; Fedrov, D.G. (Eds.), *The Fragment Molecular Orbital Method*, CRC press, 2009.
- [3] Zhou, W.; Zhu, M.; Wilson, M.A.; Petsko, G.A.; Fink, A.L.; *J.Mol.Biol.*, 2006, 356, 1036.
- [4] Miyazaki, S.; Ariga, H.; et al. *J Neurochemistry* 2008, 105, 2418.
- [5] Honbou, K.; Suzuki, N.; Horiuchi, M.; et al., *J.Biol. Chem.* 278 31380 (2003)
- [6] Blackinton, J.; et al, *J.Biol.Chem.*284 6476 (2009)