

## の開発

(北里大学薬学部) ○渡辺佳晃、竹田-志鷹真由子、荒井亮一、加納和彦、  
高谷大輔、小松克一朗、岩館満雄、梅山秀明

### 【はじめに】

X 線結晶構造解析や NMR により数多くのタンパク質の立体構造は解明され、これを利用した薬物設計は、医薬品開発において非常に重要な技術として認知されている[1, 2, 3, 4, 5]。タンパク質とリガンドとの結合に関する特徴としては、まず立体的相補性が挙げられ、結合の特異性を高める役割を果たしている。さらに重要な特徴としては、結合の誘導適合が挙げられる。これは、溶液中のタンパク質の立体構造が、わずかに異なる多くの構造の間を移り変わってゆらいでおり(動的挙動)、これにリガンドなどが結合すると、結合が可能な構造のみに固定され、結果的にはリガンドがタンパク質の構造を結合に適したように変える物理化学的性質のことである。

タンパク質の立体構造を用いたリガンド探索プログラムは多く知られているが、タンパク質とリガンドとの結合に重要な「誘導適合」の部分を充分に考慮しているものは少ない。そこで本研究では、「誘導適合」を考慮した新たなリガンド探索システムを開発することとした。

「誘導結合」は MD(分子動力学)計算によりシミュレーションすることが可能であることが知られている[6, 7, 8, 9, 10]。しかし、該当タンパク質に対して従来方法で MD 計算を行うと、X 線、NMR 等で解析された座標から大きくズレる場合がある。よって、MD 計算を行う場合は各原子に「誘導適合」を反映する程度の拘束をかける必要があるが、拘束条件の設定は煩雑であり、研究者

のスキルが相当必要とされる。そこで、我々は、精度の高い結果を得ることができ、かつ簡易に条件設定を行えるようにするプログラムとして、タンパク質の MD 計算において、初めに基準振動計算を行い、主鎖の二面角揺らぎを求めた後、主鎖の二面角揺らぎに基づいて各原子に拘束をかけて MD 計算する手法(二面角拘束 MD)を開発した。

次に、リガンド探索システムとしては、標的タンパク質の二面角拘束 MD 計算で得られる複数の立体構造座標を用い、これらを一度に処理できるようにプログラムを作成し、タンパク質とリガンドとの相互作用の評価については、「誘導適合」を反映するために、古典力学で用いられている弾性衝突の理論を適応したエネルギー関数を用いて評価する手法を開発した。

本発表では、本システムの開発に関して報告する。

### 【方法】

本システムは、標的タンパク質の基準振動解析から得られる主鎖二面角の揺らぎに基づいて各原子に拘束をかけて MD 計算を行い、リガンド探索では、MD 計算より得られた立体構造座標と弾性衝突の理論を適応したエネルギー項を含む評価関数を用いて標的タンパク質と相互作用しうるリガンドを見出す方法である。本システムの全体的な構成を図 1 を以下に示す。

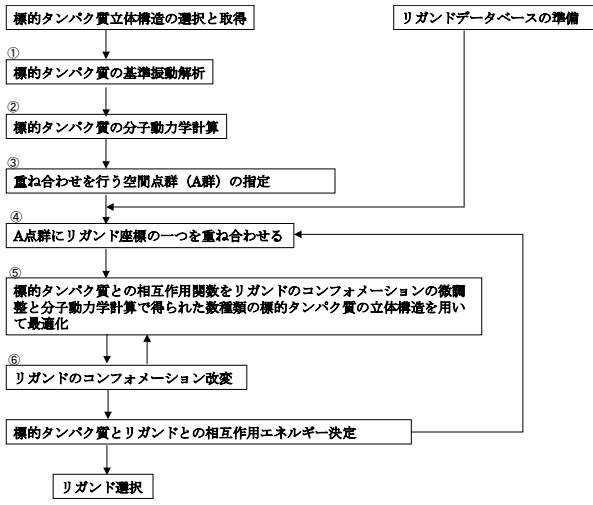


図 1 リガンド探索システム

図 1において本システムの特徴的な部分は①、②、⑤のステップである。そこで、これらのステップについて以下に示す。

### ①標的タンパク質の基準振動解析

標的タンパク質の基準振動解析[11,12,13]（条件：温度 300K）を行い、定常状態における主鎖二面角  $\phi$ 、 $\psi$  の揺らぎを算出した。主鎖二面角  $\omega$  およびプロリンの  $\phi$  における揺らぎは 0.0 とした。

### ②標的タンパク質の分子動力学計算（二面角拘束 MD 計算）

MD 計算において、以下の(式 1)に示す二面角拘束エネルギー項を導入した。①で算出した主鎖の揺らぎ値は力の定数  $K_{rot}$  の部分に対応させ、揺らぎの小さな部分には  $K_{rot}$  を大きな値とし、その部分は  $\phi$  は  $\phi_0$  に拘束されるというように、各二面角に対して不均一な拘束がかかるようにした。

$$Erot = K_{rot}(\phi - \phi_0)^2 \quad (\text{式 } 1)$$

$Erot$  は主鎖原子の二面角拘束エネルギー項。

$\phi$  は主鎖原子の二面角。

$\phi_0$  は主鎖原子の二面角の標準値。

⑤ 標的タンパク質との相互作用関数をリガンドのコンフォメーションの微調整と分子動力学計算で得られた数種類の標的タンパク質の立体構造を用いて最適化

リガンドとの相互作用評価を行う数種類のタンパク質立体構造座標は、二面角拘束 MD 計算の途中経過 100 フェムト sec ごとのタンパク質立体構造を抽出し、全原子に対して初期座標との root mean square(RMS)を算出して、その値がある閾値以上の座標についてとりだすこととした。

タンパク質とリガンドとの相互作用評価関数を(式 2)に示す。

$$\begin{aligned} U_{\text{相互作用評価関数}} = & U_{\text{SAR}} + U_{\text{水素}} + U_{\text{疎水}} \\ & + U_{\text{スタッキング}} + U_{\text{衝突}} \end{aligned} \quad (\text{式 } 2)$$

$U_{\text{SAR}}$  とは、タンパク質中でリガンドとの結合に重要な特定部分がある場合、その部分を占めることで相互作用がより強くなるように定義した関数である。 $U_{\text{水素}}$  とは、タンパク質とリガンドとの水素結合を評価する関数である。 $U_{\text{疎水}}$  とは、タンパク質とリガンドとの疎水相互作用を評価する関数である。 $U_{\text{スタッキング}}$  とは、タンパク質とリガンドとの間の  $\pi-\pi$  スタッキングを評価する関数である。 $U_{\text{水素}}, U_{\text{疎水}}, U_{\text{スタッキング}}$  は、タンパク質中とリガンドとの各原子間距離によって相互作用の強さを評価した関数である。 $U_{\text{衝突}}$  とは、以下の(式 3)、(式 4)によって定義される関数で、古典力学で用いられている弾性衝突の理論をタンパク質とリガンドとの相互作用に適応した関数である。具体的には、二面角拘束 MD 計算の結果、タンパク質のリガンド結合部位で立体構造変化の少ない側鎖原子及び主鎖原子を弾性エネルギーの大きい原子として取り出し、その  $i$  番目の原子とリガンドの  $j$  番目の原子との原子間距離  $R$  が衝突距離  $R_{\text{衝突}}(i, j)$  以内のとき、 $D(i, j)$  を計算するように定義した。

$$U_{\text{衝突}} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N D(i,j) \quad (\text{式 } 3)$$

$$D(i,j) = K_{\text{衝突}} \times (R_{\text{衝突}}(i,j) - R)^2 \quad (\text{式 } 4)$$

$M$  は弾性エネルギーの大きい結合部位の原子の数、 $N$  はリガンドの数、 $K_{\text{衝突}}$  は 1000.0 とした。 $R_{\text{衝突}}(i,j)$  は活性部位の  $i$  番目の原子とリガンドの  $j$  番目の原子それぞれの Van der Waals 半径の和とした。

リガンド座標の微小変化は中心に並進、回転、シングルボンドまわりの角度を RSMD で 0.3 を越えない程度に座標変化させことによって行い、(式 2) で示した評価関数が最少になるように最適化した。

## 【結果】

### 二面角拘束 MD の評価

二面角拘束 MD 計算結果は、二面角拘束エネルギー項を適応しない場合と比較して、タンパク質立体構造の大きな変化が少ない。

以下にその一例としてジヒドロ葉酸還元酵素 (PDB ID:1LUD) を対象にした場合の MD 計算において二面角拘束がある場合(A)とない場合(B)で比較した実験構造と MD 計算で得られた構造との比較を図 2 に示す。

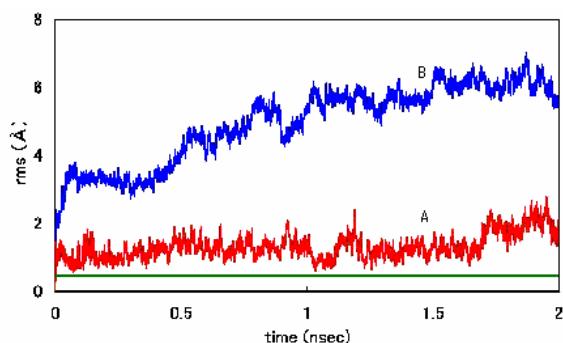


図 2 1LUD の MD 計算による構造変化

A : 二面角拘束エネルギー項有り  
B : 二面角拘束エネルギー項なし

図 2 中の RMS は、MD 計算において 100 フェ

ムト sec ごとに得られた構造座標と MD 計算前の立体構造とのリガンド結合部位における主鎖原子座標を用いて算出した。図 2 に示すとおり、二面角拘束エネルギー項がない場合(B)は、ある場合

(A) よりも MD 計算の時間経過とともに、RMS の値が大きくなっていることが分かる。

このように MD 計算において、二面角拘束エネルギー項を適応することで、計算過程における構造が実験構造から大きくズレるといった変化を防いでいる。よって得られた立体構造座標は、「誘導適合」を反映していると考えてよい。

本計算は、基準振動計算から二面角拘束 MD 計算までのステップが一連のプログラムで構成されており、他のタンパク質を用いた場合でも簡単に適応可能である。

### タンパク質/リガンド複合体モデルを用いた精度の評価

本システムでは、最終的にはタンパク質/リガンド複合体モデルを構築する。そこで本システムが精度良く、「誘導適合」を考慮したモデルを構築しているかを評価するために、タンパク質/リガンドの複合体モデルの立体構造を構築し、実験構造との比較を行った。標的タンパク質には、誘導適応型のタンパク質を用いた。

その一例としてジヒドロ葉酸還元酵素を対象にした場合の複合体モデル構造と実験構造との比較を図 3 に示す。

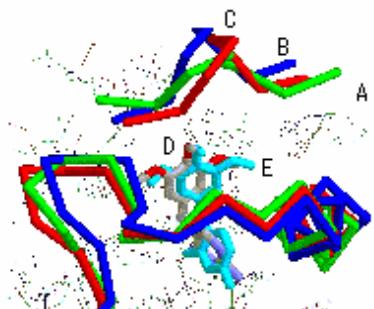


図 3 リガンド結合部位付近の複合体モデル構造と実験構造との比較

複合体モデル構造 : タンパク質C、リガンドE  
複合体実験構造 : タンパク質A、リガンドD  
計算前のタンパク質構造 : タンパク質B

図3では、リガンド結合付近の構造を比較している。図3に示したとおり、複合体モデル構造(C, E)は、複合体実験構造(A, D)とよく重なりあっていることが分かる。また、複合体モデル中のタンパク質構造(C)は、計算前タンパク質の立体構造(B)から構造を変化させている(誘導適合を反映している)。

このように、本システムによって構築された複合体モデル構造は、実験構造を精度よく予測することができるとともに、「誘導適合」も十分に考慮していることが分かる。

#### リガンド探索の適応例

リガンドデータベースを用意し、本システムを用いて、いくつかのセリンプロテアーゼに対してリガンド探索を行った。その結果、各セリンプロテアーゼに対し、データベースからリガンドが選択された。

選ばれたリガンドは結合部位の形状が変化していることを反映していた。

#### **【まとめ】**

本研究では、タンパク質の「誘導結合」を考慮したリガンド探索システムを開発した。「誘導適合」は、基準振動計算結果を基にした二面角拘束MD計算、弾性衝突の理論を適応したエネルギー関数部分で反映されている。これまで基準振動計算は、タンパク質の動的挙動を伴う機能解析に用いられることが多かったが、本研究では本格的に薬物設計に取り入れることが出来た。

二面角拘束MD計算については、従来では拘束条件の設定は煩雑であり、研究者のスキルが相当必要とされたMD計算を大幅に改善し、簡易化と汎用性に大きく貢献できる手法と考えられる。

本リガンド探索システムについては、精度について一定の水準はクリアしていると考えられるが、今後適応例を重ねるにあたり、評価関数の修正、追加なども行っていく必要はあると思われる。

また、本システムでは最終的には、タンパク質

/リガンド複合体モデルを構築することが可能であるので、バーチャルスクリーニングとしてだけでなく、ドッキングシミュレーションとしても用いることができる。

#### **【References】**

- [1]Takeda-Shitaka M., Takaya D., Chiba C., Tanaka H., Umeyama H., *Curr. Med. Chem.*, 11(5), 551, 2004
- [2]Komatsu K., Kurihara Y., Iwadate M., Takeda-Shitaka M., Umeyama H., *Proteins*, 52(1), 15, 2003
- [3]Yamaguchi A., Iwadate M., Suzuki E., Yura K., Kawakita S., Umeyama H., Go M., *Nucleic Acids Res.*, 31(1), 463, 2003
- [4]Ogata K., Umeyama H., *J. Mol. Graph. Model.*, 18(3), 258, 305, 2000
- [5]Ogata K., Umeyama H., *Proteins*, 31, 355, 1998
- [6]Yoneda S., Yoneda T., Kurihara Y., Umeyama H., *J. Mol. Graph. Model.*, 21(1), 19, 2002
- [7]Yoneda S., Umeyama H., *J. Chem. Phys.*, 97, 6730, 1992
- [8]Yoneda S., Kitazawa M., Umeyama H., *J. Comp. Chem.*, 17, 191, 1996
- [9]Takeda-Shitaka M., Umeyama H., *FEBS Letters*, 425, 448, 1998
- [10]Yoneda S., Yoneda T., Takayama N., Kitazawa M., Umeyama H., *J. Mol. Graph. Model.*, 17, 114, 1999
- [11]Adachi M., Kurihara Y., Nojima H., Takeda-Shitaka M., Kamiya K., Umeyama H., *Protein Sci.*, 12(10), 2125, 2003
- [12]Kamiya K., Sugawara Y., Umeyama H., *J. Comput. Chem.*, 24(7), 826, 2003
- [13]Soejima K., Kurihara Y., Kamiya K., Umeyama H., *FEBS Letters*, 463(1-2), 19, 1999