

KP02 分子動力学シミュレーションによるヒト血清アルブミン

ークロミフェン／ワルファリン複合体の相互作用解析

(北里大薬) ○松下泰雄、岩田 率、山乙教之、広野修一

はじめに

ヒト血清アルブミン (HSA) は脂肪酸、ホルモンなどの内因性物質と結合して、血液によりそれらを目的の部位へ運搬する役割を持つ血液のタンパク質であるが、その基質特異性は極めて低いため、外因性物質である薬物とも多様な様式で結合する^[1]。この結合親和性が薬物の体内分布を決定する重要な因子であり、その親和性が変化した場合、遊離薬物濃度の変動により薬効の減弱や副作用発現を引き起こす可能性が高くなる。従って、HSA と薬物との結合や HSA 分子上の結合部位での薬物間の相互作用を詳しく解明することは極めて重要である。一般に、HSA 分子上にはサイト I (ワルファリンサイト) およびサイト II (ジアゼパムサイト) と呼ばれる 2 つの領域の存在^[2,3] がわかっている。しかし、これ以外にもある特定の薬物が結合する領域が複数存在することも知られている。そのような領域の一つにクロミフェン (CLM) などが結合する領域がある^[4]。この領域に結合する薬物は、HSA 分子上においてサイト I の代表的な結合薬物であるワルファリン (WAR) との間で互いの結合を強め合うアロステリックな相互作用を示すことが知られている^[4]。しかしその領域内の結合部位や結合様式はまだ明らかにされていない。そこで、今回我々は以前構築した HSA-WAR-CLM 複合体^[5] から WAR を取り除いた HSA-CLM 複合体を水溶液中で最適化し、得られた構造に基づき分子動力学

(MD) シミュレーションを実施し、HSA に対する CLM 単独の結合様式を決定すると同時に、その構造を基に CLM と WAR との間のアロステリック効果の機構解明を行った。

方法

1) HSA-WAR-CLM 複合体構築

1H9Z に対して FlexX [SYBYL Tripos inc.] でドッキングを行い、当教室で定義した AASS (Average of Auto-Scaled Scores) を算出後、値の小さい上位 10 個を候補モデルとして選択した。

2) HSA-WAR-CLM 複合体モデルの決定および解析

上位のモデルを AMBER により水溶液中でのエネルギー極小化後、MM/PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann solvent accessible surface area) 法で CLM の相対的結合自由エネルギー値より 2 つの TYPE のモデルを選択した。これらのモデルを初期構造として AMBER で水溶液中での MD シミュレーションを行い、得られた MD トラジェクトリを用いて MM/PBSA 法で相対的結合自由エネルギー解析を行い、値が低いモデルを最終的な HSA-WAR-CLM 複合体溶液構造^[5] とした。

3) HSA-CLM 複合体溶液構造の決定および解析

決定した HSA-WAR-CLM 複合体構造から WAR を取り除いた HSA-CLM 複合体についても同様に MD シミュレーションによる溶液構造の解析を行うとともに両複合体について絶対的結合自由エネルギー解析 (エントロピ

イ項を考慮した：分子の振動解析）を行った。
 なお、HSA 内部の誘電率は2を用いた。

4) 複合体構造でのアミノ酸単位の相互作用 エネルギー分割

さらに、両複合体構造中の CLM の分子間相互作用を詳細に調べるため、AMBER の ANAL モジュールを用いてアミノ酸単位の相互作用エネルギー解析を行った。また、HSA-WAR-CLM 複合体については、CLM と WAR との間の相互作用も合わせて計算した。

以上、今回は以前得た、HSA-WAR-CLM 複合体^[5]と HSA-CLM 複合体の溶液構造に基づき、CLM の結合様式と CLM と WAR との間のアロステリック効果の機構を絶対的結合自由エネルギーを考慮して解析した。

結果と考察

図1には、HSA-CLM および HSA-WAR-CLM 複合体の時間に対する CLM 結合部位周辺領域における誤差を表示した。HSA-CLM 複合体の

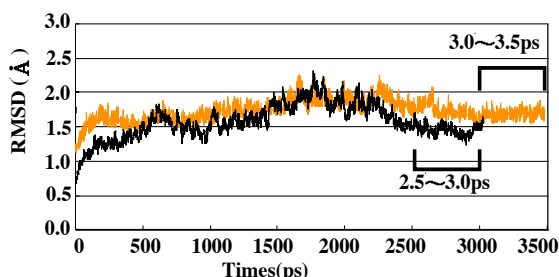


図1 複合体のCLM結合部位近辺領域のRMSDに関する時間プロファイル
 黒：HSA-CLM複合体
 薄い黒：HSA-WAR-CLM複合体

場合、時間 2.5-3.0ns で約 1.5Åに収束した。一方、HSA-WAR-CLM 複合体の場合、時間 3.0-3.5ns において約 1.7Åに収束した。これらの時間における構造を各複合体の溶液構造とした。図2には MD シミュレーションで決定した両複合体の溶液構造を示した。HSA-CLM 複合体では、CLM はサブドメイン IIA の方向に若干移動していた。また、HSA-WAR-CLM 複合体

では、CLM の結合部位の位置は HSA のサブド

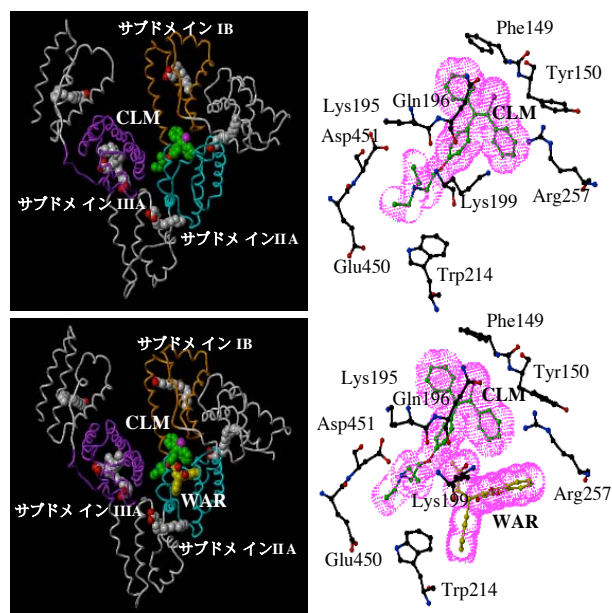


図2 MDシミュレーションで得られた複合体および複合体中での薬物の結合部位
 上: HSA-CLM複合体
 下: HSA-WAR-CLM複合体

メイン IB、IIA および IIIA の間の領域に結合していた。これは、CLM 分子内の3個のベンゼン環から成る疎水性部分とサブドメイン IIA 内のアミノ酸との相互作用によると考えられる。次に、エネルギー解析およびエネルギー分割による相互作用およびアロステリック効果について検討した。HSA-CLM 複合体溶液構造の結合自由エネルギー値は-8.0kcal/mol（表1）で、明らかにされている実験値-8.8kcal/mol^[6]を非常によく再現していた。このことは今回、シミュレーションで得られた複合体構造が極めて妥当であったことを示している。さらに HSA-WAR-CLM 複合体の結合自由エネルギー解析と比した結果を表1に示す。HSA-

表1 HSA-CLMとHSA-WAR-CLM複合体との結合自由エネルギーの比較 (kcal/mol)

	ΔE_{dec}	ΔE_{vdW}	ΔG_{np}	ΔG_{PB}	T ΔS	ΔG_{bind}
A:WAR(-)	-94.7	-44.3	-6.5	117.0	20.5	-8.0
B:WAR(+)	-111.2	-50.5	-7.1	137.3	16.9	-14.6
	$\Delta \Delta E_{\text{dec}}$	$\Delta \Delta E_{\text{vdW}}$	$\Delta \Delta G_{\text{np}}$	$\Delta \Delta G_{\text{PB}}$	T $\Delta \Delta S$	$\Delta \Delta G_{\text{bind}}$
B-A	-16.5	-6.2	-0.6	20.3	-3.6	-6.6

WAR-CLM 複合体では HSA-CLM 複合体に比

べ、水和自由エネルギーが 20.3kcal/mol 大きく不利になった。これは HSA の多くの極性残基が脱溶媒されるためと考えられる。しかしながら、van der Waals (vdW) 相互作用 (-6.2kcal/mol)、静電相互作用(-16.5kcal/mol)および疎水相互作用(-0.6kcal/mol)の増強により、結果として CLM の結合が強められていることがわかった。そこで、両複合体における CLM に関する分子間相互作用のエネルギー分割を行うことにより、CLM の結合様式と WAR とのアロステリック効果を詳細に解析した。表 2 に両複合体の vdW 相互作用エネルギー値を示

表 2 HSA-CLMとHSA-WAR-CLM複合体における CLMと各アミノ酸残基およびWARとのvdW相互作用エネルギー (kcal/mol)

残基	HSA-CLM	HSA-WAR-CLM
subdomain IB		
Phe149	-1.9	-0.7
Tyr150	-2.8	-1.4
Glu153	-2.7	-2.6
Glu188	-0.2	-1.2
Ala191	-0.3	-1.0
Ser192	-2.2	-3.4
Lys195	-4.9	-6.5
Gln196	-5.5	-4.4
subdomain IIA		
Leu198	-1.6	-0.7
Lys199	-4.7	-4.5
Trp214	-2.5	-2.6
His242	-1.5	-0.7
Arg257	-1.8	-1.0
His288	-1.0	-0.5
subdomain IIIA		
Glu450	-0.7	-0.9
Asp451	-0.9	-1.4
•	•	WAR -6.6
•	•	•
•	•	•
Total	-44.3	-50.5

す。HSA-WAR-CLM 複合体で相互作用エネルギー値が大きくなったものを斜体で示した。HSA-WAR-CLM 複合体では、サブドメイン IIA 内部のアミノ酸 (His242, Arg257, His288 など)

との相互作用が弱くなった。さらに、Glu188, Ala191, Ser192, Lys195 などのサブドメイン IB のアミノ酸との相互作用が少し強くなった。このことは、CLM の結合部位のわずかな違いを表している。しかしながら、全体的な vdW 相互作用エネルギー値は、両複合体でほとんど変化していない。さらに、WAR との vdW 相互作用エネルギー値が-6.6kcal/mol (表 2) で他のアミノ酸との相互作用と比べても特に強い。一方、HSA-CLM 複合体における CLM の結合にはサブドメイン IB の構成アミノ酸 (Phe149, Tyr150, Lys195, Gln196 など)、サブドメイン IIA の構成アミノ酸 (Lys199, Trp214, Arg257 など) と vdW 相互作用をしていることがわかった。従って、vdW 相互作用についてのアロステリック効果は、CLM と WAR との間の直接の作用と考えられる。さらに静電相互作用については表 3 に示した。両複合体ともサブドメイン IB、IIA および IIIA の酸性ア

表 3 HSA-CLMとHSA-WAR-CLM複合体におけるCLMと各アミノ酸残基およびWARとの静電相互作用エネルギー(kcal/mol)

残基	HSA-CLM	HSA-WAR-CLM
subdomain IB		
Glu153	-11.8	-10.4
Glu187	-10.7	-11.2
Glu188	-11.4	-11.9
subdomain IIA		
Glu292	-16.0	-13.8
Glu294	-10.1	-10.6
subdomain IIIA		
Glu450	-21.4	-24.1
Asp451	-26.5	-31.7
•	•	WAR -18.5
•	•	•
•	•	•
Total	-94.7	-111.2

ミノ酸と強い静電相互作用をしていた。その中でも、サブドメイン IIIA 構成アミノ酸 (Glu450, Asp451) との静電相互作用 (表 3) が関与していることがわかった。さらに、WAR との静電相互作用エネルギー値が-18.5kcal/mol となった。従って、静電相互作用についての

アルステリック効果は、Glu450、Asp451 との相互作用増強および WAR との直接の相互作用と考えられる。さらに、HSA-CLM 複合体で CLM と vdW 相互作用の強かったアミノ酸のうち疎水性アミノ酸 (Phe149, Tyr150, Leu198, Trp214 など) で構成された疎水ポケットの形態は保持されていた。従って、CLM の疎水性部分とこれらのアミノ酸との疎水性相互作用が示唆された。一方、HSA-WAR-CLM 複合体の場合、WAR は Trp214 および Arg257 (アルキル鎖部分) と相互作用をしており、疎水ポケットの隙間を埋めるように結合していることがわかった。これらの結果より、HSA との結合に関する CLM と WAR のアロステリック効果の要因としては、

1. CLM と WAR との直接の vdW 相互作用および静電相互作用
2. CLM と Glu450 および Asp451 との静電相互作用の増強
3. WAR の存在により結合部位周辺の疎水環境の増強

の3つが重要であると考えられる。

以上、本研究から得られた情報は、HSA 分子上における薬物間相互作用の予測や、優れた体内動態を示す新規化合物の効率的な分子設計に有用なものになると思われる。

References

- [1] Kragh-Hansen, U., *Pharmacol. Rev.*, **33**, 17-53 (1981).
- [2] Sudlow, G. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **11**, 824-832 (1975).
- [3] Sjöholm, I. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 767-777 (1979).
- [4] Sengupta, A. and Hage, D.S. *Anal. Chem.*, **71**, 3821-3827 (1999).
- [5] 岩田、松下、山乙、広野：第31回構造活性相関シンポジウム、講演番号 K16(2003).
- [6] Hage, D.S. and Sengupta, A. *Anal. Chem.*, **70**,

4602-4609 (1998).