

(北里大学薬学部) ○加倉井 隆一, 山乙 教之, 合田 浩明, 広野 修一

はじめに

蛋白質にリガンドをドッキングさせるために、多くのプログラムが考案されている。しかし、現在幅広く用いられているこれらのプログラムは、蛋白質を剛体として扱っているため、induced-fit するような蛋白質に対して十分な精度の複合体構造が得られないということが分かっている。また、リガンドが結合していない状態の X 線構造や、アミノ酸配列からモデリングした蛋白質立体構造に対して複合体構造を予測する時に、標的となる蛋白質が induced-fit するかどうかを判断することも難しい。従って、ドッキングプログラムのみを用いて、蛋白質-リガンド複合体の正しい構造を予測することは困難である。

複合体の正確な構造を予測する手段の一つに、ドッキングプログラムを用いてある程度の精度の蛋白質-リガンド複合体の候補を生成し、あらわな水分子中での分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、構造を平衡化させることで複合体構造を精密化する方法がある。このように、ドッキングプログラムと分子動力学手法を組み合わせることで、より天然構造に近い蛋白質-リガンド複合体を予測できるということが分かっているが、あらわな水分子を用いた MD 計算は非常に時間がかかるという問題があるため、structure-based drug design で多種のリガンド複合体に適用するのは実際上困難である。

そこで、非常に時間がかかる水溶液中の MD シミュレーションのかわりに、当研究室で開発したブラウン動力学(BD) プログラムをドッキ

ング問題に適用して複合体構造の精密化を試みた。ブラウン動力学法では、水の影響を粘性力とランダム力として取り扱うため、あらわな水分子を用いる分子動力学手法に比べて計算時間が短いという利点がある。

この手法を、induced-fit すると報告されている Intestinal Fatty Acid protein 系及び(サイトの RMSD:0.56 Å), protein Tyrosine Phosphatase 1B(サイトの RMSD:3.52 Å)系に適応し、それぞれの蛋白の単独構造から蛋白質-リガンド複合体構造を予測し、リガンドがついている状態で決定されている複合体立体構造が再現できるかを検証した。

方法

リガンド結合サイトの同定

蛋白質とリガンドの結合には、疎水相互作用が重要な役割を果たすことが多いといわれている。そこで、当研究室で開発したサイト探索プログラム HBOP を用いて、蛋白質のリガンド結合サイトの探索を行った。

ドッキングモデルの初期構造の構築

上記の方法で同定されたリガンド結合サイトに対して、ドッキングプログラム FlexX [SYBYL6.9 Tripos 社]を用いて、蛋白質-リガンド複合体の初期モデルを構築した。FlexX はリガンドをフレキシブルに取り扱い、結合ポケット内の結合様式を探索するプログラムである。

結合候補モデルの選択

次に、これら複合体について、相互作用解析プログラム CScore[SYBYL6.9 Tripos 社]を用いて、得られたドッキングモデルを評価した。CScore には相互作用評価関数が 5 つある (F_Score, G_Score, D_Score, PMF_Score,

ChemScore)。ここで蛋白質-リガンド複合体モデルを絞り込むために、当研究室で定義したAASS (Average of Auto-Scaled Scores) を用いて結合複合体モデルを順位付けした。経験的に AASS の値が 0.2 を切る場合には、スコアが上位のものに正しいモデルが含まれていると考えられるので、上位 20 個を候補構造に選択した。AASS の値が 0.2 を切るもののがほとんどない場合は、スコアの上位に正しいモデルを含んでいない可能性があるので、AASS の値の上位 50 個を候補構造とした。全ての候補構造について計算を行うのは効率的でないので、立体配座毎に構造を分類し、その代表構造について BD シミュレーションを行った。

BD シミュレーション

溶液中でブラウン動力学法する粒子の運動は、ランジュバン方程式によって記述される。

$$m \frac{d\mathbf{v}}{dt} = \mathbf{F} - m\zeta\mathbf{v} + \mathbf{F}^B$$

ここで、 m は粒子の質量、 \mathbf{v} は速度、 t は時間、 \mathbf{F} は相互作用力、 $m\zeta$ は摩擦係数、 \mathbf{F}^B はランダム力である。 ζ はストークスの法則から、以下の式で導かれる。

ここで、 η は粘度、 a は原子半径である。BD シミュレーションのアルゴリズムは Ermak と Buckholz によって開発された以下の式を採用した[1, 2]。

$$\zeta = 6\pi\eta a/m$$

ここで、 \mathbf{r} は位置、 h はタイムステップ、 \mathbf{r}^B は

$$\begin{aligned}\mathbf{r}(t+h) &= \mathbf{r}(t) + \frac{1}{\zeta} \mathbf{v}(t)(1 - e^{-\zeta h}) \\ &+ \frac{1}{m\zeta} \mathbf{F}(t) \left\{ h - \frac{1}{\zeta} (1 - e^{-\zeta h}) \right\} + \mathbf{r}^B(t+h) \\ \mathbf{v}(t+h) &= \mathbf{v}(t) e^{-\zeta h} + \frac{1}{m\zeta} \mathbf{F}(t)(1 - e^{-\zeta h}) \\ &+ \frac{1}{m\zeta h} (\mathbf{F}(t+h) - \mathbf{F}(t)) \left\{ h - \frac{1}{\zeta} (1 - e^{-\zeta h}) \right\} + \mathbf{v}^B(t+h)\end{aligned}$$

ランダム変位、 \mathbf{v}^B はランダム変速である。

BD シミュレーションのためのリガンド原子

の原子電荷は HF/6-31G* 法によって求められた静電ポテンシャルにフィットするように求めた resp 電荷を採用した。量子化学計算には Gaussian98 [gaussian 社] を使用した。蛋白質の力場パラメータには AMBER の parm94 を、リガンドの力場パラメータには AMBER の Gaff を用いた。各蛋白質-リガンド複合体の BD シミュレーションを行い、複合体構造を平衡化させた。

複合体構造の決定

候補構造が複数存在するときには、BD トライエクトリーや MM-PBSA 法により候補の複合体構造の自由エネルギー計算を行い、結合が安定なものを最終的な結合候補モデルとして選択した。

結合自由エネルギーの計算は BD トライエクトリーや complex、receptor 単独、ligand 単独のそれぞれの座標を取り出し、それぞれの溶液構造と仮定した。

complex、receptor、ligand それぞれの構造に対して各々の分子エネルギー (G) を計算した。分子のエネルギーは以下の式で表される。

$$G = E_{MM} + G_{PBSA} - TS$$

E_{MM} は分子力場の van der Waals 相互作用エネルギーと静電相互作用エネルギーの和である。エントロピー (TS) 寄与については、同一の蛋白質に対して類似の結合様式をとるリガンド群に関する相対的な結合親和性を求める場合には、この項はほぼ同一と考えられるため計算から除外した。水和自由エネルギー (G_{PBSA}) は以下の式で表される。

$$G_{PBSA} = G_{PB} + G_{np}$$

水和自由エネルギーは電荷が関与する部分と表面積に依存する部分に分割され、Poisson-Boltmann 方程式を有限差分法で解くプログラム delphi と MSMS を用いて計算した。

結合自由エネルギーを以下の式で求め、結合候補モデルを評価した。

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - (G_{receptor} + G_{ligand})$$

結果

小さな Induced Fit のある場合：Intestinal Fatty Acid Binding Protein 系

FlexX を用いて、HBOP により同定されたリガンド結合サイトにパルミチン酸をドッキングさせたところ、234 個のドッキングモデルが得られた。CScore の値から計算した AASS の値が 0.2 を切るものを多数含んでいたので、上位 20 位を候補とした。複合体の配向をもとに構造を分類したところ、これらのモデルはリガンドの立体配座が類似した 1 つの結合様式にまとめることができた。そこで、AASS のスコアが一位のモデルを初期構造にして、BD シミュレーションを行い構造を平衡化した。初期構造からのリガンドおよび、リガンド結合部位周辺原子の RMSD を計算したところ 1.9ns から 2.4ns において構造が安定していた。安定した構造の中には実験的に得られた複合体構造に近いものが含まれており、リガンドの結合様式は、全体のずれが 1.97 Å から 1.36 Å、立体配座の違いも 1.30 Å から 1.13 Å へ改善されていた。また水素結合も保たれ、より複合体 X 線構造に近い立体構造が得られた(図 1, 2, 3)。



図 1 複合体 X 線構造のパルミチン酸結合部位近傍の立体図

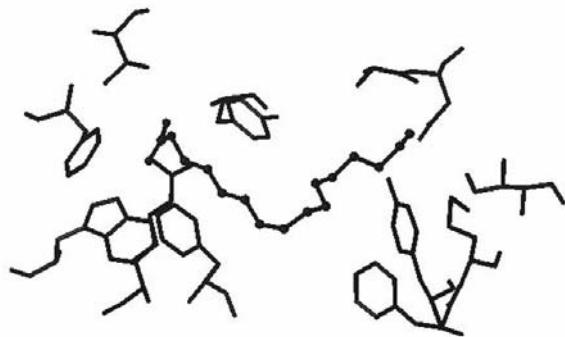


図 2 FlexX で得られた複合体モデル

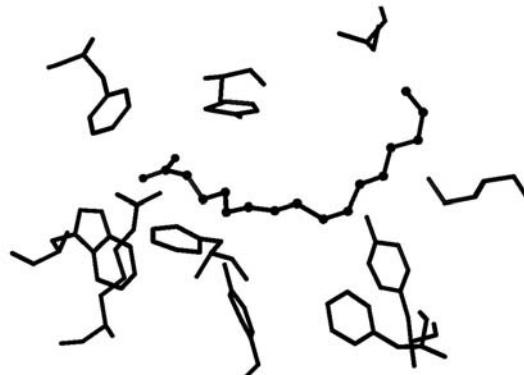


図 3 BD シミュレーションで平衡化した複合体モデル

大きな Induced Fit のある場合：Protein-Tyrosine Phosphatase 1B 系

① 2-(OXALYL-AMINO-4,7-DIHYDRO-5H-THIENO[2,3-3 C] PYRAN-3-CARBOXYLIC ACID (OPA) がリガンドの場合

FlexX を用いて、HBOP により同定されたリガンド結合サイトに OPA をドッキングさせたところ、248 個のドッキングモデルが得られた。CScore の値から計算した AASS の値が 0.2 を切るものが一つしかなかったので、上位 50 位を候補とした。複合体の配向をもとに構造を分類したところ、これらのモデルはリガンドの結合構造が異なる 4 タイプのモデルに分類することができた。そこで、各モデル毎に、AASS のスコアが 1 位のモデルを初期構造にし、BD シミュレ

ーションを行うことで、構造を平衡化した。これら4タイプの複合体モデルの結合自由エネルギー解析を行い、最も安定な結合様式を選択した。初期構造からのリガンドおよび、リガンド結合部位周辺原子の RMSD を計算したところ 400 から 600ps において構造が安定していた。安定した構造の中には実験的に得られた複合体構造に近いものが含まれており、その構造は、全体のずれが、3.74Å から 1.16Å へ大きく改善され、配座の違いも 1.21Å から 0.90Å へ改善された。水素結合も正しく結ばれ、より複合体 X 線構造に近い立体構造が得られた(図 4, 5, 6)。

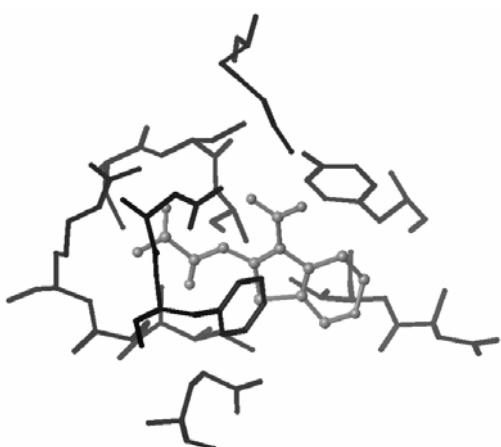


図 4 複合体 X 線構造のパルミチン酸結合部位近傍の立体図

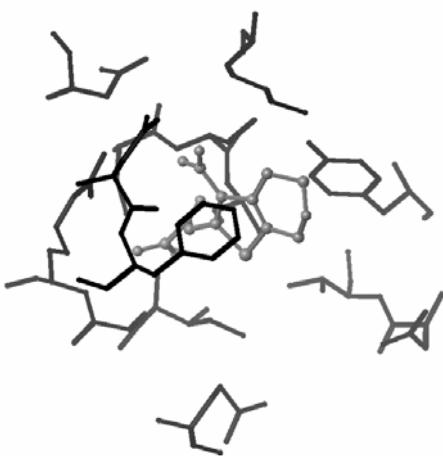


図 5 FlexX で得られた複合体モデル

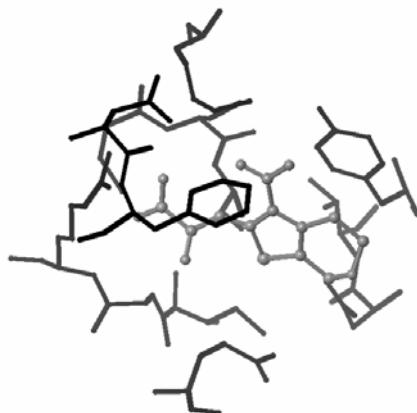


図 6 BD シミュレーションで平衡化した複合体モデル

②

2-(OXALYL-AMINO)-4, 5, 6, 7-TETRAHYDRO-THIEN
0 [2, 3 3-C]PYRIDINE-3-CARBOXYLIC ACID (OTA)
がリガンドの場合

OPA と同様にドッキングを行ったところ 216 個のドッキングモデルが得られた。複合体の配向をもとに構造を分類したところ、これらのモデルはリガンドの結合構造が異なる4タイプのモデルに分類することができた。そこで各モデル毎に AASS のスコアが 1 位のモデルを初期構造にし、BD シミュレーションを行うことで、構造を平衡化した。これら4タイプの複合体モデルの結合自由エネルギー解析を行い、最も安定な結合様式を選択した。その最も安定な結合様式を持つ複合体モデルでは、リガンドの全体のずれが、3.55Å から 0.82Å へ大きく改善され、立体配座の違いも 0.61Å から 0.55Å へ改善され、より複合体 X 線構造に近い立体構造が得られた。

まとめ

ブラウン動力学法により、ドッキングプログラムで得られた不完全な複合体構造を出発点として、induced fit が起こる蛋白質の場合でも、ブラウン動力学法を用いて精密化を行い、X 線構造に近い複合体を得ることができた。

参考文献

- [1] D.L.Ermak ,et, al.,, J.Comput. Phys., 35, 169-182 (1980).
- [2] 神山新一 & 佐藤明, 「流体ミクロ・シミュレーション」, 朝倉書店(1997)