

三次元定量的構造活性相関解析

北里大薬 ○中込 泉、山乙教之、広野修一

はじめに

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)はリガンド誘導性転写制御因子の核内レセプターである。そのサブタイプの一つであるPPAR α は、主に肝臓や骨格筋で脂肪酸の輸送や代謝に関連する遺伝子の発現を制御しており¹⁾、脂質代謝に深く関与している。高脂血症は、糖尿病、心筋梗塞等の心臓血管系の病気、高血圧、脳梗塞等の主たる危険因子である。Fibrate系薬剤は、PPAR α を活性化し脂質濃度の低下を生じるため高脂血症治療薬として使われており、PPAR α は、高脂血症等の脂質代謝異常症のための薬剤の標的タンパクとして注目されている。

PPAR α は、N末リガンド非依存性転写領域、DNA結合ドメイン、C末リガンド結合ドメインから構成されているが、ヒトPPAR α のリガンド結合ドメイン(LBD)の立体構造は、X線結晶解析実験によって明らかになっている²⁾。

そこで、本研究では、高脂血症薬の合理的設計を目指して、ヒトPPAR α の立体構造情報を用いて、PPAR α アゴニストとPPAR α LBDの複合体モデルを作成し、三次元定量的構造活性相関解析を行って、PPAR α LBDとPPAR α アゴニストの相互作用に関する情報を得るだけでなく、新規リガンドの活性予測が可能なQSARモデルの作成を試みた。

方法

1 GW409544のPPAR α LBDへのドッキング

初めに、複合体構造既知のアゴニストGW409544を用いてドッキングを行い、FlexXの計算条件とエネルギー極小化計算の条件を決定した。

① GW409544のPPAR α LBDへのドッキング

PPAR α LBD-GW409544複合体の立体構造(PDB ID: 1k7l)中のPPAR α LBDの座標に対し、Sybylで作成したGW409544をFlexX(Sybyl 6.51 Tripos inc.)を用いてドッキングさせた。結合部位は結晶構造中のGW409544の位置から半径6Åのアミノ酸を指定し、相互作用するPPAR α LBD側のアミノ酸には、S280, Y314, H440, Y464、リガンド側にはカルボン酸を指定した。

得られた複数のモデルに対して、CSCORE(F_score, P_Score, D_Score, G_Score, Chem_Score)の5つの評価関数の統合評価)とAASS³⁾(各評価関数値を規格化した値の平均)による評価を行った。

② PPAR α LBD-GW409544複合体のエネルギー極小化計算

得られた複数のPPAR α LBD-GW409544複合体モデルに対して、Sybylでエネルギー極小化計算を行った。Tripos力場を用いて、電荷は、PPAR α に対してKollman電荷、リガンドはGasteiger-Huckel電荷を割り当てた。非結合相互作用に対するカットオフ距離は12Åとした。誘電率は2rと4rの2種類で行った(rは原子間距離を表す)。

2 PPAR α アゴニストのPPAR α へのドッキングとCoMFA解析

① PPAR α アゴニストのPPAR α LBDへのドッキングとエネルギー極小化計算

FlexX を用いて PPAR α アゴニスト (学習系と予測系) (表 1) の PPAR α LBD へのドッキングを行った。FlexX から複数のモデルが得られた場合は、CSCORE と AASS で評価し、モデルを選択した。そして、得られた PPAR α LBD-アゴニスト複合体に対してエネルギー極小化計算を行った。

活性既知化合物 (学習系)

化合物	EC ₅₀ (μ M)	-log(EC ₅₀)
L-796449	0.004	8.39
GW9578	0.05	7.30
GW2433	0.17	6.77
GI262570	0.45	6.35
KRP-297	0.85	6.07
JTT-501 metabolite	1.9	5.72
GW7845	3.5	5.46
Wy-14643	5.0	5.30
L-165041	10.0	5.00
fenofibrate metabolite	30.0	4.52
bezafibrate	50.0	4.30
clofibrate metabolite	55.0	4.26

活性未知化合物 (予測系)

perfluoro octane-1-sulfonic acid (PFOS)
perfluoro octanoic acid (PHOA)
perfluoro hexanoic acid (PFHA)
perfluoro dodecanoic acid (PFDA)
gemfibrozil
ciprofibrate
perfluoro octan-1-ol (PF octan-1-ol)
perfluoro octanoic acid (PF octanoic acid)

表 1 使用した PPAR α アゴニスト EC₅₀:転写活性¹⁾

② 学習系化合物を用いた CoMFA 解析と予測化合物に対する活性予測

初めに、得られた複合体モデルの PPAR α LBD の主鎖を重ねることによってリガンドをアラインメントし、リガンド結合配座を抽出した。次に学習系化合物に対して得られた結合配座とアラインメントを使って CoMFA 解析を行った。プローブ原

子は+1 の電荷を持つ sp³C、格子間隔は 2Åで行った。

そして、予測化合物に対して、得られた CoMFA モデルを使って活性を予測した。

結果

1 GW409544のPPAR α LBDへのドッキング

① GW409544 の PPAR α LBD へのドッキング

FlexXの結果得られたCSCOREが5の複合体モデルについて、AASSと実験による結合配座とのずれ(RMS)を表2にまとめた。この中に、実験による結合配座に結合部位内での位置においてもコンフォメーションにおいても非常に類似している2つのモデル(84と74)を得ることができた。これらのモデルは、AASSが共に0.2以下であり、以前当研究室で報告した、「X線構造に近い複合体構造はAASS0.2以下に含まれる」という結果と一致した³⁾。そこで、ここで用いたFlexX条件を他のアゴニスト化合物に対して適用することにした。

複合体モデル	RMS (Å)	AASS	CSCORE
GW40_84	1.27	0.15	5
GW40_74	1.25	0.19	5
GW40_112	1.22	0.28	5
GW40_47	1.83	0.29	5
GW40_12	4.75	0.30	5
GW40_1	4.60	0.31	5
GW40_7	4.86	0.31	5
GW40_8	4.85	0.32	5
GW40_17	1.74	0.33	5
GW40_27	2.90	0.33	5
GW40_34	1.15	0.35	5
GW40_121	5.05	0.38	5
GW40_56	2.84	0.41	5

表 2 GW409544 に対する FlexX の結果

② PPAR α LBD-GW409544 複合体のエネルギー極小化計算

得られたCSCOREが5の複合体モデルを、配置及びコンフォメーションについて分類し、これらの代表的なモデルに対して誘電率を4rと2rでエネルギー極小化計算を行い比較した(表3)。

その結果、X線結晶解析による複合体(GW40)と、

それに近い構造をもつモデル(GW40_74, GW40_84)のエネルギーが、誘電率が 4r の時はモデルセットの中で高くなったのに対し、誘電率を 2r にした場合比較的低くなる傾向が見られた。又、誘電率を 2r にした場合、FlexX で得られた複合体モデルの中で最安定エネルギーから 7kcal/mol のモデルを選択すれば真の複合体構造に近い複合体モデルが含まれることが示唆された。従って、この系ではエネルギー極小化計算における誘電率として 2r を採用することにした。

a) ϵ : 4r

複合体モデル	energy	ΔE	rmsd	AASS
GW40_027	-836.84	0.00	2.56	0.33
GW40_012	-816.97	19.88	2.27	0.30
GW40_074	-816.26	20.58	0.74	0.19
GW40	-812.42	24.42	0.51	0.00
GW40_047	-812.36	24.48	0.81	0.29
GW40_056	-807.03	29.82	1.49	0.41
GW40_121	-805.13	31.71	2.52	0.38
GW40_001	-801.45	35.39	2.01	0.31
GW40_084	-799.83	37.02	0.69	0.15
GW40_007	-792.06	44.78	2.24	0.31

b) ϵ : 2r

複合体モデル	energy	ΔE	rmsd	AASS
GW40	-1193.08	-2.07	0.96	0.00
GW40_027	-1191.01	0.00	1.89	0.33
GW40_074	-1187.72	3.29	1.00	0.19
GW40_056	-1187.71	3.30	1.87	0.41
GW40_084	-1186.90	4.11	1.01	0.15
GW40_012	-1184.45	6.56	2.40	0.30
GW40_001	-1178.23	12.78	2.24	0.31
GW40_047	-1176.77	14.24	1.20	0.29
GW40_121	-1168.82	22.19	2.65	0.38
GW40_007	-1167.52	23.49	2.57	0.31

表 3 GW409544 に対するエネルギー極小化計算の結果
 rmsd : エネルギー極小化前の GW409544 とのずれ(A)
 ΔE : FlexX より得られた複合体モデルセット内の最安定エネルギーからのエネルギー差(kcal/mol)

2 PPAR α アゴニスト (学習系と予測系) の PPAR α へのドッキングと CoMFA 解析

FlexX による解析の結果、複数の複合体モデルが得られた化合物に対しては、CSCORE が 5 と AASS が 0.2 以下のモデルを選択した。この条件に該当するモデルがない化合物に対しては CSCORE の最上位得点と AASS 上位 20 個を選択した。これらの

複合体モデルを配置、構造的に分類しグループ分けした。グループの代表モデルに対して、GW409544 と同様の条件でエネルギー極小化計算を行い、エネルギーが最安定構造から 7kcal/mol 以内の複合体モデルを選択した。

その結果、数種類のアゴニストに対して、複数の複合体モデルが得られた。そこで、これらのモデルからそれぞれ結合配座を取り出し、組み合わせて PLS 解析を行い、統計数値が良好となる配座の組み合わせセットを選択した。リガンド化合物のアラインメントを図 1 に、統計結果を表 4 に示した。立体相互作用と静電相互作用によるモデルでも、立体相互作用と静電相互作用、ClogP を用いたモデルでも、両者とも q^2 が 0.5 を越え、良好な CoMFA モデルが得られた。

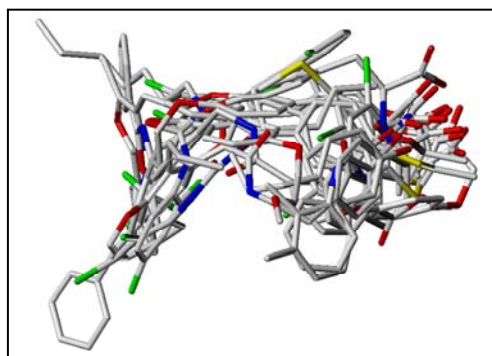


図 1 アラインメント図

	ST+EL	ST+EL+ClogP
Cross-validated		
q^2	0.59	0.57
S_{press}	0.90	0.92
最適成分数	2	2
Conventional		
r^2	0.97	0.90
F	140.61	40.77
s	0.2	0.4
寄与率(%)		
立体相互作用 (ST)	64.8	38.7
静電相互作用 (EL)	35.2	28.2
ClogP		33.1

表 4 CoMFA 解析の結果

3 予測化合物に対する予測

予測系化合物に対して、得られた CoMFA モデルを使って活性を予測した。ヒト PPAR α LBD を使った

実験から活性順位が PFOA > PFOS > PFHA であること⁴⁾、又文献より ciprofibrate > PFOA であること⁵⁾が報告されている。これらは、CoMFA 解析で使用した活性と測定条件は異なっている。

予測した結果、立体相互作用と静電相互作用のみによるモデルでは、実験による活性順位を再現することができなかった。一方、立体相互作用と静電相互作用に加えて ClogP を用いたモデルでは、PFOA と PFOS が PFHA より親和性が高いこと、ciprofibrate が PFOA より活性が強いことを再現することができた(表5)。又、このモデルに対する統計結果より、ClogP が活性に多大な影響を与える(33%)ことが示唆された(表4)。これは PPAR α が核内受容体であり、そのリガンドとなる物質は脂溶性で核膜を透過する必要があることと一致する。従って、この系の CoMFA モデルとしては、立体相互作用、静電相互作用、logP を用いたモデルが適当と考えられる。

立体相互作用、静電相互作用、ClogP を用いたモデルから得られた等高線を図2に載せた。等高線

化合物	-log(EC ₅₀)	
	計算値	実験値
L-796449	8.17	8.39
GW9578	6.99	7.30
GW2433	6.88	6.77
GI262570	6.33	6.35
KRP-297	6.63	6.07
JTT-501 metabolite	5.21	5.72
GW7845	5.57	5.46
Wy-14643	4.54	5.30
L-165041	5.14	5.00
PFDA	4.94	
gemfibrozil	4.92	
PF octan-1-ol	4.91	
† ciprofibrate	4.60	
fenofibrate metabolite	5.04	4.52
†* PFOA	4.35	
* PFOS	4.35	
bezafibrate	4.67	4.30
clofibrate metabolite	4.27	4.26
* PFHA	4.22	
PF octanoic acid	3.96	

表5 予測結果

学習系: 実験値がある化合物 予測系: 実験値がない化合物

†* : 活性順位が実験から既知の化合物

は、PPAR α のリガンド結合部位周辺の立体構造情報と一致していた。

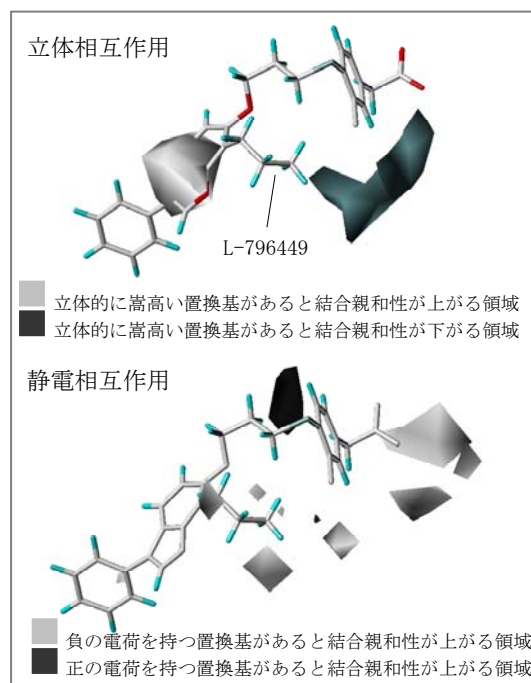


図2 CoMFA 等高線

結論

立体構造が既知の PPAR α -GW409544 複合体の立体構造を使って、PPAR α リガンドに対して、結合配座とアラインメントを求め、CoMFA 解析を行った。その結果、立体相互作用、静電相互作用、logP を使って統計的に良好な CoMFA モデルを得ることができた。得られた CoMFA モデルを使って活性が未知の化合物に対して活性を予測した。その結果、実験で活性順位が既知の予測系化合物に対して活性順位をほぼ再現することができた。

参考文献

- Willson T. M., Brown P. J., Sternbach D. D. Henk B. R. J. Med. Chem. 43(4) 527-550 2000
- Xu H. E., Lambert M. H. et al. PNAS 98 13919-13924 2001
- 山乙教之、広野修一 日本薬学会第123年会 要旨集3 32p 2003
岩田 率ら 第31回構造活性相関シンポジウム要旨集 57p 2003
- 明治薬科大 本島清人先生 提供
- Intrasuksri U, Rangwala S. M. et al., Gen. Pharmac. 31(2) 187-197 1998