

コンピュータ技術を活用した創薬手法の研究における 疾患原因蛋白の構造解析手法の研究

プロジェクト責任者

高田 俊和 日本電気(株)基礎・環境研究所

著者

佐久間俊広 (株)NEC情報システムズ ユビキタス事業部

秋元 利夫 (株)NEC情報システムズ ユビキタス事業部

山口 直人 NECソフト(株)VALWAYテクノロジーセンター

廣川 雄一 独立行政法人 海洋研究開発機構

ヒト由来造血器型プロスタグランジン合成酵素(H-PGDS)の新規阻害剤の設計・開発をインシリコで行う目的で、阻害剤複合体に対する非経験的分子軌道計算を行った。本計算では、これまでに井上らによるX線構造解析によって明らかになった複数の阻害剤-蛋白質複合体の中から、2種類のリガンド分子(HQL-79、Cibacron-blue)とH-PGDSとのBinding Affinityを計算することにより、新規阻害剤の設計・開発の指針を得ようとした。その結果、HQL-79構造のpiperidineとTrp104のindoleとの間のcation- π 相互作用、及びCibacron-blueのanthraquinoneとTrp104との間の π - π 相互作用は、真空中でそれぞれ大きな結合エネルギー(4.5、5.7 kcal/mol)を形成しており、新規候補阻害剤の設計を行う上で重要な相互作用であることが判明した。

キーワード：非経験的分子軌道法、プロスタグランジン合成酵素、阻害剤、Binding Affinity

1. はじめに

プロスタグランジン(PG)は、H-PGDS合成酵素によって合成され、アレルギー媒介物質として機能する。そのため、H-PGDS合成酵素を阻害する化合物の開発は、新しい抗アレルギー剤として花粉症などの治療薬になることから、大いに注目されている。最近、阻害剤の一つであるHQL-79(本稿で計算)は、経口投与で抗アレルギー作用を発揮するばかりでなく、PGの産生を抑制することによって、脳損傷の拡大阻止、筋ジストロフィーの筋壊死阻止作用を示すことが分かり、その特効薬としての開発が期待されている。

これまでに、井上らによるX線構造解析からH-PGDSのnativeの構造及び複数の阻害剤とH-PGDSとの複合体の解析が行われ(図1)、阻害活性の相関関係(IC₅₀, Km, Kd値)の比較が詳細に報告されている[1, 2]。本稿では、井上らに

よるX線構造解析結果の中から、図2-3に示した、1)HQL-79複合体・Mg²⁺型構造、2)Cibacron-blue・Ca²⁺型構造の、2種類の複合体の非経験的分子軌道計算から、アミノ酸との特徴的な相互作用を解析することによって、新規阻害剤開発への設計指針を得ようとした。これらの2種類の構造の選択の理由は、HQLに見られるpiperidineのcation- π 型、Cibacron-blueのanthraquinoneの π - π 型を特徴とする構造を有しており、新規デザインを考慮する上で重要な相互作用を解析できると考えたからである。

2. 計算の方法

ヒト由来H-PGDSは、アミノ酸残基数198個(モノマー)、補酵素としてグルタチオン(GSH)を含むテトラマー構造の酵素で、ダイマーで機能する比較的小さな化合物である。その

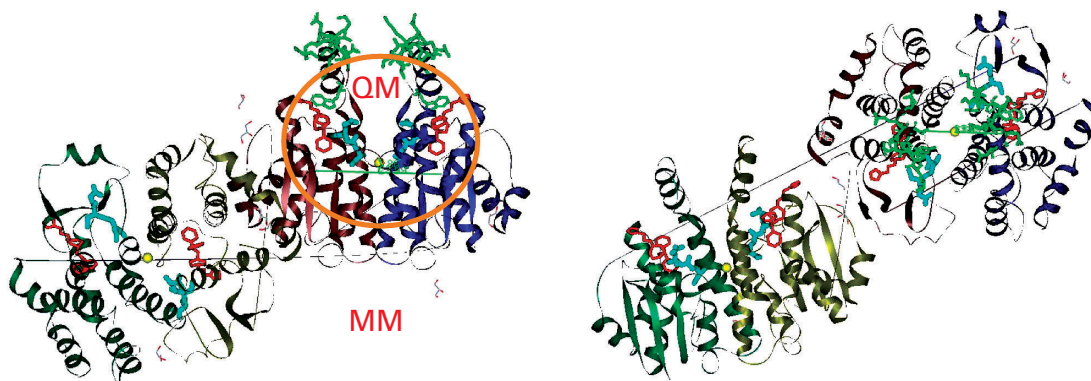
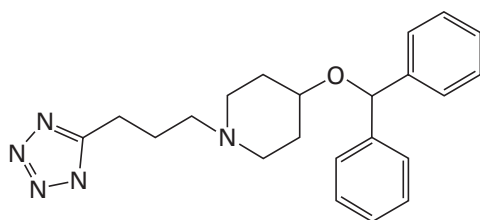
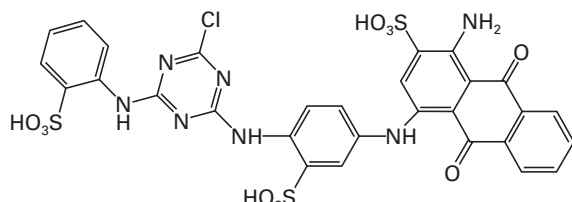


図1 ヒト由来H-PGDSの複合体構造(4量体構造)とQM/MM計算のモデル化。

図2 HQL-79複合体・Mg²⁺型構造。図3 Cibacron-blue・Ca²⁺型構造。

ため、QM/MM計算におけるモデル化では、図1に示したように4量体の一方の2量体構造を用いて行った。実際の実験的分子軌道計算では、QM領域は量子力学的に計算し、MM部分は、点電荷をハミルトニアンに加えることにより行った。本報告書におけるQM/MM計算では、分子軌道計算プログラムAMOSSを用い、基底関数は全てMIDI-4で行った。

尚、H-PGDS酵素とHQL-79、Cibacron-blue複合体への水素付加、および水素位置の最適化は、Tripos社のSYBYL (Ver.7)を用いて、分子力学法に基づきConjugate gradient法で行った。

3. HQL複合体の計算結果

(1) 非経験的分子軌道計算

表1に、HQL複合体の分子軌道計算結果を示した。本計算は、HQLのX線構造解析データそのものを用いて行った。特に注目すべき相互作用は、Trp104とpiperidineとの間のCation- π 相互作用エネルギーである[3]。本QM/MM計算の結果、真空中、及び溶媒効果を取り入れた場合のCation- π エネルギーは、それぞれ-5.74、-6.39 (kcal/mol)となり、Gaoら[4]が報告している-5.6 ~ -9.3 (kcal/mol)と、合致した結果を得た。また、A.S. ReddyとG.N. Sastry[5]による量子力学計算では、indole ringとNH₄⁺、NMe₄⁺との間の

表1 HQL-79との相互作用エネルギー(単位:kcal/mol)。

| アミノ酸 | HQL(真空中) | HQL(QMMM) |
|---------------|--------------|--------------|
| Trp104 | -5.74 | -6.39 |
| Tyr8 | -1.92 | -7.93 |
| Arg14 | -19.84 | +3.24 |

*)太字は、Trp104とpiperidineとのCation- π 相互作用エネルギーを表す。

*)相互作用エネルギーの計算は、次式により算出している。

$$\Delta E(AB) = E(AB) - (E(A) + E(B))$$

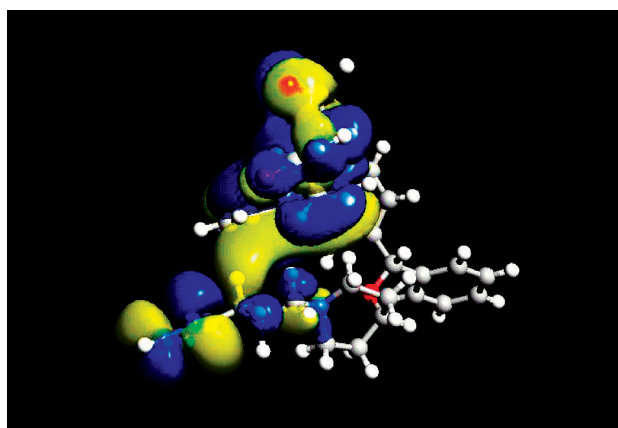
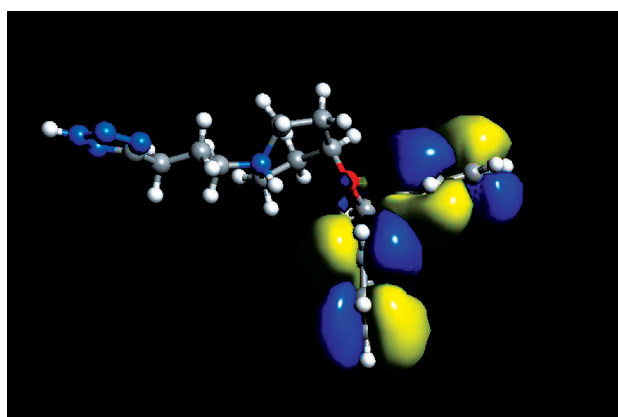
図4 Trp104とHQLの分子軌道(Cation- π interaction)。

図5 Trp104とHQLのHOMOの分子軌道。

(HQLのNH⁺とは構造が異なる) Cation- π 相互作用エネルギーは、各々、約-20、-10 (kcal/mol)と報告されている。HQL-79とTyr8との相互作用は、-1.92 (真空中)、-7.93 (QM/MM計算)となり、周囲の蛋白質の効果により、更に安定化することが計算から確認できた。

(2) HQL79分子の分子軌道(MO)の形状

図4、5は、各々Trp104とHQLのCation- π 相互作用軌道、HOMOを表している。図4の下部がHQL分子であり、上部がTrp104である。各分子間をCation- π 軌道が占有していることが分かる。

4. Cibacron-blue複合体の計算結果

(1) 非経験的分子軌道計算

次に、anthraquinone骨格を持つ阻害剤分子としてCibacron-blueとPGDSとの相互作用エネルギーの解析を行った。Cibacron-blueでは、3環系anthraquinoneとTrp104がstackしており、表2から π - π 相互作用によるstacking energyは、真空中で-4.61 (kcal/mol)、周囲の効果を取り入れたQM/MMでは、-117.91 (kcal/mol)という結果になった。

(2) Blue分子の分子軌道(MO)の形状

次に、Blueと、Trp104の分子軌道のHOMO、LUMOの形状を示した。HOMO、LUMO軌道とも、Blue分子上に軌道が局在化していることが分かる。

表2 Cibacron-blueとの相互作用エネルギー(単位:kcal/mol)。

| アミノ酸 | Blue(真空中) | Blue(QMMM) |
|---------------|--------------|----------------|
| Trp104 | -4.61 | -117.91 |
| Arg14 | -134.91 | -124.29 |
| Tyr8 | -13.16 | -9.18 |

*) 太字は、Trp104とanthraquinoneとの $\pi-\pi$ のstacking energyを表す。

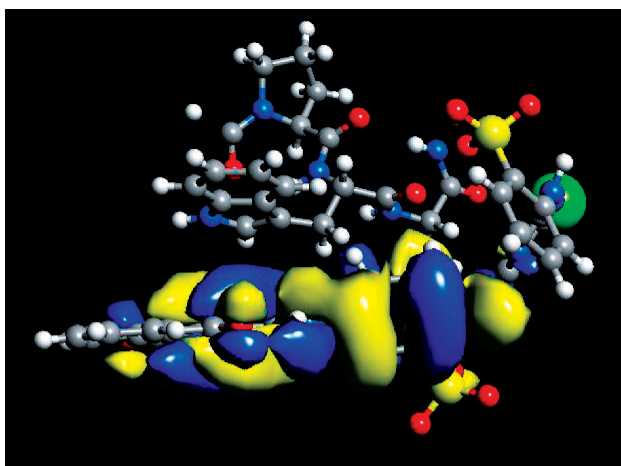


図6 Blue - Trp104のHOMO。

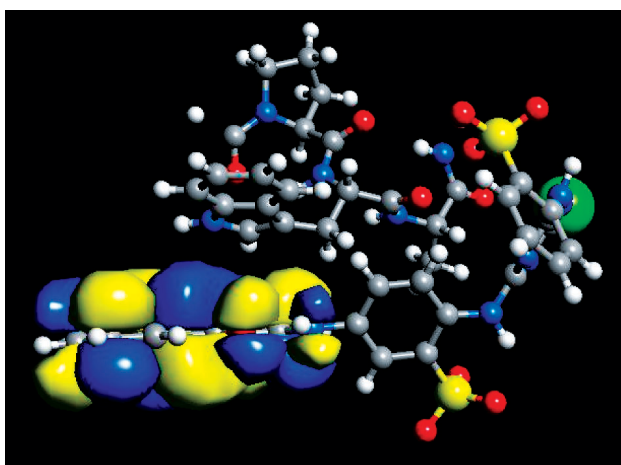


図7 Blue - Trp104のLUMO。

5. H-PGDSの阻害剤デザインの指針

これまでの2種の阻害剤分子(HQL-79、Cibacron-blue)とH-PGDSとのBinding Affinityの計算結果から、Cation- π 、 $\pi-\pi$ 相互作用が重要であることが分かった。これらを踏まえた阻害剤デザイン指針としては、1) HQLとTrp104との間のCation- π 相互作用エネルギーを強くする目的で、HQLのpiperidine環のN-H(+)からTrp104のindole環へのinteractionが増加するように、piperidine環の官能基を置換、2) HQLとTyr8、GSHとの空間に新規に、GSH--阻害剤(HQL)--Tyr8の水素結合トライアングルネットワークを形成、3) blueとTrp104との間の $\pi-\pi$ 相互作用を強化目的の構造設計、をすることである。尚、上記1)を補足すると、A.S. ReddyとG.N. Sastry [5]による量子力学計算に基づく計算では、 NH_4^+ の窒素原子とindoleの6員環(5員環側ではなく)の最も安定な構造は、N原子との距離が2.88 Åであることが報告されている。本HQLのX線構造では、N原子からindole ringへの距離は3.97 Å(A鎖)、3.77 Å(D鎖)であり、安定構造から若干伸びている。今後のHQLを母核とした阻害剤開発では、より構造を安定化するような設計が重要である。

参考文献

- [1] Inoue, T., Irikura, D., Okazaki, N., Kinugasa, S., Matsumura, H., Uodome, N., Yamamoto, M, Kumasaka, T., Miyano, M., Kai, Y., Urade, Y., Nat. Struct. Biol. 10, 291 (2003).
- [2] Inoue, T., Okano, Y., Kado, Y., Aritake, K., Irikura, D., Uodome, N., Kinugasa, S., Okazaki, N., Matsumura, H., Kai, Y., Urade, Y., J. Biochem. 135, 279 (2004).
- [3] Ma, J., Dougherty D., Chem. Rev. 97, 1303 (1997).
- [4] Mo, Y., Subramanian, G., Gao, J., Ferguson, D., J.A.C.S. 124, 4832 (2002).
- [5] Reddy, A.S., Sastry G.N., J. Phys. Chem. A, 109, 8893 (2005).

Research for Method of Protein Structure Analyzing using X-ray by using Drug Design System on Computer

Project Representative

Toshikazu Takada Fundamental and Environmental Research Laboratories, NEC

Authors

Toshihiro Sakuma NEC Informatec Systems, Ltd.

Toshio Akimoto NEC Informatec Systems, Ltd.

Naoto Yamaguchi NEC Soft, Ltd.

Yuichi Hirokawa Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

QM/MM calculations based on ab initio molecular orbital theories are carried out to investigate a possible drug against prostaglandin D2 synthetase which causes allergic reactions in human bodies. The two ligands are selected to study the interactions between them and the protein, from the complex structures determined by X-ray structure analyses by Inoue et al, that is, HQL-79 and Cibacron-bule. The cation- π interaction between piperidine of HQL-79 and indole of Trp104, and π - π interaction between anthraquinone of Cibacron-blue and indole of Trp104 are found to be important. As the result, those cation- π and π - π interactions are considered to be a guiding principle to design new drug for prostaglandin D2 synthetase.

Keywords: ab initio molecular orbital theory, QM/MM method, drug design, prostaglandin D2 synthetase, inhibitor