

タンパク質周囲の水分子の観測に基づいた リガンド結合部位予測システムの開発

Development of protein-ligand binding site prediction system

focusing on water molecule dynamics

佐々木 孝章[†]
Takaaki Sasaki

関嶋 政和^{†,‡}
Masakazu Sekijima

概要

タンパク質とリガンドの結合は、タンパク質の機能発現や創薬に重要である。タンパク 3000 プロジェクトを始めとするタンパク質の大規模な構造解析により、多くのタンパク質の構造情報が得られてきた。このタンパク質の構造情報からタンパク質とリガンドとの結合を予測し、機能発現や創薬への応用が期待されている。従来、リガンド結合部位は立体構造解析と静電場の解析から求められてきており、その結果、*in silico* による創薬では相補的構造を有する分子を中心に探索されている。本研究では、水分子が自由度を得るとエントロピー的に有利に機能することを利用し、タンパク質周囲の水分子のダイナミクス解析を行うことでリガンドの結合部位予測を行うシステムを開発し、その検証を行った。

1 はじめに

近年、日本では薬の特許切れが相次ぐ一方で、新薬の創出能力の低下が問題視されている。医薬品の開発において、ターゲットとなるタンパク質に結合するリガンドは、天然資源からの単離やハイスループット・スクリーニング (HTS : high-throughput screening) が主に使われてきた。HTS は、既知の化合物のみに適用可能な方法であること、極めてコストが大きいこと、偽陽性ヒットの割合の大きいことなどが問題になっている。また、HTS では活性が高いが単位原子当たりの有効性が低い化合物から最適化を始めるために、最終化合物は分子量及び構造の複雑性の増大に伴う物性の悪化が懸念される [1]。この問題を解決する手法として、

低分子量化合物からリード化合物を作り上げて行くフラグメントベース創薬 (FBDD : fragment based drug design) への取組みが進められている [2]。FBDD では、活性は低い単位原子当たりの有効性が高い化合物に対して、化合物の伸張や結合等の最適化を行う為に、無駄の少ないコンパクトな最終化合物の作成を可能にする。従来のタンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計では、リガンド結合部位の立体構造解析と静電場の解析 (鍵穴構造の解析) から、この部位での相補的構造を有する分子 (鍵) をデータベースから検索し、結合を行う [3]。具体的には、活性部位の空洞を原子を模した球体で埋め、その球体の中心間の距離を求め、原子間距離が近い化合物を分子構造データベースから検索するという方法である。しかし、この手法では設計されるリガンドは立体構造上の相補性に依存することになり、活性が低い母化合物を拡張することで単位原子当たりの有効性が高まるかは保証されない。つまり、現状ではタンパク質とリガンドが結合した構造 (活性構造) を考慮した最適化を行うことが困難である。本研究では、水分子が自由度を得るとエントロピー的に有利に機能することを利用して、タンパク質とリガンドが結合した構造 (活性構造) を考慮したリガンド設計を可能にするためにリガンド結合部位予測を行うシステムを開発し、その検証を行うことを目的とする。

2 システムの概要

2.1 MD シミュレーションによる水分子のダイナミクスの獲得

分子動力学法 (MD : molecular dynamics) を用いることで、対象となるタンパク質の周囲の水のダイナミクスを獲得する。まず、対象となるタンパク質エネ

[†]東京工業大学大学院情報理工学専攻 計算工学専攻

[‡]東京工業大学学術国際情報センター

ルギー最小化を1000ステップおこなう。次に、水分子を対象となるタンパク質の周囲に直方体状に配置する。水分子を緩和させる為に、分子動力学法を用いて30psかけて0Kから300Kまで圧力を一定にして温度を上げた後、20psの等温のMDシミュレーションを実行する。この過程を経た対象となるタンパク質について2種類のMDシミュレーションを行う。一つは初期から常に対象となるタンパク質の構造を固定したまま水分子のみが動くことが可能な20nsのMDシミュレーションをおこなう方法である。もう一つは対象となるタンパク質に対し、MDシミュレーションを10ns間実行し、1ns毎にスナップショットを取ることで熱揺らぎを考慮し、それらのスナップショットを固定して水分子のみが動くことが可能なMDシミュレーションをそれぞれ10ns実行する方法である。

2.2 水分子のダイナミクス解析

MDシミュレーション結果からPDBファイルを出し、解析を行なう。対象となるタンパク質から10ps毎の原子の各座標をPDBファイルとして出力する。次に、対象となるタンパク質と水からなる系を一边1.5Åの立方体に細分化する。MDシミュレーションの結果毎にPDBファイルから水がどの立方体内に存在するかカウントし、水の向きを調べる。水の向きは酸素原子の座標と、二つの水素原子の中点を結ぶベクトル $v_{i,j}$ として定義する。 i はPDBファイルの出力番号、 j は水分子の番号を示す。

$$\bar{v}_k = \frac{1}{n_k} \sum_{v_{i,j} \in k} \frac{v_{i,j}}{|v_{i,j}|} \quad (1)$$

ここで \bar{v}_k とは、立方体 k における平均のベクトルであり、 n_k は立方体 k において観測された水分子の個数を表す。各ベクトルを立方体毎で正規化を行い平均をとると、その大きさが0に近いと向きが揃っていない事になり、1に近づくほど立方体内で同じ向きをしている事がわかる。水分子が同じ向きをしている領域では水素結合ネットワーク等が存在する事が想定できる。各シミュレーションから出力されたすべてのPDBファイルからデータを得られたら、シミュレーション時間の半分以上において水が観測された領域と水の向きの平均を解析する。

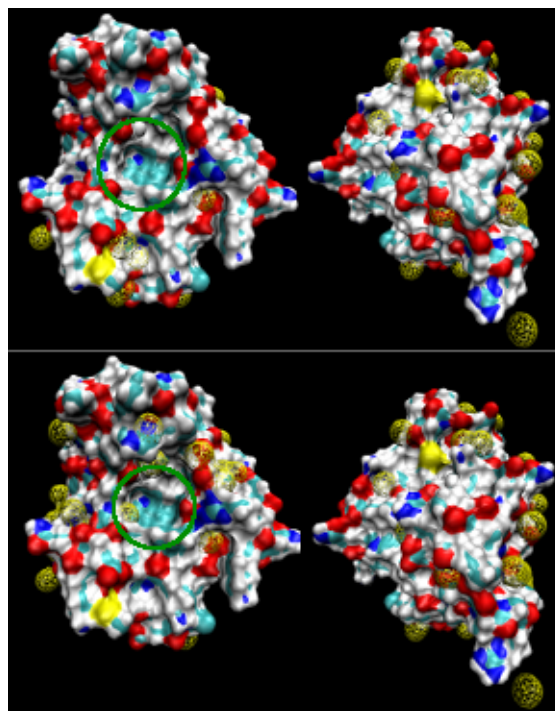


図1: 固定した構造からの解析結果。黄色のwireframeが水分子が多く観測された領域を表す。上段が1000, 下段は800をカウントの閾値としたもの。左側がFK506の結合するポケットのある表面, 右側はその裏を示す。緑の円で囲った部分がFK506結合部位。

3 実験結果

3.1 実験の条件

本研究では、対象となるタンパク質として、免疫抑制剤の一種であるFK506と呼ばれるリガンドと結合するFKBP (FK506 Binding Protein[4])を用いた。周囲に配置する水分子はTIP3Pモデルを用いた。分子動力学シミュレーションには、AMBER10のPMEMDを用いた。長距離の静電相互作用にはParticle Mesh Ewald (PME)法を用いて、カットオフ距離は10Åに設定した。水分子が立方体で多く観測されたとする閾値を全ステップの半数以上(3.2では1000, 3.3では500)とした。3.2においては、800を閾値とした結果も示す。

3.2 固定した構造からの解析

20ns間固定したシミュレーションでは、水分子が全ステップの半数(1000ステップ)以上観測された領域は27か所存在した(図1上段)。その大部分はタンパ

ク質の表面に点在しているが、リガンドが結合可能なポケット様な部位に留まっているものはなかった。閾値を800ステップとして観測された領域を調べたところ、該当する領域は67か所見つかかり、そのうち2か所がFK506結合部位の内部に見つかった。(図1下段)。なお、水分子が少なくとも1回観測された領域における全体の平均観測ステップ数は105であることから、800ステップ以上観測された領域は他の領域と有意な差があるといえる。

水の向きベクトルは、1000ステップ以上観測された領域の平均が、0.828であり、領域ごとに同じ向きをしている割合が多い事がわかる。また800ステップ以上では0.772という結果になった。一方で1000ステップ未満の領域における平均は、0.157である。水分子の偏在する領域では水の向きについても特徴がある事がわかる。

3.3 熱揺らぎを考慮した解析

それぞれのスナップショット(B-1~B-10)からMDシミュレーションを行い、全ステップの半数(500ステップ)以上で水分子を観測した領域は最少で23か所、最多で44か所となりスナップショット毎にばらつきがある(表1)。その位置については固定した構造からの解析と同様、タンパク質表面に点在している。しかし固定した構造の解析の場合と異なり、閾値を全ステップの半数に設定した場合においても、FK506結合部位の内部には500ステップ以上観測された領域が、1か所以上存在している。

水の向きの平均については、どのスナップショットでも多く観測された領域では0.8前後である(図2)。全体の平均は約0.16であり、この結果に関しても3.2で説明したように、タンパク質が偏在する部分においては、他の領域と比べて向きも決まっているという事を示している。

熱揺らぎを考慮した解析では、水分子の偏在する領域がそれぞれ異なっており、特定のシミュレーションのみで観測される水分子の偏在は、その初期構造が有無偶然であり、B-1~B-10の多くに共通する水分子の偏在は、リガンドの結合部位を始め何らかの意味を持つと考えられる。図3は、B-6~B-8のスナップショットを利用した実験から水分子の偏在する領域をwireframeの形で表した結果である。熱の揺らぎによってタンパク質の構造の変化や移動が起きている事と同時に、水分子の観測される領域が変化している。例えば、図3の右側は上段(6ns)では中央に水分子の偏りが見られ

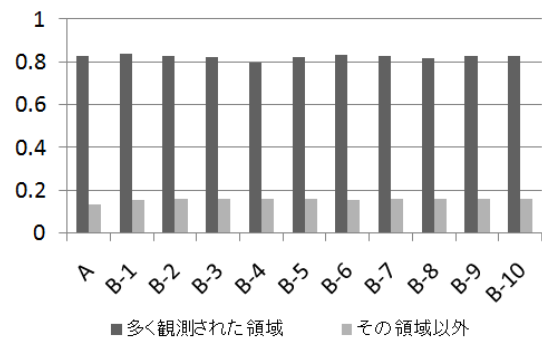


図2: 水分子の向きの平均。

るが、中央(7ns)ではそのような領域が無くなっている。同じく左側を見ると、タンパク質の右下にくぼみがあり、下段(8ns)では水分子が多く観測されたが、6,7nsの時は多く観測されなかった。その一方で、緑の円で囲ったFK506の結合部位となる部分には水の偏在する領域がどのスナップショットでも存在している。全スナップショットのシミュレーションを解析したところ、FK506の結合する部位を含めリガンドが結合可能なポケットの候補を発見した。

4 まとめ

本研究では、タンパク質のリガンド結合部位を水のダイナミクスから予測するシステムを開発した。タンパク質とリガンドが結合する際、活性部位に水和している水が外に排出されることによってエネルギー的な安定をはかる[4]。この排出は結合自由エネルギーにエントロピー的にもエンタルピー的にも寄与する。これは結合前では、水和水は配向と位置の制約からエントロピー的に不利であり、疎水性クロージャに水和した水は、水素結合の補完が形成できないためエンタルピー的に不利となることを利用している。

本研究では、タンパク質のリガンド結合部位の予測の検証を行う為に、FKBPを用いたMDシミュレーションを行い、タンパク質内の水分子のダイナミクスについて解析を行った。その結果、リガンドが結合可能なポケット様な部位において、水分子が他の領域と比較して偏在している事を確認した。またそのような領域の水分子はある一定の方向を向いている事を示した。一定の方向を向く事は水素結合などの分子間の相互作用により束縛されていると考えられる。このような領域の水分子はそこから離れる事によって自由度を得るこ

表 1: 全ステップのうち半分以上水分子が観測された領域の数

シミュレーション	A	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9	B-10
結合部位の内部	0	1	2	2	1	1	3	1	1	3	2
その他の領域	27	22	40	38	34	33	31	28	37	36	42
計	27	23	42	40	35	34	34	29	38	39	44

A:20ns 固定の MD シミュレーション B-n:固定せずに n ps の MD シミュレーション

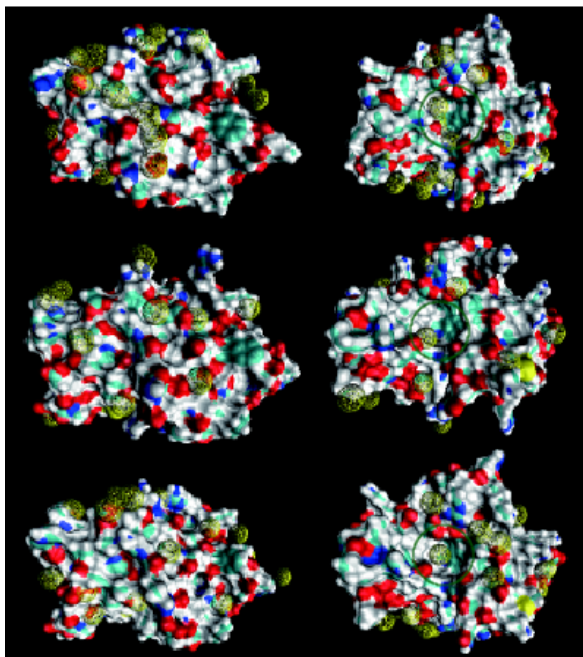


図 3: スナップショットを使った結果. 上から 6ns, 7ns, 8ns の状態を表す. 右側が FK506 の結合するポケットのある表面側, 左側はその裏側. 緑の円で囲った部分が FK506 の結合部位となる.

とができる事から活性に影響を及ぼしているリガンド結合部位候補である. 一方で, タンパク質表面においても水分子が偏在する領域が確認されたが, スナップショットを用いることで熱揺らぎを考慮したシミュレーションにより, タンパク質表面に偶然留まるような場合をある程度取り除く事ができる.

熱揺らぎを考慮した実験では, 1ns のあいだにタンパク質の構造が大きく変わっている事もあり, 同じ領域の水分子の偏在を評価する事が難しい場合もある. しかし, シミュレーション全体の半数を閾値とした場合においては, タンパク質を固定した実験と異なり, リガンド結合部位において水分子が多く観測されており, この事から, 熱揺らぎを考慮する事でより正確な予測が可能になると考えられる. 今後は相対的な座標を考

慮できるような手法や, 他のタンパク質を用いて同様の実験を行い, より適切な閾値を求める必要がある.

参考文献

- [1] Oprea, T. I., Davis, A. M., Teague, S. J. and Leeson, P. D.: Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, Vol. 41, No. 5, pp. 1308–1315 (2001).
- [2] Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. and Fesik, S. W.: Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR, *Science* 29 November 1996, Vol. 274 No. 5292 pp. 1531–1534 (1996).
- [3] Kuntz, I. D.: Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery *Science* 21 August 1992, Vol. 257 No. 5073 pp. 1078–1082 (1992).
- [4] Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., Clardy, J.: Atomic Structure of FKBP-FK506, an Immunophilin-Immunosuppressant Complex *Science* 10 May 1991, Vol. 252 No. 5007 pp. 839–842 (1991).
- [5] Abel, R., Young, T., Farid, R., Berne, B. J. and Fresner, R. A.: Role of the Active-Site Solvent in the Thermodynamics of Factor Xa Ligand Binding *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 130, No. 9, pp. 2817–2831 (2008).