

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590042

研究課題名（和文） 架橋水をリガンドに組み込んだ仮想的な水和リガンドドッキング法の開発

研究課題名（英文） Development of a new docking method using the hypothetical hydrated ligand which take account of bridging water molecules

研究代表者

山乙 教之 (YAMAOTSU NORIYUKI)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：60230322

研究成果の概要（和文）：蛋白質-リガンドドッキング法において、水を介したリガンド分子と標的蛋白質の相互作用は、まれにしか考慮されていない。しかしながら、蛋白質-リガンド複合体の形成において、水分子が蛋白質とリガンド間の水素結合架橋により、蛋白質-リガンド相互作用の安定化に大きな役割を演じる場合がある。この研究において、我々は、蛋白質によるリガンド認識に関与し、蛋白質-リガンド相互作用を安定化する水分子を考慮する仮想的な水和リガンドを用いた簡便なドッキング手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：In protein-ligand docking methods, the interaction of the target protein with the ligand molecule through water is rarely considered. In the formation of protein-ligand complex, however, there are some cases that water molecules play a significant role in stabilizing the protein-ligand interactions by hydrogen-bond bridging between the protein and the ligand. In this study, we devise the easy-to-use docking approach using the hypothetical hydrated ligand which take account of water molecules involving in recognition of the ligand by the protein and stabilizing the protein-ligand interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドッキング、リガンド、結晶水、酵素、蛋白質、水素結合、相互作用、複合体

1. 研究開始当初の背景

蛋白質とリガンド分子の複合体形成において、水分子は様々な形で影響を与えている。特に、幾つかの高解像度のX線結晶構造において、リガンドが水分子を介して蛋白質のアミノ酸残基と水素結合している事が観測されている。これらの水分子（架橋水と呼ぶこ

とにする）は、水素結合ブリッジを介して、蛋白質のリガンド認識や、蛋白質-リガンド複合体の安定化に重要な役割を果たしている事が知られている。このような架橋水を考慮することは、リガンドの結合様式や複合体の結合親和性を明らかにする上で、極めて重要である。

ヒトゲノム計画の完了により、今後、多数の病気関連の蛋白質立体構造が明らかになると予想され、標的蛋白質の立体構造に基づいた薬物分子設計 **Structure-Based Drug Design (SBDD)**は、創薬においてより重要性が増す。そして、コンピュータによる蛋白質へのリガンドドッキングの精度の向上が、**SBDD**の成否の鍵になると考えられる。しかし、現在のリガンドドッキング研究では架橋水を考慮しないため、正しい結合様式を得られない事が多い。したがって、最初から架橋水を考慮したリガンドドッキング研究を行うことが**SBDD**にとって重要である。

従来、蛋白質-リガンド複合体 X線結晶構造が既知であり、リガンドと蛋白質間に存在する結晶水の位置から架橋水の必要性が明らかになっている場合には、リガンドのドッキング計算時に、顕わに架橋水を蛋白質の一部として組み込むことで、取り扱ってきた。しかしながら、リガンドの中には、自分自身の水素結合性官能基で、架橋水の肩代わりをするものもあり、問題は簡単ではない。さらに、蛋白質単独の構造のみが明らかな場合には、架橋水の有無自体が分からない。

また、架橋水を考慮する別の方法として、最初にリガンドのみのドッキング計算を行い、後から水分子を発生させる方法も考えられるが、その場合、ドッキングプログラムは、リガンドを蛋白質の水素結合可能なアミノ酸残基と直接相互作用させてしまうので、リガンドと蛋白質の間に架橋水を置くことができない。

2. 研究の目的

そこで、我々は、架橋水を、蛋白質の一部として取り扱うのでも、後から発生させるのでもなく、リガンドの一部として、架橋水を組み込んだ仮想的水和リガンド法を考案した。この方法では、リガンド中の水素結合可能な官能基全てに対して、考えられる水分子との水素結合を実際の結合として結んだ仮想的水和リガンドを作成し、そして、元のリガンドと仮想的水和リガンドの両方をドッキングして、水分子も含めた蛋白質-リガンド相互作用の評価を行う。架橋水が必要な場合には、仮想的水和リガンドが選択され、架橋水が必要でない場合には、元のリガンドが選択されるというものである。

従来のドッキング手法では、架橋水を考慮していないために、リガンドの結合様式を正しく再現出来ない多数の事例を用いて、本手法の有効性を検証するとともに、仮想的水和リガンドを作成する際の各パラメータを決

定する。

前述したように、既存のドッキングプログラムにおいては、X線構造から明らかとなっている架橋水を蛋白質の一部として取り込むことで架橋水を取り扱っている。しかし、我々が考案した仮想的水和リガンド法は、リガンドの一部として、架橋水を組み込む方法である。この方法の利点は、既存のドッキングプログラムをほとんど改変することなく、仮想的な水和リガンドを通常のリガンドと同様に、ドッキングプログラムに入力することで実行可能なことである。

この手法が確立した場合、蛋白質単独の構造のみが明らかになっている場合でも、薬物のリード探索のためのコンピュータを用いたヴァーチャル・スクリーニングにおいて、より精度の良いドッキング計算ができるものと予測される。

我々は、市販のドッキングプログラム **Surflex-Dock (Certara, L.P.)**を用いて予備的な研究を行い、架橋水を介する蛋白質-リガンド複合体系と介さない系、それぞれ数個について、元のリガンドと仮想的水和リガンドの両方をドッキングした場合、架橋水を介した系では、仮想的水和リガンドが選択され、架橋水を含めたリガンド結合様式を再現することに成功し、また、架橋水を介さない系では、元のリガンドが選択され、正しい結合様式が得られることを確かめている。しかし、汎用の手法とするには、更なる検証と、手法の自動化が必要である。

3. 研究の方法

仮想的水和リガンドドッキング法の有用性を検証するために、まず、PDB上の蛋白質-リガンド複合体 X線結晶構造から、蛋白質-リガンドの間に架橋水が介在している系としていない系をそれぞれ抽出し、検証データセットを構築した。ついで、リガンド中の水素結合形成可能な官能基と水分子との水素結合を実際の結合として結び、仮想的水和リガンドを作成した。仮想的水和リガンドと元の非修飾のリガンドを併せてドッキングし、相互作用評価を行った。架橋水が存在する系では仮想的水和リガンドが、存在しない系では元のリガンドが、正しく選択されたかを確認を行った。そして、ドッキング結果が、架橋水も含めた X線の結合様式をどれだけ再現できたかについて検討した。

(1) 検証系の構築

蛋白質-リガンド複合体 X線構造データベース PDBbind [Wang, R., et al., *J. Med. Chem.*, 47, 2977-2980 (2004), Wang, R., et

al., *J. Med. Chem.*, 48, 4111-4119 (2005), Cheng, T., et al., *J. Chem. Inf. Model.*, 49, 1079-1093 (2009)]に登録されている X 線結晶構造から、蛋白質-リガンドの間に架橋水が介在している複合体構造を選択し、検証系を構築した。また、水分子が介在しない蛋白質-リガンド複合体系に対して、仮想的な水和リガンド法を適用しても、仮想的な水和リガンドではなく、元のリガンドを正しく選択することを確認するために、水分子が介在しない複合体系のデータセットも作成した。

(2) 仮想的な水和リガンドの作成

仮想的な水和リガンドの作成方法は、リガンドの官能基の中で水分子と水素結合を形成し得る全ての箇所において、水分子との水素結合を実際の結合として結び、仮想的な水和リガンドを作成することによる。この仮想的な結合の結合長は、蛋白質-リガンド相互作用に参与する水分子とリガンドとの間の水素結合距離の平均値(2.7Å)とした。仮想的な結合部分については、基本的に $-CH_n-OH$ ($n=0, 1, 2$) の形とした。ただし、平面性を持つようなアミドやアニリン性の窒素原子等については $-NH_n-OH$ ($n=0, 1$) (平面性を保つ窒素原子タイプを割り当てた) の形を取ることとした。

(3) ドッキング計算

作成した仮想的な水和リガンドおよび修飾を施していない元のリガンドの両方について、ドッキングプログラム Surflex-Dock (Certara, L. P.) [Jain, A. N., *J. Med. Chem.*, 46, 499-511 (2003), *J. Comput. -Aided Mol. Des.*, 21, 281-306 (2007)] を用いて、ドッキング計算を行った。

ドッキングプログラムとして、Surflex-Dock を選択した理由は、ドッキングアルゴリズムに、リガンドを部分構造ごとに構築する増加構築法を用いているからである。この増加構築法は、仮想的な水和リガンド法と相性が良いと考えられる。

(4) エネルギー極小化計算および結合自由エネルギー値の評価

各々のリガンドに対して得られた多数のドッキングポーズについて、蛋白質-リガンド相互作用評価プログラム CScore (Certara, L. P.) [Clark, R. D., et al., *J. Mol. Graph. Model.*, 20, 281-295 (2002)] の 5 つの評価関数を用いてスコアを計算し、当研究室で定義したコンセンサス・スコアリング法 AASS (Average of Auto-Scaled Scores) [Katsuki, M., et al., *J. Biol. Chem.*, 280, 1384-1391 (2005), Oda, A., et al., *J. Chem. Inf. Model.*, 46, 380-391 (2006)] に基づき、ドッキングモデルのランク付けを行い、AASS 値

の上位 20 個のドッキングモデルを候補構造として選択した。

(5) エネルギー極小化計算および結合自由エネルギー値の評価

20 個の候補構造について、仮想的な水和リガンドのドッキング構造を、実際のリガンド分子と架橋水に戻した後、エネルギー極小化計算を行った。そして、より精度の高い結合自由エネルギーを求めることができる MM/PBSA 計算を行い、最も安定な候補構造を最終的な結合様式として決定した。MM/PBSA 計算には、高速 MM/PBSA 計算プログラム Zap [Grant, J. A., et al., *J. Comput. Chem.*, 22, 608-640 (2001)] を用いた。

4. 研究成果

(1) リガンド内の水素結合性官能基を仮想水和化するプログラムを作成した。そして、プログラムの検証のために、キチナーゼ B と新規阻害剤とのドッキング計算に適用した。この蛋白質と既知阻害剤の複合体 X 線結晶構造において、6 個の水分子が蛋白質-リガンド間を架橋していることが知られている。新規阻害剤とのドッキング計算において、仮想水和化したリガンドが、仮想水和化していない元のリガンドより自由エネルギー的に有利であるとして選択された。既知阻害剤とキチナーゼ B を架橋していた 6 個の水分子の内、新規阻害剤では、3 個の水分子が保存されていた。この仮想水和化したリガンドとキチナーゼ B との複合体モデルは、NMR より得られた複合体構造情報と正しく一致した。この計算により、仮想的な水和リガンドドッキング法の有効性が証明された。

(2) 仮想的な水和リガンドドッキング法では、リガンドの水素結合性官能基を仮想的な水和化する必要があった。しかしながら、全通りの組み合わせの数だけ、仮想的な水和リガンドを作成しドッキングするのは、計算時間がかかる。そこで、蛋白質-リガンド複合体形成において架橋水が関与する場合のリガンド側フラグメントや蛋白質側サブサイトについての情報を利用して、作成するべき仮想的な水和リガンド数の削減を試みた。

蛋白質のリガンド結合サイト内で水素結合している水分子を検出するプログラムを作成し、蛋白質-リガンド複合体 X 線構造データベース PDBbind に対して検索を行った。蛋白質-リガンド間を架橋している水分子を架橋水、リガンドから 4Å 以内だが蛋白質とのみ水素結合している水分子を水和水として定義した。そして、架橋水および水和水から 4Å 以内のアミノ酸残基を水結合サブサイトとして検出した。

得られた水結合サブサイト同士を、今回開

発したサブサイト重ね合わせプログラム SUPERPOSE_SITE を用いて重ね合わせアミノ酸残基の空間配置の類似性を計算した。各水結合サブサイトについて、出現頻度を集計し、5 回以上検出されるものを水分子結合モチーフとして同定した。そして、高確率で、架橋水を持つものを架橋水結合モチーフ、水和水を持つものを水和水結合モチーフと定義した。

PDBbind 中の core セット (216 蛋白質-リガンド複合体) について検索を行った結果、数十個の水分子結合モチーフを見出した。その内、架橋水結合モチーフは 3 個、水和水結合モチーフは 1 個存在した。残りは、架橋水/水和水のどちらも取りうる水分子結合モチーフだった。このデータを活用することにより、ドッキングしたい結合サイト内における架橋水の最小・最大数が分かるため、仮想水和水化するリガンド官能基の数を予め決定でき、計算時間を短縮できる。

(3) 手法の開発から得られた知見に基づき、ブラジル産プロポリスに含まれる 2 種の成分、artepillin C (C3) とその誘導体 (C4) について、PPAR γ と JNK1 に対するドッキング計算を行った。その結果、C3 は PPAR γ のアゴニストとして働き、C4 は JNK1 の阻害剤として働くことを明らかにした。従って、C3 と C4 は、化学構造が類似しているにもかかわらず、異なる標的蛋白質に結合し、それゆえ、異なる機構によりアディポネクチンの発現低下を抑制することが分かった。

また、新規抗がん剤のリード化合物として期待されている AMF-26 を、ゴルジ体の小胞輸送に関与する Arf1-ArfGEF 蛋白質-蛋白質複合体にドッキングし、分子動力学法によりドッキングモデルの精密化を行った。それにより、AMF-26 が、既知のゴルジ体阻害剤 Brefeldin A (BFA) と同じ結合サイトに結合すること、すなわち、AMF-26 のゴルジ体破壊作用が、BFA と同じ機構によることを明らかにした。

さらに、 κ -オピオイド受容体や ABCG2 トランスポーターについても、リガンド側から解析を行い、新薬開発のための重要な示唆を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Nagase H, Imaide S, Yamada T, Hirayama S, Nemoto T, Yamaotsu N, Hirono S, Fujii H, Essential Structure of Opioid κ Receptor Agonist Nalfurafine for Binding to κ Receptor 1: Synthesis of

Decahydroisoquinoline Derivatives and Their Pharmacologies, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 査読有, 60(8)、2012、945-948

DOI:10.1248/cpb.c12-00336

- ② Ishikawa T, Hirano H, Saito H, Sano K, Ikegami Y, Yamaotsu N, Hirono S, Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Analysis to Predict Drug-Drug Interactions of ABC Transporter ABCG2, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 査読有, 12(6)、2012、505-514

DOI:10.2174/138955712800493825

- ③ Ohashi Y, Iijima H, Yamaotsu N, Yamazaki K, Sato S, Okamura M, Sugimoto K, Dan S, Hirono S, Yamori T, AMF-26, a Novel Inhibitor of the Golgi System, Targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with Potential for Cancer Therapy, The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 287(6)、2012、3885-3897

DOI:10.1074/jbc.M111.316125

- ④ Ikeda R, Yanagisawa M, Takahashi N, Kawada T, Kumazawa S, Yamaotsu N, Nakagome I, Hirono S, Tsuda T Brazilian propolis-derived components inhibit TNF- α -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 査読有, 1810(7)、2011、695-703

DOI:10.1016/j.bbagen.2011.04.007

- ⑤ Gouda H, Sunazuka T, Hirose T, Iguchi K, Yamaotsu N, Sugawara A, Noguchi Y, Saito Y, Yamamoto T, Watanabe T, Shiomi K, Ōmura S, Hirono S, NMR spectroscopy and computational analysis of interaction between *Serratia marcescens* chitinase B and a dipeptide derived from natural-product cyclopentapeptide chitinase inhibitor argifin, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 査読有, 18(16)、2010、5835-5844

DOI:10.1016/j.bmc.2010.06.093

- ⑥ Yamaotsu N, Fujii H, Nagase H, Hirono S, Identification of the three-dimensional pharmacophore of κ -opioid receptor agonists, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 査読有, 18(12)、2010、4446-4452

DOI:10.1016/j.bmc.2010.04.069

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山乙教之、蛋白質の水分子結合モチーフ：架橋水と水和水、日本コンピュータ化学会 2012 秋季年、2012 年 10 月 14 日、山形大学（山形県）
- ② 山乙教之、タンパク質と相互作用する分子フラグメントを同定するプログラムの開発、日本コンピュータ化学会 2011 秋季年会、2011 年 11 月 5 日、福井商工会議所（福井県）
- ③ 山乙教之、タンパク質と相互作用する分子フラグメント探索法の開発、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、（静岡県）

〔図書〕（計 1 件）

- ① Yamaotsu N、Hirono S、(Ed. Nagase H)、Springer-Verlag、Chemistry of Opioids、(Topics in Current Chemistry 299)、2011、277-307
DOI:10.1007/128_2010_84

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山乙 教之 (YAMAOTSU NORIYUKI)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：60230322