

平成 21年 5月 14日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号：19700278
 研究課題名 (和文) 計算科学的・生化学的手法を用いた EGF レセプター高親和性人工リガンドの分子設計
 研究課題名 (英文) Computational design of artificial ligand for EGF receptor

研究代表者
 末永 敦 (SUENAGA ATSUSHI)
 独立行政法人理化学研究所・高速分子シミュレーション研究チーム・基幹研究所研究員
 研究者番号：90415191

研究成果の概要：上皮増殖因子 (EGF) レセプターに対して、天然 EGF 分子よりも高親和性を持つ人工 EGF 分子を計算科学的手法を用いて設計し、その効果を生化学的手法を用いて確認した。その結果、天然 EGF よりもわずかに高親和性の人工 EGF 分子の設計に成功した。本研究では、1アミノ酸変異のみを EGF に導入したが、多重変異を導入することでより強力な分子設計法に発展することが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・コンピュータシミュレーション

キーワード：細胞内情報伝達系・分子シミュレーション・結合自由エネルギー

1. 研究開始当初の背景

細胞は、置かれた細胞外環境の変化に対して常に応答する。この細胞応答は多くの場合、その細胞外因子 (ホルモン、栄養分など) を細胞が受容体 (レセプター) を通じて受取、その情報を核へと伝え (細胞内情報伝達系)、ふさわしい遺伝子を発現することにより引き起こされる。この応答を一步間違えれば、癌などの疾患を生じ、個体の危機を招きかねない。細胞内情報伝達系において、上皮増殖因子 (EGF) レセプターとそのリガンドであるペプチド性ホルモン (EGF) の結合は、癌

化と密接な関係があることが知られ、この結合を標的とした抗癌剤の期待から世界各国において活発に研究されている。特に、天然に存在する EGF と拮抗するような高親和性人工リガンドは EGF レセプターの活性制御剤として用いられることが期待されているため、注目度は高い。しかしながら、これまでの新規ペプチド性分子の設計は、試行錯誤的な実験による突然変異体構築により行われており、組み合わせ数かつ費用が膨大に必要であり、決め手となる分子設計法は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、EGF レセプターと EGF の結合に着目し、EGF レセプターに対し天然 EGF よりも高親和性の人工 EGF 分子を計算機シミュレーションと生化学的実験の両面から設計し、ペプチド性新規人工リガンドの効率的な分子設計法を確立することを目的とした。設計された新規人工 EGF は、非抗体アンタゴニストとして働くことや、EGF レセプター制御剤として用いられることが期待される。

3. 研究の方法

人工リガンドは、天然リガンドよりも簡素であるほうが理想的である。そのため、EGF 分子における EGF レセプターとの結合に重要な領域を、分子動力学シミュレーションにより得られた動態解析の結果から抽出した。さらに、上記の結果得られた「結合に重要ではない領域」を削った EGF 分子を数種作成し、それぞれの分子動力学シミュレーションを 100 ナノ秒間行い、構造の安定性を確認し最も安定な欠損 EGF を得た。次いで、その一部欠損した EGF を構成する 22 個のアミノ酸それぞれに対して、全ての可能な 1 アミノ酸置換を計算機上で行い、1 アミノ酸変異欠損 EGF 分子を構築した。本研究では、人工リガンドの特性を持たせるために、2 種類の非天然アミノ酸（ノルロイシン、オルニチン）も候補に入れた。従って、欠損 EGF 22 残基×（自分自身を除くアミノ酸種 19 + 非天然アミノ酸 2 種）= 462 種について、1 アミノ酸変異欠損 EGF と EGF レセプターの複合体構造モデルを作成した。それぞれのモデル構造に対し、構造平衡化のための分子動力学シミュレーションを 1 ナノ秒間行い、リガンドとレセプター間の結合親和性を Linear Interaction Energy 法により算出した。

上記により見積もられた 1 アミノ酸変異欠損 EGF と EGF レセプター間の結合親和性について順位付けを行い、高親和性 1 アミノ酸変異欠損人工 EGF 分子の候補を網羅的に検索する。それら候補を 10 程度に絞り、生化学的実験（1 分子蛍光測定）により、精密な結合親和性を測定し、人工リガンドの最終候補を得た。

4 結果とまとめ

4-1. 研究成果

EGF と EGF レセプター複合体の分子動力学シミュレーションから、EGF と EGF レセプターの結合に関する自由エネルギーとそのエネルギー成分を抽出した。その結果、EGF の EGF レセプターとの結合に重要な領域は、C

末端の 20 残基であることがわかった（図 1）。すなわち EGF の N 末端側は、EGF レセプターとの結合には関与しないと考えられた。そこで、人工リガンドとして簡素なモデルを構築するため、EGF の N 末端を 5 残基、10 残基、15 残基、20 残基、25 残基欠損させた EGF 欠損モデルを構築し、それぞれの分子動力学シミュレーションを行い構造の安定性を確認した。その結果、図 2 に示すように、N 末端 25 残基欠損 EGF ($\Delta N25$ -EGF) でも元の天然構造をよく維持していることが確認された。すなわち、 $\Delta N25$ -EGF は、EGF レセプターとの結合に重要な C 末端側の構造を維持し、かつ天然 EGF より簡素な構造を持つため（図 3）、この $\Delta N25$ -EGF を人工 EGF のテンプレート構造とした。

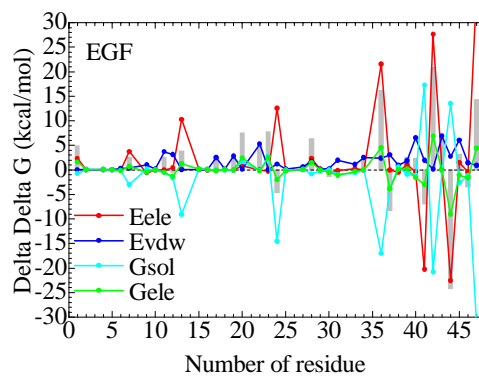


図 1 EGF-EGF レセプター間の相互作用自由エネルギーの成分分析。Eele: 分子間静電相互作用、Evdw: 分子間ファン・デル・ワールス相互作用、Gsol: 親水性水和に関する自由エネルギー成分、Gele: Evdw+Gsol

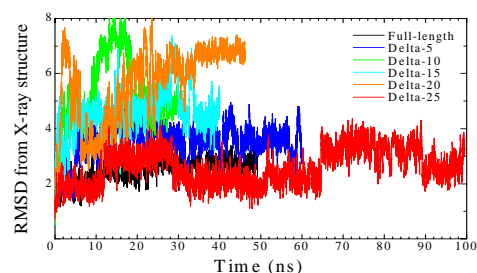


図 2 欠損 EGF の構造安定性

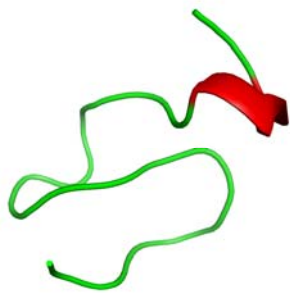


図3 ΔN25-EGFの構造

ΔN25-EGF を構成する22残基それぞれに対し、自分自身を除くアミノ酸+非天然アミノ酸2種（ノルロイシン、オルニチン）の1アミノ酸変異を導入し（総計462種）、分子動力学シミュレーションを行い、その結果から Linear Interaction Energy 法を用いて各種1アミノ酸変異ΔN25-EGFとEGFレセプターとの結合親和性を見積もった（図4）。Linear Interaction Energy 法は、生化学的実験により既に求められた既知の結合自由エネルギーを用い、未知の結合自由エネルギーを線形近似で求める方法であるが、本研究では既知のデータが存在しない。そのため、自分自身へのアミノ酸変異（すなわち天然EGF）の結合自由エネルギーを条件（初期構造）を変えてシミュレーションすることでいくつか求め、その結合自由エネルギーが±0.5 kcal/molになるよう線形近似して他の1アミノ酸変異EGFの結合自由エネルギーを産出した。そのため、本方法では、天然EGFとの相対的な結合自由エネルギー差が産出されるが、その正負の値は意味を持たない。したがって、計算によって見積もられた結合親和性の妥当性を確認するため、天然EGFと比較して結合親和性が高くなったまたは低くなったと見積もられた上下位各5個の1アミノ酸変異ΔN25-EGFに対して、生化学的実験（1分子蛍光測定）を行った（図5）。

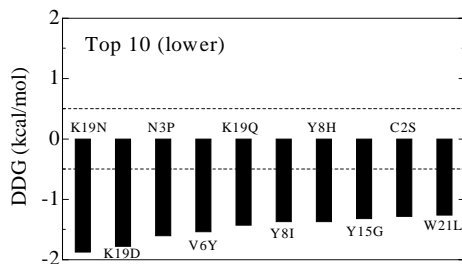


図4（続く）

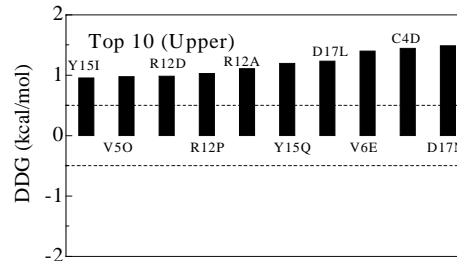


図4 計算機シミュレーションによって見積もられたΔN25-EGFとEGFレセプターとの結合親和性。左カラム図は、結合親和性が高くなった上位10候補、上図は結合親和性が低くなった下位10候補。

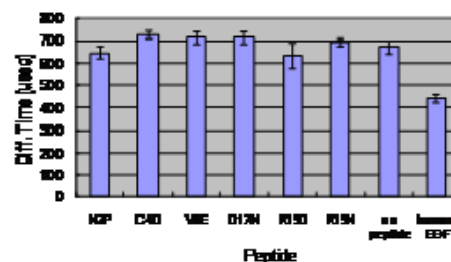


図5 一分子蛍光測定実験の結果

1分子蛍光測定の結果、計算機シミュレーションより予測されたΔN25-EGF-N3P、ΔN25-EGF-K19Dの2変異体が、天然EGFより僅かながらEGFレセプターとの結合親和性が高いことが確認された。

4-2. まとめ

本研究により、計算機シミュレーションは高親和性人工リガンドの分子設計に有効な方法であることを示すことができた。現段階では、1アミノ酸変異体のみを導入した人口リガンドの分子設計であるが、今後は2重、3重変異体への応用も可能であると考えられる。2重、3重変異体の場合、検索すべき候補数が膨大になるため、より高速かつ高性能な結合親和性予測法の開発が必須である。そのような高速・高性能結合親和性予測法は、本研究におけるタンパク質-タンパク質相互作用への応用のみならず、薬剤のような低分子化合物とタンパク質との相互作用研究にも応用が可能である（計算科学的な薬剤分子の設計）。すなわち、今後の発展研究により、計算機シミュレーションによる人工分子（機能性タンパク質や薬剤分子）の設計が実現可能となることが期待される。本研究は、そのような計算機シミュレーションをベースとした分子設計法開発の開拓に貢献し、またそれらによる成果は、癌に対する新規薬剤の開発等に大きく貢献すると考えられる。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 末永敦、Computational design of artificial ligand for EGF receptor、The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium、2008年9月25日、日本(熱海)

- ② 末永敦、計算科学的手法を用いたEGFレセプター高親和性人工リガンドの分子設計、次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発シンポジウム バイオスーパーコンピューティング2008、2008年12月25日、日本(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末永 敦 (SUENAGA ATSUSHI)

独立行政法人理化学研究所・高速分子シミュレーション研究チーム・基幹研究所研研究員

研究者番号：90415191