

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500376

研究課題名(和文) 進化計算アプローチによる創薬標的GPCRの立体構造予測法の開発

研究課題名(英文) Prediction of 3D Structure of Drug Target GPCR Using Evolutionary Computation

研究代表者

石野 洋子 (ISHINO, Yoko)

山口大学・大学院技術経営研究科・准教授

研究者番号：90373266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で対象とするGタンパク質共役型受容体(GPCR)は重要な創薬ターゲットであるにもかかわらず、これまで結晶構造解析で立体構造が解明されたものは数種類しかない。さらにGPCRは構造の揺らぎが大きいため、コンピュータによる構造予測の精度に限界がある。

そこで本研究では、GPCR特有の構造の揺らぎを考慮した新しい構造予測方法を開発した。具体的には、GPCRとその既知のリガンドとの結合シミュレーションをモジュール化して進化計算に組み入れることで、揺らぎによって起こる様々な構造のなかから最良構造を探索できる手法を提案した。ロイコトリエン受容体を例として、本手法の効果は実証された。

研究成果の概要(英文)：G-Protein coupled receptors (GPCRs) are one of the most important drug target proteins today. However, the 3D structures of GPCRs have not yet been determined by X-ray crystallography, except a few proteins, because GPCRs are difficult to crystallize. In addition, due to the huge structural fluctuation of GPCRs, there is a limitation to computationally predict GPCR's accurate conformation.

This study developed a new method for modeling GPCR thermal fluctuations, where conformation changes of the proteins are modeled by combining fluctuations on multiple time scales. This study proposed a novel method which predicts a best 3D structure of a GPCR from a variety of fluctuating candidate structures, by using the evolutionary computation including receptor-ligand docking simulations. The method was validated using human leukotriene B4 receptor BLT1 as a sample GPCR.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学，生体生命情報学

キーワード：生命分子計算 進化計算 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

多くの製薬企業では、研究開発初期の薬物候補化合物の発見と最適化の段階において、計算機を用いた *in silico* の仮想スクリーニングを行い、研究開発効率を上げる努力をしている。仮想スクリーニングを成功裡に行うには、候補化合物とのドッキング計算で精度の高い相互作用エネルギー値を算出する必要があり、そのために標的タンパク質の高精度な立体構造情報が必要となる。これまでに 68,500 個を超えるタンパク質の立体構造が X 線結晶構造解析や核磁気共鳴法によって明らかにされているが、結晶化が困難なために立体構造が実験的に得られていないタンパク質は未だ数多く存在する。

本研究では、立体構造が不明のタンパク質のなかでも特に有望な薬物標的である G タンパク質共役型受容体 (G-Protein Coupled Receptor: GPCR) に着目した。GPCR ファミリーは千種類以上のタンパク質が属する巨大なタンパク質群である。そして、膜貫通ヘリックスを 7 本有して細胞膜上に存在し、ヘテロ三量体グアノシン三リン酸結合タンパク質 (G タンパク質) との結合・解離を介して細胞内シグナル伝達を行うという点がファミリーで共通している。現在臨床的に用いられている薬の約半分が GPCR に働くと言われており、GPCR は創薬分野における最も重要なターゲットである。しかし、GPCR は膜タンパク質のため結晶化しにくく、立体構造情報を結晶構造解析実験で得るのは非常に難しい。研究開始当初までに分子全体の X 線結晶構造が得られている GPCR はウシロドプシン、ヒト β アドレナリン受容体など数種にすぎない。

そこで、GPCR に対しても計算による構造予測が試みられている。これまでに提案された GPCR の構造予測は、上述の構造既知 GPCR の立体構造を鋳型として予測するホモロジーモデリングが多い。しかし、既知の GPCR 構造はすべて拮抗薬と結合する不活性型構造であるため、鋳型に忠実に予測するホモロジーモデリングでは作動薬と結合する活性型 GPCR の立体構造を予測できないという欠点がある。

一方、分子動力学 (MD) 計算を適切に用いると誘導適合をシミュレーションでき、活性型 GPCR の構造予測も可能だとする報告もある。しかしこの場合、MD 計算前に適切な構造上の拘束をかける必要があり、専門家の経験やスキルが不可欠で、容易ではない。また、タンパク質の熱揺らぎのモードは、フェムト秒から、分単位、あるいはそれ以上のオーダーまできわめて広い時間スケールにわたる。誘導適合の構造変化には少なくともミリ秒以上の揺らぎを計算する必要があるといわれているが、通常の MD ではせいぜいマイクロ秒が限度であり、一般の計算機上で MD だけで構造変化のすべての過程をシミュレートするには膨大な時間がかかり、ほとん

ど不可能に近い。

2. 研究の目的

本研究で対象とする G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は重要な創薬ターゲットであるにもかかわらず、これまで結晶構造解析で立体構造が解明されたものは数種類しかない。さらに GPCR は構造の揺らぎが大きいいため、コンピュータによる構造予測の精度に限界がある。そこで本研究では、GPCR 特有の構造の揺らぎを考慮した新しい構造予測方法を開発する。具体的には、GPCR とその既知のリガンドとの結合シミュレーションをモジュール化して進化計算に組み入れることで、揺らぎによって起こる様々な構造のなかから最良構造を探索できるようにする。これまで、このような複雑な探索を実用範囲内の計算時間で十分に行うことは難しいとされてきたが、計算アルゴリズムを工夫し、コンピュータによる並列処理を行うことで、その課題を克服する。

3. 研究の方法

(1) 提案する進化計算の枠組み

タンパク質は、限定された平均構造のまわりを、熱的に大きく揺らいでいる。タンパク質の熱揺らぎのモードは、フェムト秒から、分単位、あるいはそれ以上のオーダーまできわめて広い時間スケールにわたっている。また、空間的にも原子間の熱振動やアミノ酸側鎖の回転のようなマイクロ空間での速い運動から ヒンジモーションや局所的なアンフォールディングといった比較的遅い大きな構造変化まで多くの階層が存在する。

これらの知見をもとに、本研究では時間スケールの異なる揺らぎの組合せで GPCR の熱揺らぎをモデル化することを考えた。ピコ秒、ナノ秒レベルでの各原子の振動や揺らぎを調べることで、短いスパンでの平均構造をもとめ、それに対してより時間スケールの大きい揺らぎとして GPCR の特性ともいえる各ヘリックスの軸を中心とした回転運動を組み合わせるといったものである。このアイデアは、GPCR は脂質二重膜に囲まれているため他の球状タンパク質ほどは自由に動けないが結晶中の環境ほど拘束されてはいないという点と、溶液中での GPCR を構成するヘリックスの軸周りの回転運動が誘導適合に大きく寄与しているという化学実験結果とに端を発している。このような単純化は、厳密に化学計算を試みる向きには議論を醸すかもしれない。しかし、こうすることで要求される計算量も適度なものにおさまり、誘導適合を考慮した GPCR の活性型立体構造を一般の計算機で探索できるようになる。

このモデルに基づいて、次のような解法へのフレームワークを提案する。その基本的な概念は「数百ピコ秒～ナノ秒程度までの GPCR 分子の揺らぎを MD でシミュレーション計算し、平均構造を求める。続いて、ヘリ

ックスの回転がどの程度起こったときに活性型構造としてアゴニストと結合するのかわを、進化計算にドッキングシミュレーションを組み込んだ方法で求める」というものである。

(2) 提案する実行手順

初期構造の設定：ロドプシンまたはβアドレナリン受容体を鋳型とし、鋳型と当該 GPCR のアミノ酸一次配列をアラインメントした後、通常ホモロジーモデリングで当該 GPCR の立体構造(不活性型)を構築し、活性型構造探索の初期値とする。

短い時間レベルの揺らぎによる平均分子構造：当該 GPCR のまわりに水分子を適度に配置し、数百 ps 程度までの GPCR 分子の揺らぎを MD でシミュレーション計算し、エネルギーの値が下がらなくなって安定した時点の平均的な構造を求める。

ヘリックスの回転運動による分子構造変化：より時間スケールの大きい揺らぎとして、GPCR を構成する各ヘリックスの軸まわりの回転運動を仮定し、実数値 GA とドッキングシミュレーションで最適値を求める。進化計算における各個体はヘリックスごとに の平均構造からの回転角の変化を実数ベクトルとしてコードした遺伝子を持つ。

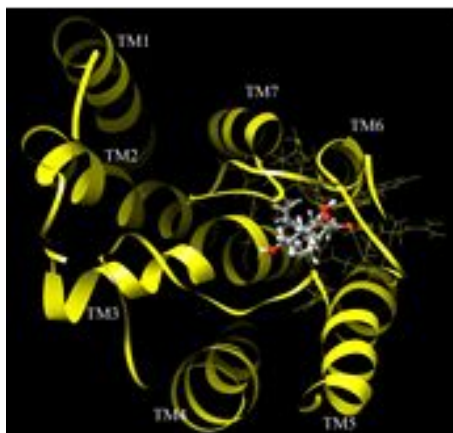
4. 研究成果

多様な GPCR のなかからロイコトリエン (Leukotriene: LT) 受容体を取り上げて、計算を行った。ロイコトリエンは、生体防御に重要な役割を果たす生理活性脂質である一方、気管支喘息の発症・増悪因子として知られている。現在までに4種のLT受容体のクローニングがなされているが、そのなかでヒト高親和性LTB4受容体BLT1のアミノ酸配列情報を用いて実験を行った。なお、用いたBLT1のGPCRDBエントリーIDは、LT4R1_HUMANであり、Swiss-ProtエントリーIDは、Q15722である。

Intel Xeon CPU 3.6GHz (デュアルプロセッサ)1台を用いて、MD過程は219.3psのシミュレーションに524時間を要した。本研究ではMDは短い時間レベルでの構造変化、すなわち緩和を目的に行っているため、200ps程度で十分だと考え、219.3psで停止した。続いて、進化計算過程は200世代の計算に899時間を要した。200世代後の回転角の最良解は、TM3: 11°, TM5: 14°, TM6: -105°であった。

この最良解を持つLT受容体の立体構造とリガンドの結合状態を図1に示す。図1(A)は細胞外から膜を見下ろす視点で、図2(B)は膜断面から見る視点(上が細胞外)で、結合立体構造を示している。なお、受容体-リガンドの相互作用を見やすくするために各ヘリックス主鎖の骨格をリボン表示で示し、LTア

(A)



(B)

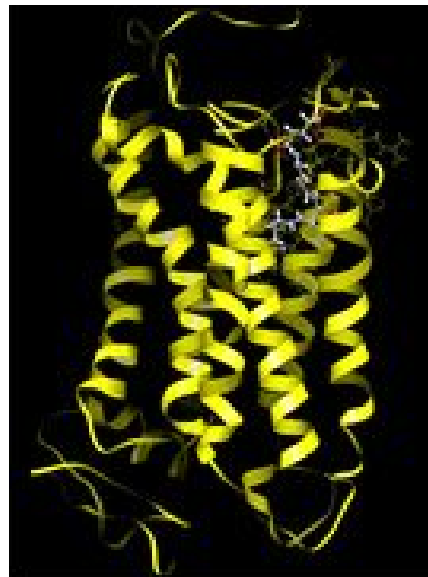


図1 得られたドッキング構造

ゴニストの12-keto-LTB4をBall & Stick表示している。図1から、TM3、TM5、TM6で作るくぼみ(ポケット)にLTアゴニストが結合しているのがわかる。このLT受容体-アゴニストの結合状態について詳細に調べたところ、LTアゴニストに相対しているそれらヘリックスは、ほとんどが疎水性アミノ酸残基で構成されており、LTアゴニストは強い疎水性環境におかれていることがわかった。LTアゴニストは多くの疎水基からなることから、このアゴニストの結合には疎水性相互作用の寄与が大きい。いくつかの水素結合が関与しているものと考えられる。また、TM3、5、6以外に、TM7もLTアゴニストのアルキル鎖との疎水性相互作用に寄与していると予想される。

LTアゴニストの12-keto-LTB4の分配係数XlogP(logPの計算値で、この値が大きいほど疎水性が強い)は、4.4とかなり強い疎水性を示すことから、今回得られた構造のようにLTアゴニストがGPCR中で疎水性残基環境にあることは、化学的に妥当な結果である。

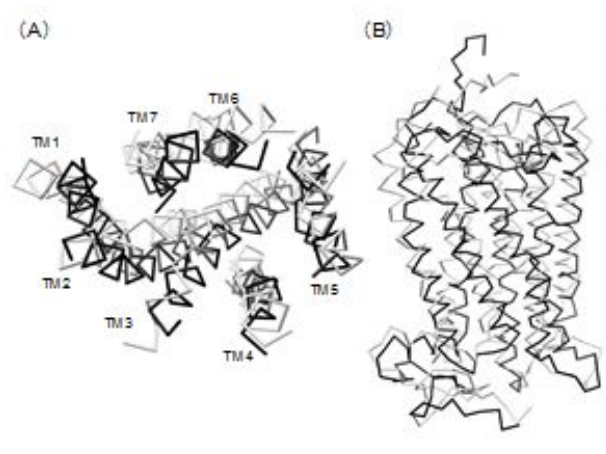


図2 MDによる受容体構造の変化

続いて、受容体構造の構造変化を理解するために、構造比較によく使われる各原子の平均二乗偏差 (Root Mean Square Deviation; RMSD) を求めた。ホモロジーモデリングによる初期構造を構造 I、MD を行った後の構造を構造 II、MD 後に進化計算を行った構造を構造 III とすると、バックボーンを構成する原子 1316 個を用いて計算した RMSD は、構造 I と構造 II では 4.49、構造 II と構造 III では 1.55、構造 I と構造 III では 4.63 であった。この数値から、構造 I から構造 II への変化が大であることがわかる。図 2 に構造 I と構造 II の違いを示した。図 2 は、バックボーンの主鎖をトレースしたもので、図 2(A) は細胞外から膜を見下ろす視点で、図 2 (B) は膜断面から見る視点 (上が細胞外) で、黒色線が構造 I、灰色線が構造 II を表す。構造 I と II では全てのヘリックスで主鎖原子の位置が変化していることがわかる。

次に、構造 I~III に対して、5 種類の LT アゴニストとの結合計算を行い、最高結合スコア (GOLD score) を求めた。その結果を表 1 に示す。構造 I では結合ポケット付近には溶媒接触可能な分子が存在せず、構造 II では全てのアゴニストでスコアがマイナス値を示し、結合構造が安定していないことがわかる。これらのことから、LT 受容体の立体構造は MD でかなり変化するものの、MD だけではアゴニストに強く結合する活性型構造は得られず、TM3,5,6 の回転運動が重要な役割を果たしていることが判明した。

表 1 受容体構造のアゴニストとの結合評価 (GOLD Score)

LTアゴニスト	構造I	構造II	構造III
CID: 5283156	No Solvent Accessible Atoms in The Active Site	-91.8	59.2
CID: 5280877		-108.7	50.2
CID: 5280876	The Active Site	-91.9	46.9
CID: 5280492		-97.2	46.1
CID: 1589		-139.2	42.4

次に、最終的に得られた構造 (構造 III) に対して、これまでに GPCR 類のアゴニスト・アンタゴニスト・インバースアゴニストとして知られている 144 の化合物を用いてその構造の確かさを評価するための実験を行った。144 個の化合物の内訳は、BLT1 のアゴニストが 6 個、BLT1 のアンタゴニストが 14 個、そして、他の GPCR のリガンドが 124 個であった。個々の化合物に対してドッキングシミュレーションを行い、そのスコアにより順位付けを行うことで、各順位におけるヒット率からデータベースエンリッチメントを求めた。なお、データベースエンリッチメントとは、化合物ライブラリが、あらかじめいくつかのヒット化合物を含んでいる場合、この化合物ライブラリから何%の化合物を選択したときに何%のヒット化合物が含まれるかを示す数値であり、横軸に選択した化合物数、縦軸に選択されたヒット化合物をプロットした図をデータベースエンリッチメントカーブという。今回の 144 個のライブラリを用いて行ったデータベースエンリッチメントの結果を図 3 に示す。

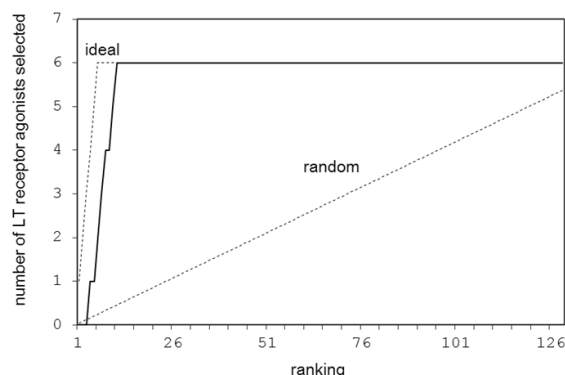


図3 エンリッチメントカーブ

図 3 の実線のカーブの立ち上がり急なことから、構造 III が BLT1 アゴニストに対して高い選択性を持っていることがわかる。

以上より、本論文で提案する手法を用いると、既知の事実に反しないで専門家が納得できる程度の GPCR の活性型の立体構造が得られることを実証した。

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 2 件)

Yoko Ishino, Research Trend of Technology Management, Journal on Innovation and Sustainability, ISSN 2179-3565, Vol. 5, No.2, pp. 78-86, 2014. 査読有

Yoko Ishino and Takanori Harada, Novel Computational Methodologies for Structural Modeling of Spacious Ligand Binding Sites of G-Protein-Coupled Receptors:

Development and Application to Human Leukotriene B4 Receptor, The Scientific World Journal, Vol. 2012, Article ID 691579, 11 pages, 2012. doi:10.1100/2012/691579.
査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

石野洋子: 消費者調査データに基づいたエージェントの内部モデルの検討, 計測自動制御学会(SICE)システム・情報部門・第 5 回社会システム部会研究会, pp.197-200, 2014 年 3 月 5 日~7 日, 大瀧信泉記念館(沖縄県石垣市).

Yoko Ishino: Research Trend of Technology Management, Proc. of the 10th International Conference on Innovation and Management (ICIM2013), Dec. 2-4, 2013, Sao Paulo, Brazil.

宮崎真志, 石野洋子, 高橋真吾: 医療保険における製品普及への口コミ効果, 計測自動制御学会(SICE)システム・情報部門学術講演会 2013(SSi2013), pp.445-449, 2013 年 11 月 18 日~20 日, ピアザ淡海(滋賀県大津市).

Yoko Ishino: A Comprehensive Calibration Method for Improving Protein Identification Accuracy in Proteomics with ESI-TOF-MS, Proc. of the 2013 Annual Convention of Japanese Society for Bioinformatics (JSBi2013), P59, Oct. 29-31, 2013, タワーホール船堀(東京都江戸川区), Japan.

Masashi Miyazaki, Yoko Ishino and Shingo Takahashi: Effects of Word-of-Mouth Communication on Product Diffusion: A Case of Medical Insurance Product, Proc. of the 8th International Workshop on Agent-Based Approach in Economic and Social Complex Systems (AESCS 2013), Sep. 11-13, 2013, 芝浦工業大学(東京都江東区), Japan.

Yoko Ishino: Knowledge Extraction of Consumers' Attitude and Behavior: A Case Study of Private Medical Insurance Policy in Japan, Proc. of the 8th International Knowledge Management in Organizations Conference (KMO2013), Sep. 9-13, 2013, Kaohsiung, Taiwan.

石野洋子: テキストマイニングによる技術経営の潮流分析, 第 19 回社会情報システム学シンポジウム, ISSN: 1882-9473, pp. 47-52, 2013 年 1 月 23 日, 電気通信大学(東京都調布市).

Yoko Ishino: An Approach towards Medical Insurance Business Innovation Based on Japanese Customer Survey Data, Proc. of the 9th International Conference on Innovation and Management (ICIM 2012), Nov. 14-16, 2012, Eindhoven, Netherlands.

Yoko Ishino: Analysis and Modeling of Customer-Perceived Value of Medical

Insurance Products, Proc. of the 7th International Workshop on Agent-Based Approaches in Economic and Social Complex Systems (AESCS 2012), Jan. 17-19, 2012, 関西大学(大阪府吹田市), Japan.

Yoko Ishino: Impact of the Novel Protein Structure Prediction on R&D Process in Drug Discovery and Development, Proc. of the 8th International Conference on Innovation and Management (ICIM 2011), Nov. 30- Dec. 2, 2011, リーガロイヤルホテル小倉(福岡県北九州市), Japan

〔図書〕(計 1 件)

Yoko Ishino, Analysis and Modeling of Customer-Perceived Value of Medical Insurance Products, in T. Murata, T. Terano, S. Takahashi (eds.): Agent-Based Approaches in Economic and Social Complex Systems VII, Springer, ISBN: 978-4-431-54278-0, pp. 115-127(総ページ数 262 ページ中), 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石野 洋子 (ISHINO, Yoko)

山口大学・大学院技術経営研究科・准教授

研究者番号: 9 0 3 7 3 2 6 6