

課題名 (タイトル) :

網羅的計算による高効率インシリコスクリーニングの実現

利用者氏名 : ○本間 光貴^{**}, 幸 瞳^{**}, 佐藤 朋広^{**}, 高谷 大輔^{*}, 津田 和実^{*}, 渡邊 博文^{**},
Gloria Fuentes^{*,**}

所属 : *横浜研究所 ライフサイエンス技術基盤センター 制御分子設計研究チーム
**横浜研究所 ライフサイエンス技術基盤センター 創薬分子設計基盤ユニット

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

当チームでは、各種の生命現象や疾患に関連するタンパク質に対して、その機能を制御する低分子阻害剤や非天然の修飾核酸、ペプチドなどを開発し、生命現象のメカニズムを解明する、あるいは新規の薬剤の開発へとつなげていくことを目的として研究を行っている。低分子阻害剤の探索研究において、分子ドッキング、類似化合物検索、機械学習などの手法はそれぞれ異なる観点から標的タンパク質に対する阻害活性を予測するため、複数の手法に基づく予測結果を適切に組み合わせることで、化合物データベースから効率的に低分子阻害剤を検出することが可能となる。現在市販されている化合物の数は数千万にも及び、それら全てに対して複数の手法を用いた計算を実行するためには多くの演算資源が必要である。RICC システムを利用することで、当チームにて低分子~中分子化合物と標的タンパク質間における詳細な解析が可能となり、有用な制御分子の発見につながる事が期待される。

今年度は、ドッキング計算によるインシリコスクリーニングを実施するにあたり、活性化化合物により適した標的タンパク質の座標を得るため、(1) PAD4-Stereptonigrin 複合体、(2) IKKa キナーゼ、(3) HLA-DP5 ペプチド複合体について、MD 計算を用いて構造変化を調べた。また動物・ヒトに投与後の低分子化合物の代謝部位を予測するため、代謝酵素である CYP3A4 と、一例として Tolterodine との複合体の MD 計算を実施した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

上記に述べた 4 つの具体的研究について個々に記載する。

(1) PAD4-Stereptonigrin 複合体

We have built an initial model of the complex PAD4-streptonigrin using a shape-based ligand alignment, employing the crystallographic PAD4 ligands as seeding. However, structurally streptonigrin is quite different to the rest of the known inhibitors. In order to assess the binding mode of this ligand, we are making use of the potential advantages of MD simulations, which reveals dynamical spatial-time conformations of the system.

(2) IKKa キナーゼ

The purposes are scanning a large protein conformational space that can serve as input in these approaches, and thus exploiting the search of inhibitors with different chemical identity to the known ones. We have used MD simulations to generate an ensemble of conformations for IKK isoforms α and β in both active and inactive kinase states.

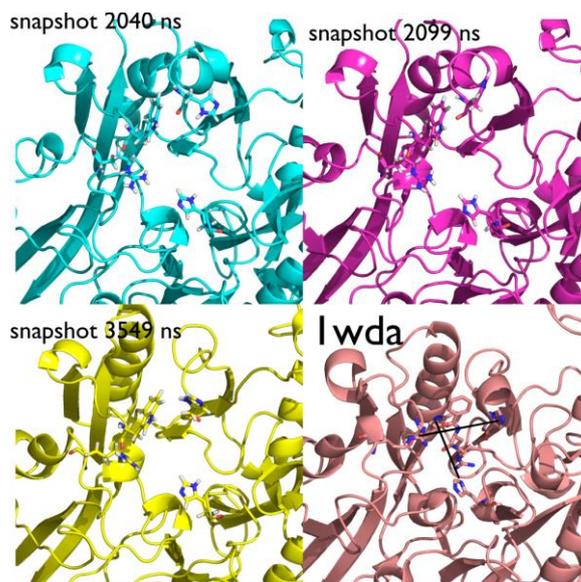
(3) HLA-DP5 ペプチド複合体

Human leukocyte antigens (HLA) polymorphisms mostly map to the antigen-binding cleft, thereby diversifying the repertoire of peptide antigens selected by different HLA haplotypes. There are many class II HLA molecules, everyone showing a particular specificity towards some epitopes. In spite these sequence and/or structural information, the mechanism of specific epitope recognition is unknown. Using MD simulations and Alanine Scanning protocols, we have carried out an extensive study of the binding profile of a

set of putative epitope to HLA-DP5.

(4) CYP3A4-Tolterodine

CYP3A4 が化合物を代謝する際、化合物が活性中心であるヘムに近づく必要がある。化合物のどの原子がヘムに近づきやすいかを、MD を用いて検証した。適用例として、CYP3A4 と化合物として代謝部位が実験的に報告されている Tolterodine を使用した。ドッキング計算により、27 つの複合体モデルを作成し、AMBER12 による MD 計算を 10 ナノ秒実施し、シミュレーション中の化合物の結合自由エネルギー、ヘム鉄と化合物原子の距離、化合物とアミノ酸残基の水素結合有無を解析した。



Distances within binding pocket

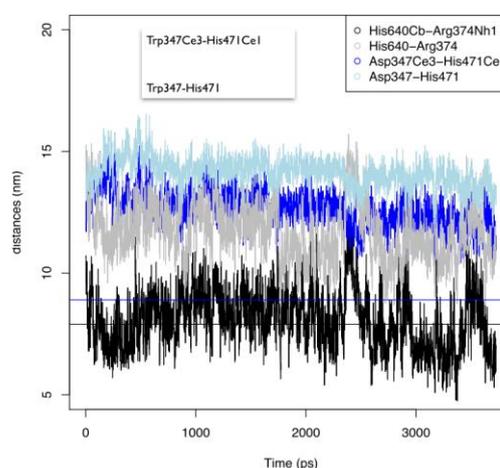


Fig. 1 PAD4 結合部位のスナップショットと残基間距離の変化

3. 結果

上記で述べた 4 つの具体的研究について個々に記載する。

(1) PAD4-Stereptonigrin 複合体

Preliminary analysis of the system shows a highly dynamical behavior of the ligand within the pocket. The ligand explores different poses within the proximity of the canonical binding pocket (Fig. 1). Long MD simulations and the use of several replicates will give insight of the nature and stability of these "transient" binding modes. If validated, these different interactions will give some insights on the mechanisms of binding as well as opening up new venues for developing improved selective PAD inhibitors, aside the already known ones.

(2) IKKa キナーゼ

MD 計算により得られた多様な側鎖配座をもつ 13 構造と 8 つの X 線構造に対して、既知阻害化合物をテストセットとしたインシリコスクリーニングの効率を調べた結果、MD 計算由来の構造は X 線構造由来の構造と同等のスクリーニング効率をもつことがわかった。検出できた化合物の詳細な解析が必要だが、X 線構造のみでは得られがたい阻害化合物を得られている可能性がある。

(3) HLA-DP5 ペプチド複合体

Preliminary results show the importance of the inclusion of protein flexibility in the understanding of the recognition mechanism of this class II HLA allele. But more importantly,

this protein dynamism helps to distinguish between binder and non-binder peptides. The analysis provides quantitative information of the likelihood for different amino acids, or at least the general nature of them, for each position in the studied peptides. This fact could potentially have implications in the design of specific vaccines for HLA-DP5.

(4) CYP3A4-Tolterodine

解析は完全に終了していないが、Tolterodine の実際の代謝部位がヘム鉄に近づく結果が一部得られている。

4. まとめ

RICC の利用により、いずれの研究においても長時間、または複数モデルによる MD 計算が実施可能となり、研究室の計算資源のみでは計算実行が難しかったタンパク質構造と化合物のふるまいを明らかにすることができた。制御分子を探索する標的タンパク質や ADME に関与するタンパク質が構造解析されているとは必ずしも限らず、また構造解析されていても適切な複合体が得られるとは限らないため、MD 計算を含む大規模計算によって、インシリコスクリーニングや化合物デザインに適したタンパク質構造を見いだせることが今後期待される。

5. 今後の計画・展望

本研究室の主要テーマである低分子阻害剤の探索研究において、RICC を利用することで新たな解析手法を検証できること、複数の標的タンパク質に関して研究を進める際に計算機の不足による研究速度の鈍化が低減されることが期待される。化合物の代謝部位予測に関しては、他の化合物や CYP3A4 以外の CYP ファミリーでも代謝部位予測が可能かを検討する予定である。