

コンピュータ技術を活用した創薬手法の研究における疾患原因蛋白の構造解析手法の研究

プロジェクト責任者

高田俊和

プロジェクト責任者所属機関名

日本電気(株) 基礎・環境研究所

著者名

佐久間俊広[1]、秋元利夫[1]、山口直人[2]、廣川雄一[3]

著者所属機関名：[1] (株)NEC情報システムズ ユビキタス事業部

[2] NECソフト(株) VALWAYテクノロジーセンター

[3] 独立行政法人 海洋研究開発機構

アブストラクト

ヒト由来造血器型プロスタグランジン合成酵素(H-PGDS)の新規阻害剤の設計・開発をインシリコで行う目的で、阻害剤複合体に対する非経験的分子軌道計算を行った。本計算では、これまでに井上らによるX線構造解析によって明らかになった複数の阻害剤-蛋白質複合体の中から、2種類のリガンド分子(HQL-79、Cibacron-blue)とH-PGDSとのBinding Affinityを計算することにより、新規阻害剤の設計・開発の指針を得ようとした。その結果、HQL-79構造のpiperidineとTrp104のindoleとの間のcation- π 相互作用、及びCibacron-blueのanthraquinoneとTrp104との間の π - π 相互作用は、真空中でそれぞれ大きな結合エネルギー(4.5、5.7 kcal/mol)を形成しており、新規候補阻害剤の設計を行う上で重要な相互作用であることが判明した。

キーワード: 非経験的分子軌道法、プロスタグランジン合成酵素、阻害剤、Binding Affinity

本文

1. はじめに

プロスタグランジン(PG)は、H-PGDS合成酵素によって合成され、アレルギー媒介物質として機能する。そのため、H-PGDS合成酵素を阻害する化合物の開発は、新しい抗アレルギー剤として花粉症などの治療薬になることから、大いに注目されている。最近、阻害剤の一つであるHQL-79(本稿で計算)は、経口投与で抗アレルギー作用を発揮するばかりでなく、PGの産生を抑制することによって、脳損傷の拡大阻止、筋ジストロフィーの筋壊死阻止作用を示すことが分かり、その特効薬としての開発が期待されている。

これまでに、井上らによるX線構造解析からH-PGDSのnativeの構造及び複数の阻害剤

と H-PGDS との複合体の解析が行われ(図 1)、阻害活性の相関関係(IC_{50} , K_m , K_d 値)の比較が詳細に報告されている[1;2]。本稿では、井上らによる X 線構造解析結果の中から、図 2-3 に示した、1) HQL-79 複合体・ Mg^{2+} 型構造、2) Cibacron-blue・ Ca^{2+} 型構造の、2 種類の複合体の非経験的分子軌道計算から、アミノ酸との特徴的な相互作用を解析することによって、新規阻害剤開発への設計指針を得ようとした。これらの 2 種類の構造の選択の理由は、HQL に見られる piperidine の cation- π 型、Cibacron-blue の anthraquinone の π - π 型を特徴とする構造を有しており、新規デザインを考慮する上で重要な相互作用を解析できると考えたからである。

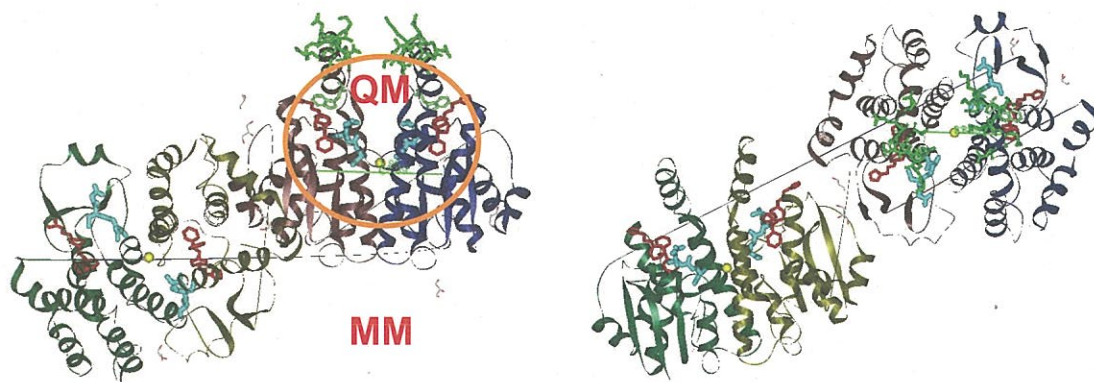


図 1 ヒト由来 H-PGDS の複合体構造(4 量体構造)と QM/MM 計算のモデル化

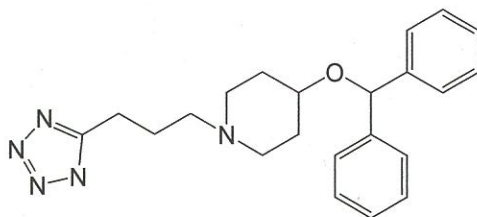


図 2 HQL-79 複合体・ Mg^{2+} 型構造

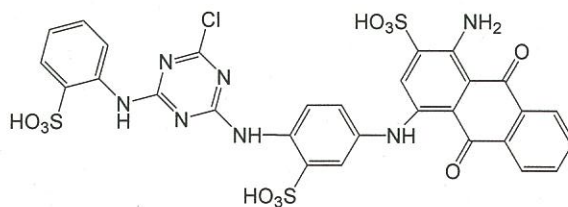


図 3 Cibacron-blue・ Ca^{2+} 型構造

2. 計算の方法

ヒト由来 H-PGDS は、アミノ酸残基数 198 個 (モノマー)、補酵素としてグルタチオン (GSH) を含むテトラマー構造の酵素で、ダイマーで機能する比較的小さな化合物である。そのため、QM/MM 計算におけるモデル化では、図 1 に示したように 4 量体の一方の 2 量体構造を用いて行った。実際の非経験的分子軌道計算では、QM 領域は量子力学的に計算し、MM 部分は、点電荷をハミルトニアンに加えることによって行った。本報告書における QM/MM 計算では、分子軌道計算プログラム AMOSS を用い、基底関数は全て MIDI-4 で行った。

尚、H-PGDS 酵素と HQL-79、Cibacron-blue 複合体への水素付加、および水素位置の最適化は、Tripos 社の SYBYL (Ver. 7) を用いて、分子力学法に基づき Conjugate gradient 法で行った。

3. HQL 複合体の計算結果

(1) 非経験的分子軌道計算

表 1 に、HQL 複合体の分子軌道計算結果を示した。本計算は、HQL の X 線構造解析データそのものを用いて行った。特に注目すべき相互作用は、Trp104 と piperidine との間の Cation- π 相互作用エネルギーである [3]。本 QM/MM 計算の結果、真空中、及び溶媒効果を取り入れた場合の Cation- π エネルギーは、それぞれ -5.74、-6.39 (kcal/mol) となり、Gao ら [4] が報告している -5.6 ~ -9.3 (kcal/mol) と、合致した結果を得た。また、A. S. Reddy と G. N. Sastry [5] による量子力学計算では、indole ring と NH_4^+ 、 NMe_4^+ との間の (HQL の NH^+ とは構造が異なる) Cation- π 相互作用エネルギーは、各々、約 -20、-10 (kcal/mol) と報告されている。HQL-79 と Tyr8 との相互作用は、-1.92 (真空中)、-7.93 (QM/MM 計算) となり、周囲の蛋白質の効果により、更に安定化することが計算から確認できた。

アミノ酸	HQL (真空中)	HQL (QMMM)
Trp104	-5.74	-6.39
Tyr8	-1.92	-7.93
Arg14	-19.84	+3.24

表 1 HQL-79 との相互作用エネルギー (単位: kcal/mol)

*) 太字は、Trp104 と piperidine との Cation- π 相互作用エネルギーを表す。

*) 相互作用エネルギーの計算は、次式により算出している。

$$\Delta E(\text{AB}) = E(\text{AB}) - (E(\text{A}) + E(\text{B}))$$

(2) HQL79 分子の分子軌道 (MO) の形状

図 4、5 は、各々 Trp104 と HQL の Cation- π 相互作用軌道、HOMO を表している。図 4 の下部が HQL 分子であり、上部が Trp104 である。各分子間を Cation- π 軌道が占有していることが分かる。

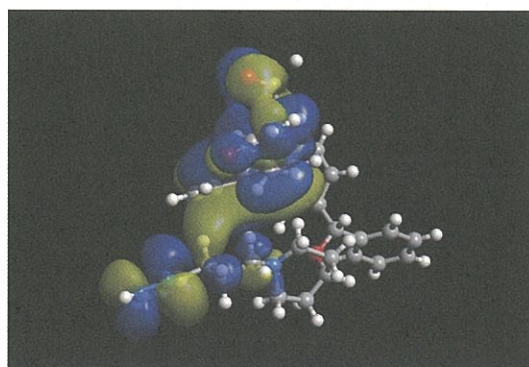


図4 Trp104 と HQL の分子軌道 (Cation - π interaction)

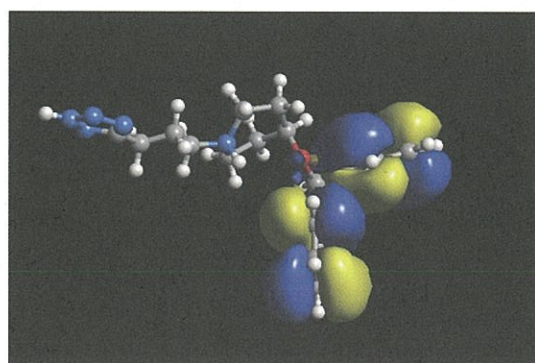


図5 Trp104 と HQL の HOMO の分子軌道

4. Cibacron-blue 複合体の計算結果

(1) 非経験的分子軌道計算

次に、anthraquinone 骨格を持つ阻害剤分子として Cibacron-blue と PGDS との相互作用エネルギーの解析を行った。Cibacron-blue では、3環系 anthraquinone と Trp104 が stack しており、表2から π - π 相互作用による stacking energy は、真空中で -4.61(kcal/mol)、周囲の効果を取り入れた QM/MM では、-117.91(kcal/mol) という結果になった。

アミノ酸	Blue(真空中)	Blue(QMMM)
Trp104	-4.61	-117.91
Arg14	-134.91	-124.29
Tyr8	-13.16	-9.18

表2 Cibacron-blue との相互作用エネルギー (単位: kcal/mol)

*) 太字は、Trp104 と anthraquinone との π - π の stacking energy を表す。

(2) Blue 分子の分子軌道 (MO) の形状

次に、Blue と、Trp104 の分子軌道の HOMO、LUMO の形状を示した。HOMO、LUMO 軌道とも、

Blue 分子上に軌道が局在化していることが分かる。

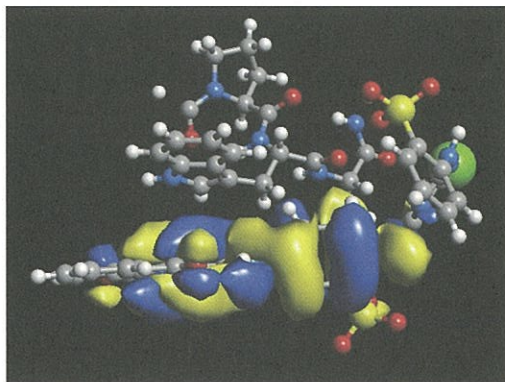


図 6 Blue-Trp104 の HOMO

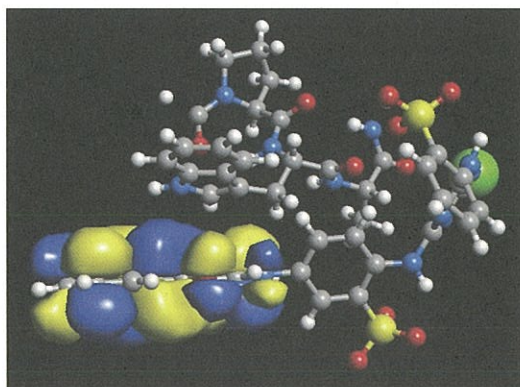


図 7 Blue-Trp104 の LUMO

5. H-PGDS の阻害剤デザインの指針

これまでの2種の阻害剤分子(HQL-79、Cibacron-blue)とH-PGDSとのBinding Affinity の計算結果から、Cation- π 、 π - π 相互作用が重要であることが分かった。これらを踏まえた阻害剤デザイン指針としては、1)HQL と Trp104 との間の Cation- π 相互作用エネルギーを強くする目的で、HQLの piperidine 環のN-H(+)から Trp104の indole 環への interactionが増加するように、piperidine 環の官能基を置換、2)HQL と Tyr8、GSH との空間に新規に、GSH--阻害剤(HQL)--Tyr8の水素結合トライアングルネットワークを形成、3) blue と Trp104 との Trp104 との間の π - π 相互作用を強化目的の構造設計、をすることである。尚、上記1)を補足すると、A. S. Reddy と G. N. Sastry[5]による量子力学計算に基づく計算では、NH₄⁺の窒素原子と indole の6員環(5員環側ではなく)の最も安定な構造は、N原子との距離が2.88Åであることが報告されている。本HQLのX線構造では、N原子から indole ring への距離は3.97Å(A鎖)、3.77Å(D鎖)であり、安定構造から若干伸びている。今後のHQLを母核とした阻害剤開発では、より構造を安定化するような設計が重要である。

参考文献

- [1] Inoue, T., Irikura, D., Okazaki, N., Kinugasa, S., Matsumura, H., Uodome, N., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Miyano, M., Kai, Y., Urade, Y., *Nat. Struct. Biol.* 10, 291 (2003)
- [2] Inoue, T., Okano, Y., Kado, Y., Aritake, K., Irikura, D., Uodome, N., Kinugasa, S., Okazaki, N., Matsumura, H., Kai, Y., Urade, Y., *J. Biochem.* 135, 279 (2004)
- [3] Ma, J., Dougherty D., *Chem. Rev.* 97, 1303 (1997)
- [4] Mo, Y., Subramanian, G., Gao, J., Ferguson, D., *J.A.C.S.* 124, 4832 (2002)
- [5] Reddy, A.S., Sastry G.N., *J. Phys. Chem. A*, 109, 8893 (2005)

Research for method of protein structure analyzing using X-ray by using Drug Design system on computer

Name of Project Representative

Toshikazu Takada

Professional Affiliation of Project Representative

Fundamental and Environmental Research Laboratories

Name of Author

[1]Toshihiro Sakuma, [1]Toshio Akimoto, [2]Naoto Yamaguchi, [3]Yuichi Hirokawa

Professional Affiliation of Author: [1]NEC Informatec Systems,Ltd,

[2] NEC Soft, Ltd.,

[3] Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

Abstract

QM/MM calculations based on ab initio molecular orbital theories are carried out to investigate a possible drug against prostaglandin D2 synthetase which causes allergic reactions in human bodies. The two ligands are selected to study the interactions between them and the protein, from the complex structures determined by X-ray structure analyses by Inoue et al, that is, HQL-79 and Cibacron-blue. The cation- π interaction between piperidine of HQL-79 and indole of Trp104, and π - π interaction between anthraquinone of Cibacron-blue and indole of Trp104 are found to be important. As the result, those cation- π and π - π interactions are considered to be a guiding principle to design new drug for prostaglandin D2 synthetase.

Keywords: ab initio molecular orbital theory, QM/MM method, drug design, prostaglandin D2 synthetase, inhibitor

Main Text

1. Introduction

Prostaglandin D2 synthetase produces prostaglandin in human bodies, which causes allergic reactions such as hay fever. Therefore, it is needed to find out inhibitors against prostaglandin D2 synthetase to control allergic reactions. The X-ray structures of the protein and two compounds were reported by Inoue et al. [1, 2]. Here, these inhibitors, HQL-79 and Cibacron-blue are chosen to carry out QM/MM calculations based on ab initio molecular orbital theories to investigate guiding principle to design new drugs for the hay fever.

2. Method of Calculations

The human prostaglandin D2 synthetase is a tetramer consisting of 198 amino acids and two glutathione(GSH) as co-enzyme and realizes its functions as two dimers. Using the X-ray structures of the tetramer, the QM/MM method is applied to the dimer to evaluate the binding affinities. Fig. 1 schematically shows the QM and MM space separation of the dimer. Figs. 2 and 3 show the molecular structures of HQL-79 and Cibacron-blue.

To describe the QM region, Hartree-Fock method is taken with the basis set of MIDI-4.

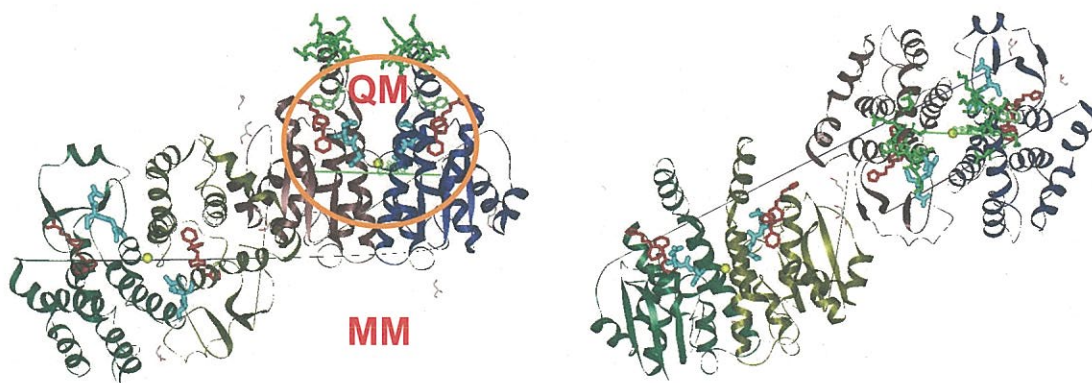


Fig. 1 Structure of human prostaglandin D2 synthetase and schematic illustration of QM and MM regions

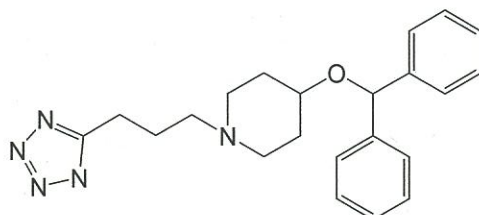


Fig. 2 Molecular structure of HQL-79

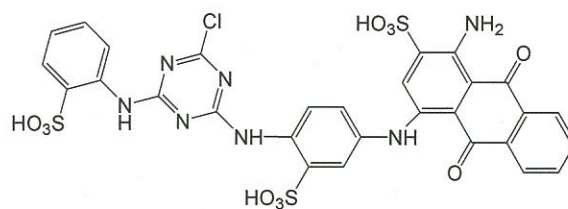


Fig. 3 Molecular structure of Cibacron-blue

3. Results and Discussions

The binding energy of prostaglandin D2 synthetase and HQL-79 is calculated with the model shown in Fig. 1. It is noticed that the interaction of Trp104 of the protein and piperidine of HQL-79 is estimated to be -5.74 kcal/mol in the case of the QM space only and -6.39 kcal/mol with all the atoms in the QM and MM regions. The importance of this cation- π interaction is pointed out by Ma et al [3] and the values here are closed to those reported by Subramanian et al [4]. The HOMO of the complex is shown in Fig. 4, indicating the delocalization between Trp104 and HQL-79.

The similar results are obtained for Cibactron-blue. That is, the binding energies are -4.61 and -117.91 kcal/mol, respectively. But, the delocalization of HOMO is less in comparison with HQL-79.

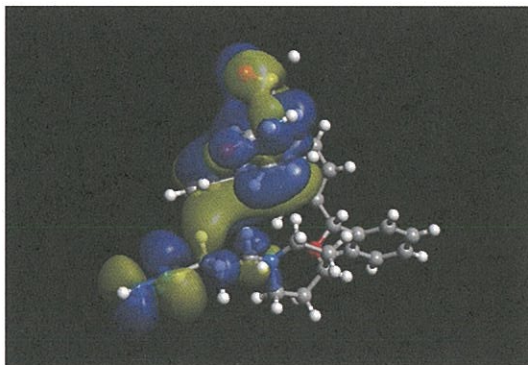


Fig. 4 Highest occupied molecular orbital (HOMO) of Trp104 and HQL-79 complex

4. Conclusions

From the present calculations, the cation- π interactions between Trp104 and ligands are a key to design the inhibitors against prostaglandin D2 synthetase. Since HQL-79 is a inhibitor against prostaglandin D2 synthetase, it is a proper approach to modify the side chains of HQL-79 to have stronger cation- π interactions for design of new drugs.

References

- [1] Inoue,T., Irikura,D., Okazaki,N., Kinugasa,S., Matsumura,H., Uodome,N., Yamamoto,M, Kumasaka,T, Miyano,M., Kai,Y, and Urade,Y., *Nat. Struct. Biol.* 10, 291 (2003)
- [2] Inoue,T., Okano,Y., Kado,Y., Aritake,K., Irikura,D., Uodome,N., Kinugasa,S., Okazaki,N., Matsumura,H., Kai,Y. and Urade,Y., *J. Biochem.* 135, 279 (2004)
- [3] Ma, J. and Dougherty D., *Chem. Rev.* 97, 1303 (1997)
- [4] Mo, Y., Subramanian, G., Gao, J. and Ferguson, D., *J.A.C.S.* 124, 4832 (2002)