

エストロゲン受容体のアミノ酸変異による エストラジオール結合エネルギーの変化

前田 紘輔^a, Alexander SCHUG^{b, c}, 渡邊 博文^{b, c}, 福澤 薫^{c, d},
望月 祐志^{c, e}, 中野 達也^{c, f}, 田中 成典^{a, b, c*}

^a 神戸大学発達科学部人間環境科学科, 〒 657-8501 神戸市灘区鶴甲 3-11

^b 神戸大学大学院自然科学研究科, 〒 657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

^c 科学技術振興機構 (JST) CREST, 〒 332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

^d みずほ情報総研株式会社科学技術部, 〒 101-8443 東京都千代田区神田錦町 2-3

^e アドバンスソフト株式会社、東京大学国際産学共同研究センター, 〒 153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

^f 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部, 〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

*e-mail: tanaka2@kobe-u.ac.jp

(Received: August 3, 2006; Accepted for publication: November 11, 2006; Published on Web: January 24, 2007)

エストロゲン受容体とエストラジオールとの結合に関する分子メカニズムを解明することを目的とし、エストロゲン受容体にコンピュータ上でアミノ酸変異を導入して、エストラジオールとの結合能をフラグメント分子軌道法を用いて評価した。アミノ酸変異の導入方法の妥当性を検討するために、実験で用いられたのと同じアミノ酸変異を導入して、結合エネルギーを評価し、実験データと比較した。その結果、6種類のアミノ酸変異のうち、3つは定性的に一致し、残り3つは不一致となった。それらの結果の原因を検討した。

キーワード: エストロゲン受容体, アミノ酸変異, リガンド結合, フラグメント分子軌道法

1 はじめに

近年、ヒトゲノムの解読完了宣言がなされ、これらゲノム計画の後に続く研究段階として、ポストゲノム時代に入ったと言われている。ポストゲノムとは、ゲノム情報に基づき、遺伝子の機能や発現、その後に続くタンパク質の機能やそれらのネットワークなどを研究する段階のことである。これら解読されたゲノム情報から、新しい研究分野の誕生や従来の研究分野間の連携などが起こり、特に医学や薬学への応用に大きな期待が寄せられている。

研究分野の連携として、特に情報科学が重要である。膨大なゲノム情報を扱い研究を進めていくには、従来の研究手法のみでは不十分で、情報科学と分子生物

学のより密接な連携が重要になってくる。このような状況において、現在 NR - SX 計画という研究計画も提唱されている [1]。この計画は核内受容体 (Nuclear Receptor ; NR) の NR と Syndrome X の SX から由来している。Syndrome X とは肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧など、相互に関連した一連の症状と疾患の総称であり、最近ではメタボリックシンドロームとも呼ばれる。遺伝子の発現制御に関連している核内受容体と、それら Syndrome X との関係に対する研究が計画されている。分子生物学の対象とする領域が、より広範に、またより小さいミクロな領域に展開していくには、情報科学や他の様々な分野との相互作用が求められている。そして、研究背景としてももう1つ重要なことは、コンピュータリソースの充実、計算化学の進歩である。

量子化学の分野において、フラグメント分子軌道法 (Fragment Molecular Orbital method ; FMO 法) という手法の誕生によって、巨大分子であるタンパク質の電子状態や分子軌道の計算を行うことが現実味を帯びてきた。従来の量子化学の手法では、タンパク質のような巨大分子はコンピュータリソースの制限を受け、膨大な計算時間がかかることで事実上不可能であった。しかし北浦、中野らによって開発された FMO 法によって、ほとんど計算精度を落とすことなく大幅な計算時間の短縮が実現可能となった [2-6]。タンパク質などの生体分子においても、電子状態は重要であり、量子化学計算の必要性は明らかである。例えば、分子間相互作用や化学反応過程の研究においては分子の電子状態が重要となる。

本研究で具体的に注目しているのは、先にも述べた遺伝子の転写を調節するタンパク質である NR ファミリーであり、これらはリガンドが受容体に結合することで、核内に移動し転写調節を行う。これら NR の中には、調節の標的となる遺伝子がシトクロム P450 などの薬物代謝タンパク質であるものもあり、医学や薬学の分野で、NR に結合する分子は薬のターゲットとして重要であり、そのメカニズムの解明が進められている。薬の開発には従来、莫大な費用と多大な時間を要するが、計算化学によるドラッグデザインによりその問題を改善することができる。

本研究では、核内受容体の 1 つであるエストロゲン受容体 (Estrogen Receptor ; ER) に注目した。エストラジオール (Estradiol ; EST , Figure 1) は女性ホルモンであるエストロゲン的一种である。この受容体に結合するリガンドは複数存在することが確認されている。本来結合するはずの EST など天然のエストロゲンに加えて、骨粗鬆症治療薬であるラロキシフェンや、ジエチルスチルベステロールなどが結合する。

これら以外にも、エストロゲンに似た化学物質として受容体に結合してしまい人体に悪影響を及ぼす環境ホルモン (内分泌攪乱物質) があり、問題視されている。そこで、EST の ER に対する結合に関する微視的メカニズムの解明に向けて計算化学の側面から研究を行った。具体的には、ER のアミノ酸残基を変異させることで EST の ER に対する結合能がどのように変化するかを調べた。

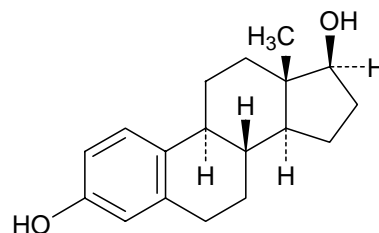


Figure 1. Molecular structure of 17 β -Estradiol (EST).

2 エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor ; ER) の構造

ER には 2 つのサブタイプ ER α と ER β があることがわかっているが、本研究では ER α (以下 ER) の構造を用いた。立体構造としてエストロゲンの中で最も生理活性が高い EST と ER のリガンド結合ドメイン (Ligand Binding Domain ; LBD) との複合体を用いる。ER は全長 595 残基で 6 つのドメインからなっているが、ここでは、LBD に注目する。これはリガンドである EST の ER に対する結合能を見るために重要であるとともに、Protein Data Bank (PDB) に登録されている複合体の立体構造がほとんど LBD との複合体であるからである。

量子化学計算を行うには、立体構造が初期構造として必要である。そこで本研究では、多くのタンパク質の立体構造が登録されている PDB により ER の立体構造を検索した。検索された 22 個の立体構造から、EST と ER の複合体として PDBID が 1QKU である立体構造を対象として選んだ。

次に、本研究の計算に用いるために、PDB からダウンロードしてきた立体構造にいくつかの処理を行った。

まずは使う複合体の選択である。PDB ID の 1QKU として A、B、C の 3 つの複合体鎖が登録されていた。これらの中から、最もペプチド鎖が長く、欠損しているアミノ酸残基のない A 鎖を選択した。そして A 鎖の立体構造のデータに水素付加を行い水素のみを構造最適化した。この作業にはソフトウェア MOE (The Molecular Operating Environment) [7] を用いた。また立体構造には水分子が多く含まれていたが、EST から 6Å 以内の範囲には水分子は存在していなかったため、水分子は EST と ER の結合に直接関与しないと考え、全て除去した。最終的に計算に用いた立体構造は全体で 247 残基である ER の LBD と EST からなり、水分子は含まれていない (Figure 2; カラー図は後に掲載)。

3 計算方法

本研究では、量子化学計算として FMO 法を用いた一点計算を行った [8]。エネルギー計算においては、HF(Hartree-Fock)法と MP2(Møller-Plesset 2 次摂動)法 [6] を用い、基底関数は STO-3G を用いた。また、1 つのフラグメントに対して 2 つのアミノ酸残基を割り当てて計算した。計算用、可視化用ソフトウェアとして、FMO 法に対応した解析ソフト ABINIT-MP と FMO 計算結果の可視化ソフト BioStation Viewer (以下の URL[9] からダウンロード可能; 但し、本解析では JST-CREST プロジェクト開発バージョンを使用) を用いた。また、タンパク質のアミノ酸変異や表示、構造最適化計算等の操作を行える総合開発環境である MOE を用いた。計算機としては、Pentium4 3.2GHz クラスタならびに Opteron 2.0GHz クラスタを用いた (Pentium4 クラスタは 6 ノード、Opteron クラスタは 8 ノード)。

まず、PDB から計算に用いる EST と ER との複合体の立体構造をダウンロードした。次に、ダウンロードしてきた立体構造に、水素付加等、先に述べた処理を行った。水素付加された立体構造に対して、アミノ酸変異を行い、配座解析を行って側鎖の位置を決めた。その後、変異前の立体構造と変異後の立体構造に対してそれぞれ構造最適化を行った。但し、構造最適化はそれぞれの立体構造の、変異対象のアミノ酸残基と EST のみに対して同時に行った。構造最適化計算には MMFF94x 力場 [10] を用いた。

次に、これらの立体構造を入力データとして、FMO 計算を行った。FMO 計算により、福澤らの定義 [11] に従って結合エネルギー (ΔE) を計算した。

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - (E_{\text{ligand}} + E_{\text{receptor}})$$

ここで、 E_{complex} 、 E_{ligand} 、 E_{receptor} はそれぞれ、EST と ER との複合体、EST のみ、ER のみに対するエネルギーである。

また、変異体 $\Delta E(\text{mutant})$ と野生型 (wild-type; アミノ酸変異をさせてない構造) $\Delta E(\text{wild-type})$ の結合エネルギー差 ($\Delta\Delta E$) を以下のように定義した。

$$\Delta\Delta E = \Delta E(\text{mutant}) - \Delta E(\text{wild-type})$$

この $\Delta\Delta E$ を用いて結合能の変化を評価した。

ER の変異については全て 1 アミノ酸変異体を考察した。どこの位置のアミノ酸をどのようなアミノ酸に変異させるかについては、以下の 6 つの 1 アミノ酸変異を選んだ。

Table 1. Amino acid mutations employed in the present calculations and change of the total charge of the complex after the mutations. The total charge of the wild-type complex is +6.

mutation	change in the property of mutated amino acid residue	change of total charge of the complex after the mutation
E353Q	Acidic \rightarrow Polar	+1
G521A	Nonpolar \rightarrow Nonpolar	0
H524A	Basic \rightarrow Nonpolar	-1
H524Q	Basic \rightarrow Polar	-1
L525A	Nonpolar \rightarrow Nonpolar	0
M528A	Nonpolar \rightarrow Nonpolar	0

E353Q、G521A、H524A、H524Q、L525A、M528A

これら 6 つの変異に関するアミノ酸の性質の変化と特徴は Table 1 に示されている。変異の基準としては以下の 2 つを採用した。

1 つ目の基準は EST から 3Å 以内に原子があるアミノ酸残基を変異の対象とする (Figure 3; 後に掲載)。

2 つ目の基準は、Herynk ら [12] がまとめている 1 アミノ酸変異の実験データ (Table 2) を参照した。

これら 2 つの基準をとともに満たすようなアミノ酸変異を対象とした。

4 結果

4.1 計算結果

Figure 4 (後に掲載) の左側の図は、HF 法で計算し、 $\Delta\Delta E$ を求めたものである。ここで ΔE (wild-type) が異なるのは、変異アミノ酸と EST に対する構造最適化により構造が PDB のものとは若干ずれるためである。このグラフから E353Q、H524A、H524Q の、それぞれ 3 つのアミノ酸変異の場合で、 $\Delta\Delta E$ が正の値を示した。これはアミノ酸を変異させることで負である ΔE の絶対値が小さくなり、結合が不安定化したことを示している。G521A もわずかではあるが、正の値を示している (約 0.6kcal/mol)。一方、L525A は負の値を示した、つまり変異によって負である ΔE の絶対値

が大きくなり、結合が安定化したことを示している。また M528A に関してはグラフでは確認できないが、正の値を示しており値は約 0.1 kcal/mol であった。

しかし、E353Q、H524A、H524Q の 3 つの変異に比べて、残り 3 つの変異は変化のスケールが小さい。そこで、HF 法ではなく、電子相関を取り入れた MP2 法 [6] で同様の計算を行った。その結果が Figure 4 の右側の図である。MP2 法では、E353Q、H524A、H524Q のそれぞれ 3 つのアミノ酸変異の場合では HF 法の図と同様に $\Delta\Delta E$ が正の値を示した。つまり、アミノ酸変異により結合が不安定化したことを示している。特に H524A、H524Q に関しては、HF 法に比べて MP2 法の方が絶対値がほぼ 2 倍になっていた。

一方 G521A の変異では、HF 法の結果がわずかに正の値を示しているにもかかわらず、MP2 法の結果では符号が逆転し、わずかに負の値を示している (+ 0.6 - 2.8kcal/mol)。これは変異後のほうが EST の ER に対する結合が安定化していることになる。L525A は HF 法に比べて絶対値が小さくなっている (- 3.3 - 2.1kcal/mol)。M528A も同様により正の値を示した (0.1 - 2.0kcal/mol)。即ち、G521A では HF 法に比べて $\Delta\Delta E$ の符号が逆転し、L525A では絶対値が小さくなり、M528A ではより正の値を示した。方法による結果の変化は多少みられたが、E353Q、H524A、H524Q の 3 つに比べて、残りの 3 つの変異で $\Delta\Delta E$ の値が小さいことは MP2 法の場合も同様であった。

4.2 実験データとの比較

本研究で参考にした実験データを Table 2 に記した。この表は Herynk らの論文 [12] から引用したもので、1 アミノ酸変異の実験データの中からエストロゲンと ER との結合にかかわるようなデータを引用した。これらの実験データは全てアミノ酸変異に対して結合が低下していることを示唆している。

一方、本研究で行った計算では、 $\Delta\Delta E$ が正の値であれば、アミノ酸変異によって EST と ER との結合が野生型に比べてエネルギー的に不安定になっていることを示している。計算結果は先に述べたとおり、6 つの内 3 つは明らかに $\Delta\Delta E$ が正の値であったが、残りの 3 つは有意な結果とはいえなかった。このことは HF 法でも MP2 法でも同様であった。

Table 2. Qualitative experimental data for the effects of point mutation on the ER-EST binding [12].

Mutation	Result of mutation
E353Q	Decreased affinity for estrogens
G521A	Decreased estrogen binding
H524A	Decreased estrogen binding
H524Q	Decreased response to estrogen
L525A	Decreased estrogen binding
M528A	Decreased estrogen binding

5 考察

5.1 E353Q、H524A、H524Q

特に大きく $\Delta\Delta E$ の値が正となった E353Q、H524A、H524Q の変異については、Table 1 より、他の 3 つとは対照的に、変異させることでアミノ酸の性質が全く変わっていることがわかる。E353Q では、酸性側鎖をもつグルタミン酸から電気的中性であるが極性のあるグルタミンへ、H524A では塩基性のヒスチジンから非極性のアラニンへ、H524Q では塩基性のヒスチジンから極性のあるグルタミンへ変化している。このようなアミノ酸変異によって、その周辺のクーロン相互作用が大きく変化していると考えられる。参考までに、Table 1 に変異後の複合体全体の形式電荷の変化の値を示した。

結合エネルギーに加え、MP2 法によりフラグメント間相互作用エネルギー (Inter-Fragment Interaction Energy; IFIE) 解析を行った。これはある特定のフラグメントに対して、他のフラグメントとの相互作用エネルギーを計算したものである [13]。本計算では、1 つのフラグメントに対し 2 アミノ酸残基が割り当てられており、最後の 247 番目のヒスチジン残基と EST に関しては、それぞれ 1 フラグメントずつが対応する。このため、あるフラグメントと EST との間の IFIE は、そのフラグメントを構成する 2 アミノ酸残基と EST との相互作用エネルギーに相当する。EST に対して、ER の各フラグメントとの IFIE 解析を行った。変異前後の EST と ER の IFIE (E_{int_frag}) の差、 ΔE_{int_frag} を定義した。

$$\Delta E_{int_frag} = E_{int_frag}(\text{mutant}) - E_{int_frag}(\text{wild-type})$$

E353Q に関しては、Figure 5 の結果となった。非常

に特徴的なのは、変異させたアミノ酸残基 (353) の ΔE_{int_frag} である。アミノ酸の電気的性質が大きく変化したために、EST との相互作用においてエネルギー変化が大きい。このグラフを図示し、さらに EST 単体分子の静電ポテンシャルを重ねて表示したものが Figure 6 (後に掲載) である。黄色で表示された EST に対して、受容体側のアミノ酸は IFIE 値を可視化したもので、色の濃さに比例し、青が斥力、赤が引力的な相互作用を示している [14]。一方、EST の骨格を覆っているのが静電ポテンシャルの等値面であり、青が正、赤が負の値を示す。Figure 6 の左側が変異前、右側が変異後の図である。比較してみると、左側の変異前のアミノ酸残基 (グルタミン酸) は赤く表示されており、引力を示している。一方、右側のアミノ酸 (グルタミン) は青く表示されており、IFIE が正つまり斥力を表している。また、EST の静電ポテンシャルも同時に表示させているが、変異前では青く表示されている正の静電ポテンシャルの中にグルタミン酸の酸素原子が入っている。これは負に帯電しているグルタミン酸の酸素原子に対して EST とのクーロン引力相互作用が働いていることを示している。一方、変異後の右の図では、グルタミン (GLN) の側鎖が EST と反対側に向いていることがわかる。つまり E353Q に関しては、変異させたアミノ酸残基の性質の変化が、そのまま EST との結合能の変化に効いていると思われる。

H524A、H524Q に関しても同様に、EST に対する

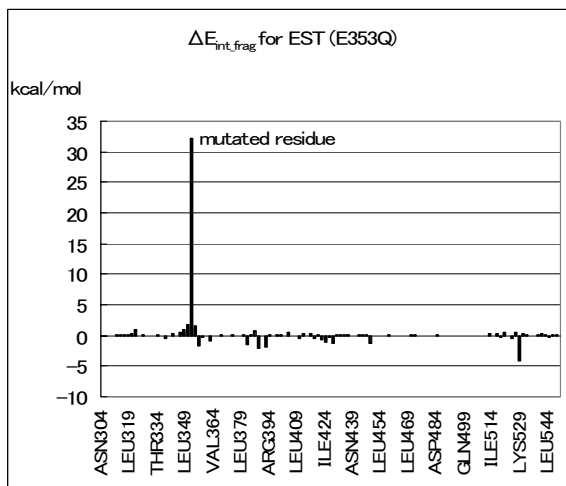


Figure 5. ΔE_{int_frag} for EST in the case of E353Q.

フラグメント間相互作用解析の結果を Figures 7, 8 に示した。E353Q と同様に、変異させたアミノ酸残基において大きく相互作用エネルギーが変化した。これは E353Q と同様にアミノ酸の性質の変化によるものと考えられる。E353Q とは異なり他のアミノ酸残基からの相互作用に関しても、2kcal/mol 程度の変化は見られるが、やはり変異残基のところで最も大きいエネルギー変化を示している。Figures 9, 10 (後に掲載) では、H524A、H524Q 双方とも変異させた前後で明らかにアミノ酸残基の側鎖の位置が異なっている。変異前ではヒスチジンの側鎖は、EST の方を向いており、相互作用解析からも引力が働いていることがよくわかる。ヒスチジンは塩基性残基で、側鎖に正の電荷をもっている。また、ヒスチジンに近い EST は Figures 9, 10 の通り負の静電ポテンシャルを示している。このために、強くクーロン引力相互作用が働いていたと考えられる。このアミノ酸残基をアラニンに変異させた場合、つまり H524A では、アラニンは非極性残基であるためにそのクーロン力相互作用が著しく弱くなったと思われる。H524Q でも、側鎖 (主にアミドの N 原子) に極性があるが、あらわに電荷をもつアミノ酸に比べるとやはりクーロン力相互作用が弱くなったと思われる。また Figure 10 から、明らかにグルタミンの側鎖は EST と反対方向に向いており、極性をもつ NH_2 基も EST との結合にあまり関与していないと思われる。

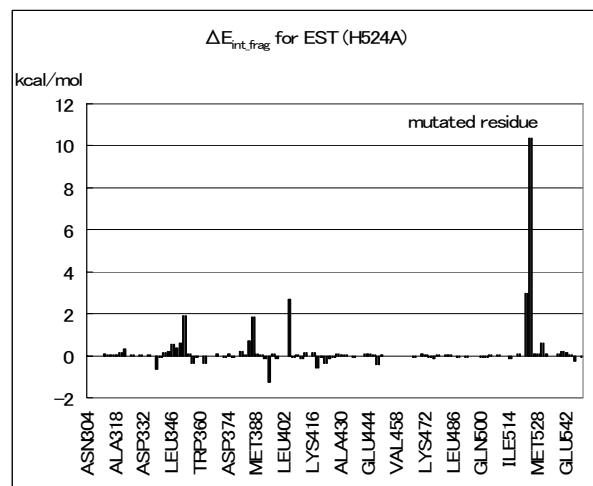


Figure 7. ΔE_{int_frag} for EST in the case of H524A.

5.2 G521A、L525A、M528A

残り3つの変異G521A、L525A、M528Aは先の3つの変異と比べて ΔE の絶対値が著しく小さく、約2~3kcal/molである。典型的な水素結合のエネルギー(約3~6kcal/mol)よりも低い。E353Q、H524A、H524Qに比べてほとんど ΔE は変わっていないといえる。これらの変異は全て非極性残基から非極性残基への変異であり、変異によるアミノ酸の性質の変化が小さいことが大きな要因であると思われる。

Figure 11にはG521Aの、ESTに対するIFIE解析のグラフを示している。変異残基に関する ΔE_{int_frag} は正の値になっているが、他のアミノ酸残基においては負の値を示しているものもあり、特にGLY344、LEU345

に関しては特徴的な変化を示している。

Figure 12ではそのGLY344、LEU345に対するIFIE解析の結果を示している。この図から、GLY344、LEU345に対する ΔE_{int_frag} はESTとの相互作用を除いては、変異残基を含め、ほとんど相互作用に変化がないということがわかる。つまり、G521Aというアミノ酸変異によって変異残基とESTとの相互作用はわずかに斥力的となったが、ESTと他のアミノ酸残基において、より強い引力が働いた。これはアミノ酸変異を行った際の構造最適化におけるESTの構造変化によるものと思われる。全体としてESTとの結合能はわずかに強くなった。しかし変異残基の影響を受けているとは言い難い。

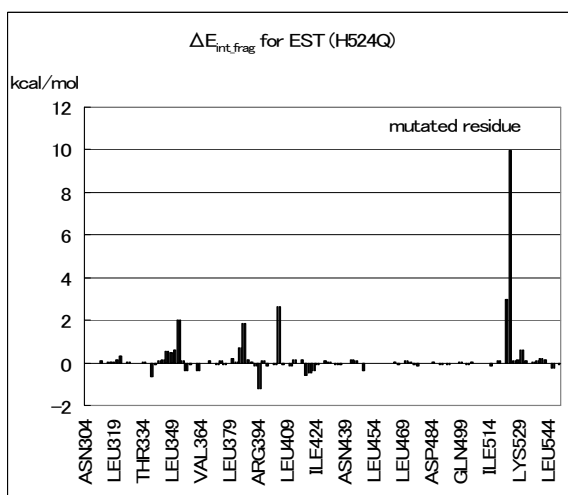


Figure 8. ΔE_{int_frag} for EST in the case of H524Q.

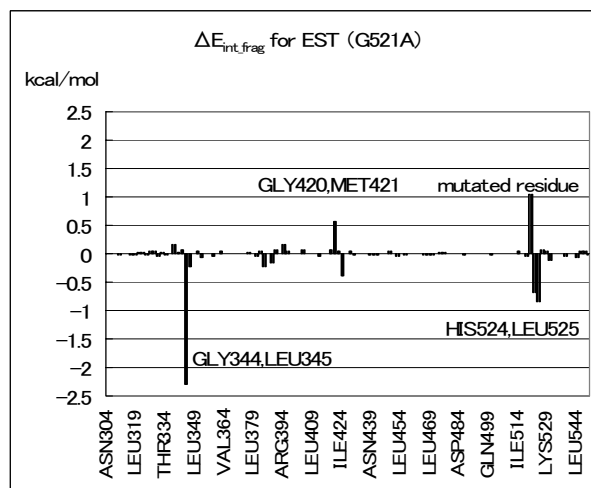


Figure 11. ΔE_{int_frag} for EST in the case of G521A.

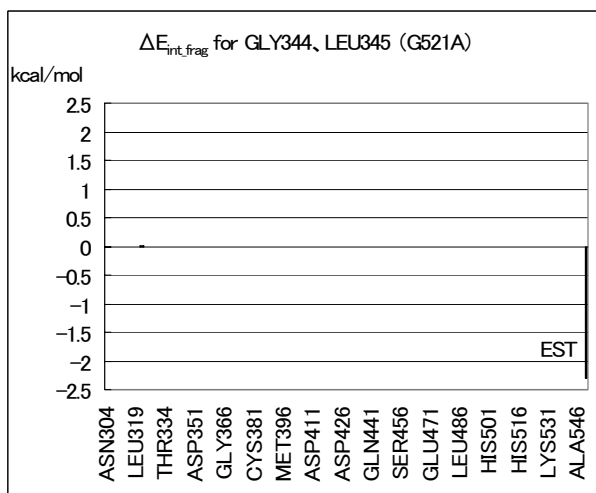


Figure 12. ΔE_{int_frag} for GLY344, and LEU345 in the case of G521A.

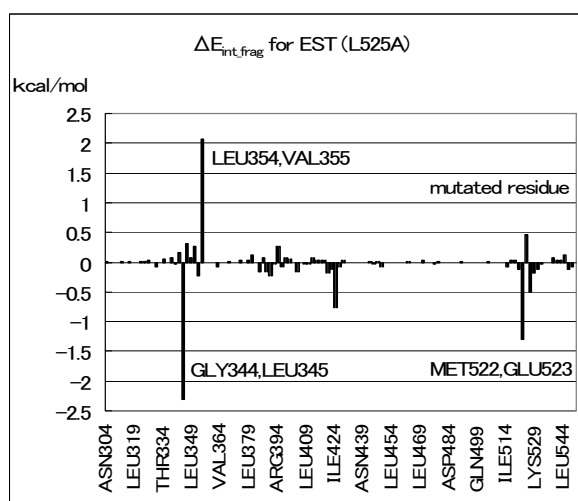


Figure 13. ΔE_{int_frag} for EST in the case of L525A.

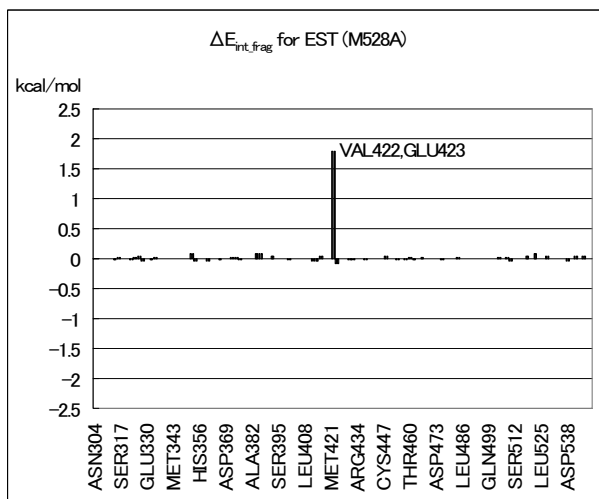


Figure 14. ΔE_{int_frag} for EST in the case of M528A.

L525A に関しては、Figure 13 に示している。この場合も変異残基との ΔE_{int_frag} がわずかに正の値を示しているが、他のアミノ酸残基に比較的大きな変化が起こっている。特に、GLY344、LEU345 と LEU354、VAL355 は非常に特徴的な結果を示しており、GLY344、LEU345 は先の G521A の場合と同様の結果を示していた（図示せず）。LEU354、VAL355 に関しても同様の結果が現れた（図示せず）。やはり、これも EST の構造最適化による構造変化がこれらのアミノ酸残基との相互作用の変化を招いたと考えられる。

M528A については、Figure 14 に結果を示した。EST の、VAL422、GLU423 との相互作用エネルギーのみが約 2kcal/mol ほど変化している。この原因も先の G521A、L525A の場合と同様に、構造最適化による EST の構造変化と思われたが、視覚上 EST はほとんど構造変化していなかった。Figure 15 は VAL422、GLU423 に対するフラグメント間相互作用解析を行ったグラフである。変異残基との相互作用エネルギーも変化しているが、非常に小さい値である。この場合もほとんどアミノ酸変異の効果が現れていないことがわかる。

5.3 計算方法の検討

E353Q、H524A、H524Q の場合は、アミノ酸変異の効果を計算によって適切に取り入れることができた。しかし残り 3 つの変異 G521A、L525A、M528A（電荷

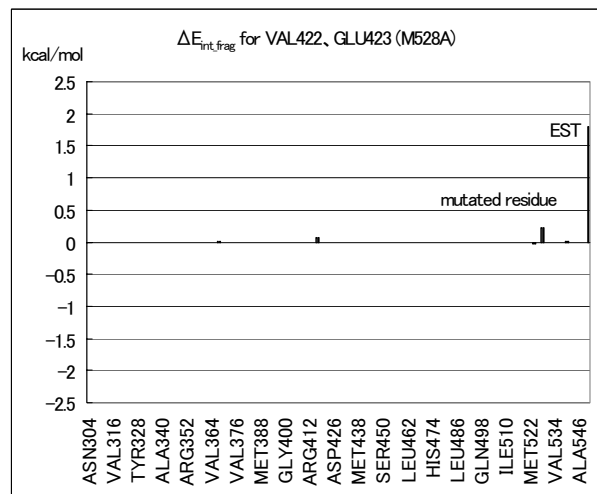


Figure 15. ΔE_{int_frag} for VAL422, and GLU423 in the case of M528A.

が変化しない場合) に対しては、今回の計算方法では十分であるとは言えない。原因として、幾つかの可能性が考えられる。まず、今回の変異方法では、構造最適化の範囲と力場の選択に対してある程度任意性がある。構造最適化はアミノ酸変異の効果を評価するために EST と変異残基のみに対し同時に行ったが、リガンド結合部位での水素結合ネットワーク等を含む構造の正確な決定には、量子力学的な構造最適化を行う必要があるかもしれない。力場に関しては、今回 MMFF94x を用いた。MMFF94x 以外にも AMBER94 力場を用いて同様の計算（但し、FMO 計算は HF/STO-3G）を行ったが、計算結果は MMFF94x の場合と比べて大差なかったため、（古典）力場の影響は少ないと考えられる。理想的には、FMO 法によるリガンド結合部位全体の構造最適化が望ましいが、現時点ではその手法の実行は困難である。

また基底関数も計算精度に影響すると考えられる。今回コンピュータリソースの関係上、HF/STO-3G、MP2/STO-3G で FMO 計算を行った。確認のために M528A については、基底関数を 3-21G にして計算を行ったが、この程度の拡張では $\Delta \Delta E$ の計算結果にはあまり変化がなかった（STO-3G では 2.0kcal/mol、3-21G では 0.2kcal/mol となった）。

また、結合部位における特定の水分子の取り扱いが計算結果に影響する可能性がある。本研究では、用いた結合構造中のリガンド周辺に水分子がなかったため、水分子は全て削除した。しかし以前の福澤らの研究 [11] では、結合に関与する水 1 分子を考慮して、

様々な種類のリガンド分子の ER に対する結合能が調べられている。その結果、FMO 法によって求められた結合エネルギーと実験によって得られている RBA (Relative Binding Affinity) [15] の値との間で良い相関がみられた。また福澤らの別の研究 [16] から、結合部位でのリガンド、その周辺残基、水分子間での電荷移動が報告されている。Figure 16 (後に掲載) は、福澤らが基にした立体構造 (PDB ID; 1ERE) であるが、これらの研究から Figure 16 のような位置にある水分子は結合能を評価する上で、重要な要素の 1 つだと示唆されている。

ところが今回の場合、構造を見てみると (Figure 16; 中心に EST があり周辺のアミノ酸残基は今回変異を行ったアミノ酸残基 (GLU, GLY, HIS, LEU, MET) が表示されている)、水分子は EST の図中の左側に位置し、353 番目のグルタミン酸とは水素結合を形成しているが、右側の 4 残基とは直接相互作用していない。従って今回検討を行った殆どの変異に関しては、この水分子の有無が結合能の変化に大きく寄与しているとは思えない。また、マクロな溶媒効果に関しても、これらポケット部分のような水に露出していない局所的な場に対する影響は一般には大きくないと思われる。変異によりアミノ酸の電荷が変化し、静電相互作用が大きく変化する場合、水分子によるクーロン遮蔽効果が重要となる可能性もあるが、「結合能の変化の方向」という定性的な議論に限定すれば、真空中の計算でも理論解析は可能だと考えられる [17]。なお、Polarizable Continuum Model による溶媒和エネルギーの見積りについては、文献 [11] に考察がある。

溶媒効果と関連して、受容体タンパク質とリガンド分子との結合を考える際、エントロピー変化に関する考察も必要となる。現状の FMO 計算の枠内ではこの取り扱いは困難であるが、ここでは以下の二つの点をコメントしておく。第一に、電荷が変化するようなアミノ酸変異の自由エネルギー変化に対しては、エントロピーの寄与はエンタルピーの寄与と比べて相対的に小さいと期待できる。第二に、電荷が変化しない変異の場合にはエントロピー効果が重要となる可能性が考えられ、この効果を何らかの形で取り入れることで、計算と実験の一致が改善される可能性がある。

また、本系では複合体全体が荷電しているため、実際にはカウンターイオンが配位していると考えられる。特にアミノ酸変異によって正味の電荷が変化する場合にはこれらのイオンが結合性に影響する可能性も考え

られる。

さらに、本解析で取り入れられなかった効果として、アミノ酸変異による大規模な構造変化の可能性が考えられる。本研究では野生型の立体構造を基に解析を行ったが、本来タンパク質は 1 つのアミノ酸が変異しただけでも、タンパク質本来の機能を果たせなくなる可能性がある。つまり 1 アミノ酸変異によって、タンパク質の立体構造が大きく変化する場合がある可能性を示している。今回行ったような、局所的な構造変化を仮定した評価方法では、E353Q、H524A、H524Q のように電氣的性質が大きく変化するアミノ酸変異の場合は結合能の変化を表現できるが、タンパク質全体に構造変化を及ぼすようなアミノ酸変異が重要である場合には、この方法では取り扱うことができない。アミノ酸変異による結合能の変化をみるには、このような効果をどのように考慮するかという点も大きな課題である。現在、計算化学においてタンパク質の構造予測も非常に盛んな研究分野であるが、本研究で用いたような ER の LBD (約 250 残基) 規模の立体構造を予測するには至っていない。アミノ酸の性質があまり変化せず、しかもある程度広い領域で構造変化が起きる場合に、変異による結合能の変化を本研究のような方法で (しかも 5 kcal/mol 程度以内のエネルギー誤差で) 扱うことは現時点ではまだ困難であると言わざるを得ない。

6 まとめ

本研究では、6 種類の 1 アミノ酸変異体に対する FMO 計算を行い、それに対応する実験データとの定性的な比較を行った。

3 つのアミノ酸変異 (E353Q、H524A、H524Q) では結合エネルギー差 $\Delta\Delta E$ が正の値を示し、実験データを定性的には再現したと言える。アミノ酸の性質の変化に起因するクーロン相互作用が、EST の ER に対する結合能の変化に大きな影響を与えていた。残りの 3 つのアミノ酸変異 (G521A、L525A、M528A) については、 $\Delta\Delta E$ が小さな値を示し前者ほど明確な結果は得られなかった。今回、アミノ酸変異を行う際の構造最適化の手法や基底関数の選択、そして大規模な構造変化や溶媒分子・エントロピー効果の考慮などの点において理論解析上の問題が残っており、今後はこれらを詳細に検討する必要がある。

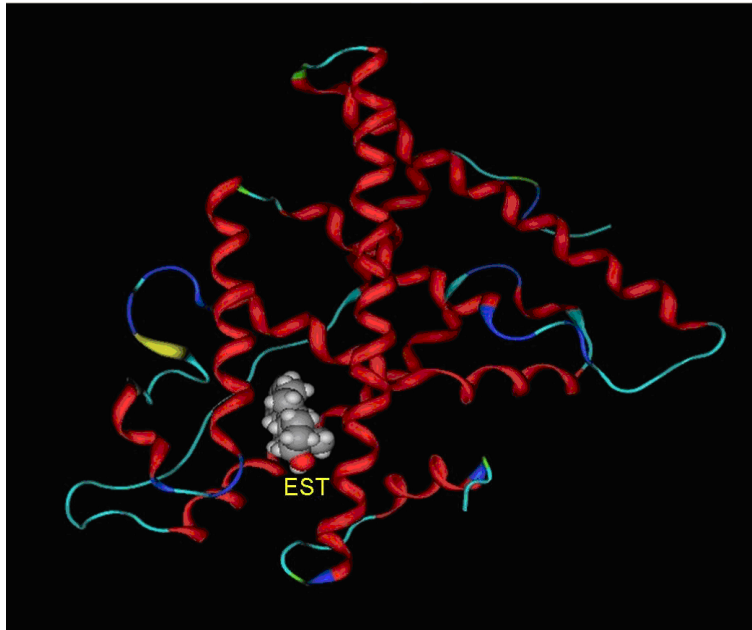


Figure 2. Molecular structure of EST-ER complex (wild-type, PDB-ID:1QKT).

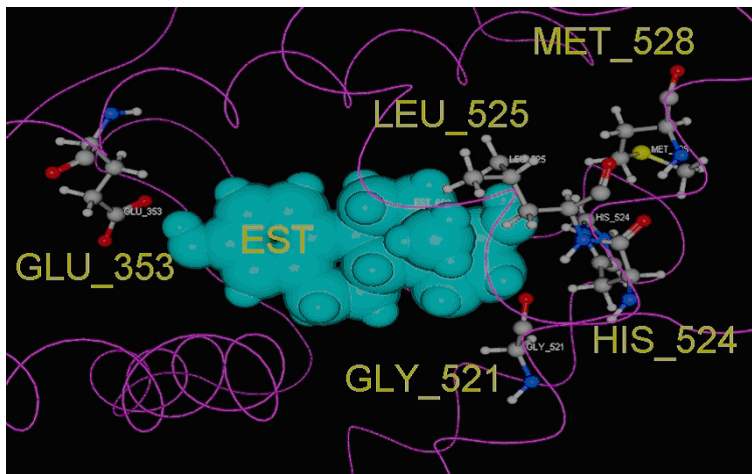


Figure 3. Five amino-acid residues surrounding EST.

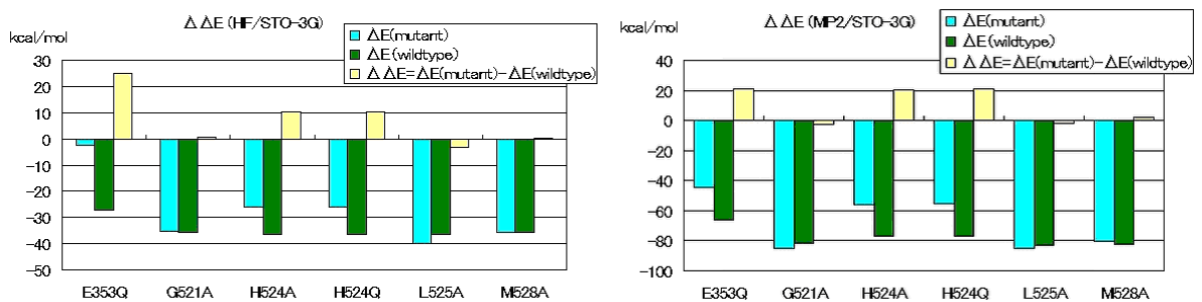


Figure 4. Calculation results for the binding energy differences by point mutations by the HF and MP2 methods.

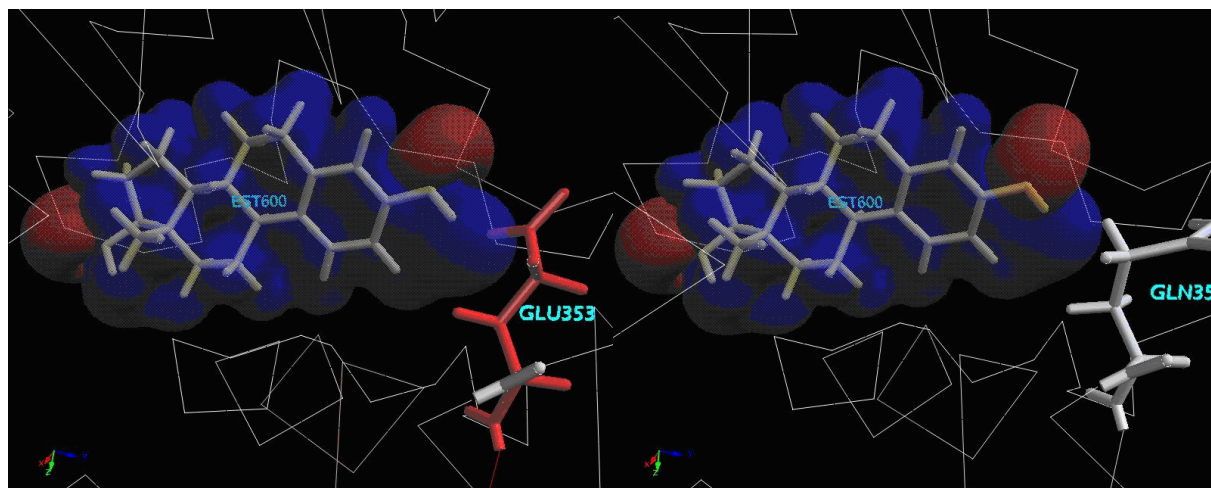


Figure 6. IFIEs between EST and each amino acid residue of the ER in the case of E353Q. The IFIE values of the mutated residues with EST are represented by color (see text). Electrostatic potentials of EST are also shown as isosurfaces at ± 0.02 a.u. when a +e charge exists. Left and right figures refer to those before and after the mutation, respectively. Thin line represents the main chain of ER.

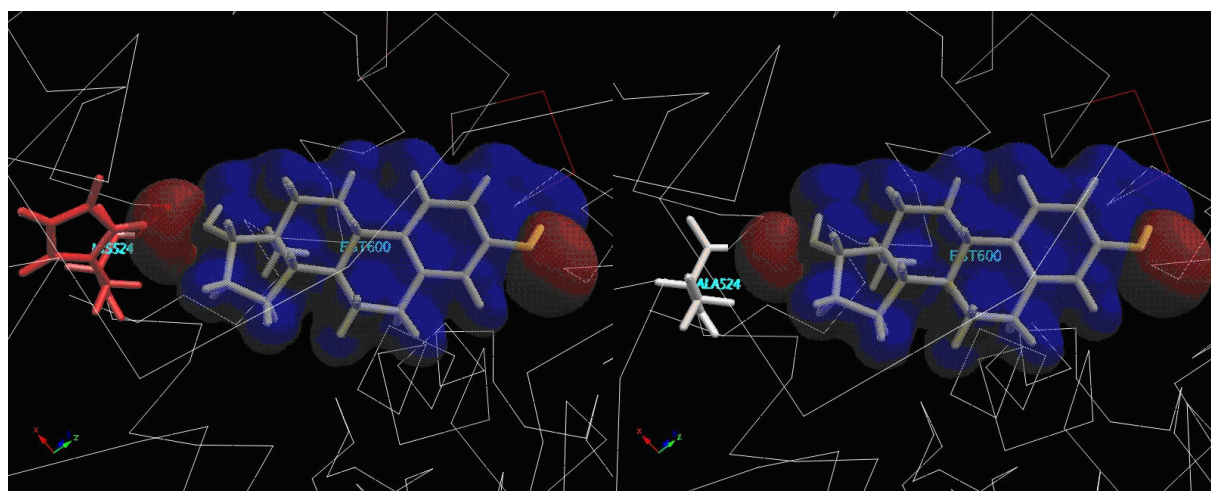


Figure 9. IFIEs between EST and each amino acid residue of the ER in the case of H524A. The IFIE values of the mutated residues with EST are represented by color (see text). Electrostatic potentials of EST are also shown as isosurfaces at ± 0.02 a.u. when a +e charge exists. Left and right figures refer to those before and after the mutation, respectively. Thin line represents the main chain of ER.

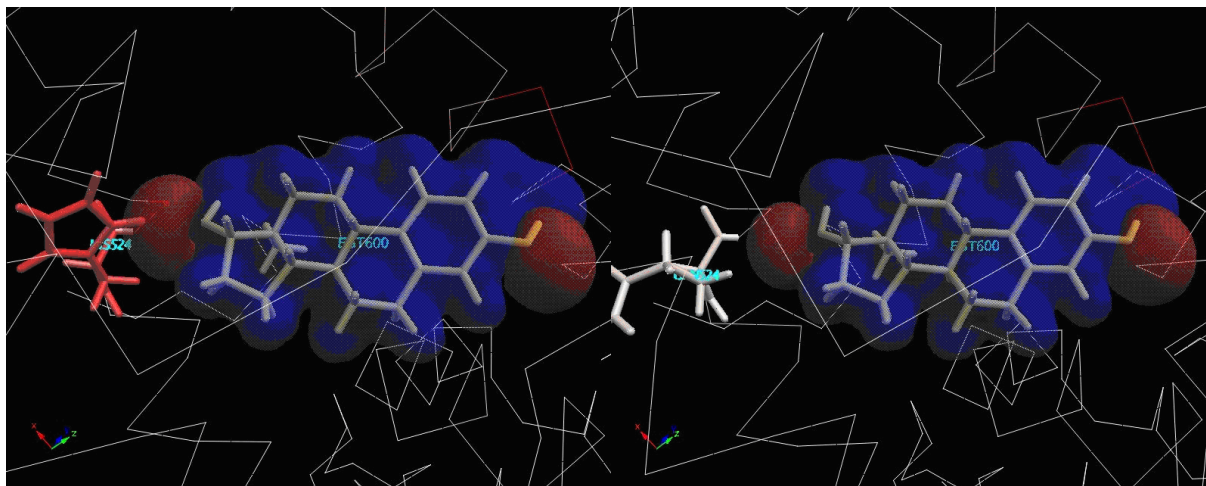


Figure 10. IFIEs between EST and each amino acid residue of the ER in the case of H524Q. The IFIE values of the mutated residues with EST are represented by color (see text). Electrostatic potentials of EST are also shown as isosurfaces at ± 0.02 a.u. when a +e charge exists. Left and right figures refer to those before and after the mutation, respectively. Thin line represents the main chain of ER.

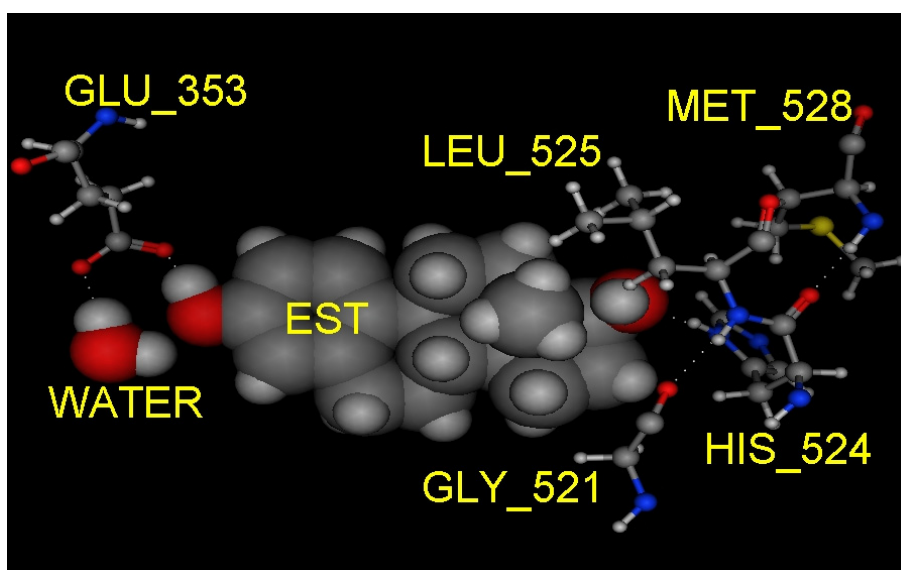


Figure 16. Molecular structure of ligand pocket region (PDB-ID: 1ERE), where the dashed-line represents the hydrogen bond.

本研究は科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業（CREST）の研究課題「フラグメント分子軌道法による生体分子計算システムの開発」の資金援助により行われた。

参考文献

- [1] T. Kaminuma, *CBI Journal*, **3**, 130-157 (2003).
- [2] K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano and M. Uebayashi, *Chem. Phys. Lett.*, **313**, 701-706 (1999).
- [3] T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M.

- Uebayashi and K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 614-618 (2000).
- [4] K. Kitaura, S. Sugiki, T. Nakano, Y. Komeiji, and M. Uebayashi, *Chem. Phys. Lett.*, **336**, 163-170 (2001).
- [5] T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, K. Fukuzawa, Y. Akiyama, M. Uebayashi and K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.*, **351**, 475-480 (2002).
- [6] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, and K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.*, **396**, 473-479 (2004).
- [7] Molecular Operating Environment, version 2005.06 ; Chemical Computing Group : Montreal, Canada.
- [8] 中野達也, 谷森奏一郎, 加藤昭史, 小池上繁, 雨宮克樹, 福澤薫, フラグメント分子軌道法入門, アドバンスソフト (2004).
- [9] ABINIT-MP および BioStation Viewer のダウンロード先 URL
<http://www.rss21.iis.u-tokyo.ac.jp/result/download>
- [10] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.*, **17**, 490-519 (1996).
- [11] K. Fukuzawa, K. Kitaura, M. Uebayashi, K. Nakata, T. Kaminuma and T. Nakano, *J. Comp. Chem.*, **26**, 1-10 (2005).
- [12] M. H. Herynk and S. A. W. Fuqua, *Endocrine Reviews*, **25**, 869-898 (2004).
- [13] K. Fukuzawa, Y. Komeiji, Y. Mochizuki, A. Kato, T. Nakano, and S. Tanaka, *J. Comp. Chem.*, **27**, 948-960 (2006).
- [14] A. Kato, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, S. Amari, T. Nakano, *Journal of the Visualization Society of Japan*, **26**, 124-129 (2006).
- [15] G. G. J. M. Kuiper, J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg, and J-Å. Gustafsson, *Endocrinology*, **139**, 4252-4263 (1998).
- [16] K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, S. Tanaka, K. Kitaura and T. Nakano, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 16102-16110 (2006).
- [17] S. Sugiki, M. Matsuoka, R. Usuki, Y. Sengoku, N. Kurita, H. Sekino, and S. Tanaka, *J. Theor. Comput. Chem.*, **4**, 183-195 (2005).

Effects of Point Mutations on the Binding Energies of Estrogen Receptor with Estradiol

Kousuke MAEDA^a, Alexander SCHUG^{b, c}, Hirofumi WATANABE^{b, c}, Kaori FUKUZAWA^{c, d}, Yuji MOCHIZUKI^{c, e}, Tatsuya NAKANO^{c, f} and Shigenori TANAKA^{a, b, c*}

^aDepartment of Science of Human Environment, Faculty of Human Development, Kobe University
3-11 Tsurukabuto, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

^bGraduate School of Science and Technology, Kobe University
1-1 Rokkodai, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

^cCREST, Japan Science and Technology Agency (JST)
4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

^dDivision of Science and Technology, Mizuho Information & Research Institute, Inc.
2-3 Kanda Nishiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8443, Japan

^eAdvancesoft and Institute of Industrial Science, Center for Collaborative Research, University of Tokyo
4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan

^fDivision of Safety Information on Drug, Food and Chemicals, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

**e-mail: tanaka2@kobe-u.ac.jp*

We have studied the molecular mechanism for the binding between estrogen receptor and estradiol using ab initio methods. To examine the validity of in silico analysis of mutation effects, we made point mutations of receptor employed in experiments, and compared the calculated results for the binding energies with experimental data. We performed the calculations at the HF/STO-3G and MP2/STO-3G levels by using the Fragment Molecular Orbital (FMO) method. The calculated results for three of six mutants qualitatively agreed with experimental data. However, the other three examples failed to reproduce the experimental data. We discussed the reasons for these discrepancies.

Keywords: Estrogen receptor, Point mutation, Binding energy, Fragment Molecular Orbital method

