

血液凝固因子 Xa とリガンドとの FMO 相互作用解析

— 結合サイトの水分子の影響調査 —

○佐藤 博之、松浦 東

富士通研究所(〒243-0197 厚木市森の里若宮 10-1)

【緒言】

近年、京などに代表される超並列計算機の普及に伴い、computer aided drug design (CADD)の研究が盛んになってきた。タンパク質結晶構造の情報から、薬の候補となる化合物(リガンド)を設計する Structure-based drug design (SBDD)も、CADD の主要なテーマの 1 つである。SBDD によるリガンド設計では、タンパク質との結合自由エネルギーを如何に評価するかが重要なポイントとなる。ただし結合自由エネルギーの評価にあたっては、タンパク質とリガンドだけでなく、周囲の水の影響を考慮しなければならない。例えばタンパク質の結合サイトに存在する水は、リガンドがタンパク質と結合する際に排除されてエントロピーを獲得し、系全体の自由エネルギー変化に関与する。そのため特に結合サイトの水は、研究の重要なファクターとして注目されている。

結合サイトの水の影響を評価するツールに、Schrödinger 社の WaterMap[1]がある。しかし血液凝固因子 Xa (fXa) とリガンドとの結合自由エネルギーに対する水の影響など、WaterMap での評価が困難なケースも報告されている。この原因は、リガンドの硫黄原子と結合サイトの水分子との相互作用が適切に評価されないためだと考えられている[2]。そこで今回、分子動力学 (MD) 計算で特定した水分子を含む fXa について、フラグメント分子軌道 (FMO) 法[3]を用いた電子状態計算により、硫黄原子を含む 4 種類のリガンド (RRP, RTR, RDR, RRR) との相互作用エネルギーを求め、実測の結合自由エネルギーと比較することで、結合サイトの水の影響を調査した。

【方法】

タンパク質とリガンド間の相互作用解析に含める水分子を特定するために、リガンドの重原子を拘束した MD 計算を 10ns 実施した。得られた軌跡の全フレームに含まれる水分子を 1 フレームにマッピングし、水の密度がバルクの状態よりも高いサイトを特定した。各サイトにおける水の代表構造のうち、タンパク質とリガンドの双方の近傍で、かつ他のリガンドとは異なる位置の水分子を、タンパク質の部分構造と見なして FMO による相互作用解析を実施した (図 1)。

fXa とリガンドの複合体構造には、PDB の 1NFU (fXa+RRP), 1NFY (fXa+RTR), 1NFX (fXa+RDR), 1NFW (fXa+RRR)を用いた[4]。fXa の力場には Amber99SB-ILDN-GORD[5]を用い、水には TIP3P を用いた。リガンドは HF/6-31G*で構造最適化し、点電荷に RESP、力場に General amber force field (GAFF)を用いた。FMO は 2 layer の 2 体近似とし、リガンドとその近傍 6Å 内のフラグメントには RI-MP2/6-31G*を、その他のフラグメントには HF/3-21G を用いた。またリガンド近傍のカルボキシル基の基底に diffuse 関数を追加した。RI の外部基底には cc-pVDZ を用いた。fXa のフラグメントはアミノ酸 1 残基単位とし、C α 炭素とカルボニル炭素間で分割した。fXa に含めた水以外の溶媒効果は PCM により評価した。MD 計算には Gromacs-4.6.5 を、FMO 計算には GAMESS 1 MAY 2013 (R1)を用いた。

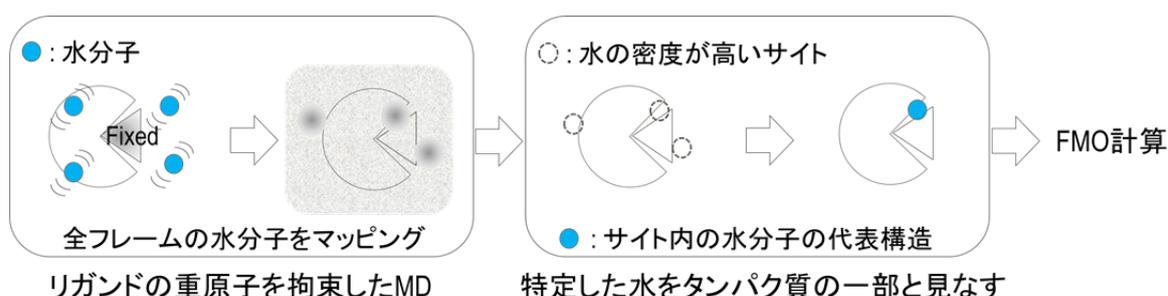


図 1. リガンド拘束 MD と FMO 計算とを組み合わせたタンパク質 - リガンド相互作用解析

【結果】

fXa の部分構造と見なす水分子を特定するために、リガンドの重原子を拘束した MD を 10 ns 実施した。全ての重原子を拘束した MD と比較して、リガンドの重原子のみ拘束した MD の方が、PDB の結晶水の位置と水分布の密度の高いサイトとの一致が改善する (図 2)。

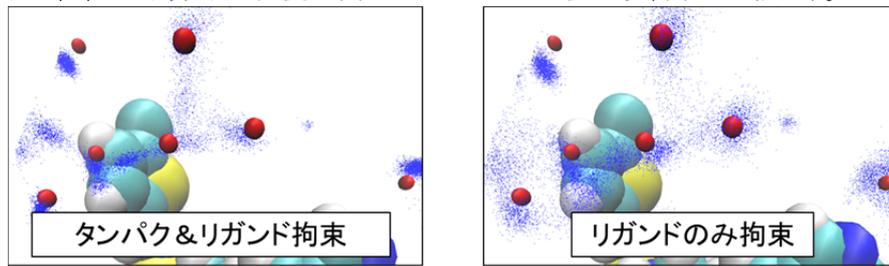


図 2. 重原子拘束 MD による水分布 (青点) と結晶水 (赤球)

解析に用いた 4 種類のリガンドは全てスルホンアミド構造を持ち、分子サイズも結合ポーズもほぼ同様である。そのため結合自由エネルギーの相対値に対するエントロピーの寄与も同等と仮定すると、fXa との相互作用エネルギーは、実測の結合自由エネルギーと線形の相関を持つことが期待される。しかし implicit な溶媒効果と分極効果を含めた FMO 計算の結果では、期待された線形の相関から RRR のみ約 20 kcal/mol 外れた。リガンド拘束 MD 計算により特定した水分子を fXa の部分構造と見なし、その他の溶媒を implicit に取り込んで FMO 計算を実施した結果、分極効果を含めた相互作用エネルギーと実測の結合自由エネルギーとの相関が改善されることが分かった (図 3)。

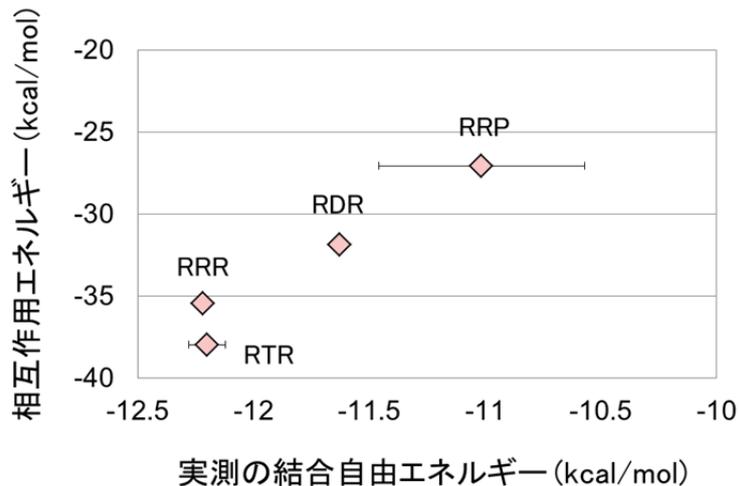


図 3. FMO による全相互作用エネルギーと実測の結合自由エネルギー

参考文献

- [1] <http://www.schrodinger.com/WaterMap.php>
- [2] A. Abel et al., J. Am. Chem. Soc. 130, 2817-2831 (2008).
- [3] K. Kitaura et al., Chem. Phys. Lett. 313, 701-706 (1999).
- [4] A. Maignan et al., J. Med. Chem. 46, 685-690 (2003).
- [5] K. Lindorff-Larsen et al., Proteins. 78, 1950-1958 (2010).