

－研究ノート－

アロステリック制御薬剤探索に向けた高圧力蛋白質研究センターの取り組み

白木琢磨¹、櫻井一正²、米澤康滋²

要旨

様々ながん医薬品の多くは細胞内シグナル伝達経路タンパク質を競争的に阻害するが、抵抗性獲得の問題があり従来とは異なるアプローチによるがん薬剤創薬が求められている。我々は NMR と計算機科学を組み合わせた独自の方法でその標的分子の揺らぎを制御するアロステリック制御薬の探索法確立を目標として共同研究を進めている。モデル標的分子として、がん細胞が示す共通の代謝状態（がん代謝）に関連するタンパク質の一つである ENTPD5 の分子動力学シミュレーション計算とその基礎的なデータ解析を実施したのでその内容を報告する。

キーワード：タンパク質、分子動力学シミュレーション、アロステリック創薬、がん

1. 緒言

ミクロな視点からは、創薬とは疾病の原因となる異常状態の細胞群を正常に戻す役割を果たす新規薬剤分子を創出する事を示す。従来の薬剤探索方法では標的分子のリガンド結合部位の競争阻害に注力していたが⁽¹⁾、標的タンパク質がファミリーを形成する場合、特異性の問題から新規薬剤発見が困難になっている。近年は、従来法に変わる有望な方法としてアロステリック制御薬剤が注目を浴びている。タンパク質のアロステリック制御とは、活性部位とは異なる部位（アロステリック部位）に多くの場合は基質とは異なる分子（制御分子：アロステリック調整因子）が結合し、タンパク質の活性を変化させる現象である。アロステリック制御の利点は、標的分子に特異的に働くために副作用がない事、かつ阻害から促進まで効果に幅を持たせて緩やかな制御が可能という点にある。アロステリック制御の効果は活性の阻害から亢進まで幅があり、競争阻害ではない事から基質が類似する他のタンパク質を阻害しにくい特徴を有する。しかし現時点では、アロステリック部位を見つける確立された方法はなく経験のみに頼っているのが現状である。我々は、NMR と分子動力学シミュレーション計算を用いて、標的タンパク質の活性に関わる構造変化に伴って形や運動性が変化する活性部位から離れた構造部位を特定し、この部位に結合する制御分子を探索する新たな薬剤探索方法を考案しその実現に取り組んでいる。

アロステリック制御を用いた薬剤探索の研究対象として我々はがんを選んだ。がんは細胞の成長・増殖の制御が乱れた状態とも定義できる。1970 年頃からシグナル経路上のキーとなるタンパク質の阻害剤が試されたが、ほとんどのがんに対して顕著な成果は上げられなかった。その理由の一つは特定のシグナル経路を阻害して一部の細胞の増殖を抑制しても、がん組織中から抵抗性の細胞が出現するからである。また特異性の低い基質の競争阻害薬剤は、正常細胞のタンパク質も阻害してしばしば重篤な副作用を示す。このため現在では、がんに対して特定のシグナル経路の因子を標的とする方法には限界があると考えられている。一方、がん細胞は共通して Warburg 効果⁽²⁾と呼ばれる特有の解糖系亢進を示し、現在はその代謝経路に関連する遺伝子・タンパク質が新たながんの標的の候補と期待されている。例えば ENTPD5⁽³⁾、SIX1⁽⁴⁾、LDHA⁽⁵⁾等である。このような背景の下、我々は ENTPD5 を共同研究のモデル標的タンパク質に設定した。

原稿受付 2021 年 12 月 24 日

本研究は学内助成金 KD1705、KD2003 の支援を受けた。

¹ 近畿大学 生物理工学部 食品安全工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

² 近畿大学 先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. ENTPD5

Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 5 (ENTPD5) は、がん共通の糖の吸収が促進される Warburg 効果に関わる⁽³⁾。吸収された糖は、エネルギー生産だけではなく UDP と結合して糖鎖の合成に関与する事でがん細胞内の発現タンパク質の品質管理に働き(図 1)、取り込まれた糖鎖がタンパク質の品質管理に利用され成長因子受容体などの産生を亢進していると考えられている。その中で ENTPD5 は、がん細胞で特異的に活性が上昇しており糖の取込みを進めていることが 2010 年に Fang らによって報告された⁽³⁾。さらに彼らはシグナル抑制因子が欠損したがんモデル細胞 ENTPD5 の発現量を抑えると、増殖が抑えられることも示した。ENTPD5 の活性を操作することで、発現タンパク質の糖鎖付加を抑えてがん化の抑制につながる事が予想され、近年実際に ENTPD5 の阻害剤の投与で、がん細胞の増殖が抑えられたと報告されている⁽⁶⁾。

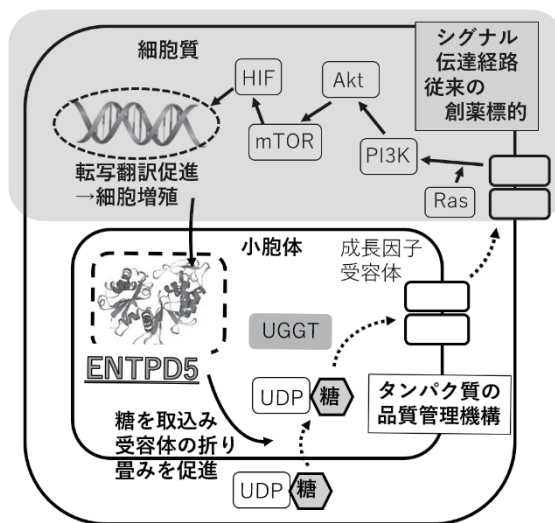


図1 ENTPD5 の糖吸収促進機構

3. 分子動力学シミュレーション

分子シミュレーションは、近年の計算情報科学技術の発展に伴い生命科学分野でも有用な研究方法として活用されている。分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) シミュレーション⁽⁷⁾ はタンパク質や核酸等の生命高分子の動的側面を非常に高い精度で計算機上に再現できることから、タンパク質分子のアロステリック制御機構の研究に大変適した方法である。我々は以下の手順で ENTPD5 の MD シミュレーションを実施し得られたデータを解析した。

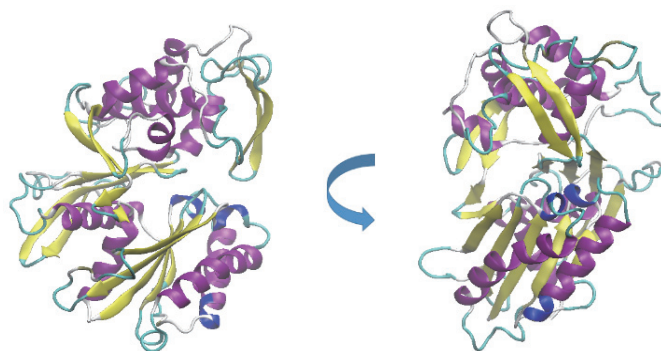


図2 ENTPD5 のホモロジーモデリング構造。リボンモデルで描画し、2次構造のヘリックス構造は紫色、シート構造は黄色で色分けしている。

3-1 モデル構築

ヒトの ENTPD5 の構造は実験的に解明されていない。ENTPD5 と相同性が高い構造 (PDBID: 5u7x)⁽⁸⁾ をテンプレートとしてホモロジーモデリングでヒトの ENTPD5 の構造を決定した。図2にホモロジーモデリングで得られた ENTPD5 の立体構造を示す。

3-2 計算方法

モデリングで決定したヒト ENTPD5 構造を適切に配置された水分子モデル TIP3P⁽⁹⁾ で満たされた直方体の中心付近に設置し、ENTPD5 構造と重なる水分子を排除した。さらに水分子を適切な数の塩化物イオン及びナトリウムイオンと交換して生理的イオン濃度(約 150mM)にした。この系を周期的境界条件に置き、タンパク質 (ENTPD5) 表面から各周期的境界面への距離が 1.5nm 以上となるように調整した(図3)。Amber力場パラメータをタンパク質の古典力場として用いた⁽¹⁰⁾。タンパク質分子中の化学結合には LINCS 法を適用した⁽¹¹⁾。水分子には SETTLE 法を適用した⁽¹²⁾。

長距離静電相互作用計算には、Particle Mesh Ewald (PME) 法を用いた⁽¹³⁾。MD シミュレーションの時間刻み幅は 2 fs とした。

初めにエネルギー最小化 MD シミュレーションを実行した。このエネルギー最小化実行後に定温 MD シミュレーション (310K) を実行した⁽¹⁴⁾。その後、定温定圧 MD シミュレーション (310K, 1 気圧) を実行した。その際、温度のコントロールは Nosé-Hoover 法⁽¹⁵⁾を用い Parrinello-Rahman 法を併用している⁽¹⁶⁾。この後にデータ取得用の定温定圧 MD シミュレーションを実行し、構造データを 10ps 毎に保存し解析した。

全ての MD シミュレーションは GROMACS⁽¹⁷⁾を用いて実施した。

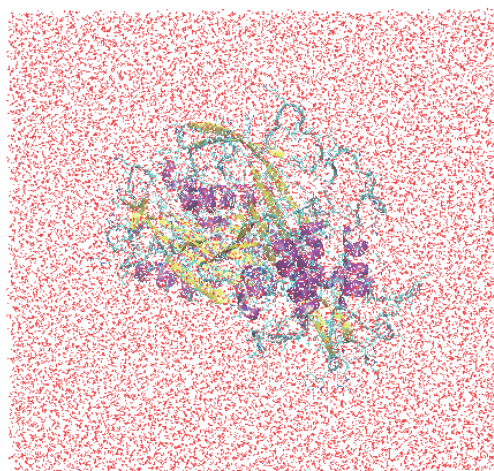


図3 ENTPD5 の MD シミュレーション系。赤色の分子は水分子を示している。

4. 解析結果

ENTPD5 の MD シミュレーションから得られたデータを用いて基礎的な解析を実施した結果を以下に示す。

4-1 RMSD 解析

MD シミュレーションデータの解析から得られた Root Mean Square Deviation (RMSD) を図 4 に示す。RMSD の基準構造として ENTPD5 の平均構造を用い、RMSD の算出にはタンパク質主鎖の C_{α} 原子のみを使用した。図 4 から ENTPD5 は基準構造から 0.2nm 程度を下限として上限は約 0.8nm に及ぶ 0.35nm 付近を中心とした大きな揺らぎを示すことが解る。

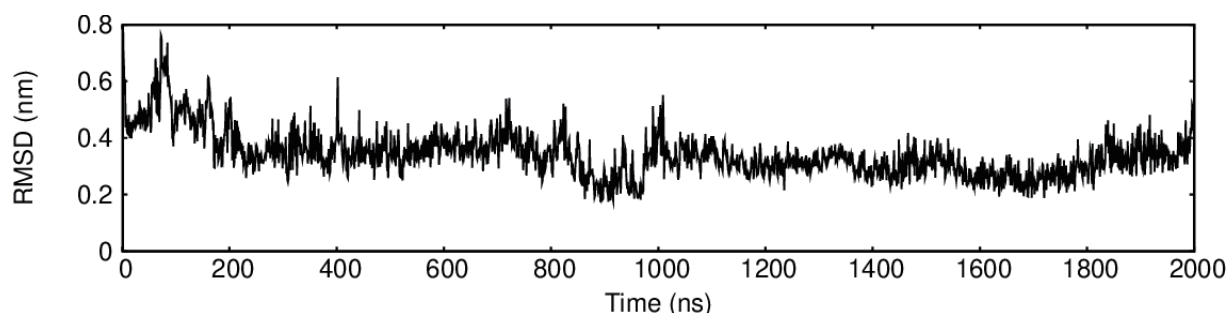


図4 ENTPD5 の RMSD 値の時間変化。横軸は MD シミュレーションの計算時間を、縦軸は RMSD 値を示している。

4-2 RMSF 解析

Root Mean Square Fluctuation (RMSF) は、タンパク質中の残基毎の揺らぎを評価する一般的な指標である。基準となる構造からの熱力学的な揺らぎはタンパク質の機能と構造を結びつける上で大変重要な知見の一つである。図 5 に示された RMSF から ENTPD5 には比較的大きな揺らぎを示す領域と、相対的に小さな揺らぎを示す領域が混在している事が解る。

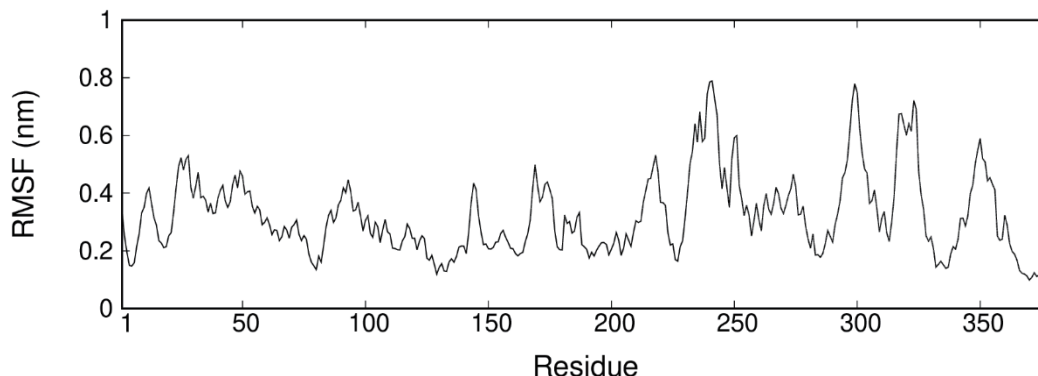


図5 MD シミュレーションデータの解析から得られた ENTPD5 の C_{α} 原子の RMSF 値。横軸は C_{α} 原子のアミノ酸残基番号を縦軸は平均位置からの C_{α} 原子のずれを示している。

4-3 PCA 解析

主成分解析 (Principal Component Analysis method : PCA) はタンパク質分子の長時間揺らぎを分子シミュレーション結果から抽出するために有用で広く用いられている。PCA は、分子シミュレーションから得られた平均構造からの揺らぎを固有ベクトルに分解することができる。大きな固有値に対応する固有ベクトルはタンパク質分子活性に重要な揺らぎに対応していると考えられる。従って寄与が大きな固有ベクトルを解析することで酵素機能に関わる重要な揺らぎが評価可能である。図6に MD シミュレーションで得られたデータから、ENTPD5 の C_{α} 原子座標を用いて計算した分散共分散行列の固有値から求めた寄与率分布を示す。ここで縦軸は寄与率、横軸は寄与率の大きな順から並べた番号を示している。図6からは最大の固有値の寄与率は 0.5 程度の大きさであり、例えば 1 番大きな固有値から 4 番目までに対応する固有ベクトルを用いて ENTPD5 の主鎖に関するおおよその運動性が評価出来る事を示している。

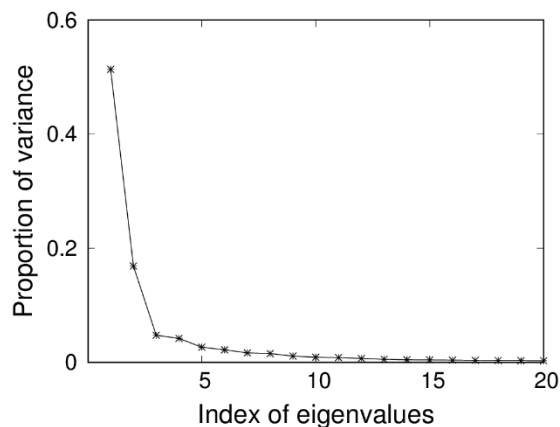


図6 ENTPD5 の C_{α} 原子の分散共分散行列固有値の寄与率分布。寄与率の一番大きなものから降順に 20 番目までを示している。

図7にENTPD5の構造変化に関するPCAを利用したMDシミュレーションデータの解析結果を示す。

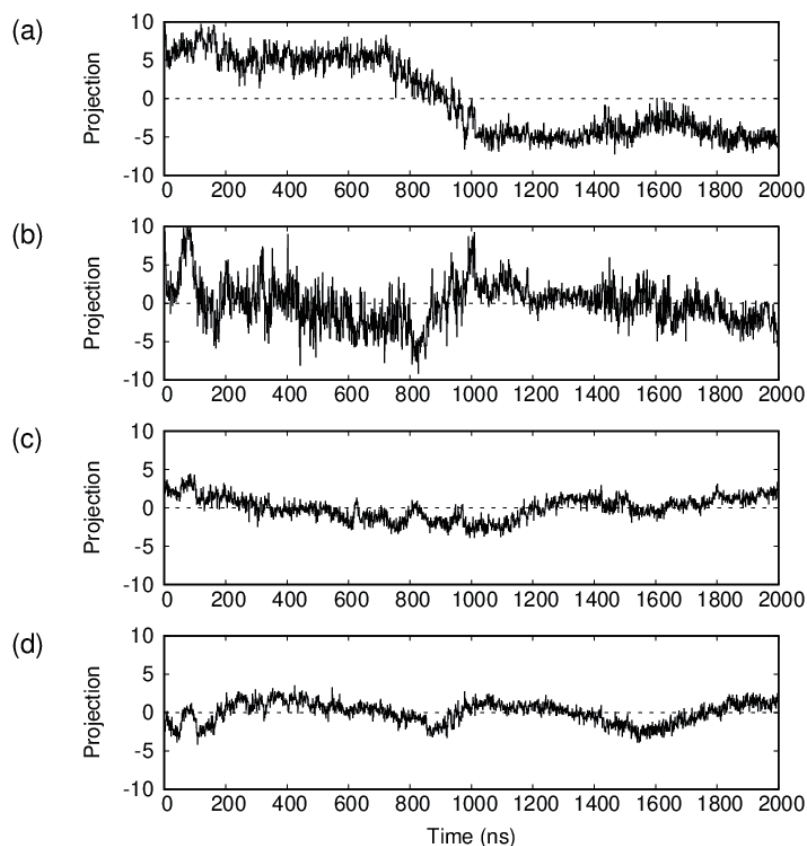


図7 MDシミュレーションデータに対する固有ベクトルの射影値。MDシミュレーションから得られた時系列データに規格化された(a)第1、(b)第2、(c)第3、(d)第4の固有ベクトルを射影した結果を示している。

図7の一番上の図(a)が最大の固有値を持つ第1固有ベクトルを用いた射影値に対応し以下、(b)第2、(c)第3、(d)第4固有ベクトルを用いた結果を示している。第1固有ベクトルでは、その射影値の時間変動からこの運動は最も大きな振幅を持ち2000ns以上の周期を持って変動している事が示唆される。また第2固有ベクトルの時間変動は第1固有ベクトルに比べて相対的に大きなノイズを伴っていることが解る。一方、第3及び第4固有ベクトルの振幅は第1及び第2固有ベクトルと比較して小さく、寄与率の結果とも一致している。

5. まとめ

近年、創薬の分野においてアロステリック創薬が注目を集めている。我々はアロステリック制御薬剤を効果的に探索する技術を確認する事を目指している。本報告で我々は、がんのアロステリック制御薬剤を探求する目的で、がんの糖代謝に関わるENTPD5の分子モデリングと分子動力学シミュレーションを実施し、そのデータ解析からENTPD5の基本的な構造揺らぎの特徴を示した。一方、ENTPD5の揺らぎを支配すると思われる大域的な揺らぎと局所的な揺らぎの関連性については現時点においては未知の部分が多く、今後NMRを用いた構造揺らぎの解析と併せた融合研究でその詳細を明らかにしてゆく予定である。さらに令和2年度からオール近大ポストコロナプロジェクトで構築したKindaiLibrary2.0を用いる事で計算と実験を融合して、本研究センターでアロステリック制御薬剤の探索をより一層加速させたいと考えている。

謝辞

近畿大学先端技術総合研究所及び生物理工学部に関わる方々全てに深く感謝申し上げます。この研究は松本和也研究所所長、梶山慎一郎生物理工学部長を初めとする先端技術総合研究所と生物理工学部に関わる皆様の多大なるご支援を頂き実施しています。

参考文献

- (1) Batool, M., Ahmad, B., Choi, S. (2019) A Structure-Based Drug Discovery Paradigm, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 2783.
- (2) Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144, 646-674.
- (3) Fang, M., Shen, Z., Huang, S., Zhao, L., Chen, S., Mak, T. W., Wang, X. (2010) The ER UDPase ENTPD5 Promotes Protein N-Glycosylation, the Warburg Effect, and Proliferation in the PTEN Pathway, *Cell*, 143, 711-724.
- (4) Li, L., Liang, Y., Kang, L., Liu, Y., Gao, S., Chen, S., Li, Y., You, W., Dong, Q., Hong, T., Yan, Z., Jin, S., Wang, T., Zhao, W., Mai, H., Huang, J., Han, X., Ji, Q., Song, Q., Yang, C., Zhao, S., Xu, X., Ye, Q. (2018) Transcriptional Regulation of the Warburg Effect in Cancer by SIX1, *Cancer Cell*, 33, 368-385.
- (5) Pathria, G., Scott, D. A., Feng, Y., Lee, J. S., Fujita, Y., Zhang, G., Sahu, A. D., Ruppin, E., Herlyn, M., Osterman, A. L., Ronai, Z. A. (2018) Targeting the Warburg effect via LDHA inhibition engages ATF4 signaling for cancer cell survival, *The EMBO J.*, 37, e99735.
- (6) Durst, M. A., Ratia, K., Lavie, A. (2019) Identifying small molecule probes of ENTPD5 through high throughput screening, *PLoS ONE*, 14, e0210305.
- (7) McCammon, J. A., Gelin, B. R., Karplus, M., Wolynes, P. G. (1976) The hinge-bending mode in lysozyme, *Nature*, 262, 325-326.
- (8) Summers, E. L., Cumming, M. H., Oulavallickal, T., Roberts, N. J., Arcus, V. L. (2017) Structures and kinetics for plant nucleoside triphosphate diphosphohydrolases support a domain motion catalytic mechanism, *Protein Sci.*, 26, 1627-1638.
- (9) Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, 79, 926.
- (10) Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J., Kollman, P. (2003) A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations, *J. Comput. Chem.*, 24, 1999-2012.

-
- (11) Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Fraaije, J. G. E M. (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.*, 18, 1463–1472.
- (12) Miyamoto, S., Kollman, P. A. (1992) Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models, *J. Comput. Chem.*, 13, 952–962.
- (13) Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L. G. (1995) A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103, 8577.
- (14) Ryckaert, J., Ciccotti, G., Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes, *J. Comput. Phys.*, 23, 327–341.
- (15) Nosé, S. (1984) A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods, *J. Chem. Phys.*, 81, 511.
- (16) Parrinello, M., Rahman, A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.*, 52, 7182.
- (17) Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, 4, 435-447.

-Research Note-

High Pressure Protein Research Center's Efforts to Explore Allosteric Regulators

Takuma Shiraki¹, Kazumasa Sakurai², Yasushige Yonezawa²

Abstract

Many cancer drugs competitively inhibit intracellular signaling pathway proteins, but due to the problem of drug resistance, there is a need for a different approach to cancer drug discovery. We are collaborating to establish a method to search for allosteric regulators that control the fluctuations of their target molecules using our method that combines NMR and computer science. As a model target molecule, we have performed molecular dynamics simulation calculations and basic data analysis of ENTPD5, which is one of the proteins related to the common metabolic state shown by cancer cells (cancer metabolism).

Keywords: protein, molecular dynamics simulation, allosteric drug discovery, cancer

¹ Department of Science and Technology on Food Safety, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

² High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan