

薬学研究科・創薬分子設計学研究室

1. 研究課題名

「タンパク質の立体構造に基づくシード・リード最適化および新規リガンド探索研究」

2. 研究メンバー

仲西 功	近畿大学大学院薬学研究科創薬分子設計学研究室・教授
中村 真也	近畿大学大学院薬学研究科創薬分子設計学研究室・助手
高平 和典	近畿大学大学院薬科学研究科創薬分子設計学研究室・修士課程1年生

3. 研究成果

糖尿病の特効薬としてインドやスリランカの伝統医学アーユルヴェーダでは、*salacia*属植物である*S. reticulata*や*S. oblonga*などが用いられている。これらの植物から、糖尿病治療薬acarboseやvogliboseに匹敵する強い α -グルコシダーゼ阻害活性を示し、チオ糖スルホニウム硫酸分子内塩構造を有するsalacinolやkotalanolが単離されている^{1,2}。両化合物をシードとした化合物展開が生命有機化学研究室において実施されているが、立体構造とエネルギー解析に基づきより論理的な医薬品設計を進めるために、当研究室ではこれらの化合物と α -グルコシダーゼとの複合体構造の解析に着手し、これらの知見からsalacinol¹に比べ10倍強い活性を持つ化合物を得ることに成功した³。 α -グルコシダーゼは、ヒトでは数種のサブタイプタンパク質の基質選択性の異なる触媒ドメインから構成されているため、それらを同時に阻害する薬物には、より高い抗糖尿病薬としての効果を期待できる。そのためホモロジーモデリングの手法を用いて、立体構造が未知である α -グルコシダーゼの構造を予測し、salacinol類縁体の結合様式を推定した。またさらなる高活性の化合物をデザインするため、高活性が報告された類縁体についても結合様式を推定した。

3.1. ラットの α -グルコシダーゼのホモロジーモデリング

現在、我々のグループでは、化合物の阻害活性の測定は、ラット小腸から得られた α -グルコシダーゼを用いて行われている。そのためラットによってヒトの α -グルコシダーゼへの阻害効果の評価を妥当に行えるかどうかを検証する必要がある。これまでに、ラットの α -グルコシダーゼの立体構造は報告されていないため、ホモロジーモデリングによってその構造を予測し、阻害剤の結合様式を検討した。

3.1-1. ヒト ntMGAM のホモロジーモデリングによる手法検証

ホモロジーモデリングにより立体構造予測を行うにあたり、その予測精度の検証を行う必要がある。そのため結晶構造が既知であるヒトのntMGAM (N-terminal Maltase glucoamylase) の立体構造をホモロジーモデリングによって予測できるかどうかを検証した。

ヒトntMGAMのアミノ酸配列(HSA:8972)をゲノムネット⁴から入手した。予測ツールにはSWISS-MODEL⁵を用いた。この際、立体構造の元となるテンプレート構造にはヒトntSI

(N-terminal Sucrase isomaltase, PDB-id:3LPP.B鎖)⁶ が採用された。得られた初期構造に対して、ヒトntMGAMとkotalanol複合体である (PDB-id: 3L4V) との重ね合わせを行い、ヒトntMGAMとkotalanolの結合モデルの初期構造を作成した。同時に水素結合に関与すると考えられる水分子も配置した。得られた初期構造に対して、kotalanolから周囲 10 Åについて構造の反発を緩和するために、MOE⁷を用いてMMFF94x力場⁸により構造最適化を行った。その後、InsightIIを用いてkotalanolの周囲 20 Åに水分子を水和させた構造を作成し、再度MOEで水素原子の位置のみを最適化した。今後、分子動力学計算を行うことを念頭に、以降の構造最適化計算にはCHARMM⁸を用いた。kotalanolの原子部分電荷にMulliken電荷を用い、それ以外の構造に関してはCHARMM電荷およびパラメータを用いた。構造最適化条件はSteepest Descent法で20000回、Conjugate Gradient法で20000回を最大回数とし、RMS Gradientが、0.01 kcal/(mol・Å)以下になるまで行った。kotalanolから 20 Åに関して構造最適化を行い、この構造から阻害剤の結合様式を検討した。結晶構造と比較したところ、kotalanolおよびその結合ポケットのアミノ酸 (周囲 4.5 Å) とのRMSD値は0.45 Åとなりほぼ変化していなかった。結合様式は図1のようになり、一部の水素結合が形成されていないものの、ほとんどの水素結合は保持されていることから、本予測手法を以後の計算に用いた。

3.1-2. ラット ntMGAM のホモロジーモデリング

ラットの ntMGAM のアミノ酸配列(RNO: 312272)をゲノムネットから入手した。このアミノ酸配列について、同様の手順でホモロジーモデリングおよび構造最適化を行った。得られた結合様式を図2に示す。阻害剤と強く相互作用をしていたアミノ酸残基のうち、重要な変化として、ヒトの Asp443 および Asp542 がラットではそれぞれ Glu437、Asn498 に変化している。(Asn498 要確認) 一部の水素結合の様式は変化しているが、基本的な置換基の役割は変化し

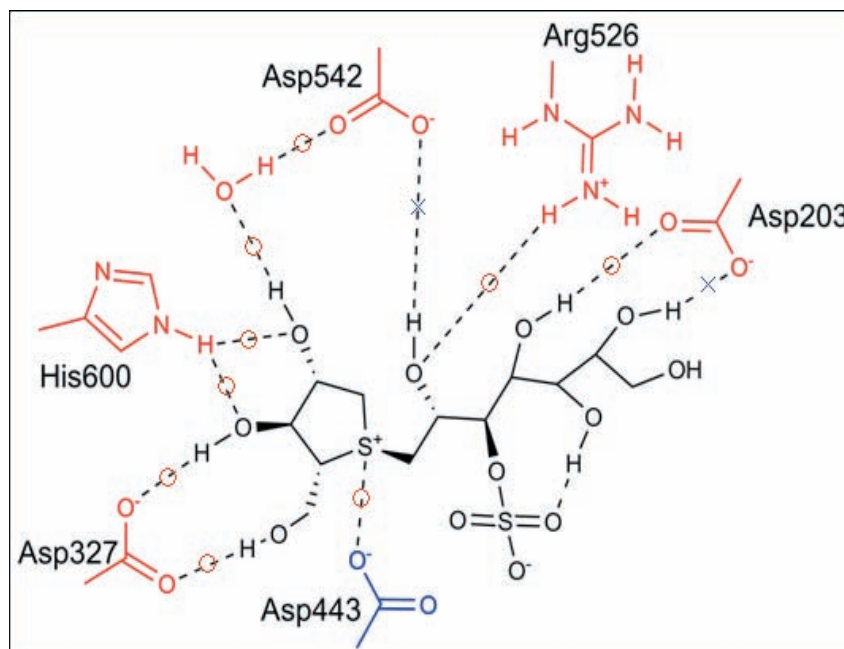


図1. ヒト ntMGAM 予測構造と kotalanol との結合様式 水素結合を破線で示し、結晶構造の様式を保っているものを○、結晶構造と異なっているものを×で示した。

ておらず、ラットを用いてもヒトの酵素阻害活性を十分評価できると考えられる。

3.1-3. ラット ntSI のホモロジーモデリング

ラットの ntSI のアミノ酸配列(RNO: 497756)をゲノムネットから入手した。このアミノ酸配列について、同様の手順でホモロジーモデリングおよび構造最適化を行った。得られた結合様式を図3に示す。結合ポケット内で水素結合にかかわるアミノ酸残基については、ヒトの ntMGAM および ntSI と変化はなかった。これらの結果からもラットによりヒトの酵素阻害活性を十分評価できることが示唆された。

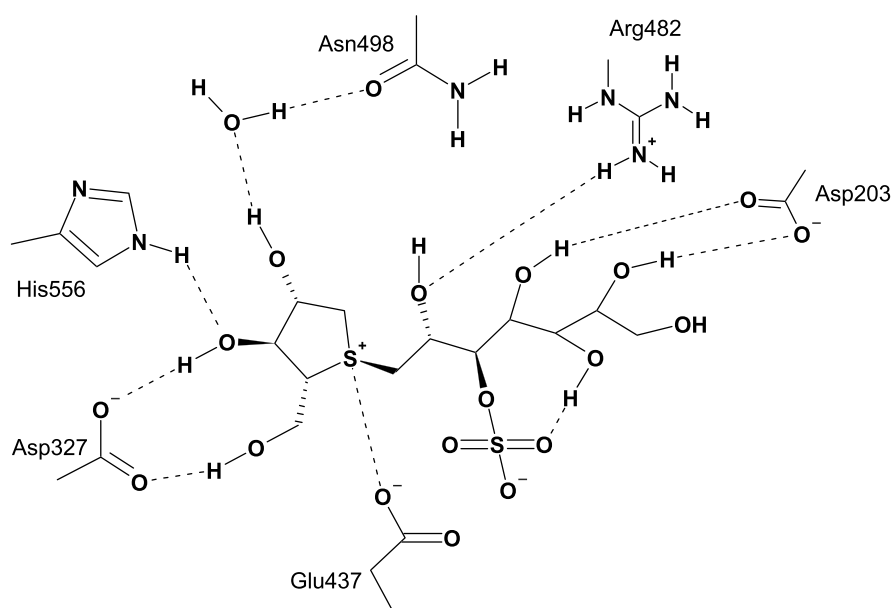


図2. ラット ntMGAM モデルと kotalanol の予測結合様式の模式図

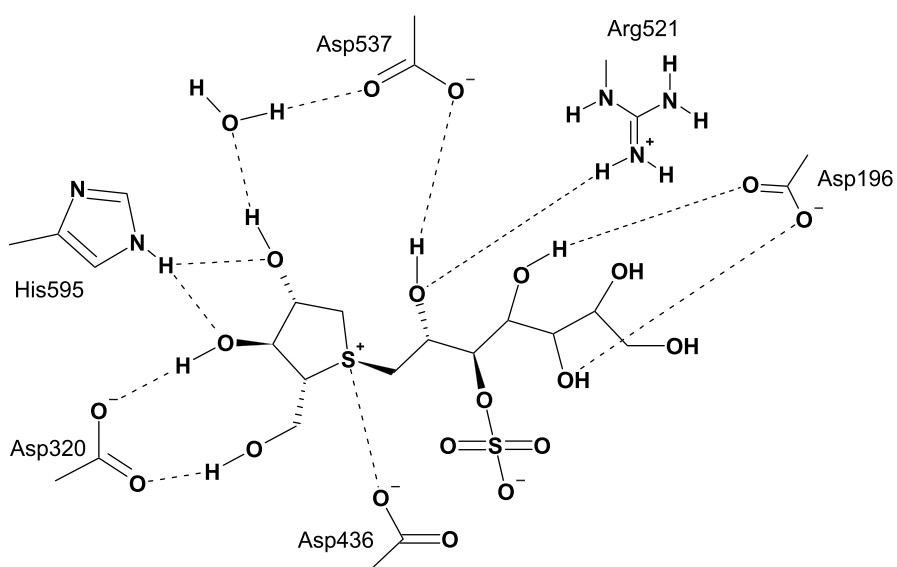


図3. ラット ntSI モデルと kotalanol の予測結合様式の模式図

3.2. ヒト ctMGAM のホモロジーモデリング

ヒトの α -グルコシダーゼは Maltase-Glucoamylase (MGAM) や Sucrase-Isomaltase (SI) などから構成されており、それぞれ N 末端側と C 末端側の二つの触媒ドメインを有する。そのため、複数種の酵素を同時に阻害する方がより効率的に治療効果を発揮できると考えられる。しかし、その立体構造に関しては ntMGAM、ntSI しか判明していない。そこで、別種 (C 末端側触媒ドメイン) の α -グルコシダーゼも考慮に入れたデザインのため、ラットのホモロジーモデリング研究と並行して、まずヒトの ctMGAM (C-terminal Maltase Glucoamylase) に関しても構造予測を試みた。

3.2-1. ヒト ntSI のホモロジーモデリングによる手法検証

ホモロジーモデリングにより立体構造予測を行うにあたり、その予測精度の検証を行う必要がある。そのため結晶構造が既知であるヒトの ntSI の立体構造をホモロジーモデリングによって予測できるかどうかを検証した。

予測ツールには MODELLER⁹ を用いた。この際、立体構造の元となるテンプレート構造にはヒト ntMGAM と kotalanol 複合体 (PDB-id:3L4V)¹⁰ を採用した。得られた複合体の初期構造に対して、CHARMM を用いて構造最適化を行った。この際、kotalanol の原子部分電荷に Mulliken 電荷を用い、それ以外の構造に関しては CHARMM 電荷およびパラメータを用いた。構造最適化条件は Steepest Descent 法で 20000 回、Conjugate Gradient 法で 20000 回を最大回数とし、RMS Gradient が、0.01 kcal/(mol \cdot Å) 以下になるまで行った。この過程においては、まず水素原子以外を固定して行い、次に、タンパク質の主鎖のみを固定して行い、最後に全ての固定を解除して 3 段階で最適化を行った。

予測された結合様式を図 4 と図 5 に示す。予測構造では分子内水素結合を形成しており、Asp231 と水素結合する水酸基の位置が異なっているが、これらはほとんど溶媒に露出している部分であり自由度の高い部分である。ポケット内では相互作用的にはほぼ変化が無いため、相互作用の予測としては問題なく行えており、結晶構造をよく再現できていると考えられる。

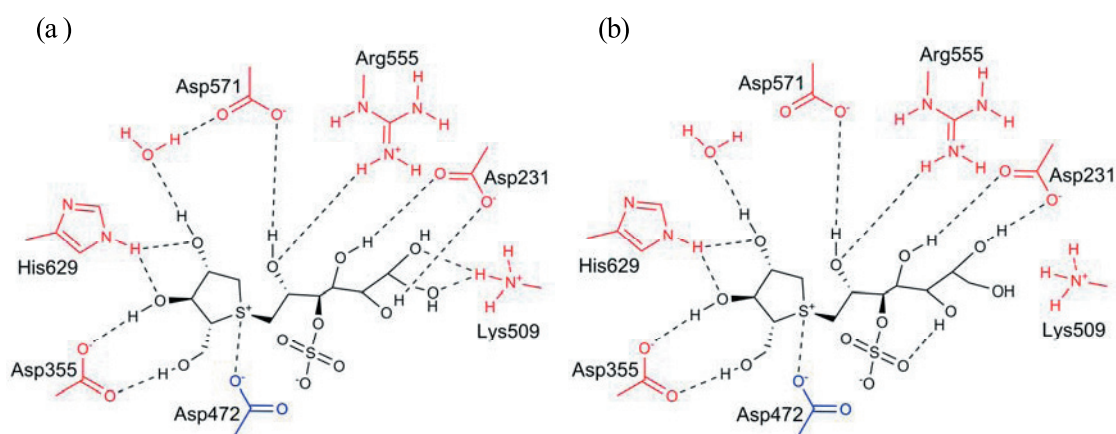


図 4. ntSI と kotalanol との結合様式の模式図 (a) 結晶構造、(b) 予測構造

3.2-2. ヒト ctMGAM のホモロジーモデリング

ヒト ctMGAM のアミノ酸配列(HSA:8972)をゲノムネットから入手し、ntMGAM をテンプレート構造として、同様の条件でモデリングおよび構造最適化を行った。得られた kotalanol の結合様式を図6に示す。ntMGAM および ntSI とほぼ同様の水素結合様式が得られたが、これらの結合様式の相違点について図7に示した。

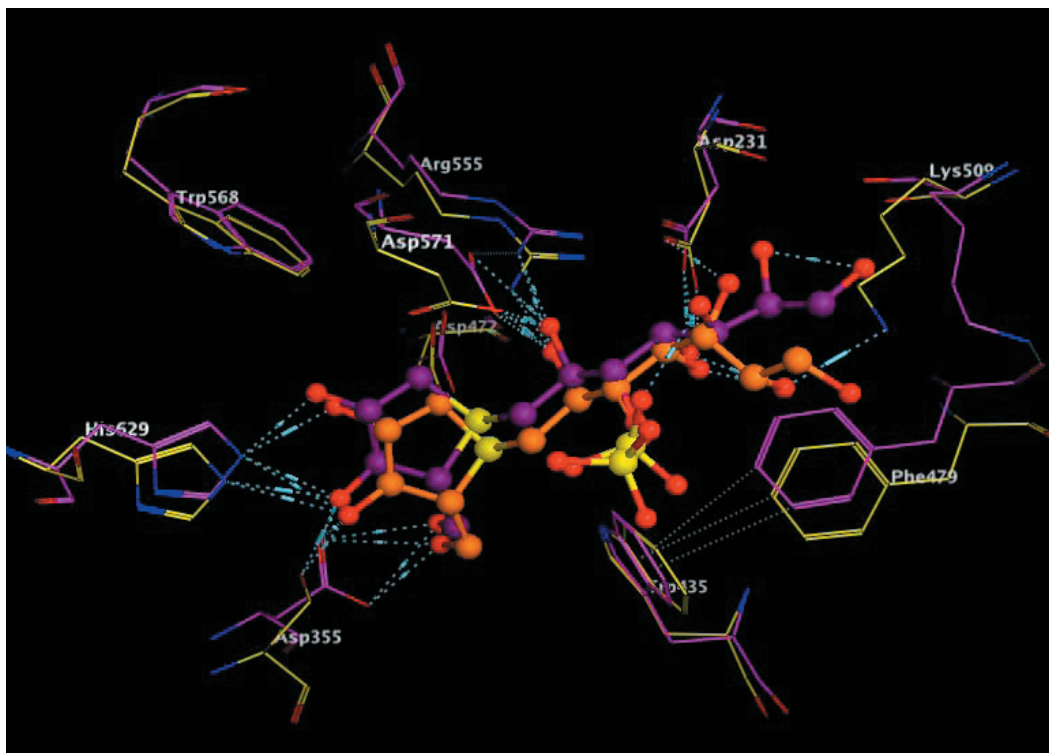


図5. ntSI-kotalanol 複合体の結晶構造と予測構造の重ね合わせ
イエローとオレンジ：結晶構造のタンパク質と kotalanol、ピンクとマゼンタ：予測構造のタンパク質と kotalanol

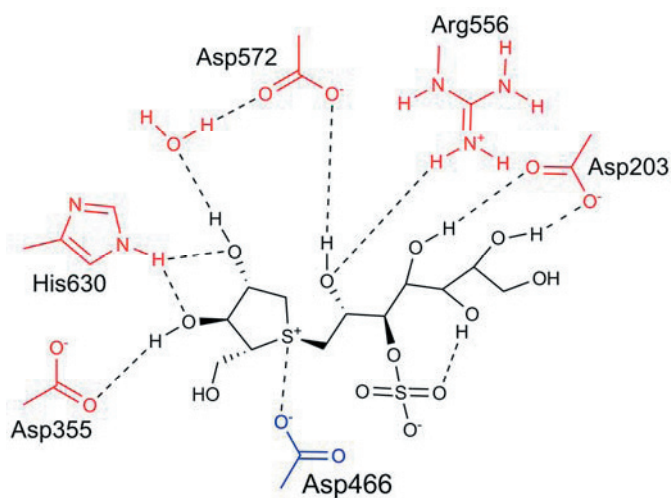


図6. 予測された ctMGAM と kotalanol の結合様式の模式図

アミノ酸残基の違いから、ctMGAMは結合ポケットを形成するアミノ酸残基に嵩高いものが多く、ntMGAMよりむしろntSIの嵩高さに近いと考えられる。ntSIに関しては、この嵩高さによって α -1,6結合に特異性を持つと考えられている⁶。特に硫酸基周辺に関しては、ctMGAMではPhe606の存在のため、ntSIやntMGAMよりも、硫酸基との疎水性の相互作用が強いと考えられた。このことから硫酸基部を疎水性置換基で置き換えることが活性向上につながったと考えられる。

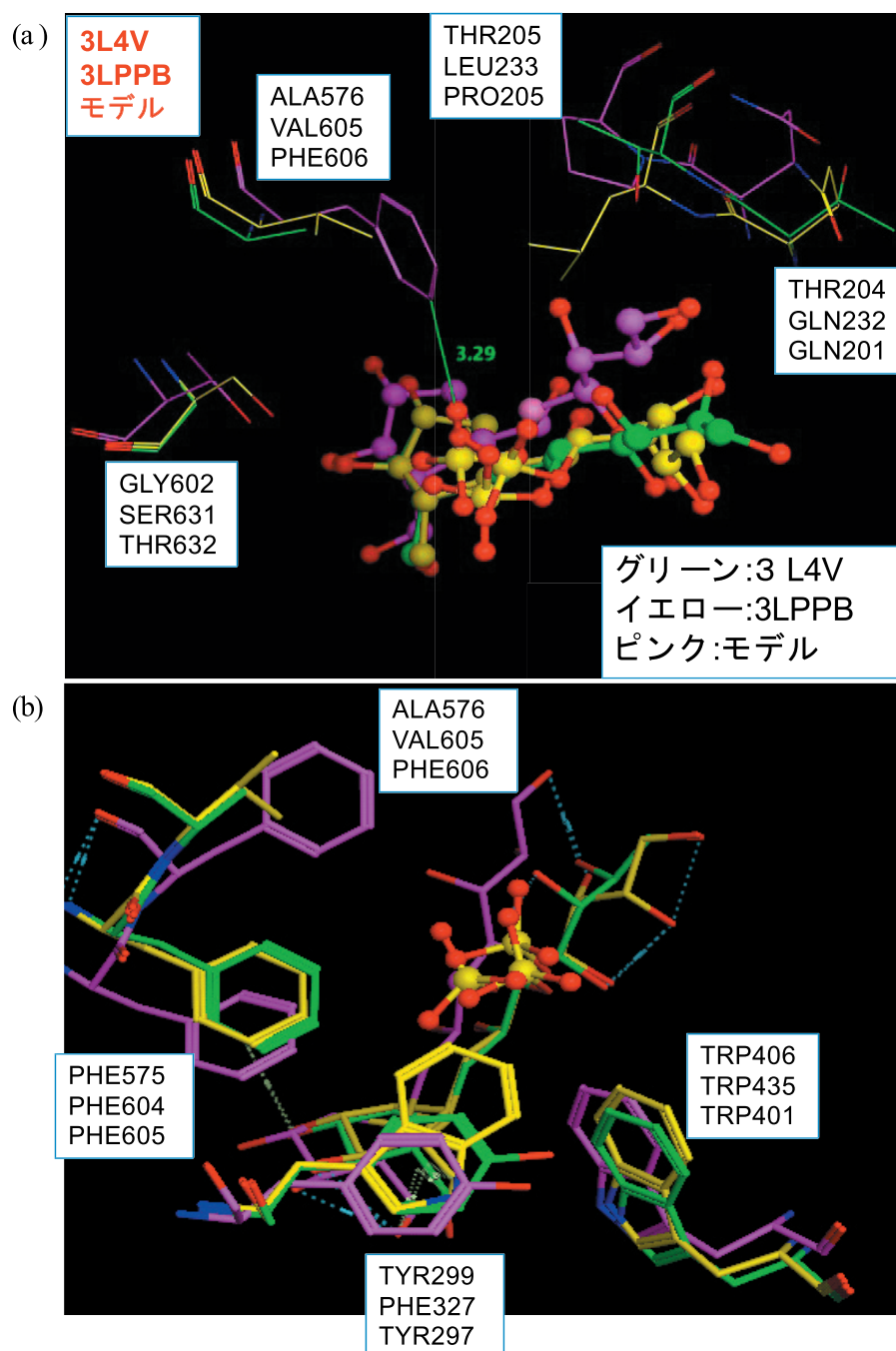


図7. 結合部位のアミノ酸残基の比較 (a) 全体図、(b)硫酸基結合部周辺
グリーン: ntMGAM(3L4V)、イエロー: ntSI(3LPP-B 鎖)、ピンク: ctMGAM 予測構造

3.3. salacinol 類縁体とグルコシダーゼとのドッキング

さらなる高活性の化合物をデザインするため、今回新規にデザインされた化合物群に対して結合様式を確認するためにドッキングシミュレーションを実施した。今回は既に立体構造が既知である ntMGAM と ntSI および、今回ホモロジーモデリングにより作成した ctMGAM に対して、salacinol を含む図8に示す各化合物のドッキングを行った。

3.3.1 ntMGAM との結合様式

タンパク質構造として結晶構造 (PDBcode:3L4Z)¹⁰を構造最適化した構造を使用した。構造最適化計算にはCHARMMを用いた。まず、水素原子以外を固定して行い、次に主鎖のみを固定して行い、最後に、全ての固定を解除して行った。いずれも、Steepest Descent法 20000回、Conjugate Gradient法 20000回を最大回数とし、RMS Gradientが、0.01 kcal/(mol・Å)以下になるまで行った。またドッキング計算にはMOE-Dock⁷を用いた。この際得られた候補構造の上位100個をMM/GBMV法¹¹にて最適化し、さらにMM/GBMVスコアの上位50個について再度化合物の構造のみを構造最適化した。この過程は、スルホニウムイオンを含む環構造の結合長や結合角がドッキング計算において、構造のパラメータ欠損の問題から歪んだものになってしまったものを正常に戻すという過程である。その相互作用を再度算出し、ドッキングスコアとして用いた。

精度検証は、salacinol のドッキングにより行った。ドッキングスコアが2位の結合様式が結晶構造を最も再現するもの (RMSD 値 0.5 Å) であったため (図9)、以降の検討では上位3構造を検討の対象とした。メチル化合物は、salacinol とほぼ同様の結合様式が得られたが、ベンジル化合物に関しては、想定していた結合様式とは異なり硫酸基結合部位にベンゼン環が位置せず、側鎖の4位水酸基方向のポケットにベンゼン環が疎水的な相互作用により位置する結合様式が得られた (図10)。またエチル化合物についてもエチル基が側鎖方向に位置していた。

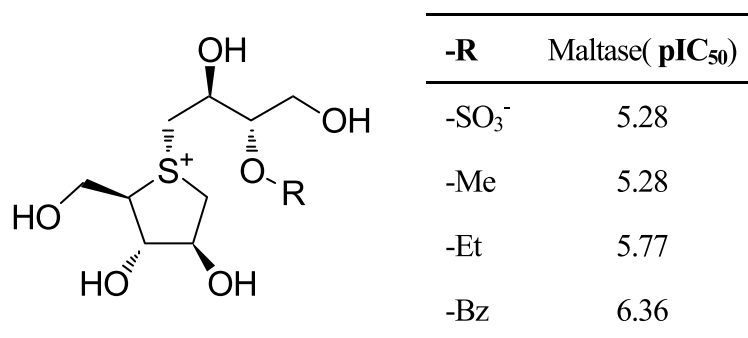


図8. salacinol およびその類縁体と阻害活性値

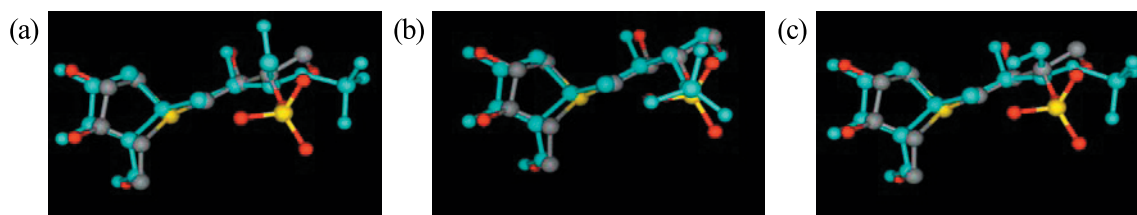


図9. salacinol のドッキング構造 (a) スコア1位、(b) スコア2位、(c) スコア3位
原子別色：結晶構造、シアン：ドッキング構造

3.3.2 ntSI との結合様式

タンパク質は結晶構造 (PDBcode:3LPP)⁶を計算に用い、それ以外は同様に計算を行った。ntMGAMと同様にメチル化合物は、salacinolとほぼ同様の結合様式が得られ、ベンジル化合物については、硫酸基結合部位周辺にベンゼン環が位置する図11のような結合様式が得られた。このことから、ベンジル基の結合は、主に疎水性相互作用によるものであり、硫酸基方向へも側鎖方向へも位置できる可能性があることが示唆された。エチル化合物もベンジル化合物と同様の傾向を示し、硫酸基結合部位にエチル基が位置していた。

3.3.3 ctMGAM との結合様式

タンパク質はホモロジーモデリングにより予測した構造を用いた。ドッキングの条件は同様に行った。いずれの化合物においても他のグルコシダーゼと同様の結合様式を保っていたが、salacinolのドッキング結果の候補やベンジル化合物の結合候補構造にも、硫酸基結合部位からさらに外側の壁面に結合した結合様式(図12)が得られた。これはctMGAMで疎水性・芳香族性の高いアミノ酸残基がポケットで多くなっており、そのポケット形状に最も沿う形で結合が得られたものと推測される

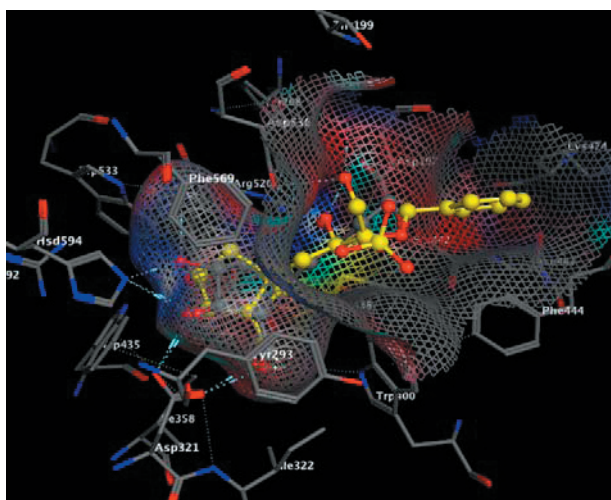


図10. ntMGAMにおける salacinol とベンジル化合物の結合様式の比較

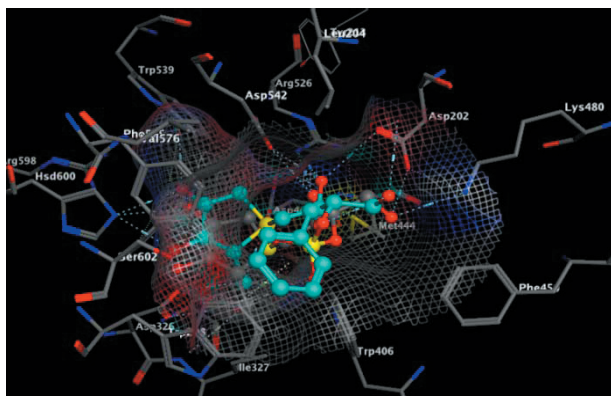


図11. ntMGAMにおける salacinol とベンジル化合物の結合様式の比較
イエロー: salacinol、シアン: ベンジル化合物

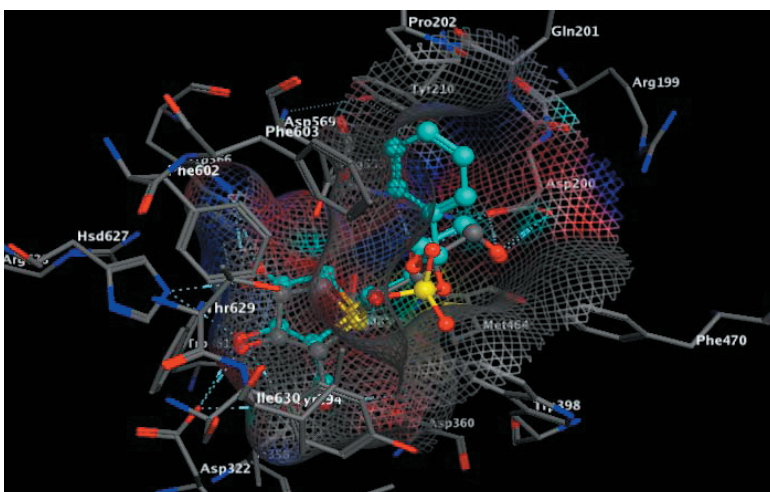


図1 2. ctMGAMにおける salacinol とベンジル化合物の結合様式の比較
 イエロー：ntSI 結合時の salacinol の結合位置、シアン：ベンジル化合物

引用文献

- 1) Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G, Muraoka O. : *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8367-8370 (1997).
- 2) Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H. : *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1339-1340 (1998).
- 3) Tanabe G, Otani T., Cong W., Minematsu T., Ninomiya K., Yoshikawa M., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 3159-3162 (2011).
- 4) GenomeNet: <http://www.genome.jp/ja/>
- 5) Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T., *Bioinformatics*, **2**, 195-201 (2006).
- 6) Sim L., Willemsma C., Mohan S., Naim H.Y., Pinto, B.M., Rose, D.R. *J. Biol. Chem.* **285**: 17763-17770 (2010).
- 7) MOE ver 2010.10, Chemical Computing Group, Montreal, Canada
- 8) Halgran T. A.: *J. Comput. Chem.* **17**, 587-615 (1996).
- 9) Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M., *J. Comp. Chem.*, **4**, 187-217 (1982).
- 10) Fiser A., Sali A., *Methods in Enzymology* **374**, 461-491 (2003).
- 11) Sim, L., Jayakanthan, K., Mohan, S., Nasi, R., Johnston, B.D., Pinto, B.M., Rose, D.R. *Biochemistry* **49**, 443-451 (2010).
- 12) Labute P. *J. Comput. Chem.* **29**, 1693-1698 (2008).