

4P080

分子シミュレーションによる芳香族炭化水素受容体への リガンドの安定結合配置の探索

(豊橋技術科学大学大学院¹、理化学研究所計算科学研究機構²、東芝研究開発センター³)
村田享士郎¹、宮城慧¹、佐篠和哉¹、伊藤聡²、石原-菅野美津子³、栗田典之¹

Molecular simulations for searching stable binding-site of various ligands into AhR protein

(Toyohashi University of Technology¹, RIKEN AICS², TOSHIBA R&D Center³)
Kyoshiro Murata¹, Satoshi Miyagi¹, Kazuya Sashino¹, Satoshi Ito², Mitsuko Ishihara-Sugano³,
and Noriyuki Kurita¹

【はじめに】

芳香族炭化水素受容体 (AhR : Aryl hydrocarbon receptor) は、リガンド依存性転写因子であり、外来異物や体内に存在する様々なリガンドを結合し、その情報を核に伝える。最近の研究により、AhR は免疫細胞の分化や薬物代謝など様々な機構に関与している事が明らかになっている[1]。AhR に結合するリガンドには、Fig.1 に示す外来性のダイオキシン TCDD、及び FICZ(6-formylindolo[3,2-b]carbazole)、ITE(2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester)などの生体内に存在する内因性のものがある。外来性リガンドは、毒性発現に関与する事が知られているが、内因性リガンドが関与する細胞の分化・再生機構及び免疫機構については未解明な部分が多い。これらを解明するには、AhR の立体構造及び様々なリガンドとの特異的相互作用を、原子・電子レベルで解明することが重要である。

我々は、これまでに、マウス AhR の LBD (Ligand binding domain)の構造、及び LBD に TCDD、 β -NF (β -Naphthoflavone)、FICZ、ITE が結合した 4 種類の複合体の水中での安定構造を、分子モデリング手法と古典分子力場法を用いて求めた。さらに、LBD とリガンド間の相互作用の強さを、Ab initio fragment molecular orbital (FMO)法[2]を用いて解析し、生化学実験で求めた各リガンドの AhR 転写反応への影響を、計算結果を基に電子レベルで説明しようとした[3]。本研究では、これまでに多くの実験研究が行われているラット AhR (以下 rAhR)へのリガンドの結合位置をより広く探索し、rAhR とリガンド間の特異的相互作用を明らかにした。

【計算手法】

本研究では、リガンドとして Figure 1 に示す 4 種類の化合物を採用し、rAhR の LBD とリガンド間の特異的相互作用を電子レベルで解析した。rAhR の LBD の立体構造は、アミノ酸並列情報を基に、タンパク質構造予測プログラム MODELLER を用い予測した。その際、鋳型構造として HIF-2 α (hypoxia inducible factors-2 α)と人工リガンドが結合した PDB 構造(PDB ID: 3H82)を用い、人工リガンドを消去した構造に、タンパク質リガンドドッキングプログラム Autodock を用い、4 種類のリガンドをドッキングし、リガンドの安定結合位置を広範囲に探索した。さらに、幾つかの rAhR+リガンド複合体の周囲に 8 Å に溶媒水を付加し、複合体の水和構造を古典分子動力学計算プログラム AMBER9 を用い最適化した。最後に、FMO 法を用い、rAhR とリガンド間の特異的相互作用を、電子レベルで解析した。

【結果と考察】

Autodock を用い、rAhR に TCDD をドッキングした結果を Fig. 2a に示す。生成した 256 個の候補構造は、TCDD がリガンドポケット内に入った構造(2 ケース)、ポケットの入り口付近に結合した構造、rAhR 外側の α -helix あるいは β -sheet 付近に結合した構造の 5 種類に分類できる。これらを水中で最適化した構造のエネルギーを FMO 計算で求め、最安定構造を決定した結果を Fig. 2b

に示す。その構造の中で、TCDD がリガンドポケット内に入った構造が最安定になり、今回の計算手法の妥当性が検証できた。

さらに、得られた構造の妥当性を検証するため、Fig. 2b の構造を従来の結果と比較した。Mottoらの研究[4]では、rAhR と TCDD の結合に重要な 7 つのアミノ酸が明らかになっている。今回求めた rAhR+TCDD の最安定構造に対し、rAhR の各アミノ酸と TCDD 間の相互作用エネルギー (I.E.) を、FMO 法を用いて計算した結果、上記の 7 つのアミノ酸が TCDD と強い引力相互作用をしており、今回求めた構造の妥当性が確認できた。また、アミノ酸置換の実験[4]で、重要とされた他のアミノ酸についても、今回の計算で、TCDD と強く相互作用することが明らかになり、今回の一連の計算手法の妥当性が検証できた。

そこで、同じ計算手法を用い、rAhR に他の 3 種類のリガンドをドッキングし、rAhR との相互作用を調べた。まず、rAhR とリガンド間の結合の強さを見積るため、結合エネルギーを計算した。その値は、30.8 (TCDD)、38.0 (β -NF)、51.0 (FICZ)、55.8 kcal/mol (ITE) であり、この結果は TCDD と FICZ 及び ITE の結合エネルギーの大小関係に関しては、従来の計算結果[5]と定性的に一致する。更に、rAhR とリガンド間の特異的相互作用を明らかにするため、rAhR の各アミノ酸とリガンド間の I.E. を FMO 計算により求めた。その結果、rAhR の Gln381 は、4 種類のリガンド全てと強く引力相互作用し、特に FICZ との相互作用が強い (-23 kcal/mol) ことが明らかになった。また、Tyr320 は TCDD 及び ITE とのみ強く相互作用し、特に ITE と強く (-20 kcal/mol) 相互作用する。従って、FICZ 及び ITE と rAhR 間の結合エネルギーが大きくなる主な原因は、Gln381 と FICZ、及び Tyr320 と ITE 間の特異的結合であることが、今回の計算で明らかになった。詳細は、当日のポスターで発表する。

【参考文献】

- [1] E. A. Stevens, *et al.*, *Nature*, 2008, 453, 46.
- [2] K. Kitaura, *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 2001, 336, 163.
- [3] K. Sashino, *et al.*, *CBI/JSBi2011*, 2011, Kobe, Japan.
- [4] I. Motto, *et al.*, *J. Chem. Inf. Model*, 2011, 51, 2868.
- [5] H. Bisson, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 5635.

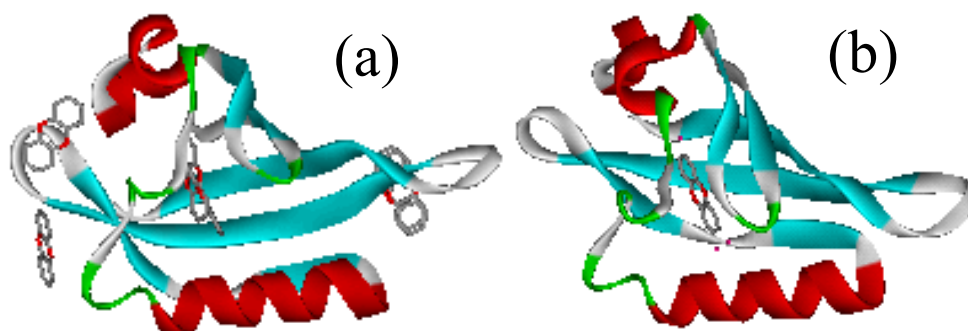
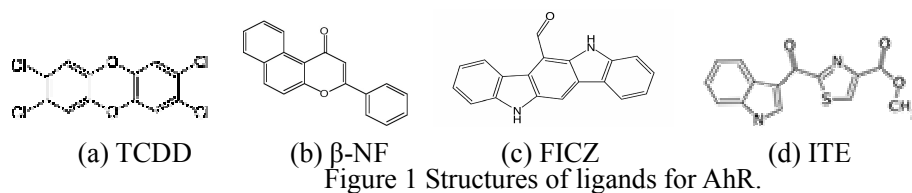


Figure 2 (a) Various binding-sites of TCDD to LBD of rAhR produced by Autodock, (b) most stable structure of solvated rAhR+TCDD optimized by AMBER9.