

4P082

がん細胞受容体に特異的に結合する新規ペプチドの提案とその結合特性： リガンドドッキング及びフラグメント分子軌道計算による解析

○水島達朗¹、川野裕章¹、霞知世¹、小林浩²、栗田典之¹

(¹豊橋技術科学大学、²奈良県立医科大学)

A proposal of new peptide inhibitor binding to the cancer cell receptor and the analysis of its binding properties to the receptor by ligand-docking and fragment molecular orbital calculations

○T. Mizushima¹, H. Kawano¹, T. Kasumi¹, H. Kobayashi², N. Kurita¹

(¹Toyohashi University of Technology, ²Nara Medical University)

【はじめに】

がん細胞は様々なタンパク質分解酵素を産生し、細胞周辺組織を分解・浸潤し、血管に進入して血管内を移動し、標的臓器の血管内皮細胞に接着・増殖し、転移巣を形成する。従って、がん転移を抑制するには、がん浸潤を抑制することが効果的である。近年の生理医学実験[1]により、がん浸潤には urokinase-type plasminogen activator (uPA) という酵素の作用が重要であることが明らかになった。がん細胞の表面には、がん細胞受容体である uPAR (uPA receptor) が存在し、この uPAR に uPA が結合することにより、がん浸潤が引き起こされる。従って、uPAR と uPA の結合を阻害できれば、がん浸潤は抑制できると考えられる。実験[2]により、uPA の ATF (amino-terminal fragment) 部位が uPAR と結合し、特に、ATF 中の 19 から 31 番目のアミノ酸が、uPAR と uPA の結合に重要であることが明らかになっている。

我々は、分子シミュレーションを用いて、uPAR と uPA 間の特異的相互作用を原子・電子レベルで解析し、上記のアミノ酸以外で uPA の正荷電のアミノ酸 Lys46 と Lys61 が結合に重要であることを明らかにした[3]。それらは uPAR のリガンド結合ポケットの上部に存在する負荷電の Glu33、Glu34、Glu36 と強く相互作用する。Figure 1 に示すように、uPAR のポケットの周囲には、負荷電のアミノ酸である Glu が多く存在し、Glu33、Glu34、Glu36 の反対側に、Glu132、Glu134、Glu135 が存在している。これらのポケットの両側に存在する荷電アミノ酸の Glu に強く結合するペプチドを提案できれば、uPAR のポケットを塞ぎ、uPAR と uPA の結合を阻害できると考えられる。

我々はこれまでに、分子シミュレーションを用いて、uPAR のポケットを塞ぐことが可能なペプチドを提案した[4]。本研究では、これらのペプチドを基に、アミノ酸置換を行ない、錠剤として生成可能な低分子ペプチドを新たに提案し、それらと uPAR 間の結合特性を、高精度に解析した。

【計算手順】

本研究では、uPAR の初期構造として欠損部位が最小である X 線構造(PDB ID: 3BT1)を採用し、ホモロジーモデリングを用いて uPAR の欠損部位を補い、uPAR の初期構造を作成し、古典分子力学(MM)計算により、uPAR の水中での安定構造を決定した。次に、Lys を 2 個含む[Gly-Lys-(Gly)*n*-Lys-Gly](*n*=1~6)のアミノ酸配列を持つペプチド(KGn)を提案

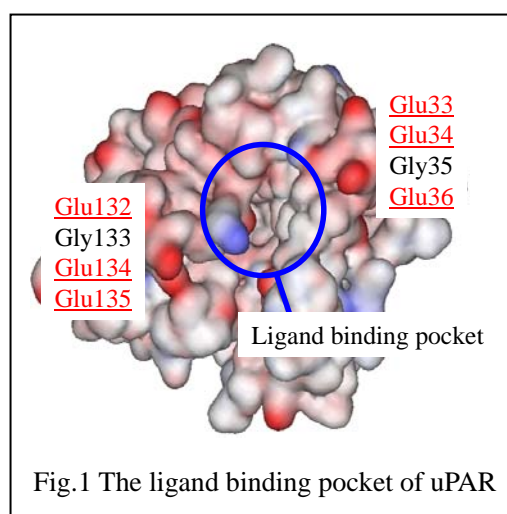


Fig.1 The ligand binding pocket of uPAR

し、分子軌道計算プログラム Gaussian09 の MP2/6-31G(d,p)計算により安定構造を求め、電荷パラメータを決定した。そして、リガンドドッキングプログラム AutoDock4.2 を用いて、uPAR にペプチドをドッキングし、uPAR とペプチドの複合体の初期構造を作成し、MM 計算により水中での安定構造を決定した。さらに、第一原理フラグメント分子軌道(FMO)計算により、uPAR とペプチド間の結合特性を電子レベルで解析し、がん転移抑制剤としての可能性を検討した。

【計算結果と考察】

ペプチドが uPAR のリガンドポケットを塞ぐためには、25.0~37.0 Å の長さが必要である。ペプチド KGn の KG1~KG6 の長さを調べ、n が 3 以上であれば 25.0 Å 以上の長さが確保できることが明らかになった。そこで、KG3~KG6 のペプチドを uPAR にドッキングし、FMO 法の MP2/6-31G 計算を用いて、uPAR とペプチド間の結合エネルギーを求めた。その結果、Table 1 に示すように、KG5 が uPAR と最も強く結合することが明らかになった。さらに、uPAR と KG5 の各アミノ酸間の相互作用エネルギーを解析した結果、KG5 は uPAR のリガンドポケットを挟んで対称の位置に存在する Glu36、Glu134、Glu135 と強く引力相互作用することがわかった。従って、KG5 は uPAR のこれら 3 つのアミノ酸と結合することで、uPAR のリガンドポケットを塞ぎ、uPAR と uPA の結合を阻害する可能性があると考えられる。

Table 1 Binding energies (B.E.) (kcal/mol) between uPAR and peptide

Structure	B.E.
uPAR + KG3	257.7
uPAR + KG4	294.2
uPAR + KG5	301.9
uPAR + KG6	291.2
uPAR + KG5-Glu	300.1
uPAR + KG5-Asp	242.7

しかし、KG5 は両端の Lys しか uPAR と結合しておらず、中央部の 5 つの Glu が uPAR のどのアミノ酸とも結合していない。また、KG5 は全体で+2 の電荷を有しており、KG5 が人体に入った際にカウンターイオンが付加し、uPAR に特異的に結合できない可能性がある。また、人体に電荷を有するものを与えることは好ましくないと考えられる。そこで、ペプチドの中央部の結合の問題を改善するため、KG5 の中央の Gly を負電荷アミノ酸 Glu、及び Asp に置換したペプチド (KG5-Glu、KG5-Asp)を作成し、KG5 と同様の計算を行い、uPAR との結合エネルギーを求めた。Table 1 に示すように、uPAR と KG5-Glu 間の結合エネルギーは、uPAR と KG5 間の結合エネルギーとほぼ同等になった。また、置換した Glu 及び Asp は、uPAR の Lys139 と強く引力相互作用した。従って、KG5 の中央部の結合の問題点は、中央の Gly を負電荷アミノ酸に置換することで改善できると考えられる。さらに、KG5 の+2 電荷の問題を改善するため、KG5 の中央部の 5 つの Gly 中の 2 個を負電荷アミノ酸に置換し、ペプチド全体の電荷を 0 にしたペプチドを新たに作成し、uPAR とペプチド間の結合エネルギーを求めた。こちらの計算結果、及び uPAR とペプチド間の結合特性に関しては、当日のポスターで発表する。

【参考文献】

- [1] A.E. Baker, *et al.*, *J. Cancer*, 39, 981(2003).
- [2] R. D. GmbH, *et al.*, WO98/46731 (1998).
- [3] S. Tsuji, *et al.*, *J. Mol. Graph. Model.*, 29, 975(2011); T. Kasumi, *et al.*, *Mol. Simu.* (2013) in press.
- [4] T. Kasumi, *et al.*, *J. Phys.*, 433, 012034 (2013).