

2F11

テトラエチレングリコール修飾による DNA 四重鎖の安定化機構の解明

(甲南大 FIBER¹, 神戸大院システム情報学², 東工大生命理工³, 甲南大 FIRST⁴) ○大山達也¹, 建石寿枝¹, 田中成典², 村岡貴博³, 金原数³, 杉本直己^{1,4}

Investigation of stabilizing mechanism for G-quadruplexes by tetraethylene glycol modification

(FIBER, Konan Univ.¹, Grad. Sch. Sys. Inform., Kobe Univ.², Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Tech.³, FIRST, Konan Univ.⁴) ○Tatsuya Ohyama¹, Hisae Tateishi-Karimata¹, Shigenori Tanaka², Takahiro Muraoka³, Kazushi Kinbara³, and Naoki Sugimoto^{1,4}

【序】

DNA は溶媒環境や配列により二重らせん構造以外にも、i-motif やヘアピン、四重鎖などの非標準構造を形成することが近年報告されている。なかでも、DNA 四重鎖はテロメアやがん遺伝子のプロモータ領域などのグアニンに富んだ配列において形成されやすく、四重鎖形成が転写や逆転写、翻訳反応、テロメアーゼ伸長反応を阻害する。そのため、四重鎖の形成を制御する技術を開発し、がんなどの治療薬の開発への応用が期待されている[1-4]。

我々はグアニン四重鎖の構造を安定化させるため、アンチパラレル型の DNA 四重鎖のループ領域のチミン塩基にテトラエチレングリコール (TEG) を付加した DNA 四重鎖を設計した (Figures 1a and 1b)[5]。この DNA 四重鎖の熱力学的安定性を測定した結果、側面にあるループ領域のチミン塩基 (Figure 1a の T₄) に TEG を導入した DNA 四重鎖は安定性が大幅に向上した。一方、中央のループ領域 (Figure 1a の T₇) に TEG を導入した DNA 四重鎖は、通常の DNA 四重鎖と変わらない結果が得られた。本研究では、TEG が DNA 四重鎖の熱力学的安定性に与える影響や TEG の位置による安定化の違いを解明するため、分子動力学 (MD) 計算とフラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いて研究を行った。

【方法】

実験で用いたアンチパラレル型の DNA 四重鎖は Protein Data Bank から入手し、これを TEG がいない状態の DNA 四重鎖構造 (Q1) の初期構造とした。また、Q1 の 4 番目および 7 番目のチミンのメチル基を TEG で修飾し、Q1-X₄、Q1-X₇ の構造を作製した。これらの構造の周囲に水分子とカウンターイオンを付加し、298 K で 35 ns の MD 計

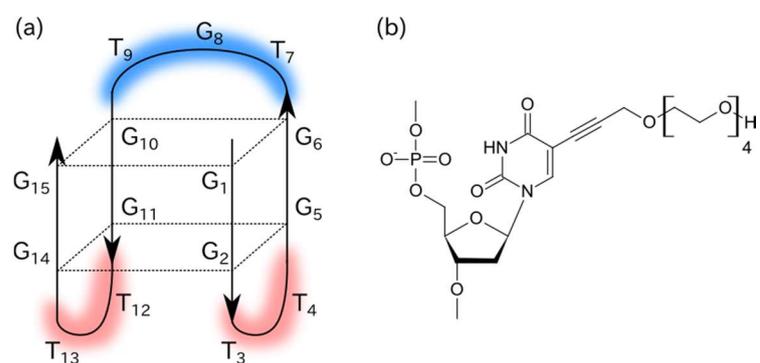


Figure 1. (a) Schematic representation of the unmodified G-quadruplex (Q1) and (b) Chemical structure of TEG-modified deoxythymine (X). T₃ and T₄, and T₁₂ and T₁₃ are in lateral loop regions (red), respectively. The sequence from T₇ to T₉ is a central loop region (blue). In Q1-X₄ and Q1-X₇, T₄ and T₇ were replaced with X, respectively.

算を行った。力場は DNA には AMBER99bsc0、X₄ および X₇ については GAFF 力場を用いた。また、階層クラスタリングにより、TEG の構造を 10 クラスターに分類した。クラスターの中でスナップショット数が多いクラスターの代表構造を Fragment molecular orbital (FMO) 法を用い、電子状態を MP2/6-31G(d) で計算した。フラグメントはヌクレオチドを塩基と骨格に、TEG についてはさらに、2 ないし 4 フラグメントに分割して、DNA 四重鎖と TEG 間の相互作用を解析した。

【結果】

Q1-X₄ と Q1-X₇ の平衡状態にあるスナップショットの TEG の構造についてクラスタリングをした結果、Q1-X₄ では約 59.1% のスナップショットが反対側のループ領域に向かって伸び、相互作用している構造が得られた。これら構造の相互作用を詳しく解析するため、代表構造の FMO 計算をしたところ、TEG のヒドロキシル基が反対側の側面ループ領域の骨格と 2 本の水素結合を形成していることが明らかになった (Figures 2c and 2d)。さらに、TEG の炭化水素が周囲の塩基と CH- π 相互作用や、双極子-誘起双極子相互作用、CH-HC 相互作用で相互作用していることがわかった (Figures 2b, 2c, 2d, and 2e)。これらの弱い相互作用が側面のループ

領域間をつなぐことにより、DNA 四重鎖の構造が安定化していると考えられる。また、DNA 四重鎖内の G-カルテット間の相互作用を、Q1 と Q1-X₄ で比較したところ、Q1-X₄ の π - π 相互作用による相互作用が強くなっている結果が得られた。これらの構造を比較で、Q1-X₄ の G-カルテットが歪み、TEG と反対側の G-カルテットとの距離が縮まっていることから、TEG が G-カルテットを押し上げることにより、G-カルテット間の距離を狭め、 π - π 相互作用を強めていると考えられる。本講演ではこれらの結果のほか、Q1-X₇ との違いについても詳しく説明する。

【参考文献】

- [1] S. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, *Chem. Rev.*, **114**, (2014) 2733–2758.
- [2] M. Hagihara, L. Yamauchi, A. Seo, K. Yoneda, M. Senda, and K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, (2010) 11171–11178.
- [3] H. Tateishi-Karimata, N. Isono, and N. Sugimoto, *PLoS One*, **9**, (2014) e90580.
- [4] T. Endoh, Y. Kawasaki, and N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, (2013) 5522–5526.
- [5] H. Tateishi-Karimata, T. Muraoka, K. Kinbara, and N. Sugimoto, *ChemBioChem*, (2016) in press.

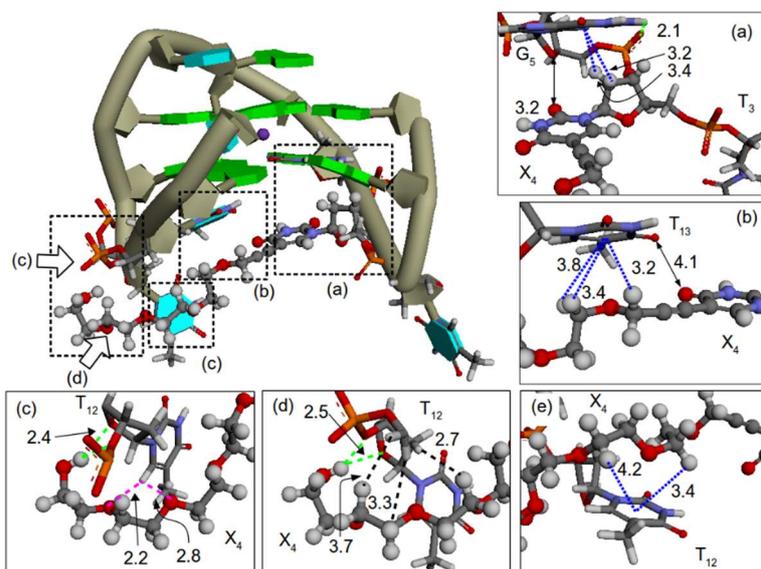


Figure 2. The structure of Q1-X₄ and enlarged views for details of interactions between TEG and nucleotides. (a) T₃ and G₅, (b–d) T₁₂, and (e) T₁₃. Green and cyan blocks indicate guanine and thymine, respectively. Representations of orange, red, blue, gray, and white balls illustrate phosphorus, oxygen, nitrogen, carbon, and hydrogen atoms, respectively. Green, pink, black, and blue dashed lines show hydrogen bonds, dipole-induced dipole, CH-HC, and CH- π interactions, respectively.

2F12

低温赤外分光法による(6-4)光回復酵素のDNA修復中間体の測定

(お茶大・生命情報¹、阪大院・基礎工²、名工大院・工³、米国・スク
リプス研⁴) ○山田大智¹、山元淳平²、張宇³、岩田達也³、
E. D. Getzoff⁴、岩井成憲²、神取秀樹³

The intermediates in (6-4) photolyase repair process by Low-temperature FTIR spectroscopy.

(Cent. Info. Biol., Ochanimizu Univ. Japan¹, Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.
Japan², Nagoya Inst. Tech. Japan³, The Scripps Res. Inst., USA⁴)
○Daichi Yamada¹, Junpei Yamamoto², Yu Zhang³, Tatsuya Iwata³,
Elizabeth D. Getzoff⁴, Shigenori Iwai², Hideki Kandori³

【序】我々生物がもつ DNA に紫外光が当たると細胞死やガンの原因となる DNA 損傷 (主に、シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) と(6-4)光産物 (Figure 1、左上)) が生じる。光回復酵素とは、この DNA 損傷を同じ紫外光 (あるいは青色光) を使って修復することができる酵素である。これまでの研究により光回復酵素は以下のような特徴をもつことが知られている。光吸収を担うのは酵素内部に結合した発色団フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) であり、酸化型 (FAD^{ox}) から 2 回の光照射によりセミキノン型 (FADH[•]) を経て触媒活性をもった完全還元型 (FADH⁻) を生成する。FADH⁻ が基質存在下で光を吸収すると、基質への電子移動が起こって修復が実現する。光回復酵素には、CPD を修復する CPD 光回復酵素と(6-4)光産物を修復する(6-4)光回復酵素 (Figure 1、下) がある。(6-4)光回復酵素は CPD 光回復酵素よりも発見が遅く、反応機構の理解も遅れている。CPD より複雑な構造を有する(6-4)光産物の修復においては酸素の転位が必須であるが、修復における反応中間体の構造解析は未だ皆無である[1]。

我々はフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法を用いた構造解析を試み、これまで FAD^{ox} から FADH⁻ への光反応及び(6-4)光産物の修復における FTIR 差スペクトルを得ることに成功し、反応機構解明に向けた端緒を開くことが出来た[2-6]。今回我々は、*Xenopus* (6-4)光回復酵素に対して低温 FTIR 分光法を用いた構造解析を試みたところ、(6-4)光産物の修復中間体に由来する信号を含んでいると考えられる赤外差スペクトルを温度依存的に捉えることに成功した。さらに、¹³C 標識(6-4)光回復酵素と ¹⁵N 標識(6-4)光産物、¹⁸O 標識(6-4)光産物をそれぞれ用いた測定を行うことで、FTIR シグナルの帰属と中間体の構造モデルを提案する。

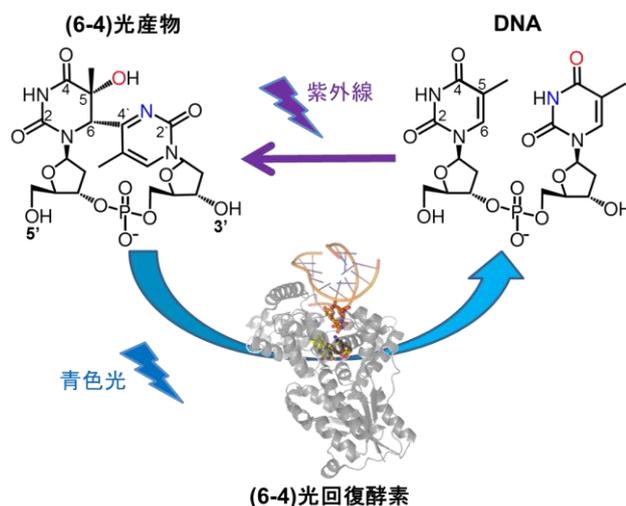


Figure 1 (6-4)光産物形成と
(6-4)光回復酵素による修復

【実験】*Xenopus* 由来の(6-4)光回復酵素の調製は以前に報告した方法を用いた[4]。¹³C 標識(6-4)光回復酵素は、M9 培地 (0.5 g/ 1L culture ¹⁴NH₄Cl, 4 g/ 1 L culture ¹³C-Glucose を含む) を用いて培養し精製した[6]。二本鎖 DNA は 14 塩基対からなり、配列中に合成した(6-4)光産物を含む。塩基配列を以下に示す[7]。

5'-CGCGAATTTGCGCCC-3' (TT:(6-4) 光産物)
3'-GCGCTTAACGCGGG-5'

また、 ^{15}N 標識(6-4)光産物と ^{18}O 標識(6-4)光産物は、Figure 1 に示す青の N と赤の O の原子を標識している。

FTIR 測定は、(6-4)光産物存在下で、*Xenopus* (6-4) 光回復酵素の再溶解試料を作製し、277 K で $>450\text{ nm}$ の光照射により還元型を蓄積させた[2]。その後 77-277 K で目的の温度にセットし、温度が安定するのを待って $>390\text{ nm}$ 以上の光を照射し、光照射前後の差スペクトルを得た。

【結果と考察】低温で測定した光照射前後の差スペクトルは、277 K (修復前後の差スペクトル) とは異なるものであった (Figure 2)。77 K では、 $1800\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ の C=O 伸縮振動は変化しただけの Amide I の領域 ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) に変化が見られなかった。200 K 以上で Amide I 領域に変化が現れ、230 K では、さらにリン酸 (PO_2^-) の非対称伸縮振動領域 ($\sim 1230\text{ cm}^{-1}$) に変化が見られた。250 K を見ると 277 K と類似したバンドが見られた。1720 (+) cm^{-1} のバンドは修復され新たに生じたチミンの $\text{C}_4=\text{O}$ (Figure 1, 右) に由来すると考えられているバンドである[2]。そのため、250 K でも修復反応が起きていると考えられるが、230 K 以下ではスペクトルの形が 277 K のものとは異なるため、これらの温度では完全には修復がなされておらず、修復中間体だと考えられる。また、光照射に伴い FADH^- から(6-4)光産物に電子が供給され、 FAD は一電子酸化された FADH^\cdot を形成する。しかし、今回得られた低温のスペクトルには、 FADH^- に特徴的な 1535 cm^{-1} のバンドが見られなかった。得られた低温スペクトルは、構造変化を誘起していることから電子移動反応は起きているが、電子は FAD に戻った後の構造状態を捉えていると考えられる。次に、同じ測定を ^{13}C 標識(6-4)光回復酵素についても行い、標識と非標識、両者のスペクトルを比較することで、 $1800\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ のバンドが(6-4)光産物の C=O 伸縮振動、 $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ のバンドが(6-4)光回復酵素の Amide I、低波数領域のバンドが DNA のリン酸骨格であると同定した。さらに、 ^{15}N 標識(6-4)光産物と ^{18}O 標識(6-4)光産物でそれぞれ測定した結果も合わせて、各温度における中間状態の構造モデルを提案する。

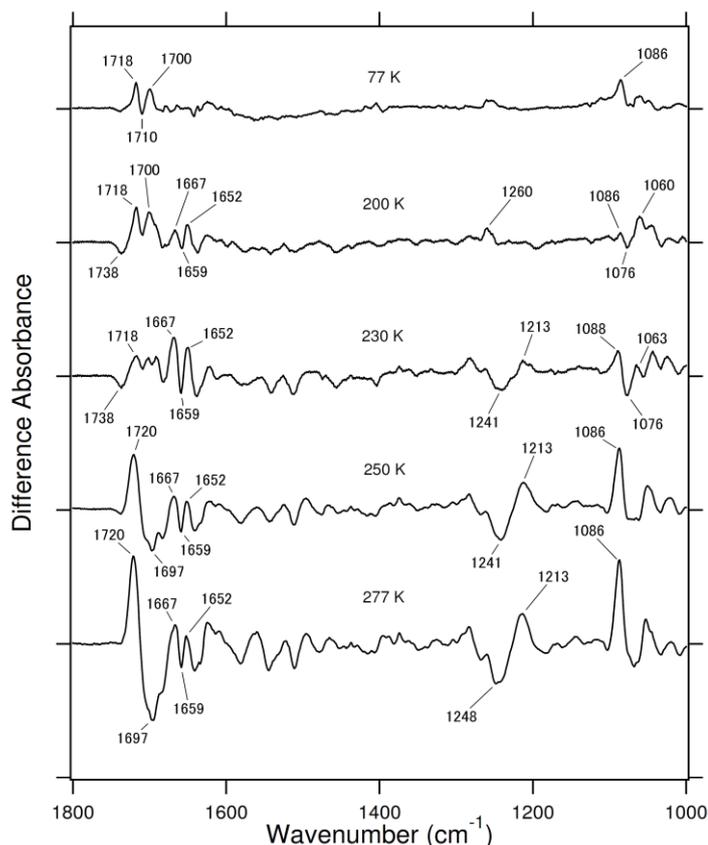


Figure 2 低温FTIR分光法を用いた(6-4)光産物の修復中間体の測定結果

[1] Sancar, A. *Angew.Chem.Int. Ed.*, **2016**, 55, 8502–8527.

[2] Zhang, Y., Iwata, T., Yamamoto, J., Hitomi, K., Iwai, S., Todo, T., Getzoff, E. D., Kandori, H. *Biochemistry* **2011**, 50, 3591–3598.

[3] Zhang, Y., Yamamoto, J., Yamada, D., Iwata, T., Hitomi, K., Iwai, S., Todo, T., Getzoff, E. D., Kandori, H. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, 2, 2774–2777.

[4] Yamada, D., Zhang, Y., Iwata, T., Hitomi, K., Getzoff, E. D. and Kandori H. *Biochemistry* **2012**, 51, 5774–5783.

[5] Yamada, D., Iwata, T., Yamamoto, J., Hitomi, K., Todo, T., Iwai, S., Getzoff, E. D., Kandori H., *Biophys. Physicobiol.*, **2015**, 12, 139–144.

[6] Yamada, D., Yamamoto, J., Zhang, Y., Iwata, T., Hitomi, K., Getzoff, E. D., Iwai, S., Kandori H., *Biochemistry*, **2016**, 55, 715–723.

[7] Iwai, S.; Shimizu, M.; Kamiya, H.; Ohtsuka, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7642–7643.

VSFG 検出赤外超解像顕微鏡法による
 羽毛 β -ケラチンの分子配向イメージング
 (東工大・化生研¹、東工大・生命理工²、岡理大・理³)
 ○渡瀬五常¹、藤井正明¹、酒井誠^{2,3}

Orientation-sensitive imaging of feather β -keratins
 by VSFG-detected IR super-resolution microscopy

(Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology¹,
 Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology²,
 Faculty of Science, Okayama University of Science³)
 ○Yukihisa Watase¹, Masaaki Fujii¹, Makoto Sakai^{2,3}

【序】 生体繊維の中でも物理的・化学的に頑丈で軽量の羽毛は、羽軸を中心に羽枝、小羽枝へと分岐した特殊な形状を持っており (図 1)、それぞれの直径は $\sim 200 \mu\text{m}$ 、 $\sim 100 \mu\text{m}$ 及び $\sim 5 \mu\text{m}$ と明瞭な違いがある[1]。各部位では、共通の主成分である β -シート構造を有するケラチンタンパク質 (β -ケラチン) が階層的に収束し、繊維状構造を形成している[2]。特に、羽軸では、平行に配列した一対の β -ケラチンが互い違いに重なった β -ケラチンフィラメント (図 2) が、羽軸の伸長方向に沿って並んでいるといわれている[3, 4]。しかし、この β -ケラチンの配向は透過型電子顕微鏡を用いた測定から推測されているため、実際の分子配向に関する情報は得られていない。また、羽軸内における β -ケラチンの空間分布についても、一般的な赤外顕微鏡の空間分解能が低い ($\sim 10 \mu\text{m}$) ために解明されていないことから、 β -ケラチンの分布および配向の分光学的な測定が求められている。

そこで、私たちは、赤外光と可視光による二次的非線形光学過程である振動和周波発生 (VSFG) 法を顕微技術に応用し、空間分解能を $\sim 1.0 \mu\text{m}$ まで向上した VSFG 検出赤外超解像顕微鏡を用いて、羽毛 β -ケラチンの分布の解明を試みた。また、VSFG 信号強度は VSFG、可視光そして赤外光の偏光に影響し、分子配向によってその応答が変化すること[5]から、 β -ケラチンの分子配向の観察が期待される。本研究では、羽軸における β -ケラチンの分布に加え、VSFG 信号の偏光依存性を測定して分子配向を解明することを目的としている。

【実験】 励起光源の可視光と赤外光を発生するために、再生増幅器によって増幅させたピコ秒レーザーシステム (パルス幅: 2 ps) を採用した。赤外光は 5500~9000 nm まで波長を可変できるようにし、可視光は 613 nm に固定して使用した。赤外光と可視光はビームコンバイナーで同軸に合わせ、羽毛試料に対して垂直に照射し、発生した VSFG を反対側から対物レンズで集光した後、赤外カットフィルターおよびバンドパスフィルターを介して ICCD カメラに結像した。偏光依存

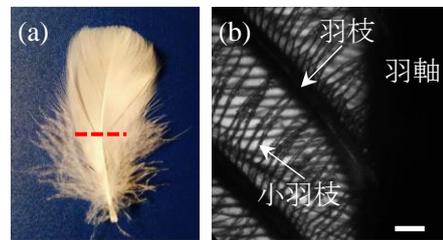


図 1 : (a) 羽毛の全体像 (破線: 切断方向)、(b) 拡大像 (スケールバー: $100 \mu\text{m}$)



図 2 : β -ケラチンフィラメント[3]

性測定では、可視光と赤外光は 1/2 波長板、VSFG は偏光フィルターを用いて、偏光を縦偏光および横偏光に制御して測定した。

羽毛試料の調製では、ガチョウの胸部の羽毛をエポキシ樹脂で包埋し、 β -ケラチンの熱変性を防ぐために 65 °C で約 18 時間熱重合させてサンプルチップを作製した後、マイクロームで図 1-a 上に示した破線の通り羽軸の長軸方向に対して垂直に厚さ 3 μm に薄切した。切り出した羽軸横断面は、カバーガラス上に半固定したものを測定に用いた。

【結果・考察】図 3 は、羽軸横断面に対して行った β -ケラチンのアミド I バンド ($\text{CO str.}, 1630 \text{ cm}^{-1}$) における偏光依存性測定の結果である。画像上で横方向が X 偏光、縦方向が Y 偏光とし、VSFG、可視光、赤外光のそれぞれの偏光の組合せが、YYX (図 3-b) と XXY (図 3-c) の場合で測定した。まず、図 3-b (YYX) により羽軸全体から強い VSFG 信号が観測されたことより、羽軸の大部分に β -ケラチンが分布していることの可視化に成功した。加えて、信号強度に濃淡が見えることから β -ケラチンが不均一に存在していることが分かった。一方、偏光の組合せを変えた図 3-c (XXY) では、VSFG 信号強度や分布が明瞭に変化した結果が得られた。この図 3-b, c の信号分布の差異の原因を考察する。測定された異方性をストレートに解釈すると画面上でアミド I が横方向に振動するように β -ケラチンが配向していると考えられる。もし図 2 の β -ケラチンフィラメント構造が正しいとすると、アミド I は同じ領域で横、縦方向に振動しているため、YYX と XXY では信号分布に差が生じないはずである。したがって、 β -ケラチンフィラメントは報告されている構造 (図 2) ではなく、アミド I が横方向に振動して β -ケラチンが一律に整列してはいなくてはならない。一方、この分光法は β -ケラチンフィラメントが成す層と層の間に存在する界面に選択的に応答する。最近、 β -ケラチンフィラメントの集合体がレイヤー状の構造を取り、羽毛を形成しているという報告がされた[2]。この構造を考慮すると、レイヤー間の界面は異方的であるため、その界面の偏光依存性が顕著に現れた可能性も考えられる。すなわち、羽軸内部の β -ケラチンは図 2 のような構造で構成されているが、界面に関しては β -ケラチンが規則的に一方方向に整列している可能性が考えられる。発表では、切断角度を変えて調製した羽軸縦断面に対する偏光依存性測定の結果を交えて、 β -ケラチンの配向の考察を報告する予定である。

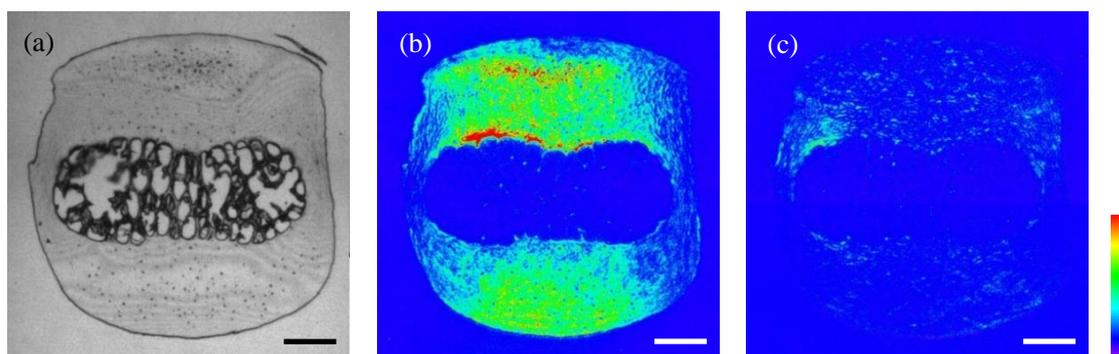


図 3 : (a) 羽毛横断面の透過像 (スケールバー : 40 μm)、(b)アミド I バンド (1630 cm^{-1}) に対する VSFG 像 (YYX)、(c) アミド I バンド (1630 cm^{-1}) に対する VSFG 像 (XXY)

【参考文献】

- [1] D. Yildiz *et al.*, *J. Anim. Vet. Adv.*, **12**, 8, (2009). [2] T. Lingham-Soliar *et al.*, *Proc. R. Soc. B*, **1161-1168**, 277, (2010). [3] R. D. B. Fraser and E. Suzuki, *Polymer*, **35-56**, 12, (1971). [4] R. D. B. Fraser *et al.*, *J. Struct. Biol.*, **1-13**, 162, (2008). [5] Y. R. Shen and V. Ostroverkhov., *Chem. Rev.*, **106**, 1140, (2006).

2F14

分子動力学シミュレーションを用いた水溶液表面の A β 40 に関する研究

(分子研, 総研大) ○伊藤暁, 奥村久士

A β 40 on the solution surface studied by molecular dynamics simulations

(IMS, Sokendai) ○Satoru G. Itoh, Hisashi Okumura

【序】 アルツハイマー病はアミロイドベータペプチド (A β) が凝集して不溶性のアミロイド線維を形成することで引き起こされると考えられている。A β は 39 から 43 アミノ酸残基からなるペプチドである。

40 アミノ酸残基からなる A β 40 はアミロイド線維中で図 1 に示すような構造を形成している。この構造では 10-22 番目の残基と 30-40 番目の残基がそれぞれ分子間 β -シート構造 (β 1 及び β 2) を形成している [1]。

近年の研究で, A β のアミロイド線維形成は糖鎖と脂質膜の界面, ある

いは水と空気の界面といった親水性/疎水性界面で促進されるということが明らかとなった [2,3]。また, 糖鎖/脂質界面存在下で単量体状態の時に, アミロイド線維中では分子間 β -シート構造 β 1 及び β 2 を形成している残基の多くが界面近傍に存在しており, ヘリックス構造を形成しているも明らかになった [4]。水/空気界面で同様の構造を形成するのか, さらに親水性/疎水性界面がアミロイド線維形成をどのように促進するのかを明らかにするために, 水/真空界面存在下での A β の分子動力学シミュレーションを行った。

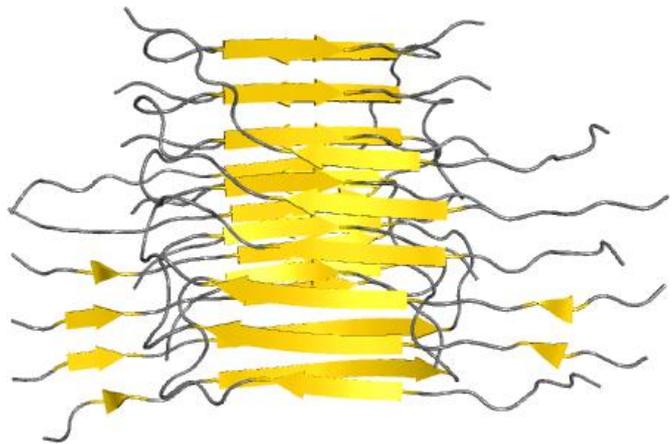


図 1: アミロイド線維中での A β 40 の構造。

【シミュレーション条件】 水/真空界面をシミュレーション中で実現するために, シミュレーションボックスの半分にのみ水分子を配置した (図 2)。A β 40 の初期配置として, 図 2 に示すように, 水/真空界面, 水中及び真空中の 3 つを用いた。初期構造は伸びた構造であり, それぞれの初期配置に対して, 240 ns のカノニカル分子動力学シミュレーションを 3 回行った (合計で 9 回のカノニカル分子動力学シミュレーションを実行)。系の温度は 350 K に設定し, 温度制御には能勢・フーバー法を用いた。シミュレーションボックスのサイズは 108 Å で, 周期境界条件を用いた。系に含まれる水分子の数はどの初期配置でも約 40,000 分子であった。静電相互作用の計算は particle mesh Ewald 法により行った。力場は AMBER parm99SB を用いた。比較のために, 水/真空界面の存在しない条件下で, 水中の A β 40 に対するカノニカル分子動力学シミュレーションも行った。

界面

水中

真空中

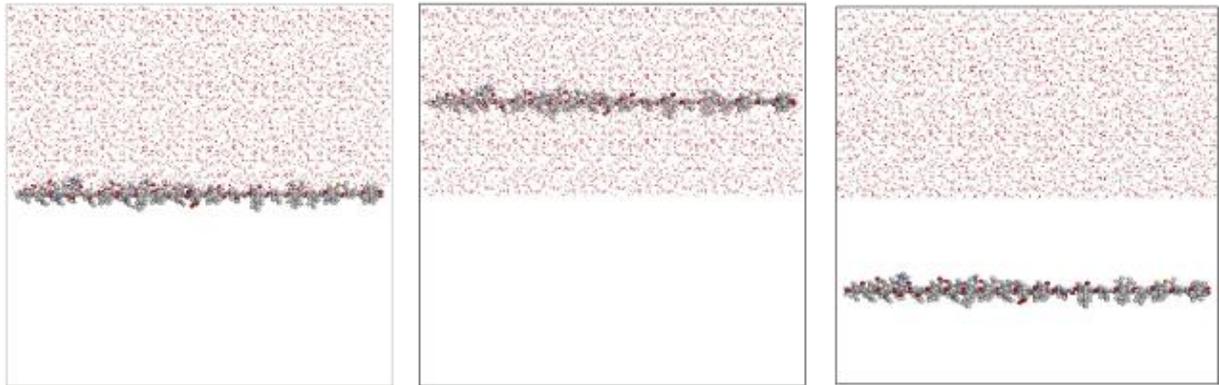


図 2: Aβ40 の 3 つの初期配置.

【結果】 水/真空界面存在条件下でカノニカル分子動力学シミュレーションを行った結果, 図 3 に示すように, アミロイド線維中で分子間 β-シート構造 β1 及び β2 を形成している残基の多くが水/真空界面近傍に存在していることが分かった. また, 界面近傍に存在する残基はヘリックス構造を形成しやすいことも明らかとなった. これは, 実験で明らかにされた糖鎖/脂質界面存在下での Aβ40 の構造と一致している.

さらに, 本講演では, 水/真空界面の存在しない条件下でのシミュレーション結果との比較から, 水/真空界面で Aβ のアミロイド線維形成が促進されるメカニズムについても議論する予定である.

【参考文献】

- [1] A. T. Petkova, W. Yau, and R. Tycko, *Biochemistry* **45**, 498 (2006).
- [2] K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, and Y. Ihara, *Nat. Med.* **1**, 1062 (1995).
- [3] M. Hoernke, J. A. Falenski, C. Schwieger, B. Kokschi, and G. Brezesinski, *Langmuir* **27**, 14218 (2011).
- [4] M. Utsumi, Y. Yamaguchi, H. Sasakawa, N. Yamamoto, K. Yanagisawa, and K. Kato, *Glycoconj. J.* **26**, 999 (2009)

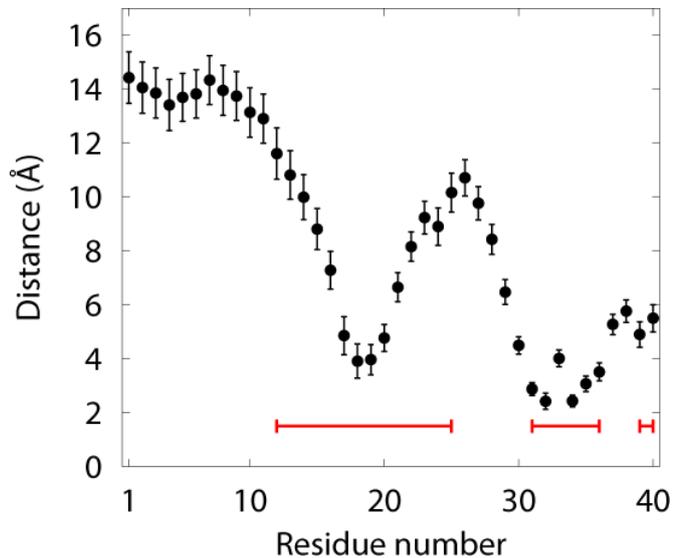


図 3: 各残基の界面からの距離. 赤線は糖鎖/脂質界面存在下での実験で界面近傍に存在していた残基を表わす.

創薬分子設計における FMO 法の役割

(日本大学松戸歯学部) ○福澤薫

Role of FMO method in structure based drug design

(School of Dentistry at Matsudo, Nihon University) Kaori Fukuzawa

【序】

フラグメント分子軌道(FMO)法は、電子状態計算に基づいて、医薬品候補化合物とターゲットタンパク質との詳細な相互作用情報が得られることから、論理的創薬に適した新しい手法として期待されている。FMO 法では、タンパク質-リガンド複合体構造に対する量子化学計算を行い、フラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)を指標として化合物と各アミノ酸残基との相互作用を定量的に評価することができる。また IFIE に基づいて、タンパク質との相互作用情報から特異的な相互作用をもつ化合物を選別することができる。これらの手法は、これまでに多くの事例に適用され成果を挙げてきた[1-3]。最近では、これらの研究成果を発展させた活動が急速に進展しつつある。本発表では、産学官連携の「FMO 創薬コンソーシアム」における研究開発状況や、創薬プロジェクトの探索段階において FMO 法が担う役割について、最新の研究内容を紹介する。

【FMO 創薬コンソーシアム】

FMO 法を実用的なインシリコ創薬手法として発展させるために、2014年11月に製薬企業14社、IT企業1社、アカデミア8機関を含む「FMO 創薬コンソーシアム」[4]を設立し、産業界における実応用に向けた活動を始めた。2015年度からは、コンソーシアムを母体として、スーパーコンピュータ「京」の利用研究課題を推進している。2015年度の「京」利用によって、FMO 研究としては初めて数百構造規模(具体的には505構造のタンパク質-リガンド複合体)の計算実施に成功し、大規模データに対する手法の汎用性の評価を開始した。

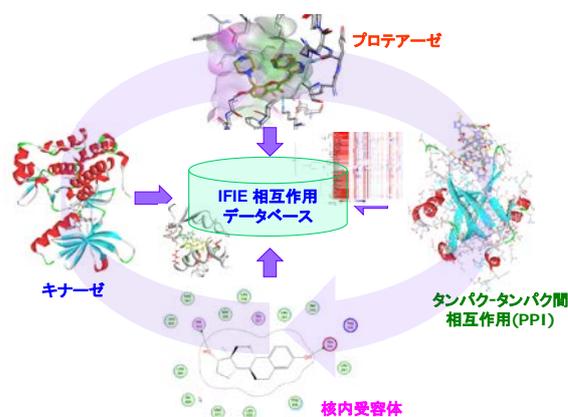


図1 FMO 創薬コンソーシアムの取り組み

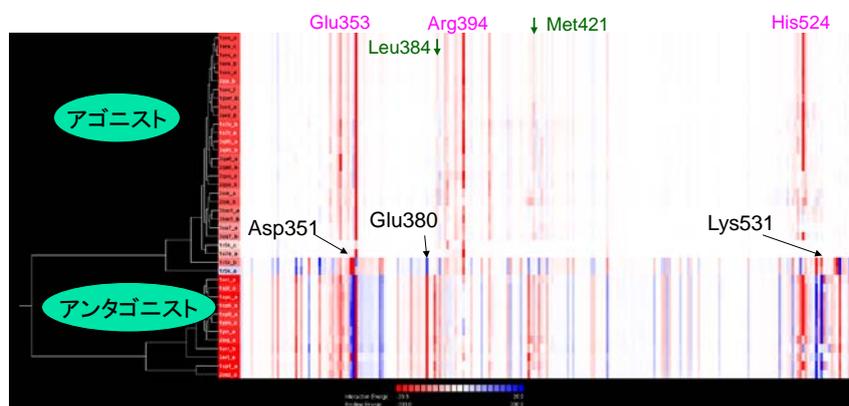


図2 エストロゲン受容体と22化合物の相互作用パターン

4つの重要なターゲットタイプ（キナーゼ、核内受容体、プロテアーゼ、タンパク質-タンパク質間相互作用（PPI））のいずれ対しても、実験的な活性値と計算値との間に概ね相関があることが分かってきており、汎用性としては一定のレベルをクリアしていることが明らかとなる一方で、妥当な複合体構造の作成、溶媒としての水の影響の評価、熱揺らぎの効果に対する統計性の加味などが計算技術上の共通の課題であり、また複数のターゲットを用いた特異性の評価、あるいは予測のためのドッキング構造の作成も創薬分子設計の観点から極めて重要な課題であることが示唆された。これら課題の解決に向けた継続課題と、FMO 計算結果による相互作用データベース構築が進行中である。

【異分野融合研究における FMO 法の役割】

創薬プロジェクトの探索段階において、インシリコ技術による効率化は重要な課題であり、実験結果に論理的な解釈を与えることができる FMO 計算は異分野の研究者との融合研究においても威力を発揮する。カテコール-O-メチル転移酵素（COMT）をターゲットとした日本大学における抗 COMT 不全薬の開発研究では、有機合成や標的タンパク質の精製、X 線結晶構造解析に加えて FMO 計算が取り入れられている。これらを融合した論理的な分子設計の最新の状況についても紹介したい。

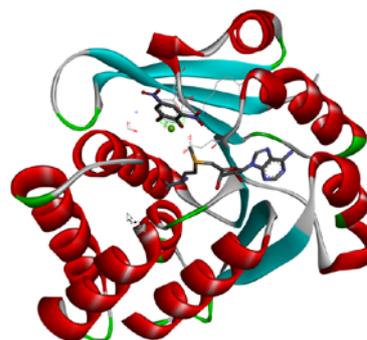


図3 COMTの活性サイト

【おわりに】

FMO 創薬は、他のインシリコ手法および異分野との融合によってはじめて創薬に貢献できる手法になりうる。上記の活動によって、将来的には、従来までの古典力学的手法では解決することのできない、電子的な効果が重要となる場面に対して、飛躍的に精度の高い信頼性と有効性を持った論理的創薬を可能にし、多くのターゲットに対する創薬を大きく効率化できると期待される。

【謝辞】

本研究は、JSPS 科研費基盤研究(C) 15K05397 および日本大学 平成 28 年度学術研究助成金(総合研究)「抗 COMT 不全薬-新規腎保護薬を目指して」の助成を受けた。また、第 8 回資生堂女性研究者サイエンスグラントおよび文科省「HPCI 戦略プログラム 分野 4 次世代ものづくり」からの支援を受けた。本研究の一部の計算には、平成 27 年度および 28 年度の HPCI システム利用研究課題（産業利用枠）「HPCI を活用した FMO 創薬プラットフォームの構築」（課題番号 hp150160, hp160103）の中で、スーパーコンピュータ「京」を利用した。最後に、FMO 創薬コンソーシアムのメンバー全員に感謝を述べたい。

【参考文献】

1. "The Fragment Molecular Orbital Method" edited by Fedorov, D. G. & Kitaura K.: (Taylor & Francis/ CRC Press, Boca Raton, FL, 2009).
2. Fedorov, D. G., Nagata, T., Kitaura, K., Phys. Chem. Chem. Phys. 14, 7562-7577 (2012).
3. Tanaka, S., Mochizuki, Y., Komeiji, Y., Okiyama, Y. and Fukuzawa, K., Phys. Chem. Chem. Phys., 16, 10310-10344 (2014).
4. FMO drug design consortium (FMODD) <http://eniac.scitec.kobe-u.ac.jp/fmodd/>
5. BioStation (ABINIT-MP and BioStation Viewer) <http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/riss/dl>