

(NEC 基礎研、*京大院農) ○津田健一郎、中川 優*、入江一浩*、高田俊和

【序】Protein Kinase C (PKC) は、細胞内情報伝達において重要な役割を果たしている酵素タンパク質であり、ホルボールエステルおよびインドラクトムVなどの発がん促進物質（発がんプロモーター）と強力に結合する。PKC には 10 種類に及ぶアイソザイムが存在し、そのうち、カルシウム依存性の conventional PKC (PKC α, β I, β II, γ) とカルシウム非依存性の novel PKC (PKC $\delta, \epsilon, \eta, \theta$) は、発がんプロモーターとの結合部位を 2 つ (C1A, C1B ドメイン) 持っている。最近の研究では、これら 2 つの C1 ドメイン間で発がんプロモーターに対する親和性に差異が存在し、また皮膚発がんには novel PKC が関与しているが、その役割はアイソザイム間で異なることが指摘されている。このような背景のもとで、発がん促進の機構を理解し、抗がん剤の開発に結び付けるには、PKC アイソザイム選択的かつ C1 ドメイン選択的なりガンド分子を開発することが必要である。このために、実験的手法に加えて非経験的分子軌道法 (ab initio MO 法) を始めとする計算化学の手法を取り入れることが、近年大いに期待されている。その最初としてこれまで我々は、非経験的分子軌道法により PKC δ -C1B 分子とホルボールエステル分子の複合体の全電子計算を行った [1]。PKC δ -C1B とホルボールエステルとの結合の有無により、生体膜との親和性をオン・オフしてリン酸化を調節すると考えられている反応機構 [2] は、タンパク質分子表面の静電ポテンシャル分布がリガンドとの結合前後で大きく変化している事が一因となっていると我々は指摘してきた [3]。今回は新規リガンド分子の結合選択性に関する実験結果を説明し、結合様式を解析するとともに、今後の PKC リガンド設計の指針構築に役立てることを目標として、インドラクトム V と新規リガンド分子であるインドラクトム誘導体 (インドリンラクトム V) について、分子の配座探索、PKC δ -C1B とリガンド分子との結合構造予測、結合アフィニティー及び、各リガンドでの結合様式の違いについて、非経験的分子軌道法などの計算化学の手法を用いて検討を行った。

【計算スキーム】本研究では、以下に示す 3 点についての計算を行った。①インドラクトム V 及びインドリンラクトム V の配座を探索する。② ①により得られた各配座と PKC との結合構造を予測する。③ ②で求めた結合構造での結合エネルギーを求め、配座間での結合様式の違いを非経験的分子軌道法により解析する。①では、Simulated annealing 法により、取り得る可能性のある配座を探索し、各配座の最安定構造を初期構造として非経験的分子軌道法により構造最適化を行った。さらに溶媒からの静電効果を取り入れたエネルギーを算出し、配座間での安定性について検討を行った。②では、①で得られた配座を用いて、PKC δ -C1B とのドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションには Tripos 社の FlexX [4] を用い、得られた結合構造を初期構造として分子動力学計算によるエネルギー最小化を行い、最安定構造を求めた。③では、②で得られた結合構造を用いて非経験的分子軌道法による解析を行い、それぞれの分子及び配座と PKC δ -C1B との結合アフィニティーを予測するとともに、結合様式の相違について検討を行った。PKC δ -C1B の 3 次元座標は、Hurley らによる X 線結晶構造解析の結果 (Protein Data Bank (PDB) に登録されている 1ptq 及び 1ptr) [2] に水素を付加し、水素位置を分子動力学計算で最適化したものを用いた。なお、タンパク質分子の非経験的分子軌道計算には、NEC 計算化学グループで開発した AMOSS-H11 を用いた。

【計算結果と考察】図 1 にインドラクトム V およびインドリンラクトム V の配座探索の結果を示す。インドラクトム V においては、*cis*-アミド型 (twist 型) および *trans*-アミド型 (sofa 型) の 2 つの安定コンホマーが得られた一方で、インドリンラクトム V においては、3R 体が *cis*-アミド型、3S 体が *trans*-アミド型がそれぞれ最安定コンホマーであった。NMR 解析から、インドラクトム V は室温で *cis* および *trans*-アミド型コンホマーの混合物である一方で、インドリンラクトム V においては、3R 体が *cis*-アミド型、3S 体が *trans*-アミド型であることが明らかとなり [5]、本計算結果は、実験結果とよく対応している。インドラクトム V の twist 型と sofa 型間の安定性を分子軌道計算 (DFT-B3LYP) で計算した全エネルギーにより比較すると、twist 型と sofa 型のそれぞれの最安定構造のエネルギー差は、1 kcal/mol 以下あり、

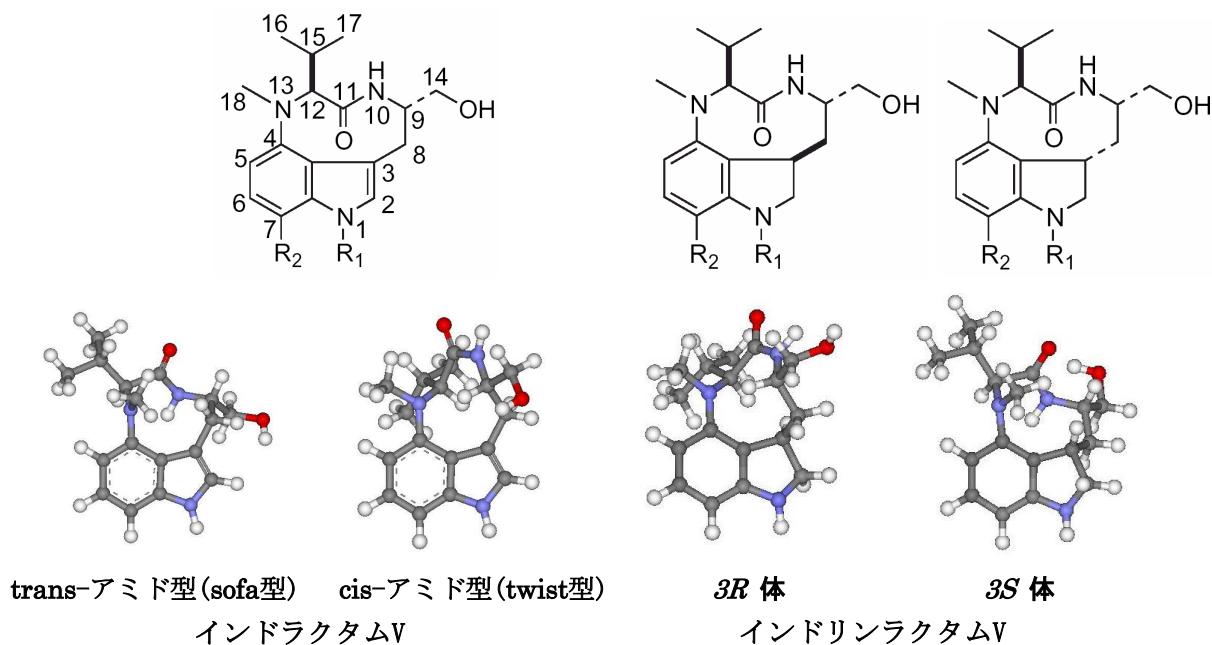


図1. インドラクタムV及び誘導体の化学構造と安定配座 ($R_1=R_2=H$)

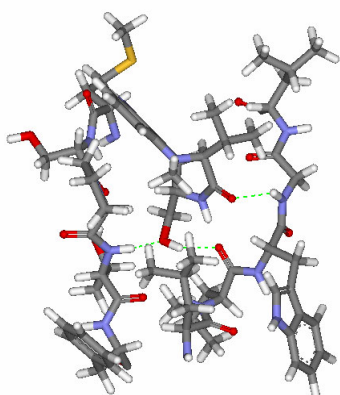


図2. インドラクタムVと
PKC δ -C1Bの予測結合構造

これら 2 つのコンホマーが室温で容易に相互変換するという実験結果と一致している。しかしながら、twist 型が重クロロホルム中でわずかに安定であることは必ずしも説明できていない。溶媒効果を含めたエネルギー計算がさらに必要と思われる。

次に、上記で得られた各分子と PKC δ -C1B とのドッキングシミュレーションを行った。インドラクタム V の twist 型と PKC δ -C1B とのシミュレーションにより予測された結合構造を図 2 に示す。本結果は、過去に行われたシミュレーション予測結果 [6] とよく一致しており、インドラクタム V の PKC δ -C1B との結合における構造活性相関の結果を説明できるものであった。さらに詳細な結合様式を検討するために行った分子軌道法による解析結果およびインドラクタム V の sofa 型、インドリンラクタム V の 3*R* 体、3*S* 体に関する結果は当日発表する。

【参考文献】

- [1] K. Tsuda, H. Kaneko, J. Shimada, and T. Takada, *Comput. Phys. Commun.* **142**, 140-143 (2001).
- [2] G. Zang, M. G. Kanani, P. M. Blumberg, and J. H. Hurley, *Cell*, **81**, 917-924 (1995).
- [3] K. Irie, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9159-9167 (1998).
- [4] 津田、高田, 2002 年分子構造総合討論会 (神戸), 3p124
- [5] G. Klebe and T. Mietzner, *J. Comput-Aided Mol. Design*, **8**, 583-606 (1994).
- [6] Y. Nakagawa, K. Irie, Y. Komiya, H. Ohigashi, and K. Tsuda, *Tetrahedron*, submitted.
- [7] Y. Endo, S. Takehana, M. Ohno, P. E. Driedger, S. Stabel, Y. Mizutani, N. Tomioka, A. Itai, and K. Shudo, *J. Med. Chem.* **41**, 1476-1496 (1998).
- [8] S. Wang, M. Liu, N. E. Lewin, P. S. Lorenzo, D. Bhattacharaya, L. Qiao, A. P. Kozikowski, and P. M. Blumberg, *J. Med. Chem.* **42**, 3436-3446 (1999).