

4P133 計算化学によるプロテインキナーゼ C のリガンドの分子設計 その2

(NEC 基礎・環境研、京大院農*) 津田健一郎、中川 優*, 入江 一浩*

【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リン酸化酵素であり、ホルボールエステルおよびインドラクタム V などの発がんプロモーターが強力に結合することが知られている。PKC には 10 種類の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 δ , ϵ , η , θ) は、発がんプロモーターの結合部位を 2 つ (C1A, C1B ドメイン) 持っている。最近の研究では、皮膚発がんには 3 種の novel PKC (δ , ϵ , η) が関与し、各アイソザイムの 2 つの C1 ドメイン間で発がんプロモーターに対する結合能に差異が存在していることが指摘されている。従って、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の開発は、発がんプロモーション機構の解明および抗がん剤の発見につながるものである。

このようなりガンド分子の開発・設計には、実験的手法と分子動力学法や非経験的分子軌道法 (*ab initio* MO 法) といった計算化学的方法とを併用することがきわめて有効である [1]。

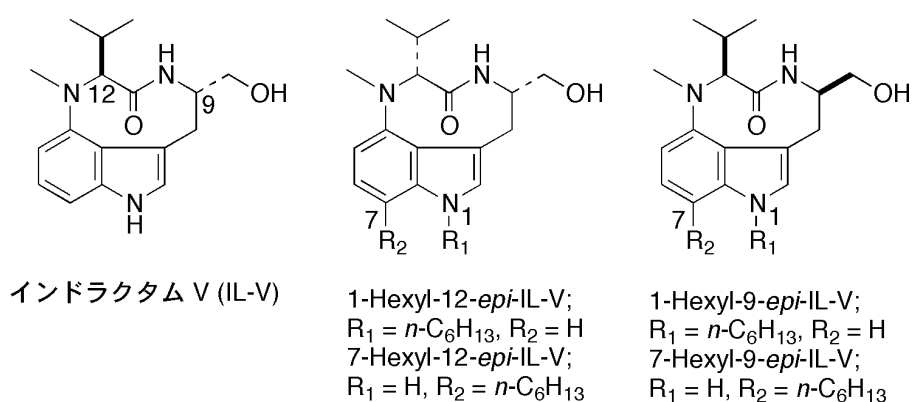
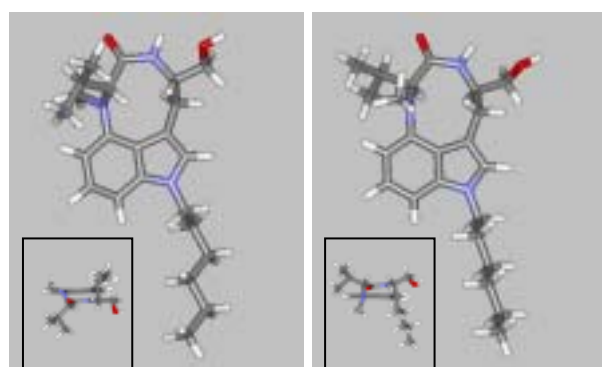


図1 インドラクタム V とエピ体の構造

今回は、インドラクタム V (IL-V) の 9 員環部分の不斉炭素原子の立体配置が、PKC δ -C1B との結合様式に及ぼす影響について明らかにするため、1 位あるいは 7 位にヘキシル基を有する IL-V の 9 位および 12 位のエピ体 4 種について、PKC δ -C1B との結合構造の予測と結合エネルギー評価を行い、実験によって求められた解離定数 (K_i 値) との比較を行った。

【計算スキーム】本研究では、以下に示す 3 点について計算を行った。各りガンド分子の最安定配座を探索する。により得られた各配座と PKC との結合構造を予測する。で求めた結合構造における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。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。では、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 [2] を使い、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。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 [3]) 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。では、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 との結合エネルギ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。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】 Simulated annealing 法および *ab initio* MO 法により、IL-V が最安定配座として



1-Hexyl-12-epi-IL-V

1-Hexyl-9-epi-IL-V

図2. IL-V-エピ体の最安定構造

シス-ツイスト型を取るのに対して、12-epi 体は *r*-シス-ソファ型を、9-epi 体はシス-ソファ型を主として取ることが推定された。本結果は、NMR による立体構造解析の結果 [4] と一致する。これらの最安定配座を用いて PKC との結合構造を求めたところ、すべての分子が同じ結合部位に結合したが、その結合様式は異なっていた。図3に、ドッキング計算で予測した 1-hexyl-12-epi-IL-V と PKC δ -C1B との結合構造の一部を示した。

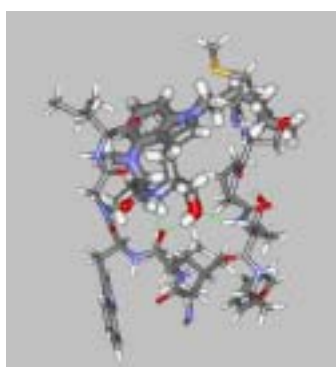


図3. 1-Hexyl-12-epi-IL-VとPKC δ -C1Bとの結合構造予測結果

表1. PKC δ -C1B とインドラクトム V、IL-V-エピ体の結合試験による K_i 値と結合エネルギー計算結果

	結合エネルギー (kcal/mol)	結合試験による K_i 値 (nM)
1-Hexyl-12-epi-IL-V	17.21	63
7-Hexyl-12-epi-IL-V	15.02	31
1-Hexyl-9-epi-IL-V	6.19	228
7-Hexyl-9-epi-IL-V	3.48	>10,000
Indolactam-V (IL-V)	27.45	8.3

水素結合するアミノ酸は、Thr-242、Leu-251、Gly-253 であり、一方 1-hexyl-9-epi-IL-V は、Leu-251、Gly-253 と水素結合することが予測された。さらに、7-hexyl-9-epi-IL-V の結合相手は、Gly-253、Leu-254、Gln-257 で、他のリガンドとは大きく異なっていた。これらの結合様式の差異は、表1に示した結合エネルギー計算の結果に反映されており、結合試験から求めた K_i 値と定性的には符合している。12-epi 体の方が 9-epi 体よりも PKC δ -C1B とより強く結合する主たる要因は、水素結合数の違いであると考えられる。

PKC とリガンド分子との結合において、脂質膜との相互作用効果が重要であるが、本シミュレーションには含まれていない。結合部位の推定では今回のアプローチは有効であるが、より定量的な議論のためには、この効果をシミュレーションへ取り込むことが必要である。

【参考文献】

- [1] Y. Nakagawa, K. Irie, Y. Komiya, H. Ohigashi, and K. Tsuda, *Tetrahedron*, **60**, 7077-7083 (2004).
- [2] G. Klebe and T. Mietzner, *J. Comput-Aided Mol. Design*, **8**, 583-606 (1994).
- [3] G. Zang, M. G. Kananietz, P. M. Blumberg, and J. H. Hurley, *Cell*, **81**, 917-924 (1995).
- [4] T. Kawai, T. Ichinose, M. Takeda, N. Tomioka, Y. Endo, K. Yamaguchi, K. Shudo, and A. Itai, *J. Org. Chem.*, **57**, 6150 (1992).