

TSUBAME 共同利用 令和元年度 共同利用 成果報告書

利用課題名 分子動力学シミュレーションを用いた抗関節リウマチ分子標的薬の設計
英文: Molecular design of anti-rheumatic drugs with molecular dynamics simulation

利用課題責任者 和久井直樹
First name Surname Naoki Wakui

所属 独立行政法人国立高等専門学校機構 長岡工業高等専門学校
Affiliation National Institute of Technology (KOSEN), Nagaoka College
URL <http://www.nagaoka-ct.ac.jp/>

邦文抄録(300 字程度)

関節リウマチは全身性の自己免疫疾患であり、滑膜関節炎と破壊性関節病変により身体機能障害をきたす疾患である。関節リウマチの原因タンパク質として Protein Arginine Deiminase4(以下、PAD4)が同定されている。本研究では PAD4 選択的阻害剤として知られる GSK199 と PAD4 の相互作用ならびに GSK199 と PAD4 のアイソザイムである PAD1、PAD2、PAD3 との相互作用を分子動力学シミュレーションを用いて解析した。相互作用解析の結果、PAD4 と GSK199 の間にだけ π - π スタッキングが形成されることが分かった。 π - π スタッキングを形成する Phe634 に対応する PAD1~PAD3 のアミノ酸の側鎖は芳香環を持たないことから、Phe634 が GSK199 の標的選択性に関与していることが示唆された。

英文抄録(100 words 程度)

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disease that causes physical dysfunction due to synovial arthritis and destructive joint lesions. Protein Arginine Deiminase4 (PAD4) has been identified as a causative protein in rheumatoid arthritis. In this study, we analyzed the interaction between GSK199, which are known as selective PAD4 inhibitor, and PAD4 and the interaction between GSK199 and PAD1, PAD2, and PAD3, which are PAD4 isozymes, with molecular dynamics simulations. These interaction analyses showed that π - π stacking was formed only between PAD4 and GSK199. the amino acids corresponding to Phe634, which forms the π - π stacking, from PAD1 to PAD3 do not have an aromatic ring, suggesting that Phe634 is involved in the target selectivity of GSK199.

Keywords: Molecular dynamics, Drug discovery, Protein Arginine Deiminase

背景と目的

関節リウマチは全身性の自己免疫疾患であり、滑膜関節炎と破壊性関節病変により身体機能障害をきたす疾患である。患者数も年々増加傾向にあり、特に 50 代から 70 代の女性での発症が多いのが特徴である。既存の関節リウマチに対する治療は免疫抑制剤または生物学的製剤の使用による寛解が限界である。リウマチ専門医の数が限られ、生物学的製剤を使用する場合は月 1 回の点滴投与または 2 週間に 1 回の皮下注射となっており、特に患者数の多い 50 代から 70 代の患者に対しての身体的負担が大きい。これまでの基礎研究結果から、関節リウマチ患者はシトルリン化したタンパク質に対する自己抗体を多く生産していることが明らかになっており、タンパク質をシトルリン化する酵素として Protein Arginine Deiminase(以下、PAD)が同定されている。PADには PAD1、PAD2、PAD3、PAD4、

PAD6 の 5 つのアイソザイムが存在しており、PAD1 から PAD4 はシトルリン化活性を有しているが PAD6 は多数の変異があるためシトルリン化活性がない。PAD1 から PAD4 のうち、PAD4 のシトルリン化活性が高くなることが関節リウマチの発症と進行に寄与していることから、標的タンパク質として注目されている¹⁾。しかし、アイソザイム間でのアミノ酸配列一致度が 50%を超えているため、PAD4 阻害剤として開発した場合であっても PAD1、PAD2、PAD3 に結合し阻害する場合がある。標的タンパク質以外を阻害してしまう場合、副作用などの重篤な症状が出る場合があり、高い標的選択性を持った PAD4 阻害剤の開発が求められている。本研究では PAD4 のシトルリン化活性阻害を作用機序とする PAD4 選択的阻害剤の設計を分子動力学シミュレーションにより行うことを目的とした。TSUBAME3.0 でサポートされている Schrödinger Small Molecule Drug

Discovery Suite を用いて、アイソザイム (PAD1~PAD3) と候補化合物の複合体構造のモデリングならびに分子動力学シミュレーションを実施し、PAD4 への選択性に寄与していると考えられる相互作用を同定した。

概要

関節リウマチの原因タンパク質として PAD4 が同定されている。PAD4 選択的阻害剤の開発には、PAD4 との amino acid 配列一致度が 50% を超えるアイソザイムとの基質認識機構の違いを明らかにする必要がある。本研究では、PAD4-阻害剤複合体とアイソザイム-阻害剤複合体に対して分子動力学シミュレーションを行い、基質認識機構に影響を与える amino acid 残基の同定を行った。

結果および考察

複合体構造のモデリング

Lewis らの先行研究より、GSK199 と呼ばれる化合物が PAD4 を選択的に阻害する可能性があることが示唆された²。また、Lewis らは PAD4 と GSK199 との複合体構造の決定に成功している。PAD4 を選択的に阻害する化合物を設計するためには、PAD4 のアイソザイムとして知られている PAD1、PAD2 および PAD3 と GSK199 との相互作用と PAD4 と GSK199 の相互作用の差異を見つける必要がある。しかし、これらアイソザイムと GSK199 の複合体構造は未だ報告されていないため、PAD1~PAD3 と GSK199 の複合体構造をモデリングする必要がある。PAD4/GSK199 複合体構造に基づき、ホモロジーモデリングと呼ばれる手法を用いて PAD1/GSK199 複合体構造、PAD2/GSK199 複合体構造、PAD3/GSK199 複合体構造のモデリングを行った。

GSK199 とタンパク質間の相互作用解析

TSUBAME3.0 および D. E. Shaw Research がアカデミア向けに無償提供している Desmond を用いて各複合体構造に対する 200 ns の分子動力学シミュレーションを実施し、分子動力学シミュレーションの結果得られたトラジェクトリに対して相互作用解析を行った。PAD1~PAD4 の相互作用を比較したところ、

PAD4/GSK199 複合体にのみ、Phe634 との π - π スタッキングによる相互作用が全シミュレーション時間のうち約 80% の割合で形成されることが確認された (図 1)。PAD1~PAD4 の amino acid 配列を比較してみると、PAD4 の Phe634 に対応する PAD1、PAD2 および PAD3 ではそれぞれ Leu634、Ser636 および Thr635 であった。これらの amino acid はいずれも側鎖に芳香環がないため、PAD4/GSK199 複合体で見られたような π - π スタッキングが形成できないと考えられる。

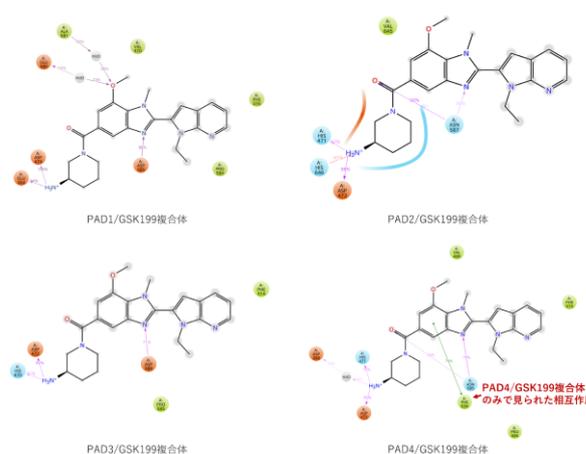


図 1 各複合体構造における相互作用

GSK199 とタンパク質間の結合自由エネルギーの推定

Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area (MM-GBSA) 法を用いて、GSK199 と各タンパク質との結合自由エネルギーを推定した。Run1、Run3 および Run4 において PAD4/GSK199 複合体がエネルギー的に有利であることが示唆された。

表 1 結合自由エネルギー推定結果

複合体	ΔG_{bind} (kcal mol ⁻¹)			
	Run1	Run2	Run3	Run4
PAD1/GSK199	-72.6±3.3	-63.4±4.3	-67.0±4.6	-70.4±5.7
PAD2/GSK199	-72.5±7.9	-81.9±5.2	-73.7±7.1	-75.4±3.5
PAD3/GSK199	-65.3±2.3	-63.0±6.0	-62.1±5.1	-63.0±4.5
PAD4/GSK199	-74.7±4.8	-78.6±5.6	-77.4±6.7	-77.4±5.7

まとめ、今後の課題

PAD4 選択的阻害剤として報告されている化合物

GSK199 の標的選択性を明らかにするために、複合体構造のモデリング、分子動力学シミュレーション、相互作用解析、結合自由エネルギーの推定を行った。相互作用解析の結果、GSK199 の標的選択性には Phe634 との π - π スタッキングが影響していることが示唆された。PAD4/GSK199 複合体にのみ π - π スタッキングがあるため、結合自由エネルギーを調べた際に、PAD4/GSK199 複合体が最も安定であると考えられる。今後は GSK199 よりも PAD4 選択性が高くなる化合物の設計を行う必要がある。

参考文献

1. Schellekens, Gerard A., *et al.* "Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." *The Journal of clinical investigation* 101.1 (1998): 273-281.
2. Lewis, Huw D., *et al.* "Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation." *Nature chemical biology* 11.3 (2015): 189.