

MOE 応用事例紹介

MOE は創薬モダリティ研究を支援するアプリケーション、データコンテンツ、開発環境を備えた統合計算化学システムです。本稿では、MOE の開発元である CCG 社のスタッフが共著者となっている二報の論文について、計算化学の内容にフォーカスして紹介します。一つ目は Aloin の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のパピリン様プロテアーゼ (PLpro) に対する阻害機構に関する研究¹⁾、二つ目は血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) を標的とした抗体 KD035 の機能特性評価に関する研究²⁾です。これらの論文ではドッキングシミュレーションやタンパク質表面パッチ解析の機能など MOE のさまざまな機能が活用されています。

■ Aloin の PLpro 阻害機構の研究¹⁾

PLpro は SARS-CoV-2 の複製に必要な非構造タンパク質を生成するためのタンパク質分解酵素です。さらに PLpro には脱ユビキチン化 (DUB) 活性があり、これによりインターフェロンを介した抗ウイルス反応を抑制し、サイトカインストームを引き起こすことが示唆されています。これらのことから PLpro は新型コロナウイルス治療薬の標的として注目されています。著者らは、一連の in vitro の実験により、口腔洗浄剤製品に含まれる有効成分のうち Aloin A と B (図 1) が PLpro のタンパク質分解活性と DUB 活性を阻害することを見出しました。さらに MOE を使用した分子シミュレーションにより、これらのメカニズムの解明を試みました。そして、Aloin A と B の両方について以下に示すような解析を行い、同様の結果が得られました。

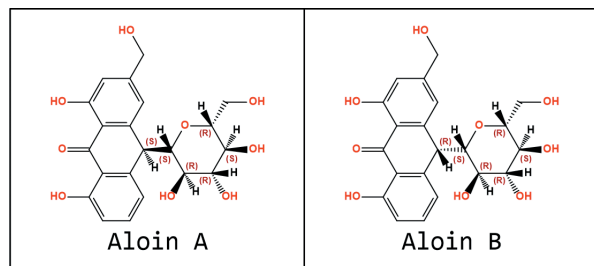


図 1. Aloin A と B の構造式。中心付近の一つの不斉炭素原子について立体配置が異なる。

PLpro と阻害剤 GRL0617 の結晶構造 (PDB ID: 7CMD) を基に、MOE を使用したドッキングシミュレーションを行い、Aloin と PLpro の複合体構造を予測しました。ドッキングシミュレーションでは、得られた 20 個の結合配座から、ドッキングスコアと結合ポケットにおける配向に基づいて、2 つの配座を選択しました。結合ポケットにおける配向については、Y268 との相互作用に着目しました。Y268 は PLpro のタンパク質分解活性において重要な役割を担っており、この残基の変異は PLpro のタンパク質分解活性に影響することが分かっています。これら 2 つの配座は、Y268 と水素結合あるいは OH/ π 相互作用を形成しており、PLpro のタンパク質分解活性を阻害すると考えられます。さらにこれらの複合体構造について 100 ns の MD シミュレーションを行いました。シミュレーション時間全体を通してドッキングスコアは、 -6 kcal/mol 付近で変動しており、安定的に相互作用

用することが分かりました (図 2 下)。また、MOE のタンパク質-リガンド相互作用フィンガープリント (PLIF) による解析を行った結果、Y268 だけでなく E167 との相互作用も比較的高い頻度で確認されました (図 2 上、図 3)。E167 は PLpro のユビキチンコアの認識において重要な役割を担っており、E167 の変異は DUB 活性の大幅な低下を引き起こすことが分かっています。以上のように、Aloin は Y268 や E167 と安定的に水素結合を形成することで、PLpro のタンパク質分解活性と DUB 活性を阻害することが示されました。

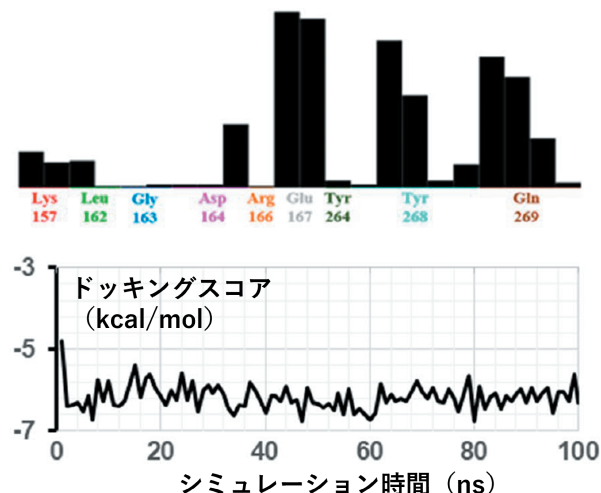


図 2. Aloin B と PLpro の MD シミュレーションにおける PLIF のヒストグラム表示 (上) とドッキングスコアのプロット (下)。PLIF のヒストグラム表示では、各アミノ酸残基の相互作用の頻度を示している。複数のビンがある残基は複数の相互作用を持つことを意味する。

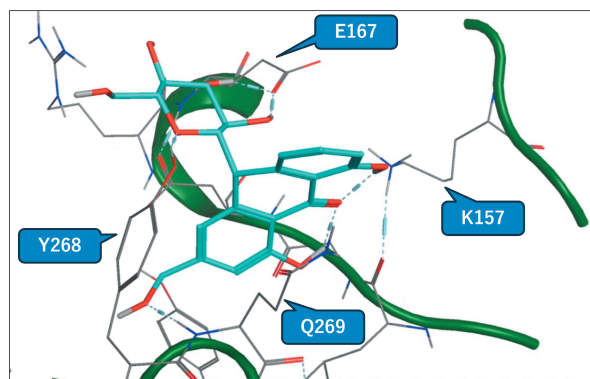


図 3. Aloin B と PLpro の MD シミュレーションのスナップショット。水色の点線は水素結合を示している。

■ VEGFR2 の抗体の機能特性評価の研究²⁾

VEGFR2 は、VEGF-A や VEGF-C などの血管内皮増殖因子 (VEGF) と結合することで血管内皮の増殖や血管新生を促進します。したがって、これらの結合を阻害することで、がんに栄養を送るための血管新生を抑制し、その増殖を防ぐことができると考えられています。以下で詳述する KD035 と B1 は、VEGFR2 を標的とした抗体で、B1 はファージディスプレイ・ライブラリー・スクリーニングにより単離された KD035 の親抗体です。KD035 と VEGFR2 の複合体構造は実験的に決定されていないため、実験と計算化学的手法を組み合わせることで複合体構造の予測と界面の特徴付けを行いました。

KD035 と B1 の結晶構造の CDR の周辺について、MOE のタンパク質表面パッチ解析を行った結果、KD035 では新たに 1 つの正電荷表面パッチと 2 つの負電荷表面パッチが見出されました (図 4)。これらの表面パッチは、主に B1 から KD035 への変異残基である N52K、S29D、D25E の側鎖構造によるものでした。KD035 は B1 と比較して 8.2 倍ほど VEGFR2 への結合親和性が高いことが実験的に確認されており、一般的に抗体の CDR が抗原との結合に関与することから、これらの変異残基が VEGFR2 との結合親和性の向上に特に重要な相互作用部位であると考えられます。

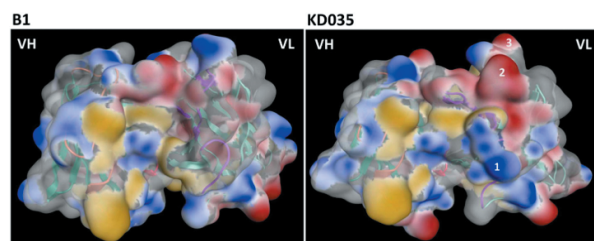


図 4. B1 (左) と KD035 (右) のタンパク質表面パッチ (赤：負電荷、青：正電荷、黄色：疎水性)。ラベル 1-3 は KD035 に特有のパッチであり、それぞれ N52K、S29D、D25E に対応している。

VEGFR2 の細胞外領域は D1 から D7 までのドメインで構成されています。これを断片化して KD035 との結合親和性を実験的に評価した結果、KD035 と VEGFR2 との相互作用には D2 と D3 が必要であることが分かりました。また、KD035 とマウスの D1-D7 との結合親和性がないことを利用して、マウスの配列を部分的にヒトの配列に戻して同様の実験を行った結果、D3 の一部の残基が重要であることが分かりました。さらにこれらの残基について、VEGFR2 (D2-3) と VEGF-C との結晶構造 (PDB ID: 2X1W) における溶媒露出度から、重要な相互作用部位を推定しました (図 5)。

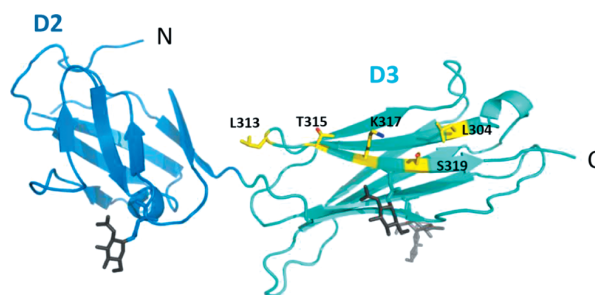


図 5. VEGFR2 の D2 と D3. 黄色の箇所は実験により推定された相互作用残基。

上記の実験と構造解析で特定した相互作用部位を拘束条件とした KD035 と VEGFR2 (D2-D3) とのタンパク質-タンパク質ドッキングシミュレーションを MOE を使用して実行しました。その結果、ドッキングスコアが最良の複合体構造では、KD035 の Y31 や W90 が VEGFR2 の L313 などの周辺の疎水性残基と相互作用していました。さらに MD シミュレーションと MOE の PLIF 機能を用いた解析により、これらの相互作用は安定に保持されることが確認されました。この内容は、L313R の変異体では結合親和性がなくなる実験結果とよく整合しました。その他に複合体では、KD035 の W31 および T28 がそれぞれ D257 および E261 と水素結合を形成していました。これらの相互作用も同様に MOE の MD シミュレーションと PLIF 機能による解析では保持されており、さらに D257A/E261A 二重点変異体実験において結合親和性が低下する結果と整合しました。以上のように KD035 と VEGFR2 の複合体構造の妥当なモデル化がされました。

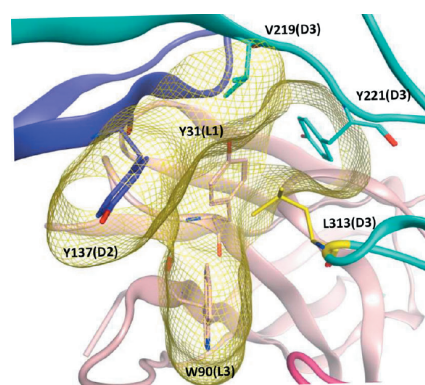


図 6. KD035 と VEGFR2 (D2-D3) のドッキング構造における相互作用部位。KD035 の Y31 や W90 が VEGFR2 の L313 などの周辺の疎水性残基と相互作用している。

- 1) Lewis, D. S. M.; Ho, J.; Wills, S.; et al. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 2145.
- 2) Depetris, R. S.; et al. *Proteins* **2022**, *90* (4), 919-935.