



技術解説

計算機科学を用いたDNAの創薬化学

大石 宏文*

medicinal chemistry of DNA with computer science

abstract

最近、創薬化学の分野において蛋白質の構造を使うことが多い。たとえばドッキング法を用いて創薬を行ったり、構造活性相関に蛋白質の構造を用いたり、MD計算で基質の安定性を求めたり、分子軌道法によって基質の安定性を求めたり反応性を求めたりすることが多い。これらの計算機科学的機能を核酸に応用することができないかどうかの検討を行ってきた。その結果、これらの計算が全ての核酸の計算に応用はできないが応用できる範囲はかなり広いことが明らかとなった。その詳細について以下に述べる。

分子設計におけるドッキング手法

分子設計の手法において最近のドッキング手法の技術的発展は目覚ましいものがある。蛋白質とその基質や阻害剤分子の結合様式を予測する手法としてドッキング手法は非常に優れた結果を算出してくれる。水素結合の位置、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンとのスタッキング相互作用などかなりきっちりと計算されて基質分子や阻害剤分子の位置が算出される。我々は以前より、この手法をDNAやRNAなどの遺伝子に応用できないかと考えてきた。ネトロプシンやポリアミンなどがB-DNAやZ-DNAに結合するminor groove binding²⁾⁻⁵⁾、ダウノマイシン

やアクチノマイシンなどがB-DNAに結合するintercalatingなどが主なDNAと薬物との相互作用である。ネトロプシンやポリアミン分子がB-DNAやZ-DNAのminor grooveに結合するのを予測することはネトロプシンやポリアミン分子のアミノ基やイミノ基がDNAのリン酸基や塩基のアミノ基、カルボニル基との水素結合を予測するだけなのである程度の予測は可能であると考えられる。しかしながらダウノマイシンやアクチノマイシンなどのように非常に多くの共役環を有する薬物とDNAの相互作用様式を予測することは困難を極める。なぜならばこれらの薬物はDNAの塩基と塩基の間に入り上下の塩基とのスタッキング相互作用によってきわめて安定にDNAに結合するからである。第一にどの塩基とどの塩基との間に入れば安定なのかわからない。塩基間にスタッキング相互作用によって結合したとしても安定に結合しえる方向が何種類も考えられるなどの点があり、簡単に一つの安定な結合位置を決めることは困難を極めるからだ。左巻きZ-DNAはきわめて大きなminor grooveを持っている。我々はX線結晶構造解析によって以前から左巻きZ-DNAのminor grooveに結合するポリアミンの探索を続けてきた。そしてN⁺[2-(2-amino-ethylamino)-ethyl]-ethane-1,2-(diamine PA(222))というポリアミンがほぼ完全に左巻きZ-DNAのminor grooveに結合することをX線結晶構造解析法によって明らかにした⁵⁾。X線結晶構造解析の結果によるとCGのヘキサマーにPA(222)分子は2分子結合し、1分子は完全にminor grooveに結合し、もう1分子はZ-DNAの表面に結合してシンメトリーで移動した他のZ-DNA間に架橋構造を形成していた。我々はこのドッキングシュミレーションを行った。d(CGCGCG)のminor groove付近に1辺50Åの立方体を置いた。全原子にMMFF94のポテンシャルエネルギーを割り当てた。リガンド分子を非DNA分子と認識させ1 cycle 8000 iterationで20 cycleの計算を行っ



* Hirofumi OHISHI
1957年7月生
1985年大阪大学・大学院薬学研究所・博士前期課程終了
現在、大阪薬科大学・薬学部、講師、博士(薬学)、生物物理化学
TEL 072-690-1090
FAX 072-690-1090
E-mail: ohishi@gly.oups.ac.jp

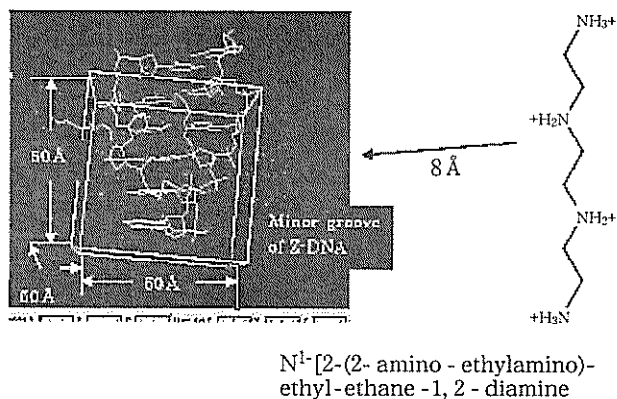


図1 DNAの周りに50Åの立方体の領域を設けその立方体から8Å離れた位置からポリアミンをドッキングさせる。DNAのポテンシャルを3方向に50のグリッドにきって計算を行う。

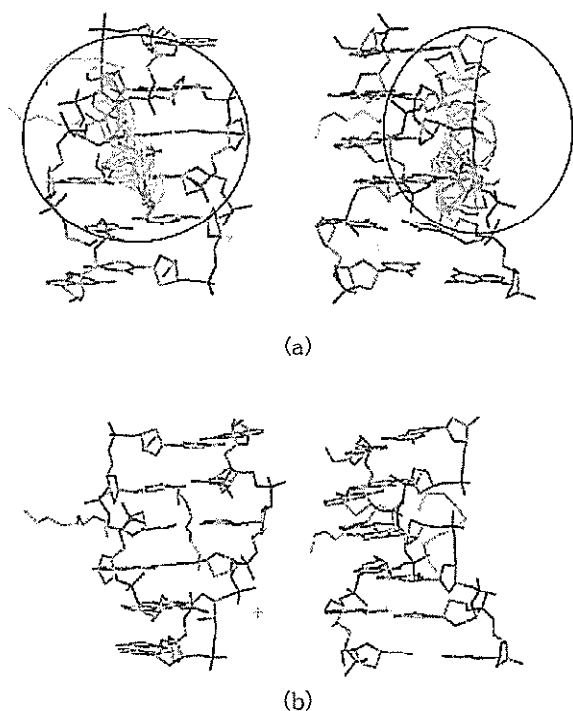


図2 (a) 1 cycle 8000 iteration で20 cycleのドッキング計算を行ったその結果、Z-DNAのminor grooveにほとんどのポリアミンが入った。その位置はX-線結晶構造解析から求めた (b) 図に非常によく似ていた。
(b) d(CGCGCG)とN¹-[2-(2-amino-ethylamino)-ethyl-ethane-1,2-diamine]の1.0Å分解能のX-線結晶構造解析の結果。

た。この計算過程の図は図1に示した。計算にはPentium4 2.8GHz 1GBメモリー 320 GB HDDのワークステーションを用いた。恐らく核酸のminor grooveにポリアミンをドッキングさせた計算はこれが始めてであると考えられる。計算の結果、ほとんどのポ

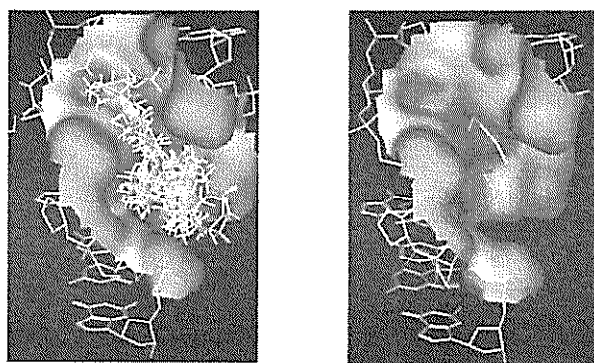


図2 (a) 1 cycle 8000 iteration で20 cycleのドッキング計算を行ったその結果、Z-DNAのminor grooveにほとんどのポリアミンが入った。その位置はX-線結晶構造解析から求めた (b) 図に非常によく似ていた。
(b) d(CGCGCG)とN¹-[2-(2-amino-ethylamino)-ethyl-ethane-1,2-diamine]の1.0Å分解能のX-線結晶構造解析の結果。ドッキング解析したポリアミンの位置がほとんどX-線結晶構造解析の位置と同じである。

リアミンはX線結晶構造解析で求められた位置とほぼ同じ位置のminor grooveに結合していた。この結果は図2、図3に示した。更にもう1本のポリアミンはX線結晶構造解析ではシンメトリーで移動した何分子かのDNAに架橋を形成するような結合をしていたが計算結果もやはりシンメトリーで移動した何分子かのDNAに架橋を形成するような構造でポリアミンがDNAの表面に結合していた。この計算の信頼性はX線結晶構造解析によって示されており、かなり正確な位置計算ができることが明らかとなった。一方、intercalatorのドッキングはきわめて難しく安定な位置をドッキング法によって求めることは今後の課題である。

分子設計におけるmolecular dynamics計算

次に計算上非常に難しいのがmolecular dynamics計算である。蛋白質の場合、真空中においても溶媒中においてもmolecular dynamics計算において原形をとどめないほど、構造が変化することはありえない。C末端やN末端、ループの一部においてかなり大きな変化を示す部分もあるが、全体構造としてはそれほど大きくは動かない。基質や阻害剤を結合させた状態でのmolecular dynamics計算においては基質や阻害剤の位置が多少動くことは考えられるが、原形をとどめないほど、動くことはほぼありえない

と考えられる。しかしながらDNA, RNAなどの遺伝子のmolecular dynamics 計算においては蛋白質の場合とはかなり異なった動きを示す。DNA, RNAどちらにおいてもA型, B型, Z型のどのタイプでもリン酸のマイナスイオンを中和するプラスイオンをいれずにmolecular dynamics計算を行った場合, DNA, RNAの二重螺旋は完全に巻き戻ってしまう。原形はとどめないと考えて間違いはない。更にプラスイオンでも誘電率の低い原子また質量の軽い原子-NH₃⁺やNa⁺などでは二重螺旋は巻き戻ってしまうことがほとんどである。これは実際にDNA, RNAをバッファ溶液中に入れて一当量のNa⁺を入れて放置すると開裂現象が見られる。Molecular dynamics計算を行った場合にそれと同じ現象が起こっていると考えられる。プラスイオンをC_s⁺などのような誘電率が高く, 質量の大きなプラスイオンで中和するとmolecular dynamics計算でDNA, RNAの構造は多少動いたとしてもA型, B型, Z型のコンフォメーションは保持されることはこれまでの我々の研究で明らかになっている。図4にこれらのデータを示している。我々が通常DNAのmolecular dynamicsの計算を行う場合, リン酸のフリーの酸素と二重結合の酸素の midpoint とリン原子を結ぶ線分を延長し, midpoint とリン原子間距離の5倍の位置にプラス金属を配置しポリアミンなどは予測される位置に置く。DNAの回りに35Å, 35Å, 50Åのボックスを作りmonte calro法で水分子を入れる。アンサンブルはNVTで周期境界条件をつけ摂動法で1step 1fsで1000000stepのmolecular dynamics計算を行うのが通常である。準備段階として300stepのConjugate Gradient minimization, 300stepのNewton Raphason minimization, 2000stepのsimulated annealing, 1000stepのequilibuliumを行う。通常molecular dynamicsの計算がうまくいった場合, RMS値とtotal energy値が収束する。この収束した状態を詳細に見てみるとX線結晶構造解析の結果を反映していることがわかる。表1と表2にこれらのデータを示した。最近ではEwaldの手法を用いてB型DNAからZ型DNAへの連続的なシュミレーション実験が各地行われている。早くB to Zのシュミレーションを見てみたいものだと思う。

分子設計における *ab-initio* および分子軌道計算

最近ではこれらドッキングやmolecular dynamics

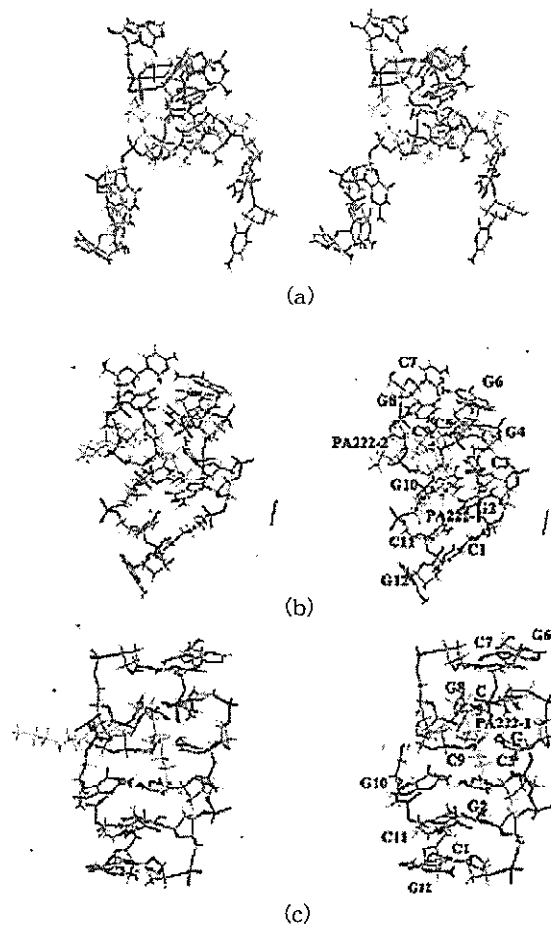
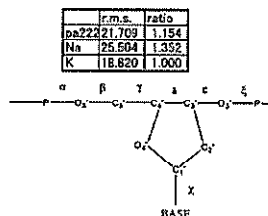


図4(a) N¹⁺ [2-(2-(2-amino-ethylamino)-ethyl)ethane-1,2-diamine]だけをプラスイオンとしてMDの系に入れてMD計算を行ったがDNAは100ps以内に二十螺旋が解けて元の原形を残さないほどに崩れた。
 (b) N¹⁺ [2-(2-(2-amino-ethylamino)-ethyl)ethane-1,2-diamine]に加えて10個のNa⁺原子をMDの系に入れた100psのMDでベースペアや二十螺旋は崩れてしまったがDNAの形だけは残している。
 (c) N¹⁺ [2-(2-(2-amino-ethylamino)-ethyl)ethane-1,2-diamine]に加えてK⁺イオンを10個MDの系に入れた。100psのMD計算ではポリアミンの位置も二十螺旋もX線結晶構造解析の結果とほぼ同じであった。

計算によって得られた構造を元に分子軌道計算をできるだけ大きな分子の分子軌道計算を行うことができる。HF法, B3CYP法を基底関数CEP-31Gを用いて計算するとほとんどの原子の軌道計算を行うことができる。1000原子くらいからなる分子の計算も行うことができる。ただし構造最適化を行うと莫大な計算時間を必要とする。もちろんDNAやRNAにおいてもHF法, B3CYP法は基底関数CEP-31Gとともに使用することができかなり正確な分子軌道, 電荷計算を行ってくれる。

表1 Na⁺体, K⁺体, PA(222)体, それぞれのグリコシド結合周りのトーションアングルを示している。標準値とのRMSはNa⁺体は25.5°, K⁺体は18.8°, PA(222)は21.7°でこの表からは金属やポリアミンの違いによる計算値の違いは大きくは認められない。

		C1	C3	C5	C7	C9	C11	C2	C4	C6	C8	C10	C12	r.m.s
std		233	223		223	223	47	47	47	47	47	47	47	
pa222	α	191	22		80	102	138	285	63	60	43	38	38	38.48142
Na		340	181		264	247	871	209	81	107	74	191	27.54809	
K		204	87		248	99	74	55	83	32	89	164	23.49574	
std		221	221		221	221	179	179	179	179	179	179		
pa222	β	207	80		253	215	156	140	202	145	178	171	14.87740	
Na		252	156		349	88	283	269	177	288	217	124	28.62198	
K		248	208		204	70	207	215	200	200	200	214	16.81626	
std		56	56	56	56	56	191	191	191	191	191	191		
pa222	γ	179	131	349	191	121	170	160	59	218	158	177	176	33.61062
Na		194	178	61	195	322	112	168	163	171	114	220	144	30.94103
K		119	61	86	187	57	230	173	196	176	165	162	111	20.44012
std		138	138	138	138	138	99	99	99	99	99	99		
pa222	δ	124	169	91	178	113	110	65	64	100	178	163	95	11.14114
Na		82	133	93	101	112	129	71	73	77	50	95	168	10.59416
K		119	61	86	187	57	230	68	92	165	103	45	128	15.66948
std		-94	-94	-94	-94	-94	-104	-104		-104	-104			
pa222	ϵ	-126	-171	-84	-58	-167	-87	-93	-103		-64	-78		13.00981
Na		-187	0	-48	-181	-55	-177	-147	-67		-293	-53		27.71714
K		-82	-143	-97	-69	-85	-65	-69	-178		-61	-158		13.19356
std		80	80	80	80	80	291	291		291	291			
pa222	ζ	159	84	83	108	157	180	238	288		203	252		18.86743
Na		125	49	63	124	52	117	83	335		149	351		27.82762
K		68	135	74	75	79	52	252	72		256	312		23.48688



Schem The torsion angles of the backbone of nucleic acid

おわりに

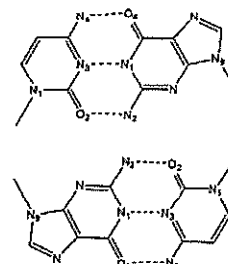
若干難しいがこれらの手法を用いて近い将来遺伝子による創薬が可能になることを切に願う次第である。

文献

- 1) Ohishi, H. ; Nakanishi, I. ; and Tomita, K. Comparison of a left-handed Z-DNA molecular structure determined by X-rays with that simulated by a molecular dynamics Biochemical and Biophysical Research Communications, 236, 146-150(1997)
- 2) Ohishi, H. ; Kunisawa, S.; van der Marel, G A. ; van Boom, J H. ; Rich, A. ; Wang, A H-J. ; Tomita, K. ; and Hakoshima, T. Interaction between the left-handed Z-DNA and polyamine. The crystal structure of the d(CG)₃ and N-(2-aminoethyl)-1,4- diamino - butane com-

表2 この表はMD後のNa⁺体, K⁺体, PA(222)体のベースペアのずれの大きさを示している。K⁺体では標準値とのずれはRMSで0.578ÅでありNa⁺体は2.052Åであり, PA(222)体は8.69Åであり, いかにK⁺体が安定であるかがわかる。

	3.4940	2.9050	2.4630	4.0130	3.5060	4.0630
O2-N2						
N3-N1	2.5380	2.7340	2.5800	3.3650	3.0780	3.9650
N4-O6	2.9300	3.4370	2.6000	3.5310	3.2040	2.7650
d(CG) ₃ +PA(222)+10Na ⁺						
O2-N2	6.3420	6.1260	3.1030	2.9280	3.8020	5.7020
N3-N1	3.8070	4.7550	3.0940	3.0810	2.8560	6.1490
N4-O6	3.8200	4.3810	3.0650	3.6760	2.8050	8.0330
d(CG) ₃ +PA(222)						
O2-N2	2.9850	5.6690	12.5850	10.5500	13.5980	15.5220
N3-N1	5.2830	4.6010	10.9710	10.7750	13.5810	18.4360
N4-O6	7.7740	2.6880	10.4100	11.5840	13.4500	18.0470
Standard d(CG) ₃ model						
O2-N2	2.8800	2.9100	2.8800	2.9100	2.8800	2.9100
N3-N1	2.9300	2.9300	2.9300	2.9300	2.9300	2.9300
N4-O6	2.9100	2.8800	2.9100	2.8800	2.9100	2.8800
	r.m.s	ratio				
d(CG) ₃ +PA(222)+10K ⁺	0.578131	1.000000				
d(CG) ₃ +PA(222)+10Na ⁺	2.052889	3.550558				
d(CG) ₃ +PA(222)	8.690991	15.032899				



Schem The interaction mode between Guanine and Cytosine

plex FEBS Letters, 284, 238-244(1991)

- 3) Ohishi H., Terasoma N., Nakanishi I., van der Marel G., van Boom J. H., Rich A., Wang A. H. - J., Hakoshima T., Tomita K. Interaction between left - handed Z - DNA and polyamine-3. The crystal structure of the d(CG)₃ and thermospermine complex FEBS Letters , 398(2,3), 291-296. (1996)
- 4) Ohishi H., Nakanishi I., Inubush K., van der Marel G., van Boom J. H., Rich A., Wang A. H.-J., Hakoshima T., Tomita K. Interaction between the left - handed Z - DNA and polyamine-2. The crystal structure of the d(CG)₃ and spermidine complex FEBS Letters, 391(1,2), 153-156 (1996)
- 5) Ohishi, H. ; Suzuki, K. ; Ohtsuchi, M. ; Hakoshima, T. ; and Rich, A. The crystal structure of N¹-[2-(2-amino-ethylamino)-ethyl]-ethane-1,2-diamine(polyamines)binding to the minor groove of d(CGCGCG)₂, hexamer at room temperature FEBS Letters, 523, 29-34 (2002)