

2P06 FMO 法による上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)の相互作用解析

○^{1,2} 渡邊寿雄、^{1,2} 石元孝佳、³ 田村裕、⁴ 稲富雄一、^{1,2} 梅田宏明、^{1,2} 長嶋雲兵
¹産総研計算科学（〒305-8568 つくば市梅園 1-1-1 中央第二）、²JST-CREST、
³千葉大学大学院医学研究院生命情報科学、⁴九州大学情報基盤研究開発センター

【緒言】 受容体型チロシンキナーゼ(RTK)である上皮細胞増殖因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)の変異がいくつかのタイプの癌で見つかっており、抗がん治療の標的分子として注目されている。

EGFR とそのリガンドである EGF や TGF α との複合体の結晶構造[1,2]を元にして、EGFR のリガンド結合誘導型二量化機構(図 1)

が Schlessinger によって提唱されている[3]。また結晶構造解析[1]により EGFR と EGF との結合サイトが明らかになっているが、その結合機構に関してはまだ不明であり、実験やドッキングシミュレーションによる研究をより一層加速するためにその解明は不可欠である。

近年の大規模分子軌道計算の新たな手法の開発や、急速な計算環境の発展により、巨大分子の分子軌道計算が技術的に可能になってきた。その中でも FMO 法[4]は巨大分子を小さなフラグメントへ分割することにより計算量を大幅に削減する上に、広域分散計算環境にも非常に適している。また FMO 法によって得られるフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)により、詳細な相互作用の解析が可能であり、生体分子における結合機構の解析には非常に有用であることが示されている。[5]

そこで、我々は EGR-EGFR 複合体の相互作用解析を FMO 法で行った。詳細な相互作用解析により、EGFR のリガンド結合機構を明らかにするだけでなく、新規阻害剤の開発に有用な情報を得ることも目的とした。

【モデル及び計算方法】 計算に用いた構造は、Protein Data Bank (PDB) の構造 1IVO を元で作成した。1IVO は EGFR-EGF の二量体であるが、その片方の EGFR-EGF 複合体

に欠落残基と水素を付加し、古典力場(charmm22)にて束縛条件下での構造最適化を行った。それぞれの分子のサイズは EGFR (512 残基、7,837 原子)、EGF (51 残基、786 原子)であり、FMO 計算では詳細なフラグメント間相互作用エネルギーを得るために、1 残基を 1 フラグメント(チオール結合は 2 残基 = 1 フラグメント)とし、EGFR-EGF 複合体を 542 フラグメントに分割して計算を行った。FMO 計算には HF/STO-3G を用いて行った。計算プログラムは ABINIT-MP Ver.20021029 を、AIST スーパークラスター(ASC)の F-32 部(Dual Xeon 3.06GHz \times 272 ノード)及び P-32(Dual Opteron 2.0GHz \times 1072 ノード)を使用して計算を実行した。EGFR-EGF 複合体の FMO-HF/STO-3G 計算は ASC F-32 部を 64 ノード(128 プロセス)にて、3 時間弱(10599 秒)で終了した。

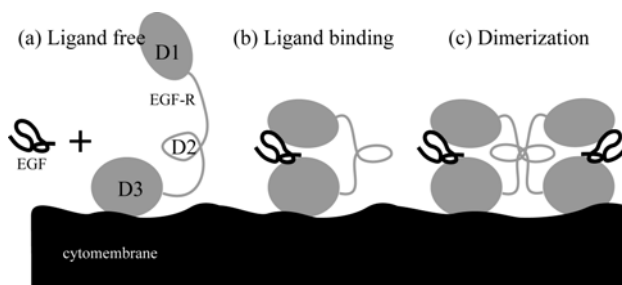


図1 EGFRのリガンド結合誘導型二量化機構

表1 EGFR-EGF 複合体のモデルサイズ

	N _{residue}	Sequence	N _{atom}	N _{basis}	Charge	N _{s-s bond}
EGFR-EGF	563		8,623	26,351	-1	21
EGF	51	1- 51	786	2,474	-4	3
EGFR	512	1-512	7,837	23,877	3	18
EGFR Domain I	163	1-163	2,595	7,859	-4	2
EGFR Domain II	146	164-309	2,107	6,575	2	11
EGFR Domain III	170	310-479	2,655	7,939	5	2
EGFR Domain IV	33	480-512	480	1,504	0	3

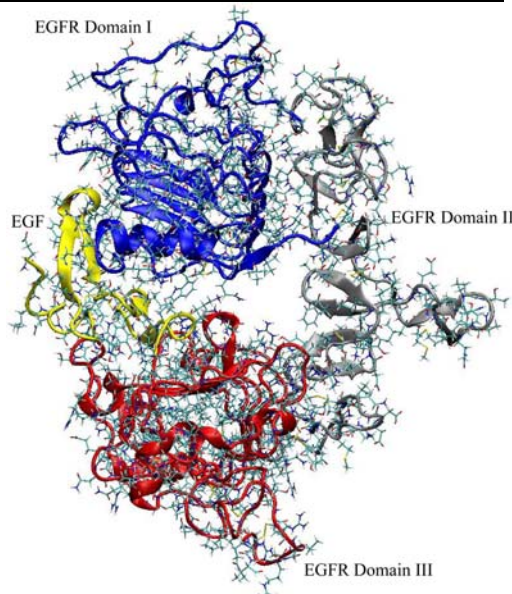


図2 EGRF-EGF複合体の構造

【計算結果】 まず、EGF と EGFR の Domain I 及び III の間の相互作用を調べるため、静電ポテンシャル(ESP)を計算した(図 3)。それによると、EGF が負に帯電しており、正に帯電した EGFR Domain III との間に、強い静電相互作用が生じることが分かる。一方、EGF と EGFR Domain I は両方とも負に帯電しており、静電反発が生じることが分かる。構造的には EGF – EGFR Domain I と EGF – EGFR Domain III は似通っているが、その相互作用は全く異なっていることが分かる。またこれより、EGF はまず EGFR Domain III に結合し、その後に EGFR Domain I と結合することが分かる。

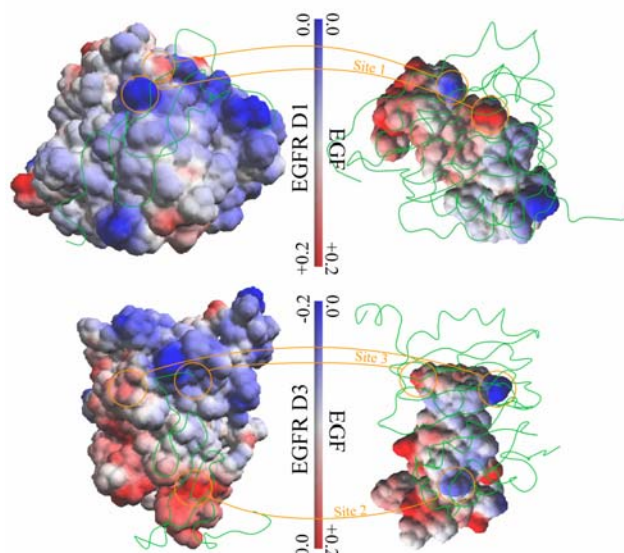


図 3 EGF と EGFR Domain I (上図) と、EGF と EGFR Domain III (下図) の ESP 図

次に、IFIE 解析にて得られた近距離力にて相互作用している 3 つの結合サイトを、図 3 に橙色で示した。これらの結合サイトは相補的な ESP 値を持っている。また、これらの結合サイトは、小木曾らが結晶構造解析で示した 3 つの結合サイトと一致している[1]。これらの結合サイトのうち、結合サイト 1 と 3 は、正負に対になった結合サイトと逆符号の結合サイトが相互作用している。そのため、これらの相互作用が双極子–双極子相互作用であり、EGF の向きが重要であることがわかる。一方で、結合サイト 2 では EGF の濃青(Arg41 に起因する負の ESP 値)の領域と EGFR Domain III の濃赤(Asp355 に起因する正の ESP 値)の領域が相互作用しており、他の 2 つの結合サイトに比べて配向依存性は少ない。これより EGF と EGFR Domain III の結合機構は、まず結合サイト 2 にて結合した後、EGF の配向を調整した後に結合サイト 3 での結合が生成すると考えられる。また、EGF と EGFR Domain I の結合に関しても、EGF – EGFR Domain III の結合前では、EGF の配向を固定できないため、結合形成が困難なことがわかる。

【結言】 以上のことを踏まえて、図 4 のような EGFR のリガンド結合機構を提案する。まず、EGF は EGFR Domain III に 5 Å 程度に接近する(図 4b)ことにより、強い近接相互作用で EGF – EGFR Domain III の間の結合を形成する。その後、EGF – EGFR Domain III と EGFR Domain I が 5 Å 程度に接近する(図 4d)と、結合サイト 1 による強い近接相互作用で EGF – EGFR Domain I の結合が形成される。EGFR はこのような複数段階のリガンド結合機構や配向依存の高い結合サイトにより、高いリガンド認識能を持つことが分かった。

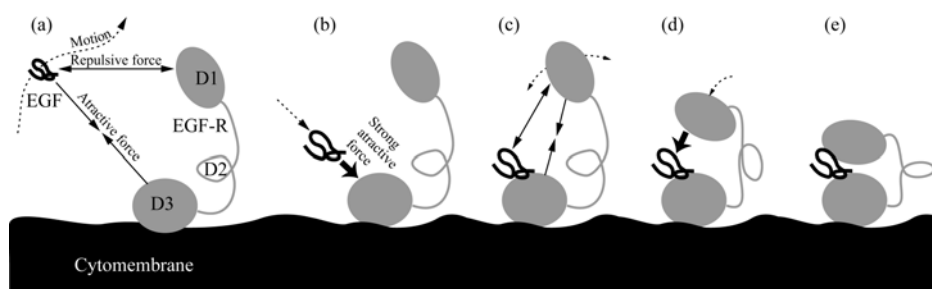


図 4 EGFR のリガンド結合機構

【参考文献】 [1] Ogiso, H. et al., *Cell*, **110** (2002) 775-787. [2] Garrett, T. P. et al., *Cell*, **110** (2002) 763-773. [3] Schlessinger, J., *Cell*, **110** (2002) 669-672. [4] K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.*, **312** (1999) 319, K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.*, **313** (1999) 701, T. Nakano et al., *Chem. Phys. Lett.*, **318** (2000) 614. [5] K. Fukuzawa et al., *J. Comput. Chem.*, **26** (2005) 1, K. Fukuzawa et al., *J. Comput. Chem.*, **27** (2006) 948, T. Watanabe et al., *J. Phys. Chem. B*, **111** (2007) 9621-9627.