

神経障害性疼痛の原因受容体：リゾホスファチジン酸受容体 1 のコンピューター利用によるモデル化とリガンド結合状態の動力学的解析

(Computer-Aided Modeling and Ligand-Binding Dynamics of Lysophosphatidic Acid Receptor 1: The Signature Receptor of Neuropathic Pain)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻

OMOTUYI IDOWU OLAPOSI

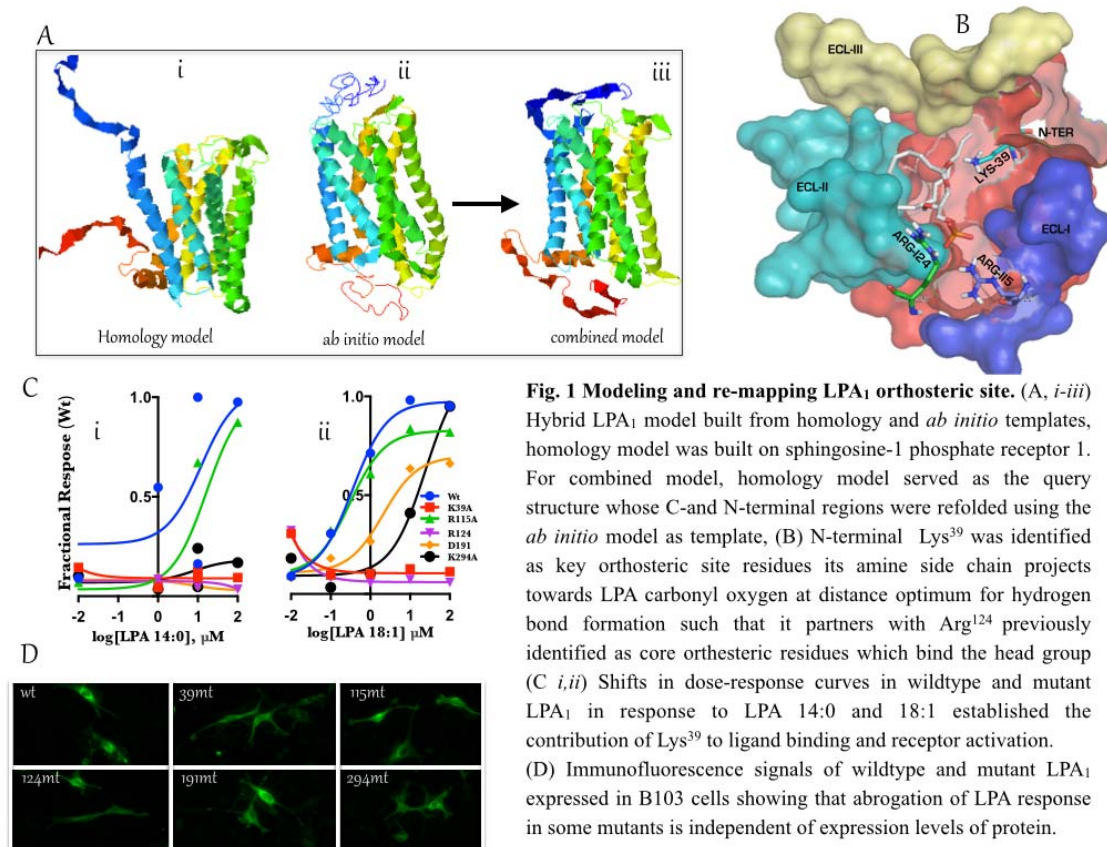
(背景) 慢性疼痛は、裂傷や炎症に伴う生理的疼痛の病態と異なり、アロディニアと呼ばれる異常痛が原因で起きる非生理的疼痛である。通常、痛覚と触覚を伝達する神経は、脊髄レベルで完全に別経路を辿るが、アロディニア現象では両神経の混線によるシグナルの交錯が生じると想定されている。神経障害性疼痛患者は、神経が障害を受けると、中枢までの疼痛伝達の仕組みが変異し記憶される。そのため、痛みや病気の原因を取り除いても、少しの刺激でも強い痛みを感じることもある。侵害受容性疼痛に処方されるモルヒネ様物質や抗炎症薬では効果を得られず、根治治療を目的とした新薬の開発には、慢性疼痛の原因分子の同定及び複雑な病態の解明が不可欠である。以前、LPA<sub>1</sub> 受容体シグナルが神経障害後のアロディニアと脱髄誘発の初発機構を担うこと発見した。さらに、LPA (リゾホスファチジン酸) 産生機構が受容体を介して自己増幅することを明らかにし、LPA が慢性疼痛の初発機構のみならず疼痛病態の維持機構における原因因子であることを突き止めた。本研究では、創薬標的として期待される LPA/LPA<sub>1</sub> 受容体の反応プロセスを理解するために、原子レベルの視点で "hybrid *ab initio*/Homology modeling method" を用いた LPA<sub>1</sub> 受容体の 3 次元構造の構築に着手した。また、シュミレーション結果と、LPA<sub>1</sub> 変異体とのアンタゴニスト活性の生物学的結果から、リガンド結合部位に重要なアミノ酸を特定した。今後、計算結果を基に大規模インシリコ阻害薬探索スクリーニングに資するシステムを構築し、慢性疼痛薬となる LPA<sub>1</sub> 受容体阻害薬創出に向けて展開する。

(目的)

1. 膜貫通タンパク質 LPA<sub>1</sub> 受容体のホモロジーモデリングの構築
2. 仮想的な立体構造から LPA/LPA<sub>1</sub> の原子レベルの相互作用を解析し、分子構造変換が及ぼすシグナル伝達機構の考察
3. 分子シュミレーションの検証：LPA<sub>1</sub> 変異体のアンタゴニスト活性の比較実験
4. 大規模インシリコ阻害薬探索スクリーニングに適用可能なシステムの構築

(方法と結果) タンパク質の 3 次元構造を得る方法は、X 線結晶構造解析が一般的であるが、GPCR のような大量発現及び結晶化が難しいタンパク質では、計算化学により仮想的構造を得ることが主流である。本研究では、信頼性および正確性を重視し、LPA<sub>1</sub> 受容体のアミノ酸 1 次配列情報から量子計算による *ab initio* (I-TASSER) とホモロジーモデリング (MODELLER, ver 9:11) を組み合わせたハイブリッド型ホモロジーモデリング法を活用した (Fig. 1A)。得られた立体構造と LPA のドッキングシュミレーションを GROMACS MD engine で分子動力学計算したところ、Lys39 のアミノ基と LPA のカルボン酸がイオン結合し、細胞外に局在している N 端ドメインがオルソステリック部

位を覆い隠すような動態が観察された(Fig. 1B)。計算結果を基に、Lys39 の他、細胞外ループ I 領域の Arg124 並びに Asp191、Lys294 もリガンド結合領域に重要であることに着目し、これらのアミノ酸残基に対するアラニン変異体を B-103 細胞を使って作製した。LPA シグナル応答をカルシウムアッセイにて検討したところ、特に 39 及び 124 Lys-Ala 変異体において有意な活性低下が見られた (Fig. 1C)。Asp191 変異体については飽和脂肪酸(LPA14:0)では有意な活性低下が認められたが、不飽和脂肪酸(LPA18:1)ではその変化は小さなものとどまった。しかし、それぞれの発現細胞においては変異体の免疫組織化学的シグナルの確認はできた (Fig. 1D)。

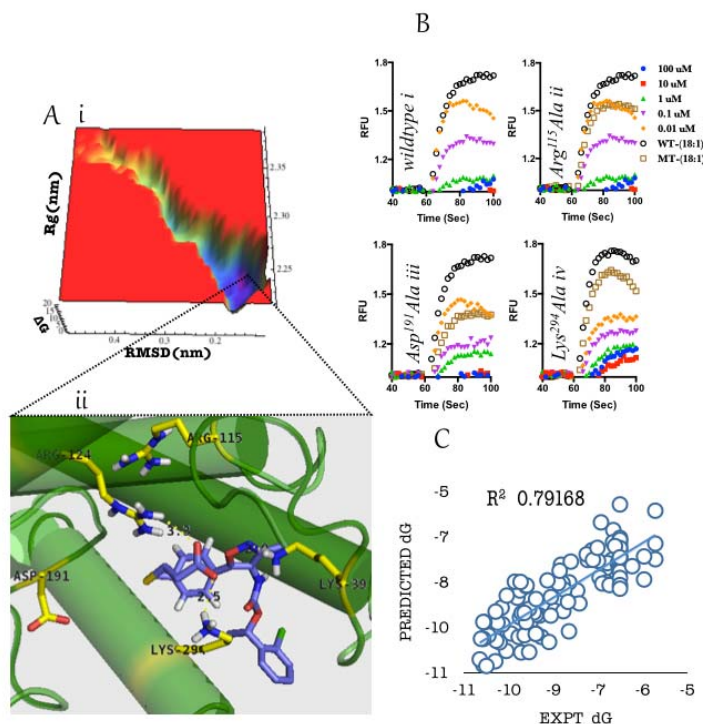


続いて、既存の LPA<sub>1</sub> 阻害薬 Ki16425 の結合様式を分子動力的解析シミュレーションを行って (Fig. 2 A)、速度論的動態を調べた (Fig. 2B)。その結果、LPA と同様 Ki16425 が LPA<sub>1</sub> 受容体と相互作用している様子が観察された。フェニル基上置換基であるイソキサゾール環とメチルチオプロパン酸が Lys294 を挟み込むような立体配座が得られた。イソキサゾール環は Lys39 並びに Lys294 とカチオン - π相互作用をしていることが示唆された。また、メチルチオプロパン酸は、Arg124 と水素結合していることが予想された。

これら計算結果を基に、スクリーニング系に利用できるシステム構築に取り組んだ。当研究室では、21 万東京大学化合物ライブラリーを基にした 4000 万コンフォメーションライブラリーを所有している。通常の高速度コンピューターの精度でも、Molecular Operating Environment (MOE) を用いて、全ての化合物コンフォメーションをドッキング計算するには、多大な時間が掛かる。記述子を組み込んで、データベース中から LPA もしくは Ki16425 と類似構造を有する化合物を予めクラスタリングし、数千化合物まで絞り込めば、円滑に阻害薬探索スクリーニングを実施できる。そこで、分子記述子を用いて LPA 及び Ki16425 のファーマコホア構造と類似する化合物を選出し、分子構造と

結合エネルギーから阻害活性を予測するシステムを構築した。導き出した計算モデルの検証を行うために、約 100 種類の構造既知化合物の LPA<sub>1</sub> アンタゴニスト活性 (IC<sub>50</sub>) と、結合エネルギーの予想値(IC<sub>50</sub>)に対する回帰分析を行ったところ、Fig. 2C に示す相関式 (線形モデル) が得られた。相関係数が  $r^2 = 0.792$  であったことから、予想値と実験値との間には比較的に高い相関関係があり、スクリーニング系に利用可能なレベルの計算結果が見出された。

Fig. 2: **Structural basis for antagonist-LPA<sub>1</sub> interaction and descriptor-based mathematical prediction of LPA<sub>1</sub> antagonism.** (E, i,ii) Following 300 ns MD simulation, the radius of gyration and root mean square deviation of generated structures were projected plot along the 3D free energy surface to show the metastable basins of LPA<sub>1</sub>/Ki16425 complex (i), a representative structure revealed the roles of hydrogen bond and cation-pi interaction between Ki16425 and Arg<sup>124</sup>, Lys<sup>39</sup> and Lys<sup>294</sup> of LPA<sub>1</sub>. (G) mutation of Arg<sup>124</sup>, and Lys<sup>39</sup> alanine resulted in total loss of receptor activation but intracellular Ca<sup>2+</sup> was observed in Lys<sup>294</sup>Ala-LPA<sub>1</sub>-expressing B103 cells at 100 μM Ki16425. (H) Linear correlation graph of mathematical predicted and experimental free energy values with a spearman correlation coefficient ( $r^2$ ) value of 0.792.



(考察と展望) 以上、本研究成果は、複雑な 3 次元構造情報をアミノ酸 1 次配列から取得し、スクリーニング系に利用できることを示唆しており、これまで結晶化が困難とされていた GPCR 等のタンパク質への応用に期待される。今後、変異体の活性評価系から得られる生物学的結果と構造予測プロトコルのチューニングを行い、更なる精密化を試みる。将来的には、慢性疼痛薬となる LPA<sub>1</sub> 受容体阻害薬創出に向けた大規模インシリコスクリーニングを実施する。

## REFERENCES

1. Ueda, H., Matsunaga, H., Omotuyi, O. I., & Nagai, J. (2013). Lysophosphatidic acid: Chemical signature of neuropathic pain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(1), 61-73.
2. Omotuyi, O. I., & Ueda, H. (2013). A Novel Unified Ab Initio and Template-Based Approach to GPCR Modeling: Case of EDG-LPA Receptors. *Current Bioinformatics*, 8(5), 603-610.
3. Omotuyi, O. I., & Ueda, H. (2013). Descriptor-based Fitting of Structurally Diverse LPA<sub>1</sub> Inhibitors into a Single predictive Mathematical Model. *J Phys Chem Biophys*, 3(3), 121