

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	分子動力学シミュレーションによるアポトーシス抑制性タンパク質阻害剤の標的選択性に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	和久井直樹
Author(English)	Naoki Wakui
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10906号, 授与年月日:2018年4月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岩崎 博史,一瀬 宏,伊藤 武彦,清尾 康志,林 宣宏,関嶋 政和
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10906号, Conferred date:2018/4/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

分子動力学シミュレーションによる アポトーシス抑制性タンパク質阻害剤 の標的選択性に関する研究

大学院生命理工学研究科 分子生命科学専攻

和久井 直樹

指導教員：岩崎 博史

2018 年 2 月



東京工業大学

目次

第 1 章 序論	1
1.1 シミュレーションを用いた創薬研究	1
1.2 アポトーシス	3
1.3 創薬標的としての BCL-2 ファミリーとその阻害剤	5
1.4 研究目的	11
1.5 本論文の構成	11
第 2 章 分子シミュレーションの概要	13
2.1 分子力学法	13
2.1.1 分子力場	13
2.1.2 分子内力場	14
2.1.3 分子間力場	15
2.1.4 OPLS 力場	15
2.2 分子動力学法	16
2.2.1 分子動力学法と運動方程式	16
2.3 Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area 法	18
第 3 章 実験手法	19
3.1 タンパク質/阻害剤複合体のモデル構築	19

3.2 構築した複合体構造の妥当性の検証	21
3.3 モデル構造の前処理	22
3.4 MD シミュレーションに用いる系の構築	22
3.5 MD シミュレーションの設定	23
3.6 根平均 2 乗偏差 (Root mean square deviation, RMSD)	25
3.7 根平均 2 乗変動 (Root mean square fluctuation, RMSF)	25
3.8 相互作用解析	26
3.9 クラスタリングを用いた代表構造の抽出	27
3.10 Prime MM-GBSA を用いた結合自由エネルギー変化の推定	28
 第 4 章 タンパク質/阻害剤相互作用解析	 29
4.1 概要	29
4.2 結果と考察	29
4.2.1 モデリングしたタンパク質/阻害剤複合体構造	29
4.2.2 構造の安定性解析	39
4.2.3 BCL-2/Navitoclax 複合体の相互作用解析	42
4.2.4 BCL-XL/Navitoclax 複合体の相互作用解析	44
4.2.5 BCL-2/ABT-199 複合体の相互作用解析	45
4.2.6 BCL-XL/ABT-199 複合体の相互作用解析	47
4.2.7 BCL-2/A-1155463 複合体の相互作用解析	49
4.2.8 BCL-XL/A-1155463 複合体の相互作用解析	51
4.2.9 BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-XL/Navitoclax 複体の相互作用比較	53
4.2.10 BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-2/ABT-199 複体の相互作用比較	56

4.2.11 BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-XL/ABT-199 複体の相互作用比較	59
4.2.12 BCL-XL/Navitoclax と BCL-XL/A-1155463 の相互作用比較	63
4.2.13 BCL-2/A-1155463 と BCL-XL/A-1155463 の相互作用比較	66
4.2.14 ABT-199 の BCL-2 選択性	70
4.2.15 A-1155463 の BCL-XL 選択性	75
 第 5 章 MM-GBSA 法を用いた結合自由エネルギー解析	 81
5.1 概要	81
5.2 結果と考察	81
5.2.1 MM-GBSA 法による結合自由エネルギー変化の推定	81
5.2.2 アミノ酸ごとの結合自由エネルギー変化への寄与	84
 第 6 章 計算機上での変異体解析および新規阻害剤の提案	 89
6.1 概要	89
6.2 BCL-2(D103E)/ABT-199 複体の相互作用解析および結合自由エネルギー変化の推定	89
6.2.1 モデリングした BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体	89
6.2.2 BCL-2(D103E)/ABT-199 複体の構造安定性	91
6.2.3 BCL-2(D103E)/ABT-199 複体の相互作用解析	94
6.2.4 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-2/ABT-199 複体の相互作用比較	96
6.2.5 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-XL/ABT-199 複体の相互作用比較	101
6.2.6 変異導入による結合自由エネルギー変化の推定	104

6.3 BCL-2/ABT-199 複合体および BCL-XL/ABT-199 複体の相互作用解析に基づいた新規化合物の提案	106
6.3.1 提案する化合物の二次元構造	106
6.3.2 モデリングした BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体および BCL-XL/Indole 型 ABT-199 誘導体複体の構造	106
6.3.3 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-XL/Indole 型 ABT-199 誘導体複体の構造安定性	108
6.3.4 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複体の相互作用解析	108
6.3.5 BCL-XL/Indole 型 ABT-199 誘導体複体の相互作用解析	113
6.3.6 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-XL/Indole 型 ABT-199 誘導体複体の相互作用比較	115
6.3.7 提案化合物の結合自由エネルギー変化の推定	118
 第 7 章 結論	 120
 参考文献	 122
 謝辞	 141

第 1 章

序論

1.1. シミュレーションを用いた創薬研究

薬剤は我々の健康のために無くてはならない存在であるが、新規の薬剤を創出する創薬分野の研究開発には膨大な費用と期間が必要とされている。近年では、1 剤が上市されるまでの研究開発費は、約 3000 億円とおよそ 12 年から 14 年の期間が必要であると見積もられており[1,2]、その期間および費用を削減するための効率的な創薬手法が求められている。創薬の初期段階である探索研究において活性化合物を探索する手法としては、ハイスループットスクリーニング(High-throughput screening: HTS)やコンビナトリアルケミストリーなどが挙げられる[3,4]。HTS は大量の化合物の中から阻害活性を示す化合物を探索するためにマイクロプレートを用いて実験の一連の流れを専用のアッセイロボットによって行うシステムであり、コンビナトリアルケミストリーは化合物の合成をロボットによって自動化し、高速に多種多様な化合物の取得を行う方法である。一方、1960 年代以降、X線結晶構造解析による立体構造解析が発展していくと同時に、タンパク質や薬剤候補化合物の立体構造情報や、分子シミュレーションなどのコンピューターを用いた創薬手法への注目が高まった[5-7]。近年では、創薬研究において後述するような計算機を用いた手法が適用されており、多くの研究で新たな薬剤候補化合物の発見に成功している[8-11]。

創薬研究における計算機を用いた手法は、構造情報に基づいた薬剤設計 (Structure-based drug discovery、SBDD) [12]と化合物情報に基づいた薬剤設計

(Ligand-based drug discovery、LBDD) [13,14]の2つに大別できる。SBDDでは、X線回折や核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR)を用いて得られた標的タンパク質の立体構造を用いて標的タンパク質と薬剤候補化合物の結合親和性を予測する。ここでは主にタンパク質-リガンドドッキングや後述する分子動力学法といった分子シミュレーションが用いられる。LBDDでは、過去の生物学的実験によって得られた化合物の結合親和性情報を用いて標的タンパク質と薬剤候補化合物の結合親和性を予測する。ここでは主に定量的構造活性相関や機械学習といった統計的手法が用いられる。

X線結晶構造解析によってタンパク質などの生体高分子の構造が明らかになったのと同時に、タンパク質を構成する原子の運動が基質や阻害剤などの結合の過程において重要な役割を担っていることが明らかになり、シミュレーションによる生体高分子の挙動の予測の重要性が認識されるようになった。しかしながら、一般的なタンパク質-化合物系の全原子に対して量子化学計算を行うことは計算量の観点から困難であるため、実用性のある生体高分子用のシミュレーション方法が求められていた。

分子動力学法 (Molecular Dynamics、MD)シミュレーションとは、多原子系における原子の運動を、原子間の相互作用を計算しながら、個々の原子に対するニュートンの運動方程式を数値的に積分することにより計算機上で再現する手法である。このような積分は解析的に計算することが不可能であるため、原子をおもり、結合をばねとして扱う単純なモデル化を行うことで、ニュートンの運動方程式に従って生体高分子の細胞内での挙動を原子分解能で捉えることを可能にしている。このシミュレーションでは、運動方程式に従って変化した構造を保存し、構造変化の時系列を得ることが出来る。この構造の時系列変化を捉えたデータは、軌跡もしくはトラジェクトリ (Trajectory) と呼ばれている。多くの MD シミュレーションは、古典力学に基づいて行われており、生体高分子などの複雑な系にも適用可能である。初期の MD シミュレーション手法として、1950 年代後半に Alder と Wainwright によって剛体球の MD 法が開発された。剛体球系では、対象

となる系の中に複数の粒子が存在するが、それらの粒子間の相互作用は全く考慮せず、衝突のみが考慮されている[15]。また、1977 年に Karplus と McCammon は MD 法をタンパク質に応用し、「タンパク質は動的な系である」という概念を主張した[16]。現在では一般的な概念ではあるが、当時の「タンパク質は剛体である」という概念を転換するきっかけとなった。1980 年以降では、温度や圧力、化学ポテンシャルなどを制御する方法が導入され、実際の実験系により近いシミュレーションが行われるようになった[17-19]。現在利用できる MD シミュレーションのソフトウェアは、AMBER[20,21]、CHARMm[22]、NAMD[23,24]、及び GROMACS[25] などが知られている。現在ではこれらのソフトウェアによって核酸、生体膜やタンパク質など様々な生体高分子の MD シミュレーションが行われており[26-34]、近年の研究では MD シミュレーションがタンパク質と薬剤の結合にかかわる分子メカニズムを解析するために用いられている[35-38]。MD シミュレーションから得られる物理化学的な知見は、計算機を用いた創薬研究、特にシード化合物やリード化合物の発見に貢献している[39]。

1.2. アポトーシス

I 型プログラム細胞死もしくはアポトーシス (apoptosis) として知られている現象は 1970 年代初頭に初めて定義され[40]、正常な発達、組織の恒常性、および損傷した細胞の除去などにおいて重要な役割を果たしている。具体例として、T 細胞の免疫系では、T 細胞受容体が正しく形成されなかった場合や、生体内に存在する抗原を認識したとき、その細胞はアポトーシスで除去される[41]。自己免疫疾患であるインスリン依存型糖尿病や関節リウマチなどはアポトーシスによる除去が正常に行われていないことが原因である[42]。また、アポトーシスはウイルスなどに感染した細胞を除去することによっ

てウイルス複製を防ぐ、修復不可能な DNA 損傷を持つ悪性腫瘍の原因となる細胞を取り除くといった身体の防御系でも重要な役割を担う。従って、アポトーシス過程の異常はがんや自己免疫疾患など様々なヒトの疾患に関連することが知られている[43,44]。また、悪性の腫瘍細胞はアポトーシスを回避する能力を有する[45]。

アポトーシスの経路には、3 種の *ced* (cell death abnormal) と *EGL-1* (*egg-laying defective-1*) と呼ばれる遺伝子産物が関与している[46]。CED-3 はアポトーシスを誘発させるシステインプロテアーゼであり、カスパーゼというプロテアーゼファミリーの一種である。CED-4 は Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) と呼ばれており、その呼び名が示す通りカスパーゼである CED-3 を活性化させるスキファオールドタンパク質である。CED-9 は BCL-2 ファミリーのメンバーで、このファミリーに所属する多くのタンパク質は CED-4 を不活性化させ細胞をアポトーシスから守る機能を有する。逆に EGL-1 は同じ BCL-2 ファミリーではあるが、CED-9 を阻害するためアポトーシスを誘発させる。CED-9 が不活性化、もしくは EGL-1 が異常に発現した場合、CED-4 と CED-3 を活性化させて多くの細胞をアポトーシスによって除去してしまうため、結果として胚が成長せず死んでしまう。逆に CED-3 もしくは CED-4 が不活性化、もしくは CED-9 が異常に発現した場合、不必要な細胞が生存する。これらの CED や EGL-1 に対応するタンパク質はすべての哺乳動物の経路で見出されている[47-49]。

アポトーシス抑制性タンパク質である CED-9 と、アポトーシス促進性タンパク質である EGL-1 が属する BCL-2 ファミリーは、哺乳類では 15 種のメンバーが知られており、3 つのグループに分けられている[50]。グループ I は BCL-2 と BCL-X_L を含み、全てのメンバーが短い相同的なアミノ酸残基の領域である BH (BCL-2 homology region) 1 から 4 と、C 末端に疎水性の配列を有する。この疎水性の配列は、ミトコンドリアの外膜や小胞体膜に組み込まれ、タンパク質のほとんどがサイトゾルへ露出するような配向になる。グループ I に属するメンバーはアポトーシス抑制性タンパク質であ

る。グループ II は BAX と BAK を含み、前述したグループ I のメンバーと類似しているが、BH4 領域が欠落しており、全てのメンバーがアポトーシス促進性タンパク質である。グループ III は BAD、BID、BIK、BIM、BLK を含み、BH3 領域しか有していないため、それ以外に BCL-2 との配列類似性は見られない。そのため、このグループに属するメンバーは BH3-オンリータンパクと呼ばれ、全てアポトーシス促進性タンパク質である。

1.3. 創薬標的としての BCL-2 ファミリーとその阻害剤

BCL-2 ファミリータンパク質はアポトーシスを制御しがん治療における潜在的な創薬標的である[51,52]。今日までに、BCL-2 ファミリーに属する複数のアポトーシス抑制性タンパク質、BCL-2、BCL-X_L、BCL-W、BCL-2A1 や MCL1 が同定され、それらに対する選択的阻害剤の開発も行われている[53-59]。

アポトーシス抑制性タンパク質である BCL-2 は、ほとんどの B 細胞由来リンパ腫や結腸および直腸腺がんなど多くのがん細胞において過剰発現することが見出されている[60-66]。BCL-2 は様々な長さのループによって連結された 8 つの α ヘリックスで構成されている (図 1 - 1 (a))。2 つの中央ヘリックス (α ヘリックス 5 および α ヘリックス 6) はタンパク質のコアを形成している。これら 2 つの α ヘリックスは疎水性であり、片側が α ヘリックス 3 と α ヘリックス 4、他方が α ヘリックス 1 と α ヘリックス 2 によって挟まれた構造となっている。 α ヘリックスの 2、3、4、5、8 はタンパク質の表面上に細長い疎水性の溝を形成している (図 1 - 1 (b))。この疎水性の溝にアポトーシス促進性タンパク質やアポトーシス抑制性タンパク質の阻害剤が結合することが知られている[67-76]。

BCL-2 と同様にアポトーシス抑制性タンパク質である BCL-X_L の過剰発現は、複数の固形腫瘍および血液悪性腫瘍の薬剤耐性および疾患進行と関係している[77-82]。BCL-2 と同様に、BCL-X_L は 8 つの α ヘリックスから構成され、タンパク質表面上に疎水性の溝を有するタンパク質である（図 1 - 1 (c), (d)）。 α ヘリックス 3 によって構成される疎水性の溝の底は BCL-2 に比べていくらか狭くなっている。これらのタンパク質のアミノ酸配列において、疎水性の溝の性質を変化させるような違いがいくつか存在する。例えば、BCL-X_L 中の Ala-104 と BCL-2 の Asp-111、BCL-X_L 中の Leu-108 と BCL-2 中の Met-115 や BCL-X_L 中の Ser-122 と BCL-2 中の Arg-129 などである。疎水性の溝の静電特性などの相違はアポトーシス促進性タンパク質の結合に影響を及ぼし、アポトーシス促進性タンパク質への異なる特異性を生み出していると考えられる[83]。

BCL-2 ファミリータンパク質は配列相同性があり、例えば BCL-2 と BCL-X_L のアミノ酸配列の一致度は 50% である（図 1 - 2）。これらタンパク質のアミノ酸配列が類似していることから、3 次元構造もまた非常に類似しており、BCL-2 に結合する阻害剤は BCL-X_L にも結合することが容易に想像できる。標的選択性は創薬研究において、副作用に影響を与える重要な要因の一つである[84,85]。しかし、同一ファミリーに属し非常に高い配列類似性を示すタンパク質に対して選択性の高い薬剤を設計することは困難であるとされる[86]。Navitoclax[87]は経口投与可能な低分子化合物であり BCL-2 および BCL-X_L に結合する（図 1 - 3）。前臨床試験において、Navitoclax はリンパ系悪性腫瘍に対して抗腫瘍活性を示したが、副作用として血小板減少症が確認された[88,89]。これはリンパ系悪性腫瘍のアポトーシスが BCL-2 によって制御され、血小板のアポトーシスが BCL-X_L によって制御されており Navitoclax が両方のアポトーシスを誘導したためと考えられている[90,91]。Navitoclax の前臨床試験での結果は BCL-2 ファミリータンパク質を標的とする選択的阻害剤の開発を促した。

ABT-199[73]は BCL-2 を選択的に阻害し、A-1155463 [92]は BCL-X_L を選択的に阻害す

る。ABT-737[67]と Navitoclax は BCL-2 と BCL-X_L の両方に結合し、BCL-X_L/ABT-737[93]、BCL-2/Navitoclax[73]の共結晶構造がすでに報告されている。また、BCL-X_L/WEHI-539 複合体、BCL-X_L/Compound 10[94]複合体の共結晶構造も報告されている。

ABT-199 の 2 次元構造を図 1 - 4 に示し、BCL-2 および BCL-X_L との阻害定数 K_i を表 1 - 1 にまとめた。ABT-199 はアポトーシスを引き起こすように設計された経口投与可能な BCL-2 選択的阻害剤であり、難治性の慢性リンパ球性白血病（chronic lymphocytic leukemia, CLL）の治療薬として 2016 年にアメリカ食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）の承認を受けている。A-1155463 の構造を図 1 - 5 に示し、BCL-X_L と BCL-2 への阻害定数 K_i を表 1 - 1 に示した。A-1155463 は BCL-X_L に対してサブ nM の阻害定数を有する BCL-X_L 選択的阻害剤であり、ヒト小細胞肺癌由来のがん細胞の増殖を阻害することが報告されている。

図 1 - 2 に示す通り、BCL-2 と BCL-X_L は高いアミノ酸配列の相同性と類似した立体構造を持つにも関わらず、ABT-199 は BCL-2 を選択的に阻害し、A-1155463 は BCL-X_L を選択的に阻害する。しかしながら、BCL-2/ABT-199 複合体、BCL-2/A-1155463 複合体、BCL-2/WEHI-539 複合体、BCL-2/Compound 10 複合体、BCL-X_L/ABT-199 複合体と BCL-X_L/Navitoclax 複合体の共結晶構造は未だ報告されていない。タンパク質機能の阻害にかかわる分子メカニズムを解明するためには、タンパク質の立体構造だけでなく、タンパク質の動的性質やタンパク質/阻害剤間の相互作用などを明らかにする必要がある。生体高分子の動的性質を調べるために用いられる MD シミュレーションは、静的構造中で見られる相互作用だけでなく、アミノ酸と阻害剤原子との間の動的な相互作用を調べる事が可能である。また、選択的阻害剤と標的となるタンパク質が結合した複合体構造は実験的に得ることが可能であるが、標的でないタンパク質との複合体構造を実験的に得ることはそのタンパク質への親和性の低さなどから困難であると考えられる。このことから、選択性のメカニズムを相互作用の観点から考察するためには、計算機上

で複合体構造を推定することも必要であると考えられる。タンパク質/阻害剤複合体モデリングは、複合体構造を計算機上で仮想的に生成する手法である。この手法は幅広く使われており、MD シミュレーションと組み合わせて使うことが可能である[95-99]。

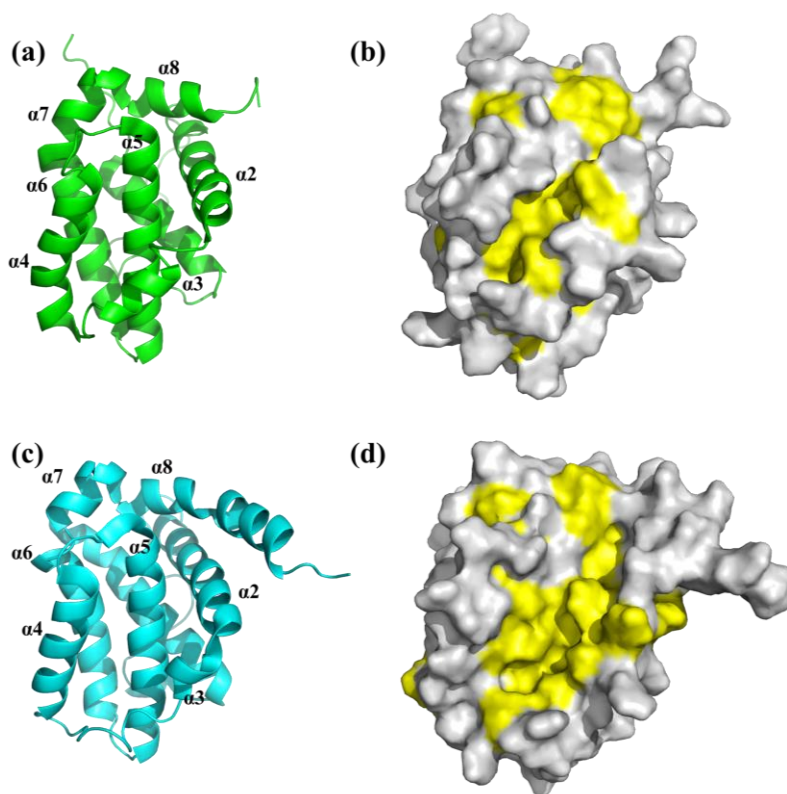


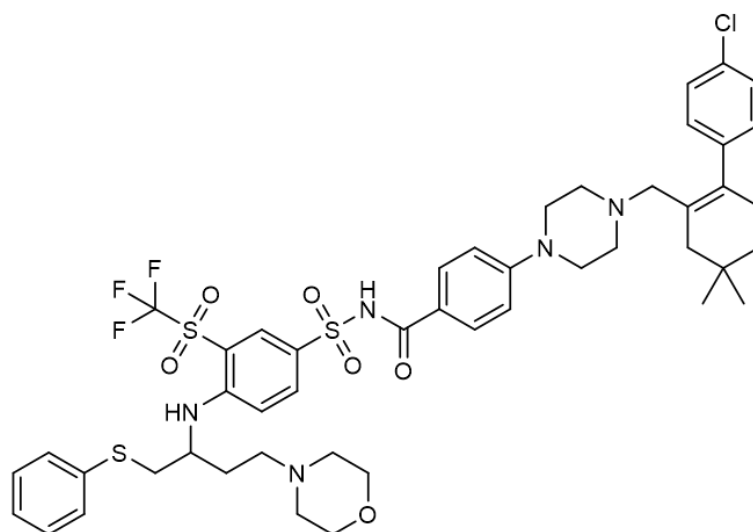
図 1 - 1 BCL-2 と BCL-X_L の立体構造

Protein Data Bank (PDB) [100]から取得した BCL-2 の立体構造 (PDB ID: 1G5M) と BCL-X_L の立体構造 (PDB ID: 1G5J)。構造決定は NMR によって行われた。BCL-2 は 3 - 207 残基目までの構造、BCL-X_L は 1 - 209 残基目までの構造となっている。(a)、(c) BCL-2 を緑、BCL-X_L をシアンの Cartoon モデルで示した。 α ヘリックス 2 から 8 までをそれぞれ示した。(b)、(d) BCL-2 と BCL-X_L を灰色の Surface モデルで示した。アポトーシス促進性タンパク質や低分子阻害剤が結合する疎水性の溝を構成する α ヘリックス 2、3、4、5、8 中のロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、アラニンを黄色で色付けした。

		$\alpha 1$		
Bcl-2	MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDA GDVGAAPPGAAPAPGIFSSQPGHTPHPA			60
Bcl-XL	- - - - -MSQSNRELVDVFLSYKLSQKGYSWSQFSDVEENRTEAPEG - - - TESEMETPSAI			51
	 * * * * * : : : : : * * * * * : : * * .			
		$\alpha 2$	$\alpha 3$	
Bcl-2	ASRDPVARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVPP - - VVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQ			118
Bcl-XL	NGNP SWHLADSPAVNGATGHSSSLDAREV I PMAAVKQALREAGDEFELRYRAFSDLTSQ			111
	 : : * * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * *			
		$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$
Bcl-2	LHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMT			178
Bcl-XL	LHITPGTAYQSFEQVVNELFRDGVNWGRIVAFFSFGGALCVESVDKEMQVLVSRIAAWMA			171
	* * : * * * * * * * : * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * : * * : * * : * *			
		$\alpha 7$	$\alpha 8$	
Bcl-2	EYLNRLHTWIQDNGGWDAFVELYG - PSMRPLFDFSWLSLKTLLSLALVGACITLGAYLG			237
Bcl-XL	TYLNDHLEPWIQENGWDTFVELYGNNAAAE SRKGQERFNRWFLTGMTVAGVVLLGSLFS			231
	* * * * * . * * * : * * * * : * * * * * : . . . : : * * : * * : . .			
Bcl-2	HK			
Bcl-XL	RK			
	: *			

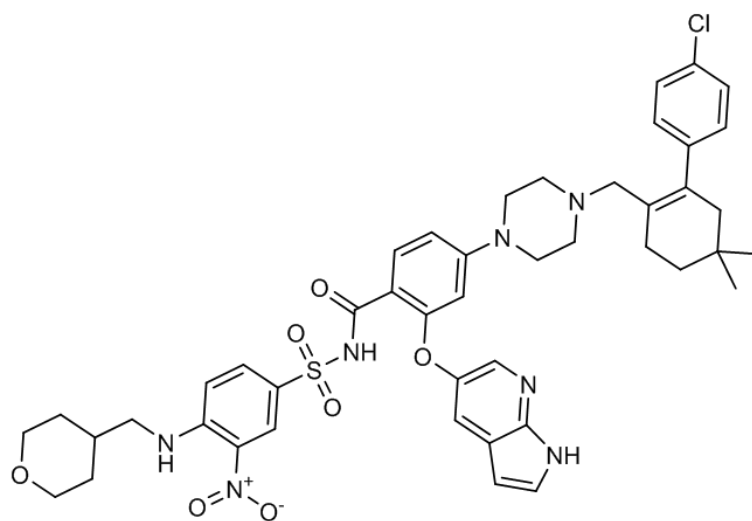
図 1 - 2 BCL-2 と BCL-X_L のアミノ酸配列アライメント

BCL-2 と BCL-X_L のアミノ酸配列で一致しているところはアスタリスク (*), 保存的置換はコロン (:), 半保存的置換はピリオド (.) で示してある。これまでに構造解析された BCL-2 と BCL-X_L の立体構造から、 α ヘリックスの位置も示してある。



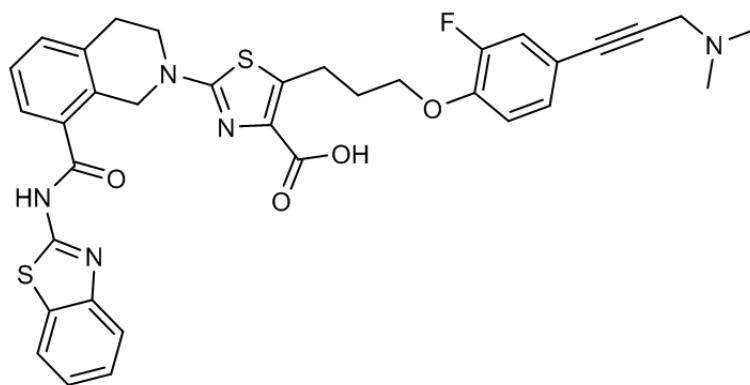
Navitoclax

図 1 - 3 Navitoclax の 2 次元構造



ABT-199

図 1 - 4 ABT-199 の 2 次元構造



A-1155463

図 1 - 5 A-1155463 の 2 次元構造

表 1 - 1 Navitoclax と ABT-199 と A-1155463 の BCL-2 および BCL-X_L との阻害定数

薬剤	BCL-2	BCL-X _L
	K_i (nM)	K_i (nM)
Navitoclax	< 0.044	< 0.055
ABT-199	< 0.010	48
A-1155463	80	< 0.01

1.4. 研究目的

本研究では、計算機を用いたタンパク質/阻害剤複合体モデリングと MD シミュレーションを用いて標的選択性に影響を与える分子メカニズムを明らかにする。本研究では ABT-199 または A-1155463 と BCL-2 および BCL-X_L との複合体構造に関する MD シミュレーションの結果を用いて、BCL-2 および BCL-X_L 選択性を与える分子メカニズムに関する知見を得ることを目的とする。さらに、得られた知見に基づいて新規化合物の提案を行うことも目的とする。

1.5. 本論文の構成

第 2 章では本研究で用いた分子シミュレーションの概要について述べる。第 3 章では実際に行った実験手順について述べる。第 4 章では分子動力学シミュレーション (MD シミュレーション) と相互作用解析に基づいて、ABT-199 の BCL-2 選択性と A-1155463 の BCL-X_L 選択性に関わる相互作用およびアミノ酸について考察する。第 5 章では、MM-GBSA 法に基づいて第 4 章の結果から示唆された重要なアミノ酸がエネルギー的どの程度選択性に寄与しているかを考察する。第 6 章では第 4 章および第 5 章から得ら

れた知見を基に BCL-2 の変異体を作成し、変異体と ABT-199 との相互作用について述べる。さらに新規化合物を提案しその BCL-2 選択性について MD シミュレーションと MM-GBSA の結果を基に議論を行う。最後に第 7 章で本研究の総括を行う。

第 2 章

分子シミュレーションの概要

2.1. 分子力学法

分子力学 (Molecular mechanics, MM) 法は分子のポテンシャルエネルギーを求める力学的な手法である。分子のエネルギーを厳密に求めるにはシュレーディンガー方程式を解く必要があるが、核酸やタンパク質などの生体高分子のシュレーディンガー方程式を直接解くことは容易ではない。一方、詳細な電子構造がわからなくても、安定構造が予測できれば解決できる問題も多い。そこで、共有結合をばねとして扱うなどのモデル化により、巨大な分子のエネルギーを計算できるように考え出されたのが MM 法である。

MM 法では分子の全ポテンシャルエネルギー $V(\mathbf{R}^N)$ を①分子内の結合の伸縮エネルギー、②結合角の変角エネルギー、③ねじれ角のねじれエネルギー、④非結合相互作用エネルギーという 4 つのエネルギー成分の和で表せると仮定する。ここで、 $\mathbf{R}^N$ は N 個の原子群の位置座標 $(\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_N)$ をまとめて表したものである。このとき用いる 4 つのエネルギー成分を評価する関数を、その関数を規定するパラメータとあわせて分子力場 (Molecular Force Field) という。

2.1.1. 分子力場

分子集合系に対する分子力場 $V(\mathbf{R}^N)$ は、分子内力場 (Intramolecular Force Field) V^{intra} と分子間力場 (Intermolecular Force Field) V^{inter} との和として、式(2. 1)のように表現で

きる。

$$V = V^{intra} + V^{inter} = \sum_{I=1} V_I^{intra}(\mathbf{R}_I^N) + \sum_I \sum_{J < I} V_{IJ}^{inter}(\mathbf{R}_I^N, \mathbf{R}_J^N) \quad (2.1)$$

ここで、 V^{intra} は化学結合でつながった個々の分子内の力場を表し、 V^{inter} は化学結合していない、分子間相互作用に対応する力場を表している。また、 $\mathbf{R}_I^N$ は I 番目の分子の分子内の原子位置を表すための位置変数（分子内変数）をまとめて表している。 I と J はこの分子集合系に含まれている分子の総数だけ値が変化する。

2.1.2. 分子内力場

分子モデルとして、球棒（Ball and Stick）モデルを考える。ある1つの分子に対して、原子を球、化学結合を棒で表すことにする。分子内変数として以下の3つを考える。

- (1) 結合長 L
- (2) 結合角 θ
- (3) ねじれ角 φ

このとき、分子集合系の中の分子群の分子内力場 $V_I^{intra}(\mathbf{R}_I^N)$ の全体は、式(2.2)のように表現できる。

$$\begin{aligned} V^{intra} &= \sum_{I=1} V_I^{intra}(\mathbf{R}_I^N) \\ &= \sum_{I=1} \left(\sum_{bonds} V_I^R(L_I) + \sum_{angles} V_I^\theta(\theta_I) + \sum_{dihedrals} V_I^\varphi(\varphi_I) \right) \end{aligned} \quad (2.2)$$

ここで、 $\mathbf{R}_I$ は I 番目の分子の原子位置を表すための分子内変数 L_I, θ_I, φ_I を指している。 N はこの分子集合系に含まれる原子の総数である。また、 $\Sigma_{bonds}, \Sigma_{angles}, \Sigma_{dihedrals}$ はそれぞれの分子内に存在しているすべての化学結合、結合角、ねじれ角について和をとることを簡略的に示している。それぞれ、伸縮振動、変角振動、ねじれ振動に対応する力場を表す。

2.1.3. 分子間力場

分子間力場 $V_{IJ}^{inter}(\mathbf{R}_I^N, \mathbf{R}_J^N)$ を表すための分子間変数として以下の2つを考える。

- (1) 原子核間距離 $R_{ij}^{nucleus}$
- (2) 点電荷間距離 R_{ij}^{charge}

このとき、分子間力場 $V_{IJ}^{inter}(\mathbf{R}_I^N, \mathbf{R}_J^N)$ の全体は、式(2.3)のように表現できる。

$$\begin{aligned} V^{inter} &= \sum_{I=1} \sum_{J < I} V_{IJ}^{inter}(\mathbf{R}_I^N, \mathbf{R}_J^N) \\ &= \sum_{I=1} \sum_{J < I} \left(\sum_{i \in I}^{atoms} \sum_{j \in J}^{atoms} V_{ij}^{vdW}(R_{ij}^{nucleus}) + \sum_{i \in I}^{atoms} \sum_{j \in J}^{atoms} V_{ij}^{est}(R_{ij}^{charge}) \right) \end{aligned} \quad (2.3)$$

最右辺の大きな括弧内の第1項は、 I 番目と J 番目の分子間のファンデルワールス相互作用を表し、第2項は静電相互作用を表している。

2.1.4. OPLS 力場

OPLS 力場[101]は1996年にJorgensenらによって報告され、様々な低分子化合物の溶液中での熱力学的特性を再現するために広範囲にわたってパラメータの最適化が行われた最初の力場の1つであった。OPLS 力場の関数形は式(2.4)のように表現される。

$$\begin{aligned} E &= \sum_{i < j} \left[\frac{q_i q_j e^2}{r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) \right] f_{ij} \\ &+ \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\ &+ \sum_{dihedrals} \left[\frac{V_1}{2} (1 + \cos \varphi) + \frac{V_2}{2} (1 - \cos 2\varphi) + \frac{V_3}{2} (1 + \cos 3\varphi) \right. \\ &\quad \left. + \frac{V_4}{2} (1 - \cos 4\varphi) \right] \end{aligned} \quad (2.4)$$

ここで、結合長および結合角に関するエネルギーは調和型で表現され、 r_{eq} と θ_{eq} はそれぞれ平衡時の結合長および結合角を表す。ねじれ角はすべての二面角を合計したフーリエ級数の第4項までの和によって表現されている。分子間相互作用エネルギーは i と j で

示した相互作用可能な分子内原子対の静電相互作用とレナード・ジョーンズの項の和として表現されている。3 結合距離以下の分子内原子対のエネルギーは f_{ij} によってスケールされている。レナード・ジョーンズ項の ϵ_{ij} と σ_{ij} は特有のパラメータに基づいている。

医薬品候補化合物空間に適切に対応するために、OPLS3 力場では他の一般的に利用されている低分子化合物力場と比較して一桁以上多い参照データおよび関連するパラメータを有している[102]。

2.2. 分子動力学法

分子動力学 (Molecular dynamics, MD) 法は系を構成する原子 1 つ 1 つに対する運動方程式を数値積分して、位置、速度、エネルギーなどの時間変化を追跡する。これにより、計算機上で分子や原子の動きを再現し、分子系の動的な構造変化や機能発現の仕組みを明らかにすることが可能である。

2.2.1 分子動力学法と運動方程式

分子は古典力学に従い、原子はそれぞれ質量 m_i をもつ質点として扱われている。周りに力を受けて運動する原子の運動は、式(2. 5)に示すニュートンの運動方程式に従っている。

$$F_i(t) = m_i a_i(t) = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (2. 5)$$

ここで、 $r_i(= (x_i, y_i, z_i))$ は i 番目の原子の位置ベクトル、 $F_i(t)$ は i 番目の原子に働く力を表し、その原子のもつ加速度および質量は $a_i(t)$ と m_i と表される。原子は式(2. 5)に従って運動するので、初期条件となる時刻 0 での原子 i の位置 $r_i(0)$ と速度 $v_i(0)$ がわかると、原理的にはその後の原子の位置と速度を知ることができる。しかし、生体高分子のよう

な多数の原子の相互作用が関係している系では解析的に解くことができない。そこである時間きざみごとに、時間に沿って逐次数値的に答えを求めていく必要がある。まず現在の時刻 t から Δt 秒だけ進んだ状態($t + \Delta t$)と Δt だけ遡った状態($t - \Delta t$)における i 番目の原子の位置 $r_i(t \pm \Delta t)$ を、時刻 $t = t$ のまわりでテイラー展開する。

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \Delta t \frac{dr_i(t)}{dt} + \frac{\Delta t^2}{2!} \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} + \frac{\Delta t^3}{3!} \frac{d^3 r_i(t)}{dt^3} + O(\Delta t^4) \quad (2.6)$$

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - \Delta t \frac{dr_i(t)}{dt} + \frac{\Delta t^2}{2!} \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} - \frac{\Delta t^3}{3!} \frac{d^3 r_i(t)}{dt^3} + O(\Delta t^4) \quad (2.7)$$

式(2.6)と(2.7)の Δt^3 以降を無視し両辺を足し合わせると、以下ようになる。

$$r_i(t + \Delta t) + r_i(t - \Delta t) = 2r_i(t) + \Delta t^2 \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (2.8)$$

さらに、式(2.8)に式(2.5)を代入すると、以下ようになる。

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m_i} F_i(t) \quad (2.9)$$

式(2.9)は、 i 番目の原子の現在の位置と力、そして Δt 秒前の位置から Δt 秒後の位置が求まる事を表している。式(2.9)の力 $F_i(t)$ は

$$F_i = -\nabla_i V = \left(-\frac{\partial V}{\partial x_i}, -\frac{\partial V}{\partial y_i}, -\frac{\partial V}{\partial z_i} \right) = (F_{x_i}, F_{y_i}, F_{z_i}) \quad (2.10)$$

として計算できる。ここで、 V はポテンシャルエネルギーを表しており、多くの分子動力学計算では 2.1.1 で述べた分子力場そのものと同義である。従って、分子のポテンシャルエネルギーの勾配を求めることができれば、すべての原子に対して Δt 秒だけ先の位置を求める事ができる。この計算を逐次実行することにより系の時間発展、すなわち全原子のトラジェクトリを追跡することが可能となる。式(2.9)中の時間きざみを表す Δt は、計算対象とする系の最も早い運動周期よりも短くとる必要がある。生体高分子系で最も早いと考えられている水素原子の振動周期が 10 fs 程度であり、この振動を十分な精度で近似するために、1 から 2 fs 程度の値が用いられることが多い。

2.3. Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area 法

Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area (MM-GBSA) 法[103]は結合自由エネルギー変化を推定する方法である。

熱力学の基本原則から、結合の自由エネルギー変化 ΔG_{bind} はエンタルピー変化 ΔH とエントロピー変化 ΔS を用いて式(2. 11)のように表すことができる。

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S \quad (2. 11)$$

ただし、エントロピー変化 ΔS は直接計算することができないため、基準振動解析を用いて調和近似のもとで計算するか、阻害剤を変えたときのエントロピー変化の変化 $\Delta\Delta S$ は小さいと考慮して無視することもある。式(2. 11)中のエンタルピー変化 ΔH はタンパク質と阻害剤の相互作用から生じる項と溶媒分子との相互作用から生じる項で分けて考えることができ、式(2. 12)のようになる。

$$\Delta G_{bind} \approx \Delta E + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (2. 12)$$

ΔE を計算するのに、MM 法を用いる。また、溶媒分子との相互作用から生じる項はさらに、一般化ボルン (Generalized Born, GB) モデルから求められる極性項 ΔG_{GB} と溶媒露出面積 (Solvent-accessible surface area, SASA) から求められる非極性項 ΔG_{SA} に分けることができ、式(2. 13)のようになる。

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{GB} + \Delta G_{SA} \quad (2. 13)$$

第 3 章

実験手法

3.1. タンパク質/阻害剤複合体のモデル構築

ABT-199 と A-1155463 の標的選択性に関する知見を得るためには、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の相互作用比較および BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体の相互作用比較が必要であると考えられる。さらに、ABT-199 および A-1155463 よりも前に開発された Navitoclax は BCL-2 と BCL-X_L の両方を阻害することから BCL-2/Navitoclax 複合体および BCL-X_L/Navitoclax 複合体で形成される相互作用は選択的阻害剤に対する基準になると考えられる。よって、6 つのタンパク質/阻害剤複合体の構造を用意することとした。

6 つのタンパク質/阻害剤複合体のうち、BCL-2/Navitoclax 複合体[73]および BCL-X_L/A-1155463 複合体[92]は結晶構造が報告されている（それぞれの PDB ID : 4LVT, 4QVX）。これら、2 つの複合体に関しては構造情報を PDB から取得し初期構造として用いた。

4 つのタンパク質/阻害剤複合体（BCL-2/ABT-199 複合体、BCL-X_L/ABT-199 複合体、BCL-2/A-1155463 複合体、BCL-X_L/Navitoclax 複合体）を構築するために、BCL-2/Navitoclax analog 複合体（PDB ID : 4MAN）、BCL-2/Navitoclax 複合体（PDB ID : 4LVT）、BCL-X_L/A-1155463 複合体（PDB ID : 4QVX）と BCL-X_L/HBx-BH3 motif 複合体（PDB ID : 5B1Z）の構造情報を PDB から取得した。BCL-2/Navitoclax analog 複合体に含まれる Navitoclax analog 複合体は目的とする阻害剤 ABT-199 に最も類似している

(MACCS keys[104]を用いた 2 つの化合物間の Tanimoto 係数が 0.908) ことからこの構造を選択した。また、BCL-X_L/HBx-BH3 motif 複合体は BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-2/Navitoclax analog 複合体に類似している (タンパク質の C α で重ね合わせたときの RMSD がそれぞれ 0.359 と 0.451) ことからこの構造を選択した。

BCL-2/ABT-199 複合体を構築するために、BCL-2/Navitoclax analog 複合体を用いた。Navitoclax analog から ABT-199 への変換はソフトウェア Maestro[105]に実装されている“3D Builder”機能を用いた (図 3 - 1)。

BCL-X_L/ABT-199 複合体の構築には BCL-X_L/HBx-BH3 motif 複合体 (PDB ID : 5B1Z) と BCL-2/ABT-199 複合体を用いた。BCL-X_L/HBx-BH3 motif 複合体と BCL-2/ABT-199 複合体の構造をタンパク質の C α 原子で重ね合わせを行い、HBx-BH3 motif と BCL-2 の構造を削除し BCL-X_L/ABT-199 複合体の構造を得た。BCL-2/A-1155463 複合体の構築には BCL-2/Navitoclax analog 複合体 (PDB ID : 4MAN) と BCL-X_L/A-1155463 複合体 (PDB ID : 4QVX) を、BCL-X_L/Navitoclax 複合体の構築には BCL-X_L/HBx-BH3 motif 複合体 (PDB ID : 5B1Z) と BCL-2/Navitoclax 複合体 (PDB ID : 4LVT) をそれぞれ用い、同様の手順で目的とする複合体構造を得た。

BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体を構築するために、BCL-2/ABT-199 複合体を用いた。Maestro に実装されている“3D Builder”機能を用いて、BCL-2 の 103 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に変異させ、BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体を得た。

BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体を構築するために、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体を用いた。Maestro に実装されている“3D Builder”機能を用いて、ABT-199 の Azaindole を Indole への変換を行った。

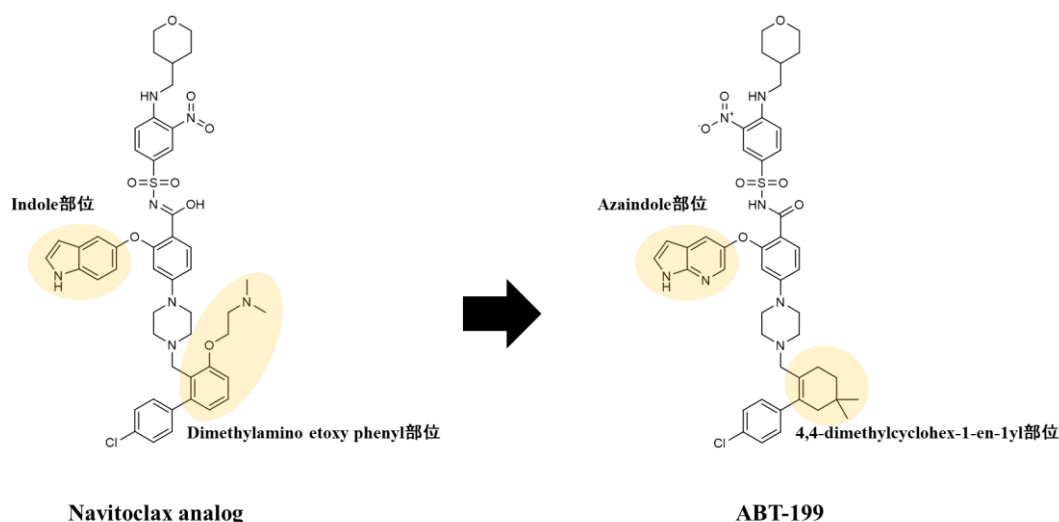


図 3 - 1 Navitoclax analog から ABT-199 への変換

“3D Builder”機能を用いて変換した部位をオレンジで示した。Navitoclax analog の Indole 部位を Azaindole に変換した。また、Navitoclax analog の Dimethylamino ethoxy phenyl 部位を 4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl に変換した。

3.2. 構築した複合体構造の妥当性の検証

前節で構築した 4 つのタンパク質/複合体構造が妥当であるかどうかを検証するために、PDB に登録されている BCL-2 および BCL-X_L と低分子化合物との共結晶構造の静的な状態での相互作用を比較する事で初期構造としての妥当性を検証する事とした。

PDB に登録されている BCL-2/阻害剤複合体 (PDB ID : 1YSW, 2O21, 2O22, 2O2F, 2W3L, 4AQ3, 4IEH, 4LVT, 4LXD, 4MAN) および BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 1YSI, 1YSN, 2O1Y, 2O2M, 2YXJ, 3INQ, 3QKD, 3SP7, 3SPF, 3WIZ, 3ZK6, 3ZLN, 3ZLO, 3ZLR) を取得した。それぞれの複合体に含まれる阻害剤と Navitoclax、ABT-199 および A-1155463 の構造類似度を MACCS keys を用いた Tanimoto 係数で評価し、Tanimoto 係数が 0.7 以上の阻害剤との複合体構造を比較対象として用いる事とした。

BCL-X_L/Navitoclax 複合体は 3 つの複合体構造 (PDB ID : 2O2M, 2YXJ, 3INQ) と静的

な状態での相互作用を比較する事とした。BCL-2/ABT-199 複合体は 5 つの複合体構造 (PDB ID : 2O22, 2O2F, 4IEH, 4LVT, 4LXD) と比較する事とした。BCL-X_L/ABT-199 複合体は 5 つの複合体構造 (PDB ID : 2O2M, 2YXJ, 3QKD, 3SP7, 3WIZ) と比較する事とした。A-1155463 と Tanimoto 係数が 0.7 以上の阻害剤は 1 つかつ、BCL-X_L との複合体構造 (PDB ID : 4TUH) しか報告されていないので、BCL-2/A-1155463 複合体はその構造と比較する事とした。

3.3. モデル構造の前処理

構築した複合体構造は PDB から取得した構造情報を基にしている。結晶構造中では水素原子が見えないため、構築した複合体構造に水素原子を付加する必要がある、水素原子を適切に付加するためには各原子の結合次数の割当も必要となる。Maestro に実装されている“Protein Preparation”機能と PDB に登録されている構造に含まれるアミノ酸、核酸、低分子化合物等の情報を収集した Chemical Component Dictionary (CCD) [106]に基づいて各原子の結合次数の割当を行い、水素原子を付加した。

阻害剤は溶液中でプロトン化や脱プロトン化を受け、様々なイオン化状態や互変異性体を生じることが知られており、周囲の環境に合わせて適切なプロトン化状態を生成する必要がある。阻害剤のプロトン化状態の生成は Epik[107]を用いて行った。

タンパク質を構成するアミノ酸の中には周囲の環境によってプロトン化状態が変化するものもある。がん細胞の細胞内 pH が 7.0~7.2 程度[108]との報告があることから各アミノ酸の pK_a 値は pH7.0 として PROPKA[109]を用いて決定した。

3.4. MD シミュレーションに用いる系の構築

生体内の環境に近づけるために 0.15 M の NaCl を系に加えることにした。また、系の

電荷を中和させるためにイオンを加えることとした。複合体の周囲には水分子で満たされた溶媒ボックスを配置する必要がある。溶媒ボックスが小さすぎると周期境界によって同一分子同士で相互作用してしまう。しかし溶媒ボックスを大きくしすぎると、水分子が必要以上に多くなってしまい計算に時間がかかってしまう。そこで、複合体の周囲 10 Å に水分子で満たされた溶媒ボックスを配置することとした。イオンや溶媒ボックスの配置は Maestro に実装されている“System Builder”機能を用いて行った。本研究で扱う系では、カウンターイオンの初期位置がシミュレーションの結果に与える影響はないと考えランダムに配置した。Maestro に実装されている“Force Field Builder”機能を用いてタンパク質、阻害剤と塩には OPLS3 力場を、水分子には SPC モデルの割当を行った。

3.5. MD シミュレーションの設定

MD シミュレーションは Desmond MD パッケージ (Desmond Driver v2.3) を用いて行った。以下に示すような一連の短時間の MD シミュレーションを行い、前節で構築した系の緩和を行った。

ステップ.1

溶質の重原子に位置拘束 ($50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) をかけながら温度を 10 K とし温度・体積一定 (NVT) 条件で 100 ps の MD シミュレーションを実施することで、人工的に配置された水分子やイオンの平衡化を行った。

ステップ.2

溶質の重原子に位置拘束 ($50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) をかけながら温度を 10 K とし温度・体積一定 (NVT) 条件で、1 ps ごとに速度の割り振りをを行いながら 12 ps の MD シミュレーションを実施した。速度の割り振りを行うことで、系の局所的な高エネルギー状

態の改善を行った。

ステップ.3

溶質の重原子に位置拘束 ($50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) をかけながら温度を 10 K とし温度・圧力一定 (NPT) 条件で、1 ps ごとに速度の割り振りをを行い、12 ps 実施した。定圧条件とすることで溶媒ボックスの境界部分に存在するファンデルワールス空隙を埋めて適切な溶媒密度となるようにした。

ステップ.4

溶質の重原子に位置拘束 ($50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) をかけながら温度を 300 K とし温度・圧力一定 (NPT) 条件で、1 ps ごとに速度の割り振りをを行い、12 ps 実施した。プロダクションランで用いる温度での平衡化を行った。

ステップ.5

溶質への位置拘束をせず、温度を 300 K とし温度・圧力一定 (NPT) 条件で 24 ps 実施し、系全体の平衡化を行った。

プロダクションランは温度 300 K、圧力 1.01325 bar の温度・圧力一定(NPT)条件下、温度制御として Nose-Hoover 法[110, 111]、圧力制御として Martyna-Tobias-Klein 法[112]を用いた。短距離の分子間相互作用のカットオフ半径は $9 \text{ \AA}$ [113]に設定し、長距離の静電相互作用の計算には D.E. Shaw 研究所で開発された u-series アルゴリズム[114]を用いて計算を行った。100 ns の MD シミュレーションを各タンパク質/阻害剤複合体に対して初速度を変えて 4 回ずつ行った。

3.6. 根平均 2 乗偏差 (Root mean square deviation, RMSD)

RMSD はある構造が基準となる構造からどれだけずれているかを表す指標であり、式 (3. 1) で表すことができる。基準となる構造は、結晶構造や MD シミュレーションの 1 ステップ目などを用いることが多く、MD シミュレーションを通して構造がどれだけ変化したかを確認するために用いる。

$$RMSD_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}) \right)^2} \quad (3. 1)$$

N は RMSD を計算するために選択した原子の総数を、 t_{ref} は基準とした構造が得られた時間を、 r'_i は RMSD を計算するために選択した原子を基準とする構造に重ね合わせた時の位置を、 t_x は RMSD を計算したい構造が得られた時間をそれぞれ表している。

3.7. 根平均 2 乗変動 (Root mean square fluctuation, RMSF)

RMSF は平均構造からのずれを表す指標であり、式 (3. 2) で表すことができる。標的とするタンパク質のアミノ酸配列に沿ってどの部分の構造が揺らぎやすいかなどを知ることができる。

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \left\langle \left(R'_i(t) - R_i(t_{ref}) \right)^2 \right\rangle} \quad (3. 2)$$

T は RMSF を計算するために用いるフレームの総数を、 t_{ref} は基準となる構造が得られた時間を、 R_i はアミノ酸残基 i の位置を、 R'_i は基準となる構造に重ね合わせた時のアミノ酸残基 i の位置をそれぞれ表している。

3.8. 相互作用解析

MD シミュレーションから得られたトラジェクトリ中でタンパク質と阻害剤の間どのような相互作用が形成されていたかを調べることは、タンパク質と阻害剤の結合の分子メカニズムを知るうえで重要である。MD シミュレーション中である相互作用がどの程度安定的に存在するのかを示す指標として保持率を定義した。保持率は式(3. 3)で表される。

$$\text{保持率} = \frac{N_{\text{interaction}}}{T} \times 100 \quad (3. 3)$$

T は MD シミュレーションから得られたフレームの総数を、 $N_{\text{interaction}}$ はある相互作用が形成されていたフレーム数を表している。

本研究では以下の相互作用を定義し保持率を計算した。

(1) 水素結合

水素結合を形成しているかどうかの判断基準として、ドナー原子とアクセプター原子間の距離が 3.5 Å 以内であること。ドナー原子-水素原子-アクセプター原子 ($D-H\cdots A$) で構成される角度が 120° 以上であること。水素原子-アクセプター原子-結合している原子 ($H\cdots A-X$) で構成される角度が 90° 以上であることとした。

(2) π - カチオン相互作用

π - カチオン相互作用を形成しているかどうかの判断基準は、芳香属性官能基と荷電性官能基が 4.5Å 以内の距離にあることとした。

(3) π - π スタッキング

π - π スタッキングを形成しているかどうかの判断基準は、2 つの芳香属性官能基が face-to-face または face-to-edge でスタッキングしているかどうかとした。

(4) 疎水性相互作用

疎水性相互作用を形成しているかどうかの判断基準は、疎水性アミノ酸の側鎖が阻害剤の芳香属性官能基の炭素原子または脂肪族性官能基の炭素原子と $3.6\text{\AA}$ 以内にあることとした。

(5) イオン性相互作用

イオン性相互作用を形成しているかどうかの判断基準は、水素結合に関与していない正電荷と負電荷をもつ原子間の距離が $3.7\text{\AA}$ 以内にあることとした。

(6) 水を介した水素結合

水を介した水素結合を形成しているかどうかの判断基準は、ドナー原子とアクセプター原子間の距離が $3.5\text{\AA}$ 以内であること。ドナー原子-水素原子-アクセプター原子 ($D-H\cdots A$) で構成される角度が 110° 以上であること。水素原子-アクセプター原子-結合している原子 ($H\cdots A-X$) で構成される角度が 80° 以上であることとした。

3.9. クラスタリングを用いた代表構造の抽出

MD シミュレーション中にどのような構造が最も頻繁に現れたかを知ることで、タンパク質と阻害剤の間に形成される相互作用について構造的に考察することが可能となる。MD シミュレーションから得られたトラジェクトリに対してクラスタリングを実施することで、代表構造を抽出する。

クラスタリングを行うためには、MD シミュレーションから得られた構造間の類似度を定義する必要がある。構造変化の度合いを数値化するために、3.6 で説明した RMSD を類似度として用いることとした。クラスタリングのアルゴリズムは階層的クラスタリングを用いた。クラスタ間の距離は群平均法によって算出し、2 つのクラスタを 1 つのクラスタにするかどうかはクラスタ間の距離が $2.0\text{\AA}$ 以内にあるかどうかとした。クラ

スタ内で近接する構造が最も多い構造を代表構造とした。

3.10. Prime MM-GBSA を用いた結合自由エネルギー変化の推定

標的とするタンパク質と阻害剤がどれほど結合しやすいかを熱力学的に見積もることとは、標的選択性を持った阻害剤の開発を戦略的に進める上で非常に重要となる。

クラスタリングから得られた代表構造に対して Schrödinger 社の Small-Molecule Drug Discovery Suite に実装されている Prime MM-GBSA を用いて結合の自由エネルギー変化の推定を行った。式(2. 12)の ΔE は OPLS3 力場に含まれるパラメータに基づいて計算を行った。溶媒分子との相互作用から生じる項 ΔG_{sol} は VSGB 2.0[115]というモデルに基づいて計算を行った。VSGB 2.0 モデルでは、SASA から求められる項 ΔG_{SA} の代わりにパラメータ化された疎水性項 $E_{hydrophobic}$ を用いており、 $E_{hydrophobic}$ は式(3. 4)となっている。

$$E_{hydrophobic} = -0.30 \cdot \sum_{ij} E_{hydrophobic}^{ij} \quad (3. 4)$$

$$E_{hydrophobic}^{ij} = \begin{cases} 0.0 & (1 \leq scale) \\ 0.25 \cdot scale^3 - 0.75 \cdot scale + 0.5 & (-1.0 < scale < 1.0) \\ 1.0 & (scale \leq -1.0) \end{cases}$$

$$scale = 2.0 \cdot (r_{ij} - r_i^{vdw} - r_j^{vdw} - 2.0)/3.0$$

Prime MM-GBSA では分子の内部自由度に由来するエントロピー項は含まれていない。

第 4 章

タンパク質/阻害剤相互作用解析

4.1. 概要

モデリングした 6 つのタンパク質/阻害剤複合体（BCL-2/Navitoclax 複合体、BCL-X_L/Navitoclax 複合体、BCL-2/ABT-199 複合体、BCL-X_L/ABT-199 複合体、BCL-2/A-1155463 複合体、BCL-X_L/A-1155463 複合体）に対して 100 ns の MD シミュレーションを初速度を変えて 4 回ずつ実施し、それぞれのタンパク質/阻害剤複合体でみられる相互作用様式を解析した。さらに、タンパク質/阻害剤間の相互作用を比較し ABT-199 の BCL-2 選択性と A-1155463 の BCL-X_L 選択性について議論を行う。

4.2. 結果と考察

4.2.1. モデリングしたタンパク質/阻害剤複合体構造

モデリングした BCL-X_L/Navitoclax 複合体の全体構造を図 4 - 1 に示した。構築した BCL-X_L/Navitoclax 複合体と 3 つの BCL-X_L/阻害剤複合体構造（PDB ID : 2O2M, 2YXJ, 3INQ）を比較すると、Gly-138 との水素結合が共通して確認された（図 4 - 2）。

BCL-2/ABT-199 複合体の全体構造を図 4 - 3 に示した。構築した BCL-2/ABT-199 複合体と 5 つの BCL-2/阻害剤複合体（PDB ID : 2O22, 2O2F, 4IEH, 4LVT, 4LXD）を比較すると、2 つの共通する相互作用が確認された。Phe-104 との $\pi - \pi$ スタッキングは図 4 - 4 の(b)と(d)の複合体中でも確認された。また、Tyr-202 との $\pi -$ カチオン相互作用は図 4 -

4 の(d)、(d)と(f)の複合体中でも確認された。

BCL-X_L/ABT-199 複合体の全体構造を図 4 - 5 に示した。構築した BCL-X_L/ABT-199 複合体と 5 つの BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 2O2M, 2YXJ, 3QKD, 3SP7, 3WIZ) を比較すると、2 つの共通する相互作用が確認された。Gly-138 との水素結合は比較した 5 つの BCL-X_L/阻害剤複合体中でも確認された。また、Tyr-195 との π - カチオン相互作用は図 4 - 5 の(b)、(c)と(d)の複合体中でも確認された。

BCL-2/A-1155463 複合体の全体構造を図 4 - 7 に示した。構築した BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 4TUH) を比較すると、共通した相互作用は確認できなかったが類似した官能基の近くにアミノ酸配列アライメント上対応するアミノ酸が位置していた (例えば、Asp-103 と Glu-96 や Phe-104 と Phe-97)。

上述のように構築した 4 つのタンパク質/阻害剤複合体は既知タンパク質/阻害剤複合体と共通した相互作用が確認できたため、構築した複合体構造が妥当なものと判断し、以下で行う解析は構築したこれらの構造に対して実施した。

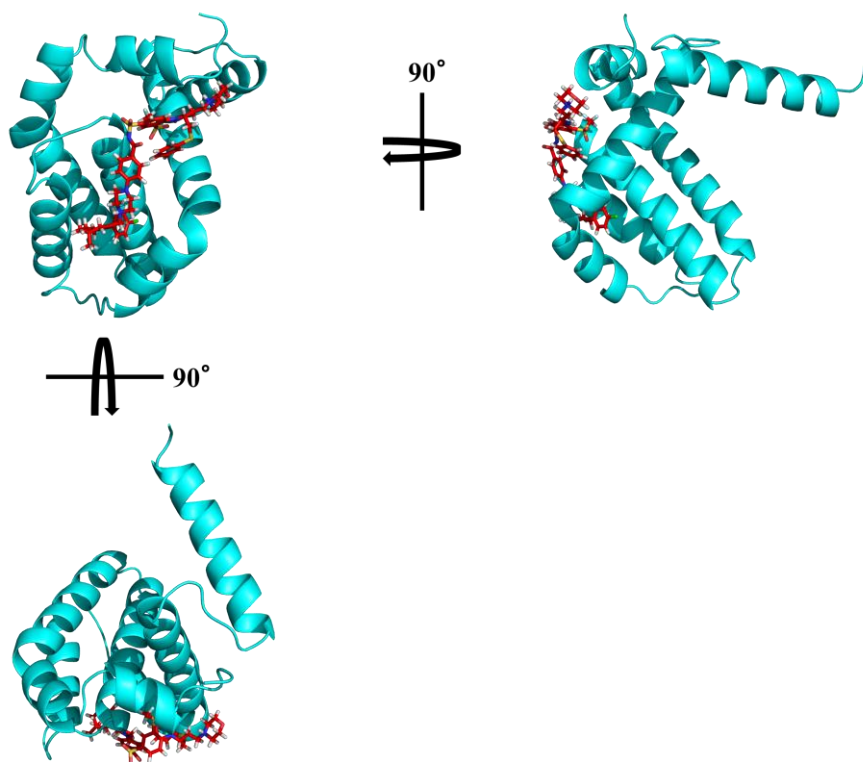


図 4 - 1 BCL-X_L/Navitoclax 複合体のモデリング構造

BCL-X_L をシアンの Cartoon モデル、阻害剤 Navitoclax を赤の stick モデルで示した。

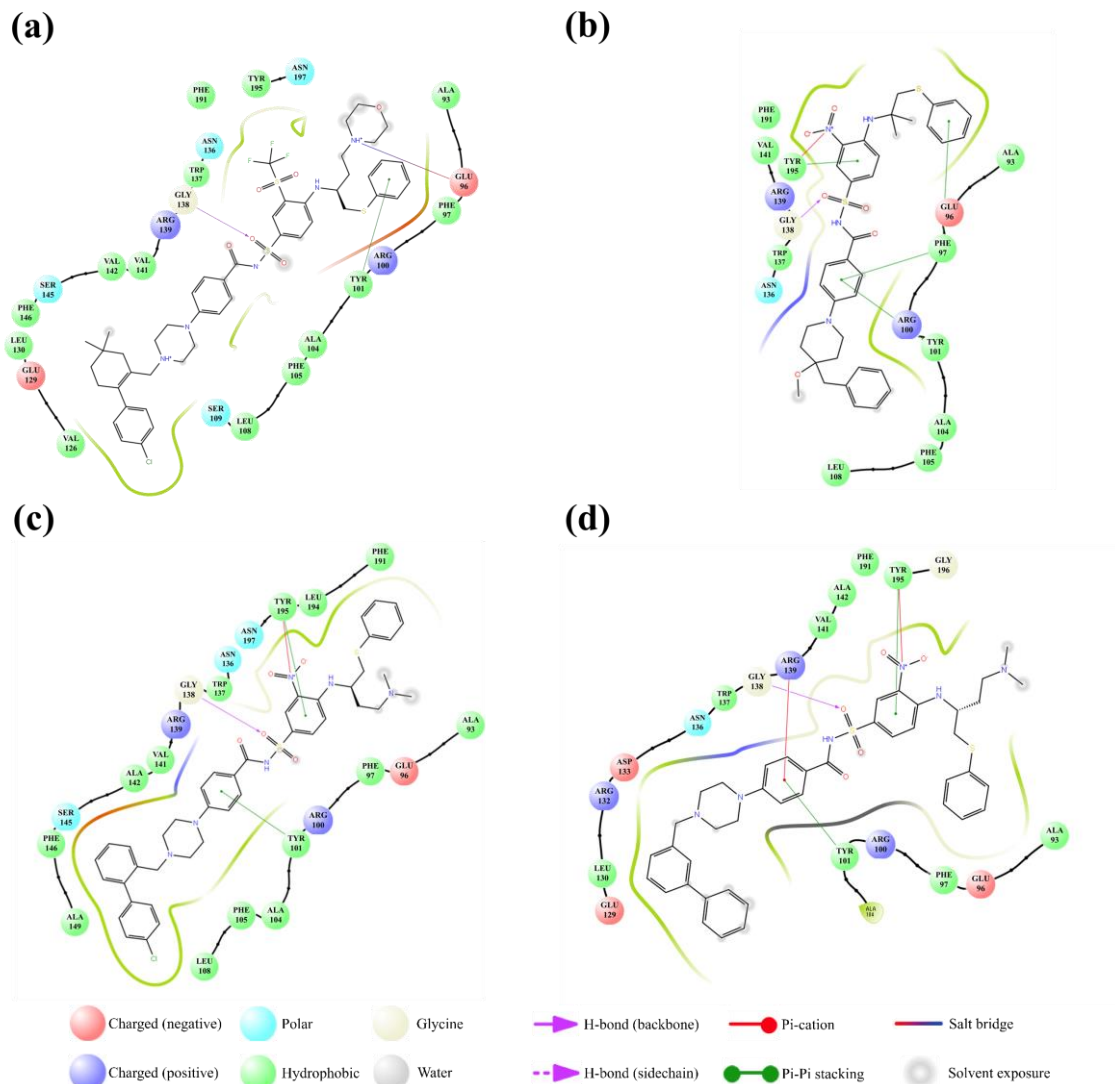


図 4 - 2 BCL-X_L/Navitoclax 複合体との静的な状態での相互作用比較

阻害剤の周囲 4 Å 以内にあるアミノ酸を球形で示した。(a) BCL-X_L/Navitoclax 複合体

(b) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 2O2M) (c) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 2YXJ)

(d) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 3INQ)

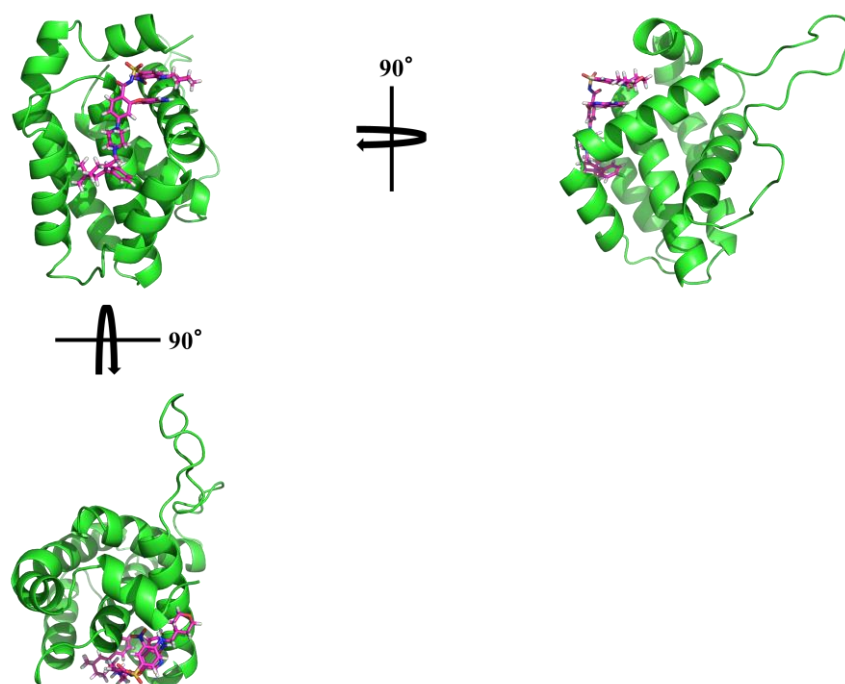


図 4 - 3 BCL-2/ABT-199 複合体のモデリング構造

BCL-2 を緑の Cartoon モデル、阻害剤 ABT-199 をマゼンタの stick モデルで示した。

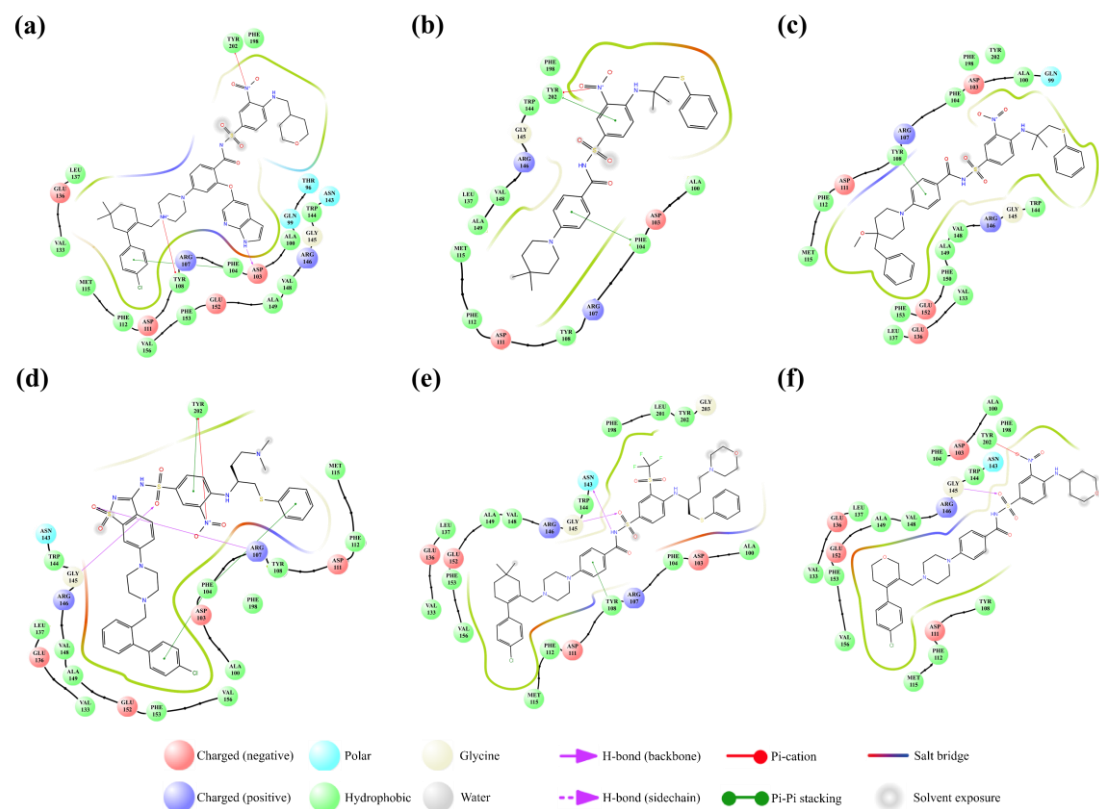


図 4 - 4 BCL-2/ABT-199 複合体との静的な状態での相互作用比較

阻害剤の周囲 4 Å 以内にあるアミノ酸を球形で示した。(a) BCL-2/ABT-199 複合体 (b) BCL-2/阻害剤複合体 (PDB ID : 2O22) (c) BCL-2/阻害剤複合体 (PDB ID : 2O2F) (d) BCL-2/阻害剤複合体 (PDB ID : 4IEH) (e) BCL-2/Navitoclax 複合体 (PDB ID : 4LVT) (f) BCL-2/阻害剤複合体 (PDB ID : 4LXD)

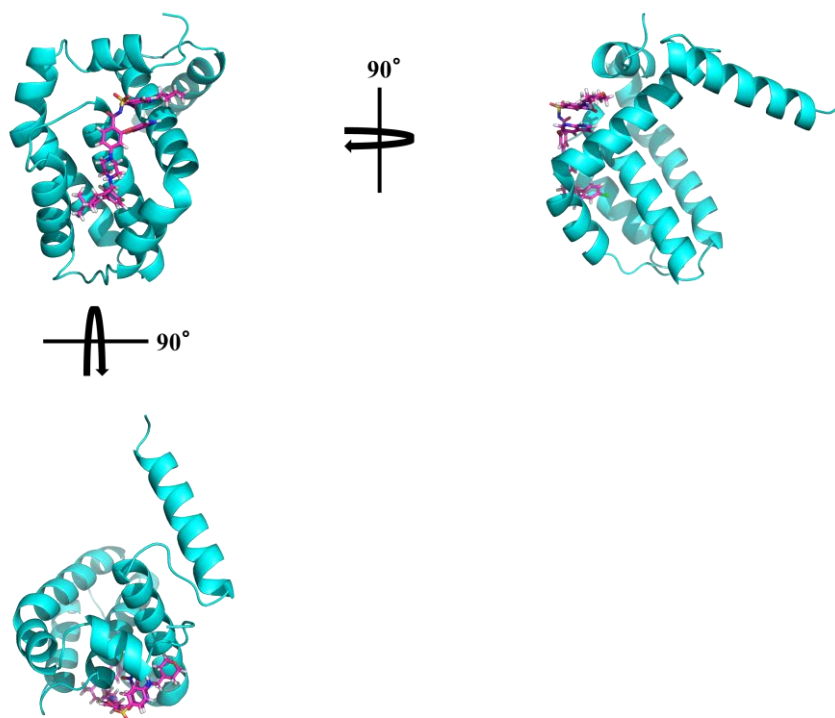


図 4 - 5 BCL-X_L/ABT-199 複合体のモデリング構造

BCL-X_L をシアンの Cartoon モデル、阻害剤 ABT-199 をマゼンタの stick モデルで示した。

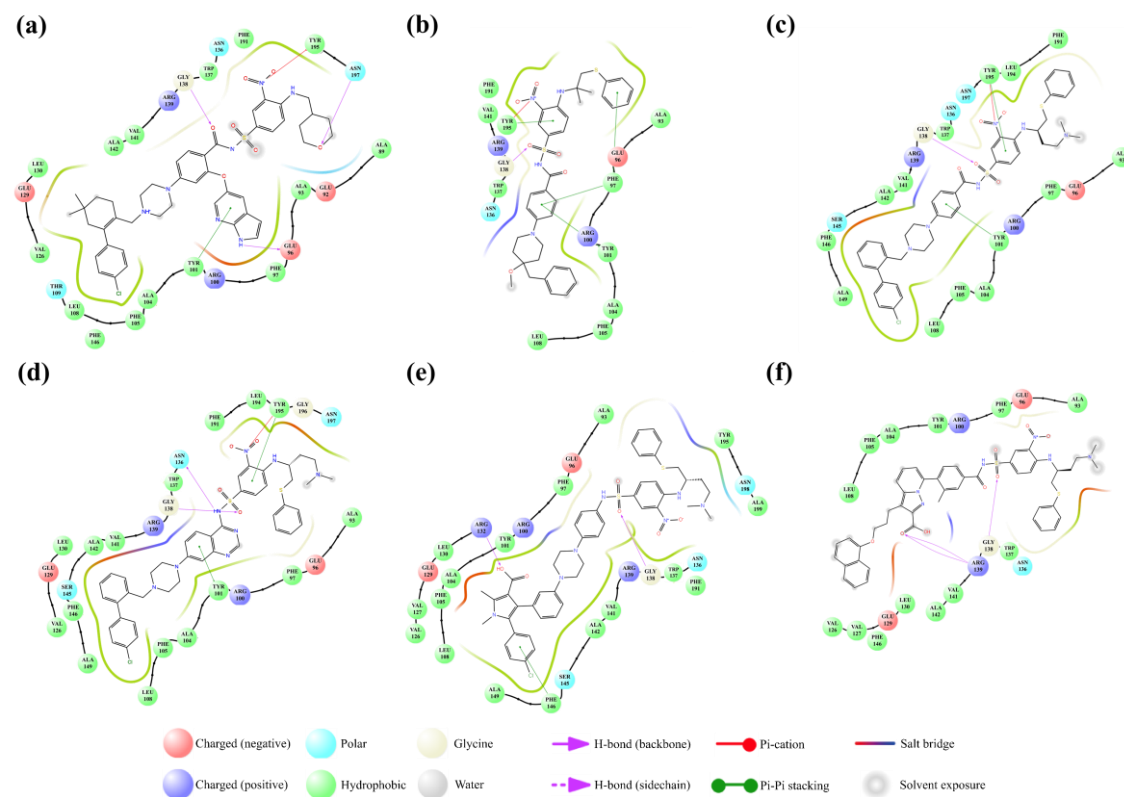


図 4 - 6 BCL-X_L/ABT-199 複合体との静的な状態での相互作用比較

阻害剤の周囲 4 Å 以内にあるアミノ酸を球形で示した。(a) BCL-X_L/ABT-199 複合体 (b) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 2O2M) (c) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 2YXJ) (d) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 3QKD) (e) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 3SP7) (f) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 3WIZ)

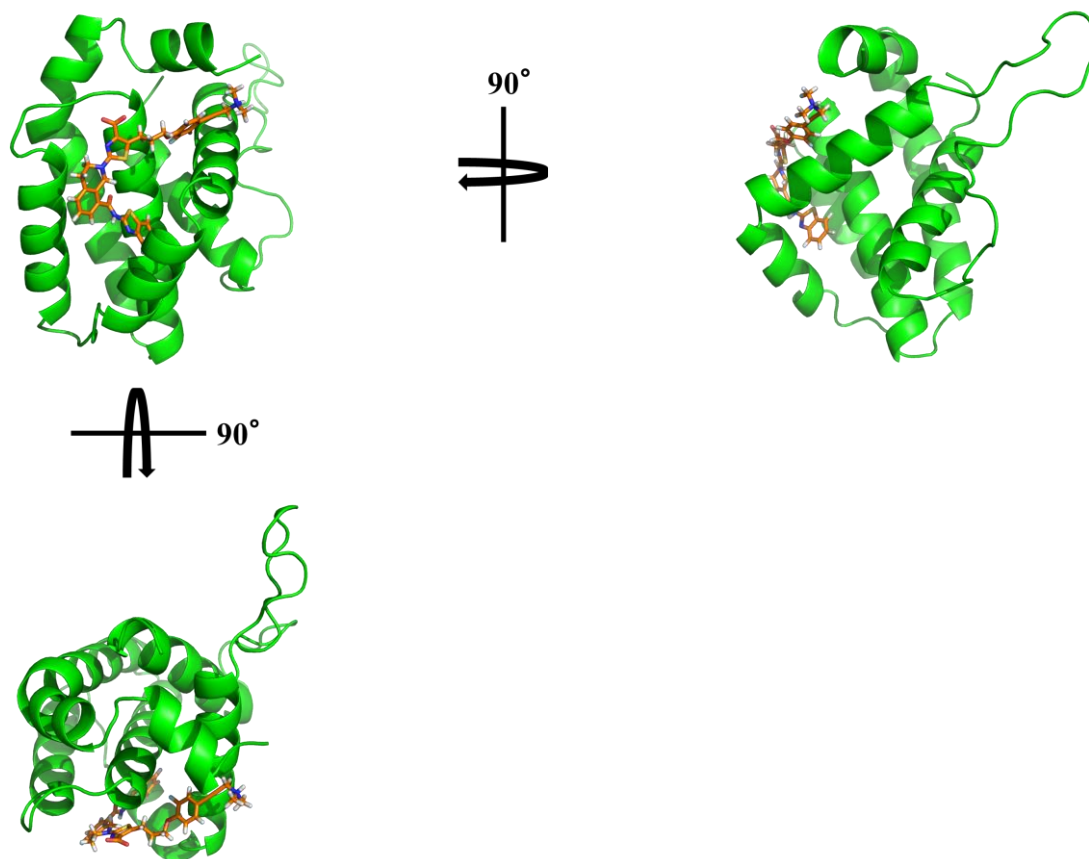


図 4 - 7 BCL-2/A-1155463 複合体のモデリング構造

BCL-2 を緑の Cartoon モデル、阻害剤 A-1155463 をオレンジの stick モデルで示した。

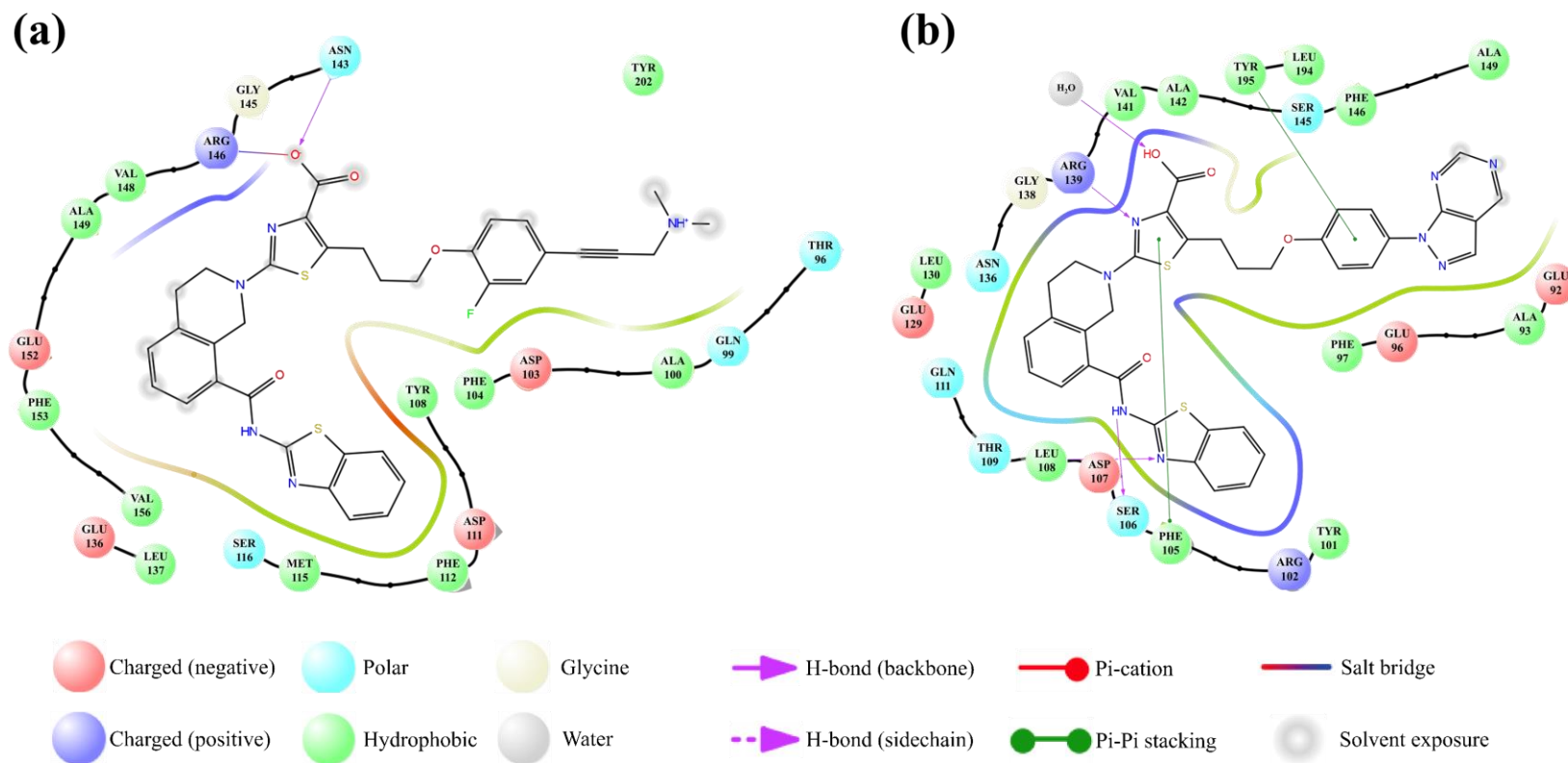


図 4 - 8 BCL-2/A-1155463 複合体との静的な状態での相互作用比較

阻害剤の周囲 4 Å 以内にあるアミノ酸を球形で示した。(a) BCL-2/A-1155463 複合体 (b) BCL-X_L/阻害剤複合体 (PDB ID : 4TU)

4.2.2. 構造の安定性解析

初期構造からの重原子の RMSD 変化をそれぞれの複合体構造に対して計算した。100 ns の MD シミュレーションにおける RMSD の時間変化を図 4 - 9 に示した。すべてのシミュレーションにおいて、シミュレーション時間の 70 ns ~ 100 ns において RMSD は安定した値に到達している。これらの結果、6 つのタンパク質/阻害剤複合体構造の系は十分に平衡化していると考え事ができる。RMSD の平均値がもっとも大きかった複合体は Bcl-X_L/Navitoclax 複合体であり、RMSD の値は 3.39 から 6.82 Å の幅で構造の揺らぎが見られた。これは、N 末端の α ヘリックス 1 の揺らぎが大きかったためと考えられる (図 4 - 10 (b))。BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体では、RMSD の値はそれぞれ 2.15 から 2.49 Å、2.88 から 3.65 Å の間で変化していた。BCL-X_L/ABT-199 では N 末端の α ヘリックス 1 が大きく揺らいでいた (図 4 - 10 (d))。これら二つの複合体構造はモデリングによって得られた構造ではあるが、BCL-2/ABT-199 複合体のほうが BCL-X_L/ABT-199 複合体よりも安定であることを示唆している。BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体では RMSD の値は 2.30 から 2.89 Å と 1.48 から 1.60 Å の間で変化していた。BCL-X_L/A-115546 複合体はこれら 6 つの複合体中で最も安定な複合体であると考えられる。

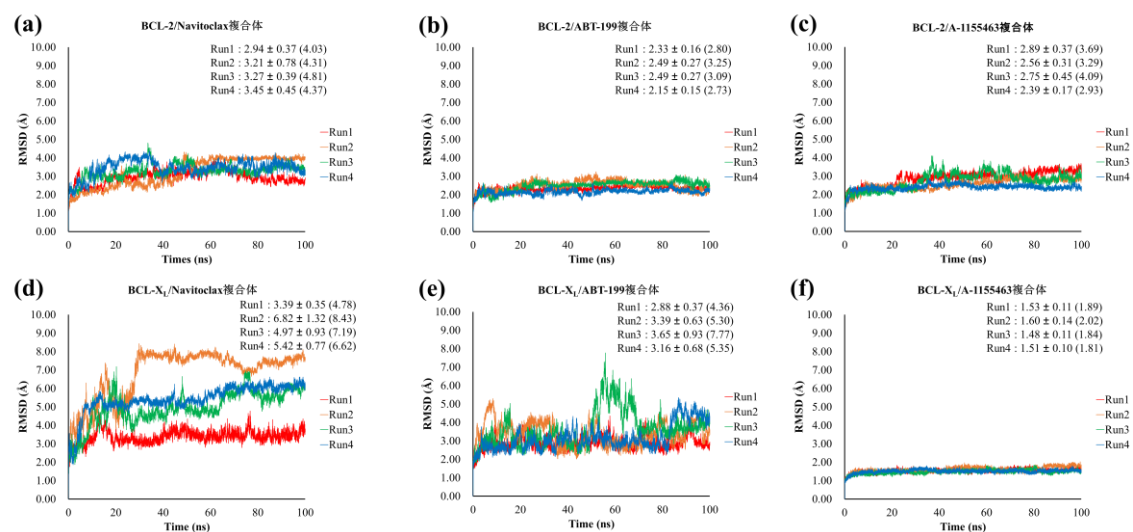


図 4-9 各タンパク質/阻害剤複合体におけるタンパク質重原子 RMSD の時間変化

横軸にシミュレーション時間 (ns)、縦軸に RMSD (Å) をとり、タンパク質重原子の RMSD をプロットした。Run1 を赤、Run2 をオレンジ、Run3 を緑、Run4 を青の線でそれぞれ示している。グラフ中には RMSD の平均値および標準偏差を示した。括弧内の数字は RMSD の最大値を表している。(a) BCL-2/Navitoclax 複合体 (b) BCL-2/ABT-199 複合体 (c) BCL-2/A-1155463 複合体 (d) BCL-X_L/Navitoclax 複合体 (e) BCL-X_L/ABT-199 複合体 (f) BCL-X_L/A-1155463 複合体

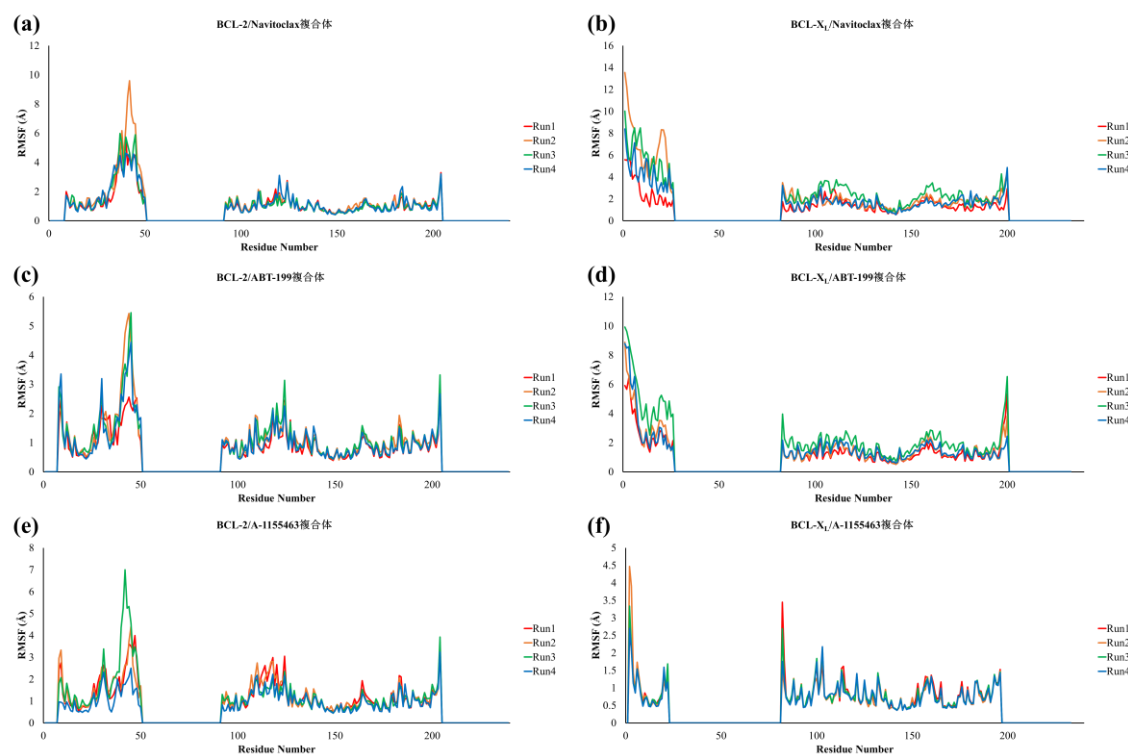


図 4 - 10 各タンパク質/阻害剤複合体におけるタンパク質の RMSF

横軸にアミノ酸の残基番号、縦軸に RMSF (Å) をとり、タンパク質の RMSF をプロットした。Run1 を赤、Run2 をオレンジ、Run3 を緑、Run4 を青の線でそれぞれ示している。

(a) BCL-2/Navitoclax 複合体 (b) BCL-X_L/Navitoclax 複合体 (c) BCL-2/ABT-199 複合体
(d) BCL-X_L/ABT-199 複合体 (e) BCL-2/A-1155463 複合体 (f) BCL-X_L/A-1155463 複合体

4.2.3. BCL-2/Navitoclax 複合体の相互作用解析

BCL-2/Navitoclax 複合体における BCL-2 と Navitoclax の間で見られた相互作用を図 4 - 11 に示し、表 4 - 1 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30 %以上にわたって Navitoclax と相互作用を形成していたアミノ酸は 4 残基（Tyr-108、Met-115、Asn-143 と Tyr-202）であった。

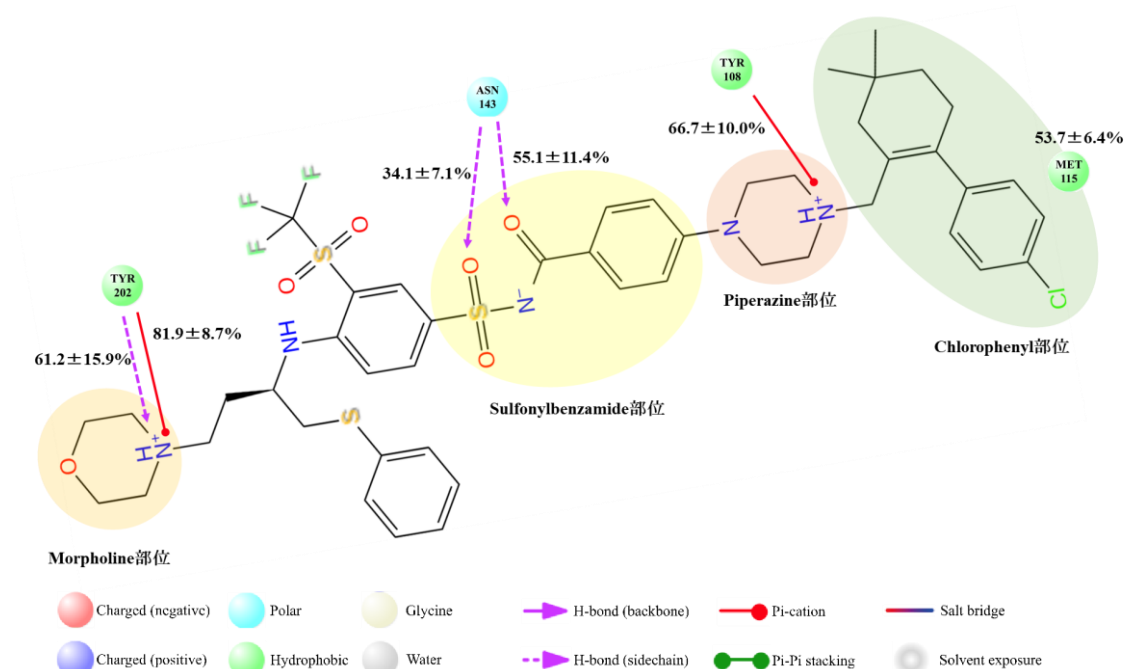


図 4 - 11 BCL-2/Navitoclax 複合体で形成されていた相互作用

平均して総シミュレーション時間の30%以上でNavitoclax と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 4 - 1 BCL-2/Navitoclax 複合体で形成されていた相互作用

アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率* (%)
Tyr-108	Piperazine 部位	π - カチオン	66.7 $\pm$ 10.0
Met-115	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	53.7 $\pm$ 6.4
Asn-143	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	55.1 $\pm$ 11.4
Asn-143	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	34.1 $\pm$ 7.1
Tyr-202	Morpholine 部位	π - カチオン	81.9 $\pm$ 8.7
Tyr-202	Morpholine 部位	水素結合	61.2 $\pm$ 15.9

*Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

4.2.4. BCL-X_L/Navitoclax 複合体の相互作用解析

BCL-X_L/Navitoclax 複合体における BCL-X_L と Navitoclax の間で見られた相互作用を図 4 - 12 に示した。平均して総シミュレーション時間の 30 %以上にわたって Navitoclax と相互作用を形成していたアミノ酸は Tyr-101 のみであった。

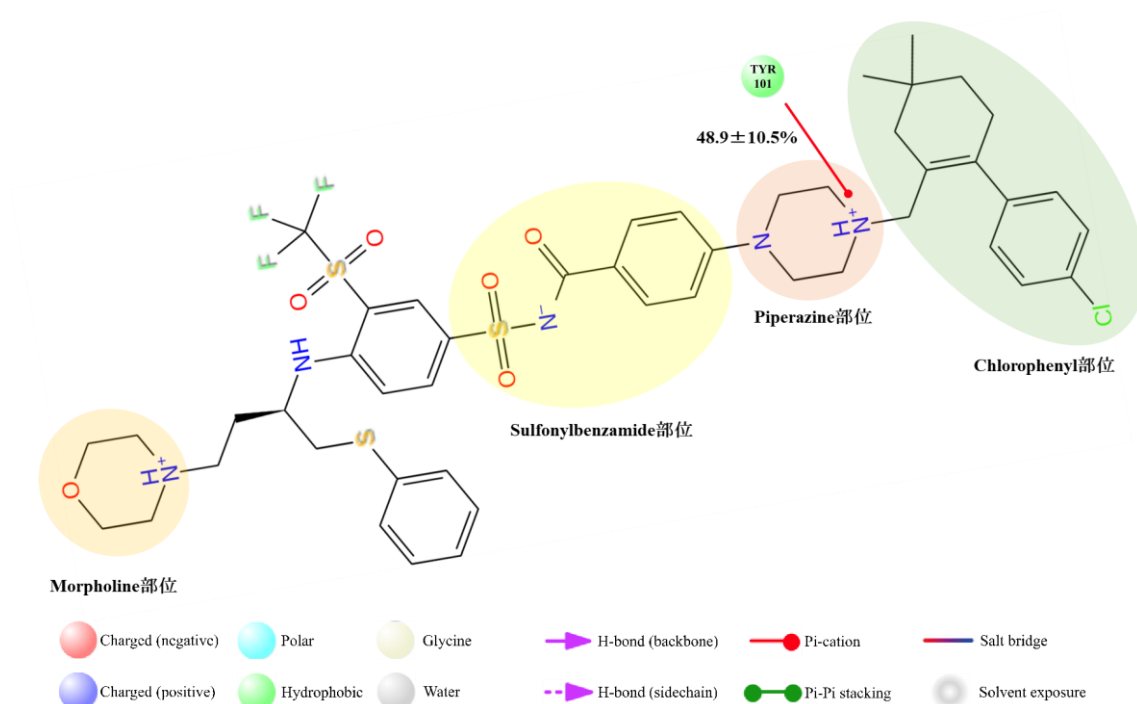


図 4 - 12 BCL-X_L/Navitoclax 複合体で形成されていた相互作用

平均して総シミュレーション時間の30%以上でNavitoclax と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

4.2.5. BCL-2/ABT-199 複合体の相互作用解析

BCL-2/ABT-199 複合体における BCL-2 と ABT-199 の間で見られた相互作用を図 4 - 13 に示し、表 4 - 2 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30 %以上にわたって ABT-199 と相互作用を形成していたアミノ酸は 6 残基 (Asp-103、Phe-104、Tyr-108、Met-115、Asn-143 と Tyr-202) であった。

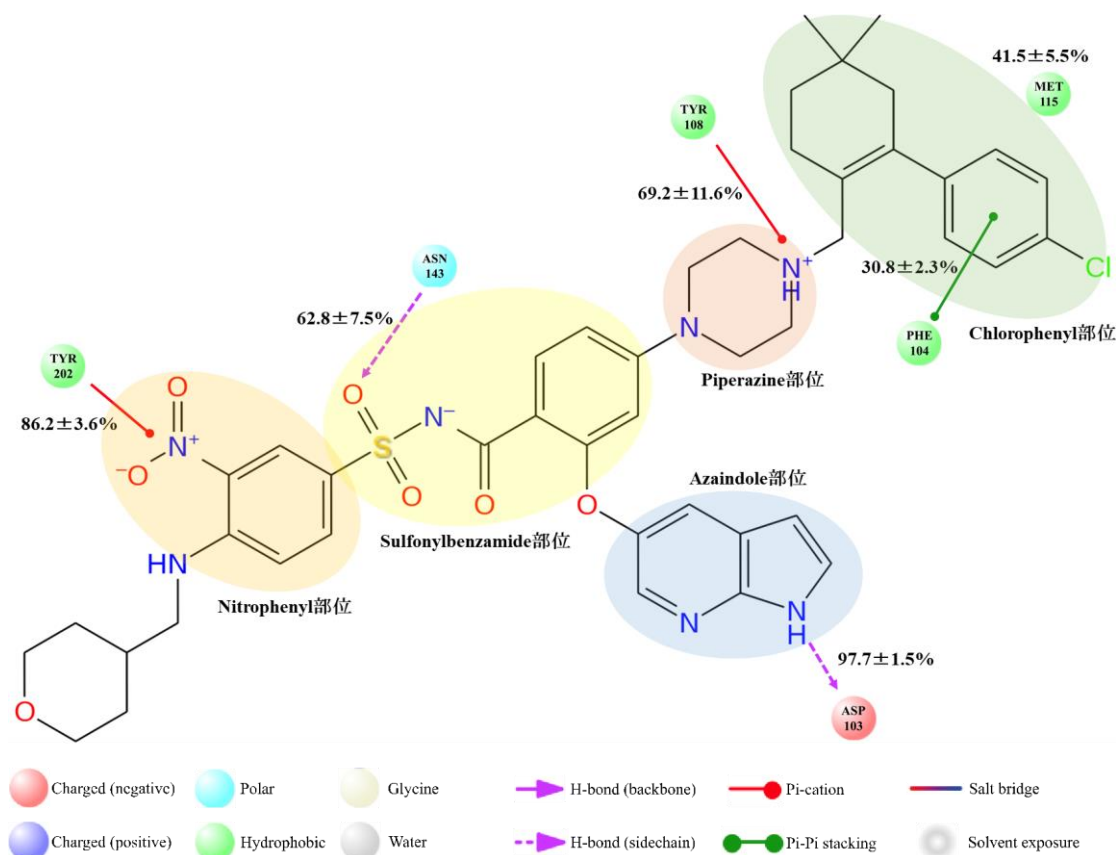


図 4 - 13 BCL-2/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用

平均して総シミュレーション時間の 30%以上で ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 4 - 2 BCL-2/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用

アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率* (%)
Asp-103	Azaindole 部位	水素結合	97.7±1.5
Phe-104	Chlorophenyl 部位	π - π スタッキング	30.8±2.3
Tyr-108	Piperazine 部位	π - カチオン	69.2±11.6
Met-115	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	41.5±5.5
Asn-143	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	62.8±7.5
Tyr-202	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	86.2±3.6

*Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

4.2.6. BCL-X_L/ABT-199 複合体の相互作用解析

BCL-X_L/ABT-199 複合体における BCL-X_L と ABT-199 の間で見られた相互作用を図 4-14 に示し、表 4-3 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30 %以上にわたって ABT-199 と相互作用を形成していたアミノ酸は 6 残基（Glu-96、Phe-97、Tyr-101、Leu-108、Asn-136 と Tyr-195）であった。

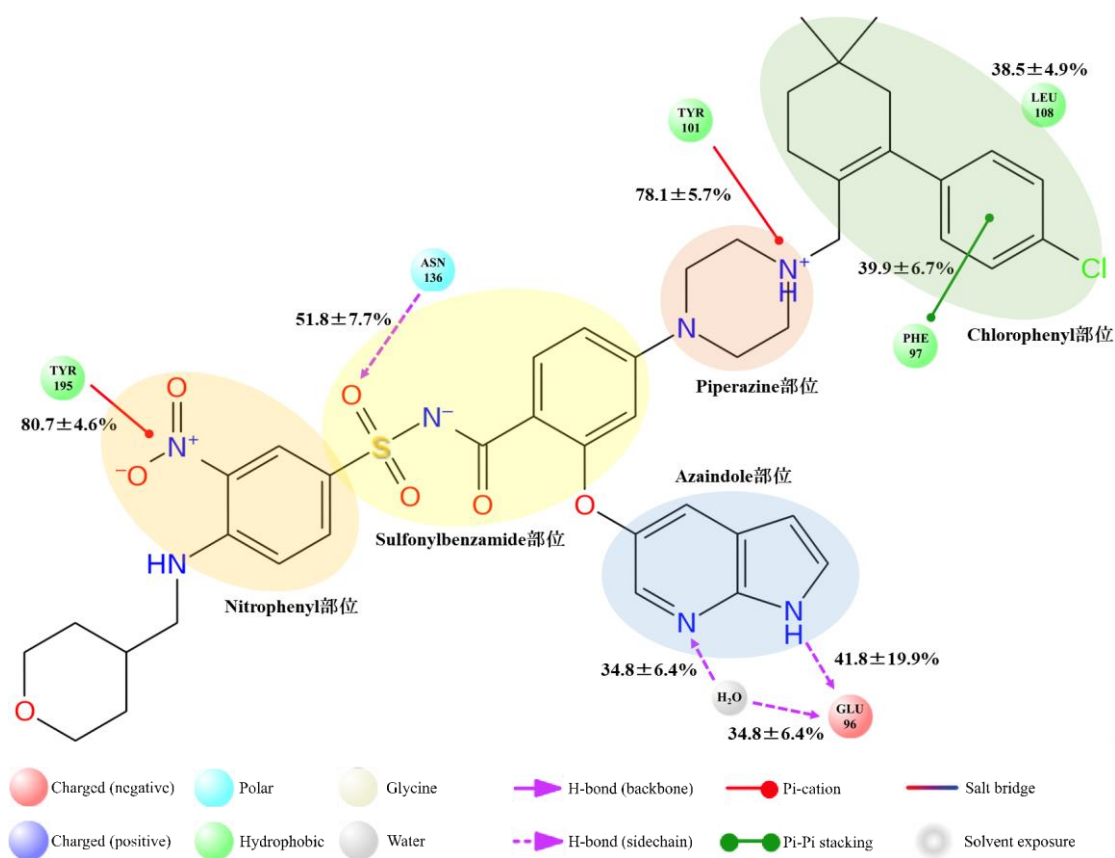


図 4-14 BCL-X_L/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用

総シミュレーション時間の 30%以上で ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 4 - 3 BCL-X_L/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用

アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率* (%)
Glu-96	Azaindole 部位	水素結合	41.8±19.9
Glu-96	Azaindole 部位	水を介した水素結合	34.8±6.4
Phe-97	Chlorophenyl 部位	π - π スタッキング	39.9±6.7
Tyr-101	Piperazine 部位	π - カチオン	78.1±5.7
Leu-108	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	38.5±4.9
Asn-136	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	51.8±7.7
Tyr-195	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	80.7±4.6

* Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

4.2.7. BCL-2/A-1155463 複合体の相互作用解析

BCL-2/A-1155463 複合体における BCL-2 と A-1155463 の間で見られた相互作用を図 4 - 15 に示し、表 4 - 4 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30%以上にわたって A-1155463 と相互作用を形成していたアミノ酸は 7 残基 (Asp-103、Phe-104、Phe-112、Leu-137、Asn-136、Arg-139、Tyr-202) であった。

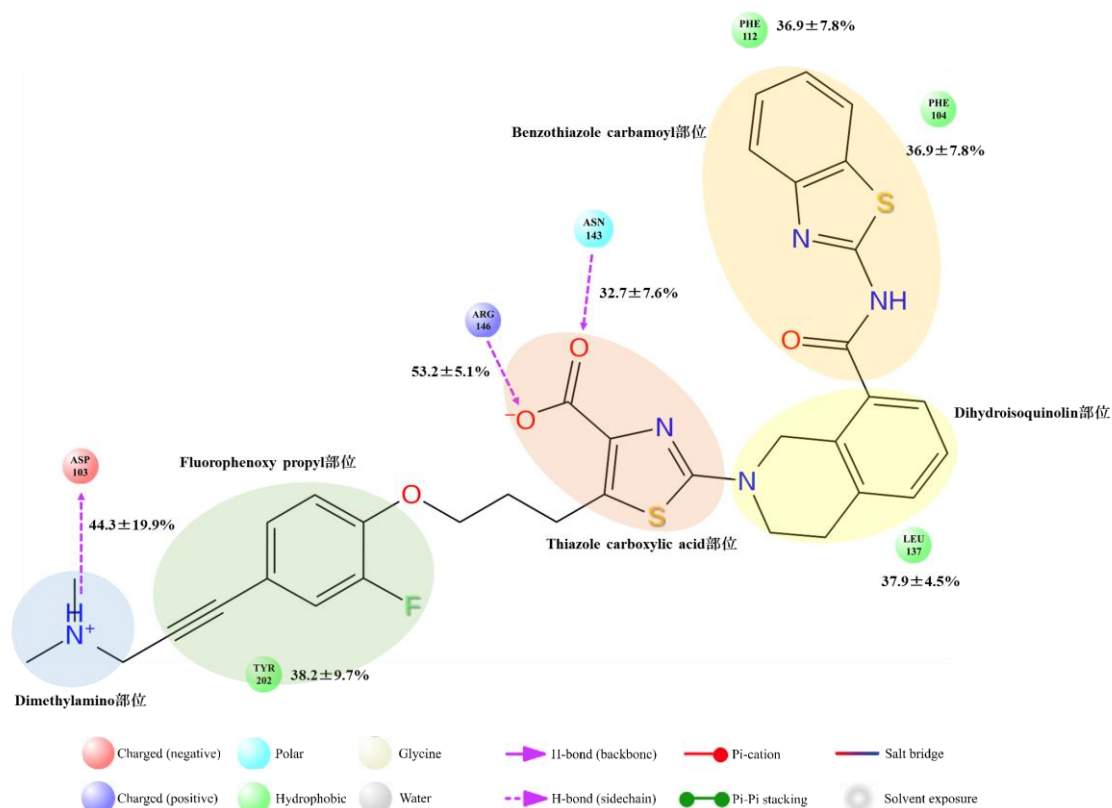


図 4 - 15 BCL-2/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用

総シミュレーション時間の 30%以上で A-1155463 と相互作用していたアミノ酸残基を示している。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 4 - 4 BCL-2/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用

アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Asp-103	Dimethylamino 部位	水素結合	44.3 ± 19.9
Phe-104	Benzothiazole carbamoyl 部位	疎水性相互作用	36.9 ± 7.8
Phe-112	Benzothiazole carbamoyl 部位	疎水性相互作用	41.8 ± 4.0
Leu-137	Dihydroisoquinolin 部位	疎水性相互作用	37.9 ± 4.5
Asn-143	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	32.7 ± 7.6
Arg-146	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	53.2 ± 5.1
Tyr-202	Fluorophenoxy propyl 部位	疎水性相互作用	38.2 ± 9.7

* Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

4.2.8. BCL-X_L/A-1155463 複合体の相互作用解析

BCL-X_L/A-1155463 複合体における BCL-X_L と A-1155463 の間で見られた相互作用を図 4 - 16 に示し、表 4 - 5 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30%以上にわたって A-1155463 と相互作用を形成していたアミノ酸は 8 残基（Tyr-101、Phe-105、Ser-106、Leu-108、Leu-130、Asn-136、Arg-139 と Ala-149）であった。

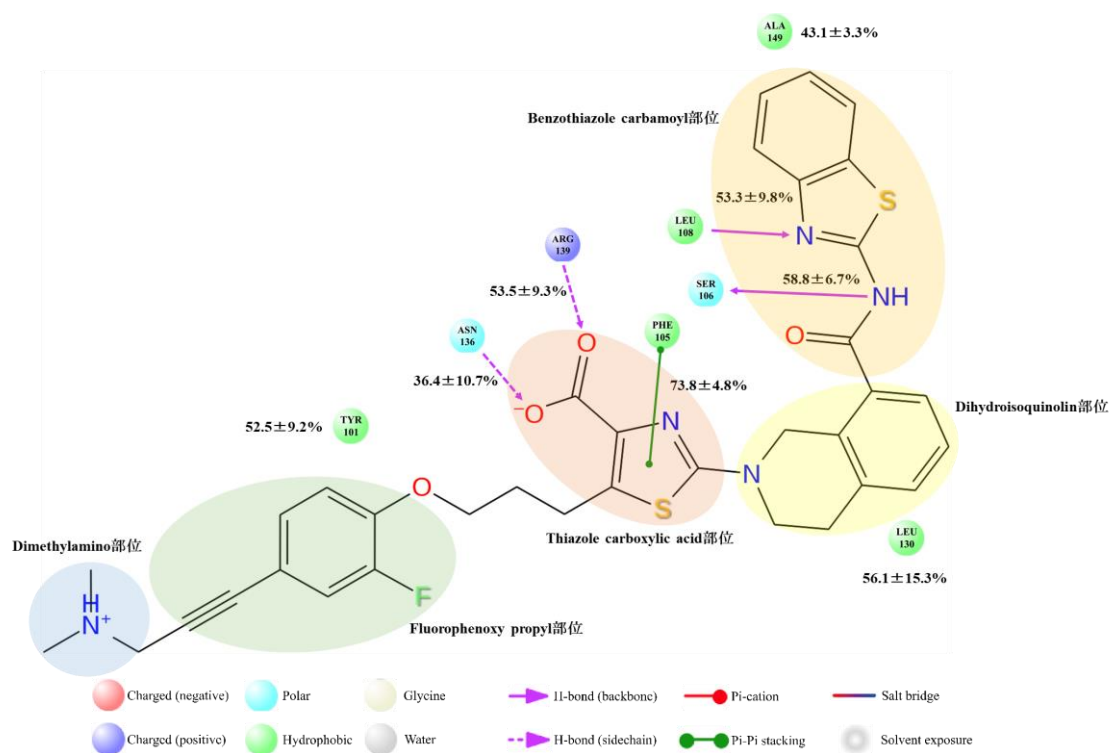


図 4 - 16 BCL-X_L/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用

総シミュレーション時間の 30%以上で A-1155463 と相互作用していたアミノ酸残基を示している。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 4 - 5 BCL-X_L/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用

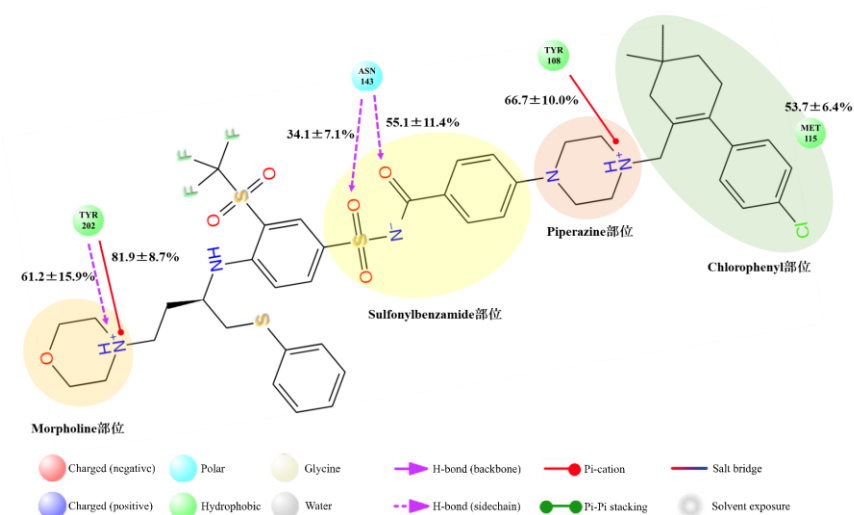
アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率* (%)
Tyr-101	Fluorophenoxy propyl 部位	疎水性相互作用	52.5 ± 9.2
Phe-105	Thiazole carboxylic acid 部位	π - π スタッキング	73.8 ± 4.8
Ser-106	Benzothiazole carbamoyl 部位	水素結合 (主鎖)	58.8 ± 6.7
Leu-108	Benzothiazole carbamoyl 部位	水素結合 (主鎖)	53.3 ± 9.8
Leu-130	Dihydroisoquinolin 部位	疎水性相互作用	56.1 ± 15.3
Asn-136	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	36.4 ± 10.7
Arg-139	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	53.5 ± 9.3
Ala-149	Benzothiazole carbamoyl 部位	疎水性相互作用	43.1 ± 3.3

* Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

4.2.9. BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-X_L/Navitoclax 複体の相互作用比較

Navitoclax は BCL-2 と BCL-X_L の両方を阻害することが知られており、阻害定数は同程度の値となっている。Navitoclax と BCL-2 および BCL-X_L との相互作用は選択的阻害剤に対する基準となると考えられる。BCL-2 中の Tyr-108 は BCL-X_L の Tyr-101 に対応し、類似した相互作用を示していた。BCL-2 と総シミュレーション時間の 30%以上にわたって相互作用していた他のアミノ酸 (Met-115、Asn-143 と Tyr-202) に対応する BCL-X_L のアミノ酸も 30 %以上の保持率はないものの同様の相互作用を示した。Navitoclax では BCL-2 と BCL-X_L で類似した相互作用を示すことから、Navitoclax は両方のタンパク質を阻害できると考えられる。

(a)



(b)

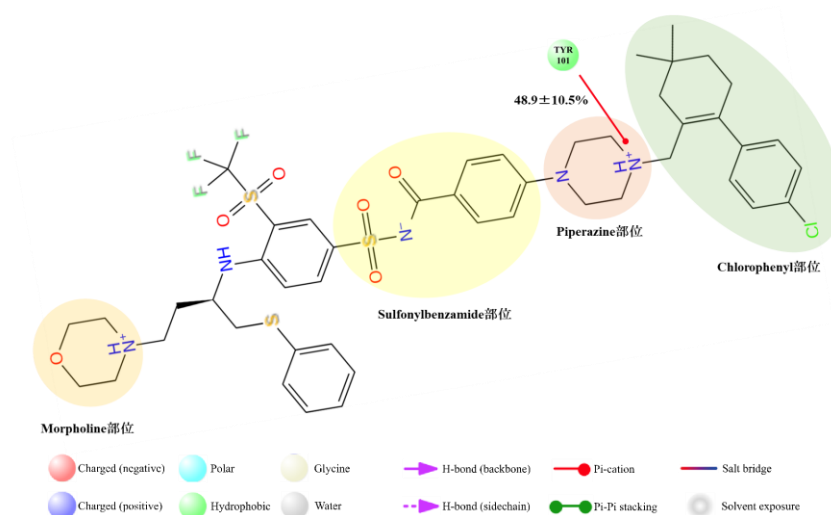


図 4 - 17 BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-X_L/Navitoclax 複合体の相互作用比較

総シミュレーション時間の30%以上でNavitoclaxと相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率はRun1～Run4の平均と標準偏差を示している。(a) BCL-2/Navitoclax 複合体で形成されていた相互作用。(b) BCL-X_L/Navitoclax 複合体で形成されていた相互作用。

表 4 - 6 BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-X_L/Navitoclax 複合体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-2/BCL-X _L)	BCL-2/Navitoclax 複合体			BCL-X _L /Navitoclax 複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Tyr-108/Tyr-101	Piperazine 部位	π -カチオン	66.7 $\pm$ 10.0	Piperazine 部位	π -カチオン	48.9 $\pm$ 10.5
Met-115/Leu-108	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	53.7 $\pm$ 6.4	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	21.4 $\pm$ 7.5
Asn-143/Asn-136	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	55.1 $\pm$ 11.4	-	-	-
Asn-143/Asn-136	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	34.1 $\pm$ 7.1	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	9.7 $\pm$ 6.1
Tyr-202/Tyr-195	Morpholine 部位	π -カチオン	81.9 $\pm$ 8.7	Morpholine 部位	π -カチオン	7.4 $\pm$ 10.5
Tyr-202/Tyr-195	Morpholine 部位	水素結合	61.2 $\pm$ 15.9	-	-	-

4.2.10. BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-2/ABT-199 複体の相互作用比較

BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-2/ABT-199 複合体で見られた相互作用をまとめた (図 4 - 18、表 4 - 7)。ABT-199 は Navitoclax を基にして設計されているので、Tyr-108, Met-115, Asn-143, Tyr-202 は類似した相互作用が二つの複合体では見られた。BCL-2/ABT-199 複合体では BCL-2/Navitoclax 複合体に加えて 2 つの相互作用が新たに観測された。Asp-103 は Azaindole 部位の窒素原子と相互作用を形成し、Phe-104 は chlorophenyl 部位との $\pi - \pi$ スタッキング相互作用を形成していることが明らかになった。

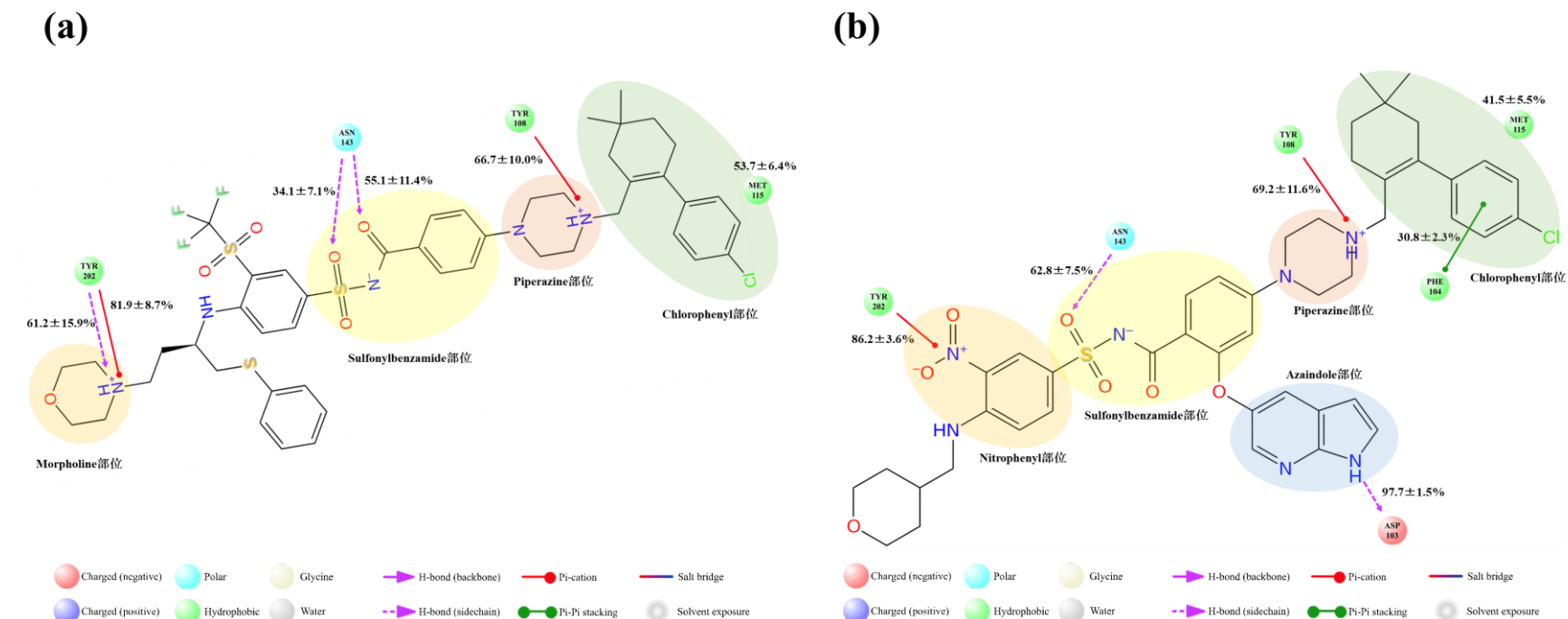


図 4 - 18 BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-2/ABT-199 複合体の相互作用比較

総シミュレーション時間の 30%以上で Navitoclax または ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。(a) BCL-2/Navitoclax 複合体で形成されていた相互作用。(b) BCL-2/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用。

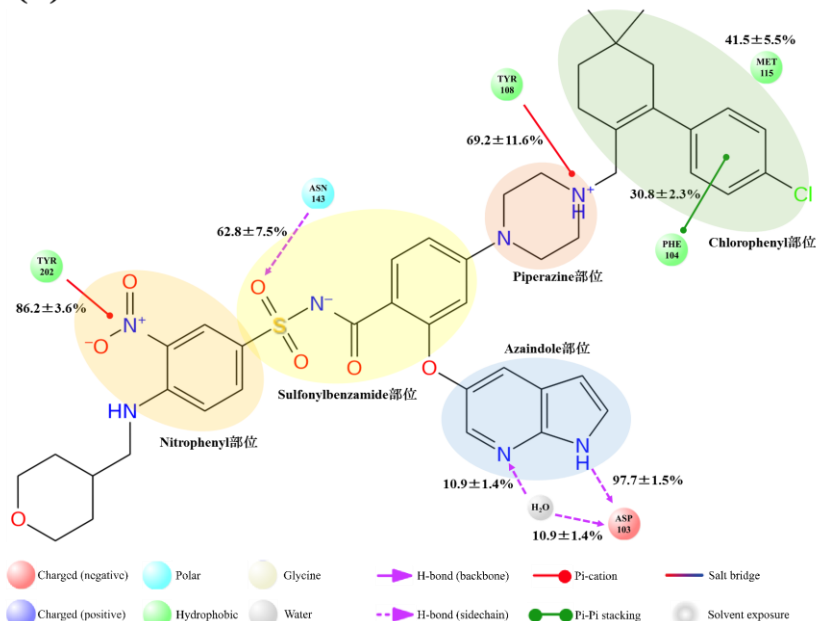
表 4 - 7 BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-2/ABT-199 複体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-2)	BCL-2/Navitoclax 複合体			BCL-2/ABT-199 複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Asp-103	-	-	-	Azaindole 部位	水素結合	97.7 ± 1.5
Phe-104	-	-	-	Chlorophenyl 部位	π - π スタッキング	30.8 ± 2.3
Tyr-108	Piperazine 部位	π -カチオン	66.7±10.0	Piperazine 部位	π -カチオン	69.2 ± 11.6
Met-115	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	53.7±6.4	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	41.5 ± 5.5
Asn-143	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	55.1±11.4	-	-	-
Asn-143	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	34.1±7.1	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	62.8 ± 7.5
Tyr-202	Morpholine 部位	π -カチオン	81.9±8.7	Nitrophenyl 部位	π -カチオン	86.2 ± 3.6
Tyr-202	Morpholine 部位	水素結合	61.2±15.9	-	-	-

4.2.11. BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複体の相互作用比較

BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体で見られた相互作用をまとめた(図 4 - 19、表 4 - 8)。BCL-2 の Asp-103、Phe-104、Tyr-108、Met-115、Asn-143、Tyr-202 は BCL-X_L の Glu-96、Phe-97、Tyr-101、Leu-108、Asn-136、Tyr-195 にそれぞれ対応する。立体構造上での各アミノ酸の位置は図 4 - 20 に示した。Phe-104 と Phe-97、Tyr-108 と Tyr-101、Asn-143 と Asn-136 および Tyr-202 と Tyr-195 はアライメント上で対応するアミノ酸であり、ABT-199 との相互作用様式は同じであった。また、総シミュレーション時間における相互作用の保持率にも大きな差がないことが明らかになった。Met-115 と Leu-108 ではアミノ酸残基は異なるものの、ABT-199 との相互作用様式は同じ非特異的な疎水性相互作用であった。Asp-103 と Glu-96 は共に ABT-199 の Azaindole 部位と水素結合を形成していた。相互作用の保持率を見ると Asp-103 は平均して総シミュレーション時間の 97.7%にわたって水素結合を形成していたのに対し、Glu-96 は平均して総シミュレーション時間の 41.8%しか水素結合を形成できていなかった。Asp-103 と Glu-96 では相互作用の保持率に違いがあることが明らかになった。

(a)



(b)

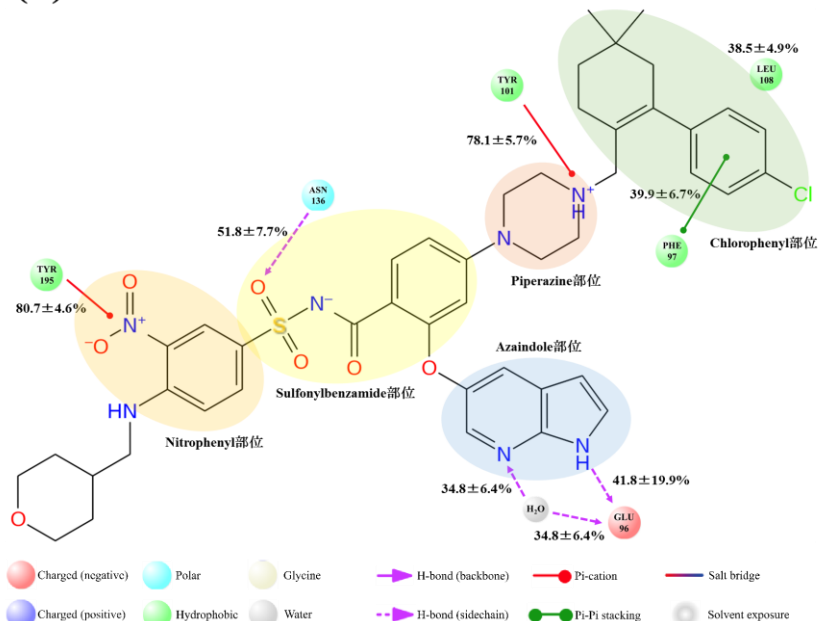


図 4 - 19 BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複体の相互作用比較

総シミュレーション時間の 30%以上で ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用的保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。(a) BCL-2/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用。Asp-103 の水を介した水素結合は保持率が 10.9±1.4%であるが、比較のため載せてある。(b) BCL-X_L/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用。

表 4 - 8 BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-2/BCL-X _L)	BCL-2/ABT-199 複合体			BCL-X _L /ABT-199 複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Asp-103/Glu-96	Azaindole 部位	水素結合	97.7 ± 1.5	Azaindole 部位	水素結合	41.8 ± 19.9
Asp-103/Glu-96	Azaindole 部位	水を介した水素結合	10.9±1.4	Azaindole 部位	水を介した水素結合	34.8±6.4
Phe-104/Phe-97	Chlorophenyl 部位	π - π スタッキング	30.8 ± 2.3	Chlorophenyl 部位	π - π スタッキング	39.9 ± 6.7
Tyr-108/Tyr-101	Piperazine 部位	π -カチオン	69.2 ± 11.6	Piperazine 部位	π -カチオン	78.1 ± 5.7
Met-115/Leu-108	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	41.5 ± 5.5	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	38.5 ± 4.9
Asn-143/Asn-136	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	62.8 ± 7.5	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	51.8 ± 7.7
Tyr-202/Tyr-195	Nitrophenyl 部位	π -カチオン	86.2 ± 3.6	Nitrophenyl 部位	π -カチオン	80.7 ± 4.6

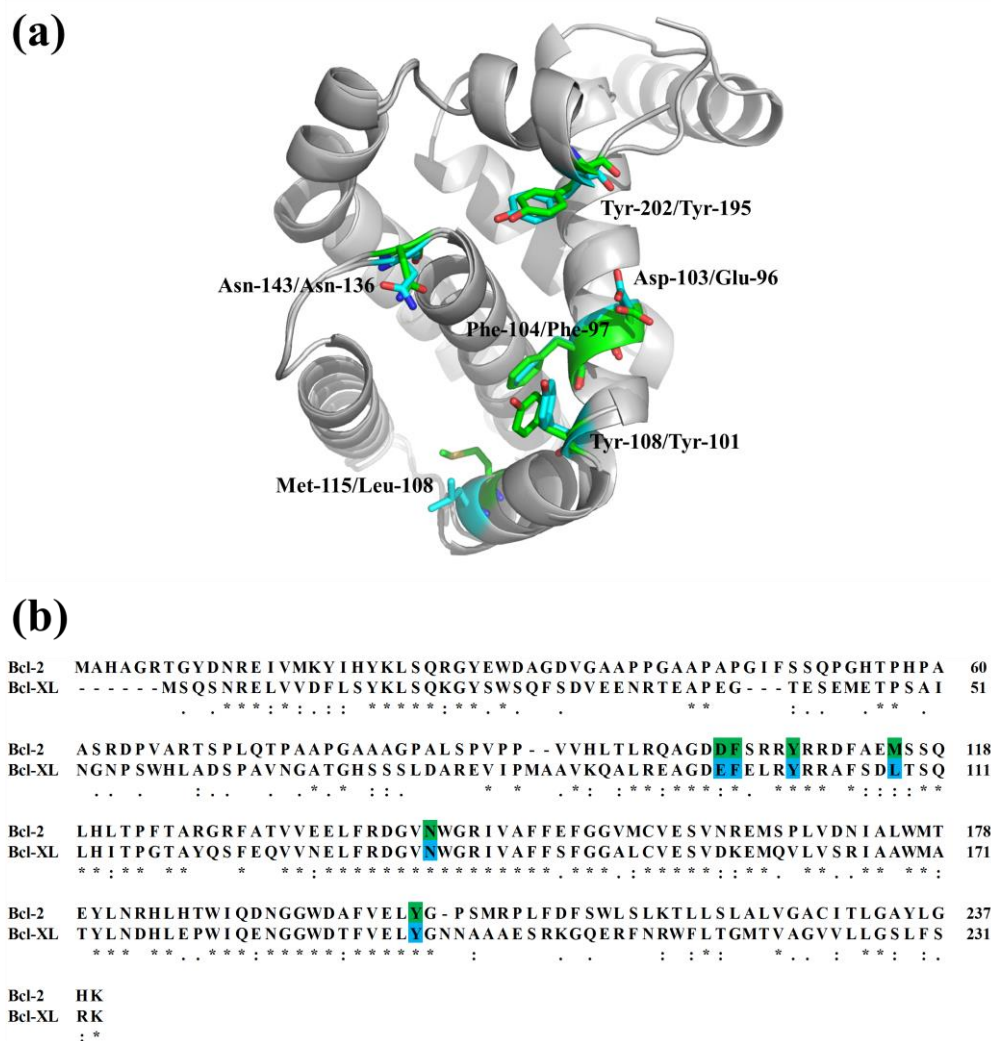


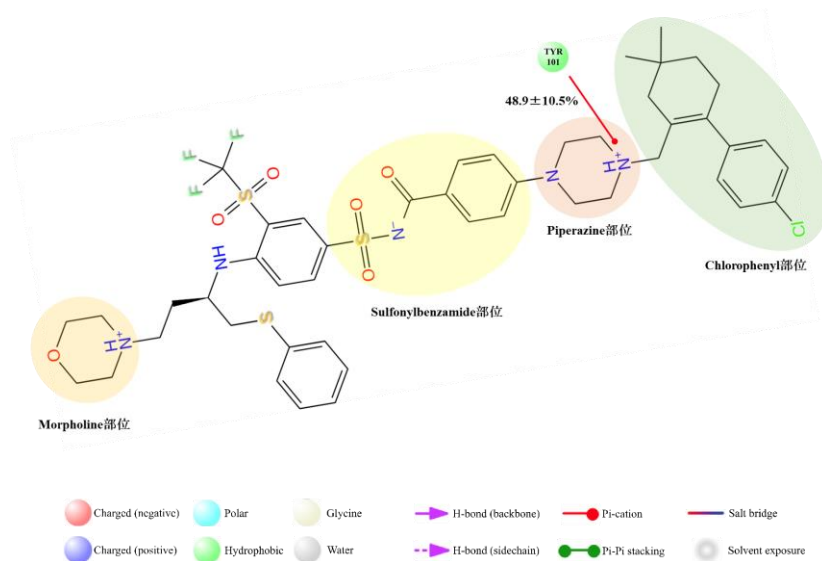
図 4 - 20 BCL-2 と BCL-X_L の構造および配列アライメント

(a) ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基の立体構造上での比較。BCL-2 および BCL-X_L の全体構造はグレーの Cartoon モデルで重ね合わせて示してある。4 回の Run を平均し、総シミュレーション時間の 30%以上にわたって ABT-199 と相互作用していた残基を緑 (BCL-2) とシアン (BCL-X_L) の stick モデルで示した。(b) BCL-2 と BCL-X_L のアミノ酸配列アライメント。4 回の Run を平均し、総シミュレーション時間の 30%以上にわたって ABT-199 と相互作用していた残基を緑 (BCL-2) と水色 (BCL-X_L) で示した。

4.2.12. BCL-X_L/Navitoclax と BCL-X_L/A-1155463 の相互作用比較

BCL-X_L/Navitoclax 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体では相互作用様式が異なっており、その原因として Navitoclax と A-1155463 の母核が異なっていることがあげられる。MACCS keys を用いて化合物類似度を Navitoclax と A-1155463 で計算すると 0.48 となり、Navitoclax と A-1155463 では構造が似ていないので相互作用様式が異なっていると考えられる。BCL-X_L/A-1155463 複合体では Phe-105、Ser-106、Leu-108、Leu-130、Asn-136、Arg-139 と Ala-149 の相互作用を新たに獲得していた。Tyr-101 は Navitoclax と A-1155463 と相互作用していたが、それらの様式は異なっていた。BCL-X_L/Navitoclax では Tyr-101 は Piperazine 部位と π - カチオン相互作用を形成していたのに対して、BCL-X_L/A-1155463 複合体では Fluorophenoxy propyl 部位と疎水性相互作用を形成していた。

(a)



(b)

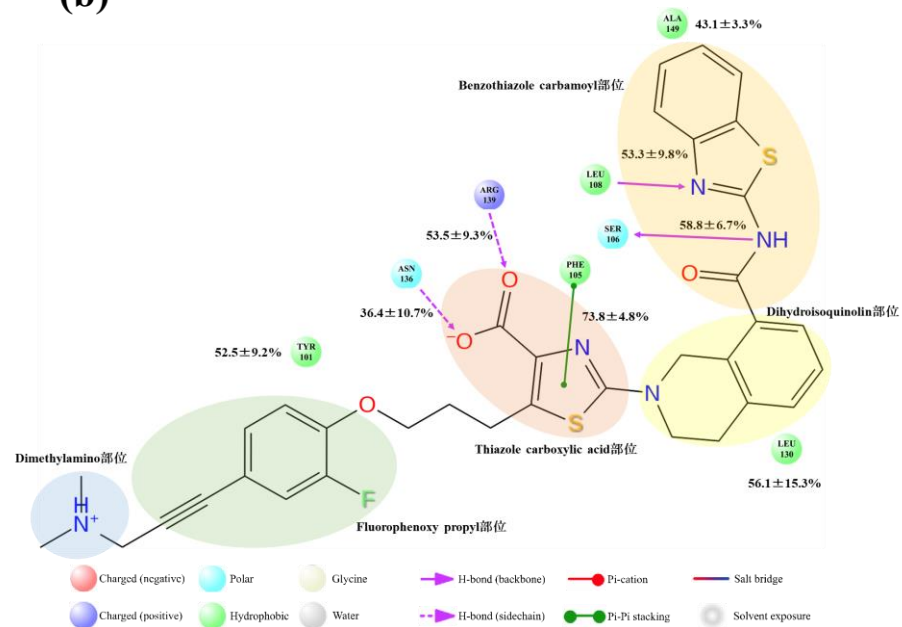


図 4 - 21 BCL-X_L/Navitoclax 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体の相互作用比較

総シミュレーション時間の 30%以上で Navitoclax または A-1155463 と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。(a) BCL-X_L/Navitoclax 複合体で形成されていた相互作用。(b) BCL-X_L/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用。

表 4 - 9 BCL-X_L/Navitoclax 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-X _L)	BCL-X _L /Navitoclax 複合体			BCL-X _L /A-1155463 複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Tyr-101	Piperazine 部位	π -カチオン	48.9 $\pm$ 10.5	Fluorophenoxy propyl 部位	疎水性相互作用	52.5 $\pm$ 9.2
Phe-105	-	-	-	Thiazole carboxylic acid 部位	π - π スタッキング	73.8 $\pm$ 4.8
Ser-106	-	-	-	Benzothiazole carbamoyl 部位	水素結合	58.8 $\pm$ 6.7
Leu-108	-	-	-	Benzothiazole carbamoyl 部位	水素結合	53.3 $\pm$ 9.8
Leu-130	-	-	-	Dihydroisoquinolin 部位	疎水性相互作用	56.1 $\pm$ 15.3
Asn-136	-	-	-	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	36.4 $\pm$ 10.7
Arg-139	-	-	-	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	53.5 $\pm$ 9.3
Ala-149	-	-	-	Benzothiazole carbamoyl 部位	疎水性相互作用	43.1 $\pm$ 3.3

4.2.13. BCL-2/A-1155463 と BCL-X_L/A-1155463 の相互作用比較

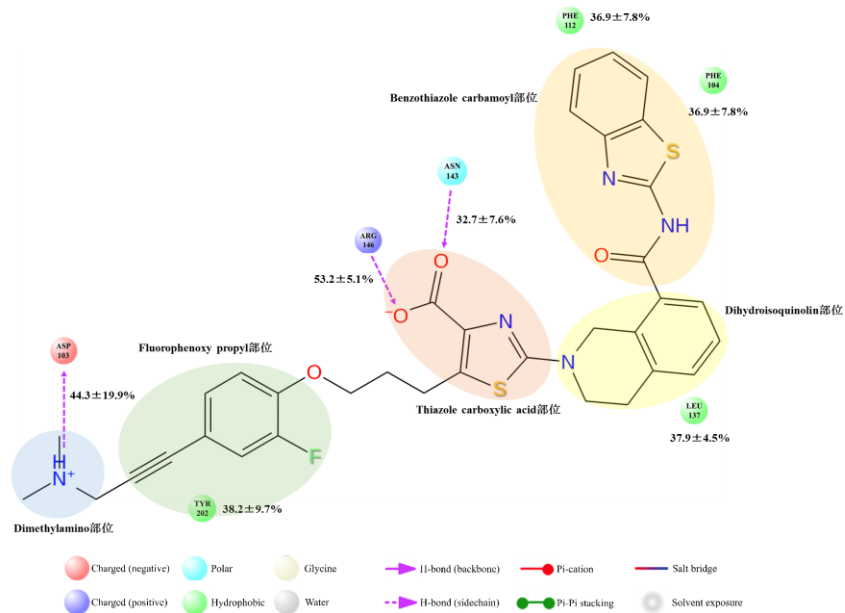
BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体で見られた相互作用をまとめた (図 4 - 22、表 4 - 10)。BCL-2 の Phe-112、Leu-137、Asn-143 と Arg-146 は BCL-X_L の Phe-105、Leu-130、Asn-136 と Arg-139 に対応する。表 4 - 10 でまとめた各アミノ酸の立体構造上での位置を図 4 - 23 に示した。

BCL-2/A-1155463 複合体中でのみ相互作用していたアミノ酸残基は Asp-103、Phe-104、Tyr-202 であった。一方、BCL-X_L/A-1155463 複合体中でのみ相互作用していたアミノ酸残基は Tyr-101、Phe-105、Ser-106、Leu-108、Ala-149 であった。

Leu-137 と Leu-130、Asn-143 と Asn-136 および Arg-146 と Arg-139 は BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体でそれぞれ共通した相互作用を形成しており、相互作用の保持率も差が見られなかった。

BCL-X_L の Phe-105 と BCL-2 の Phe-112 は対応するアミノであるが、それぞれの A-115546 との相互作用様式は異なっていた。Phe-105 は A-1155463 の Thiazole carboxylic acid 部位と π - π スタッキングを形成していたのに対して、Phe-112 は Benzothiazole carbamoyl 部位と疎水性相互作用を形成していた。

(a)



(b)

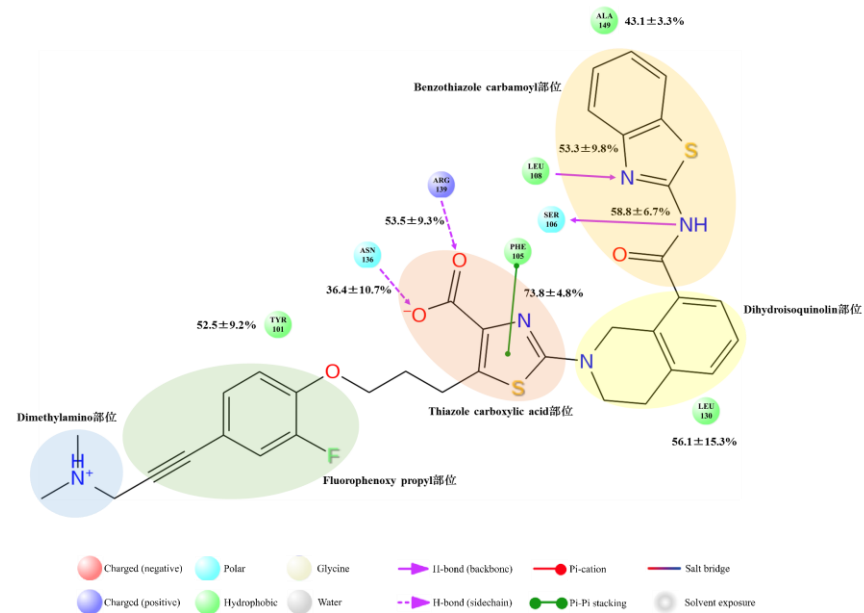


図 4 - 22 BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体の相互作用比較

(a) BCL-2/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用。(b) BCL-X_L/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用。

表 4 - 10 BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-2/BCL-X _L)	BCL-2/A-1155463 複合体			BCL-X _L /A-1155463 複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Asp-103/Glu-96	Dimethylamino 部位	水素結合	44.3 ± 19.9	-	-	-
Phe-104/Phe-97	Benzothiazole carbamoyl 部位	疎水性相互作用	36.9 ± 7.8	-	-	-
Tyr-108/Tyr-101	-	-	-	Fluorophenoxy propyl 部位	疎水性相互作用	52.5 ± 9.2
Phe-112/Phe-105	Benzothiazole carbamoyl 部位	疎水性相互作用	41.8 ± 4.0	Thiazole carboxylic acid 部位	π - π スタッキング	73.8 ± 4.8
Ala-113/Ser-106	-	-	-	Benzothiazole carbamoyl 部位	水素結合	58.8 ± 6.7
Met-115/Leu-108	-	-	-	Benzothiazole carbamoyl 部位	水素結合	53.3 ± 9.8
Leu-137/Leu-130	Dihydroisoquinolin 部位	疎水性相互作用	37.9 ± 4.5	Dihydroisoquinolin 部位	疎水性相互作用	56.1 ± 15.3
Asn-143/Asn-136	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	32.7 ± 7.6	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	36.4 ± 10.7
Arg-146/Arg-139	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	53.2 ± 5.1	Thiazole carboxylic acid 部位	水素結合	53.5 ± 9.3
Val-156/Ala-149	-	-	-	Benzothiazole carbamoyl 部位	疎水性相互作用	43.1 ± 3.3
Tyr-202/Tyr-195	Fluorophenoxy propyl 部位	疎水性相互作用	38.2 ± 9.7	-	-	-

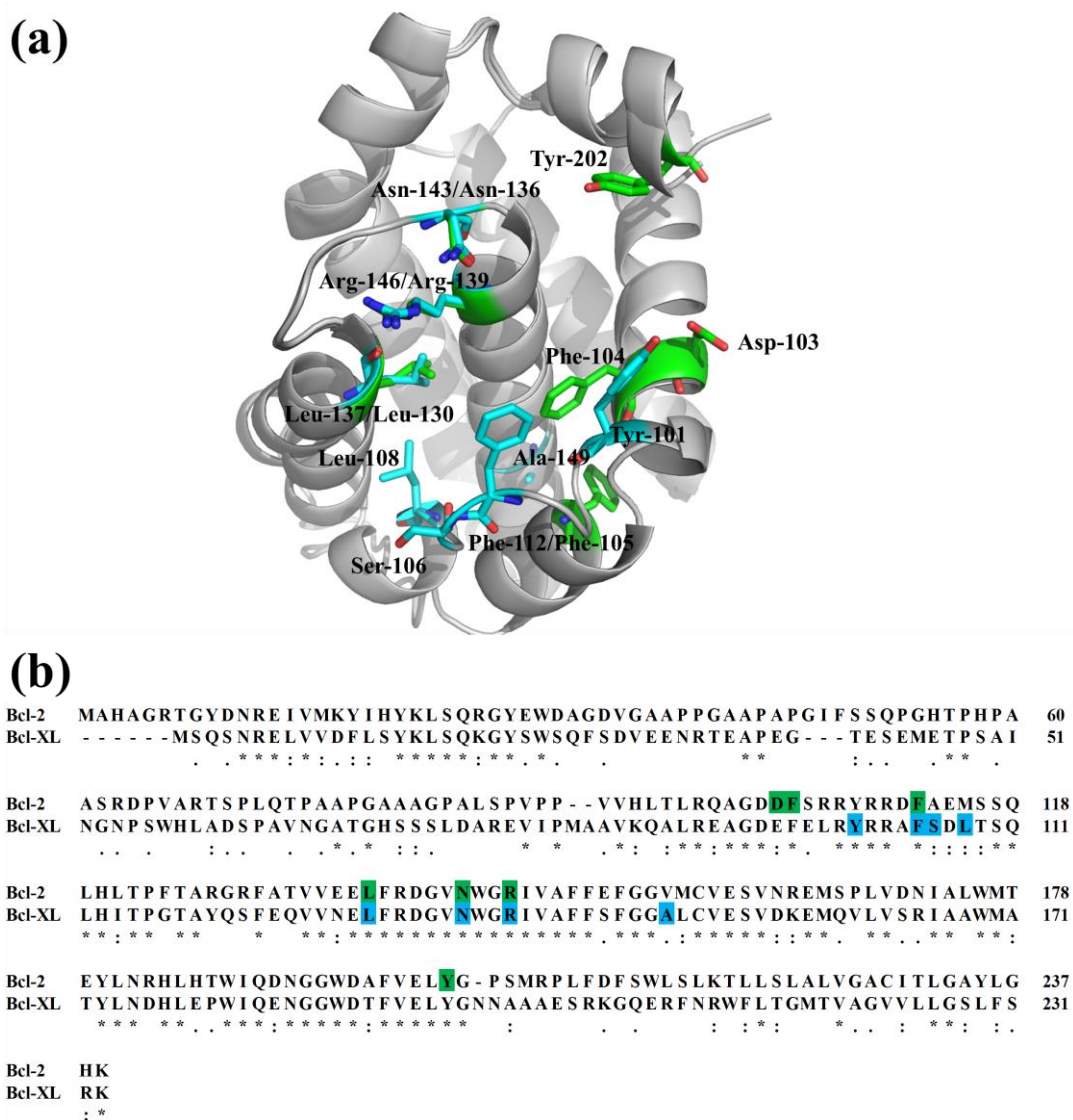


図 4-23 BCL-2 と BCL-X_L の構造および配列アライメント

(a) A-1155463 と相互作用していたアミノ酸残基の立体構造上での比較。BCL-2 および BCL-X_L の全体構造はグレーの Cartoon モデルで重ね合わせて示してある。4 回の Run を平均し、総シミュレーション時間の 30% 以上にわたって A-1155463 と相互作用していた残基を緑 (BCL-2) と水色 (BCL-X_L) の stick モデルで示した。(b) BCL-2 と BCL-X_L のアミノ酸配列アライメント。4 回の Run を平均し、総シミュレーション時間の 30% 以上にわたって A-1155463 と相互作用していた残基を緑 (BCL-2) と水色 (BCL-X_L) で示した。

4.2.14. ABT-199 の BCL-2 選択性

BCL-2 と BCL-X_L の阻害剤結合部位におけるアミノ酸残基の違いを図 4 - 24 に示した。阻害剤から 5Å 以内にあるアミノ酸は 40 残基あり、そのうち 12 残基が BCL-2 と BCL-X_L でアミノ酸が異なる。この 12 残基のうち、本研究で ABT-199 との相互作用が確認できたアミノ酸は Asp-103/Glu-96 と Met-115/Leu-108 であった。Met-115 と Leu-108 は異なるアミノ酸残基であるが、共に ABT-199 と疎水性相互作用を形成していたため、選択性に寄与しているとは考えにくい。一方、相互作用解析の結果から Asp-103 と Glu-96 の相互作用の保持率に差があることが明らかになった。また、BCL-2 の Asp-103 と BCL-X_L の Glu-96 の違いは阻害剤の BCL-2 選択性において重要な因子であると考えられている[73]。

BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の代表構造を図 4 - 25 と図 4 - 26 に示す。BCL-2/ABT-199 複合体の代表構造を見ると、Asp-103 が ABT-199 の Azaindole 部位と水素結合を形成するのに適切な距離 (2.8 Å) に配置されているのがわかる。一方、Glu-96 は Azaindole 部位の方を向いておらず、直接の水素結合を形成できない距離 (4.3 Å) となっている。Glu-96 がこのような配置になっている場合は、水を介した水素結合を形成していると考えられる。Glu-96 と Azaindole 部位の水を介した水素結合の保持率は平均して 34.8% となっている (表 4 - 8)。Glu-96 と Azaindole 部位との直接の水素結合の保持率は平均して 41.8% であることから、Glu-96 は Azaindole 部位と直接の水素結合を形成している状態と水を介した水素結合を形成している状態の 2 つの状態を行き来していると考えられる。

ABT-199 の開発において、Navitoclax analog の Indole 部位を Azaindole に変化させることで、BCL-2 の Arg-107 と ABT-199 の相互作用を増やすことができると考えられていた[73]。しかし、相互作用解析の結果からは、Arg-107 と Azaindole 部位との相互作用はほとんど観測されなかった。BCL-2/ABT-199 複合体において、Arg-107 は Asp-103 と

相互作用していることがわかった（図 4 - 27）。Arg-107 は Asp-103 と水素結合または塩橋を形成することで、Asp-103 と Azaindole 部位との水素結合形成を安定化していると考えられる。

ABT-199 の BCL-2 に対する選択性は Asp-103 と Azaindole 部位との安定した水素結合が重要であると考えられる。

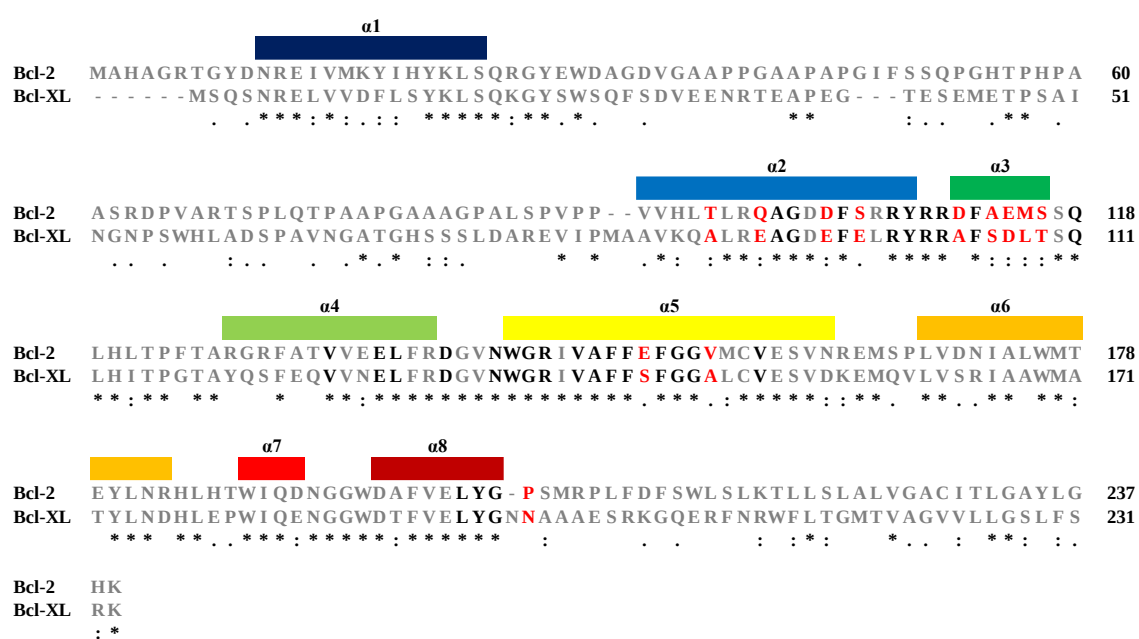


図 4 - 24 阻害剤結合部位における BCL-2 と BCL-XL のアミノ酸残基の違い

阻害剤の周囲 5Å 以内にあるアミノ酸は黒字で示し、阻害剤の周囲 5Å 以内かつ BCL-2 と BCL-XL でアミノ酸が異なる場所を赤字で示した。

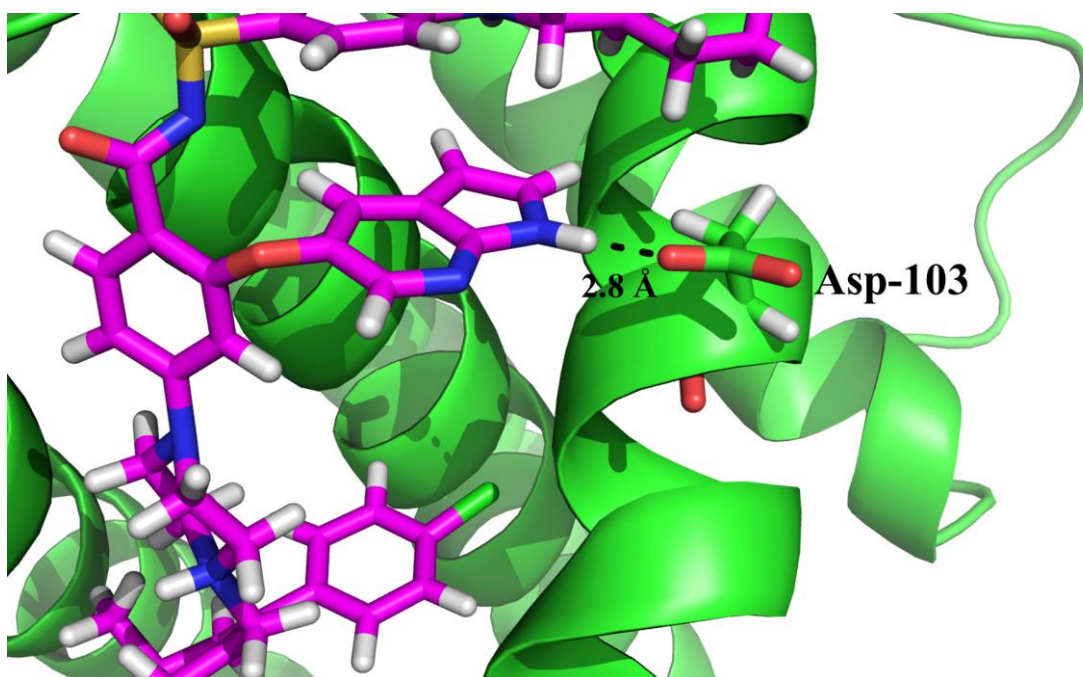


図 4 - 25 BCL-2/ABT-199 複合体の代表構造

BCL-2 を緑の Cartoon モデル、ABT-199 をマゼンタの Stick モデル、Asp-103 を Stick モデルで表示。水素原子は白、酸素原子は赤、窒素原子は青と硫黄原子は黄色となっている。BCL-2 では炭素原子は緑、ABT-199 ではマゼンタとなっている。この構造のシミュレーション中での存在確率は 68.8 %であった。

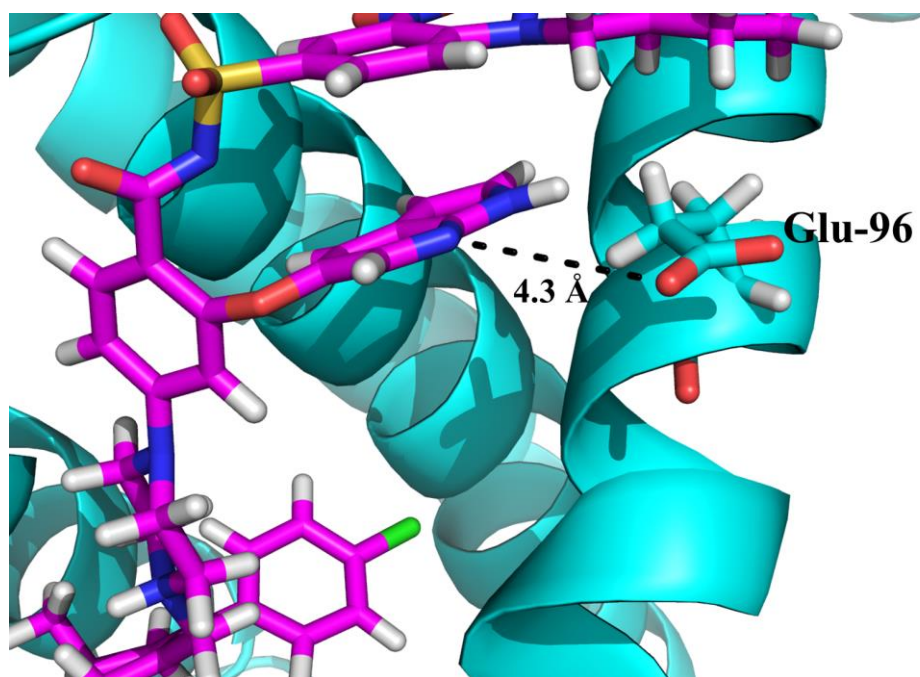


図 4 - 26 BCL-X_L/ABT-199 複合体の代表構造

BCL-X_L をシアンの Cartoon モデル、ABT-199 をマゼンタの Stick モデル、Glu-96 を Stick モデルで表示。水素原子は白、酸素原子は赤、窒素原子は青と硫黄原子は黄色となっている。BCL-X_L では炭素原子はシアン、ABT-199 ではマゼンタとなっている。この構造のシミュレーション中での存在確率は 12.1 %であった。

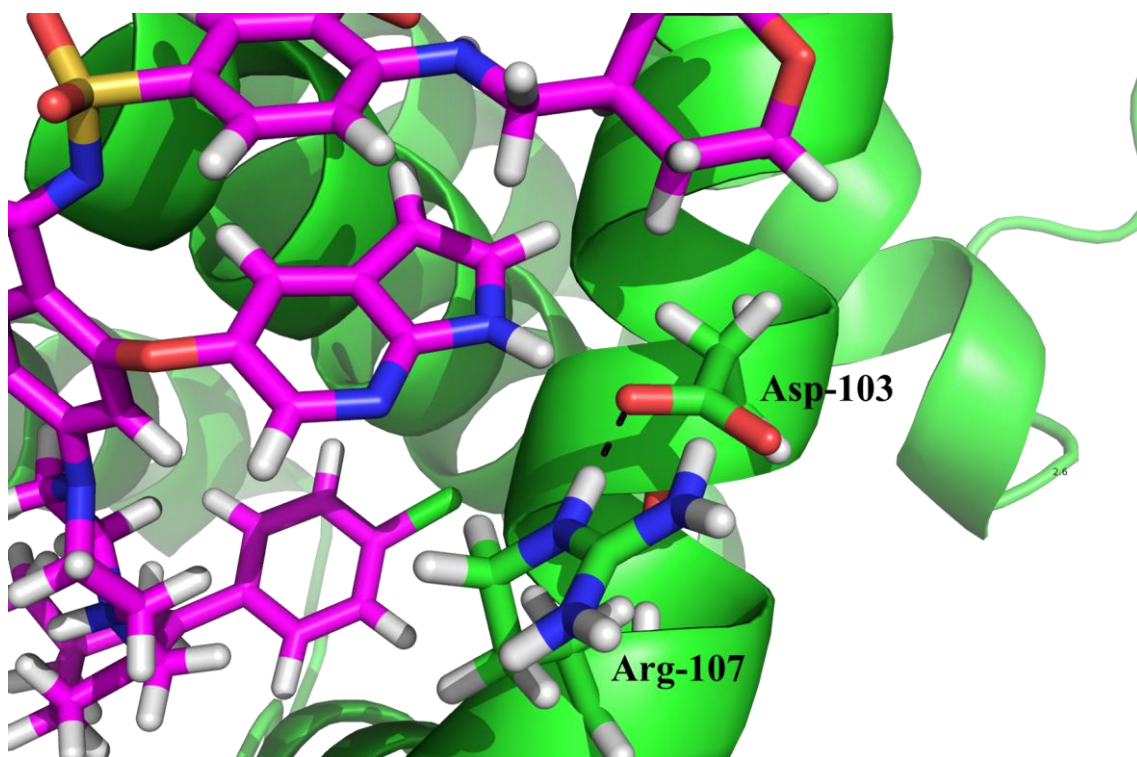


図 4 - 27 BCL-2/ABT-199 複合体における Asp-103 と Arg-107 の相互作用

BCL-2 を緑の Cartoon モデル、ABT-199 をマゼンタの Stick モデル、Asp-103 と Arg-107 を Stick モデルで表示。水素原子は白、酸素原子は赤、窒素原子は青と硫黄原子は黄色となっている。BCL-2 では炭素原子は緑、ABT-199 ではマゼンタとなっている。

4.2.15. A-1155463 の BCL-X_L 選択性

MDシミュレーションのトラジェクトリから得られた代表構造を比較すると、BCL-X_L の Phe-105、Ser-106 と Leu-108 が位置する α ヘリックス 3 の二次構造に違いが見られた (図 4 - 28、図 4 - 29)。BCL-X_L では α ヘリックス 3 と α ヘリックス 4 に構造変化が起きていることが報告されている[116]。 α ヘリックス 3 の緩みはアポ体構造、BAK 結合構造、Beclin-1 結合構造で報告されている[67-69]。一方、BIM 結合構造、ABT-737 結合構造では α ヘリックス 3 はヘリックス構造を保っている[49, 70]。BCL-X_L/A-1155463 複合体では、 α ヘリックス 3 は緩み、ループ様の構造をとっており、この 2 次構造は MD シミュレーション中保持されていた。

BCL-X_L の Phe-105 と BCL-2 の Phe-112 は構造上対応するアミノ酸残基であるが、それぞれの A-1155463 との相互作用様式は異なっていた。Phe-112 は疎水性のポケットを構成しているため、Benzothiazole carbamoyl 部位と疎水性相互作用を形成している。一方、Phe-105 は疎水性のポケットを構成しておらず、ポケットから外に出ているため、Phe-105 は Thiazole carbocyclic acid 部位と π - π スタッキング相互作用を形成している (図 4 - 28、図 4 - 29)。

Phe-105 と Phe-112 の位置によって、A-1155463 の Benzothiazole carbamoyl 部位の向きが大きく変化していることがわかった (図 4 - 30)。BCL-2/A-1155463 複合体では、A-1155463 の Benzothiazole carbamoyl 部位は Phe-112 と疎水性相互作用を形成するような向きで疎水性ポケットに結合し、Phe-104 とも疎水性相互作用を形成しているのがわかる (図 4 - 31)。一方、BCL-X_L/A-1155463 複合体では、Phe-105 が疎水性ポケットを構成していないので、Benzothiazole carbamoyl 部位が 90°回転した向きで結合している。さらに、 α ヘリックス 3 が緩んだことで、Ser-106 と Leu-108 の主鎖が新たに水素結合を形成できるようになっていた (図 4 - 32)。

A-1155463 の BCL-X_L 選択性は、 α ヘリックス 3 の二次構造変化とそれに伴う Phe-105、

Ser-106 および Leu-108 の相互作用獲得が要因であると考えられる。

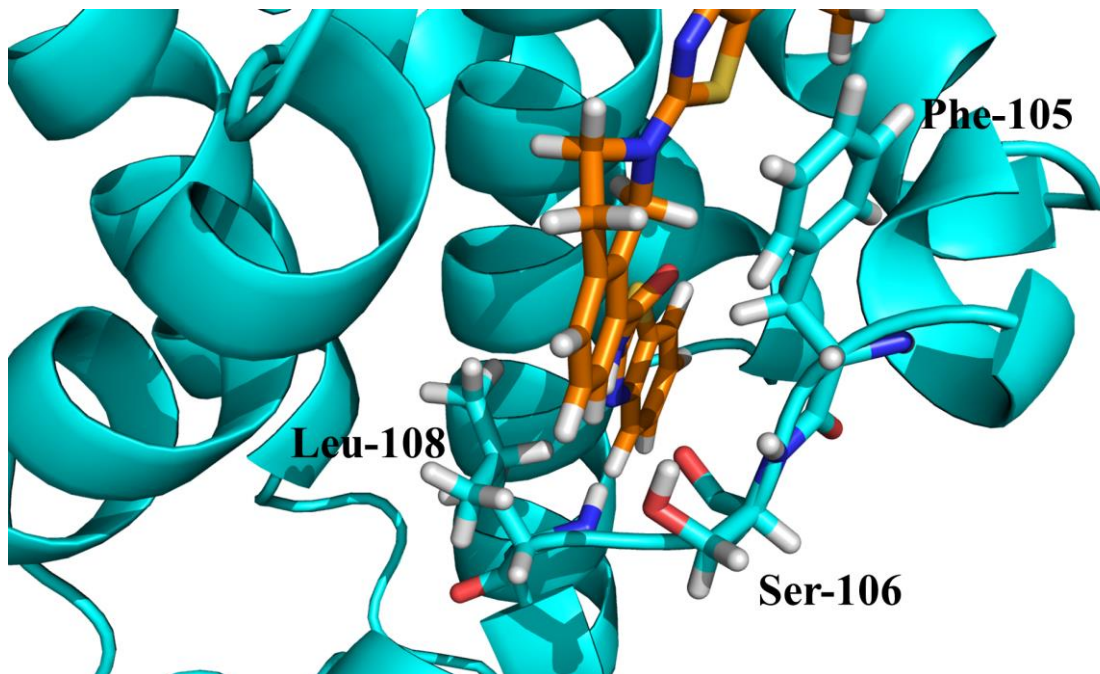


図 4 - 28 BCL-X_L/A-1155463 複合体の代表構造

BCL-X_L をシアンの Cartoon モデル、A-1155463 をオレンジの Stick モデルで表示した。

BCL-X_L の Phe-105、Ser-106 と Leu-108 は Stick モデルで表示した。水素原子は白、酸素原子は赤、窒素原子は青と硫黄原子は黄色となっている。BCL-X_L では炭素原子はシアン、A-1155463 ではオレンジとなっている。

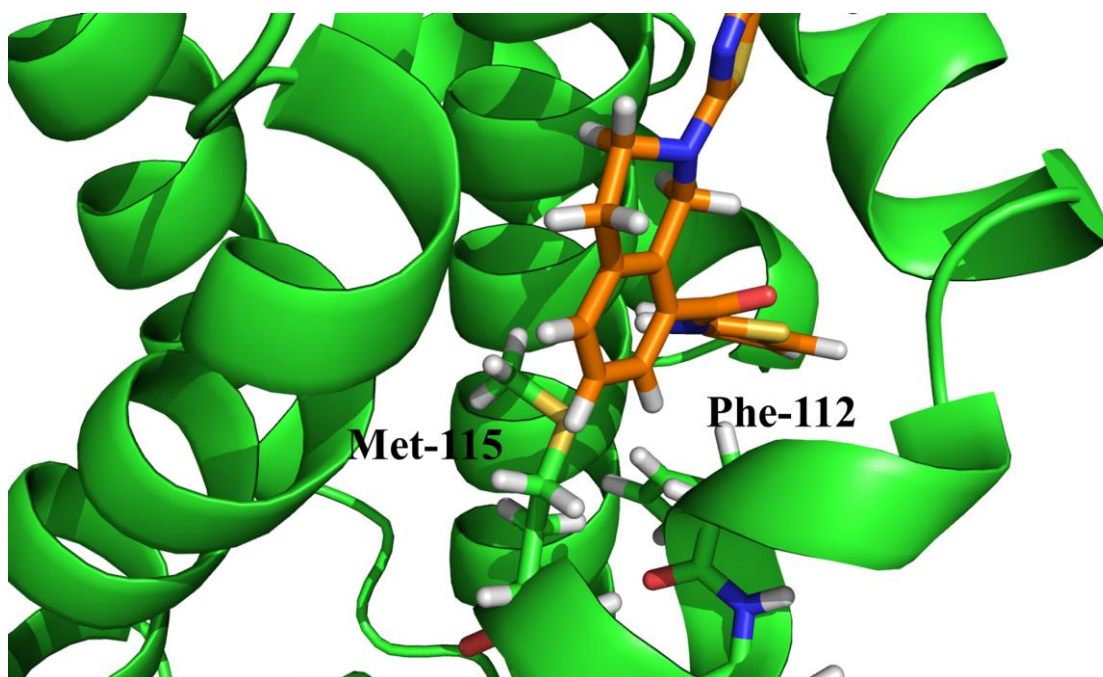


図 4 - 29 BCL-2/A-1155463 複合体の代表構造

BCL-2 を緑の Cartoon モデル、A-1155463 をオレンジの Stick モデルで表示した。BCL-2 の Phe-112 と Met-115 は Stick モデルで表示した。水素原子は白、酸素原子は赤、窒素原子は青と硫黄原子は黄色となっている。BCL-2 では炭素原子は緑、A-1155463 ではオレンジとなっている。

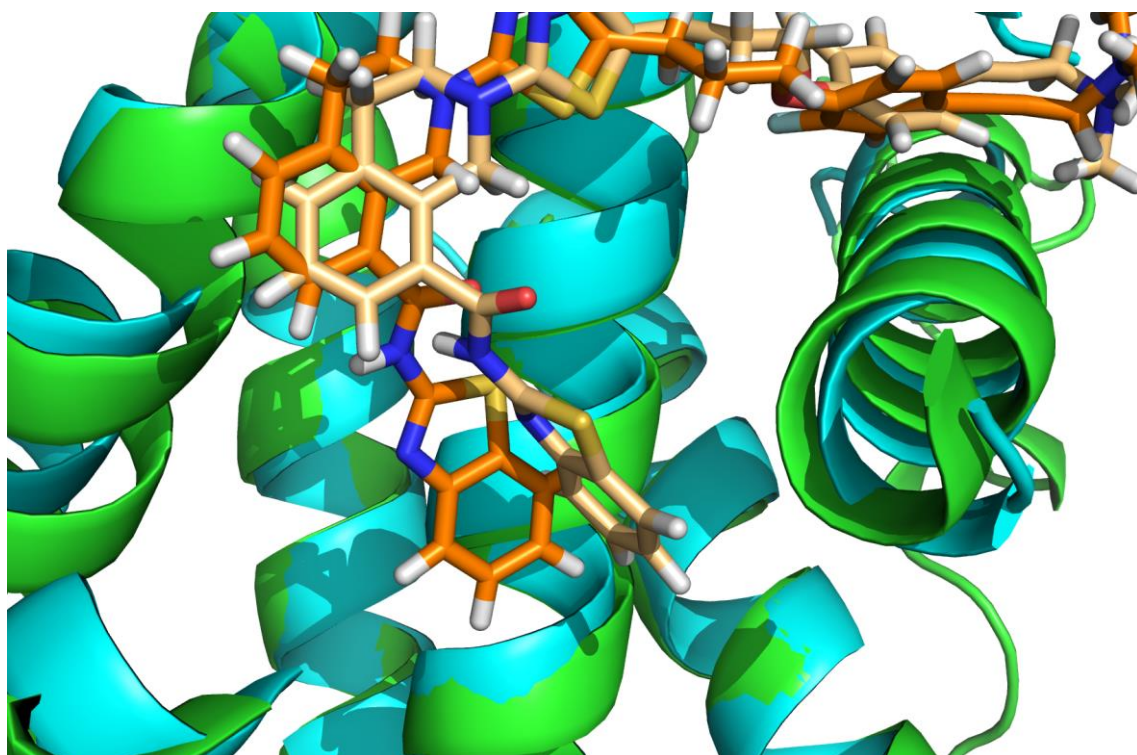


図 4 - 30 Benzothiazole carbamoyl 部位の向きの違い

BCL-X_L をシアンの cartoon モデル、BCL-2 を緑の cartoon モデルで示した。

BCL-X_L/A1155463 複合体中の A-1155463 をオレンジ、BCL-2/A-1155463 複合体中の A-1155463 をライトオレンジの stick モデルで示した。

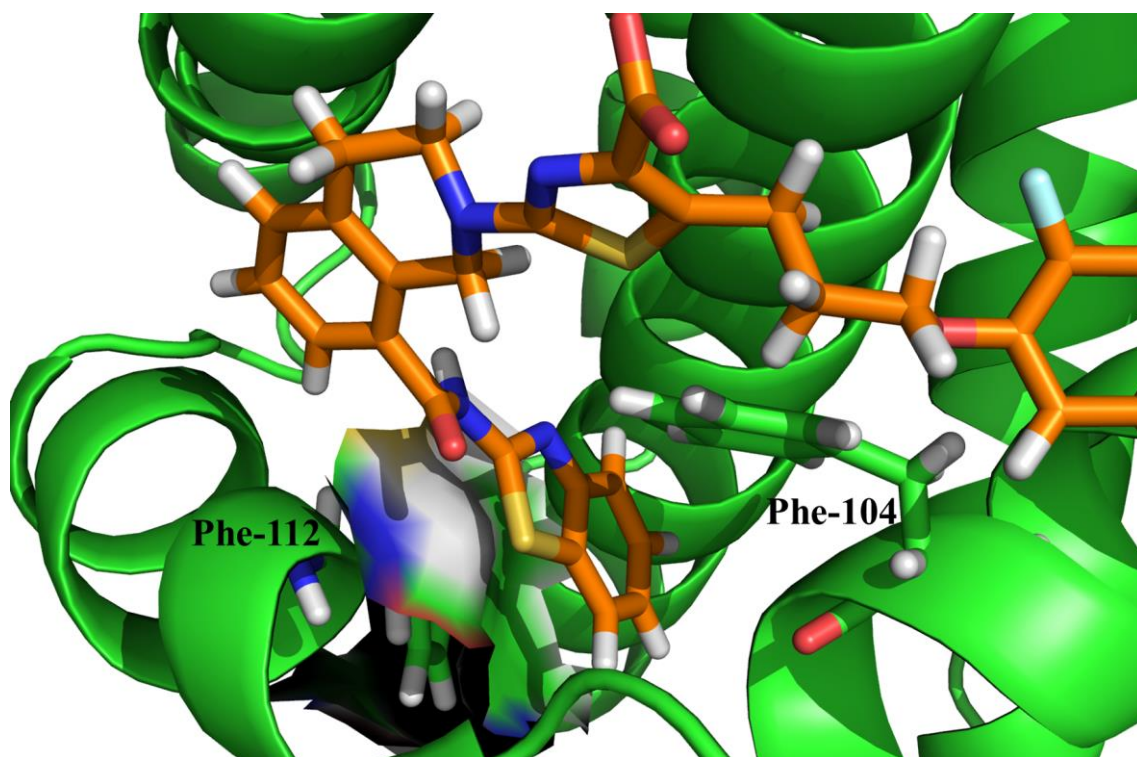


図 4 - 31 BCL-2/A-1155463 における Benzothiazole carbamoyl 部位との相互作用

BCL-2 を緑の Cartoon モデル、A-1155463 をオレンジの stick モデルで示した。BCL-2 中の Phe-104 は stick モデル、Phe-112 は stick モデルと surface モデルで示した。

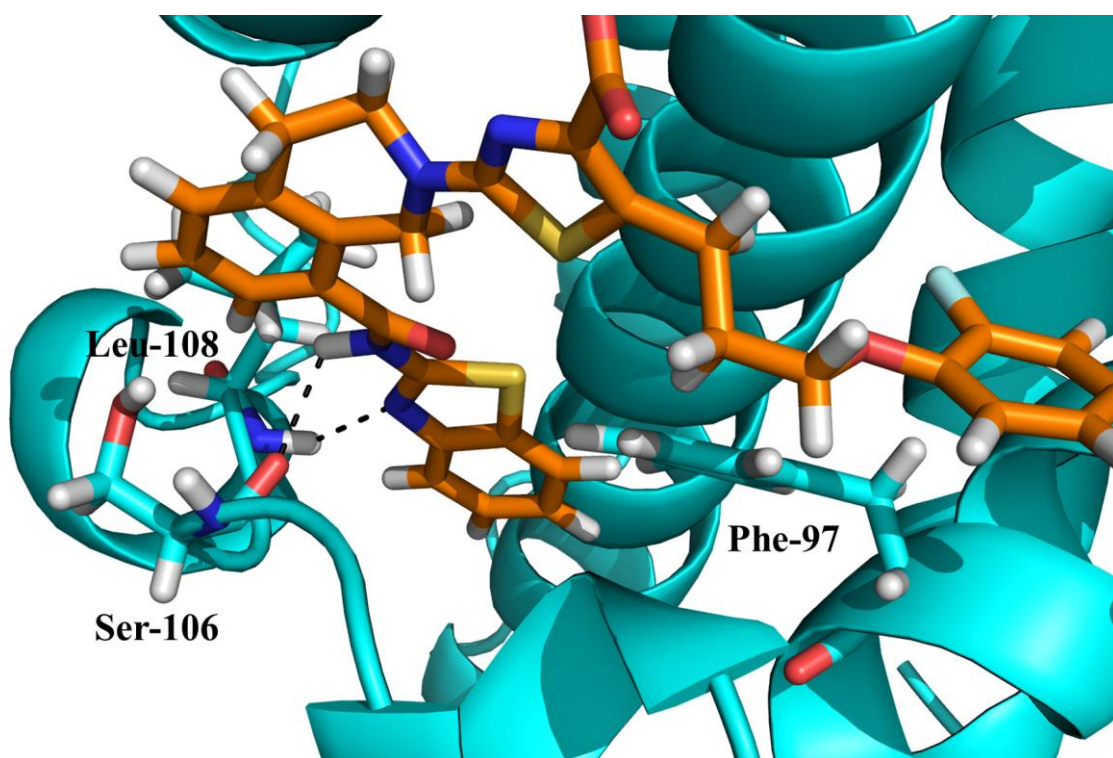


図 4 - 32 BCL-X_L/A-1155463 における Benzothiazole carbamoyl 部位との相互作用

BCL-X_L をシアン色の Cartoon モデル、A-1155463 をオレンジ色の stick モデルで示した。

BCL-X_L 中の Phe-97、Ser-106 と Leu-108 を Stick モデルで示した。Ser-106 および Leu-108 と A-1155463 の間で形成されていた水素結合を点線で示した。Ser-106 の主鎖酸素原子と Benzothiazole carbamoyl 部位の窒素原子の間の距離は 2.4 Å であり、Leu-108 の主鎖窒素原子と Benzothiazole carbamoyl 部位の窒素原子の間の距離は 2.3 Å である。

第 5 章

MM-GBSA 法を用いた結合自由エネルギー解析

5.1. 概要

第 4 章ではタンパク質/阻害剤相互作用解析を行ったことで、ABT-199 の BCL-2 選択性と A-1155463 の BCL-X_L 選択性に寄与していると考えられるアミノ酸見出すことができた。第 4 章で行った MD シミュレーションから得られた代表構造に対して、MM-GBSA 法を用いてタンパク質/阻害剤の結合自由エネルギー変化を調べた。また、MM-GBSA 法を用いることでどのアミノ酸がどの程度結合に寄与しているかをエネルギーの観点から調べることができる。第 4 章で標的選択性に重要と示唆されたアミノ酸が実際にどの程度結合に寄与しているかを調べた。

5.2. 結果と考察

5.2.1. MM-GBSA 法による結合自由エネルギー変化の推定

MD シミュレーションを行った 6 つの複合体（BCL-2/Navitoclax 複合体、BCL-X_L/Navitoclax 複合体、BCL-2/ABT-199 複合体、BCL-X_L/ABT-199 複合体、BCL-2/A-1155463 複合体、BCL-X_L/A-1155463 複合体）の結合自由エネルギー変化を MM-GBSA 法を用いて推定した（表 5 - 1）。

実験値から計算される結合自由エネルギー変化の変化（ $\Delta\Delta G_{bind}$ ）の絶対値は

Navitoclax で 0.1 kcal/mol 程度、ABT-199 で 5.0 kcal/mol 程度、A-1155463 で 5.3 kcal/mol 程度となる。これに対して MM-GBSA から推定された結合自由エネルギー変化の変化の絶対値はそれぞれ、17.0 kcal/mol 程度、2.3 kcal/mol 程度、30.7 kcal/mol 程度であった。Navitoclax の場合は、BCL-2 への結合自由エネルギー変化と BCL-X_L への結合自由エネルギー変化に差が出てしまっているが、ABT-199 と A-1155463 の場合では選択性のあるタンパク質との複合体構造の方がより大きな負の値となっており、実験事実を定性的に再現しているものと考えられる。

BCL-2/Navitoclax 複合体と BCL-X_L/Navitoclax 複合体の ΔG_{bind} の構成要素を見てみると、最も寄与が大きいのはファンデルワールス相互作用によるものであった。ついで、疎水性相互作用と静電相互作用の寄与が大きい。BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の ΔG_{bind} の構成要素を見てみると、ファンデルワールス相互作用と疎水性相互作用の寄与が大きいことが分かった。Navitoclax と ABT-199 を比べると、ABT-199 では静電相互作用の項が正の値となり結合に好ましくない相互作用を形成していると考えられるが、溶媒和に関する項の値が Navitoclax よりも小さくなっており、脱溶媒和による影響が小さくなっていると考えられる。BCL-2/A-1155463 複合体と BCL-X_L/A-1155463 複合体の ΔG_{bind} の構成要素を見てみると、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用および静電相互作用の寄与が大きいことが分かった。他 4 つの複合体と比較すると、静電相互作用の項が大きな負の値となっており、結合に好ましい相互作用を形成していると考えられる。結合に好ましい静電相互作用形成に伴って脱溶媒和が起こるため、 ΔG_{GB} 項の値が正となっていると考えられる。

表 5 - 1 MM-GBSA 法によって計算された各タンパク質/阻害剤複合体の ΔG_{bind} とその構成要素 (kcal/mol)

	$\Delta E_{covalent}$	$\Delta E_{Coulomb}$	ΔE_{vdW}	ΔE_{Hbond}	$\Delta E_{Packing}$	ΔE_{Lipo}	ΔG_{GB}	ΔG_{bind}
BCL-2/Navitoclax 複合体	0.0	-10.1	-84.0	-1.1	-1.8	-39.6	26.9	-109.9
BCL-X _L /Navitoclax 複合体	0.0	-9.3	-70.4	-0.8	-2.7	-34.0	24.3	-92.9
BCL-2/ABT-199 複合体	0.0	9.4	-85.5	-1.4	-4.5	-40.7	7.7	-115.1
BCL-X _L /ABT-199 複合体	0.0	10.0	-83.3	-1.2	-4.6	-40.9	7.2	-112.8
BCL-2/A-1155463 複合体	0.0	-20.0	-69.6	-1.7	-3.6	-34.9	30.7	-99.1
BCL-X _L /A-1155463 複合体	0.0	-36.2	-81.3	-3.0	-6.0	-44.9	41.7	-129.8

すべての値は 4 回ずつ行った MD シミュレーションの代表構造から計算し、平均値を載せている。 $\Delta E_{covalent}$ は ΔE_{bonds} 、 ΔE_{angles} 、 $\Delta E_{torsions}$ の合計値である。 $\Delta E_{Coulomb}$ は静電相互作用から計算される項、 ΔE_{vdW} はファンデルワールス相互作用から計算される項、 ΔE_{Hbond} は水素結合から計算される項、 ΔE_{Lipo} は疎水性相互作用から計算される項、 ΔG_{GB} は GB モデルから計算される項をそれぞれ表している。

5.2.2. アミノ酸ごとの結合自由エネルギー変化への寄与

第 4 章で示唆されたアミノ酸がエネルギー的にどの程度結合に寄与しているかどうかを調べるために残基ごとの結合自由エネルギー変化への寄与を求めた。

BCL-2/ABT-199 複合体において、ABT-199 の周囲 4 Å 以内のアミノ酸の結合自由エネルギー変化への寄与を図 5 - 1 に示した。BCL-2 と ABT-199 の結合にもっとも寄与していたアミノ酸は Phe-104 であり、次いで Tyr-202 と Tyr-108 であった。それぞれの結合自由エネルギー変化への寄与は -8.5 kcal/mol 程度、-5.2 kcal/mol 程度と -4.8 kcal/mol 程度であった。

BCL-X_L/ABT-199 複合体での各アミノ酸の結合自由エネルギー変化への寄与を図 5 - 2 に示した。BCL-2 の Phe-104、Tyr-202、Tyr-108 に対応する Phe-97、Tyr-195、Tyr-101 が BCL-2/ABT-199 複合体でも寄与が大きかった。それぞれ、-7.7 kcal/mol 程度、-6.4 kcal/mol 程度、-4.4 kcal/mol 程度であった。

ABT-199 の BCL-2 と BCL-X_L への結合に寄与しているアミノ酸を調べると、ABT-199 の BCL-2 選択性に重要と考えられる Asp-103 はエネルギー的にはそれほど寄与していないことが分かった (-0.2 kcal/mol, 図 5 - 3)。BCL-2/ABT-199 複合体および BCL-X_L/ABT-199 複合体ともに Asp-103 または Glu-96 と Azaindole 部位の水素結合は形成するため、エネルギー的には差が見られないと考えられる。

同様に、BCL-2/A-1155463 複合体および BCL-X_L/A-1155463 複合体における各アミノ酸の結合自由エネルギー変化への寄与を求めた (図 5 - 4 と図 5 - 5)。BCL-2/A-1155463 複合体で寄与の大きかったアミノ酸は Phe-104 と Arg-146 でそれぞれ、-5.5 kcal/mol 程度と -5.2 kcal/mol 程度であった。BCL-X_L/A-1155463 複合体では Phe-105 と Arg-139 の寄与が大きく、-8.8 kcal/mol 程度と -7.3 kcal/mol 程度であった。A-1155463 の BCL-2 と BCL-X_L への結合に寄与しているアミノ酸を調べると、A-1155463 の BCL-X_L 選択性に関係していると考えられる、Phe-105 と Leu-108 の寄与が大きいことがわかった (図 5 - 6)。

Ser-106 も Phe-105 と Leu-108 ほどではないが、BCL-X_L の結合に寄与している結果となった。このことから、相互作用解析で示唆された Phe-105、Ser-106 と Leu-108 はエネルギー的に見ても BCL-X_L 選択性に関係していると考えられる。

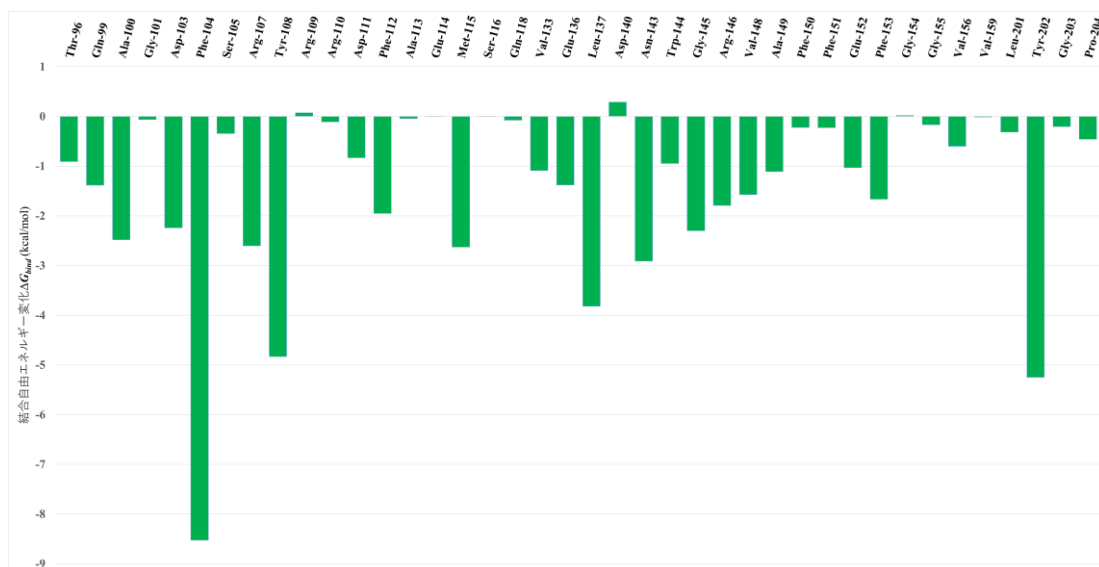


図 5 - 1 BCL-2/ABT-199 複合体における阻害剤の周囲 4 Å 以内のアミノ酸の結合自由エネルギー変化への寄与

すべての値は 4 回ずつ行った MD シミュレーションの代表構造から計算し、平均値を用いてグラフ化している。

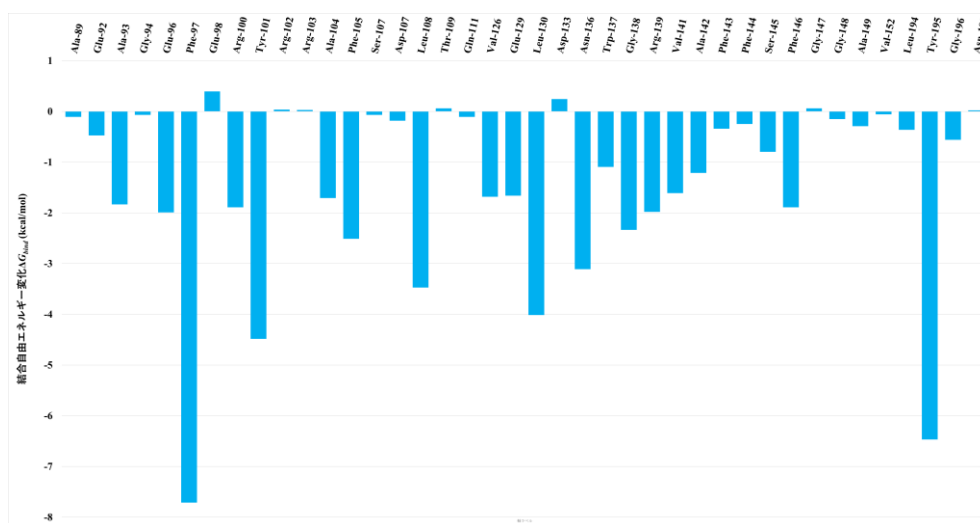


図 5 - 2 BCL-X_L/ABT-199 複合体における阻害剤の周囲 4 Å 以内のアミノ酸の結合自由エネルギー変化への寄与

すべての値は 4 回ずつ行った MD シミュレーションの代表構造から計算し、平均値を用いてグラフ化している。

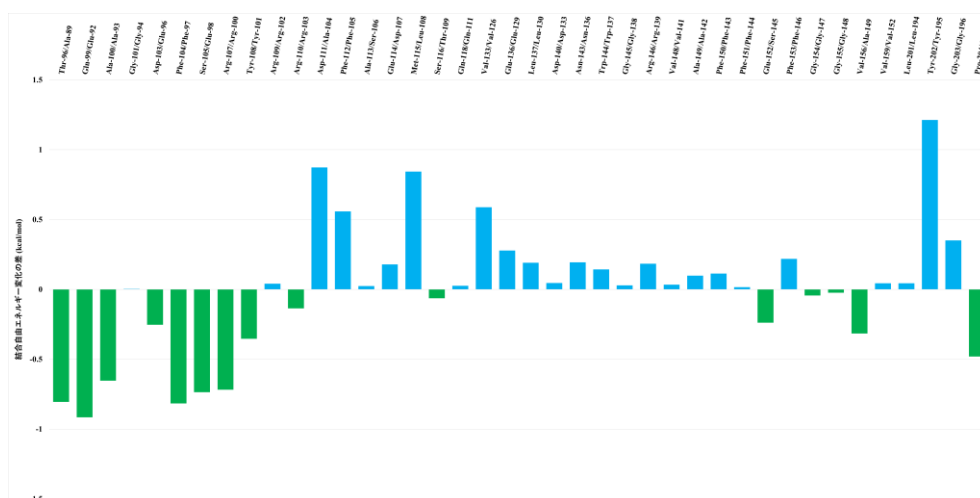


図 5 - 3 各アミノ酸の結合自由エネルギー変化の差

BCL-2/ABT-199 複合体における各アミノ酸の結合自由エネルギー変化から BCL-X_L/ABT-199 複合体における各アミノ酸の結合自由エネルギー変化を引いた値をグラフ化した。負の値となるのはより BCL-2 への結合に寄与しているアミノ酸、正の値となるのはより BCL-X_L への結合に寄与しているアミノ酸。

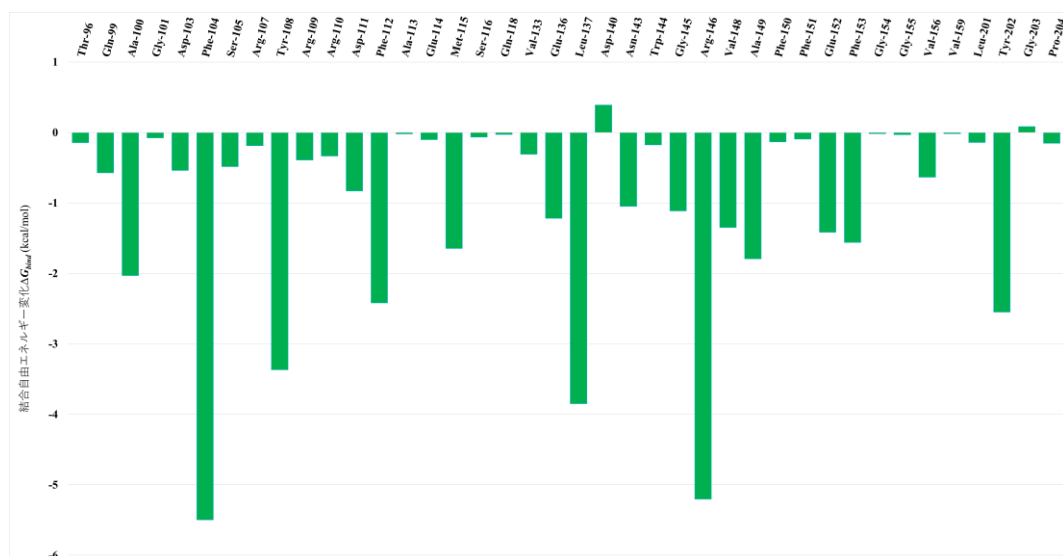


図 5 - 4 BCL-2/A-1155463 複合体における阻害剤の周囲 4 Å 以内のアミノ酸の結合自由エネルギー変化への寄与

すべての値は 4 回ずつ行った MD シミュレーションの代表構造から計算し、平均値を用いてグラフ化している。

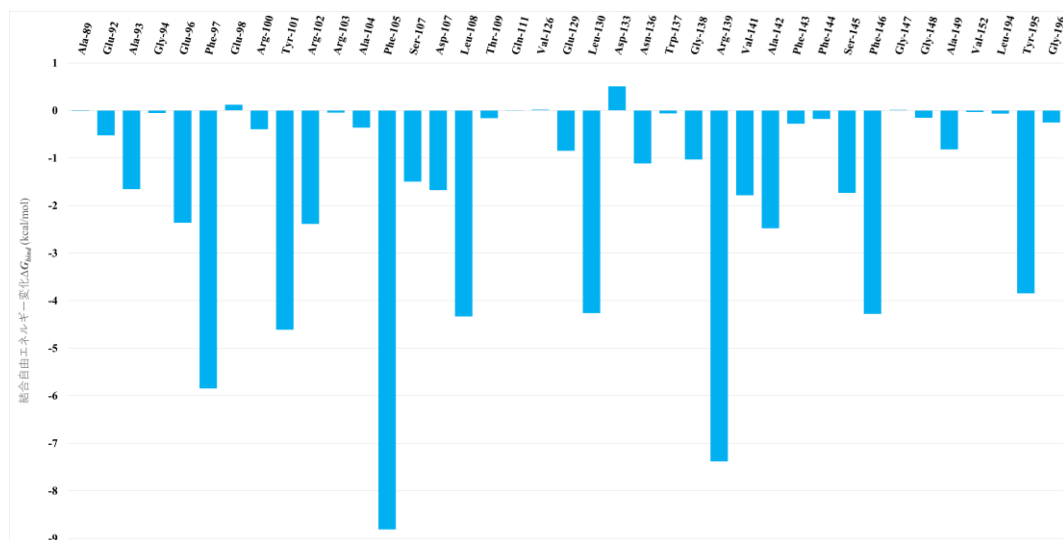


図 5 - 5 BCL-XL/A-1155463 複合体における阻害剤の周囲 4 Å 以内のアミノ酸の結合自由エネルギー変化への寄与

すべての値は 4 回ずつ行った MD シミュレーションの代表構造から計算し、平均値を用いてグラフ化している。

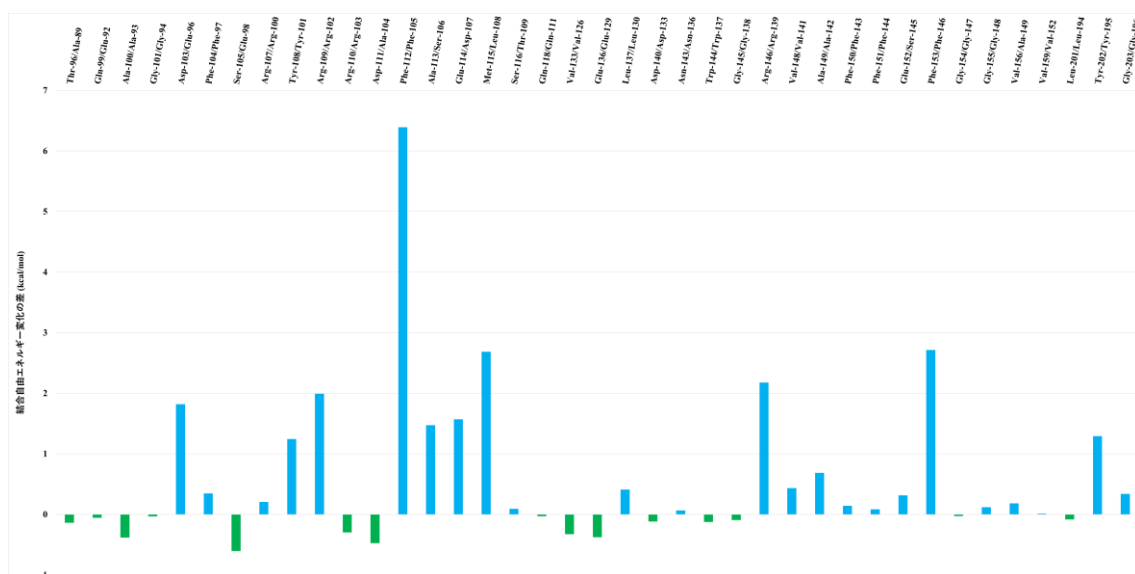


図 5-6 各アミノ酸の結合自由エネルギー変化の差

BCL-2/A-1155463 複合体における各アミノ酸の結合自由エネルギー変化から BCL-X_L/A-1155463 複合体における各アミノ酸の結合自由エネルギー変化を引いた値をグラフ化した。負の値となるのはより BCL-2 への結合に寄与しているアミノ酸、正の値となるのはより BCL-X_L への結合に寄与しているアミノ酸。

第 6 章

計算機上での変異体解析および新規阻害剤の提案

6.1. 概要

第 4 章で得られた知見に基づいて、ABT-199 の BCL-2 選択性に影響していると考えられる BCL-2 の 103 番目のアスパラギン酸 (Asp-103) をグルタミン酸に変異させたときの影響を相互作用解析および結合自由エネルギー変化の観点から考察する。また、ABT-199 の Azaindole 部位を Indole 部位に変換した Indole 型 ABT-199 誘導体を提案し、その BCL-2 および BCL-X_L との相互作用解析と結合自由エネルギー変化の推定を行った。

6.2. BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の相互作用解析および結合自由エネルギー変化の推定

6.2.1. モデリングした BCL-2 (D103E) /ABT-199 複合体

モデリングした BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の全体構造および変異を導入した 103 番目のアスパラギン酸周辺の構造を図 6-1 と図 6-2 にそれぞれ示した。

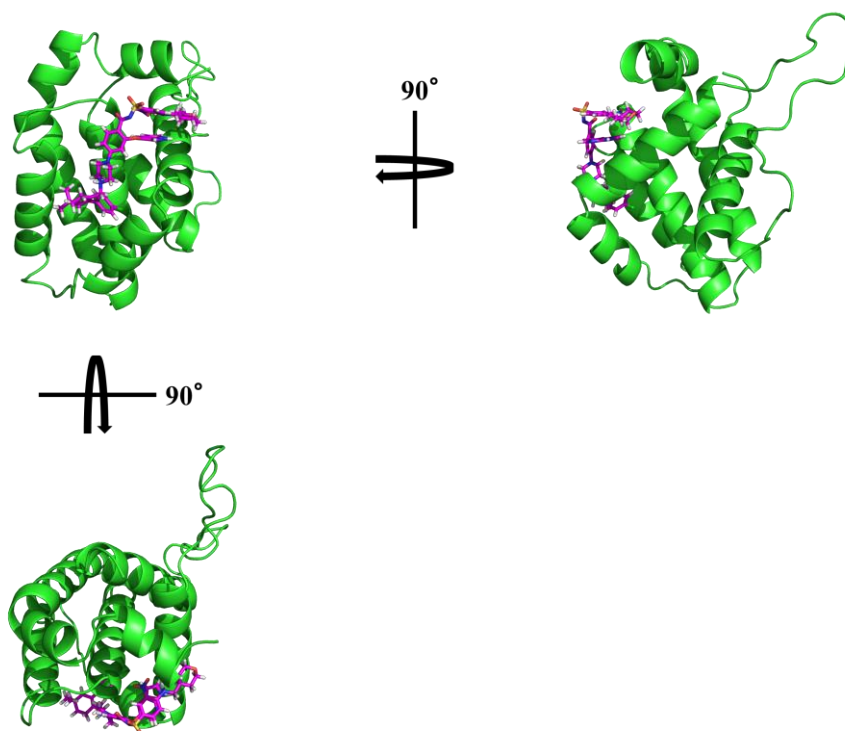


図 6 - 1 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体のモデリング構造

BCL-2(D103E)を緑の Cartoon モデル、阻害剤 ABT-199 をマゼンタの stick モデルで示した。

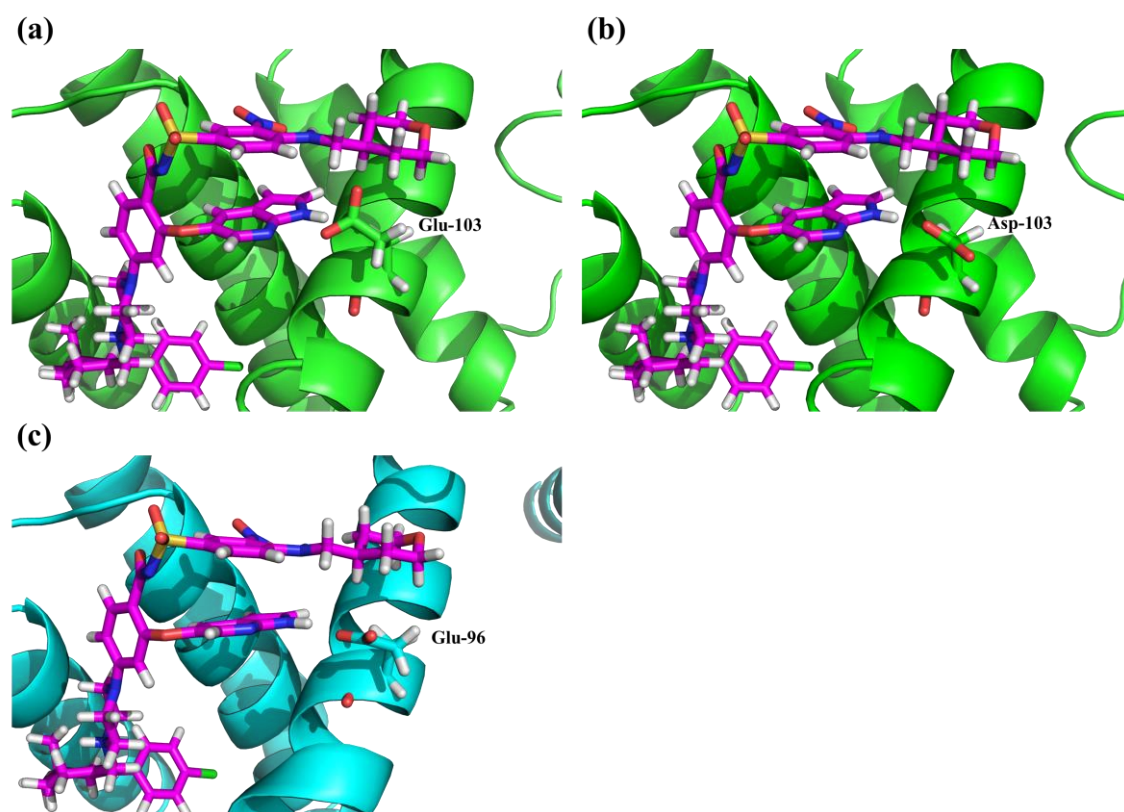


図 6 - 2 変異導入部位の拡大図

BCL-2 は緑の Cartoon モデル、BCL-X_L はシアンの Cartoon モデル、ABT-199 はマゼンタの Stick モデルで示した。(a) BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体 (b) BCL-2/ABT-199 複合体 (c) BCL-X_L/ABT-199 複合体

6.2.2. BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の構造安定性

初期構造を参照構造とし、タンパク質重原子の RMSD 変化を計算した (図 6 - 3)。BCL-2/ABT-199 複合体および BCL-X_L/ABT-199 複合体同様に 70 ns~100 ns において RMSD 変化は安定しており、BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の系は十分に平衡に達していると考えられる。BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の RMSD の平均値は 2.63 Å から 2.78 Å の幅で構造の揺らぎが見られ、BCL-2/ABT-199 複合体よりはわずかに構造の揺らぎが大きい、BCL-X_L/ABT-199 複合体よりは構造の揺らぎが小さい。

BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体では BCL-2/ABT-199 複合体同様に、 α ヘリックス 1 と α ヘリックス 2 の間のループの揺らぎが最も大きいことが分かった。BCL-X_L/ABT-199 複合体ほど、N 末の α ヘリックス 1 は構造が揺らがないことも明らかとなった。この結果から、103 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換したことによる影響は複合体構造全体にはないと判断できる。

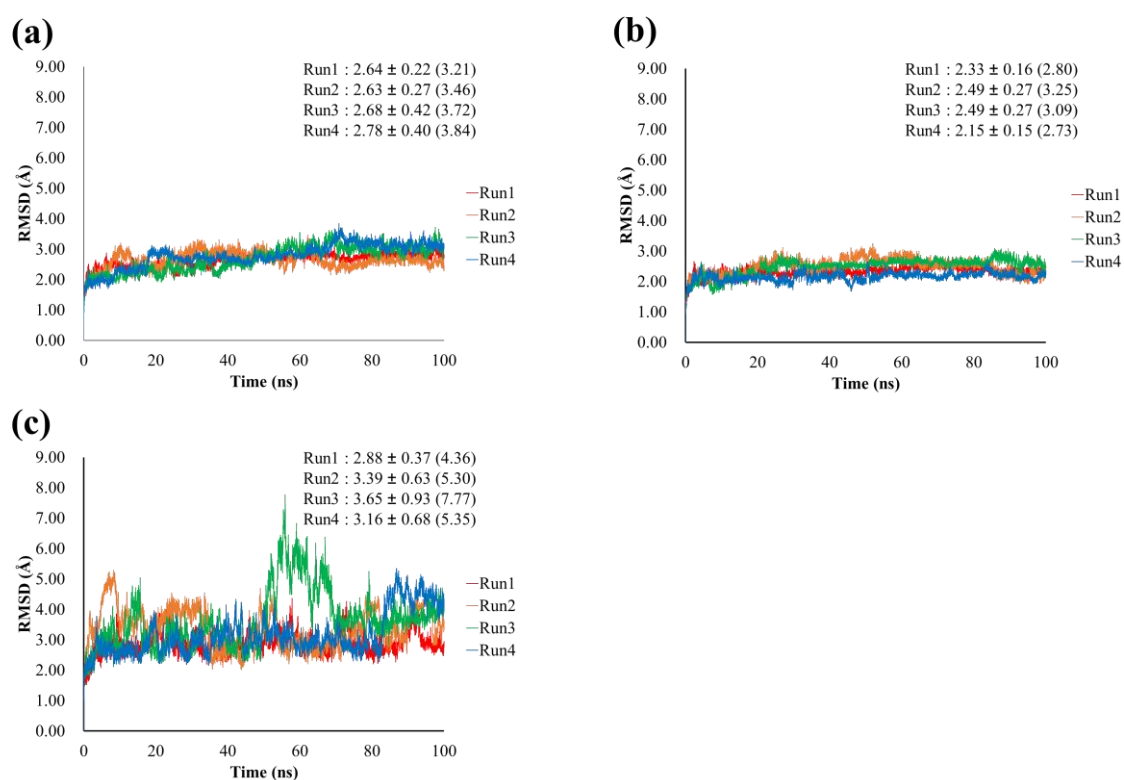


図 6-3 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体におけるタンパク質重原子 RMSD の時間変化の比較

横軸にシミュレーション時間 (ns)、縦軸に RMSD (Å) をとり、タンパク質重原子の RMSD をプロットした。Run1 を赤、Run2 をオレンジ、Run3 を緑、Run4 を青の線でそれぞれ示している。グラフ中には RMSD の平均値および標準偏差を示した。括弧内の数字は RMSD の最大値を表している。(a) BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体 (b) BCL-2/ABT-199 複合体 (c) BCL-X_L/ABT-199 複合体

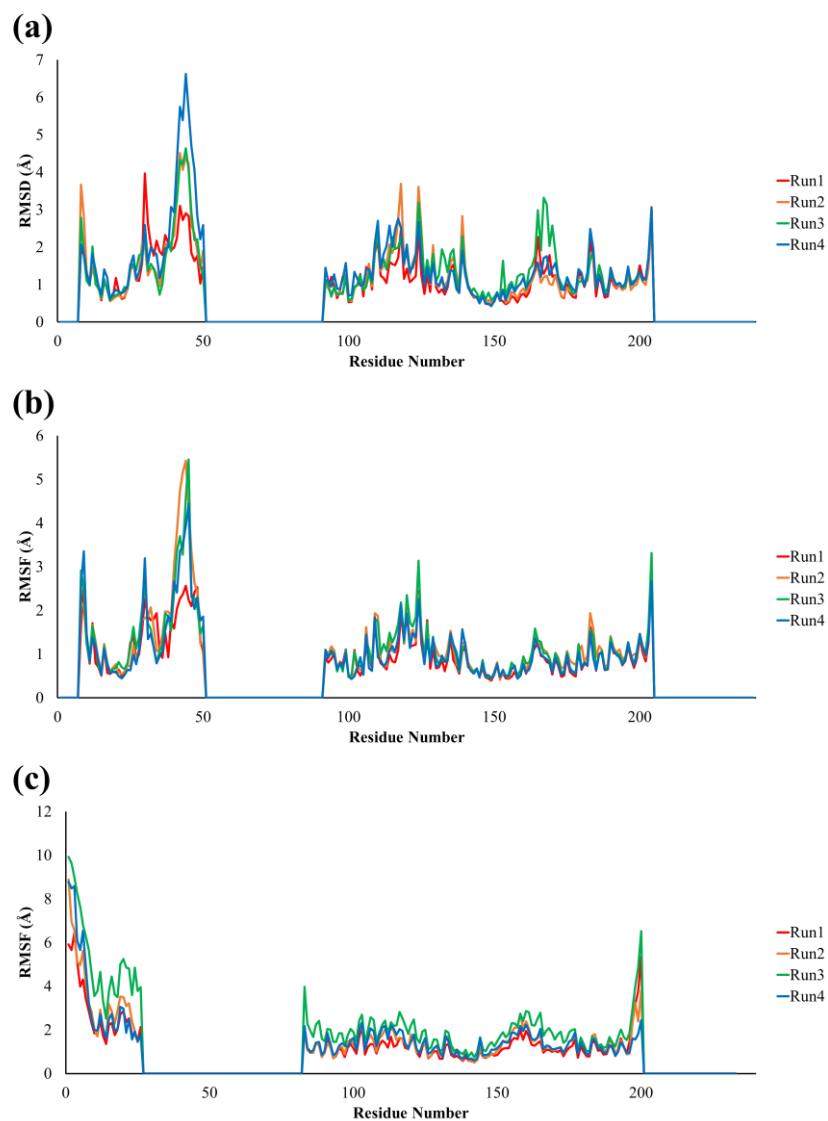


図 6 - 4 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体におけるタンパク質重原子 RMSF の比較

横軸にアミノ酸の残基番号、縦軸に RMSF (Å) をとり、タンパク質の RMSF をプロットした。Run1 を赤、Run2 をオレンジ、Run3 を緑、Run4 を青の線でそれぞれ示している。

(a) BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体 (b) BCL-2/ABT-199 複合体 (c) BCL-X_L/ABT-199 複合体

6.2.3. BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の相互作用解析

BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体における BCL-2(D103E)と ABT-199 の間で見られた相互作用を図 6 - 5 に示し、表 6 - 1 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30%以上にわたって ABT-199 と相互作用を形成していたアミノ酸は 5 残基 (Phe-104、Arg-107、Tyr-108、Gly-145 と Tyr-202) であった。

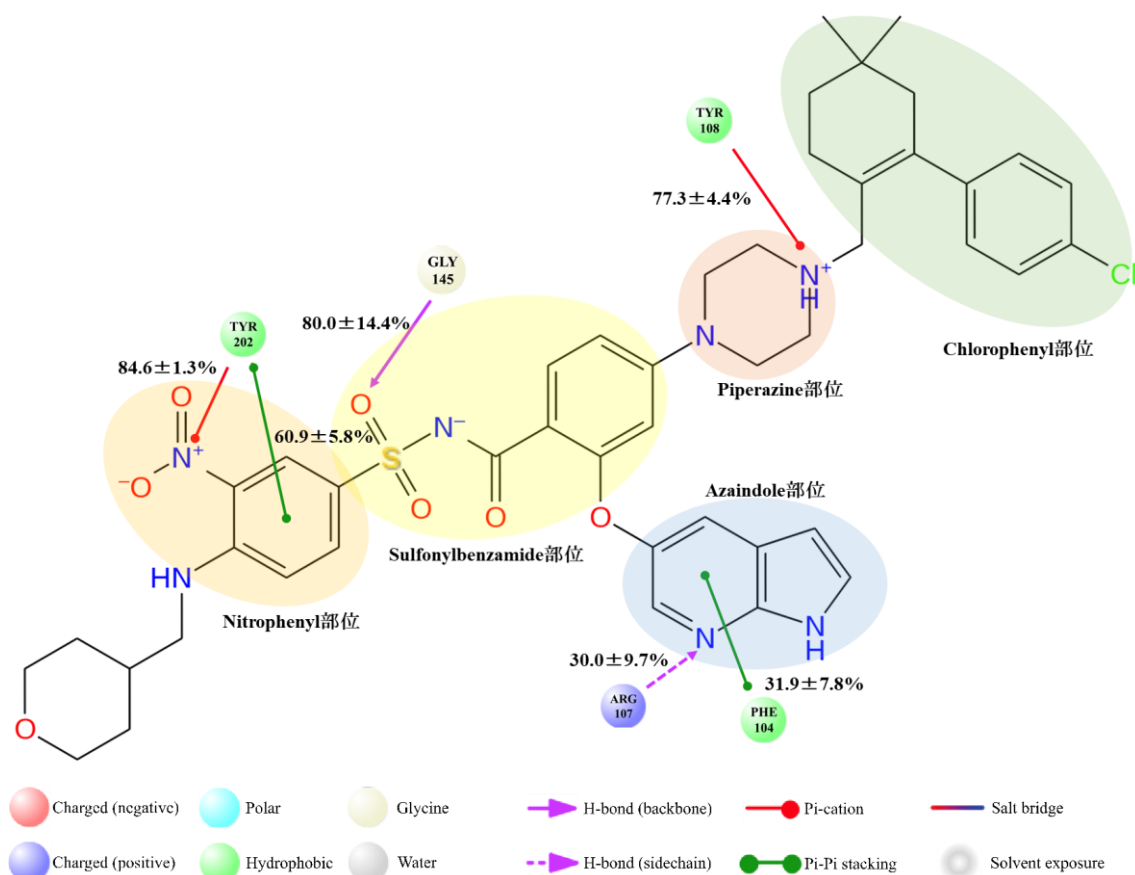


図 6 - 5 BCL-2(D103E)/A-1155463 複合体で形成されていた相互作用

総シミュレーション時間の 30%以上で ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基を示している。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 6 - 1 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用

アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率* (%)
Phe-104	Azaindole 部位	$\pi - \pi$ スタッキング	31.9 $\pm$ 7.8
Tyr-108	Piperazine 部位	π - カチオン	77.3 $\pm$ 4.4
Arg-107	Azaindole 部位	水素結合	30.0 $\pm$ 9.7
Gly-145	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合(主鎖)	80.0 $\pm$ 14.4
Tyr-202	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	84.6 $\pm$ 1.3
Tyr-202	Nitrophenyl 部位	$\pi - \pi$ スタッキング	60.9 $\pm$ 5.8

*Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

6.2.4. BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-2/ABT-199 複体の相互作用比較

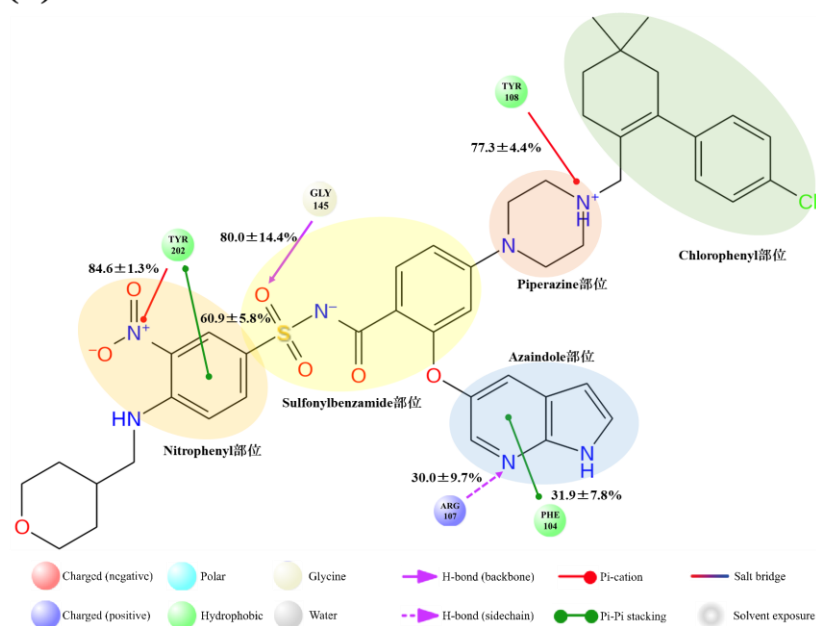
BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-2/ABT-199 複合体で見られた相互作用をまとめた (図 6-6 と表 6-2)。BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-2/ABT-199 複体の違いは 103 番目のアミノ酸がグルタミン酸かアスパラギン酸かだけであるが、5 つのアミノ酸で相互作用様式に違いが見られた。まず、変異を導入した 103 番目のグルタミン酸とアスパラギン酸である。アスパラギン酸をグルタミン酸に変えると、Azaindole 部位との水素結合の形成頻度が著しく低下していることが分かった。クラスタリング解析の結果から得られた代表構造 (シミュレーション中の存在確率は 32.7%) 中では、Glu-103 と Azaindole 部位に含まれる二つの窒素原子との距離はそれぞれ 4.8 Å と 5.5 Å (図 6-7) と直接の水素結合を形成できる距離にないため水素結合の形成頻度が低下していると考えられる。

Azaindole 部位の相互作用に着目すると BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体では Phe-104 との π - π スタッキングが形成されていた。BCL-2/ABT-199 複合体では Phe-104 は Chrolophenyl 部位との π - π スタッキングであったが、BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体では Azaindole 部位との π - π スタッキングを形成しやすいことがシミュレーションで示唆された。また BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体では、Arg-107 が Azaindole 部位との水素結合を形成していた。BCL-2/ABT-199 複合体では、Arg-107 は Asp-103 と安定した水素結合または塩橋を形成し、Asp-103 と Azaindole との水素結合を安定化していたがグルタミン酸に置換したことによって、Arg-107 と Glu-103 の水素結合や塩橋の形成が起こりにくくなり、フリーになった Arg-107 が Azaindole 部位との相互作用を形成するようになったと考えられる。

Chrolophenyl 部位周辺の相互作用を比較すると、BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体では Met-115 との疎水性相互作用の形成確率が下がる結果となった。

Sulphonylbenzamide 部位では水素結合を形成するアミノ酸が Gly-145 か Asn-143 かの違いが見られた。これは、アスパラギン酸がグルタミン酸に代わり Azaindole 部位との水素結合の形成頻度が落ちたことによって、Azaindole 部位が Glu-103 側に約 1 Å 程ずれたことによって相互作用するアミノ酸が Asn-143 から Gly-145 に変化したと考えられる (図 6-8)。

(a)



(b)

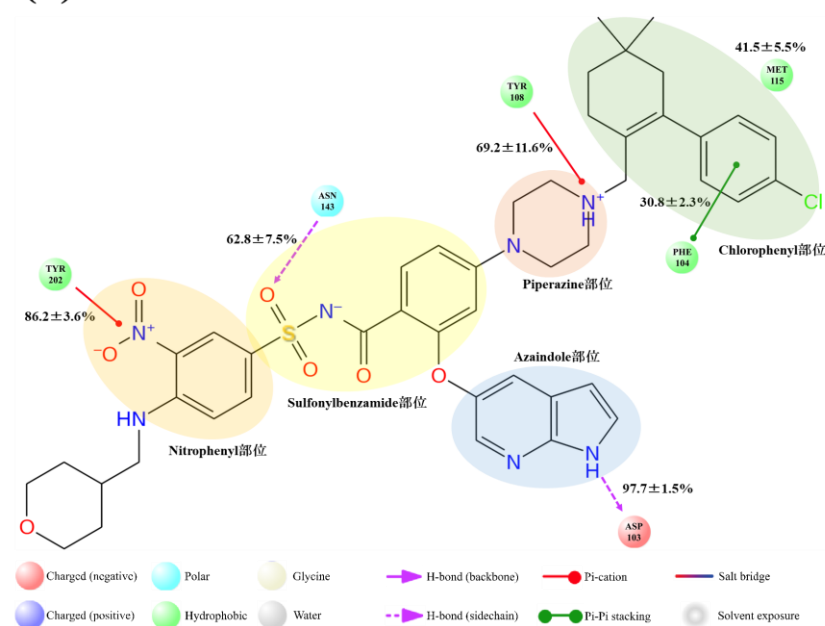


図 6 - 6 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-2/ABT-199 複合体の相互作用比較

総シミュレーション時間の 30%以上で ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。(a) BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用。(b) BCL-2/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用。

表 6 - 2 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-2/ABT-199 複合体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-2)	BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体			BCL-2/ABT-199 複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Glu-103/Asp-103	-	-	-	Azaindole 部位	水素結合	97.7 ± 1.5
Phe-104	Azaindole 部位	$\pi - \pi$ スタッキング	31.9±7.8	Chlorophenyl 部位	$\pi - \pi$ スタッキング	30.8 ± 2.3
Arg-107	Azaindole 部位	水素結合	30.0±9.7	-	-	-
Tyr-108	Piperazine 部位	π - カチオン	77.3±4.4	Piperazine 部位	π -カチオン	69.2 ± 11.6
Met-115	-	-	-	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	41.5 ± 5.5
Asn-143	-	-	-	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	62.8 ± 7.5
Gly-145	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合(主鎖)	80.0±14.4	-	-	-
Tyr-202	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	84.6±1.3	Nitrophenyl 部位	π -カチオン	86.2 ± 3.6
Tyr-202	Nitrophenyl 部位	$\pi - \pi$ スタッキング	60.9±5.8	-	-	-

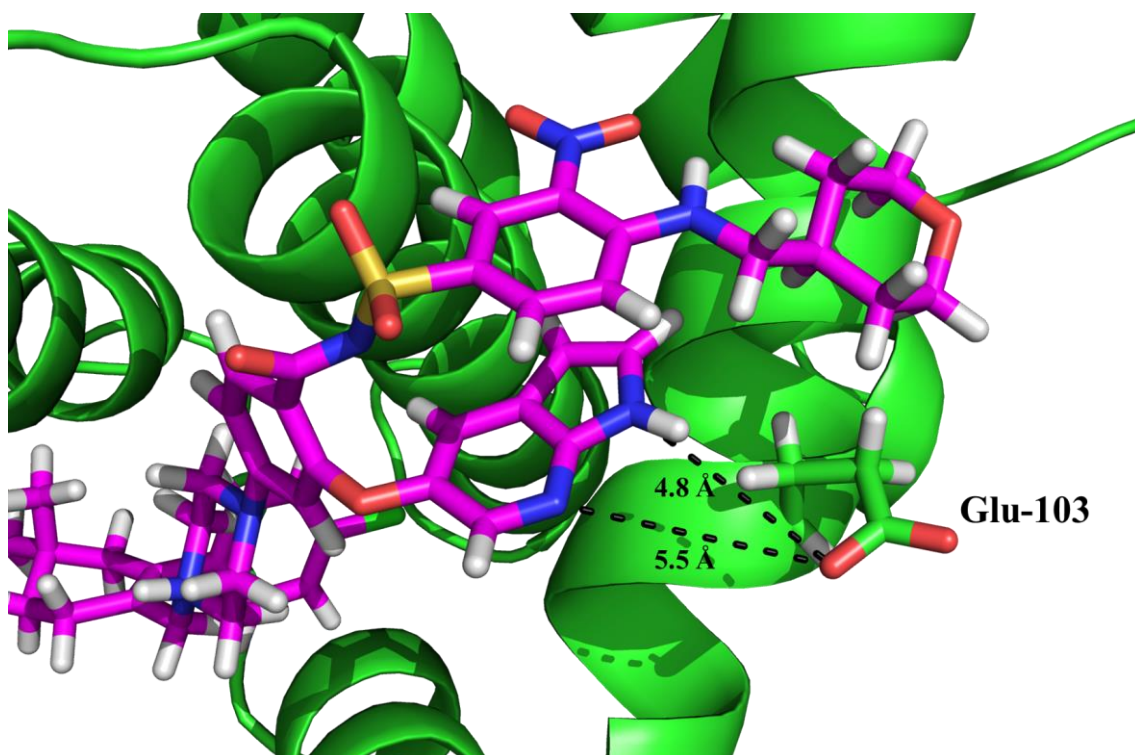


図 6 - 7 Glu-103 と Azaindole 部位の位置関係

クラスタリング解析から得られた代表構造中での Glu-103 と Azaindole 部位の位置関係を示している。BCL-2(D103E)は緑の Cartoon モデル、ABT-199 はマゼンタの Stick モデルで表示している。

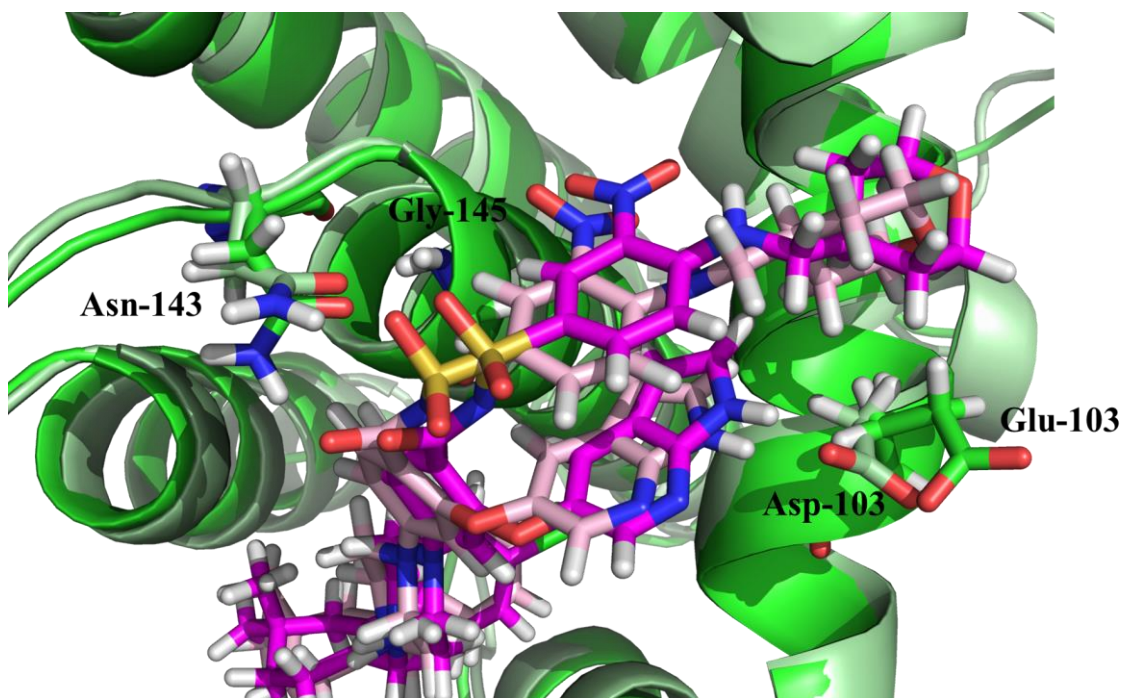


図 6 - 8 BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の重ね合わせ

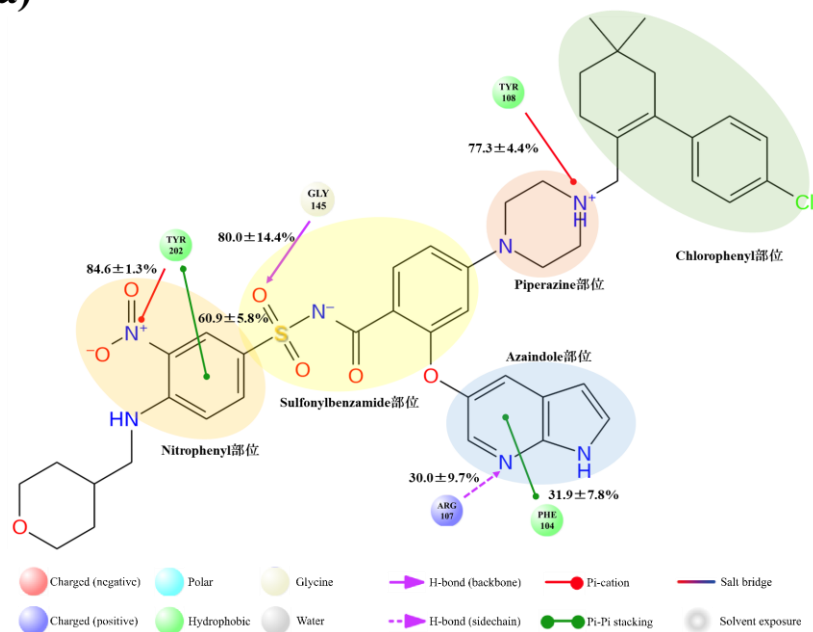
BCL-2/ABT-199 複合体中の BCL-2 をライトグリーン、ABT-199 をライトピンクで示し、BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体中の BCL-2 を緑、ABT-199 をマゼンタで示した。

6.2.5. BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の相互作用比較

BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体で見られた相互作用をまとめた (図 6 - 9 と表 6 - 3)。BCL-2 と BCL-X_L の阻害剤結合部位の数少ないアミノ酸残基の違いであったアスパラギン酸をグルタミン酸に変えたことで、Azaindole 部位周辺の相互作用が BCL-X_L/ABT-199 複合体の相互作用に類似することが期待されたが、BCL-X_L/ABT-199 複合体とは異なる相互作用様式となることが明らかになった。

BCL-X_L/ABT-199 複合体では Glu-96 が Azaindole 部位と水素結合または水を介した水素結合を形成していたが、BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体では Glu-103 と Azaindole 部位との水素結合または水を介した水素結合の形成は見られなかった。

(a)



(b)

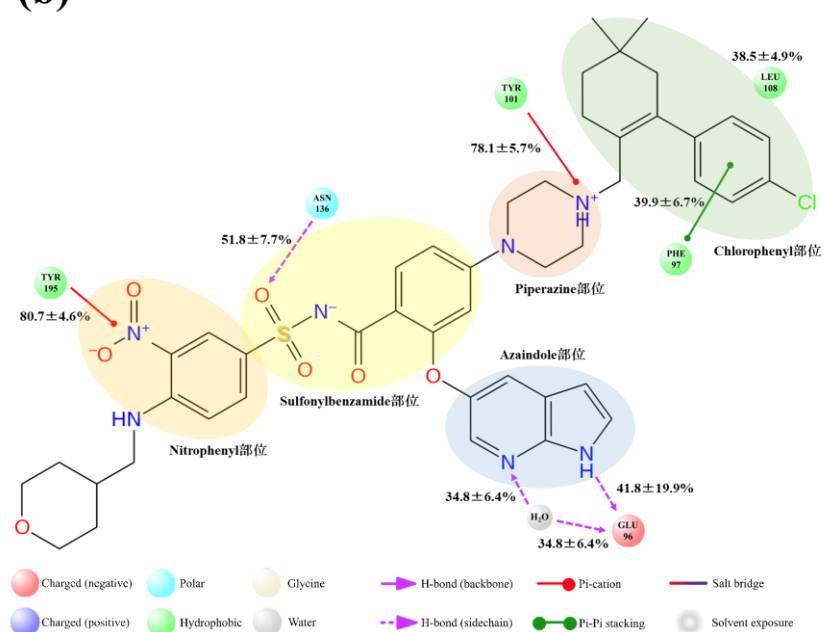


図 6 - 9 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の相互作用比較

総シミュレーション時間の 30%以上で ABT-199 と相互作用していたアミノ酸残基を球形で示した。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。(a) BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用。(b) BCL-X_L/ABT-199 複合体で形成されていた相互作用。

表 6 - 3 BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-2/BCL-X _L)	BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体			BCL-X _L /ABT-199 複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Glu-103/Glu-96	-	-	-	Azaindole 部位	水素結合	41.8 ± 19.9
Glu-103/Glu-96	-	-	-	Azaindole 部位	水を介した水素結合	34.8±6.4
Phe-104/Phe-97	Azaindole 部位	$\pi-\pi$ スタッキング	31.9±7.8	Chlorophenyl 部位	$\pi-\pi$ スタッキング	39.9 ± 6.7
Arg-107/Arg-100	Azaindole 部位	水素結合	30.0±9.7	-	-	-
Tyr-108/Tyr-101	Piperazine 部位	π - カチオン	77.3±4.4	Piperazine 部位	π -カチオン	78.1 ± 5.7
Met-115/Leu-108	-	-	-	Chlorophenyl 部位	疎水性相互作用	38.5 ± 4.9
Asn-143/Asn-136	-	-	-	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合	51.8 ± 7.7
Gly-145/Gly-138	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合(主鎖)	80.0±14.4	-	-	-
Tyr-202/Tyr-195	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	84.6±1.3	Nitrophenyl 部位	π -カチオン	80.7 ± 4.6
Tyr-202/Tyr-195	Nitrophenyl 部位	$\pi-\pi$ スタッキング	60.9±5.8	-	-	-

6.2.6. 変異導入による結合自由エネルギー変化の推定

BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の結合自由エネルギー変化を MM-GBSA 法を用いて推定し、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の推定値と比較した(表 6 - 4)。

BCL-2 の 103 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換しただけであるが、BCL-2/ABT-199 複合体および BCL-X_L/ABT-199 複合体で推定された ΔG_{bind} よりも BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の ΔG_{bind} は不利となることがわかった (-102.2 kcal/mol)。

このことから、Asp-103 は ABT-199 の BCL-2 への結合において重要であると考えられる。

表 6 - 4 MM-GBSA 法によって計算された BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の ΔG_{bind} とその構成要素 (kcal/mol)

	$\Delta E_{covalent}$	$\Delta E_{Coulomb}$	ΔE_{vdW}	ΔE_{Hbond}	$\Delta E_{Packing}$	ΔE_{Lipo}	ΔG_{GB}	ΔG_{bind}
BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体	0.0	23.0	-81.1	-0.8	-4.7	-37.0	-1.5	-102.2
BCL-2/ABT-199 複合体	0.0	9.4	-85.5	-1.4	-4.5	-40.7	7.7	-115.1
BCL-X _L /ABT-199 複合体	0.0	10.0	-83.3	-1.2	-4.6	-40.9	7.2	-112.8

すべての値は 4 回ずつ行った MD シミュレーションの代表構造から計算し、平均値を載せている。 $\Delta E_{covalent}$ は ΔE_{bonds} 、 ΔE_{angles} 、 $\Delta E_{torsions}$ の合計値である。 $\Delta E_{Coulomb}$ は静電相互作用から計算される項、 ΔE_{vdW} はファンデルワールス相互作用から計算される項、 ΔE_{Hbond} は水素結合から計算される項、 ΔE_{Lipo} は疎水性相互作用から計算される項、 ΔG_{GB} は GB モデルから計算される項をそれぞれ表している。

6.3. BCL-2/ABT-199 複合体および BCL-X_L/ABT-199 複体の相互作用解析に基づいた新規化合物の提案

6.3.1. 提案する化合物の二次元構造

第 4 章の BCL-2/ABT-199 複合体および BCL-X_L/ABT-199 複体の相互作用解析の結果、ABT-199 の Azaindole を Indole に置換することで、BCL-X_L の Glu-96 との水を介した水素結合を形成しにくくし、より BCL-2 選択的な阻害剤になるのではないかと考えられる。提案する化合物 Indole 型 ABT-199 誘導体の二次元構造を図 6 - 10 に示した。

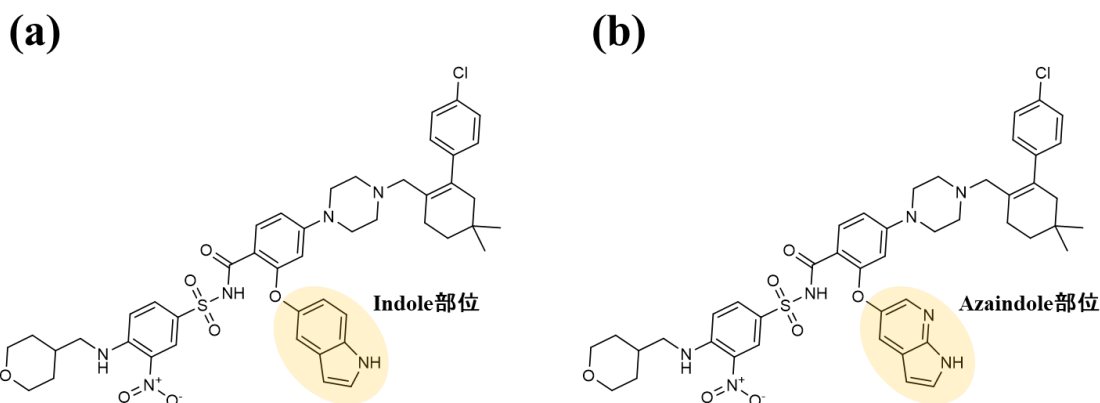


図 6 - 10 提案する Indole 型 ABT-199 誘導体と ABT-199 の二次元構造の比較

(a) Indole 型 ABT-199 誘導体 (b) ABT-199

6.3.2. モデリングした BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体および BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複体の構造

モデリングした BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体および BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複体の全体構造を図 6 - 11 と図 6 - 12 にそれぞれ示した。BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体は BCL-2/ABT-199 複合体を、BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体は BCL-X_L/ABT-199 複合体をそれぞれ基に作成しており、MD シミュレーショ

ンの初期構造として用いるには問題ないと考えられる。

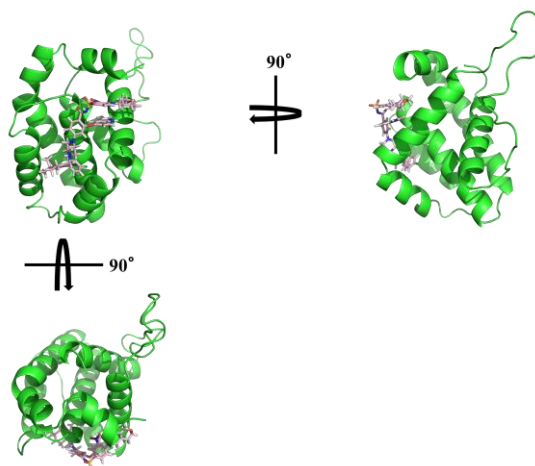


図 6 - 11 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体のモデリング構造

BCL-2 を緑の Cartoon モデル、Indole 型 ABT-199 誘導体をピンクの stick モデルで示した。

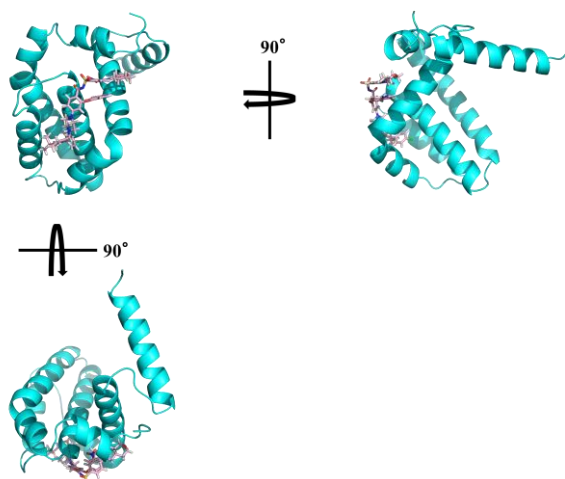


図 6 - 12 BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体のモデリング構造

BCL-X_L をシアンの Cartoon モデル、Indole 型 ABT-199 誘導体をマゼンタの stick モデルで示した。

6.3.3. BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の構造安定性

初期構造を参照構造とし、タンパク質重原子の RMSD 変化を計算した (図 6 - 13)。
BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体では、30 ns 付近から RMSD 変化は安定しており、十分に平衡に達していると考えられる。一方、BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体では Run4 を除いて 60 ns 付近から RMSD 変化は安定していた。Run4 に関しては N 末の α ヘリックスの揺らぎが特に大きかったため (図 6 - 14 (b))、RMSD の値が大きくなっていると考えられる。BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の RMSD の平均値は 1.76 Å から 3.42 Å の幅で構造の揺らぎが見られ、BCL-2/ABT-199 複合体よりも構造の揺らぎが大きかった。BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の RMSD の平均値は 5.81 Å から 7.80 Å の幅で構造の揺らぎが見られ、BCL-X_L/ABT-199 複合体よりも構造の揺らぎが大きかった。BCL-X_L/ABT-199 複合体では α ヘリックス 1 の N 末のみの揺らぎが大きかったが、BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体では α ヘリックス 1 全体の揺らぎが大きかったために BCL-X_L/ABT-199 複合体よりも RMSD 値が大きくなったと考えられる (図 6 - 14)。

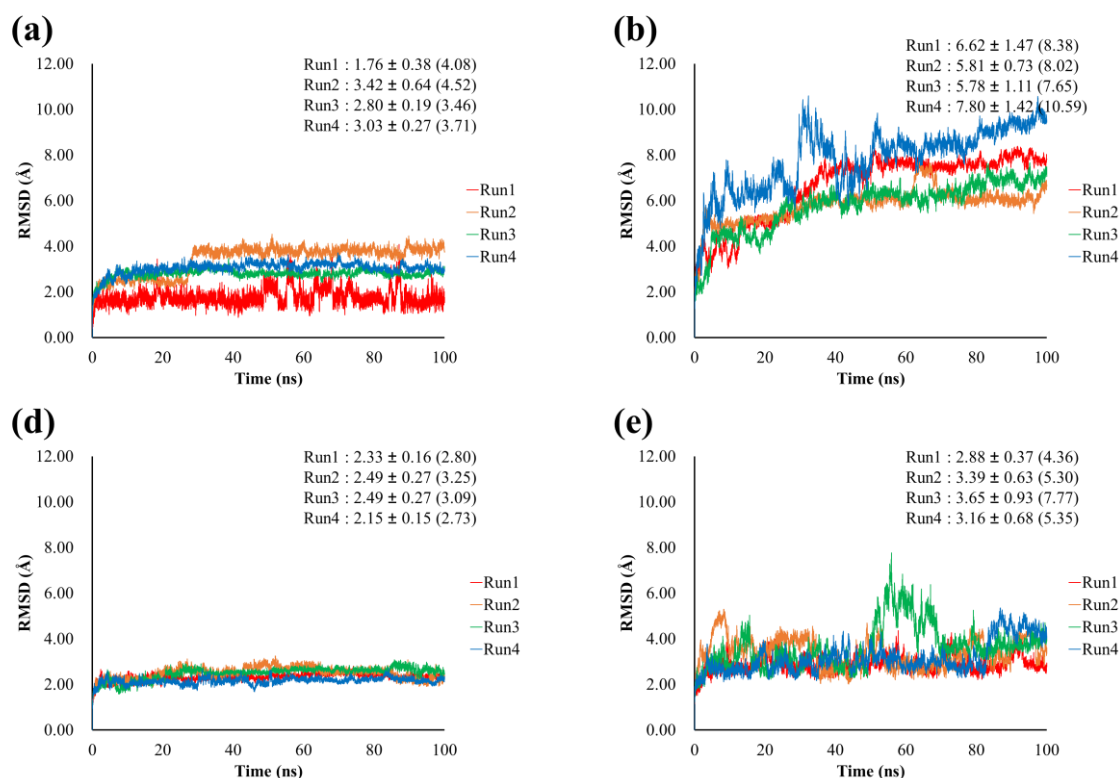


図 6 - 13 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体、BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体(Indole analog)複合体、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体におけるタンパク質重原子 RMSD の時間変化の比較

横軸にシミュレーション時間 (ns)、縦軸に RMSD (Å) をとり、タンパク質重原子の RMSD をプロットした。Run1 を赤、Run2 をオレンジ、Run3 を緑、Run4 を青の線でそれぞれ示している。グラフ中には RMSD の平均値および標準偏差を示した。括弧内の数字は RMSD の最大値を表している。(a) BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体 (b) BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体 (c) BCL-2/ABT-199 複合体 (d) BCL-X_L/ABT-199 複合体

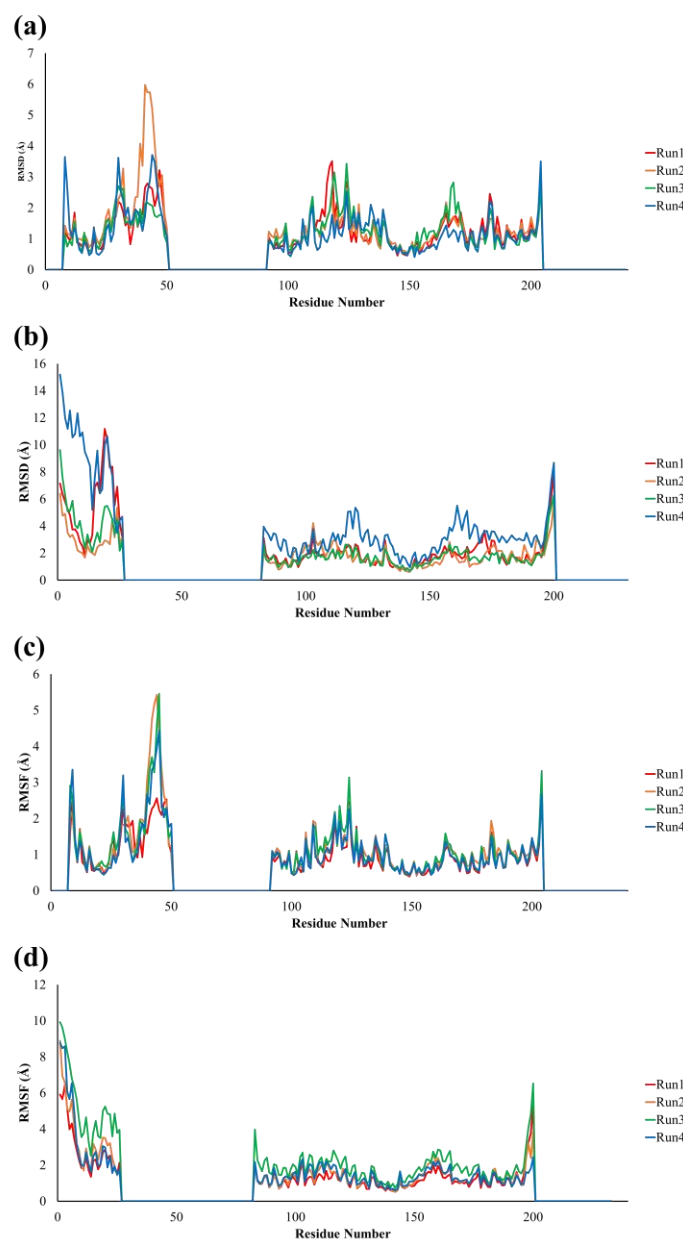


図 6 - 14 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体、BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体におけるタンパク質重原子 RMSF の比較

横軸にアミノ酸の残基番号、縦軸に RMSF (Å) をとり、タンパク質の RMSF をプロットした。Run1 を赤、Run2 をオレンジ、Run3 を緑、Run4 を青の線でそれぞれ示している。

(a) BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体 (b) BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体

(c) BCL-2/ABT-199 複合体 (d) BCL-X_L/ABT-199 複合体

6.3.4. BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の相互作用解析

BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体における BCL-2 と Indole 型 ABT-199 誘導体の間で見られた相互作用を図 6 - 15 に示し、表 6 - 5 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30%以上にわたって Indole 型 ABT-199 誘導体と相互作用を形成していたアミノ酸は 5 残基（Asp-103、Phe-104、Tyr-108、Gly-145 と Tyr-202）であった。

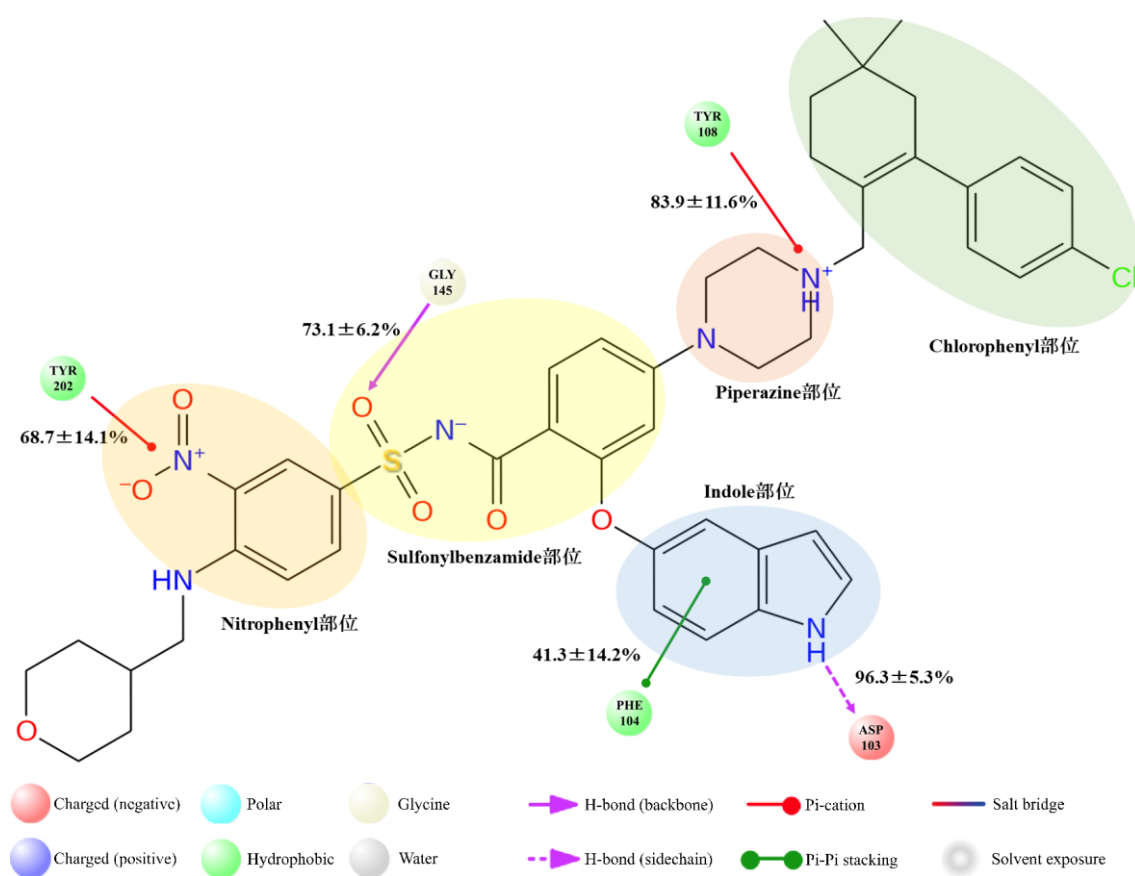


図 6 - 15 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で形成されていた相互作用

総シミュレーション時間の 30%以上で Indole 型 ABT-199 誘導体と相互作用していたアミノ酸残基を示している。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 6 - 5 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で形成されていた相互作用

アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率* (%)
Asp-103	Indole 部位	水素結合	96.3±5.3
Phe-104	Indole 部位	π - π スタッキング	41.3±14.2
Tyr-108	Piperazine 部位	π - カチオン	83.9±11.6
Gly-145	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合 (主鎖)	73.1±6.2
Tyr-202	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	68.7±14.1

*Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

6.3.5. BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の相互作用解析

BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体における BCL-X_L と Indole 型 ABT-199 誘導体の間で見られた相互作用を図 6 - 16 に示し、表 6 - 6 にまとめた。平均して総シミュレーション時間の 30%以上にわたって Indole 型 ABT-199 誘導体と相互作用を形成していたアミノ酸は 4 残基（Phe-97、Tyr-101、Gly-135 と Tyr-195）であった。

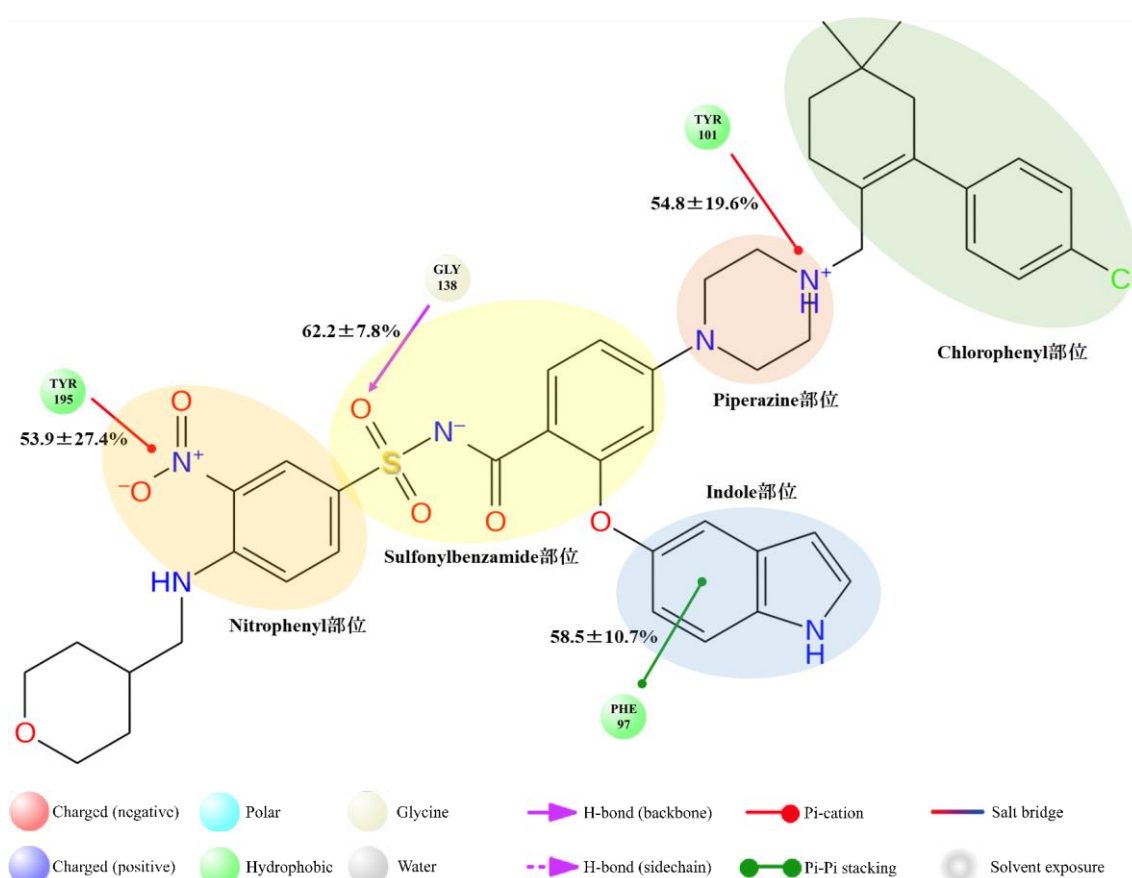


図 6 - 16 BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で形成されていた相互作用

総シミュレーション時間の 30%以上で Indole 型 ABT-199 誘導体と相互作用していたアミノ酸残基を示している。各相互作用の保持率は Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

表 6 - 6 BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で形成されていた相互作用

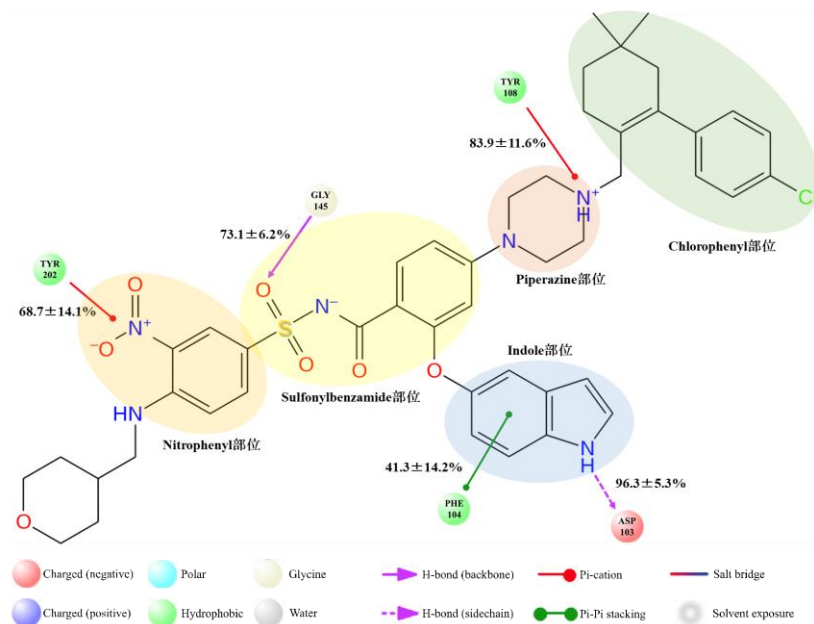
アミノ酸残基	相互作用部位	相互作用様式	保持率* (%)
Phe-97	Indole 部位	π - π スタッキング	58.5±10.7
Tyr-101	Piperazine 部位	π - カチオン	54.8±19.6
Gly-138	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合 (主鎖)	62.2±7.8
Tyr-195	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	53.9±27.4

*Run1～Run4 の平均と標準偏差を示している。

6.3.6. BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の相互作用比較

BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で見られた相互作用をまとめた (図 6 - 17 と表 6 - 7)。BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で形成される相互作用はそのほとんどが同じであることが分かった。基となっている ABT-199 でも BCL-2 および BCL-X_L との相互作用に大きな差がなかったことから想定内の結果といえる。ABT-199 との唯一の違いは、BCL-2 の Asp-103 および BCL-X_L の Glu-96 との水素結合である。BCL-X_L/ABT-199 複合体では、Glu-96 は直接の水素結合または水を介した水素結合を ABT-199 の Azaindole 部位と形成していたが、Indole 型 ABT-199 誘導体では直接の水素結合も水を介した水素結合もほとんど観測されなかった。BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体では Azaindole 部位が Indole 部位に代わり、Arg-107 と Asp-103 の水素結合が安定して形成され、結果として Asp-103 と Indole 部位との水素結合を安定化していた。一方、BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体では、Azaindole 部位から Indole 部位に変化したことで、水を介した水素結合や Arg-100 との相互作用がなくなってしまったことにより Indole 部位が安定せず、Indole 部位の反転が見られた。結果としてさらに Glu-96 との水素結合が形成しにくい状態を生み出すため、Glu-96 と Indole 部位との水素結合がほとんど見られなかったと考えられる。

(a)



(b)

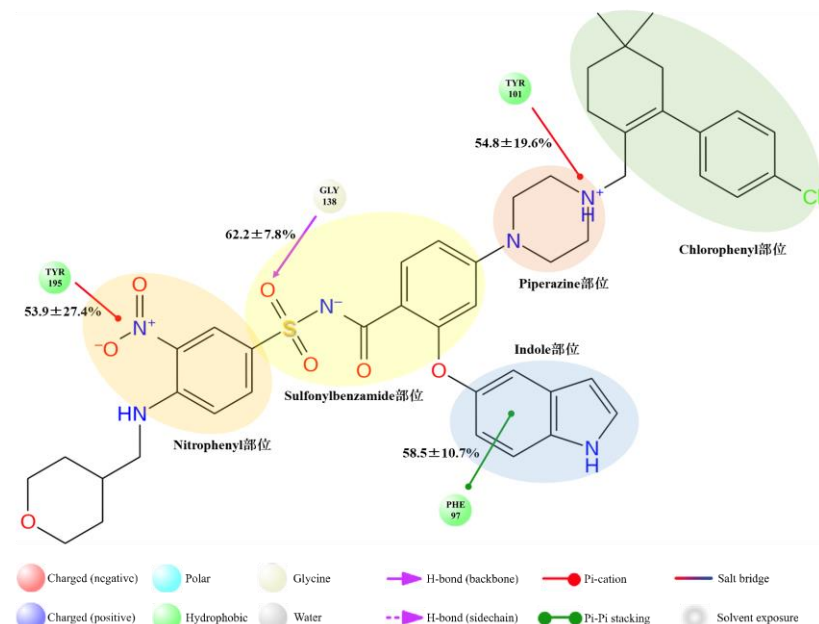


図 6 - 17 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の相互作用比較

(a) BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で形成されていた相互作用。(b) BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体で形成されていた相互作用。

表 6 - 7 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の相互作用比較

相互作用残基 (BCL-2/BCL-X _L)	BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体			BCL-X _L /Indole 型 ABT-199 誘導体複合体		
	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)	相互作用部位	相互作用様式	保持率 (%)
Asp-103/Glu-96	Indole 部位	水素結合	96.3 ± 5.3	-	-	-
Phe-104/Phe-97	Indole 部位	π - π スタッキング	41.3 ± 14.2	Indole 部位	π - π スタッキング	58.5 ± 10.7
Tyr-108/Tyr-101	Piperazine 部位	π - カチオン	83.9 ± 11.6	Piperazine 部位	π - カチオン	54.8±19.6
Gly-145/Gly-138	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合（主鎖）	73.1 ± 6.2	Sulfonylbenzamide 部位	水素結合（主鎖）	62.2±7.8
Tyr-202/Tyr-195	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	68.7 ± 14.1	Nitrophenyl 部位	π - カチオン	53.9±27.4

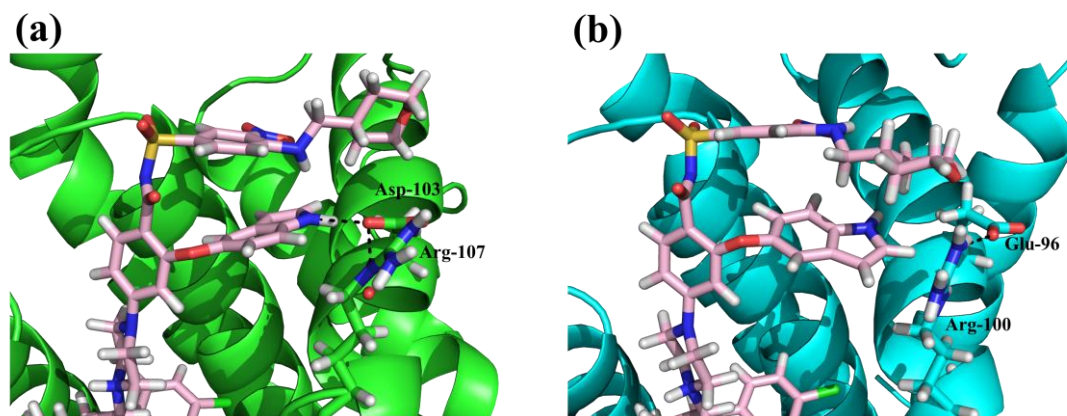


図 6 - 18 BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の代表構造比較

Indole 型 ABT-199 誘導体をピンクの Stick モデルで示した。黒の破線は水素結合を表している。(a) BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の代表構造 (シミュレーション中の存在確率は 71.8%) (b) BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の代表構造 (シミュレーション中の存在確率は 18.1%)

6.3.7. 提案化合物の結合自由エネルギー変化の推定

BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の結合自由エネルギー変化を MM-GBSA 法を用いて推定し、BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の推定値と比較した。BCL-2 に対する Indole 型 ABT-199 誘導体の結合自由エネルギー変化は ABT-199 のそれと大きな差がないことから、ABT-199 と同程度に BCL-2 に結合することが考えられる。BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複合体の $\Delta\Delta G_{bind}$ が -2.3 kcal/mol なのに対して BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体と BCL-X_L/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体の $\Delta\Delta G_{bind}$ が -12.1 kcal/mol とより、差が大きいことから ABT-199 よりも Indole 型 ABT-199 誘導体の方が BCL-2 選択的な化合物であることが期待される。

表 6-8 MM-GBSA 法によって計算された各タンパク質/阻害剤複合体の ΔG_{bind} とその構成要素 (kcal/mol)

	$\Delta E_{covalent}$	$\Delta E_{Coulomb}$	ΔE_{vdW}	ΔE_{Hbond}	$\Delta E_{Packing}$	ΔE_{Lipo}	ΔG_{GB}	ΔG_{bind}
BCL-2/Indole 型 ABT-199 誘導体複合体	0.0	19.9	-84.5	-1.3	-4.8	-41.0	-2.5	-114.4
BCL-X _L /Indole 型 ABT-199 誘導体複合体	0.0	14.0	-74.5	-0.8	-5.9	-39.0	4.0	-102.3
BCL-2/ABT-199 複合体	0.0	9.4	-85.5	-1.4	-4.5	-40.7	7.7	-115.1
BCL-X _L /ABT-199 複合体	0.0	10.0	-83.3	-1.2	-4.6	-40.9	7.2	-112.8

すべての値は 4 回ずつ行った MD シミュレーションの代表構造から計算し、平均値を載せている。 $\Delta E_{covalent}$ は ΔE_{bonds} 、 ΔE_{angles} 、 $\Delta E_{torsions}$ の合計値である。 $\Delta E_{Coulomb}$ は静電相互作用から計算される項、 ΔE_{vdW} はファンデルワールス相互作用から計算される項、 ΔE_{Hbond} は水素結合から計算される項、 ΔE_{Lipo} は疎水性相互作用から計算される項、 ΔG_{GB} は GB モデルから計算される項をそれぞれ表している。

第 7 章

結論

本研究では、タンパク質/阻害剤複合体モデリングおよび MD シミュレーションを組み合わせたことによって ABT-199 の BCL-2 に対する選択性と A-1155463 の BCL-X_L 選択性に対する理解をより深めるものであった。BCL-2 選択性に関しては、BCL-2 の Asp-103 と Azaindole 部位の窒素原子との水素結合が重要な因子であることを相互作用解析から示した。BCL-X_L 選択性に関しては、柔軟な α ヘリックス 3 の二次構造変化、すなわち α ヘリックス 3 が緩むことによって、Phe-105、Ser-106 および Leu-108 が結合部位に露出し、 π - π スタッキングと主鎖を用いた水素結合を A-1155463 と形成することが重要な因子であることを相互作用解析から示した。

相互作用解析の結果から得られた結果をエネルギーの観点から評価するために、MM-GBSA 法を用いて結合自由エネルギー変化の推定を行った。A-1155463 の BCL-X_L 選択性に重要であると考えられる Phe-105、Ser-106 および Leu-108 はエネルギー的にも BCL-X_L への結合に寄与していることを明らかにした。

計算機を用いたシミュレーションの利点の一つに変異体などが簡単に作成でき、その影響を検証できるということがあげられる。ABT-199 の BCL-2 選択性にどの程度 Asp-103 が影響しているかを調べるためにアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体を作成し変異の影響を調べた。アスパラギン酸をグルタミン酸に変異させると、ABT-199 の Azaindole 部位との水素結合が形成されなくなることと相互作用解析から示した。さらに BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体の結合自由エネルギー変化を MM-GBSA 法で推定したところ、12.9 kcal/mol 程度

BCL-2(D103E)/ABT-199 複合体で不利になることが分かった。このことから、Asp-103 は ABT-199 の BCL-2 選択性に影響していると考えられる。

BCL-2/ABT-199 複合体と BCL-X_L/ABT-199 複体の相互作用解析の結果から、ABT-199 の Azaindole を Indole へ変換することで BCL-2 への選択性がより高くなる可能性が示唆された。実際に ABT-199 の Azaindole を Indole へ変換することでどの程度 BCL-2 への選択性が変化するかを MD シミュレーションによって求めた結果、Indole 型 ABT-199 誘導体は ABT-199 と同程度の強さで BCL-2 に結合するが、BCL-X_L には ABT-199 ほど強く結合しないことがシミュレーションから示唆された。

結晶構造がない場合、興味のあるタンパク質/阻害剤複合体間の相互作用を比較することは難しい。本研究で用いたようなタンパク質/阻害剤複合体モデリングを行うことで、少なくとも相互作用を比較することが可能となるがそれだけでは選択性を説明するに十分な情報が得られない可能性がある。MD シミュレーションによる相互作用解析に加えて、MM-GBSA 法などの自由エネルギー変化を予測する手法を組み合わせることによって、タンパク質と阻害剤の安定した相互作用を明らかにすることが出来る。MD シミュレーションはタンパク質と阻害剤の間の動的な相互作用変化を捉えることができ、薬剤設計を支援することができる技術であるといえる。本研究から得られた知見は新たな BCL-2 または BCL-X_L 選択的阻害剤を設計する際に利用されることが期待される。

参考文献

- [1] Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews Drug discovery*, 9(3), 203.
- [2] Morgan, S., Grootendorst, P., Lexchin, J., Cunningham, C., & Greyson, D. (2011). The cost of drug development: a systematic review. *Health policy*, 100(1), 4-17.
- [3] Haggarty, S. J., Mayer, T. U., Miyamoto, D. T., Fathi, R., King, R. W., Mitchison, T. J., & Schreiber, S. L. (2000). Dissecting cellular processes using small molecules: identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis. *Chemistry & biology*, 7(4), 275-286.
- [4] Young, K., Lin, S., Sun, L., Lee, E., Modi, M., Hellings, S., Husbands, M., Ozenberger, B., & Franco, R. (1998). Identification of a calcium channel modulator using a high throughput yeast two-hybrid screen. *Nature biotechnology*, 16(10), 946.
- [5] Egan, W. J., Merz, K. M., & Baldwin, J. J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of medicinal chemistry*, 43(21), 3867-3877.
- [6] Jorgensen, W. L., & Duffy, E. M. (2002). Prediction of drug solubility from structure. *Advanced drug delivery reviews*, 54(3), 355-366.
- [7] Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W. (2014). Computational methods in drug discovery. *Pharmacological reviews*, 66(1), 334-395.
- [8] Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided*

drug design, 7(2), 146-157.

- [9] Acharya, C., Coop, A., E Polli, J., & D MacKerell, A. (2011). Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. *Current computer-aided drug design*, 7(1), 10-22.
- [10] Lionta, E., Spyrou, G., K Vassilatis, D., & Cournia, Z. (2014). Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(16), 1923-1938.
- [11] Yoshino, R., Yasuo, N., Hagiwara, Y., Ishida, T., Inaoka, D. K., Amano, Y., Tateishi, Y., Ohno, K., Namatame, I., Niimi, T., Orita, M., Kita, K., Akiyama, Y., & Sekijima, M. (2017). In silico, in vitro, X-ray crystallography, and integrated strategies for discovering spermidine synthase inhibitors for Chagas disease. *Scientific reports*, 7(1), 6666.
- [12] Güner, O. F. (Ed.). (2000). *Pharmacophore perception, development, and use in drug design* (Vol. 2). Internat'l University Line.
- [13] Tropsha, A. (2010). QSAR in drug discovery. *Drug Design: Structure-and Ligand-Based Approaches*, 151-164.
- [14] Arora, K., & Brooks Iii, C. L. (2009). Functionally important conformations of the Met20 loop in dihydrofolate reductase are populated by rapid thermal fluctuations. *Journal of the American Chemical Society*, 131(15), 5642-5647.
- [15] Alder, B. J., & Wainwright, T. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of chemical physics*, 27(5), 1208-1209.
- [16] McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), 585.
- [17] Andersen, H. C. (1980). Molecular dynamics simulations at constant pressure

- and/or temperature. *The Journal of chemical physics*, 72(4), 2384-2393.
- [18]Parrinello, M., & Rahman, A. (1980). Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. *Physical Review Letters*, 45(14), 1196.
- [19]Rappe, A. K., & Goddard III, W. A. (1991). Charge equilibration for molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(8), 3358-3363.
- [20]Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., & Kollman, P. A. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5179-5197.
- [21]Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.
- [22]Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, 4(2), 187-217.
- [23]Kalé, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Krawetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., Varadarajanm, K., & Schulten, K. (1999). NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics. *Journal of Computational Physics*, 151(1), 283-312.
- [24]Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1781-1802.
- [25]Christen, M., Hünenberger, P. H., Bakowies, D., Baron, R., Bürgi, R., Geerke, D. P.,

- Heinz, T. N., Kastenholtz, M. A., Kräutler, V., Oostenbrink, C., Peter, C., Trzesniak, D., & van Gunsteren, W. F. (2005). The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1719-1751.
- [26] Sułkowska, J. I., Noel, J. K., & Onuchic, J. N. (2012). Energy landscape of knotted protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), 17783-17788.
- [27] Nam, K., Pu, J., & Karplus, M. (2014). Trapping the ATP binding state leads to a detailed understanding of the F1-ATPase mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(50), 17851-17856.
- [28] Hayes, R. L., Noel, J. K., Mohanty, U., Whitford, P. C., Hennelly, S. P., Onuchic, J. N., & Sanbonmatsu, K. Y. (2012). Magnesium fluctuations modulate RNA dynamics in the SAM-I riboswitch. *Journal of the American Chemical Society*, 134(29), 12043-12053.
- [29] Yildirim, A., Sharma, M., Varner, B. M., Fang, L., & Feig, M. (2014). Conformational preferences of DNA in reduced dielectric environments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(37), 10874-10881.
- [30] Sekijima, M., Motono, C., Yamasaki, S., Kaneko, K., & Akiyama, Y. (2003). Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophysical journal*, 85(2), 1176-1185.
- [31] Gapsys, V., de Groot, B. L., & Briones, R. (2013). Computational analysis of local membrane properties. *Journal of computer-aided molecular design*, 27(10), 845-858.
- [32] Ingólfsson, H. I., Melo, M. N., Van Eerden, F. J., Arnarez, C., Lopez, C. A.,

- Wassenaar, T. A., Periole, X., de Vries, A. H., Tieleman, D. P., & Marrink, S. J. (2014). Lipid organization of the plasma membrane. *Journal of the american chemical society*, 136(41), 14554-14559.
- [33]Levine, Z. A., Venable, R. M., Watson, M. C., Lerner, M. G., Shea, J. E., Pastor, R. W., & Brown, F. L. (2014). Determination of biomembrane bending moduli in fully atomistic simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 136(39), 13582-13585.
- [34]Sodt, A. J., Sandar, M. L., Gawrisch, K., Pastor, R. W., & Lyman, E. (2014). The molecular structure of the liquid-ordered phase of lipid bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 136(2), 725-732.
- [35]Buch, I., Giorgino, T., & De Fabritiis, G. (2011). Complete reconstruction of an enzyme-inhibitor binding process by molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10184-10189.
- [36]Doruker, P., Atilgan, A. R., & Bahar, I. (2000). Dynamics of proteins predicted by molecular dynamics simulations and analytical approaches: Application to α -amylase inhibitor. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 40(3), 512-524.
- [37]Shan, Y., Kim, E. T., Eastwood, M. P., Dror, R. O., Seeliger, M. A., & Shaw, D. E. (2011). How does a drug molecule find its target binding site?. *Journal of the American Chemical Society*, 133(24), 9181-9183.
- [38]Bártová, I., Otyepka, M., Kříž, Z., & Koča, J. (2004). Activation and inhibition of cyclin-dependent kinase-2 by phosphorylation; a molecular dynamics study reveals the functional importance of the glycine-rich loop. *Protein science*, 13(6), 1449-1457.

- [39]Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Gready, J. E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal research reviews*, 26(5), 531-568.
- [40]Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
- [41]Golstein, P. (1998). Cell death in us and others.
- [42]Mountz, J. D., Wu, J., Cheng, J., & Zhou, T. (1994). Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis & Rheumatology*, 37(10), 1415-1420.
- [43]Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203), 1456-1462.
- [44]Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), 1415-1430.
- [45]Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- [46]Conradt, B., & Horvitz, H. R. (1998). The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 93(4), 519-529.
- [47]Vaux, D. L., Weissman, I. L., & Kim, S. K. (1992). Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. *Science*, 258(5090), 1955-1957.
- [48]Hengartner, M. O., & Horvitz, H. R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, 76(4), 665-676.
- [49]Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The C.

- elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641-652.
- [50] Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(1), 49.
- [51] Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322-1326.
- [52] Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(1), 47.
- [53] Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D., & Souers, A. J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(4), 273.
- [54] Némati, F., de Montrion, C., Lang, G., Kraus-Berthier, L., Carita, G., Sastre-Garau, X., Berniard, A., Vallerand, D., Geneste, O., de Plater, L., Pierré, A., Lockhart, B., Desjardins, L., & Decaudin, D. (2014). Targeting Bcl-2/Bcl-XL induces antitumor activity in uveal melanoma patient-derived xenografts. *PloS one*, 9(1), e80836.
- [55] Bai, L., Chen, J., McEachern, D., Liu, L., Zhou, H., Aguilar, A., & Wang, S. (2014). BM-1197: a novel and specific Bcl-2/Bcl-xL inhibitor inducing complete and long-lasting tumor regression in vivo. *PloS one*, 9(6), e99404.
- [56] Levenson, J. D., Phillips, D. C., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Diaz, D., Tahir, S. K., Belmont, L. D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X. M., Lowes, K. N., Kovar, P., Chen, J., Jin, S., Smith, M., Xue, J., Zhang, H., Oleksijew, A., Magoc, T. J., Vaidya K. S., Albert, D. H., Tarrant, J. M., La, N., Wang, L., Tao, Z., Wendt, M. D., Sampath, D., Rosenberg, S. H., Tse, C., Huang, D. C. S., Fairbrother, W. J., Elmore, S. W., &

- Souers, A. J. (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Science translational medicine*, 7(279), 279ra40-279ra40.
- [57] Lessene, G., Czabotar, P. E., Sleebs, B. E., Zobel, K., Lowes, K. N., Adams, J. M., Baell, J. B., Colman, P. M., Deshayes, K., Fairbrother, W. J., Flygare, J. A., Gibbons, P., Kersten, W. J. A., Kulasegaram, S., Moss, R. M., Parisot, J. P., Smith, B. J., Street, I. P., Yang, H., Huang, D. C. S., & Watson, K. G. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X L inhibitor. *Nature chemical biology*, 9(6), 390.
- [58] Levenson, J. D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S. K., Phillips, D. C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., Kovar, P., Tanaka, A., Bruncko, M., Sheppard, G. S., Wang, L., Gierke, S., Kategaya, L., Anderson, D. J., Wong, C., Eastham-Anderson, J., Ludlam, M. J. C., Sampath, D., Fairbrother, W. J., Wertz, I., Rosenberg, S. H., Tse, C., Elmore, S. W., & Souers, A. J. (2015). Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell death & disease*, 6(1), e1590.
- [59] Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G. L., Gong, J., Moujalled, D. M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z. B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Ondi, L., Blasko, G., Robertson, A., Surgenor, A., Dokurno, P., Chen, I., Matassova, N., Smith, J., Pedder, C., Graham, C., Studeny, A., Lysiak-Auvity, G., Girard, A., Gravé, F., Segal, D., Riffkin, C. D., Pomilio, G., Galbraith, L. C. A., Aubrey, B. J., Brennan, M. S., Herold, M. J., Chang, C., Guasconi, G., Cauquil, N., Melchiorre, F., Guigal-Stephan, N., Lockhart, B., Colland, F., Hickman, J. A., Roberts, A. W., Huang, D. C. S., Wei, A. H., Strasser, A., Lessene, G., & Geneste, O.

- (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*, 538(7626), 477.
- [60] Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science*, 226, 1097-1100.
- [61] Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). The t (14; 18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, 229, 1390-1394.
- [62] Schena, M., Larsson, L. G., Gottardi, D., Gaidano, G., Carlsson, M., Nilsson, K., & Caligaris-Cappio, F. (1992). Growth-and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 79(11), 2981-2989.
- [63] Sinicrope, F. A., Hart, J., Michelassi, F., & Lee, J. J. (1995). Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 1(10), 1103-1110.
- [64] Öfner, D., Riehemann, K., Maier, H., Riedmann, B., Nehoda, H., Tötsch, M., Böcker, W., Jasani, B., & Schmid, K. W. (1995). Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *British Journal of Cancer*, 72(4), 981-985.
- [65] Baretton, G. B., Diebold, J., Christoforis, G., Vogt, M., Müller, C., Dopfer, K., Schneiderbanger, K., Schmidt, M., & Löhrs, U. (1996). Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas: Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer*, 77(2), 255-264.

- [66] Leahy, D. T., Mulcahy, H. E., O'donoghue, D. P., & Parfrey, N. A. (1999). bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology*, 35(4), 360-367.
- [67] Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W., & Rosenberg, S. H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435(7042), 677-681.
- [68] Bruncko, M., Oost, T. K., Belli, B. A., Ding, H., Joseph, M. K., Kunzer, A., Martineau, D., McClellan, W. J., Mitten, M., Ng, S. C., Nimmer, P. M., Oltersdorf, T., Park, C. M., Petros, A. M., Shoemaker, A. R., Song, X., Wang, X., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W., Rosenberg, S. H., Elmore, S. W. (2017). Studies leading to potent, dual inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(4), 641-662.
- [69] Porter, J., Payne, A., de Candole, B., Ford, D., Hutchinson, B., Trevitt, G., Edwards, C., Watkins, C., Whitcombe, I., Davis, J., & Stubberfield, C. (2009). Tetrahydroisoquinoline amide substituted phenyl pyrazoles as selective Bcl-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(1), 230-233.
- [70] Ku, B., Liang, C., Jung, J. U., & Oh, B. H. (2011). Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell research*, 21(4), 627-641.

- [71] Perez, H. L., Banfi, P., Bertrand, J., Cai, Z. W., Grebinski, J. W., Kim, K., Lippy, J., Modugno, M., Naglich, J., Schmidt, R.J., Tebben, A., Vianello, P., Wei, D.D., Zhang, L., Galvani, A., Lombardo, L.J., & Borzilleri, R.M. (2012). Identification of a phenylacetylsulfonamide series of dual Bcl-2/Bcl-xL antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(12), 3946-3950.
- [72] Touré, B. B., Miller-Moslin, K., Yusuff, N., Perez, L., Doré, M., Joud, C., Michael, W., DiPietro, L., van der Plas, S., McEwan, M., Lenoir, F., Hoe, M., Karki, R., Springer, C., Sullivan, J., Levine, K., Fiorilla, C., Xie, X., Kulathila, R., Herlihy, K., Porter, D., & Visser, M. (2013). The role of the acidity of N-heteroaryl sulfonamides as inhibitors of Bcl-2 family protein–protein interactions. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(2), 186-190.
- [73] Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., Mason, K. D., Mitten, M. J., Nimmer, P. M., Oleksijew, A., Park, C. H., Park, C. M., Phillips, D. C., Roberts, A. W., Sampath, D., Seymour, J. F., Smith, M. L., Sullivan, G. M., Tahir, S. K., Tse, C., Wendt, M. D., Xiao, Y., Xue, J. C., Zhang, H., Humerickhouse, R. A., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine*, 19(2), 202-208.
- [74] Checco, J. W., Lee, E. F., Evangelista, M., Sleebs, N. J., Rogers, K., Pettikiriachchi, A., Kershaw, N. J., Eddinger, G. A., Belair, D. G., Wilson, J. L., Eller, C. H., Raines, R. T., Murphy, W. L., Smith, B. J., Gellman, S. H., & Fairlie, W. D. (2015). α/β -Peptide foldamers targeting intracellular protein–protein

- interactions with activity in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 137(35), 11365-11375.
- [75]Jiang, T., Liu, M., Wu, J., & Shi, Y. (2016). Structural and biochemical analysis of Bcl-2 interaction with the hepatitis B virus protein HBx. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), 2074-2079.
- [76]Berger, S., Procko, E., Margineantu, D., Lee, E. F., Shen, B. W., Zelter, A., Silva, D-A., Chawla, K., Herold, J. M., Garnier, J. M., Johnson, R., MacCoss, M. J., Lessene, G., Davis, T. N., Stayton, P. S., Stoddard, B. L., Fairlie, W. D, Hockenbery, D. M., & Baker, D. (2016). Computationally designed high specificity inhibitors delineate the roles of BCL2 family proteins in cancer. *Elife*, 5, e20352.
- [77]Amundson, S. A., Myers, T. G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J. C., & Fornace, A. J. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer research*, 60(21), 6101-6110.
- [78]Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z. M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C., & Kufe, D. (1997). Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 6939-6942.
- [79]Leech, S. H., Olie, R. A., Gautschi, O., Simões-Wüst, A. P., Tschopp, S., Häner, R., Hall, J., Stahel, R. A., & Zangemeister-Wittke, U. (2000). Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *International journal of cancer*, 86(4), 570-576.

- [80] Lebedeva, I., Rando, R., Ojwang, J., Cossum, P., & Stein, C. A. (2000). Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Research*, 60(21), 6052-6060.
- [81] Simões-Wüst, A. P., Olie, R. A., Gautschi, O., Leech, S. H., Häner, R., Hall, J., Fabbro, D., Stahel, R. A., & Zangemeister-Wittke, U. (2000). Bcl-xl antisense treatment induces apoptosis in breast carcinoma cells. *International journal of cancer*, 87(4), 582-590.
- [82] Friess, H., Lu, Z., Andrén-Sandberg, A., Berberat, P., Zimmermann, A., Adler, G., Schmid, R., & Büchler, M. W. (1998). Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer. *Annals of surgery*, 228(6), 780.
- [83] Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). Bcl-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell death and differentiation*, 25(1), 65.
- [84] Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*, 162(6), 1239-1249.
- [85] Huggins, D. J., Sherman, W., & Tidor, B. (2012). Rational approaches to improving selectivity in drug design. *Journal of medicinal chemistry*, 55(4), 1424-1444.
- [86] Civjan, N. (2012). *Chemical biology: approaches to drug discovery and development to targeting disease*. John Wiley & Sons.
- [87] Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2008).

- ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer research*, 68(9), 3421-3428.
- [88] Wilson, W. H., O'Connor, O. A., Czuczman, M. S., LaCasce, A. S., Gerecitano, J. F., Leonard, J. P., Tulpule, A., Dunleavy, K., Xiong, H., Chiu, Y., Cui, Y., Busmam, T., Elmore, S. W., Rosenberg, S. H., Krivoschik, A. P., Enschede, S. H., & Humerickhouse, R. A. (2010). Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *The lancet oncology*, 11(12), 1149-1159.
- [89] Roberts, A. W., Seymour, J. F., Brown, J. R., Wierda, W. G., Kipps, T. J., Khaw, S. L., Carney, D. A., He, S. Z., Huang, D. C. S., Xiong, H., Cui, Y., Busman, T. A., McKeegan, E. M., Krivoschik, A. P., Enschede, S. H., & Humerickhouse, R. (2011). Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of Clinical Oncology*, 30(5), 488-496.
- [90] Zhang, H., Nimmer, P. M., Tahir, S. K., Chen, J., Fryer, R. M., Hahn, K. R., Iciek, L. A., Morgan, S. J., Nasarre, M. C., Nelson, R., Preusser, L. C., Reinhart, G. A., Smith, M. L., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2007). Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death & Differentiation*, 14(5), 943-951.
- [91] Mason, K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., Ellis, S., Kelly, P. N., Ekert, P. G., Metcalf, D., Roberts, A. W., Huang, D. C., & Kile, B. T. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*, 128(6), 1173-1186.
- [92] Tao, Z. F., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A. M., Park, C. H., Boghaert, E.

- R., Catron, N. D., Chen, J., Colman, P. M., Czabotar, P. E., Deshayes, K., Fairbrother, W. J., Flygare, J. A., Hymowitz, S. G., Jin, S., Judge, R. A., Koehler, M. F. T., Kovar, P. J., Lessene, G., Mitten, M. J., Ndubaku, C. O., Nimmer, P., Purkey, H. E., Oleksijew, A., Phillips, D. C., Sleebs, B. E., Smith, B. J., Smith, M. L., Tahir, S. K., Watson, K. G., Xiao, Y., Xue, J., Zhang, H., Zobel, K., Rosenberg, S. H., Tse, C., Leverson, J. D., Elmore, S. W., & Souers, A. J. (2014). Discovery of a potent and selective BCL-XL inhibitor with in vivo activity. *ACS medicinal chemistry letters*, 5(10), 1088-1093.
- [93] Lee, E. F., Czabotar, P. E., Smith, B. J., Deshayes, K., Zobel, K., Colman, P. M., & Fairlie, W. D. (2007). Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell Death & Differentiation*, 14(9), 1711-1713.
- [94] Koehler, M. F., Bergeron, P., Choo, E. F., Lau, K., Ndubaku, C., Dudley, D., Gibbons, P., Sleebs, B. E., Rye, C. S., Nikolakopoulos, G., Bui, C., Kulasegaram, S., Kersten, W. J. A., Smith, B. J., Czabotar, P. E., Colman, P. M., Huang, D. C. S., Baell, J. B., Watson, K. G., Hasvold, L., Tao, Z., Wang, L., Souers, A. J., Elmore, S. W., Flygare, J. A., Fairbrother, W. J., & Lessene, G. (2014). Structure-guided rescaffolding of selective antagonists of BCL-XL. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5(6), 662-667.
- [95] Wang, D. F., Helquist, P., Wiech, N. L., & Wiest, O. (2005). Toward selective histone deacetylase inhibitor design: homology modeling, docking studies, and molecular dynamics simulations of human class I histone deacetylases. *Journal of medicinal chemistry*, 48(22), 6936-6947.
- [96] Hou, T., & Yu, R. (2007). Molecular dynamics and free energy studies on the

- wild-type and double mutant HIV-1 protease complexed with amprenavir and two amprenavir-related inhibitors: mechanism for binding and drug resistance. *Journal of medicinal chemistry*, 50(6), 1177-1188.
- [97] Alterio, V., Vitale, R. M., Monti, S. M., Pedone, C., Scozzafava, A., Cecchi, A., Simone, G. D., & Supuran, C. T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray and molecular modeling study for the interaction of a fluorescent antitumor sulfonamide with isozyme II and IX. *Journal of the American Chemical Society*, 128(25), 8329-8335.
- [98] Shahlaei, M., Madadkar-Sobhani, A., Mahnam, K., Fassihi, A., Saghaie, L., & Mansourian, M. (2011). Homology modeling of human CCR5 and analysis of its binding properties through molecular docking and molecular dynamics simulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(3), 802-817.
- [99] Feng, Z., Alqarni, M. H., Yang, P., Tong, Q., Chowdhury, A., Wang, L., & Xie, X. Q. (2014). Modeling, molecular dynamics simulation, and mutation validation for structure of cannabinoid receptor 2 based on known crystal structures of GPCRs. *Journal of chemical information and modeling*, 54(9), 2483-2499.
- [100] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242.
- [101] Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45), 11225-11236.

- [102] Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., Wang, L., Lupyan, D., Dahlgren, M. K., Knight, J. L., Kaus, J. W., Cerutti, D. S., Krilov, G., Jorgensen, W. L., Abel, R., & Friesner, R. A. (2015). OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *Journal of chemical theory and computation*, 12(1), 281-296.
- [103] Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Taisung, L., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D. A., & Cheatam, T. E. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research*, 33(12), 889-897.
- [104] Durant, J. L., Leland, B. A., Henry, D. R., & Nourse, J. G. (2002). Reoptimization of MDL keys for use in drug discovery. *Journal of chemical information and computer sciences*, 42(6), 1273-1280.
- [105] Schrödinger Release 2017-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017
- [106] Westbrook, J. D., Shao, C., Feng, Z., Zhuravleva, M., Velankar, S., & Young, J. (2014). The chemical component dictionary: complete descriptions of constituent molecules in experimentally determined 3D macromolecules in the Protein Data Bank. *Bioinformatics*, 31(8), 1274-1278.
- [107] Shelley, J. C., Cholleti, A., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Timlin, M. R., & Uchimaya, M. (2007). Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of computer-aided molecular design*, 21(12), 681-691.
- [108] Zhang, Xiaomeng, Yuxiang Lin, and Robert J. Gillies. "Tumor pH and its measurement." *Journal of Nuclear Medicine* 51.8 (2010): 1167-1170.

- [109] Li, H., Robertson, A. D., & Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4), 704-721.
- [110] Nosé, S. (1984). A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of chemical physics*, 81(1), 511-519.
- [111] Hoover, W. G. (1985). Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Physical review A*, 31(3), 1695.
- [112] Martyna, G. J., Tobias, D. J., & Klein, M. L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5), 4177-4189.
- [113] Piana, S., Lindorff-Larsen, K., Dirks, R. M., Salmon, J. K., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2012). Evaluating the effects of cutoffs and treatment of long-range electrostatics in protein folding simulations. *PLoS One*, 7(6), e39918.
- [114] Shaw, D. E., Grossman, J. P., Bank, J. A., Batson, B., Butts, J. A., Chao, J. C., Deneroff, M. M., Dror, R. O., Even, A., Fenton, C. H., Forte, A., Gagliardo, J., Gill, G., Greskamp, B., Ho, C. R., Ierardi, D. J., Iserovich, L., Kuskin, J. S., Larson, R. H., Layman, T., Lee, L. S., Lerer, A. K., Li, C., Killebrew, D., Mackenzie, K. M., Mok, S. Y. H., Moraes, M. A., Mueller, R., Nociolo, L. J., Peticolas, J. L., Quan, T., Ramot, D., Salmon, J. K., Scarpazza, D. P., Schafer, U. B., Siddique, N., Snyder, C. W., Spengler, J., Tang, P. T. P., Theobald, M., Toma, H, Towles, B., Vitale, B., Wang, S. C., & Young, C. (2014, November). Anton 2: raising the bar for performance and programmability in a special-purpose molecular dynamics supercomputer. In *Proceedings of the International Conference for High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis* (pp. 41-53). IEEE Press.

- [115] Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S., & Friesner, R. A. (2011). The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(10), 2794-2812.
- [116] Yang, C. Y., & Wang, S. (2011). Hydrophobic binding hot spots of Bcl-xL protein– protein interfaces by cosolvent molecular dynamics simulation. *ACS medicinal chemistry letters*, 2(4), 280-284.
- [117] Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D. G., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. C., & Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381(6580), 335-341.
- [118] Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., & Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-x L-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275(5302), 983-986.
- [119] Oberstein, A., Jeffrey, P. D., & Shi, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-2 peptide complex Bcl-2 is a novel BH3-only protein. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 13123-13132.
- [120] Lee, E. F., Sadowsky, J. D., Smith, B. J., Czabotar, P. E., Peterson-Kaufman, K. J., Colman, P. M., Gellman, S. H., & Fairlie, W. D. (2009). High-Resolution Structural Characterization of a Helical α/β -Peptide Foldamer Bound to the Anti-Apoptotic Protein Bcl-xL. *Angewandte Chemie*, 121(24), 4382-4386.

謝辞

本論文を作成するにあたり、指導をしてくださった岩崎博史教授に心より御礼申し上げます。本論文の研究内容の構想および研究遂行のお力添えを頂いた吉野龍ノ介特任助教に心より御礼申し上げます。本論文の作成および研究内容に関するご助言を頂いた秋山泰教授、関嶋政和准教授、石田貴士准教授、大上雅史助教、伊澤和輝研究員に心より御礼申し上げます。最後に普段から研究に関する議論を行ってくださった情報理工学院情報工学系 秋山研究室および石田研究室の方々にも心より御礼申し上げます。

2018 年 2 月

和久井直樹