

課題名 「創薬を志向した Sirt4 複合体の構造モデリング」

申請者 小島 正樹

所属 東京薬科大学生命科学部

背景

心疾患のうち約 8 割は虚血性心疾患であり、その多くがメタボリックシンドロームにより引き起こされる。虚血性疾患では心筋細胞が低酸素状態にさらされ細胞死を引き起こすことで心筋の機能障害が生じ生命に重篤な危機を生じる。H9c2 cardiomyoblast cells (心筋芽培養細胞) を利用した実験で、Sirtuin4 (Sirt4) は低酸素状態における細胞死に対して抵抗性を示すことが報告されている。また、拡張型心筋症を亢進させる因子としても報告されている。

Sirt4 はミトコンドリアに存在しグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)に対する ADP リボシル化反応を触媒し、非肝臓組織において Sirt5 とともに TCA サイクル、細胞内 ATP/ADP 比、脂肪酸の β 酸化を制御する。これらのことから Sirt4 は心筋の代謝回転と細胞死を直接結びつけ制御する重要な因子であることが示唆される。

近年、ターゲットタンパク質の立体構造情報をもとにした創薬戦略 (structure-based drug design) が重要性を高めている。Sirt4 の立体構造とその動作機構を解明することは Sirt4 の活性制御薬剤の開発のために重要である。

方法、結果

Sirt4 の構造モデルをホモロジーモデリングおよび threading といった鋳型依存のモデリング手法で構築した。鋳型に用いたタンパク質は、Sirt5 や微生物由来の Sir2 といった Sirt4 に対する相同性が 30% 以上のものであった。ホモロジーモデリングのため Robetta, Swiss-MODEL といったプログラムを利用した。Threading 用のプログラムとして I-TASSER を利用した。それぞれのプログラムから複数の構造モデルが得られたため、Ramachandran plot, Verify3D, ERRAT, 構造エネルギー計算により Robetta が作成したモデル構造の妥当性、優位性が示された。

Sirt4 の反応機構解析解析のためには基質との複合体構造モデルを得ることが重要である。そこで、Robetta 由来の 5 個のモデルに対して、Sirt4 の基質の 1 つである NAD⁺ のドッキングを検討した。ドッキングのために Autodock Vina プログラムを用いた。Sirt4 は GDH の ADP リボシル化のために、GDH のほか NAD⁺ を基質とする。NAD⁺ のドッキングの結果、Robetta モデルのうちの 1 個では、Sirt5 で示された NAD⁺ のドッキングポーズと同様のドッキングポーズが示された (図 A)。このことは、このモデルが他の Sirtuin と同様の

内部構造を有していることを示唆した。

上記のようにして得られた Sirt4-NAD⁺複合体構造モデルに対して、もう1つの基質である GDH の ADP リボシル化部位を含む部分構造のドッキングを試みた。このドッキングの試みのために、まず ZDOCK, ClusPro といった剛体-剛体ドッキングソフトを検討したところ、同様のドッキングポーズが示された。次いで、フレキシブルリガンドによるドッキングを FlexPepDock 等を用いて実行したところ、改めて同様のドッキングポーズが示された (図 B)。これらのことから、GDH の部分構造は Sirt4 のループ構造(図 B 緑)に挿入される形でドッキングすることが示された。また、このドッキングモデルでは GDH の ADP リボシル化部位と Sirt4 上の NAD⁺の反応部位が近傍に位置することから、こうした構造が GDH の ADP リボシル化反応を導く可能性が示された。このモデルを分子動力学シミュレーションにより解析し、シミュレーション前の構造(図 C 白)と後の構造(同シアン)を比較したところ、全体構造に変化は見られなかったことから、モデル構造の妥当性が支持された。

議論

私たちは本共同研究課題により Sirt4-NAD⁺-GDH 複合体の構造モデルの構築に成功し、その構造の妥当性について評価した。今後は、本構造を用い、薬剤候補化合物のドッキング、スクリーニングあるいは量子化学的な解析による詳細な反応機構の解析を行うことで、Sirt4 創薬を主に計算科学的なアプローチにより追求することを目指している。

なお本研究で明らかになった成果については、論文にまとめて現在投稿中である。

