

## 演習問題

- (1) ABO 式血液型を決める遺伝子は ABO である。ヒトの ABO 遺伝子産物の UniProtKB のエントリーを参考に A 型、B 型、O 型の遺伝子産物の違いを述べよ。また、それぞれの型について、立体構造が決まっているかどうか調べ、決まっている構造同士で、構造の比較をせよ。

- (2) 微分方程式の数値解法としてはオイラー法が一般的に用いられる。

$$f(t + \Delta t) = f(t) + f'(t)\Delta t$$

ここで  $f'(t)$  は  $f(x)$  の  $x = t$  における微分係数である。運動方程式は以下のように 1 階の連立微分方程式に変換できるので、オイラー法を適用できる。

$$\begin{cases} \frac{dq}{dt} = v \\ m \frac{dv}{dt} = F(q) \end{cases}$$

調和振動子の系 ( $F(q) = -kq$ ) を、オイラー法を用いて解き、オイラー法が運動方程式の数値解法として適していないことを示せ。

- (3) 例題 4.2 で扱った抗インフルエンザ薬 oseltamivir は、体内で oseltamivir carboxylate に加水分解される。この oseltamivir carboxylate はインフルエンザウイルスの表面にあるノイラミニダーゼ (neuraminidase) に結合して、その活性を阻害する。PubChem から oseltamivir carboxylate の立体構造を取得し、例題 4.2 と同じ手順でエネルギー最小化した後、N1 neuraminidase (PDB ID: 2HTY の A 鎖) にドッキングせよ。この結果を、正解の複合体構造 (PDB ID: 2HU4 の A 鎖) と比較せよ。

## 解答例

(1) UniProtKB にアクセスし、「ABO human」で検索する。トップにエン트리 ID P16442、エン트리名 BGAT\_HUMAN が表示されるので、これをクリックし、Histo-blood group ABO system transferase のページに移動する。Function のセクションを読むと、A 型の人には H 抗原を UDP-GalNAc を用いて A 抗原に変換する糖転移酵素を発現し、B 型の人には H 抗原を UDP-Gal を用いて B 抗原に変換する糖転移酵素を発現していることがわかる。また O 型の人はそのような活性を欠いている。Catalytic activity を見ると、糖鎖に UDP-GalNAc の GalNAc を転移していることがわかる。また Sequence のセクションの Polymorphism を見ると、このエントリの配列は A 型の配列を示しており、B 型は数残基異なることがわかる。266 番目と 268 番目の残基が特異性に重要である。また、O 型は塩基の 1 つ (グアニン) が欠失してフレームシフトを起こし、117 残基のポリペプチド鎖に翻訳される (A 型は 354 残基)。このため、O 型の人には活性のある糖転移酵素を発現していない。Structure のセクションには多数の PDB のエン트리が表示されている。この中から (トップに表示されている) 1LZ0 の RCSB-PDB のリンクをクリックする。1LZ0 のページを開くと、このエントリが A 型の構造であることがわかる。Literature を見ると、同じ論文で 4 つの構造を決定していることがわかる。それぞれ確認すると、1LZ7 が B 型、1LZJ が B 型と H 抗原、UDP の複合体、1LZI が A 型と H 抗原、UDP の複合体であることがわかる。ここでは活性中心付近の構造を見るために、1LZI と 1LZJ を比較する。

UCSF Chimera を起動し、メニューの「File」→「Fetch by ID」を用いて、1LZI と 1LZJ を順に開く。「Favorites」→「Model Panel」を開き、2 つのモデルを選択した状態で、Model Panel の右側のメニューにある「match」をクリックする。

まず、配列を比較するため、1LZI と 1LZJ のアミノ酸配列を FASTA フォーマットでそれぞれ表示し、blast2seq を実行する。アラインメントを見ると、292 残基中 288 残基一致しており、4 残基異なることがわかる。MatchMaker のウィンドウが開くので、下部にある「After superposition, compute structure-based multiple sequence alignment」をチェックし、「OK」をクリックする。Create Alignment from Superposition のウィンドウが現れるので、「OK」をクリックする。メインウィンドウでは 2 つの構造の重ね合わせが表示され、別のウィンドウには配列アラインメントが表示されているはずである。RMSD は 0.206 Å となっており、2 つの構造は非常によく一致している。配列アラインメントを見ると、UniProtKB で特異性に重要とされていた 266 番目と 268 番目は A 型 (1LZI) では Leu266 と Gly268、B 型 (1LZJ) では Met266 と Ala268 である。立体構造を見ると、この 2 つの残基は基質 (UDP、H 抗原) の近くに位置していることがわかる。H 抗原に転移される糖 (A 型では

GalNAc、B 形では Gal) は UDP のリン酸基の先に結合している、B 型では 266 番、268 番ともに A 型より嵩高いアミノ酸となっているのに対して、糖は A 型の方が嵩高い (GalNAc は 2 位が-NHCOCH<sub>3</sub> に対して Gal は-OH)。このため、A 型に Gal が結合しても十分に相互作用を形成できず、B 型に GalNAc が結合すると原子同士が衝突すると予想される。このように糖転移酵素の特異性は、266 番、268 番の残基の大きさによって決まっていると考えられる。

- (2) 調和振動子の運動方程式は以下のように書ける。

$$\begin{cases} \frac{dq}{dt} = v \\ \frac{dv}{dt} = -\omega^2 q \end{cases}$$

ここで、 $\omega^2 = k/m$  である。これにオイラー法を適用すると以下のように書ける。

$$\begin{cases} q(t + \Delta t) = q(t) + v\Delta t \\ v(t + \Delta t) = v(t) - \omega^2 q(t)\Delta t \end{cases}$$

となる。ここで、 $q_n = q(n\Delta t)$ 、 $v_n = v(n\Delta t)$  と書くことにすると、

$$\begin{cases} q_{n+1} = q_n + v_n\Delta t \\ v_{n+1} = v_n - \omega^2\Delta t q_n \end{cases}$$

このとき、全エネルギーの時間変化は以下で与えられる。

$$H_n = \frac{k}{2}q_n^2 + \frac{m}{2}v_n^2 = \frac{m}{2}(\omega^2 q_n^2 + v_n^2)$$

これに上の漸化式を代入すると以下を得る。

$$H_{n+1} = [1 + (\omega\Delta t)^2]H_n$$

従って、 $H_n = [1 + \omega^2(\Delta t)^2]^n H_0$  となり、全エネルギーは単調に増加する。これはエネルギー保存則に反するため、オイラー法は運動方程式の数値解法として適していないと言える。

- (3) AutoDock Vina のサイトから各自のオペレーティングシステムに合わせてソフトウェアをダウンロードし、インストールしておく。PubChem にアクセスし、「oseltamivir carboxylate」で検索する。Compound CID が 449381 であることを確認する。UCSF Chimera を開き、メニューの「File」→「Fetch by ID」を開き、Database を「PubChem」、ID を「449381」として「Fetch」する。中性ではカルボキシ基が脱プロトン化し、アミノ基がプロトン化していることから、まず、カルボキシ基に結合している酸素原子を「Ctrl」キーを押しながらクリックして選択し、「Actions」→「Atoms/Bonds」→「delete」で削除する。続いて、「Tools」→「Structure Editing」→「AddH」を開き、アミノ基を

プロトン化する。「Tools」→「Structure Editing」→「Add Charge」で電荷を割り当て (Net Charge は 0)、「Tools」→「Structure Editing」→「Minimize Structure」でエネルギー最小化を行う。エネルギー最小化後の構造は、「File」→「Save MOL2」でデスクトップに「ose.mol2」として保存する。

「File」→「Close Session」で初期化した後、「File」→「Fetch by ID」を開き、Database を「PDB」、ID を「2HTY」として受容体の構造を「Fetch」する。

「Select」→「Chain」→「A」で A 鎖を選択する。「File」→「Save PDB」を開き、「Save selected atoms only」をチェックし、デスクトップに「2HTY\_A.pdb」として保存する。「File」→「Close Session」で初期化した後、同様に正解構造である 2HU4 の A 鎖を、デスクトップに「2HU4\_A.pdb」として保存する。デスクトップに「docking」という名前のフォルダを作成し、ose.mol2 と 2HTY\_A.pdb、2HU4\_A.pdb を移動する。「File」→「Close Session」で UCSF Chimera を初期化した後、「File」→「Open」で受容体「2HTY\_A.pdb」を開く。続いて、リガンド「ose.mol2」を開く。「File」→「Residue」→「HOH」で水分子を選択し、「Actions」→「Atoms/Bonds」→「delete」で削除する。同様に、「File」→「Residue」→「NDG」で糖鎖を選択し、「Actions」→「Atoms/Bonds」→「delete」で削除する。

「Tools」→「Surface/Binding Analysis」→「Dock Prep」を開き、「OK」をクリックする。Add Hydrogens for Dock Prep のウインドウが現れるので、「OK」をクリックする。続いて、Assign Charges for Dock Prep のウインドウが現れるので、「OK」をクリックする。Specify Net Charges で CA (Ca<sup>2+</sup>) が「+2」、UNK (リガンド) が「0」となっていることを確認して、「OK」をクリックする。電荷の計算が終わると Chimera Warning のウインドウが現れるが「Close」で閉じてよい。

ブラウザで GHECOM のページを開く。PDB ID に「2hty」と入力 (小文字で入力すること) し、「送信」する。次のページで「do ghecom」をクリックする。その下に「show pockets (jmol)」のリンクが現れるのでクリックし、計算結果のグラフィックスを表示する。color を「cluster」に変更し、赤色で表示されている最大のクラスタを確認する。「Pocket grid PDB file」をクリックし、ダウンロードされた「pocket\_grid.pdb」を適当なテキストエディタで開く。原子名 CA、残基名 CEN、チェーン ID 1 となっている行がクラスタ 1 の中心の座標データを表しており、(-0.260, 78.567, 112.853)となっていることを確認する。

UCSF Chimera に戻り、「Tools」→「Surface/Binding Analysis」→「AutoDock Vina」を開く。Output File の横の「Browse」をクリックし、デスクトップに作成した docking フォルダを開き、ファイル名を「ose.pdbqt」として「Set Output Location」をクリックする (出力ファイルなのでこの時点ではまだ存在しない)。Receptor に「2HTY\_A.pdb (#0)」、Ligand に「CID 449381 (#1)」を

指定する。Center に GHECOM で求めた、「-0.260」、「78.567」、「112.853」を入力し、Size に「20」、「20」、「20」を入力する。「Executable location」をクリックして展開し、「local」を選択して、インストールした AutoDock Vina の実行形式へのパスを指定する。「OK」をクリックすると計算が始まる。

計算が終了すると View Dock のウインドウが現れる。Score のカラムにスコアが表示されており、負で絶対値が大きいほど、親和性が高いと予測された構造であることを示している。ドッキング構造を正解構造と比較するために、「File」→「Open」で「2HU4\_A.pdb」を開く。「Favorites」→「Model Panel」を開き、CID 449381 の Show のカラムのチェックを外した後、2HTY\_A.pdb と 2HU4\_A.pdb を選択して、Model Panel の右側のメニューにある「match」をクリックする。「OK」を押すと、2HU4\_A.pdb が 2HTY\_A.pdb に重ね合わせられるので、リガンドの構造を比較しやすくなる。結果は実行ごとに異なるが、筆者の計算では6位の構造が正解構造に最も近くなった。スコアは-6.1 で一位の構造(-6.7)より 0.6 大きい、他の候補との間の差は 0.2 程度で差があまり開いていないことに注意する。ドッキングスコアの順位だけで、正解の構造を得ることは難しいため、スコア上位の構造について、分子動力学シミュレーションを適用して安定性を比較することなどが必要であると言える。