

＜チュートリアル＞ FMODBデータを対象とした 相互作用クラスタリング解析

大阪大学大学院 薬学研究科

修士1年 御幡 瑠璃

■ チュートリアルの内容

● 内容①

- BioStationViewerを用いたリガンド-タンパク質のIFIE/PIEDA解析

● 内容②

- VISCANA機能を用いた解析
- アミノ酸残基との相互作用エネルギーに基づくリガンドのクラスター解析

実際に操作するスライドには右上に星マークを書いています

■ チュートリアルの内容

● 内容①

- BioStationViewerを用いたリガンド-タンパク質のIFIE/PIEDA解析

● 内容②

- VISCANA機能を用いた解析
- アミノ酸残基との相互作用エネルギーに基づくリガンドのクラスター解析

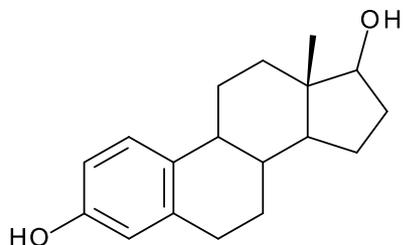
■ ターゲット

エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor : ER) β

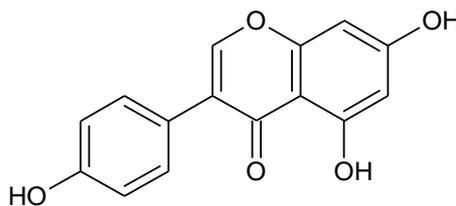
ERのサブタイプのひとつであり、17 β -Estradiol (EST) との親和性は ER α と同等であるが、Genistein (GEN) などの植物エストロゲンとの親和性が高い。

	ER α IC ₅₀ (nM)	ER β IC ₅₀ (nM)
17 β -Estradiol	3.2 \pm 1.0	3.6 \pm 1.6
Genistein	395 \pm 181	10 \pm 4

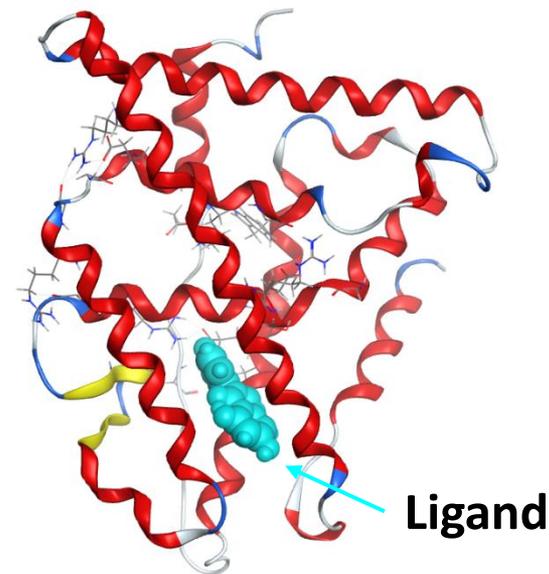
Malamas, M.S., Manas, E.S., McDevitt, R.E., Gunawan, I., Xu, Z.B., Collini, M.D., Miller, C.P., Dinh, T., Henderson, R.A., Keith Jr., J.C., Harris, H.A. J.Med.Chem. 47: 5021-5040 (2004)



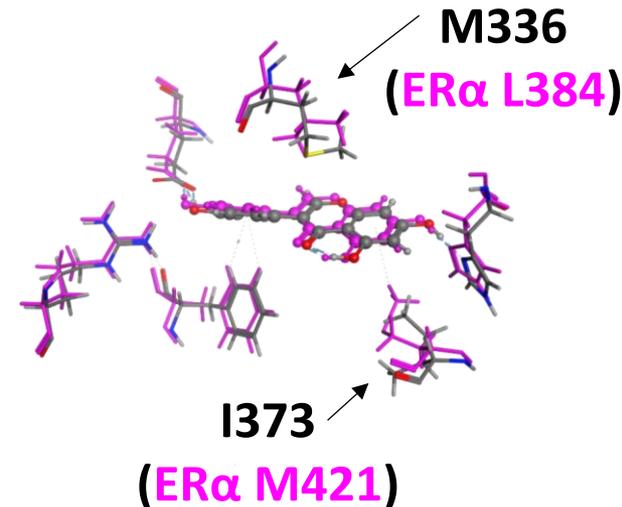
17 β -Estradiol (EST)



Genistein (GEN)

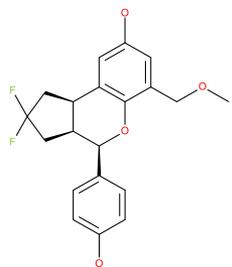


リガンド結合ポケット

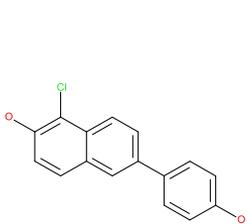


- リガンドのサブタイプ選択性を解析する。
FMODDBに登録されたデータを用いて、受容体ーリガンドの相互作用パターンに基づくクラスター解析を行う。

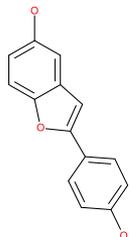
■ ERβの複合体としてPDB (Protein Data Bank) に登録されているリガンドが23個ある。



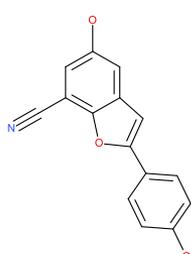
2QTU



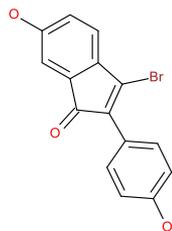
1YY4



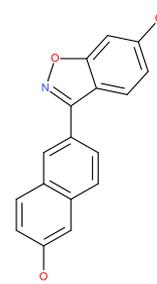
1U9E



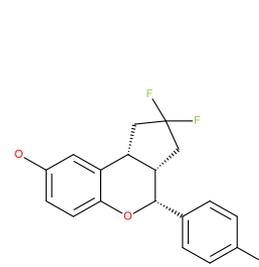
1X76



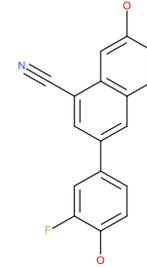
1ZAF



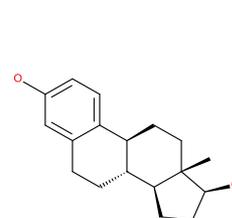
1U3S



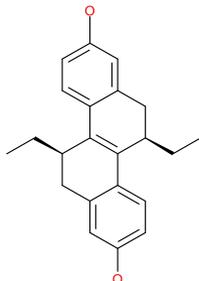
2Z4B



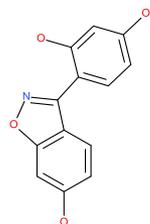
1YYE



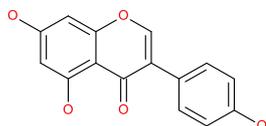
3OLS



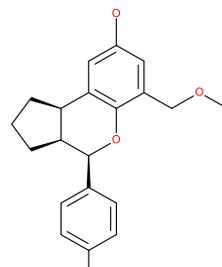
1L2J



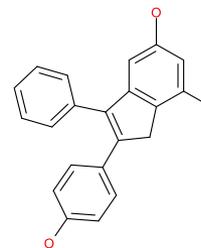
1U3Q



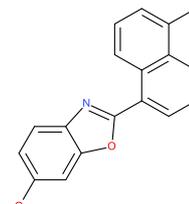
1QKM



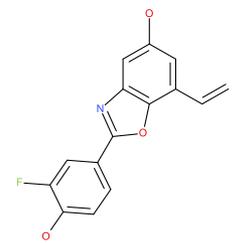
2JJ3



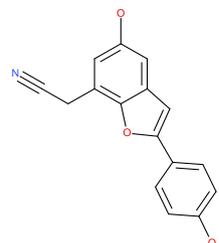
4ZI1



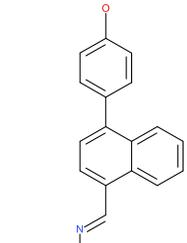
1U3R



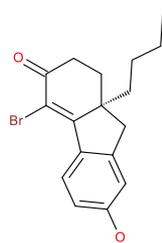
1X7B



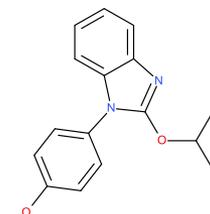
1X78



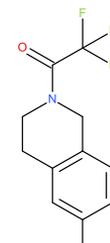
2NV7



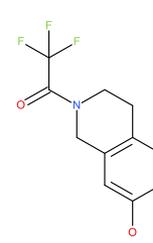
2GIU



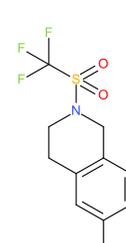
2YJD



3OMO



3OMP



3OMQ

サブタイプへの選択性が異なる多数のリガンドをクラスタリングによって網羅的に解析する。

■ FMOODB/PDBjの構造のダウンロード方法



- I. BioStationViewer の画面右部の [Download File from DB](#) をクリック
- II. ダウンロードしたい構造のFMOODB IDを入力する。
➤ 今回は[3NRZL](#)を入力
- III. [Download](#) をクリック

左ボタンのドラッグで回転、
右ボタンで移動、
ホイールボタンを押しながら拡大・縮小

Download

FMOODB PDBj

② FMOODB ID 3NRZL

File Type CPF Format PDB Format

Range

None

Ignore Fragments

Fragments in Distance from Distance [Å]

Ignore Fragments by dimer value(CPF R23)

Save C:\Users\ruri_\Downloads\3NRZL.cpf File

③ Download

Get Tree

Search from FMOODB

Keyword

PDB ID

Help(H)

File

① Download File From DB

Open

List

Close

Save Viewpoint

Save Profile

Selection

Atom

Residue

Fragment

Tool

Set Center

Target View(Residue)

Target View(Fragment)

Reset View

CHPI

Monitor

VISCANA

IFIE

PIEDA(1:1)

PIEDA(N:1)

PIEDA List

Preference

Background

Font +

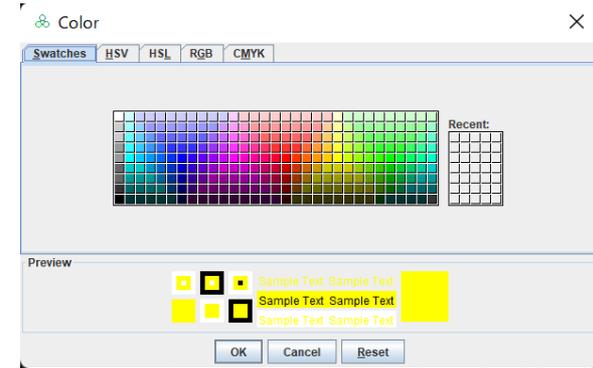
Font -



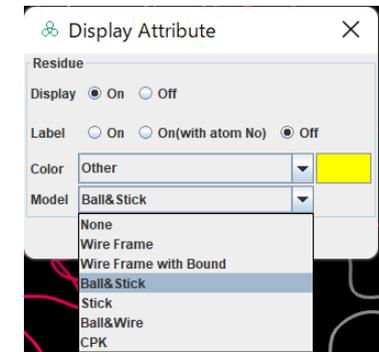
■ BioStationViewerを用いた解析①

- I. 左側(A鎖)を展開して下から二番目の3AS1(リガンド)を選択する。
- II. 選択され黄色に変わったリガンドを右クリックする。
- III. Display Attributeが表示されるので、Colorの右の色が付いている部分をクリックし、リガンドの色を変更する。
- IV. Modelの右の三角の部分を選択し、リガンドの構造の表示形式をBall & Stickに変更
- V. リガンドが選択されたまま、右側のTarget View (Fragment)を選択→リガンド周辺の構造が表示される。

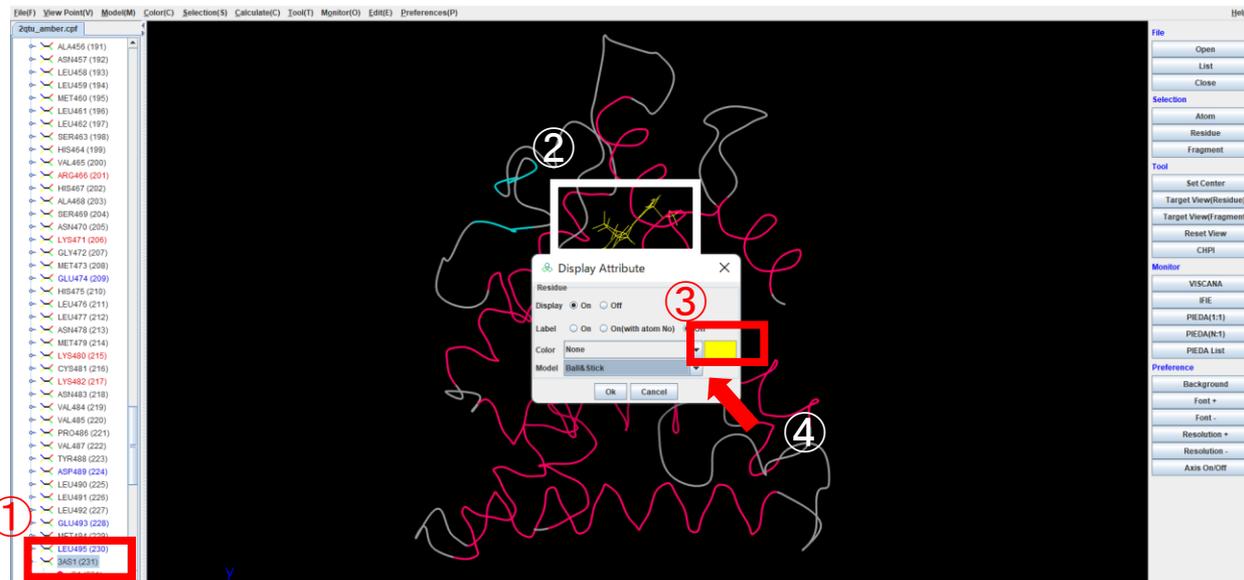
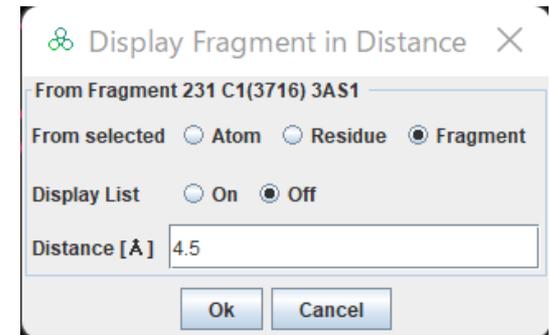
③



④



⑤



■ BioStationViewerを用いた解析②



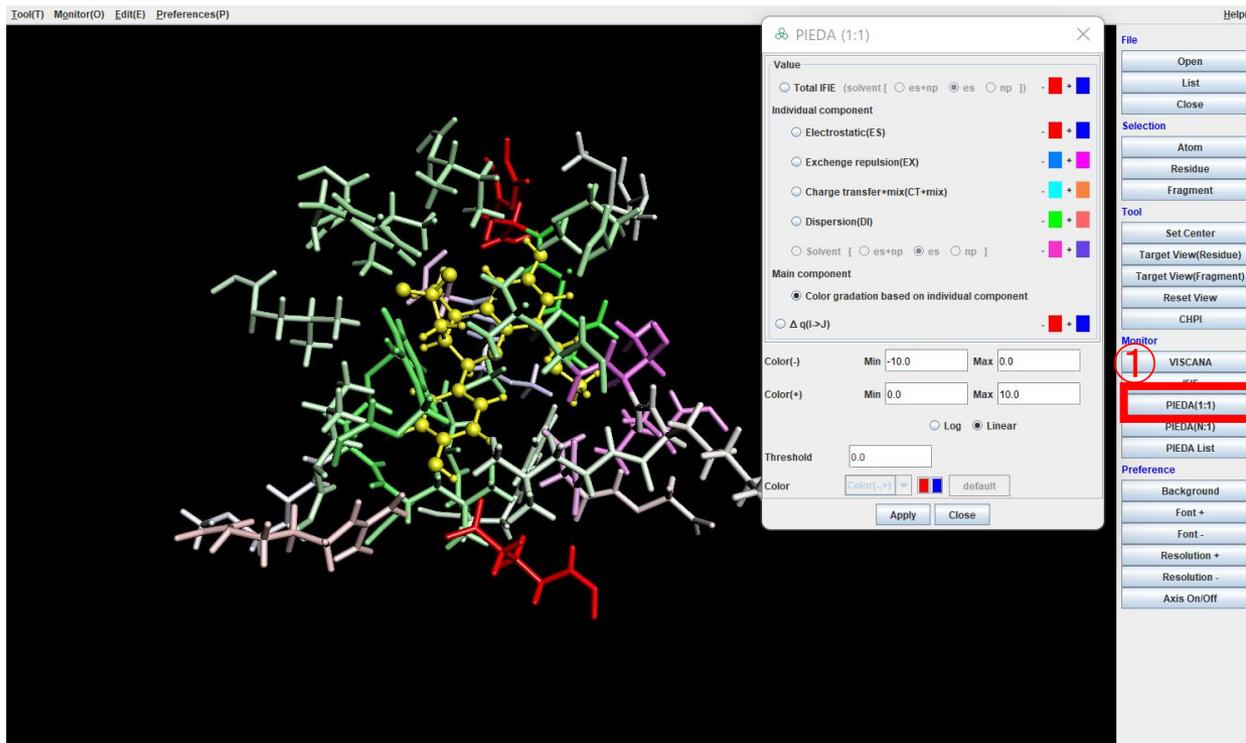
VI. 右部の**PIEDA(1:1)**を選択する。(リガンドを選択したまま)

VII. Color gradation based on individual componentを選択する。

VIII. Color(-) Min **-10.0**、Color(+) Max **10.0**

➔ リガンド周囲の残基との相互作用がメインのPIEDA成分毎に可視化される。

左ボタンのドラッグで回転、
右ボタンで移動、
ホイールボタンを押しながら
拡大・縮小

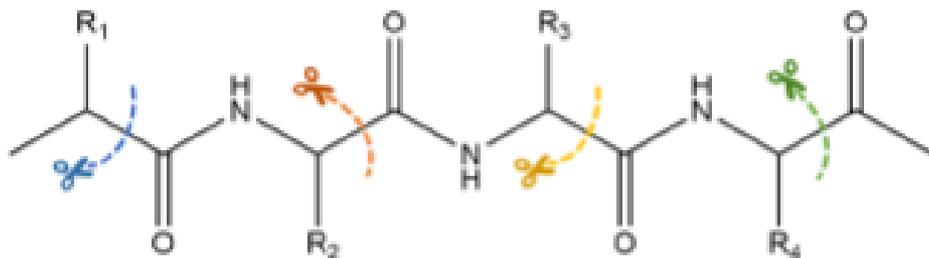


■ PIEDA (Pair Interaction Energy Decomposition Analysis)

フラグメント間相互作用エネルギーIFIE($\Delta\tilde{E}_{IJ}$)を以下のエネルギーに分解して解析する手法。

$$\Delta\tilde{E}_{IJ} = \Delta\tilde{E}_{IJ}^{ES} + \Delta\tilde{E}_{IJ}^{EX} + \Delta\tilde{E}_{IJ}^{CT+mix} + \Delta\tilde{E}_{IJ}^{DI}$$

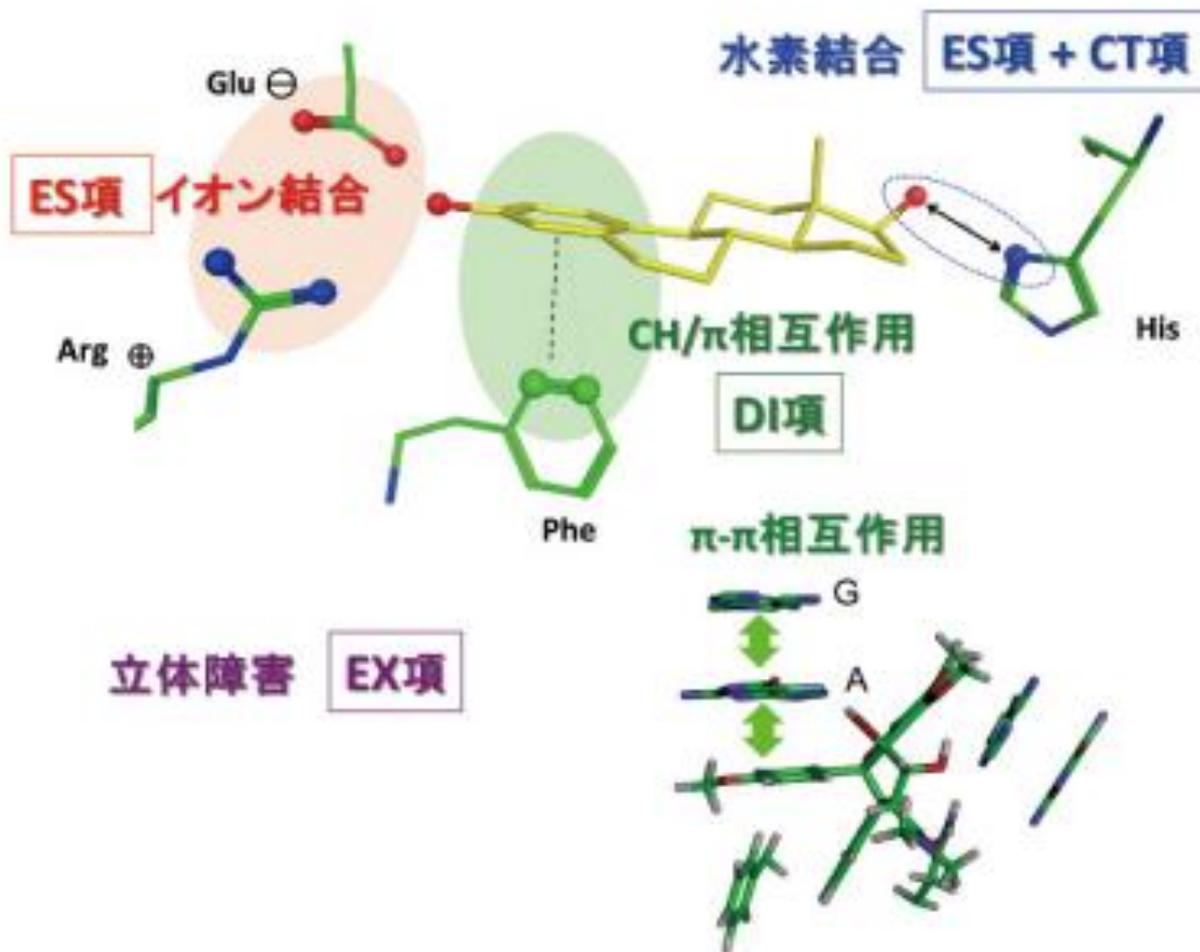
- 静電相互作用エネルギー($\Delta\tilde{E}_{IJ}^{ES}$)
- 交換反発相互作用エネルギー($\Delta\tilde{E}_{IJ}^{EX}$)
- 電荷移動相互作用エネルギー($\Delta\tilde{E}_{IJ}^{CT+mix}$)
- 分散相互作用エネルギー($\Delta\tilde{E}_{IJ}^{DI}$)



フラグメント分割例

PIEDAにより相互作用の化学的性質を特定し定量化することが可能となる。

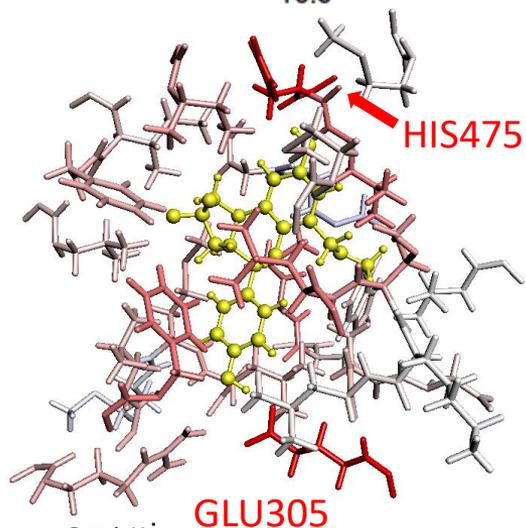
PIEDAによる、フラグメント間相互作用の解釈



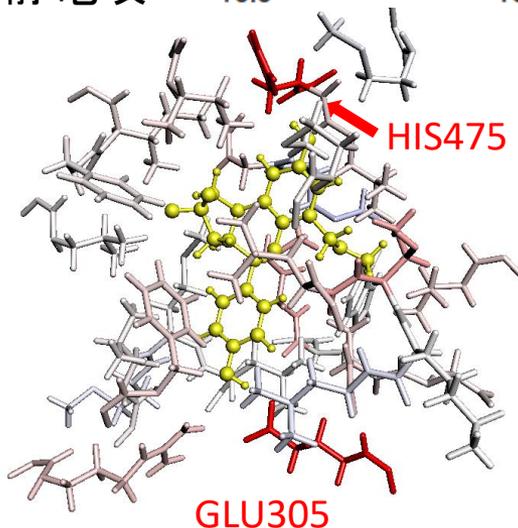
■ BioStationViewerを用いた解析③



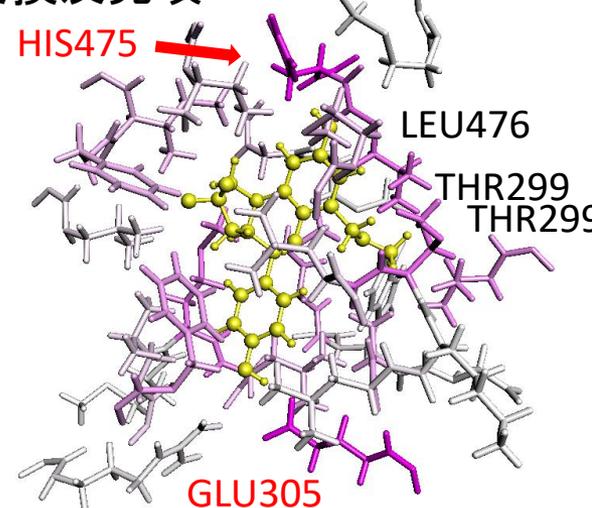
Total IFIE
-10.0 +10.0



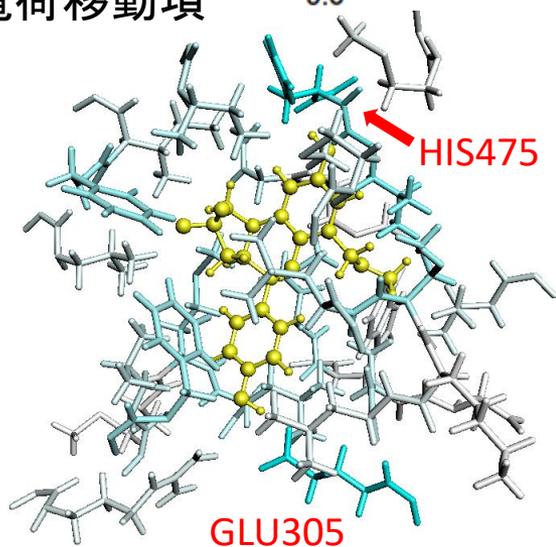
ES
静電項 -10.0 +10.0



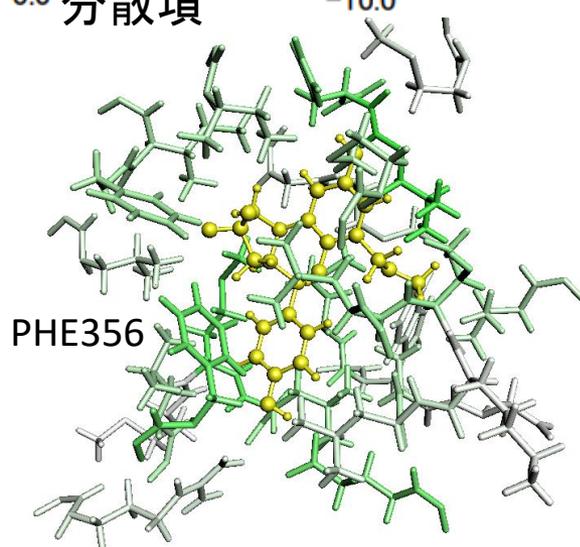
EX
交換反発項 0.0 +10.0



CT+mix
電荷移動項 -5.0



DI
分散項 0.0 -10.0 0.0



ES成分とCT成分 ➡ 水素結合をしている可能性が高い。

DI成分 ➡ CH/πやπ/π相互作用等の電子同士の運動に起因する相互作用をしている可能性が高い。

■ FMO DBを用いたPIEDA解析

左ボタンのドラッグで回転、
右ボタンで移動、ホイールボタンを押し
ながら拡大・縮小

①

Base fragment(s) of PIEDA/FIE

Single fragment Multi fragments

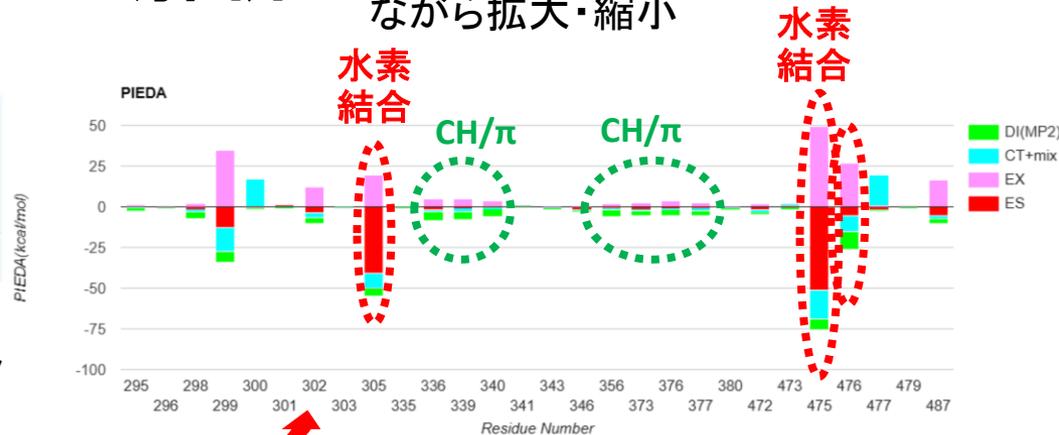
231(A:1:3AS)Lignad

Fragment list

Charge [e] FCHARGE : 0 / q_Mulliken : -0.122 / q_NPA : -0.090

Distance from base fragment(s) [Å]

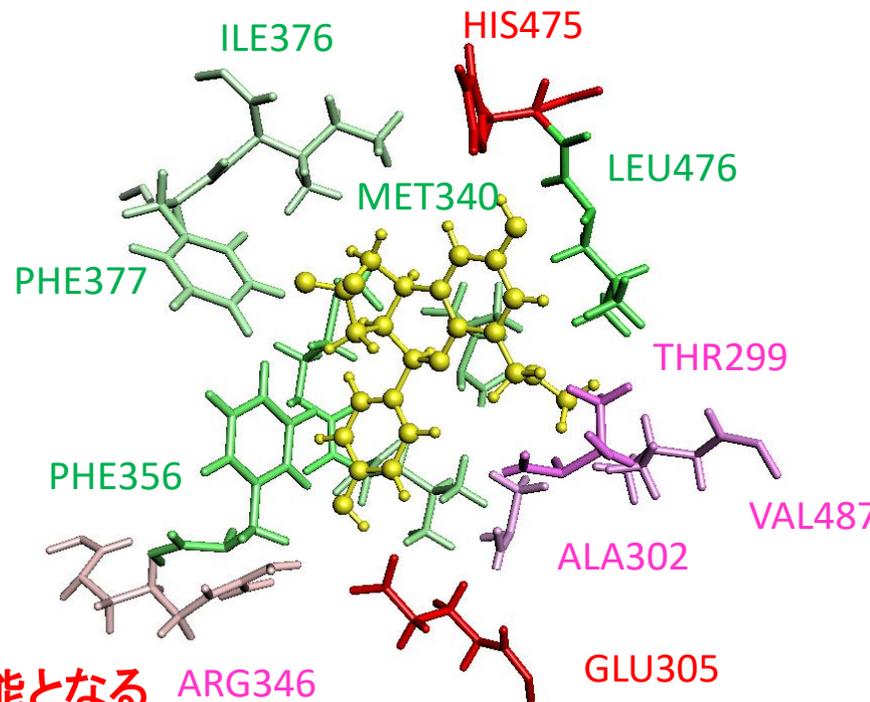
② Dist 4.5



- I. Single fragmentにてリガンドを選択
- II. Distを4.5にする

<https://drugdesign.riken.jp/FMO DB/>

- GLU305、**HIS475**はES, CT^{+mix}のエネルギーが大きく、水素結合を形成していると考えられる。
- MET340、PHE356は全体のエネルギーは小さいものの、DIのエネルギー、構造を確認するとCH/π相互作用をしていると考えられる。
- LEU476はDIが大きく出ているもののES, CT^{+mix}が小さいながらも確認でき、水素結合をしている可能性がある。



▶ PIEDA成分値と構造にて相互作用の予測が可能となる

■ チュートリアルの内容

● 内容①

- BioStationViewerを用いたリガンド-タンパク質のIFIE/PIEDA解析

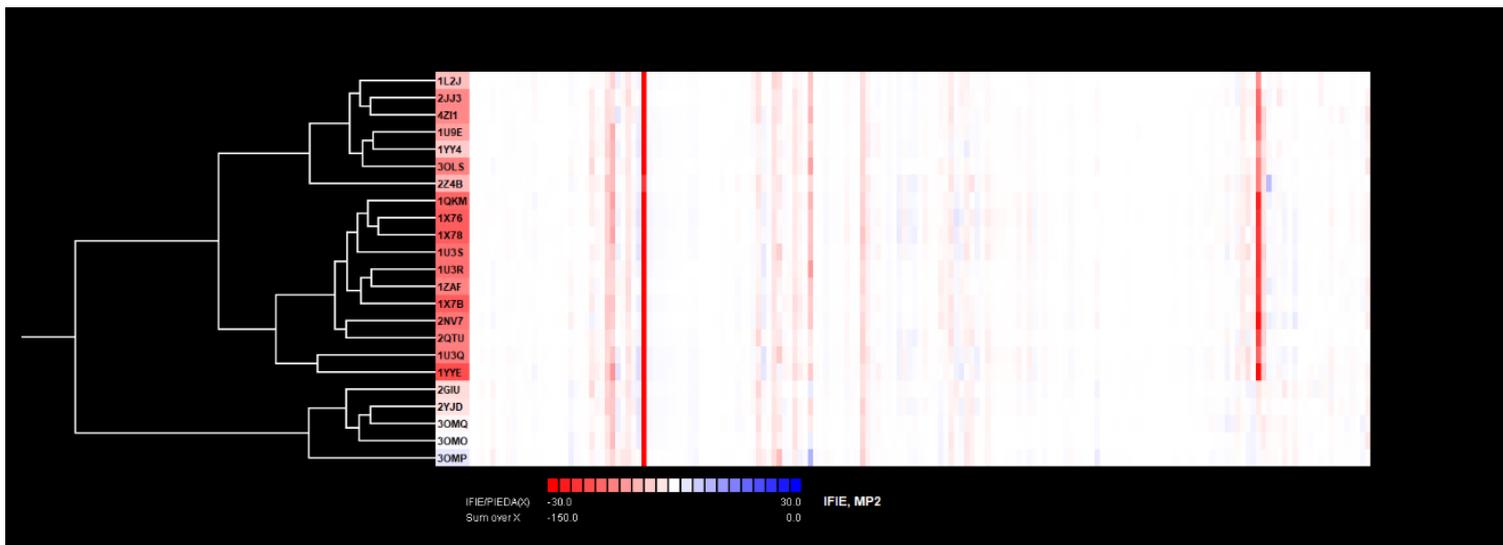
● 内容②

- VISCANA機能を用いた解析
- アミノ酸残基との相互作用エネルギーに基づくリガンドのクラスター解析

■ VISCANA

(Visualized Cluster Analysis of Protein-Ligand-Interaction)

- 相互作用エネルギー (IFIE) に基づいたクラスター解析により、受容体結合におけるリガンドの類似性を抽出する手法である。
- リガンド-アミノ酸残基間相互作用の類似性を距離として定義し、階層的クラスター解析を行うことができる。

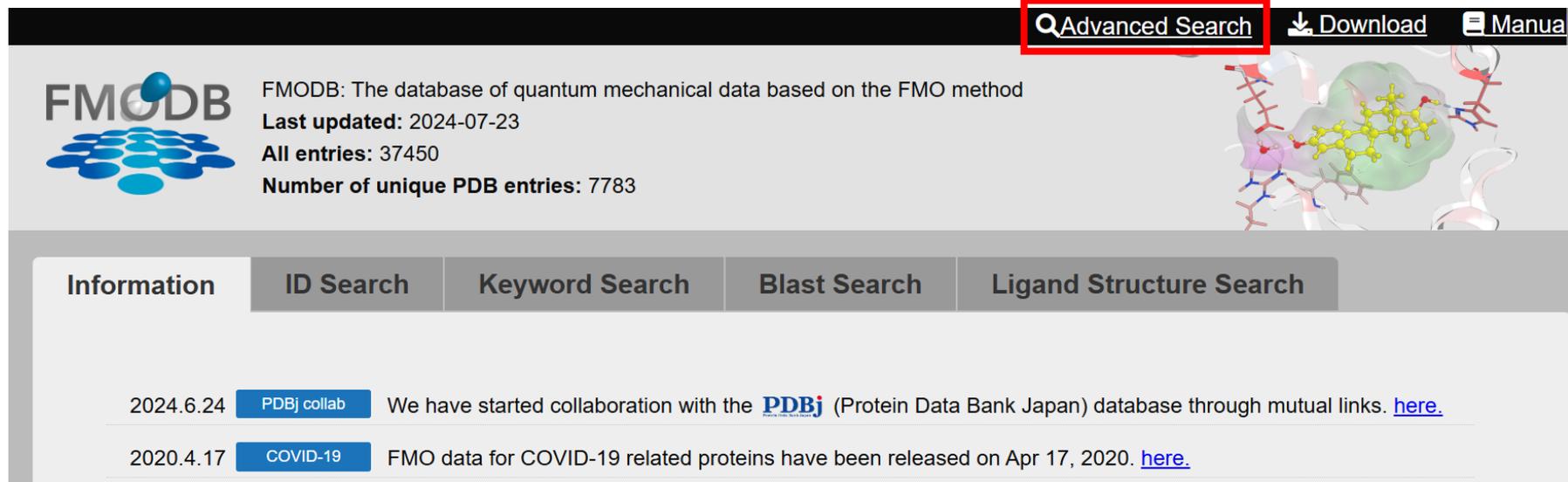


今回のチュートリアルではERβ複合体をターゲットとし、BioStationViewerのVISCANAを用いて解析することで、リガンドを受容体との相互作用パターンによって分類する。

■ FMODBからのデータの取得方法

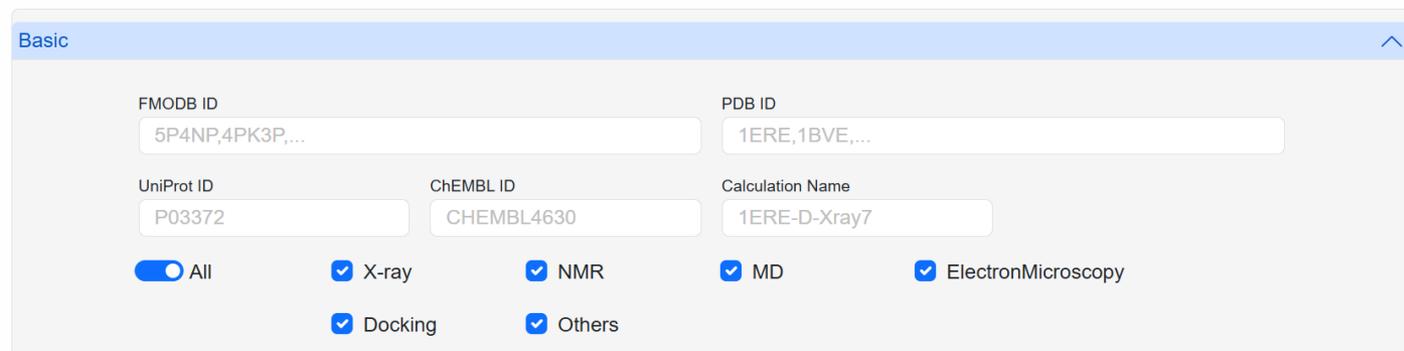
当日は事前に用意しているデータを使用する。

- I. 計算結果のファイルをまとめておくための新しいディレクトリを作成する。
- II. FMODBを開き、右上の [Advanced Search](#) を選択する。



Advanced Search

Advanced Searchの
ウィンドウが開く。



<https://drugdesign.riken.jp/FMODB/>

■ FMOODBからのデータの取得方法②

III. BasicのUniProt IDの部分にERbのUniProt IDである [Q92731](#)を入力する。

Basic

FMOODB ID: 5P4NP,4PK3P,...

PDB ID: 1ERE,1BVE,...

UniProt ID: Q92731 ✓

ChEMBL ID: CHEMBL4630

Calculation Name: 1ERE-D-Xray7

OK

All X-ray NMR MD ElectronMicroscopy

Docking Others

Preferred Name: Estrogen receptor alpha

Target Type: Choose...

Chain ID: A

With Ligand

Ligand Name: estradiol

Ligand Code: NHI

IV. Modeling methodのWater (計算に含まれる水分子)の [Water\(s\) essential for molecular recognition.](#) (分子標識に重要な水分子)を選択する。

Modeling method

Optimization: Choose...

Restraint: Choose...

Water

Water(s) essential for molecular recognition.

■ FMODBからのデータの取得方法③

V. FMO calculationのSoftwareのMIZUHO/ABINIT-MP 4.0(SMP)を選択する。

FMO calculation

FMO method: FMO2-MP2 / Choose...
Fragmentation: Choose...

① Software: MIZUHO/ABINIT-MP 4.0(SMP)

➡ 23個のERbのFMO計算結果がHitする。

Criteria for

Base Structure: X-ray NMR MD ElectronMicroscopy Docking Others

Summary for all items(csv file) Summary for checked items(csv files) CheckPoint File(checked items up to 10 data)

② Calculation Data(zip files; checked items up to 10 data)

③ Download

Search Result: 23 Hits

Currently showing: 1 - 23

Page: 1 / 1

Displaying results: 10 50 100

Sort Display only checked items

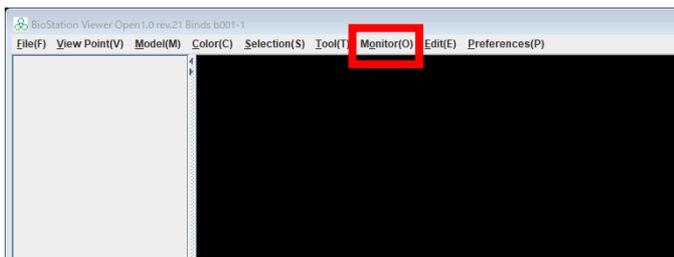
check / uncheck all items on this page

VI. CheckPoint File(checked items up to 10 data)をチェックし、Downloadを選択する。
(1度に10個の結果までしかダウンロード出来ない。)

■ VISCANAの操作手順①



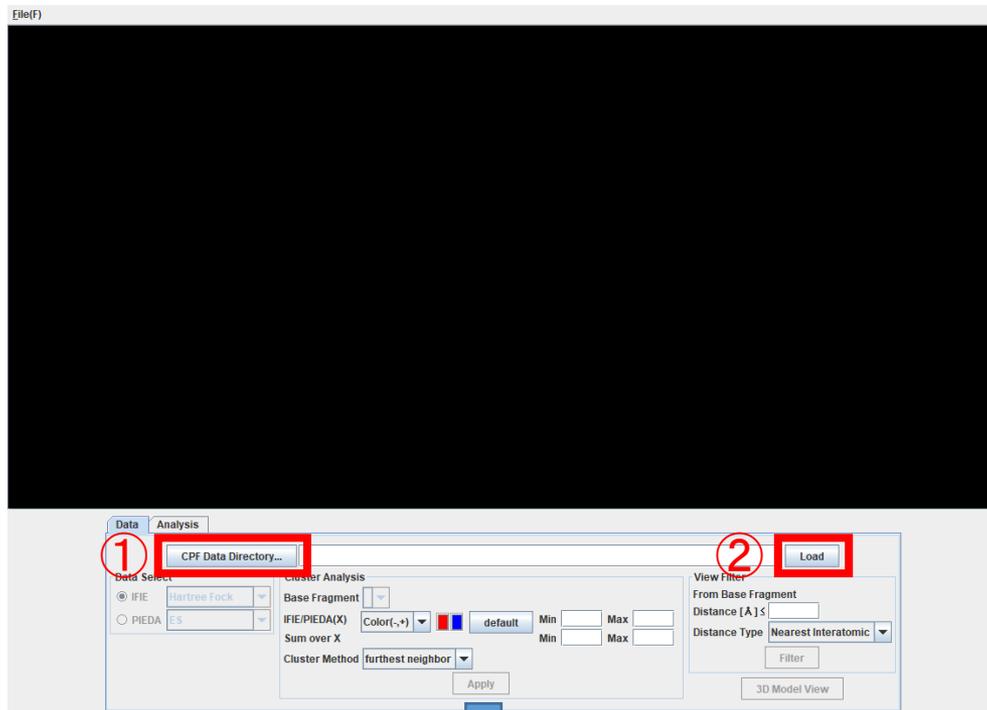
I. Monitor → VISCANA を選択する。



VISCANAのウィンドウが開く。

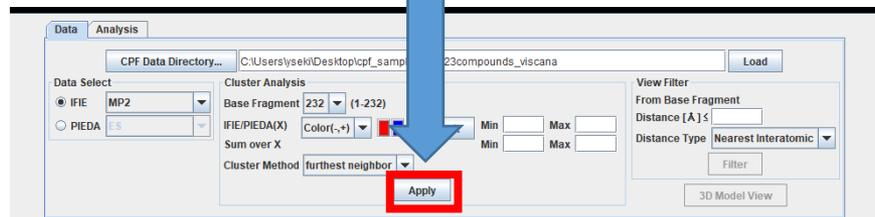
Loadされるまで
少し時間がかかります。

II. CPF Data Directory... で cpfファイルをまとめた
ディレクトリを指定する。→ Load を選択する。



正常に Load されれば
Cluster Analysis の Apply が表示される。

ここではまだApply
を選択しない





■ VISCANAの操作手順②

III. Data Select でクラスタリングに用いる相互作用エネルギーを指定する。
今回は [IFIE-MP2](#) を指定する。

IV. Cluster Analysis で以下の指定をする。

✓ Base Fragment をリガンドのフラグメント番号 ([231](#)) にする。

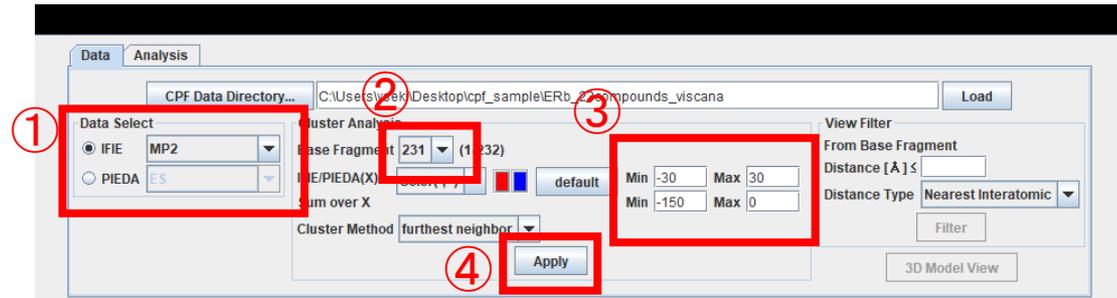
✓ Data Select で設定したエネルギーの

○ 範囲 ([-30,30](#))

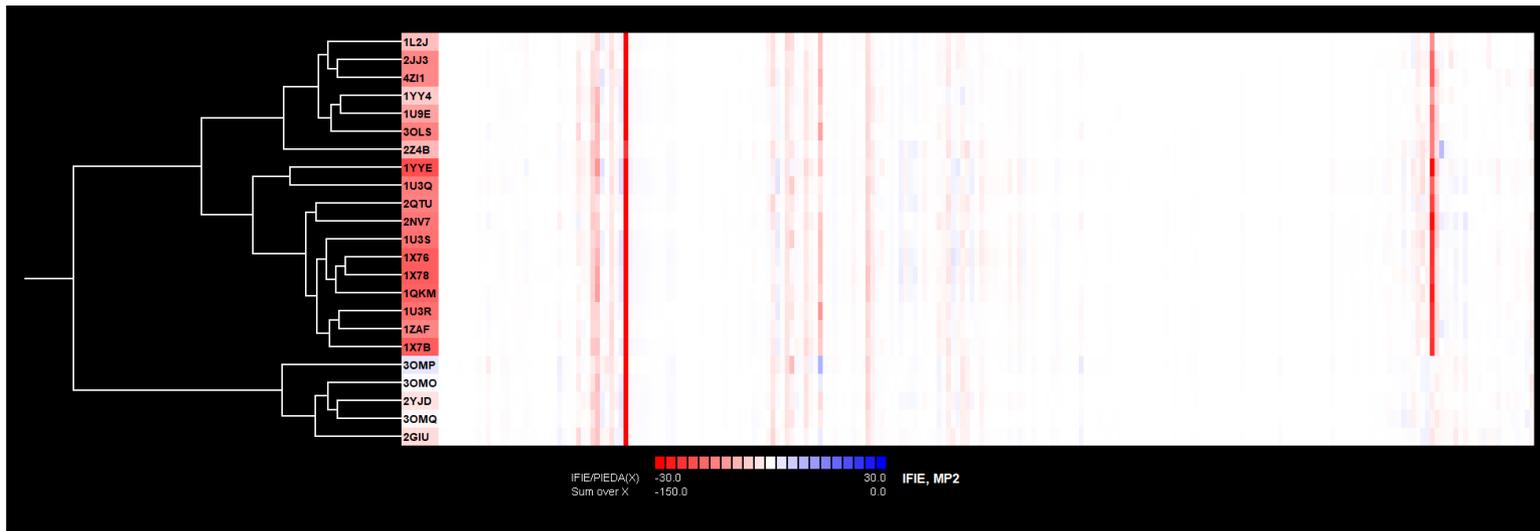
○ 合計の範囲

([-150,0](#))

を指定する。



→ Apply

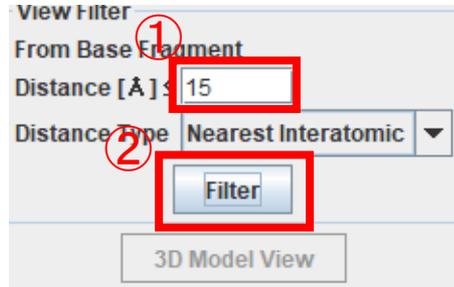




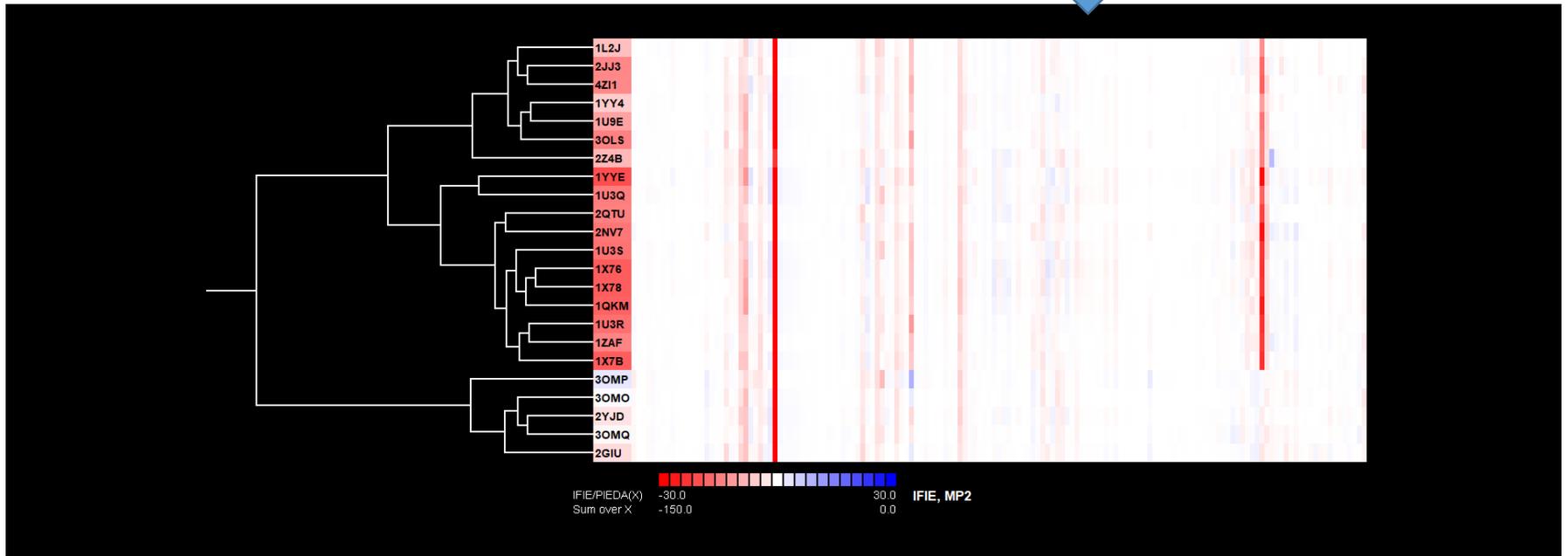
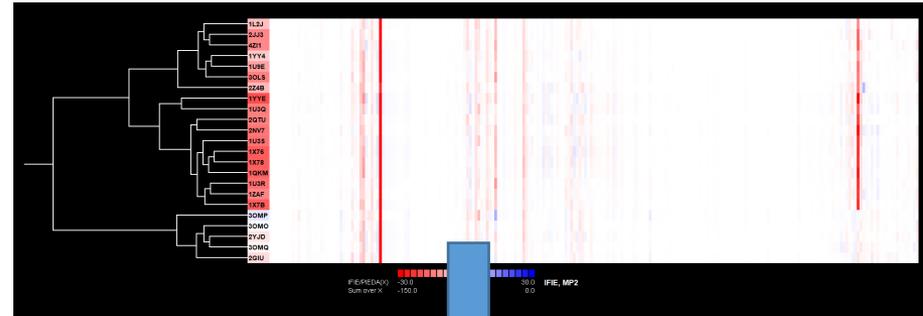
■ 図の整理

Viewer Filter で Base Fragment からの距離を **15 Å** と指定する

→ **Filter**



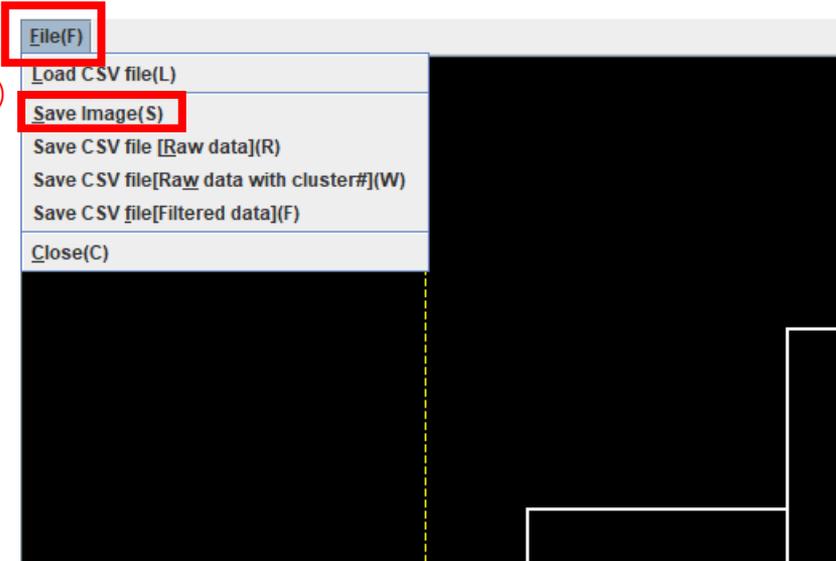
指定した距離内のフラグメントとの相互作用バンドのみを表示することができる。





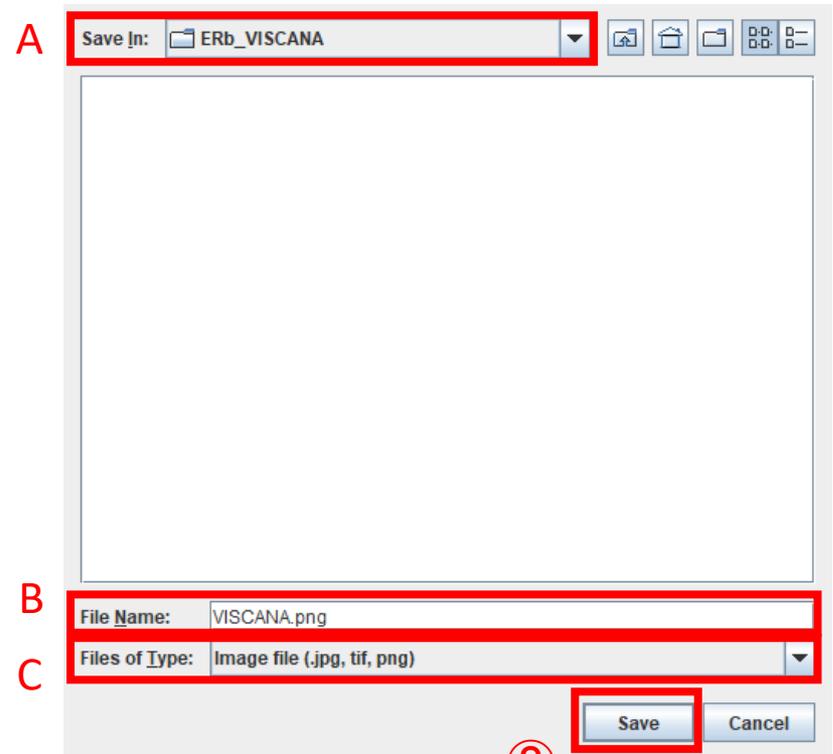
■ 結果の図の保存

① 左上部のFileから Save Image を選ぶ。



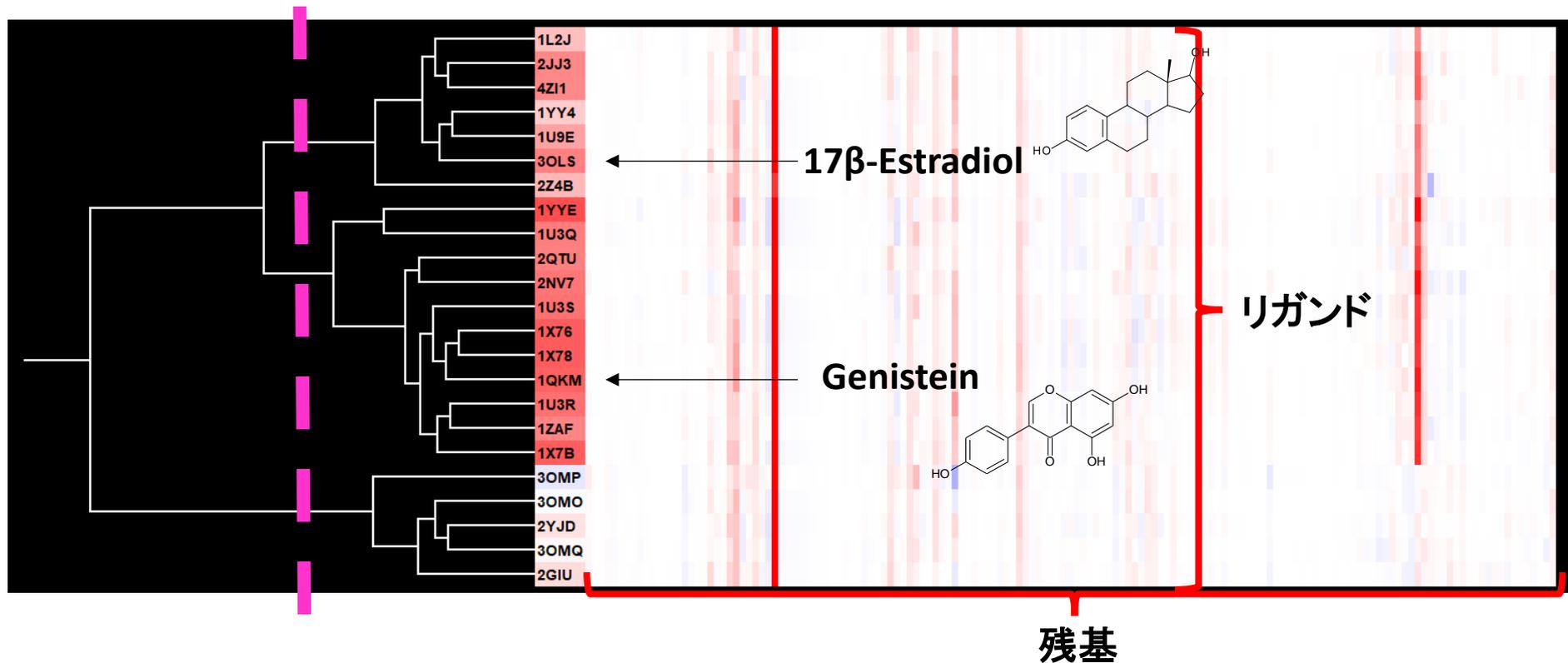
A) Save In: 保存先ディレクトリ
B) File Name: ファイル名.png
C) File of Type: Image file (.jpg, .tif, .png)
を指定

→ Save②



VISCANAの図が保存される。

■ VISCANAの見方



選択性のない17β-Estradiolと選択性のあるGenisteinは別のクラスターに含まれる。

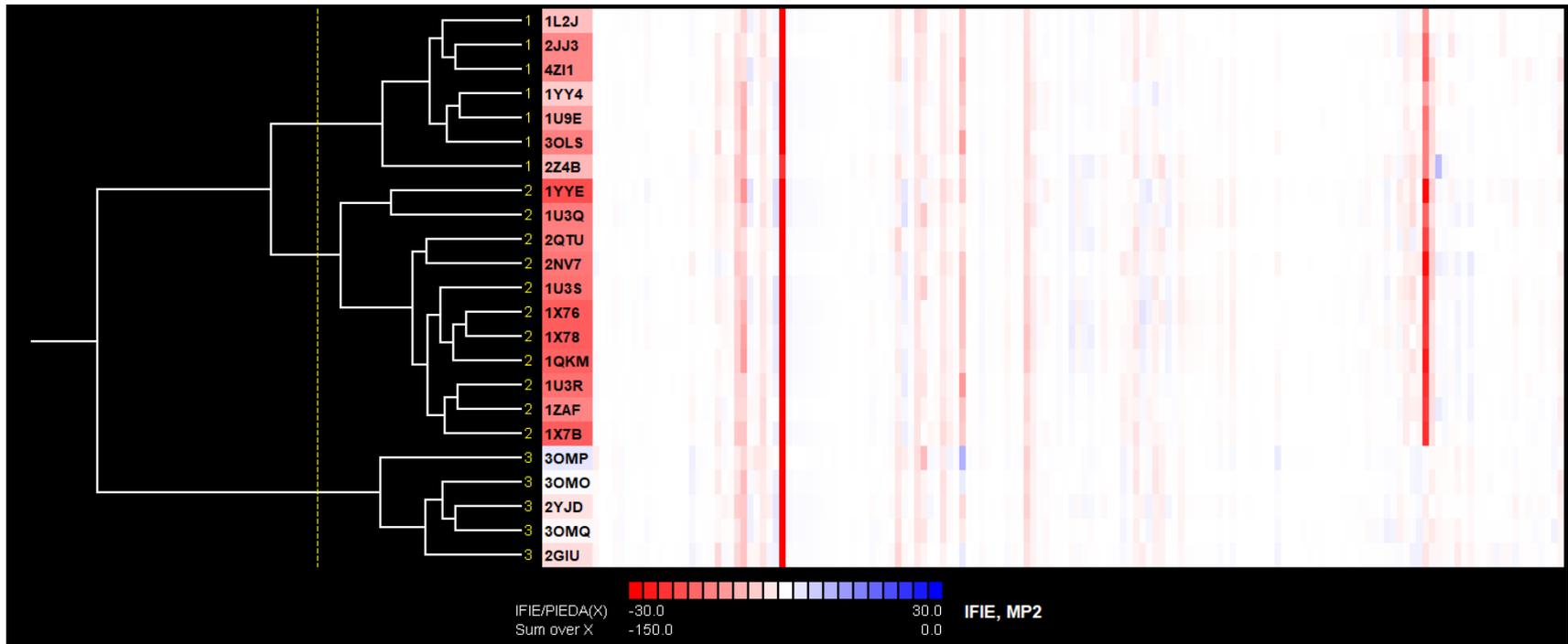
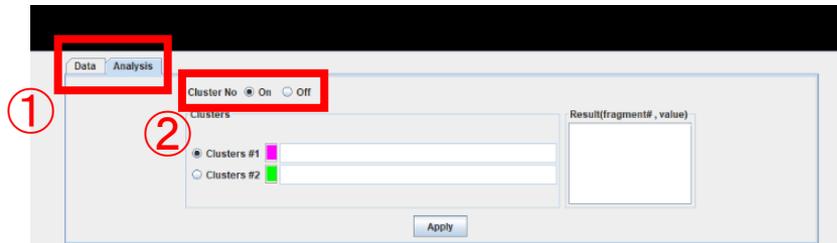
ERのサブタイプのひとつであり、17β-Estradiol (EST) との親和性は ERαと同等であるが、Genistein (GEN) などの植物エストロゲンとの親和性が高い。

	ERα IC ₅₀ (nM)	ERβ IC ₅₀ (nM)
17β-Estradiol	3.2 ± 1.0	3.6 ± 1.6
Genistein	395 ± 181	10 ± 4



■ クラスタリングの結果の詳細な解析①

I. Data を Analysis に変え、Cluster No の On にチェックをつける → [Apply](#)



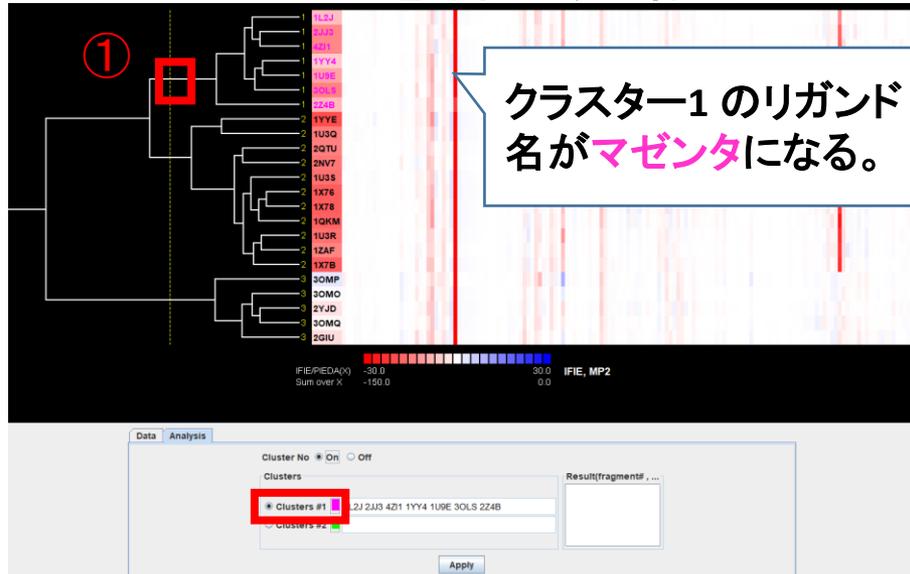
黄色の破線はカーソルを動かすと連動する。

破線の位置でクラスター分割したときに割り当てられるクラスター番号がリガンド名の左に表記される。



■ クラスタリングの結果の詳細な解析②

- II. Cluster #1 にチェックが付いていることを確認し、破線とクラスターの分岐の①をクリックする。



- III. 同様にCluster #2 にチェックをつけ、破線とクラスターの分岐の④をクリックする。

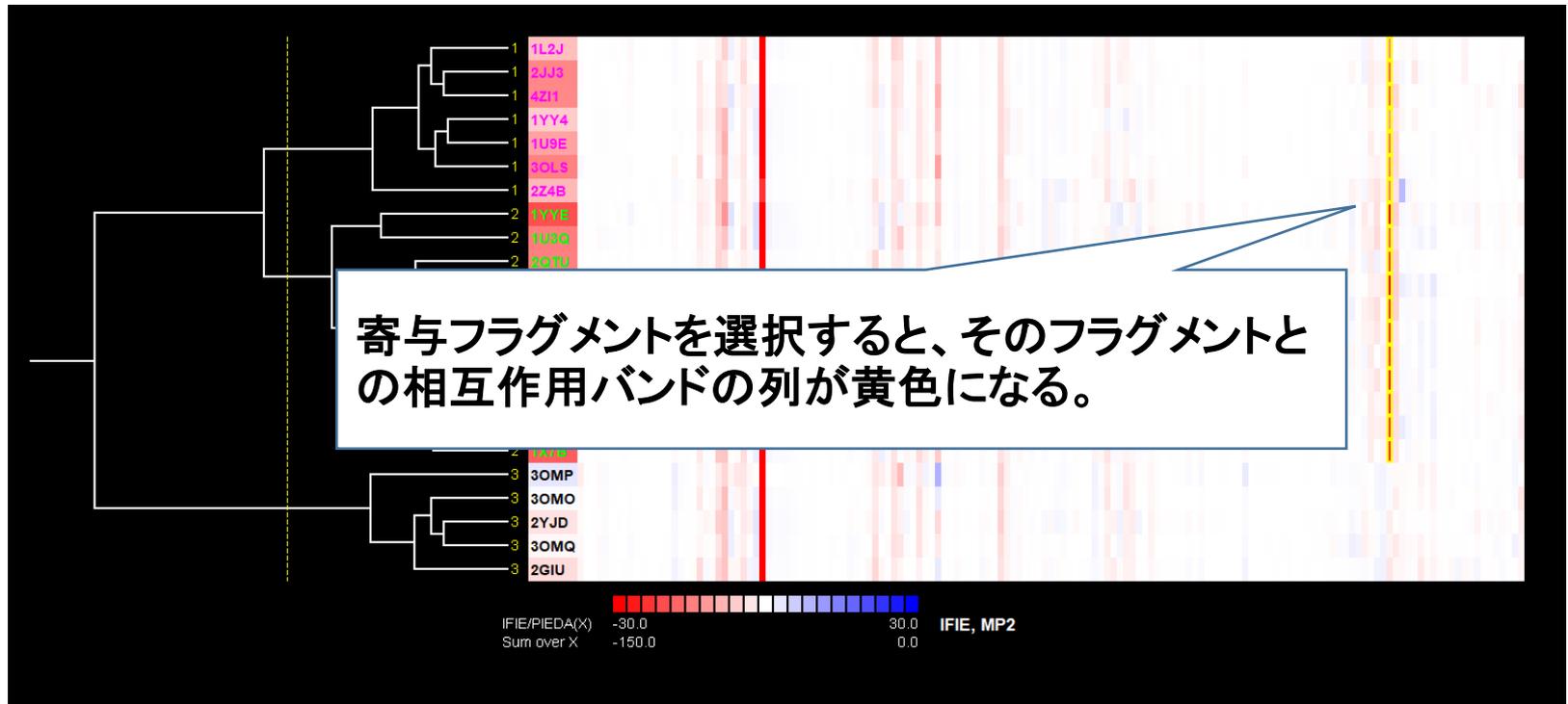


→ Apply (次頁)



■ クラスタリングの結果の詳細な解析③

Result(fragment#, value) の欄に、クラスタリングに寄与したフラグメント番号 (#) と寄与の度合いを示す値 (value) が表れる。



Data Analysis

Cluster No On Off

Clusters

Clusters #1 1L2J 2JJ3 4ZI1 1YY4 1U9E 3OLS 2Z4B

Clusters #2 1TU 2NV7 1U3S 1X76 1X78 1QKM 1U3R 1ZAF 1X7B

① Result(fragment#, ...)

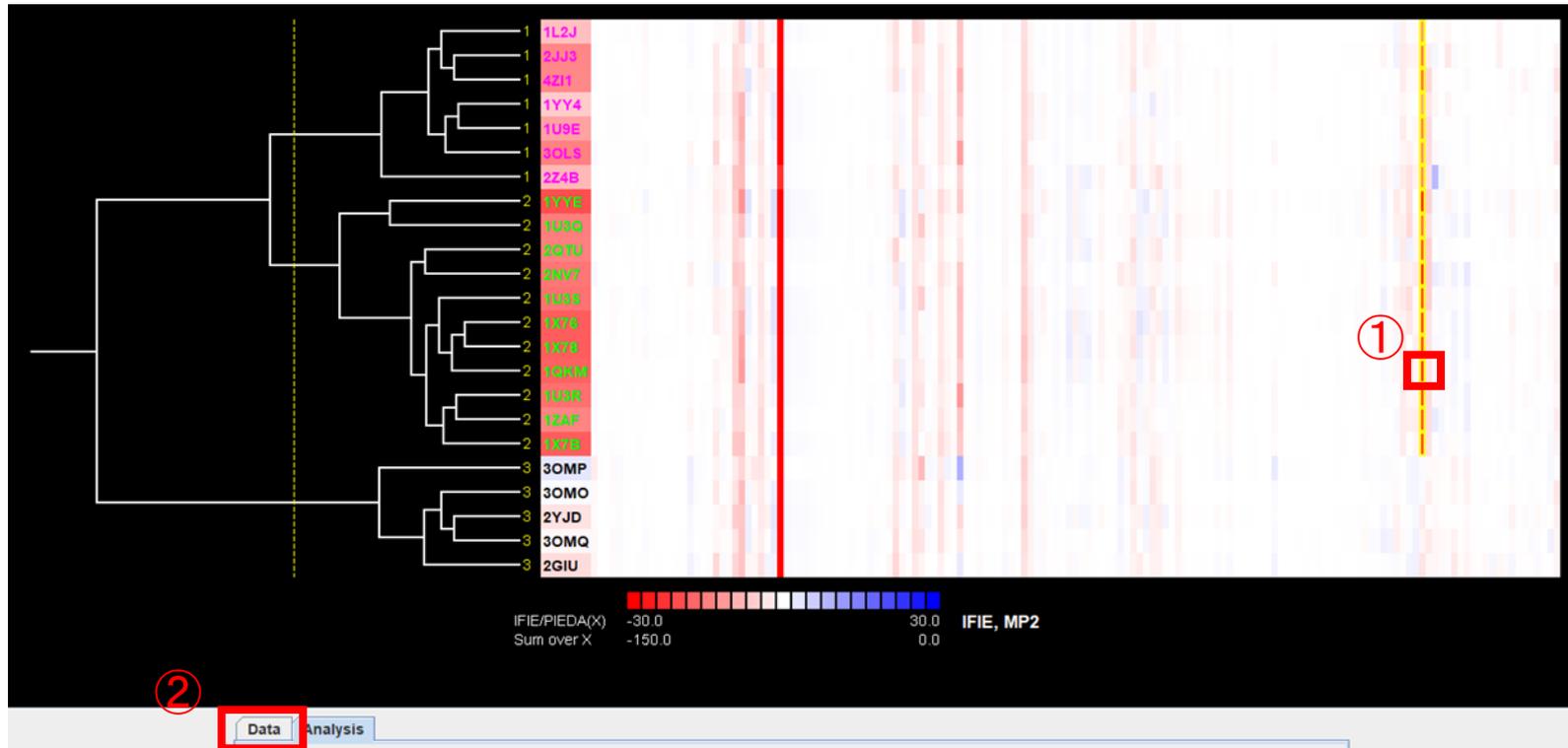
210	9.061755E00
40	6.497555E00
72	1.436116E00
211	1.103529E00

Apply

■ クラスタリング結果をもとに相互作用を確認



- I. リガンドと fragment: 210 との相互作用バンドを指定し、再度AnalysisをDataに変える。→今回は選択性のある Genistein が結合している1QKMを選択



II. 3D Model View を選択する。

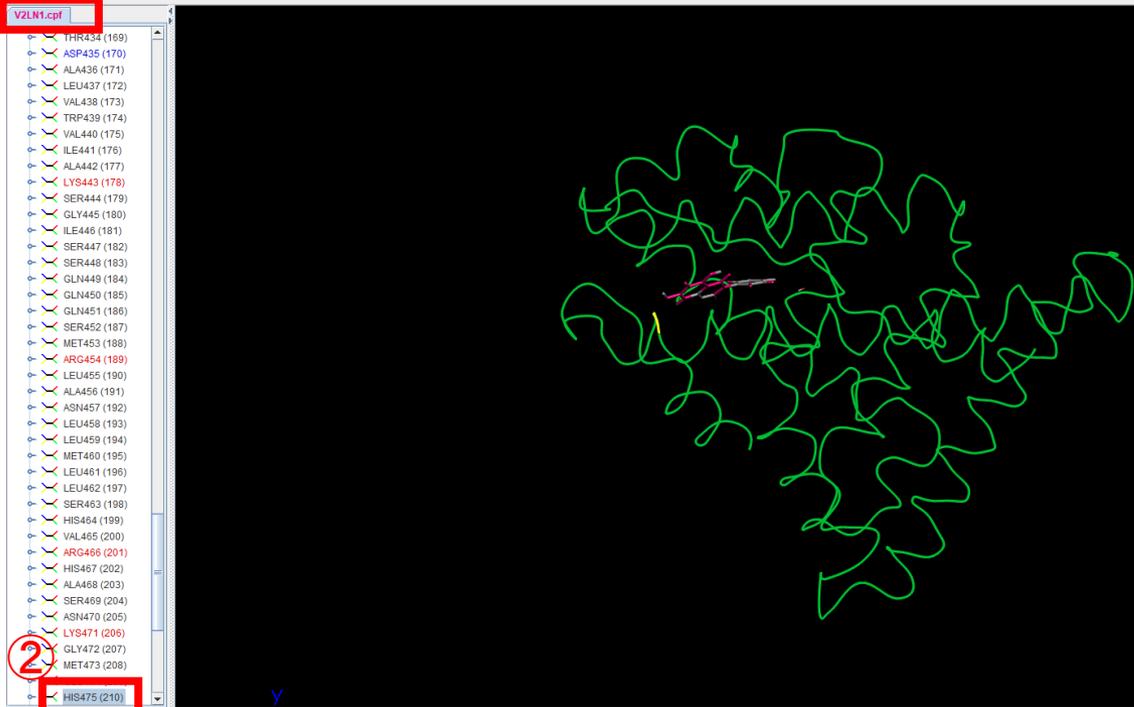


Viewer に複合体構造が読み込まれる。

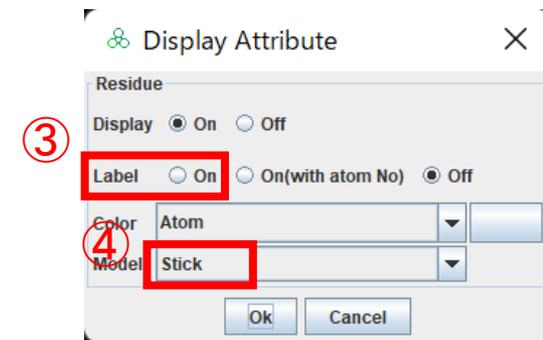


■ クラスタリングの結果の詳細な解析

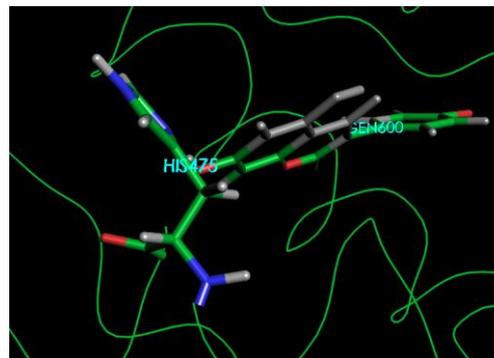
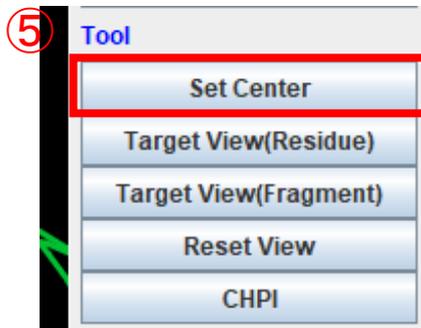
① III. V2LN1のHIS475が選択されていることを確認する。



IV. LabelのOnをクリックする。
V. ModelをStickに変更する。
→OK



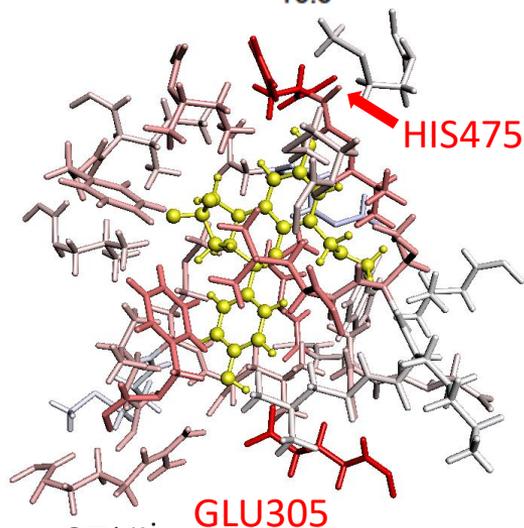
VI. 右部のSet Centerを選択すると、HIS475が中央に表示される。



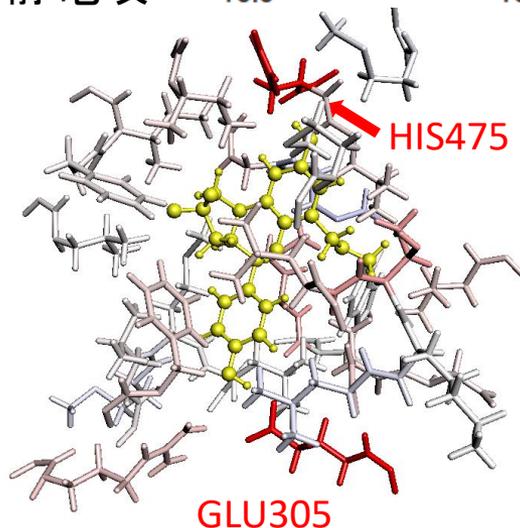
左ボタンのドラッグで回転、
右ボタンで移動、
ホイールボタンを押しながら
拡大・縮小

■ BioStationViewerを用いた解析③

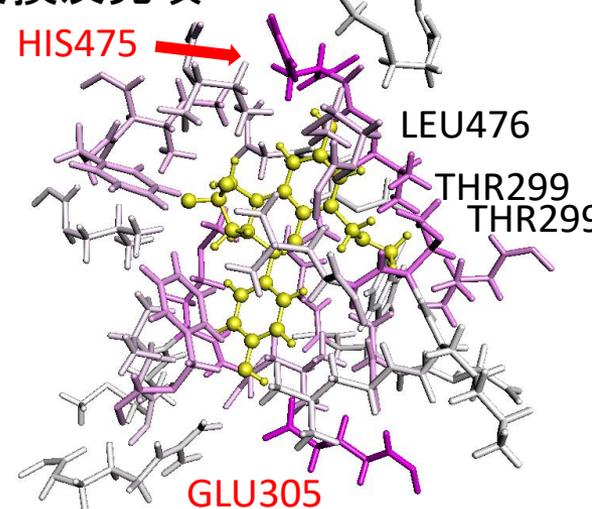
Total IFIE
-10.0 +10.0



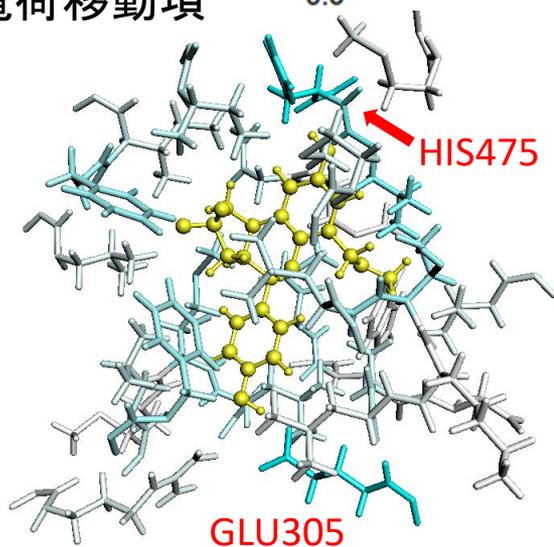
ES
静電項
-10.0 +10.0



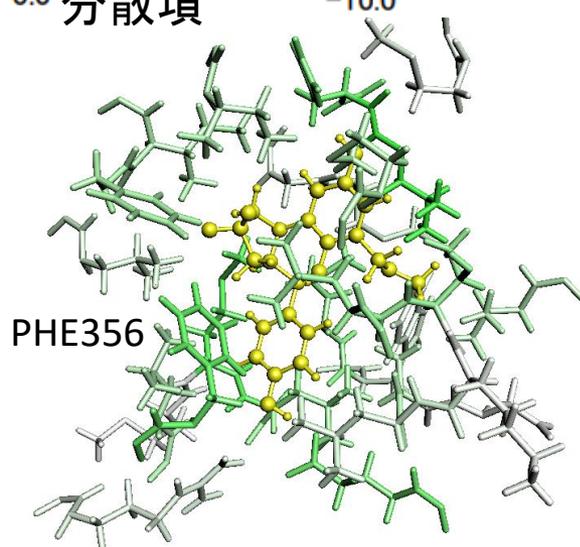
EX
交換反発項
0.0 +10.0



CT+mix
電荷移動項
-5.0



DI
分散項
0.0 -10.0



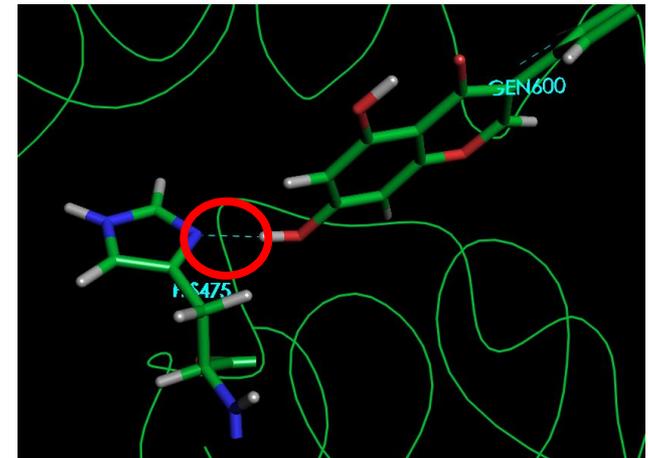
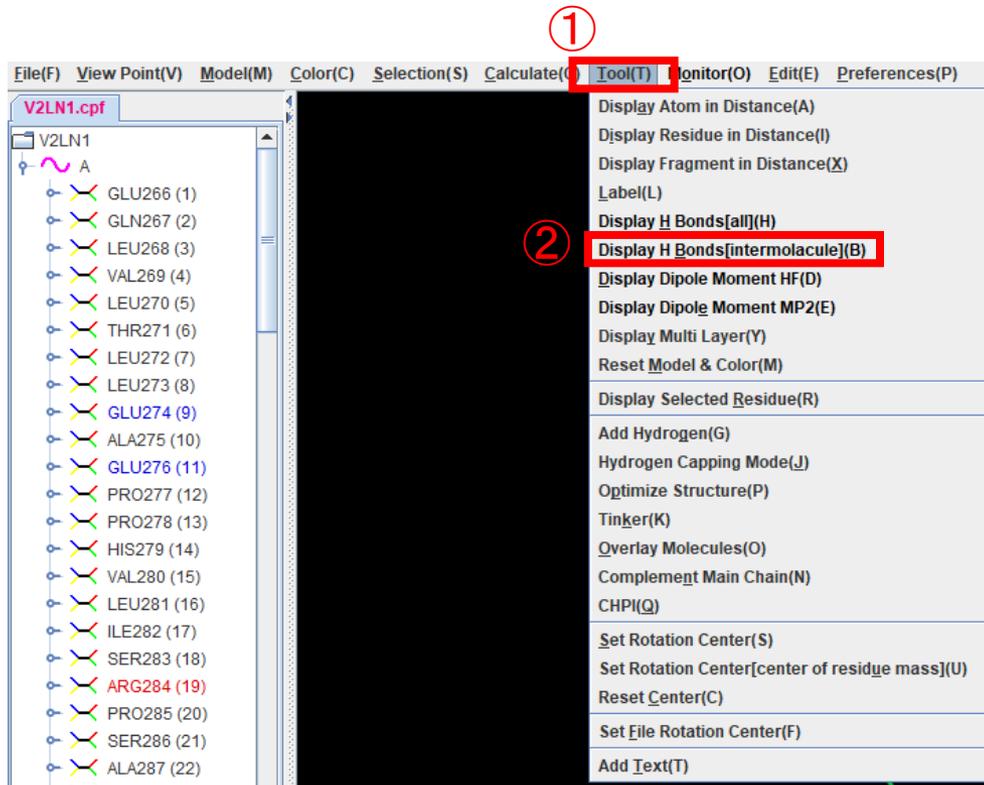
ES成分とCT成分 ➡ 水素結合をしている可能性が高い。

DI成分 ➡ CH/πやπ/π相互作用等の電子同士の運動に起因する相互作用をしている可能性が高い。



■ HIS475とリガンドの水素結合解析

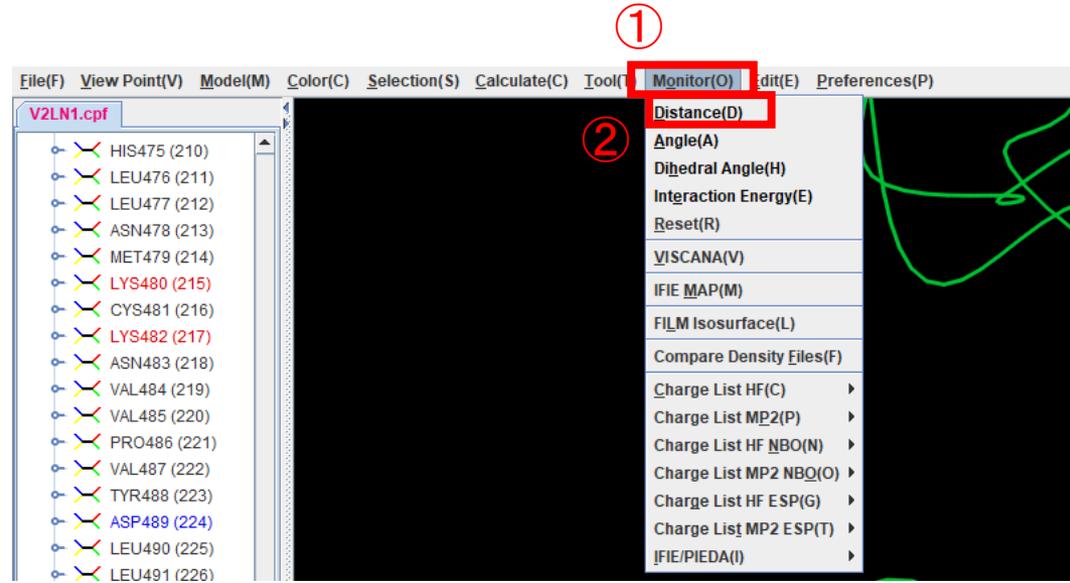
- I. リガンド([GEN600](#))を選択する。
- II. 画面上部の[Tool](#)を選択する。
- III. [Display H Bonds \[intermolecule\]](#)を選択する。
→水素結合が水色の破線として表示される。



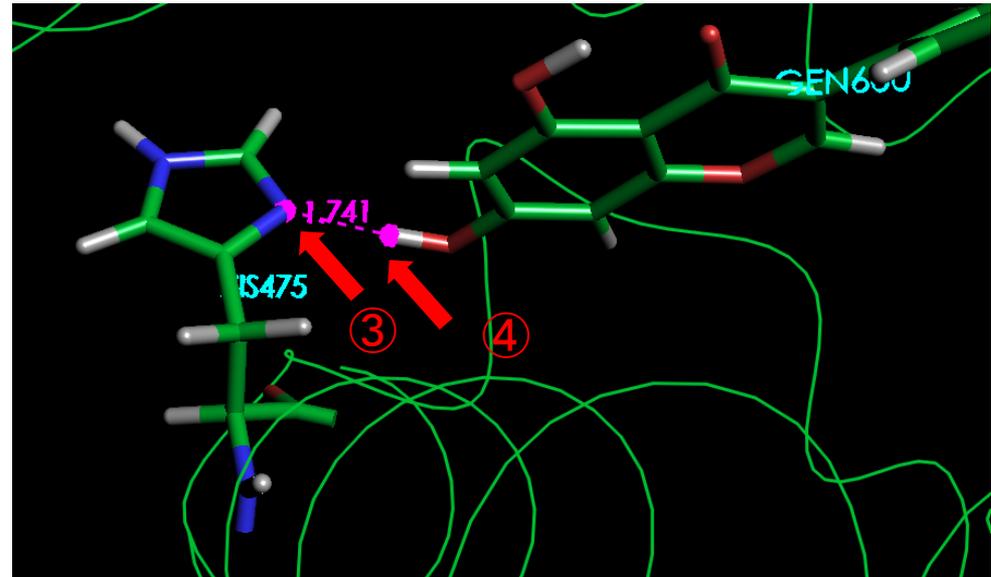


■ HIS475とリガンドの距離の表示方法

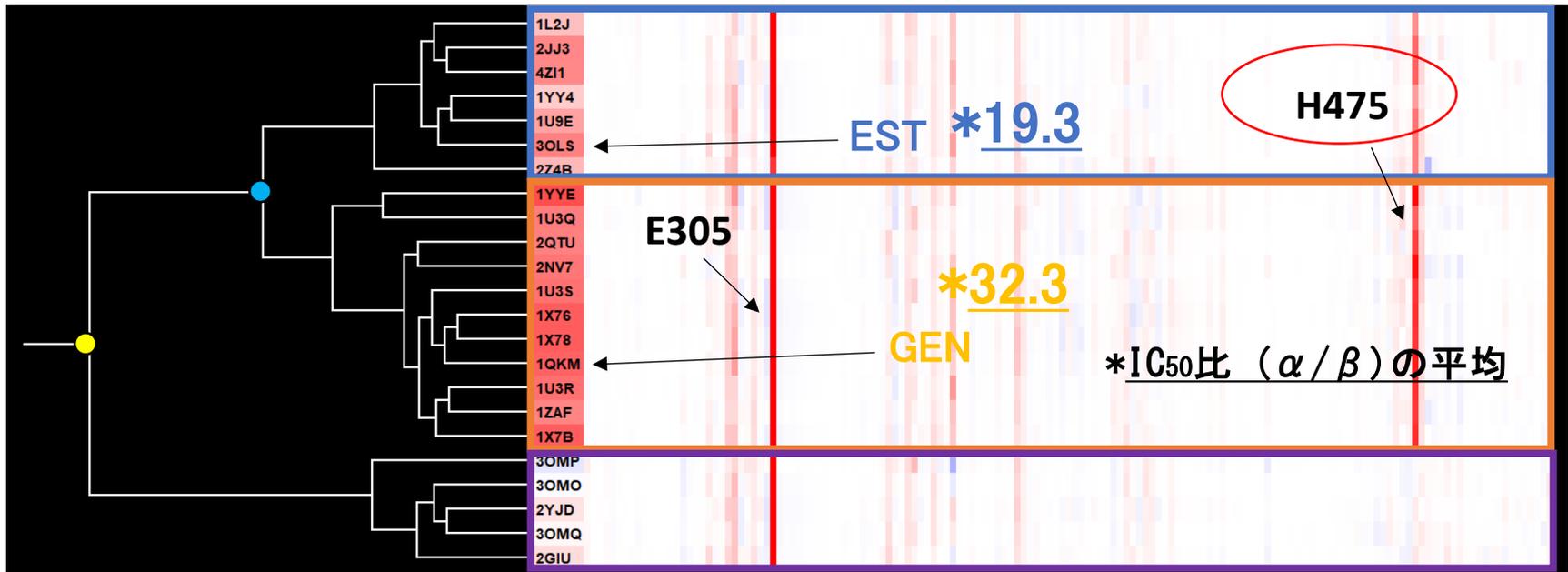
- I. 画面上部のMonitorを選択する
- II. Distanceを選択



- III. 距離を見たい部分の両端をクリックする。

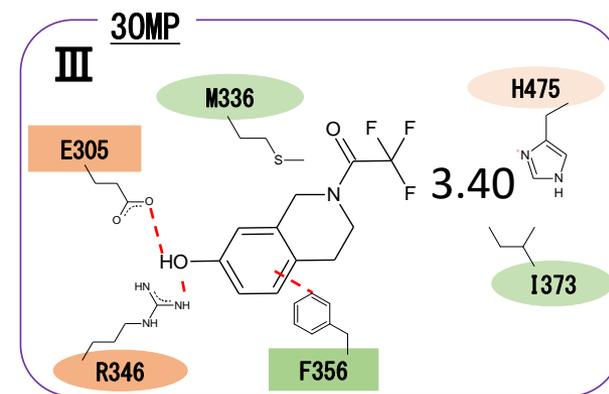
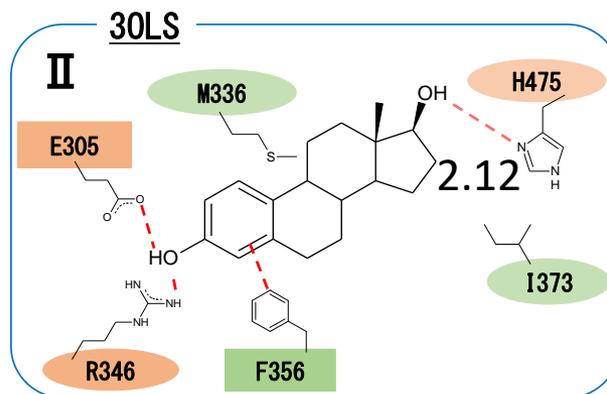
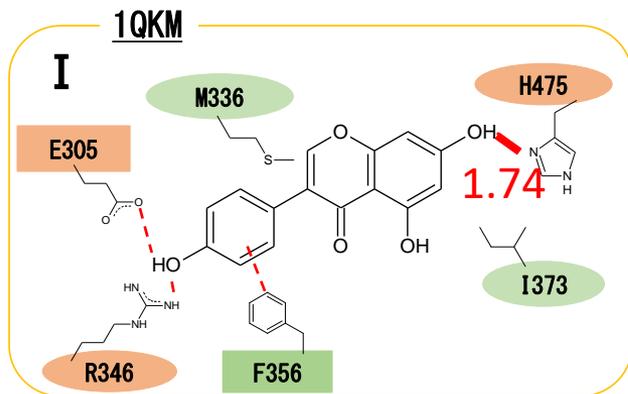


ERβのリガンドクラスター解析



● H475 との相互作用の有無

● H475 との相互作用の強さ



H475との相互作用の強さによる分岐(青色の点)で、選択性があるGenisteinと選択性のない17β-Estradiolは別のクラスターに分類されたと考えられる。

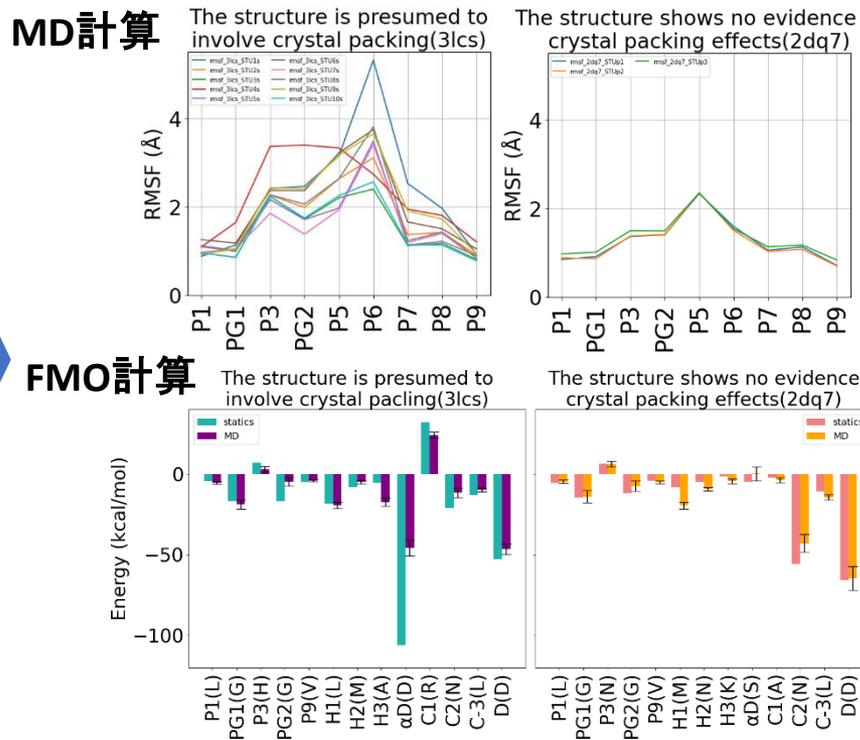
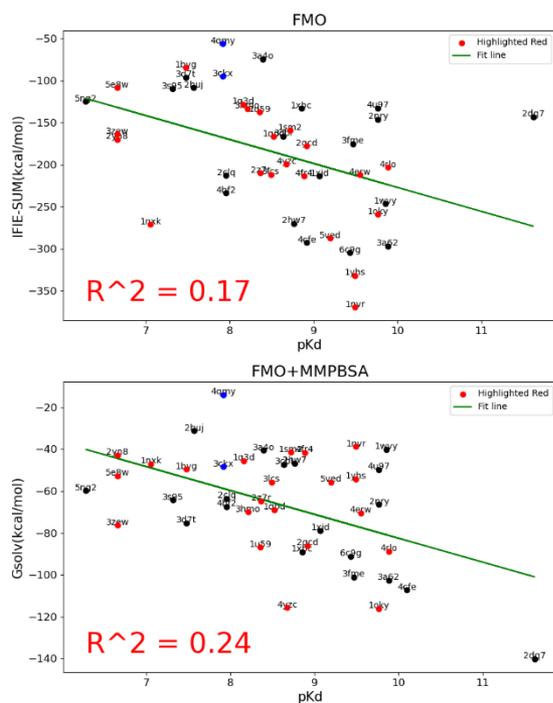
■ まとめ

- IFIE/PIEDA解析にてクラスタリングに重要な相互作用も含めて、予測できる。
- VISCANAを用いたIFIEに基づくクラスタリングによって、
 - ・ リガンドを残基との相互作用パターンの類似性によって分類
 - ・ 受容体ーリガンド結合の特徴の抽出が可能となる。
- 特に選択性の異なるリガンドを含むクラスターどうしを比較することで、選択性に関わる相互作用を推測することが示唆された。

■ 宣伝

10月29(火)16:00-17:00 / 30日(水)17:00-18:00 (A) P04-01

Analysis of Kinase Binding Specificity of Staurosporine using the Fragment Molecular Orbital Method



STUが結合したヒトプロテインキナーゼの K_d と相互作用エネルギーの低い相関係数の原因がクリスタルパッキングと予想

クリスタルパッキングの影響を緩和するためにMD計算を行うことは、より正確な相互作用を得るための合理的なアプローチであることが示唆された。