＜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

株式会社テクノプロ テクノプロ R&D 社

(TechnoPro, Inc. TechnoPro R&D, Company)

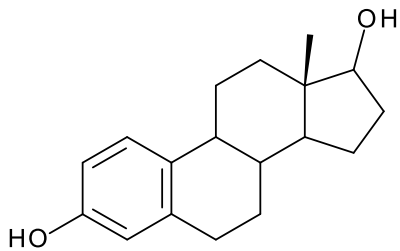
関　祐哉

■ ターゲット
エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor : ER) β

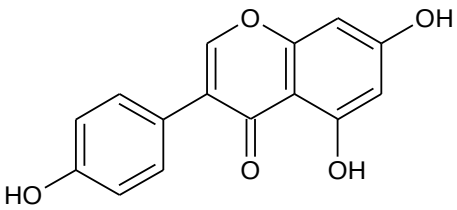
ERのサブタイプのひとつであり、17β-Estradiol (EST) との親和性は ERαと同等であるが、Genistein (GEN) などの植物エストロゲンとの親和性が高い。

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

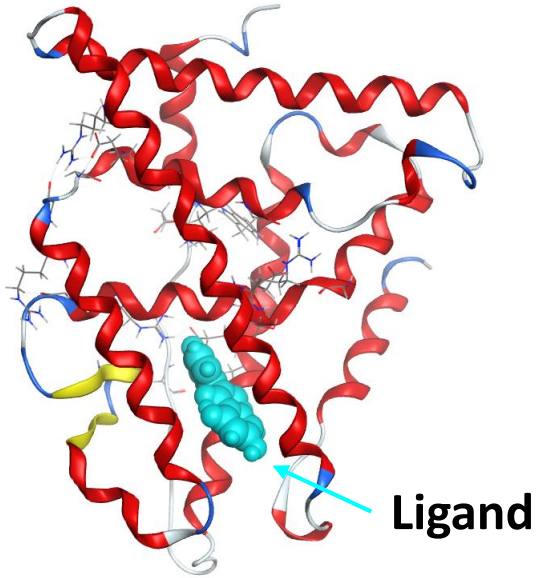
Malamas, M.S., Manas, E.S., McDevitt, R.E., Gunawan, I., Xu, Z.B., Collini, M.D., Miller, C.P., Dinh, T., Henderson, R.A., Keith Jr., J.C., Harris, H.A. J.Med.Chem. 47: 5021-5040 (2004)



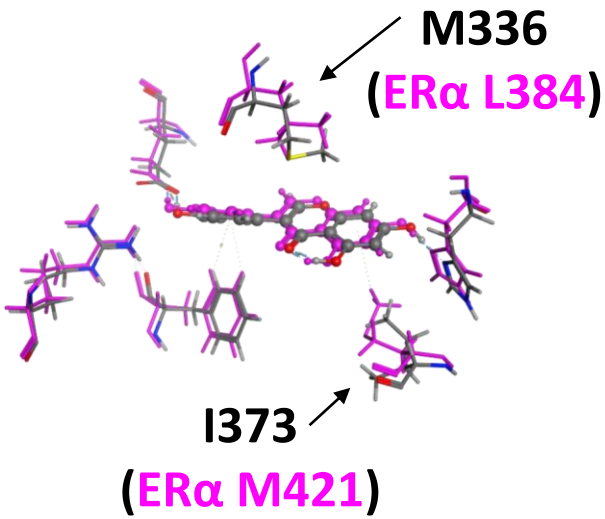
17β-Estradiol (EST)



Genistein (GEN)

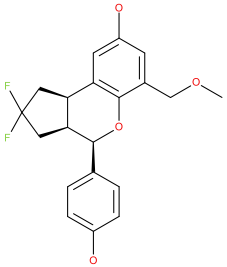


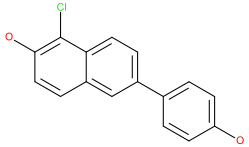
リガンド結合ポケット

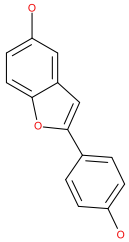


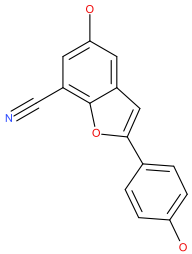
➢ リガンドのサブタイプ選択性を解析する。
FMODBに登録されたデータを用いて、受容体ーリガンドの相互作用パターンに基づくクラスター解析を行う。

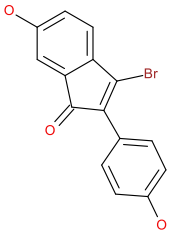
■ ERβの複合体としてPDB (Protein Data Bank) に登録されているリガンドが23個ある。

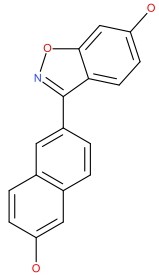

2QTU

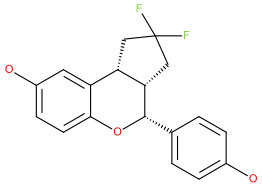

1YY4

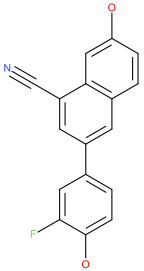

1U9E

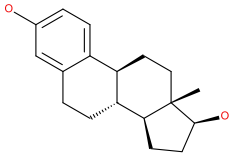

1X76

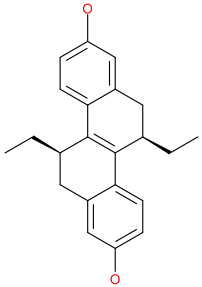

1ZAF

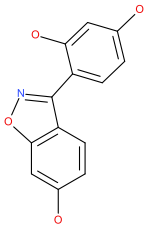

1U3S

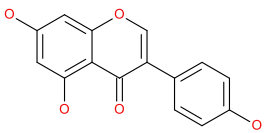

2Z4B

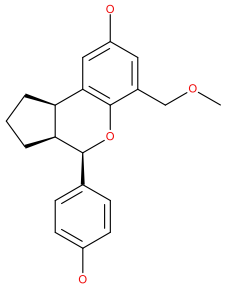

1YYE

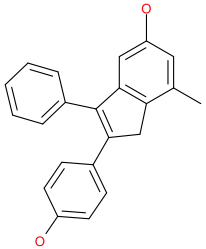

3OLS

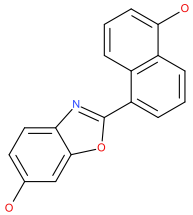

1L2J

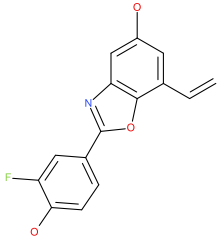

1U3Q

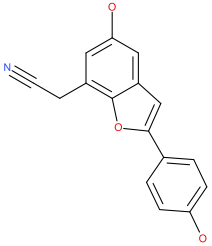

1QKM

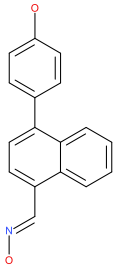

2JJ3

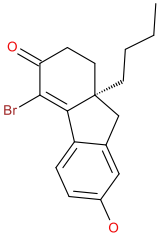

4ZI1

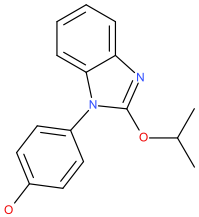

1U3R

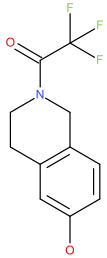

1X7B

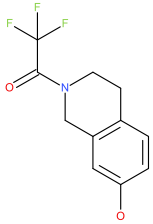

1X78

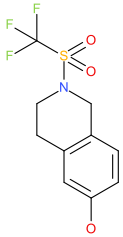

2NV7


2GIU


2YJD


3OMO


3OMP

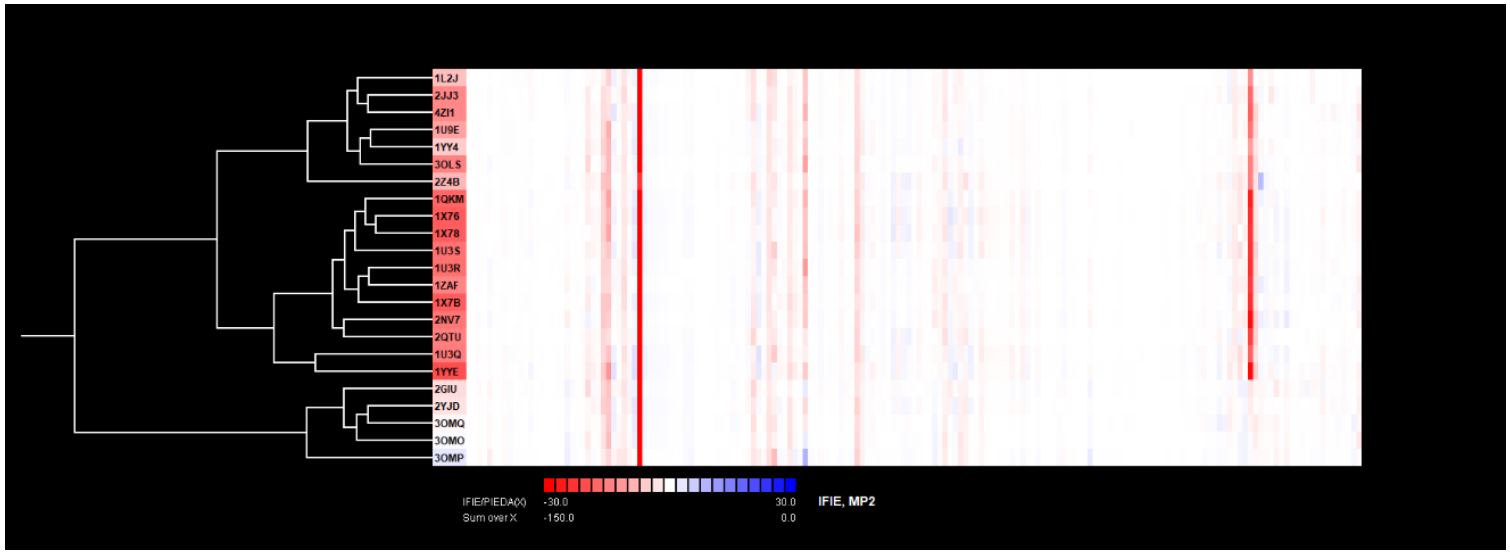

3OMQ

サブタイプへのselectivity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。

■ 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。
- リガンド同士の類似性の距離が近いほどフラグメントとの結合の類似性が高い。



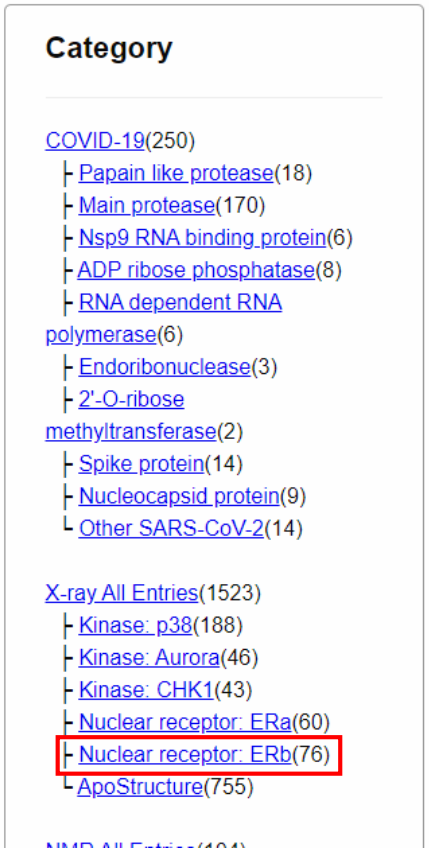
サンプル例題のERβ複合体をターゲットとし、
ソフトに BioStationViewer を、手段に VISCANA を用いて解析することで、
リガンドを受容体との相互作用パターンによって分類する。

S. Amari *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 221-230.

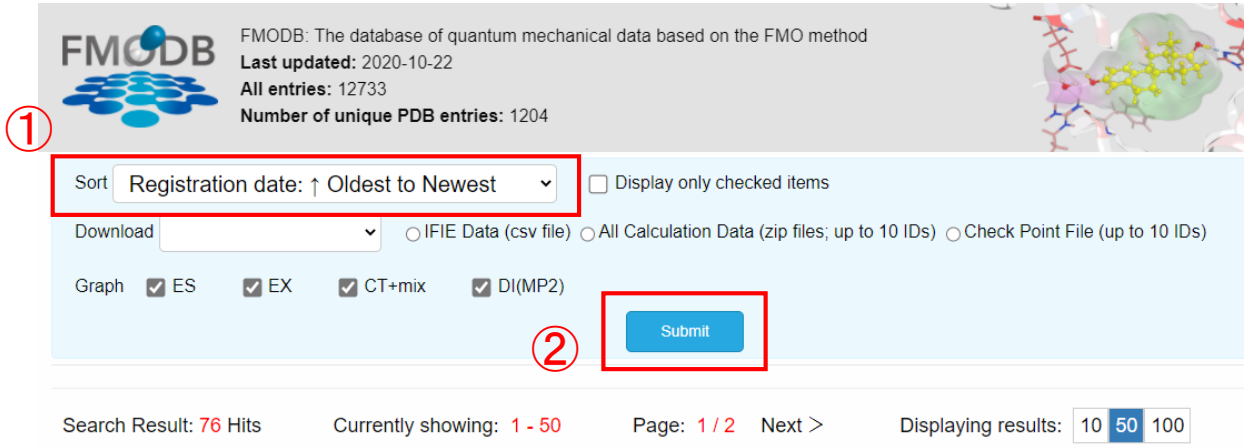
■ FMO計算結果の一括ダウンロードの手順

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しておく。

II.　FMODBより、Category – X-ray All Entries – Nuclear receptor: ERb を選択する。



III.　SortでRegistration data: ↑Oldest to Newest を指定する① → Submit②



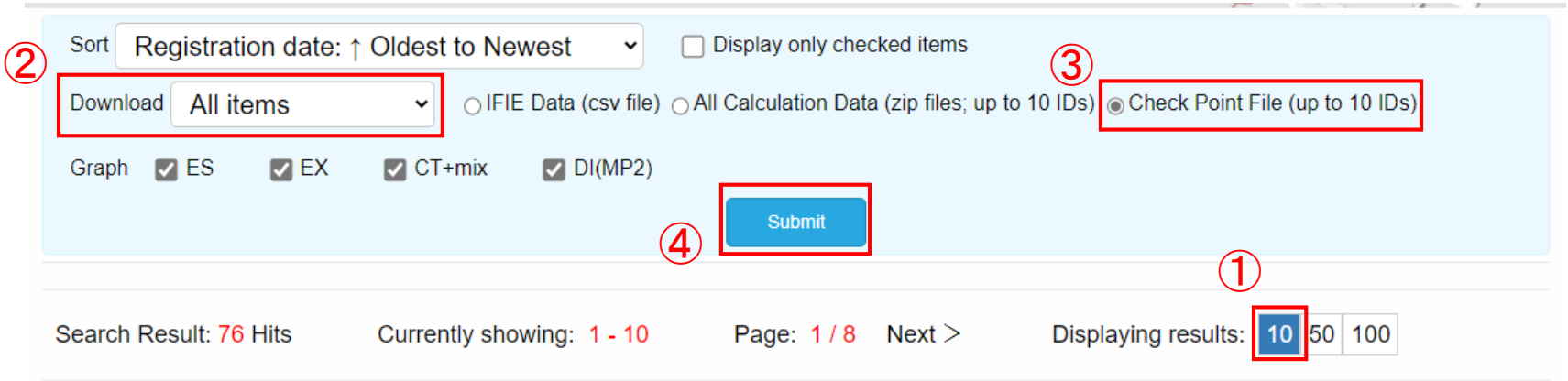
<u>上から登録の新しい順にソートされる。</u>

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

■ FMO計算結果の一括ダウンロードの手順

IV. Displaying results: 10を指定しデータを10個表示にする①。

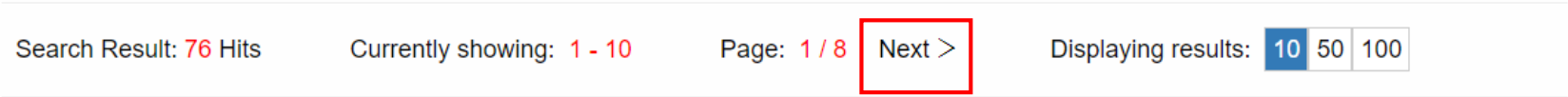
V. DownloadでAll itemsを指定し②、Check Point File (up to 10 IDs)にチェックをつける③ → Submit④



<u>表示中のデータ10個が一括でダウンロードされる。</u>

VI. ダウンロードしたzipファイルを開き、解凍する。

VII. Next＞をクリックし2ページ目の10個のデータを表示したら、同様に手順V. VI.の操作で10個のデータをダウンロード後zipファイルを解凍する。



■ FMO計算結果の一括ダウンロードの手順

VIII. 再度Next＞をクリックし3ページ目の10個のデータを表示したら、上から3個のデータ(PDB ID: 1U3Q, 1QKM, 1L2J)にチェックをつける。

Search Result: 76 Hits　Currently showing: 21 - 30　Page: 3 / 8　＜ Back　Next ＞　Displaying results:
10 50 100

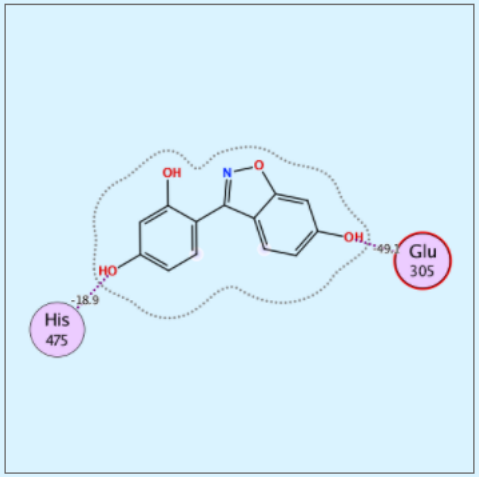
☑ X18ZP

FMODB ID: X18ZP
Calculation Name: 1U3Q-C-Xray11
Preferred Name:
PDB ID: 1U3Q
Chain ID: C
UniProt ID: Q92731
Base Structure: X-ray
Registration Date: 2017-06-23
Reference:
Modeling method
Optimization: MOE:Amber10:EHT
Restraint: OptH
Procedure: Auto-FMO protocol ver. 1.2017021
FMO calculation
FMO method: FMO2-MP2/6-31G(d)
FMO2-HF: Total energy (hartree): -96399.33
FMO2-MP2: Total energy (hartree): -96669.646505

Ligand binding energy

IFIE [kcal/mol]	PIEDA [kcal/mol]				Charge transfer value [e]
IFIE SUM	ES	EX	CT+mix	DI(MP2)	q(I=>J)
-113.931	-98.803	72.440	-35.567	-51.999	0.095

Ligand Interaction

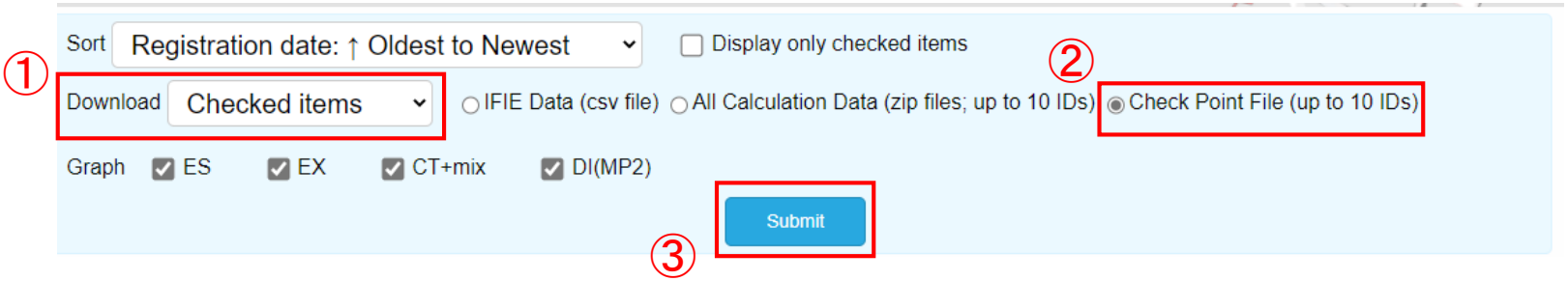


Ligand:272

チェックしたデータは背景が青色になる。

■ FMO計算結果の一括ダウンロードの手順

IX. DownloadでChecked itemsを指定し①、Check Point File (up to 10 IDs)にチェックをつける② → Submit③



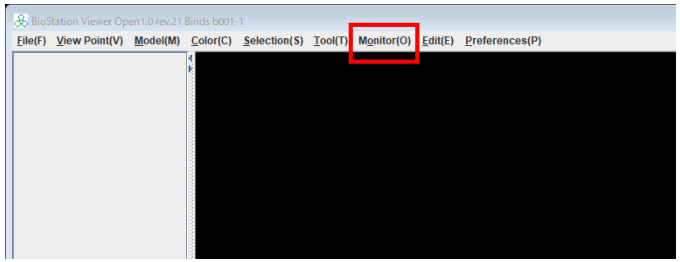
<u>選択したデータ3個が一括でダウンロードされる。</u>

X. ダウンロードしたzipファイルを開き、解凍する。

XI. 解凍したファイル内の.cpfファイル計23個を、手順 I. で作成したディレクトリに移動させ一つにまとめる。

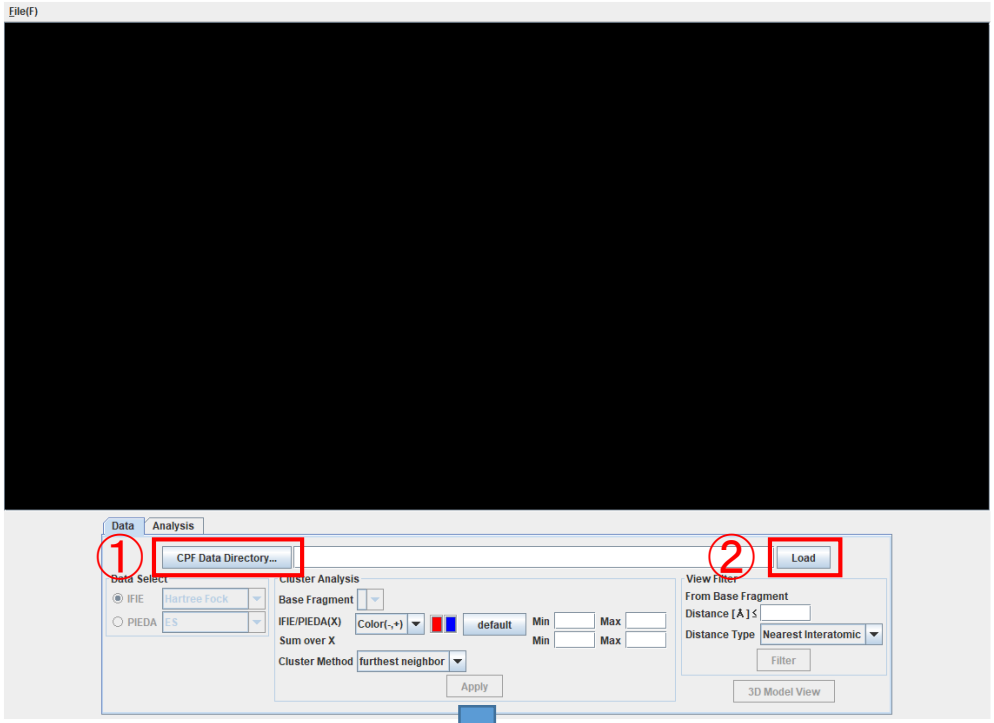
■ VISCANAの操作手順

I. Monitor → VISCANA を選択する。

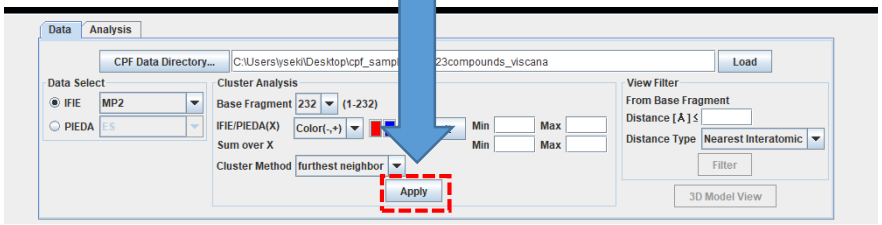


VISCANAのウインドウが開く。

II. CPF Data Directory... で cpfファイルをまとめたディレクトリを指定① → Load②



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



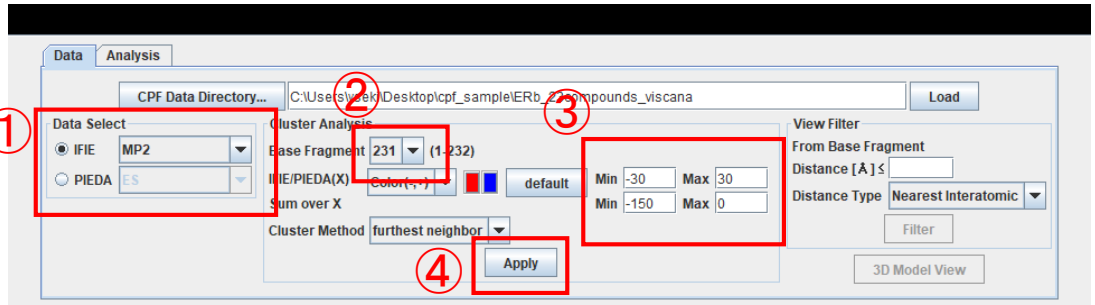
■ VISCANAの操作手順

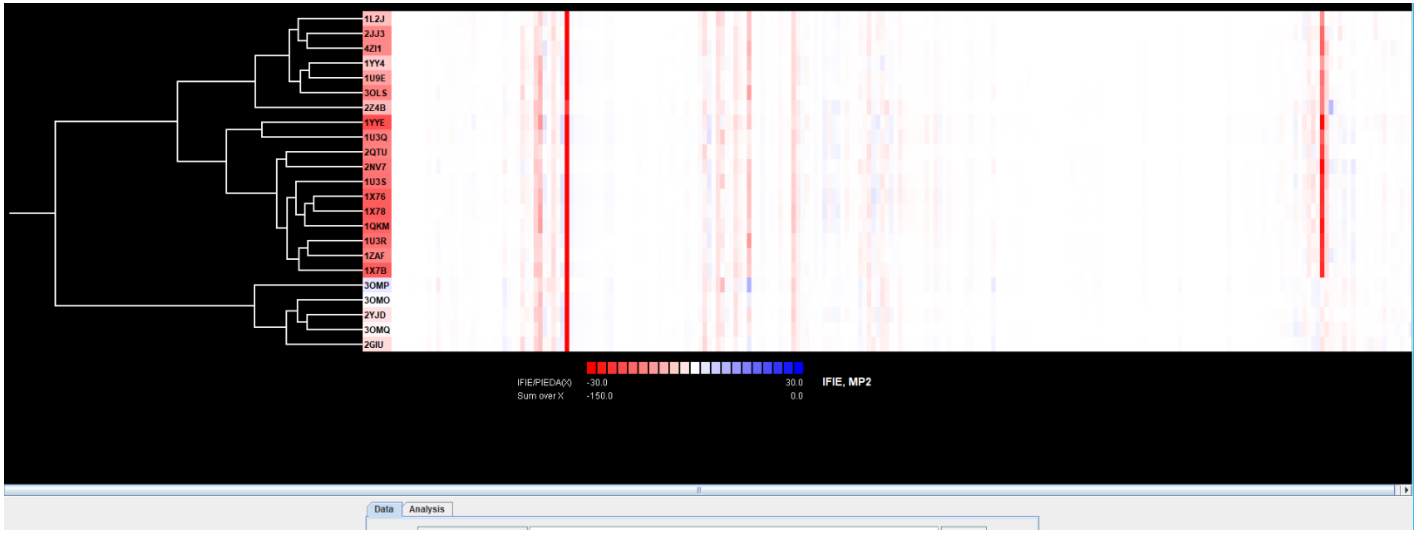
III. Data Select でクラスタリングに用いる相互作用エネルギーを指定する。
今回は IFIE-MP2 を指定する①。

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にする②。
✓ Data Selectで設定したエネルギーの
- 範囲
- 合計の範囲

を指定する③。

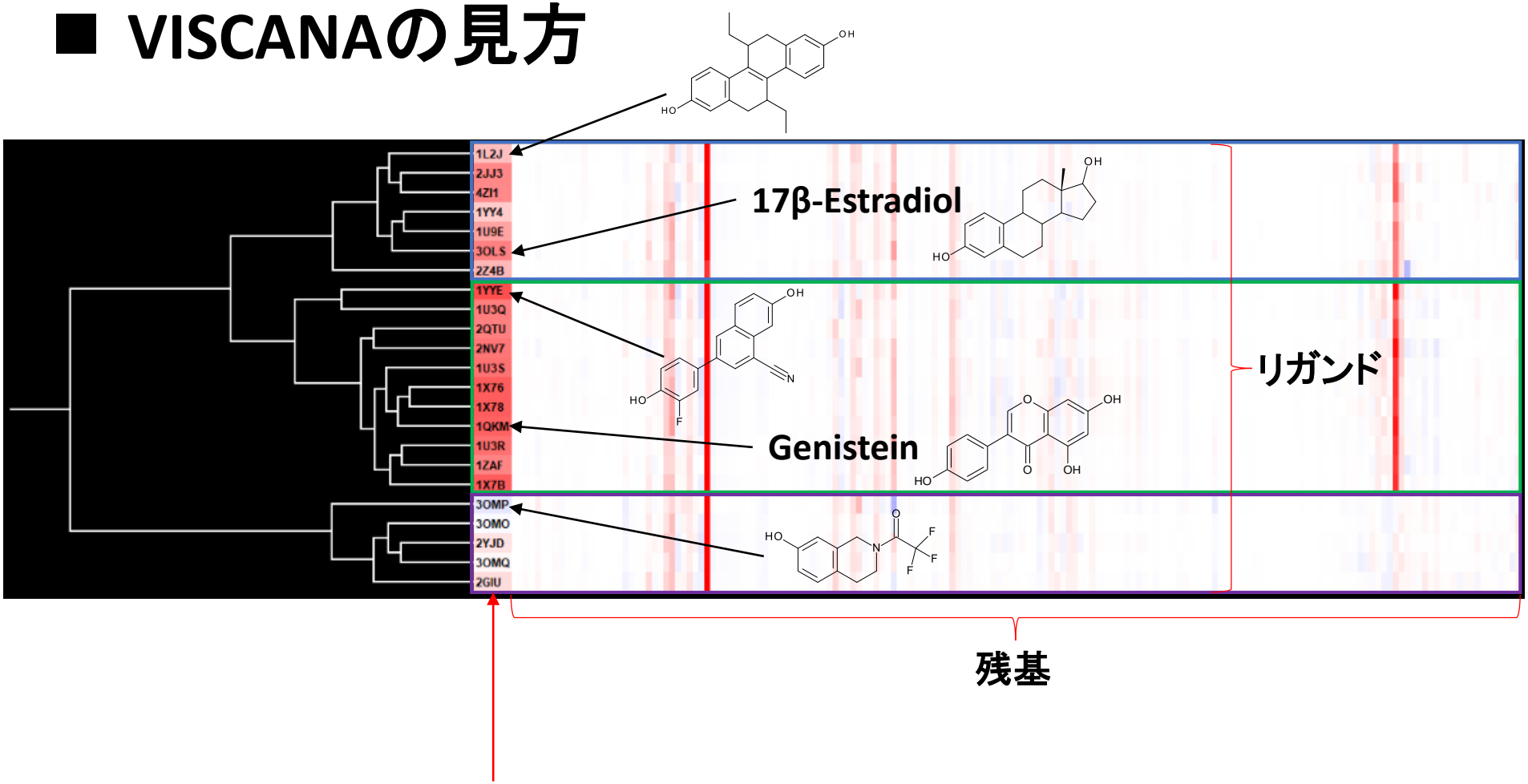
→ Apply④





結果の図が表れる。

■ VISCANAの見方

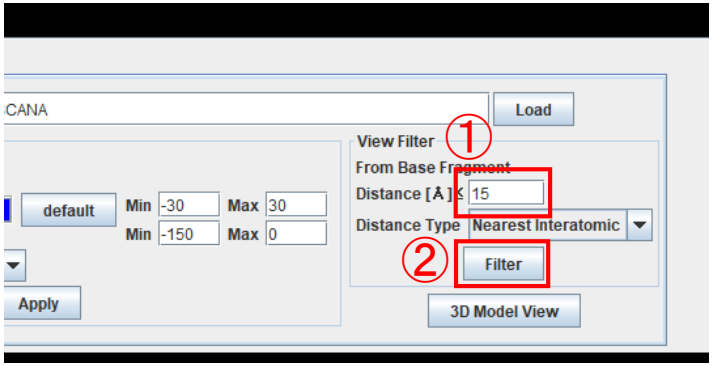


※ 各クラスターの一番上に表記されたリガンドがクラスターセンター

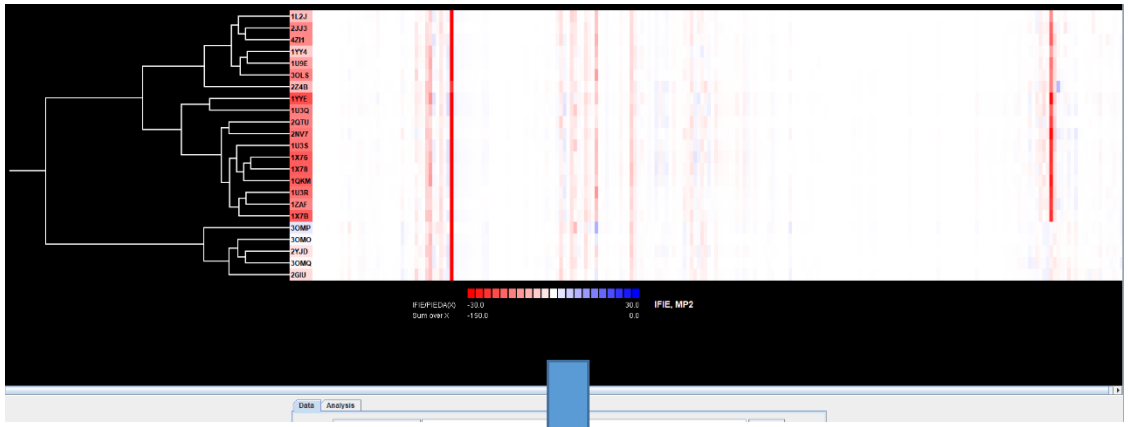
<u>選択性のない17β-Estradiolと選択性のあるGenisteinは別のクラスターに含まれる。</u>

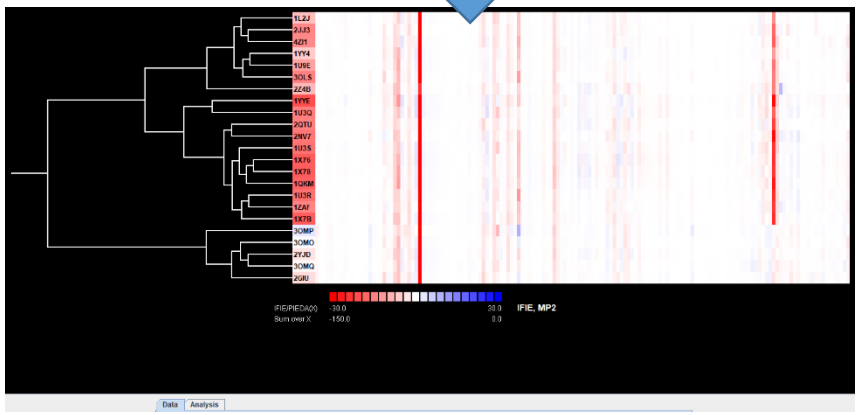
■ 図の整理

Viewer Filter で Base Fragment からの距離を指定する① → Filter②



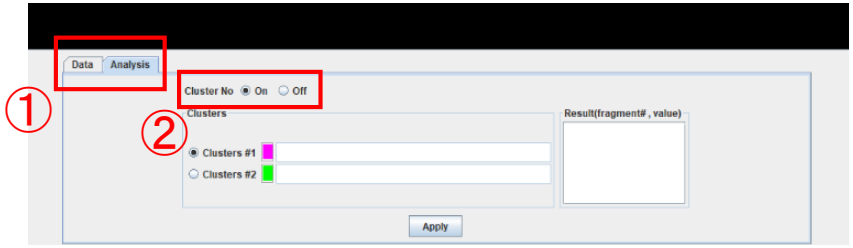
<u>指定した距離内のフラグメントとの相互作用バンドのみを表示することができる。</u>

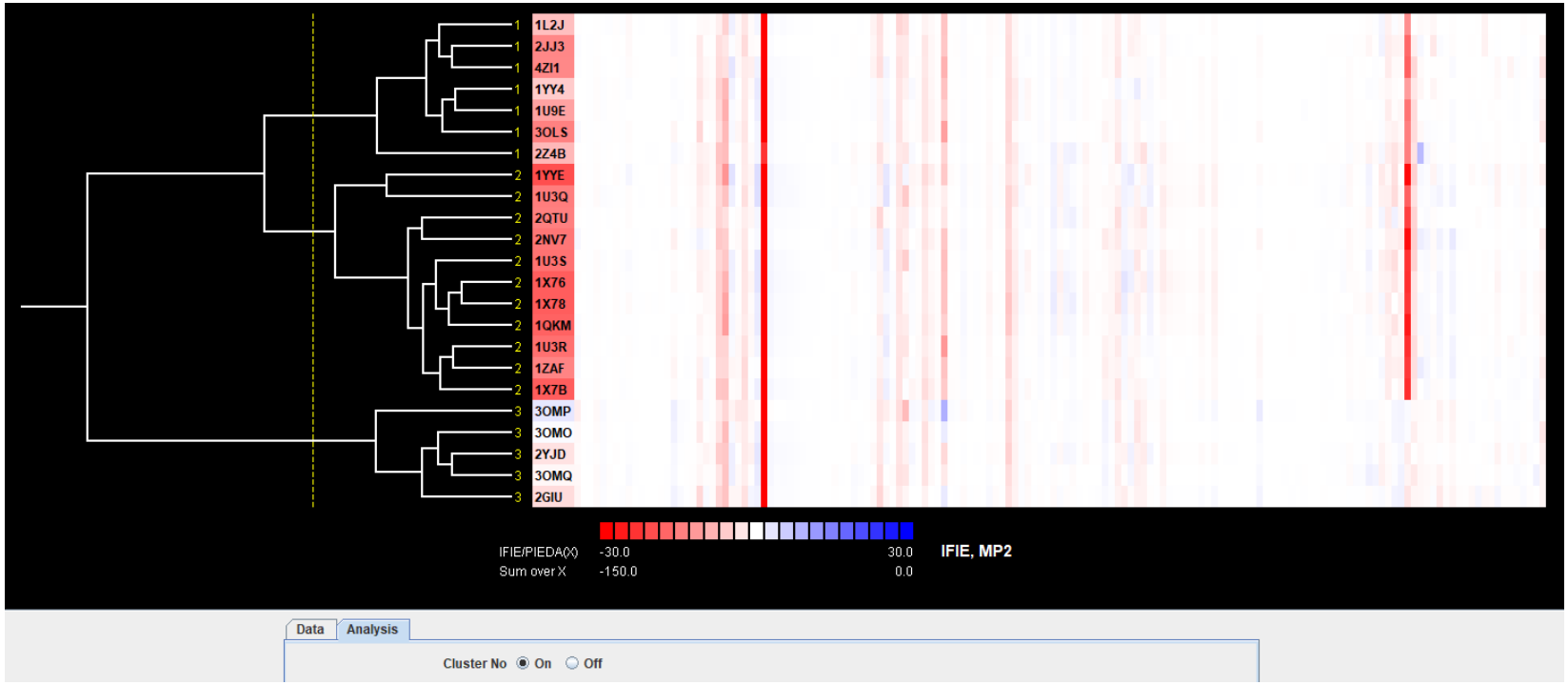




■ クラスタリングの結果の詳細な解析

I. Data を Analysis に変え①、Cluster No の On にチェックをつける②。

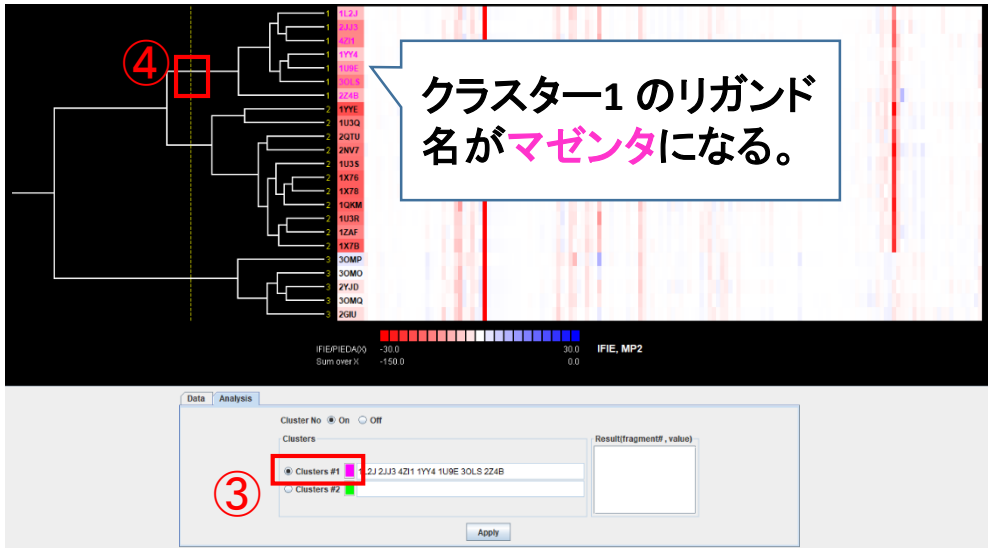




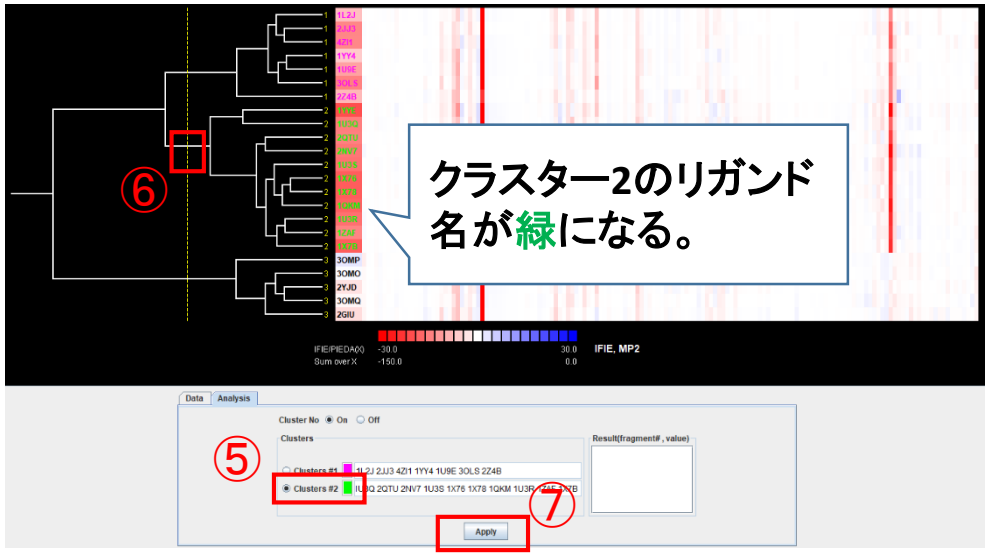
<u>黄色の破線はカーソルを動かすと連動する。</u>
<u>破線の位置でクラスター分割したときに割り当てられるクラスター番号がリガンド名左に表記される。</u>

■ クラスタリングの結果の詳細な解析

II.　Cluster #1 にチェックをつけ③、クラスターの分岐に破線を置き白線との交点をクリック④。



III.　同様にCluster #2 にチェックをつけ⑤、白線と破線の交点をクリックする⑥



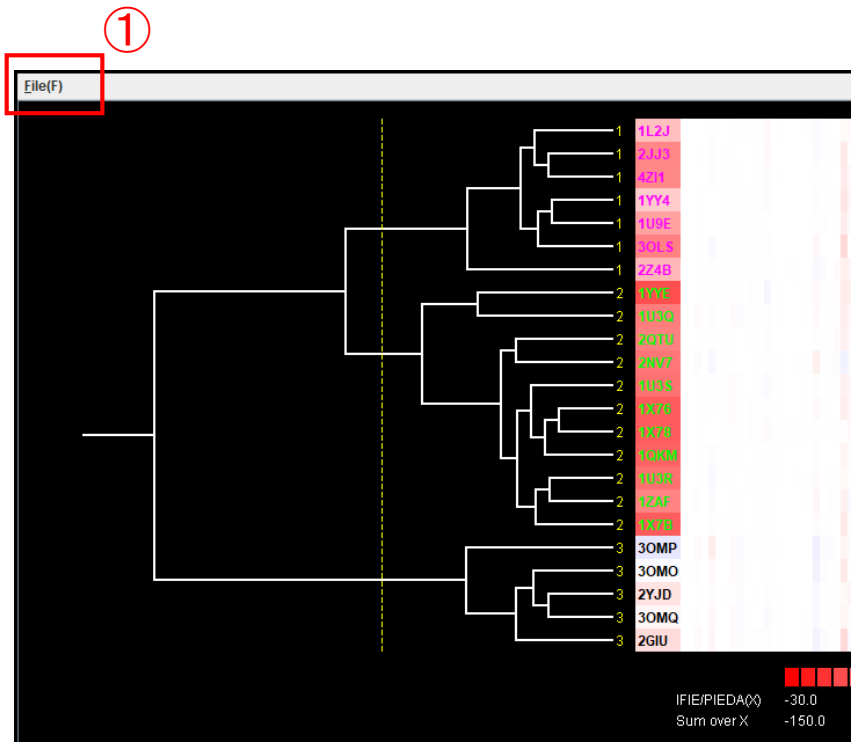
→ Apply⑦（次頁）

■ クラスタリングの結果の詳細な解析

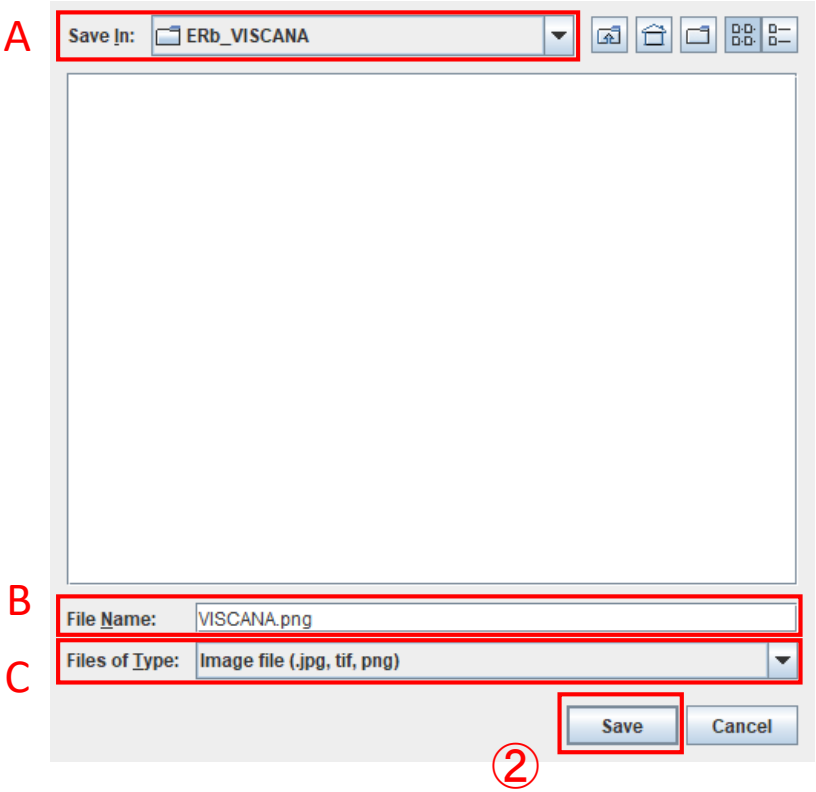
Result(fragment#, value) の欄に、クラスタリングに寄与したフラグメント番号 (#) と寄与の度合いを示す値 (value) が表れる。

■ 結果の図の保存

File①から Save Image を選ぶ。



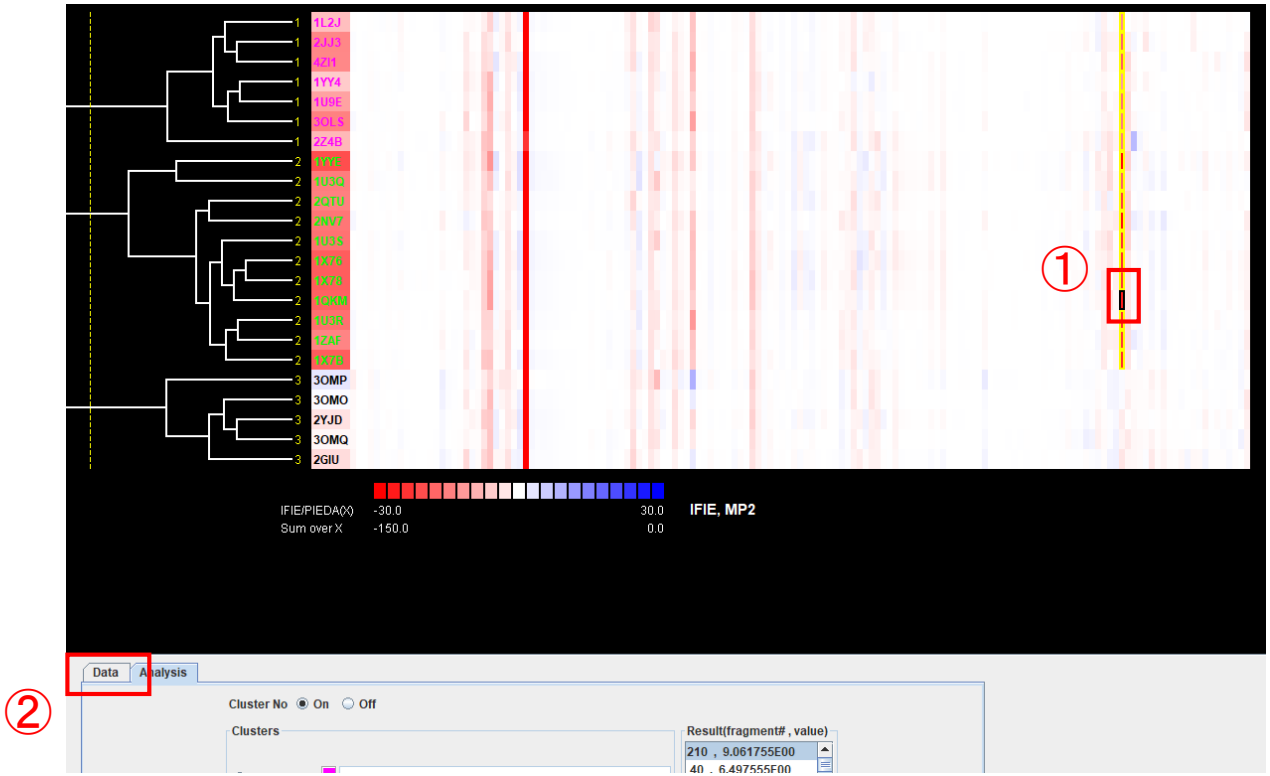
A) Save In: 保存先ディレクトリ
B) File Name: ファイル名.png
C) File of Type: Image file (.jpg, .tif, .png)
を指定
→ Save②



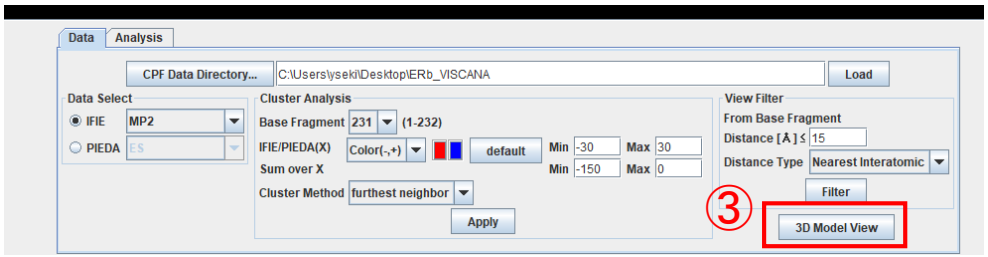
<u>VISCANAの図がファイルとして保存される。</u>

■ 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①(黄色が消える)、再度Data を Analysis に変える②。



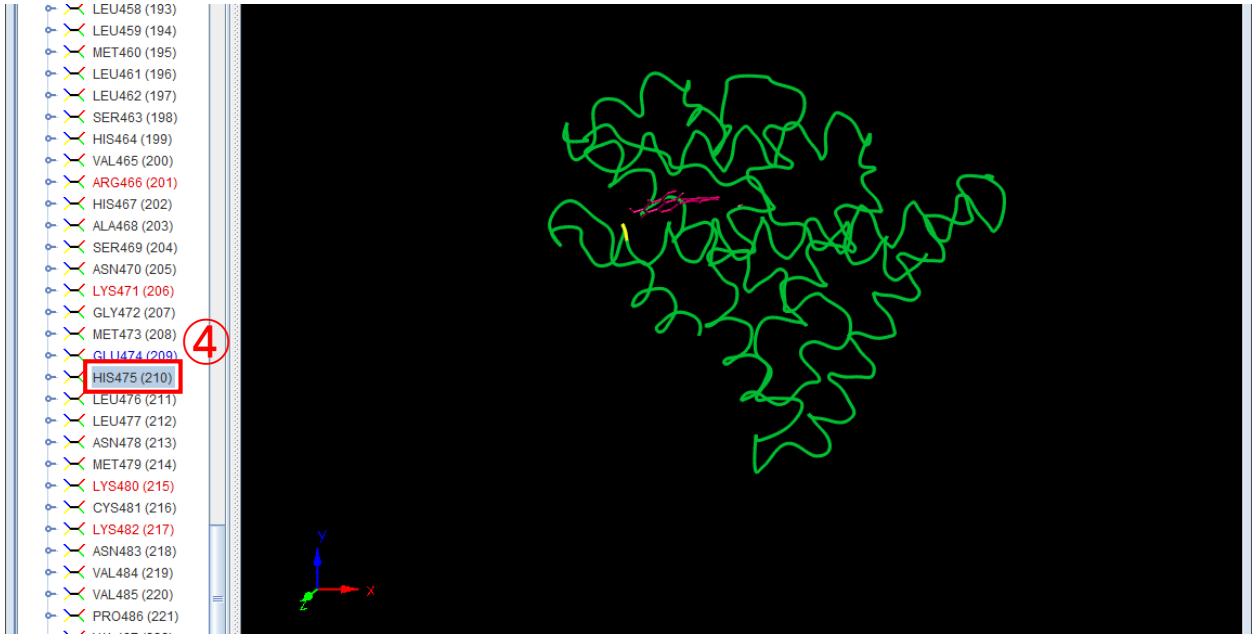
II. 3D Model View ③。

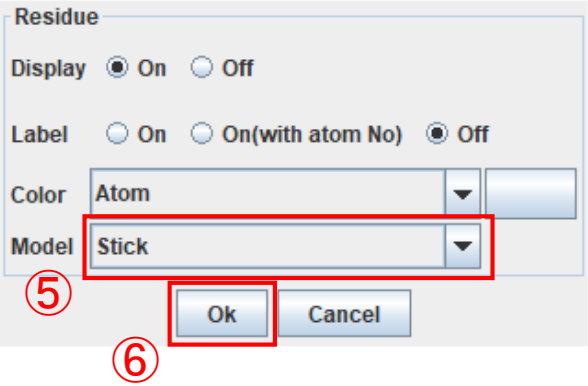


<u>Viewer に複合体構造が読み込まれる。</u>

■ クラスタリングの結果の詳細な解析

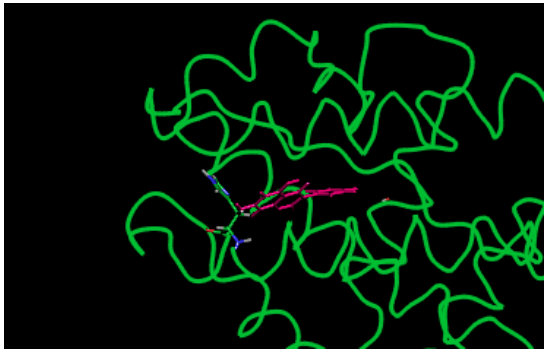
III. HIS475(210)を右クリックし④、Stick を選ぶ⑤。その後OK⑥。

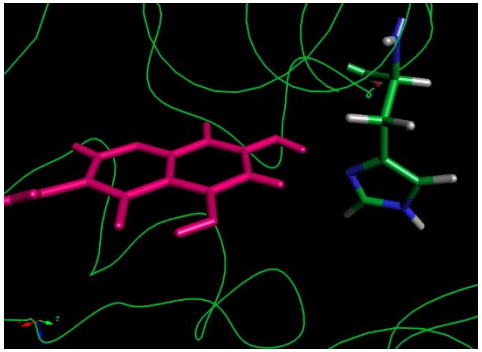




H475残基が Stick 表示になる。

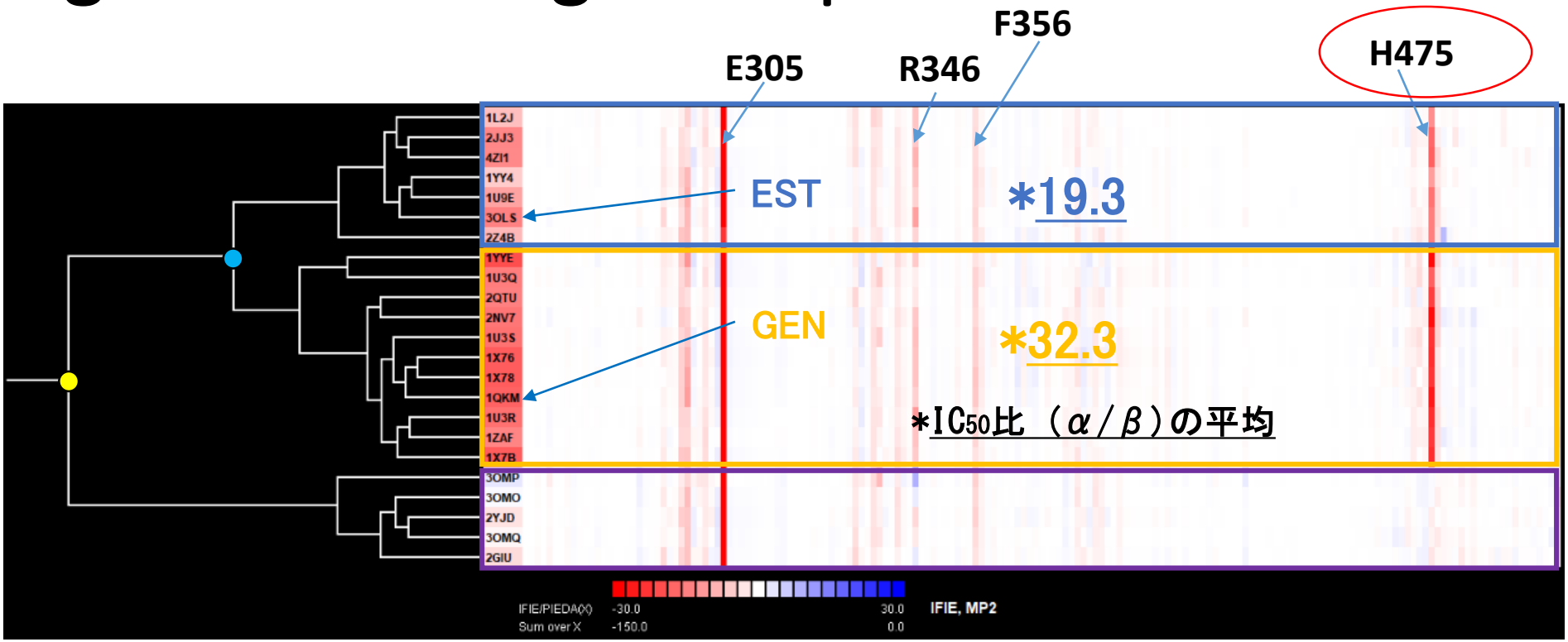
IV. 左ボタンのドラッグで視点を変え、ホイールボタンのドラッグで拡大・縮小する。



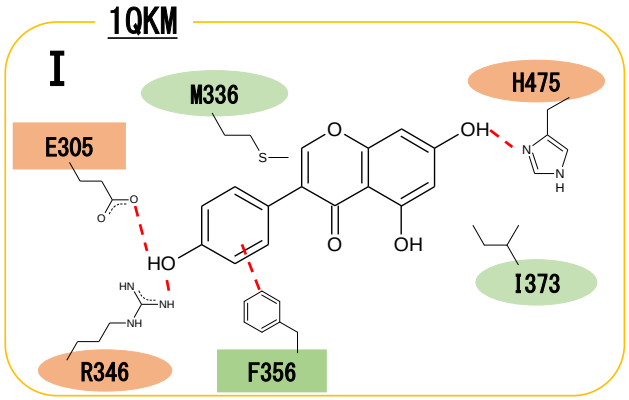


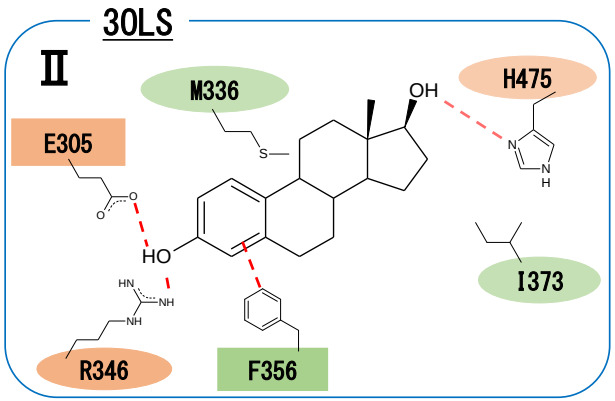
H475 とリガンドの水素結合が確認できる。

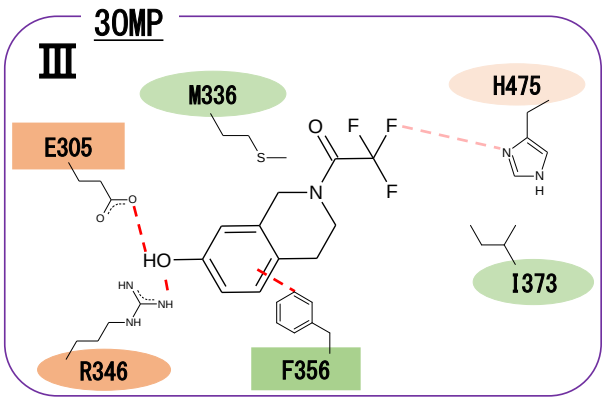
Ligand clustering for ERβ



- H475 との相互作用の有無
- H475 との相互作用の強さ







■ まとめ

- 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

ができる。

- 特にselectivity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できる。