양자역학으로 π-π interaction 에너지 계산을 통한 ligand binding energy 분석

이승진,[1] 윤지희,[2] 장성민[3], Art E. Cho[*]

[1,2,3,] 세종특별자치시 세종로 2511, 고려대 생명정보공학과, 339-700.*

전화 : (010) 5448-7093, 이메일 : jin2694@naver.com

Chemworks (or Chemworks2) ID: ecc13_kor_kucca, ecc13_kor_kuccb, ecc13_kor_kucc ecc13_kor_kuccd.

초록

생물정보학의 다양한 이론적 내용과 계산적 방법들이 갈수록 전문화 되어짐에 따라 신약 개발, 신 물질 합성, 단백질의 구조 예측 등 다양한 분야에서 필요성이 커져가고 있다. 이 중 molecular docking 기술은 단백질과 특정 분자간의 결합 형태를 분자 모델링 기법을 통해 알아내는 방법이며 신약개발 연구에 큰 영향을 미치고 있다. Molecular docking 을 통하여 분자간의 결합 형태를 예측하는 과정에서 Protein-ligand complex 의 정확한 에너지 측정을 가능하게 하는 scoring function 이 필요하다. 그런데 본 연구에서 사용한 B-Raf kinase protein 은 active site 부분에서 ligand 와 receptor 간에 aromatic ring 로 인한 π–π interaction 이 정확한 에너지 계산을 어렵게 한다. 이러한 π–π interaction 부분의 에너지를 정확하게 계산하기 위해 양자역학 계산을 실시하였다. Active site 부분에서 ligand 와 receptor 에서 발생하는 각각 다른 5 개의 π–π interaction 구조를 준비하여 Gaussian 을 통해 양자역학 에너지를 계산하였다. 그리고 이러한 결과 값들이 ligand 의 활성 값과 어떤 상관관계를 갖는지 살펴보았다. 그 결과 π–π interaction 을 양자역학으로 계산한 값이 그렇지 않은 것보다 더 좋은 상관관계를 보여주었다. 이는 특별한 구조의 영향으로 ligand 와 receptor 간의 결합에너지를 정확하게 계산하기 어려운 문제에서 양자역학을 적용할 경우 더욱 좋은 결과값을 얻을 수 있었다. 또한 이러한 데이터가 신 물질 개발이나 신약 개발 등의 다양한 분야에서 계산화학 방법이 신뢰성을 얻는데 도움 될 수 있다고 생각된다.

핵심어 : π-π interaction, quantum mechanics, scoring function, Gaussian

서론

Molecular docking 은 단백질의 결합 부위에 리간드가 결합한 구조를 예측하는 방법이다.[1] 일반적으로 docking 은 두 가지 요소로 이루어져 있다. 첫 번째는 search algorithm 으로 리간드가 표적이 되는 단백질에 효능을 가지는 결합하는 구조를 찾아내는 것이며, 두 번째는 이러한 결합 구조들 중에서 scoring function 으로 에너지 값을 계산하여 결합된 리간드의 활성을 정확히 예측해 내는 것이라고 할 수 있다.[3,4]

신약개발에는 파이프라인이라 불리는 여러 단계의 프로세스가 있으며 이중 특히 초기 개발단계에서 컴퓨터를 이용한 여러 기술이 사용된다. 가상 스크리닝 (virtual screening)은 이러한 기술 중 하나로써 여러 가지 방법을 통해 밝혀진 표적 단백질에 결합하는 화합물을 찾아내는 과정이며, 이 기술에 사용되는 molecular docking 은 그 핵심적인 부분이다.[2] 따라서, molecular docking 을 구성하는 search algorithm 과 scoring function 이 단백질과 리간드의 결합을 정확하게 예측할 수 있다면 신약개발 단계에서 상당한 비용과 시간을 단축할 수 있다. Docking program 에서 표적 단백질에 대하여 리간드의 다양한 결합 구조를 예측하는 search algorithm 은 상당한 진전을 이루었지만, 이를 평가하여 올바른 결합 구조를 예측하는 scoring function 의 경우 일반적인 경우에는 결합구조를 잘 예측하지만 특수한 경우에는 이러한 능력이 현저히 떨어진다.[5]

π-π interaction 은 방향족 고리 화합물 간에 일어나는 결합으로 X-ray crystallography 와 NMR 등의 많은 실험결과에 의하면, 단백질을 구성하는 아미노산인 Phe, Tyr, Trp, His 과 방향족 고리를 가지는 리간드에서 이러한 결합이 관찰되었다.[6] 따라서 생물학적 현상에 π-π interaction 이 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.[5] 일반적으로 scoring function 은 π-π interaction 을 고려하지 않는데 이유는 π-π interaction energy 값을 전체 protein-ligand

energy 값과 비교해 보았을 때 상대적으로 적은 값이기 때문이다.[7] 그러나, 단백질과 리간드의 결합에 충분히 많은 방향족 고리 화합물이 존재 한다면 π-π interaction energy 값은 전체 interaction energy 에서 중요한 요소가 된다.

이번 연구에서는 scoring function 에 단백질과 리간드의 방향족 고리 화합물의 사이의 π-π interaction energy 을 고려하여 리간드의 활성도를 정확하게 예측하고 정확도를 향상시키는 것이다. 연구에 사용된 표적 단백질은 B-raf 로 그 저해제로 실험적으로 알려진 benzimidazoles drivatives 를 리간드로 사용하여 실질적인 실험 값과 예측된 에너지 값의 연관성을 보고자 하였다. (그림 1) B-Raf 는 성장 신호 전달 단백질 인산화 효소인 Raf kinase family 의 하나로 세포 분열, 분화 등에 영향을 주는 MAP kinase/ERKs 신호경로를 조절하는 역할을 한다. B-Raf 의 변이는 세포가 끊임없이 성장하도록 과도한 신호를 줌으로써 암을 유발한다. Ligand 로 사용한 B-Raf 저해제는 암 치료제로 kinase domain 의 비활성과 활성 두 형태로 개발 되어 왔다.[8,9,10] 또한,π-π interaction energy 를 계산하기 위하여 양자역학 계산 프로그램인 Gaussian 을 이용하였으며, MM-GBSA 로 계산한 결과와 함께 실험값과 상관관계를 살펴보았다.

이론 및 계산방법

B-Raf kinase inhibitor

Raf 는 serine-threonine kinase 로서 3 가지 isoform 들인 A-Raf, B-Raf, 그리고 C-Raf(또는 Raf-1)을 가지며, Ras 의 하류 신호전달을 담당한다. 돌연 변이된 Raf-1 은 항상 활성을 지니게 되는 변형된 형태이며, 이러한 Raf 돌연변이는 인간 악성 암에서 발견된다. 본 연구에서 사용한 ligand 는 benzimidazoles 계열의 Raf kinase inhibitor 들로 선행

연구된 논문을 참고하여 13 개의 ligand 구조와 IC_{50} 값을 확보하였다.(표 1) B-Raf 단백질 구조는 Protein data bank (PDB ID: 1UWJ)를 이용해서 준비하였고 Schrödinger Maestro 를 이용해서 preparation 하였다. 이후 Glide docking 을 이용해서 ligand-receptor complex structure 를 얻었다. Ligand 구조에 head, middle, tail 부분에 각각 aromatic ring 을 포함하고 있다. (그림 2)

π–π interaction

서로 이웃하는 aromatic ring 사이의 힘을 표현할 때 파이 겹침(π-stacking) 또는 파이-파이 상호작용이라 (π–π interaction) 한다. 일반적으로 scoring function 에서는 π–π interaction 을 거의 사용하지 않는데 그 이유는 π–π interaction energy 값을 전체 protein-ligand energy 값과 비교 하면 상대적으로 작은 값이기 때문이다.[7] 그러나 active site 와 ligand 에 충분히 많은 aromatic ring moieties 가 존재 한다면 π–π interaction energy 값은 전체 interaction energy 에서 중요한 요소가 된다. 본 연구에서 사용한 B-Raf 의 경우 ligand 와 receptor 가 상호작용 하는 active site 부분에서 5 개의 π–π interaction 이 존재하고, 이는 ligand binding energy 에 큰 영향을 준다. 하지만 분자역학만을 이용해서 이러한 energy 를 계산할 경우 정확도가 떨어지기 때문에, 양자역학을 통한 정확한 계산이 필요하다. B-Raf 의 active site 의 Trp530, Phe582, Phe594, His573 아미노산은 ligand 의 head, middle, tail 부분에 존재하는 aromatic ring 과 서로 다른 5 개의 π–π interaction 을 형성한다. 우리는 5 개의 π–π interaction 을 각각 다른 구조파일로 만들어 chemworks2 의 Gaussian tool 을 이용하여 양자역학 에너지를 계산하였다. (그림 3)

Gaussian09

π–π interaction 구조의 양자역학 에너지 계산은 chemwork2 의 Gaussian09 tool 을 사용하였다. 13 개의 ligand 가 protein 과 complex 를 이룬 상태에서 active site 에 있는 5 개의 π–π interaction 을 대상으로 하였다.(그림 3) 계산은 π–π interaction 부분의 구조를 .xyz 파일로 저장 후 chemworks2 에서 Gaussian input file 로 설정하였다. RHF/STO-3G 로 옵션을 설정하고 single point energy 를 계산하였다. 5 개의 π–π interaction 을 모두 포함한 계산을 total 로, 각각 따로 계산한 값을 each 로 정하였다.(표 2) 그리고 ligand-receptor complex structure 를 Schrödinger Maestro Prime 프로그램의 MM-GBSA 를 이용해서 계산한 에너지를 포함하여 각 ligand 의 activity 값과 상관관계를 살펴보았다. (표 3)(그림 4)

결과 및 토의

표 2 에는 active site 에서 receptor 와 ligand 결합을 통해 나타나는 모든 π–π interaction 에너지를 계산하여 보여준다. MM-GBSA 로 계산된 binding 에너지와 와 π–π interaction 에너지, 그리고 ligand 의 biological activity 를 서로 비교하여 표 3 에 나타내었다. 표 4 에서는 이러한 값들의 상관관계를 그래프를 그려서 알아보았다. 13 개의 ligand 의 pIC50 값은 MM-GBSA 를 통해 계산된 값과의 상관관계에서 R^2 값이 0.6409 가 나와 두 값의 상관관계가 낮다는 것을 보여주었다. 그러나 양자역학으로 계산한 결과값은 더욱 좋은 상관관계를 보여준다. 양자역학 계산은 두 가지 방법으로 진행하였다. 먼저 total π–π 에너지는 한 ligand 가 active site 에서 갖는 5 개의 π–π interaction 을 한번에 single-point energy 계산을 한 값으로, ligand activitie 값과의 상관관계에서 R^2 값이 0.767 로 측정되어 MM-GBSA 를 이용한 결과보다 더 좋은 상관관계를 보여주었다. Each π–π 에너지는 한

ligand 가 active site 에서 갖는 5 개의 π–π interaction 의 에너지를 각각 계산하여 모두 더한 값으로, R^2 값이 0.8071 이 나와 가장 좋은 상관관계를 보여주었다.

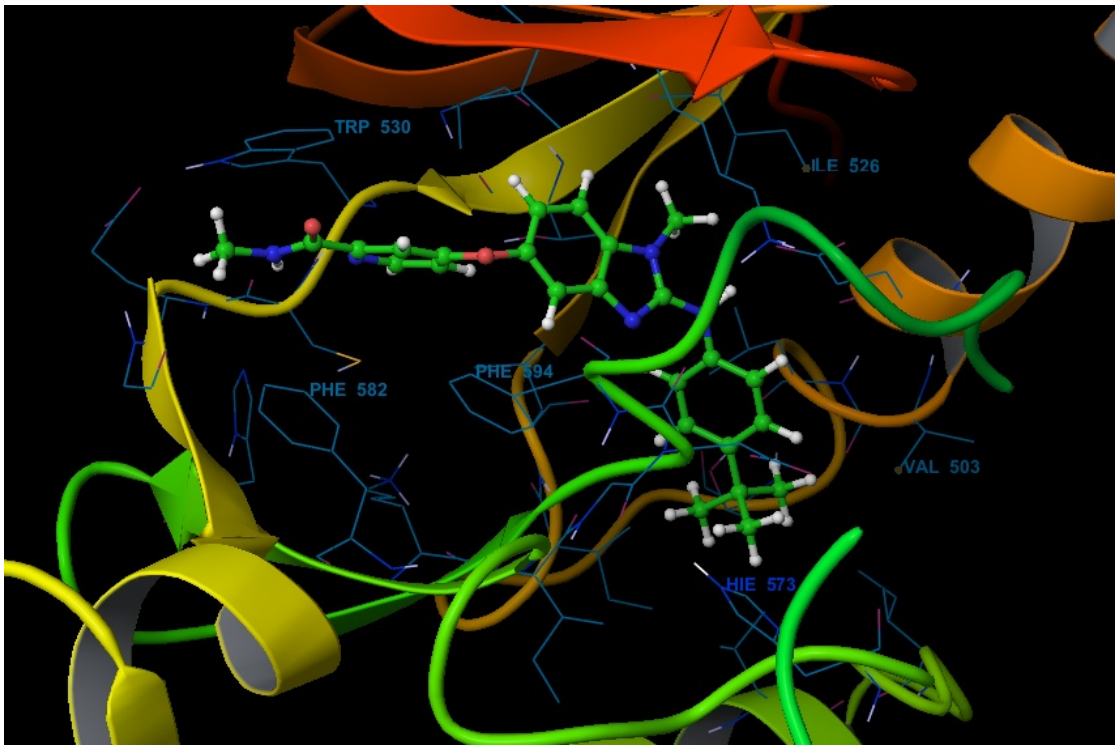

그림 1. B-Raf active site 에서의 binding poses.

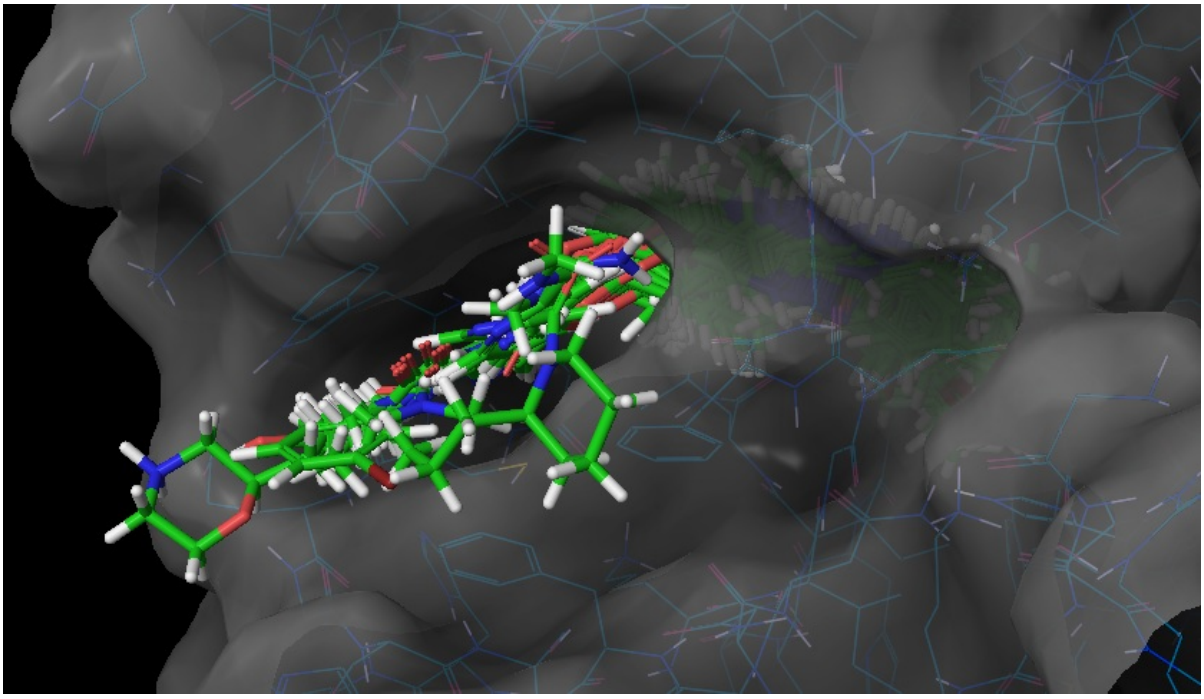

그림 2. The input ligands' conformations in the B-Raf active site

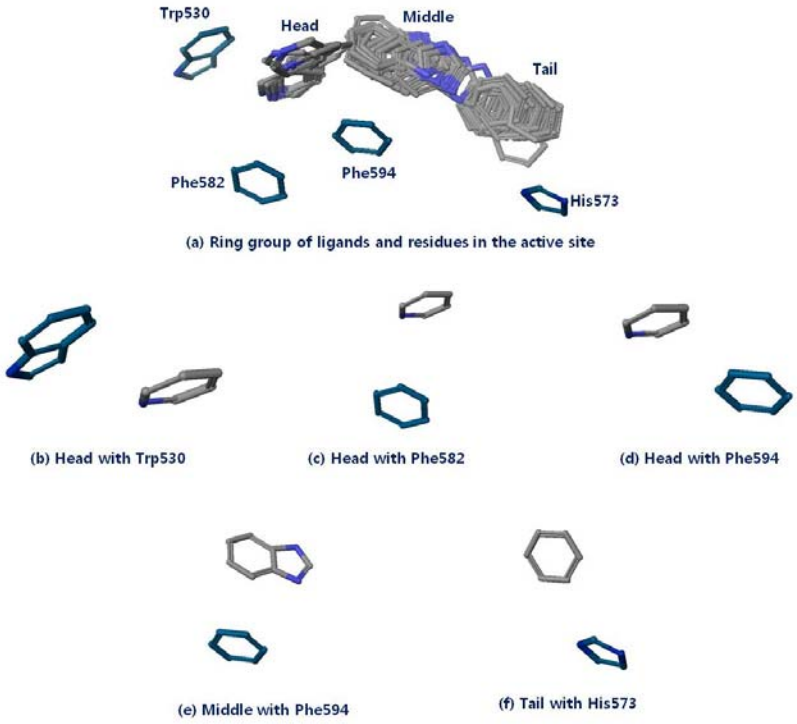

그림 3. Active site 에서 ligand 와 residues 사이의 방향족 고리의 π-π interaction.

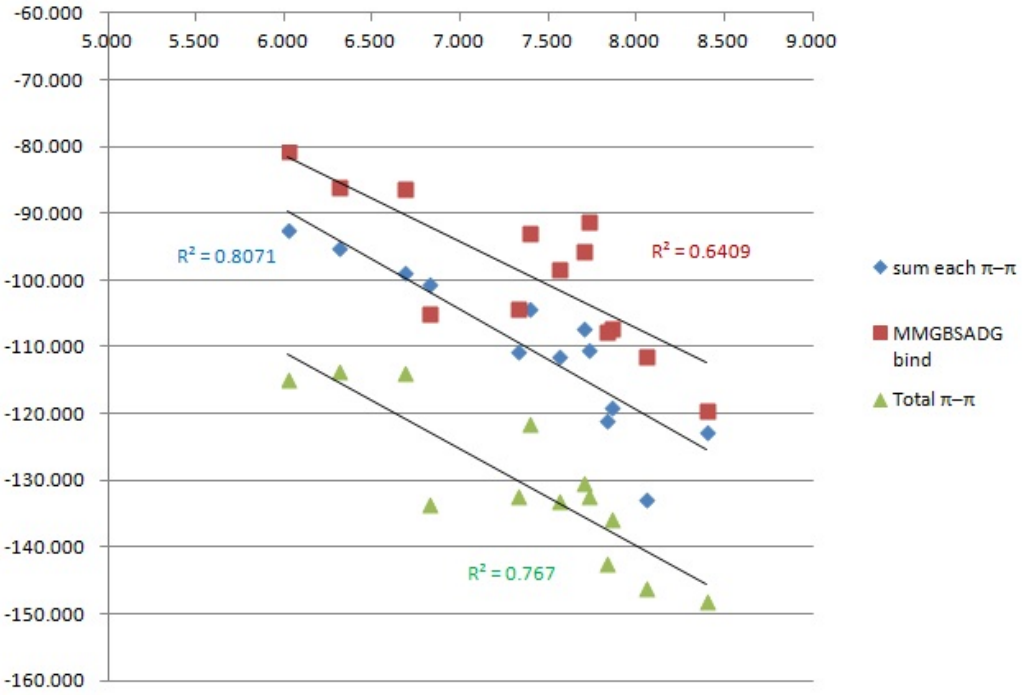

그림 4. 각 에너지 값과 ligand 의 활성값의 상관관계 그래프.

No	CHEMBL ID	Molecular Formula	Value (nM)	Assay Type	pIC50
01	CHEMBL511836	C25 H27 N5 O2	9.0	IC50	8.046
02	CHEMBL470591	C22 H18 F3 N5 O2	150	IC50	6.824
03	CHEMBL472450	C21 H16 F3 N5 O2	20.0	IC50	7.699
04	CHEMBL471407	C24 H25 N5 O2	15.0	IC50	7.824
05	CHEMBL471408	C21 H19 N5 O2	48.0	IC50	7.319
06	CHEMBL486137	C22 H20 Br N5 O3	4.0	IC50	8.398
07	CHEMBL470359	C22 H20 Br N5 O2	14.0	IC50	7.854
08	CHEMBL472448	C20 H16 Br N5 O2	19.0	IC50	7.721
09	CHEMBL472449	C21 H16 F3 N5 O2	950.0	IC50	6.022
10	CHEMBL519065	C20 H16 Br N5 O2	210.0	IC50	6.678
11	CHEMBL486943	C20 H16 Br N5 O2	490.0	IC50	6.310
12	CHEMBL472652	C22 H27 N5 O2	28.0	IC50	7.553
13	CHEMBL486341	C28 H30 Br N5 O2	41.0	IC50	7.387

표 1. The structures and observed B-Raf inhibitor activities.

No	Head[A]	Trp530[B] : -360.067		Phe582[B] : -230.054		Phe594[B] : -230.054		Middle [A]	Phe594[B] : -230.054		Tail[A]	His573[B] : -223.408	
		complex [AB]	[AB]-[A]-[B]	complex [AB]	[AB]-[A]-[B]	complex [AB]	[AB]-[A]-[B]		complex [AB]	[AB]-[A]-[B]		complex [AB]	[AB]-[A]-[B]
1	-243.271	-603.392	0.054	-473.155	-0.170	-473.157	-0.168	-373.353	-603.406	-0.001	-226.493	-449.901	0.000
2	-243.271	-603.393	0.055	-473.156	-0.169	-473.157	-0.168	-373.352	-603.405	-0.001	-226.492	-449.900	0.000
3	-243.268	-603.391	0.056	-473.150	-0.172	-473.155	-0.167	-373.343	-603.394	-0.002	-226.493	-449.901	0.000
4	-243.269	-603.392	0.056	-473.152	-0.171	-473.155	-0.168	-373.348	-603.401	-0.001	-226.493	-449.901	0.000
5	-243.290	-603.391	0.034	-473.154	-0.190	-473.156	-0.188	-373.352	-603.405	-0.001	-226.491	-449.899	0.000
6	-243.291	-603.392	0.034	-473.153	-0.193	-473.158	-0.187	-373.348	-603.401	-0.001	-226.492	-449.900	0.000
7	-243.290	-603.391	0.034	-473.154	-0.191	-473.156	-0.188	-373.347	-603.400	-0.001	-226.492	-449.900	0.000
8	-243.292	-603.393	0.035	-473.156	-0.190	-473.157	-0.189	-373.350	-603.403	-0.001	-226.491	-449.899	0.000
9	-243.291	-603.393	0.035	-473.147	-0.197	-473.168	-0.177	-373.346	-603.399	-0.001	-226.494	-449.902	0.000
10	-243.269	-603.392	0.056	-473.148	-0.174	-473.169	-0.154	-373.342	-603.393	-0.003	-226.492	-449.900	0.000
11	-243.270	-603.393	0.056	-473.149	-0.175	-473.169	-0.154	-373.341	-603.393	-0.002	-226.492	-449.900	-0.001
12	-243.290	-603.392	0.034	-473.154	-0.190	-473.158	-0.186	-372.998	-603.020	-0.032	-226.448	-450.008	0.153
13	-243.271	-603.394	0.056	-473.150	-0.175	-473.164	-0.161	-373.351	-603.404	0.000	-226.493	-449.900	0.000

표 2. π–π interaction energies using Gaussian between ring groups of ligands and the active site of B-Raf.

No.	pIC50	MMGBSADG bind	sum each π–π	Total π–π
1	8.046	-111.409	-132.861	-146.109
2	6.824	-105.003	-100.603	-133.403
3	7.699	-95.658	-107.187	-130.158
4	7.824	-107.615	-120.874	-142.215
5	7.319	-104.109	-110.558	-132.309
6	8.398	-119.561	-122.709	-148.061
7	7.854	-107.274	-118.915	-135.674
8	7.721	-91.082	-110.428	-132.171
9	6.022	-80.715	-92.515	-114.715
10	6.678	-86.255	-98.755	-113.755
11	6.310	-86.069	-95.069	-113.669
12	7.553	-98.428	-111.371	-132.928
13	7.387	-92.887	-104.309	-121.387

표 3. Summary of the observed data, binding affinity values by MMGBSA, and π–π

interaction energies.

결론

본 연구에서는 B-Raf protein 의 active site 에서 receptor-ligand 의 결합에너지를 측정하는 과정에서 π–π interaction 때문에 정확하게 측정하기 어려운 문제점을 양자역학 계산을 통해서 정확도를 높이는 방법을 살펴보았다. Gaussian 을 이용한 양자역학 에너지 계산은 π–π interaction 같은 정확한 에너지 계산이 어려운 구조의 문제점을 해결하는데 도움을 줄 수 있다. 이러한 연구 결과가 신 물질 개발이나 신약 개발 등의 다양한 분야에서 계산화학 방법이 신뢰성을 얻는데 도움 될 수 있다고 생각된다.

참고문헌

1. Jorgensen WL, "Rustin of the lock and key model for protein-ligand binding" Ssceince 254 (5034): 954-4 1991

2. Seifert MH.; Kraus J.; Kramer B. Virtual high-throughput screening of molecular databases. Current opinion in drug discovery & development 10 (3). 2007, 298-307.

3. Leach, A. R.; Shoichet, B. K.; Peishoff, C. E. J. Med. Chem. 2006, 49, 5851.

4. Sa´ ndor, Mr.; Kiss, R. B.; Keseru, G. M. J. Chem. Inf. Model 2010, 50, 1165.

5. Chung, J. Y.; Cho, J. S.; Cho, A. E.; Hah, J. M. "In silico binding free energy predictability with π–π interaction energy-augmented scoring function: Benzimidazole Raf inhibitors as a case study" 2012

6. Meyer, EA; Castellano, RK; Diederich, F (2003). "Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition". Angewandte Chemie (International ed. In English) 42 (11): 2003, 1210–50.

7. Cho, A. E.; Chung, J. Y.; Kim, M.; Park, K. J. Chem. Phys. 2009, 131, 134108.

8. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R. "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF". Cell 116 (6): 2004, 855–67.

9. Tsai J et al. "Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (8): 2008, 3041–6.

10. Bollag G et al. "Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma". Nature 467 (7315): 2010, 596–599.