

機関番号：32644

研究種目：基礎研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19200024

研究課題名(和文) 既存医薬分子-タンパク質相互作用の *in silico* 解析研究課題名(英文) *in silico* analysis of molecular interactions between commercially available drugs in Japan and proteins

研究代表者

平山 令明 (HIRAYAMA NORIAKI)

研究者番号：70238393

研究成果の概要(和文)：

生体内で機能する種々のタンパク質と医薬分子との相互作用を知ることは、医薬分子の開発研究や副作用の理解に有用である。これらの相互作用を全て実験的に求めることは事実上困難であるが、コンピュータによる解析 (*in silico* 解析) はそれを可能にする。本研究では、実験に匹敵する相互作用解析を可能にする新たな *in silico* 解析法を研究し、炭水化物の代謝に關与するタンパク質と既存医薬分子との相互作用解析にそれらを応用した。

研究成果の概要(英文)：

Understanding of modes of interactions between drugs and proteins is important to promote drug discovery and studies on side-effects of drugs. Although it is not practically possible to measure all the interactions experimentally, *in silico* methods are expected to become viable alternatives. In this project, we have studied novel methodologies essential for this purpose, and applied them to evaluate the interactions between commercially available drugs and proteins which are closely related to carbohydrate metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,400,000	3,720,000	16,120,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	20,300,000	6,090,000	26,390,000

研究分野：創薬科学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：医薬分子、タンパク質、分子認識、ドッキング、分子力学

1. 研究開始当初の背景

本研究の開始時には、ゲノム解析や構造生物学の成果を活用した新規の低分子性医薬分子(以下医薬分子)の探索・創製に多くの関心と期待が寄せられていた。医薬分子が生体内で直接的に相互作用し、薬理作用発現に第一義的に重要な役割を果たす生体高分子を標的分子と言い、その大部分はタンパク質である。高活性で低副作用の医薬分子は特定の標的分子と十分に強い相互作用をすると期待さ

れる。

一方、医薬分子は生体内で標的分子以外の複数のタンパク質と特異的ないし非特異的に作用する可能性も高く、それは副作用の発現につながる。既存医薬分子と生体内で重要な働きをするタンパク質(以下、重要タンパク質)との相互作用に関する知見は、医薬分子の副作用予測だけでなく、新規医薬分子の探索・創製上も極めて重要である。しかし、我々が既に臨床的に使用している医薬分子

(以降、既存医薬分子)と重要タンパク質との相互作用の組合せ数は極めて多く、それらを実験で全て測定することは絶望的に近い。一方、重要タンパク質のX線構造を基に、医薬分子との相互作用を*in silico*解析することは実現可能である。*in silico*解析は実験による確認が必要な医薬分子-タンパク質の組合せ数を大幅に絞り込めるだけでなく、相互作用に関する新知見をもたらす可能性も高い。

そこで、本研究では既存医薬分子と重要タンパク質の相互作用を*in silico*解析するために必要な方法の開発を行い、それらの方法を用いた具体的な相互作用解析を行うことにした。

2. 研究の目的

(1) 医薬分子化学構造データベースの再構築と標的タンパク質構造の選定

本研究開始前に研究代表者らは独自に構築した既存医薬分子のデータベースを保有していたが、本研究の為にその内容の大幅な改訂を行うと共に、医薬分子の代謝物で化学構造が既知のものはその構造もデータベースに含める。炭水化物の代謝に関係するタンパク質群 (proteins involved in carbohydrate metabolism:PCM) を標的タンパク質の対象に設定し、精度の高いX線構造をProtein Data Bank(PDB)から選択する。

(2) 医薬分子結合部位の予測アルゴリズムの研究

低分子性医薬分子の多くはタンパク質表面の窪み (concavity) に結合する。しかしタンパク質表面には類似の大きさのconcavityが通常は複数存在し、どのconcavityに医薬分子が結合するかが不明であることが多い。そこで、まずタンパク質のどの部分に医薬分子が結合しやすいかを予測する方法の研究を行う。この研究課題は本研究の中で重要な位置を占める。この方法で予測したconcavityに対する医薬分子の結合性を以下のドッキング・シミュレーションで行う。

(3) 医薬分子とタンパク質のドッキング・シミュレーションを行うアルゴリズムの研究

これまで研究代表者らが開発してきたドッキング法を本研究に適するように改良すると共に、最適なドッキング・プロトコルを作り上げる。

(4) ドッキング・シミュレーション結果の評価法の検討

ドッキング・シミュレーションで得られる結果を評価するために用いる尺度を決定するために適当なタンパク質-医薬分子系を用いて種々の評価関数を検討する。

(5) 医薬分子とPCMのドッキング・シミュレーションの実行およびその結果の解析

各既存医薬分子とPCMとの相互作用をドッキング法でシミュレーションし、各医薬分子

がそれらのタンパク質に対して与える影響について解析する。

3. 研究の方法

既存医薬分子のデータベースはまず化合物データベース・システムISIS/Base (MDL社製)を用いて整備し、それをプログラム・システムMOE (Molecular Operating Environment(カナダChemical Computing Group社製);本科学研究費補助金で使用ライセンスを購入)用のデータベースに変換し、ドッキング計算に使用した。重要タンパク質のX線構造はPDBから得た。

重要タンパク質における医薬分子結合部位の予測アルゴリズムおよびドッキング・アルゴリズムを実行するソフトウェアはMOEに実装されている科学ベクトル言語 (scientific vector language:SVL)を用いて作成した。すべての計算にはMOEを使用した。

本研究中に実行したすべての計算は本科学研究費補助金で購入したDell社製の3台のワークステーションおよび周辺機器を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 医薬分子化学構造データベースの再構築とPCMデータベースの構築

所期の目的の通り、本研究に用いる医薬分子と標的タンパク質のデータベースを各々整備した。

(2) 医薬分子結合部位の予測法の研究

重要タンパク質の医薬分子結合部位を予測するために、医薬分子 (または医薬様分子) とその標的分子との複合体の高質X線構造を活用して、結合部位を予測する方法を研究した。その結果、医薬分子の結合部位付近に出現するアミノ酸は特徴的な組成を示すことが明らかになった。そこで、concavity周辺のアミノ酸組成を用いて医薬分子の結合性を表現する医薬分子結合選好指数 (PLB (propensity of ligand binding) 指数) を考案した。検討の結果、このPLB指数は、複数の結合部位候補の中から医薬分子が結合する特定の部位を高い確率で予測できることが明らかになった。タンパク質表面にあるconcavity周辺のアミノ酸組成を計算するだけで、その部位の医薬分子結合性を高い確度で予測できるこの方法の発見は、本研究の中でも最も特筆すべき成果である。

PLB指数による医薬分子結合部位予測の成功は、タンパク質の機能とアミノ酸の局所的な組成の間に一般的な関係が成り立つことを強く示唆した。そこで、PLB指数については、本研究期間中に更にその応用範囲の拡張を図った。タンパク質には医薬分子に限らず、その機能と密接に関わる様々な種類の低分子 (例えば、補酵素など) が結合する。解析の

結果、これらの分子が結合する部位もPLB指数を用いると良好に予測できることが明らかになった。すなわち興味深いことには、共通の化学的特徴を持つ低分子の結合部位は、その部分に集合するアミノ酸の組成によって強く決定されている。この関連の発見は、タンパク質-低分子相互作用と化学進化の関係を考察する上で重要な意味を持つと思われる。さらに、この考え方をタンパク質-タンパク質相互作用についても応用できないかと考え、本研究期間の最終段階では、PLB指数を特定の抗体に対するエピトープ予測に応用したところ、既存の他の方法より有意に高い確度で予測できることが確認された。

以下のドッキング計算においては、PLB指数の最も高い部位を医薬分子結合部位とした。

(3) ドッキング計算のアルゴリズム改良

本研究の開始前に研究代表者らが開発したソフトウェアPh4Dockを大幅に改良してASEDockを新たに開発した。水素結合等に関与するファーマコフォア(pharmacophore)を活用するPh4Dockは高機能であったが、少数の分子系でのドッキングにおいて問題点を持っていた。この点を改良する為にASEDockでは結合部位のconcavityと低分子の形の相補性を第一義的に活用するアルゴリズムを採用した。その結果、Ph4Dockよりずっと良好なドッキング性能を様々な医薬分子-タンパク質系で示すことが分かった。そこで、本研究でのドッキング計算にはこのASEDockを用いた。

(4) concavityと医薬分子の適合性解析を行うASF法の開発

concavityの周辺にあるアミノ酸からの影響を直接的に受けるconcavity内の領域は、concavityに結合する擬似的な分子に相当すると考えられる。この擬似分子に対応する化学構造が推定出来れば、特定のconcavityに結合できる分子群を予め選択し、効率的にドッキング計算を行うことが可能になる。この目的でAlpha Site Filter (ASF) 法を開発した。この方法を活用すると、ドッキングすべき分子数を大幅に減少できる。ASF法の開発はドッキング計算の実行と同時進行的に行われたので、残念ながら本研究で行ったドッキング計算に実際に応用することはできなかった。

(5) ドッキング・シミュレーション結果の評価法の検討

ヒト血漿アルブミン(HSA)には種々の医薬分子が結合して、それらの医薬分子の体内動態に大きな影響を与える。HSAには医薬分子が結合できる複数のconcavityがあるが、NSAID(nonsteroidal antiinflammatory drug)類が特徴的に結合する部位はsite IIと呼ばれており、複数のNSAIDがsite IIに結合することが実験的に確認されている。そこで、これらの分子の結合性を予測できる評価関数を求めた。その結果、ASEDockで相互作用エ

ネルギーとして計算する U_{dock} を医薬分子に含まれる非水素原子の数(N)で除した量が適切であることが分かった。 $U_{dock}=U_{ele}+U_{vdw}+U_{strain}$ であり、 U_{ele} および U_{vdw} は医薬分子とタンパク質間の静電およびvan der Waals相互作用エネルギーを、 U_{strain} は医薬分子の歪みエネルギーを示す。 U_{dock}/N は一般にligand efficiency(LE)と呼ばれる値に対応しており、ここでは $LE_{U_{dock}}$ と呼ぶことにする。HSA-医薬分子の系では $LE_{U_{dock}}$ を評価関数に用いると、実験的に結合性が確認されている分子を良好に選択することができた。そこで本研究では $LE_{U_{dock}}$ の値を用いてドッキング結果を評価することにした。

(6) 医薬分子とタンパク質のドッキング・シミュレーションおよびその結果の解析

医薬分子とPCMの相互作用エネルギー $LE_{U_{dock}}$ が -5kcal/mol 、 -10kcal/mol および -20kcal/mol 以下の医薬分子-PCMの組合せの数は各々5551、709および71であった。 -20kcal/mol 以下の組合せは相互作用がかなり強いことを意味する。ここでは、特にこの強い相互作用を示した医薬分子-PCM組合せについて、その特徴の概要を述べる。

このような強い相互作用を示した医薬分子は31種類あり、その中には骨粗鬆治療薬、抗菌薬および降圧薬が各々6分子含まれ、これらの医薬分子が炭水化物の代謝に少なからず影響を与えることが強く示唆された。bisphosphonate系の骨粗鬆治療薬は多くのPCMと強く結合することが示唆されたが、既に幾つかのPCMとbisphosphonate系分子との相互作用については研究報告がある。特にetidronic acidは13種のPCMと強い相互作用をすることから、この医薬分子は炭水化物代謝に対してかなり強力かつ広範な影響を与えることが示唆される。医薬分子と強い相互作用をするPCMにも特徴が見られ、多くの医薬分子との相互作用が見られたPCMはその頻度の順にinositol monophosphatase (21)、galactokinase(10)、phosphomannomutase(8)、aldorase(5)、enolase(4)およびGAPDH(4)であった。括弧内は各PCMと相互作用する医薬分子の種類である。これら6種類のPCMで今回計算に用いたPCMの73%を占める。これらのPCMは医薬分子によってその機能が大きく影響される可能性がある。また強い相互作用に関与するPCMは全部で20種類であった。以上の結果は特定のPCMと特定の医薬分子の親和性が高いことを示しており、これらの医薬分子の副作用を考える上で非常に重要な知見と思われる。

PCMと医薬分子の相互作用は生体内で起こるので、生体内に存在する他の分子の影響が相互作用に少なからず影響を与えることは充分考えられる。則ち、純粋な二元系でシミュレーションしている本研究結果が生体内

での状況を実現しているとは言い難い。しかし、強力な相互作用を示す医薬分子については、そのような作用が生体内でも少なからず起こることが強く予想される。従って、これらの医薬分子の作用と副作用を明確に理解する上で、それらの相互作用を実験的に検証することの重要性は高いと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計9件)

- (1) S. Soga, D. Kuroda, H. Shirai, M. Kobori and N. Hirayama, 'Use of amino acid composition to predict epitope residues of individual antibodies', *Protein Eng. Des. Sel.*, **23**, 441-448 (2010) (査読有)
- (2) K. Toda, J. Goto and N. Hirayama, 'A novel target-based *de novo* ligand design by use of pseudomolecular probe', *Med. Chem. Comm.*, **1**, 349-354 (2010) (査読有)
- (3) H. Muta and N. Hirayama, 'Alpha Sphere Filter Method: Application of Pseudomolecular Descriptors in Virtual Screening of 2D Chemical Structures', *J. Comput. Chem.*, **31**, 2225-2232 (2010) (査読有)
- (4) 東田欣也、後藤純一、平山令明、「擬似分子プローブと標的分子構造に基づく *de novo* 医薬分子設計法の開発」、*SAR News* **16**, 16-20 (2009) (査読有)
- (5) S. Soga, H. Shirai, M. Kobori and N. Hirayama, 'Chemocavity: specific concavity in protein reserved for the binding of biologically functional small molecules', *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 1679-1685 (2008) (査読有)
- (6) N. Hirayama, S. Soga, H. Shirai and M. Kobori, 'Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites', *Drugs of the Future*, **33A**, 76 (2008). (査読有)
- (7) J. Goto, R. Kataoka, H. Muta and N. Hirayama, 'ASEDock-Docking Based on Alpha Spheres and Excluded Volumes', *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, (2008) (査読有)
- (8) S. Soga, H. Shirai, M. Kobori and N. Hirayama, 'Identification of the druggable concavity in homology models using the PLB index', *J. Chem. Inf. Model.*, **47**, 2287-2292 (2007) (査読有)
- (9) S. Soga, H. Shirai, M. Kobori and N. Hirayama, 'Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites', *J. Chem. Inf. Model.*, **47**, 400-406 (2007) (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 平山令明、「*in silico*創薬科学は稀少疾患治療薬の研究開発を可能にするか？」CBI学会2010年大会、2010年9月15日(学術総合センター(東京))
- (2) 曾我真司、白井宏樹、小堀正人、平山令明、「アミノ酸組成を利用した医薬分子結合部位の予測」CBI学会2010年大会、2010年9月16日(学術総合センター(東京))
- (3) 平山令明、「コンピュータを用いた合理的創薬法の現状とその可能性」第25回日本整形外科学会基礎学術集会、2010年10月15日(国立京都国際会館(京都))
- (4) S. Soga, H. Shirai, M. Kobori and N. Hirayama, 'Chemocavity: Specific Concavity in Protein Reserved for the Binding of Biologically Functional Small Molecules' 17th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) and 8th European Conference on Computational Biology (ECCB), 2009年7月1日(ストックホルム、スウェーデン)
- (5) 朝川直行、小林誠一、後藤純一、平山令明、「AutoGPAモデルによる受容体ポケットの特徴抽出」第37回構造活性関連シンポジウム、2009年11月12日(北里大学薬学部(東京))
- (6) 平山令明、「PLB法を用いた低分子結合部位の差別化」第10回日本バイオインフォマティクス学会創薬インフォマティクス研究会、2009年12月2日(産総研 臨海副都心センター(東京))
- (7) 曾我真司、白井宏樹、小堀正人、平山令明「アミノ酸の共起性から見た蛋白質の低分子化合物結合部位」第8回日本蛋白質科学会年会、2008年6月10日(タワーホール船堀(東京))
- (8) N. Hirayama, 'Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites' XXth International Symposium on Medicinal Chemistry, 2008年9月4日(ウイーン(オーストリア))
- (9) 曾我真司、白井宏樹、小堀正人、平山令明「アミノ酸の共起性から見た蛋白質の低分子化合物結合部位」第36回構造活性関連シンポジウム、2008年11月3日(神戸国際会議場(神戸))

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
平山 令明 (HIRAYAMA NORIAKI)
研究者番号: 70238393
- (2) 研究分担者
牟田 元 (MUTA HAJIME)
研究者番号: 80384923
(2007年-2008年)