

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790032

研究課題名 (和文) 溶媒双極子場を利用した創薬プログラムの開発

研究課題名 (英文) A Drug Discovery Program Development Based on Solvent Dipole Ordering

研究代表者

村田 克美 (MURATA KATSUMI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80372556

研究成果の概要(和文):本研究では、溶媒双極子場に基づいた創薬プログラムの開発を行った。このプログラムを ALR2、CDK2、InhA、PDE5 の 4 種類の蛋白質に適用し、バーチャルスクリーニングを行ったところ、活性化化合物がヒットすることが確認できた。また、既存のプログラム (FRED) を使用した場合よりも、高いヒット率が得られることが示された。

研究成果の概要 (英文) : We developed a drug discovery program based on solvent dipole ordering. This program was applied to virtual screening of ligands for four typical drug target proteins and the performance compared with that of FRED (well-known rigid docking method); the efficiency of our program was demonstrated to be better than FRED.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：計算化学、生物物理、創薬

1. 研究開始当初の背景

(1) コンピュータによる薬物設計は、理論と情報に基づいて論理的に分子を設計することで、新薬開発をスピードアップとコストダウンの点で効率を上げることを目指している。近年、タンパク質結晶解析をはじめとする構造生物学の進歩によって多数のタンパク質の立体構造やリガンドとの分子間相互作用が解明され、コンピュータの性能や利用技術の飛躍的向上により、コンピュータによる薬

物設計が実用的なレベルに到達しつつある。

(2) これまでに、新規なリガンドをデザインするためにプログラムは多数考案されているが、大きく分けると Atom growing 法とフラグメント法の 2 種類に分けることができる。Atom growing 法は、活性部位に当てはまる化合物を原始単位で発生させていく方法で、LEGEND、GENSTAR、RASSE といったプログラムがある。この方法は、受容体の構造

から分子を創成する最も直接的な方法であるが、計算機が自動生成した化学構造は必ずしも化学者の視点から合理的なものになっていないことが多い。例えば、結合に無関係な置換基が生成されてしまう、フレキシブルな骨格の分子が数多く発生する、受容体との水素結合があまり形成されない、といった問題が生ずる。一方、フラグメント法は、活性部位の異なる位置に当てはまるフラグメントを発生させた後、それらをつなぎあわせていく方法で、LUDI、MCSS/HOOKS、SPROUTなどのプログラムがある。この方法では、フラグメントの組み合わせによりバラエティーに富んだ分子が生成されるが、フラグメントの最適位置を保持しながらフラグメント間を連結するのは難しい。また、選択するフラグメントの種類によっては結合ポケットをうまく埋めることができない事も考えられる。そこで、本研究により、溶媒双極子場を用いることで、既存のプログラムの問題のいくつかを解決できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

タンパク質と結合するリガンドはタンパク質と相互作用しており、活性部位のポケットと相補的な形をしている。一方、リガンドが結合していないときは、活性部位のポケットは水分子で埋められており、この水分子は、タンパク質と相補的なパターンを形成していると考えられる。実際に活性部位に残留している溶媒双極子場のパターンを見ても、リガンドの形と一致していることがいくつかのタンパク質で確認された。本研究では、溶媒双極子場を利用することで、既存のプログラムでは生成できないような新規なリガンドを効率的に生成できるプログラムを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究の特徴である溶媒双極子場を利用する最大の利点は、分子の形状において相補性の良いリガンドが得られる点にあり、この点を常に意識して研究を進めていった。まず、抽象的なリガンドを生成することを最初の目標とした。具体的には、溶媒双極子場のパターンと一致する sp^3 炭素のみで繋がれたリガンドを生成するプログラムを作成する。その後、 sp^2 炭素、 sp 炭素も生成できるようにプログラムを拡張していく。これにより、活性部位の形と相補性の良いリガンドの基本骨格が得られる。

(2) 次に、タンパク質とリガンドの水素結合について考える。水素結合が分子認識において重要な役割を果たすことは、多くのリガンド-受容体複合体構造や部位特異的アミノ

酸置換による変異受容体のリガンド結合実験から示されている。そこで、水素結合を形成する部位を溶媒双極子場のパターンから同定する機能をプログラムに組み込む。

(3) 以上のプログラムの作成に当たり、使用するタンパク質としては、FKBP、p38 (キナーゼ)、ER (核内受容体)、エラスターゼ (プロテアーゼ) などバラエティーに富んだタンパク質で行う。これらのタンパク質において、すでに得られているリガンドとの複合体結晶構造と作成したリガンドを重ね合わせてみることで、結果の妥当性を検証する。

4. 研究成果

(1) まず、リガンド生成プログラムを作成するために必要な基礎事項の検討を行った。使用したタンパク質は、FKBP、p38 (キナーゼ)、ER (核内受容体)、FXa (プロテアーゼ) の 4 種類であり、作成するプログラムの汎用性の検討も行った。まず、各タンパク質について、分子動力学計算を実行し、活性部位付近の水分子の双極子場のパターンを計算した (図 1)。

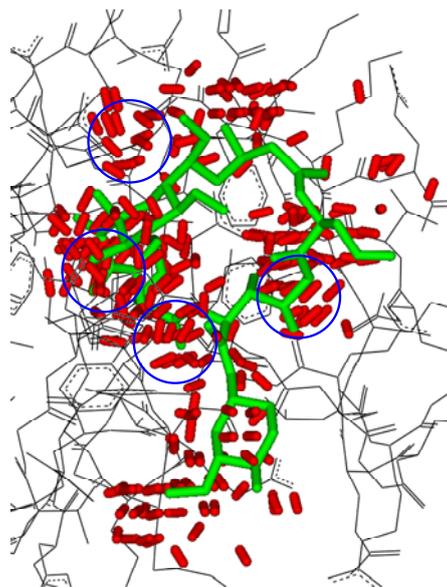


図 1 FKBP のリガンド(緑)と水分子の双極子場のパターン(赤)

次に、このパターンと一致する sp^3 炭素のみで繋がれたリガンドの骨格を生成するプログラムを作成した。作成したプログラムを用いて、各タンパク質に対して 100 個のリガンド骨格を生成した所、これらの中に実際の結晶構造中のリガンドと形が一致する物が数多く含まれることが確かめられた。さらに、リガンドの骨格を sp^3 炭素だけではなく、 sp^2 炭素も用いて形成されるようにプログラム

の機能の拡張を行った。その結果、より多くの実物のリガンドと形が一致する骨格を作ることが可能となった。以上により、本研究で作成したプログラムを使い、活性部位の形と相補性の良いリガンドの基本骨格が、4種類のバラエティーに富んだタンパク質で得られることが確認された。また、水素結合を形成する部位を溶媒双極子場のパターンから同定し、その部分は炭素ではなくヘテロ原子にする機能をプログラムに組み込んだ。これにより、実際の化合物に近いリガンドの骨格が作成できるようになった(図2)。

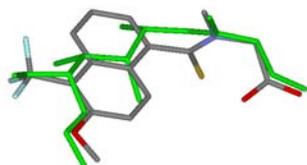


図2 作成されたリガンド(緑)と実際のリガンドとの重ね合わせ

(2)次に、リガンドの基本骨格をもとに、drug-like なリガンドを生成することを考えた。まず、既知の医薬品ライブラリー中の化合物をフラグメント化したフラグメントライブラリーを作成し、これと対応する溶媒双極子場のパターンとの”フラグメント-溶媒双極子場マップ”を作成した。そして実際のタンパク質に対して計算した活性部位内の溶媒双極子場を適当な大きさに分割し、これをあらかじめ作っておいた”フラグメント-溶媒双極子場マップ”を参照して、フラグメントに置き換え、リガンドの基本骨格と重ね合わせ、重複する部分を上手く削除することで、リガンドを作成する機能をプログラムに組み込んだ。このプログラムを用いて生成されたリガンドが、相補性が良い形状を持ち、且つ drug-like であるかどうかの検証を、初年度と同様に4種類のタンパク質、FKBP、p38(キナーゼ)、ER(核内受容体)、FXa(プロテアーゼ)に対して行った。その結果、これらのタンパク質の既知リガンドと同様の結合様式を持ち、タンパク質と相補性が良い形状の化合物を得ることに成功した。また、これらの化合物に対して openeye 社の filter モジュールを用いて drug-like か否かを検証したところ、drug-like な化合物と判断されるものが数種類確認された。

(3)ここまでは、タンパク質を剛体と近似し、活性部位の形は結晶構造から得られる形をそのまま用いた。しかしながら、結晶構造は、タンパク質の取り得るさまざまな構造の一つであり、溶液中や活性発現過程ではさらに多数の構造が連続的に存在する。また、結合

するリガンドの種類によっても、さまざまな構造を取り得る。この点を考慮することができれば、新規なリガンドを数多く生成できると考えられるため、この問題に取り組んだ。具体的には、分子動力学シミュレーションでタンパク質の構造変化をシミュレートする。ただし、通常分子動力学シミュレーションでは、系がエネルギー曲面の極小状態にとどまってしまい、大きな構造変化が起こらない場合も考えられる。この問題を解決するために拡張アンサンブル法を用いる。拡張アンサンブル法は、エネルギー極小状態から抜け出し、幅広い構造をサンプリングすることができる手法である。元々は、物性物理分野で開発された手法であるが、近年、タンパク質、核酸などの生体分子にも応用されるようになってきた。これにより得られたタンパク質のさまざまな構造の各々に対して溶媒双極子場を計算して、開発したプログラムを用いてリガンドを生成した結果、構造に多様性を持ったリガンドの生成に成功した。

(4)本研究で開発したプログラムで作成したリガンドをクエリとして、ALR2、CDK2、InhA、PDE5の4種類の蛋白質に対してバーチャルスクリーニングを行ったところ(この方法を SDOVS と名付けた)、活性化合物がヒットすることが確認できた。また、6つのスコア関数(SG、CG、PLP、CS、SS、ZAP)を用いて効率を、既存のプログラム(FRED)を使用した場合よりも、高いヒット率が得られることが示された(図3)。

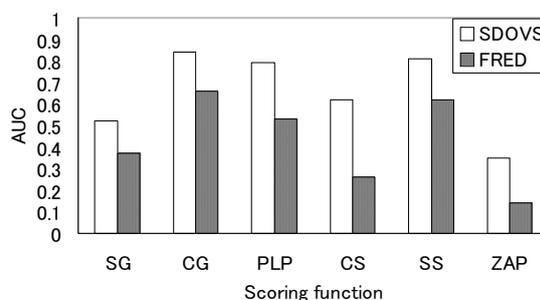


図3 SDOVS と FRED との AUC の比較 (AUC が 1 に近いほどヒット率が高い)

また、CK2 という腎炎治療薬の標的蛋白質に対して、300万化合物からなる市販試薬ライブラリーから本研究で開発したプログラムを用いて、100化合物を選抜し、実験で阻害活性を測定した。その結果、構造に多様性のある20個の新規阻害剤分子を見出すことに成功した(30 μ M で50%以上の酵素阻害能のあるものをヒットと定義した)。通常、バーチャルスクリーニングでのヒット率は10%もあれば良い方であるが、その3倍の30%のヒット率が得られた。今後の研究では、

プログラムの適用の成功例を増やすとともに、さらなるヒット率の向上を目指してプログラムを改良していく。

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 1 件)

① 村田克美、永田尚也、仲西功、北浦和夫、
Ligand Shape Emerges in Solvent Dipole
Ordering Region at Ligand Binding Site of
Protein、Journal of Computational
Chemistry、査読有、31 巻、2010、791-796

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 克美 (MURATA KATSUMI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80372556