

シミュレーション技術を活用した分子構造基盤薬物設計の研究

工業材料科 主任研究員 重光保博

タンパク質や DNA 等の生体分子をターゲットとした高精度量子計算手法の活用を通じて、創薬分野へのシミュレーション技術導入が積極的に試みられている。次世代創薬技術として実験プロセスをシミュレーションで代替する *in silico* 創薬技術への移行が期待される。本研究では、原子電子レベルシミュレーションをいくつかのモデル系に対して実行し、その有効性を検討する。

1. 緒言

新薬開発の最初のステップは候補化合物を効率よく発見することであるが、特定分子種に偏らないよう化学的多様性を有する候補化合物をバランス良く選出することが後の最適化ステップにおいて重要となる。創薬の現場では、大規模な化合物ライブラリをコンビナトリアルケミストリ (CC) で合成し、その活性をハイスループットスクリーニング (HTS) によって高速に判定する手法が普及している。しかし偶発的発見に頼る絨毯爆撃的探索では、膨大なコストに見合う成果を出すことがしだいに困難になっている。コンビナトリアルケミストリでは、化学的多様性を十分に反映させることが難しいことがその一因である。この問題解決のため、ケモインフォマティクスやシミュレーション手法の導入による探索効率化が模索されている。

標的タンパク質や候補化合物の立体構造情報に基づいた創薬 (SDBB) は、探索効率化の有力な手法であり、第一原理シミュレーションの活用が期待されている。現代の量子力学計算は、以前はアプローチ不可能であった生体高分子をその解析ターゲットとしつつある。薬効発現は複雑な代謝系を構成する高度に組織化された化学反応群から構成されており、各反応に関与する化合物の分子原子レベルの知見によって記述されるため、信頼性の高い創薬技術には量子力学に基づく第一原理シミュレーションが必要となる。SDBB の現場では、候補化合物の構造情報 (Ligand-base) や標的タンパク質の構造情報 (Structure-base) を用いて、化合物ライブラリの精密化が試みられている。実際 G タンパク質共役受容体 (GPCR) に対する Structure-base フォーカストライブラリが構築され、探索効率化が実証されている [1]。疾病の標的タンパク質やリガンドの多くはその構造が未知であるが、第一原理生体分子シミュレーションはこのような場合において SDBB

を可能にする汎用的手法として期待される。

2. 手法

2.1 Fragment MO (FMO) 法 [2]

従来の古典的計算法では、計算精度が不十分なため SDBB には信頼性限界がある。一方、高精度な第一原理計算は計算負荷が大きいため、巨大系に対応した理論と計算手法が必要となる。FMO 法はこの問題を解決する有力な手段であり、巨大分子を小さな構造単位 (Fragment) で分割し、各 Fragment の個別エネルギーを用いて、全系のエネルギーを外挿する手法である。計算コストを大きく軽減しつつ、従来の第一原理計算と同等の定量精度を保持しているため、水素結合や CH/ π 結合などの弱い相互作用が重要となる生体高分子の計算にも適応可能である。Fragment 間の相互作用も解析でき、タンパク質 - リガンド結合をアミノ酸残基単位で求めることができる利点もある。インフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質 - 受容体の相互作用解析 [3] などに適用され、生体分子を対象にした大規模高精度シミュレーションの有効性検証が進んでいる。

2.2 DJ - 1 タンパク質 [4]

ChainA/B からなる小タンパク質 J 1 (約 22kDa, 378 残基) は、家族性パーキンソン病 PARK 7 因子をはじめ、活性酸素制御、生殖機能、乳がんバイオマーカーなど様々な機能に関与していることが報告されている。Chain A 中に存在する Cys106 の酸化による変異が重要な役割を果たしていると考えられ、このサイトに結合するアンタゴニストを *in silico* スクリーニングを用いて化合物ライブラリから絞り込み、水晶振動子マイクロバランス法で求めた結合親和性と一致した結果が得られている [4]。酸化型 / 還元型 DJ 1 のそ

れぞれに対して、約30000個の化合物ライブラリから、酸化型 / 還元型の C106 サイトとのドッキングスコアが高い化合物 (Compound A, Compound B)、酸化型とのドッキングスコアが低い化合物 (Compound C) のバーチャルスクリーニングを実行し、それらのサイト親和性が実験結果と一致することが示されている[4]

3 . 解析結果

本報告では、(1) 活性サイト C106 近傍の立体構造解析 (2) リガンド化合物 Compound A, B, C の電子状態解析を行った。

還元型 DJ 1 は Honbou らによる dimer データ (1 UCF) [5], 酸化型 DJ 1 は Blackinton らによる monomer データ (3 EGZ) [6] をそれぞれ用い、分子動力学法により系を平衡化させて平均構造を求めた。活性中心 C106 の硫黄原子 (S764) 近傍 3.5 オングストローム以内に存在するアミノ酸残基は、それぞれ GLU18 / HIS126 / ARG156 (還元型)、GLU18 / GLY75 / HIS126 / ARG156 (酸化型) であった。酸化に伴う大きな構造変化は起こっていないと考えられるが、酸化型では GLY75 の O536 が近接領域に入ってくる。これはスルフィン化に伴う微妙な構造変化を反映していると考えられる。還元型においては、C106 近傍には Chain B は存在せず、Chain 間の相互作用が及ぼす影響は無視できると考えられる。C106 は Chain A の表層部に位置しており、ちょうど HIS126 のイミダゾール基が「蓋をする」構造をとっている。S764 との主要な相互作用は HIS126 (N899) と推定され、硫黄原子のソフト性を考慮すると静電力のみではなく、 $\pi\pi$ や $\sigma\pi$ といった軌道相互作用が大きな役割を果たしていると推定される。

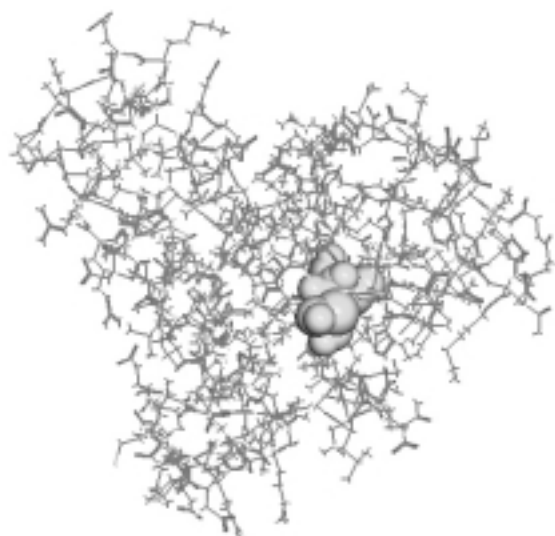


Figure 1 . DJ 1 タンパク質 (3 EGZ: Chain A) の構造と活性サイト C106 (酸化型)

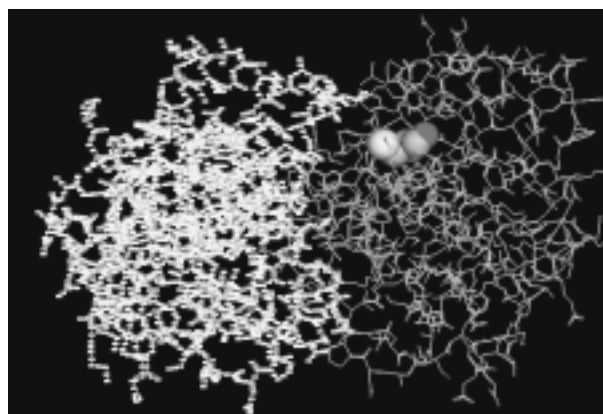


Figure 2 . DJ 1 の Chain A (stick 表示) と Chain B (黄色標記) および活性サイト C106 (CPK 表示 (還元型))

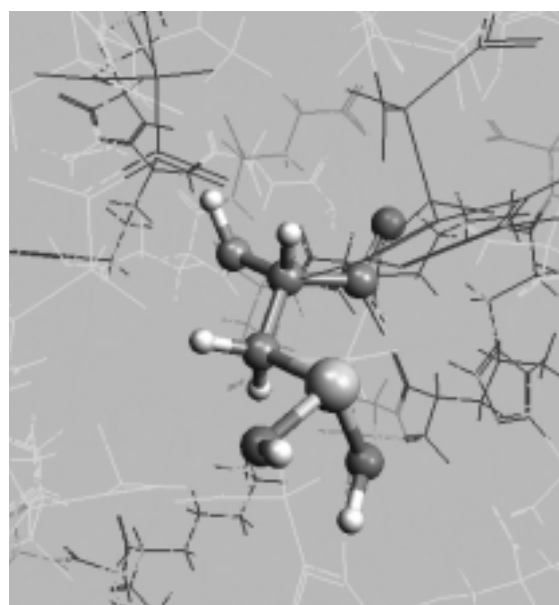


Figure 3 . DJ 1 の活性サイト C106 の拡大図 (酸化型)

活性化合物 (Compound A, B) および非活性化合物 (Compound C) について、量子化学計算により分子構造および電子構造を解析した。分子骨格の相補性が構造フィッティングにおいて重要であるが、フィッティング時のエネルギー安定化に関しては電子的相互作用が主要な役割を果たす。この点を明らかにするため、DFT (B3LYP) / 6-31G (d, p) 計算により HOMO/LUMO エネルギーレベルを求めた。低活性の Compound C は、顕著に低い LUMO レベルのため大きな Electron acceptor 能が示唆される。高活性の Compound A, B はそれぞれの分子末端に HOMO/LUMO 分布を有しているのに対して、Compound C では分子中央部に分布している。この分布の違いは、タンパク質 - リガンド相互作用においてフィッティング形状を決定する重要な要素と考えられる。Compound C は分子末端に HOMO/

LUMO 分布を持たないため、酵素ポケットとの相互作用ができず活性が低いと推測される。次に、各化合物の電荷分布から静電ポテンシャルを求め、フィッティング形状との相補性を考察した。高活性の Compound A, B については、分子末端に負のポテンシャル領域が存在するのに対して、低活性の Compound C の負ポテンシャル領域は分子中央に存在している。

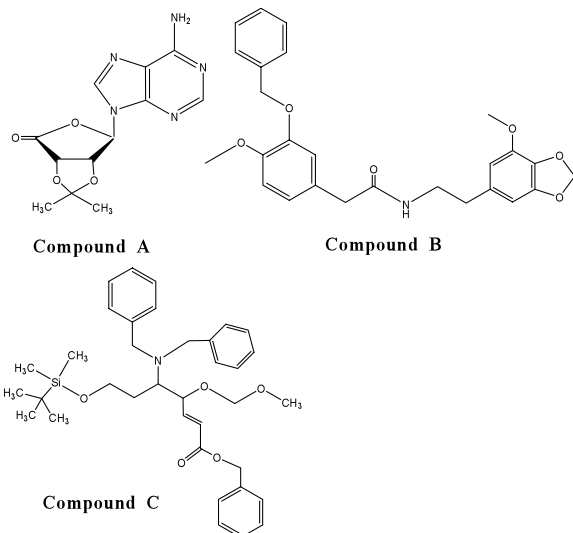


Figure 4 . リガンド化合物

Table1 .HOMO/LUMO levels of Compound A,B,C

entry	HOMO α (a.u.)	LUMO α (a.u.)
Compound A	0 .1407	0 .0630
Compound B	0 .1066	0 .0737
Compound C	0 .1101	0 .0471

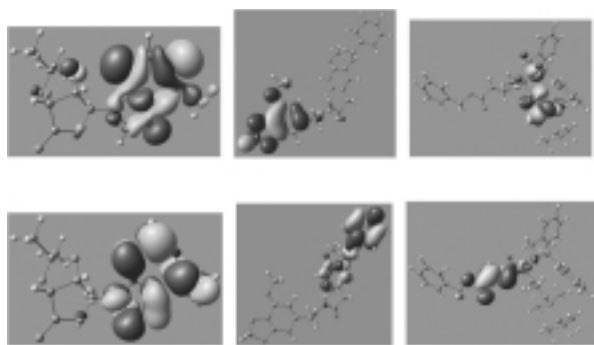


Figure 4 . HOMO (上) / LUMO (下) の分布。Compound A (左), Compound B (中央), Compound C (右)

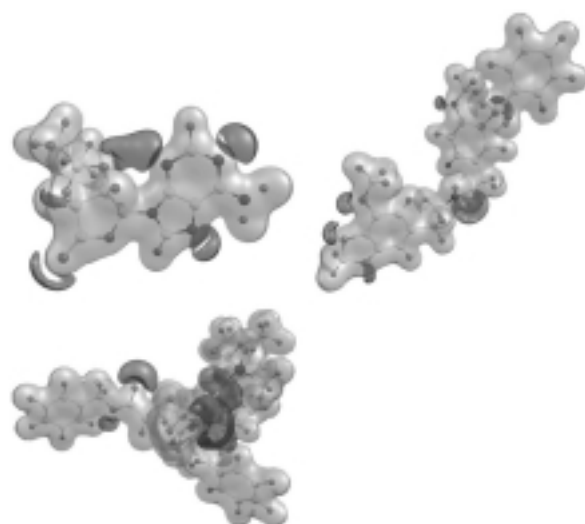


Figure 5 . 各化合物の静電ポテンシャル : Compound A (左上), Compound B (右上), Compound C (左下)

4 . 結 言

本研究では、第一原理計算に基づく高精度 *in silico* スクリーニングの有効性の確認、すなわち予測結果の改善を検証することが最終目的である。今回、DJ 1 をターゲットとした予備計算を行った。(1) DJ 1 の Cys106近傍の残基配置の解析 (2) 活性 / 非活性化合物 Compound A, B, C の電子状態計算を行い、鍵 - 鍵穴フィッティングの重要な情報である HOMO / LUMO 軌道分布や静電ポテンシャル分布を求めた。今後、Compound A, B, C の安定配座の数種類についてドッキングシミュレーションを実行し、タンパク質 - リガンド間の相互作用を詳細に分析する。

参考文献

- [1] 古谷利夫, *CICSJ Bulletin* 23 ,143 (2005)
- [2] 北浦和夫, 近畿化学協会コンピューター化学部会例会資料 (2007)
- [3] J.Iwata, U.Mochizuki, S.Tanaka et al., *Comp.Biol. Chem.*, 32,198(2008)
- [4] S.Miyazaki, T.Yanagida, M.Ariga et al, *J.Neurochemistry*, 105, 2418 - 2434(2008)
- [5] K.Honbou, N.N.Suzuki, M.Horiuchi et al., *J.Biol. Chem.* 278 31380 (2003)
- [6] J.Blackinton et al, *J.Biol.Chem.* 284 6476 (2009)