



技術解説

計算化学的手法による新規活性化合物の探索

仲 西 功*

Discovery of Novel Bioactive Compounds by *in silico* methodsKey Words : SBDD, *de novo* design, virtual screening, lead generation, computational chemistry

はじめに

生理活性物質がその受容体(酵素などの蛋白質)に結合し、活性を発現する現象は“鍵”と“鍵穴”にたとえられる。すなわち“鍵”である生理活性物質が、“鍵穴”である受容体蛋白質の活性ポケットに当てはまることにより、その生体反応が始まり薬理作用を発現する。近年、蛋白質のクローニング技術が発達し、“鍵穴”である受容体蛋白質を容易に入手できるようになり、その立体構造がX線結晶構造解析やNMRにより迅速に解明されるようになってきた。その結果、“鍵穴”の精密な立体構造をもとに“鍵”となる化合物を論理的・効率的にデザインする Structure-Based Drug Design(以下SBDDと略す)技術が注目され、これまでにいくつかの成功例が報告されている¹⁻³。

この技術は当初、既存のリガンド分子の活性を向上させる、あるいは活性の変化を論理的に解明するのに非常に有効なことがチミジル酸合成酵素やプリンヌクレオシドホスホリラーゼの阻害剤の最適化研究において示された^{1,2}。その後HIVプロテアーゼにおいて既存の阻害剤との複合体構造から新規骨格を持つ化合物の創出例が報告され³、シード/リードジェネレーションへの応用が期待されるようになった。しかしながら、たとえ活性部位の精密な3次元構造が与えられても、人間の感覚だけで活性ポケットに

適合する化合物を、全く新規にデザインすることは非常に困難なことである。この障壁を乗り越えるための手段として、計算化学的なアプローチが次々に考案されている。ここでは今日までに紹介されているものの中から、*de novo*デザイン法やデータベース探索法の代表的なものをいくつか紹介し、これらの方法が抱える問題点について解説する。また、薬物受容体の立体構造がわからない場合にも、既存のリガンドの構造と活性情報などから新規化合物を探索するLigand-based Drug Design(以下LBDDと略す)という方法も実用化されているので合わせて紹介する。

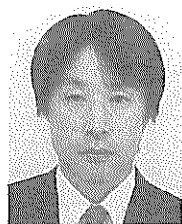
1. SBDDの成功事例

今日までにSBDDの応用事例が多く報告されているが、ここではわかりやすい例としてチミジル酸合成酵素(TS)阻害剤の活性向上研究について簡単に説明する⁴。TSは代表的な細胞増殖必須酵素で、その働きを抑制する薬物は制癌剤になり得ると考えられるため、制癌剤標的酵素の一つである。図1にSBDDによる化合物の阻害活性向上の流れを示した。この二つのステップで元となった化合物の阻害活性を200倍も向上させている。SBDDを用いない合成的なアプローチでは200倍の活性向上を得るためには通常数十(時には数百)を超える化合物を合成し薬理評価にかけなければならない事が多いが、SBDDを用いる事により数個~十数個の化合物の合成でその目的を達成できると考えられる。

2. SBDDによるシード/リードジェネレーション

前節の例ではSBDDの元になる化合物が得られていたが、それでは運悪くそのような化合物が無い状況ではどのようにするかを以下に解説する。薬物受容体の立体構造をもとにして、新規骨格を持つ化合物を計算化学的に創出する方法は大きく分けて2通

* Isao NAKANISHI
1960年8月生
1985年大阪大学大学院・薬学研究科・
博士前期課程修了
現在、藤沢薬品工業株式会社・探索
研究所・分子科学探索担当、主任研
究員、博士(薬学)、計算化学
TEL 0298-47-8611
FAX 0298-47-8313
E-Mail isao.nakanishi@po.
fujisawa.co.jp



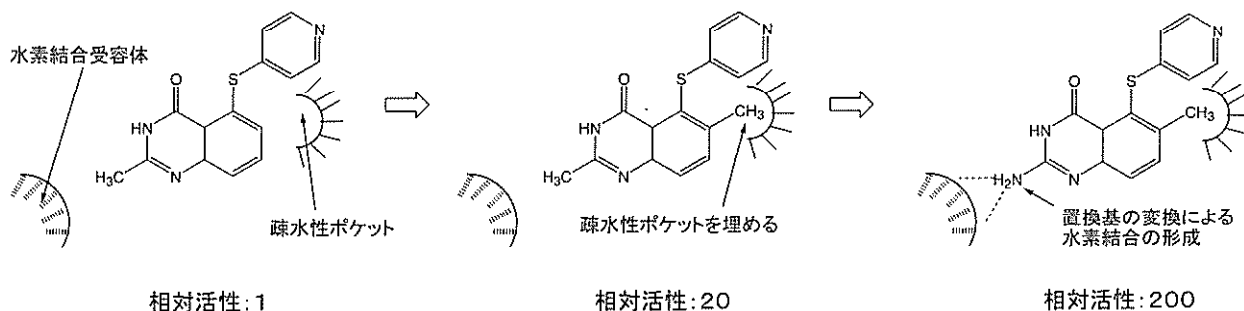


図1 (左図)元化合物(相対活性1)とTSとの複合体のX線結晶構造解析の結果, 結合ポケットに結合している元化合物の周辺に非占有の疎水性の空間と水素結合受容体がある事が判明した. (中図)疎水性の空間を埋めるため, 元化合物にメチル基を導入すると阻害活性が20倍向上した. (右図)更に水素結合受容体の近くに位置していたメチル基を, 水素結合供与体であるアミノ基に変換すると活性が10倍向上した. この2ステップで活性は200倍向上したことになる.

りに分類される. それは, 活性部位に当てはまる化合物を一から構築していく *de novo* デザインという方法と既存の化合物データベースの中から新規な骨格の化合物を検索する方法である. それぞれ多くの研究者によりいくつかの異なった手法が提案され, 実用化されている. 以下にそれぞれ代表的なものを紹介する.

1) *de novo* デザイン法

de novo デザイン法は薬物受容体の活性部位に当てはまる化合物を活性部位の3次元構造をもとに一から構築する手法であるが, 原子単位で構築するかフラグメント単位で構築するかにより, 更に2通りに分類される.

まず活性部位に当てはまる化合物を原子単位で構築させていく方法には, LEGEND⁵ や GENSTAR⁶, RASSE⁷ などのソフトウェアがある. 図2に本方法による分子構築過程の一例を示す. この方法は受容体の構造から分子を創製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事が多い. 例えば, 結合に無関係な置換基が無意味に生成されてしまったり, 合成が困難あるいは不可能であったりする. また, 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, といった問題も生ずる.

一方フラグメント単位で分子を構築する方法を図3に示す. これは, 活性部位の異なる位置にフィットす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, LUDI⁸ や MCSS/HOOK⁹, SPROUT¹⁰ などのソフトウェアがある. この方法

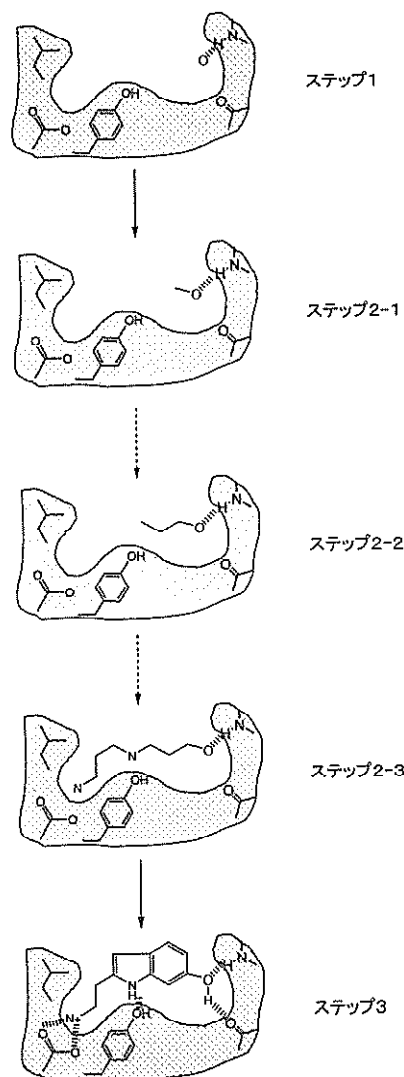


図2 原子成長(atom-growing)法による分子構築過程例. ステップ1: 受容体の水素結合可能部位から, 生成分子の水素結合に関与する原子を発生する. ステップ2-1~ステップ2-3: ステップ1で得られた原子に1個ずつ原子を付加して, 目的とする大きさの分子を得る. 原子を付加していく過程で分子内・分子間のエネルギーを評価する. ステップ3: 生成した分子に対して未完成の芳香環を完成させたり, 足りない水素を補ったりして完全な形の分子を得る. また分子力場計算により, 生成された分子の形を整える.

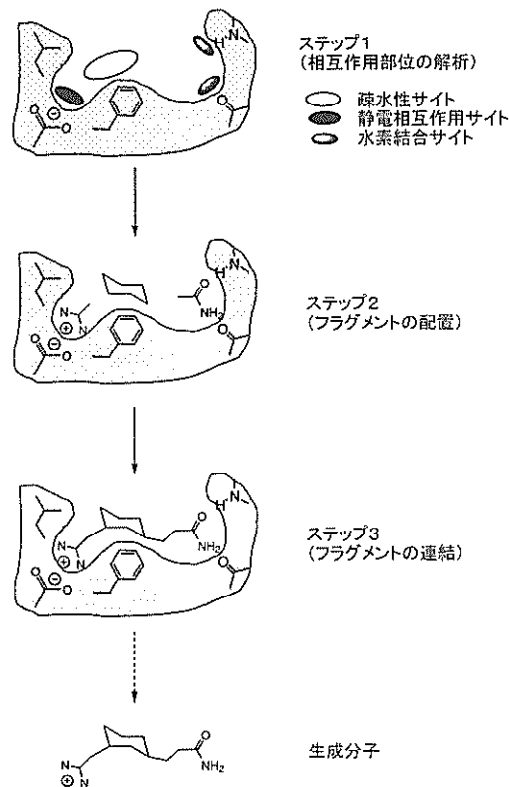


図3 フラグメント法による分子生成過程例。ステップ1：相互作用部位(疎水相互作用サイト, 静電的相互作用サイト, 水素結合のドナー・アクセプター, 等)の抽出を行なう。ステップ2：フラグメントライブラリーから相互作用部位へフィットするフラグメントを選択し最適位置に置く。ステップ3：フラグメント同志を連結する。

の問題点は、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ものの、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こと、また、用いるフラグメントデータベース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等が挙げられる。

2) データベース検索法

薬物受容体の活性部位に適合する既知のリガンドとは異なる骨格を持った化合物を、試薬などの既存の低分子化合物の3次元構造データベースから計算化学的にスクリーニングする方法である。コンピューター内部で受容体と化合物との結合状態と親和性(活性値)をシミュレーションし選別するため、*in silico*スクリーニング、あるいはバーチャルスクリーニングと呼ばれる。HTS(High Throughput Screening)用のアクセシシステムや実化合物のスクリーニングライブラリーを用意する必要がないため、安価にスクリーニ

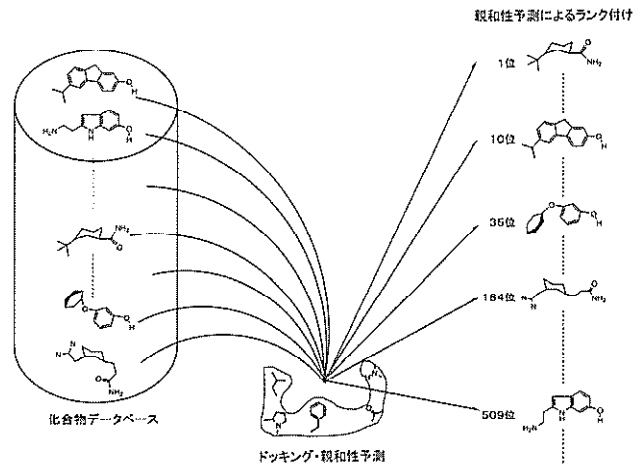


図4 *in silico*スクリーニングによる検索過程例。~数十万化合物よりなる低分子の仮想化合物データベースから1化合物ずつ結合ポケットに結合シミュレーションし、親和性の予測値により各化合物をランキングする。予測の信頼性が低いので、結合モードを目視によりチェックした後、パスした化合物を実際に入手し薬理評価を行なうのが現在では一般的である。

ングを行なえるメリットがある。DOCK¹¹やFlexX¹², PRO_LEADS¹³, LigandFit¹⁴, UNITY¹⁵, ADAM & EVE¹⁶等の多くのソフトウェアが存在するが、基本的にはデータベースにある分子を一つずつ受容体の結合ポケットに仮想的にドッキングさせ、その適合度合いを独自の指標に則り評価付けするという流れである(図4)。結合部位の抽出の仕方や、化合物の当てはめ方、親和性(活性値)の予測法等により手法間の相違が出る。多くのターゲット受容体を対象に適用され成果が報告されているが、まだまだ多くの問題点がある。例えばドッキングの精度が不十分であること(現状ではX線構造との比較において一致度が、~2Å程度の精度)、低分子化合物のフレキシブルな取り扱いが困難であり長い計算時間を要すること、結合ポケットの形状が浅い場合にはよい結果を得にくいこと、受容体側の動き(インデューストフィット等)にうまく対応できないこと、スクリーニングした化合物の親和性の予測法の精度が悪いことなどである。計算時間に関しては、CPUの高速化や安価なPCクラスターの出現により、そう大きな問題ではなくなってきたが、結合モードと親和性の予測精度は、この方法の生命線であり現在も多くの研究者により改良研究が行なわれている。

3. LBDDによるシード/リードジェネレーション

いくらターゲット蛋白質の立体構造が迅速に得られるようになってきたとはいえ、多くの薬物のターゲットとなるであろう膜に存在する薬物受容体の立体構造を得ることは、そう簡単なことではない。7回膜貫通型の受容体ではバクテリオロドプシンやロドプシンの構造をもとにホモロジーモデリングで得られた精度の未知なる構造を利用しているのが現状であろう。そこで既存のリガンドや阻害剤の受容体との構造活性相関データから、相互作用に重要と考えられるリガンド分子の部分構造(ファーマコフォア)を抽出し、それらの幾何学的な位置情報をもとに低分子化合物の3次元構造データベースを検索し、必要なファーマコフォアとその空間配置条件を満足

する分子を見つける手法がある(図5)。これを行なうためのソフトウェアには Catalyst¹⁴, UNITY¹⁵, ISIS3D¹⁷があるが、有効な(正しいであろう)検索条件をいかに生成するかが、これらの手法の肝になるため、各ソフトウェアごとに色々な工夫がなされている。この方法の利点は、検索に要する時間が受容体構造を用いる方法よりはるかに短いことと薬物受容体側の立体構造情報がない場合にも適用できることである。しかしその利点があるまま問題点につながり、すなわち受容体側の立体構造情報が失われるため、検索によりヒットした化合物であっても受容体の活性部位におさまらない可能性があり、また、想定した検索条件が正しいという保証もないため、SBDDよりも難易度は高いといえるであろう。

4. 課題

いずれの手法も蛋白質側の構造は動かないものとして取り扱っている。実際多くの蛋白質はインデューストフィットなどの構造変化を示す事が多いが、それらを考慮し効果的に取り扱う方法論はまだ確立されていない。de novo デザインでは、やはり生成された化合物の合成が最も大きな問題となるであろう。合成を考慮した化合物生成のアルゴリズム導入が期待される。SBDDによるデータベース検索ではいかに精度よくリガンドがドッキングされているかがポイントになる。現在のレベルではX線構造との比較で1.5~2.0Åまでの一致度がよりどころとなっているが、1結合長(約1.5Å)以下、願わくば1Å以下の一致度でシミュレーションできるようになればその後のデザイン研究がより効率化されると考える。また、フレキシブルなりガンドのコンフォメーションをどう取り扱うかも重要で、これがうまくできないと活性のある化合物を見逃してしまうことになる。以上のいずれの方法においても共通の問題点は、出力された化合物をいかに正しく、活性が期待できる順にランク付けできるかにある。化合物の親和性の予測法については、経験法・力場法・知識ベース法など異なるアプローチにより精力的にその改良研究が行なわれている。しかし、今だすべての受容体の系において十分なレベルのものは提出されておらず、今後期待するところが大きい。

おわりに

新薬の開発競争は昨今ますます激化し、創薬の方

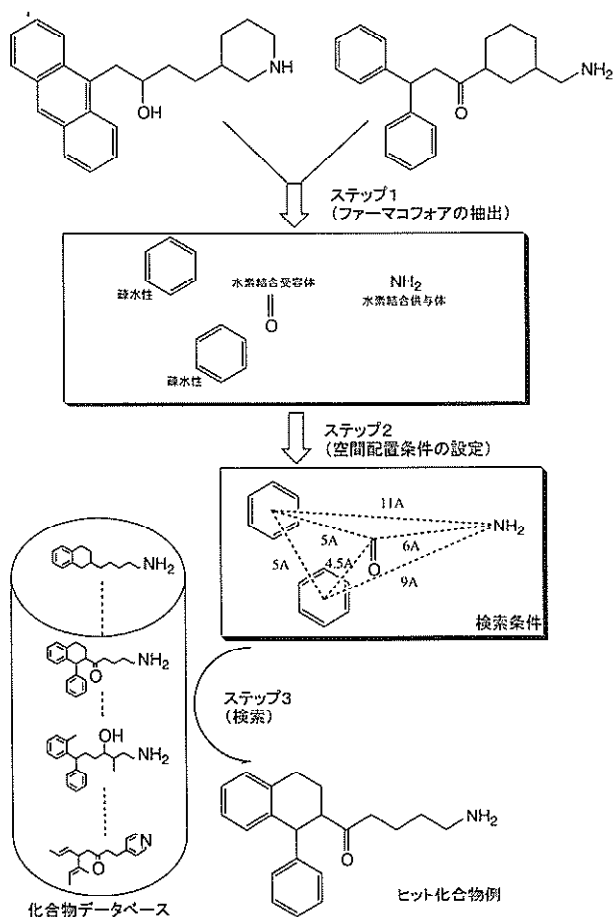


図5 ファーマコフォアの幾何学情報によるデータベース検索例。ステップ1: 活性に重要と考えらる部分構造(ファーマコフォア)の抽出。ステップ2: 抽出したファーマコフォア間の幾何学情報(距離, 角度, 二面角等)を求める。ステップ3: ファーマコフォア構造とその空間配置の関係を検索キーとして低分子化合物の3次元構造データベースを検索する。

法論もこの10年で大きく変化してきた。SBDDのような合理的なアプローチに加え、コンビナトリアル・ケミストリー(CC)による多数の化合物合成とHTSを組み合わせた方法も実用化されている。またSBDDとCCを組み合わせるというアプローチも示されている(例えば受容体の活性部位構造に注目したフォーカストライブラリーの作成など)。いずれにしても最終的な化合物合成は合成研究者が行なうため、合成者にとって、これから自分が作ろうとする化合物がどのくらいの活性を期待できるのかを知ることが、合成をするモチベーションの向上という点で重要なことである。そのような意味からも化合物の親和性(活性)を予測する方法論を確立することは大きな意味のあることである。

ポストゲノムの時代を迎え、解読された遺伝子がコードするすべての蛋白質の立体構造を決定しようとするStructural Genomicsの全世界的なプロジェクトが進行している。おそらく、これから数年のうちに、創薬のターゲットになりそうな多くの薬物受容体の立体構造が解明されることになるであろう。このことはSBDDが将来にわたっても不可欠な創薬手法となることを示しており、計算化学的手法による効率的な新規薬物候補の発見法の確立はますます重要になると考えられる。従って現在課題とされている問題点をいかにして克服していくかが、創薬の現場で競争に勝ち残るうえで重要なことになる。

引用文献

1. Appelt, K. et al., (1991) *J. Med. Chem.* 34, 1925-1934
2. Ealick, S. E. et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11540-11544
3. Lam, P. Y. S. et al., (1994) *Science* 263, 380-384
4. Webber, S. E. et al., (1993) *J. Med. Chem.* 36, 733-746
5. Nishibata, Y. et al., (1993) *J. Med. Chem.* 36, 2921-2928
6. Rotstein, S. H. et al., (1993) *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 7, 23-43
7. Luo, Z. et al., (1996) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 36, 1187-1194
8. Bohm, H. -J. (1992) *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 6, 61-78
9. Miranker, A. et al., (1991) *Proteins* 11, 29-34
10. Gillet, V. et al., (1993) *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 7, 127-153
11. DesJarlais, R. L. et al., (1988) *J. Med. Chem.* 31, 722-729
12. Rarey, M., et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 261, 470-489
13. Baxter, C. A. et al., (1998) *Proteins* 33, 367-382
14. Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California 92121, U.S.A.
15. Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, Missouri 63144, U.S.A.
16. (株)医薬分子設計研究所, 〒113-0033東京都文京区本郷5-24-5 角川本郷ビル4 F
17. Molecular Design Limited, 2132 Farallon Drive, San Leandro, California 94577, U.S.A.

