

## LEGEND による創薬の可能性

(株)医薬分子設計研究所) ○水谷 実穂、志谷 和紀、  
市瀬 多鶴子、板井 昭子

## はじめに

生体内で重要な働きをする蛋白について、立体構造データの蓄積が加速度的に増大している現在、それらのデータを新規薬物設計に活かす有効な手法がますます重視され、求められている。標的蛋白の立体構造が既知の場合に、そこに安定に結合しうる新規リガンド構造を論理的に得るためのアプローチとしては、自動ドッキングに基づいて三次元データベースを検索するバーチャルスクリーニング法[1]と、コンピューターにリガンド構造を自動構築させる *de novo* リガンド設計法などが挙げられる。私たちはそのいずれの手法についても精力的に研究を進め、成果を上げてきたが、今回の講演では後者の *de novo* リガンド設計法に焦点を当てたい。

私たちが開発してきた *de novo* リガンド設計法 LEGEND[2] は、分子生成過程における原子タイプ・結合タイプ・原子位置などの種々の決定に乱数を用い、生成構造の評価に力場計算を用いて、1 原子ずつ原子を付加することにより分子構造を構築するユニークなアルゴリズムをとっている。図 1 に LEGEND の方法論の流れを示す。乱数利用による生成構造の多様性と、力場計算を用いた構造最適化・エネルギー評価により、分子形状・物理化学的性質が蛋白キャビティによくフィットした安定な構造が得やすいことが特長である。構造構築過程では、積極的な分子間水素結合

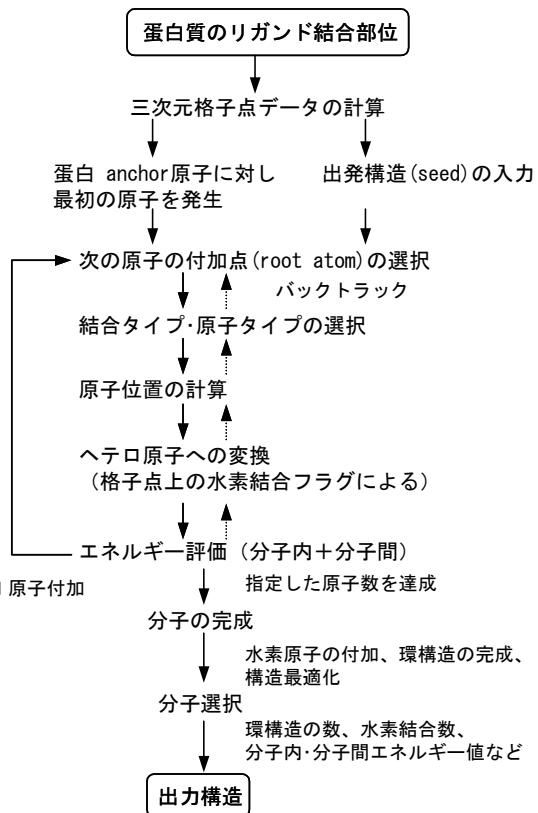


図 1 LEGEND の流れ

の形成や種々の環構造の生成も行なわれる。また、ユーザーが指定した順序で蛋白キャビティ中の水素結合サイトをたどりつつ、構造を伸ばしていくオプション（オーダー機能 [3]）や、各原子種の出現確率をユーザーが自在に調節する機能など、研究戦略に応じてユーザーが望む構造が得やすい機能も充実している。ユーザーが入力したリガンドの部分構造（seed 構造）を分子発生の出発点に設定することもできるため、特定の母核構造

に対する構造展開の目的にも非常に有用である。

このように LEGEND は、既知リガンドや既存構造にとらわれることなく、多様な新規リガンド候補構造や構造展開のヒントが簡便に得られる手法である。しかし、新規構造であるが故に、活性を知るためににはまず生成構造を合成してみなければならない。特に新規骨格をもつ化合物の場合、合成法の検討からして容易でないケースが多くあり、その他、物質としての安定性の予測が困難など LEGEND 単独では解決できない問題も多い。

今回の発表では最近の LEGEND の改良について説明するとともに、LEGEND の生成構造をどのように実際の創薬に結び付けていくのか、私たちが考えている道筋を示したい。また、LEGEND の実施例として 2 つの標的蛋白に適用した結果を紹介する。

### 最近の LEGEND の改良

最近の LEGEND に関する主な改良点は以下のとおりである。まず、*de novo* 設計構造における大きな問題点の 1 つとして、分子構造としての安定性や蛋白への適合性の評価が難しいことが挙げられる。今回の改良では、自動ドッキング法 ADAM[4]のエネルギー評価法を取り入れることにした。これにより、ドッキングモードの選別や、バーチャルスクリーニングにおける活性化合物識別のためのスコア評価の研究成果を、そのまま LEGEND にも移行しやすくなり、蛋白への適合性などの評価機能が向上した。また、生成構造の多様性を増すために、5 員芳香環の発生を可能にした。フラグメントを利用せずに、あらゆるタイプの 5 員芳香環を発生できるロジックとなっている。この改良により、LEGEND は医薬品によく見られる化学構造全てを生成しうる道具立てがそろったことになる。更に、構造完成後の結合次数・原子価のチェックや構造最適化により、化学的な破綻やひずみのある構造が出力されないようになった。

オーダー機能については抜本的な改良を行なった。目標の水素結合サイトへの道筋と逆行する無駄な試行を排除し、確実に次のサイトへ進められるアルゴリズムを開発した。これにより計算速度が大幅に高速化し、指定サイトとの水素結合の形成もより容易になった。

以上のような改良および細かいパラメタ調整を経て、LEGEND の全体的な機能やパフォーマンスは飛躍的に向上した。最新版の特長をまとめると、①医薬化合物によく見られる官能基・原子団を優先的に発生、②多様な生成構造、③標的蛋白との安定な相互作用、④破綻のない化学構造、⑤ひずみのない立体構造（安定な分子内エネルギー）、⑥積極的な水素結合形成、⑦完全自動かつ高速、⑧ユーザーが希望する構造を得やすい（オーダー機能、原子タイプ発生頻度の指定など）。

### LEGEND の適用例

改良した LEGEND を 2 つの蛋白系に適用して、有効性を検証した。ここでは、そのうちの 1 つ、MAP kinase p38 における結果を示す。

蛋白の三次元座標は、阻害剤との複合体構造を PDB の 1A9U [5] より得、プログラム CALGRID[6] によりリガンド結合領域に三次元格子点を発生させた。この格子点には、種々のエネルギーポテンシャル値が格納されており、エネルギー評価に利用される。また、格子点領域内に LEGEND 構造が生成される。LEGEND 計算の条件としては、既知阻害剤に見られるフルオロベンゼンを seed 構造とし、そこから Lys53 側鎖 NZ、次いで Met109 主鎖 N の水素結合サイトへと分子構造が伸びていくようオーダー機能を設定した（図 2）。

以上の条件で、100 個の構造を自動生成した。計算時間は Pentium III 1GHz の Linux マシンにて、22 分であった。生成構造の中には、全くの新規骨格が多数含まれる一方、既知阻害剤に非常に類似した構造も複数含まれていた（図 3）。これは、LEGEND が実際に活性を有する化合物構造を発

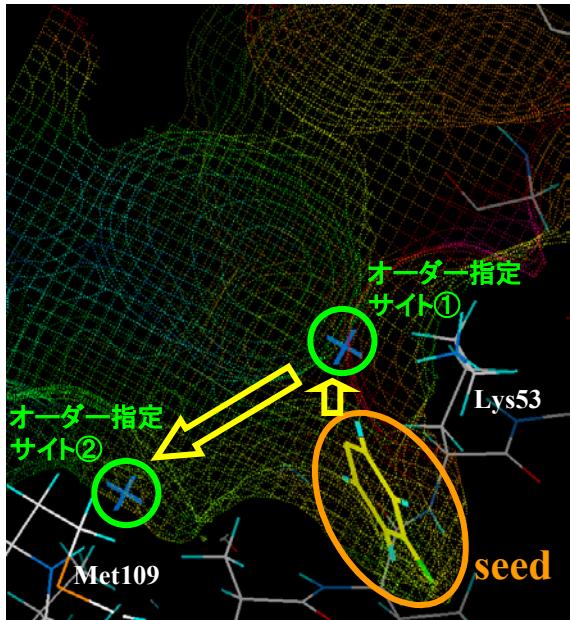


図2 MAP kinase p38におけるLEGEND計算条件  
カゴ状の表示はリガンド結合領域の形状を表す。

生しようことを示している。全体に生成構造は標的蛋白と安定な相互作用エネルギーをもち、最低1個のオーダーサイトとの水素結合、および多くの場合それ以外の分子間水素結合も有していた。

### LEGEND構造から創薬へ

LEGENDから発生した構造は、多くの場合、全くの新規構造である。この新規な構造を、現実の創薬場面でリード候補化合物にまで持っていくには、まず複数化合物について合成・活性評価を行ない、その結果に基づいて構造の選択や修正をし、再度合成・活性評価を行なうというサイクル

を繰り返す必要がある。しかし実際問題として、de novo 分子設計から得られた化合物の合成が必ずしも容易とは限らない。効率的で現実的な de novo 分子設計を進める上で重要なファクターとなる、この化合物入手の問題を解決するために、私たちは de novo 設計構造を query としたデータベース検索システム EUREKA を開発してきた[7]。

EUREKA は、de novo 設計構造（生成構造そのもの、または蛋白との相互作用に必須な母核構造を抽出したもの）と同一ないしは類似の骨格をもつ化合物を対象データベースから検索するプログラムである。対象データベースとしては、入手可能または文献既知の化合物を収めたものなどが幅広く利用でき、ヒットした化合物をそのまま入手、または文献情報に基づいて合成することができる。また、データベースには化合物の三次元構造が収められている必要はなく、二次元の化学構造式のみでも構造類似性の判定には十分である。ただし、三次元構造まで得られる場合には、EUREKA はその情報を利用することができる。query である de novo 設計構造の蛋白内での結合位置に基づいて、データベース中の類似構造を蛋白に自動ドッキングし、結合性まで評価することができる。EUREKA も、最近の改良により、検索機能の大幅な向上と高速化が実現された。

MAP kinase における LEGEND 発生構造（図3）に対する、EUREKA の適用例を示す。対象データ

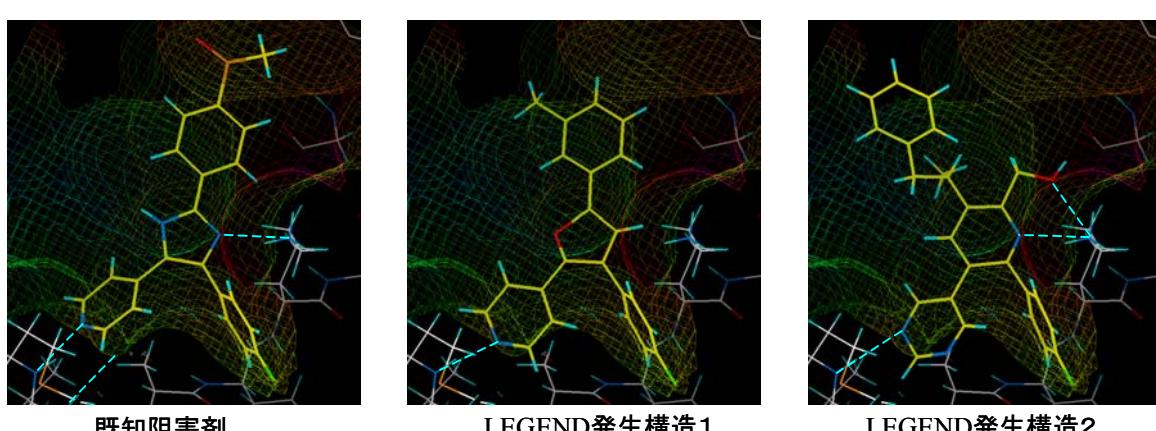


図3 MAP kinaseに対するLEGEND発生構造の例 水色の破線は水素結合を表す。

ベースには 35 万件の市販化合物を含む Available Chemicals Directry (ACD) を用いた。2 つの LEGEND 構造そのものを query とした場合にはヒットはなかったが、それぞれ部分構造を取り出して query とした場合には、計 11 個の構造がヒットした。その中には、既知阻害剤の構造が複数含まれていた（図 4）。このことは、LEGEND 構造を query とした EUREKA 検索が、実際に活性化合物の発見・創製について有効であることを示唆している。

### まとめ

標的蛋白と安定に相互作用しうる多様な新規構造を生成する LEGEND の魅力を活かしつつ、合成・活性評価・構造修正と再デザインのサイクルをうまく回していくために、入手可能あるいは文献既知の化合物情報を収めたデータベースを検索する EUREKA を組み合わせる戦略は、非常に有効と考えられる。近い将来、このような手法による新規リード創製の実現が期待される。

### 参考文献

- [1] Mizutani, M. Y., Itai, A. *J. Med. Chem.*, in press.
- [2] Nishibata, Y., Itai, A. *Tetrahedron*, **47**, 8985-8990 (1991); Nishibata, Y., Itai, A. *J. Med. Chem.*, **36**, 2921-2928 (1993)
- [3] 岩間、齋藤、西端、富岡、板井 第 21 回構造活性相関シンポジウム要旨集 331-334 (1993)
- [4] Mizutani, M. Y., Tomioka, N., Itai, A. *J. Mol. Biol.*, **243**, 310-326 (1994)
- [5] Wang, Z., et al. *Structure*, **6**, 1117-1128 (1998)
- [6] Tomioka, N., Itai, A., Iitaka, Y. *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **1**, 197-210 (1987); Tomioka, N., Itai, A. *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **8**, 347-366 (1994)
- [7] 富岡、西端、板井 第 22 回構造活性相関シンポジウム要旨集 304-307 (1994)  
富岡、板井 第 23 回構造活性相関シンポジウム要旨集 274-275 (1995)

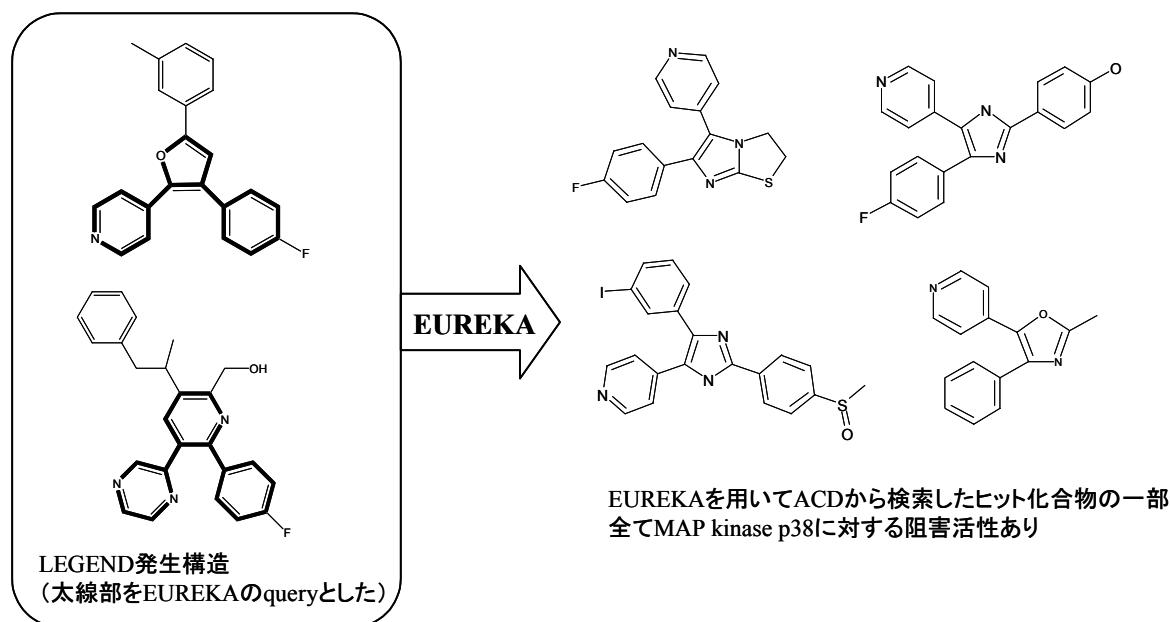


図 4 MAP kinaseに対するLEGEND発生構造をqueryとしたEUREKA検索の結果の一部