

(菱化システム) 片岡良一、後藤純一 (東海大医) ○平山令明\*

## はじめに

生体高分子の立体構造解析が迅速化し、医薬分子の標的になる多くの生体高分子、すなわち標的分子の立体構造データが従来に比較して求め易くなつて来ている。標的分子の立体構造データは、合理的に医薬分子を設計する上で有用であり、特に標的分子に結合可能な分子を *in silico* で探索することには大きな期待が寄せられている。標的分子と低分子の結合状態を予測することを一般的にドッキング・シミュレーションと呼ぶ。

正確なドッキング・シミュレーションを行うための重要な条件には二つある。第一は、シミュレーションに用いる分子構造の精度であり、第二は分子間相互作用の計算の精度である。本講演では、我々が最近 MOE<sup>(1)</sup>の上で開発した Ph4Dock<sup>(2)</sup>というドッキング・シミュレーション用ソフトウェアの評価の過程で考察した前者の問題について議論する。具体的には、ドッキング・シミュレーションを正確に行う上でどの程度正確な標的分子構造を用いるべきか、またドッキング結果の精度はどのように評価すべきかについて述べる。

## 標的分子の構造の正確さ

医薬分子の探索を目的としたドッキング・シミュレーションを行う上で標的分子の構造に対して要求される主な条件は次のようなである。アミノ酸の全ての非水素原子座標が求められていること、原子種の帰属が正確であること（例えばNとO原子の区別）、原子の位置が確定していること、もし確定できない時にはその可能な領域を限定

できること、阻害剤の結合位置が正確に同定されていること、反応や機能に重要な関係のある水分子やイオンの位置が正確に求められていることである。

しかし実際に Protein Data Bank(PDB)に収録されている座標データを調べると、これらの条件を満たす解析例は決して多くないことが分かる。これらの言わばデータ上の欠陥は、多くの実験的な制約や生体高分子結晶特有の問題によるものであり、その解決は必ずしも容易ではないが、ドッキング・シミュレーションを行うためには可能な限りこれらの欠陥を解決した構造データを使う必要がある。

現実的にこれらの問題を含む構造を用いてドッキング・シミュレーションを行う場合には、事前に充分注意して構造上の問題点を洗い出すことと、そのような欠陥を可能な限り妥当に補填ないし修復する必要がある。しかし、例えばアスパラギンやグルタミンのアミド基の 180° 回転やヒスチジンの互変異性問題のように、データを供託している研究者の見解が必ずしも最も妥当とは言えないが、否定もできないという状況に陥ることも少なくない。そのような場合には、複数の初期モデルを構築することが行われているが、これらのモデルの信頼度を客観的に判断する基準は残念ながらない。

一方、ドッキング・シミュレーション用ソフトウェアの評価のために構造を選択する場合には、比較的客観的にこの作業を行えるはずである。多くのドッキング・シミュレーション用ソフトウ

開発やその評価に関する論文では、テスト用のデータセットを用意しており、それに基づいた検討を行っている。しかしテスト・データセットを選ぶ基準は、ほとんどの場合医薬品様の低分子化合物を含むかどうかであり、その構造の正確性という観点からの選択は明確には行われていない。CCDC/Astex<sup>(3)</sup>がドッキング・シミュレーション用ソフトウェア GOLD<sup>(4)</sup>の評価用に公開しているデータ・セットは分解能毎に分類されている。しかし、分解能の高さと構造の正確性（原子座標の位置の確定性）とは必ずしも相関している訳ではない。

ドッキング・シミュレーション用ソフトウェアの評価を行う上で最も重要な点は、実験データの正確さであり、我々は次の基準でテスト・データ・セットを選択することにした。

1. 医薬分子様の低分子を複合体として含むこと
2.  $R_{\text{free}}$  が 30% 以下であること
3. タンパク質の全アミノ酸の非水素原子の占有率が 1.0 であること（等方性温度因子（B）が 50 以上ではないこと）。
4. 医薬分子様低分子の原子座標の占有率が 1.0 であること（等方性温度因子（B）が 50 以上ではないこと）

テスト・データ・セットは PDB から直接ではなく、CCDC/Astex と Wang ら<sup>(5)</sup>によるデータ・セットをマージしたものから、上記の判断基準で選択した。結晶学的な  $R$  因子が低い場合でも、構造に問題があるものが少なくなく、後述の判定基準を使用する必要性から、 $R_{\text{free}}$  の報告のない構造は対象外とした。このような基準を用いると 44 種の構造が選択された。この数はテスト・データ・セットとして少ない印象もあるが、幸いにもこの構造中に含まれる低分子は多様であり、医薬分子を探索する目的で使用するソフトウェアの評価用データ・セットとしての適性条件を満たしていると考えられる。このデータ・セットの一部を表 1 に示した。少なくともこれらのデータは現状では信頼のおける構造であり、それらの構造を

適切な条件下で再現できることがドッキング・ソフトウェアに求められる機能である。

## ドッキング結果の評価

複数分子のドッキングの結果を評価するための評価関数に関する報告は多くあるが、ここではあくまでドッキング・ソフトウェアの機能を評価するための方法について議論したい。この方法は勿論、複数分子のドッキング結果を評価するためにも使用できる。

生体高分子の結晶の特性により、高分解能のデータは本質的に得にくいか得ることが出来ない。質の高い回折データの数が決定すべき原子パラメータの数に比較して十分に多くないために、完全行列を用いた最小二乗法を行うことができない。したがって、構造解析の結果得られた原子パラメータの誤差の評価は通常行われていない。また温度因子（B）が 50 を越す場合には、その原子の座標の信頼性はほとんどゼロに近いと考えるべきであるが、そのような吟味を十分にしないままドッキングに使用している例も少なくない。完全行列最小二乗法によらず、簡易的に原子位置の誤差を見積もる方法を 1999 年に Cruickshank<sup>(6)</sup> が提案した。この方法によって見積もられる誤差を Cruickshank は diffraction-component precision index (DPI) と呼んでいる。DPI を使うと、完全行列最小二乗法で求めた誤差にほぼ匹敵する誤差を算出できる。しかし、PDB や原論文中に示されているデータのみから、誤差を見積もることが出来ない場合が多く（構造解析の論文の大量生産時代に入り、詳細な実験条件や計算条件、そして結果が論文から姿を消しつつあるのは実は大きな問題であろう）、Blow<sup>(7)</sup> は 2002 年に Cruickshank の式を更に変形および簡便化した次式を DPI に対して提案し、この式でも十分に誤差を求められることを示した。

$$\sigma(r, B_{\text{avg}}) = 2.2 N_{\text{atoms}}^{1/2} V_a^{1/3} n_{\text{obs}}^{-5/6} R_{\text{free}}$$

この式で  $\sigma$  は原子位置の誤差を表しており、

$N_{\text{atoms}}$ 、 $V_a$  および  $n_{\text{obs}}$  は、原子の数、結晶の非対称単位の体積および X 線反射の数をそれぞれ意味する。この式は、結晶学的に得られた結果を評価するために導入されたものであり、ドッキング・シミュレーションの結果を評価するには厳密すぎるが、もしシミュレーションが充分に正確に行われれば、この式による誤差評価は有用である。また、実験的に求められる誤差以上の正確さをシミュレーションに求めることは不毛であるから、シミュレーションで求めるべき正確さの限界を、計算の出発にする構造の実験誤差から予め決めるることは有意義である。表 1 には、このようにして求めた各構造中の非水素原子の平均的な原子位置誤差 ( $\sigma$ ) を示した。

ドッキング・シミュレーションがテスト・データ・セットに対して良好に行われたかどうかを判定する最良の方法は、実験的に求められた低分子化合物の構造とシミュレーションで求められた構造の一致度をみることである。GOLD の著者らは、主観的な一致度を使っているが、この方法が好ましくないのは明らかであり、これらの著者も

それを認めている。我々は、二つの構造の非水素原子の root mean square deviation(rmsd)のみを一致度の基準に用いた。これはかなり厳格な判定方法になる。モデルの非水素原子の位置誤差  $\sigma$  は、実験的に求められた位置誤差と同等と見積もることは可能であり、その仮定をすると、rmsd の誤差は単純に  $\sqrt{2} \sigma$  と見積もることが出来る。本研究では、この算定を用いて、シミュレーション結果と実験値の一致度を判定することとした。この判定方法は、実験値の誤差に基づき、ドッキング結果の良否を客観的に判定できるメリットを持っている。

#### 例 : biotin と streptavidin のドッキング

biotin は非常に強力に streptavidin に結合することが知られており、ドッキング・シミュレーションの良好な試金石に使える。更に X 線解析では 2 量体の構造が決定されており、独立な二つの結合部位が検討に使用できる。PDB コードが 2rtd の構造は、1.65 Å の分解能データに基づき、 $R_{\text{free}}=0.236$  ( $R=0.210$ ) まで精密化されている。

表 1 幾つかの標的分子-医薬分子様低分子ドッキングの結果

PDB_code	$R_{\text{free}}$	$\sigma(r, \text{Bavg})$	rmsd	rmsd/4.242 $\sigma$	rmsd <sub>min</sub>	HET	Weight	SlogP
1a28	0.2279	0.191	0.580	0.717	0.326	Ub best	STR	314.5
1ai5	0.2215	0.402	1.238	0.726	min	Ub best	MNP	182.2
1aqw	0.261	0.158	1.165	1.738	min	Ub best	glutathione	306.4
1b58	0.223	0.206	1.344	1.539	min	Ub best	KYK	438.5
1b9v	0.271	0.467		0.000			RA2	349.4
1bcu	0.212	0.238	0.784	0.776		Ub best	PRL	209.3
1bxo	0.125	0.159	1.215	1.801	1.139	Ub best	PP7	637.7
1byg	0.287	0.534	1.307	0.577	1.126	Ub best	STU	467.5
1c1e	0.294	0.347		0.000			ENH	383.9
1c5c	0.253	0.212	0.568	0.633	min	Ub best	TK4	343.3
1c5x	0.244	0.440	0.678	0.363	0.259	Ub best	ESI	303.1
1c83	0.231	0.177	0.793	1.055	0.732	Ub best	OAI	246.2
1cbs	0.237	0.218	1.019	1.104	min	Ub best	REA	299.4
1ckp	0.26	0.332	1.167	0.830	min	Ub best	PVB	259.7
1cvu	0.235	0.317	1.000	0.743	min	Ub best	ACD	303.5
1d0l	0.200	0.213	1.770	1.959	min	Ub best	BLG	550.5
1d3d	0.223	0.288	2.758	2.256			U(5/50)	593.6
1d3h	0.185	0.136	1.956	3.380	1.949	Ub best	BZT	5.20
1d3p	0.214	0.295		0.000			A26	270.2
1d4p	0.231	0.310	0.713	0.543	min	Ub best	BT3	555.8
1dd7	0.284	0.462	1.209	0.617	1.185	Ub best	BPP	361.5
1dg5	0.243	0.260	1.125	1.019	0.792	Ub best	1PM	479.5
1e1l	0.266	0.493	1.381	0.661	min	pK best	TOP	290.3
1ejn	0.24	0.246	0.905	0.867	0.842	Ub best	ANP	503.2
2rtd	0.236	0.158	1.142	1.704	min	Ub best	AGB	-7.07
			0.158	0.577	0.861	Ub best	BTN	342.5
								-0.77

Blow の式で求めた  $\sigma$  は  $0.158\text{\AA}$  である。独立な二つのポリペプチド鎖において、占有率が 1.0 である非水素原子の平均等方性温度因子は約 22 である。各鎖に対して Ph4Dock で求めたモデルと X 線解析で求めた分子の rmsd は表 1 に示すように  $1.142$  および  $0.577\text{\AA}$  であり、上記の  $\sigma$  の値から判断すると両者は実験値とほぼ一致していると考えることができる。しかし、二つの活性部位の結合性には有意な差があることも窺わせる。シミュレーション結果と実験結果が  $\text{rmsd}=1.142\text{\AA}$  である場合について、モデル分子と実験的に得られた分子を溶媒露出表面で重ねると、両者は非常によく重なる。この比較から、この系においては、rmsd が  $6\sigma$  までは、実質的に両者は一致すると考えて良いこと、すなわちこの範囲で一致する解は実質的に正解であることを示唆する。

### Ph4Dock によるドッキング成功率

選択した 44 複合体について Ph4Dock でドッキング・シミュレーションを行った結果の一部も表 1 に示した。その結果をまとめると以上のようになる。

37 構造 (84%) については  $\text{rmsd}<2.0\text{\AA}$  になり、ほぼ正しい構造が予測された。25 構造 (57%) については  $\text{rmsd}<3\sigma$  になり、実験的に得られた誤差の範囲内で構造を予測することができた。一方、7 構造については、 $\text{rmsd}>3.0\text{\AA}$  になり、Ph4Dock でのドッキングに実質的に失敗したことが分かる。その理由は明確ではないが、Ph4Dock のアルゴリズムだけではなく、X 線構造にも問題がある可能性もある。

本検討の結果、Ph4Dock によるドッキング予測能力は成功率の正確さの点から GOLD を凌いでいることを示し、医薬分子を *in silico* 探索するという実用的な目的に充分 Ph4Dock が使用できることを示唆した。

### まとめ

ドッキング・シミュレーションを開始する場合、

既に適当な低分子との複合体結晶の構造データがあれば、まずその構造が再現できることを検証し、その条件を用いて、別の低分子とのドッキングを行うことなる。出発に用いる構造が正確でない場合には、不正確なドッキングにより誤った結果を得る可能性が高い。より正確な初期座標と適切なソフトウェアを用いることがドッキング・シミュレーションの成功の鍵を握っている。このような事前の検証を行う上で、モデル構造と X 線構造の rmsd を評価に用いることは有用であり、実験データから推定される誤差に基づいて rmsd を評価できる。またこのような客観的な評価により、シミュレーション用のソフトウェアの評価も可能になる。

標的分子の正確な構造さえ得られれば、高い精度でドッキング予測が行えるようになりつつあり、この手法は今後も創薬支援の重要な方法論として進化していくものと思われる。

### 謝辞

本研究を行うにあたり、東海大学総合研究機構および新エネルギー・産業技術総合開発から援助を得た。ここに記して謝意を表する。

### References

- (1) Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada.
- (2) 後藤・片岡・平山：第 26 回情報化学討論会、講演番号 J14(2003), 片岡・後藤・平山：第 26 回情報化学討論会、講演番号 JP14(2003)
- (3) [http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life\\_science/validate/astex/pdb\\_entries](http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_science/validate/astex/pdb_entries)
- (4) Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., Leach, A.R., Taylor, R. *J.Mol.Biol.*, **267**, 727-748(1997)
- (5) Wang, R., Lu, Y., Wang, S., *J.Med. Chem.*, **46**, 2287-2303(2003)
- (6) Cruickshank, D.W.J., *Acta Cryst.*, **D44**, 583-601(1999)
- (7) Blow, D.M., *Acta Cryst.*, **D58**, 792-797(2002)