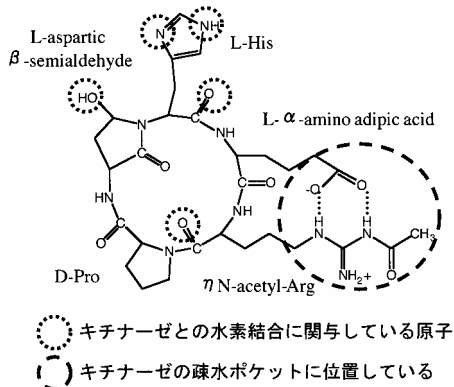


## ドックデザイン

(北里大学 薬学部) ○合田 浩明、酒匂 佑介、広野 修一

## 1. はじめに

キチンは真菌類、および昆虫を含む多くの無脊椎動物の主要な構造多糖である。それゆえ、キチンの合成および代謝過程はこれら無脊椎動物の生命維持および増殖に極めて重要となっている。このキチンの代謝過程に関わる酵素として、キチン分解作用を持つキチナーゼが知られている。このキチナーゼは真菌、昆虫、ダニ、線虫等に幅広く分布し、これらにとって必須の酵素である。したがって、キチンの代謝過程を阻害する化合物（キチナーゼ阻害剤）には、抗真菌薬、抗寄生虫薬、殺虫剤等幅広い機能を期待することができる。実際に、キチナーゼ阻害剤は、HIV 感染症患者における口腔カンジダ症の原因となる *Candida albicans* について、病原性を持つ糸状形への形態変換を抑制できることが実験的に示されている。最近、キチナーゼの活性を競合的に阻害する環状ペプチド性化合物、argadin ( $K_i=20\text{nM}$ 、図1)、が発見された<sup>1)</sup>。また、

図1 argadin ( $K_i = 20\text{nM}$ )

そのキチナーゼとの複合体構造がX線結晶解析により明らかになっている<sup>2)</sup>。X線結晶構造における argadin-キチナーゼ相互作用様式の特徴は、(1) argadin の His のイミダゾール環、および主鎖環状骨格の酸素原子がキチナーゼとの水素結合に関与していること、(2) argadin の L- $\alpha$ -amino adipic acid と  $\eta$  N-acetyl-Arg が分子内水素結合を形成し、キチナーゼの疎水ポケットに位置していること、である。

ところで、この argadin を実用的な薬物にするには、その主鎖ペプチド骨格を安定な他の化学構造に置き換える必要があると思われる。そこ

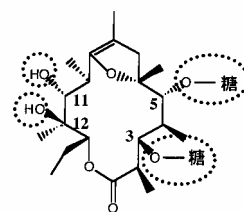


図2 EM201環状骨格

で、我々は、分子置換のための化合物として、14員環マクロライド、8,9-anhydroerythromycin A 6,9-hemiketal (EM201、図2)に着目した。それは、

(1) EM201 環状骨格の大きさが argadin 主鎖環状骨格の大きさと同程度であり、しかも水素結合可能な酸素原子がいくつか存在していること、  
 (2) EM201 環状骨格には4つの修飾可能部位があり、その部位に argadin-キチナーゼ相互作用において重要なイミダゾール環および疎水基 (argadin の L- $\alpha$ -amino adipic acid と  $\eta$  N-acetyl-Arg に対応) を付加可能であること、による。それゆえ、EM201 環状骨格の適切な修飾可能部位にイミダゾール環および疎水基を付加することで、新規キチナーゼ阻害剤を分子設計できるのではないかと考えた。そこで、本研究の目的は、計算化学手法を用いて、14員環マクロライド

骨格を持つ新規キチナーゼ阻害剤をデザインすることである。

## 2. argadin 結合配座と EM201 環状骨格のアライメント

まず、**問題（１）** EM201 環状骨格に存在する酸素原子は、argadin においてキチナーゼと水素結合を形成している酸素原子の代わりになりうるか、**問題（２）** EM201 環状骨格には４つの修飾可能部位があるが、どの部位にイミダゾール環および疎水基を付加すれば、それぞれ、argadin の His および分子内水素結合を形成している L- $\alpha$ -amino adipic acid と  $\eta$  N-acetyl-Arg の役割を果たせる可能性が高いか、という２つの問題について検討するために、次のような計算を行った。

自動配座解析プログラム CAMDAS<sup>3)</sup>を用いて、EM201 環状骨格について 1843 個の異なる配座集団を得た。次に、得られた EM201 環状骨格の配座集団と argadin のキチナーゼ結合配座の間で重ね合わせ計算を行った。この重ね合わせ計算には SPOSE 法を使用した<sup>4)</sup>。重ね合わせ計算の際に定義した特性球を図 3 に示す。

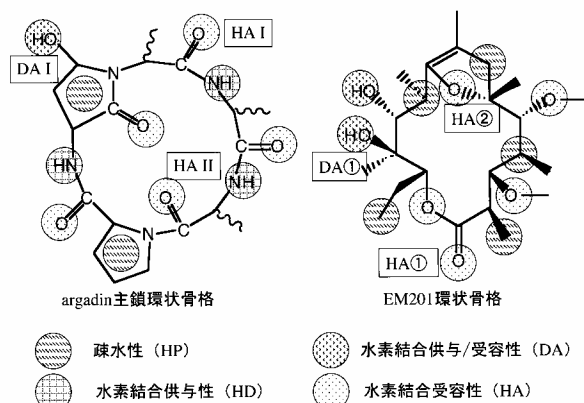


図 3 重ね合わせ計算における特性球の配置

重ね合わせ計算の結果、argadin 結合配座と最高得点で重なった EM201 環状骨格配座は 255 個あった。すなわち、255 個の異なるアライメントを得た。最後に、次の２つの条件を満足するアライメントが存在するかどうか調べた。**条件（１）** キチナーゼと水素結合を形成している argadin 酸素原子に置かれた特性球（HA I、HA II、DA I）が３つ

とも、EM201 環状骨格におかれた同性質の特性球と重なっていること。**条件（２）** EM201 環状骨格の修飾可能部位の１つが、argadin の His の近傍に位置しており、さらに EM201 の別の修飾可能部位が、argadin の L- $\alpha$ -amino adipic acid あるいは  $\eta$  N-acetyl-Arg の近傍に位置すること。解析の結果、条件を満たすアライメントを２つ得ることができた。そのアライメントを図 4 に示す。

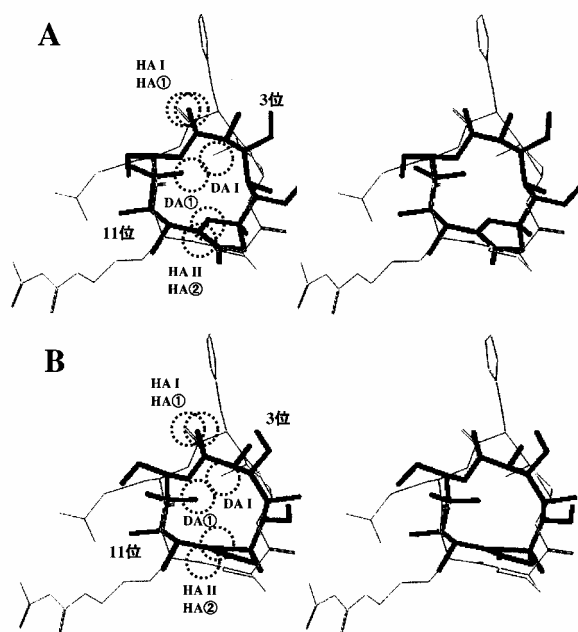


図 4 argadin 結合配座と EM201 環状骨格のアライメント  
A : CONF1040、B : CONF1453

EM201 環状骨格の配座としては、CONF1040、CONF1453 であり、その最安定配座からの  $\Delta E$  (kcal/mol) はそれぞれ、17.82、23.52 であった。２つの配座とも、EM201 環状骨格に置かれた特性球、HA ①、HA ②、DA ①、がそれぞれ、argadin の特性球、HA I、HA II、DA I に重なっていた。また、EM201 環状骨格の 3 位、11 位の修飾可能部位が、それぞれ、argadin の His、 $\eta$  N-acetyl-Arg の近傍にきていた。

以上の結果より、**問題（１）** に対しては、EM201 環状骨格の酸素原子（特性球 HA ①、HA ②、DA ①）が、キチナーゼと水素結合形成している argadin の環状骨格酸素原子と同じ空間的配置を

とりえること、問題(2)に対しては、EM201 環状骨格の3位にイミダゾール環、11位に疎水基を付加すればよいこと、がわかった。

### 3. EM201 環状骨格の3位にイミダゾール環を付加する際のスペーサーについての検討

次に、3位に付加するイミダゾール環についてスペーサーの長さをどの程度にすればよいか検討した。

まず、重ね合わせ計算で得られた2つのEM201骨格配座 (CONF1040、CONF1453) に対

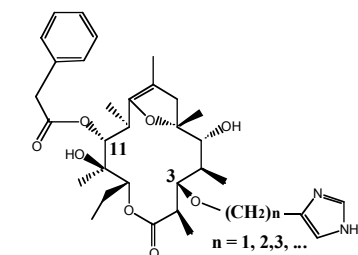


図5 3位のスペーサーについて検討するために作成した分子

して、図5のように、スペーサーの長さが異なるイミダゾール環を付加した分子をコンピュータ上で作成した。その際、EM201の11位に付加する疎水基に関してはベンジル基に固定した。次に、作成した分子それぞれについて、キチナーゼのargadin結合部位に対するドッキング計算を行った。この計算にはFlexX [SYBYL6.91、Tripos社]を使用した。それぞれの分子に対して得られた多数の結合モデルについて、Cscore [SYBYL6.91、Tripos社]の5つの評価関数を用いてスコアを計算し、さらに当研究室で定義したAASS (Average of Auto-Scaled Scores) の値を用いて結合モデルをランクづけした。AASSの値が0.2以下あるいは上位20個の結合モデルを選択した。最後に、選択した上位の結合モデルについてキチナーゼとの水素結合様式を解析した。

n=1あるいは2の分子について得られた上位の結合モデルの中に、イミダゾール環が水素結合を再現しているものはほとんど見られなかった。一方、n=3の分子について得られた上位の結合モデルの1つを、argadinの結合様式とともに図6に示す。n=3にすることで、得られた上位の結合モデルのほとんどが、イミダゾール環に関する水素結合を再現できていた。さらに、EM201環状骨格の

酸素原子(特性球HA①、HA②、DA①)についても、argadin-キチナーゼ間の水素結合をきちんと再現していることがわかった。このことは、重ね合わせ計算で得られたアライメントが、ドッキング計算でも再現されたことを意味している。また、上位の結合モデルの環状骨格の配座はすべてCONF1453であることがわかった。以上の結果より、スペーサーの長さとしてはn=3で十分であることがわかった。

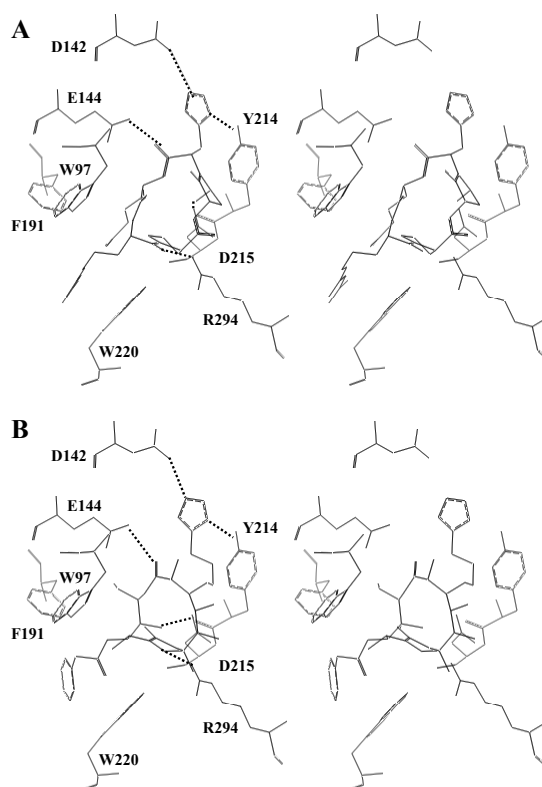


図6 A: argadin-キチナーゼ相互作用様式、B: スペーサーをn=3にした分子について得られた結合モデル 点線: 水素結合

### 4. EM201 環状骨格の11位に付加する疎水基についての検討

最後に、EM201環状骨格の11位にどのような疎水基を付加すれば、argadinに匹敵する結合親和性を獲得できるかについて検討した。

ここでは、図 7 に示すように EM201 環状骨格の 3 位については、 $n=3$  のスペーサーの長さを持つが、11 位に異なる疎水基を持つ分子をコンピュータ上でいくつか作成した。

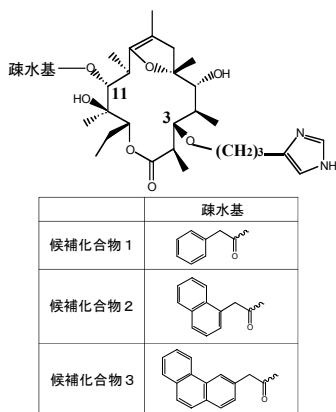


図 7 11位の疎水基について検討するために作成した分子

次に、これら作成した分子について、キチナーゼに対するドッキング計算を行い、AASS の値が 0.2 以下あるいは上位 20 個の結合モデルを選択した。さらに選択した結合モデルを水の箱に入れ、水溶液中でのエネルギー極小化計算を行った。この計算には AMBER7<sup>5)</sup>を用いた。最後に、得られたエネルギー極小構造について、結合自由エネルギー計算 (MM-PBSA 法<sup>6)</sup>)を行い、最も低い値を与える結合モデルを、その分子の最終的な結合様式とした。

表 1 に、候補化合物 1～3 についての結合自由エネルギー計算の結果を示す。いずれの分子についても、得られた最終的な結合様式は、argadin-キチナーゼ間の水素結合をすべて再現していた。また、11 位にフェナントレンを付加した場合、 $\Delta G_{\text{MM-PBSA}}$  の値が  $-63.47$  kcal/mol と最も低かった。さらに、この値は、argadin-キチナーゼ複合体について同条件で計算した値、 $-60.79$  kcal/mol、に匹敵していた。したがって、11 位にフェナントレン程度の大きさを持つ疎水基を付加することで、argadin に匹敵する結合親和性を獲得できる可能性が示唆された。最後に、候補化合物 3 とキチナーゼとの相互作用様式を図 8 に示す。

## 5. まとめ

本研究では、計算化学手法を用いて、14 員環マクロライド骨格を持つ新規キチナーゼ阻害剤をデザインした。最終的にデザインされた候補化合物 3 は argadin に匹敵する結合親和性を有するこ

とが期待される。

## 謝辞

本研究を行うに当たり、TAKEDASCIENCE FOUNDATION からの援助を得た。ここに謝意を表す。

表 1 : エネルギー極小化構造についての結合自由エネルギー計算の結果

化合物	E <sub>GMM-PBSA</sub> (kcal/mol)
候補化合物 1	-53.29
候補化合物 2	-56.56
候補化合物 3	-63.47
argadin	-60.79

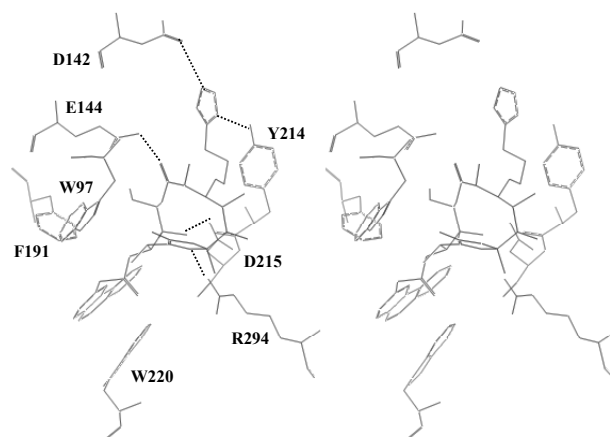


図 8 候補化合物 3-キチナーゼ複合体モデルのエネルギー極小化構造 点線：水素結合

## References and Notes

- [1] N. Arai, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **48** (10), 1442 - 1446 (2000).
- [2] D.R. Houston, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99** (14), 9127 - 9132 (2002).
- [3] H. Tsujishita, *et al.*, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **11** (3), 305 - 315 (1997).
- [4] K. Iwase, *et al.*, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **13** (5), 499 - 512 (1999).
- [5] D.A. Case, *et al.*, AMBER7, University of California, San Francisco (2002).
- [6] P.A. Kollman, *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, **33** (12), 889 - 897 (2000).