

(株式会社 医薬分子設計研究所) ○野中 はるみ、富岡 伸夫、板井 昭子

はじめに

標的蛋白質の立体構造が未知の場合に、複数の活性化合物から活性発現に必要な構造や物性の条件を抽出するための方法として「分子重ね合わせ法」がある。1986 年以前の分子重ね合わせ法は、原子位置や分子骨格の類似性に基づいたものであったが、同一結合部位に結合するために原子位置が一致する必要はなく、また骨格の異なる化合物の重ね合わせに比べて得られる情報が少ない、という問題があった。これに対して我々は、骨格の異なる分子の三次元構造を同じ空間中で重ね合わせ、標的蛋白質の結合部位の形状・共通の相互作用サイト・活性化合物中の活性に必須な官能基などを推定する分子重ね合わせ法 RECEPTS を開発してきた[1-3]。分子重ね合わせ計算には、対象とする分子のコンホメーション、分子同士の相対配置(回転・並進の自由度)を考慮して可能性を尽くす問題と、重ね合わせモデル毎に重なりの方をどのように評価するかの問題がある。RECEPTS の自動重ね合わせ機能 (AutoFit) では結合部位に想定される水素結合部位の対応付けに基づく最小自乗法計算と、三次元格子点を用いた分子間の物理化学的性質の一致度の評価により、これらの問題の解決を図っていた。

この概念に基づき、より幅広い化合物に対応できるように改良し、さらに重ね合わせ計算結果に基づくサイトモデルの作成やデータベース検索計算(バーチャルスクリーニング)を行うことができる、より実践的なシステム KeyRecept を構築した[4]。Cyclin-dependent kinase2 (CDK2) 阻害剤を例に本システムで一連の計算を行い、良好な結果が得られたので報告する。

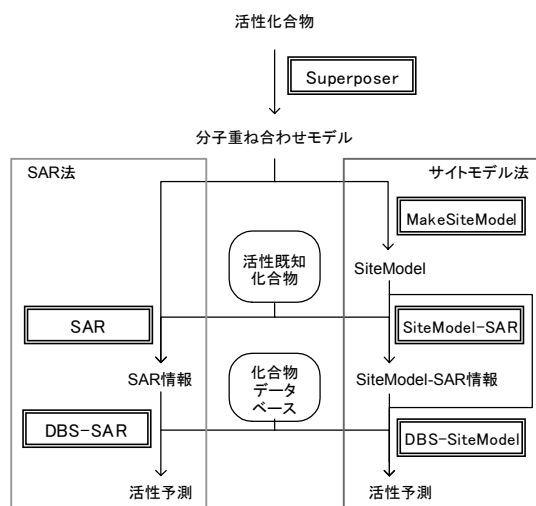


図 1 KeyRecept システム

KeyRecept システム構成

本システムによる計算の流れを図 1 に示す。最初に Superposer(分子重ね合わせ計算)により標的蛋白質の結合部位の特徴を反映する分子重ね合わせモデルを作成する。重ね合わせモデルの利用方法は、SAR 法とサイトモデル法がある。SAR 法では、SAR 計算により、活性の強弱がある複数化合物を重ね合わせモデルにそれぞれ重ねて指標値を求め、活性値と指標値の間で重回帰分析を行い、活性の強弱を説明できるモデル、活性に重要な指標などが計算される。DBS-SAR 計算では、データベース中の活性未知化合物を順次重ねて指標値を求め、SAR 計算で得られた重回帰式を利用して活性を予測するバーチャルスクリーニングができる。SAR 法は、十分な化合物活性データが必要であり、適切な相関式が得られない場合は計算ができない。そのような場合でもサイトモデル法は計算ができる。Superposer で得られた分子重ね合わせから、活性発現に重要なサイトポイ

ントとグリッド領域を抽出してサイトモデルを作成する。DBS-SiteModel 計算では、そのサイトモデルに対してデータベース中の活性未知化合物を順次重ねて指標を求め、各化合物が活性をもつ可能性を予測する。化合物活性データがある場合は、サイトモデルの重ね合わせ指標と活性値の重回帰分析を行い、それを活性予測に利用することもできる。手持ちの化合物データの量や質により SAR 法またはサイトモデル法を選択することや、比較的簡便なサイトモデル法で予備的なスクリーニングをした後に SAR 法を適用するなど、状況に応じた多彩な解析が可能である。

本システムは、標的蛋白の構造が未知の系での活性化化合物の構造-活性相関解析に有用であり、特に HTS などのランダムスクリーニングから得られる多様な骨格を有する活性化化合物の解析し、バーチャルスクリーニングを行い、新規リード化合物の発見や構造展開などに有効な方法である。

計算例

CDK2 は、真核生物の細胞周期を調節する因子の一つであり、がん治療などで注目されている。今回は、化合物の構造や活性のデータを文献[5-7]と Protein Data Bank から入手し、計算の対象とした。本来 KeyRecep システムは、標的蛋白質とリガンド分子の結合状態がわからない場合に利用するが、今回は計算の有効性を確認するため、複合体の X 線結晶解析結果が PDB に登録されている化合物を Superposer(分子重ね合わせ)計算対象とし、計算結果の妥当性を評価できるようにした。

一連の計算に利用する化学構造を含む化合物データは ISIS により作成し、そこからエクスポートした RD ファイルからプログラム Key3D[8]による三次元化を行い、さらに属性情報の付加を行って解析用データベースを作成した。結合軸回転と各種ダミー原子の発生は、自動発生プログラムの設定とおりにし、結合軸回転の刻み角度は 60° とした。

Superposer(分子重ね合わせ計算)

Superposer 計算対象分子を図 2 に示す。staurosporine に対して、他の 3 分子をそれぞれコンホメーションと相対配置を網羅して重ね合わせる計算を行った。計算結果最上位のものと、複合体 X 線結晶解析の結合部位を一致させたときのリガンド分子相対配置を図 3 に示す。各分子の相対配置は非常によく再現できており、本方法の有効性を確認することができる。

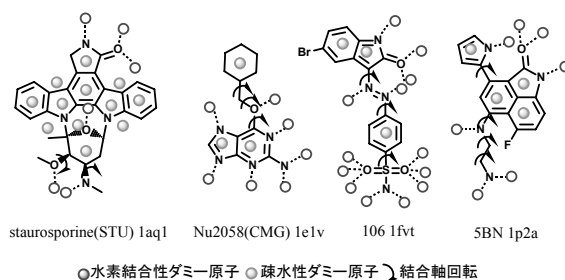
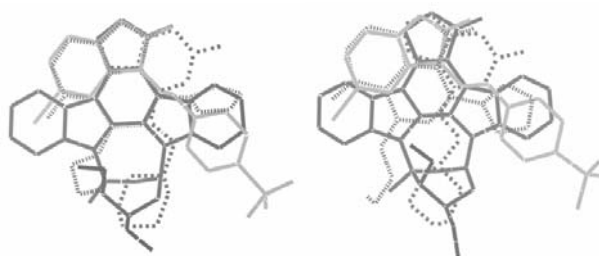


図 2 Superposer 計算対象分子



— staurosporine — Nu2058 106 5BN

図 3 計算最上位分子重ね合わせ(左)と複合体 X 線結晶解析リガンド分子相対配置(右)

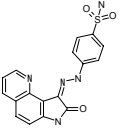
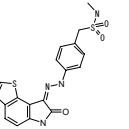
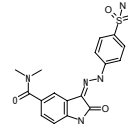
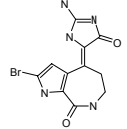
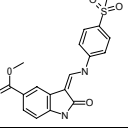
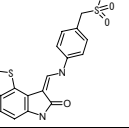
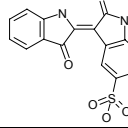
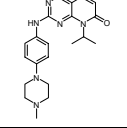
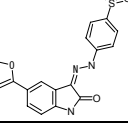
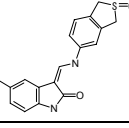
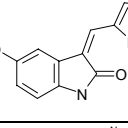
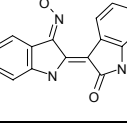
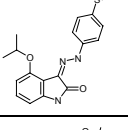
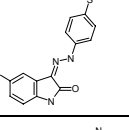
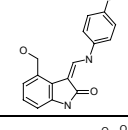
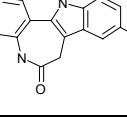
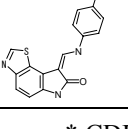
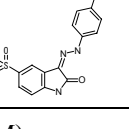
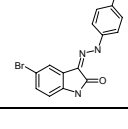
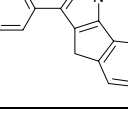
SAR 法

Superposer 計算結果の最上位のモデルに対して、活性既知 20 化合物(IC₅₀1.6~1600 μM)を検証分子(表 1)として SAR 計算を行った。20 化合物をそれぞれ staurosporine に対して重ね合わせて 12 種類の指標を算出し、活性値とあらゆる指標の組み合わせの回帰式を作成した。その中で最も相関の良かった式を示す。

$$\log(\text{IC}_{50}) = 6.00 + 10.20 \times \text{Surface} \quad R=0.841 \quad n=20$$

この式から、分子表面形状(Surface)が活性に与える影響が大きいことがわかる。また、水素結合などに関する項目が相関式にないが、これは計算対

表 1 検証分子

構造	IC ₅₀ [*]	構造	IC ₅₀	構造	IC ₅₀	構造	IC ₅₀
	1.60		5.70		17.0		70.0
	2.10		7.50		35.0		129
	2.30		8.90		22.0		440
	3.40		12.0		54.0		680
	5.70		15.0		60.0		1600

* CDK2/cyclin A (μM)

象化合物がほぼ一定の水素結合をして差がなかったためであり、単純に水素結合が活性と無関係ということではないと考えられる。

実際の研究開発時には、得られた相関式を利用してデータベース検索計算(バーチャルスクリーニング)を行い、その中から活性の期待できる化合物を選別することになる。ここでは、本方法で有効なバーチャルスクリーニングができるか確認するために、活性既知化合物 115 個の小規模データベースを作成し、データベース検索計算を実施し、予測活性値と実測値を比較した(図 4)。その結果、活性値を正確に予測する精度とはいえないが、計算予測 1.5 以下の化合物を検討対象とすれば、 $\log(\text{IC}_{50}) < 1.0$ の化合物がもれなく入ることがわかった。このような計算が、実際には候補化合物の中の実験優先順位の目安として使われることが多いことから、本方法が詳細な実験前のバーチャルスクリーニングとして有効な手法であるといえる。

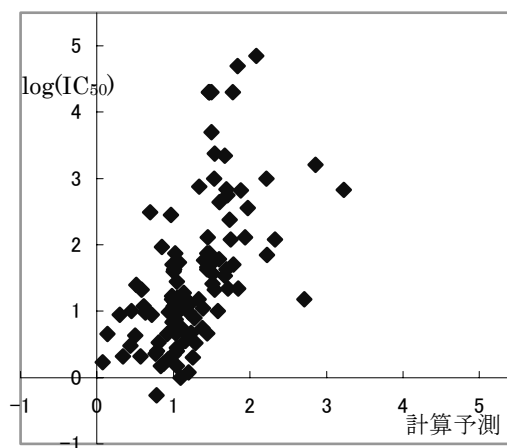


図 4 SAR 法による活性予測

サイトモデル法

Superposer 計算の最上位モデルからサイトモデルを作成した。そのサイトモデルが妥当なモデルか、活性発現に重要な指標は何かを確認するため、SAR 法で利用した活性既知 20 化合物のサイトモデルに対する重ね合わせ指標 5 種類を計算し、活

性値とあらゆる指標の組み合わせの回帰式を作成した。その中で最も相関の良かった式を示す。

$$\log(\text{IC}_{50}) = 4.47 + 7.15 \times \text{Surface} \quad R=0.813 \quad n=20$$

この式から、分子表面形状が活性に影響していることがわかる。

次に本方法の有効性を確認するため、SAR 法と同様に活性既知の小規模データベースに対して検索計算を実施し、予測活性と実測値を比較した(図5)。その結果、計算予測 1.3 以下の化合物を検討対象とすれば、 $\log(\text{IC}_{50}) < 1.0$ の化合物をもらすことがないことがわかった。SAR 法同様、詳細な実験前のバーチャルスクリーニングとして有効であるといえる。

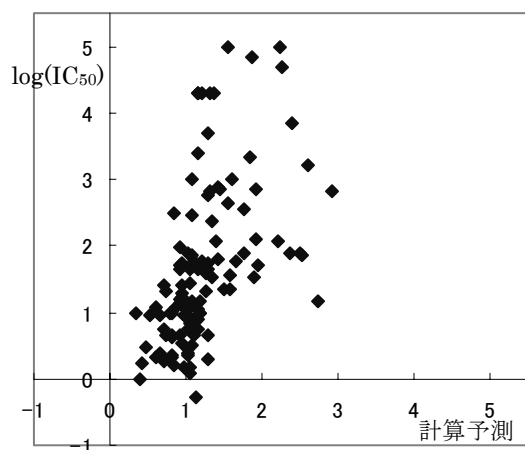


図 5 サイトモデル法による活性予測

まとめ

以上の結果から、KeyRecep システムの使用により、CDK2 阻害剤の系において、妥当な重ね合わせモデルが計算され、既知活性化合物の構造活性相関も良好に説明できることが示された。さらに、SAR 法及びサイトモデル法に基づくバーチャルスクリーニングはいずれも、活性未知化合物の活性予測や化合物の優先順位を決定する有効な手段となり得ることがわかった。これまでに CDK2 阻害剤以外の化合物系においても良好な結果を得ており[4,9]、本システムが活性既知の化

合物の構造活性相関の解析のみならず、データベースから新規活性化合物の候補を検索するバーチャルスクリーニングの目的にも応用できることを示している。

References

- [1] Kato, Y., Itai, A. and Iitaka, Y., *Tetrahedron*, **43** (1987) 5229
- [2] Itai, A., Kato, Y., Tomioka, N., Iitaka, Y., Endo, Y., Hasegawa, M., Shudo, K., Fujiki, H. and Sakai, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** (1988) 3688
- [3] Kato, Y., Inoue, A., Yamada, M., Tomioka, N. and Itai, A., *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **6** (1992) 475
- [4] 野中はるみ, 富岡伸夫, 板井昭子, 第31回構造活性相関シンポジウム要旨集 (2003)
- [5] H. Neal Bramson, John Corona, et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, **44** (2001) 4339
- [6] Ralph Hoessel, Sophie Leclerc, et al. *Nature Cell Biology* **1** (1999) 60
- [7] Marie Knockaert, Paul Greengard and Laurent Meijer, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **23** (2002) 417
- [8] 中村建介, 富岡伸夫, 板井昭子, *JCPE Journal*, **12** (2000) 177
- [9] 野中はるみ, 富岡伸夫, 板井昭子, *SAR News*, **6** (2004) 15