

博士論文

フラグメント分子軌道法を用いた
ファーマコフォアモデリングと
バーチャルスクリーニングへの応用

指導教官 清水 謙多郎 教授

応用生命工学専攻

生物情報工学研究室

吉野 龍ノ介

目次

第一章	序論-----	5
第一節	インシリコスクリーニング	
第二節	ファーマコフォアモデリング	
第三節	シャーガス病	
第四節	ジヒドロオロト酸脱水素酵素	
第五節	スペルミジン合成酵素	
第六節	研究目的	
第二章	フラグメント分子軌道法-----	18
第一節	分子力学法	
第二節	シュレディンガー方程式	
第三節	ボルン-オッペンハイマー近似	
第四節	ハートリー=フォック法	
第五節	摂動法	
第六節	フラグメント分子軌道法	
第三章	研究手法-----	30
第一節	フラグメント分子軌道法による相互作用解析とファーマコフォアモデリング	
第二節	FMO 法と従来手法によるファーマコフォアモデリングの比較	
第三節	FMO 法、及び MM 法の相互作用エネルギーの比較	
第四節	FMO 法を応用したスペルミジン合成酵素阻害剤の探索	
第四章	TcDHODH のファーマコフォアモデリング-----	33
第一節	オロト酸とオキソソ酸の相互作用解析結果	
第二節	43 種のオロト酸誘導体の相互作用解析結果	
第三節	FMO 法と従来手法のファーマコフォアモデリングの比較	
第四節	FMO 法、及び MM 法による相互作用エネルギーの比較	
第五節	考察	
第五章	FMO 法を応用したスペルミジン合成酵素阻害剤の探索-----	47
第一節	FMO 法による TcSpdSyn 阻害剤の相互作用解析	
第二節	ファーマコフォアスクリーニングによる TcSpdSyn 阻害剤探索	

第三節	TcSpdSyn 阻害剤候補化合物の <i>in vitro</i> アッセイ試験結果	
第四節	考察	

第六章	総括-----	54
引用文献	-----	56
謝辞	-----	61
付録	-----	62

第一章 序論

第一節 インシリコスクリーニング

新規の薬理活性化合物の探索及び開発の研究は非常に長い期間と莫大な開発費が必要となる。創薬研究に掛かる期間は約 12~14 年、研究開発費は約 3000 億円掛かるといわれている^{1,2)}。そのため研究機関や開発費の削減のための研究手法が求められている。創薬研究初期における、効率の良い化合物探索の従来手法として、ハイスループットスクリーニング(High-throughput screening: HTS)やコンビナトリアルケミストリーなどが挙げられる^{3,4)}。HTS は大量の化合物の中から阻害活性を示す化合物を探索するために 96 穴、384 穴、または 1536 穴マイクロプレートを用いて分注、希釈、測定の流れを専用のアッセイロボットによって行うシステムである。また、コンビナトリアルケミストリーは多数の化合物の合成を迅速に合成するロボットによって自動化し、高速に多種多様な化合物の取得を行う方法である。

1960 年代以降、X線による生体高分子の構造解析や大規模なゲノム解析などが発展していくと同時に、コンピューターを用いた手法が注目を集めていった。ゲノム解析の分野では、人では扱えない程大規模なゲノム情報のアセンブリやアライメントなどにコンピューターを導入し、三次元構造情報を持つタンパク質などの生体高分子や薬となる低分子ではコンピューターを用いた可視化や、分子シミュレーションを行うことによって様々な創薬研究に適用された⁵⁻⁷⁾。

コンピューターを用いた化合物の探索手法は、次の 2 種類に分けられる。標的タンパク質の構造情報に基づいた分子設計を行う Structure-based drug design (SBDD)と、化合物の活性情報と構造式に基づいた分子設計を行う Ligand-based drug design (LBDD)である。SBDD では、標的タンパク質の X 線構造から化合物の結合部位を同定し、結合部位の形状や、電気的な特性の情報を用いて化合物の探索や最適化を行う手法である。一方、LBDD では既知の化合物の活性情報から新規化合物の活性の有無を予測する手法である^{8,9)}。

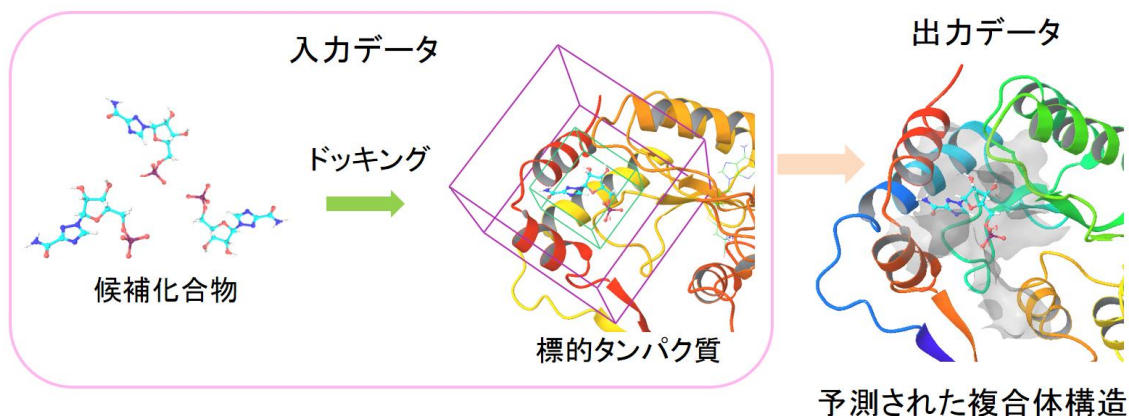


図 1.1.1 ドッキングシミュレーションの概要

SBDDでよく用いられる代表的な手法に、ドッキングシミュレーションがある(図 1.1.1)。ドッキングシミュレーションとは、標的タンパク質に対して候補となる化合物群をコンピュータ上で重ね合わせを行い、高速に大量の化合物の結合能を評価する手法である。入力データとして、薬理活性化合物の候補となる化合物群の構造データと標的タンパク質の構造データを使用し、シミュレーション後に候補化合物群と標的タンパク質の複合体構造を出力する。また、ドッキングされた各候補化合物と標的タンパク質との結合の強さをスコア関数によって評価し、結合能を予測する。現代の医薬品の多くは、標的となるタンパク質に結合し、機能の遮断や増幅、または触媒活性の阻害を行うことで薬理活性を示す。そのため、標的タンパク質と結合の予測は創薬研究の重要な課題の一つである。

標的タンパク質へのドッキング計算は、1982 年の Kuntz らによって開発された Dock と呼ばれるプログラムによって始められた¹⁰⁻¹⁵⁾。当時のドッキングでは、タンパク質や結合する化合物は構造変化のない剛体として扱われ、単純な鍵と鍵穴のモデルとして扱われていた。その後、化合物の構造変化が考慮されるようになり、遺伝的アルゴリズムを構造探索の手法として用いた AutoDock¹⁶⁾や、タンパク質側の構造変化もある程度考慮できる FlexX^{17,18)}、GOLD¹⁹⁾などが開発された。

現代のドッキングシミュレーションは、他の手法と組み合わせて使用されることが多い。例えば、ドッキングを行う際、標的タンパク質の X 線構造が報告されていることが望ましいが、構造が無い場合ホモロジーモデリングによる構造予測と組み合わせてドッキングシミュレーションを行うことが多い²⁰⁾。ホモロジーモデリングとは、タンパク質は、同一のファミリーに属しており配列の相同性が高ければそのタンパク質と構造が似ていると仮定し、その構造を参考に未知のタンパク質の構造予測を行う手法である。また、ドッキングでタンパク質の柔軟性を考慮するために分子動力学法 (Molecular Dynamics: MD)と呼ばれる手法も併用して用いられる^{21,22)}。MD は、運動方程式に従って原子や分子集団の時間発展を追跡するシミュレーション法である。タンパク質などの生体高分子や、水分子などの粒子間の相互作用にもとづいて運動方程式を解くことにより、対象とする系の挙動をコンピュータ上で予測することが可能である。

第二節 ファーマコフォアモデリング

一方、LBDD の代表的な手法の一つとして、定量的構造活性相関(Quantitative structure-activity relationship: QSAR)が挙げられる。QSAR は、化合物の薬理活性を物理化学的特性で数値化し、化合物の電子状態、立体構造、親水性・疎水性などの物理化学的パラメータを用いて薬理活性との相関を定量的に取り扱う方法である。1960 年代に C. Hansch、藤田稔夫により提唱された最も代表的な QSAR の方法である Hansch-Fujita 法²³⁾は、以下の式を基本としている。

$$\log (1/C) = a\pi + b\pi^2 + C\sigma + d Es + \text{constant} \quad (1.2.1)$$

C は薬理活性化合物が一定の活性を示すのに必要な濃度 (IC_{50} 、 CC_{50} 等)。 π は親疎水性、 σ は電子的特性、 Es は立体的な性質を表わす熱力学的パラメータである。薬理活性を示す類縁体について、生理活性値と化学的性質との定量的相関関係を解析し、薬理活性化合物の標的受容体への輸送過程、タンパク質と化合物間の相互作用、代謝などを含む活性発現過程の推定や薬理活性化合物の分子設計に対して有効な方法論となっている。

また、計算機科学の発展により、薬理活性化合物の三次元構造における物理化学的性質と生理活性値との相関関係を解析する 3D-QSAR が確立され、1988 年に Cramer らによって公表された Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 法²⁴⁾ は代表的な 3D-QSAR 法の一つとなっている。この方法はタンパク質と化合物間の相互作用において、化合物の立体構造が生理活性に影響を与えることと、タンパク質と化合物間の相互作用において結合が生成されず分子間相互作用による複合体が生成されるとの考え方に基づいている。CoMFA 法は、薬理活性化合物を包含する領域内に格子点を設定し、その各格子点上にプローブ原子 (H^+ 原子、 sp^3 炭素など) を設置する。設置されたプローブ原子と薬理活性化合物間の静電相互作用エネルギー (Coulomb) 及び van der Waals 相互作用エネルギー計算には、Lenard – Jones Potential を説明変数とし、生理活性値との定量的関係を解析する。

3D-QSAR や立体構造解析などの薬理活性化合物の立体構造に基づくドラッグデザインにおいて、類縁体の三次元構造の重ね合わせが行われる。通常、2 分子 A、B 間の対応する原子、あるいは原子団を設定し、それらの位置ベクトルを

$$\mathbf{r}_{Ai}, \mathbf{r}_{Bi} \quad (i = 1, 2, 3, \dots, n) \quad (1.2.2)$$

としたとき、次の関数 F を最小化することによって最適の重ね合わせが得られるものとする。

$$F = \sum |\mathbf{r}_{Ai} - \mathbf{r}_{Bi}|^2 \quad (1.2.3)$$

n 対の対応点 (A_i , B_i) の選択は主観に頼る場合が多く、そのため重ね合わせには任意性が含まれる。具体的な解決策として何通りかの重ね合わせを設定し、それぞれの結果を比較するなどの慎重な検討が必要となる。また、生理活性ペプチドや、配座自由度の高い薬理活性化合物は配座自由度の変化を考慮する必要がある。

QSAR とは別の LBDD の代表的な手法の一つに、ファーマコフォアモデリングが挙げられる。ファーマコフォアとは、1909 年に Pail Ehrlich により「薬物の生物学的活性

の原因となるに必須な特徴を持つ分子構造と定義された²⁵⁾。1977 年には、Peter Gund により「分子において受容体に認識され生物学的活性の原因となる一まとまりの構造的特徴」と再定義され²⁶⁾、また IUPAC では「化合物が特定の生物ターゲット構造 (受容体などの) と分子的相互作用を行って、生物応答を引き起こす際に必要かつ最適な立体的または電気的特徴の組み合わせである」と定義されている。ファーマコフォアは分子の具体的な官能基群を指すものではなく、標的タンパク質に阻害活性を示す化合物群に共通の特徴を抽出する抽象的な概念である。古典的な新規薬理活性化合物の探索や最適化は、実験者が化合物の二次元構造式や活性情報をもとに化合物の合成を行っていたが、現在ではコンピューター上で化合物の三次元構造の重ね合わせを行い、ファーマコフォアを同定する方法が一般的である(図 1.2.1)。薬理活性化合物群の構造を重ね合わせ、共通して存在する特徴をファーマコフォアとして同定し、活性未知の化合物群を作成したファーマコフォアモデルに重ね合わせを行い、モデルに一致する特徴を持つ化合物のみを実験によって活性値の測定を行うことで実験のコストを削減することが可能である。ファーマコフォアに指定される。水素結合のドナーやアクセプターとなりえる場所や、疎水性の部位、芳香族性の環、静電的相互作用が可能な部位などがある。

ファーマコフォアモデルは、化合物の三次元構造の重ね合わせからモデリングされることが多いが、実際にタンパク質との結合様式を模してはいない。そのため、スクリーニングによってファーマコフォアに適合する化合物を発見したとしても、標的タンパク質の部位に結合する際、立体障害や、化合物が大きすぎることによって生じる原子間の衝突などによって標的に対して結合できないケースがある。また、ファーマコフォアとして定義された部位が、どのように機能するかも不明である。例えば、活性が確認された化合物群に正電荷を有する官能基が共通していた場合、その官能基がタンパク質との相互作用に重要なのか、または水溶性などの物性で活性向上に寄与しているかは不明である。また、化合物の活性向上のために、タンパク質との新たな相互作用の獲得は重要な課題である。しかしながら、ファーマコフォアモデリングの共通な特徴の抽出を行う手法では、一部の化合物が獲得したタンパク質との新たな相互作用を抽出することは出来ない。LBDD の利点は標的タンパク質の構造が解かれていないケースでも適用できることではあるが、薬理活性が確認された化合物と標的タンパク質の複合体構造に対してタンパク質と化合物間の相互作用解析を行い、それらの相互作用情報をもとにファーマコフォアモデリングを行うことによって従来手法を改善することが可能であると考えられる。

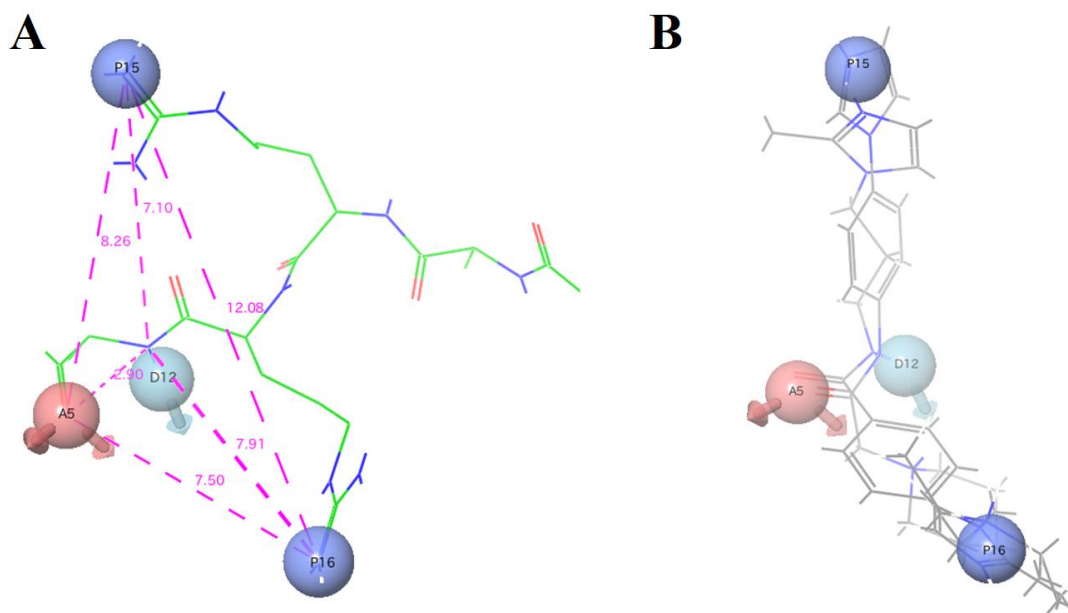
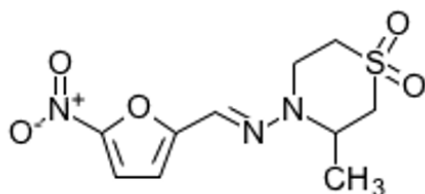


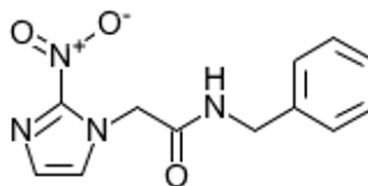
図 1.2.1 ファーマコフォアモデリング例 (A: 生理活性ペプチドにもとづいたファーマコフォアモデリング、B: 薬理活性化合物候補群のスクリーニング、赤: 水素結合のアクセプター、水色: 水素結合ドナー、群青: 正電荷)

第三節 シャーガス病

顧みられない熱帯病(Neglected Tropical Diseases: NTDs)とは、世界保健機関(World Health Organization: WHO)が定めた 17 種の疾病の総称であり、約 150 か国で蔓延し、罹患者数は約 10 億人に達する^{27,28)}。これらの疾病は主に発展途上国で蔓延しており、創薬研究の対象となりにくいため、深刻な社会問題となっている。それらの疾病の一つであるシャーガス病は、*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)の感染によって引き起こされる疾病であり、世界で三番目に多い寄生性の疾患である²⁹⁾。この疾病は、南米などの約 20 か国で蔓延しており³⁰⁻³²⁾、約 1500 万人が感染していると見積もられている³³⁾。*T. cruzi*の主な感染経路はサシガメ類の吸血、及び感染者の輸血である³⁴⁾。感染の症状は、急性期にはインフルエンザのような症状が発症し、慢性期には胃腸障害や心臓障害が発症する^{35,36)}。シャーガス病の治療薬として、ニフルチモックスとベンズニダゾールに 2 種類が存在する(図 1.3.1)。しかしながら、これらの治療薬には強い副作用や、慢性期に効果が無いなどの欠点が存在するため、新たな医療薬の開発が求められている^{37,38)}。



Nifurtimox



Benznidazol

図 1.3.1 シャーガス病の既存の治療薬

第四節 ジヒドロオロト酸脱水素酵素

シャーガス病治療薬開発の標的タンパク質の一つとして、ジヒドロオロト酸脱水素酵素 (dihydroorotate dehydrogenase: DHODH) が挙げられる。このタンパク質は、DNA や RNA などの核酸に必須であるピリミジン環の *de novo* 合成に関わる酵素である。図 1.4.1 に DHODH の基質と生成物及び補酵素であるフラビンモノヌクレオチド (flavin mononucleotide: FMN) を示す。DHODH は FMN を補酵素として用いてジヒドロオロト酸の酸化を触媒する酵素である。FMN は酸化型(FMN)と、還元型が存在する(FMNH₂)。酸化型の FMN がジヒドロオロト酸から水素を受け取り還元型の FMNH₂に変化し、ジヒドロオロト酸に二重結合を導入しオロト酸を生成する³⁹⁾。ヒトの DHODH (hDHODH) ではユビキノン電子受容体としてミトコンドリア内膜に存在する⁴⁰⁾。 *T. cruzi* の DHODH (TcDHODH) は細胞質タンパク質として存在し、フマル酸を電子受容体として使用する。また、TcDHODH をノックアウトした *T. cruzi* は生存できないことが報告されている⁴¹⁾。そのため、シャーガス病の治療薬の標的タンパク質として有望である。DHODH は免疫抑制薬、抗マラリア原虫薬、グラム陰性微好気性細菌であるピロリ菌に対する薬の標的として知られている⁴²⁻⁴⁶⁾。これらの開発された主特異的な抗 DHODH は、*in vitro* 及び *in vivo* で効果が確認されている^{47,48)}。しかしながら、これらの阻害剤はユビキノンの結合部位を標的として設計されたものであり、細胞質タンパク質の DHODH を阻害することはできないため、新たな阻害剤の開発が求められている。

図 1.4.2 に *T. cruzi* の DHODH (TcDHODH) と生成物であるオロト酸の複合体構造を示す⁴⁹⁾。FMN は参加型の生成物であるオロト酸のピリミジン環は補酵素の FMN のイソアロキサジン環とほぼ平行な位置に存在している。そのため、二つの化合物間に π - π 相互作用があることが構造から予測される。

DHODH の生成物であるオロト酸を母核とした 43 種の誘導体が東京大学の北潔教授らによって合成され、X 線構造解析による TcDHODH との複合体構造が報告されている⁴⁹⁾。これらの誘導体の構造式を図 1.4.3、誘導体 43 DHODH の結晶情報を表 1.4.1 に示す。オロト酸誘導体はピリミジン環の 5 位にエチレン、またはブチレン鎖を通じて芳香環が結合した共通の構造を持つ。

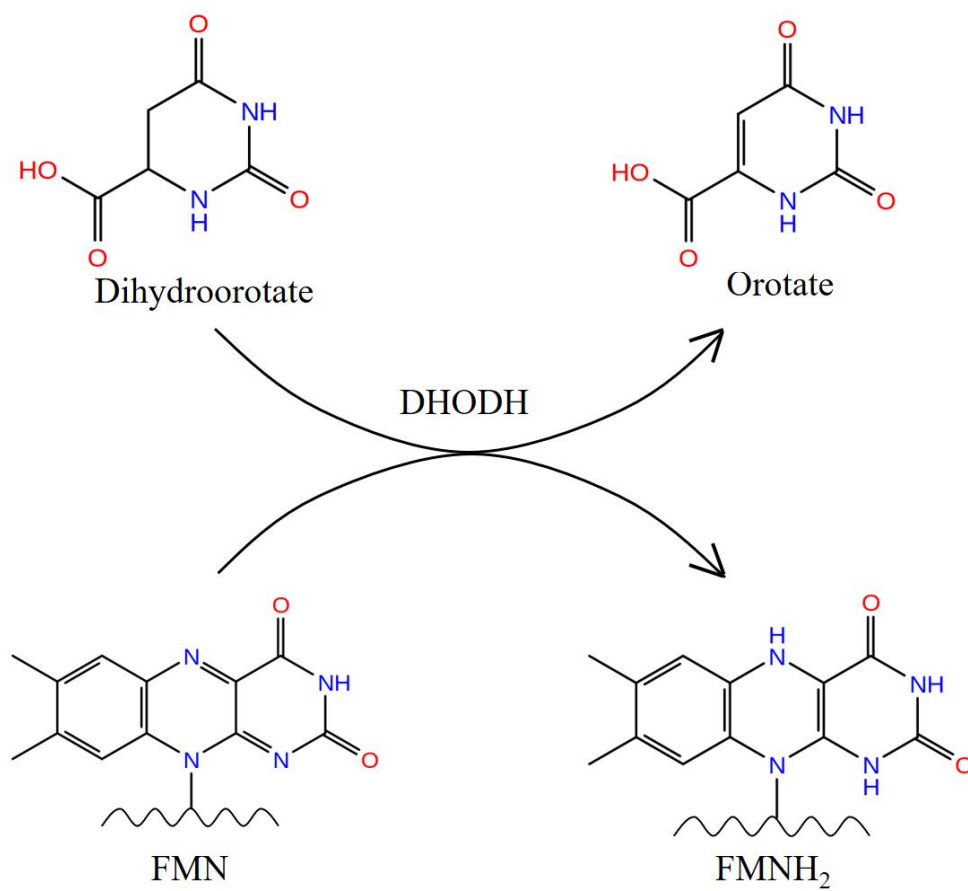


図 1.4.1 DHODH によるオロト酸生成

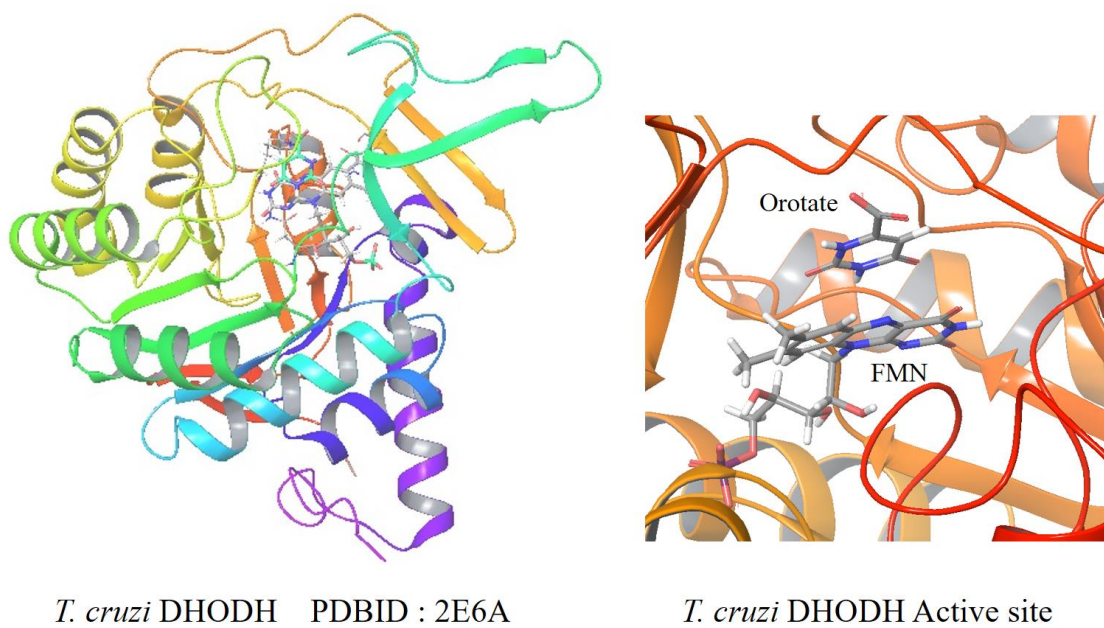


図 1.4.2 TcDHODH の全体構造、及び活性中心 (PDBID: 2E6A)

表 1.4.1 オロト酸誘導体と DHODH との結晶構造の詳細データ

PDB ID	Derivative	Resolution(Å)	R-value	R-Free	Ligand Occupancy	B-factor (ligand)	B-factor (All)
3W1R	1	1.58	0.157	0.181	1.00	12.92	11.45
3W1T	2	1.68	0.144	0.179	1.00	15.02	12.69
3W1U	3	1.85	0.153	0.185	1.00	18.78	15.90
3W1X	4	1.45	0.140	0.161	1.00	8.31	11.01
3W2J	5	1.42	0.144	0.168	1.00	13.82	11.56
3W2K	6	1.54	0.138	0.169	1.00	19.46	13.26
3W2L	7	1.64	0.136	0.170	1.00	16.30	13.27
3W2M	8	1.58	0.139	0.169	1.00	15.00	12.37
3W2N	9	1.96	0.149	0.194	1.00	10.98	14.11
3W2U	10	2.25	0.208	0.270	1.00	23.15	22.87
3W3O	11	1.96	0.151	0.192	1.00	19.84	20.06
3W22	12	1.98	0.166	0.211	1.00	26.97	23.73
3W23	13	1.48	0.146	0.177	1.00	16.13	13.79
3W6Y	14	2.68	0.199	0.282	1.00	40.63	23.14
3W7C	15	1.75	0.144	0.195	1.00	14.68	13.99
3W7D	16	1.52	0.146	0.174	1.00	14.87	13.93
3W7E	17	1.56	0.143	0.173	1.00	13.05	12.60
3W7G	18	1.55	0.138	0.165	0.67	11.01	12.85
3W7H	19	1.67	0.145	0.176	0.67	18.94	15.19
3W7I	20	1.69	0.145	0.179	1.00	19.22	13.84
3W7J	21	1.58	0.149	0.182	0.67	10.33	10.79
3W7K	22	1.61	0.150	0.180	1.00	15.93	15.69
3W7L	23	1.88	0.145	0.189	1.00	14.73	14.66
3W7M	24	2.40	0.175	0.246	1.00	33.44	29.54
3W7N	25	2.39	0.188	0.255	1.00	53.08	37.34
3W7O	26	1.68	0.142	0.178	1.00	14.63	13.76
3W7P	27	1.70	0.142	0.175	1.00	18.19	13.29
3W7Q	28	1.83	0.144	0.179	1.00	19.10	18.48
3W70	29	2.60	0.202	0.275	1.00	42.47	25.34
3W71	30	1.68	0.146	0.175	1.00	21.25	15.98
3W72	31	1.55	0.142	0.172	0.67	11.48	14.44
3W73	32	1.78	0.146	0.181	1.00	19.84	14.40
3W74	33	1.90	0.175	0.228	1.00	29.90	22.87
3W75	34	1.47	0.139	0.166	0.67	12.02	12.50
3W76	35	1.58	0.140	0.170	1.00	16.11	14.47
3W83	36	2.80	0.199	0.297	1.00	40.63	23.70
3W84	37	1.93	0.202	0.254	1.00	22.26	16.84
3W85	38	2.00	0.157	0.202	1.00	24.14	19.12
3W86	39	1.50	0.145	0.184	1.00	19.13	15.13
3W87	40	1.43	0.155	0.187	0.67	15.53	10.62
3W88	41	1.40	0.140	0.166	0.67	21.44	11.03
4JD4	42	1.51	0.138	0.162	1.00	15.53	14.13
4JDB	43	1.82	0.169	0.211	1.00	26.24	20.87

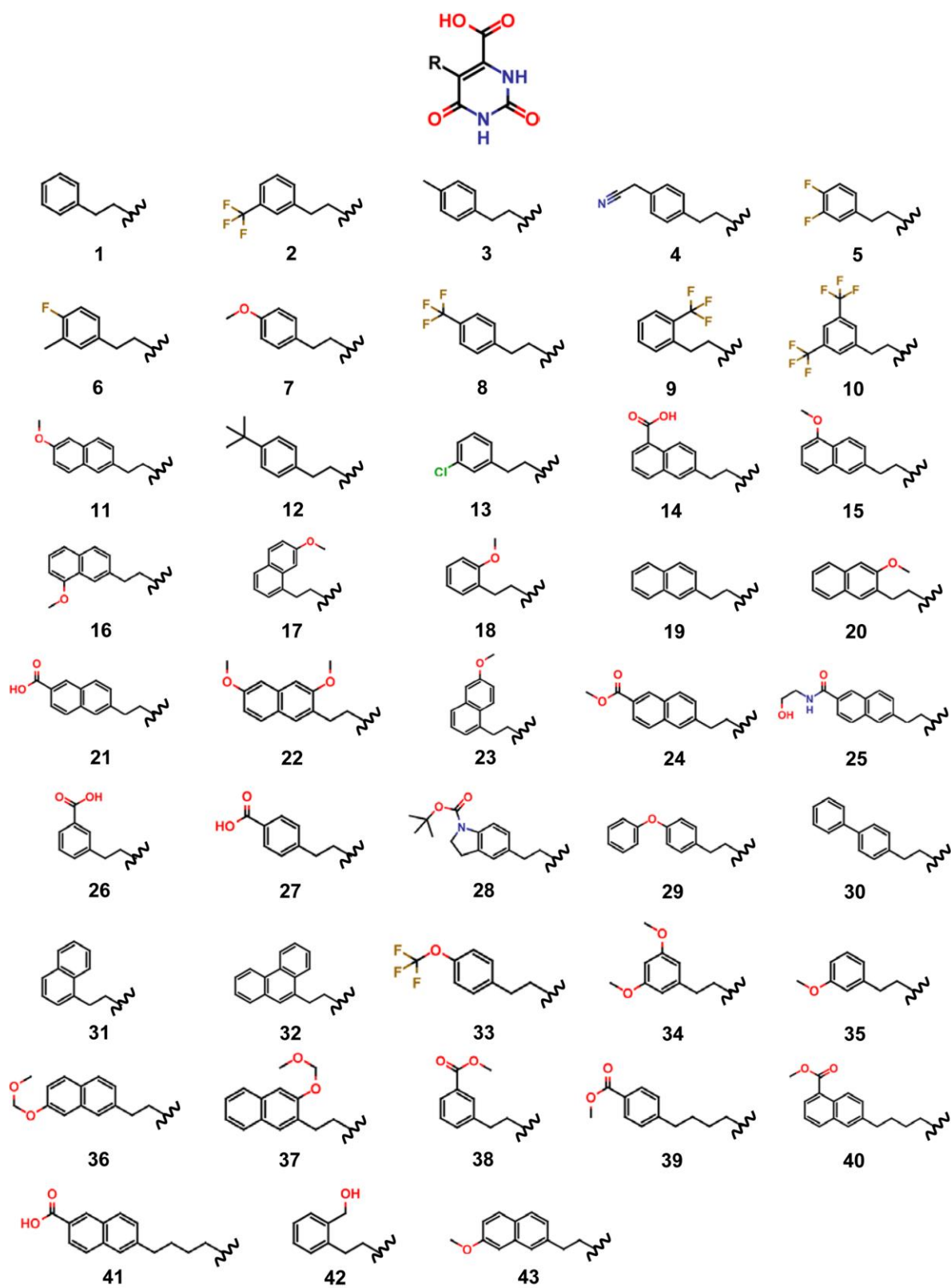


図 1.4.3 合成された 43 種のオロト酸誘導体の構造

第五節 スペルミジン合成酵素

抗シャーガス病治療薬のもう一つの標的タンパク質として、スペルミジン合成酵素 (spermidine synthase: SpdSyn) が挙げられる。この酵素はポリアミンの合成経路を担うタンパク質の一つである。図 1.5.1 にスペルミジンの合成経路を示す。この酵素は S-アデノシルメチオニン (SAM) のカルボン酸を脱炭酸した化合物 (dcSAM) を補酵素として使用する⁵⁰⁻⁵²⁾。dcSAM からプトレシンにポリアミンを転移させ、スペルミジン合成する。ポリアミンは DNA の複製や安定化に必須であり⁵³⁻⁵⁶⁾、SpdSyn をノックアウトしたアフリカ睡眠病の原因となるトリパノソーマ科の寄生原虫、*Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) は生存できないことが報告されている⁵⁷⁻⁶²⁾。図 1.5.2 に *T. cruzi* の SpdSyn (TcSpdSyn) と *T. brucei*、同じくトリパノソーマ科の寄生原虫である *Leishmania* 及びヒトの SpdSyn の配列アライメントの結果を示す。トリパノソーマ科の寄生原虫である *T. brucei* 及び *Leishmania* との Identities はそれぞれ 67%、60% と高い相同性を持つ。一方、ヒトの SpdSyn との相同性は 38% と低い相同性のため、選択的にトリパノソーマ科の寄生原虫を阻害する薬の開発が期待される。

TcSpdSyn と既知阻害剤である 4-メチルシクロヘキシルアミン (4MCHA) との結晶構造が報告されている⁶³⁾。図 1.5.3 に TcSpdSyn と 4MCHA との結晶構造を示す。この既知阻害剤である 4MCHA は、SpdSyn の基質であるプトレシンと同様の場所に結合し、阻害活性を示す (IC₅₀: 1.7 μM)⁶³⁾。4MCHA のアミノ基は Asp171 と塩橋を形成し、基質であるプトレシンも同様のアミノ酸残基と塩橋を形成する。しかしながら、この既知阻害剤の構造は一般的な薬理活性化合物と比較すると非常に小さく、水素結合及び塩橋のドナーを一つしか有さないため標的タンパク質への選択性の低さが懸念される。そのため、新たな阻害剤の探索及び設計が求められる。

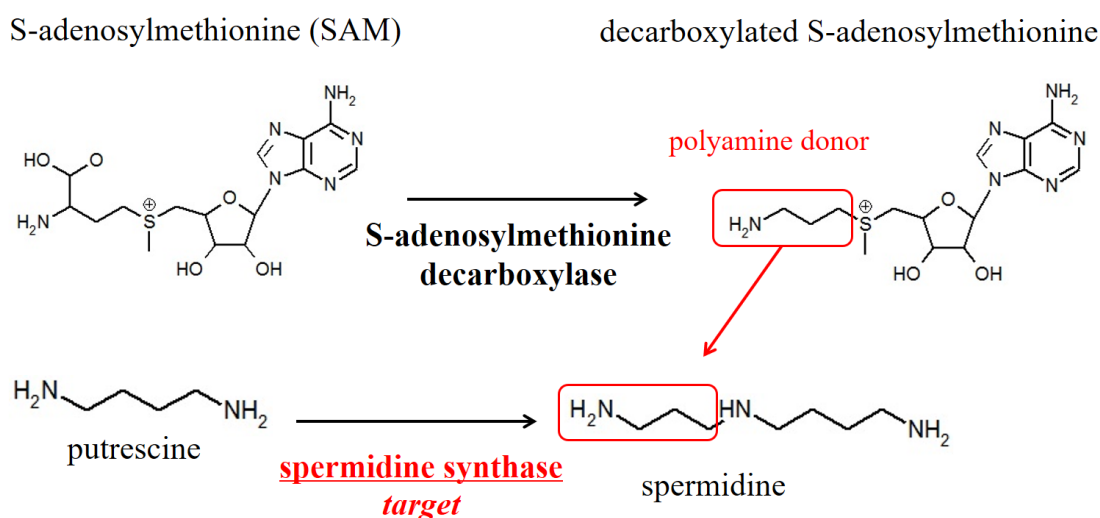


図 1.5.1 スペルミジン合成経路

a

```

>Tb09.v1.0380 |||spermidine synthase, putative|Trypanosoma
      brucei|chr 9|||Manual
      Length = 298

Score = 431 bits (1107), Expect = e-154, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 199/296 (67%), Positives = 239/296 (80%), Gaps = 1/296 (0%)

Query: 1  MPGSELISGGWFREENDQWPGQAMSLRVEKVLVDAPTKFQHLTIFESDPKGPWGTVMALD 60
      MPG L++ GWFREEN QWPGQAMS +VE+VL+D PTKFQHL+IFE+DPKGPWGTVM LD
Sbjct: 1  MPGPGLLADGWFREENGQWPGQAMSFKEEVLHDTPTKFQHLSIFETDPKGPWGTVMTL 60

Query: 61  GCIQVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPXXXXXXXXXXXXXXXXXHGTVCHDLDVID 120
      GCIQ+TD+DEFVYHE+L HT LC+HP P HGTV+ C LVDID
Sbjct: 61  GCIQLTDFDEFVYHEMLSHPTLCAHPDPVDLIIGGGGGVMREVLRHGTVKRCVLVDID 120

Query: 121  GEVMEQSKQHFPQISRSLDPRATVRVDDGLAFVRQTPDNTYDVIIIDTDPAGPASELF 180
      G+V+E SK++FPQIS +DPRA VRV DG+AFVR+ ++DVIIIDTDP GPA+ELF
Sbjct: 121  GDVIEASKYFPQISSGSDPRADVRVGDGVAFVREAASESFDVVIIDTDPDGPAAELF 180

Query: 181  GEAFYKHLRILKPDGICCNQGESIWLNLLEIEKMSRFIR-ETGFASVQYALMHVPTYP 239
      GE FY+ VLRILKP GICCNQGES+WLN LIE M+ FI+ + GFASV+YA+++ PTYPC
Sbjct: 181  GEKFYRDVLRILKPRGICCNQGESVWLNRLNIEGMADFINKKVGFAVKYAMIYPTYP 240

Query: 240  GSIGTLICSKKAGVDVTKPLRPVEDMPFAKDKYYDSEMHKASFALPRFARHINNS 295
      GSIG+LICKS AGVDVT+P+RPVE MPFA +LKYYDS++HKA+F LPRFARH+N +
Sbjct: 241  GSIGSLICKSVAGVDVTPVRPVESMPFAGELKYDSDVHKAFAFLPRFARHLNQ 296

```

b

```

>LmjF.04.0580 | organism=Leishmania_major_strain_Friedlin |
      product=spermidine synthase |
      location=LmjF.04:239178-240080(-) | length=300
      Length = 300

Score = 380 bits (977), Expect = e-134, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 180/299 (60%), Positives = 218/299 (72%), Gaps = 6/299 (2%)

Query: 1  MPGSELISGGWFREENDQWPGQAMSLRVEKVLVDAPTKFQHLTIFESDPKGPWGTVMALD 60
      MPG L+ GWFREE+ WPGQA L+VEKVLVD PT+FHQLT+FE SDP GPWGTVM LD
Sbjct: 1  MPGPGLLPDGFREESTMWPQAQGLKVEKVLVDQPTFQHLTVFESDPGPGWGTVMTL 60

Query: 61  GCIQVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPXXXXXXXXXXXXXXXXX-----GTVEHCD 115
      G IQ+TDYDEFVYHE+L + SL H KP H G V+ +
Sbjct: 61  GAIQLTDYDEFVYHEMLANLSLACHHKPERVLVIGGGGGVREVLRHKSEKDGVVQSVE 120

Query: 116  LVDIDGVEVMEQSKQHFPQISRSLDPRATVRVDDGLAFVRQTPDNTYDVIIIDTDPAGP 175
      LVDIDG VM+QSK+HFPQ++ +P T V DG AFVR PD+ YDV+IIDTDP GP
Sbjct: 121  LVDIDGAVMQSKKHFPQVACGFANPCVTATVGDGAFAVRNVPDSVYDVIIIDTDPKGP 180

Query: 176  ASELFGAEFYKHLRILKPDGICCNQGESIWLNLLEIEKMSRFI-RETGFASVQYALMHV 234
      ASELFG FY +VLRIL+P G+ CNQGES+WL+ LIEKM F+ ++ GFA+V+YA+++
Sbjct: 181  ASELFGADFYTNVLRILRPGGVVCNQGESVWLRHRLIEKMGMGLKDKIGFATVKYAMIYI 240

Query: 235  PTYPCGSIGTLICSKKAGVDVTKPLRPVEDMPFAKDKYYDSEMHKASFALPRFARHIN 293
      PTYPCGSIGTL+C+K A DVT P+RPVE + FA LKYY S+MHKA+F LPRFA H+N
Sbjct: 241  PTYPCGSIGTLVCAKADTDTVPMRPVESLGFADQLKYSSDMHKAFAFLPRFAAHLN 299

```

c

```

>gi|63253298|ref|NP_003123.2| spermidine synthase [Homo sapiens]
      Length = 302

Score = 224 bits (571), Expect = 5e-72, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 114/293 (38%), Positives = 172/293 (58%), Gaps = 6/293 (2%)

Query: 3  GSELISGGWFREENDQWPGQAMSLRVEKVLVDAPTKFQHLTIFESDPKGPWGTVMALDGC 62
      G I GWFRE WPGQA+SL+VE++L+ +++Q + +F S +G V+ LDG
Sbjct: 12  GPAIREGWFRETCSLWPGQALSLQVEQLHHRRSRVQDILVFRSKT---YGNVLVDGV 68

Query: 63  IQVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPXXXXXXXXXXXXXXXXXHGTVCHDLDVIDGE 122
      IQ T+ DEF Y E++ + LCSHP P H +VE +ID +
Sbjct: 69  IQCTERDEFYSQEMIANLPLCSHPNPRKVLIIIGGGGGVLRVVKHPSVESVQCEIED 128

Query: 123  VMEQSKQHFPQISRSLDPRATVRVDDGLAFVRQTPDNTYDVIIIDTDPAGPASELFGE 182
      V++ SK+ P ++ + + T+ V DG F++Q D +DV+I D++DP GPA LF E
Sbjct: 129  VIQVSKKFLPGMAIGYSSSKLTLHVGDFEFMKQND-AFDVITDSSDPMGPAESLFKE 187

Query: 183  AFYKHLRILKPDGICCNQGESIWLNLLEIEKMSRFIRETGFAVQYALMHVPTYPGSI 242
      ++Y+ + LK DG+ C QGE WL+L+LI++M +F + F V YA +PTYG G I
Sbjct: 188  SYYQLMKTALKEDGVLCCQGEQWLHLDLIKEMRQFCQSL-FPVVAYACTIPTYPGSI 246

Query: 243  GTLICSKKAGVDVTKPLRPVEDMPFAK-DLKYDSEMHKASFALPRFARHINN 294
      G ++CSK + +P++P+ A+ LKYY+S+++H+A+F LP FAR N
Sbjct: 247  GFMLCSKNPSTNFQEPVQLTQQQVAQMQLKYNSDVHRAAFVLPFARKALN 299

```

図 1.5.2 *T. cruzi* と各生物種の *SpdSyn* の配列アライメント

A: *T. brucei*, B: *Leishmania major*, C: *Homo sapiens*.

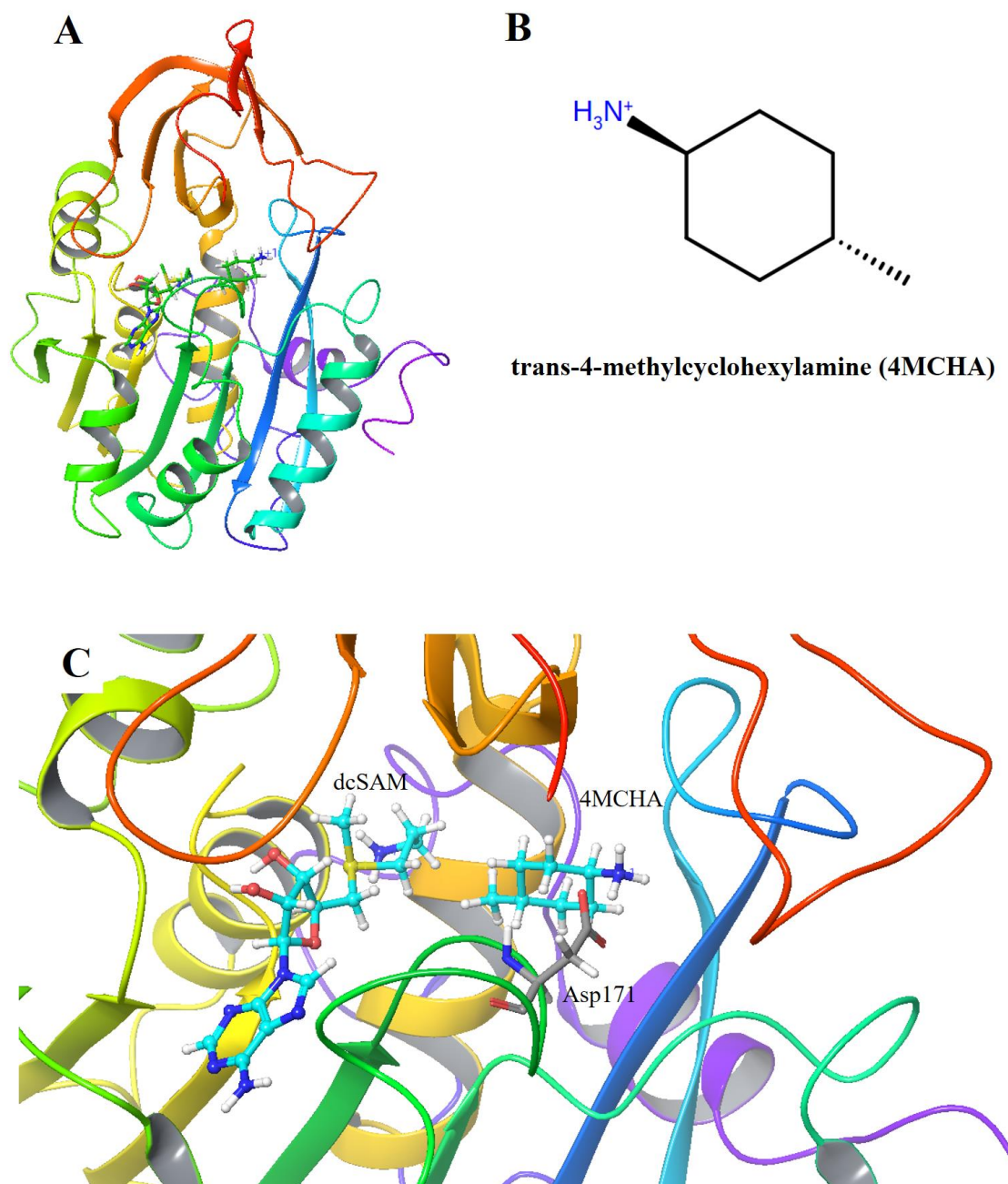


図 1.5.3 スペルミジン合成酵素と 4MCHA の結晶構造 (PDBID: 4YUW、A: TcSpdSyn 全体構造、B: 4MCHA の構造式、C: TcSpdSyn の活性中心)

第六節 研究目的

第二節で述べた、従来のファーマコフォアモデリングの改善を行うため、本研究ではフラグメント分子軌道法(Fragment molecular orbital: FMO)を用いた相互作用解析をTcDHODH と生成物であるオロト酸と既知阻害剤であるオキソン酸⁴⁹⁾、及び43種のオロト酸誘導体の結晶構造に対して実行し、相互作用情報に基づいたファーマコフォアモデリングを行った。従来の手法による化合物の三次元構造の重ね合わせから構築されたファーマコフォアモデルとの比較し、FMO法による相互作用解析を用いた新たなファーマコフォアモデリングの手法の検討を行った。本研究ではさらに、TcSpdSyn に対してFMO法による相互作用解析を用いたファーマコフォアモデリングを応用し、新規薬理活性化合物の取得を行った。

本論文では、FMO法や従来手法によるエネルギー計算の概要を第二章、本研究の手法を第三章、FMO法によるオロト酸誘導体のファーマコフォアモデリングと従来手法との比較を第四章、FMO法によるファーマコフォアモデリングを応用した新規TcSpdSyn 阻害剤の取得を第五章で述べる。

第二章 フラグメント分子軌道法

第一節 分子力学法

フラグメント分子軌道法の概要を述べる前に、古典力学によるエネルギー計算について述べる。タンパク質などの生体高分子の分子シミュレーションを行う際、一般的には分子力学法(Molecular mechanics: MM)と呼ばれる手法を用いて分子のポテンシャルエネルギーを求める。MM 法は原子をおもり、結合をばねに例えた大胆なモデル化によって巨大分子のエネルギーを短時間で計算できる手法である。MM 法による分子の全ポテンシャルエネルギーの計算は、以下の式によって求められる

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{tors}} + E_{\text{nb}} \quad (2.1.1)$$

E_{tot} は全ポテンシャルエネルギー、 E_{bond} は結合の伸縮エネルギー、 E_{angle} は結合角の変角エネルギー、 E_{tors} はねじれ角エネルギー、 E_{nb} は非共有結合性の相互作用エネルギーである。 E_{nb} の例としては、van del Waals 相互作用や静電相互作用、水素結合などである。各エネルギー成分は、分子を構成する原子座標の簡単な関数でモデル化されており、エネルギー成分を評価する関数を一般的に「力場 (Force Filed)」と呼ぶ。力場は実験的によって経験的によって求められる場合と、量子化学計算によって決定される場合などがあり、計算の対象となる系や開発目的によって異なるパラメータが提唱されるため一義的には決まらない。有名な力場として、Allinger らによって開発された MM2 や MM3^{64,65)}、Kollmann らによる Amber⁶⁶⁾が有名である。

MM 法の結合伸縮エネルギーは以下の式によって表す。

$$e_{\text{bond}} = K_b(l - l_0)^2 \quad (2.1.2)$$

K_b はばね定数、 l_0 は平衡状態での結合長である。 K_b 及び l_0 は原子対ごとに異なる。例として、C-C 結合は C-O 結合とは異なる値を持つ。また、原子対が同じ C-C 結合でも、単結合と二重結合では値は異なる。分子全体の結合伸縮エネルギーは、すべての結合に対するエネルギーの和として以下のように表す

$$E_{\text{bond}} = \sum e_{\text{bond}} \quad (2.1.3)$$

変角エネルギーの計算も同様にばねモデルが適用され、以下のように表す

$$E_{\text{angle}} = \sum e_{\text{angle}} = \sum K_a(\theta - \theta_0)^2 \quad (2.1.4)$$

K_a はばね定数、 θ_0 は平衡結合角である。結合伸縮エネルギーの時と同様に、 K_a と θ_0 は結合角をなす三原子の組み合わせごとに異なる値を持つ。さらに、少ない原子数で構成された環では結合角が強く拘束されている。直鎖上の分子とは異なるパラメータが用いられている。

ねじれ角エネルギーは分子内で発生する回転障壁を考慮することができる。例としてエタンの重なり型とねじれ型では、ポテンシャルエネルギーは約 12kJ/mol 異なる。また、エチレンでは炭素間に二重結合が存在するため回転はほとんど起こらず、エチレンの構成原子すべてが同一平面上に存在する。ねじれ角エネルギーは以下の式で表す。

$$e_{\text{tors}} = V_n (1 + \cos n\phi) \quad (2.1.5)$$

ϕ は対象とする二面角、 V_n は回転のエネルギー障壁である。 n はねじれ角の周期性を表していて、エタンでは $n=3$ 、エチレンでは $n=2$ となる。エタンやエチレンの炭素間結合のように、回転障壁となる原子がすべて水素原子で同じものならば (2.1.5) でねじれエネルギーを表現できる。回転障壁に非対称性があると (2.1.5) では表せないので、以下のように余弦関数の和として表す。

$$e_{\text{tors}} = V_1 (1 + \cos\phi) + V_2 (1 - \cos 2\phi) + V_3 (1 + \cos 3\phi) \quad (2.1.6)$$

ねじれ角エネルギーのパラメータ V_n にも変角エネルギーと同様に、少ない原子数で構成された環には別のパラメータが使用される。(2.1.6)より、分子全体の全ねじれエネルギーは以下のように表す。

$$E_{\text{tors}} = \sum e_{\text{tors}} \quad (2.1.7)$$

非共有結合性の相互作用エネルギーのうち、van del Waals 相互作用を表す関数で最も有名なのがレナード - ジョーンズポテンシャル(Lennard-Jones potential)である。この関数は、以下の式のように表す。

$$e_{\text{vdw}} = A \{ (r_m/r_{ij})^{12} - (r_m/r_{ij})^6 \} \quad (2.1.8)$$

r_{ij} は対象とする原子 i と j 間の距離、 r_m は van del Waals エネルギーが最小状態での原子間距離、つまり原子 i と j の van del Waals 半径の和である。また、 A はポテンシャルの大きさを表すパラメータである。12 乗の項が近距離での反発相互作用を表し、6 乗の項はロンドン分散力を表す。Van del Waals 相互作用に限らず、非共有結合性の相互作用

エネルギーは 3 結合以上離れたすべての原子対に対して評価を行うため、van del Waals 相互作用エネルギーの総和は以下のように表す。

$$E_{vdw} = \sum_i \sum_{j \geq i+3} e_{vdw} \quad (2.1.9)$$

分子内の電子的な偏りによって生じる静電相互作用エネルギーは、クーロン則をによって記述される。

$$e_{charge/charge} = q_i q_j / 4\pi\epsilon_0 r_{ij} \quad (2.1.10)$$

ここで q_i は原子 i の電荷、 ϵ_0 は真空中の誘電率($8.854 \times 10^{-12} \text{C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$)である。また、双極子同士の相互作用は双極子の向きにも依存するので以下のように表す。

$$e_{dipole/dipole} = \mu_i \mu_j / 4\pi\epsilon_0 r_{ij}^3 (\cos\kappa - 3\cos\alpha_i \cos\alpha_j) \quad (2.1.11)$$

μ_i は結合 i の双極子、 r_{ij} は結合 i 、 j のそれぞれの中点の間の距離、 κ は二つの結合 i と j のなす角、 α_i は結合 i とそれぞれの結合の中点を通る直線のなす角である。

水素結合の相互作用エネルギーは生体高分子の構造安定化などに関わる重要な相互作用である。水素結合エネルギーは van del Waals 相互作用エネルギーと静電相互作用エネルギーに含まれて考慮されている力場も存在するが、水素結合エネルギーを独立に考慮する力場も存在する。水素結合エネルギーは以下のように表す。

$$e_{hb} = (A/r_{ij})^{12} - (B/r_{ij})^{10} \quad (2.1.12)$$

これらのエネルギーの総和によって、MM 法は生体高分子などの巨大な系のエネルギーを求める。第一章第四節で述べたドッキングシミュレーションやファーマコフォアモデリングを行う際、スコア関数の計算や化合物の配座探索にこの MM 法を用いてエネルギー計算を行う。

第二節 シュレディンガー方程式

生体高分子などの巨大な系のエネルギーを求める際、一般的には前節に述べた MM 法を用いるが、本来はシュレディンガー(Schrödinger)方程式を解かなければならない。シュレディンガー方程式は、量子力学における基礎方程式であり、原子や分子の性質はすべて波動関数 Ψ によって記述される。

$$H\Psi = E\Psi \quad (2.2.1)$$

(2.2.1)を定常状態のシュレディンガー方程式と呼び、 H は全エネルギーに対応するハミルトン演算子である。また、 E はエネルギー固有値であり、 Ψ で表される状態のエネルギーである。 Ψ は電子や原子核の位置座標の関数であり、 $\Psi \times \Psi$ はこれらの粒子をそれぞれ決められた範囲に見出す確率密度を与える。単純な1電子の系で考えると、1点(x, y, z)の体積要素、 $dv(=dxdydz)$ の中にその電子を見出す確率は次のように表す。

$$\Psi^*(x, y, z) \Psi(x, y, z) dv \quad (2.2.2)$$

また、電子は原子核の周りの一定の範囲に必ず存在する。そのため、確率は1にならなければならない。したがって、(2.2.1)は次のようになる。

$$\int \Psi^*(x, y, z) \Psi(x, y, z) dv = 1 \quad (2.2.3)$$

この積分は、電子の存在する全領域に対して行う。この指定した確率のことを規格化条件といい、この条件が満たされているとき波動関数は規格化されているという。

原子や分子の問題に(2.2.1)を適用するために、運動エネルギーと位置エネルギーの演算子をそれぞれ \hat{T} 、 \hat{V} とすると、(2.2.1)は次の式のように表す。

$$H = \hat{T} + \hat{V} \quad (2.2.4)$$

また、 n 個の電子と N 個の原子核からなる分子の \hat{T} は次のように表す。

$$\hat{T} = \sum_{i=1}^n \hbar^2 / 2m \times \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^N \hbar^2 / 2M_A \times \nabla_A^2 \quad (2.2.5)$$

m は電子の質量、 M_A は原子核の質量である。 \hbar と ∇^2 は次のように表す。

$$\hbar = h / 2\pi \quad (2.2.6)$$

$$\nabla^2 = (\partial^2 / \partial x^2 + \partial^2 / \partial y^2 + \partial^2 / \partial z^2) \quad (2.2.7)$$

また、 \hat{V} は次のように表す。

$$\hat{V} = - \sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^N Z_A e^2 / 4\pi\epsilon_0 \times 1/r_{iA} + \sum_{j>i}^n e^2 / 4\pi\epsilon_0 \times 1/r_{ij} + \sum_{B>A}^N Z_A Z_B e^2 / 4\pi\epsilon_0 \times 1/r_{AB} \quad (2.2.8)$$

r_{iA} 、 r_{ij} 及び r_{AB} はそれぞれ電子・原子核間距離、電子・電子間距離、原子核・原子核間距離である。また、 $-e$ は原子の電荷、 $Z_A e$ は核 A の電荷を示し、 ϵ_0 は真空の誘電率で、その値は $8.854 \times 10^{-12} \text{J}^{-1} \cdot \text{C}^2 \cdot \text{m}^{-1}$ である。

原子や分子の性質を求めるには(2.2.4)で与えられるハミルトニアンに対して固有値問題を解けば良い。しかしながら、厳密な解が得られるのは水素原子や水素と類似した系だけであり、多電子系の原子や分子は近似解を得るための方法が必要である。

第三節 ボルン-オッペンハイマー近似

シュレディンガー方程式を解くために行う最初の近似は、ボルン-オッペンハイマー (Born–Oppenheimer) 近似である。陽子や中性子の質量は、電子の約 1840 倍である。ボルン-オッペンハイマー近似では、原子核の運動は電子に比べて無視できるほど遅いと考え、電子は固定された原子核によってつくられる場の中を運動すると仮定する。この近似によって、(2.2.5)の右辺第二項の原子核運動エネルギーを 0 とし、(2.2.8)の右辺第三項の原子核間反発エネルギーを定数とみなす。よって、分子の全エネルギー E から定数項をあらかじめ差し引いたものを E_{elec} と定義すると、(2.2.1)は次のようになる。

$$H_{\text{elec}} \Psi_{\text{elec}} = E_{\text{elec}} \Psi_{\text{elec}} \quad (2.3.1)$$

$$H_{\text{elec}} = \sum_{i=1}^n \hbar/2m \times \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^N Z_A e^2 / 4\pi\epsilon_0 \times 1/r_{iA} + \sum_{j>i}^n e^2 / 4\pi\epsilon_0 \times 1/r_{ij} \quad (2.3.2)$$

(2.3.1)は固定された原子核の場の中を動く電子を記述するシュレディンガー方程式である。これを解くことによって波動関数 Ψ_{elec} および電子エネルギー E_{elec} が得られる。固定された原子核での分子の全エネルギー E_{total} は、この E_{elec} に核間の反発エネルギーを加えることにより得られ、次のように表す。

$$E_{\text{total}} = E_{\text{elec}} + \sum_{B>A}^N Z_A Z_B e^2 / 4\pi\epsilon_0 \times 1/r_{AB} \quad (2.3.3)$$

この近似もとでは、分子の振動や回転、並進運動は E_{total} で作られるポテンシャル曲面上で起こると考える。

第四節 ハートリー=フォック法

前節で述べた多電子系の波動関数を求めるためのシュレディンガー方程式の近似解に、ハートリー=フォック(Hartree-Fock: HF)法がある。多電子系のシュレディンガー方程式を解く際、電子間の反発の解が問題となるが、HF法は電子間の反発は原子核によって作られる場の中に存在する限り均一であると仮定する。全ハミルトン演算子中の電子間相互作用項を、個々の電子がほかのすべての電子から受ける作用を平均的に表すポテンシャル関数の和で近似する。

$$\sum_{ij} (1/r_{ij}) \rightarrow \sum_i v(r_i) \quad (2.4.1)$$

$\sum (1/r_{ij})$ は電子間相互作用の項を示し、 $\sum v(r_i)$ 個々の電子がほかのすべての電子から受ける作用を平均的に表すポテンシャル関数の和である。 \hat{H} は1電子ハミルトン演算子の和の形で表す。

$$\hat{h}_i = -1/2\Delta_i - \sum_{\alpha=1}^N Z_{\alpha}/|\mathbf{R}_{\alpha}-\mathbf{r}_i| + v(r_i) \quad (2.4.2)$$

また、1個の電子についてのシュレディンガー方程式

$$\hat{h} \psi_{\lambda}(\mathbf{r}) = \varepsilon_{\lambda} \phi_{\lambda}(\mathbf{r}) \quad (2.4.3)$$

この(2.4.3)の解(ε_{λ})と(ϕ_{λ})が得られれば、分子全体のシュレディンガー方程式の近似解は次のようになる。

$$\Phi = \phi_1(\mathbf{r}_1) \phi_1(\mathbf{r}_2) \phi_2(\mathbf{r}_3) \phi_2(\mathbf{r}_4) \cdots \phi_n(\mathbf{r}_{2n-1}) \phi_n(\mathbf{r}_{2n}) \quad (2.4.4)$$

この(2.4.4)の Φ による全エネルギーは以下のようになる。

$$E = \sum_{\lambda}^n 2\varepsilon_{\lambda} \quad (2.4.5)$$

例としてヘリウム原子(2電子系)を述べると、ヘリウム原子の $v(r_i)$ を考えると、以下のようになる。

$$v(\mathbf{r}_i) = \int |\phi(\mathbf{r}')|^2 / |\mathbf{r}' - \mathbf{r}| \cdot d\mathbf{r}' \quad (2.4.6)$$

(2.4.6)の $v(\mathbf{r}_i)$ は、 $|\phi(\mathbf{r}')|^2 d\mathbf{r}'$ の確率密度を持つ電子間に対する作用を平均的に表すポテンシャル関数である。2 電子以上の多電子系を Be 原子を例にして考えてみると、Be 原子の全電子のハミルトン演算子は以下ようになる。

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^4 (-1/2 \Delta_i - 4/r_i) + \sum_{i < j}^4 1/r_{ij} \quad (2.4.7)$$

波動関数が、Pauli の原理の要請する反対称性を持つためには、(2.4.4)のような単純な席ではなく、スピン関数を含めた Slater 行列式の形である必要がある。そのため Φ は次のようになる。

$$\Phi(\zeta_1, \zeta_2, \zeta_3, \zeta_4) = \|\phi_1(\mathbf{r}_1)\alpha(\sigma_1)\phi_1(\mathbf{r}_2)\beta(\sigma_2)\phi_2(\mathbf{r}_3)\alpha(\sigma_3)\phi_2(\mathbf{r}_4)\beta(\sigma_4)\| \quad (2.4.8)$$

この Φ で全電子のエネルギーを計算すると、以下ようになる。

$$\begin{aligned} \xi &= \langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle \\ &= \int \Phi^* H \Phi d\mathbf{r}_1 d\sigma_1 d\mathbf{r}_2 d\sigma_2 d\mathbf{r}_3 d\sigma_3 d\mathbf{r}_4 d\sigma_4 \\ &= \sum_{i=1}^2 2H_i + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (2.4.9) \\ H_i &= \int \phi_i^*(\mathbf{r}) (-1/2 \Delta - 4/r) \phi_i(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \\ J_{ij} &= \int \phi_i^*(\mathbf{r}) \phi_i(\mathbf{r}) 1/|\mathbf{r}' - \mathbf{r}| \phi_j^*(\mathbf{r}') \phi_j(\mathbf{r}') d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \\ K_{ij} &= \int \phi_i^*(\mathbf{r}) \phi_j(\mathbf{r}) 1/|\mathbf{r}' - \mathbf{r}| \phi_j^*(\mathbf{r}') \phi_i(\mathbf{r}') d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \end{aligned}$$

(2.4.9)の式は Φ が規格化されている場合、($\langle \Phi | \Phi \rangle = 1$)の式である。この条件は以下の式であれば満たされる。

$$\begin{aligned} \langle \phi_1 | \phi_1 \rangle &= \langle \phi_2 | \phi_2 \rangle, \langle \phi_1 | \phi_2 \rangle = 0 \\ \langle \alpha | \alpha \rangle &= \langle \beta | \beta \rangle = 1, \langle \alpha | \beta \rangle = 0 \end{aligned} \quad (2.4.10)$$

波動関数(2.4.8)の形は1電子軌道関数の粗い近似概念にもとづいているが、この形の波動関数として最低の ξ の値を与えるような最良の軌道関数 ϕ_1 、 ϕ_2 を求めるのならば、その最良の形を定める方程式は、 ϕ_1 、 ϕ_2 が最良の形であるとして(2.23)を満たすかぎり任意の微小変化

$$\phi_1 \rightarrow \phi_1 + \delta\phi_1, \quad \phi_2 \rightarrow \phi_2 + \delta\phi_2 \quad (2.4.11)$$

に対して $\xi(\phi_1, \phi_2)$ が停留値をとる。つまり、以下の式であることを使うと得られる。

$$\delta\xi = \xi(\phi_1 + \delta\phi_1, \phi_2 + \delta\phi_2) - \xi(\phi_1, \phi_2) \cong 0 \quad (2.4.12)$$

これによってHF方程式は以下ようになる。

$$\hat{F}\phi_i = \varepsilon_i\phi_i \quad (i=1,2) \quad (2.4.13)$$

$$\hat{F} = -1/2 \Delta - 4/r + (2\hat{J}_1 - \hat{K}_1) + (2\hat{J}_2 - \hat{K}_2)$$

$$F = -1/2 \Delta - 4/r + \hat{v} \quad (2.4.14)$$

この方程式が、2電子以上の分子の軌道を求める分子軌道法の基礎となる。

第五節 摂動法

原子核によって作られる場の中に存在する限り均一に扱うHF法を零次の出発点とし、厳密解は零次の平均化ポテンシャルに何らかの補正を加えたものと考え、摂動法を電子相関の解法に用いることができる。摂動法とは、対象としている問題は、厳密に解くことができる問題に補正(摂動)が加えられたものとみなし、対象としている問題の近似解を厳密に解ける問題に補正項(摂動項)を加えて解く方法である。摂動法による電子相関の解法として、Møller-Plesset(MP)法があげられる。この方法は、前述のように平均場からの摂動を、摂動ハミルトニアン V とし、以下のような式になる。

$$H = H^0 + V \quad (2.5.1)$$

$$H^0 = \sum_m \{h(m) + v(m)\} \quad (2.5.2)$$

$$V = \sum_{m>n} (1/r_{mn}) - \sum_m v(m) \quad (2.5.3)$$

また、零次の波動関数が HF 行列式そのものなので、零次と一次の摂動エネルギー表現は以下のように表す。

$$E^0 = \langle \text{HF} | H^0 | \text{HF} \rangle \quad (2.5.4)$$

$$E^1 = \langle \text{HF} | V | \text{HF} \rangle \quad (2.5.5)$$

このエネルギーの和は HF の電子エネルギーになるため、電子相関の補正は二次から始まる(MP2)。そのエネルギーは 2 電子励起 Slater 行列式群 $\{D\}$ の和で与えられる。

$$E^2 = \sum_D |\langle \text{HF} | V | D \rangle|^2 (E^0 - E_D)^{-1} \quad (2.5.6)$$

$$E_D = E^0 - \langle D | H^0 | D \rangle \quad (2.5.7)$$

1 電子励起は MP2 レベルでは寄与を持たない。励起に関与するスピン軌道の添字で占有部分に関するものを i と j とし、仮想軌道に関するものを a と b とすると、Slater の行列要素規則から、以下のように表す。

$$\langle \text{HF} | V | D \rangle^2 = |(ia, jb) - (ib, ja)|^2 \quad (2.5.8)$$

$$E^0 - E_D = \varepsilon_i + \varepsilon_j - \varepsilon_a - \varepsilon_b \quad (2.5.9)$$

したがって、MP2 の電子相関エネルギーの表現はスピン軌道の添字の形で以下のように表す。

$$E^2 = E(\text{MP2}) = \sum_{\substack{i>j \\ a>b}} |(ia, jb) - (ib, ja)|^2 (\varepsilon_i + \varepsilon_j - \varepsilon_a - \varepsilon_b)^{-1} \quad (2.5.10)$$

軌道エネルギーは占有軌道が負の値、仮想軌道は一般的には正の値なので、MP2 の電子相関エネルギーは必ず負の値になる。

第六節 フラグメント分子軌道法

生体分子のエネルギー計算を行う際、本章の第一節で述べた **MM** 法を用いるのが一般的である。**MM** 法の力場はタンパク質のアミノ酸残基のような一定のパターンの分子のパラメータはある程度の精度を保つが、薬理活性化合物のような多種多様な低分子の力場を正確に決めることは困難である。よって、本来はシュレディンガー方程式の近似解法である分子軌道法を用いる方が正確ではあるが、生体高分子のような巨大な系では現実的な計算時間で解くことは出来ない。1999 年に北浦和夫博士によって提唱されたフラグメント分子軌道法(Fragment Molecular orbital: FMO)法⁶⁷⁾は、巨大な分子の系を数十個程度の小さなフラグメントに分割し、各フラグメントに対して分子軌道計算を行い系の全エネルギーを求める手法である。図 2.6.1 に、FMO 法のフラグメント分割の概要を示す。タンパク質ではアミノ酸残基毎にフラグメント分割し、 α 炭素とカルボン酸の間の単結合でフラグメント分割する。ペプチド結合は、共鳴構造により二重結合を取る所以、単純な単結合で切断し、フラグメント化するほうが望ましい。また FMO 法の計算フローチャートを図 2.6.2 に示す。分子系を N 個のフラグメントに分割したとすると、

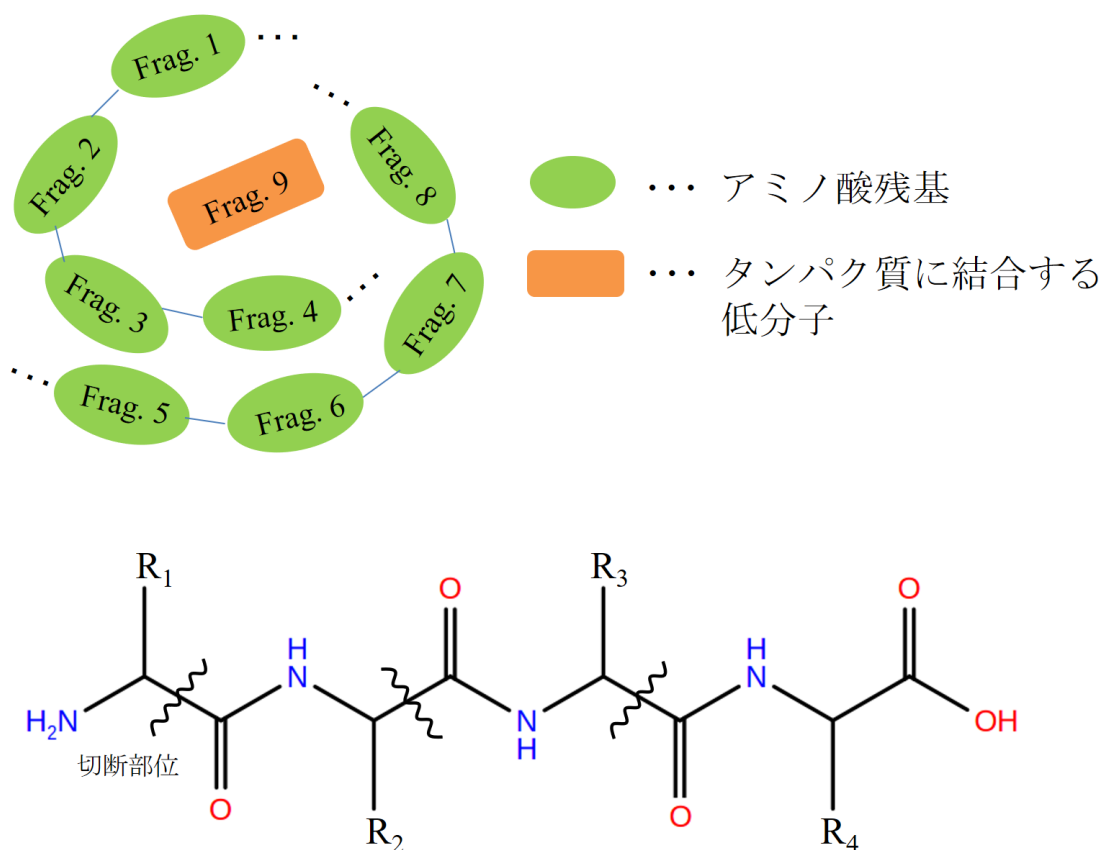


図 2.6.1 FMO 法における生体高分子のフラグメント分割

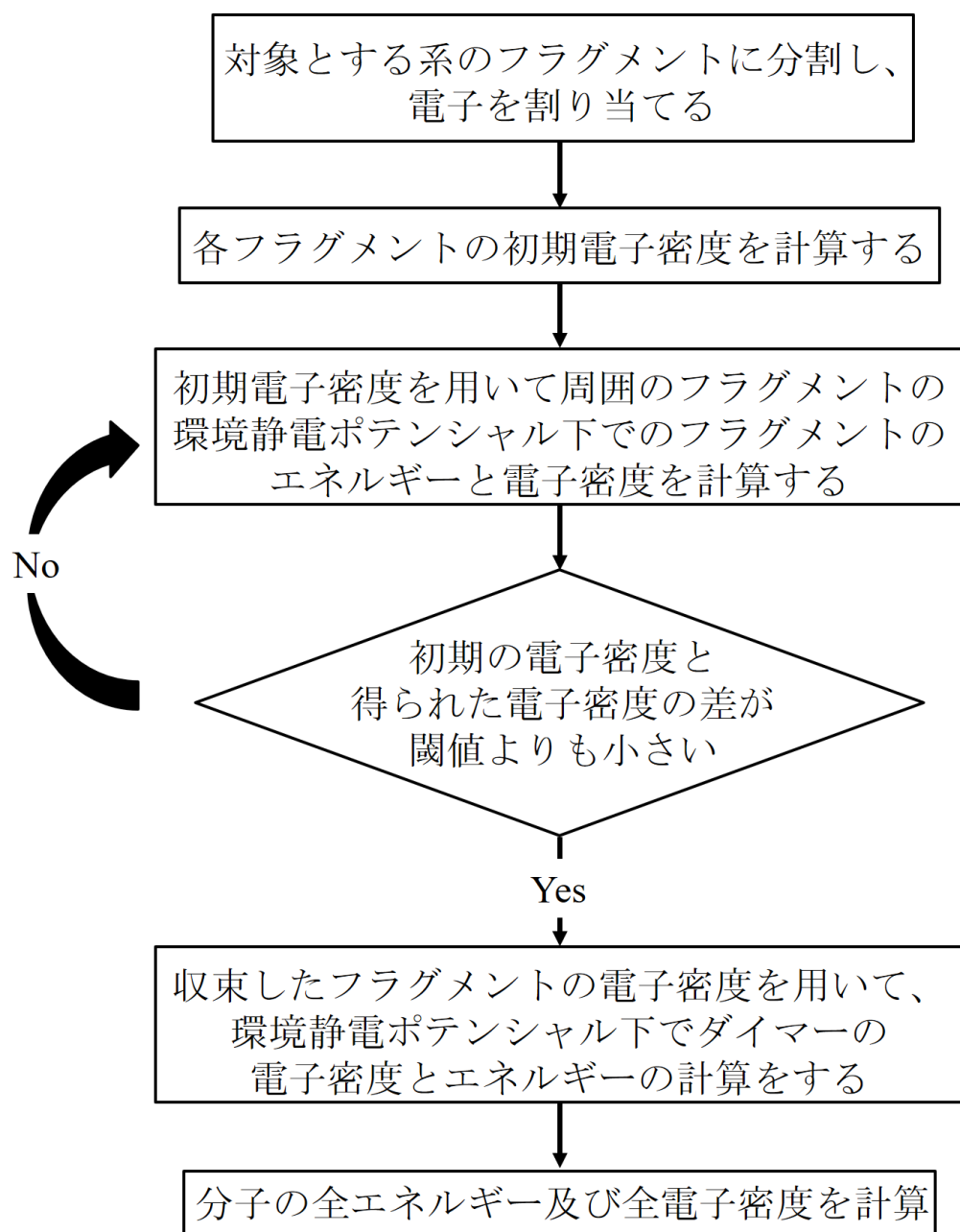


図 2.6.2 FMO 法のフローチャート

1つのフラグメント(以下モノマーとする)を計算する際には周囲の $N-1$ 個のモノマーからの環境静電ポテンシャルを計算する必要がある。このためすべてのモノマーについて電子密度が自己無撞着になるまで繰り返し計算(monomer self-consistent charge 計算: モノマーSCC 計算)を行う。このようにすることでモノマーの分極相互作用に関して N 体までの高次項を取り込むことができる。フラグメントを二つまとめたダイマー計算の場合は、モノマーSCC 計算で得られたモノマーの電子密度を用いてダイマーに対する環

環境静電ポテンシャルを計算する。こうして求めたモノマー I のエネルギーを E_I 、ダイマーの IJ のエネルギーを E_{IJ} とすると、FMO 法による系の全エネルギー E は以下のようになる。

$$E = \sum_{I>J} E_{IJ} - (N-2) \sum_I E_I \quad (2.6.1)$$

また、系の全電子密度も同様 $\rho(\mathbf{r})$ についても同様に、モノマー I の電子密度を $\rho_I(\mathbf{r})$ 、ダイマー IJ の電子密度を $\rho_{IJ}(\mathbf{r})$ とすると、以下のように表す。

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{I>J} \rho_{IJ}(\mathbf{r}) - (N-2) \sum_I \rho_I(\mathbf{r}) \quad (2.6.2)$$

また、(2.6.1)を変形すると、全エネルギーをフラグメント間相互作用エネルギー $\tilde{\Delta E}_{IJ}$ と環境静電ポテンシャルからの寄与を除いたモノマーのエネルギー、 $E'_I = E_I - \text{Tr}(\mathbf{P}^I \mathbf{V}^I)$ の和で表すことができる。

$$E = \sum_{I>J} \tilde{\Delta E}_{IJ} + \sum_I E'_I \quad (2.6.3)$$

$$\tilde{\Delta E}_{IJ} = (E'_{IJ} - E'_I - E'_J) + \text{Tr}(\Delta \mathbf{P}^{IJ} \mathbf{V}^{IJ}) \quad (2.6.4)$$

$\Delta \mathbf{P}^{IJ}$ はモノマーとダイマーの電子密度行列の差分行列であり、 E'_{IJ} はダイマーに対する環境ポテンシャルの寄与をダイマーのエネルギー、 $E'_{IJ} = E_{IJ} - \text{Tr}(\mathbf{P}^{IJ} \mathbf{V}^{IJ})$ であるフラグメント間相互作用を用いることで、タンパク質の各アミノ酸残基と結合している低分子間の相互作用エネルギーを定量的に解析することができる。

この FMO 法は、MM 法とは異なり原子のや分子集団のエネルギーを非経験的に求めることができ、また結合している低分子との相互作用エネルギーの詳細も定量的に解析できるため、新規阻害剤のデザインにも応用されている⁶⁸⁻⁷⁵。本研究では、この FMO 法を用いた相互作用解析を TcDHODH の結晶構造に対して行い、ファーマコフォアモデリングへの応用を行っている。

第三章 研究手法

第一節 フラグメント分子軌道法による相互作用解析とファーマコフォアモデリング

TcDHODH とオロト酸(PDBID: 2E6A)と既知阻害剤であるオキシソ酸(PDBID: 2E6F)、及びオロト酸誘導の相互作用解析を行うため、まず結晶構造の処理から行った。45 種の構造を、Discovery Studio (Accelrys, San Diego, CA)にインポートし、CHARMM 力場⁷⁶⁾を用いて水素付加及び水素原子の構造最適化を行った。構造処理後、FMOutil version 2.1 (<https://staff.aist.go.jp/d.g.fedorov/fmo/fmoutil.html>)を用いて FMO 法を実行するためのジョブファイルの作成を行った。ジョブファイル生成後、量子化学計算ソフトウェアである GAMESS⁷⁷⁾を用いて FMO 計算を行った。計算方法と基底関数は MP2/6-31G レベルで行った。FMO 計算は東京工業大学が保有するスーパーコンピュータ「TSUBAME2.5」を用いて計算を行った。計算後の相互作用解析は Facio⁷⁸⁾と呼ばれる解析ツールを用いて行った。本研究では、相互作用解析の結果が 8 割以上の化合物が -5.00 kcal/mol よりも強い相互作用をしている部位をファーマコフォアと定義する。また、相互作用をしている化合物数は 8 割以下だが、-10kcal/mol よりも強い相互作用エネルギーを有する場所も同様にファーマコフォアと定義する。

FMO 法による相互作用解析の結果とファーマコフォアモデリングは、四章の第一節、第二節に述べた。

第二節 FMO 法と従来手法によるファーマコフォアモデリングの比較

本研究では、FMO 法によるファーマコフォアモデリングの手法と、従来の化合物の三次元構造の重ね合わせによるファーマコフォアモデリングの比較を行った。従来手法には Schrödinger 社のファーマコフォアモデリングソフトウェア "Phase"⁷⁹⁾を用いて行った。モデリングは Phase の "Develop Common Pharmacophore Hypotheses" のモードを用いて行い、オロト酸誘導体 43 種をすべて Active な阻害剤として構造をインポートし、Generate Conformers で各誘導体の配座を複数発生させ、ファーマコフォアのモデリングを行った。すべての設定はデフォルトで行った。

FMO 法と従来手法によるファーマコフォアモデリングは、四章の第三節に述べた。

第三節 FMO 法、及び MM 法の相互作用エネルギーの比較

本研究では FMO 法と MM 法による相互作用エネルギー計算の比較も行った。MM 法による相互作用エネルギーの計算には Schrödinger 社のドッキングソフトウェア、"Glide"⁸⁰⁾を用いて行った。Glide による相互作用計算を行うために、オロト酸誘導体 43 種と TcDHODH の結晶構造に対して "Receptor Grid Generation" によるグリッドファイルの生成を行った。グリッドファイルは、ドッキングシミュレーションを行う際、ドッキングを行う化合物の標的部位を指定したファイルである。グリッドの中心は、結合

しているオロト酸誘導体を指定した。生成したグリッドを用いて、Glide によるドッキングを Standard precision (SP)モードで行い、Ligand sampling のモードを None (Score in place only)に指定し、出力の設定で Write per-residue interaction scores にチェックを入れ、標的となる TcDHODH に元々結合しているオロト酸誘導体を指定してドッキングを行った。Glide のドッキングでは、ドッキングした化合物と、周辺のアミノ酸残基との相互作用エネルギーを MM 法によって計算する。出力設定の Write per-residue interaction scores にチェックを入れることによって、出力ファイルに化合物と周辺のアミノ酸残基との相互作用エネルギーが追加で記述される。また、Ligand sampling のモードを None (Score in place only)にすることによって、元々結合していた化合物の配座を変えずに、結合していた化合物と周辺アミノ酸残基との相互作用エネルギーを MM 法で計算することが可能である。エネルギー計算には、OPLS2005⁸⁰⁾の力場を用いて行った。

FMO 法と MM 法の相互作用エネルギーの比較は四章の第四節に述べた。

第四節 FMO 法を応用したスぺルミジン合成酵素阻害剤の探索

本研究では、FMO 法によるファーマコフォアモデリングを応用し、TcSpdSyn の新規阻害剤探索を行った。TcSpdSyn の阻害剤探索のワークフローを図 3.4.1 に示す。まず初めに、TcSpdSyn と既知阻害剤の複合体(PDBID: 5B1S)に対して、本章の第一節と同様の処理を行い、FMO 法による相互作用解析を行った。相互作用解析後、-5.00kcal/mol よりも強く相互作用を形成していた部位をファーマコフォアとして定義し、Phase の Simplified Pharmacophore Modeling and Screening を用いてファーマコフォアモデリングを行った。

次に、TcSpdSyn の活性中心に対して、Glide を用いたドッキングシミュレーションを行った。ドッキングにはナミキ商事株式会社が提供する化合物統合データベース 2013 年版に登録されている薬様化合物約 480 万個を使用した。ドッキング後、ドッキングスコアの高かった 10 万化合物に対して、Phase の Simplified Pharmacophore Modeling and Screening を用いたファーマコフォアスクリーニングを行い、ファーマコフォアに適合した化合物の探索を行った。ファーマコフォアに適合した化合物を TcSpdSyn 阻害剤の候補化合物とし、その中で利用可能な 37 化合物を *in vitro* アッセイ試験によって評価し、IC₅₀を決定した。*In vitro* アッセイ試験の実験は、引用文献 37)に詳細が記載されている。

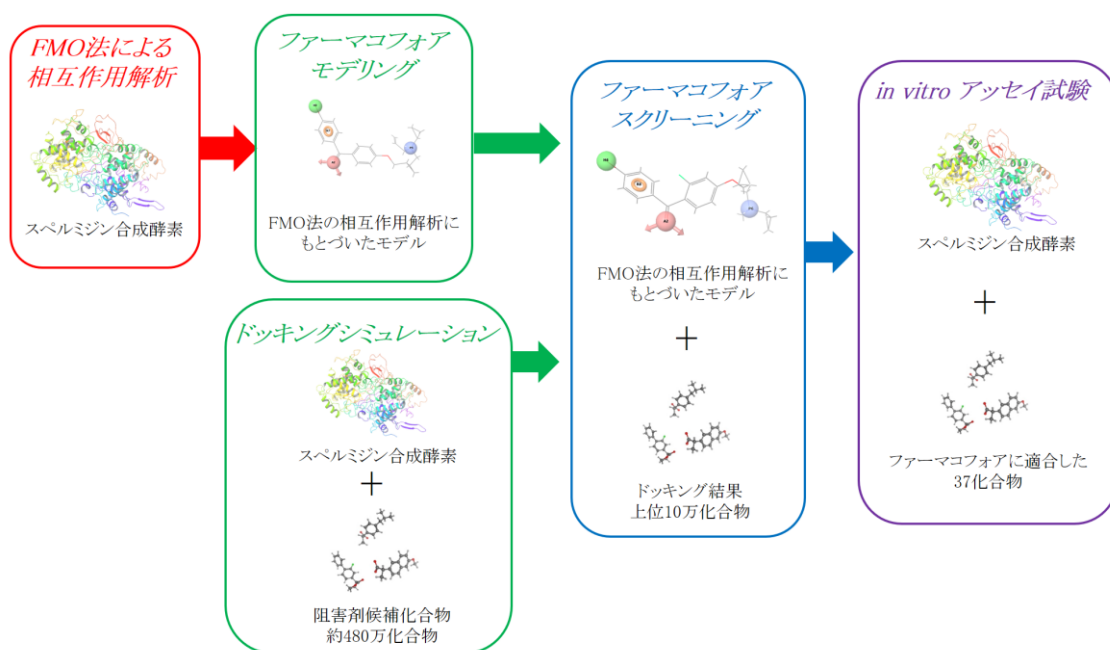


図 3.4.1 FMO 法を応用したスぺルミジン合成酵素阻害剤の探索のフローチャート

第四章 TcDHODH のファーマコフォアモデリング

第一節 オロト酸とオキソン酸の相互作用解析結果

まず初めに、DHODH の生成物であるオロト酸と、既知阻害剤であるオキソン酸の相互作用解析を行った。図 4.1.1 にオロト酸の結合様式を示す。結合様式から、Lys43 と塩橋、Asn67 と Asn194 と水素結合を 2 つずつ、補因子である FMN とは π スタッキングを形成していると予測される。図 4.1.2 にオロト酸の FMO 法による相互作用解析結果を示す。図の縦軸は相互作用エネルギー(kcal/mol)を示し、横軸は FMO 法によって分割されたときに割り当てられたフラグメント番号を示す。フラグメント番号は、PDB ファイルに書き出されているアミノ酸残基や低分子、水などを上から順に番号付けを行う。縦軸の値が負であれば、そのフラグメントと結合している分子は相互作用をしていることを示し、正であれば反発を示している。図 4.1.2 の結果から、オロト酸は結合様式から予測されるアミノ酸残基や、FMN と相互作用をしていることが示唆される。Lys43 とピリミジン環 4 位のカルボン酸と -13.02 kcal/mol の相互作用エネルギーを示し、Asn67 とピリミジン間 3 位の水素原子と 2 位のカルボニル基と水素結合を形成し、-33.71 kcal/mol の相互作用エネルギーを示す。同様に、Asn194 とピリミジン間 1 位の水素原子と 6 位のカルボニル基と水素結合を形成し -24.79 kcal/mol の相互作用エネルギーを示す。Asn67 と Asn194 は結合様式から水素結合を二つ形成していることが示唆されているので、Lys43 よりも相互作用エネルギーが強い値となっていることと対応している。さらに、結合様式から π スタッキングが予測された FMN は、-7.26 kcal/mol の相互作用エネルギーを示している。

次に既知阻害剤であるオキソン酸の結合様式を図 4.1.3 に示す。オキソン酸は、オロト酸のピリミジン環 5 位の炭素が窒素に置き換わったトリアジン環を有する化合物である。結合様式から、オキソン酸もオロト酸と同様の相互作用を有することが予測される。図 4.1.4 にオキソン酸の相互作用解析結果を示す。オキソン酸もオロト酸と同様に、Lys43、Asn67、Asn194、FMN とそれぞれ、-7.41、-43.73、-16.21、-7.26 kcal/mol の相互作用エネルギーを示す。したがって、ピリミジン環 5 位に導入した窒素原子は相互作用に影響は与えないことが予測される。

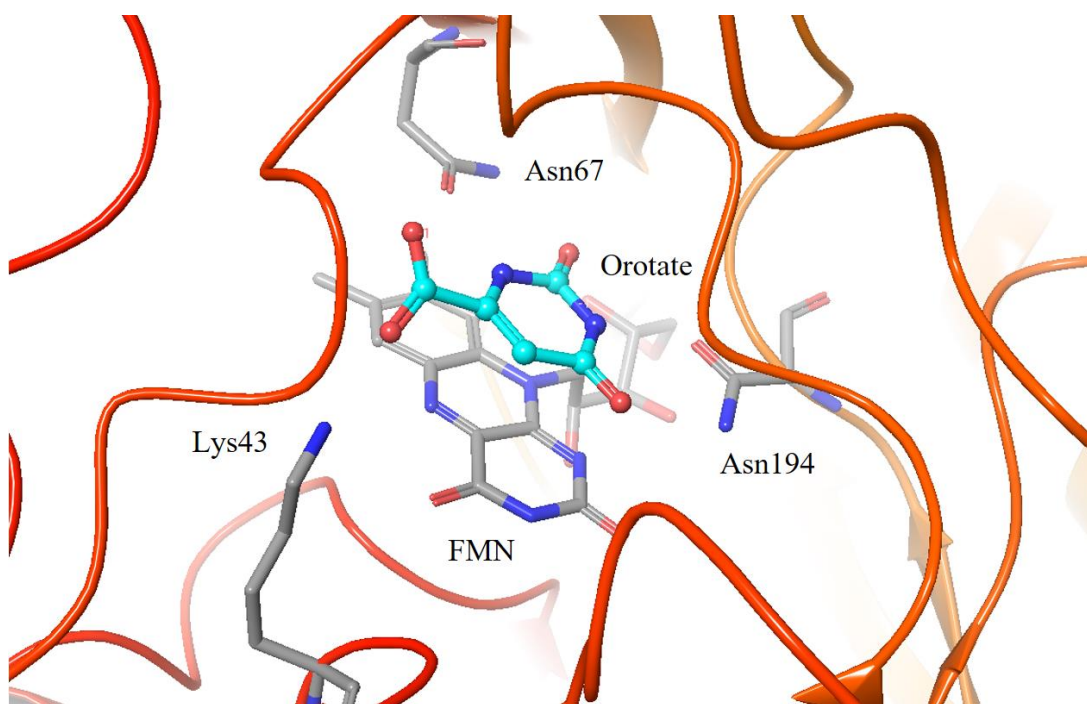


図 4.1.1 オロト酸の結合様式(PDBID: 2E6A)

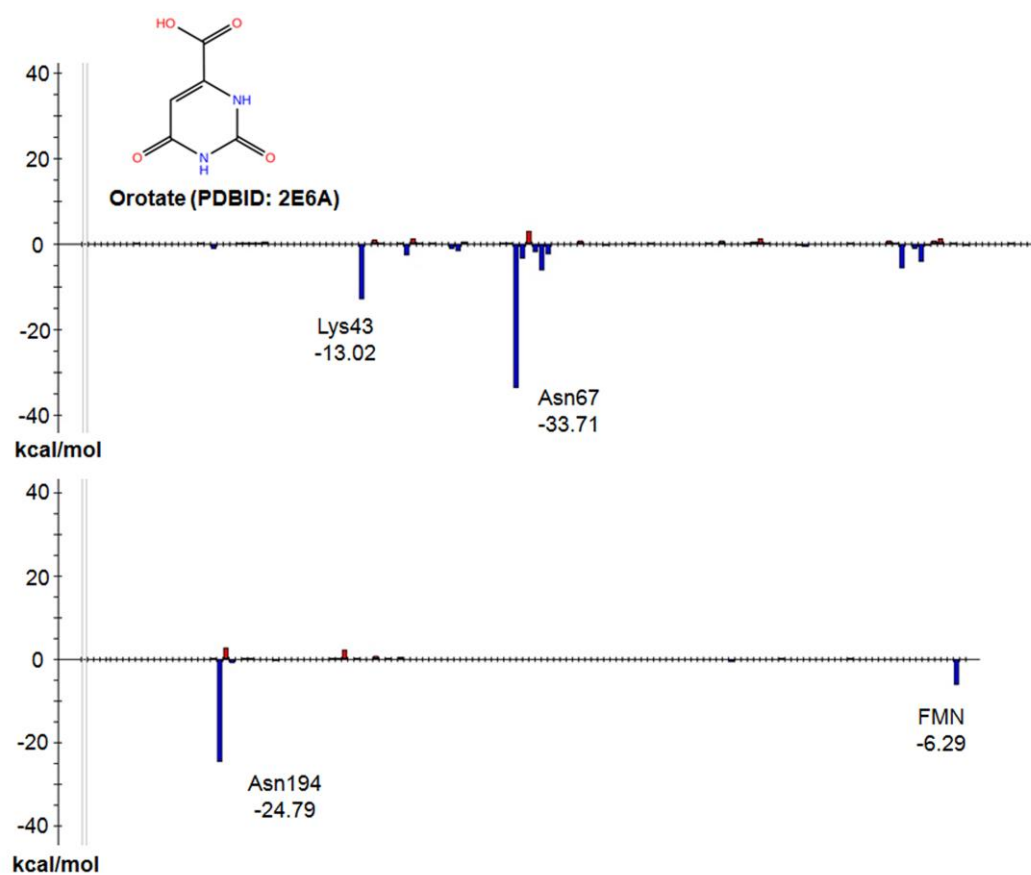


図 4.1.2 オロト酸と TcDHODH 間の相互作用解析結果

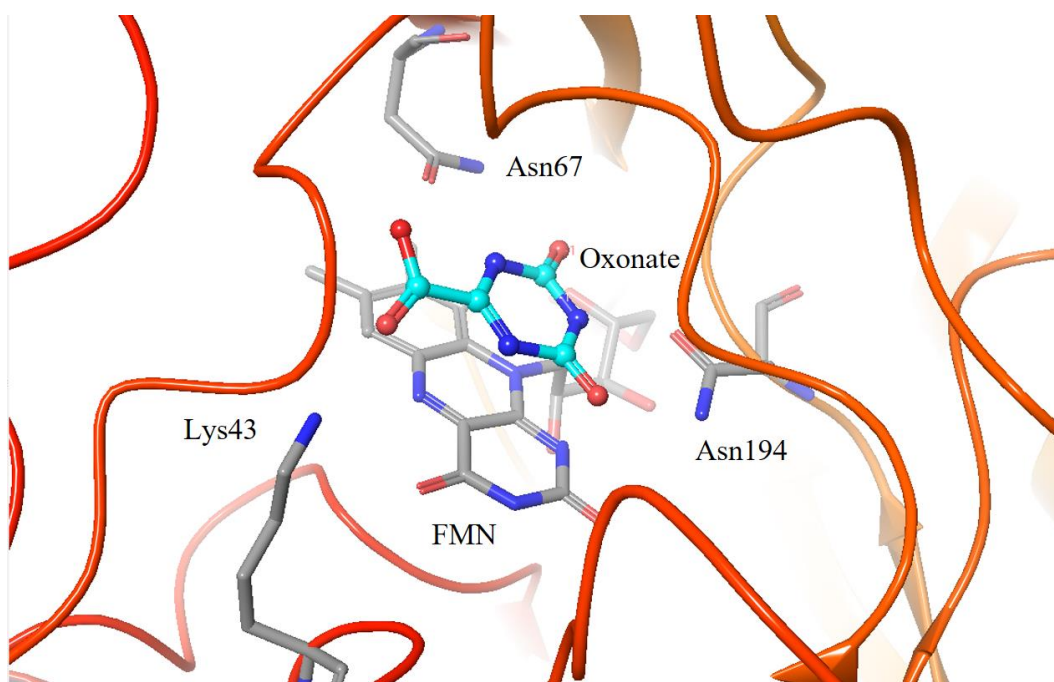


図 4.1.3 オキソン酸の結合様式(PDBID: 2E6F)

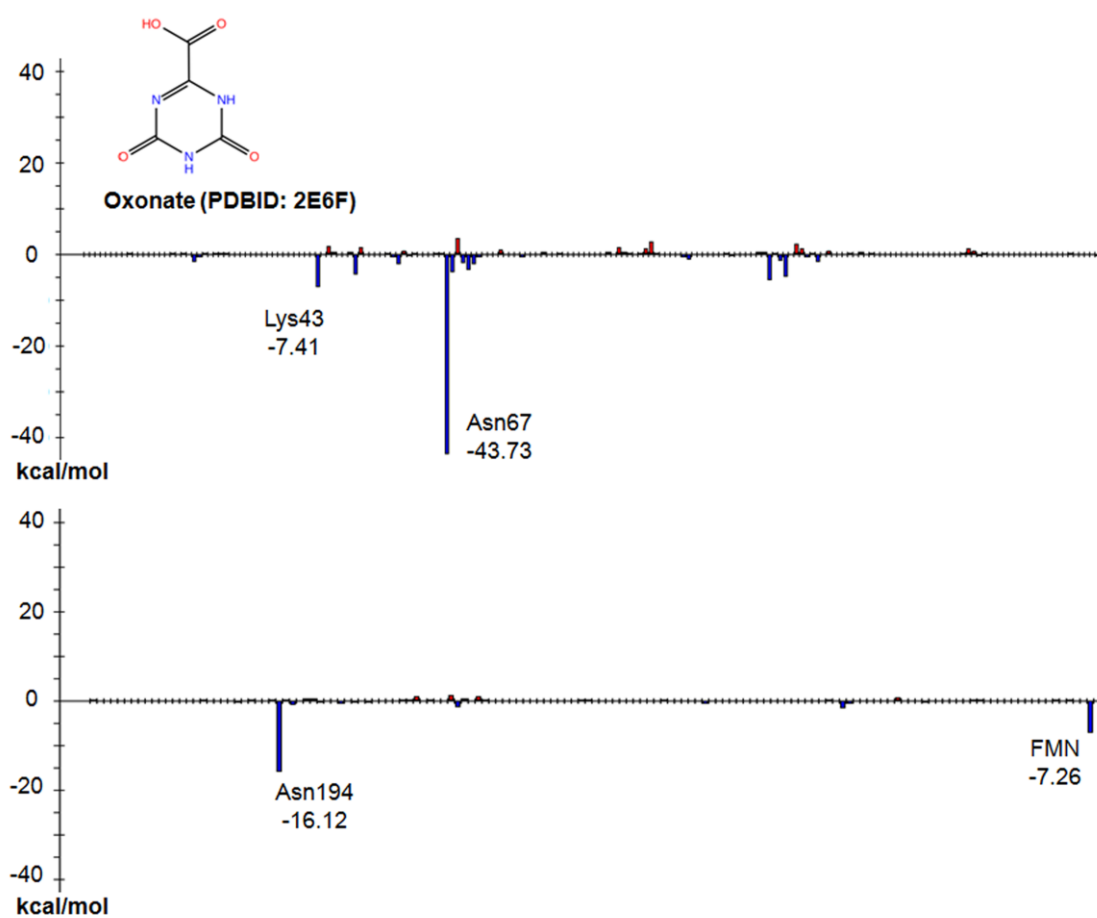


図 4.1.4 オキソン酸と TcDHODH 間の相互作用解析結果

第二節 43 種のおロト酸誘導体の相互作用解析結果

次に 43 種のおロト酸誘導体と TcDHODH 間の相互作用解析結果を示す。おロト酸誘導体はピリミジン環 5 位にエチレンまたはブチレン鎖を通じて官能基を導入した構造である。そのため、おロト酸の部位は前節と同様の相互作用様式を持つことが予測される。結合様式の例として、誘導体 **1** の結合様式を図 4.2.1A に示す。誘導体 **1** のおロト酸部分は、前節で述べたおロト酸と同様に Lys43、Asn67、Asn194、FMN との相互作用が予測される。またエチレン鎖を通して付加されたフェニル基周辺には、Asn53、Ser68、Pro131、Lys214 が存在する。もう一つの例として、図 4.2.1B に誘導体 **27** の結合様式を示す。誘導体 **27** もおロト酸や誘導体 **1** と同様に、Lys43、Asn67、Asn194、FMN との相互作用が予測される。さらに、ピリミジン環 5 位に導入された官能基のカルボン酸付近に Lys214 が存在する。そのため、付加されたカルボン酸と Lys214 との塩橋が予測される。

図 4.2.2 に誘導体 **1** の相互作用解析結果を示す。誘導体 **1** の相互作用解析結果から、

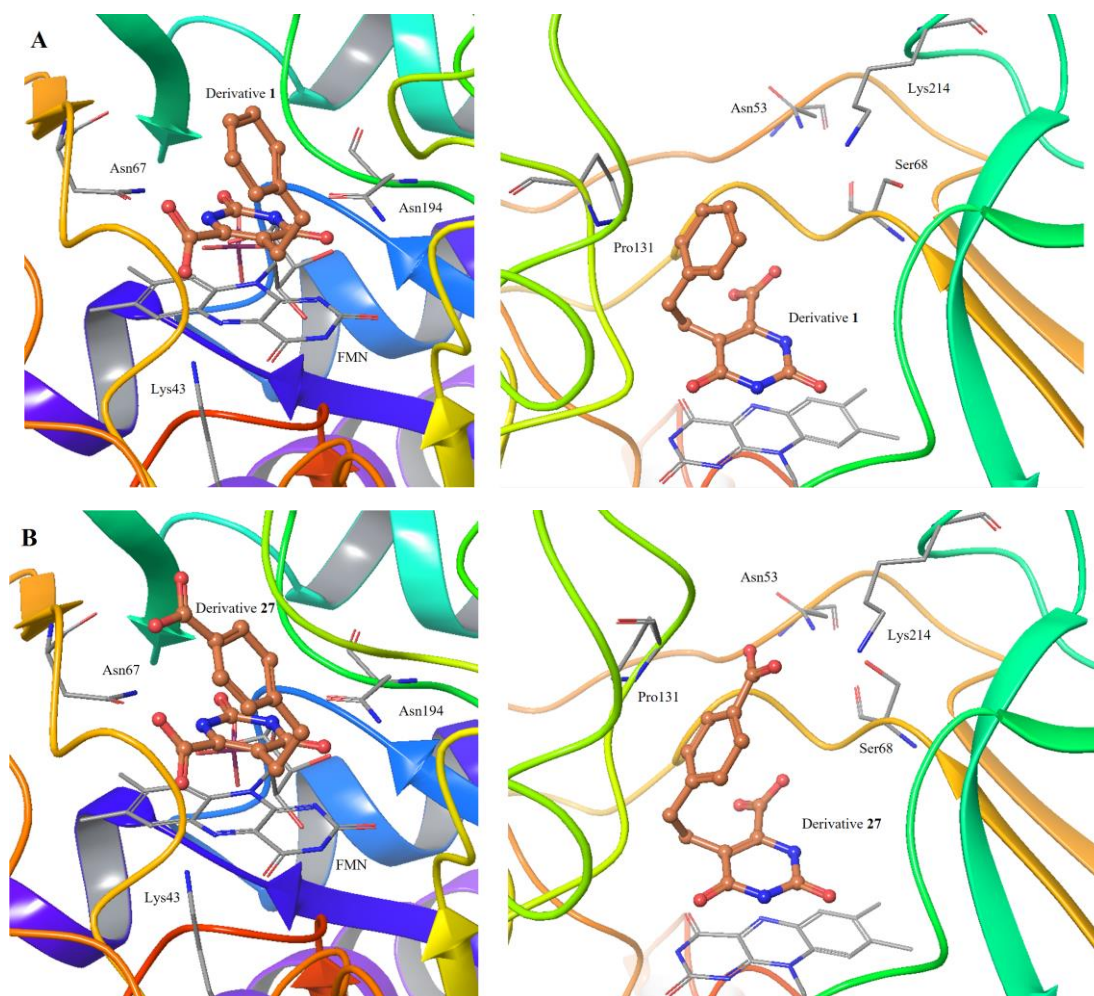


図 4.2.1 おロト酸誘導体の結合様式(A: 誘導体 **1**、B: 誘導体 **27**)

前節で述べたオロト酸及びオキソン酸と同様に、Lys43、Asn67、Asn194、FMN との相互作用が確認される。相互作用エネルギーの強さも同様に、水素結合を 2 本形成する Asn67 との相互作用が最も強い結果となっている。また、前節のオロト酸とオキソン酸では確認されなかった Gly70 との反発が誘導体 **1** で確認された。Gly70 と誘導体 **1** の構造を図 4.2.3 に示す。Gly70 は誘導体 **1** に導入されたフェニル基付近に存在している。Gly70 の α 炭素と誘導体 **1** のフェニル基の最も近い炭素の距離は、 4.45\AA である。そのため、 α 炭素に付加する水素原子と、誘導体 **1** のフェニル基に付加する水素原子との衝突が発生する。よって、この Gly70 との反発はオロト酸 5 位に官能基を付加した結果発生する反発であるため、誘導体 **1** にのみ確認される反発である。

次に誘導体 **27** の相互作用結果を図 4.2.4 に示す。誘導体 **27** でもオロト酸やオキソン酸、及び誘導体 **1** と同様に Lys43、Asn67、Asn194、FMN との相互作用が確認される。

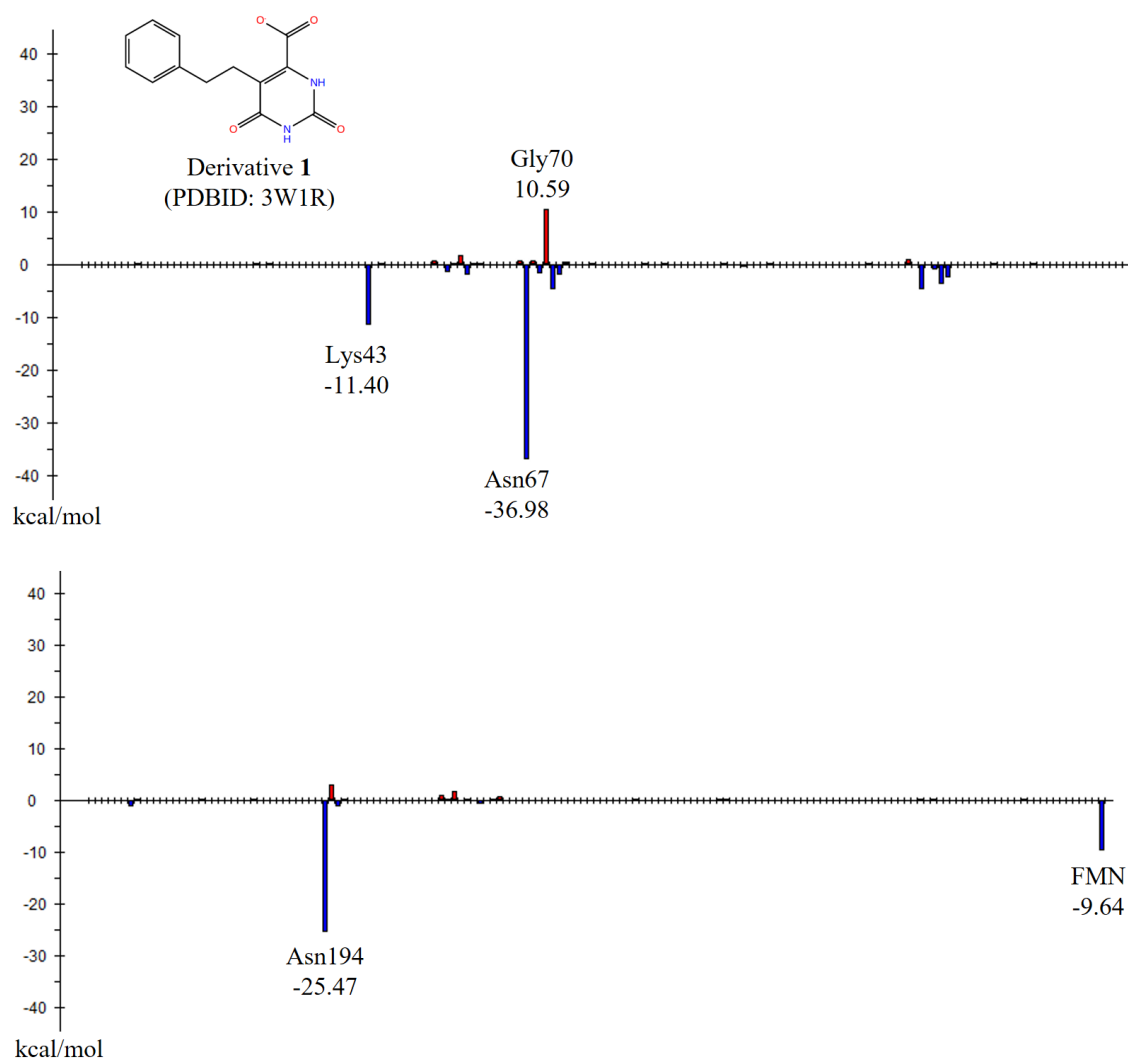


図 4.2.2 誘導体 **1** の相互作用解析結果

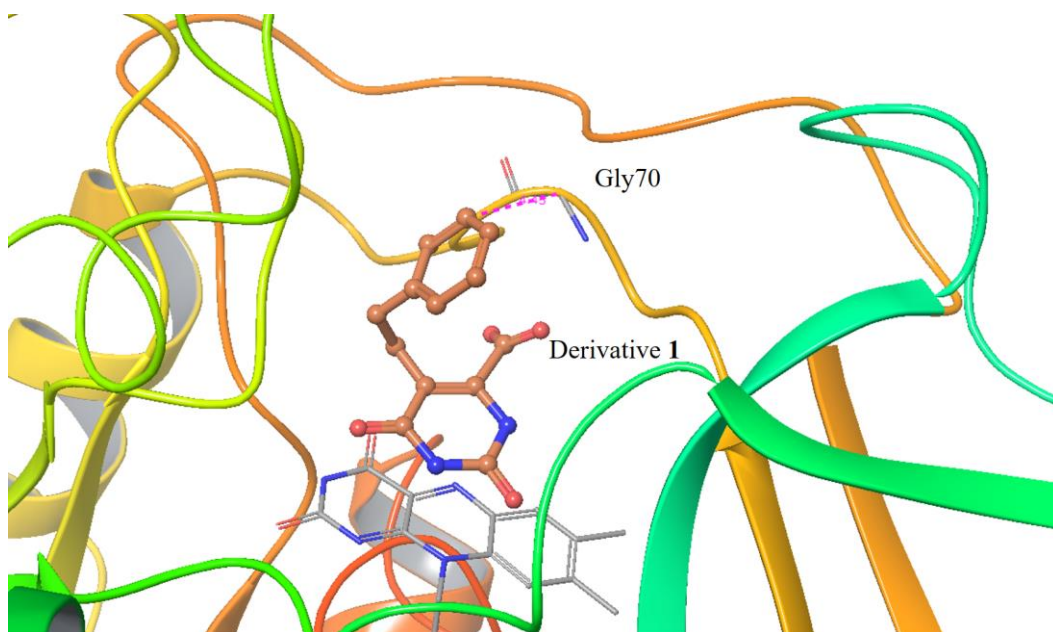


図 4.2.3 誘導体 **1** と Gly70 の構造

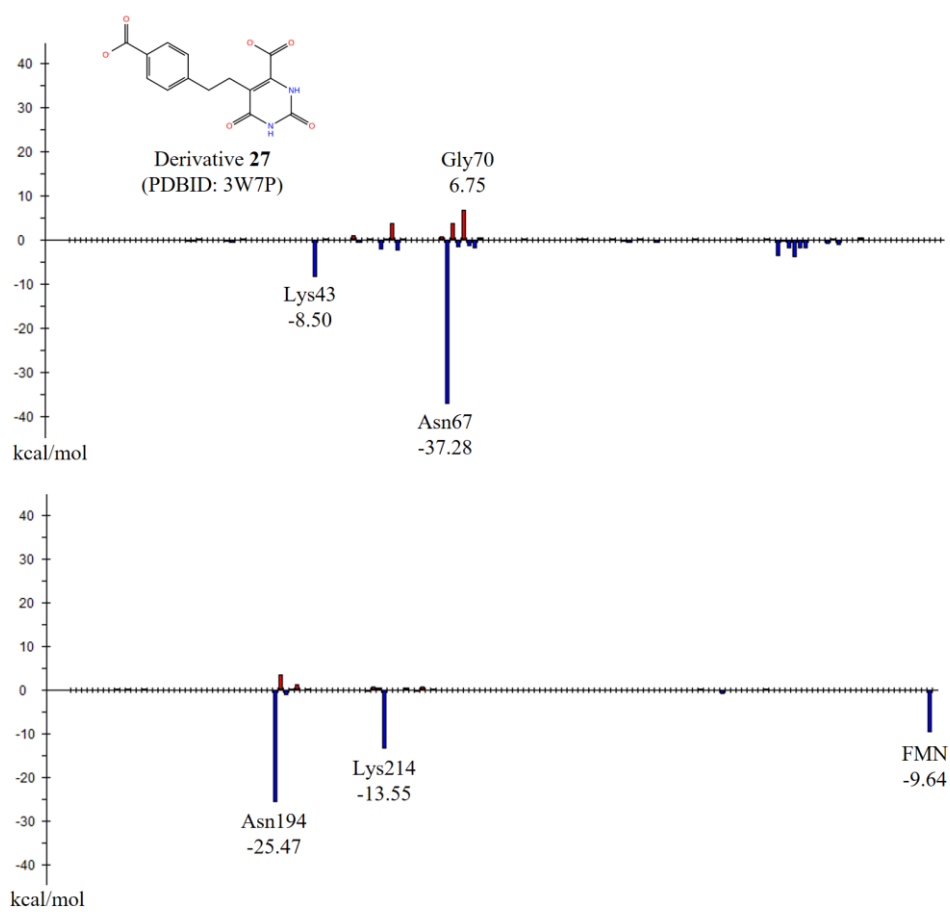


図 4.2.4 誘導体 **27** の相互作用解析結果

また、誘導体 **1** と同様に、官能基を導入したことによって Gly70 との反発が発生している。さらに、誘導体 **27** では、Lys214 との相互作用が 13.55 kcal/mol と 10 kcal/mol 以上の強さで確認された。図 4.2.5 に誘導体 **27** と Lys214 の構造を示す。誘導体 **27** のカルボン酸の酸素原子と、Lys214 のアミノ基の窒素原子の距離は 3.62Å である。これらの両官能基は、中性の溶液中では電荷を帯びていると予想されるため、誘導体 **27** のカルボン酸と Lys214 は塩橋を形成していることが相互作用解析によって示唆される。この Lys214 の相互作用は、母核であるオロト酸や既知阻害剤のオキシソン酸では確認できなかった相互作用である。そのため、官能基を導入したことによって新たに獲得した相互作用である。

次に、表 4.2.1 にオロト酸誘導体 43 種の相互作用解析結果を示す。誘導体 **1**、**27** 以外の相互作用解析の詳細は、本論文の付録に記載する。すべての誘導体で、Asn67、Asn194、FMN との相互作用が確認され、またどの誘導体でも Asn67 との相互作用が最も強く表れる結果となった。Lys43 との相互作用は、誘導体 **18** が -2.77 kcal/mol と低い値となっているが、それ以外の誘導体では -5.00 kcal/mol よりも強い相互作用エネルギーを示している。さらに誘導体 **5**、**21**、**27** で -10.00 kcal/mol よりも強い相互作用エネルギー、誘導体 **8** と **10** で -5 kcal/mol よりも強い相互作用エネルギーが Lys214 と確認された。誘導体 **21** と **27** には芳香環にカルボン酸、誘導体 **5**、**8**、**10** にはベンゼン環にフッ素原子、トリフルオロメチル基など、負電荷を帯びやすいハロゲン原子を有している。これらの官能基が、オロト酸やオキシソン酸には存在しなかった Lys214 との新たな相互作用を獲得している。

これらの相互作用解析の結果から、三章第一節の定義によってファーマコフォアをモ

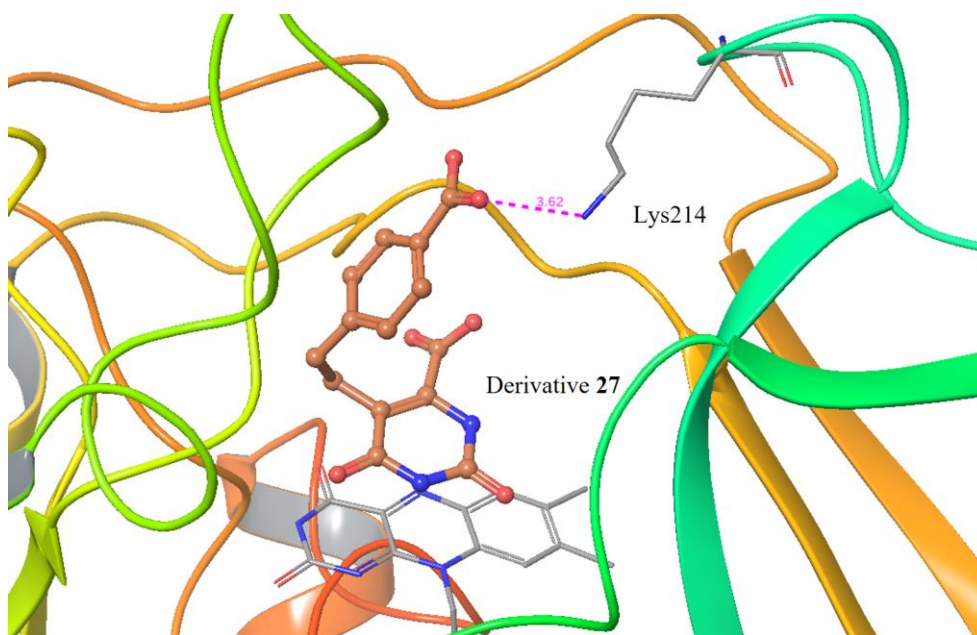


図 4.2.5 誘導体 **27** と Lys214 の構造

表 4.2.1 オロト酸誘導体の相互作用解析結果 (kcal/mol)

PDB ID	Derivative	Lys43	Asn67	Asn194	FMN	Lys214
3W1R	1	-11.40	-36.98	-25.47	-9.64	1.72
3W1T	2	-10.26	-35.07	-23.67	-8.39	3.17
3W1U	3	-11.01	-36.88	-30.16	-8.92	0.17
3W1X	4	-12.89	-38.06	-24.23	-9.78	2.66
3W2J	5	-7.78	-40.08	-25.61	-10.69	-11.89
3W2K	6	-9.97	-39.10	-26.14	-9.37	0.26
3W2L	7	-13.14	-35.55	-24.46	-8.65	4.41
3W2M	8	-8.87	-39.46	-26.45	-10.48	-7.13
3W2N	9	-13.00	-39.49	-27.22	-8.41	-2.00
3W2U	10	-5.28	-37.27	-24.90	-9.33	-7.48
3W3O	11	-14.69	-36.40	-28.38	-7.77	2.84
3W22	12	-12.59	-37.19	-27.77	-8.49	0.46
3W23	13	-8.46	-37.26	-24.82	-9.77	2.78
3W6Y	14	-14.43	-34.32	-25.60	-8.09	5.73
3W7C	15	-14.39	-36.21	-25.72	-8.73	3.13
3W7D	16	-15.93	-38.93	-28.17	-7.48	0.58
3W7E	17	-12.63	-39.04	-27.31	-8.50	1.59
3W7G	18	-2.77	-39.69	-23.95	-10.71	0.69
3W7H	19	-12.81	-38.30	-24.42	-8.36	1.51
3W7I	20	-16.99	-34.75	-23.45	-8.51	2.58
3W7J	21	-9.52	-35.73	-26.05	-12.73	-16.50
3W7K	22	-17.90	-34.85	-29.04	-7.66	-3.67
3W7L	23	-5.54	-39.55	-24.21	-9.74	1.06
3W7M	24	-11.72	-39.73	-26.86	-7.00	4.99
3W7N	25	-13.58	-40.59	-26.87	-7.37	1.93
3W7O	26	-11.13	-37.11	-25.37	-9.26	2.05
3W7P	27	-8.50	-37.28	-25.71	-9.76	-13.55
3W7Q	28	-13.21	-32.89	-26.72	-7.85	-1.95
3W70	29	-17.93	-31.13	-27.90	-4.56	-0.07
3W71	30	-14.88	-37.71	-25.69	-8.27	5.48
3W72	31	-15.76	-38.29	-30.00	-8.21	0.78
3W73	32	-12.73	-39.97	-29.00	-8.74	-1.02
3W74	33	-10.35	-33.38	-27.55	-10.09	-3.62
3W75	34	-17.08	-40.20	-29.55	-8.96	3.53
3W76	35	-15.64	-39.26	-28.43	-9.97	4.56
3W83	36	-16.05	-25.20	-25.57	-6.43	0.84
3W84	37	-10.78	-34.59	-24.88	-7.99	4.40
3W85	38	-13.72	-34.61	-29.44	-8.75	-0.12
3W86	39	-11.87	-42.10	-29.49	-8.79	6.61
3W87	40	-15.37	-39.60	-27.92	-8.41	-3.40
3W88	41	-13.33	-39.38	-29.22	-9.34	-4.98
4JD4	42	-16.41	-38.66	-29.45	-8.39	-1.31
4JDB	43	-14.67	-36.77	-26.81	-8.33	1.24

デリングすると図 4.2.6 のようなファーマコフォアモデルが得られる。ファーマコフォアの数 は 7 つで、そのうち 6 つは共通母核であるオロト酸部位に存在している。Lys43、Asn67、Asn194、FMN との相互作用は、オロト酸、オキソソ酸も含めてほぼすべての化合物で -5.00kcal/mol よりも強い相互作用が確認された。そのため、第三章第一節に述べた「相互作用解析の結果が 8 割以上の化合物が -5.00kcal/mol よりも強い相互作用をしている部位をファーマコフォアとする」という定義により、オロト酸部位に存在する二つのカルボニル基、環の窒素原子に付加した二つの水素原子、ピリミジン環 4 位に存在するカルボン酸、及び芳香族性を有するピリミジン環は、TcDHODH の阻害のために重要なファーマコフォアとなる。また、誘導体 **5**、**21**、**27** が Lys214 と -10.00kcal/mol よりも強い相互作用を示した。よって、「 -10kcal/mol よりも強い相互作用エネルギーを有する場所も同様にファーマコフォアとする」という定義により、Lys214 と相互作用をしていた官能基が存在する場所もファーマコフォアとなる。

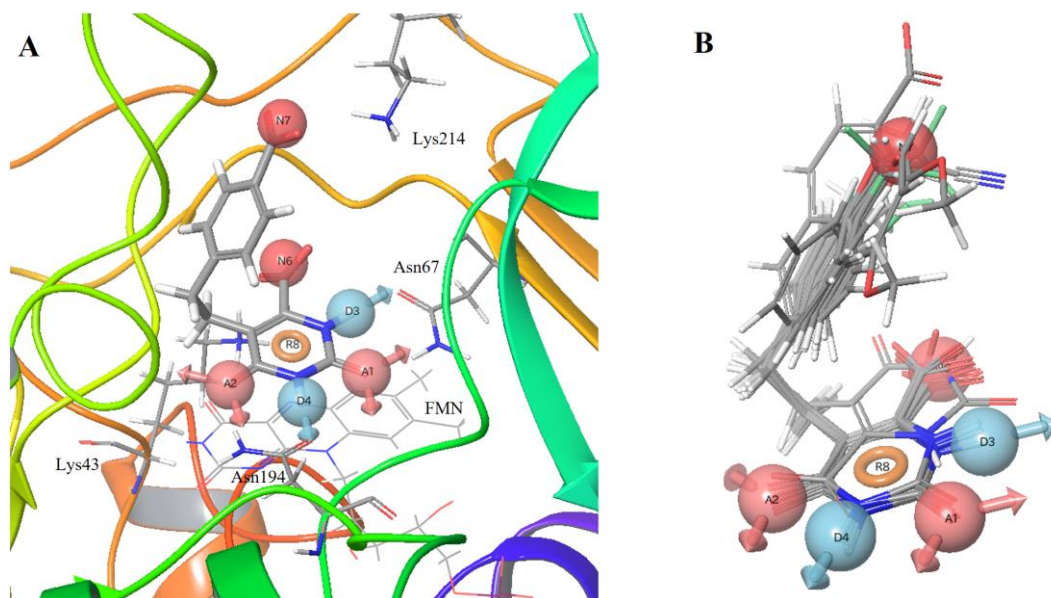


図 4.2.6 FMO 法による相互作用解析によってモデリングされたファーマコフォア(D: 水素結合供与対、A: 水素結合受容体、N: 負電荷、R: 芳香環)

第三節 FMO 法と従来手法のファーマコフォアモデリングの比較

本研究で行った FMO 法と従来手法のファーマコフォアモデリングの比較を行うために、ファーマコフォアモデリングソフトウェア、Phase を用いたファーマコフォアモデリングを行った。Phase によるファーマコフォアモデリングの結果を図 4.3.1 に示す。ファーマコフォアモデリングの結果、各誘導体のオロト酸部位のファーマコフォア 6 つが共通のファーマコフォアであると定義された。これら 6 つのファーマコフォアは、FMO 法による相互作用解析によって定義されたファーマコフォアと同じである。オロト酸部位に定義された、水素結合受容体と供与体のファーマコフォアは、Asn67、Asn194 と相

相互作用を形成していた部位であり、ピリミジン環 4 位のカルボン酸は Lys43 と塩橋を形成していた部位である。また、ピリミジン環は補因子である FMN と π スタッキングを形成していた部位である。このファーマコフォアに指定された部位は、すべての誘導体に共通している構造なので、従来手法によるモデリングでも定義することができる。しかしながら、Lys214 と相互作用をしていた誘導体 **5**、**8**、**10**、**21**、**27** の官能基は従来手法ではファーマコフォアとして定義されない結果となった。

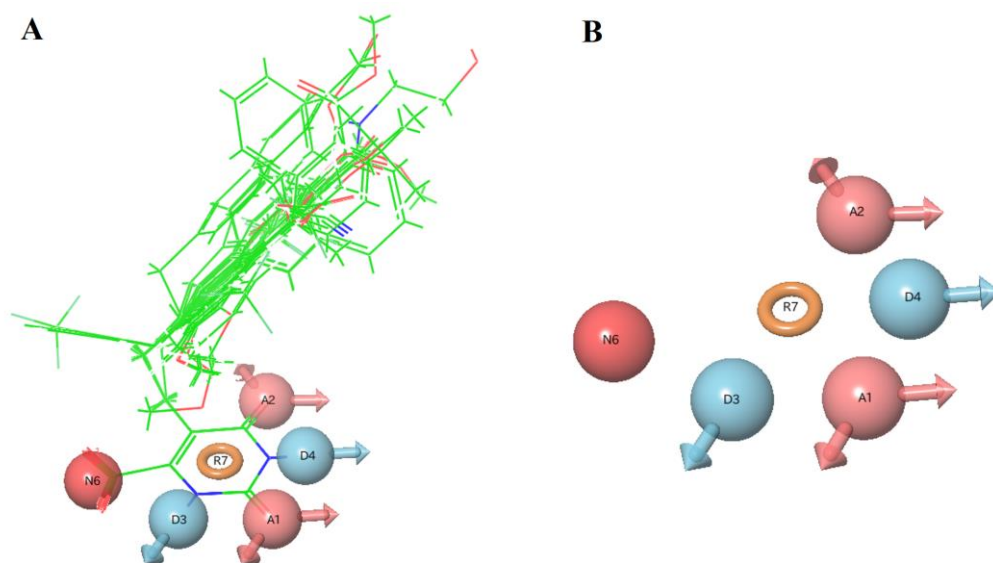


図 4.3.1 従来手法によるファーマコフォアモデリング(D: 水素結合供与対、A: 水素結合受容体、N: 負電荷、R: 芳香環)

第四節 FMO 法、及び MM 法による相互作用エネルギーの比較

本研究では更に、FMO 法と MM 法による相互作用エネルギーの計算結果の比較を行った。表 4.4.1 に FMO 法で求めた相互作用エネルギーと、MM 法で求めた相互作用エネルギーを示す。FMO 法では、オロト酸、オキソニン酸及び誘導体すべてと水素結合を 2 本形成していた Asn67 が、全化合物で最も強い相互作用エネルギーであったが、MM 法では平均相互作用エネルギーが -3.01 kcal/mol と弱い値になっている。同様に、Asn194 の相互作用エネルギーも、MM 法では -6.78 kcal/mol と弱い値となった。また、FMN との相互作用エネルギーは、FMO 法での平均相互作用エネルギーは -8.76 kcal/mol であったが、MM 法では 19.59 kcal/mol と反発として評価される結果となった。一方、Lys43 との平均相互作用エネルギーは、FMO 法では -12.49 kcal/mol であったが、MM 法では -45.24 kcal/mol と非常に強い評価となった。また、Lys214 との相互作用エネルギーは、FMO 法では誘導体 **5**、**8**、**10**、**21**、**27** との相互作用が確認されたが、MM 法ではすべての誘導体で相互作用エネルギーが確認された。

表 4.4.1 FMO 法と MM 法の相互作用エネルギーの比較(FMO: MP2/6-31G、MM: OPLS2005)

Derivative	Lys43		Asn67		Asn194		FMN		Lys214	
	FMO	MM	FMO	MM	FMO	MM	FMO	MM	FMO	MM
1	-11.40	-41.54	-36.98	-2.76	-25.47	-6.86	-9.64	19.03	1.72	-19.05
2	-10.26	-41.52	-35.07	-3.38	-23.67	-6.86	-8.39	17.89	3.17	-17.99
3	-11.01	-41.85	-36.88	-2.94	-30.16	-6.57	-8.92	18.19	0.17	-18.38
4	-12.89	-44.91	-38.06	-2.95	-24.23	-6.85	-9.78	18.89	2.66	-16.60
5	-7.78	-46.87	-40.08	-3.14	-25.61	-6.00	-10.69	17.34	-11.89	-21.72
6	-9.97	-41.41	-39.10	-3.32	-26.14	-6.93	-9.37	17.68	0.26	-19.45
7	-13.14	-44.79	-35.55	-3.23	-24.46	-7.33	-8.65	18.23	4.41	-16.96
8	-8.87	-43.38	-39.46	-3.45	-26.45	-6.96	-10.48	18.11	-7.13	-22.48
9	-13.00	-42.97	-39.49	-3.56	-27.22	-5.78	-8.41	17.65	-2.00	-20.40
10	-5.28	-36.79	-37.27	-3.11	-24.90	-5.72	-9.33	17.61	-7.48	-23.75
11	-14.69	-44.99	-36.40	-3.51	-28.38	-6.04	-7.77	18.25	2.84	-17.47
12	-12.59	-44.43	-37.19	-3.21	-27.77	-6.51	-8.49	18.45	0.46	-18.46
13	-8.46	-40.38	-37.26	-3.12	-24.82	-6.81	-9.77	18.14	2.78	-18.47
14	-14.43	-59.65	-34.32	-1.23	-25.60	-7.23	-8.09	38.44	5.73	-65.27
15	-14.39	-45.23	-36.21	-2.82	-25.72	-6.84	-8.73	18.98	3.13	-14.34
16	-15.93	-46.34	-38.93	-3.35	-28.17	-6.99	-7.48	20.50	0.58	-18.16
17	-12.63	-42.08	-39.04	-3.23	-27.31	-7.01	-8.50	18.13	1.59	-18.61
18	-2.77	-27.85	-39.69	-2.67	-23.95	-6.75	-10.71	18.60	0.69	-20.18
19	-12.81	-43.79	-38.30	-3.15	-24.42	-6.95	-8.36	18.44	1.51	-18.40
20	-16.99	-44.98	-34.75	-3.34	-23.45	-7.17	-8.51	19.08	2.58	-17.40
21	-9.52	-56.40	-35.73	-2.21	-26.05	-7.14	-12.73	35.76	-16.50	-40.45
22	-17.90	-46.37	-34.85	-4.04	-29.04	-7.04	-7.66	18.48	-3.67	-16.04
23	-5.54	-36.06	-39.55	-3.25	-24.21	-6.37	-9.74	18.36	1.06	-19.51
24	-11.72	-42.41	-39.73	-2.91	-26.86	-6.94	-7.00	17.26	4.99	-16.85
25	-13.58	-44.41	-40.59	-2.06	-26.87	-6.50	-7.37	16.16	1.93	-17.07
26	-11.13	-60.08	-37.11	-1.19	-25.37	-7.63	-9.26	38.76	2.05	-46.54
27	-8.50	-61.48	-37.28	-0.97	-25.71	-7.18	-9.76	38.45	-13.55	-59.66
28	-13.21	-46.01	-32.89	-2.39	-26.72	-5.92	-7.85	16.58	-1.95	-22.35
29	-17.93	-47.92	-31.13	-4.24	-27.90	-6.69	-4.56	16.80	-0.07	-18.23
30	-14.88	-45.06	-37.71	-3.21	-25.69	-7.02	-8.27	18.92	5.48	-15.09
31	-15.76	-44.92	-38.29	-3.10	-30.00	-6.79	-8.21	17.32	0.78	-19.13
32	-12.73	-42.21	-39.97	-3.47	-29.00	-6.70	-8.74	17.34	-1.02	-19.29
33	-10.35	-42.46	-33.38	-3.16	-27.55	-6.21	-10.09	18.37	-3.62	-18.57
34	-17.08	-46.38	-40.20	-3.13	-29.55	-7.02	-8.96	-19.53	3.53	-13.47
35	-15.64	-46.26	-39.26	-3.02	-28.43	-6.95	-9.97	18.57	4.56	-17.86
36	-16.05	-46.28	-25.20	-3.13	-25.57	-7.23	-6.43	17.21	0.84	-17.80
37	-10.78	-39.47	-34.59	-3.85	-24.88	-6.91	-7.99	18.32	4.40	-15.68
38	-13.72	-43.24	-34.61	-2.59	-29.44	-6.30	-8.75	18.04	-0.12	-17.97
39	-11.87	-45.19	-42.10	-3.79	-29.49	-7.34	-8.79	19.09	6.61	-15.28
40	-15.37	-47.15	-39.60	-3.30	-27.92	-7.26	-8.41	20.89	-3.40	-20.50
41	-13.33	-59.83	-39.38	-2.72	-29.22	-7.35	-9.34	36.24	-4.98	-45.27
42	-16.41	-44.73	-38.66	-3.10	-29.45	-6.64	-8.39	18.35	-1.31	-20.17
43	-14.67	-45.27	-36.77	-3.03	-26.81	-6.07	-8.33	18.94	1.24	-18.15
Average	-12.49	-45.24	-37.18	-3.01	-26.74	-6.78	-8.76	19.59	-0.16	-22.20
Weakest	-2.77	-27.85	-25.20	-0.97	-23.45	-5.72	-4.56	38.76	6.61	-13.47
Strongest	-17.93	-61.48	-42.10	-4.24	-30.16	-7.63	-12.73	-19.53	-16.50	-65.27

第五節 考察

本章では、FMO 法を用いたオロト酸と既知阻害剤であるオキシソニン酸、及びオロト酸誘導体 43 種の相互作用解析を行い、それらの結果をもとにファーマコフォアモデリングを行った。相互作用解析を行った結果、オロト酸とオキシソニン酸、すべての誘導体で Lys43 との塩橋、Asn67 と Asn194 との水素結合、FMN との π スタッキングが共通して確

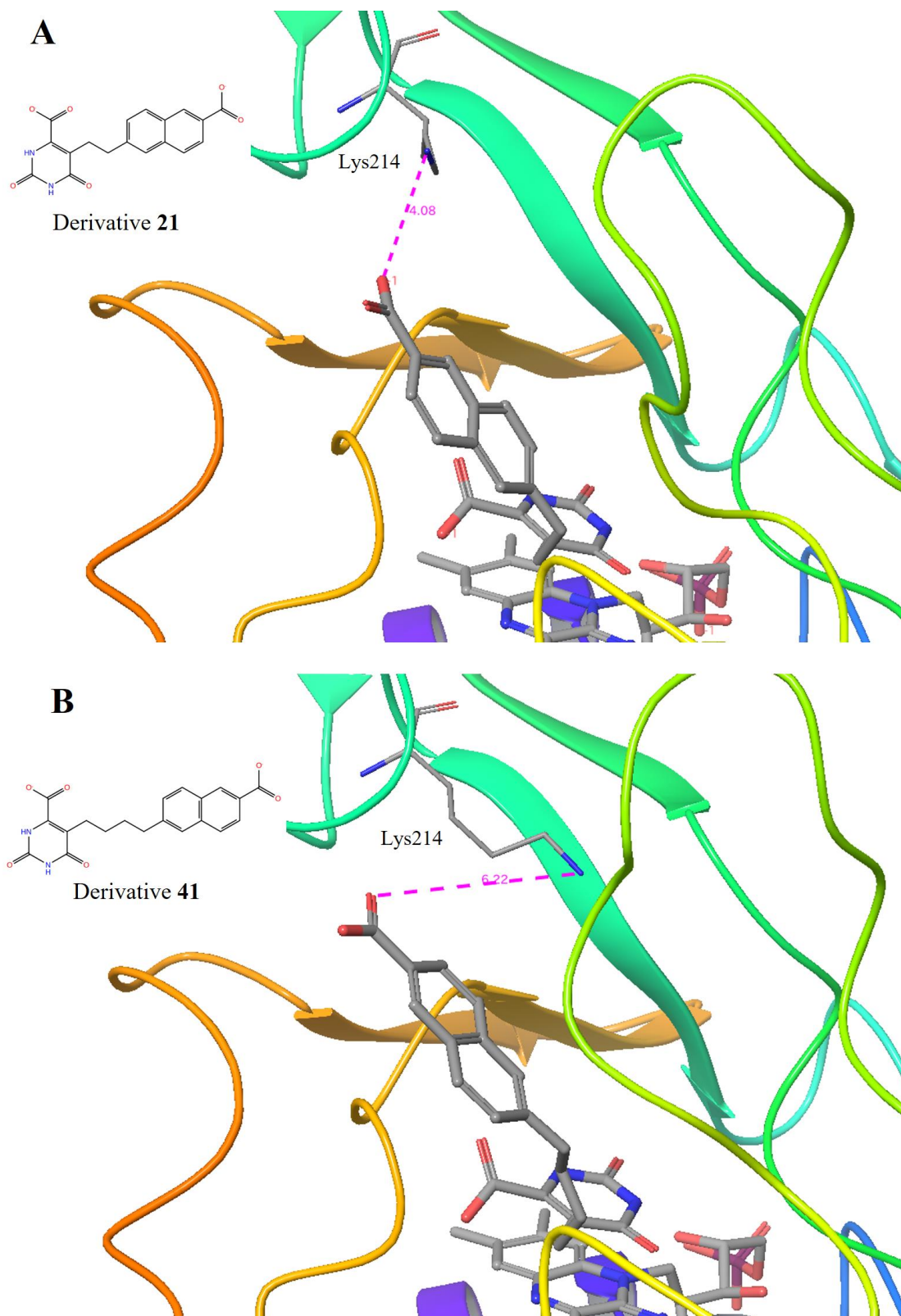


図 4.5.1 誘導体 **21**、**41** カルボン酸と Lys214 のアミノ基の距離(A: 誘導体 **21** (4.08Å)、
B: 誘導体 **41**(6.22Å))

認められた。したがって、これらの相互作用はピリミジン環 5 位に存在する官能基の有無に関わらず維持されている。よって、これらの相互作用は 43 種の阻害剤に共通して存在するファーマコフォアであると定義できる。これらの相互作用を形成する部位は、TcDHODH に結合し、反応を阻害するために重要な箇所であるといえる。また、FMO 法では誘導体 **5**、**8**、**10**、**21**、**27** と Lys214 との相互作用エネルギーが確認された。これは、オロト酸及びオキソソン酸では確認できなかった相互作用であるため、ピリミジン環 5 位に官能基を導入したことによって獲得された相互作用であるといえる。

しかしながら、誘導体 **21** や **27** と同様に、誘導体 **40**、**41** にも芳香環にカルボン酸を有しているにも関わらず、Lys214 との相互作用エネルギーはそれぞれ -3.40、-4.98 kcal/mol と、他の Lys214 と相互作用をしている誘導体と比較すると小さい相互作用エネルギーである。図 4.5.1 に誘導体 **21** と **41** の Lys214 付近の構造を示す。誘導体 **21** と **41** の構造式は、オロト酸部位と付加した官能基は同じであるが、ピリミジン環 5 位と官能基を結ぶアルキル鎖が誘導体 **21** ではエチレン鎖、**41** ではブチレン鎖となっている。官能基に付加したカルボン酸と Lys214 の距離は、誘導体 **21** では 4.08Å となっているが、**41** では 6.22Å と **21** よりも遠い距離に存在している。したがって、Lys214 との相互作用を獲得するためには、アルキル鎖はエチレン鎖の方がブチレン鎖よりも適切な長さであることが予想される。

また、本章では FMO 法によるファーマコフォアモデリングとの比較を行うために、Phase を用いたファーマコフォアモデリングを行った。従来手法のファーマコフォアモデリングは、基本的には LBDD に分類される手法であり、活性が認められた化合物の構造式があればファーマコフォアのモデリングは可能であり、標的タンパク質の構造は不要である。43 種の誘導体は、DHODH の生成物であるオロト酸を母核とした構造であるため、オロト酸部位の重ね合わせが容易に行える。そのため、母核のファーマコフォアは従来手法でも定義することが可能である。しかしながら、Lys214 と相互作用をしていた官能基は、既知阻害剤の三次元構造の重ね合わせで共通性が見られず、ファーマコフォアとして定義されない結果となった。従来手法のファーマコフォアモデリングは、標的タンパク質の構造が不要という利点はあるが、Lys214 のように新たな相互作用を獲得している官能基を見落とす可能性があるため、複合体構造から相互作用解析を行い、ファーマコフォアをモデリングする本研究の手法ではこの問題点が解決されているといえる。また、阻害剤の構造を最適化する際、阻害剤の活性を強くするために新たな相互作用を獲得する必要がある。そのため、阻害剤の共通な特徴を探索しつつ、阻害剤と相互作用しうる新たなアミノ酸残基が特定できる点でも本研究の手法は優れているといえる。

さらに、本章では FMO 法と MM 法の相互作用エネルギー計算の比較も行った。FMO 法では Asn67、Asn194 のように、水素結合を二本形成しているアミノ酸残基との相互作用エネルギーは強く表れていたが、MM 法では FMO 法と比較して非常に弱い値とな

っていた。水素結合のように、化合物内で電子の移動などによって分極が起こる相互作用を正確に見積もるためには、非経験的に各原子の静電ポテンシャルを計算する必要がある。MM法では、各原子のタイプによってポテンシャルが決められてしまうため、分子の構造や周囲の環境を考慮することが出来ない。そのため、水素結合のような相互作用の評価を正しく行うことが出来ず、形式電荷を割り当てることが出来る塩橋などを強く評価する結果となる。また、オロト酸やオキソソ酸、及びすべての誘導体と FMN の π スタッキングによる相互作用が FMO 法では確認されたが、MM 法では FMN との相互作用は逆に反発として評価される結果となった。MM 法では、 π 電子などの量子化学的な要素は考慮せず、原子をおもり、結合をばねと例えた古典力学のモデルであるため、このような相互作用を正しく見積もることは出来ない。よって、MM 法によるエネルギー計算は、生体高分子などの巨大分子に対して非常に早く行えることが利点であり、アミノ酸残基などの構造が一定である分子に対して力場を決定することは容易ではあるが、阻害剤のように多種多様な構造式を持つ化合物に対して適用する場合、非経験的にエネルギー計算を行う FMO 法の方が正確性の面で優れている。また、モデリングしたファーマコフォアを用いてスクリーニングをし、新たな化合物を取得する際、相互作用エネルギーが高い順にファーマコフォアに優先度や重み付けを行うなどといった応用をする場合でも、FMO 法による相互作用エネルギーの解析は有効であると考えられる。

第五章 FMO 法を応用したスペルミジン合成酵素阻害剤の探索

第一節 FMO 法による TcSpdSyn 阻害剤の相互作用解析

本研究では更に、四章で行った FMO 法によるファーマコフォアモデリングを応用し、TcSpdSyn の新規阻害剤の探索を行った。まず初めに、本節では TcSpdSyn と既知阻害剤の相互作用解析について述べる。図 5.1.1 に TcSpdSyn と既知阻害剤の結晶構造を示す (PDBID: 5B1S)。この結晶構造の既知阻害剤は、SpdSyn の基質であるプトレシンや、別の既知阻害剤である 4MCHA と同じ部位に結合をし、阻害活性を示す (IC_{50} : 120 μ M)。また、エチレン鎖先端に付加したのアミノ基と Asp171 との塩橋が結晶構造から予測される。このアミノ酸残基は、プトレシンや 4MCHA も同様に相互作用を示す残基であり、SpdSyn の活性中心への結合に重要な残基であると予測される。

図 5.1.2 に FMO 法による相互作用解析の結果を示す。結晶構造からも予測されたように、Asp171 との相互作用が -16.18 kcal/mol と最も強く表れる結果となった。既知阻害剤のアミノ基は、中性の溶液中では電荷を帯びているため、Asp171 と相互作用は塩橋によるものと予想される。また Gln201 と Tyr237 との相互作用が -6.68 kcal/mol、-6.49 kcal/mol となった。既知阻害剤と、Gln201、Tyr237 の相互作用様式を図 5.1.3 に示す。Gln201 のアルキル鎖が既知阻害剤の芳香環付近に存在し、また Tyr237 の芳香環が既知阻害剤の芳香環付近に存在する。よって、これらの相互作用は、既知阻害剤の芳香環の π 電子との相互作用であることが予想される。

相互作用解析の結果より、既知阻害剤は Asp171、Gln201、Tyr237 と -5.00 kcal/mol よりも強く相互作用を形成していた。よって既知阻害剤のアミノ基と、芳香環を TcSpdSyn 阻害のために重要なファーマコフォアとして定義する。

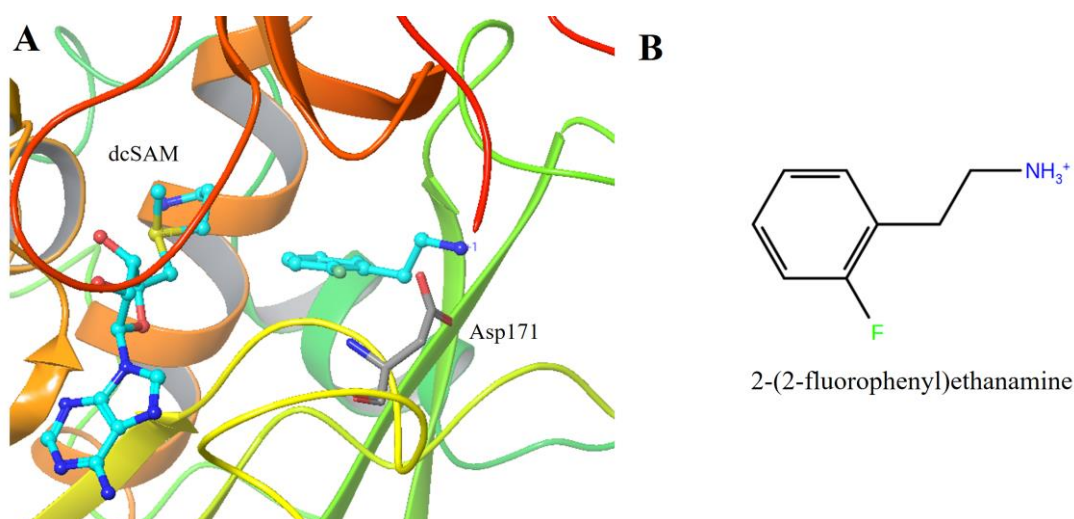


図 5.1.1 TcSpdSyn と既知阻害剤の複合体構造(A: 複合体構造の活性中心、B: 既知阻害剤の構造式)

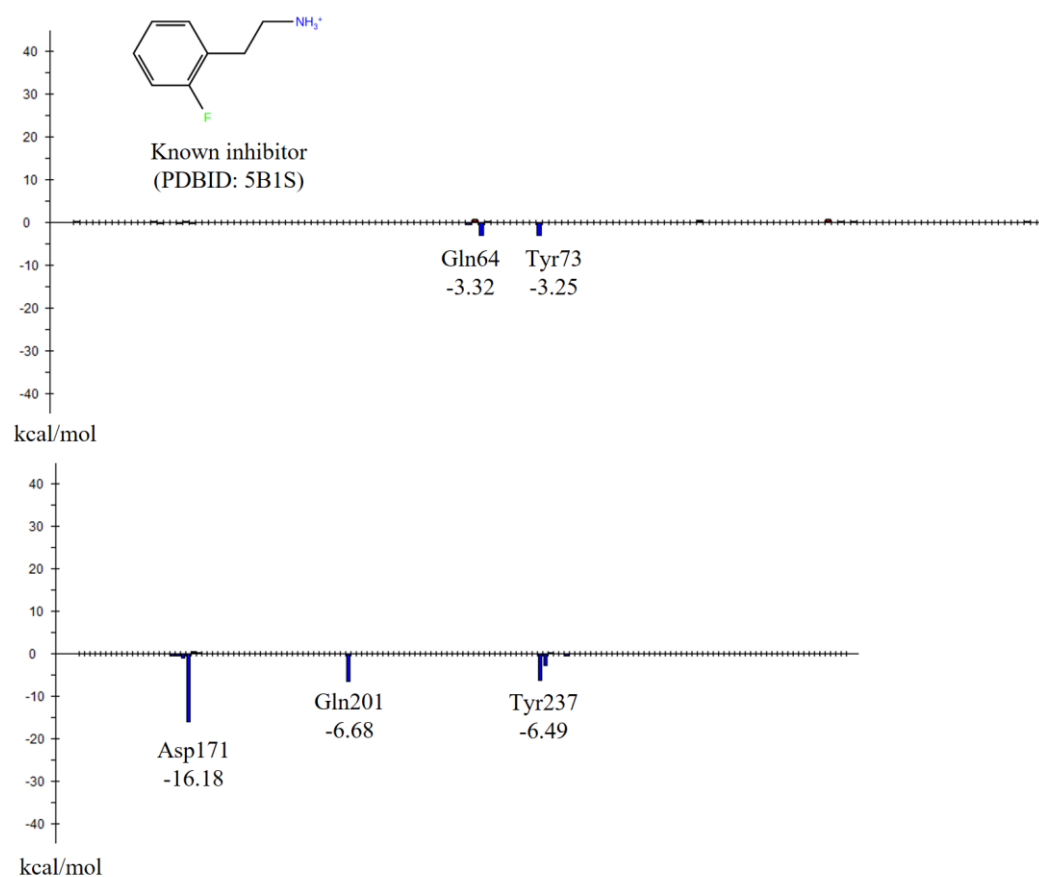


図 5.1.2 既知阻害剤と TcSpdSyn 間の相互作用解析結果

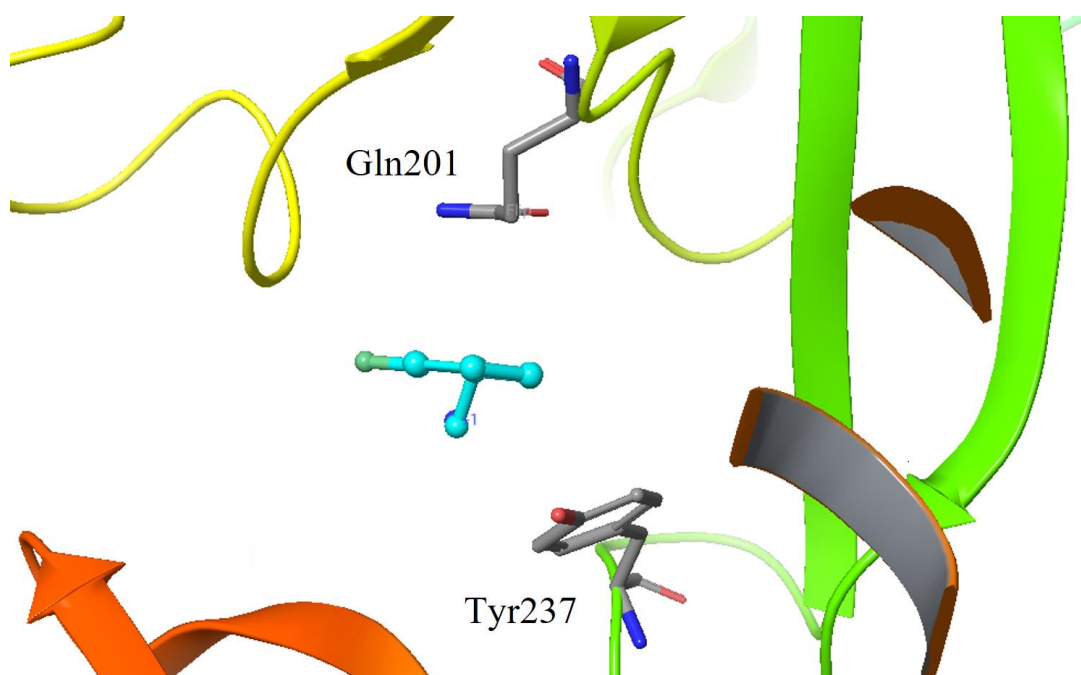


図 5.1.3 既知阻害剤と Gln201、Tyr237 の相互作用様式

第二節 ファーマコフォアスクリーニングによる TcSpdSyn 阻害剤探索

次に、前節で定義したファーマコフォアによる化合物のスクリーニングを行い、新たな TcSpdSyn 阻害剤探索を行った。図 5.2.1 に相互作用解析にもとづいてモデリングを行ったファーマコフォアを示す。Asp171 と塩橋を形成していたアミノ基の窒素には正電荷のファーマコフォア、Asp171 の方向へ向く水素原子には水素結合供与体のファーマコフォアを設置した。また、Gln201、Tyr237 と相互作用を形成していた既知阻害剤の芳香環にも同様にファーマコフォアを設置した。この三点のファーマコフォアモデルに対して、あらかじめドッキングシミュレーションを行っていた薬様化合物約 480 万化合物のうちの、ドッキングスコアの高かった上位 10 万化合物のファーマコフォアスクリーニングを行い、TcSpdSyn の阻害剤候補となる化合物の探索を行った。

ドッキング結果上位 10 万化合物をファーマコフォアモデルにスクリーニングした結果、13,882 化合物がファーマコフォアに適合した。ファーマコフォアに適合し、ドッキングスコアが高かった上位 5 化合物のスクリーニング結果を図 5.2.2。それら 5 化合物の構造式とドッキングスコア、最初にドッキングを行った約 480 万化合物の中でのドッキングスコアの順位を表 5.2.1 に示す。ドッキングスコアは結合自由エネルギーを模した値になっており(kcal/mol)、低い値であるほど強い結合能をもつと予測されている。図 5.2.2A のファーマコフォアスクリーニング結果では、既知阻害剤と同様に芳香環にアルキル鎖を通じてアミノ基を有している化合物が多くヒットしている。また、図 5.2.2B の結果から、これらの化合物も既知阻害剤と同様に Asp171 と塩橋を形成し、芳香環の π 電子が Gln201 と Tyr237 と相互作用することが期待される。また、表 5.2.1 の結果より、候補化合物 1 はヌクレオシド様の化合物であり、ヌクレオシドの塩基の部位が既知阻害剤の芳香環の部位に重なり、また糖からアルキル鎖を通じて付加したアミノ基が既知阻害剤のアミノ基と重なっている。その他の候補化合物は、既知阻害剤のように

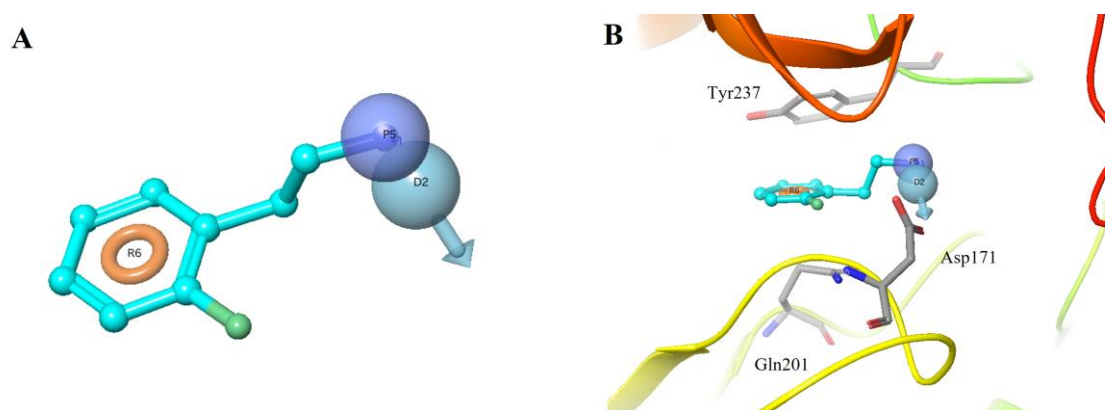


図 5.2.1 FMO 法による相互作用解析にもとづいた、TcSpdSyn 阻害剤のファーマコフォアモデル(A: 既知阻害剤のファーマコフォア(水色: 水素結合供与体、群青: 正電荷、橙: 芳香環)、B: ファーマコフォアモデルと既知阻害剤の結合様式)

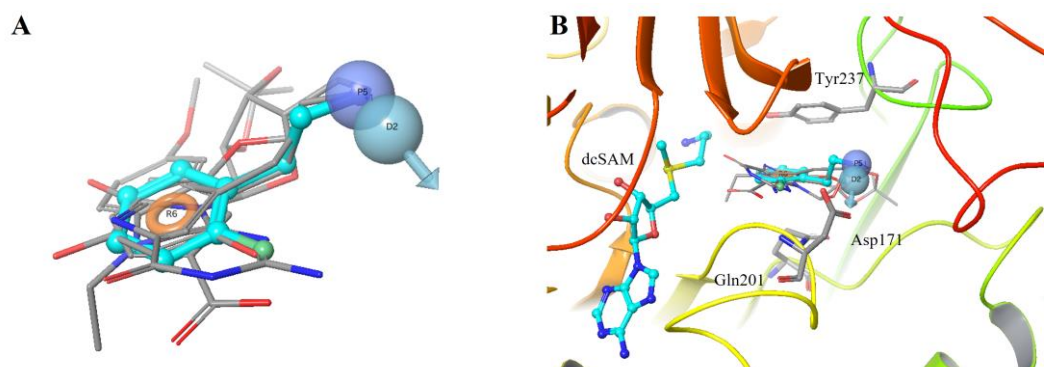
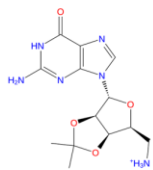
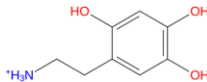
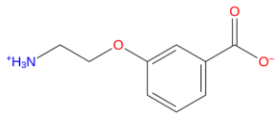
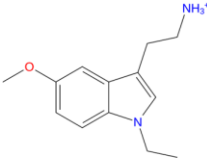
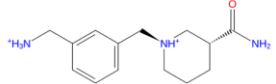


図 5.2.2 ファーマコフォアスクリーニング結果(A: TcSpdSyn の既知阻害剤とファーマコフォアに適合した化合物、B: 候補化合物と相互作用を形成していたアミノ酸残基)

表 5.2.1 ファーマコフォアスクリーニングによって絞り込まれた TcSpdSyn 阻害剤候補化合物の構造式

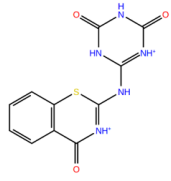
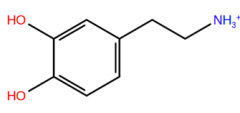
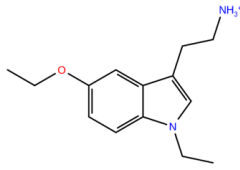
Candidate	Structure	Docking Score (kcal/mol)	Docking Rank
1		-7.51	8
2		-7.42	11
3		-7.27	22
4		-7.26	23
5		-7.21	32

芳香環にアルキル鎖を通じてアミノ基を有する化合物である。本節で得られた 13,882 化合物のうち、利用可能な 37 化合物の *in vitro* アッセイ試験を行い IC₅₀ の決定を行った。

第三節 TcSpdSyn 阻害剤候補化合物の *in vitro* アッセイ試験結果

前節で FMO 法による相互作用解析によってモデリングしたファーマコフォアを用いて、TcSpdSyn 阻害剤の候補化合物の絞り込みを行った。本節では、阻害剤の候補化合物のうち、利用可能な 37 化合物の *in vitro* アッセイ試験を行い、IC₅₀ の値を決定した。表 5.3.1 に IC₅₀ の値が決定された化合物の構造と、IC₅₀ の値を示す。37 化合物のうち、3 化合物の IC₅₀ が決定された。最も活性の高かった化合物 **1** の IC₅₀ は 35 μ M、化合物 **2** は 92 μ M、化合物 **3** は 150 μ M であった。これら三つの化合物のうち、ドッキングスコアと順位は化合物 **3** が最も良く、化合物 **1** が最もドッキングスコア及び順位が低い結果となっている。ヒットした化合物のファーマコフォアスクリーニングの結果を図 5.3.1 に示す。化合物 **1** は、トリアジン環の窒素原子と既知阻害剤のアミノ基が重なり、化合物 **1** のもう一方の環が既知阻害剤のベンゼン環と重なる結果となっている。化合物 **2** は既知阻害剤と同様に、芳香族性の環からエチレン鎖を通してアミノ基を有しているため、炭素鎖がほぼ既知阻害剤に重なっている。化合物 **3** は、インドール環からエチレン鎖を通じてアミノ基を有する構造であるため、既知阻害剤のベンゼン環と化合物 **3** のインドール環が重なり、エチレン鎖の先端のアミノ基が重なる結果となっている。

表 5.3.1 阻害剤候補化合物のアッセイ試験結果

Candidate	Structure	IC ₅₀ for TcSpdSyn(μ M)	Docking Score (Rank)
1		35	-6.22 (1131)
2		92	-6.47 (484)
3		150	-6.93 (89)

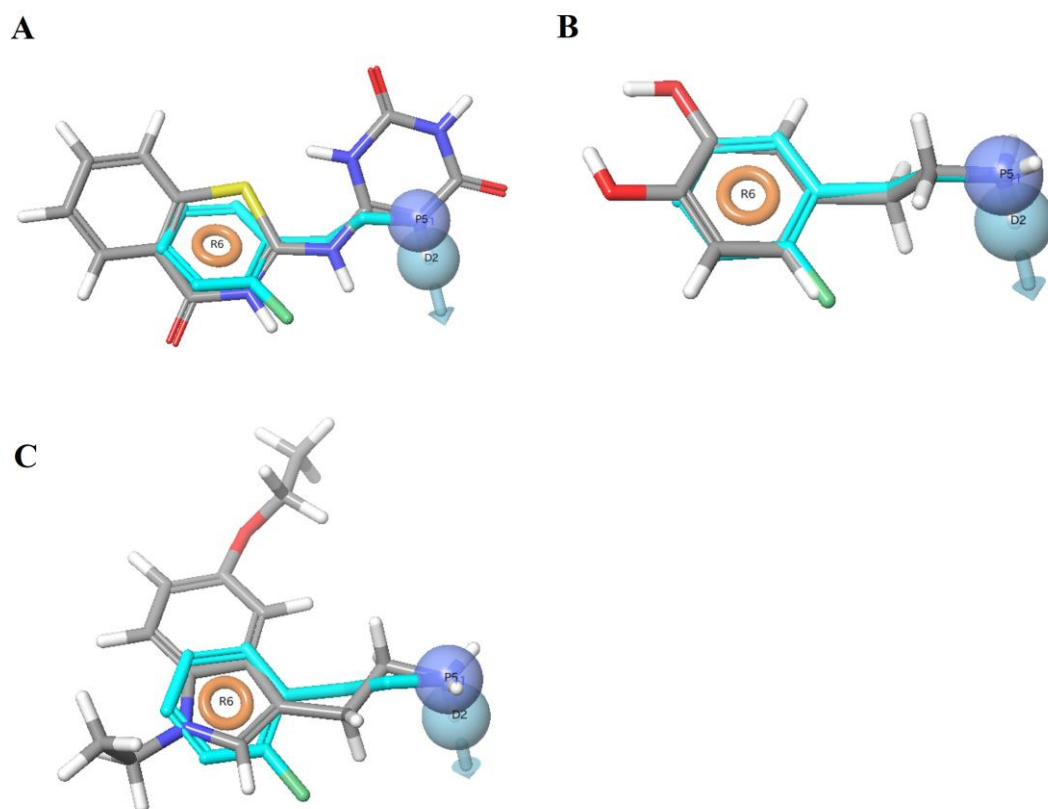


図 5.3.1 新規ヒット化合物のファーマコフォアスクリーニングの結果 (A: 化合物 **1**、B: 化合物 **2**、C: 化合物 **3**、灰色の炭素鎖: 新規ヒット化合物、水色の炭素鎖: 既知阻害剤)

第四節 考察

本章では、FMO 法の相互作用解析を用いたファーマコフォアモデリングを応用し、TcSpdSyn の新規阻害剤の探索を行った。FMO 法による既知化合物の相互作用解析を行った結果、Asp171、Gln201、Tyr237 との相互作用が強く表れ、それぞれの相互作用エネルギーの値は-16.18、-6.68、-6.49 kcal/mol となった。第四章の第四節で行った方法と同様に、既知阻害剤の相互作用エネルギーを MM 法で求めた結果を表 5.4.1 に示す。第四章での結果と同様に、Asp171 との塩橋は非常に強く見積もられるが、 π 電子との相互作用である Gln201 と Tyr235 との相互作用が弱く見積もられる結果となった。よって、本研究でファーマコフォアとして定義されたベンゼン環との相互作用は、FMO 法を用

表 5.4.1 既知阻害剤の相互作用エネルギー比較(FMO: MP2/6-31G、MM: OPLS2005)

Asp171		Gln201		Tyr235	
FMO	MM	FMO	MM	FMO	MM
-16.18	-56.26	-6.68	-3.54	-6.49	0.14

いなければ解析できない重要な相互作用であるといえる。

本章第二節の表 5.2.1 でファーマコフォアに適合した化合物のうち、候補化合物 **2** から **5** は芳香環からアルキル鎖を通じてアミノ基を有するものである。また新規ヒット化合物のうち、化合物 **2** と **3** も同様の構造である。これらのヒット化合物の結晶構造はとかれていないが、図 5.3.1 のファーマコフォアスクリーニングの結果から、化合物 **2** のベンゼン環とエチレン鎖と通じたアミノ基、化合物 **3** はインドール環とエチレン鎖を通じたアミノ基が、既知阻害剤のベンゼン環とアミノ基と同じ場所に結合し、TcSpdSyn を阻害していると予測される。また、化合物 **1** のドッキングポーズを図 5.4.1 に示す。予測されたヒット化合物 **1** のポーズでは、トリアジン環、リンカー、リンカーにつながるもう一方の芳香環の窒素原子が Asp171 付近に存在する。また、Gln201 と Tyr237 が、化合物 **1** の芳香環付近に存在し、図 5.1.3 に示した既知阻害剤と同様の結合様式を示す。よって、ヒット化合物 **1** が図 5.4.1 に示したポーズで TcSpdSyn に結合し、阻害活性を示すことが予測される。ヒット化合物 **1** の IC_{50} は、35 μ M とヒット化合物の中で最も良く、既知阻害剤よりも高い活性を示した(既知阻害剤の IC_{50} : 130 μ M)。図 5.4.1 に示したドッキングポーズでは、三つの窒素原子と Asp171 との相互作用が予想される。既知阻害剤を含めた他のすべての化合物では、Asp171 と相互作用を形成する箇所は一つである。そのため、化合物 **1** はほかの化合物よりも活性が高いことが予想される。

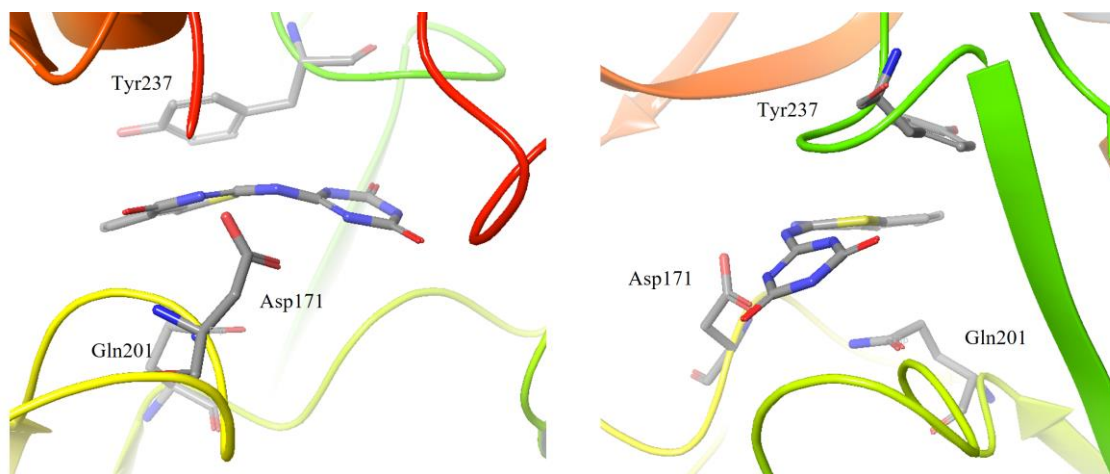


図 5.4.1 ヒット化合物 **1** のドッキングポーズ

第六章 総括

本研究では、FMO 法による相互作用解析を用いたファーマコフォアモデリングを 43 種の TcDHODH 阻害剤に対して行い、従来手法のファーマコフォアモデリング及び MM 法による相互作用解析との比較を行った。さらに、FMO 法によるファーマコフォアモデリングを応用し、TcSpdSyn を阻害する新たな活性化合物の取得を行った。

第一章では、創薬研究におけるインシリコスクリーニングおよびファーマコフォアモデリングの重要性について述べ、本研究における応用先である TcDHODH と TcSpdSyn についての概略を示した。第二章では、量子化学計算における FMO 法の原理について、古典力学を用いた手法との比較を含めて論じた。第三章では、本研究において使用した手法の詳細を述べた。

第四章における FMO 法によるオロト酸、オキソソン酸及び TcDHODH 阻害剤である 43 種のオロト酸誘導体の相互作用解析では、オロト酸とオキソソン酸、及びすべての誘導体で Lys43 との塩橋、Asn67 と Asn194 との水素結合、FMN との π スタッキングが確認された。また、誘導体 **5**、**8**、**10**、**21**、**27** の相互作用解析では Lys214 との相互作用が確認された。この Lys214 は、オロト酸のピリミジン環 5 位に導入された官能基と相互作用を形成していたため、誘導体にのみにあらわれる相互作用である。これらのアミノ酸残基及び補因子である FMN と相互作用をしていた部位を TcDHODH の阻害のために重要な特徴とみなし、ファーマコフォアのモデリングを行った。

さらに本研究では、阻害活性を有する化合物の構造のみを用いた従来のファーマコフォアモデリングも行い、FMO 法によるファーマコフォアモデリングとの比較を行った。その結果、誘導体の母核であるオロト酸部位のファーマコフォアは FMO 法を用いたファーマコフォアと同様の結果となった。しかしながら、Lys214 と相互作用をしていた官能基は、従来手法である化合物の三次元構造の重ね合わせではファーマコフォアとして定義されない結果となった。この Lys214 と相互作用をしていた官能基のファーマコフォアは、複合体構造に対して相互作用解析を行わなければ定義されないファーマコフォアであるといえる。化合物の構造のみを用いた従来のファーマコフォアモデリングは、標的タンパク質の構造が不要ではあるが、複合体構造の相互作用解析を行うことによって従来法では定義されないファーマコフォアの探索を行うことが可能である。

また、FMO 法の量子化学計算によって求められる相互作用エネルギーと、MM 法の古典力学計算によって求められる相互作用エネルギーの値の比較を行った。MM 法では、水素結合のように分子内の分極によって発生する相互作用や、 π 電子などの量子化学的な要素は考慮出来ないため、FMO 法の解析で相互作用が確認された Asn67 と Asn194、FMN との相互作用が現れない結果となった。MM 法は生体高分子などの巨大分子のエネルギー計算を素早く行えるが、FMO 法は阻害剤などの多種多様な構造を持った分子のエネルギーを非経験的に求められ、 π 電子などの量子化学的な要素をエネルギー計算

に含める。そのため、複合体構造から重要な水素結合や π 電子との相互作用を解析には FMO 法は有用である。

本研究では、TcDHODH で行った FMO 法の相互作用解析を用いたファーマコフォアモデリングを応用し、TcSpdSyn の新規阻害剤の探索を行った。FMO 法による既知阻害剤の相互作用解析を行った結果、Asp171、Gln201、Tyr237 と相互作用を形成する結果となった。それらのアミノ酸残基と相互作用をしていた、既知阻害剤のベンゼン環とアミノ基をファーマコフォアとして定義し、ファーマコフォアモデリングを行った。この FMO 法による相互作用解析によってモデリングされたファーマコフォアを用いて、新規 TcSpdSyn 阻害剤の候補化合物のスクリーニングを行い、ファーマコフォアに適合した 37 化合物の *in vitro* アッセイ試験を行った。その結果、3 化合物の IC₅₀ を決定することに成功した。

本研究で行った FMO 法によるファーマコフォアモデリングによって実際にヒット化合物を得ることに成功したため、創薬研究において、FMO 法の量子化学計算による相互作用解析は有効な手法であるという一例が示された。FMO 法を創薬研究に用いる利点は、低分子などの多種多様な構造に対して、非経験的にエネルギー計算を精度良く定量的に解析できることである。本研究ではファーマコフォアを FMO 法の相互作用解析によって定義し、スクリーニングに応用しているが、相互作用エネルギーの強さに応じてファーマコフォアに優先度を付けるなどの応用が考えられる。このような FMO 法による相互作用解析の定量性を取り入れることにより、阻害剤探索のスクリーニングの改善が期待される。

引用文献

- 1) Paul S.M. et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 203–214.
- 2) Morgan S., et al. The cost of drug development: a systematic review. *Health Policy.* 2011, 100, 4–17.
- 3) Haggarty S.J. et al. Dissecting cellular processes using small molecules: identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis. *Chem. Biol.* 2000, 7, 275–286.
- 4) Young K. et al. Identification of a calcium channel modulator using a high throughput yeast two-hybrid screen. *Nat. Biotechnol.* 1998, 16, 946–950.
- 5) Egan W.J., et al. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* 43, 3867–3877.
- 6) Jorgensen W.L. & Duffy E.M. Prediction of drug solubility from structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 355–366.
- 7) Sliwoski G., et al. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 2014, 66, 334–395.
- 8) Ou-Yang S.S., et al. Computational drug discovery. *Acta. Pharmacol. Sin.* 2012, 33, 1131–1140.
- 9) Jorgensen W.L. The many roles of computation in drug discovery. *Science.* 2014, 303, 1813–1818.
- 10) DesJarlais R.L., et al. Venkataraghavan, R. Using shape complementarity as an initial screen in designing ligands for a receptor binding site of known three-dimensional structure. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 722–729.
- 11) Meng E.C., Shoichet B.K., Kuntz I.D. Automated docking with grid-based energy evaluation. *J. Comput. Chem.* 1992, 13, 505–524.
- 12) Kuntz I.D., Meng E.C., Shoichet B.K. Structure-Based Molecular Design. *Acc. Chem. Res.* 1994, 27, 117–123.
- 13) Ewing T.J., Makino S., Skillman A.G., Kuntz I.D., DOCK4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2001, 15, 411–428.
- 14) Moustakas D.T., et al. Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006, 20, 601–619.
- 15) Lang P.T., et al. DOCK 6: Combining techniques to model RNA-small molecule complexes. *RNA.* 2009, 15, 1219–1230.
- 16) Morris G.M., et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an

- empirical binding free energy function. J. Comput. Chem. 1998, 19, 1639–1662.
- 17) Rarey M., et al. fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. J. Mol. Biol. 1996, 261, 470–489.
 - 18) Kramer B., Rarey M., Lengauer T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. Proteins. 1999, 37, 228–241.
 - 19) Jones G., et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. J. Mol. Biol. 1997, 267, 727–748.
 - 20) Chen L. et al. From laptop to benchtop to bedside: structure-based drug design on protein targets. Curr. Pharm. Des. 2012, 18, 1217–1239.
 - 21) Gohlke H. & Klebe G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2002, 41, 2644–2676.
 - 22) Lamb M.L. & Jorgensen W. L. Computational approaches to molecular recognition. Curr. Opin. Chem. Biol. 1997, 1, 449–457.
 - 23) Hansch C., Fujita T, p - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. J. Am. Chem. Soc. 1964, 86, 1616-1626.
 - 24) Cramer R.D., Patterson D.E., Bunce J.D., Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5959-5967.
 - 25) Ehrlich P., Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. Dtsch. Chem. Ges. 1909 42, 17.
 - 26) Gund, P., Three-dimensional pharmacophoric pattern searching. Prog. Mol. Subcell. Biol. 1977, 5, 117-143.
 - 27) World Health Organization
 - 28)
 - 29) Lockman J.W., Hamilton A. D., Recent developments in the identification of chemotherapeutics for Chagas disease. Curr. Med. Chem. 2005, 12, 945–959.
 - 30) Schmunis G.A., Yadon Z.E., Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta. Trop. 2010, 115, 14-21.
 - 31) Roellig D.M., et al. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates. United States. Emerg. Infect. Dis. 2008, 14, 1123–1125.
 - 32) Marcet P.L. et al. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. Parasitology. 2006, 132, 57–65.
 - 33) Rassi A. Jr, Rassi A., Marin-Neto J.A., Chagas disease. Lancet. 2010, 375, 1388–1402.
 - 34) Chagas C., Nova trypanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.

Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 1909, 1, 159–218.

35) Kirchhoff L.V., American trypanosomiasis (Chagas' disease). Gastroenterol Clin. North. Am. 1996, 25, 517-533.

36) Rossi M.A., Bestetti R.B., The challenge of chagasic cardiomyopathy. Cardiology. 1995, 86, 1-7.

37) Hugo V.D.B., Chemotherapy for parasitic infections. Nature. 1978, 273, 626-630.

38) Linares G.E.G., Ravaschino E. L., Rodriguez J.B., Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. Curr. Med. Chem. 2006, 13, 335-360.

39) Jensen K.F., Björnberg O., Evolutionary and functional families of dihydroorotate dehydrogenases. Paths Pyrimidines. 1998, 6, 20-28.

40) Liu S, et al. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. Structure. 2000, 8, 25–33.

41) Annoura T., et al. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. J. Mol. Evol. 2005, 60, 113-127.

42) Davies M., et al. Structure-based design, synthesis, and characterization of inhibitors of human and *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenases. J. Med. Chem. 2009, 52, 2683-2693.

43) Davis J.P., et al. The immunosuppressive metabolite of leflunomide is a potent inhibitor of human dihydroorotate dehydrogenase. Biochemistry. 1996, 35, 1270-1273.

44) Coteron J.M., et al. Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. J. Med. Chem. 2011, 54, 5540-5561.

45) Phillips M.A., Rathod P.K., Plasmodium dihydroorotate dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. Infect Disord Drug Targets. 2011, 10, 226-239.

46) Copeland RA, Marcinkeviciene J, Haque TS, Kopcho LM, Jiang W, Wang K, et al. *Helicobacter pylori*-selective antibacterials based on inhibition of pyrimidine biosynthesis. J Biol Chem. 2000;275: 33373-33378.

47) Diao Y., et al. Discovery of Diverse Human Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors as Immunosuppressive Agents by Structure-Based Virtual Screening. J. Med. Chem. 2012, 55, 8341-8349.

48) Marwaha A., et al. Bioisosteric Transformations and Permutations in the Triazolopyrimidine Scaffold To Identify the Minimum Pharmacophore Required for Inhibitory Activity against *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase. J. Med. Chem. 2012, 55, 7425-7436.

49) Inaoka D.K., et al. Structures of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of

- dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry*. 2008, 47, 10881-10891.
- 50) Sergey K., et al. The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nature Structural Biology*. 2001, 9, 27-31.
- 51) Wu M., et al. Structure and mechanism of spermidine synthases. *Biochemistry*. 2007, 46, 8331-8339.
- 52) Anthony E.P., et al. *Polyamines-Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media LLC, New York. 2011, 3-35.
- 53) Pendeville H., et al. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol. Cell Biol*. 2001, 21, 6549-6558.
- 54) Nishimura K., et al. Essential role of S-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development. *Genes Cells*. 2002, 7, 41-47.
- 55) Gerner E.W., Meyskens F. L., Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer*. 2004, 4, 781-792.
- 56) Janne J., et al. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur. J. Biochem*. 2004, 271, 877-894.
- 57) Ariyanayagam M. R., et al. Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *Biochem. J*. 2005, 391, 425-432.
- 58) Huynh T.T., et al. Gene knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by RNAi in the parasitic protozoa *Trypanosoma brucei* demonstrates that it is an essential enzyme. *J. Biol. Chem*. 2003, 278, 39794-39800.
- 59) Krieger S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol*. 2000, 35, 542-552.
- 60) Li F., et al. *Trypanosoma brucei brucei*: characterization of an ODC null bloodstream form mutant and the action of alpha-difluoromethylornithine. *Exp. Parasitol*. 1998, 88, 255-257.
- 61) Taylor M.C., et al. Validation of spermidine synthase as a drug target in African trypanosomes. *Biochem. J*. 2008, 409, 563-569.
- 62) Willert E.K. & Phillips M.A. Regulated expression of an essential allosteric activator of polyamine biosynthesis in African trypanosomes. *PLoS Pathog*. 2008, 4, e1000183, doi:10.1371/journal.ppat.1000183.
- 63) Amano Y. et al. Structural insights into novel inhibition mechanism of *Trypanosoma cruzi* spermidine synthase. *Acta. Crystallogr. D: Biol. Crystallogr*. 2015 D71, 1879-1889.
- 64) Allinger N.L.J., Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *Am. Chem. Soc*. 1977, 99, 8127-8134.
- 65) Allinger N.L.J., Yuh Y.H., Lii J.H., Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc*. 1989, 111, 8551-8566.
- 66) Wendy D.C., et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic

Acids, and Organic Molecules. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 5179–5197.

67) Kitaura K, et al. Pair interaction molecular orbital method: an approximate computational method for molecular interactions. Chem. Phys. Lett. 1999, 312, 319–324.

68) Tomonaga O., Kosuke O., CH/ π hydrogen bonds determine the selectivity of the Src homology 2 domain to tyrosine phosphotyrosyl peptides: an *ab initio* fragment molecular orbital study. Journal of Computational Chemistry. 2008, 29, 2656–2666.

69) Tomonaga O., et al. The importance of CH/ π hydrogen bonds in rational drug design: an *ab initio* fragment molecular orbital study to leukocyte-specific protein tyrosine (LCK) kinase. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2008, 16, 10311–10318.

70) Tomonaga O., Kosuke O., Kazuo K., CH/ π hydrogen bonds play a role in ligand recognition and equilibrium between active and inactive states of the β_2 adrenergic receptor: An *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) study. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2011, 19, 5231–5237.

71) Tomonaga O., Kosuke O., Kazuo K., Importance of CH/ π hydrogen bonds in recognition of the core motif in proline-recognition domains: an *ab initio* fragment molecular orbital study. Journal of Computational Chemistry. 2011, 32, 2774–2782.

72) Kenichi F, Yoshimasa S., The role of fluorine atoms in a fluorinated prostaglandin agonist. Chem. Med. Chem. 2010, 5, 1254–1257.

73) Ohno K., et al. Computational insights into binding of bisphosphates to farnesyl pyrophosphate synthase. Current Medicinal Chemistry. 2011, 8, 220–233.

74) Osamu I, et al. Compound design by fragment linking. Molecular Informatics. 2011, 30, 298–306.

75) Michael P.M., et al. Prediction of cyclin dependent kinase 2 inhibitor potency using the fragment molecular orbital method. Journal of Cheminformatics. 2011, 3, 2.

76) David A.C., et al. Amber 11. San Francisco. 2010.

77) Michael W.S., et al. General atomic and molecular electronic structure system. J. Comput. Chem. 1993, 14, 1347–1363.

78) <http://www1.bbiq.jp/zzzfelis/Facio.html>

79) Dixon S.L., et al. PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. J. Comput. Aided Mol. Des. 2006, 20, 647–671.

80) Banks, J. L. et al. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). J. Comput. Chem. 2005, 26, 1752–1780.

謝辞

本研究の機会をお与えいただき、終始ご懇切なご指導とご配慮賜りました、東京大学の清水謙多郎教授、東京工業大学の関嶋政和准教授に深く感謝申し上げます。

諸々のご助言とご指導いただきました、東京大学の寺田透准教授、中村周吾准教授、角越和也助教。東京工業大学の秋山泰教授、石田貴士准教授、大上雅史助教に厚く御礼申し上げます。

本研究において、多くのご支援をいただいた東京工業大学関嶋研究室の安尾信明さんに深く感謝致します。

本研究に有形無形のご指導とご声援をいただきました、東京大学の生物情報工学研究室、東京工業大学の関嶋研究室、秋山研究室、石田研究室内の学生の方々並びに諸先輩方に感謝申し上げます。

付録 オロト酸誘導体の相互作用解析結果

第四章第二節で述べたオロト酸誘導体の相互作用解析結果の詳細を付録に記載する

