

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 26 年度博士課程入学
氏 名 吉野 龍ノ介
指導教員名 清水 謙多郎

論文題目 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

【序論】

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。そのため研究期間や開発費の削減のための研究手法として、コンピューターを用いた手法が注目を集めていった。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 線結晶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。

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。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ー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と標的タンパク質の複合体構造を出力する。

一方、LBDD の代表的な手法の一つとして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、「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。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立体配座を発生させ、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。しかしながら、化合物の三次元構造の重ね合わせは、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、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。

【研究目的】

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ジヒドロオロト酸脱水素酵素 (dihydroorotate dehydrogenase: DHODH)の生成物であるオロト酸と、阻害活性が認められた 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う。

【研究手法】

FMO 法は、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。FMO 法による相互作用エネルギー計算を DHODH とオロト酸、及び 43 種のオロト酸誘導体の複合体構造に対して実行し、DHODH と各化合物間の相互作用エネルギー解析を行った。FMO 法の計算は、量子化学計算ソフトウェアである GAMESS を用いて行い、計算方法と基底関数は MP2/6-31G レベルで行った。本研究では、相互作用解析の結果が 8 割以上の化合物で -5.00 kcal/mol よりも低い相互作用エネルギーを有する部位、および相互作用をしている化合物数は 8 割以下だが、-10kcal/mol よりも低い相互作用エネルギーを有する部位も同様にファーマコフォアと定義した。

【結果と考察】

まず初めに、DHODH の生成物であるオロト酸の相互作用解析を行った。図 1 の右側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

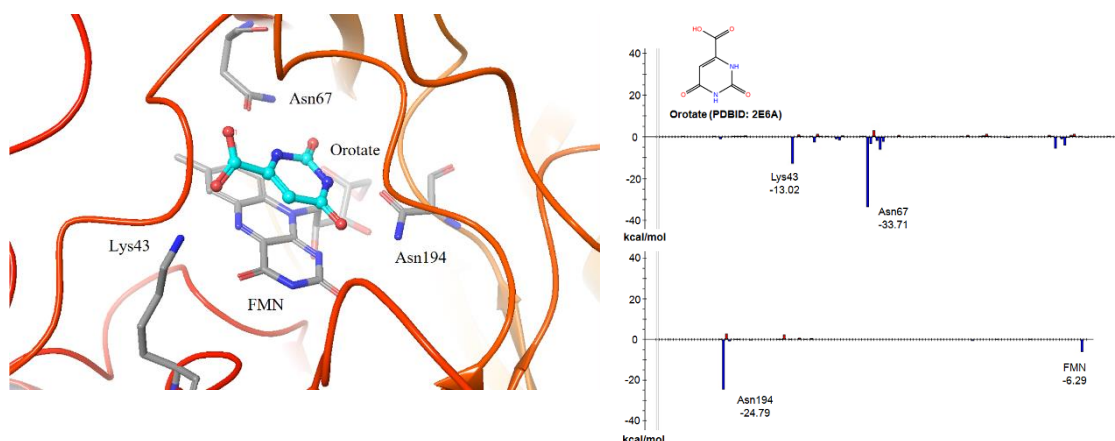


図1 オロト酸の結合様式とオロト酸-DHODH 間の相互作用解析結果(PDBID: 2E6A)
(左: DHODH-オロト酸の複合体構造、右: FMO 法によるオロト酸-DHODH 間の相互作用解析結果)

つずつ、補因子である FMN とは Pi スタッキングを形成していると予測される。図 1 の右側にオロト酸の 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。図 1 の結果から、オロト酸は結合様式から予測される相互作用が予測される Lys43、Asn67、Asn194、FMN と相互作用し、相互作用エネルギーの値はそれぞれ-13.02、-33.71、-24.79、-7.26 kcal/mol であった。

次に阻害活性が認められたオロト酸誘導体と DHODH 間の相互作用解析結果について述べる。43 種の誘導体の一例として、誘導体 27 の結合様式を図 2 に示す。誘導体 27 のオロト酸部分は、前節で述べたオロト酸と同様に 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。次に誘導体 27 の相互作用結果を図 3 左に示す。誘導体 27 でもオロト酸と同様に Lys43、Asn67、Asn194、FMN との相互作用が確認される。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 以下の値で確認された。これらの相互作用解析の結果からモデリングしたファーマコフォアを図 3 右に示す。相互作用解析を行った結果、オロト酸とすべての誘導体で Lys43 との塩橋、Asn67 と Asn194 との水素結合、FMN との Pi スタッキングが共通して確認された。さらに、一部の誘導体と 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。この Lys214 との相互作用部位に定義されたファーマコフォアは、従来手法では定義できず、FMO 法による相互作用解析によって初めて定義されたファーマコフォアといえる。

【まとめと今後の展望】

本研究では、FMO 法による相互作用解析によってオロト酸及び 43 種の誘導体に共通した相互作用を発見できた。さらに、一部の化合物にしかあらわれない Lys214 との相互作用も確認し、ファーマコフォアとして定義した。阻害剤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ため、本研究に用いた FMO 法による相互作用解析は有用な一例となる。今後の展望としては、FMO 法は相互作用エネルギーの値を精度よく見積もることができるため、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。

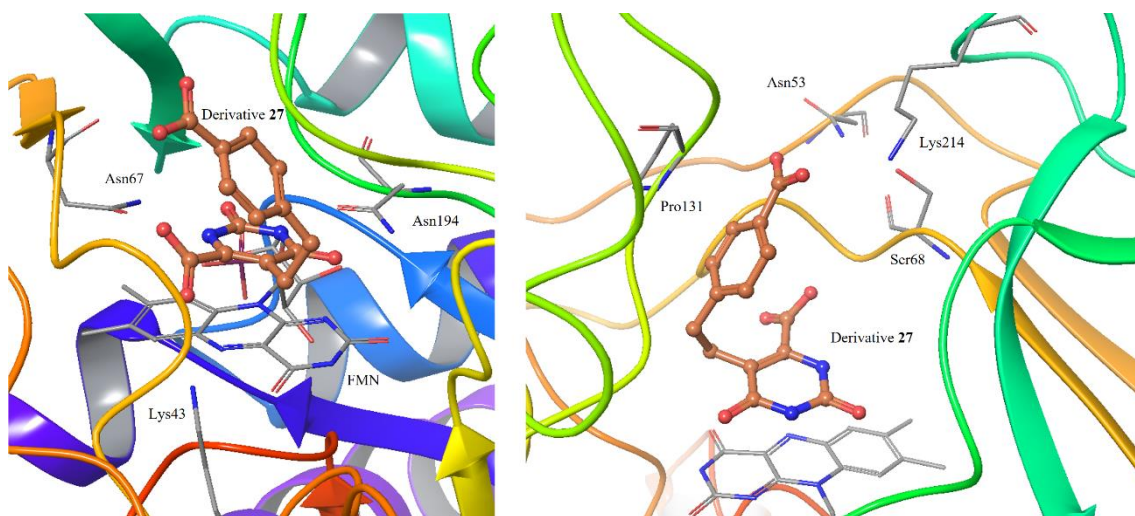


図 2. オロト酸誘導体の結合様式(左: オロト酸骨格周辺、右: 導入された官能基周辺)

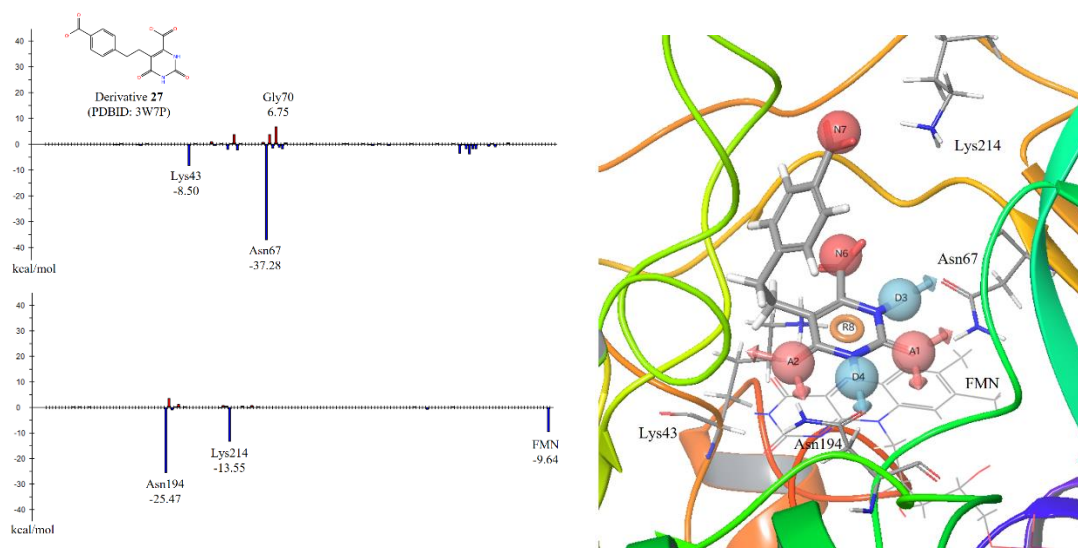


図 3. オロト酸誘導体の相互作用結果、及び FMO 法によりモデリングされたファーマコフォア(左: 誘導体 27 の相互作用解析、右: FMO 法による相互作用解析によってモデリングされたファーマコフォア(D: 水素結合供与対、A: 水素結合受容体、N: 負電荷、R: 芳香環))