



構造活性相関部会・ニューズレター <1 April, 2014>

SAR News No.26

「目次」

//// Perspective/Retrospective ////

QSAR ー半世紀を超えてー 赤松 美紀 … 2

//// Cutting Edge ////

SBDD と Classical QSAR によるドラッグデザイン
経口ヌクレオシド系抗悪性腫瘍薬の開発 多田 幸雄 … 9

//// SAR Presentation Award ////

2013 年度選考結果について … 1 7
受賞コメント … 1 8
受賞講演要旨 … 1 9

//// Activities ////

<報告>

第 41 回構造活性相関シンポジウム開催報告 岡田 孝 … 2 6

<会告>

構造活性フォーラム 2014 「困難化する医薬品開発の現状と将来」 … 2 7
第 1 回 QSAR 解析ハンズオンセミナー … 2 8
第 42 回構造活性相関シンポジウム … 2 9

部会役員人事 … 3 0

///// Perspective/Retrospective /////

QSAR –半世紀を超えて–

 京都大学大学院農学研究科 赤松美紀

1. はじめに

2012年8月25日にHansch-藤田法50周年記念シンポジウムが京都で開催された。一口にQSAR（定量的構造活性相関）といっても、現在ではさまざまな手法が開発され、Hansch-藤田法はclassical QSARと呼ばれている。Classical QSARに関する最初の論文、*Nature* 誌の「Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients」の発表が1962年で¹⁾、2012年がちょうど50周年であった。Yvonne Martin博士がclassical QSAR 50周年を記念してレビューを書かれているので、参考にしてほしい²⁾。このレビューによると、MEDLINE 検索を行ったところ、2010年1月1日～2011年8月1日の間に131報のQSARについての論文が発表されたということである。これらの論文にはclassical QSARだけでなく三次元QSARなどの論文も含まれているが、半世紀経った今もQSAR手法の重要性を示していると言える。

また、1964年に発表された*J. Am. Chem. Soc. (JACS)* の2つの論文、「A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients」³⁾、「 ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure」⁴⁾は、引用回数の多い論文としてCitation Classicにも取り上げられている。これらの論文は、アメリカ化学会125周年を記念して引用回数の多い論文125報のランキングが行われた時に39位と44位にランクインしており、classical QSARの手法を世界に広めるきっかけになったと考えられる。1964年を基準にすると、今年がちょうど50周年ということになる。

今年、9月に構造活性相関部会の主催で、QSARハンズオンセミナーが開催される。本セミナーは第1回目ということから、内容の一つとしてclassical QSARが取り上げられることとなった。本稿では、classical QSARの原点と言える植物ホルモンであるオーキシンのQSAR、および京都大学大学院農学研究科、中川・宮川らのグループが研究を行っているブラシノステロイドの構造活性相関を例に挙げ、構造活性相関とリガンド-受容体相互作用について考えるとともに、QSARの今後について述べる。

2. 植物生長ホルモン、オーキシンのQSAR**オーキシンのclassical QSAR**

Classical QSARの始まりは、置換phenoxyacetic acid類や置換benzoic acid類など植物生長ホルモンの一群であるオーキシンの構造活性研究であった。天然のオーキシンの一つにindole-3-acetic acid (IAA)があり、オーキシン様活性を示す2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)が除草剤として開発されている(図1)。オーキシンの構造活性相関研究の詳細はclassical QSARの創始者である京都大学名誉教授、藤田稔夫先生の論文^{5,6)}に詳しく書かれているので、それらを参照していただきたいが、その一端をここで紹介する。

Classical QSARのもう一人の創始者であるアメリカ合衆国ポモナ大学名誉教授の故Corwin Hansch先生とその共同研究者は、1940年代後期からphenoxyacetic acid類の構造活性相関研究を行っていた。彼らは、1951年にそれらの化合物が活性を示すためには、側鎖上にCOOH基が存在するとともに、ベンゼン環のオルト位(図1の2,6位)の一方は

置換されていないことが必要で、これら二種の構造要素がともに植物受容体と反応することが活性の発現に必須であるという仮説(二点接触説)を提唱した⁷⁾。すなわち、COOH基が受容体の塩基性基と反応し、次にそのオルト位が受容体の求核性基、例えば Cys 側鎖 SH などの攻撃を受けるといふ仮説である。1962 年の *Nature* 誌に、無置換、3-位、4-位置換 phenoxyacetic acid 類の植物生長ホルモン活性について、藤田先生、Hansch 先生らによる最初の QSAR 式が報告され¹⁾、その後、1963 年の *JACS* に、その改良式(1)が掲載された⁸⁾。

$$\log(1/C) = -1.97 \pi^2 + 3.24 \pi + 1.86 \sigma + 4.16 \quad (1)$$

$$n = 21, s = 0.484, r^2 = 0.776, \pi_{opt} = 0.82$$

解析に使用された化合物は以下の通りである。

phenoxyacetic acid (無置換)

置換基: 3 位-Halogen, Me, Et, *n*Pr, CF₃, NO₂, OMe, COMe, CN, SMe, SCF₃, SF₆, SO₂Me
4 位-F, Cl, OMe

2-naphthoxyacetic acid

ここで、*C* はエンバク子葉鞘切片の生長を一定程度促進するために必要な化合物のモル濃度である。活性の測定は pH 5.6~6.0 で行われており⁹⁾、無置換 phenoxyacetic acid の p*K*_a が約 3 であることから、測定条件では phenoxyacetic acid 類はほぼ完全に解離していると考えられる。 σ は置換基の Hammett の σ 定数で¹⁰⁾、 σ 値が大きいほど置換基は電子求引性である。 σ には電子効果のうち、誘起効果および共鳴効果成分が含まれるため、同じ置換基でもメタ位とパラ位では σ 値が異なる。ただし、オルト位が求核性成分の攻撃を受けるといふ二点接触説に基づいて、(1) 式で、 σ 値には 3-位置換基に対して σ_{para} 値が、4-位置換基に対して σ_{meta} 値が用いられている。また、 π は置換基の疎水性を表し、置換分子および無置換分子の、1-オクタノール/水系の分配係数の対数 $\log P$ から計算される¹¹⁾。 σ の係数が正であることから、電子求引性置換基が活性にとって有利であり、このことは受容体求核性成分の攻撃仮説を支持すると考えられた。また、置換基の疎水性には最適値 π_{opt} が存在することも推察できる。

その後、二点接触説について多くの支持あるいは反対意見が表明され、Hansch 先生は 1995 年の著書¹¹⁾で、式 (1) を式 (2) に訂正された(同書 (12-3) 式)。

$$\log(1/C) = 1.25 \pi + 0.97 \sigma_{meta} + 0.95 L - 5.54 \log(\beta 10^L + 1) + 1.39 \quad (2)$$

$$n = 19, s = 0.242, r^2 = 0.951, L_{opt} = 3.75$$

式 (2) は 3-位置換体しか含んでおらず、3-位置換基に対して σ_{meta} を用いることによって、置換基の電子的効果はオルト位 (2-位) ではなく、1-位の -OCH₂COOH に対して作用することになる。*L* は STERIMOL パラメーター¹²⁾で置換基の結合軸方向の長さを表す。*L* に対して Kubinyi の bilinear model¹³⁾が適用され、 $\log(\beta 10^L + 1)$ 項が有意であって、*L* に最適値 3.75 の存在することが示された。*L* 値は Cl 基: 3.52、Br 基: 3.82 である。(2) 式から、phenoxyacetic acid の 3-位置換基が、Cl 基程度の大きさで、疎水性が高く、電子求引性であるほど活性が高いことになる。

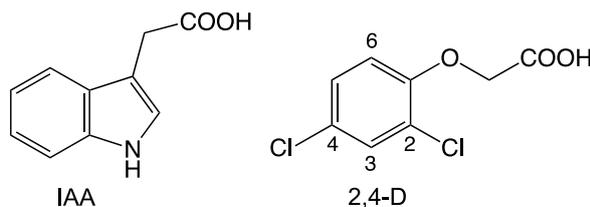


図1 IAA および 2,4-D の構造

オーキシン受容体の同定と三次元構造解明

2005年に、遺伝子発現調節に関わるオーキシン受容体が同定された^{14,15}。オーキシンは種々のオーキシン活性の発現に係わる応答遺伝子の転写に対し、抑制的に働いている Aux/IAA タンパク質の分解を促進する因子と捉えることができる。抑制タンパク質の分解には ubiquitin–ligase 複合体 SCF^{TIR1} が関与するが、オーキシンはこの複合体の構成要素である、数種の F-box タンパク質のうちの一つ TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) タンパク質と結合する。その結果、SCF^{TIR1}–オーキシン複合体が抑制タンパク質 Aux/IAA タンパク質と結合できるようになり、それが引き金となって Aux/IAA タンパク質の分解が 26S プロテアソームにより引き起こされることがわかった。すなわち、オーキシンシグナル伝達経路で重要な役割を持つ TIR1 が IAA および 2,4-D などの直接の受容体である。

また、その2年後に TIR1 の結晶構造が報告された¹⁶。2007年に報告された結晶構造は TIR1 とオーキシン、および Aux/IAA タンパク質の一部を構成する 13 残基のペプチドとの複合体であった (PDB: 2P1N)。図2に除草剤 2,4-D の結合した複合体の結晶構造を示す。天然のオーキシン IAA の結合様式もほぼ同じであった。この結晶構造から、オーキシンは受容体 TIR1 のリガンド結合ポケットの基部に結合すること、Aux/IAA タンパク質は結合したオーキシンの芳香環部分に結合してポケットの残りの部分をふさぐことが明らかとなった。すなわち、IAA などのオーキシンは、タンパク質同士の境界面に存在する疎水性の空洞を埋める、いわば、両タンパク質の「接着剤」として働き、TIR1 と Aux/IAA タンパク質の相互作用を促進する働きをしている。

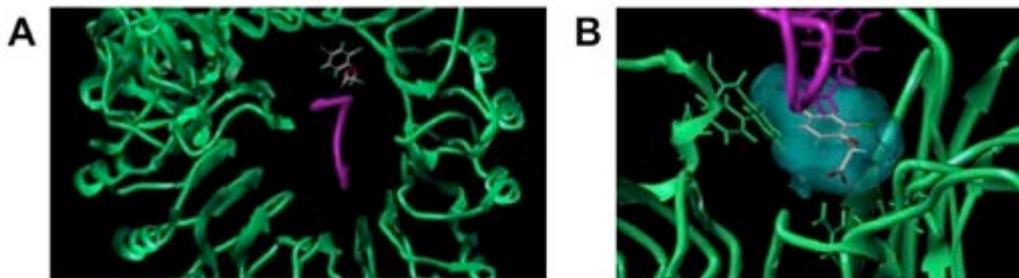


図2 TIR1-2,4-D-Aux/IAA タンパク質ペプチド複合体の結晶構造

A: 全体 (上から見た図) B: オーキシン結合部位の構造

Greenblue: TIR1 Magenta: Aux/IAA タンパク質ペプチド Cyan: 結合部位の空間境界面に結合した分子: 2,4-D

オーキシン受容体複合体の構造と QSAR

2,4-D-受容体の結晶構造から、以下のことがわかった。

- (1) 2,4-D の COO⁻基はベンゼン環平面から約 60° で立ち上がっており、TIR1 受容体の塩基性残基 Arg403 と相互作用している。また、直接相互作用はしていないが、His78、Arg436 も COO⁻基の近傍に存在する。
- (2) 2,4-D のベンゼン環は TIR1 受容体の Phe79、Phe82、Phe380 に取り囲まれており、それらと CH-π や π-π相互作用をしている。
- (3) 2,4-D 結合部位にはそれほど広がりはないが、ベンゼン環のいずれの置換位置にも、Cl 程度の置換基を導入しても許容されるスペースがある。

- (4) 2,4-D のベンゼン環置換基 Cl 基の周囲に Leu406、Val463 等の疎水性残基が存在し、Cl 基と疎水性相互作用をしている。
- (5) 2,4-D のベンゼン環は、Aux/IAA タンパク質の一部を構成するペプチドの Pro、Trp 残基と CH- π 相互作用している。

これらの結果は、QSAR 式 (2) の結果と矛盾しない。しかし、置換基の σ (電子求引性) の意味は結晶構造からは説明できない。COO⁻基が Arg403 と相互作用しているならば、アニオンの電子密度が高いほど、すなわち置換基が電子供与性であるほど受容体との結合には有利なことになり、QSAR 式とは逆である。(5) で述べた CH- π 相互作用に対して、2,4-D のベンゼン環の π 電子が不足している方が有利であるとも考えにくい。また、2,4-D の 2-Cl の近傍に、二点接触説で考えられた Cys 残基が存在するが、距離から見てこの Cys がベンゼン環 6 位に求核攻撃するとは考えられない。結晶構造では、TIR1-オーキシン複合体に結合している Aux/IAA タンパク質が完全な構造ではなく、結合部位のみのペプチドであるため、実際のオーキシン-Aux/IAA タンパク質の相互作用が見落とされている可能性はある。あるいは、受容体との相互作用ではなく、置換基が電子求引性であるほど酸としては強くなるので、化合物がアニオンになりやすいことが活性に影響しているのかもしれない。ベンゼン環置換基の電子求引性が phenoxycetic acid 類の代謝されやすさに効いている可能性もある。いずれにしても、 σ の意味については、TIR1-オーキシン-Aux/IAA タンパク質の完全な複合体の結晶構造が報告されるか、あるいはオーキシンの作用について新たな知見が得られるまで、待たなければならない。

3. 植物ホルモン、ブラシノステロイドの構造活性相関と受容体構造

Brassinolide (BL, 図 3) は植物界に普遍的に存在し、細胞生長促進、細胞分裂促進、維管束分化の促進、ストレス耐性の向上などの活性を示す植物ホルモンである^{17,18)}。さまざまな植物から、BL 様活性を示す化合物が同定されており、これらは総称してブラシノステロイドと呼ばれている。また、多くの類縁体が合成され、構造活性相関研究が行われてきた。活性評価には、主にイネ葉身屈曲試験 (ラミナジョイント法) が用いられた。イネの実生の第二葉身基部にブラシノステロイドを投与すると、イネ葉身の特異的な屈曲が見られ、その屈曲角度を測定して活性を評価する方法である。中川・宮川らはブラシノステロイドの側鎖に注目した構造活性相関研究を行い、側鎖の自由度が高いほど、活性が低下すると報告している^{19,20)}。ブラシノステロイドの classical QSAR は報告されていないが、定性的構造活性相関から、高活性に必要な構造は以下の通りであった¹⁹⁻²¹⁾。

- 1) ステロイド A 環置換基 2 α -, 3 α -OH、2) A 環と B 環が trans 結合していること、3) B 環の 6-keto あるいは 7-oxa-6-keto 構造、4) 側鎖 22-, 23-OH、5) 24-Me あるいは Et 基

受容体は膜タンパク質であることから、長い間その立体構造は明らかにされなかったが、2011 年にブラシノステロイド受容体 Brassinosteroid Insensitive 1 (BRI1) と BL の複合体の X 線結晶構造が解明され、2 つの研究グループによってほぼ同時期に *Nature* 誌に発表された^{22,23)}。BRI1 受容体は 25 個のねじれた leucine-rich repeats (LRR) からなるスーパーヘリックス構造を持ち、LRR21 と 22 の間にある 70 残基 (584-654) の island domain は、スーパーヘリックスの内部に戻るように折りたたまれ、BL を結合する表面ポケットを形成していた。

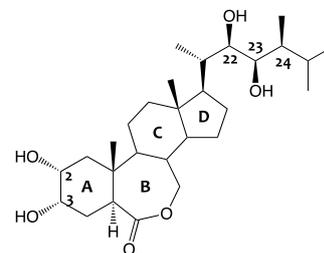


図 3 Brassinolide の構造

表面ポケットは浅いため、BLのA環とB環がtrans結合した比較的flatなステロイド構造が受容体との結合に有利であった。B環の6-keto基はTyr642の側鎖OH基と水素結合できる距離にあった。側鎖22-OH、23-OHは、いずれも直接あるいは水分子を介して、受容体と水素結合していた。BLの24-Me基および*i*-Pr基の側鎖末端部分はTrp564、Ile592、Tyr597、Leu615などの疎水性残基に取り囲まれており、それらの残基と疎水性相互作用していた。すなわち、構造活性相関から得られた情報のほとんどがリガンド-受容体の結晶構造からの情報と一致することがわかった。しかし、A環置換基2 α -, 3 α -OHはいずれも溶媒中に露出しており、受容体との相互作用に関与しないことが示唆され、これら水酸基の重要性を指摘した構造活性相関結果とは矛盾していた。

ところが、2013年に、BRI1のco-receptorであるSomatic Embryogenesis Receptor-like Kinase1 (SERK1)がBLを介してBRI1と相互作用していることが、BRI1-SERK1-BL複合体の結晶構造解析によって明らかにされた(PDB: 4LSX、図4)²⁴⁾。この結晶構造において、BRI1とBLの結合様式は2011年に報告された結晶構造とほぼ同様であったが、BLのA環置換基2 α -, 3 α -OHはSERK1のN末端ドメインに存在するHis62の骨格NHおよび側鎖と水素結合していることがわかった。さらに、SERK1のPhe61側鎖はBLのステロイド骨格C環とスタッキングしていることも明らかとなった。

ここで言いたいことは、もし、リガンド側から得られた構造活性相関情報を考慮に入れずに2011年の最初のリガンド-受容体複合体結晶構造のみを見ていたとすれば、BLのステロイドA環置換基2 α -, 3 α -OHの活性に対する重要性を見落としてしまうということである。実は、2 α -, 3 α -OHの役割は、BRI1-SERK1-BL複合体構造の報告²⁴⁾直前に発表された構造活性相関の論文²⁵⁾で推測されていた。この論文では、BLの溶媒に露出した表面は、BRI1シグナリングに必須である別の因子との相互作用に関わるのではないかという観点から、BLの2 α -, 3 α -OHを修飾すればアンタゴニストとして作用し、ブラシノステロイドのシグナルが阻害されると考えた。そして、2 α -, 3 α -OH基がアセトニド基で同時に保護された類縁体を合成した。アセトニド型の化合物はBRI1のアゴニストではなかったが、BLによる活性を濃度依存的に阻害し、予想通りBRI1アンタゴニストとして作用することがわかった。

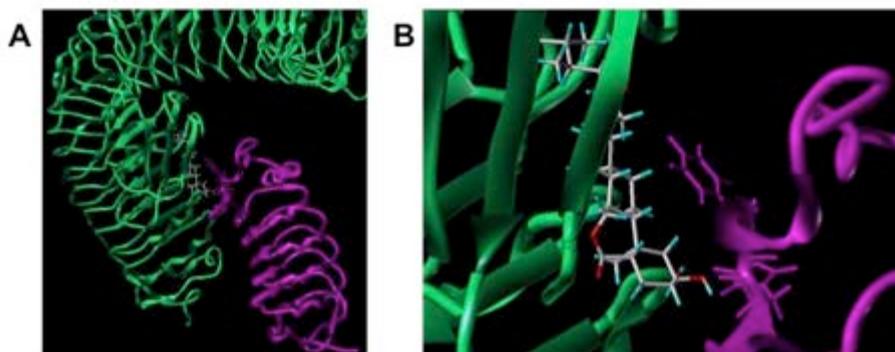


図4 BRI1-SERK1-BL複合体の結晶構造

A: 全体 B: BL結合部位の構造

Greenblue: BRI1 Magenta: SERK1 境界面に結合した分子: BL

4. おわりに

以上、2種類の植物ホルモンの構造活性相関および受容体との複合体結晶構造について述べた。受容体はいずれも非常に興味深い構造をしており、ドラッグデザインに対す

る発想を豊かにしてくれる。しかし、ここで述べてきたように、リガンド側から得られた構造活性相関情報をおろそかにしてはならない。Phenoxyacetic acid 類の QSAR 式に含まれる σ 項のように、リガンド-受容体複合体では説明できないように思える情報にも、必ず何らかの意味があるはずである。Classical QSAR は低分子化合物とタンパク質の物理化学的、生物化学的相互作用を定量的にとらえるのに役立つ。Classical QSAR 式を導くのは、慣れないうちは難しいと思われるかもしれないが、できる限りトライしてみしてほしい。導かれた式は、多くの情報を私たちに伝えてくれる。

筆者は、近年、ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) の吸収、代謝、排泄に関する QSAR を試みている。吸収に関しては、良好な classical QSAR 式を導くことができる²⁶⁾。代謝および排泄については、classical QSAR だけでなく、ドッキングなどの方法論も取り入れて、cytochrome P450 代謝酵素や排泄トランスポーターの基質認識機構を予測することができないか、検討中である。冒頭でも述べたように、現在ではさまざまな QSAR 手法が存在しているが、classical QSAR はすべての QSAR の基礎であるばかりでなく、薬物動態およびリガンド-受容体相互作用を考える基礎となる。ドラッグデザインを行う研究者は、まず、classical QSAR を学んでいただきたい。その後でどのような方法論を採用するにしても、classical QSAR の考え方が、必ず役に立つはずである。なお、2013 年から 2014 年の日本農薬学会誌の実験技術講座、QSAR 編で classical QSAR について解説が行われているので、是非、そちらを参照していただきたい²⁷⁻³¹⁾。最新号以外の論文の pdf ファイルが学会ウェブサイト (<http://pssj2.jp/journal/jjps.html>) から入手可能である。

参考文献

- (1) C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, and R. M. Muir, *Nature*, **194**, 178-180 (1962).
- (2) Y. C. Martin, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2**, 435-442 (2012).
- (3) C. Hansch and T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1616-1626 (1964).
- (4) T. Fujita, J. Iwasa, and C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5175-5180 (1964).
- (5) T. Fujita, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **25**, 509-517 (2011).
- (6) 藤田稔夫, *日本農薬学会誌*, **37**, 206-214 (2012).
- (7) R. M. Muir and C. Hansch, *Plant Physiol.*, **26**, 369-374 (1951).
- (8) C. Hansch, R. M. Muir, T. Fujita, P. P. Maloney, F. Geiger, and M. Streich, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2817-2824 (1963).
- (9) R. M. Muir and C. Hansch, *Plant Physiol.*, **28**, 218-232 (1953).
- (10) J. E. Leffler and E. Grunwald, “レフラー 有機反応速度論”, 都野雄甫ほか訳, 廣川書店, pp. 163-246, 1968.
- (11) C. Hansch and A. Leo, “Exploring QSAR, Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology,” American Chemical Society, Washington DC, 1995 (“定量的構造活性相関: Hansch 法の基礎と応用”, 江崎俊之訳, 地人書館, 2014 年 3 月に刊行).
- (12) A. Verloop, W. Hoogenstraaten and J. Tipker, “Drug Design, Vol. VII,” ed. by E. J. Ariëns, Academic Press, New York, pp. 165-207, 1976.
- (13) H. Kubinyi, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, **29**, 1067-1080 (1979).
- (14) N. Dharmasiri, S. Dharmasiri, and M. Estelle, *Nature*, **435**, 441-445 (2005).
- (15) S. Kepinski and O. Leyser, *Nature*, **435**, 446-451 (2005).
- (16) X. Tan, L. I. A. Calderon-Villalobos, M. Sharon, C. Zheng, C. V. Robinson, M. Estelle, and N. Zheng, *Nature*, **446**, 640-645 (2007).
- (17) M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen, Jr., G. L. Steffens, J. L. Flippen-Anderson, and J. C. Cook, Jr., *Nature*, **281**, 216-217 (1979).

- (18) S. Fujioka, J. Li, Y. H. Choi, H. Seto, S. Takatsuto, T. Noguchi, T. Watanabe, H. Kuriyama, T. Yokota, J. Chory, and A. Sakurai, *Plant Cell*, **9**, 1951-1962 (1997).
- (19) S. Uesusuki, B. Watanabe, S. Yamamoto, J. Otsuki, Y. Nakagawa, and H. Miyagawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1097-1105 (2004).
- (20) S. Yamamoto, B. Watanabe, J. Otsuki, Y. Nakagawa, M. Akamatsu, and H. Miyagawa, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 1761-1770 (2006).
- (21) C. Brosa, Structure-activity relationship, In "Brassinosteroids," ed. by A. Sakurai, T. Yokota, and S. D. Clouse, Springer-Verlag, Tokyo, pp. 223-241, 1999.
- (22) M. Hothorn, Y. Belkhadir, M. Dreux, T. Dabi, J. P. Noel, I. A. Wilson, and J. Chory, *Nature*, **474**, 467-471 (2011).
- (23) J. She, Z. Han, T.-W. Kim, J. Wang, W. Cheng, J. Chang, S. Shi, J. Wang, M. Yang, Z.-Y. Wang, and J. Chai, *Nature*, **474**, 472-476 (2011).
- (24) J. Santiago, C. Henzler, and M. Hothorn, *Science*, **341**, 889-892 (2013).
- (25) T. Muto and Y. Todoroki, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 4413-4419 (2013).
- (26) M. Akamatsu, M. Fujikawa, K. Nakao, and R. Shimizu, *Chem. Biodivers.*, **6**, 1845-1866 (2009).
- (27) 藤田稔夫, *日本農薬学会誌*, **38**, 2-19 (2013).
- (28) 清水 良, *日本農薬学会誌*, **38**, 185-194 (2013).
- (29) 赤松美紀, *日本農薬学会誌*, **38**, 195-203 (2013).
- (30) 中川好秋, *日本農薬学会誌*, **39**, 18-31 (2014).
- (31) 加納健司, *日本農薬学会誌*, **39**, (2014), 執筆予定.

//// Cutting Edge ////

SBDD と Classical QSAR によるドラッグデザイン 経口ヌクレオシド系抗悪性腫瘍薬の開発

東京大学 創薬オープンイノベーションセンター 多田 幸雄

1. はじめに

1980年代後半から標的タンパクの立体構造に基づいた分子設計法: Structure-Based Drug Design (SBDD) が創薬現場で用いられ始め、今では一般的な創薬手法の一つとなっている。また SBDD に関する多くのソフトウェアの開発や化合物データベースの構築もなされている[1]。しかし、SBDD を実行する際、水分子を含めた精度の高い、標的タンパク-リガンド複合体の立体構造が得られない場合も少なくない。また、タンパク構造の変化や活性部位に存在する水分子の取り扱いなど、論理的な創薬を難しくする課題が少なからず残されている。とは言え、SBDD がドラッグデザインの論理性を高めたことは間違いない。

本稿では、SBDD と化合物の物理化学的性質を自由エネルギーパラメーターとする Classical QSAR 解析 (Hansch-Fujita 法)[2] を相補的に用いたドラッグデザインの例として、経口ヌクレオシド系抗悪性腫瘍薬の開発について述べたい。研究開始当初、標的タンパクの X 線結晶解析 (大腸菌) があつたことで SBDD を開始できたが、最後までデザインした化合物との共結晶は得られなかった。しかし、抗悪性腫瘍薬: TAS-102 として臨床試験に入った後、共結晶構造が報告された[3]。従って、開発時に想定した標的タンパクの活性構造、その反応機構、デザインした化合物、および活性部位における水分子の取り扱い方について考察を加えることができた。また、更なる活性向上の可能性として、活性部位に存在する不安定な一個の水分子についても触れたい。

2. 新規ヌクレオシド系抗悪性腫瘍剤の開発コンセプト

これまでに含フッ素核酸系代謝拮抗薬として、5-fluorouracil (5-FU)、5-fluorodeoxyuridine、および 5-fluorouridine に関しては数多くの研究がなされてきた。しかし、trifluorothymidine (F₃dThd) については、thymidylate synthase (TS) を阻害することで抗悪性腫瘍活性を発現することが 1964 年に報告されているにも関わらず、医薬としてあまり検討されてこなかった。

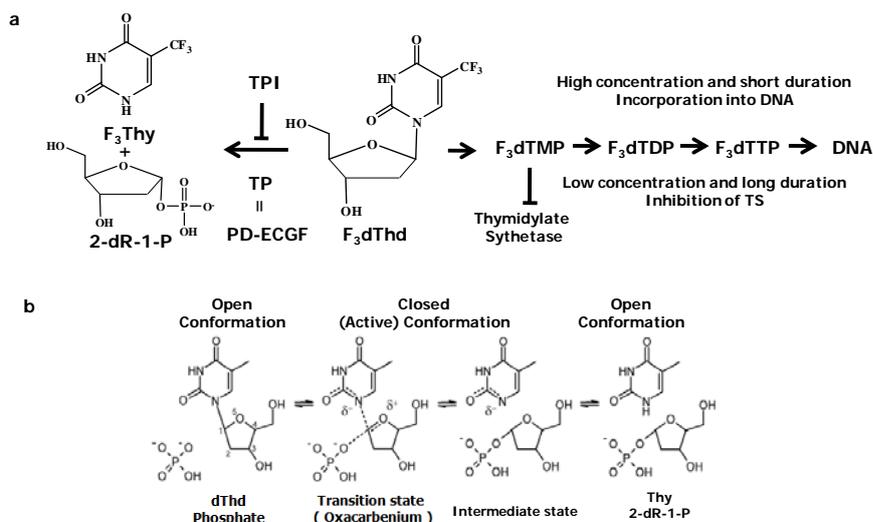


図 1 TPI の開発コンセプトと HTP の反応機構

図 1a に示した様に、 F_3dThd は癌細胞と低濃度、長時間接触において TS を阻害する一方、高濃度、短時間接触では DNA に取り込まれて抗悪性腫瘍効果を発現すると考えられている[4]。しかし、 F_3dThd は thymidine phosphorylase (TP) によって抗腫瘍効果のない trifluorothymine (F_3Thy) と 2-deoxyribose-1-phosphate(2-dR-1-P) に速やかに代謝される。従って、 F_3dThd の抗腫瘍効果を確保するには、この TP を阻害する thymidine phosphorylase inhibitor (TPI) が必要となる。

一方、TP は血管新生因子の一つである platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) と同一であり[5]、TPI には癌の転移浸潤に関わる血管新生を阻害するという、癌治療において好ましい作用も期待できる。そこで、 F_3dThd と TPI との併用による経口ヌクレオシド系抗悪性腫瘍薬の開発をすることにした。

3. TP の構造に基づく TPI デザインの考え方

TPI の開発を始めた 1993 年当時、唯一報告されていた大腸菌 TP と thymine との共結晶構造 (PDB code 1TPT : $C\alpha$ 座標のみ) をテンプレートとして、ヒト TP (HTP) のホモロジーモデルを作成した (図 2a,b)[6]。この HTP モデルは、リン酸イオンと thymine の間が 10 Å 以上離れた open conformation (図 2a: 緑) であった。尚、HTP の closed conformation モデル (図 2a: 青) は pyrimidine nucleoside phosphorylase (PDB code 1BRW) を基に作成した。

TP の反応機構としては、TP の open conformation にリン酸イオンと thymidine が結合し、closed conformation に移行し、遷移状態、中間体を経て thymine と 2-dR-1-P を生成する、2 基質 2 生成物反応の定序 Bi-Bi 機構 (Ordered Bi-Bi mechanism) と考えた (図 1b)。従って、この様な TP の大きな構造変化がある可能性を念頭においた化合物のデザインが必要であった。

図 2b において、thymine の 2 位 C=O 基、3 位 NH 基、4 位 C=O 基は各々、HTP の Lys-221、Ser-217、Arg-202 と水素結合を形成しており、この 3 本の水素結合がアンカーとなって、基質である thymidine を HTP の活性部位に繋ぎ止めていると考えられる。また、thymidine の $\log P$ は -1.94 であることから、HTP の活性部位は親水性の高い化合物にも親和性があると推定される。以上の情報から、thymine ($\log P = -0.6$) をシード化合物とした。仮にここで、最近では一般的に行われているような、化合物の分子量 300 Da 以下とするフラグメント化合物ライブラリーを用いたスクリーニング[7]を実行したとすると、分子量 126.1 である thymine がライブラリーに含まれていれば、当然ヒット化合物の一つになっただろうと推測される。

図 2c に GRID 解析[8]を用いて推定した、活性部位における疎水性基の存在が望ましい疎水性サイト (白の網目部分)、水素結合受容サイト (赤の網目部分) および水素結合供与サイト (青の網目部分) を示した。ここで、疎水性サイトに存在する不安定と考えられる水分子は、これから導入する置換基で容易に置き換えられると予測される。また実際に、参照した共結晶構造 (PDB code 1TPT) は、疎水性サイトに存在していたであろう不安定な水分子を、thymine 分子が排除した結果と解釈できる。さらに、興味深いこととして、疎水性サイトは thymine の N1 位の方向ではなく 6 位の方向に広がっている。従って、thymine への置換基導入は N1 位より 6 位の方が望ましいという示唆が得られた。

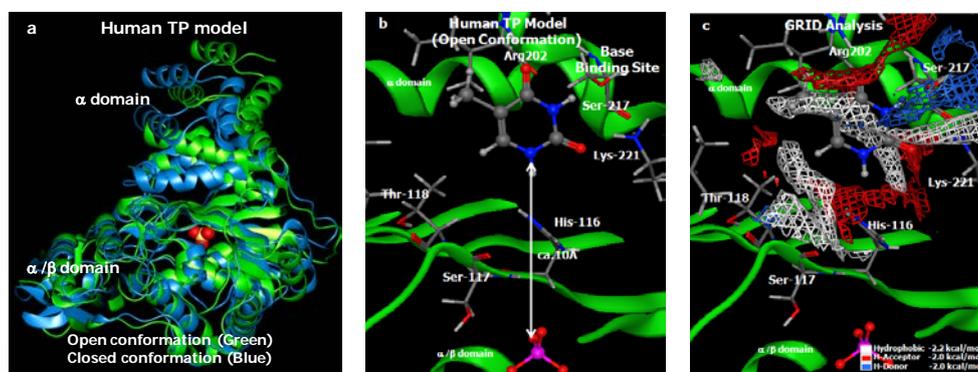


図 2 HTP のホモロジーモデルと GRID 解析

4. 疎水性ポケットに対応した thymine (4) の 5 位の CH₃ 基の最適化

より阻害活性の強いリード化合物を得る目的で、thymine (4) の 5 位 CH₃ 基を置換した誘導体を合成した。水素原子を基準に置換基の大きさの増加分 (ΔV) をパラメータとして、阻害活性 (IC_{50}) との相関を見ると、5-chlorouracil (3) の阻害活性が $IC_{50} = 0.1 \mu\text{M}$ と最も強く、thymine (4) ($IC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$) を含め、置換基が Cl 基より大きくなる程、阻害活性が弱くなった (表 1)。この構造活性相関から、thymine (4) の 5 位の方向には大きさに制限のある疎水性ポケットの存在が想定される。HTP モデルを見ると、この疎水性ポケットは Val-208、Ile-214、および、Val-241 の疎水性アミノ酸から構成されており、置換基の大きさとして Cl 基が丁度良く、これよりかなり大きい C₂H₅ 基や CF₃ 基では、Val-208 の側鎖との立体障害が原因で阻害活性が大きく低下したものと推定した (図 3)。そこで、5-chlorouracil (3) をリード化合物創製のためのアンカー化合物とした。

ところで、Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) では化合物の効力 (efficacy) より効率 (efficiency) が重視されているが、活性値を分子量で割った Binding efficiency index (BEI) = Activity (pKi, pKd, pIC₅₀) / Molecular Weight (kDa) はその指標の一つである [9]。BEI = 30 である化合物 (例えば、pIC₅₀ = 1.0 nM, MW = 300) のように BEI 値が大きい化合物では、分子の活性に関与しない余分な部分が少なく、これが特異性の高さに繋がるものと考えられる。特にリード化合物最適化の過程においては、活性の向上以上に、分子量が増加することで BEI 値が小さくなり易いので、できる限り BEI 値の大きい化合物をリード化合物とすることが望ましい。ここで、アンカー化合物に選定した 5-chlorouracil (3) は BEI = 47.9 と、非常に効率の良い化合物であった。

表 1 5 位置換 uracil 誘導体の物性と阻害活性

Compd	R	$\Delta V(\text{\AA}^3)$	$IC_{50}(\mu\text{M})$
1	H	-	76
2	F	5.4	26
3	Cl	13.9	0.1
4	CH ₃	16.9	1.8
5	Br	17.8	3.8
6	NO ₂	24.3	4.8
7	I	25.6	6.0
8	C ₂ H ₅	31.0	>100
9	CF ₃	32.4	>100

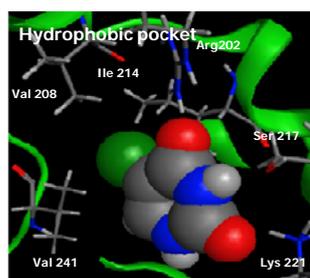
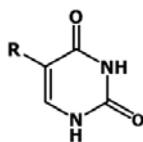


図 3 疎水性ポケット

5. アンカー化合物 (3) からリード化合物 (10) の創製

アンカー化合物 (3) に導入する置換基として、酸解離定数 (pKa) が大きく中性付近で陽イオン化する NH₂ 基を想定し、HTP の活性部位におけるアンモニウムイオン (NH₄⁺) が安定に存在できる場所を、真空中で分子力学計算 (MMFF94x 力場) を用いて探索した。その結果、アンモニウムイオンは Thr-118 と Ser-117 の C=O 基、およびリン酸イオンの近傍に安定に存在できると推定された (図 4a)。

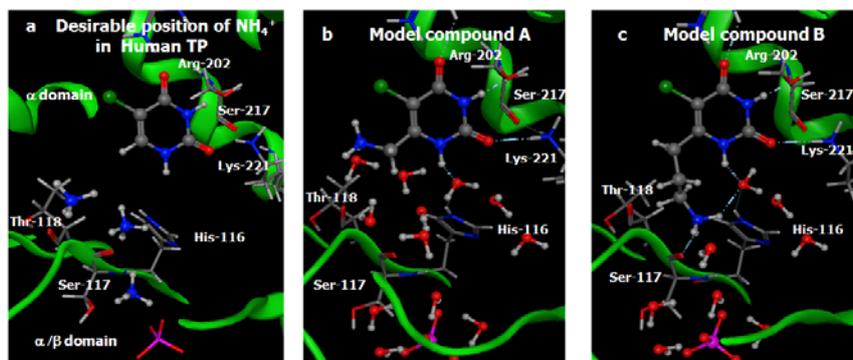


図 4 HTP (open conformation) の活性部位におけるアンモニウムイオンが安定に存在できる場所と、C6 位とアンモニウムイオンをメチレン鎖で繋いだモデル化合物 (A, B)

ここで、置換基導入は N1 位より C6 位の方が望ましいという GRID 解析 (図 2c) の結果ではあったが、念のためアンカー化合物 (3) の N1 位に $(\text{CH}_2)_n\text{-NH}_2$ ($n=2-8$) 基を導入した誘導体を合成した。N1 位と NH_2 基をつなぐメチレン鎖の長さは HTP の構造変化を考慮したものである。しかし、N1 位近傍の His-116 の立体障害のためか、全ての化合物において IC_{50} は 1 mM 以上であった。

従って、アンカー化合物 (3) への置換基導入は C6 位とした。そこで、図 4a に示した Thr-118 および Ser-117 のバックボーンの $\text{C}=\text{O}$ 基と水素結合を形成しているアンモニウムイオンと 6 位とをメチレン鎖で繋いだ、モデル化合物 A (図 4b) およびモデル化合物 B (図 4c) をデザインした。また、活性部位には MMFF94x 力場を用いて水分子を配置した。モデル化合物 A は 1 個の水分子を介して、モデル化合物 B は直接バックボーンの $\text{C}=\text{O}$ 基と水素結合を形成していると考えた。モデル化合物 A の NH_3^+ 基は、HTP の構造が活性構造である closed conformation に変化する過程で、Thr-118 から Ser-117 のバックボーンの $\text{C}=\text{O}$ 基との水素結合を、最終的にはモデル化合物 B と同様にリン酸イオンと水素結合を形成すると予測した。

実際に合成した化合物 (10) (モデル化合物 A) の阻害活性は $\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{M}$ であった (表 2)。アンカー化合物 (3) ($\text{IC}_{50} = 0.1 \mu\text{M}$, $\text{BEI} = 47.9$) に比べて、阻害活性は低下したが BEI 値は 28.9 と悪くなかったので、この化合物 (10) をリード化合物として選定した。

6. Classical QSAR (Hansch-Fujita 法) を用いたリード化合物 (10) の最適化

水分子を介した水素結合の形成が想定されるモデル化合物 A に対応する化合物 (11-20) をデザインした (表 2)。これらの化合物の疎水性パラメーターとして、オクタノール-水分配係数 ($\log P$) の計算値 CLOGP[10]を用いた。また、 NH_2 基の pK_a を精度よく計算できなかったため、代わりに PM3 法[11]により求めた窒素原子の電荷 (N_{charge}) を非解離型アミン状態 (NH_2) 基の塩基性のパラメーターとして用いた。これらをパラメーターとして重回帰分析を行い、QSAR 式 (1) を得た。この QSAR 式において、括弧内の n は化合物数、 r は相関係数、 s は標準偏差を表わす。

$$\log(1/\text{IC}_{50}) = -0.936 \text{CLOGP} - 29.38 N_{\text{charge}} + 2.38 \quad (1)$$

$$(n = 11, r = 0.811, s = 0.533)$$

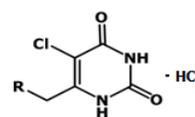
式 (1) は、化合物の疎水性が低く、窒素原子の負電荷の絶対値が大きいほど、阻害活性が強くなることを示している。化合物の疎水性が高いほど活性が強くなるのが一般的であるが、HTP の基質である thymidine の疎水性の低さ ($\log P = -1.94$) を考え合わせると、デザインする化合物の疎水性はもっと低くても良いと思われる。また、窒素原子の負電荷の絶対値が大きいことは塩基性が高く、容易に陽イオン化することでより強い水素結合を形成していると考えた。

表 2 モデル化合物 A に対応する化合物

Compd	R	CLOGP	N_{charge}	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$
10	NH_2	-1.391	-0.033	23
11	CH_3NH	-0.975	-0.044	12
12	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}$	-0.446	-0.055	20
13	$(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}$	-0.083	-0.055	32
14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{NH}$	-0.529	-0.054	210
15	$(\text{CH}_3)_2\text{N}$	-0.369	-0.063	21
16	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}$	-0.369	-0.076	340
17		-0.904	0.083	120
18		-0.345	0.096	2.2
19		-0.214	-0.104	2.6
20		-0.795	-0.104	1.0

表 3 モデル化合物 B に対応する化合物

Compd	R	CLOGP	N_{charge}	$\text{IC}_{50\text{calcd}}$	IC_{50}
21	$\text{SC}(=\text{NH})\text{NH}_2$	-0.641	-0.161	3.9×10^{-8}	3.5×10^{-7}
22	$\text{SC}(=\text{NH})\text{NHCH}_3$	-1.390	-0.177	1.5×10^{-9}	1.5×10^{-7}
23	$\text{SC}(=\text{NCH}_3)\text{NHCH}_3$	-0.434	-0.131	3.4×10^{-9}	2.0×10^{-6}
24	$\text{SC}(=\text{NC}_2\text{H}_5)\text{NHC}_2\text{H}_5$	-1.118	-0.184	1.9×10^{-12}	2.5×10^{-5}
25	$\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$	-1.953	-0.204	1.3×10^{-8}	2.7×10^{-7}
26	$\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$	-1.197	-0.240	6.5×10^{-8}	6.7×10^{-8}
27	$\text{NHC}(=\text{NH})\text{NHCH}_3$	-0.416	-0.220	6.5×10^{-8}	6.5×10^{-8}
28	$\text{NHC}(=\text{NCH}_3)\text{NHCH}_3$	-0.441	-0.182	3.4×10^{-7}	3.4×10^{-5}



次に、直接バックボーンの C=O 基と水素結合を形成しているモデル化合物 B に対応し、より負電荷の大きい imino (=NH) 基を導入した化合物 (21-28) をデザインした (表 3)。しかし、4 化合物 (22-24, 28) では、式 (1) による IC_{50} の予測値が実測値と大きく違った。その原因として、HTP の活性構造は closed conformation であるために、これらの 4 化合物では好ましくない立体障害が生じていると考えた。そこで、これら 4 化合物 (22-24, 28) には擬変数 $I=1$ を、その他の化合物 (1-21, 25-27) には $I=0$ を与えて重回帰分析を行うと、全ての化合物に対応した式 (2) が得られた。この結果からも closed conformation が HTP の活性構造であることが示唆される。

$$\log(1/IC_{50}) = -0.443 \text{ CLOGP} - 12.97 N_{\text{charge}} - 0.813 I + 3.68 \quad (2)$$

$$(n = 19, r = 0.807, s = 0.748)$$

7. 阻害活性の向上に伴う血中濃度の低下に対応した TPI (30) の創製

ここで、化合物(18, 20, 21, 25, 27)のマウス経口投与(0.17 mmol/kg; F₃dThd 50 mg/kg に相当)における血中濃度 (C_{max}) を表 4 に示した。imino 基を有する化合物(21, 25, 27)で阻害活性は向上したが、血中濃度 (C_{max}) は、各々 7.4 μM、3.1 μM、5.0 μM と低く、imino 基の負電荷の大きさと化合物の疎水性の低さが血中濃度の低い原因と考えられた。しかし、阻害活性を維持するために置換基を imino 基とする限り、その大きな負電荷による影響は避けられないので、化合物の疎水性の方を少し上げることで血中濃度の改善を図ることにした。

表 4 6 位置換 5-chlorouracil 誘導体の物性と阻害活性および血中濃度

Compd	18	20	21	25	27
R					
CLOGP	-0.345	-0.795	-0.641	-1.953	-1.197
N _{charge}	-0.096	-0.104	-0.161	-0.203	-0.240
IC ₅₀ (μM)	2.2	1.0	0.35	0.27	0.065
C _{max} (μM)	100	17	7.4	3.1	5.0

Compd	29	30	31	32
R				
CLOGP	-0.864	-0.305	-1.031	-0.502
N _{charge}	-0.206	-0.191	-0.207	-0.215
IC ₅₀ (nM)	13	35	46	360
C _{max} (μM)	12	11	3.1	1.8

疎水性の向上が見込まれる環状イミン化合物 (29-32) をデザインした。しかし、化合物 (31, 32) まで疎水性を上げると却って血中濃度が低下し、化合物 (32) では立体障害のためか阻害活性も低下した。阻害活性が強く、C_{max} が 10 μM 以上の 2 化合物 (29, 30) に関して、ヌードマウスを用いた制癌試験およびマウスの毒性試験を行い、F₃dThd と併用する HTP 阻害薬 (TPI) として化合物 (30) を選定した。

8. ヌクレオシド系抗悪性腫瘍薬 TAS-102 の臨床試験

大腸菌 TP と thymine の X 線共結晶構造から、thymine (4) ($IC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$, BEI = 46.6) をリード化合物とし、BEI 値の大きなアンカー化合物 (3) ($IC_{50} = 0.1 \mu\text{M}$, BEI = 47.9) を経て、リード化合物 (10) ($IC_{50} = 23 \mu\text{M}$, BEI = 28.9) を創製し、構造最適化化合物として TPI (30) ($IC_{50} = 35 \text{ nM}$, BEI = 30.7) の創製に至った (図 5)[12]。

経口ヌクレオシド系抗悪性腫瘍薬 TAS-102 は F₃dThd と TPI の配合剤 (配合比 1.0:0.5) であり、1999 年から臨床試験が開始された。国内第 II 相臨床試験では、フッ化ピリミジン系薬剤、イリノテカン、オキサリプラチンおよびフッ化ピリミジンを含む複数の標準化学療法に不応となった治癒切除不能な進行再発結腸・直腸がん患者 169 名を対象とした、プラセボ対照の二重盲検ランダム化比較試験の結果、TAS-102 投与群の全生存期間中央値は 9.0 ヶ月に対して、プラセボ投

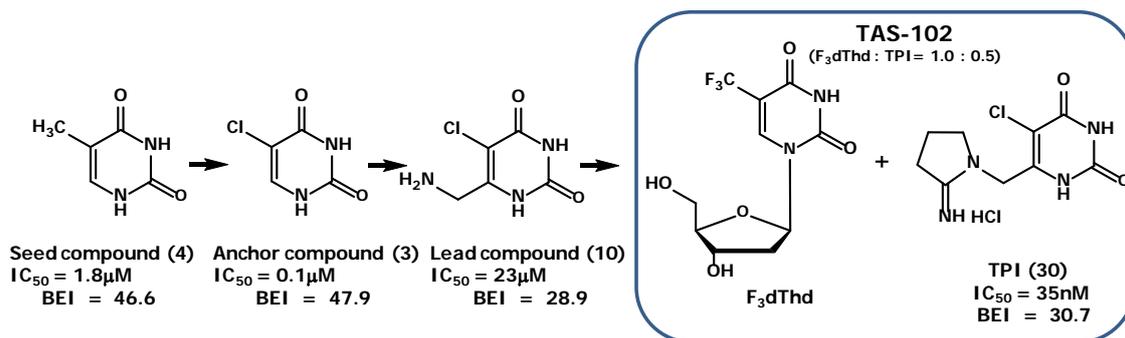


図5 化合物展開と経口ヌクレオシド系抗悪性腫瘍薬 TAS-102

与群では 6.6 月であった。また、死亡のリスクも有意に減少した[13]。現在、TAS-102 は日米欧で第 III 相臨床試験中であるが、国内では 2013 年に「治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」を適応症として、製造販売承認申請がなされた。

9. TPI (30) - HTP 共結晶構造情報に基づく相互作用様式と反応機構の考察

2004 年に AstraZenaca 社の血管新生阻害薬の研究グループより、HTP と TPI (30) の X 線共結晶構造が報告された[3] (図 6a)。予想通り TPI/HTP 複合体の構造は closed conformation であったが、リン酸イオン結合部位には水分子が存在していた。これらの水分子の酸素原子がリン酸イオンの代わりををしていると考えられる。しかし、リン酸イオンが存在していないことから、TPI (30) の阻害機構を再考する必要があった。

一方、我々は TPI (30) の電子状態に関して、uracil 誘導体の pKa に関する文献[14]から、その pKa は 7.5 以上であると予測し、TPI (30) はカチオン型で HTP と相互作用していると考えていた。しかし、AstraZenaca 社の研究グループが TPI (30) の実測 pKa 値は 6.1 と報告していることから、TPI (30) の電子的構造はカチオン型ではなく、双性イオンとして HTP と相互作用していると考えられる。

HTP の closed conformation の GRID 解析では、図 2c に示した open conformation の場合と同様に、疎水性サイトは 6 位の方法に広がっている (図 6a: 白の網目部分)。また、TPI (30) の N1 位と His-116 の水素原子は、距離 2.28 Å で水素結合を形成しており、N1 位に置換基があると、この水素結合がなくなると共に His-116 との立体障害が生じ、阻害活性が低下するものと予測される。

ここで、統計解析的に脱溶媒和自由エネルギーを求める 3D-RISM 解析[15]を用いて推定した HTP closed conformation の活性部位における、安定な水分子の領域(緑)と不安定な水分子の領域(赤)を示した (図 6b)。TPI (30) の uracil 骨格の C=O-NH-C=O 部位と Arg-202、Ser-217、Lys-221 との水素結合は、この不安定な水分子の領域 (赤) に存在したと推定される水分子を取り去ることで形成されたものと説明できる。一方、TPI (30) の N1 位の周辺には安定な水分子の領域が広がっており、この領域の水分子を排除することは望ましくないと予測される。

その一方で、図 6b に示した様に、安定な領域に存在する水分子が imino 基と水素結合を形成し、相互作用を強めていると考えられる。また、この imino 基の近傍に不安定な領域に属する水分子が一個存在し、これを脱溶媒和できる化合物をデザインすれば、阻害活性の向上が期待される (図 6b)。

HTP の酵素反応機構としては、速度論的研究から活性部位にリン酸イオンが最初に結合し、生成物の一つである 2-dR-1-P が最後に離脱する定序 Bi-Bi 機構であるとされていた[16]。ところが、リン酸イオンを除去し精製した HTP を用いて、基質である thymidine との共結晶を得ようとした結果、予想に反して thymidine ではなく反応生成物の thymine が活性部位に入った closed conformation の結晶構造 (PDB code: 2J0F) が報告された (図 6c)[17]。この報告では、精製した HTP 中に残存したリン酸イオンによる酵素反応が起こり、生成した thymine が、基質である thymidine が共存するにも関わらず、HTP の open conformation に結合し、closed conformation に構

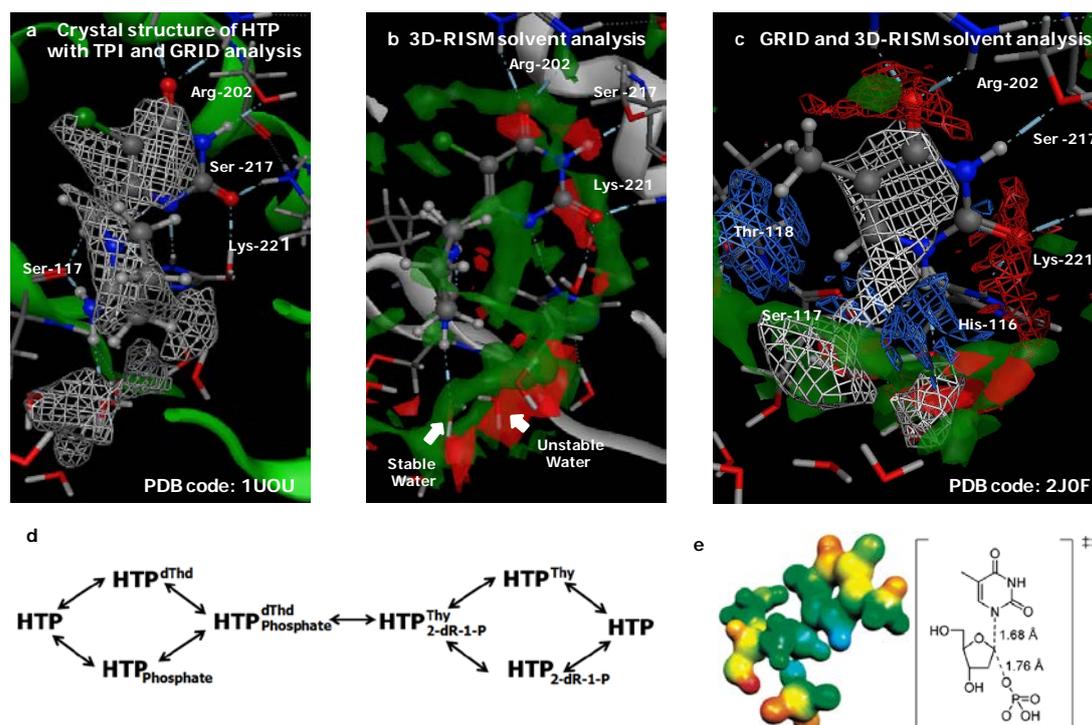


図 6 HTP-TPI(30)共結晶構造(closed conformation)、GRID、3D-RISM 解析および TP 反応機構と thymidine の遷移状態モデル

造変化したものと解釈し、この thymine による阻害は非競合的生成物阻害であるとしている。従って、HTP の酵素反応機構としては、ランダム Bi-Bi 機構 (Random Bi-Bi mechanism) が妥当であると考えられる。以上のことから結果論的ではあるが、リン酸イオン結合部位には水分子しか存在しない構造も対象として化合物をデザインすべきであったと言える (図 6d)。一般に理想的な阻害剤は遷移状態アナログであるとされている。しかし、HTP に関する速度論的同位体効果から量子化学計算 (BILYp/6-31G^{*}) を用いた thymidine 遷移状態モデル (図 6e) と、purine nucleoside phosphorylase の遷移状態アナログの K_m/K_i 値 = 5,400,000 と比較して、TPI (30) の HTP に対する K_m/K_i 値は 3,000 ($K_i = 20\text{nM}$) であることから、TPI (30) は遷移状態アナログではなく、リン酸イオンへのキレート化剤であるとされている[18]。従って、thymidine の遷移状態アナログとしての阻害剤開発は今後の課題である。

ここで、仮に thymine を含む HTP の活性構造 (closed conformation: PDB code 2J0F) を基に SBDD を開始することができたとする、図 6c に示した GRID 解析と 3D-RISM 解析により、以下の条件を満たす thymine 誘導体をデザインすれば良いことになる。

- (1) 3D-RISM 解析による安定な水分子の領域 (緑) では水素結合を形成し、不安定な水分子の領域 (赤) に存在する水分子を排除する。
- (2) GRID 解析による疎水性サイト (白の網目部分)、と Thr-118 および Ser-117 のバックボーン C=O 基の周囲に広がる水素供与サイト (青の網目部分) を利用する。

以上の様に、水分子を含む標的タンパクの立体構造情報が得ることができれば、水分子の脱溶媒和自由エネルギーも考慮した SBDD による化合物のデザインが可能になって来ている。

10. おわりに

本稿で紹介した SBDD の例では、標的タンパクのホモロジーモデルと化合物との相互作用シミュレーションに基づいて化合物をデザインした。しかし、そこで用いた標的タンパク-リガ

ド複合体の構造はあくまで推定であって、その正しさの保証は何もない。しかし、同時に Classical QSAR 解析を用いることで、SBDD による化合物デザインの妥当性が検証できたと思われる。因みに、Classical QSAR 解析を用いる利点として、QSAR 式の予測から例外化合物を客観的に見出せること、その原因を考察し次の化合物デザインに活かすことができること、またこれ以上疎水性を高める必要はないなど、化合物展開に見切りを付ける根拠とすることができることなどが挙げられる。

近年では、長時間の分子動力学計算や、タンパクの量子化学計算を実験室レベルで可能にした Fragment Molecular Orbital (FMO) 法[19]によるリガンドとタンパクの残基間との詳細な相互作用解析に基づく分子設計も行われており、今後の更なる SBDD 関連技術の進歩により、創薬がより論理的になって行くことが期待される。

参考文献

1. Kalyanamorthy, S. and Chen, Y.-P. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov. Today* **2011**, 16, 831-839.
2. (a) Hansch, C. and Fujita, T. ρ - σ - π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1616-1626. (b) Hansch, C. and Fujita, T. Additions and corrections – ρ - σ - π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5710-5710.
3. Norman, R. A. et al. Crystal structure of human thymidine phosphorylase in complex with a small molecule inhibitor. *Structure* **2004**, 12, 75-84.
4. Suzuki, N. et al. Mode of action of trifluorothymidine (TFT) against DNA replication and repair enzymes. *Int. J. Oncol.* **2011**, 39, 263-270.
5. Miyazono, K. et al. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 4098-4103.
6. 統合計算化学システム MOE (Molecular Operating Environment)
7. Chessari, G. and Woodhead, A. J. From fragment to clinical candidate – A historical perspective. *Drug Discov. Today* **2009**, 14, 668-675.
8. Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding-sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 849-857.
9. Abad-Zapatero, C. and Metz, J. T. Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery. *Drug Discov. Today* **2005**, 10, 464-469.
10. CLOGP: Bio-Loom (<http://biobyte.com/bb/prod/biloom.html>).
11. Scigress MO Compact (<http://jp.fujitsu.com/solutions/hpc/app/mocompact/>).
12. Yano, S. et al. Synthesis and evaluation of 6-methylene-bridged uracil derivatives. Part 2: Optimization of inhibitors of human thymidine phosphorylase and their selectivity with uridine phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3443-3450.
13. Yoshino, T. et al. TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: A double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2012**, 13, 993-1001.
14. Jang, Y. H. et al. First principles calculation of pKa values for 5-substituted uracils. *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 274-280.
15. Kovalenko, A. and Hirata, F. Self-consistent description of a metal-water interface by the Kohn-Sham density functional theory and the three-dimensional reference interaction site model. *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 10095-10112.
16. Krenitsky, T. A. Pentosyl transfer mechanisms of the mammalian nucleoside phosphorylases. *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 2871-2875.
17. El Omari, K. et al. Structural basis for non-competitive product inhibition in human thymidine phosphorylase: Implications for drug design. *Biochem. J.* **2006**, 399, 199-204.
18. Birck, M. R. and Schramm, V. L. Nucleophilic participation in the transition state for human thymidine phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2447-2453.
19. Kitaura, K. et al. Pair interaction molecular orbital method: An approximate computational method for molecular interactions. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 312, 319-324.

///// SAR Presentation Award /////

< SAR Presentation Award について >

「SAR Presentation Award」は、構造活性相関シンポジウムにおける若手研究者の発表を奨励し、構造活性相関研究の発展を促進するため、2010 年度に創設された。当初は応募制として審査対象講演の募集を行った。2012 年度からは、正式名称を「構造活性相関シンポジウム優秀発表賞」（英語表記 SAR Presentation Award）と定め、構造活性相関シンポジウムにおける 45 歳以下の発表者（登壇者）による全ての一般講演（口頭発表）を選考対象とすることとした。

< 2013 年度選考結果について >

第 41 回構造活性相関シンポジウム「優秀発表賞」受賞者の選考については、審査員から提出頂いた審査票の集計結果をもとに、去る 1 月 8 日（水）にウインクあいち（名古屋市）で開催された平成 25 年度第 4 回常任幹事会において、別途定めた評価基準にもとづいて協議が行われ、選考対象講演のうち、評点が上位の 2 名を受賞候補者として選出した。

2013 年度構造活性相関シンポジウム優秀発表賞

小杉貴洋（ワシントン大学 生化学科）

吉田達貞（徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部）

受賞者の発表は本ニュースレターにおける誌上発表とし、受賞者には別途部会長名で授賞通知を送付するとともに受賞の諾否を確認し、表彰状と副賞（図書券）を贈呈した。なお、審査にあたっての観点と評価基準を以下に付す。

審査の観点と評価基準：

- (5：大変優れている 4：優れている 3：良い 2：改善が必要である 1：大いに改善が必要である)
- 講演要旨：講演要旨は発表内容を反映して適切に作成されているか。(5, 4, 3, 2, 1)
 - 講演資料：スライドは専門領域の異なる参加者にも分りやすく、見易く、かつ発表時間に見合って適切に作成されているか。(5, 4, 3, 2, 1)
 - 研究のねらい：研究の背景と目的、先行研究との関係、研究の新規性あるいは有用性が明確になっているか。(5, 4, 3, 2, 1)
 - 論理構成の合理性：研究方法が適切であるか、適切な文献資料、データに基づいて議論が進められているか。考察・結論は妥当か。(5, 4, 3, 2, 1)
 - 質疑応答：質問等に対し、的確な応答・議論がなされたか。活発な討論がなされたか。(5, 4, 3, 2, 1)
 - 総合評価：a) ～e) を総合的に評価する。(5, 4, 3, 2, 1)

2013 年度審査員（50 音順、敬称略）：

赤松美紀、飯島 洋、伊藤篤史、今井輝子、大田雅照、岡島伸之、粕谷 敦、狩野 敦、川下理日人、木村敦臣、久保寺英夫、合田浩明、高木達也、田中稔祐、田上宇乃、辻下英樹、藤村健一、藤原英明、広野修一、前田美紀、宮本秀一、山下富義、山本武志、横山祐作、幸 瞳、湯田浩太郎

< 受賞者コメント >

KO04

氏名 小杉貴洋 (こすぎ たかひろ)

所属 ワシントン大学 生化学科

演題 計算機による理想的な構造を持つ機能タンパク質のデノボデザイン

このたびは、構造活性相関シンポジウム優秀発表賞に選んで頂けたことを大変光栄に思います。また、構造活性相関シンポジウムにて発表する機会を与えて下さった構造活性相関部会の先生方、海外で研究を行う機会を与えて下さった皆様、Rosetta を用いた蛋白質デザインや実験の仕方を一から教えて下さった共同研究者の古賀夫妻、そして恵まれた研究環境を与えて下さり、私のつたない英語を聞き取り適切な助言を与えて下さった David Baker 教授に心より御礼申し上げます。

本研究では機能を持つ蛋白質を一から設計する方法とその実例をいくつか紹介しました。もし望みの蛋白質を自由に創り出すことが出来れば、蛋白質の機能をより深く理解出来ると同時に、医療など様々な分野での応用が可能になると考えられます。まだ創薬への応用出来るほどの結果ではありませんでしたが、この受賞を励みに、より一層努力して、今後創薬に役立つ研究に発展出来るように頑張っていきたいと思っております。

本研究は日本学術振興会海外特別研究員制度の助成を受けて行われました。この場を借りてお礼申し上げます。

KO08

氏名 吉田達貞 (よしだ たつさだ)

所属 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部

演題 LERE-QSAR 解析の精密化とその検証

この度、第 41 回構造活性相関シンポジウムにおいて優秀発表賞の栄誉に浴しましたことは大変光栄であり、同時に身の引き締まる思いであります。審査をご担当されました先生方、日本薬学会構造活性相関部会の先生方に厚く御礼申し上げます。本研究を進める上で御指導を賜りました中馬 寛教授ならびに御協力を賜りました比多岡清司博士をはじめとする共同研究者の皆様、心より感謝申し上げます。本研究では、当研究室でこれまでに考案しているタンパク質と一連のリガンドとの複合体形成に伴う自由エネルギー変化の分子科学計算に基づく高精度予測を目指した LERE-QSAR 解析のさらなる精密化を目的に、結合相互作用エネルギーと水和自由エネルギー変化の評価にそれぞれ新しい評価法の導入を試みました。その結果、化学的精度と計算コストの両面から新規評価方法の有用性を確認することができました。本改良手法による LERE-QSAR 解析は、タンパク質に対するリガンドの作用メカニズムを物理化学的にも妥当な解釈に基づき原子・電子レベルで定量的に理解する上で有用となると期待されます。今回の受賞を励みとして、研究活動に引き続き精進して参りたいと存じます。

< 受賞講演要旨 >

次頁以降に、優秀発表賞の講演要旨を掲載する。

KO04

計算機による理想的な構造を持つ機能タンパク質のデノボデザイン

(University of Washington, Department of Biochemistry)

○小杉 貴洋、古賀 信康、古賀-巽 理恵、David Baker

1. Introduction

機能を持つタンパク質を自由にデザインすることは、学問的な興味だけでなく、その産業的な有用性からも大変注目されている。そのため、これまでに数々のタンパク質がデザインされ、それらのタンパク質が実際に機能を持つ事が実験的に確認されて来た。そして、その中には天然のタンパク質には存在しない機能を持つものや天然のタンパク質の性能を超えるものさえある。しかしながら、これまでのデザインは全て天然のタンパク質を基にその機能を上げる手法が用いられているため、基にした構造とほぼ同じ主鎖構造を持っている。一方で、より自由に、より洗練されたタンパク質を作り出すためには、主鎖構造も一から作る必要があると考えられる。

さて、計算機によるタンパク質の構造予測という問題もまたタンパク質科学の分野で最も注目されている問題の一つである。そのため、タンパク質の立体構造をアミノ酸配列から予測する研究は盛んに行われて来たが、未だ確実に予測可能な方法は存在していない。その中で、David Bakerらにより開発された Rosetta¹ というプログラムは高い構造予測能をもち、CASP といった構造予測コンテストにおいても常に高い評価がなされている。そして近年、この高精度なタンパク質構造予測の技術を用いる事で、計算機によるタンパク質のデザインが行われるようになり、これらのデザインされたタンパク質は実験的にも検証され、合理的に望みのタンパク質が得られていることが確認されて来た。ここで、代表的なものとして Kemp eliminase² や Retro-aldase³ といった酵素、ステロイドのような低分子に結合するタンパク質⁴、Influenza Hemagglutinin に結合するタンパク質⁵、そして自己会合するタンパク質⁶などが上げられる。

これらのデザインは、全く関係のない自然界の構造を基にアミノ酸配列を自由に变える事により、望みの機能を持たせることに成功している。これにより、タンパク質のデザインの幅が大きく広がることになった。しかしながら、これらのデザインにおいてさえ、基本的な主鎖構造は自然界の構造から取られているために、自由に主鎖構造

が決められているわけではない。例えば、酵素のデザインを例に挙げると、計算機により膨大な自然界のタンパク質構造の中に次々と活性部位（遷移状態類似構造）を当てはめ、これをうまく導入出来る構造を選び出し、その活性部位の周辺にあるアミノ酸配列を機能に最適化していくことにより生み出された。この方法により、立体的に活性部位を導入出来る主鎖構造に対して、機能に最適な配列は得られるが、選ばれた主鎖構造を天然の構造から大きく変える事は出来ないため最適化には限界があった。

そこで、主鎖構造を最適化するために、自然界に存在しない主鎖構造を自由に作り出す方法が必要になる。幸いにも近年、理想的なタンパク質の主鎖構造を作り出すための規則が発見され、その規則を用いる事により折りたたみに最適化された様々な理想的なタンパク質構造が一から作り出された⁷。これらのタンパク質は α ヘリックスの kink や β ストランドの bulge などを持たない理想的な構造を持っているため、非常に安定なタンパク質であるが、機能は持っていない。そこで、この方法を発展することにより、理想的な主鎖構造を持ちつつ、機能を備えたタンパク質を作り出すことを試みた。

2. Method

上述の理想的なタンパク質を作り出す方法では、最初に理想構造を作る規則に従って、デザインしたいタンパク質の二次構造のつながり（トポ

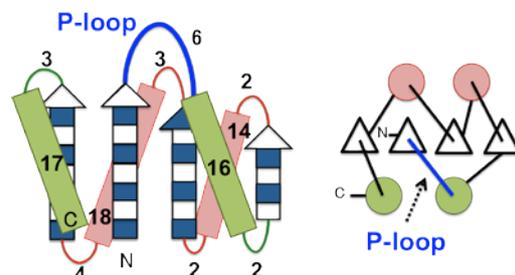


図1. 今回デザインしたタンパク質のトポロジー

ロジ)を決める。ここでは、phosphateを結合する非常に安定なタンパク質を作るために、図1の様な phosphate binding loop (P-loop) モチーフが組み込まれたミニマムなトポロジーを持つタンパク質をデザインすることにした。この P-loop モチーフは kinase などに含まれ GXXXXGK(T/S)という配列をもつ loop 構造で ATP や ADP などの phosphate を結合することが知られている。今回はこの P-loop モチーフに結合する Ligand として、Geranyl Pyrophosphate を用いる事にした。ここで、Geranyl Pyrophosphate や Farnesyl Pyrophosphate といった脂質を持ったニリン酸は、メバロン酸経路の中間体であり、これらを捕捉することによりコレステロール値の低下が期待される。また、これらの物質はがんの進行に大きな役割を果たすタンパク質のプレニル化にも関わっているため、これらの物質を補足する事によりがんの成長をおさえられる可能性もある。

デザインは図2に示した流れのように進められた。まず、望みのトポロジーをもつ主鎖構造を作り出すために、ライブラリからフラグメントを取り出し、それらをつなげていった。そして、このフラグメントを何度も繰り返し置き換えることにより、Rosetta のスコアが低く望みのトポロジーを持つタンパク質の主鎖構造を作り出した。その後、この主鎖構造に対して、これらを安定にする様に側鎖を発生させた。さらに、発生された側鎖の二面角をモンテカルロ法により最適化し、全体の原子座標も構造最適化した。こうして構造を多数作り出し、それらの構造の中から Rosetta スコアの低い構造を選び、P-loop モチーフの近くに Geranyl Pyrophosphate を置いた。そして、P-loop モチーフと Ligand の間に拘束をかけて、側鎖のデザイン、二面角の最適化、構造最適化を再び行った。最後に、デザインされた構造の中から Rosetta スコアの低いものを選び、拘束を外して構造最適

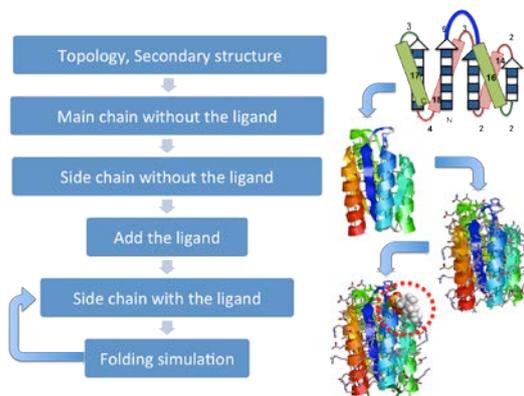


図2. 今回用いたデザインの流れ

化を行った。こうして、出来上がったデザインに対して、何度も構造予測を行い、そこから得られた構造のアンサンブルが予測構造の近くまでたどり着く事やファネル状になっていることを確認した (図3 (a))。これらを満たしたデザインに対して、実際に実験を行ってそのデザインの正しさを示した。

3. Results

上記の条件を満たしたデザインを実験により確認するために、大腸菌を用いてこのタンパク質を発現し、Ni カラムを用いて精製した。目的のタンパク質が発現されていることは、Mass スペクトルと SDS-PAGE により確認した。そして、デザインされたタンパク質の多くは高い濃度で発現されている事が確認された。

次に、この精製されたタンパク質の円偏光二色性(CD)スペクトルを測定することにより二次構造を確認した。すると、デザインした α/β タンパク質に対応する CD スペクトルが確認できた (図3 (b))。さらに、様々な温度で CD スペクトルを測定した結果、このスペクトルは高温になっても変化することがなく、かなり安定なタンパク質であることが確認された。また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、このタンパク質が溶液中でモノマーであることも確認した(図3 (c))。

デザインされたタンパク質が、適当な構造を保っていることが確認されたので、表面プラズモン共鳴(SPR)分析法により、タンパク質と Ligand

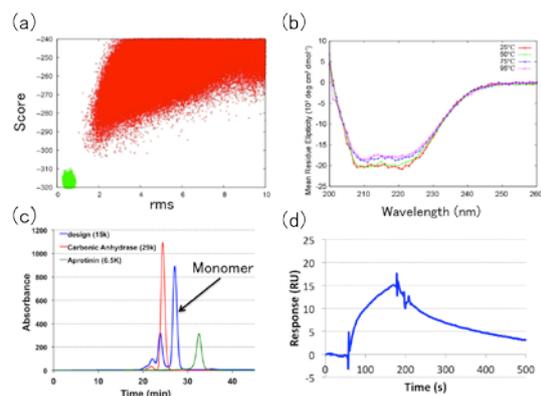


図3. デザインされたタンパク質の計算・実験結果 (a) 構造予測計算: *ab initio* 構造予測された構造 (赤点) とデザイン構造から緩和させた構造 (緑点), (b) CD スペクトル: 25°C (赤), 50°C (緑), 75°C (青), 95°C (紫)での測定, (c) サイズ排除クロマトグラフィー: デザインされたタンパク質(青)と Carbonic Anhydrase(赤)と Aprotinin(緑), (d) SPR 分析のシグナル

の結合を確認した。すると、このデザインされたタンパク質からは Ligand との結合を表すシグナルが見られ(図 3 (d))、デザインされたタンパク質は Geranyl pyrophosphate と結合することが確認された。ここで、P-loop モチーフは持たないが、類似のトポロジーを持つ理想タンパク質に対して同様の実験を行うと、Ligand との結合を表す SPR シグナルは検出されなかった。これは、Ligand の結合には P-loop モチーフが必要であることを示している。また、溶液中に大量の Pyrophosphate を加えると、この場合も Ligand の結合を表す SPR シグナルが見られないことが確かめられた。これは、デザインされた構造が Phosphate と結合していることを示している。

さらに、Fluorescent polarization 法により、これらのデザインや天然の酵素 (Adenylate Kinase) の Ligand との解離定数 K_d を測定した。まず、P-loop モチーフを持たない理想タンパク質では活性がない事が確かめられた。次に、P-loop モチーフにより Phosphate を結合する Adenylate Kinase では、数百 μM 程度の活性を持つことが確認された。そして、今回のデザインの中で最も結合活性の高いデザインもまた数百 μM ほどの活性を持っていた。つまり、デザインされた構造は天然の酵素に近い十分な活性を持っていた。一方で、同じように P-loop モチーフが導入され、安定な α/β タンパク質である事が確認されたその他のデザインの多くは、数 mM 程度の活性しか持たなかった。つまり、複数のデザインに対して安定した構造を持っている事が確かめられたにも関わらず、あるデザインは高い活性を示し、別のデザインではほとんど活性を持たなかったのである。この理由を、デザインしたタンパク質の MD シミュレーションを行うことによって確かめることにした。

今回のデザインを計算する前に、まず MD シミュレーションがタンパク質のデザインにどのように利用出来るのか検証を行った。近年、コンピュータのハードウェアやソフトウェアの進歩により、数百 ns 程度の MD シミュレーションは容易に行う事が出来るようになった。さらに、専用のコンピュータを用いる事により ms の MD シミュレーションさえ行われるようになり、あるタンパク質においては folding と unfolding が繰り返されるようなシミュレーションも行われた。そのため、経験的なスコアを用いる事をせず、MD シミュレーションによりタンパク質のデザインが可能になるかもしれないと言う期待も持たれている。そこで、デザインした構造の検証に MD シミュレーションを使う事が可能かどうか調べるために、これまでにデザインされた理想タンパク質とそのタンパク質のアミノ酸配列をすべてア

ラニンに変えたタンパク質 (poly ALA) の MD シミュレーションを行った。当然、既に安定なタンパク質であると確認された理想タンパク質ではある程度の時間安定な構造を取り、poly ALA ではすぐに unfold される事が期待される。むしろ、そうでなければ MD シミュレーションではデザインした構造が安定であるかどうか判定する事が非常に難しいと言う事になる。さて、その結果であるが、図 4 に示すように理想タンパク質では、予想された通り 100ns のシミュレーションを行っても安定な構造を保っていた。ところが、poly ALA もまた 100ns のシミュレーションを行ったにも関わらず、unfold する事なく安定な構造を保ち続けたのである。つまり、デザインされたタンパク質がどのような配列を持っていたとしても構造が壊れないため、デザインした配列の安定性を MD シミュレーションにより次々と検証して行く事は現在の計算能力を用いても非常に難しいという事が分かる。

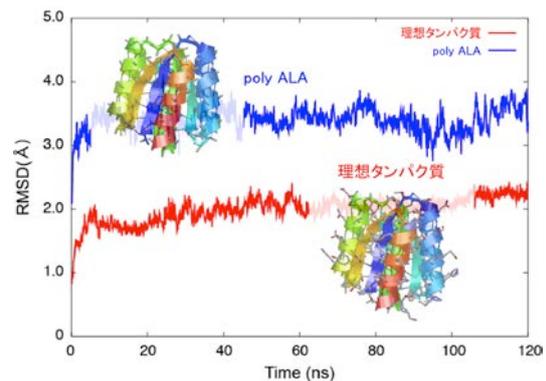


図 4. 理想タンパク質 と poly ALA の MD シミュレーションの結果

次に、今回デザインしたタンパク質の間の活性の違いを調べるため、これらの MD シミュレーションも同様に行った。当然、これらのデザインもまた MD シミュレーション中に大きな構造の変化はなく、すべて非常に安定であった。そこで、全体の構造変化ではなく、P-loop モチーフの local な動きに注目した。すると、図 5 に示すように、最も活性の高いデザインでは Ligand が無い状態で P-loop モチーフが開いており、活性のほとんどないデザインについては閉じている事が確認された。Ligand の無い状態で P-loop モチーフが閉じていると、Ligand がやって来ても結合出来ないため、Ligand が結合するためには P-loop モチーフが開いている必要がある。よって、この loop 構造の揺らぎ方の違いが活性の違いを生み出していると考えられる。さて、この P-loop モチーフの動き

の違いだが、活性のほとんどないデザインでは P-loop モチーフ周辺に大きな側鎖を持つアミノ酸が多く、それらの側鎖の影響により P-loop モチーフが閉じていた。一方で、活性の高いデザインでは周辺の残基のこのような影響は見られなかった。

このように、loop 構造の動きのような local な変化に関しては、100ns 程度の計算時間でもその違いを確認する事が出来ることが分かった。これは、ある程度デザインが出来上がった時に、活性の高いものと低いものの違いを調べ、より活性を上げる方法を見つけ出すために MD シミュレーションが使えることを示している。

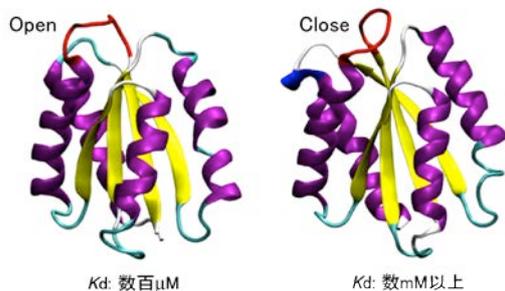


図5. 今回デザインされたタンパク質の MD シミュレーションの結果

4. Conclusion

今回の研究において、デザインするトポロジーに P-loop モチーフという Phosphate を認識する配列を導入することにより、非常に安定な Phosphate 結合タンパク質を作り出す事に成功した。そして、最も結合能力の高いデザインは天然の酵素に近い活性を示した。このようにして結合能力を持つタンパク質は作られたので、今後このデザインをもとにして、Directed Evolution によりアミノ酸配列を最適化する事や Geranyl 基のような phosphate 以外の部分も認識出来る主鎖構造や配列を用いる事により、さらに活性を上げて行く事が可能になった。

今回の研究と同様の手続きは、Ligand を結合する任意のモチーフに対して行う事が可能である。つまり、Ligand を結合することが知られている様々なモチーフを用いる事により、様々な Ligand を結合するタンパク質をデザインすることが出来る。また、Ligand の結合だけでなく、酵素の活性部位を適切に配置することにより、酵素活性を持つタンパク質を作る事も可能である。当日時間があればこれについても報告する。

さらに、アミノ酸配列だけでなく主鎖構造も変えられるこのような方法は、タンパク質の形や性

質を自由に選択出来るため、様々な発展が期待出来る。非常に効率の良い酵素を作る事も、望みの環境で機能を持つようにする事も、望みの場所にタンパク質を運ぶ事も可能になるであろう。またタンパク質をつなげる事や多量体にすることにより、複数の機能を持たせる事や機能を制御する事も出来るだろう。もちろん、このようなことを可能にするこれらの技術は、タンパク質医薬品やドラッグデリバリーシステムなどの分野において、医薬品開発にも今後大きく貢献出来ると考えられる。

5. Reference

- [1] Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M. & Baker, D. Protein structure prediction using Rosetta. *Methods Enzymol.* **383**, 66-93 (2004).
- [2] Röhrlisberger, D. *et al.* Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* **453**, 164-166 (2008).
- [3] Jiang, L. *et al.* De Novo Computational Design of Retro-Aldol Enzymes *Science* **319**, 1387-91 (2008).
- [4] Tingberg, C. E. *et al.* Computational design of ligand-binding proteins with high affinity and selectivity. *Nature* **501**, 212-216 (2013).
- [5] Fleishman, S. J. *et al.* Computational Design of Proteins Targeting the Conserved Stem Region of Influenza Hemagglutinin. *Science* **332**, 816-821 (2011).
- [6] King, N. P. *et al.* Computational Design of Self-Assembling Protein Nanomaterials with Atomic Level Accuracy. *Science* **336**, 1171-1174 (2012).
- [7] Koga, N. *et al.* Principal for designing ideal protein structures. *Nature* **491**, 222-227 (2012).

KO08

LERE-QSAR 解析の精密化とその検証

(徳島大院・薬¹, 九州大・先導物質化学研究所²)○吉田達貞¹, 馬島 彬¹, 笹原克則¹, 芝田雄登¹,
江口将大¹, 比多岡清司², 中馬 寛¹

1. 序論

我々はこれまでにタンパク質と一連のリガンドとの複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の分子科学計算に基づく高精度予測と結合相互作用メカニズムの詳細理解を目指して、Linear Expression by Representative Energy terms (LERE)-QSAR 解析を提案し、その有用性をいくつかの系で検証している [1,2]。LERE 解析では、全自由エネルギー変化 ΔG_{obs} ($= RT \ln K_f$) をいくつかの代表自由エネルギー項の加成性と penalty energy 項 ΔG_{others} ($= \Delta G_{\text{others1}} + \Delta G_{\text{others2}}$: $\Delta G_{\text{others1}} = \beta_1 (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}) + \text{const}$, $\Delta G_{\text{others2}} = \beta_2 \Delta G_{\text{diss}} + \text{const}$ ($\beta_1, \beta_2 < 0$ and/or $\text{const} > 0$)) の導入および entropy-enthalpy 補償則 ($T\Delta S = \alpha \Delta H + \text{const}$: $\alpha > 0$) に基づき下式 (I) として表す。

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta_1) (1 - \alpha) (\Delta E_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}) + (1 + \beta_2) \Delta G_{\text{diss}} + \text{const} \quad (\text{I})$$

上式において、 ΔE_{bind} はリガンドとタンパク質の結合相互作用エネルギー、 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}$ は複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化、 ΔG_{diss} はリガンドの解離自由エネルギー変化をそれぞれ表しており、これら各代表エネルギー項の高精度かつ実用的な評価法の確立が LERE-QSAR 解析のさらなる精密化に繋がると考えられる。本研究では、亜鉛含有タンパク質である炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase: CA) と一連の benzene-sulfonamide (BSA) 誘導体との複合体系を対象に、(1) 結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}) の評価方法として、Hartree-Fock (HF) 法に基づくエネルギーに経験的な分散力エネルギー補正を導入した新規 HF-D 法に基づく評価を、(2) 水和自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}$) の量子/古典化学的連続体モデルの hybrid 法による評価を導入した LERE-QSAR 解析からこれらの評価法の有用性を検証した。

2. 方法

2.1 化合物セット

Takeya らの CA に対する阻害活性データ [3] を基に、ベンゼン環上の *para*-位に置換基を有する 7 種類の BSA 誘導体を解析対象とした。

2.2 CA-BSA 複合体構造の構築

CA と各 BSA との複合体構造を MD/MM 計算 (Amber) ならびに ONIOM 法 (M06-2X/6-31+G(d):Amber) を用いて構築した (Figure 1)。

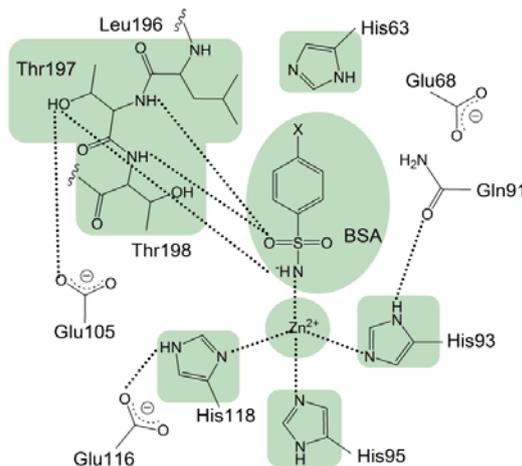


Figure 1. Schematic representation of BSA bound in the CA active site. Atoms in shadow areas are treated as the quantum region in the ONIOM calculation.

2.3 LERE 解析におけるエネルギー代表項の評価
2.3.1 HF-D 法による結合相互作用エネルギー計算

結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}) の HF エネルギーに対する経験的な分散力エネルギーの補正として sigmoid 型の damping 関数を使用した HF-D 法を用いて算出した。HF-D 法の精度検証として、生体関連分子の非共有結合性の分子間相互作用を想定した分散力支配系 (DISP, 6 個)、水素結合系 (HB, 9 個)、その他の相互作用系 (others, 3 個) の計 18 個の小分子モデルからなる複合体を使用した。CCSD(T)/aug-cc-pVTZ による相互作用エネルギーを基準値とした場合の誤差絶対値の平均値 (Mean Absolute Error: MAE) から、HF-D/6-31+G(d) は、分散力エネルギーの補正を行っていない HF/6-31+G(d) に比べていずれの複合体においても MAE は小さな値を示しており、かつ HF-D より計算コストの高い MP2 や DFT 法の結果と比較しても良好なことを確認している (Figure 2)。タンパク質とリガンドとの複合体のような大規模な分子サイズの相互作用エネルギーを評価する上では、計算コストの高い他の方法と比較して HF-D 法は有効かつ実用的な方法であると考えられる。したがって、各 CA-BSA 複合体の ΔE_{bind} の算出には ONIOM(HF-D/6-31+G(d):Amber) 法を用いた ($\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM}/\text{HF-D}:\text{Amber})$)。

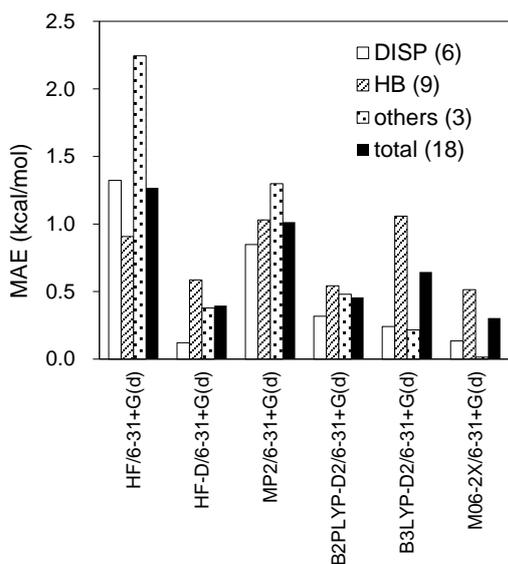


Figure 2. Performance of HF-D for non-covalent complexes.

2.3.2 量子/古典化学的連続体モデルの hybrid 法による水和自由エネルギー変化の評価

水和自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}$) の評価には、BSA ならびにその結合部位近傍を SCRF-CPCM 法により量子化学的に取扱い、その他の領域を GB および PB 法を用いて古典的に評価する hybrid 法 (CPCM/HF/6-31G(d):G(P)B) [1,4] を使用した ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}$ (CPCM:G(P)B))。なお、量子領域は ONIOM 法による ΔE_{bind} 算出時の量子領域と同一とした。

2.3.3 解離自由エネルギー変化の評価

複合体形成に伴った BSA 中の sulfonamide (-SO₂NH₂) 部位の解離自由エネルギー変化 (ΔG_{diss}) を CPCM/HF/6-31+G(d) により評価した。

3. 結果および考察

一連の BSA と CA の複合体形成に対して、LERE-QSAR 式 (I) に基づく解析の結果、実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) を高い化学的精度 ($< \sim 0.5$ kcal/mol) で説明可能な LERE-QSAR 式 (1), (2) を得ることができた。

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.0574 [\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM}/\text{HF-D}:\text{Amber}) + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}(\text{CPCM}:\text{PB})] + 0.402 \Delta G_{\text{diss}} - 27.6$$

$$n = 7, r = 0.965, s = 0.248 \text{ kcal/mol} \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.112 [\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM}/\text{HF-D}:\text{Amber}) + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}(\text{CPCM}:\text{GB})] + 0.352 \Delta G_{\text{diss}} - 23.5$$

$$n = 7, r = 0.971, s = 0.277 \text{ kcal/mol} \quad (2)$$

Figure 3 に代表エネルギー項の化合物間の変動図を示す。結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind} (ONIOM/HF-D:Amber)) と水和・解離自由エネルギー

の和 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}$ (CPCM-GB) + ΔG_{diss}) との間には良好な逆相関関係 ($r = -0.950$) が成立しており、両者は ΔG_{obs} に対して互いに拮抗するように寄与することがわかる。 ΔG_{obs} の全体の変動に対する両者の相対的寄与は、 ΔE_{bind} (ONIOM/HF-D:Amber) (variance = 1.07 kcal²/mol²) に比べて $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}$ (CPCM-GB) + ΔG_{diss} の方が有意に大きく (9.34×10^{-2})、BSA と CA の複合体形成における化合物間の差異は、水和・解離自由エネルギーの変動が支配的であることが示唆される。

[編集注]
正誤表 (p.25) 参照

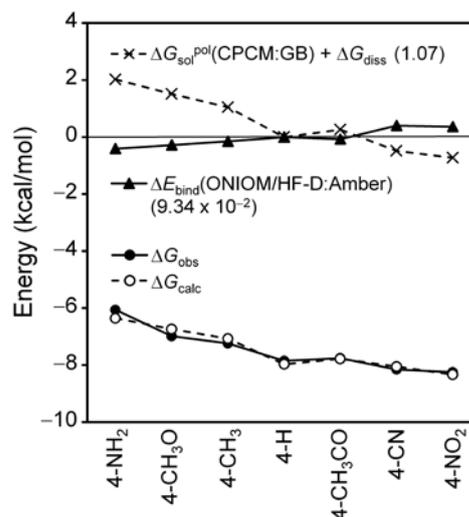


Figure 3. Variations of ΔG and its components. Variance (in kcal²/mol²) is shown in parenthesis.

本研究では LERE-QSAR 解析の精密化を目指して、結合相互作用エネルギーならびに水和自由エネルギー変化の評価にそれぞれ分散力の効果を取り入れた HF-D 法と量子/古典化学的連続体モデルの hybrid 法の適用を試みた。その結果、両アプローチは化学的精度ならびに計算コストの観点から、タンパク質とリガンドの複合体のような大規模生体分子の相互作用解析において有用であり、物理化学的解釈に基づき阻害剤の作用メカニズムを定量的に理解する上で重要となると考えられる。

引用文献

- [1] Hitaoka, S., Chuman, H. *Pestic. Sci.* **2013**, 38, 60–67.
- [2] Yoshida, T., Munei, Y., Hitaoka, S., Chuman, H. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 850–860.
- [3] Kakeya, N., Aoki, M., Kamada, A., Yata, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17, 1010–1018.
- [4] 比多岡清司, 的場弘, 河野明大, 芝田雄登, 原田政隆, 坂本修平, 吉田達貞, 中馬寛. 第 40 回構造活性相関シンポジウム, KP06, **2012**.

< 正誤表 >

受賞講演要旨は、構造活性相関シンポジウム要旨集に掲載されたものをそのまま再掲することになっております。SAR News 編集段階で演者の方から次の訂正の連絡がありましたのでお知らせいたします。

	誤	正
KO08 要旨 2 ページ目 (p.24)	ΔG_{obs} の全体の変動に対する両者の相対的寄与は、 $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM/HF-D:Amber})$ (variance = 1.07 kcal ² /mol ²) に比べて $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}(\text{CPCM-GB}) + \Delta G_{\text{diss}}$ の方が有意に大きく (9.34×10^{-3})、BSA と CA の複合体形成における・・・	ΔG_{obs} の全体の変動に対する両者の相対的寄与は、 $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM/HF-D:Amber})$ (variance = 9.34×10^{-2} kcal ² /mol ²) に比べて $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}(\text{CPCM-GB}) + \Delta G_{\text{diss}}$ の方が有意に大きく (1.07)、BSA と CA の複合体形成における・・・

//// Activities ////

第 41 回 構造活性相関シンポジウム開催報告

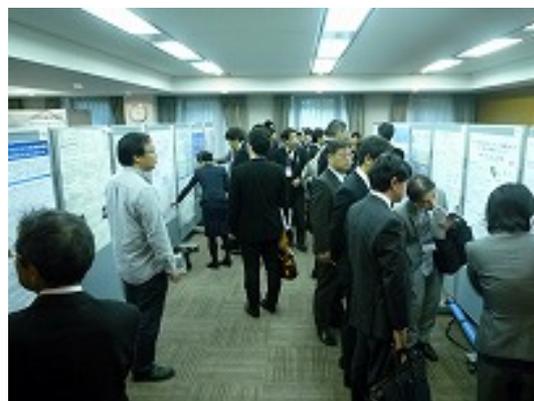
第 41 回構造活性相関シンポジウム実行委員長
 関西学院大学理工学部 岡田孝

晩秋の兵庫県西宮市において、第 41 回構造活性相関シンポジウム（会場：関西学院会館、会期：2013 年 11 月 7 日（木）～ 11 月 8 日（金）、主催：日本薬学会構造活性相関部会、協賛学協会：日本化学会、日本農芸化学会、日本分析化学会、日本農薬学会、有機合成化学協会）が開催されました。今回は理研計算科学研究機構と富士通株式会社のご好意で、前日にスーパーコンピュータ「京」の見学会を開催しました。昨年度に続き本シンポジウムの単独開催です。昨年からの新しい試みである口頭発表時間の 20 分への一本化、「構造活性相関シンポジウム優秀発表賞」（SAR Presentation Award）対象者拡大とランチョンポスターの 3 点は継続いたしました。

講演数も特別講演 1 件、招待講演 2 件、口頭発表 11 件（全件 Award 審査対象）、ポスター発表 28 件と例年に遜色ない数となり、参加者も 142 名（特別講演、招待講演、招待者含む）に達して、盛会のうちに終えることができました。これもひとえにご参加いただいた皆様と、実行委員の先生方並びに日本薬学会構造活性相関部会幹事の先生方のご助力、ご支援の賜と存じます。主催の日本薬学会構造活性相関部会と、協賛いただいた諸学協会に感謝するとともに、ご講演、ポスター発表いただいた皆様にお礼申し上げます。また、開催資金のご援助をいただいた日本薬学会と関西学院大学並びに関係企業等の皆様に深くお礼申し上げます。

伊東広樹先生（富士通次世代テクニカルコンピューティング開発本部）には「「京」誕生までの軌跡と次世代スーパーコンピュータ」の演題で特別講演をしていただきました。また、山西芳裕先生（九州大学生体防御医学研究所、高等研究院）には、「機械学習による薬物の標的分子や副作用の網羅的予測」、津本浩平先生（東京大学大学院工学系研究科、医科学研究所）には「相互作用の熱力学情報と創薬：SITE 法」と題して、それぞれのご専門の立場から貴重なご講演をいただきました。

次年度の第 42 回構造活性相関シンポジウムは、熊本大学薬学部今井輝子先生のお世話で、2014 年 11 月 13 日（木）～ 11 月 14 日（金）、くまもと森都心プラザ（熊本県熊本市）で開催の予定です。皆様のご参加、ご講演、ご討論によりますます活発なシンポジウムになりますよう、よろしく申し上げます。



///// Activities /////

〈会告〉

構造活性フォーラム 2014

「困難化する医薬品開発の現状と将来」

新規医薬品の開発は、年を追う毎に困難になってきている。開発の比較的容易な医薬品は既に上市されていて、開発に当たって何らかの壁にぶつかる医薬品が残されていくのであるから、蓋し当然ではある。しかし、この壁を乗り越えなければ、日本発の新規医薬品の開発は覚束ない。

本フォーラムでは、製薬企業、アカデミアが、近年、医薬品開発に関して取り組んでいるシステム、試みなどを、講師の先生方から伺い、今後の日本の医薬品開発のあり方に関して、長時間のパネルディスカッションにより、新たな方策を探るきっかけとしたい。

主催：日本薬学会構造活性相関部会

後援、協賛、共催等：日本化学会、日本分析化学会、日本農芸化学会、日本農薬学会、大阪大学大学院薬学研究科

日時：2014年6月27日（金）10:30-16:45

会場：大阪大学コンベンションセンター [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1、Tel: 06-6879-7171]

交通：（新幹線新大阪駅より）大阪市営交通御堂筋線 新大阪駅→（13分）→北大阪急行 千里中央駅→大阪モノレール 千里中央駅→（約15分）→大阪モノレール 阪大病院前駅下車、徒歩約10分。または、千里中央駅より阪急バス千里中央停留所 阪大本部前方面行き（6番のりば、103, 105, 164, 171系統）→（約10分）→阪大本部前下車、徒歩約3分。

（伊丹空港より）大阪モノレール 大阪空港駅→（約30分）→阪大病院前下車。

※大阪モノレールご利用の場合は、途中の万博記念公園駅にて彩都西方面へ乗り換えが必要な場合があります。

スケジュール：

講演1. 「アカデミア発創薬実現のための支援ネットワークの取り組み」

高子 徹（独立行政法人 医薬基盤研究所）

講演2. 「顧みられない熱帯感染症（NTDs）研究への取り組み」（仮題）

新美 達也（アステラス製薬株式会社）

講演3. 「Unstructured/Structured Interaction を標的にした創薬」

小路 弘行（PRISM BioLab 株式会社）

講演4. 「FINDS～テーマ公募型医薬品研究シーズ発掘の試み」

松本 弥生（塩野義製薬株式会社）

パネルディスカッション

申込方法：ホームページ（http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/jindex.html）から申込の上、参加費・懇親会費を下記の口座にお振込みください。

申込締切：6月13日（金）。これより後はご照会ください。

参加費：一般4000円、学生無料

懇親会：17:30-19:30 大阪大学内、カフェテリア「匠」にて。参加費5000円。

振替口座：三菱東京UFJ銀行 千里中央支店（店番号：240）（普通）0287351

構造活性フォーラム 2014 高木達也

問合せ先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6

大阪大学大学院薬学研究科 情報・計量薬学分野内

構造活性フォーラム 2014 事務局（実行委員長：高木 達也）

TEL: 06-6879-8243 FAX: 06-6879-8242 Email: sarforum2014@phs.osaka-u.ac.jp

//// Activities ////

〈会告〉

第1回 QSAR 解析ハンズオンセミナー

主催： 日本薬学会構造活性相関部会

会期： 2014年9月18日（木）～ 2014年9月19日（金）

会場： ニューウェルシティ湯河原
(〒413-0001 静岡県熱海市泉 107 <http://www.welcity-yugawara.co.jp/>)

内容： Classical QSAR、分子シミュレーション、ケモインフォマティクスなど、医薬品分子の論理的設計のための方法論が種々開発され、深化・多様化しています。これらの手法を適正に使用し、創薬研究に役立つ基本的な能力を養うために、チュートリアル形式の合宿セミナーを企画しました。セミナーでは、タンパク質／低分子複合体の立体構造や QSAR 式に基づく分子設計についての少人数グループワークも予定しており、議論を通じて分子設計に対する視野を広げ、創薬研究に役立つ実践力を高めていただこうと思っています。

チューター： 赤松美紀（京都大学大学院農学研究科）
大田雅照（中外製薬）
中尾和也（田辺三菱製薬）
中川好秋（京都大学大学院農学研究科）
本間光貴（理化学研究所）

募集人数： 約 30 名（最大 35 名）

参加登録費： [一般] 30,000 円、[学生] 20,000 円

予約参加登録のみ。参加費には宿泊費・食費（1泊3食）、教材が含まれます。

参加登録締切： 8月8日（金）締切。定員になり次第、受付を終了します。

参加登録方法： ホームページ（下記 URL）をご覧ください。

問合せ・申込先：

〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29
京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野内
第1回 QSAR 解析ハンズオンセミナー実行委員会 山下富義
Tel: 075-753-4535 Fax: 075-753-4575
E-mail: qsar-handson@dds.pharm.kyoto-u.ac.jp
<http://www.qsarj.org/handson>

//// Activities ////

〈会告〉

第 42 回構造活性相関シンポジウム

主催： 日本薬学会構造活性相関部会

後援： 日本化学会、日本農芸化学会、日本分析化学会、日本農薬学会、有機合成化学協会

会期： 2014 年 11 月 13 日（木）～ 2014 年 11 月 14 日（金）

会場： くまもと森都心プラザ

（〒860-0047 熊本市西区春日 1 丁目 14-1 <http://stsplaza.jp/>）

討論主題：

1. 生理活性物質の活性評価・構造展開・医農薬への応用
2. 基本パラメータ・基本手法・情報数理的アプローチ
3. 吸収・分布・代謝・毒性・環境毒性
4. In silico 技術（薬物-受容体相互作用計算、仮想スクリーニングなど）
5. バイオインフォマティクス
6. 分子情報処理（データベースを含む）・データ予測

発表形式： 口頭発表およびポスター（優秀な発表には SAR Presentation Award を授与）

発表申込： 6 月 2 日（月）～ 7 月 25 日（金）締切必着

(1) 演題、(2) 発表者氏名と所属、(3) 連絡先（住所、Tel、Fax、E-mail）、(4) 200 字程度の概略、(5) 口頭・ポスターの別、(6) 上記討論主題番号 を明記の上、Web サイトまたは E-mail でお申し込みください。詳細は、ホームページ上の発表申込要領をご覧ください。

講演要旨： 9 月 12 日（金）締切

詳細は、ホームページ上の講演要旨執筆要領をご覧ください。

参加登録予約申込： 10 月 24 日（金）締切

詳細は、ホームページ上の参加登録予約申込要領をご覧ください。

参加登録費： [一般] 予約 8,000 円、当日 9,000 円 [学生] 予約 2,000 円、当日 3,000 円

※要旨集前送希望の場合は、郵送料 1,000 円を別途申し受けます。

※費用振込み後、参加取り消しによる返金には応じられません。

懇親会： 11 月 13 日（木）18:30 頃 ホテル ニューオータニ

[一般] 予約 7,000 円、当日 8,000 円 [学生] 予約 3,000 円、当日 4,000 円

問合せ・申込み先：

〒862-0973 熊本県熊本市中央区大江本町 5-1

第 42 回構造活性相関シンポジウム実行委員会 今井輝子

E-mail: 42qsar@kumamoto-u.ac.jp

http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/jindex.html

//// Activities ////

部会役員人事

平成 26 年度から、部会長、副部会長、および SAR News 編集委員長が交代することとなりました。

部会長: 高木達也 (大阪大学大学院薬学研究科)

副部会長 (アカデミア): 中川好秋 (京都大学大学院農学研究科)

副部会長 (企業): 大田雅照 (中外製薬)

SAR News 編集委員長: 飯島 洋 (日本大学薬学部)

構造活性相関部会の沿革と趣旨

1970 年代の前半、医農薬を含む生理活性物質の活性発現の分子機構、立体構造・電子構造の計算や活性データ処理に対するコンピュータの活用など、関連分野のめざましい発展にもなっており、構造活性相関と分子設計に対する新しい方法論が世界的に台頭してきた。このような情勢に呼応するとともに、研究者の交流と情報交換、研究発表と方法論の普及の場を提供することを目的に設立されたのが本部会の前身の構造活性相関懇話会である。1975 年 5 月京都において第 1 回の「懇話会」(シンポジウム)が旗揚げされ、1980 年からは年 1 回の「構造活性相関シンポジウム」が関係諸学会の共催の下で定期的開催されるようになった。

1993 年より同シンポジウムは日本薬学会医薬化学部会の主催の下、関係学会の共催を得て行なわれることとなった。構造活性相関懇話会は 1995 年にその名称を同研究会に改め、シンポジウム開催の実務担当グループとしての役割を果たすこととなった。2002 年 4 月からは、日本薬学会の傘下組織の構造活性相関部会として再出発し、関連諸学会と密接な連携を保ちつつ、生理活性物質の構造活性相関に関する学術・研究の振興と推進に向けて活動している。現在それぞれ年 1 回のシンポジウムとフォーラムを開催するとともに、部会誌の SAR News を年 2 回発行し、関係領域の最新の情勢に関する啓蒙と広報活動を行っている。

本部会の沿革と趣旨および最新の動向などの詳細に関してはホームページを参照頂きたい。

(http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/index.html)

編集後記

日本薬学会構造活性相関部会誌 SAR News 第 26 号をお届けいたします。今号では、古典的 QSAR 手法について、最新の研究と今後の展望をテーマとしました。Perspective/Retrospective では赤松美紀先生 (京都大学) に QSAR の原点であるオーキシンの例などをご紹介いただき、古典的 QSAR がリガンド-受容体相互作用の理解にどのように役立っているか、またその重要性についてご解説いただきました。Cutting Edge では、多田幸雄先生 (東京大学) に、経口ヌクレオシド系抗癌剤の開発において、SBDD と同時に古典的 QSAR が活用された事例をご紹介いただきました。化合物の構造と生物活性の関係を、より多面的に把握するためには、今後も古典的手法を含めた QSAR の活用が重要だと感じられます。お忙しい中ご執筆いただきました先生方に、心よりお礼申し上げます。なお、今年 3 月まで編集委員を退任された久保寺英夫先生 (田辺三菱製薬) には、今号の編集の上でも大変お世話になりました。この場をお借りしてお礼申し上げます。この SAR News が今後とも構造活性相関研究の先端情報と展望を会員の皆様にご提供できることを、編集委員一同願っております。

(編集委員会)

SAR News No.26 平成 26 年 4 月 1 日

発行: 日本薬学会 構造活性相関部会長 高木 達也

SAR News 編集委員会

(委員長) 飯島 洋

福島 千晶

粕谷 敦

竹田-志鷹 真由子

* 本誌の全ての記事、図表等の無断複写・転載を禁じます。