

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月27日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590110

研究課題名（和文） 分子シミュレーションによる高活性リガンド探索法の開発

 研究課題名（英文） Development of a method to discover high affinity ligands  
using molecular dynamics simulation

研究代表者

仲西 功 (NAKANISHI ISAO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：10362576

研究成果の概要（和文）：

Free energy perturbation (FEP)法・Thermodynamic integration (TI)法を用い、既知リガンドの極微小な構造変化による高活性リガンドを探索する手法の検討を行なった。種々の条件検討を行ないながら本法をタンパク質-リガンド複合体系に適用した結果、Protein kinase CK2 のリガンドの活性変化を精度よく再現することに成功した。また、合成可能な化合物の網羅的なアフィニティ予測により、既知リガンドの活性を上回る可能性のあるリガンドの候補を見出した。最適化された計算法は、再現性も良好であり、創薬の現場でも活用できるレベルのものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The free energy perturbation (FEP)/Thermodynamic integration (TI) methods were applied to explore high affinity ligands with a small structural change to a known ligand. By changing various calculation conditions, affinity differences among protein kinase CK2 ligands could be reproduced with high accuracy. Possibly novel potent ligands for CK2 protein were discovered by exhaustive prediction of synthetic feasible ligands. The optimized calculation condition gives good reproducibility and this prediction method is useful in drug discovery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質、計算化学

## 1. 研究開始当初の背景

Structure-based drug design (SBDD)は、医薬品設計の有効な手段の一つとして日常的に活用されている。その中で計算化学の役割は、結合シミュレーション、結合エネルギー予測、QSAR 解析、バーチャルスクリーニング(VS)、

*de novo* デザインなど多岐にわたる。現在、計算化学が抱えている課題の一つは、デザインした化合物の活性予測にある。例えば 10 倍の活性差を予測するためには、結合自由エネルギー変化に換算して僅か 1.5 kcal/mol の差を識別しなければならない。長時間の分子シ

シミュレーションが必要な MM-PBSA や Linear interaction energy (LIE)法は、化合物の骨格を問わずリガンド分子のタンパク質結合親和力(アフィニティ)をまずまずの精度で予測できる手法としてよく用いられるが、10 倍の活性差を識別できるほどの精度はない。それに対し、リガンド分子のアフィニティ差を最も精度よく( $\sim 0.5$  kcal/mol)算出できる方法として古くから知られている Free energy perturbation (FEP) 法や Thermodynamic integration (TI)法は、創薬現場で活用されているという報告は少ない。おそらく原理的に計算対象にできる系が、エネルギー摂動の小さなものに限定されるため、応用範囲が狭いためであろう。また、一昔前では 3~4 週間にも及ぶシミュレーション時間が創薬のタイムスパンに合わなかったことも原因の一つとも考えられる。

一方、既存の化合物にメチル基や塩素原子を導入したり、複素環のヘテロ原子位置を変えたりする極微小な構造変化により、アフィニティが 10 倍以上向上する事例がしばしば観察される。このような構造変化は、前者では分子量や分子の物性を大きく変えることなく、また後者では物性や毒性を改善しつつアフィニティ向上を達成できる可能性が高く、リード最適化段階において極めて有用である。前述したように、リガンドの構造変化が小さな系の結合自由エネルギー変化( $\sim 2.5$  kcal/mol 程度)は、FEP 法や TI 法で精度よくアフィニティ予測できるため、構造変化が微小かつ合成可能な誘導体を網羅的にシミュレーションすることにより、その中から高活性化合物の発見を期待できる。昨今の CPU 性能の向上により 1 週間以内で 1 化合物のシミュレーションを完了できるようになったため、この方法は創薬現場において実用的な計算手法となりうる。

## 2. 研究の目的

本手法を多様な創薬ターゲットタンパク質に対して汎用性のあるシミュレーション手法とすることを最終目標とする。一般的に FEP/TI 法によるシミュレーションでは、原子が出現あるいは消える瞬間の水分子の配置の乱れに起因する誤差が顕著になると考えられる。従って、この点を改良するために、FEP/TI シミュレーションにおける新規な改良計算法あるいは計算プロトコルを考案する。具体的には、水分子の配置を乱さないように原子を消去する際にキャビティを残しておく、別途そのエネルギーを算出する方法を考える。次に、これまでに指摘されている塩素原子置換における予測精度の改善を検討する。解決策としては、シミュレーション手法の改善(水分子の再配置のための時間を長く取る)、あるいは塩素原子の計算パラ

メータの改良などを検討する。さらに、シミュレーション時間を短くするために、現在周期境界条件(PBC)系で実施している計算に関しては、水スフェア系(対象分子の周りに球状に水分子を配置する)計算への移行等を検討する。

最終的に、少しの計算条件の検討で、多様なタンパク質系に適用できる標準計算プロトコルを確立し、本手法を誰もが容易に活用できる汎用的なものとするを目標とする。具体的には、アクセラレータの補助なしに、5 日~1 週間程度で 1 リガンド系を完了できるような手法とすることを目標とする。

## 3. 研究の方法

研究は次に示す三つのステップに分けて実施した。まず、(1) FEP/TI 法の基本的な性能を、本プロジェクトの最も単純なモデル系である、ベンゼン $\leftrightarrow$ トルエン、ベンゼン $\leftrightarrow$ クロロベンゼン、ベンゼン $\leftrightarrow$ ピリジンの 3 つの系の水和エネルギー差の計算により検証を行なった。次に、(2) FEP/TI 法を実際のタンパク質複合体系に適用し、①血液凝固因子 FXa 複合体系における塩素置換、および② Protein kinase CK2 における複素環の変換、での実験値再現性、ならびに新規化合物探索への応用を試みた。また、(3) 計算スピードの向上、データの再現性、アプリケーション間での比較などを行い、本法の堅牢性を評価した。

## 4. 研究成果

前項 3. で記述した 3 つの課題について、その研究結果を以下に記述する。

### (1) 水和エネルギー差による検証

FEP/TI 法の基本的な性能を検証する目的で、最も単純なモデル系の一つである、ベンゼン $\leftrightarrow$ トルエン、ベンゼン $\leftrightarrow$ クロロベンゼン、ベンゼン $\leftrightarrow$ ピリジンの 3 つの系の水和エネルギー差の計算に適用し、検証を行なった。まず、メチル基置換、塩素原子置換となるベンゼン $\leftrightarrow$ トルエン、ベンゼン $\leftrightarrow$ クロロベンゼン系について、分子動力学計算プログラム CHARMM を用いて、水和自由エネルギー差の算出を実施した。その際、溶媒分子を溶質分子の周りに球状に配置する sphere 条件と立方体状に配置する周期境界(PBC)条件の 2 通りを試した。ベンゼン $\leftrightarrow$ トルエンおよびベンゼン $\leftrightarrow$ クロロベンゼン系それぞれの実測値 0.02 および -0.26 kcal/mol に対して、計算値は表 1 に示す通りとなった。いずれの計算系においても実験値との誤差は $\pm 0.5$  kcal/mol 以内と、精度よく実験値を再現できていた。ただし、ベンゼン $\leftrightarrow$ トルエン系では誤差は小さいものの、符号が逆転しているため、計算条件の改良により改善できるか否か検討が必要

と思われる。溶媒の配置法はケースバイケースであるが、今回のモデル系では計算時間が Sphere 系は PBC 系の約 2.5 倍かかることから、PBC 系のほうがコストパフォーマンスは高いといえる。

表 1. ベンゼン⇄トルエン、クロロベンゼン系

Solvent	Method	Toluene	Cl-benzene
Sphere	FEP	-0.41	-0.11
	TI	-0.31	-0.09
PBC	FEP	-0.24	-0.13
	TI	-0.15	-0.12
Experiment		0.02	-0.26

(kcal/mol)

一方、複素環の変換を想定したベンゼン⇄ピリジン系においては、同様の条件において実測値 -3.82 kcal/mol に対し、誤差が 1 kcal/mol 以上存在し、また試行毎の計算値も安定しなかった。この系においては、原子の消滅と大きな原子電荷の変化を伴うため、水の再配向に要する時間や原子の消滅時におけるエネルギー変化の制御など、計算条件を見直す必要があると考えられた。そこで、計算プログラムを CHARMM から Amber に変更するとともに、dual topology 法を用いて同様の計算を行なった。しかしながら、実験値との 1 kcal/mol 以上の誤差を解消することはできなかった（ちなみに本条件でもベンゼン⇄トルエン、クロロベンゼン系の実験値は再現できていた）。ここで、ピリジンの  $pK_a$  値に着目し、イオン化状態のピリジンを考慮したところ、水和エネルギー実測時の pH によっては（pH が 7.25 程度）、実験値を再現できることが明らかとなったが、論文に測定時の pH に関する記述がないことから、これ以上追求しないことにした。

## (2) タンパク質複合体での検証

### ①血液凝固因子 FXa 複合体

血液凝固因子 FXa を標的タンパク質とし、メチル基置換によるリガンドのアフィニティ変化を再現できるか検討した。温品らによる先行研究では、図 1 に示すリガンドの  $R^1 \sim R^4$  を H→Cl 変換した際に 1 kcal/mol 以内の誤差で実験値を再現できると報告されているが、データの再現性がないことが指摘されている。同じリガンドで、様々な計算条件を設定し計算を行なったが、精度の高い結果を得ることができなかった。最も問題となった点は、本リガンドはタンパク質と水素結合を形成しておらず、複合体としての安定なシミュレーションを行うことが困難なことである。また、FXa の S1 ポケットで認識されるチオフェン環に付く塩素原子と S1 ポケット底に位置するチロシン残基との Cl- $\pi$  相互作用

用が、力場では十分に考慮されていないことも問題であった。そのため、新たに Cl- $\pi$  相互作用を考慮できる力場パラメータを作成したり（学会発表(8)）、タンパク質構造の拘束を設定したりしたが、構造の安定化には寄与したものの、アフィニティの精度向上にはつながらなかった。本複合体系については、PBC 条件を試していないため、今後検討すべき点の一つである。

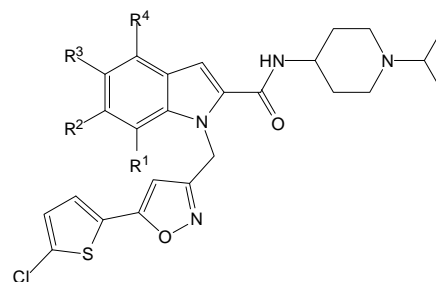
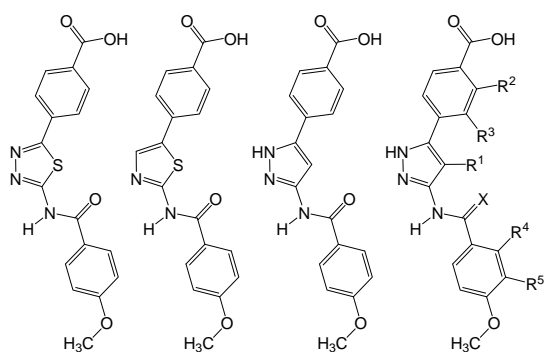


図 1. FXa リガンド

### ②Protein kinase CK2 複合体系

セリン-スレオニンリン酸化酵素である Protein kinase CK2（以下 CK2）を標的タンパク質とし、複素環変換によるリガンドのアフィニティ変化を再現できるか検討した。図 2 に示すチアジアゾール環を有する化合物 1 は、 $IC_{50} = 3.4 \mu M$  と中程度の CK2 阻害活性を示すが、チアジアゾール環をチアゾール環およびピラゾール環に変換した化合物 2 と化合物 3 は、化合物 1 に比べ、それぞれ 100 倍および 25 倍活性が増強する。極わずかな構造の変化が、これほどの活性変化をもたらすケースは、本法のテストケースとして最もふさわしいものである。そこで、これらのアフィニティ変化を TI 法で再現できるか試みた。Amber を用いて、切頂八面体型に水分子を配置し、PBC 条件にて TI 計算を実行した。その結果を表 2 に示すが、いずれのケースも計算誤差が 0.5 kcal/mol 以内の高精度で実験値を再現することに成功した。

そこで、今回の研究計画にはないが、本計算条件を用いて、置換基変換によって活性向上を見込める化合物を探索するために、化合物 3 を基本骨格とし、化合物 4a~4i をデザインし、そのアフィニティを予測した。その結果、化合物 4f が化合物 3 に比べ活性が 10 倍以上向上すると見積もられた。今後、これらの化合物を合成・活性測定し、計算の精度を確認する予定である。



化合物 1 化合物 2 化合物 3 化合物 4x

図 2. CK2 阻害剤

4a:R<sup>1</sup>=F, 4b:R<sup>1</sup>=Cl, 4c:R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>, 4d:R<sup>1</sup>=OH, 4e:R<sup>1</sup>=CN, 4f:R<sup>2</sup>=Cl, 4g:R<sup>3</sup>=Cl, 4h:R<sup>4</sup>=Cl, 4i:R<sup>5</sup>=Cl, 4j:X=S (4g~4i は R<sup>1</sup>=H, 4j 以外は X=O)

表 2. CK2 複合体系のアフィニティ差予測

	実測値	Amber	CHARMm
化合物 1→2	-2.73	-3.21	-2.18
化合物 1→3	-1.82	-1.72	—
化合物 3→4a	—	0.9	0.85
化合物 3→4b	—	1.5	1.80
化合物 3→4c	—	3.7	—
化合物 3→4d	—	1.4	—
化合物 3→4e	—	2.5	—
化合物 3→4f	—	-1.6	—
化合物 3→4g	—	-0.1	—
化合物 3→4h	—	0.3	—
化合物 3→4i	—	-0.3	—
化合物 3→4j	—	-0.6	—

(kcal/mol)

### (3) 計算諸条件の検討

CK2 複合体系において実測値をよく再現できる計算条件を得ることができた。この条件をベースとして①アプリケーション間での精度、②データの再現性の検討、③計算スピードの向上、について比較検討を実施した。

#### ①アプリケーション間での精度

CK2 複合体系において、Amber と CHARMM の二つのアプリケーションで計算値の比較を行った。その結果を表 2 に示す。実測値のある化合物 1→2 のアフィニティ差では、0.6 kcal/mol の誤差であり、Amber との精度の差はなかった。また、他の計算値においても、ほぼ同程度の予測値が得られており、アプリケーションによる計算精度の差は無いと考えられる。

#### ②データの再現性の検討

Amber による計算で、シミュレーションの初速度をランダムに変化させることにより、3 度の試行により計算値の再現性を解析した

ところ、計算値は平均値±0.2 kcal/mol にあり、十分な再現性が得られた。しかし、まれに大きく外れる、あるいは分子動力学シミュレーションが破綻することがあり、2~3 度の試行の平均値を求めるのがベターと考えられる。

#### ③計算スピードの向上

TI 計算は、一つの系の計算に 20 コア規模の PC ワークステーション計算機を用いても、1 週間~10 日くらいかかるヘビーな計算量を要する。したがって、計算の高速化は本法の創薬の現場での実用化において重要な課題である。研究計画段階での目論見では、Sphere 条件における孤立系の計算では、アクセラレーター (MD エンジン) を利用することにより、ハードウェア的に演算を高速化できると考えていた。しかし、FXa 複合体系での結果から、タンパク質のような巨大系の計算では Sphere 条件では、実験値の再現が困難である可能性が示唆された。計算条件の最適化の余地は残されているが、今回は PBC 条件での高速化の検討を優先して行なった。CK2 複合体系では、計算対象とする分子の周りに置く切頂八面体型の水分子層の厚さを種々変えて検討した結果、6 Å の時と 10 Å の時とでは計算値に大きな変化はないものの、計算時間は 1.5~2 倍程度異なった。したがって、網羅的に多種類のリガンドの計算を行なうような際には、水分子層の厚みに関して最初に時間をかけてでも最適な計算モデルを見出し、計算展開を行なうことが重要と考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

(1) N. Asada, D. G. Fedorov, K. Kitaura, I. Nakanishi, K. M. Merz. An Efficient Method to Evaluate Intermolecular Interaction Energies in Large Systems Using Overlapping Multicenter ONIOM and the Fragment Molecular Orbital Method. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2012**, 3, 2604-2610. 査読有

DOI: 10.1021/jz3010688

(2) N. Nagata, K. Kawai, I. Nakanishi. Subtle structural changes in tetrahydro-quinolines, a new class of nonsteroidal selective androgen receptor modulators, induce different functions. *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, 52, 2257-2264. 査読有

DOI: 10.1021/ci300219g

(3) Z. Hou, I. Nakanishi, T. Kinoshita, Y. Takei, M. Yasue, R. Misu, Y. Suzuki, S. Nakamura, T. Kure, H. Ohno, K. Murata, K. Kitaura, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, S. Oishi, N. Fujii. Structure-based Design of Novel Potent CK2 Inhibitors with Phenyl-azole Scaffolds. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 2899-2903. 査読有

DOI: 10.1021/jm2015167

(4) T. Ozawa, K. Okazaki, K. Kitaura. Importance of CH/ $\pi$  hydrogen bonds in recognition of the core motif in proline-recognition domains: An *Ab initio* fragment molecular orbital study. *J. Comp. Chem.*, **2011**, 32, 2774-2782. 査読有

DOI: 10.1002/jcc.21857

(5) T. Kinoshita, Y. Sekiguchi, H. Fukada, T. Nakaniwa, T. Tada, S. Nakamura, K. Kitaura, H. Ohno, Y. Suzuki, A. Hirasawa, I. Nakanishi, G. Tsujimoto. A detailed thermodynamic profile of cyclopentyl and isopropyl derivatives binding to CK2 kinase. *Mol. Cell Biochem.*, **2011**, 356, 97-105. 査読有

DOI: 10.1007/s11010-011-0960-9

(6) S. Nakamura, K. Takahira, G. Tanabe, T. Morikawa, M. Sakano, K. Ninomiya, M. Yoshikawa, O. Muraoka, I. Nakanishi. Docking and SAR Studies of Salacinol Derivatives as  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 20, 4420-4423. 査読有

DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.06.059

(7) K. Murata, N. Nagata, I. Nakanishi, K. Kitaura. SDOVS: A Solvent Dipole Ordering-Based Method for Virtual Screening. *J. Comput. Chem.*, **2010**, 31, 2714-2722. 査読有

DOI: 10.1002/jcc.21565

(8) K. Murata, N. Nagata, I. Nakanishi, K. Kitaura. Ligand Shape Emerges in Solvent Dipole Ordering Region at Ligand Binding Site of Protein. *J. Comput. Chem.*, **2010**, 31, 791-796. 査読有

DOI: 10.1002/jcc.21362

[学会発表] (計 1 1 件)

(1) 呉 竜英, 侯 増輝, 木下 誉富, 武井 義則, 安江 美里, 三須 良介, 鈴木 大和, 中村 真也, 大野 浩章, 村田 克美, 北浦 和夫, 平澤 明, 大石 真也, 藤井 信孝, 仲西 功. 「非経験的フラグメント分子軌道法を活用した高活性Protein Kinase CK2 阻害剤の設計」、第 40 回構造活性相関シンポジウム、2012 (愛知).

(2) 中西 伸介, 森脇 寛智, 中村 真也, 西脇 敬二, 仲西 功. 「分子シミュレーションを用いたProtein Kinase CK2 阻害剤の活性予測」、第 62 回日本薬学会近畿支部大会、2012 (兵庫).

(3) T. Kure, S. Nakamura, M. Kanemitsu, K. Murata, K. Kitaura, T. Kinoshita, Z. Hou, Y. Suzuki, H. Ohno, S. Oishi, N. Fujii, Y. Takei, M. Yasue, R. Misu, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, I. Nakanishi. Binding energy estimation of CK2 inhibitors by the *ab initio*-based fragment molecular orbital method. 22nd International Medicinal Chemistry Symposium 2012, 2012, Germany.

(4) 呉 竜英, 櫻井 淳史, 西脇 敬二, 中村 真也, 仲西 功. 「溶媒中における 3(5)-Amino-5(3)-arylpzazole 誘導体の互変異性体存在比率の予測」、第 10 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2012 (京都).

(5) 呉 竜英, 中村 真也, 宮野 菜央, 多田 俊治, 多賀 淳, 仲西 功. 「Srcファミリーキナーゼ特異的阻害剤SU6656 の選択性に関する計算化学的考察」、第 9 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2011 (神奈川).

(6) 永松 和彦, 中村 真也, 木下 誉富, 平澤 明, 辻本 豪三, 仲西 功. 「MM/PBSA法によるCK2 阻害剤へマテインの結合様式の予測」、第 34 回情報化学討論会、2011 (長崎).

(7) 中尾 佳人, 中村 真也, 仲西 功. 「FEP/TI 法によるリガンド間のタンパク質結合自由エネルギー差の評価」、第 34 回情報化学討論会、2011 (長崎).

(8) 中尾 佳人, 中村 真也, 仲西 功. 「分子力場計算におけるCl- $\pi$ 相互作用パラメータの作成と分子動力学計算による検証」、日本薬学会第 131 年会、2011 (静岡).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲西 功 (NAKANISHI ISAO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：10362576

### (2) 研究分担者

北浦 和夫 (KITAURA KAZUO)

神戸大学・システム情報科学研究科・

特命教授

研究者番号：30132723