

Ligand-Based Drug Designにおける3D-QSAR —有機カチオントランスポーター1リガンドの 三次元ファーマコフォア解析と結合部位モデリング—

広野 修一*・中込 泉

薬が効力を発揮するためには、投与されてから吸収・輸送過程を経て、細胞内あるいは細胞膜上にある酵素や受容体などのタンパク質（薬物標的タンパク質）と結合する必要がある。このような標的タンパク質と薬物の相互作用は、鍵（薬物）と鍵穴（タンパク質）にたとえられる。これらのミクロな鍵と鍵穴を構成しているものは有機分子であり、その相互作用は分子を構成している原子団のもつ性質を反映した分子間相互作用になる。そのため、通常鍵と鍵穴の関係に見られるような鍵の形が鍵穴に合う（立体相補性）だけでなく、鍵と鍵穴の構成分子の原子団の持つ電気的性質が相補的に合う必要がある（静電相補性）。また、生体内には体重の60%に相当する水が存在しているが、これに関連した疎水相互作用も重要である。鍵穴（タンパク質）と鍵（薬物）の疎水性基の周りに存在している疎水性水和水は、鍵（薬物）の疎水性原子団が鍵穴（タンパク質）の疎水性領域にきちんと入ること（疎水相補性）によって解放され自由な水分子となることでエントロピーが増大する（自由エネルギーが低くなる）。以上のような3つの相補性が、薬物—受容体相互作用を考える上でのキーポイントである。このような相補性に関与する薬物分子内の原子団の空間的配置（三次元ファーマコフォア）が薬理活性発現に重要であり、これを決定することが医薬品の合理的分子設計にとってのキーポイントである。すなわち、タンパク質と相互作用する原子団を特定の空間位置に配置するような分子を設計・合成することが医薬品開発の第一歩となる。

三次元ファーマコフォアを決定し、医薬品の合理的分子設計を進める際に、鍵穴（タンパク質）の立体構造が判っている場合（Structure-Based Drug Design: SBDD）と未知の場合（Ligand-Based Drug Design: LBDD）でアプローチの仕方が異なってくる。容易に推測できるように、鍵穴（タンパク質）の立体構造が未知の場合には、SBDDに比べて合理的医薬分子設計を行うことは困難になる。実際には、こちらの場合のほうがはるかに多く、解決すべき問題も数多く残っている。現在のところ、この場合に対する最も有効なアプローチは、同一の鍵穴（タンパク質）に適合する複数の鍵（分子）の立体構造を調べ、パターン認識の手法を用いて、これらの鍵（分子）

上の原子団空間配置の共通特徴を抽出し、三次元ファーマコフォアを決定する方法である。すなわち、同種の鍵の特徴から、前述の相補性に基づいて鍵穴の特徴を逆に推定し、医薬品の合理的分子設計を進めていくことになる。これがLBDDである。

この問題に対する我々の具体的な方法は、「同一のタンパク質の同一部位（鍵穴）に結合する化合物（鍵）には共通の構造特徴及び物理化学特性がある」という前提に基づいて、リガンド分子の特徴抽出から三次元ファーマコフォア情報を引き出すというものである¹⁾。手順としては、1) 複数のリガンド分子の立体配座集団の生成（マルチコピー高温分子動力学計算に基づく効率的なコンフォメーション解析）、2) 官能基特性に基づく分子重ね合わせ法、という2つの段階を通してリガンド分子の三次元構造特徴が抽出される。1) で生成される立体配座集団には活性コンフォメーションが含まれていることが経験的に確かめられている。2) の分子重ね合わせ法では、前もっての原子の対応は要求されず、客観的にすべての重なりが調べられるという特徴を持つ。この方法の具体的な応用例を次に示す。

近年、医薬品開発におけるトランスポーター研究の重要性が強く認識されているが、トランスポーターの薬物結合部位の立体構造が決定されていないため、SBDD手法を適用することはできない。ここでは、LBDD手法による計算化学的トランスポーター研究の例として、三次元定量的構造活性相関（3D-QSAR）解析を活用したOrganic Cation Transporter 1（OCT1）リガンドの三次元ファーマコフォア推定とOCT1上の薬物結合部位の立体構造モデリングについて紹介する。

OCT1の計算化学的研究

目的・背景 薬物トランスポーターは薬物の吸収・分布・代謝・排泄に関与し、薬物代謝酵素と並び薬物の体内動態を決定する重要な因子である。SLC22Aファミリーに属するOCT1は、主に肝臓における有機カチオンの吸収に関与し、基質を肝細胞内に取り込む役割を果たしている²⁾。OCT1は内因性のカチオンだけでなく、外因性のカチオン性薬物など広範な化合物を基質として認

*著者紹介 北里大学大学院薬学研究科創薬物理化学専攻（教授） E-mail: hironos@pharm.kitasato-u.ac.jp

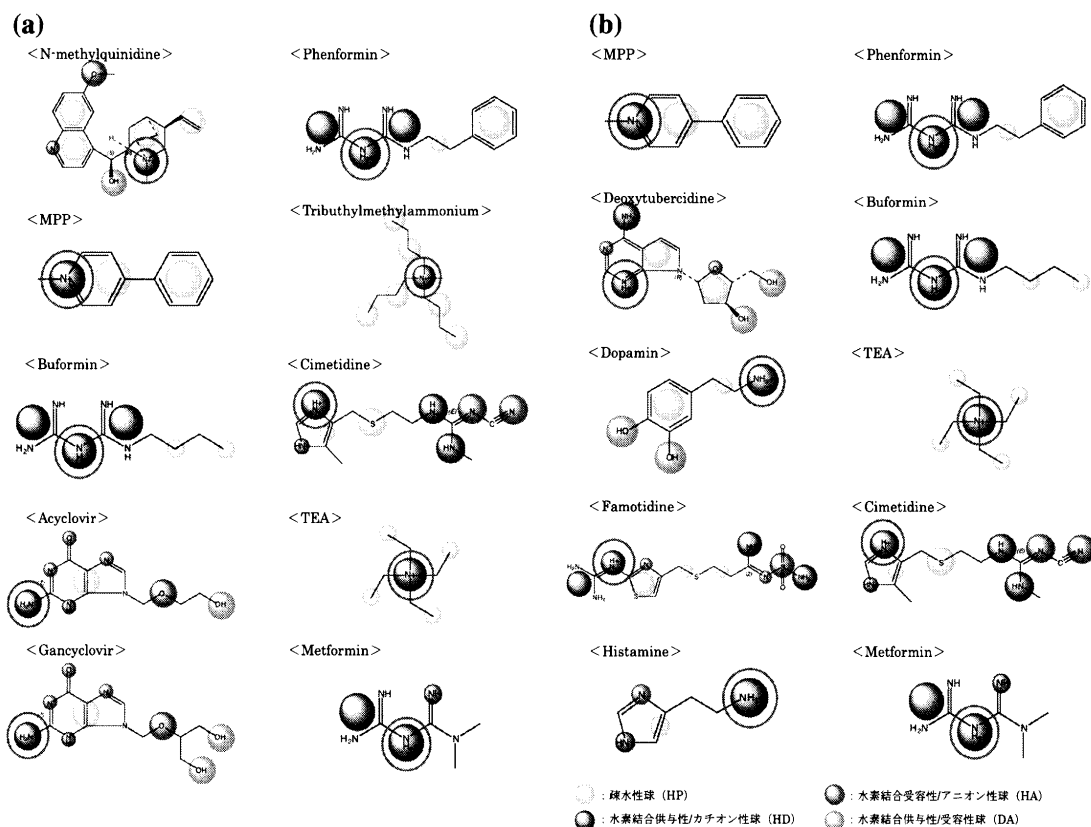


図1. ヒトOCT1 (a) とラットOCT1 (b) の解析に用いた10個のリガンド化合物に対する官能基特性球の配置

識することが分かっているが、その立体構造や基質認識機構の詳細についてはまだ明らかになっていない。そのため、OCT1とそのリガンド化合物の結合部位に関するより詳細な理解は、化合物の体内動態を考慮するための有用な情報になり、薬物輸送機構を考慮した分子設計において薬物体内動態的に有利な薬物を創出するための重要な要素になると考えられる。

そこで、当研究室で開発したLBDD手法（立体配座解析プログラムCAMDAS³⁾と分子重ね合わせ手法SUPERPOSE⁴⁾）を用いて、リガンドの結合配座および三次元ファーマコフォアを推定し、3D-QSAR解析を行った。さらに、ホモロジーモデリング手法によりOCT1のリガンド結合部位のモデリングを行い、リガンドとの相互作用様式を推定した。また、薬物の吸収・分布・代謝・排泄には種差があることが知られており、このことが動物を用いた前臨床試験では示さなかった毒性や動態がヒトに対して現れる要因になっている。そこでヒトとラット両方のOCT1を解析することにより、その分子認識機構および基質親和性の違いについても考察する。

方法 1) マルチコピー高温分子動力学 (MD) 法を利用したリガンド化合物の立体配座解析：ヒトまたはラットOCT1で輸送される各リガンド化合物に対して、当研究室で開発したプログラムCAMDASを用いて立体配座解析を行った。CAMDASでは、まず分子の任意の初

期構造を用いて高温分子動力学計算を行い、出現した立体配座を一定の時間間隔でサンプリングする。次に各立体配座に対してエネルギー極小化を行い、指定した二面角を比較することによってクラスタリングを行う。このようにして、最終的に重要なエネルギー極小立体配座集団を得た。本研究では、各化合物に対して初期配座をSybyl6.91で作製し、MD計算はMMFF94s力場から静電相互作用項と水素結合項を除いた中性力場を用いて、温度1200K、積分のタイムステップは1fsとし、100ステップごとに立体配座をサンプリングして1nsの計算を行った。2) 原子団の化学特性に基づいた分子重ね合わせ手法による結合配座の抽出：CAMDASにより得られた多数のエネルギー極小立体配座の中から結合配座を選び出すために、当研究室で開発された分子重ね合わせ手法SUPERPOSEを用いて重ね合わせ計算を行った。SUPERPOSEでは、分子内の各原子団（官能基）を疎水性 (HP)、水素結合供与性 (HD)、水素結合受容性 (HA)、水素結合供与/受容性 (DA) の4種類に大別し、ある一定の大きさを持った球（官能基特性球）として表現する。そして、各化合物の立体配座を並進・回転運動させて、官能基特性球同士の重なりが最良となる重ね合わせを出力する。本研究で用いた化合物の官能基特性球表現を図1に示す。

最初に、これらの化合物の中でOCT1との親和性が高

特 集

い化合物（ヒト OCT1 では3化合物，ラット OCT1 では4化合物の配座）を総当たりに重ね合わせ，官能基特性球の重なり方の違いによってパターン分けした。次に，各パターンに対して残りの化合物をすべて重ね合わせ，結合配座候補モデルを作成した。3) 三次元定量的構造活性相関（3D-QSAR）解析：重ね合わせ計算で得られた結合配座候補モデルに対して 3D-QSAR 手法として最もよく使用されている CoMFA 解析を行った。各リガンドに対して MOPAC2002 を用いて MNDO-ESP 法で原子電荷を計算し，CoMFA フィールドの静電エネルギーと立体エネルギーを計算した。活性データとしては，リガンドの K_m 値の対数 $\log(1/K_m)$ を用いた。CoMFA フィールドの計算では，格子間隔を 2 Å に設定し，プローブ原子として +1 の電荷を持った sp^3 炭素原子を置いた。パターン分けした複数のモデルの中で予測相関係数 q^2 値の最も高いモデルを結合配座モデルとして選択した。4) OCT1 の立体構造のホモロジーモデリング：本研究ではヒトおよびラット OCT1 のホモロジーモデリングの鋳型タンパク質として，*Escherichia coli* の Lactose Permease LacY の X 線結晶構造（PDB ID：1PV6）⁵⁾ を用いた。各 OCT1 と鋳型タンパク質との配列アライメント探索には，RPS-BLAST を使用した。得られた配列アライメントを入力として Ogata らが開発した FAMS⁶⁾ を用いてホモロジーモデリングを行った。5) タンパク質-リガンド複合体の構築：ラット OCT1 において Trp218, Tyr222, Thr226, Ala443, Leu447, Gln448, Asp475 の7個のアミノ酸が基質認識や輸送に重要であると実験的に同定されている⁷⁻⁹⁾。モデリング構造において，これらのアミノ酸が存在する部位がリガンド結合部位であると予測した（ヒト OCT1 に対しても，対応するアミノ酸が存在する部位がリガンド結合部位であると予測した）。予測したリガンド結合部位に対して，LBDD 手法により求めた結合配座のコンフォメーションを維持したまま UNITY3D を用いてタンパク質-リガンド複合体を構築した。そして，リガンドのコンフォメーションにあわせて結合部位のアミノ酸残基の位置・配向をエネルギー極小化することによって構造最適化した。

結果と考察 1) CAMDAS による立体配座集団の生成および SUPERPOSE による結合配座の抽出：各リガンド化合物に対して CAMDAS 計算を行い，立体配座集団を生成した。生成したエネルギー極小立体配座の総数と最安定構造からエネルギーが 12 kcal/mol 以内の立体配座数を表1に示す。

SUPERPOSE を用いて重ね合わせを行い抽出した結合配座モデルの重ね合わせ図，および三次元ファーマコフォアを図2に示す。

ヒトおよびラット OCT1 の三次元ファーマコフォア

表1. ヒト OCT1 (a) とラット OCT1 (b) のリガンド化合物の立体配座解析結果

(a)				
ヒト OCT1 基質	K_m 値 (μ M)	p K_m	全立体 配座数	12 kcal/mol 以下の 立体配座数
N-Methylquinidine	11.5	4.94	75	59
Phenformin	15.9	4.80	371	368
1-Methyl-4-phenylpyridinium	30	4.52	8	8
Tributylmethylammonium	53	4.28	3975	3689
Buformin	73.8	4.13	716	714
Cimetidine	111	3.95	1159	1157
Acyclovir	151.2	3.82	130	130
Tetraethylammonium	464	3.33	166	165
Ganciclovir	516.2	3.29	420	420
Metformin	539	3.27	51	48
(b)				
ラット OCT1 基質	K_m 値 (μ M)	p K_m	全立体 配座数	12 kcal/mol 以下の 立体配座数
1-Methyl-4-phenylpyridinium	9.4	5.03	8	8
Phenformin	15.9	4.80	371	368
Deoxytubercidine	23	4.64	60	51
Buformin	48.8	4.31	716	714
Dopamine	51	4.29	16	16
Tetraethylammonium	84	4.08	166	165
Famotidine	85.4	4.07	1742	1369
Cimetidine	91.6	4.04	1159	1157
Metformin	377	3.42	51	48
Histamine	300	3.52	14	16

は，空間配置に多少のズレはあるが，共に水素結合供与性球1個，疎水性球2個と共通であった。

2) 3D-QSAR 解析：ヒトおよびラット OCT1 の結合配座モデルの CoMFA 解析の結果を表2に示す。

ヒトでは q^2 値が 0.42，ラットでは 0.72 であった。 q^2 値は 1 に近いほど活性予測式の質が良いことを示しており，CoMFA 解析の場合 q^2 値が 0.3 を超えると信頼性のある式であると考えられている¹⁰⁾。よって本研究ではどちらも良好な q^2 値が得られており，妥当なモデルであると考えられる。また，各モデルの CoMFA 等高線図（立体場+静電場）を図3に示す。

3) ホモロジーモデリングおよび複合体構築：本研究で構築したヒトおよびラット OCT1 のタンパク質-リガンド複合体の構造を図4に示す。

ラット OCT1 もヒト OCT1 も共に，リガンドのカチオンまたは水素結合供与性部分がタンパク質のアスパラギン酸（ヒトでは Asp474，ラットでは Asp475）と主に相互作用していた。実験的に基質認識に重要とされている他のアミノ酸もリガンド結合部位の近傍に位置しており

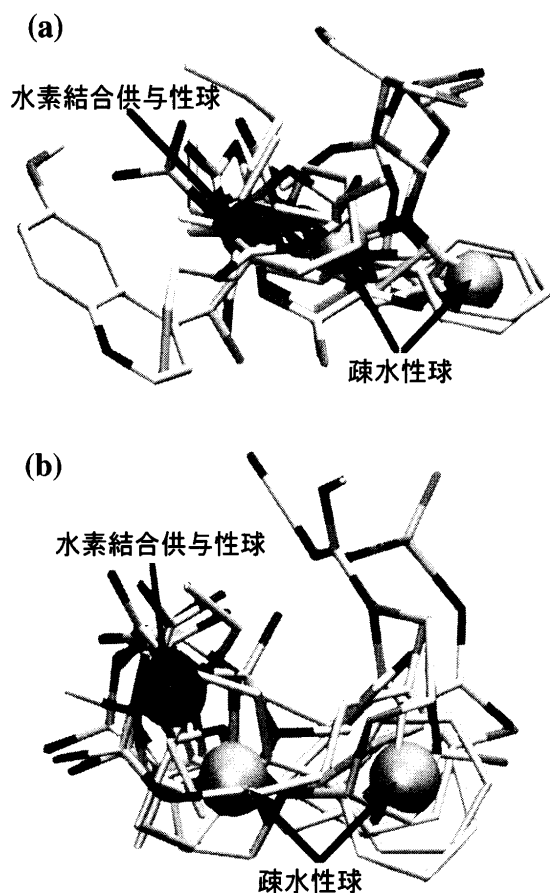


図2. ヒト OCT1 (a) とラット OCT1 (b) の結合配座モデルと三次元ファーマコフォア

表2. ヒトおよびラット OCT1 の結合配座モデルの CoMFA 解析の結果

	Cross-validated			Conventional			Contribution	
	q ²	S _{press}	成分数	r ²	F	s	ST	EL
OCT 1								
ヒト	0.42	0.53	2	0.96	81.66	0.14	0.68	0.32
ラット	0.72	0.36	2	0.99	339.57	0.07	0.72	0.28

妥当な複合体構造であると考えられる。また、CoMFA 解析の結果から得られた等高線図に対しても、矛盾しない複合体構造が得られた。

おわりに

新規医薬品を合理的に開発するための第一歩は、3次元ファーマコフォアを決定することである。Structure-Based の場合は、標的タンパク質-リガンド分子複合体を構築することで、比較的容易に3次元ファーマコフォアを同定することができる。しかし、Ligand-Based の場合、3次元ファーマコフォアの同定にはかなりの創意工夫が必要である。ここに示した“3D-QSAR を活用した3次元ファーマコフォア推定法”は、主作用のファーマコ

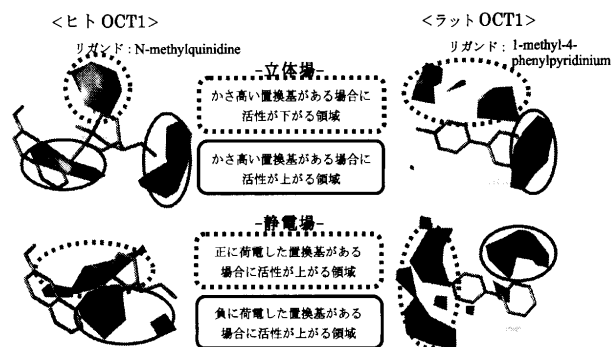


図3. ヒト OCT1 (a) とラット OCT1 (b) の結合配座の CoMFA 等高線図

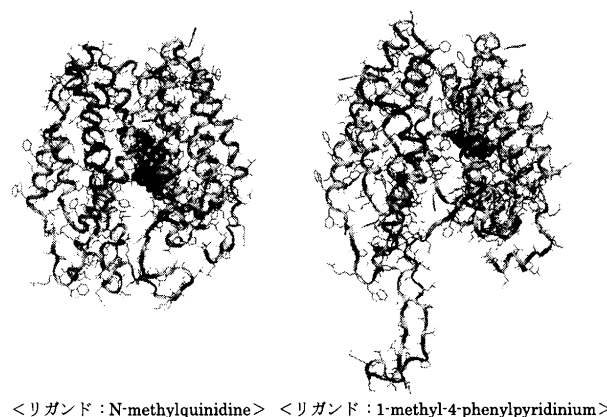


図4. モデリングしたヒト OCT1 (a) とラット OCT1 (b) の三次元構造とリガンド結合様式

フォア同定だけではなく、副作用の無い薬物に改良するための副作用ファーマコフォア解析にも適用可能である。また、3次元ファーマコフォアを同定すると共にその分子の活性(結合)配座を求め、その構造での当該分子の電子状態などを調べることによって、分子のアイソステリック変換の指針が得られ、これまでとは異なった母核構造を持ち、かつ副作用の無い洗練された新規医薬品の合理的開発につながっていくと期待される¹¹⁾。

文 献

- 1) Hirono, S. *et al.*: *Pharm. Res.*, **22**, 260 (2005).
- 2) Koepsell, H. *et al.*: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **150**, 36 (2003).
- 3) Tsujishita, H. and Hirono, S.: *J. Comput. Aided. Molec. Design.*, **11**, 305 (1997).
- 4) Iwase, K. and Hirono, S.: *J. Comput. Aided. Molec. Design.*, **13**, 499 (1999).
- 5) Abramson, J. *et al.*: *Science*, **301**, 610 (2003).
- 6) Ogata, K. and Umeyama, H.: *J. Mol. Graph. Model.*, **18**, 258 (2000).
- 7) Popp, C. *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1600 (2005).
- 8) Gorboulev, V. *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1612 (2005).
- 9) Gorboulev, V. *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **56**, 1254 (1999).
- 10) Clark, M. and Cramer, R. D. III: *Quant. Struct. Act. Relat.*, **12**, 137 (1993).
- 11) Tsuchida, K. *et al.*: *J. Med. Chem.*, **49**, 80 (2006).