

コンピューター支援による薬物設計研究
～新しい作用機序の抗菌剤の開発を目的として～

吉田 稔夫
久光製薬株式会社 研究開発本部
TTS 研究所
茨城県つくば市観音台 1-25-11

The Study of Computer Aided Drug Design
Toshio Yoshida
Hisamitsu Pharmaceutical Co.,Inc.
R&D Division TTS Research Laboratories
1-25-11 Kannondai Tsukuba Ibaraki, 305-0856 JAPAN

Abstract

RRF (Ribosome Recycling Factor) is a one of the important factor in the protein biosynthesis of procaryotes, and searching for this inhibitor , therefore, can perform the invention of new antibiotics. Using the technique of CARDD (Computer Aided Drug design), we predicted the drug-enzyme interaction part in the 3-dimensional RRF structure, and before we performed *in vitro* and *in vivo* assay, we tried to study “virtual screening of RRF inhibitor”. We tested 17,972 compounds by computer, and found 18 hopeful compounds. So we assayed these compound, finally , we discovered one compound which is the candidate of RRF inhibitor. By combining the technology stated by this research, we don't need to synthesize and evaluate the biological effect of many compounds actually, and we will get good result at few work.

Key_word

CARDD(Computer Aided Drug Design), RRF(Ribosome Recycling Factor), Virtual screening, SiteID, SYBYL

緒言

近年の世界における新薬開発の手法としては、ゲノム創薬、コンビナトリアルケミストリーの手法を用いたランダムスクリーニング等があげられる。新薬開発費用の巨額化が切実な問題となっている現状で、これらの方法は新薬として開発できる可能性や、副作用軽減、個体特異性等に優るものであるが、費用と時間が大変かかるものでもあり、企業体力の強化が必須となるものである。そこで、薬物のターゲットを決めた上でそのターゲットに対してコンピューターの支援と NMR や X 線結晶構造解析により決定された 3次元構造を用いて創薬を行う、いわゆる CARDD(Computer Aided Rational Drug Design; コンピューター支援理論的薬物設計)という手法も利用されていて、成果を挙げつつある。その良い例としては、HIV の阻害剤としてその素晴らしい効果が認められているプロテアーゼ阻害剤が挙げられる。1989 年に設立された Vertex Pharmaceuticals Incorporated(USA)は CARDD の手法で上記の HIV プロテアーゼ阻害剤(Fig.1 中央部の化合物)である Agenerase (GlaxoSmithKlain / Kissei)を既に上市しており、更にウィルス疾患、炎症、癌、自己免疫疾患や神経疾患の治療薬剤 8 つが臨床段階にあり確実に実績を挙げている。



Fig. 1 HIV protease with inhibitor.

我々も様々な情報を利用したコンピューター支援による薬物設計を目的として、High Throughput Screening(HTS)とともに CARDD システムを導入した実験を行っている。今回我々は、当初その構造も未知であった、1970 年に発見された原核生物のタンパク質生合成系に必須である因子 Ribosome Recycling Factor(RRF)に注目することにした。尚、この RRF が創薬の新しい標的タンパク質というのは以下の理由による。第 1 に RRF が関与するタンパク質合成第 4 ステップは、細菌のような原核生物とヒトのような真核生物ではその機構が異なり、RRF は細菌にとっては必須であるが、真核生物にとっては必須ではないという点である。従って、RRF 阻害剤は細菌にのみ選択毒性を有することが期待される。これはイースト菌の中から RRF 欠損株を分離し、その成長は全く正常と変わらないことを発見したインディアナ大学のウェック教授の知見に基づくものである。第 2 に、RRF の阻害は細菌成長阻害だけでなく細菌の生理状況によっては致死効果がある。抗菌剤には一般のタンパク質合成阻害剤のように細菌の成長、増殖は止めるが死に至らさないもの(テトラサイクリン、エリスロマイシン等)とペニシリン等の様に細菌を殺すものがある。RRF を細菌内で不活性化すると、成長期にある細胞にはテトラサイクリンの如く増殖阻害のみであるが、静止期 (Stationary phase) から

増殖期に移る段階にある細菌は死亡する。一般に病原菌が体内に存在する場合、増殖期よりも静止期と増殖期を繰り返すパターンが多いので、多くの場合 RRF 阻害は致死的に働くと考えられ、効果的な抗菌作用が充分期待される。大腸菌に関して可溶性タンパク質合成因子の欠如が致死的に働く場合は、RRF のみであるので、その意味でも RRF を標的とした抗菌剤はユニークである。従って RRF 阻害剤は細菌を死滅させる効果が期待されることから、生体防御機能が低下したエイズ患者などの日和見感染処置などにも効果が期待できる¹⁾。この様に、RRF 阻害剤を見出すことは真核生物であるヒトに副作用が無く、原核生物である細菌類のみダメージを与えるという画期的な薬を提供するということになる。では、具体的にそのタンパク質生合成過程がどういうものか以下に述べる。

一般にタンパク質生合成過程は「開始」、「伸長」、「終止」の3つのステップからなるといわれている。

第1ステップ(開始)：タンパク質合成が開始される前に、リボソームは大小2つのサブユニットに解離する。合成はこの解離した小サブユニット(30S)とメッセンジャーRNA(mRNA)、ホルミルメチオニルトランスファーRNA(fMet-tRNA)、開始因子(initiation factor:IF)の3種のタンパク質およびグアノシン5'-三リン酸(GTP)の会合によって30S開始複合体(30S initiation complex)を形成することから始まる。30S開始複合体の形成後、つづいて大サブユニット(50S)がこの複合体に結合して、70S開始複合体(70S initiation complex)を形成する。50Sには二つのtRNA結合部位があり、それぞれP部位(ペプチジル部位：fMet-tRNAがリボソーム上で結合している部位)、およびA部位(アミノアシル部位)と呼ばれている。

第2ステップ(伸長)：P部位にfMet-tRNAが結合すると、70S開始複合体のA部位には開始コドンの隣のコドンと対合するアンチコドンを持つtRNA分子が結合できるようになる。A部位にアシル化tRNAが結合(この反応は伸長因子(elongation factor:EF)であるEF-TuとGTPが必要)すると、ペプチジルトランスフェラーゼ(peptidyl transferase)と呼ばれる酵素複合体によってN-ホルミルメチオニンとtRNAに結合したアミノ酸との間にペプチド結合が形成され、また、その際にN-ホルミルメチオニンはP部位のfMet-tRNAから切離される(EF-Tuはこの時EF-Tsの働きでリボソームから遊離する)。ここでリボソーム上では、

- 1) アミノ酸を放したP部位のtRNAはこの部位を離れる。
- 2) ペプチジル-tRNAがA部位からP部位に移動する。
- 3) mRNAが3塩基分の距離だけ移動し、A部位には次のコドンが現れる。

という3種類の動きがみられる。2)、3)の動きをトランスロケーション(translocation)と呼ぶ。この反応を触媒するのがEF-Gである。mRNAの移動が起きるとA部位に次のコドンに対応するアンチコドンをもつアシル化-tRNA分子が結合し、上記の過程が繰り返されてペプチド鎖が次々に長くなる。

第3ステップ(終止)：ペプチド鎖の伸長が進行し、終始コドン(UAA, UAG, UGA)に到達すると、A部位に結合できるアシル化-tRNAは存在しないため鎖の伸長は停止する。そしてこれらの停止信号を認識する終結因子(release factor:RF)が働いて、完成したペプチド鎖はリボソームを離れる。この反応後「終止コンプレック

ス」と称する複合体が残される。この第3ステップまでが今までの通説であったが、さらにタンパク質合成には続きのステップがあり、それが第4(再利用)ステップである。

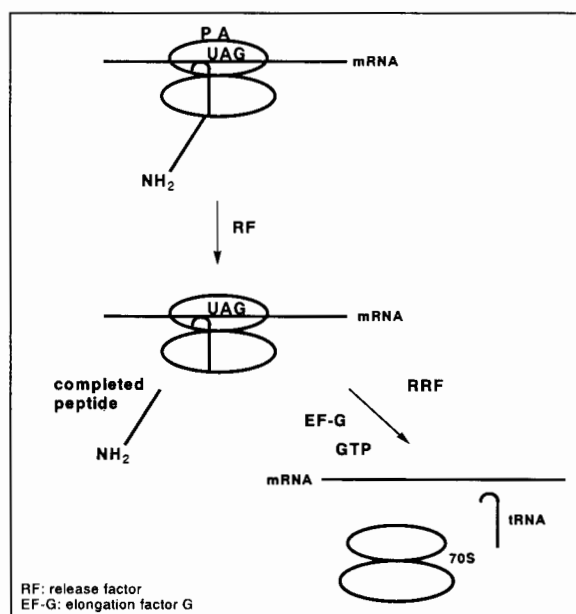


Fig.2 Protein bio-synthesis step and ribosome recycling step

第4ステップ(再利用)：第3ステップで残された終止コンプレックスは mRNA、tRNA、及び70S リボソームよりなる。この複合体をそれぞれの要素に分解して再利用することが第4ステップで、これを司るのが RRF である。即ち、タンパク質合成の1ラウンド後にタンパク質合成のために使用した道具であるリボソームその他を再利用するための酵素が RRF である。この際 RRF はもう一つの因子 EF-G と GTP と協力してこの再利用作業を行う。この模式図を Fig.20 に示す。リボソームは mRNA 上に残されるとそのまま新しく翻訳反応を続け、生体には関係ない不必要なタンパク質を生成してしまうので、ポストターミネーション複合体は直ちに解体されねばならない。更に RRF 反応が行われないと、細菌の場合一つの mRNA 上に多くの遺伝子情報があるために、下流にある遺伝子情報の翻訳にも支障をきたすことになる。以上の理由からこの第4のステップ、つまりリボソーム、mRNA、tRNA の再利用作業は細菌にとって不可欠かつ重要なステップである。このステップを司るのが RRF である(Fig.2)。

我々はこの RRF の3次元構造からその活性部位の探索を行い、さらには推定した活性部位と相互作用すると思われる化合物のコンピューターによるバーチャルスクリーニングを行ったので、以下に述べる。

実験方法

この研究を始めた当初、RRF は一次配列のみ決定されていた。その後の研究で、RRF が185残基からなるタンパク質であり十分 NMR を測定できる分子量であることもあって、NMR での構造決定や、複数の研究グループからの X線結晶構造解析による3次元構造の報告がなされた^{2) 3) 4) 5) 6) 7)}。これらの3次元構造を使用し、その RRF と薬物との相互作用部位の探索を行った。

そこで L. Janosi らの大腸菌 RRF への部位特異的変異導入の方法を用いて検討した結果(Fig. 3)⁸⁾、図に示すような残基が重要であることが判明した。また、大腸菌の RRF に変異を導入したタンパク質を作製し、そのリボゾームへの結合の変化を表面プラズモン測定装置(BIACORE2000)を利用して観測することにより、相互作用に特に重要な残基の候補を Arg132 に絞り込んだ⁹⁾。

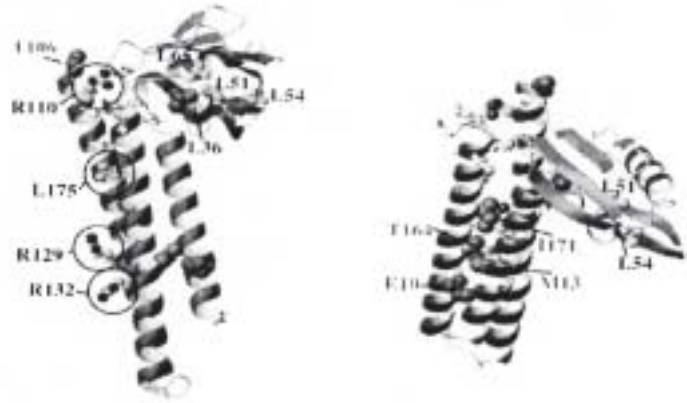


Fig. 3 Critical residues of *E.coli* RRF Molecule

このように分子生物学的な手法からも種々の重要な情報を収集できたが、それとは独立して RRF の構造から相互作用部位予測をコンピューターシミュレーションすることを計画し、“SiteID”(TRIPOS)を使って PDB で公開されているいくつかの RRF の立体構造を用いて相互作用部位の予測を行うことにした。尚、“SiteID”は、活性ポケットを探索するための SYBYL(TRIPOS)のモジュールの1つである。

実際の作業ステップとしては、まず検討する PDB 収載タンパク質に、計算上水素原子を付加した後、モジュール“SiteID”を起動し、その検討するタンパク質の形状が平坦か起伏に富んでいるかをパラメータで規定し、タンパク質の周りに1層の水分子を模した球を配置する。さらに検討に考慮する配置した球と近傍の球の距離範囲を規定し、活性ポケットと認識するために必要な球の数も規定する。ここで、検討するタンパク質の座標がX線結晶解析データであれば、含まれる結晶水などの座標を消去しておく必要がある。この作業を行い、モジュールを実行することにより候補となる活性ポケットを計算により表示させる。

まず実際に検討しようと考えた手法の妥当性を評価するために、次のような検討を行った。活性ポケットとそのリガンドがともに PDB に収載されていることと、タンパク質の表面の状態が RRF と同様にどちらかというと平坦である FK バインディングプロテイン(ID 番号: 1BKF)を用いて検討を行った。FK バインディングプロテインでは PDB にリガンド FK506 が入った 1BKF と FK506 がいないもの(ID 番号: 1D6O)が収載されている。リガンドが結合すると、タンパク質全体の構造が変化するものも多いので、この二つをコンピューター上で重ね合わせを行って、その構造を比較したところほぼ主鎖の流れは同じであった(Fig. 4)。従って、リガンドの有無による目的のタンパク質の構造変化はほとんどないと判断して、1BKF を使用して以下の検討を行った。

まずリガンドである FK506 の座標をデータより削除し、さらに計算のためにコンピューター上で水素原子を付加し、“SiteID”規定値 (Minimum pocket concavity; 2, Minimum pocket size; 6, Sphere radius around each solvent atom; 8.0Å)で活性ポケットを探索したが、残念ながら目的とするものが1つも見出されなかった。

従って、パラメータを変更して活性ポケットを見出すことが出来る検索条件について検討を行った。予め

表面の平坦な RRF タンパク質で使用しようと考えていたパラメータデータセット(Minimum pocket concavity; 1, Minimum pocket size; 6, Sphere radius around each solvent atom; 10.0Å)という条件で探索を試みたところ、Fig.5 に

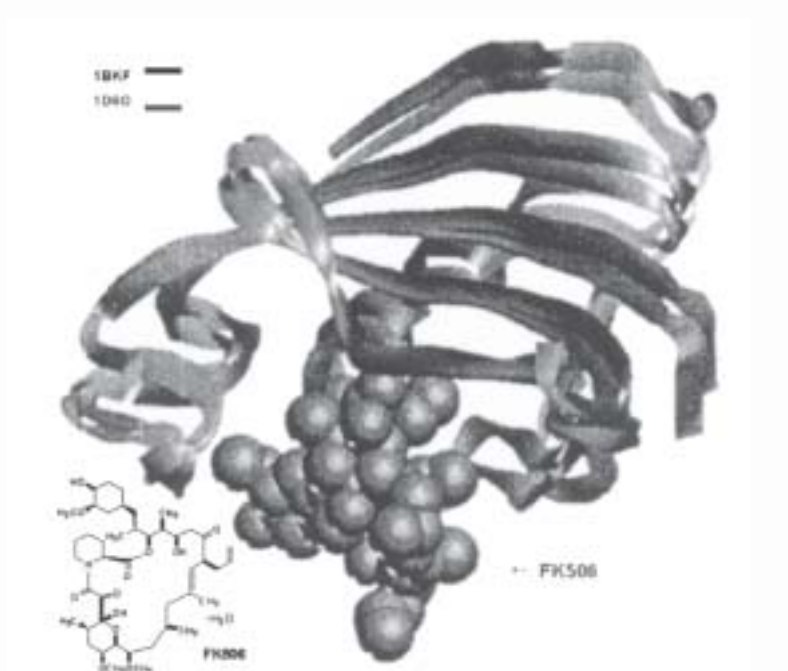


Fig. 4 Superimpose of 1BKJ and 1D6O

示すように淡色の球の集合と濃色の球の集合の2つの活性ポケットの候補を見出した。この2つの候補のうち
の1つ(図中上方の淡色の球の集合で示した部分)が FK506(上方の淡色の球の集合に重ね合わせた濃色の球の
集合)が作用する活性ポケットに合致した(Fig. 6)。

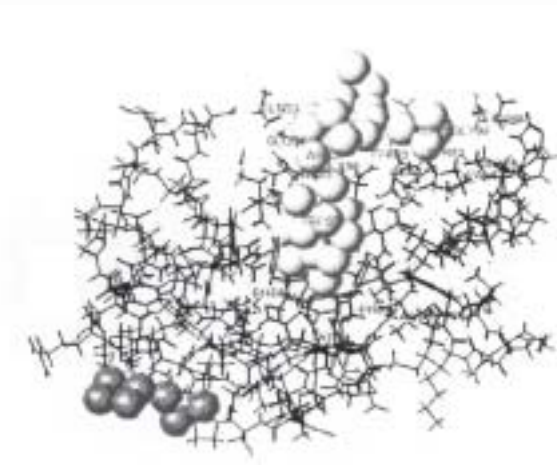


Fig. 5 Searching active pocket of 1BKJ by SiteID

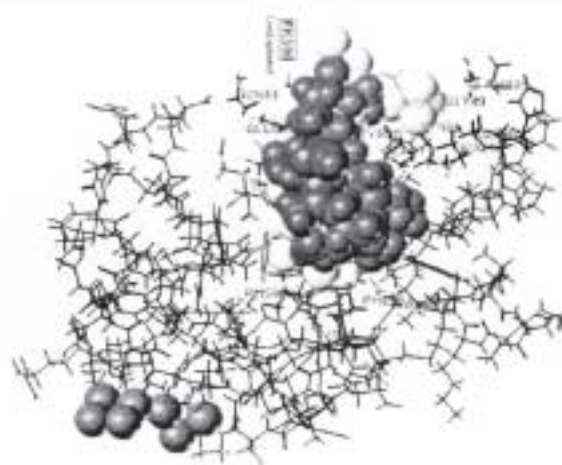


Fig. 6 Superimpose of FK506

このことから、このパラメータデータセットが使用できると判断し、まずは実際に PDB に収載されている大腸菌由来 RRF の立体構造(ID 番号: 1EK8)を使用して検討を開始した^{5) 6)}。1EK8 は、ヘリックス構造部分のドメイン I とドメイン II を結ぶつなぎの部分に界面活性剤 decyl-β-D-maltopyranoside が入り込んで、通常

90度の角度である2ドメイン間の角度が110度になっている。今回はそのままこの座標を使用することにして、コンピューター上でタンパク質に水素原子を付加し、decyl- β -D-maltopyranoside、結晶水などを削除した初期入力データを作成した。これで、"SiteID"により活性ポケットを探索したところ8個の活性ポケットの候補が得られた(Fig. 7)。その8個の活性ポケットの1つに、つなぎの部分(Hinge part)があり、decyl- β -D-maltopyranoside が占有していた部分に相当していた(Fig. 8)。その他にも、本節の始めに述べた部位特異的変異導入による RRF の活性残基が含まれており、その中には表面プラズモン測定装置(BIACORE2000)で判明したりボゾームへの結合に重要な残基(Arg132)も含まれていた。

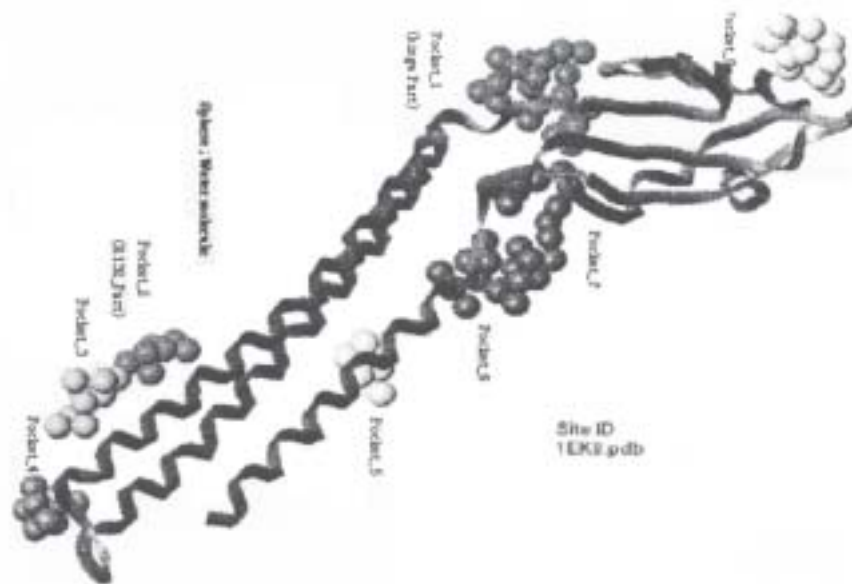


Fig. 7 Candidates of Active pocket 1EK8 by SiteID

以上により、コンピューターを使用した RRF タンパク質の相互作用部位の推定ができたので、次のステップとしてこの部位に適合する化合物のパーチャルスクリーニングを計画した。

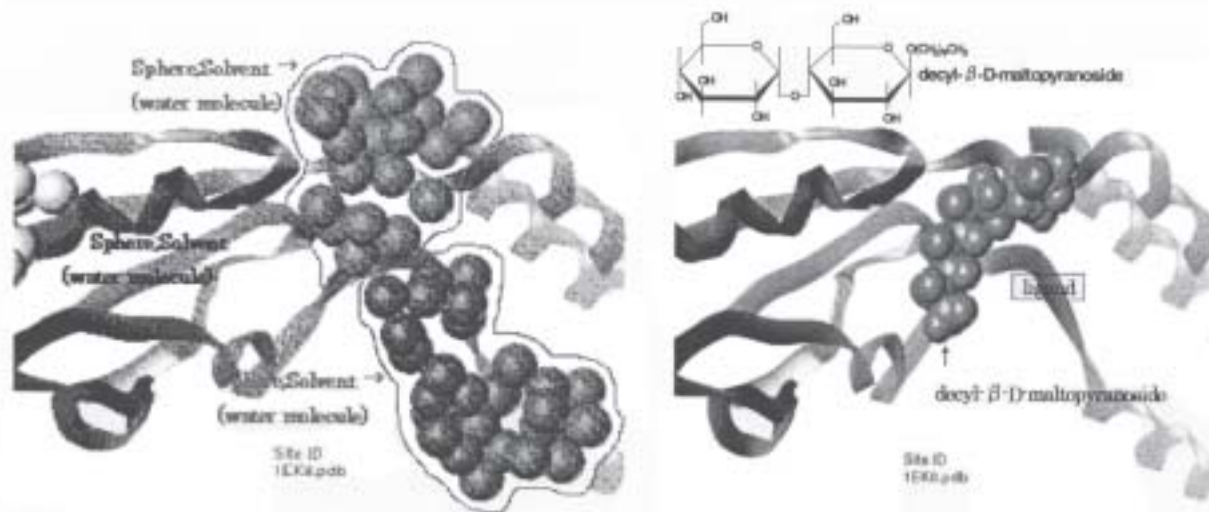
手順としては"SiteID"で見出された活性ポケットに"SYBYL"(TRIPOS 社)のモジュール"MOLECAD"で検索用のポケットの鋳型を作成し、スクリーニングに供する自社保有化合物の2次元構造式データから"CONCORD"(TRIPOS 社)によって3次元に構造を立ち上げ、活性ポケットに合致する化合物を検索するのに使用する"UNITY"(TRIPOS 社)のデータベースへ加工する。"UNITY"により、各候補活性ポケットで作成した"MOLECAD"平面の立体データと、水素結合の指定、活性残基の指定を行い、用意した3次元構造データベースでこの検索条件に合致するものを計算によって求める。得られた候補化合物をショ糖密度勾配法の系²⁷⁾で評価することとし、そのポリソーム分解反応の有無により RRF の阻害の有無とすることとした。

まず"SiteID"で求めた8つの活性ポケットのうち、部位特異的変異実験からの情報、他菌種 RRF のアミノ酸配列との配列相互比較検討の結果、表面プラズモン共鳴装置による検討結果からつなぎの部分とドメイン I のヘリックスにある Arg129, Arg132 周辺部分にある活性ポケットより検討を開始した。スクリーニングには自社保有化合物ライブラリの中から多様性を考慮した17,972個を用いることとし、その化合物の構造式のSDファイルを薬物設計用ワークステーションに読み込み、"CONCORD"によってこれらの化合物の3次元構造を発生させ、さらにこれを検索に使用する"UNITY"用データベースとして保存した。

次に"SiteID"により求めたポケットを活性ポケットとして定義し、"MOLCAD"を用いてその活性ポケット部分に溶媒接触可能表面を作成した。そして引き続き上記の"UNITY"データベースから活性ポケット内部にうまくはまりこみ、かつタンパク質と適切な水素結合を行うリガンド候補を検索するためにその Query(検索用構造式)を作成した。内容としては、水素結合に関係したタンパク質分子上の Acceptor site と、それに対応するリガンド上の Donor atom の位置を決め、同様に水素結合に関係したタンパク質分子上の Donor site と、それに対応するリガンド上の Acceptor atom の位置を決めるというものである。さらに広くリガンドと成りうる候補を拾うため、指定した Donor/Acceptor に対して、Partial Match constraints の設定を行い、従って指定した全ての Donor/Acceptor の条件を満たさなくても、その一部のみ満たしていれば検索式に適合したとして認めることができるようにした。そして、前述の"MOLCAD"平面を Surface constraints としてこの部分に検索される化合物が接触しないように定義し Query の作成を完了した。

早速大韓民国の K. K. Kim らの報告^{5) 6)}に記載されている大腸菌 RRF において、界面活性剤が相互作用しているつなぎの部分の活性ポケットについて検討を試みた。Fig. 8 に示したように、"SiteID"は2カ所のつなぎの部分における活性ポケット(それぞれ線で囲んだ球の集合部分)を予測していたが、そのうちの上方の予測部分の方に、対応する界面活性剤 n-decyl- β -D-maltopyranoside が入っているのが観察された。しかし、この活性ポケットにおける検索条件では自社化合物 17,972 個の中には適合する化合物は見出されなかった。次回、予め界面活性剤が相互作用し、つなぎ部分の角度が 110 度であったものを鋳型にするのではなく、他菌種の RRF がそうであったように、つなぎ部分の角度が 90 度の状態での検討を行う予定である。

次に、表面プラズモン共鳴装置による検討結果から、リボソーム RNA と相互作用すると推定したドメイン I のヘリックスにある Arg132 周辺部分の活性ポケットについても同様に query を作成し(Fig. 9)、さらに自社化合物 17,972 個を検索したところ、条件に適合する化合物が 18 種類見出された。これらの化合物が本当に RRF 阻害活性を示すかどうか実際にシヨ糖密度勾配法による *in vitro* assay¹⁾を行った。この方法は、擬似ポストターミネーションコンプレックスを作成し、RRF、EF-G、GTP 存在下反応を行い、RRF 阻害活性がなけれ



(decyl- β -D-maltopyranoside (ligand of 1EK8))

Fig. 8 Candidates of Active pocket – Hinge part

ば当然ポリソームが分解されモノソームが増える現象を観察するものである。(Fig.10 にコンピューターによるバーチャルスクリーニングでヒットした化合物 18 個のうちの一つで以下の *in vitro* assay で活性が確認された化合物(上方)を示す。下方は RRF ヘリックス部の予想活性部位である。)

Fig. 11 にそのシヨ糖密度勾配法による *in vitro* assay の実験結果を示す。チャート縦軸は UV254nm における吸光度、横軸は超遠心分離後シヨ糖密度の勾配によりつくられる分画を示す。分画はチャート下側がトップ(従って重量が軽いもの)、上側がボトム(重量が重いもの)である。擬似ポストターミネーションコンプレックスで RRF 存在下の反応を行う RRF 阻害陰性コントロールと、RRF 非存在下で反応を行う阻害陽性コントロールの 2 つと同時に 18 個の試験サンプルをアッセイし、得られたチャートとそれら 2 つのコントロールとの比較により判定を行った。結果として 18 化合物中の 1 つにモノソームが少なくポリソームが多いという状態を示すものがあり、従って RRF を阻害している可能性が示唆された。また、この化合物の最小発育阻止濃度(MIC)を測定したところ、100 μ g/mL 程度ではあるが抗菌活性も観察された。このように、実際 17,972 個を 1 つ 1 つ手間と時間がかかるシヨ糖密度勾配法(材料調製に約 4 週間、アッセイは 4 サンプル/ 3 時間以上)による *in vitro* assay を行うところを 18 個まで絞り込むことが出来たのは、かなりの成果であるといえる。残念ながら特許出願の兼ね合いで検索条件に適合した化合物の構造式、詳細な検索条件の開示については今回は省略しているが、特許出願後論文投稿により開示する計画である。

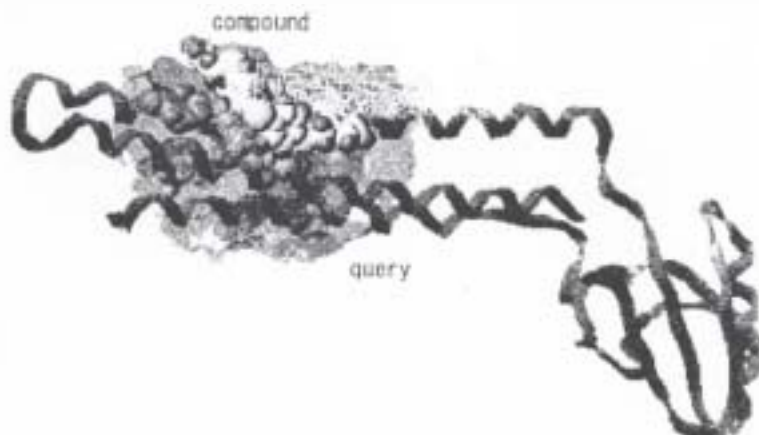


Fig. 9 Result of Virtual Screening –Arg132 part Candidate of RRF inhibitor



Fig. 10 Candidate of RRF inhibitor

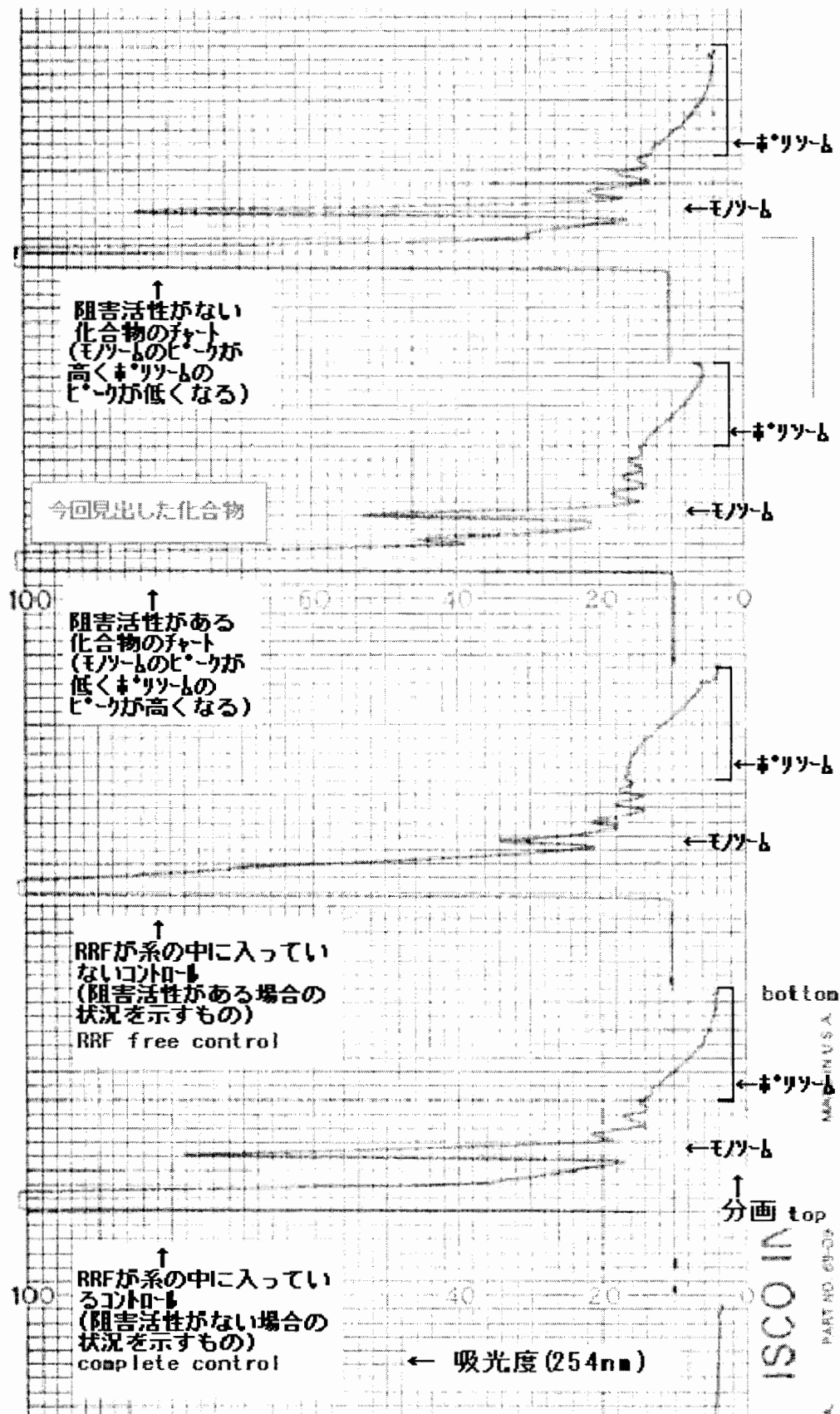


Fig. 11 Result of RRF inhibitory activity test(*in vitro* assay)

結論

今回の検討により、その作用機序から真核生物であるヒトに副作用が無く原核生物である細菌類のみダメージを与えると考えられる RRF 阻害剤の候補の 1 つを見出すことが出来た。また、ある疾患に関与する酵素(タンパク質)の 3 次元構造のデータがあり、その酵素の活性中心の情報が入手できるかまたは予測できる場合、*in vitro*, *in vivo* の活性評価を行う前にバーチャルスクリーニングを行うことで、容易に評価するサンプル量、サンプル数を少なく絞り込むことが出来ることが立証されたと考えられる。このように、本研究において検討した手法を組み合わせることによって、実際に数多くの化合物の合成またはその生物学的な評価をするのではなく、シミュレーションによりその数を絞り込み、より確率性の高い、より標的の薬物受容体に適合した化合物を導き出すことが出来るという戦略が可能となり、結果として手間と費用を省きスピーディな創薬研究ができると考えられる。

謝辞

本研究をまとめるに際して、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました福岡大学薬学部薬品物理化学教室 後藤良宣教授、田川義展講師に深く感謝の意を表します。

本研究の機会を与えられ、終始ご支援とご鞭撻を賜りました久光製薬株式会社 中富博隆代表取締役、野田寛治取締役、佐藤秀次取締役、境美智順基礎研究所長、肥後成人 TTS 研究所長、池末公一基礎研究所主任研究員に謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益なご助言とご協力を頂きました横瀬一輝博士、原裕人博士、石野哲也博士をはじめとする株式会社アール・アール・エフ研究所の研究員(当時)諸氏およびその共同研究先であった東京大学 医科学研究所 中村義一教授、大阪大学大学院 薬学研究科 小林祐次教授に心より感謝致します。

参考文献

- 1) 梶 昭, 広川 剛, 新 健治, 蛋白 核酸 酵素, **44**, 831 (1999).
- 2) H. Kashimori, T. Yoshida, H. Kijima, H. Shimahara, S. Uchiyama, T. Ishino, M. Shuda, H. Nakano, Y. Shibata, Y. Saihara, T. Ohkubo, T. Yoshida, A. Kaji, Y. Kobayashi, *J. Biomol. NMR*, **15**, 341 (1999).
- 3) M. Selmer, S. Al-Karadashi, G. Hirokawa, A. Kaji, A. Liljas, *SCIENCE*, **286**, 2349 (1999).
- 4) T. Toyoda, O. F. Tin, K. Ito, T. Fujiwara, T. Kumasaka, M. Yamamoto, M. B. Garber, Y. Nakamura, *RNA*, **6**, 1432 (2000).
- 5) J. Yun, W. Kim, S. C. Ha, S. H. Eom, S. W. Suh, K. K. Kim, *Acta Crystallogr. D*, **56**, 84 (2000).
- 6) K. K. Kim, K. Min, S. W. Suh, *EMBO J.*, **19**, 2362 (2000).
- 7) T. Yoshida, S. Uchiyama, H. Nakano, H. Kashimori, H. Kijima, T. Ohshima, Y. Saihara, T. Ishino, H. Shimahara, T. Yoshida, K. Yokose, T. Ohkubo, A. Kaji, Y. Kobayashi, *Biochemistry*, **40**, 2387 (2001).
- 8) Janosi, H. Mori, Y. Sekine, J. Abragan, R. Janosi, G. Hirokawa, A. Kaji, *J. Mol. Biol.*, **295**, 815 (2000).
- 9) T. Ishino, K. Atarashi, S. Uchiyama, T. Yamami, Y. Saihara, T. Yoshida, H. Hara, K. Yokose, Y. Kobayashi, Y. Nakamura, *Genes to Cells*, **5**, 953 (2000).