

1) コンピュータシミュレーションを用いた薬物設計および違法薬物等の活性予測

栗原正明

Computational study on drug design and prediction of bioactivity for regulation of non-controlled psychotropic substances

Masaaki Kurihara

We demonstrated design and synthesis of rescue ligands for agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu), and performed QSAR study of non-controlled psychotropic substances and docking study of non-approved or unauthorized pharmaceuticals, inhibitors of human phosphodiesterase 5 (PDE5) using computer simulation.

Keywords: drug design, mutant vitamin D receptor (Arg274Leu), QSAR, non-controlled psychotropic substances, non-approved or unauthorized pharmaceuticals

はじめに

ここでは2つのトピックについて書く。ひとつはコンピュータシミュレーションによる薬物設計であり、もう一つはQSAR (定量的構造活性相関) 等を用いた違法薬物の規制についてである。共通のキーワードは「予測」である。薬物を設計するためには、設計した分子が「どのような構造をとるか?」、「タンパク質とどのような相互作用をするか?」を予測しなくてはならない。信頼できる予測ができないと、複雑な分子の合成に踏み込む勇気がわからない。薬物設計の例としては変異ビタミンD受容体救済型リガンドの設計に絞って述べる。一方、違法な薬物を迅速に規制するためにはQSARやドッキングスタディによる活性予測は有効である。動物試験や生物学的試験を行うことが最善であるが、それには多くの時間が必要となる。ここでは違法な薬物の活性予測についての実例の例を述べる。

1. 変異ビタミンD受容体救済型リガンドの設計

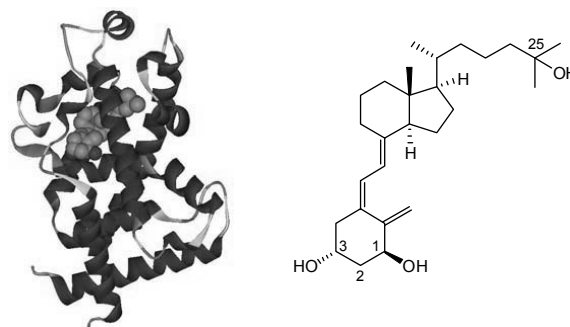
1-1 2位 α 置換活性型ビタミンD₃誘導体リガンド

近年、癌の分子標的薬等の様にタンパク質の変異によって引き起こされる様々な疾病に対する薬物の開発が注目されている。核内レセプターの変異によって起こる疾

病があり、これらの疾病は遺伝子の変異によって起きるもので、難病とされているものが多い。ビタミンDレセプター (VDR) の変異 (Arg274Leu) により遺伝性ビタミンD抵抗性くる病が発症する。

ビタミンDレセプターは核内レセプターのひとつで、骨代謝、免疫調節等の作用を転写レベルで制御している。そのリガンドは活性型ビタミンD₃ ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) である。(Fig. 1) VDRと活性型ビタミンD₃の複合体は4つの水素結合を形成していることが明らかになっている。(Fig. 2)

その中でもリガンドの1 α -ヒドロキシ基とArg274のグアジノ基間での水素結合が特に重要である。変異 (Arg274Leu) によりこの水素結合ができずリガンドはレセプターに結合しにくくなり、遺伝性ビタミンD抵抗性くる病が発症する。それを改善するために別の位置で水素結合を形成するようリガンドを設計すれば失われた

Fig. 1 VDR-LBD and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

To whom correspondence should be addressed:

Masaaki Kurihara: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: masaaki@nihs.go.jp

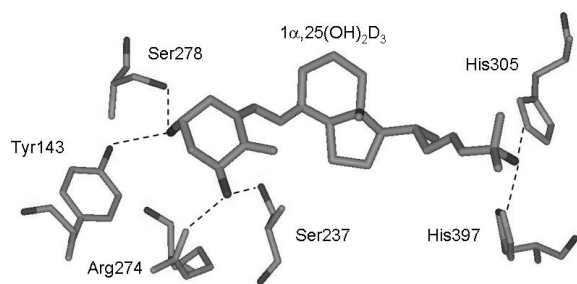


Fig. 2 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bound to VDR

水素結合を補うことができると考えた. そのためにA環の2位に3-ヒドロキシプロポキシ基を導入した. (Fig. 3)

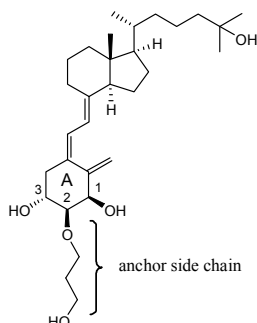


Fig. 3 $2\alpha\text{-(3-Hydroxypropoxy)-}1\alpha,25\text{-vitamin D}_3$

これはモデリングにより3-ヒドロキシプロポキシ基の末端水酸基がAsp144と水素結合することを予測したからである. (Fig. 4) タンパク質内のリガンドのコンフォメーションは, プログラム *MacroModel* (Schrodinger, Inc.) のコンフォメーションルサーチ (条件: Mixed MCMM/Low Mode, Amber*) を用いて求めた. コンフォメーションルサーチで得られた最安定構造を結合モデルとした. 実際このリガンドは変異VDR (Arg274Leu) に対して活性型ビタミンDよりはるかに強く結合することが明らかとなった¹⁾. これをはじめとして幾つかのリガンドを設計, 合成した^{2, 3)}. いずれも, 変異によって失われた相互作用を補うように分子設計することにより結合を強める救済型のリガンドである.

ちなみに, 2位 α 置換活性型ビタミンD₃誘導体は正常なVDRにも強い活性を持ったリガンドとなる³⁾.

1-2 ノンセコステロイド型リガンド

著者等はセコステロイド骨格(ビタミンDの基本骨格)を持たないリガンドの創製(設計と合成)を行っている. すでにYR301 (Fig. 5) が活性型ビタミンD₃に匹敵する転写活性があることを見いだした⁴⁾. さらにVDR-LBDとYR301のX線構造解析にも成功した⁵⁾. その結合様式

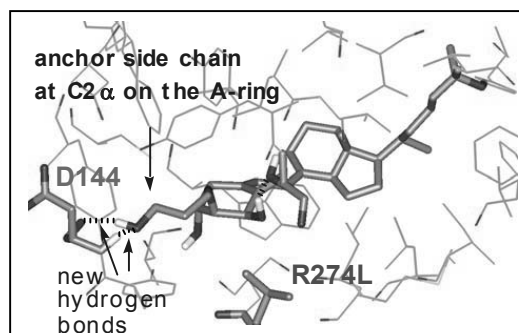
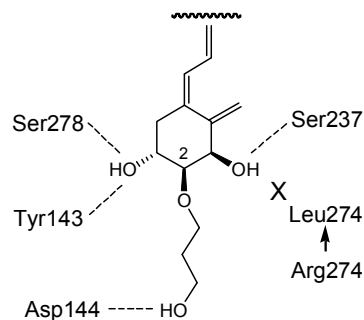


Fig. 4 Modeling structure of the rescue ligand bound to mutant VDR (Arg274Leu)

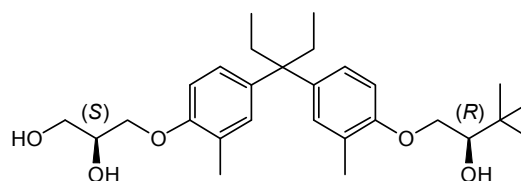


Fig. 5 Structure of YR301

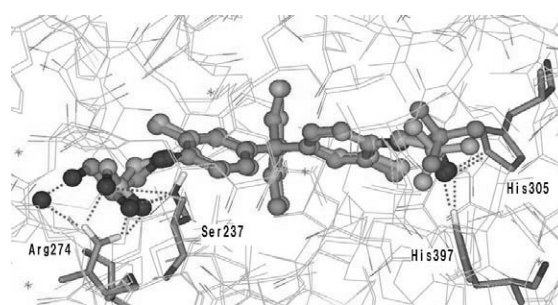


Fig. 6 Structure of YR301 bound to VDR-LBD. (dark: x-ray structure, light: modeled structure)

は事前に予測したモデリングの構造 (Fig. 6) とよく一致した.

このノンセコ型のリガンドが救済型のリガンドにもなることを見いだした⁶⁾. YR301の立体異性体であるYR303 (Fig. 7) と変位VDR (Arg274Leu) のモデリングの結果YR303の左側の末端の水酸基はSer237と水素結合することが予測された. (Fig. 8) 変異VDRを用いて

転写活性を測定したところではYR303は活性型ビタミンD₃よりも26倍の活性を示した。正常なVDRにおいてはArg274と水素結合している末端水酸基がSer237と水素結合することにより失われた水素結合を補填していると考えられる。これは鎖状構造の柔軟性によるものである。

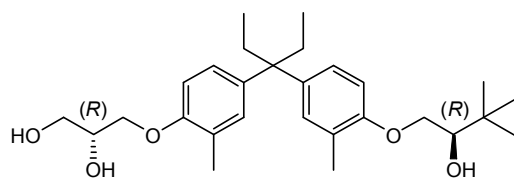


Fig. 7 Structure of YR303

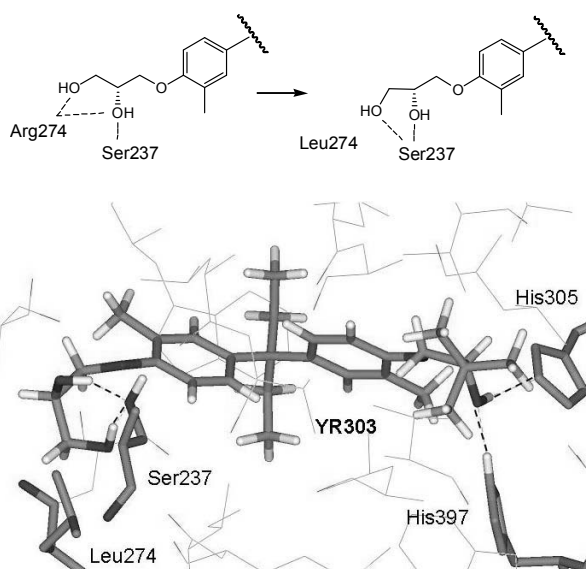


Fig. 8 Modeling structure of YR303 bound to mutant VDR (Arg274Leu)

ここで示した救済型リガンドの方法論は他の変異タンパクにも適用が可能である。変異により引き起こされる疾病は難病が多い。患者の数が少ない難病においては、治療薬の開発は製薬メーカーが行いにくい現状もあり、我々が取り組むべきひとつの課題であると考えている。

2. 違法薬物等の活性予測

2-1 QSARを用いた違法薬物の活性予測

違法ドラッグが大きな社会問題となっている。そこで、違法ドラッグを速やかに規制するためには、違法ドラッグの迅速な評価法が必要である。動物実験や生物学的試験には多くの時間が必要であり、迅速な規制のためにはコンピュータを用いたインシリコ評価法を開発することが必要である。ここでは実際に行ったひとつの例として4-メチルメトカチノン (Fig. 9) の場合を述べる。

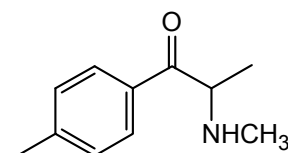


Fig. 9 Methcathinone

活性予測は2つの方法で行った。ファーマコフォアフィンガープリント法と2D-QSAR (定量的活性相関) である。

いずれも化学計算パッケージMOE (CCG社) を用いた。活性が既知の化合物として1~10の化合物を用いた。(Table 1) 活性値は(+)-アンフェタミン (1 mg/kg) で弁別したラットを用いて般化試験を行った際の構造類似化合物1~10の実測活性値 (ED₅₀値) を採用し、それぞれの方法で4-メチルメトカチノン(11)の活性値を予測した。

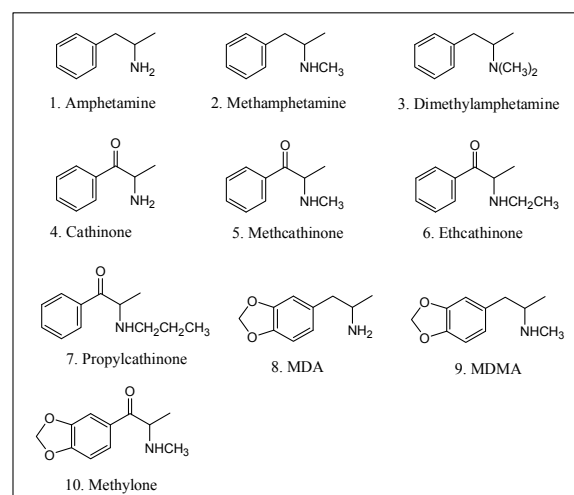


Fig. 10

Table 1 Psychotropic substances

No	Psychotropic substances	Activities* (ED ₅₀ , mg/kg)
1	Amphetamine	0.71
2	(±)-Methamphetamine	0.49
3	(+)-Dimethylamphetamine	2.92
4	(±)-Catinone	0.71
5	(±)-Methcathinone	0.37
6	Ethcathinone	0.77
7	Propylcathinone	2.03
8	MDA	2.29
9	MDMA	1.64
10	Methylone	2.36

* T. A. Dal Cason et al., Pharmacology Biochemistry and Behavior, 58(4) (1997) 1109-1116.

① ファーマコフォアフィンガープリント法

化学構造の類似性のみによる評価法として、ファーマコフォアフィンガープリント法による評価を行った。2点のファーマコフォアのグラフ距離で分子の類似性を評価するTGD法を用いた。活性の強い化合物2, 5をテンプレートとして構造の類似性を算定した。化学構造の類似性と活性値との相関から4メチルメトカチノンの活性値を予測した。(Fig. 11, X軸：構造の類似性, Y軸：活性値)

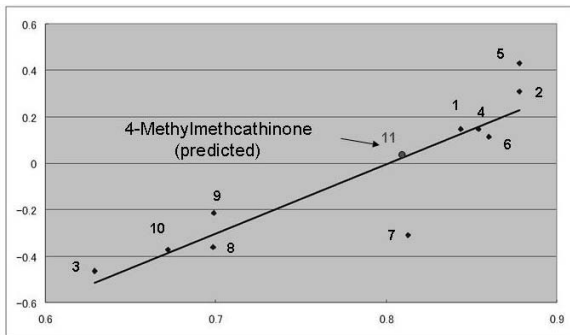


Fig. 11

② 2D-QSAR (定量的活性相関) 法

AutoQuaSAR法を使って妥当なQSARモデル式を構築し、4メチルメトカチノンの活性値を予測した。QSARモデル式で用いた記述子は、MOE上で動作するAutoQuaSARプログラムによって、MOEに搭載されている184のすべての2D記述子から選択されたものである。QSAR式は交差検定の R^2 (相関係数の2乗) が最も良いものを用いた。(Fig. 12, X軸：活性値の予測, Y軸：活性値)

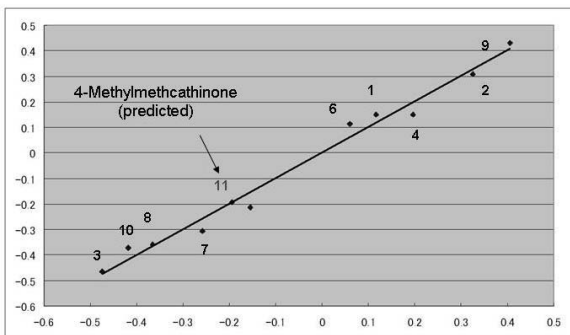


Fig. 12

相関係数の二乗 (R^2)=0.84

交差検定の相関係数の二乗 (XR^2)=0.92

QSAR式

$pIC_{50} = 1.40145$

$-0.0365513 * PEOE_VSA-0$

$-0.0848188 * PEOE_VSA-1$

$-0.0168429 * SMR_VSA2$

$+0.0168429 * SlogP_VSA5$

麻薬、覚せい剤、指定薬物を含む構造類似化合物10化合物の活性 (既知) と比較するために、ファーマコフォアフィンガープリント法及び2D-QSAR (定量的活性相関) 法の2方法で評価した。4メチルメトカチノンは、どちらの方法でもこれら規制化合物群と同程度の活性があることが予測された。このデータは4メチルメトカチノンを規制するための科学的データとして使われた。

2-2 シルденаフィル類似化合物の活性予測

無承認無許可医薬品であるシルденаフィル類似物質 (PDE5阻害剤) が健康被害の危険性があり、大きな問題となっている。これら無承認無許可医薬品を迅速に規制、検挙するためには、これら不適切な化合物の迅速な活性評価スクリーニングが必要である。しかし、*in vitro*, *in vivo*試験では時間がかかり、迅速な対応が困難である。そこで*in silico*による評価法について検討した。

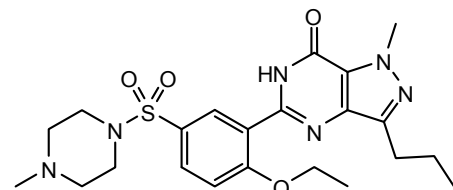


Fig. 13 Structure of Sildenafil

ここでは、ヒドロキシチオホモシルденаフィル (Fig. 14) について述べる。

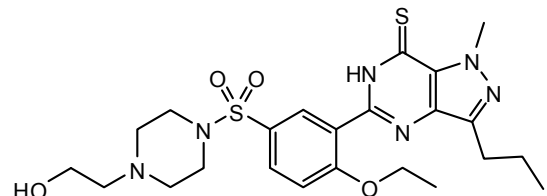


Fig. 14 Structure of hydroxythiohomosildenafil

シルденаフィルは、生体内で環状グアノシナーン酸 (cGMP) の分解を行っている5型ホスホジエステラーゼ (PDE5) の酵素活性を阻害する。これがNO作動性神経に作用して血管を拡張させ、血流量が増えることによって活性を発現すると考えられている。シルденаフィル類似物質とHuman Phosphodiesterase 5 (PDE5) と

の結合モデルを以下のようにして構築した。PDE5の三次元構造はX線構造 (PDB ID: 1UDT) を用いた。タンパク質内の薬物のコンフォメーションは、プログラム *MacroModel* (Schrodinger, Inc.) のコンフォメーションルサーチ (条件: Mixed MCMM/Low Mode, Amber*) を用いて求めた。コンフォメーションルサーチで得られた最安定構造を結合モデルとした。水素結合を中心に結合モデルの評価を行った。ヒドロキシチオホモシルデナフィルとPDE5 (1UDT) の結合モデルを構築した。(Fig. 15) その結果、これらはシルデナフィルが結合した部位にほぼ同一の配向性で結合することが明らかとなった。さらに、シルデナフィルは活性ドメインにおいてGln817と水素結合を形成するが、これらも同様にGln817と水素結合を形成しうることが示された。(Fig. 15) このことにより、これらは同一の作用機序でシルデナフィルの標的分子であるPDE5を阻害することが予測される。このデータはヒドロキシチオホモシルデナフィルを規制するための科学的データとして使われた。

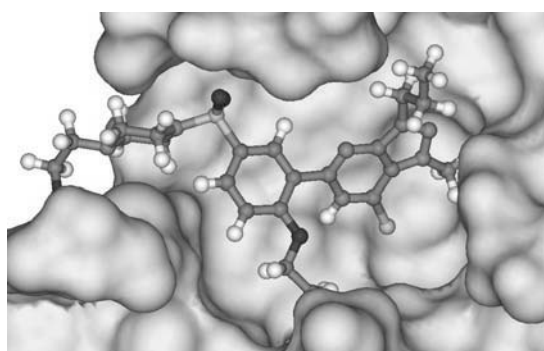
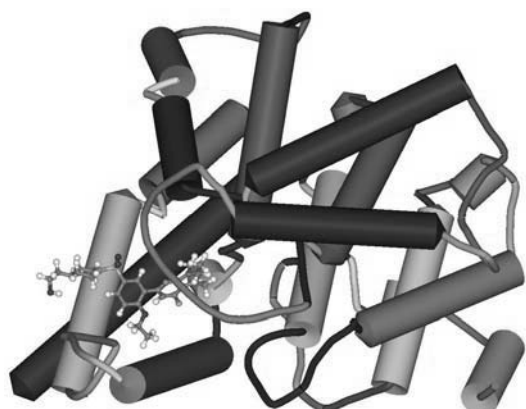


Fig. 15 Modeled structure of hydroxythiohom sildenafil bound to PDE5

文献

1) Kittaka, A., Kurihara, M., Peleg, S., Suhara, Y., Takayama, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 357-358

(2003)

- 2) (a) Honzawa, S., Yamamoto, Y., Yamashita, A., Sugiura, T., Kurihara, M., Arai, M. A., Kato, S., Kittaka, A., *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3002-3024 (2008) (b) Honzawa, S., Takahashi, N., Yamashita, A., Sugiura, T., Kurihara, M., Arai, M. A., S. Kato, S., Kittaka, A., *Tetrahedron*, 65, 7135-7145 (2009)
- 3) (a) Kittaka, A., Suhara, Y., Takayanagi, H., Fujishima, T., Kurihara, M., Takayama, H., *Org. Lett.*, 2, 2619-2622 (2000) (b) Fujishima, T., Konno, K., Nakagawa, K., Tanaka, M., Okano, T., Kurihara, M., Miyata, N., Takayama, H., *Chem. Biol.*, 8, 1011-1024 (2001)
- 4) Hakamata, W., Sato, Y., Okuda, H., Honzawa, S., Saito, N., Kishimoto, S., Yamamoto, A., Sugiura, T., Kittaka, A., Kurihara, M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 120-123 (2008)
- 5) Kakuda, S., Okada, K., Eguchi, H., Takenouchi, K., Hakamata, W., Kurihara, M. Takimoto-Kamimura, M.: *Acta Crystallogr. F*, 64, 970-973 (2008)
- 6) Demizu, Y., Nakatsu, A., Sato, Y., Honzawa, S., Yamashita, A., Sugiura, T., Kittaka, A., Kato, S., Okuda, H., Kurihara, M.: *Lett. Org. Chem, in press* (2010)