タンパク質の立体構造と薬物設計

吉 田 元 二*

1. は じ め に

1990年の米国医薬品開発センターの調査によると、最近10年間に米国の主要医薬品メーカーの開発した医薬品の平均の開発費用は約3億円、開発期間は12年であった。また、1つの農業を上市するまでに合成される化合物の数は、約3万個に及ぶとの報告もある。このような背景には、薬物の人体や環境への影響といった安全性に対する審査の強化、癌、エイズあるいはアルツハイマー病といった慢性疾患や難病の治療薬の開発への取り組みなどによるものである。今後、この傾向は益々強まり、薬物の開発環境は厳しくなることが予想されており、より効率的な薬物の開発が火急の課題となってきた。この効率化のためのアプローチの1つとして、コンピュータを利用した薬物設計に関心が集まってきている。

ところで、コンピュータによる材料設計のなかで、薬物への適用の歴史は古い方である。このことは、必ずしも、薬物の薬効発現のメカニズムが明らかであり、コンピュータを利用しやすかったからではない。むしろ、そのメカニズムが複雑すぎ、理論的に解明することが困難であったことが、後述する定量的構造活性相関(QSAR)のような経験的方法を生み出すことになったのではないと思われる。現在でも、薬物発現のメカニズムが完全に解明されたわけではないが、薬物-受容体理論に基づいて、受容体であるタンパク質などの生体高分子の立体的な構造を基とした薬物設計の研究が盛んに行われるようになってきている。

ここでは、薬物設計で用いられるいくつかのアプローチの方法について述べてみたい。

2. 定量的構造活性相関

薬物分子の開発には、大きく分けて、2つのフェーズが考えられる。最初のフェーズは、なんらかの薬効を持つ薬物分子の骨格となる構造を見つけるフェーズであり、母核創生(リードジェネレーション)といわれている。次のフェーズは、母核構造の部分構造(置換基)をいろいろと変えて、より高活性な、より安全な最終的な薬物分子を見つけたフェーズであり、母核最適化(リードオプティミゼーション)といわれている。リードジェネレーションは、天然化合物の有効成分の抽出、既存の特許情報の検討、あるいは偶発的な発見などによってなされることが多い。

ここで述べる、定量的構造活性相関(QSAR: Quantitative Structure and Activity Relationships)は、リードオプティミゼーションにおいて有効な方法である。QSARの基本的な考え方は、置換基の変化によって、活性が変化するということは、活性を置換基の構造的な特徴を表すパラメータによって説明し得るはずであるという点である。

すなわち、活性を置換基の構造パラメータの関数として表現し、既存のデータをベースにその関数を定めようとするものである。関数の決定には、統計的な手法が活用される。ここで、問題になるのは、活性に影響の深い構造パラメータとして何を選ぶかということである。薬物設計においては、QSARの長い研究の成果として、パラメータとしては、置換基の立体的なパラメータ、電子的なパラメータ、疎水的なパラメータなどが用いられることが多い。これらのパラメータは、現在考えられている、薬物がタンパク質などの受容体の活性部位とバインディングするときの相互作用に関わる要因(立体的効果、電子的効果、疎水的効果など)や薬剤の生体内での移送現象に関わる要因(疎水的効果)が適切に取り入れられたものとなっている。また、多く用いられる関数型は、線形関数か、たかだか2次関数であり、モデルとしては非常に簡単なものである。

このような方法のことをハンシュ-藤田の方法とよぶが、実際の薬物設計において広く用いられ、数多くの成功例が報告されている⁽¹⁾⁽²⁾。

次に、実際の適用例について述べる。藤浪らは⁽³⁾、ブド

* 住友化学工業(株)筑波研究所主席研究員
The 3-dimensional Structures of Protein and the Drug Design; Mototsugu Yoshida (Sumitomo Chemical Co., Ltd., Tsukuba)

Keywords: *drug design, quantitative structure and activity relationships, partial least square regression, conformation analysis, protein*

1992年3月13日受理

ウの灰色カビ病菌に対する殺菌活性を有する殺菌剤スミレックス(図1)の開発の過程において、図2に示すようなN-フェニルコハク酸イミド類といわれる化合物群が高い殺菌活性を示すことを見いだした。そこで、図中X, Y, Zで示す置換基をいろいろと変えた化合物を合成して、より高い活性を示す化合物を探索する(リードオブティミゼーション)研究がなされた。このとき、X, Y, Zの置換基候補がそれぞれ10種類あったとすると候補化合物の数は1000個になってしまう。QSARはなるべく少ない数の化合物の合成によって、最も高活性の化合物を見つけたすことを目的としている。藤浪らは、置換基を種々変えた61個の化合物を合成し、その生物活性を調べた。得られた活性データに基づいてQSAR解析を行い、活性値と構造パラメータの間に次の関係式を得た。

$$pI_{50} = 0.72 \sum \pi^{3.5} + 1.46 \sum \sigma^0 + 0.89 \sum E_s^{2.6} + 0.67 E_s^{\pi} + 0.35 E_s^4 - 0.54 \sum H-A + 3.69$$

この回帰分析による重相関係数は0.95と良好であった。

ここで、 pI_{50} は灰色カビ病菌に対する抗菌活性を表し、 π は疎水性、 σ^0 は電子的性質、 E_s はかさ高さ、 $H-A$ は水素結合性の有無を表すパラメータである。

なお、 π , E_s に付随する数字は置換位置を表し、 E_s^{π} は2個のメタ置換基のうち、立体的によりかさ高い方の置換基の E_s を意味する。

上記の式から以下のことがいえる。

- (1) メタ置換基の疎水性が大きくなる程、活性が高くなる。
- (2) 置換基の電子吸引性が大きくなる程、活性が高くなる。
- (3) 置換位置により程度の差はあるが、置換基のかさ高さが小さくなる程(E_s の値が大きくなる程)、活性が高くなる。ただし、2箇所のメタ位がともに置換されている場合には、よりかさ高い置換基のかさ高さのみが活性に影響を与える。
- (4) 置換位置によらず、置換基が水素結合受容性基である場合、活性を低下させる。

図1 スミレックス。

図2 N-フェニルコハク酸イミド類。

このような知見をもとに、どのような置換基をもった化合物が高い活性を示すかを予測することが可能になる。さらに、置換基の各パラメータに関するデータベースがある場合には、そのデータベースを検索して、高活性化合物の候補を提案することができる。スミレックスの開発においては、このようなQSARの手法を駆使して、最終的に図1の化合物を上市するに至った。

QSARの利点としては、合理的な設計により、実際に合成する化合物の数を減らすことができる点、薬効発現のメカニズムをある程度想定し得る点、高活性の化合物の候補が提案されるので、特許対策としても利用できる点などが考えられる。

ところで、立体的パラメータについては、かさ高さ以外にも分子の三次元構造に基づく各種のパラメータ、例えば、置換基の幅を表すSTERIMOLパラメータ(図3)、環と環のなす角度、特定の原子間の距離などいろいろのものが考えられるし、電子的パラメータについても、よく用いられる、ハメットの σ 以外にも、HOMOやLUMOのエネルギー、双極子モーメントなどいろいろ考えられる。

したがって、一般には、活性を説明するためのパラメータの候補は多数ある。これらのパラメータの中から、本当に活性と関わりのあるものだけを選び出すことが必要となる。

そのための手法として、最近、PLS回帰法(Partial Least Square Regression)という方法が用いられるようになってきた⁽⁴⁾。

図3 STERIMOLパラメータ。
上は置換基を上からみたもの。
下は結合軸(L軸)方向からみたもの。

3. 理論化学計算

分子力学法, 分子軌道法, 分子動力学法などの理論化学計算も薬物分子の設計に利用されている。利用の目的としては, 三次元構造の決定と電子状態の解析である。三次元構造が, 薬効発現と深く関わっていることは QSAR の結果からも明らかである。安定な三次元構造(立体配座)の解析には, 上の 3 つの方法とも有効である。

分子力学法は, 有効ポテンシャル関数を用いた古典力学に基づいて安定構造が計算される。計算時間が短く, 大きな分子も取り扱えるという特長を有する。しかし, 反面, ポテンシャル関数の妥当性, バネ定数に対応するようなパラメータの妥当性, 電子の効果が構造に影響するような化合物には不適当であるなどの問題点も含む。

分子軌道法は, 電子状態の解析のための方法ではあるが, 安定構造を求めることも可能である。基本的には, 計算により分子軌道とそのエネルギーが求められるが, それから, 分子のイオン化ポテンシャル, 結合エネルギー, 生成熱, 電子密度分布, 双極子モーメント, 基準振動などの物理化学的性質が求まる(図 4)。問題点としては, 計算時間がかかり, 大きな分子の計算ができないことである。そのため, いくつかの近似計算法が提案されている(図 5)が, 最近のコンピュータの高速化によって, かなりの大き

図 5 分子軌道法での基本近似。

さの分子まで扱えるようになっている。

分子動力学法は, 有限温度での分子のダイナミックな挙動を解析できることから最近急速に活用されている。特にグラフィックスの進歩により, 分子の動きがビジュアルにとらえることができる点に関心が集まっている。しかし, 分子動力学法の本質は, その時間的な変化を統計処理して, 動径分布関数, 比熱, 体積圧縮率等の統計力学的な物性が求められる点にある。このことは, 分子動力学法は, 理論化学計算によって求められるミクロスコピックな性質と研究者の求めているマクロスコピックな性質を結び付けることができることを意味している。

ここでは, 薬物分子の活性配座の解析への理論化学計算の適用例を述べる。

薬物分子の三次元構造は, 実験的には結晶の X 線構造解析によって求められるし, また計算によってもその最安定構造を上記の方法で求めることができる。しかし, 実際に薬物がタンパク質などの生体内高分子と相互作用して, 薬効を示すときにとる構造は, 必ずしも X 線による構造や計算による最安定構造とは限らない。

栗田らは⁽⁵⁾, ピレスロイド系殺虫剤の活性配座の推定を分子力学法と分子軌道法を用いて行った。ピレスロイド系殺虫剤の 1 つであるフェンパレレート(商品名スミサイジン)は, 4 個の光学異性体をもつが, 高い殺虫活性をもつものはその中の SS 体だけである(図 6 に示した化合物 I (SS))。

そこで, 図 6 に示す 5 つのピレスロイド(図中 I (SS), II (R), IV が高活性ピレスロイド, その他は低活性ピレス

図 4 分子軌道法プログラムの構成。

図 6 ビレスロイド系化合物の構造.
(点線内の部分構造について配座解析)

ロイド)を取り上げて、半経験的分子軌道法 AM1 によって最安定構造を求めた。次に、図 6 にそれぞれ矢印で示した結合を 120° 間隔で回転させて複数の初期構造を発生させ、そこから得られる安定構造を計算した。そして、各化合物に対して、得られた安定構造のなかから、最安定構造から 25 kJ/mol 以内の複数の安定構造を実際にとり得る構造として抽出した。

次に、立体構造の重ね合わせを行い、対応する原子間の距離の自乗和の平方根が 0.5 nm 以内にあり、図 6 に示すベンゼン環 b 同士のなす角度が 45° 以内であるならば 2 つの構造は類似していると考えて、高活性を示すビレスロイドではとりうるが、低活性のビレスロイドでは決してエネルギー的にみてもとれない構造を探索した。その結果、3 つの高活性化合物にたいして、それぞれ図 7 に示す配座が

図 7 部分構造の活性配座.
(a) I (SS), (b) II (R), (c) IV.

図 8 N の活性配座(点線)と I (SS) の活性配座(実線)の重ね合せ.
(a) 前面図, (b) 側面図.

見つけられ、これらが活性配座であることが推定できた。さらに、I (SS) と II (R) が S 体と R 体と異なるにもかかわらず、共に高い活性を示すことが図 8 の重ね合わせから理解できた。

この結果は、活性発現機構の解明に有用な知見を与えると共に、活性配座をリジッドとするような構造変換によって、より高活性の薬物を設計することができることを示唆している。

4. 受容体構造に基づく薬物分子

薬物分子が薬効を発現するのは、薬物分子がタンパク質のような受容体の活性部位にうまくはまり込むためであるという、いわゆる薬物-受容体理論(鍵と鍵穴理論ともいう)は、19世紀末にドイツのエールリッヒによって、仮説として提案され、後に X 線構造解析によって実証された。

このことは、酵素、抗体あるいはホルモンといったタンパク質の立体構造が分かれば、その活性部位に入るような薬物化合物を設計できるという期待がもたれる。つまり、リードジェネレーションが可能となることである。

タンパク質は図 9 に示すような基本構造をもった 20 種類のアミノ酸(図中の R の部分がアミノ酸によって異なる)がペプチド結合によってつながった高分子(ポリペプチド)である。アミノ酸の並び(アミノ酸の一次配列という)は、実験的に比較的簡単に求めることができるようになってきた。また、その三次元構造は、結晶が得られたものについては、実験的に X 線構造解析によって求めることができる。米国のブルックヘブン国立研究所のプロティン・

図 9 アミノ酸の基本構造.

データバンクには、約500件のタンパク質などの生体内高分子の三次元構造が収録されており、広く利用することが可能である。しかし、X線による解析にはかなりの時間を必要とすること、結晶が得られないタンパク質や、まだ見つけれられていなかったり、これから合成しようとするタンパク質の三次元構造を知りたい場合には、計算により求めることが望ましい。タンパク質用の分子力学法や分子動力学法のポテンシャル関数は存在するが、初期構造が正しい加減であると、とんでもない準安定構造に落ち込む可能性が大であり、現在のところ、アミノ酸の一次配列の情報だけから、その三次元構造を求めることは、不可欠である。しかし、タンパク質は、突然変異などによって、そのアミノ酸配列が変わっても、その立体構造は保たれることが経験的に知られている(図10)。

ところで、20種類のアミノ酸は、原理的には、そのいづれともペプチド結合することが可能である。たとえば、100個のアミノ酸からなるタンパク質の数は、理屈の上からは20の100乗というとても数になるが、実際にはそのように多数は存在しない。このことは、タンパク質として安定に存在するためには、どんなアミノ酸の組合せでもよいというわけではないことを示している。

アミノ酸の性質はRの性質により、疎水性のものと、親水性のものがあるが、存在するタンパク質の立体構造を調べてみると、中心部分は、疎水性コアとよばれ、疎水性

のアミノ酸による最密充填構造をとっていることが分かる。

また、 α ヘリックスと呼ばれる螺旋を巻いた部分、 β シートと呼ばれる板状の部分などから成り立っていることが分かる(このような構造上の特徴をタンパク質の二次構造という)。どのようなアミノ酸の並びのときに α ヘリックスとなり易く、どのようなアミノ酸の並びのときに β シートになり易いかということが分かれば、先に述べた三次元構造の予測の場合に大いに参考となる。このような二次構造予測の研究は、既存のタンパク質のアミノ酸配列とその立体構造の統計的な解析によって行われてきたが、最近になって、ニューラルネットワークの利用が盛んに行われるようになってきた⁽⁶⁾。

以上のような知見を基に、同様な働きを示すタンパク質(ファミリータンパク質と呼ばれる)の立体構造が既知の場合には、それを下敷きとして(参照タンパク質)、ある程度目的タンパク質の三次元構造を予測することが可能となっている。すなわち、まず双方のアミノ酸配列を比較して、なるべく少ない置換、削除、挿入によって、参照タンパク質のアミノ酸配列を目的タンパク質のアミノ酸配列に変換するには、どうすればよいか解析される。このとき、疎水コア、タンパク質の二次構造、あるいはアミノ酸置換に関する突然変異確率などが考慮される。さらに、アミノ酸の削除、挿入を極力参照タンパク質の立体構造が変化しないように行われる。このようにして得られた立体構造を初期構造として、分子力学法により安定構造を求めることにより、かなり正確に立体構造が未知のタンパク質の立体構造を予測することができるが示されている⁽⁷⁾。

このような実験あるいは計算によって得られたタンパク質の立体構造に基づいて、薬物分子と活性部位の立体的な関係(立体的相補性という)、静電氣的相補性、疎水的相補性、あるいは水素結合などの相互作用を考慮にいたした薬物分子の設計がはじまっており、その成果が期待される。

ところで、タンパク質自身も薬としての作用をもつものがある。例えば、モノクローナル抗体は、低下した免疫機能に変わって、細菌の毒素を中和する免疫グロブリンの1つである。人間以外の動物のものでは、抗原抗体反応があるので繰り返し使うことができないし、ヒト免疫グロブリンは無数の抗体の集まりであるので、特定の細菌に対しては薬効が低い。住友化学では、ラットのモノクローナル抗体の立体構造を基に、いくつかのヒト型のモノクローナル抗体の立体構造を予測し、既知のヒトモノクローナル抗体の立体構造の特徴と比較することによって、9つの候補抗体を提案した。その結果、従来の方法では数百の抗体のスクリーニングが必要であったものが、9個の抗体のスクリーニングによって高い活性を示すヒト型モノクローナルを見いだすことに成功している。

図10 ファミリータンパク質(セリンプロテアーゼ)の立体構造の類似性。
(J. Greer: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 3393(1980)より)。

5. お わ り に

以上、薬物分子の設計へのコンピュータ利用の一端について述べてきた。しかし、その利用は緒に付いたばかりであり、溶液中での薬物分子の挙動、薬物分子とタンパク質との相互作用の解明といった分子間相互作用の解析、薬物分子の代謝過程の解析など解決しなければならない課題も数多く存在している。しかし、今後のさらなるコンピュータの進歩と理論面での進展によって、コンピュータの利用が薬物分子の設計に不可欠な手段となることは間違いないところであると確信している。

文 献

- (1) 藤田稔夫編, 化学増刊107号「構造活性相関とドラッグデザイン」, 化学同人, (1986).
 - (2) 森口郁生・梅山秀明編, 現代化学増刊13号「新薬のリードジェネレーション」, 東京化学同人, (1987).
 - (3) C. Takayama and A. Fujinami: *Pestic. Biochem. Physiol.*, **12**(1979), 163.
 - (4) B. Norden, U. Edlund, D. Johnels and S. Wold: *Quanta. Struct. -Act. Relat.*, **2**(1983), 73.
 - (5) Y. Kurita, K. Tsushima and C. Takayama: *ACS Symposium Series*, **413**(1989), 183.
 - (6) D. G. Kneller, F. E. Cohen and R. Langridge: *J. Mol. Biol.*, **214**(1990), 171.
 - (7) 金子寛生, 曾根田雄一, 梅山秀明: 第16回構造活性相関シンポジウム講演要旨集, (1988).
- 略 号
- HOMO: highest occupied molecular orbital, 最高被占軌道.
LUMO: lowest unoccupied molecular orbital, 最低空軌道.
QSAR: quantitative structure and activity relationships, 定量的構造活性相関.

材料開発における2つの方法

材料や医・農薬品の開発は従来労をいとわぬ試行錯誤によって行われて来た。たとえば15世紀頃からヨーロッパへ輸入された東洋磁器は生活用具でなく高価な美術品として取り扱われたようで、同じ重さの金と等価に取り引きされたといわれている。このため模造への欲求がきわめて強かった。模造するための技術開発が活発に行われ、配合した素地を80年も土中に埋めておいたり、素地に馬糞を混合するようなことまで行われたそうである。

一方医薬品、農薬品の開発も膨大な時間、コストを必要とする。昔の例ではサルバルサンの開発がある。1904年に梅毒の病原菌がつきとめられるや、エールリッヒと秦佐八郎は有機性ヒ素剤に注目し、合成されたヒ素剤を次々と試みて梅毒の科学療法を発見しようと努力した。ついに1910年606番目に試みたアルスフェナミン(サルバルサンという名はヘキスト社の商品名)が梅毒に有効である

ことを発見した。このためサルバルサンは別名606号とも呼ばれたそうである。現在では1つの薬の開発に3万もの新物質を合成してスクリーニングし、10年間、約100億円もの開発期間とコストが必要であるとのことである。フロンの代替材料のように短期間で新物質の発見をしなければならないような場合、従来のようなランダムな試行錯誤による材料開発に限界があることは明らかである。ランダムな試行錯誤に代わってよりインテリジェントな試行錯誤が求められている。コンピュータ、グラフィックス、理論的手法、データベース、シミュレーション等により試行錯誤の回数を劇的に減らし、材料技術者を“3K”職場から解放するような時代が到来しつつある。実際、特に有機合成分野ではコンピュータ、ケミストリー、システム(CCS)による“化学土方”の3K職場からの解放が進みつつある。