

## FMO 法を用いた抗トリパノソーマ候補薬と標的蛋白質間の相互作用解析

吉野 龍ノ介<sup>†1</sup> 安尾 信明<sup>†2</sup> 萩原 陽介<sup>†3</sup> 大野 一樹<sup>†3</sup> 折田 正弥<sup>†1,3</sup>  
井上 将行<sup>†4</sup> 原田 繁春<sup>†5</sup> 本間 光貴<sup>†6</sup> 稲岡 ダニエル 健<sup>†6</sup>  
北 潔<sup>†6</sup> 関嶋 政和<sup>†1,2</sup>

**概要:** トリパノソーマの寄生が原因であるシャーガス病は、顧みられない熱帯病の一つとして知られている。我々は、トリパノソーマに対する有効な治療薬の開発のため、核酸の構成に重要なピリミジン合成するジヒドロオロト酸脱水素酵素を標的とした阻害剤の研究を行い、X線構造解析によってこれらの阻害剤と標的蛋白質の複合体構造を明らかにした。しかしながら、阻害機構を解明するためには阻害剤と蛋白質間の詳細な相互作用エネルギーを解析する必要がある。そこで本研究では、阻害剤と標的蛋白質のアミノ酸残基間の相互作用エネルギーをフラグメント分子軌道法を用いて解析した。その結果、リシンやアスパラギンとの水素結合が重要であることが明らかになった。

**キーワード:** 熱帯病, トリパノソーマ, ジヒドロオロト酸脱水素酵素, フラグメント分子軌道法

## Protein-ligand interaction energy analysis between anti-trypanosome drug candidate and target protein using fragment molecular orbital

RYUNOSUKE YOSHINO<sup>†1</sup> NOBUAKI YASUO<sup>†2</sup> YOHSUKE HAGIWARA<sup>†3</sup>  
KAZUKI OHNO<sup>†3</sup> MASAYA ORITA<sup>†1,3</sup> MASAYUKI INOUE<sup>†4</sup>  
SHIGEHARU HARADA<sup>†5</sup> TERUKI HONMA<sup>†6</sup> INAOKA DANIEL KEN<sup>†6</sup>  
KIYOSHI KITA<sup>†6</sup> MASAKAZU SEKIJIMA<sup>†1,2</sup>

**Abstract:** Chagas' disease caused by *Trypanosoma cruzi* is known as neglected tropical diseases (NTD's). To develop effective anti-Trypanosome drug, we remarked dihydroorotate dehydrogenase which assumed synthesis of orotic acid and studied inhibitor of the enzyme. Although X-ray structure of target protein with inhibitor is clarified, important protein-ligand interaction is not determined for elucidation of inhibition mechanism. Then, in this research, we analyzed interaction energy between target proteins and inhibitors using fragment molecular orbital method. As a result, it was revealed that hydrogen bonding with Lys and Asn was important. It is expected that these results are useful for anti-Trypanosome drug design.

**Keyword:** Tropical diseases, *Trypanosoma cruzi*, Dihydroorotate dehydrogenase, Fragment molecular orbital method

### 1. はじめに

熱帯病とは発展途上国の多い東南アジア、アフリカ、南アメリカなどの熱帯地域に多発する病気の総称で、これら

の病気は先進国でほとんど症例がないため「顧みられない熱帯病」として問題となっている。熱帯病の一つであるシャーガス病は、寄生性の原虫である *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) によって引き起こされる感染症で、米国南部や中南米などの約 20 カ国で影響を及ぼす病気であり[1]、約 1500 万人が感染していると見積もられている[2]。

我々はシャーガス病の治療薬の開発のため、創薬ターゲットである蛋白質とその基質の構造を X 線構造解析によって決定した[3]。更に基質の構造を母核とした誘導体を阻害剤候補として合成し、それらの候補化合物と標的蛋白質の複合体構造も明らかになっている。候補化合物と標的蛋白質との相互作用を結合様式から予測し、化合物の構造最適化を行うのが創薬プロセスであるが、その際標的蛋白質との相互作用エネルギーを定量的に評価し、阻害剤の結合に重要なアミノ酸残基を求める必要がある。複合体構造が

<sup>†1</sup> 東京工業大学 学術国際情報センター  
Global Scientific Information and Computing Center, Tokyo Institute of Technology, Meguro, Tokyo 152-8550, Japan

<sup>†2</sup> 東京工業大学 情報工学科  
Department of Computer Science, Tokyo Institute of Technology, Meguro, Tokyo 152-8550, Japan

<sup>†3</sup> アステラス製薬株式会社 研究本部化学研究所  
Chemistry Research Labs, Drug Discovery Research, Astellas Pharma Inc, Tsukuba, Ibaraki 305-8585, Japan.

<sup>†4</sup> 東京大学大学院 薬学系研究科  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>†5</sup> 京都工芸繊維大学 理学系研究科  
Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Sakyo, Kyoto 606-8585, Japan

<sup>†6</sup> 東京大学大学院 医学部医学系研究科  
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan

決定されているならば、分子力学法などの計算によって分子間の相互作用エネルギーを求めることが出来るが、原子タイプによって分子のポテンシャルを決定するため多種多様な化合物全てに対応出来ず、また $\pi$ 電子などの量子化学的な要素を考慮することが出来ない。そこで本研究では、蛋白質などの高分子にも対応できるフラグメント分子軌道法 (FMO) [4] を用いて標的蛋白質と阻害剤の候補化合物間の相互作用エネルギーの解析を行い、阻害剤の結合に重要なアミノ酸残基の特定を行った。

## 2. 標的蛋白質及び相互作用解析

### 2.1 ジヒドロオロト酸脱水素酵素

本研究では、抗トリパノソーマ薬のターゲット蛋白質としてジヒドロオロト酸脱水素酵素 (DHODH) に注目した。この蛋白質はピリミジンの *de novo* 合成を行う蛋白質の一種であり、ジヒドロオロト酸からオロト酸への酸化を触媒する酸化還元酵素である (図 1)。

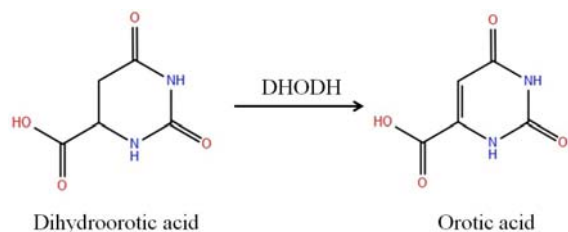


図 1. オロト酸の生成

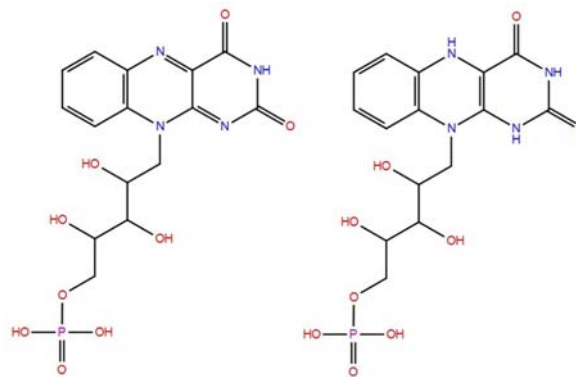
ピリミジンは DNA 中ではシトシンとチミン、RNA 中ではシトシンとウラシルを構成する重要な複素環である。T. cruzi の DHODH の X 線構造は既に明らかになっており、また DHODH-ノックアウト T. cruzi は生存できないことが報告されているため[5]、DHODH は抗トリパノソーマ薬のターゲットとして有望である。

DHODH の反応にはフラビンモノヌクレオチド (FMN) が補因子として働く。FMN は酸化型と還元型 (FMNH<sub>2</sub>) が存在し (図 2)、オロト酸の生成には酸化型が酸化剤として機能する。図 3 は DHODH とオロト酸の複合体構造と活性中心を示したものである。この構図から、オロト酸と FMN の複素環の  $\pi$ - $\pi$  相互作用が示唆される。よって、この活性中心を標的部位とする阻害剤はアミノ酸残基以外にも、補因子である FMN が相互作用も重要であることが考えられる。本研究では、まず図 3 に示した DHODH とオロト酸の複合体構造の相互作用解析を行い、Ligand の結合に重要な活性中心付近のアミノ酸残基の特定を行った。更に、抗 DHODH 候補薬としてのオロト酸誘導体と DHODH 間の相互作用解析も行った。

### 2.2 相互作用解析

本研究では FMO 法を相互作用解析に用いた。FMO 法は 1999 年に北浦らにより提唱された Schrödinger 方程式

の近似解法であり、計算対象とする系をアミノ酸残基、Ligand ごとにフラグメントに分割し、各フラグメントに対して分子軌道法を実行する (図 4)。FMO 法は分子軌道法を行う際、各フラグメント間のポテンシャルの影響を考慮する。結果としてフラグメント間の相互作用エネルギーが求められる。FMO 法の実行は、Gordon と Schmidt らに



酸化型 (FMN)

還元型 (FMNH<sub>2</sub>)

図 2. フラビンモノヌクレオチドの構造式

*Trypanosoma cruzi* DHODH  
 PDB ID : 2E6A

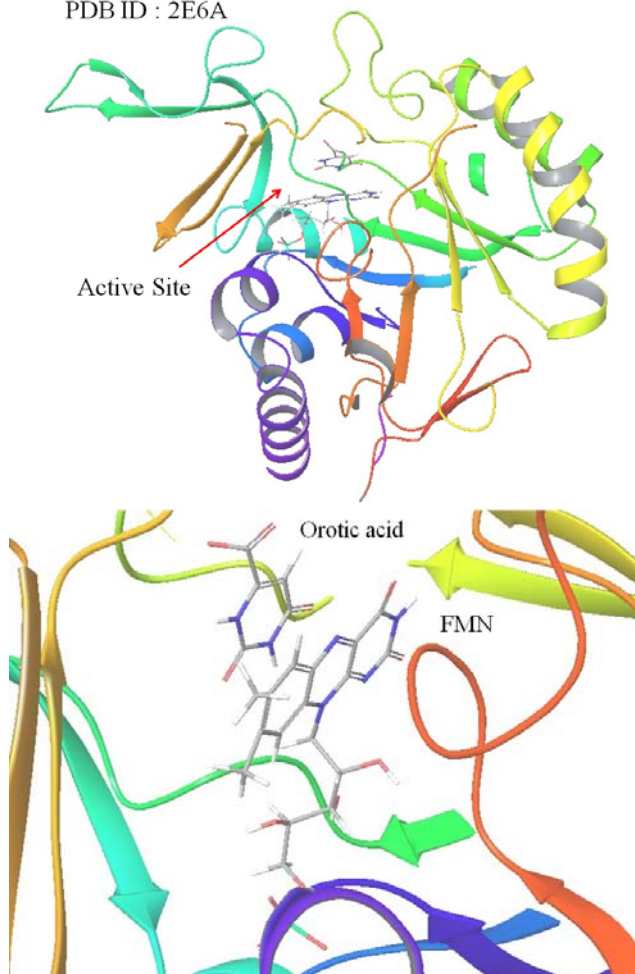


図 3. DHODH の構造及び活性中心

よって開発された量子化学計算プログラム GAMESS [6] を用いて行った。

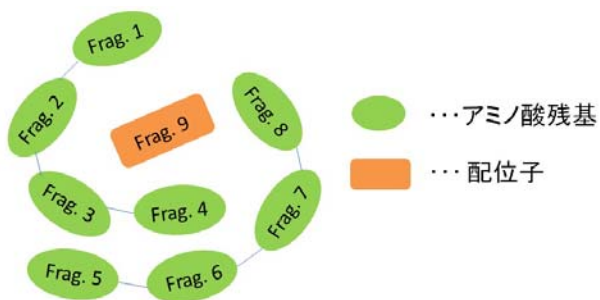


図 4. 蛋白質のフラグメント化

相互作用の解析は、Fedorov らが提唱した Pair interaction energy decomposition analysis [7] を用いて行い、解析ツールは Facio [8] を使用した。図 5 に相互作用解析の例を示す。縦軸は Ligand と各フラグメント間の相互作用エネルギーを示し、横軸はフラグメントの番号を示す。フラグメントの番号は N 末端から C 末端、次に基質や補因子などの Ligand の順に振り分けられ、PDB ファイルに記述されている順番が保存される。この図では Ligand が Lys401 や Phe408 と強く相互作用をしている。

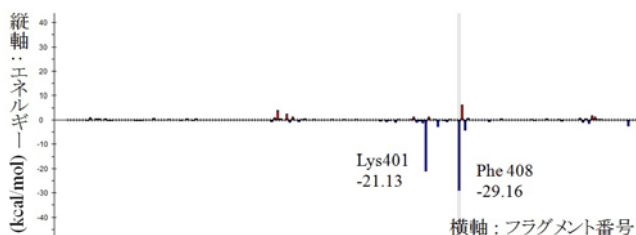


図 5. 相互作用解析例 (kcal/mol)

FMO 法による相互作用解析は、Ligand が蛋白質に結合する際重要な水素結合や疎水性相互作用を定量的に評価することが出来る他、量子化学計算が必要となる  $\pi$ - $\pi$  相互作用や  $\pi$ -cation, CH- $\pi$  相互作用の評価が行えることが利点である。本研究では、抗トリパノソマ候補薬と DHODH の複合体構造に対して FMO 法による相互作用解析を行い、Ligand の結合に重要なアミノ酸残基の特定を行った。

### 3. 相互作用解析結果

ここではオロト酸及びオロト酸誘導体と DHODH 間の相互作用解析結果について述べる。本稿で述べる複合体構造や計算結果の全ては、水素付加を Discovery Studio を用いて行い、モノマーに対して FMO 計算を MP2/6-31G で行った。

#### 3.1 DHODH-オロト酸間の相互作用解析

まず初めに DHODH と生成物であるオロト酸の複合体

構造に対して相互作用解析を行った結果について述べる。FMO 法による相互作用解析の結果を図 6 に示す。解析の結果、Lys43, Asn67, Asn194 が相互作用に重要であることが示唆され、特に Asn との相互作用が強く現れる結果となった。また、複合体構造から予想された FMN との  $\pi$ - $\pi$  相互作用は -6.29 kcal/mol となった。

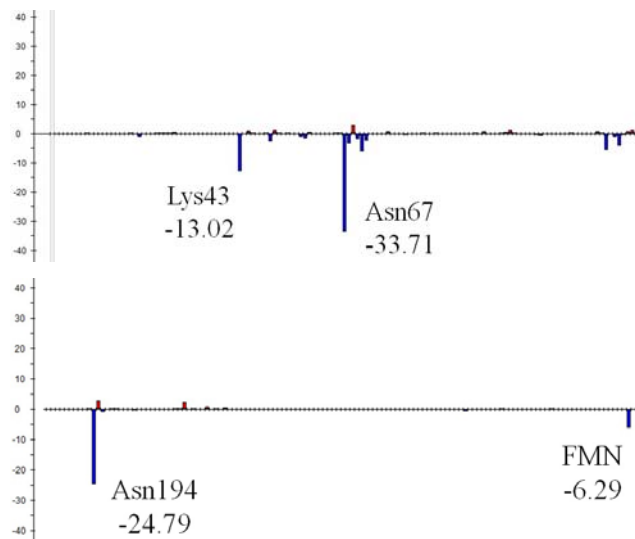


図 6. DHODH-オロト酸間の相互作用エネルギー(kcal/mol)

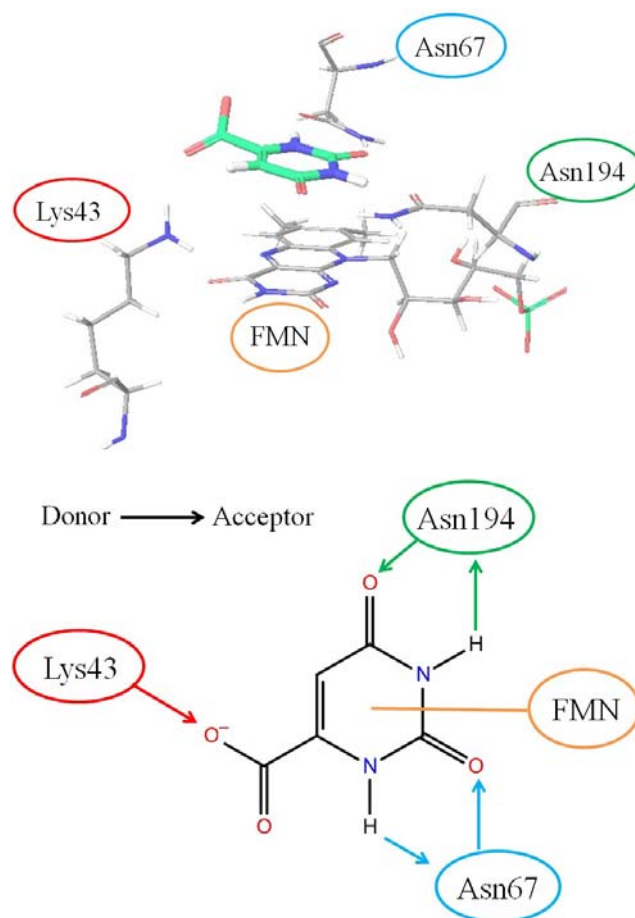


図 7. オロト酸の結合様式

次に相互作用が現れたアミノ酸残基とオロト酸の結合様式を図 7 に示す .Asn67, Asn194 は水素結合を 2 本形成し

ているため、相互作用エネルギーが強く現れることが結合様式から予測される。よって、DHODH の活性中心は水素結合のドナー、アクセプターを有する芳香族が適していることが示唆された。

### 3.2 DHODH-オロト酸誘導体間の相互作用解析

次に DHODH とオロト酸誘導体の複合体構造に対して相互作用解析を行った結果について述べる。オロト酸誘導体は 43 種合成され、DHODH との複合体構造が明らかにされている。誘導体は共通してピリミジン環の 5 位にメチレン鎖を通して官能基を付加した構造となっている (図 8)。まず初めにオロト酸と相互作用を示した 4 つのアミノ酸、Lys43, Asn67, Asn194, FMN との相互作用の結果を表 1 に示す。誘導体でも同様に 4 つのアミノ酸残基との相互

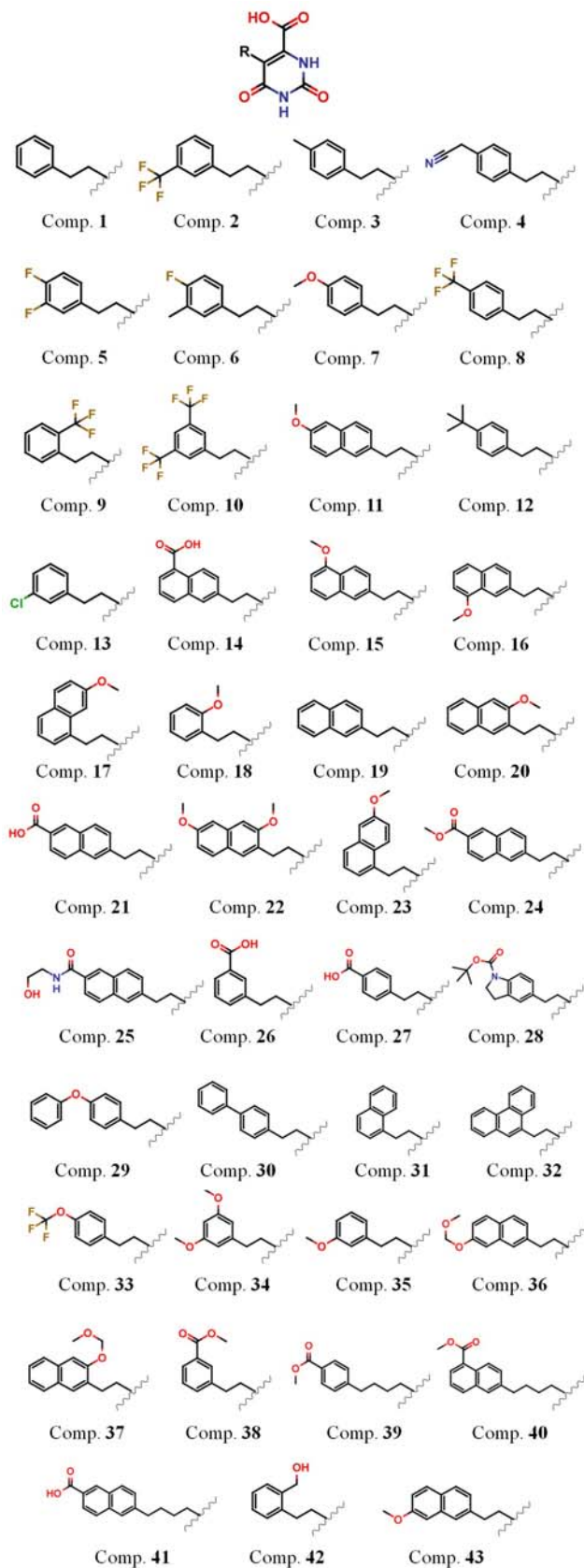


図 8. オロト酸誘導体の構造式

表 1. DHODH と母核間の相互作用エネルギー(kcal/mol)

PDBID	Compound	Lys43	Asn67	Asn194	FMN
3W1R	1	-11.40	-36.98	-25.47	-9.64
3W1T	2	-10.26	-35.07	-23.67	-8.39
3W1U	3	-11.01	-36.88	-30.16	-8.92
3W1X	4	-12.89	-38.06	-24.23	-9.78
3W2J	5	-7.78	-40.08	-25.61	-10.69
3W2K	6	-9.97	-39.10	-26.14	-9.37
3W2L	7	-13.14	-35.55	-24.46	-8.65
3W2M	8	-8.87	-39.46	-26.45	-10.48
3W2N	9	-13.00	-39.49	-27.22	-8.41
3W2U	10	-5.28	-37.27	-24.90	-9.33
3W3O	11	-14.69	-36.40	-28.38	-7.77
3W22	12	-12.59	-37.19	-27.77	-8.49
3W23	13	-8.46	-37.26	-24.82	-9.77
3W6Y	14	-14.43	-34.32	-25.60	-8.09
3W7C	15	-14.39	-36.21	-25.72	-8.73
3W7D	16	-15.93	-38.93	-28.17	-7.48
3W7E	17	-12.63	-39.04	-27.31	-8.50
3W7G	18	-2.77	-39.69	-23.95	-10.71
3W7H	19	-12.81	-38.30	-24.42	-8.36
3W7I	20	-16.99	-34.75	-23.45	-8.51
3W7J	21	-10.24	-39.80	-27.15	-9.62
3W7K	22	-17.90	-34.85	-29.04	-7.66
3W7L	23	-5.54	-39.55	-24.21	-9.74
3W7M	24	-11.72	-39.73	-26.86	-7.00
3W7N	25	-13.58	-40.59	-26.87	-7.37
3W7O	26	-11.13	-37.11	-25.37	-9.26
3W7P	27	-8.50	-37.28	-25.71	-9.76
3W7Q	28	-13.21	-32.89	-26.72	-7.85
3W70	29	-17.93	-31.13	-27.90	-4.56
3W71	30	-14.88	-37.71	-25.69	-8.27
3W72	31	-15.76	-38.29	-30.00	-8.21
3W73	32	-12.73	-39.97	-29.00	-8.74
3W74	33	-10.35	-33.38	-27.55	-10.09
3W75	34	-17.08	-40.20	-29.55	-8.96
3W76	35	-15.64	-39.26	-28.43	-9.97
3W83	36	-16.05	-25.20	-25.57	-6.43
3W84	37	-10.78	-34.59	-24.88	-7.99
3W85	38	-13.72	-34.61	-29.44	-8.75
3W86	39	-11.87	-42.10	-29.49	-8.79
3W87	40	-15.37	-39.60	-27.92	-8.41
3W88	41	-13.33	-39.38	-29.22	-9.34
4JD4	42	-16.41	-38.66	-29.45	-8.39
4JDB	43	-14.67	-36.77	-26.81	-8.33

作用が現れており、相互作用エネルギーの強さも同様に Asn67, Asn194 との相互作用が強く現れるため、これらの相互作用は誘導体でも保存されていると考えられる。次に官能基の導入により、オロト酸では見られなかったアミノ酸残基との相互作用を表 2 に示す。誘導体 25 のように相互作用を示さないものもいくつか存在するが、ほとんどの誘導体は Leu 71, Cys130 との相互作用を示す結果となった。図 9 に誘導体 5 と Leu71, Cys130 間の相互作用を示す。Leu71 の官能基と誘導体 5 のメチレン鎖が密接しているため、疎水性相互作用であることが示唆され、また Cys131 の  $\alpha$  水素が誘導体 5 の芳香環に対して向いているため、CH- $\pi$  相互作用であることが示唆される。また、

表 2. DOHD と官能基間の相互作用エネルギー(kcal/mol)

PDBID	Compound	Leu71	Cys130	Lys214
3W1R	1	-4.72	-3.73	1.72
3W1T	2	-0.21	-2.23	3.17
3W1U	3	-6.26	-3.04	0.17
3W1X	4	-8.46	-5.50	2.66
3W2J	5	-4.12	-5.18	-11.89
3W2K	6	-1.98	-3.11	0.26
3W2L	7	-4.33	-3.12	4.41
3W2M	8	-3.99	-5.60	-7.13
3W2N	9	-7.81	-2.45	-2.00
3W2U	10	-5.17	-4.55	-7.48
3W3O	11	-1.22	-2.66	2.84
3W22	12	-2.90	-1.21	0.46
3W23	13	-1.54	-3.76	2.78
3W6Y	14	-4.68	-3.31	5.73
3W7C	15	-6.27	-2.85	3.13
3W7D	16	-5.91	-1.86	0.58
3W7E	17	-5.96	-3.14	1.59
3W7G	18	-8.16	-2.78	0.69
3W7H	19	-3.28	-2.05	1.51
3W7I	20	-5.29	-3.82	2.58
3W7J	21	-4.19	-3.98	1.88
3W7K	22	-3.15	-0.70	-3.67
3W7L	23	-4.29	-3.99	1.06
3W7M	24	-4.63	-3.38	4.99
3W7N	25	8.04	-2.92	1.93
3W7O	26	-3.65	-5.00	2.05
3W7P	27	-1.38	-3.94	-13.55
3W7Q	28	-7.88	-1.37	-1.95
3W70	29	-5.37	-1.67	-0.07
3W71	30	-3.51	-2.87	5.48
3W72	31	-2.86	-3.52	0.78
3W73	32	-7.66	-3.56	-1.02
3W74	33	-2.60	-5.09	-3.62
3W75	34	-5.89	-4.04	3.53
3W76	35	-4.05	-3.87	4.56
3W83	36	-3.24	-1.40	0.84
3W84	37	-7.55	0.89	4.40
3W85	38	-5.11	-3.29	-0.12
3W86	39	-6.19	-0.43	6.61
3W87	40	-8.75	-2.18	-3.40
3W88	41	-7.43	-0.79	-4.98
4JD4	42	-5.37	-4.44	-1.31
4JDB	43	-7.65	-6.26	1.24

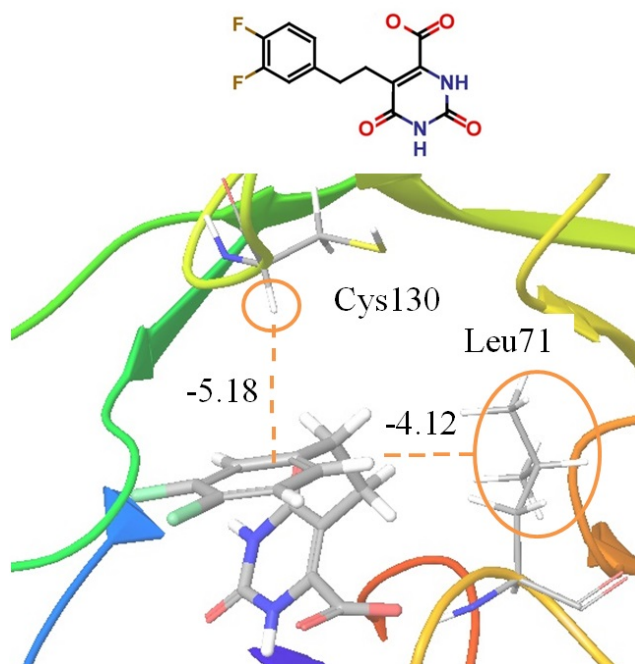


図 9. 誘導体 5 と Leu71, Cys130 間の相互作用(kcal/mol)

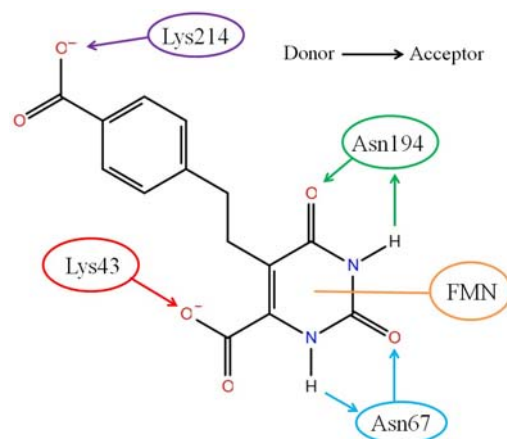
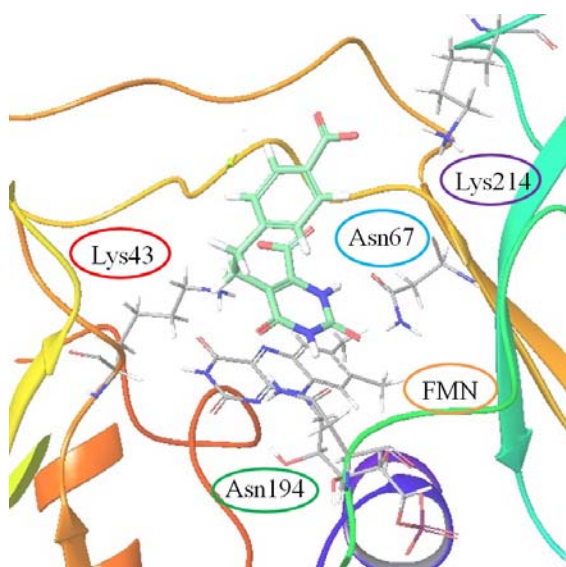


図 10. 誘導体 27 の結合様式

いくつかの誘導体は Lys214 と相互作用を示す。誘導体 27 が Lys 214 との相互作用が最も強く現れ、その他の誘導体では 5, 8, 10, が Lys214 と相互作用を示す。図 10 に誘導体 27 の結合様式を示す。結合様式より、フェニル基に導入されたカルボキシレートが Lys214 と水素結合を形成しているため、Lys214 付近に水素結合のアクセプターが存在することが Ligand の結合に重要であると考えられる。

他にも誘導体 27 と同様に、官能基にアクセプターを有する誘導体はいくつかあるが、誘導体 21 などは Lys214 との相互作用を示さない。図 11 に誘導体 21, 27 と Lys214 の構造の比較を示す。誘導体 21 は 27 と比較すると、ナフタレン環にカルボキシレートが置換している誘導体 27 では、Lys214 は配座を変化させ疎水性であるメチレン鎖を誘導体 27 のナフタレン環に向けている。よって、Lys214 は Ligand 官能基の大きさによって配座を変化させ、適切な位置に存在するアクセプターと水素結合を形成すると考えられる。

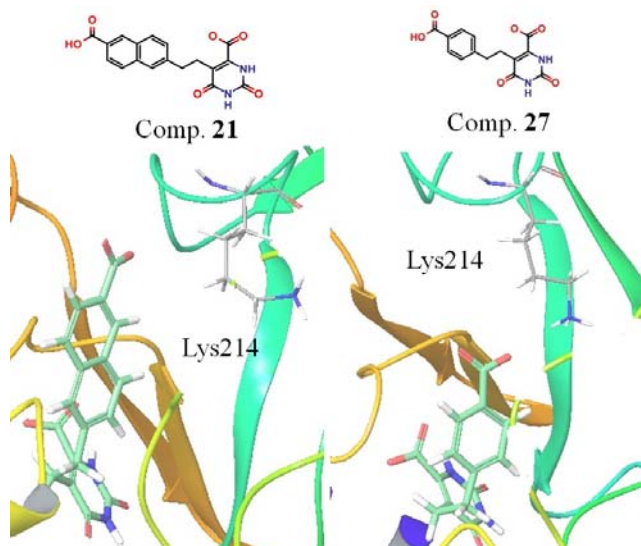


図 11. 誘導体 21, 27 と Lys 214 の結合様式

#### 4. 結論

FMO 法による相互作用の結果より、誘導体の母核であるオロト酸は Lys43, Asn67, Asn194 と水素結合、FMN と  $\pi$ - $\pi$  相互作用を示し、導入された官能基は Leu71 と疎水性相互作用、Cys130 と CH- $\pi$  相互作用、官能基の適切な位置にアクセプターを有する誘導体は Lys214 と水素結合を示す結果となった。これらの相互作用が Ligand の結合に重要であると考えられるため、図 12 に示すように Lys 付近にアクセプター、Asn 付近にドナー又はアクセプター、Leu71 付近に疎水性の官能基、活性中心中央及び Cys130 付近に芳香環を有する化合物が DHODH の阻害剤として適していると考えられる。母核であるオロト酸は水素結合が多く存在し、導入された官能基は疎水性相互作用や

CH- $\pi$  相互作用等の非極性相互作用が現れる。そのため、母核であるオロト酸は結合自由エネルギーのエントロピー項への寄与が高く、導入された官能基は DHODH に結合する際の脱水和に重要であると考えられるため、エントロピー項への寄与が高いと予想される。本研究によって得られた相互作用解析の知見をもとに、抗トリパノソーマ薬が開発されることが期待される。

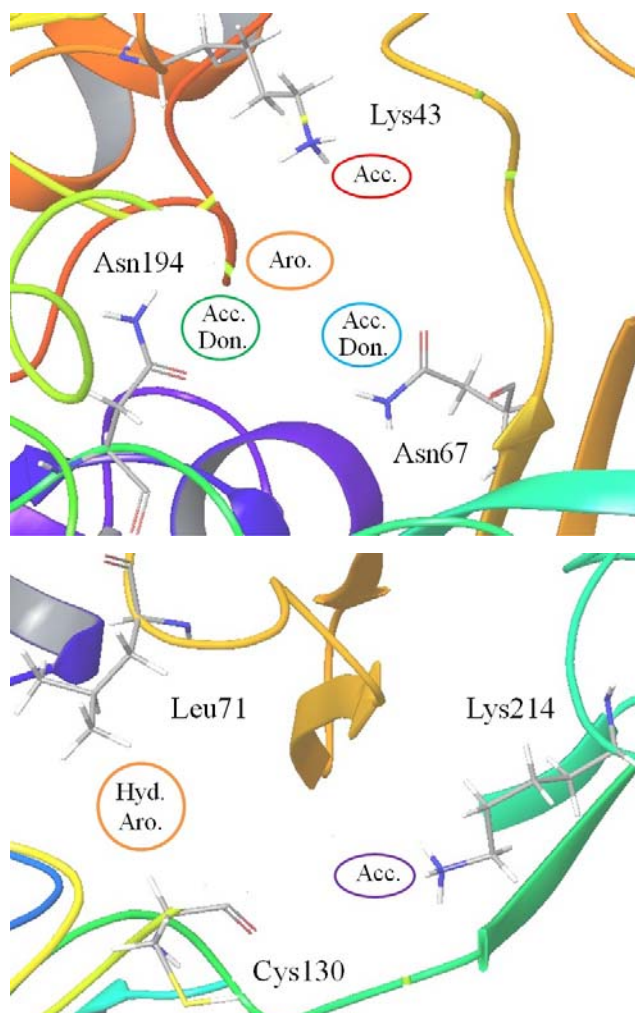


図 12. 相互作用解析により推定されるファーマコフォア

Acc : Acceptor, Don : Donor  
 Aro : Aromatic, Hyd : Hydrophobic

#### 参考文献

- [1] Schmunis G.A., Yadon Z.E.: Chagas disease a Latin American health problem becoming a world health problem, *Acta Trop.*, **2010**, 115, 14-21
- [2] World Health Organization(TDR/GTC/09 2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico. Ginebra: World Health Organization.
- [3] Inaoka D.K., Sakamoto S., Shimizu H., *et al.*:

- Structures of Trypanosoma cruzi Dihydroorotate Dehydrogenase Complexed with Substrates and Products, *Biochemistry*, **2008**, 47, 10881-10891
- [4] K. Kitaura, T. Sawai, *et al.*: Pair interaction molecular orbital method: an approximate computational method for molecular interactions, *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, 312, 319-324
- [5] Annoura T., Nara T., *et al.*: The Origin of Dihydroorotate Dehydrogenase Genes of Kinetoplastids, with Special Reference to Their Biological Significance and Adaptation to Anaerobic, Parasitic Conditions, *J. Mol. Evol.*, **2005**, 60, 113–127
- [6] M.W. Schmidt, K. K. Baldridge, *et al.*: General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comput. Chem.*, **1993**, 14 1347-1363
- [7] Fedorov D.G., Kitaura K.: Pair interaction energy decomposition analysis, *J. Comput. Chem.*, **2007**, 28, 222-237
- [8] <http://www1.bbiq.jp/zzzfelis/Facio.html>