

# 薬学教育におけるドッキングシミュレーションソフトの活用 Use of a Molecular Docking-Simulation Software for Pharmaceutical Education

植沢芳広<sup>a</sup>、東 恭一郎<sup>b</sup>、古源 寛<sup>c</sup>

Yoshihiro Uesawa, Kyoichiro Higashi, Hiroshi Kogen

<sup>a</sup> 明治薬科大学 臨床薬剤学教室、<sup>b</sup> 生化学教室、<sup>c</sup> 医薬分子設計学教室

E-Mail: uesawa@my-pharm.ac.jp

## 1. ドッキングシミュレーションとは

一般に、薬物、ホルモン、栄養素といった低分子化合物の生理作用の発現過程には、酵素等の生体高分子との相互作用が介在する。この、低分子・生体高分子間相互作用における複合体の安定構造をコンピュータ上で計算的に推定する手法がドッキングシミュレーションである。ドッキングを実施するためには低分子側、高分子側およびその相互作用に関する様々な知識が要求されるため、学生教育への導入の敷居は決して低いとは言えない。また、商用のドッキングシミュレーションソフトウェアは一般に高価であり、これもまたドッキングシミュレーションの教育への導入に対する大きな障壁となっていると考えられる。しかし、この手法は創薬過程で重視されるばかりでなく、薬効発現機序の理解にも寄与し得る。そこで本稿では、無料で導入可能なドッキングプログラムによるシミュレーション実施例を通して、薬学教育への導入の可能性を検討する。

## 2. AutoDock

現在、無料でドッキング環境を構築可能な数種類のアプリケーション (AutoDock<sup>1)</sup>、Dock<sup>2)</sup>等) が存在する。以後、本稿では AutoDock を例としてドッキングシミュレーションソフトウェアの使用例を報告するとともに教育導入への可能性を検討していく。AutoDock は米国の Scripps Research Institute が開発した、薬物候補化合物等と 3 次元構造既知のタンパク質との複合体の結合様式を推定するためのドッキングシミュレーションプログラムである。Linux のみ

ならず、一般に普及している Windows および Macintosh 上においても動作する。また、AutoDockTools (ADT) を使用することにより GUI 環境を獲得できるため、コマンドラインの入力は基本的に不要である。これらの特徴は、コンピュータリテラシーの不均一な薬学部学生に対する教育ツールとして重要な要件であると考えられる。さらに、上記の AutoDock および AutoDockTools は完全に無料のソフトウェアとして Scripps Research Institute の運営するホームページに公開されている<sup>1)</sup>。なお、Windows 上で両ソフトウェアを実行するためには、UNIX 環境を構築するソフトウェアである Cygwin<sup>3)</sup> およびプログラミング言語である Python<sup>4)</sup> を事前にインストールしておく必要があるが、これらもまたフリーソフトである。

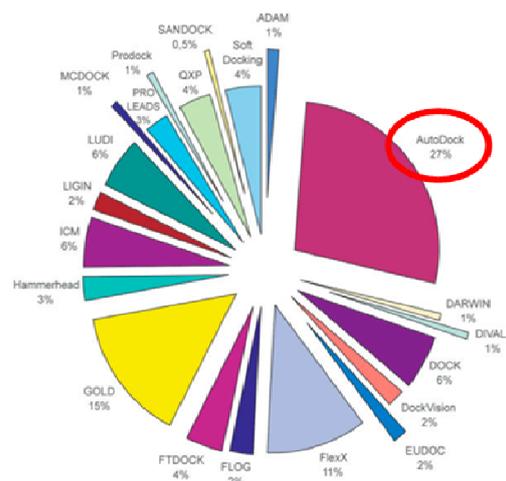


図1. AutoDock の引用回数

(Proteins, 2006, 65:15-26; Using AutoDock4 With ADT.ppt Handouts から引用)

### 3. AutoDock の信頼性

図1に、2001年から2005年の間における各種ドッキング用アプリケーションの化学論文への引用回数を示した<sup>5)</sup>。多様なプログラムの中で、AutoDockの被引用回数は最大であり、全体の27%を占有している。この報告は、先端的な研究分野における同ソフトウェアの高い信頼性を裏付ける資料である。

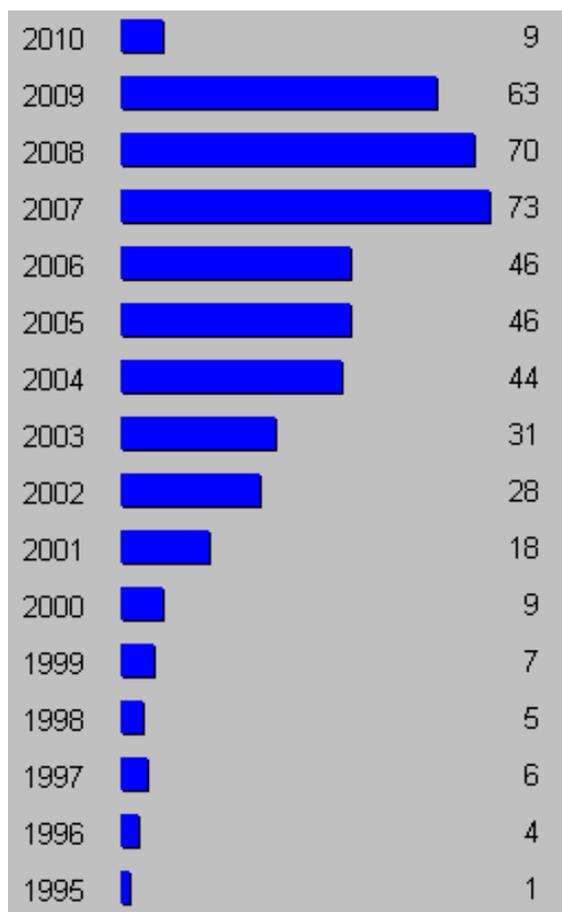


図2. AutoDock 掲載論文数の推移  
(2010年1月時点/SciFinder)

上記資料は2006年に報告されたものであった。日進月歩の当該分野の現状はどうであろうか。図2に現在までのAutoDock掲載論文数の年次推移を示す。各掲載論文数は、本学に導入されている科学文献データベースであるSciFinder<sup>6)</sup>において検索単語に“AutoDock”を入力した結果得られたものである。2010年1月に行った調査であるため、2010年は9件と少ない。2009年の論文数は本稿執筆時点

(2010年2月)で66件であり、まだ若干推移し得るものと思われる。このような単純な調査であるが、現時点においてもAutoDockがドッキングシミュレーション関連研究の主要なツールの一つであることが伺える。なお、2007年の掲載論文数がその前年と比較して飛躍的に増加している理由として、AutoDockプログラムのノンライセンス化との関連が推察される。

### 4. AutoDock の使用例

ここでは、教育への導入の可能性を検討する目的でドッキングシミュレーションの実施例を紹介したい。最初に、HIV1-プロテアーゼとプロテアーゼ阻害剤インディナビルのドッキングシミュレーションを示す。

HIV1-プロテアーゼはエイズウイルス(HIV)の初期増殖過程に参与するタンパク質分解酵素である<sup>7)</sup>。HIVはヒトの体内で産生したHIV遺伝子由来のタンパク質を、このプロテアーゼを用いて切断することによって、ウイルス構造タンパク質を形成する。この過程はHIVの増殖に必須であることから、HIV1-プロテアーゼ活性を阻害する化合物は抗エイズ薬の重要なシーズとなる。一方、インディナビルは、メルク社が*in silico*スクリーニングを用いて開発した最初期のHIV1-プロテアーゼ阻害薬である<sup>8)</sup>。HIV1-プロテアーゼおよびインディナビルの構造ファイルはAutoDockのチュートリアルとして提供されている<sup>1,9)</sup>。また、両者の複合体のX線結晶解析構造はProtein Data Bank<sup>10)</sup>に登録されており、チュートリアルの構造はPDBID: 1HSGと一致する。

#### 4-1. タンパク質構造ファイルの取り扱い

チュートリアルのプロテアーゼ構造ファイルは上記X線解析データからインディナビルを削除された形で提供されている。X線解析データは水素に関する情報が欠落しているとともに、水分子由来の酸素を多量に含有している。このため、結晶構造データからの水分子の排除と水素原子の添加がドッキングシミュレーションにおける最初の作業となるが、これらはGUI環境を備えたAutoDockToolsによって簡便

に遂行できる。さらにいくつかの前処理の済んだ構造ファイルの構成原子、静電マップ等の構造情報をグリッドに移行する。AutoDockにおけるグリッドとは、初期設定において 0.375 Å幅(炭素炭素間結合距離の約 4 分の 1)のグリッドポイントからなる方形領域である。ここにタンパク質の基質親和性ポケット周辺の構造情報を移行することによって計算コストの軽減が図られる。図 3 は HIV1-プロテアーゼ二量体の中央部に貫通する親和性ポケット周辺にグリッドを展開した例である。なお、親和性ポケットに関する情報のないタンパク質を取り扱わなければならない場合にポケットを探索する手段として、タンパク質全体を取り囲むようにグリッドを展開する手法をブラインド・ドッキングという。

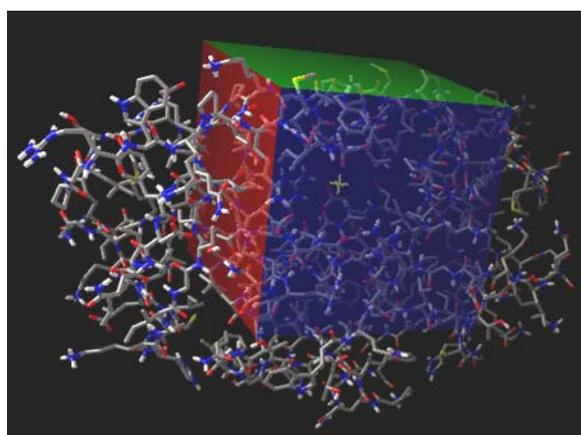


図3. グリッド

#### 4-2. 低分子構造ファイルの取り扱い

シミュレーションに使用する低分子側(リガンド)のインディナビルは、チュートリアルにおいて PDB ファイル形式で供給されている。なお、AutoDockTools は MOL2 等他のファイル形式にも対応している。PubChem<sup>11)</sup>、ZINC<sup>12)</sup>、KEGG<sup>13)</sup>等のデータベースから取得した低分子構造情報を ChemDraw ( ChemBioDraw )<sup>14,15)</sup> や Marvin View/Marvin Sketch<sup>16,17)</sup>などの構造式エディターを用いて適宜ファイル変換することによりドッキングシミュレーションに供することが可能である。

今回のリガンド分子ファイルはタンパク質と同様に水素原子を欠落しているため、AutoDockTools によ

って水素を添加する。さらに、Gasteiger 電荷が計算される。これらの作業はリガンド PDB ファイルを AutoDockTools で開くことによって自動的に行われる。インディナビルは単結合の多い比較的フレキシブルな分子である。AutoDock では遺伝的アルゴリズムにより親和性部位における低分子構造のコンホメーションを推定するが、フレキシビリティの高い分子のドッキングシミュレーションには大きな計算コストが要求される。今回の試行においては、チュートリアルに従い AutoDockTools によってアミド結合の回転等を制限した。

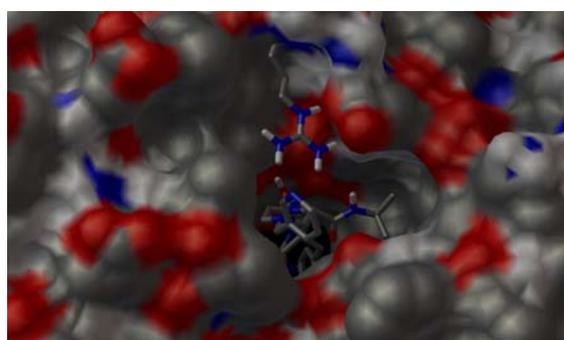


図4. ドッキングポーズ

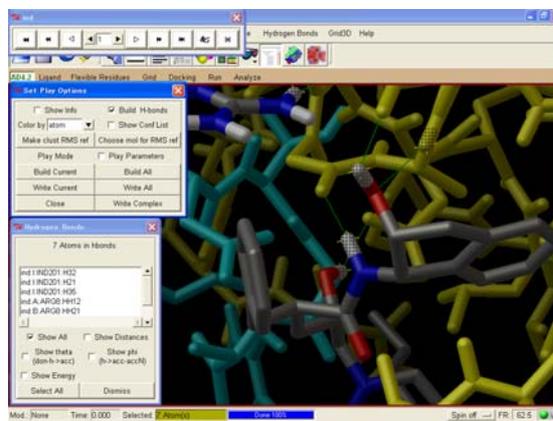


図5. 水素結合の表示

#### 4-3. AutoDock の実行

AutoDock プログラムは AutoDockTools から GUI 環境下で実行することができる。数分から数時間の計算の後、“Successful Completion”と表示されれば無事計算終了である。計算結果は AutoDockTools によって高い表現力で可視化できる。図 4 にタンパク質表面を構成原子ごとに色分けしたドッキング風景を示す。タンパク質側およびリガンド側をともにス

ティックモデルで描画し、水素結合の位置を明示することも可能である(図5)。図6に10,000,000回の試行の結果得られたドッキングポーズを示す。遺伝的アルゴリズムによってこの回数シミュレーションを実行することにより、ほぼ図示したコンホメーションに収束した。これは、図の右に併記した複合体 X 線結晶解析構造中のリガンドコンホメーションと良く一致した。これらの結果は、AutoDock によるシミュレーションがインディナビルと HIV1-プロテアーゼの複合体を良く再現できることを示唆している。

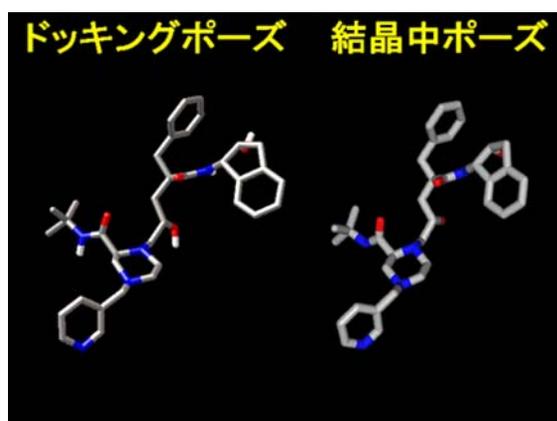


図6. 結晶中ポーズとの比較

#### 4-4. 誤った鍵と鍵穴の例

リガンドとターゲットタンパク質の関係は鍵と鍵穴に例えられる。タンパク質の親和性ポケット内に過不足無く収まり、周辺の官能基と安定な相互作用を形成できるリガンドは、タンパク質の鍵穴にフィットする正しい鍵として高い親和性や阻害活性を示す可能性が高い。それでは、誤ったリガンドを AutoDock シミュレーションに供するとどうなるであろうか。

アトルバスタチンは高脂血症治療薬として頻用される HMG-CoA 還元酵素阻害薬である<sup>18)</sup>。その本来のターゲットタンパク質は HMG-CoA 還元酵素であり、HIV1-プロテアーゼとは無関係な化合物である。そこで、HIV1-プロテアーゼに対するリガンドとしてアトルバスタチンを使用し、上記のインディナビルと同様の条件におけるドッキングシミュレーションを試みた。結果を図7に示す。HIV1-プロテアーゼは二量体であるが、結合状態を俯瞰するため B 鎖とリガンドのみを表示した。インディナビルはタンパク質表面に

良くフィットした安定な複合体を想起させる結合様式であることがわかる。一方、アトルバスタチンは間隙の多い不安定な複合体構造を与えた。AutoDock によって算出されるインディナビルおよびアトルバスタチンの結合エネルギーは、各々  $10^{-11}$  kcal/mol および  $10^{-4}$  kcal/mol であった。すなわち、正しい鍵であるインディナビルは誤った鍵であるアトルバスタチンの  $10^7$  倍安定であると評価された。

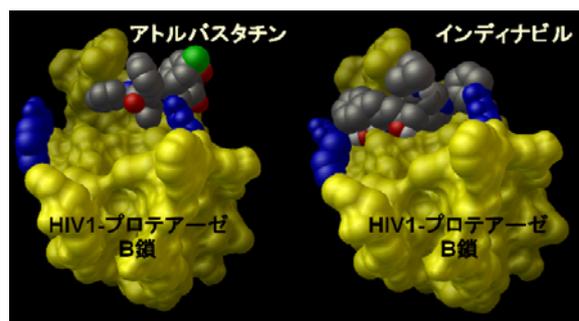


図7. ドッキングポーズの比較

### 5. ドッキングシミュレーションを用いた実習案

以上述べてきた AutoDock によるドッキングシミュレーションは、低分子と人体との相互作用を主幹とする「薬学」の理解に大きく寄与すると考えられる。以下、ドッキングシミュレーションを用いた実習案を簡単に述べる。

#### a) 「基質探索」実習

複数のリガンド構造ファイル(もしくはリガンド名)を与え、教材タンパク質との間に高い親和性を有するリガンドを探索させる。製薬企業の行う *in silico* スクリーニングの小規模版である。

#### b) 「親和性ポケット探索」実習

ブラインド・ドッキングの手法を用いて、教材リガンド分子と親和性の高いタンパク質分子表面(ポケット)を探索させる。

リガンド-タンパク質間相互作用は低分子化合物の生理作用発現過程の根幹である。アイデア次第で様々な *in silico* 実習が構築できるであろう。

### 6. 所感

AutoDock を用いたドッキングシミュレーションを遂

行するには、やや煩雑な構造ファイルの取り扱いが必要となる。特に Windows 環境では、Cygwin や Python を別途インストールする必要があり、またコンピュータ環境によってはアプリケーションが起動しない、計算が完遂しないなどといった多くの不具合を経験した。すなわち、いかに GUI 環境が整備されていても AutoDock を使いこなすにはある程度のコンピュータリテラシーはやはり必要であると言える。しかし、この点さえクリアできれば、シミュレーション自体は比較的容易に達成できる。総合的に、薬学教育へのドッキングシミュレーションの導入は十分に現実的な範囲にあると考える。

## 7. 参照

- 1) <http://autodock.scripps.edu/>
- 2) <http://dock.compbio.ucsf.edu/>
- 3) <http://www.cygwin.com/>
- 4) <http://www.python.jp/Zope>
- 5) Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges, Sousa, SF, Fernandes, PA, Ramos, MJ, *Proteins*, 2006, **65**: 15-26.
- 6) <http://www.cas.org/products/sfacad/index.html>
- 7) Inhibition of HIV protease activity by heterodimer formation, Babé LM, Pichuantes S, Craik CS, *Biochemistry*, 1991, **8**; **30**: 106-111.
- 8) L-735, 524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, Vacca JP, Dorsey BD, Schleif WA, Levin RB, McDaniel SL, Darke PL, Zugay J, Quintero JC, Blahy OM, Roth E, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **26**; **91**: 4096-4100.
- 9) Using AutoDock 4 with AutoDockTools: A Tutorial, Written by Ruth Huey and Garrett M. Morris.
- 10) <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- 11) <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 12) <http://zinc.docking.org/>
- 13) <http://www.genome.jp/kegg/>
- 14) <http://www.cambridgesoft.com/>
- 15) 第9回MBI:植沢芳広、生物系・臨床系教育研究におけるChemDrawの活用、*明治薬科大学研究紀要*、2007、**第36号**: 67-69.  
[http://www.my-pharm.ac.jp/joho/mbi/no.9/kiyo9\\_uesawa.pdf](http://www.my-pharm.ac.jp/joho/mbi/no.9/kiyo9_uesawa.pdf)
- 16) <http://www.chemaxon.com/>
- 17) 第9回MBI:植沢芳広、薬学教育に有用な高機能分子エディター、*明治薬科大学研究紀要*、2009、**第38号**:48-52.  
[http://www.my-pharm.ac.jp/joho/mbi/mbi11/mbi11\\_uesawa.pdf](http://www.my-pharm.ac.jp/joho/mbi/mbi11/mbi11_uesawa.pdf)
- 18) Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, Sprecher DL, Schwartz SL, Lupien PJ, Jones PH, Haber HE, Black DM, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 678-682.