



高精度計算創薬科学

研究代表者：重田 育照（筑波大学計算科学研究センター）

1) 研究期間

中期型（2020 年 5 月 25 日～2021 年 3 月 31 日）

2) 応募時の目的・目標・達成イメージなど

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2(SARS-CoV-2) による新型コロナウイルス疾患 2019(COVID-19)が中国・武漢から初めて報告されて以来、未だ SARS-CoV-2 に対する特異的な抗ウイルス薬が利用可能になっていない。一方で、その新規開発に数年から十年を必要とする。したがって、長期間の臨床が必要となる新薬の新規開発ではなく、既存薬の転用(ドラッグリポジショニング)が有効であると考えられている。現在、SARS-CoV-2 由来のタンパク質の結晶構造解析が急速になされ、様々なターゲットタンパク質の精密な構造が得られるようになってきており、それらに対する各種薬剤の結合様式の解明、および新規薬剤候補の同定が求められている。本研究では、各種計算科学的なアプローチを用いることで、薬剤候補のスクリーニングを加速することを目的とし、抗ウイルス薬の同定に資する研究を行う。

3) 本プログラムで実施した研究の内容と成果

COVID-19 は世界的なパンデミックとなり、ウイルス (SARS-CoV-2) に対する薬剤の開発が急務となっている。SARS-CoV-2 の 3C 様プロテアーゼ (3CLpro) は、広範な抗コロナウイルス創薬のための好ましいターゲットである。Liu らは、*S. baicalensis* とその成分の抗 SARS-CoV-2 活性を調べたところ、その成分であるバイカレインが、インビトロで SARS-CoV-2 3CLpro 活性を阻害し、IC₅₀ が 0.39 μ M であることを明らかにした[H. Liu, F. Ye, Q. Sun, H. Liang, C. Li, S. Li, R. Lu, B. Huang, W. Tan, L. Lai, J. Enz. Inhib. Med. Chem., 36, 497-503 (2021).]。また、SARS-CoV-2 3CLpro 活性を阻害する可能性のある他のハーブ由来の 4 種のバイカレイン類似体を同定した。したがって、これらのフラボノイド類は広範な抗コロナウイルス薬としての可能性があると考えられている。またバイカレインは腫瘍関連ヒトキナーゼ CK2 の触媒サブユニットに対するリガンドとして知られており、バイカレインをハロゲン原子で置換することで、hCK2 α への結合親和性が向上することも報告された[E. Marzec, M. Świtalska, M. Winiewska-Szajewska, J. Wójcik, J. Wietrzyk, A.M. Maciejewska, J. Poznański, A. Mieczkowski, IUBMB Life. 72, 1250-1261 (2020).]。これらの研究を総合すると、ハロゲン置換により 3CLpro への親和性の向上も期待できる。

本研究では、バイカレインを含む数種類のフラボノイド系に対して、ドッキングシミュレーション、分子動力学 (MD) 計算、フラグメント分子軌道法 (FMO) 計算を駆使し、結合自由エネルギー解析を行うことで、バイカレインのハロゲン置換体が 3CLpro に対して最も親和性が高いことを示した。

図 1 はドッキング計算による結合親和性スコアであり、化合物の種類によって、ハロゲン置換に



より親和性が上昇、あるいは下降する場合が見られた。特にバイカレイン (TH027) のハロゲン置換体 (TH024) は調査した分子の中で最も低い結合エネルギーを示し、より 3CLpro への親和性が高いことが示された。

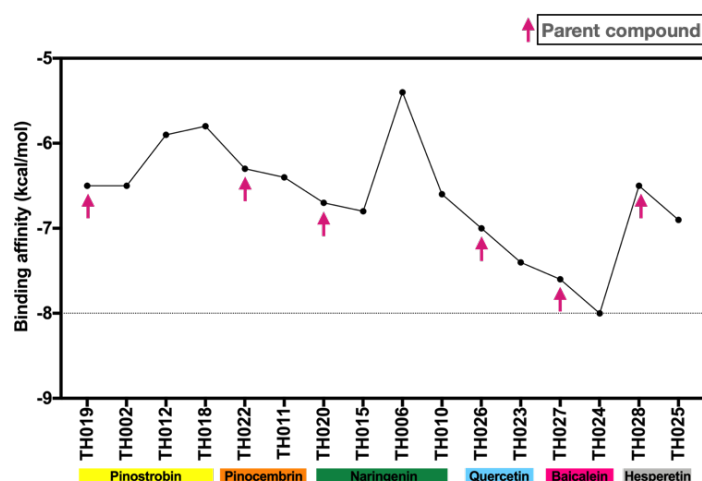


図1 ドッキング計算による結合親和性 (kcal/mol) (矢印は親化合物を表す)

ドッキング構造から分子力場レベルでエネルギー緩和させた構造に対する FMO/RI-MP2 法による対相互作用 (結合エネルギー) の評価結果を図 2 に示す。横軸は相互作用の大きなアミノ酸残基の種類および番号を示している。カラーマップはそれぞれ青が引力的な、赤が斥力的な相互作用を、濃淡がその強度を表している。この結果により、どのアミノ酸残基がリガンドと強く相互作用しているのかを一目で把握することが可能である。例えばバイカレインの場合は、N142-C145、M165-E166 が主に引力的に寄与している。右縦軸には全結合エネルギーを示しており、バイカレインのハロゲン置換体が親化合物よりも結合エネルギーが低い傾向はドッキングシミュレーションと同様である。一方でドッキングの結果と異なり、ケルセチンの方が全結合エネルギーが低くなる結果となった。

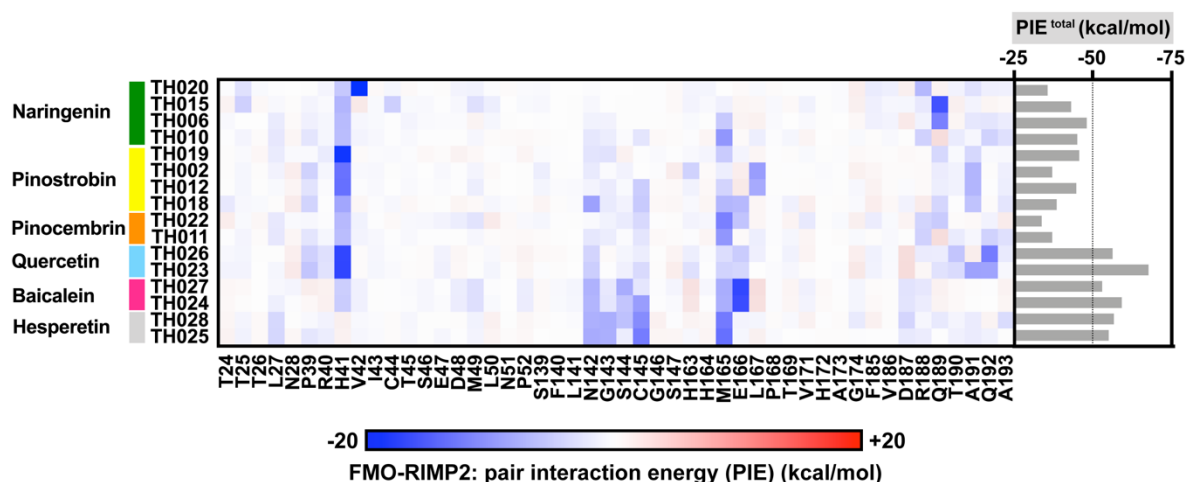
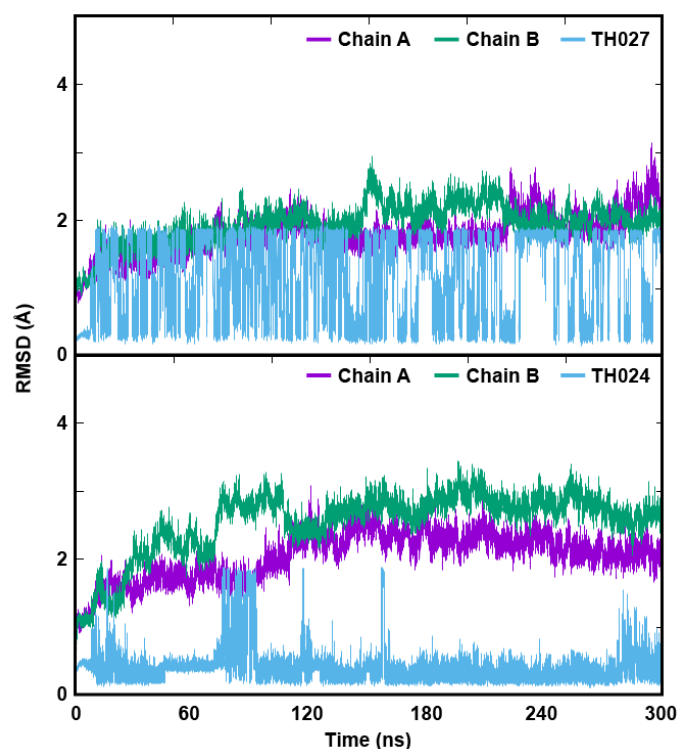


図2 FMO 計算による対相互作用エネルギー (kcal/mol)

(カラーマップ：アミノ酸残基ごとに表示、棒グラフ：全結合エネルギー)

上記の結果は静的な単一の代表構造に対する結果であり、実際の結合親和性を評価するためには、ダイナミクスによる安定性の評価が必要である。そこで、バイカレイン (TH027) とバイカレインのハロゲン置換体 (TH024) について、300 ns の分子動力学シミュレーションにより、ポケット内部での構造揺らぎを評価した。バイカレイン (図 3 上) は、ポケット内で構造が揺らいでいるのに対し、図 3 の FMO の結果から示唆されているようにハロゲン置換体はハロゲンと C145 との相互作用によってより安定化し、揺らぎが抑えられている (図 3 下) ことがわかった。一般的に揺らぎが小さい方が高い結合能を有することから、ハロゲン置換体の方が静的な効果だけでなく動的にも結合



能が高いことが示された。

図 3 MD 計算によるリガンドの位置に関する平均二乗変位 (RMSD) (Å)

本研究では、16 種類のフラボノイドに対して、ドッキングシミュレーション、分子動力学計算、フラグメント分子軌道法計算を実行し、結合親和性 (結合エネルギー) が低いものを見いだすことができた。特にバイカレインのハロゲン置換体は結合ポケット内で 300 ns のシミュレーションの範囲内で極めて安定に存在することがわかった。一方で、リガンドがどのように結合するなのかや、どの程度の間、結合が持続するかについては、より長時間の MD シミュレーションによる検証が必要である。

4) 研究業績・研究広報

1. R. Morita, Y. Shigeta, R. Harada, "Random Rearrangements of Water Molecules in Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Enhance Structural Explorations of



- Proteins", *Bulletin of Chemical Society of Japan* **94**, 97-105 (2021).
DOI:[10.1246/bcsj.20200174](https://doi.org/10.1246/bcsj.20200174)
2. S. Boonyasuppayakorn, T. Saelee, P. Visitchanakun, A. Leelahavanichkul, K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, T. N. T. Huynh, J. J. H. Chu, T. Rungrotmongkol, W. Chavasiri, "Dibromopinocembrin and dibromopinostrobin are potential anti-dengue leads with mild animal toxicity", *Molecules* **25**(18), 4154 (2020).
DOI:[10.3390/molecules25184154](https://doi.org/10.3390/molecules25184154)
 3. R. Harada, K. Yamaguchi, Y. Shigeta, "Enhanced Conformational Sampling Method Based on Anomaly Detection Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics: ad-PaCS-MD", *Journal of Chemical Theory and Computation* **16**(10), 6716-6725 (2020).
DOI: [10.1021/acs.jctc.0c00697](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00697)
 4. R. Morita, K. Nakano, Y. Shigeta, R. Harada, "The Molecular Mechanism on the Actin-Binding Domain of the Alpha-Actinin Ain1 Studied by Molecular Dynamics Simulations and Mutagenesis Experiments", *Journal of Physical Chemistry B* **124**(39), 8495-8503 (2020).
 5. B. Nutho, P. Mahalapbutr, K. Hengphasatporn, N.C. Pattarangoon, N. Simanon, Y. Shigeta, S. Hannongbua, T. Rungrotmongkol, "Why are lopinavir and ritonavir effective against the newly emerged Coronavirus 2019?: Atomistic insights into the inhibitory mechanisms", *Biochemistry*, **59**(18), 1769-1779 (2020).
DOI:[10.1021/acs.biochem.0c00160](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00160)
 6. 重田育照, "Covid-19 関連タンパク質に対する統合的インシリコリポジショニング", HPCI オープンセミナー「スーパーコンピュータと COVID-19」, Jan. 19th 2021, Online 開催.
 7. 重田育照, "Covid-19 関連タンパク質に対する統合的インシリコリポジショニング", 第 9 回 JCAHPC セミナー (第 4 回 OFP 利用活用報告会)「人類と地球を守るスーパーコンピューティング」, Oct. 15th 2020, Online 開催.
 8. 重田育照, 日本生化学会大会、シンポジウム「学際研究で切り拓く脂質とアミノ酸のメタボダイナミズム」, Sep. 15th 2020, Online 開催.

5) 最新の成果・情報

筑波大学「知」活用プログラムウェブサイト>重田 育照

https://www.osi.tsukuba.ac.jp/fight_covid19/shigeta/

インタビュー記事

https://www.osi.tsukuba.ac.jp/fight_covid19_interview/shigeta/