

## タンパク質中のリガンド結合部位を探索するための手法の開発及び評価

小田 彰 史

## Development and Validation of Programs for Ligand-binding-pocket Search

Akifumi ODA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan*

(Received May 27, 2011)

Searching for the ligand-binding pockets of proteins plays an important role in structure-based drug design (SBDD), which is based on knowledge of the three-dimensional structures of target proteins. In SBDD, small molecules that can interact with the target protein are designed. SBDD methods require the identification of ligand-binding pockets, in which ligand molecules interact with protein atoms. The computer programs for the detection of ligand-binding pockets are categorized into two types: one is programs using only geometric properties; and the other is programs using the physicochemical properties of proteins as well as geometry. This paper describes the development and evaluation of a program for ligand-binding pocket search. The program HBOP (Hydrophobicity On a Protein) searches for ligand-binding pockets using hydrophobic potentials derived from experimentally determined functions. This is based on the fact that hydrophobicity plays a significant role in protein-ligand binding. The results of evaluation indicate that programs using physicochemical properties can discover actual ligand-binding pockets more efficiently than those using only geometric properties.

**Key words**—ligand-binding pocket; hydrophobicity; structure-based drug design; docking

## 1. はじめに

コンピュータを用いて自然現象の再現や予測を行う試みの歴史は、コンピュータの歴史そのものとはほぼ同じ長さを持つ。例えばコンピュータ黎明期における有名な汎用電子計算機 ENIAC は、当初砲弾の弾道計算を目的として開発が始められたが、これは紛れもなく物理現象の再現・予測に関する問題である。数学のいくつかの分野は自然科学と関連して発達してきたため、コンピュータが自然現象の理解に用いられるのは当然とも言えるが、生命現象に関してもコンピュータを利用した研究が多くなされている。その主な例としては、生体分子の性質や挙動を物理法則に基づいて計算する計算化学手法や、生物学的データを情報学的に処理するバイオインフォマティクス技術、化学データを取り扱うケモインフォ

マティクス技術などがある。このようなコンピュータを利用した生命科学のうちの、創薬と密接に関連した分野の1つとしてタンパク質-リガンド複合体構造の予測がある。コンピュータによるタンパク質-リガンド複合体構造の予測はドッキングと呼ばれ、生体分子の立体構造に基づいた創薬 (Structure-based drug design, SBDD) において重要な役割を果たしている。<sup>1)</sup> 基質や阻害剤などは生体内で機能する際、生体高分子によって認識され、複合体を形成する。この分子認識に際しては水素結合やイオン間相互作用のような分子間相互作用、さらには疎水性効果等が働く。コンピュータによるドッキングではこれらの相互作用等を推定することでタンパク質-リガンド間の結合様式を予測し、複合体構造を構築する。このとき、まずタンパク質とリガンドが相互作用する場としてリガンド結合部位を同定する必要がある。同定されたりガンド結合部位の環境を解析することで、タンパク質-リガンド複合体構造予測がなされる。すなわち、リガンド結合部位の同定がなされた後にドッキングソフトウェアによってリ

東北薬科大学薬学部 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

e-mail: oda@tohoku-pharm.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会東北支部奨励賞 (基礎薬学部門) の受賞を記念して記述したものである。

グンド分子をタンパク質に結合させることで、タンパク質-リガンド間の複合体形成について詳細に検討することができる。このようにリガンド結合部位の探索は SBDD を行うための第一歩となる操作であり、SBDD 全体において重要な役割を果たしている。本稿ではタンパク質中のリガンド結合部位を同定するための手法の開発・評価について、筆者らの研究を中心に紹介する。

## 2. アミノ酸残基の疎水性を指標としたリガンド結合部位探索手法の開発

リガンド結合部位探索プログラムについては、これまでいくつか開発されているが、<sup>2,3)</sup> それらのアルゴリズムは主に 2 種類に分類できる。1 つはタンパク質の立体構造に基づいて幾何学的あるいは物理化学的にリガンド結合部位を探索する方法で、SBDD ではこちらが主に使用される。もう 1 つはタンパク質のアミノ酸配列から配列比較などのバイオインフォマティクス手法を用いて探索する方法で、こちらはタンパク質の機能同定などで使用されることが多い。タンパク質の立体構造に基づいたリガンド結合部位探索プログラムもさらに 2 種類に分類できる。1 つは純粋にタンパク質の形状のみに注目して幾何学的にリガンド結合部位を探索するプログラムである。このタイプのアルゴリズムでは、複数発見されたリガンド結合部位候補のうち最も大きい候補、あるいは最も深い候補を、真のリガンド結合部位である可能性が最も高いと判定することが多い。これは空洞内部に収まったプローブ球の数が最も多い候補や、タンパク質の溶媒接触可能表面を算出した後で凹凸をならした平均平面を求め、そこからの深さが最も深くばみを真のリガンド結合部位であると評価する方法である。もう 1 つはタンパク質の物理化学的性質を考慮して「リガンド結合部位らしさ」を評価するプログラムで、こちらは単に大きいというだけではなく、リガンド分子が結合し易いかどうかについても推測する。前者に属するプログラムとしては alpha-shape アルゴリズムに基づく CAST、<sup>4)</sup> プローブ球が収まりかつ十分に埋もれているかどうかを判断する PASS、<sup>5)</sup> タンパク質の cleft を探索する SURFNET、<sup>6)</sup> グリッドを発生させてリガンド結合部位を探索する SiteID<sup>7)</sup> などがある。後者に属するプログラムとしては有機溶媒プローブとの相互作用を計算する computational mapping 法によるポケ

ット探索、<sup>8)</sup> メチルプローブに対する相互作用を計算する Q-SiteFinder、<sup>9)</sup> そしてわれわれの研究チームで開発した HBOP<sup>10,11)</sup> がある。

HBOP は経験的な疎水性ポテンシャル<sup>12)</sup> を用いてリガンド結合部位を同定する。これは、タンパク質-リガンド結合において疎水性が重要な役割を果たすという知見<sup>13)</sup> に基づいている。このプログラムの動作について Fig. 1 に示す。まずタンパク質の周囲に 10 Å の厚みで 1 Å 間隔のグリッドを発生させ、その各グリッド点における疎水性ポテンシャルを計算する。この疎水性ポテンシャルについては、Israelachvili らによる経験式

$$\Delta G_{\text{H}} = -2.0R_{ij} \exp(-D_{ij}/10)$$

$$R_{ij} = R_i R_j / (R_i + R_j)$$

$$D_{ij} = d_{ij} - (R_i + R_j)$$

を使用して求める。ここで  $R_i$  及び  $R_j$  はそれぞれタンパク質及びプローブの炭素原子の半径である。ここでプローブとしては  $sp^3$  炭素を用い、半径  $R_j = 1.52 \text{ \AA}$  とした。また  $d_{ij}$  はタンパク質中の原子とプローブの原子との間の距離である。これは疎水性表面間に働く引力的な自由エネルギー変化を実験によって測定し、その値から経験的に得られた数式である。この式は疎水性ポテンシャルが指数関数的に減衰することを示しており、タンパク質による分子認識等を考える際に van der Waals 力と比較してより長距離相互作用的に働くことがわかる。HBOP では、疎水性ポテンシャルの計算にはタンパク質の疎水性アミノ酸残基 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met,

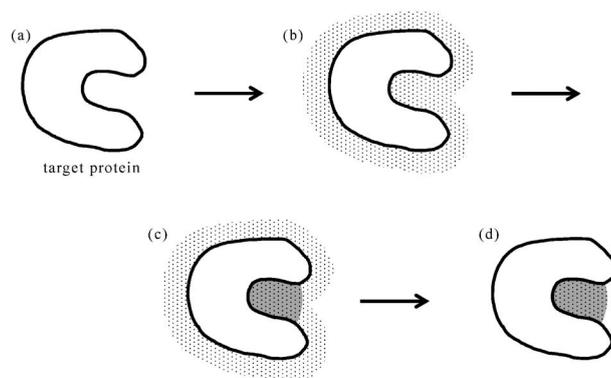


Fig. 1. Ligand Binding Pocket Search Procedure of HBOP  
(a) Target protein. (b) Grid points are generated around the target protein. (c) Hydrophobic potential on the grid points are calculated. Highly hydrophobic area is shown by gray. (d) The grid points whose hydrophobic level is lower than HB6 are rejected. The remained grid points are predicted ligand binding pockets.

Trp, Phe, Pro) のみに注目し, これら疎水性残基のアミド炭素を除く炭素原子のみを使用した. 各グリッド点に対して得られた疎水性ポテンシャルを 20 段階に分割し, 疎水性ポテンシャルが上位 30% 以内のグリッド点をリガンド結合部位として推定する. 具体的には, 得られた疎水性ポテンシャルのうち最大値を  $\Delta G_{\text{max}}$ , 最小値を  $\Delta G_{\text{min}}$  とすると, 疎水性ポテンシャルの値を  $0.05 \times (\Delta G_{\text{max}} - \Delta G_{\text{min}})$  毎に 20 段階に分類する. その分類に応じてグリッド点をクラス分けし, 疎水性の高い方から HB1, HB2, …… とする. ここで HB6 までのグリッド点をリガンド結合部位とする. 経験的な疎水性ポテンシャルやグリッド点を使用しているためこのプログラムは計算機資源の面においても非常に優れており, それほどパワーのないコンピュータを使用しても十分高速に実行が可能である.

また, HBOP で発生させたグリッド点をクラスタリングし, 他のプログラムと同様の体積を持った「結合サイト」を検出するプログラム HBSITE も開発している. これは隣接するグリッド同士をグループ化し, 10 点 ( $10 \text{ \AA}^3$ ) 以上集まった場合そのグループを「結合サイト」と定義するプログラムである. HBOP ではグリッド点でリガンド結合部位を表現するが, HBSITE によってある程度の体積を持ったサイトを同定することができ, またリガンドが収まらないほど狭い隙間を排除して計算の効率化を図ることもできる. HBSITE で同定された結合サイトは「リガンド結合部位らしさ」に応じて順位付けされるが, サイトの体積 (サイトに含まれるグリッド点の数) が大きいほどリガンド結合部位らしいと判断する HBSITE (size) 基準と, サイトに含まれるグリッド点の疎水性が高いほど (サイト中に疎水性の高いグリッドが多く含まれているほど) リガンド結合部位らしいと判断する HBSITE (HB) 基準の 2 通りの順位付けを行っている.

### 3. リガンド結合部位探索手法の評価

筆者らは HBOP 及び HBSITE の開発と並行して, その能力の評価についても行った. テストに際しては立体構造既知の 458 個のタンパク質-リガンド複合体をテスト系として使用した. これらは FlexX-200 テストセット,<sup>14,15)</sup> Wang のテストセット,<sup>16)</sup> Glide のテストセット,<sup>17)</sup> Kontoyianni のテストセット,<sup>18)</sup> Perola のテストセット<sup>19,20)</sup> のうちで,

重複を除き, リガンドがタンパク質と共有結合していない系である. HBOP 及び HBSITE に加え, 比較のために PASS, SiteID, Q-SiteFinder による試験も行った. 計算の設定としてはデフォルトの値を使用した. リガンド結合部位が正しく認識されているかどうかの判断基準として, PASS では結晶構造のリガンド分子から  $6.5 \text{ \AA}$  以内に site point を置くことができたかどうかを調べた. また, SiteID ではリガンド分子から  $3.0 \text{ \AA}$  以内に, Q-SiteFinder では  $1.0 \text{ \AA}$  以内に, HBOP でも  $1.0 \text{ \AA}$  以内にリガンド結合部位を構成するグリッド点が存在するかどうかを判断基準に使用した. PASS の判定基準はリガンドの位置を基準とした場合によく使用されるリガンド結合部位の定義<sup>15)</sup> に準じており, SiteID は分子モデリングプログラム SYBYL におけるデフォルトの定義を参照した. また, HBOP はグリッド間隔から考えて最も厳しい判定基準を採用した. Q-SiteFinder ではグリッド解像度は  $0.9 \text{ \AA}$  であるが, HBOP に合わせてより寛大な値を使用した. HBSITE で作成したサイトについては, サイトの大きさ (サイト中に含まれるグリッド点の数) の順に順位付けした HBSITE (size) と, サイトの疎水性 (疎水性スコアが最上位だったグリッド点の数) の順に順位付けした HBSITE (HB) の両方について比較を行った.

また, より実際の創薬に近いテストとして, リガンドを結合していない構造を使用したテストも行った. タンパク質の立体構造はリガンドの結合に伴って変化することが知られているが, 実際の創薬ではリガンドの結合する前の構造しか使用できない場合もある. このテストは, そのような場合にも正しくリガンド結合部位を認識できるかどうかを評価するために行った. 使用した系は論文<sup>9)</sup>に記載されている 35 種類のタンパク質である. これらのテストセットは論文<sup>9)</sup>において Q-SiteFinder の能力を評価するために用いられた系である. また, プログラムとしては HBSITE (HB) と Q-SiteFinder を使用した. まずリガンドを結合していないタンパク質に対してリガンド結合部位探索を行い, 発見されたリガンド結合部位が実在のタンパク質-リガンド複合体において真のリガンド結合部位となっているかどうか調べることで評価を行った. すなわち, もともと複合体として解析されたタンパク質立体構造を使うこと

なく、リガンド非結合状態のタンパク質の構造を用いて正しくリガンド結合部位を探索できるかどうかをテストした。このとき正しく調査できたかどうかの評価基準となる複合体構造についても論文<sup>9)</sup>に記載されているものを使用した。評価の際にはリガンドの結合していないタンパク質とリガンドの結合したタンパク質の主鎖を重ね合わせ、リガンド非結合状態に対して同定されたリガンド結合部位が、リガンド結合状態においてリガンドの存在する位置に対応するかどうかで評価した。

Table 1 に 458 個の系でのリガンド結合部位探索の結果を示した。ここでは、リガンド結合部位候補の順位については考慮せず、各プログラムが発見したリガンド結合部位候補の中に実際のリガンド結合部位があるかどうかだけを検討した。ここに示したように、HBOP で真のリガンド結合部位を発見できなかった系は 12 個と最も少なかった。HBOP の結果をクラスタリングして結合サイトを同定する HBSITE でもリガンド結合部位同定に失敗した系は 25 個であり、これは PASS や SiteID と比較して優れている。また、1 つの系あたりに発見されたリガンド結合部位候補の数は HBSITE が最も少なかった。予測されたリガンド結合部位候補の数が多いということは偽陽性の候補が多く含まれているということを示しているため、予測された候補数の少ない HBSITE は最も効率的に真のリガンド結合部位を探索することができると考えられる。また、Q-SiteFinder (24 個の系で失敗している) は HBSITE とほぼ同程度の結果が得られている。しかし Q-SiteFinder はすべての系に対して 10 個のリガンド結合部位候補を出力するため、候補数はすべての手法の中で最大となっている。したがって、成功数では HBSITE とほぼ同等ではあるものの、効率の面では HBSITE に劣っていることになる。一方、SiteID では 71 個の系で真のリガンド結合部位を探

索することができず、そのうち 9 つの系ではそもそも予測されたリガンド結合部位候補が 1 つもない (見当外れな候補さえみつからない) という結果であった。PASS はリガンド結合部位探索能力としては HBOP と SiteID の中間に位置していたが、1 つの系あたりに予測されたリガンド結合部位候補数が多く、効率の面で劣っていることが示唆される。

ここで、HBOP で真のリガンド結合部位を発見できなかった系についてみてみよう。Table 1 に示したのは HB6 までに真のリガンド結合部位があった系であるが、これを HB10 までに拡張すると失敗した系はわずかに 2 つとなる。HB7 から HB10 までに真のリガンド結合部位のある系はすべて 2 本鎖以上を持つタンパク質であり、これらの鎖間の疎水性領域に高いスコアをつけてしまった結果、真のリガンド結合部位の疎水性スコアが相対的に低下しているものと考えられる。このような複数鎖からなるタンパク質に対しては、1 本鎖のみを考えたり、HB10 付近まで調査したりすることで、見落としはなくなるものと考えられる。一方、HB10 までみても真のリガンド結合部位を探索できなかったのは PDB ID で 1CDG, 5CNA の 2 つであった (1CDG は HB13 に、5CNA は HB14 に真のリガンド結合部位が存在していた)。1CDG はシクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼとマルトースの複合体、5CNA はコンカナバリン A と  $\alpha$ -メチル-D-マンノピラノシドの複合体であり、これはどちらも糖及びその類縁体がタンパク質表面の浅い部位にドッキングした構造を持っている。糖のドッキングについては、場合によっては通常のアプローチと異なった手法を用いる必要があることが知られており<sup>21,22)</sup> これを汎用のリガンド結合部位探索プログラムで考慮するのは限界がある。一方で今回テストに使用した複合体のうち、酸素以外のヘテロ原子や疎水性基を持たない糖誘導体をリガンドとしたもの

Table 1. Results of the Tests for Ligand-binding-pocket Search Using 458 Protein-ligand Complex Structures

	HBOP	HBSITE	PASS	SiteID	Q-SF <sup>a</sup>
Number of successful test <sup>b</sup>	446	433	420	387	434
Number of failed test <sup>c</sup>	12	25	38	71	24
Average number of candidate	—	4.64	9.53	8.70	10.0

<sup>a</sup> Q-SF: Q-SiteFinder. <sup>b</sup> Number of the test systems for which actual ligand-binding pockets were successfully detected. <sup>c</sup> Number of the test systems for which actual ligand-binding pockets were not detected.

は 20 個あった。これらのリガンドでは糖構造以外に相互作用点となり得る特性基を持っていないことを考えると、90%の複合体 (20 個中 18 個) で正しい結合部位を発見できたことは、むしろ上述のような限界にもかかわらず HBOP のリガンド結合部位探索能が糖の結合部位探索においても高いことを意味している。なお、この 2 つの系は PASS 及び SiteID, Q-SiteFinder でも真のリガンド結合部位が探索できておらず、通常のリガンドドッキングを視野に入れたりリガンド結合部位探索手法では扱うのが困難な系ではないかという考察を支持している。

次に、予測されたりリガンド結合部位候補を順位付けし、その第何位の候補が実際のリガンド結合部位であったかを調べた結果を Fig. 2 に示す。ここには、第 1 位のリガンド結合部位候補が正解だった系の数と、上位 3 位までに実際のリガンド結合部位が存在していた系の数をそれぞれ図示している。すなわち、最上位の候補がまさに「正解」だった場合と、3 つまで絞った中に「正解」が含まれる場合とを検討した。ここに示したように、第 1 位のリガンド結合部位候補が正解だった系の数も上位 3 位までに実際のリガンド結合部位が存在していた系の数も、疎水性スコアを基にした HBSITE が最も多かった。ただし、第 1 位のみをみた場合については Q-SiteFinder も同数であった。第 3 位までみた場合については HBSITE (HB) が Q-SiteFinder をも上回っている。加えて、上位 3 位までに実際のリガンド結合部位が存在していた系の数をみると、HBSITE (HB) のみならず HBOP, HBSITE (size) も PASS, SiteID, Q-SiteFinder よりも多かった。これは HBOP によるリガンド結合部位探索が有効に機能している

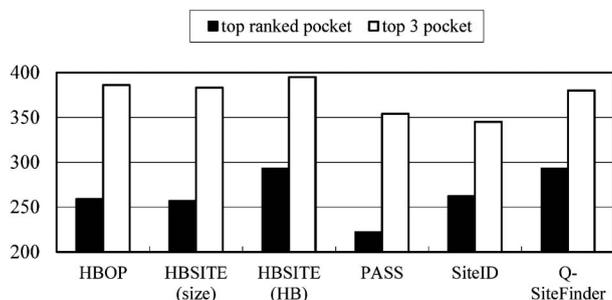


Fig. 2. Number of Tests in Which the Top-ranked Pocket Candidate or One of the Top Three Pocket Candidates Was the Actual Ligand-binding Pocket

ことを示しているが、その中でも HBSITE (HB) が最も良好な結果を与えたことは、疎水性によって結合部位候補の順位付けを行うのが有効であることを示唆している。すなわち、HBOP の結果をそのまま使用するよりも HBSITE でクラスタリングし、かつ疎水性スコアで順位付けしたほうが効率的に真のリガンド結合部位を発見できることがわかった。また、Q-SiteFinder も PASS や SiteID より良好な結果を与えており、このことはリガンド結合部位探索において PASS や SiteID のように単純にタンパク質の形だけを考えるのではなく、HBOP, HBSITE や Q-SiteFinder のようにタンパク質の物理化学的性質についても考慮した方がよいことを示唆している。

リガンドの結合していないタンパク質 (unbound と表記) に対するリガンド結合部位探索の結果を Table 2 に示す。また、第 1 位のリガンド結合部位候補のみをみた場合 (Top-ranked pocket), 上位 3 位の候補をみた場合 (Top three pockets), 順位に関係なく成功数をみた場合 (All pockets) のそれぞれについて記載した。比較のため、評価に使用したりリガンドを含んだ複合体 (bound と表記) に対する探索の結果も併記している。いずれも、35 個の系のうちいくつで真のリガンド結合部位を探索できたかを示している。458 個の系に対するテストでは HBSITE (HB) と Q-SiteFinder はほぼ同等の能力であったが、unbound の系に対しては明らかに HBSITE (HB) のほうが順位付けに成功している。なお、順位付けを無視した all pockets では 458 個の系で行ったテストとほぼ同等の結果となっており、これらの問題は順位付けの際に発生している。比較のために行った bound の系では 458 個の系と無矛盾な結果となっていることから、これは un-

Table 2. Results of the Tests for Ligand-binding-pocket Search Using Ligand-bound and Unbound Protein Structures

Test system Programs	Bound		Unbound	
	HBSITE (HB)	Q-SF <sup>a</sup>	HBSITE (HB)	Q-SF <sup>a</sup>
Top-ranked pocket	30	27	30	21
Top three pockets	34	32	35	29
All pockets	34	34	35	34

<sup>a</sup> Q-SF: Q-SiteFinder.

bound な状態に対して HBSITE (HB) が有効にリガンド結合部位候補を順位付けできることを示しており、HBSITE (HB) が多少の構造変化に対してロバストであることが示唆される。これは Q-SiteFinder では 6-12 型の van der Waals 相互作用を使用しているのに対して、HBOP 及び HBSITE で使用される疎水性ポテンシャルが長距離相互作用関数であるためではないかと考えられる。すなわち、構造上のわずかな差異で評価関数が大きく値を変えないことが、このロバストさにつながっているのではないだろうか。したがって、高解像度で信頼できるタンパク質-リガンド複合体立体構造が得られるような状況では Q-SiteFinder も有効に機能するが、複合体構造が得られておらず、完全に新規にリガンド結合部位予測を行うような場面では HBSITE (HB) のほうが適切にリガンド結合部位を同定し、順位付けできるのではないかと期待できる。

#### 4. おわりに

本研究では、疎水性を指標にしてタンパク質のリガンド結合部位を探索するプログラムの開発を行い、その能力評価もまた行った。その結果、疎水性を指標としてリガンド結合部位探索を行う HBOP 及び HBSITE が、幾何学的性質のみを基に探索する PASS, SiteID よりも優れた結果を与えることがわかった。また、メチルプローブを使用する Q-SiteFinder と比較すると、タンパク質-リガンド複合体構造が得られていないような系に対しても HBSITE が有効に機能することがわかった。HBOP は疎水性の相対値を評価基準としているため、二本以上のペプチド鎖からなるタンパク質については疎水性の高いペプチド-ペプチド（あるいはタンパク質-タンパク質）界面に評価が偏ってしまい、低分子化合物のリガンド結合部位が過小評価される傾向があった。これは HBOP, HBSITE の欠点ではあるが、逆にタンパク質-タンパク質ドッキングサイトの同定に応用できる可能性も示している。また、このような欠点にかかわらず、複数のペプチド鎖を持つようなタンパク質に対しても HBOP, HBSITE は他のプログラムよりも良好な結果を与えている。

本研究では HBOP 及び HBSITE の開発及び評価を行った。これらのプログラムによって疎水性ポテンシャルを割りあてられたグリッド点は、リガンド

結合部位探索だけではなく、ドッキングによるタンパク質-リガンド複合体構造の推定にも有効に使用できる可能性がある。ドッキングにおいて重要な相互作用等のうち、疎水性の効果は水素結合などの指向性の相互作用と比べて定義が難しいが、HBOP で求められたグリッド点を空間的な制約として使用することによって疎水性の効果を利用できるのではないかと考えられる。今後、そのような発展的な研究が進むことを期待したい。なお、HBOP 及び HBSITE はアカデミックフリーである [入手を希望する場合は、北里大学薬学部・山乙教之助教 (yamaotsun@pharm.kitasato-u.ac.jp) まで連絡]。

**謝辞** 本研究の遂行にあたってご指導、ご鞭撻を賜りました北里大学薬学部の広野修一教授、山乙教之助教、東北薬科大学の高橋央宜准教授に深く感謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 935-949 (2004).
- 2) Campbell S. J., Gold N. D., Jackson R. M., Westhead D. R., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 389-395 (2003).
- 3) Sottriffer C., Klebe G., *Farmacology*, **57**, 243-251 (2002).
- 4) Jie L., Edelsbrunner H., Woodward C., *Protein Sci.*, **7**, 1884-1897 (1998).
- 5) Brady G. P. Jr., Stouten P. F., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **14**, 383-401 (2000).
- 6) Laskowski R. A., Luscombe N. M., Swindells M. B., Thornton J. M., *Protein Sci.*, **5**, 2438-2452 (1996).
- 7) "SiteID," Tripos Inc., St. Louis, 2004.
- 8) Dennis S., Kortvelyesi T., Vajda S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4290-4295 (2002).
- 9) Laurie A. T. R., Jackson R. M., *Bioinformatics*, **21**, 1908-1916 (2005).
- 10) Yamaotsu N., Oda A., Hirono H., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1552-1558 (2008).
- 11) Oda A., Yamaotsu N., Hirono S., *J. Comput. Chem.*, **30**, 2728-2737 (2009).
- 12) Israelachvili J. N., Pashley R. M., *Nature*, **300**, 341-342 (1982).

- 13) Ajay A., Murcko M. A., *J. Med. Chem.*, **38**, 4953–4967 (1995).
- 14) Rarey M., Kramer B., Lengauer T., *Bioinformatics*, **15**, 243–250 (1999).
- 15) Kramer B., Rarey M., Lengauer T., *Proteins*, **37**, 228–241 (1999).
- 16) Wang R., Lu Y., Wang, S., *J. Med. Chem.*, **46**, 2287–2303 (2003).
- 17) Friesner R. A., Banks J. L., Murphy R. B., Halgren T. A., Klicic J. J., Mainz D. T., Repasky M. P., Knoll E. H., Shelley M., Perry J. K., Shaw D. E., Francis P., Shenkin P. S., *J. Med. Chem.*, **47**, 1739–1749 (2004).
- 18) Kontoyianni M., McClellan L. M., Sokol G. S., *J. Med. Chem.*, **47**, 558–565 (2004).
- 19) Perola E., Charifson P. S., *J. Med. Chem.*, **47**, 2499–2510 (2004).
- 20) Perola E., Walters W. P., Charifson P. S., *Proteins*, **56**, 235–249 (2004).
- 21) Taroni C., Jones S., Thornton J. M., *Protein Eng.*, **13**, 89–98 (2000).
- 22) Shionyu-Mitsuyama C., Shirai T., Ishida H., Yamane T., *Protein Eng.*, **16**, 467–478 (2003).