

解 説

低分子薬剤開発に活かされる熱量測定の最前線

長門石 暁^{a,b}, 津本 浩平^{a,b,c}

^a 東京大学 医科学研究所

^b 東京大学 大学院工学系研究科

^c 東京大学 創薬機構

(受取日: 2017年7月25日, 受理日: 2017年9月27日)

Calorimetric Analysis in the Screening of Small Molecule Drug Discovery

Satoru Nagatoishi^{a,b}, Kouhei Tsumoto^{a,b,c}

^a Institute of Medical Science, The University of Tokyo

^b Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

^c Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo

(Received Jul. 25, 2017; Accepted Sep. 27, 2017)

Many issues have been found to be addressed for the interactions between drugs and their target proteins in the small molecule drug discovery, e.g. low efficiency of lead construction and off-target effect with low specificity; these are due to limited physicochemical information on the drug-protein interactions. In the true molecular target-based drug discovery, hit, seed, and lead compounds should show high binding affinity and specific inhibition activity. To obtain the correct interaction profiles of small compounds with a target protein, technical development of physicochemical approaches (biophysical methods) for the interactions is essential for the next generation molecular target-based drug discovery. Thermodynamic analysis using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) is one of the representative biophysical methods, since it can monitor the direct binding of compounds with thermal reaction and discuss the binding specificity. Calorimetric analysis using ITC has recently been an attractive approach in the fields of the small molecule drug discovery. In this review, our recent studies for the small-molecule drug screening were introduced, where the inhibitors for target proteins were validated using ITC. Furthermore, we demonstrate that ITC analysis is the potential selection of validated hits and lead compounds in PPI screening.

Keywords: Small molecule drug discovery, Biophysical method, Isothermal titration calorimetry, Thermodynamics, Protein-protein interaction (PPI)



長門石 暁
Satoru Nagatoishi
E-mail: nagatoishi@ims.u-tokyo.ac.jp



津本 浩平
Kouhei Tsumoto
E-mail: tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

従来の低分子医薬品の探索・設計では、標的分子と低分子薬剤との相互作用様式について不明瞭なまま進めることも多い。その結果、リード探索における最適化の効率が下がるという問題や、特異性の低さから、off-target 作用により毒性が発現するなどの問題が生じる場合がある。また近年、標的となる分子（主にタンパク質）は酵素や受容体にとどまらず、膜タンパク質や天然変性タンパク質など生化学的な扱いが困難な標的も少なくない。標的となっている分子の取り扱いが確実に難しくなっている。取り扱いが困難な標的分子になると、これまでの既存の薬剤探索アプローチやアッセイ系では通用しないことも多い。そこで、スクリーニング前段階における標的分子のクオリティーチェック（標的分子の質を見極めること）も重要な位置づけになりつつある。¹⁾ このような多くの課題を抱えている分子標的創薬において、最も問われることが薬剤の高い結合親和性、特異性創出である。そのためには、より精度の高い探索技術と解析技術が必要とされており、その1つとして物理化学的アプローチに期待が寄せられている。標的分子に対する低分子化合物の分子レベルでの精密な相互作用様式の解析技術の活用は、大幅な開発コスト削減も期待できると共に、これまで見逃してきた新規の薬剤候補を見つける機会が出てくることも期待される。

一方で低分子薬剤の作用においては、酵素に対する基質ポケットのような明瞭な結合サイトが存在するとは限らず、タンパク質-タンパク質間相互作用 (PPI) や巨大タンパク質複合体の会合界面に作用しなければならないなど、その特殊性も増している。このような標的タンパク質に対して特異的に結合する化合物を選抜するためには、結合挙動を定量的に解析できる高感度な検出技術が必要不可欠である。特異的な結合は、その低分子化合物の分子サイズ、化学構造、置換基の種類・数より概算される非共有結合能から、結合親和性、熱力学、速度論などにおいて特徴を見出せることが多い。結合様式においてはタンパク質の構造をより安定化させたり、構造変化を誘起させたりする場合もある。一方、化合物の非特異的な結合の場合は、複数の化合物によるタンパク質への吸着、さらにはタンパク質の変性などにより、均質な結合挙動は観察されない。したがって、化合物の結合において、バリデーションやオプティマイゼーションの過程で“質”を評価することが重要となり、物理化学的な解析技術が注目を集めている (Fig.1)。このような測定は、Label-free 測定、また Biophysical 測定とも呼ばれている。^{1,2)} 主な解析技術としては、化合物側の結合状態を評価する NMR (Ligand-observed NMR)、速度論的な結合評価を行う Surface Plasmon Resonance (SPR)、結合における熱量変化を評価できる Isothermal Titration Calorimetry (ITC)、タンパク質の熱安定性変化を評価する Differential Scanning Fluorometry (DSF)、結合に伴う質量変化を定量評価する Mass Spectrometry (MS) などが挙げられる。また次世代の物理化学的解析法として Bio-Layer Interferometry (BLI)、Resonant Waveguide Grating (RWG)、Back-Scattering Interferometry (BSI)、Microscale Thermophoresis (MST) などが活用され始めている。¹⁾ さらにスクリーニングに用いる化合物ライブラリーとして、比較的小さな化合物群からなるフラグメントライブラリーが近年注目されており、高感度かつ定量的な評価を可能とする物理化学的解析技術はその重要性が増している。

また近年 HTS においても物理化学的解析を導入することにより、false positive の低下による莫大なコストカットが見込まれるという意見も出てきている。¹⁾

以上のように、物理化学的解析技術は、着実に低分子創

薬の中に根付きつつある。純国産の低分子薬剤の開発において、物理化学的解析が大きな役割を果たす時代が、今まさに始まろうとしている。このような背景から、本稿ではまず既存薬における物理化学的な特徴について解説する。つづいて著者らが積極的に取り組んでいる熱力学的解析を用いたスクリーニング技術開発、さらには標的分子として注目されている PPI の阻害剤探索における熱量解析の活用例について紹介する。

2. 熱力学と薬効

低分子医薬品の最適化において、熱力学的知見の利用が有効であるレトロスペクティブな研究例を紹介する。エイズ治療薬である HIV プロテアーゼ阻害剤の標的タンパク質に対する熱力学的プロファイルを図.1 にまとめる。^{3,4)} この図では、より新しく承認された阻害剤が左から右に並んでいる。新しく承認された阻害剤ほど標的タンパク質との結合親和性が高い、すなわち ΔG が負に大きい傾向にあることが見て取れる。

注目すべきは、その熱力学的プロファイルである。初期の薬剤 (IDV など) は、結合エンタルピー (ΔH) が不利で結合エントロピー (ΔS) が有利なエントロピー駆動型であった。ところが薬剤が最適化されるにつれて、エントロピー駆動型からエンタルピー駆動型へと熱力学的パラメータのバランスが変化している (Fig.1)。

初期の阻害剤ではエントロピーの寄与が大きいのに対し、新しく承認された阻害剤はエンタルピー寄与によるところが大きいが大きい。このような傾向は高コレステロール血症治療薬スタチン、骨粗しょう症の治療薬ビスフォスフォネート剤などにおいてもみられている。^{6,7)} 以上の結果は、標的との高い特異性すなわちエンタルピー駆動型の性質が薬剤の最適化において重要な因子であることを示唆している。このように薬効を上げてゆく上での構造最適化、改良において、官能基がどのような熱力学的貢献を果たしているかを読み解くことは、分子標的薬の質を知る上で非常に有用な知見となる。どの官能基がエンタルピーに貢献し、どの官能基がエントロピーに貢献するのか、に関して一般性を導くことは容易ではないが、^{8,9)} 熱力学的パラメータを検証し、薬剤を合理的に設計することは、標的タンパク質に対する低分子設計の特異性創出のために重要な情報を与えると考えられる。

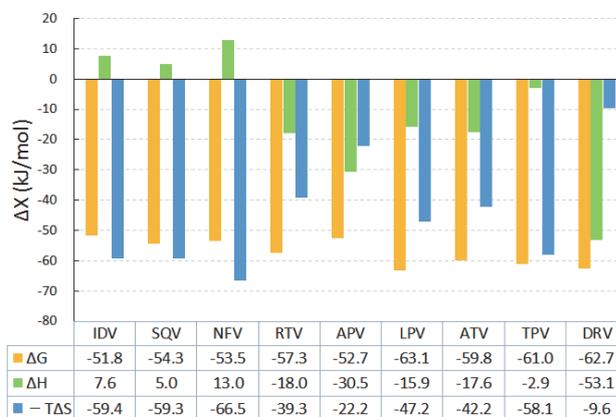


Fig.1 Thermodynamic profiles of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors.

3. フラグメントスクリーニングにおける熱解析

創薬ターゲットとなるタンパク質に特異的に結合する低分子化合物を見出す上で、タンパク質表面の網羅的なケミカルスペースの探索は、効率的かつ有効なスクリーニング手法である。そこで注目されているのがフラグメントライブラリーによる創薬戦略である。⁵⁾ これらは芳香環が1~2個、水素結合可能な数本の置換基から構成された、300Da以下の低分子である。フラグメント化合物としての物性にはRule of Threeと呼ばれる指標がある。⁵⁾ これらの化合物は、ハイスループットスクリーニング (HTS) で用いられている Drug-like な化合物を断片化したような骨格となっているため、小規模な化合物数でケミカルスペースを満たすことができるライブラリーとなっている。したがってHTSと比べるとスクリーニング効率はとて高く、また新規の骨格を有した化合物を選抜することができるが期待されている。

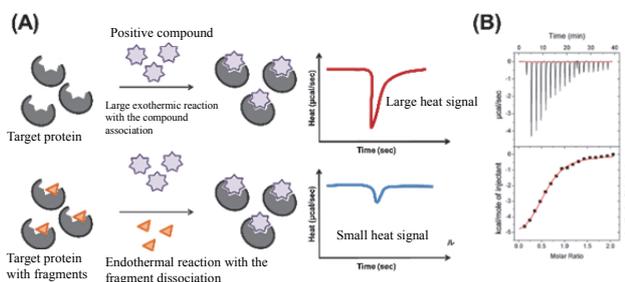


Fig.2 (A) Hit validation of competitive assay using ITC. (B) ITC profile of hit compound.

しかしながら、フラグメント化合物は比較的シンプルな化学構造をしているため、タンパク質に対する結合親和性は低く解離定数は数 mM となることもある。このため、高感度でかつ物理化学的な解析アプローチが可能な ITC が有効な評価法に位置づけられている。特異的結合の場合は有意な発熱反応とその反応収束が観察されることが多い。このようなプロファイルを示す場合、水素結合形成が期待される。一方、非特異的相互作用の場合は反応熱が収束せず、また疎水的な相互作用の場合は吸熱反応が観察される。⁵⁾ 以上から、ヒットしてきた化合物群の中で、発熱反応を示す化合物を有力な候補として選別する戦略が望ましい。¹¹⁾ 標的タンパク質において結合サイトが明確に決まっており、またその結合サイトに対して結合する基質や低分子リガンドなどが知られている場合、競合アッセイは有効な戦略である。この際 ITC を用いて競合アッセイを行うことにより、結合サイト特異的、かつ発熱反応を示すヒット化合物を選抜することができる (Fig.2(A), (B)).¹⁰⁾

著者らの具体例について述べる。ケトステロイド異性化酵素 (KSI) に対してフラグメントライブラリーから SPR スクリーニングにより化合物を選抜した。それらについて、ITC による競合アッセイにて効率的なヒットバリデーションを行った。この解析技術は、標的タンパク質とスクリーニングから得られた化合物を共存させて、その溶液系に対して既知のリガンド分子を滴下する手法である (Fig.2(A))。フラグメント化合物が KSI の目的の結合サイトにおいて相互作用している場合、より結合親和性の高い既知のリガンド (Deoxycholate, DOC) は、フラグメント化合物を追い出すことで結合サイトにて安定化する。フラグメント化合物が発熱反応を伴う相互作用をしている場合、DOC の結合に

伴うフラグメント化合物の解離は吸熱反応として現れる。さらにスループット性を上げるために、この熱量変化における競合アッセイを1回の滴下にて評価できる手法を考案した (Single-injection thermal extinction, SITE)。この SITE 法を用いて KSI に対するフラグメント化合物結合のヒットバリデーションを行った。¹⁰⁾ その結果、KSI の基質 DOC と競合し、かつ有意な発熱反応を示すエンタルピー駆動型のヒット化合物を取得することができた (Fig.2(B))。さらに細胞内シグナル伝達経路の1つ MAPK カスケードに関わるキナーゼタンパク質 ERK2 についても、同様にフラグメントスクリーニングからの化合物取得に成功している。このように、薬剤の最適化にとどまらず、探索の段階においても熱量評価が威力を発揮することがわかる。発熱反応は、非共有結合において特異性を創出すると考えられる水素結合を含む場合が多い。しかし水素結合をラショナルに設計することは比較的難しいとされている。そのような中、薬剤設計の初期段階において、水素結合形成を有する低分子化合物を見出し、それから合成展開することは、質の高いリード化合物に導く有用な手法となり得る。

フラグメント化合物に対する熱量評価は、ヒット化合物の選抜以外にも威力を発揮する。標的タンパク質に対し特異的に結合する低分子化合物を取得するには、タンパク質の構造に合わせたリガンド設計が重要になってくる。これは構造活性相関 (SAR) 評価とも呼ばれ、分子標的創薬において欠かせない戦略となっている。この SAR を強力に支援する解析技術に X 線結晶構造解析があり、化合物とタンパク質間の相互作用を分子レベルで明確に議論できる。しかしながら、SAR のために X 線結晶構造解析をいくつも実施することは、時間とコスト、熟練した解析技術を必要とするなど容易ではない。より廉価で簡便に、かつ in house で分子レベルの SAR 評価を行うことは、分子設計の効率を上げるためにも重要である。そこで威力を発揮するのが ITC による熱力学解析である。我々は黄色ブドウ球菌の病原因子タンパク質を標的に、フラグメントスクリーニングによる阻害剤探索を行い、ITC によるヒットバリデーションからリード化合物の取得を試みた。

黄色ブドウ球菌の病原因子の一つである莢膜は糖の重合体であり、黄色ブドウ球菌の表面を覆い、食食から免れることにより黄色ブドウ球菌の病原性を高めている。この莢膜合成に必須の酵素である CapF は、CapE と協同的に働き、NADPH を用いて基質を還元することにより莢膜の合成の一端を担っている。我々は近年 CapF の構造を明らかにし、構造に基づく CapF の酵素触媒メカニズムを解明しつつある。そこで黄色ブドウ球菌の莢膜合成を阻害する抗菌剤の探索を行うことを目的とし、CapF に対してフラグメントスクリーニングを行った。1次スクリーニングとして SPR による選抜を行い、酵素活性阻害測定、濃度依存性評価を実施したところ、3-isopropenyl-Tropolone (3isoTropo) が酵素阻害活性やサブ mM レベルの結合親和性を示した。

この 3isoTropo に関して、結合部位、結合様式に対する詳細な理解を目指し ITC を用いた結合解析を行ったところ、3isoTropo は CapF に 1:1 結合比で発熱を伴うエンタルピー駆動で結合することが明らかとなった (Fig.3(A))。一方、EDTA 存在下では発熱反応は観察されず、また亜鉛イオン溶液に対しても反応しなかった (Fig.3(B),(C))。さらに 3isoTropo に類似した化合物群を用いて ITC 評価を行ったところ、ヒドロキシル基が発熱反応に重要な役割を果たしていた (Fig.3(D)-(G))。以上は、ヒドロキシル基が CapF に結合している亜鉛イオンを認識していることを示唆する。実際に X 線結晶構造解析を実施したところ、ITC の結果を支持する相互作用様式が明らかとなった (Fig.4)。¹²⁾

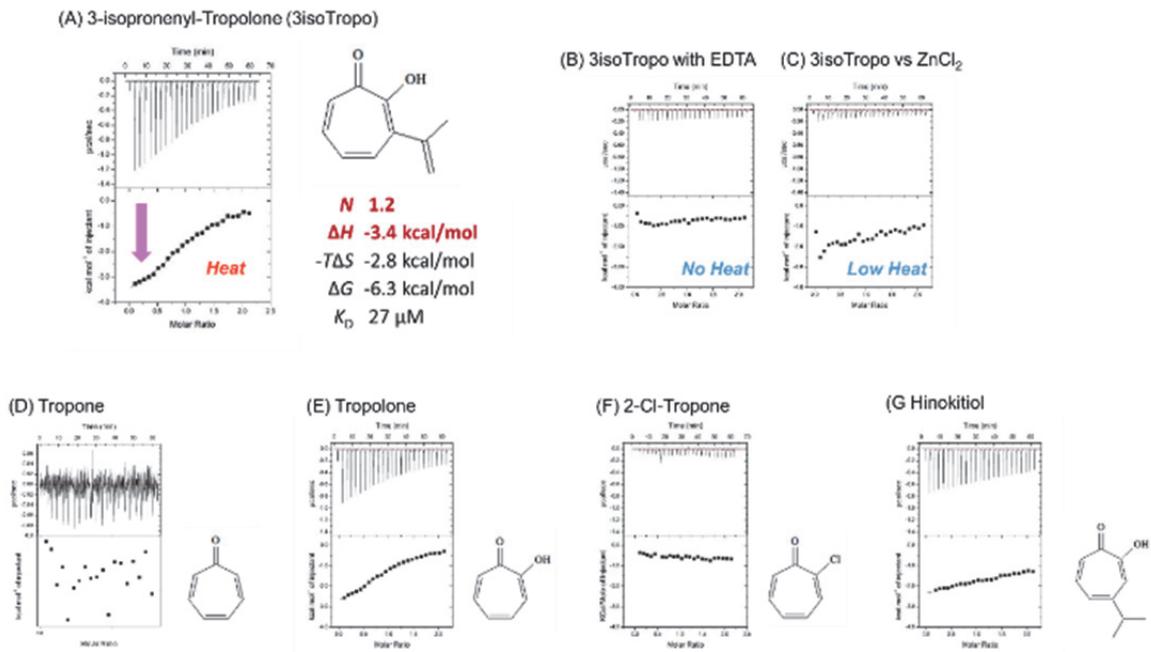


Fig.3 ITC profiles of hit compound and its derivatives binding to the target protein CapF.

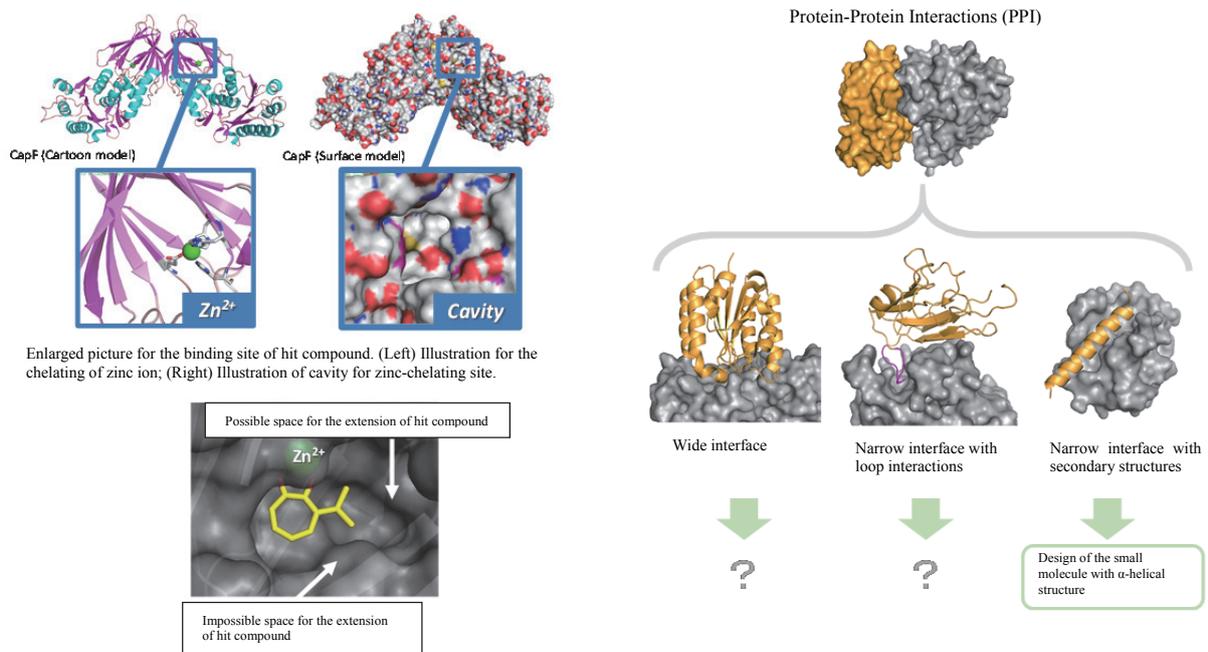


Fig.4 X-ray crystallographic analysis of the complex structure between CapF and hit compound.

Fig.5 Various binding interfaces for protein-protein interactions.

以上のように、低親和性フラグメントスクリーニングから、ITCによる熱量評価を行うことにより、CapFに特異的に結合し、かつ酵素活性を阻害する化合物を得ることができている。また類似構造化合物における熱量変化の違いから、ヒット化合物の結合特異性・親和性を示す置換基の位置を議論できることも示された。ITCによるSAR評価は構造解析を補う有力な解析技術である。

4. チャレンジングな標的PPI

低分子創薬において、蛋白質-蛋白質間相互作用PPIに対する低分子阻害剤の設計は最もチャレンジングなテーマ

のひとつである。PPI界面の面積に対して、低分子薬剤の分子サイズでは阻害面を十分にはカバーできないため、効果的な低分子設計が困難であるとされている。そのため、現実としてPPI阻害剤の多くは抗体医薬品である。低分子阻害剤は臨床試験で苦戦しているのが現状である。¹³⁾しかしながらPPIに対する低分子薬剤のニーズは高い。抗体は細胞外においては威力を発揮するものの、分子サイズが大きいためから膜透過性が低く、結果として細胞内を標的にすることが困難という欠点がある。細胞内には様々な疾患関連で標的となりうるPPIが存在することから、低い抗原性と高い透過性の低分子化合物によるPPI阻害剤設計に大きな期待が寄せられている。

Table 1 PPI inhibitors validated by ITC.

標的タンパク質	PPI タイプ	IC ₅₀	K _D (ITC)	ΔH / kcal mol ⁻¹	-TΔS / kcal mol ⁻¹	他の結合情報	文献
BET bromodomains vs peptide	Cavity	77 nM (Alpha-Screen) 4 nM (Cell growth)	49 nM	-8.4	-1.2	+9.4 oC (DSF)	16)
CBP/p300 bromodomain vs peptide	Cavity		32 nM	-10.5	0.6		17)
RAD51 vs peptide	Cavity		1300 nM	-5.4	-2.7		18)
BRD4	Cavity	8000 nM (HTFR)	1800 nM	-8.7	1.1	+1.9 oC (DSF)	19)
Atg8 vs Atg3 peptide	Cavity	18500 nM (SPR) 19000 nM (Cell growth)	990 nM	-3.4	-4.7	-2.0 oC (DSF)	20)
P53 vs MDM2	Cleft	5900 nM (FP)	2.3 nM	-7.7	-4.1	+25 oC (DSF) 1.7 nM (TF-FRET)	21)
14-3-3 vs Tau peptide	Cleft		13400 nM	-1.0 ?		2200 nM (SPR)	22)
EphA4 vs ephrin-A5	Cleft	3700 nM (FP) 3400 nM (ELISA)	1200 nM	-10.6	2.6		23)
Keap1 vs Nrf2		>10000 nM (FP)	6000 nM	-28 ?	22?		24)
Gankyrin vs partners			580 nM	-20 ?		630 nM (MST) increase (DSF)	25)
Pan-RAS vs effectors		3800 nM (Cell growth)	17800 nM	-0.09	-6.4	4700 nM (MST)	26)
PARP1	homodimer	540 nM (FP) 1140 nM (Enzyme)	3100 nM	-3.2		470 nM (FP)	27)
RAD52	homoligomer	1100 nM (FP)					28)
CK2b	homodimer						29)

低分子化合物が PPI 阻害剤としての役割を果たすためには、その PPI 界面に対して低分子が特異的に結合しなければならぬであろう。さらに、PPI 界面は比較的フラットで、酵素と基質のような明瞭な凹凸がないことも多い。^{13,14)} その中で、PPI 界面が「比較的小さく、かつ明瞭な二次構造を有するタイプ」については、近年阻害剤開発技術が急速に発展している (Fig.5)。¹⁵⁾ α-helix を模倣した主鎖と官能基の立体配置のデザインによる PPI 阻害剤設計が、現在のところ主要なコンセプトとなりつつある (Fig.5)。

しかし PPI 界面は「明瞭な二次構造を有するタイプ」のみではないことは自明である。「相互作用界面の広いタイプ」や「明瞭な二次構造がない界面タイプ」の低分子阻害剤開発に大きなブレイクスルーを出すことが求められている (Fig.5)。このように、標的 PPI に対して薬剤を合理的に設計するアプローチはなく、手探りであるのが現状である。そのため、PPI 阻害剤探索のための化合物ライブラリーについても議論が続いているが、明確なコンセプトはない。このように、PPI 阻害剤開発においてパラダイムシフトを起こしうるような戦略が、今まさに求められている。その中でヒット候補阻害剤の“質”を見極めるために、熱量解析が威力を発揮している。

5. ITC を活用した PPI 阻害剤の例

PPI 界面は比較的フラットで、酵素と基質のような明瞭な凹凸がないことも多い。わずかな凹凸に対して特異的に結合できる低分子化合物を如何にして見つけ出すか。そのために物理化学的アプローチを駆使した探索・設計が効果

を発揮している例が近年出つつある。その中で、ITC 測定による熱量解析により、阻害剤のバリデーションを実施している例を紹介する。Table 1 にその例をまとめた。

(1) cavity タイプ¹⁶⁻²⁰⁾

PPI 界面は比較的フラットであると先に述べたが、その中に存在する明確なくぼみ (cavity タイプ) に対して薬剤設計した PPI 阻害剤が比較的多い。その 1 つに bromodomain がある。Bromodomain は翻訳修飾されたアミノ酸側鎖を選択的に認識し、転写制御に深く関与しているエピジェネティクス関連蛋白質にて機能しているドメインである。Bromodomain は、この翻訳後修飾を受けたアミノ酸を特異的に認識するために、明確な結合ポケットを形成させている。ITC による bromodomain との相互作用においても多くの K_D 値が nM オーダーを示しており、エンタルピー得な熱力パラメータが観察されている。その結合エンタルピーは -5 から -10 kcal mol⁻¹ ほどが観察されている。興味深いことに、うち 2 化合物については阻害剤の結合に伴う bromodomain の熱安定性の向上が観察されている。

(2) Cleft タイプ²¹⁻²³⁾

PPI 界面に比較的明確な凹凸が見られるタイプとして、一方のタンパク質がペプチド断片レベルでも十分な結合能を示すものがある。これらの多くは溝 (cleft) のような表面構造に対して構造相補的にペプチドが結合する。このとき、ペプチドが α-ヘリックスを形成している場合もある。有名な標的 PPI の 1 つとして、MDM2-p53 複合体があるが、その低分子阻害剤は nM オーダーと非常に強い阻害能を示

すものが報告されており、結合エンタルピーが $-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ のエンタルピー駆動型で、cavity タイプと性質が似ている。²¹⁾ 一方、14-3-3 と tau の PPI 相互作用においては、数 μM と低い阻害能をしめす低分子が報告されている。²²⁾ 発熱量も非常に小さく、脱水和を駆動力とした疎水性相互作用による結合様式で阻害をしている可能性が示唆される。

(3) flat タイプ²⁴⁻²⁶⁾

明確な凹凸がわからない PPI の場合、その低分子阻害剤を見てみると、先ほどの cavity や cleft タイプとは異なる特徴がある。結合親和性は数 μM から nM レベルと高いが、結合エンタルピーが数 kcal mol^{-1} もしくは $-20 \text{ kcal mol}^{-1}$ 以上と非常に高い値を示している。数 kcal mol^{-1} の場合は、熱力学特性がエンタルピー/エントロピー駆動型で、非共有結合による発熱反応が起きる中に、脱水和作用を伴う吸熱反応も含まれているように見える。一方で $-20 \text{ kcal mol}^{-1}$ 以上と非常に高い値を示す場合は、結合に伴うタンパク質の構造変化が関与している可能性が示唆される。言い換えれば低分子化合物の結合前と後では、蛋白質表面の構造（凹凸状態）が変化している可能性がある。

(4) 会合状態変化タイプ (homodimer 形成, homooligomer 阻害)^{27,28)}

ITC 解析を活用した PPI の低分子阻害剤はホモダイマーやホモオリゴマーの解離にも活用されている。ホモ多量体を解離させる低分子化合物を探索する際に、気を付けなければならない点の1つとして、蛋白質を変性させていないかどうか挙げられる。低分子化合物が時に蛋白質に対して多点的に作用して蛋白質の構造を不安定化させることがある。しかし、この場合の多くは非特異的な作用であることが多い。その際に ITC による熱量測定、熱力学的パラメータの算出により、その特異性を担保できる可能性が高い。ITC 測定により発熱反応が観察され 1:1 結合として評価された低分子化合物は、特異性をもってホモ多量体の相互作用界面に、またアロステリックに作用し、多量体を解離させ阻害効果を発揮していると考えられる。

(5) その他 (希釈熱解析)

ITC 解析のユニークな使用方法として、希釈熱による評価方法も報告されている。²⁹⁾ ホモ二量体を形成して機能を果たしている CK2b 蛋白質は、ITC による希釈熱測定において、吸熱反応が観察される。これは CK2b のホモ二量体形成がエンタルピー駆動型であることを示している。ここに阻害剤が共存すると、ホモ二量体が化合物の作用により単量体となり、希釈熱変化が優位に減少する。

6. まとめ

本稿では、低分子薬剤の探索・設計における熱量解析、特に ITC 測定を活用した我々の研究成果と、近年の PPI 阻害剤探索における ITC 測定の活用例について紹介した。これらの研究結果から、ITC 測定より得られた結合に関する熱量変化には、その分子間相互作用における“特異性”に関する重要な情報が含まれていることがわかる。分子標的創薬における薬剤の探索や設計には、常にこの“特異性”を意識し、そして見極めなければならない。正確な立体配置にもとづく非共有結合形成や、芳香環を主とした嵩高いアミノ酸側鎖によってつくられた疎水性と構造相補性などから創出される有利なエンタルピーやエントロピー変化は、いずれも特異性を創出する上で欠かせない要素である。相互作用に関する熱力学パラメータは、薬剤の質を見極める

有効な解析技術であると考えられる。今後、ますます活用の場が広がることが期待される。

謝 辞

本研究において用いた化合物ライブラリーは、東京大学創薬機構 DDI より供与されました。また九州大学 Caaveiro Jose 准教授には、KSI や CapF に関する研究において多大なサポートをいただきました。さらに既存薬の熱力学的知見に関しては、アステラス製薬の楠崎祐子氏の多大なご助言によるものです。最後に本研究は、日本医療研究開発機構の創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業と創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業、さらに JSPS 科研費の助成を受けて遂行されています。厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) R. H. Folmer, *Drug Discov. Today* **21**, 491-498 (2016).
- 2) V. I. Razinkov, M. J. Treuheit, and G. W. Becker, *Curr. Drug Discov. Technol.* **10**, 59-70 (2013)
- 3) H. Ohtaka and E. Freire, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **88**, 193-208 (2005).
- 4) S. Muzammil, A. A. Armstrong, L. W. Kang, A. Jakalian, P. R. Bonneau, V. Schmelmer, L. M. Amzel, and E. Freire, *J. Virol.* **81**, 5144-5154 (2007).
- 5) C. K. Lawrence, *Methods in Enzymol.* **493**, Academic Press, (2011).
- 6) T. Carbonell, E. Freire, *Biochemistry* **44**, 11741-11748 (2005).
- 7) Y. Kawasaki, M. Sekiguchi, M. Kawasaki, Y. Hirakura, *Chem. Pharm. Bull.* **62**, 77-83 (2014)
- 8) Á. Tarcsay, G. M. Keserú, *Drug Discov. Today* **20**, 86-94 (2015).
- 9) G. Klebe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 95-110 (2015).
- 10) A. Kobe, J. M. Caaveiro, S. Tashiro, D. Kajihara, M. Kikkawa, T. Mitani, and K. Tsumoto, *J. Med. Chem.* **56**, 2155-2159 (2013)
- 11) H. L. Silvestre, T. L. Blundell, C. Abell, and A. Ciulli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 12984-12989 (2013)
- 12) K. Nakano, T. Chigira, T. Miyafusa, S. Nagatoishi, J. M. Caaveiro, and K. Tsumoto, *Sci. Rep.* **5**, 15337 (2015).
- 13) D. E. Scott, A. R. Bayly, C. Abell, and J. Skidmore, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **15**, 533-550. (2016)
- 14) Z. Na, B. Peng, S. Ng, S. Pan, J. S. Lee, H. M. Shen, and S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 2515-2519 (2015)
- 15) N. London, B. Raveh, and O. Schueler-Furman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 952 (2013).
- 16) P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, and J. E. Bradner, *Nature* **468**, 1067-1073 (2010).
- 17) A. Hammitzsch, C. Tallant, O. Fedorov, A. O'Mahony, P. E. Brennan, D. A. Hay, F. O. Martinez, M. H. Al-Mossawi, J. de Wit, M. Vecellio, C. Wells, P. Wordsworth, S. Müller, S. Knapp, and P. Bowness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 10768-10773 (2015).
- 18) D. E. Scott, A. G. Coyne, A. Venkitaraman, T. L. Blundell, C. Abell, and M. Hyvönen, *ChemMedChem.* **10**, 296-303 (2015).
- 19) S. Milhas, B. Raux, S. Betzi, C. Derviaux, P. Roche, A. Restouin, M. J. Basse, E. Rebuffet, A. Lugari, M. Badol, R. Kashyap, J. C. Lissitzky, C. Eydoux, V. Hamon, M. E. Gourdel, S. Combes, P. Zimmermann, M. Aurrand-Lions, T. Roux, C. Rogers, S. Müller, S. Knapp, E. Trinquet, Y. Collette, J. C. Guillemot, and X. Morelli, *ACS Chem. Biol.*

- 11**, 2140-2148 (2016).
- 20) A. U. Hain, A. S. Miller, J. Levitskaya, and J. Bosch, *ChemMedChem*. **1**, 900-910 (2016).
- 21) P. Holzer, K. Masuya, P. Furet, J. Kallen, T. Valat-Stachyra, S. Ferretti, J. Berghausen, M. Bouisset-Leonard, N. Buschmann, C. Pissot-Soldermann, C. Rynn, S. Ruetz, S. Stutz, P. Chène, S. Jeay, and F. Gessier, *J. Med. Chem.* **58**, 6348-6358 (2015).
- 22) L. G. Milroy, M. Bartel, M. A. Henen, S. Leysen, J. M. Adriaans, L. Brunsveld, I. Landrieu, and C. Ottmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 15720-15724 (2015).
- 23) B. Wu B. , Z. Zhang, R. Noberini, E. Barile, M. Giulianotti, C. Pinilla, R. A. Houghten, E. B. Pasquale, and M. Pellecchia, *Chem. Biol.* **20**, 19-33 (2013).
- 24) A. F. Winkel, C. K. Engel, D. Margerie, A. Kannt, H. Szillat, H. Glombik, C. Kallus, S. Ruf, S. Güssregen, J. Riedel, A. W. Herling, A. von Knethen, A. Weigert, B. Brüne, and D. Schmoll, *J. Biol. Chem.* **290**, 28446-28455 (2015).
- 25) A. Chattopadhyay, C. J. O'Connor, F. Zhang, C. Galvagnion, W. R. Galloway, Y. S. Tan, J. E. Stokes, T. Rahman, C. Verma, D. R. Spring, and L. S. Itzhaki, *Sci. Rep.* **6**, 23732 (2016).
- 26) M. E. Welsch, A. Kaplan, J. M. Chambers, M. E. Stokes, P. H. Bos, A. Zask, Y. Zhang, M. Sanchez-Martin, M. A. Badgley, C. S. Huang, T. H. Tran, H. Akkiraju, L. M. R. Brown, R. Nandakumar, S. Cremers, W. S. Yang, L. Tong, K. P. Olive, A. Ferrando, and B. R. Stockwell, *Cell* **168**, 878-889 (2017).
- 27) Z. Na, B. Peng, S. Ng, S. Pan, J. S. Lee, H. M. Shen, and S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 2515-2519 (2015).
- 28) G. Chandramouly, S. McDevitt, K. Sullivan, T. Kent, A. Luz, J. F. Glickman, M. Andrade, T. Skorski, and R. T. Pomerantz, *Chem. Biol.* **22**, 1491-1504 (2015).
- 29) W. G. Seetoh and C. Abell, *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 14303-14311 (2016).