

解 説

医薬品・薬剤探索のためのカロリメトリーの活用

長門石 暁^a, 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: 2019 年 12 月 10 日, 受理日: 2020 年 2 月 25 日)

Practical Use of Calorimetric Analysis in Small Ligand and Drug Discovery

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

^a Institute of Medical Science, The University of Tokyo

^b School of Engineering, The University of Tokyo

^c Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo

(Received Dec. 10, 2019; Accepted Feb 25, 2020)

When researchers design specific ligands to regulate target proteins in cellular regulation or drug discovery, they usually focus on a higher affinity of ligands. Consequently, ligands having lower affinities are frequently removed in the ligand selections. However, these selections do not necessarily explain the mechanism of inhibitory actions of ligands. Therefore, we have doubt that the high affinity selection is always equal to the specificity selection. Since the specific ligands possess a specific binding manner in the protein-ligand interactions, we focus on the biophysical quality, especially thermodynamics, of ligand interactions but not high affinity to obtain the specific ligands against the target proteins. 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. We are studying some ligand screenings for target enzymes, for example, we obtained one hit small molecule to inhibit the target using biophysical methods including thermodynamic analysis. This ligand successfully inhibits the target protein in cells, although its binding affinity is around μM range. Therefore, we propose that the important factor governing the ligands' specificities is not only high affinity but also the thermodynamics.

Keywords: Small molecule drug discovery, Biophysical method, Isothermal titration calorimetry, Thermodynamics

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間との相互作用様式や、標的分子そのものが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、特異性が低いまゝ off-target 作用により毒性が発現するなどの問題が生じる。そこで、標的とする分子を明確に定め、その標的分子に対して特異的に結合し、活性を示す分子標的創薬が盛んに取り組まれている。この分子標的創薬における低分子阻害剤

の探索において、標的分子に対する高い阻害活性と高い結合活性を指標にしてセレクションを行うことが一般的である。しかし標的分子と低分子阻害剤との相互作用様式について不明瞭なまま薬剤開発を進めることも多く、結果として、構造活性相関が悪くリード設計や構造最適化に至らないといった問題が生じる。これらは標的分子に対する特異性の低さが懸念され、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。それ故に、探索からセレクションされた化合物（ヒット化合物）の特異性を担保する有効かつ新たな探索技術が求められている (Fig.1)。

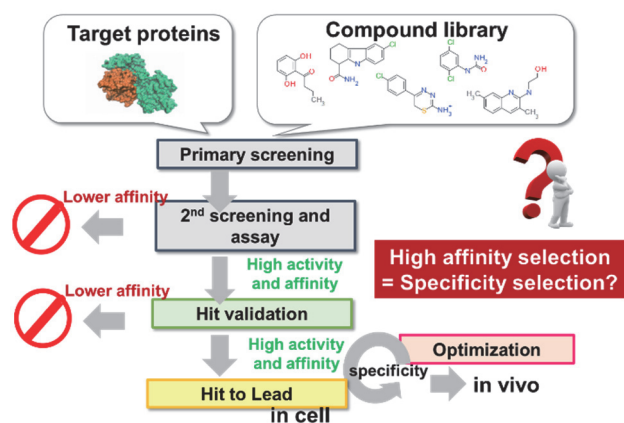


Fig.1 Workflow of small molecule screening to find the specific ligands with high affinity

また近年の薬剤探索は分子標的創薬が重要視されていることから、創薬の標的となる分子（主にタンパク質）は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が着実に増えてきている。さらには、標的分子に酵素の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、低分子阻害剤がタンパク質-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。これらの標的分子は、もちろん酵素等を標的としてきた従来の薬剤探索アプローチやアッセイ系では通用しない場合が多く発生する。

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、物理化学的アプローチは1つの解決手法として近年期待が寄せられている。特異的な結合の場合、その相互作用には鍵と鍵穴モデルで例えられるような立体的な構造相補性と複数の非共有結合が存在しているはずである。その低分子化合物の化学構造と標的分子の結合部位の界面構造の組み合わせから、非共有結合の様式、結合親和性、熱力学、速度論などにおいて固有な特徴を見出せることが多い。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、セレクションやバリデーションの過程で“質”を評価することが重要となり、物理化学的な解析はまさに有効な手段の1つであると言える。¹⁻⁴⁾

物理化学的な解析の中で、熱力学的な指標が有効な分子設計につながることを示唆するレトロスペクティブな研究例がある。HIV プロテアーゼ阻害剤薬剤、高コレステロール血症治療薬として知られるスタチン、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は、初期の阻害薬では比較的エントロピーの寄与が大きいものに対して、その後承認されている阻害薬はエンタルピー寄与によるものが大きい傾向にある。⁵⁻⁷⁾ このように熱力学的な解析は、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。

このような背景から、著者らは、ITCに着目した。^{4,8-10)} 特異的な相互作用では、熱力学パラメータが重要な因子として扱われている。我々は熱力学パラメータ、特にエンタルピー得な相互作用（発熱反応）が、特異性創出に重要な因子となるという仮説をもって、低分子スクリーニングにおいて発熱反応を示す化合物のセレクションやバリデーションを行うこととした。この際に、高い結合親和性、高い阻害活性はあまり考慮しないようにした。このようなア

プローチによって、先述の“質を評価する”ことができる考え、さらには、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とも期待した（Fig.2）。著者らは以前に、熱測定を活用した低分子リガンド探索に関する新技術について、さらに創薬が難しいとされている標的タンパク質-タンパク質相互作用を制御する低分子リガンドに対する熱測定の活用例についてまとめた。¹¹⁾ 本稿では、著者らが取り組んでいる低分子スクリーニングにおける熱量解析の新たな活用例をいくつか紹介し、その“質”について議論する。

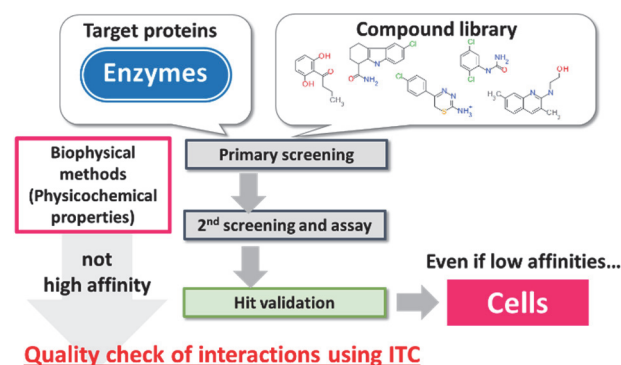


Fig.2 Overview of the hit selection and validation using ITC in small molecular screening

2. 熱的バリデーションによる *in vitro* で酵素阻害活性を有する化合物探索

明瞭な結合ポケットが存在しない場合、PPIのようなフラットな相互作用界面を標的とする場合、また新しい阻害機構による薬剤設計を行いたい場合など、従来の化合物ライブラリーではなかなか有望なヒット化合物が取得できない標的分子に対する戦略として、フラグメントライブラリーによる薬剤探索が注目されている。¹²⁾ このライブラリーは、Rule of Three と呼ばれる指標が1つの基準となっており、芳香環が2個以下、水素結合可能な置換基が数個、そして300Da以下の低分子である。¹²⁾ このような傾向を有する化合物群は、タンパク質表面の網羅的なケミカルスペースの探索において有効であると言われている。これらの化合物は、ハイスループットスクリーニング（HTS）と比べるとスクリーニング効率がとても高く、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と期待されている。このフラグメント化合物に対する熱量評価に関して、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特異的なヒット化合物の取得を試みた例を紹介する。

黄色ブドウ球菌は多剤耐性菌（MRSA等）のような社会問題を引き起こす病原性微生物の1つとして、新しい抗菌剤開発が喫緊の課題となっている。我々はこの病原因子の一つである莢膜に着目した。莢膜は糖の重合体であり、黄色ブドウ球菌の表面を覆い、宿主の免疫反応等から免れることにより自身の病原性を高めていると言われている。この莢膜合成に必須の酵素としてCapFが知られており、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。我々は以前よりCapFの構造を明らかにしており、この構造に基づいたCapFの阻害剤設計が新しい抗菌剤設計につながるのではないかと考えた（Fig.3(A), (B)）。

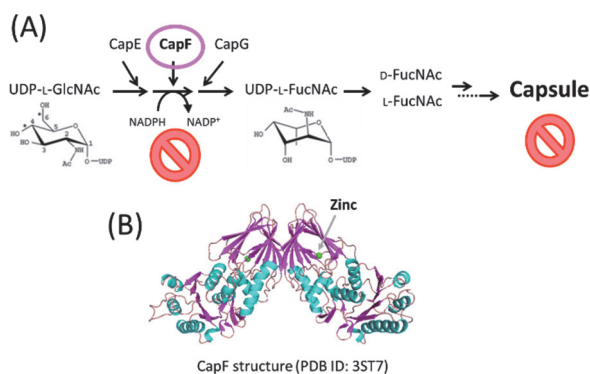


Fig.3 (A) Synthetic scheme of capsule utilizing CapE, CapF, and CapG in *Staphylococcus aureus*, (B) Protein structure of CapF

そこで CapF に対してフラグメントスクリーニングを用いた阻害剤探索を実行し、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、濃度依存性評価を行った。これらの選抜の結果、3-isopropenyl-Tropolone (3iso-Trp) が阻害活性やサブ mM レベルの結合親和性を示すヒット化合物として得られた (Fig.4)。

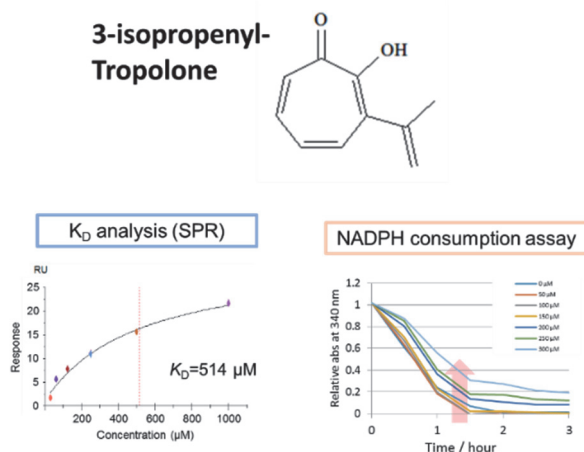


Fig.4 Chemical structure of hit compound 3-isopropenyl-Tropolone, binding analysis by SPR and inhibition analysis by NADPH consumption assay

この 3iso-Trp に関する詳細な酵素阻害活性を調べたところ、HPLC 分析の結果より、3iso-Trp は CapF による生成物の産生を止めて、基質や中間体で留める阻害効果を有していることが明らかとなった。(Fig.5(A)) そこで ITC による詳細な結合解析を行ったところ、CapF に対して 1:1 の結合比で、発熱を伴うエンタルピー駆動の相互作用様式であった (Fig.5(B))。CapF に関する我々の構造解析の結果では、CapF は亜鉛イオンを有していることと、ヒット化合物の 3iso-Trp はキレーター部位を持っていることから、金属イオンに対する作用が予想された。そこで EDTA 存在下で ITC 測定を行ったところ、発熱反応は観察されなかった (Fig.5(C))。さらに亜鉛イオン溶液に対しても反応熱は得られなかった (Fig.5(D))。このことから、3iso-Trp は CapF の亜鉛イオンとその周辺のポケットを合わせて認識していることが強く示唆された。

ITC 測定より明らかとなった CapF とヒット化合物の結合様式を確かめるために、複合体に関する X 線結晶構造解析にも成功した。その結果 ITC の結果を支持する相互

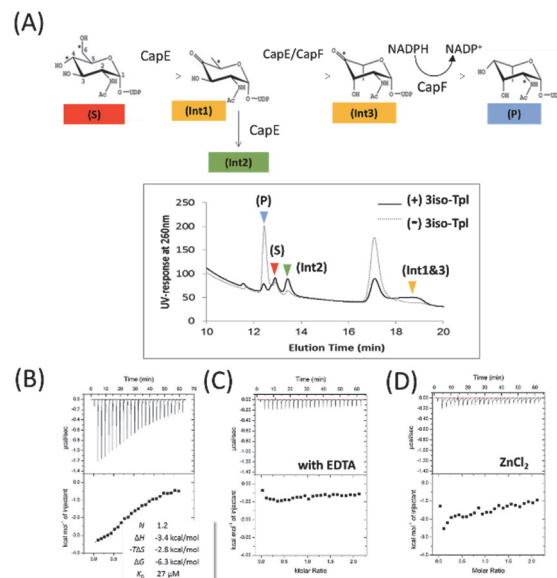


Fig.5 (A) HPLC analysis of sugars to evaluate the CapF activity in the presence and absence of 3-isopropenyl-Tropolone, ITC analysis of 3-isopropenyl-Tropolone (B) binding to CapF, (C) binding to CapF in the presence of EDTA, and (D) binding to $ZnCl_2$.

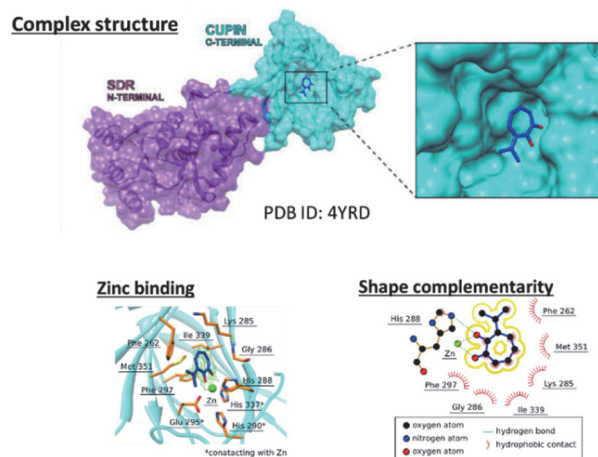


Fig.6 (Top) Complex structure of CapF and 3-isopropenyl-Tropolone, (Bottom) The binding site of 3-isopropenyl-Tropolone in CapF

作用様式が明らかとなり、3iso-Trp は CapF のポケットに入り、近傍の亜鉛イオンをキレートしていることが確かめられた (Fig.6)。¹³⁾ 興味深いことに、3iso-Trp と capF のポケットには高い構造相補性も観察された。このことから、ITC 測定によるエンタルピー型のリガンド選抜が、標的タンパク質に対する特異的な低分子化合物をセレクトンすることができる強力なツールになることが示された。

3. 細胞内で阻害活性を示す化合物の熱的バリデーション

熱的なヒットバリデーションの有用性をさらに検証するために、*in vitro* からさらに細胞内 (*in cell*) の標的タンパク質に対して活性を有する化合物の選抜を行った。パーキンソン病や癌に深く関与していることで近年注目されているタンパク質の 1 つに DJ-1 がある。¹⁴⁾ DJ-1 はグリ

オキサール活性や脱グリケース活性を示す酵素として知られているが、これらの酵素活性と疾患との関連性は未だ不明瞭な点が多い。そこで本研究では、DJ-1 に対する阻害活性を示す化合物を取得することにより、これら DJ-1 の酵素活性と疾患との関係性を明らかにし、新しい治療への橋渡しになることを期待した (Fig.7)。DJ-1 は SPR による 1 次スクリーニングより、フラグメントライブラリーの中からいくつかのヒット候補化合物を選抜した。これらの化合物群の中に、Isatin 骨格を有する化合物が複数種類存在していることが分かった (Fig.7)。

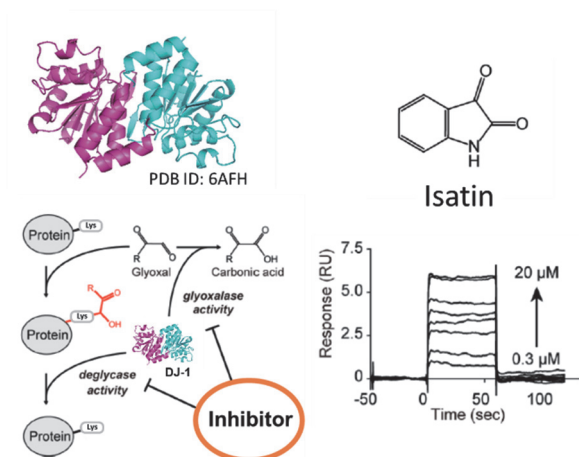


Fig.7 (Left) Protein structure of DJ-1 and overview of DJ-1 inhibition in the enzymatic reaction of DJ-1, (Right) Chemical structure of hit compound Isatin and its SPR profile binding to DJ-1

これらの化合物について、ITC 測定を行ったところ、Isatin が DJ-1 に対して発熱反応を有するエンタルピー駆動型の結合様式を示す化合物であることが分かった (Fig.8(A))。さらに示差走査型蛍光法 DSF によるタンパク質の熱安定性解析を行ったところ、Isatin は DJ-1 の熱安定性を向上させることも明らかとなった。そこで Isatin と DJ-1 との共結晶構造解析を行ったところ、Isatin が共有結合を形成して DJ-1 と相互作用しているユニークな複合体構造が得られた。¹⁵⁾ この構造情報を基に変異体解析を行ったところ、溶液中でも Isatin は結晶構造と同様の結合サイトと相互作用していることが示唆された (Fig.8(B))。この複合体構造情報をもとに、化合物の親和性向上を試みた。その結果、化合物#15 において、nM オーダーの結合親和性を示すことに成功した (Fig.9(A), (B))。この化合物も DJ-1 に対する安定性を向上させた。

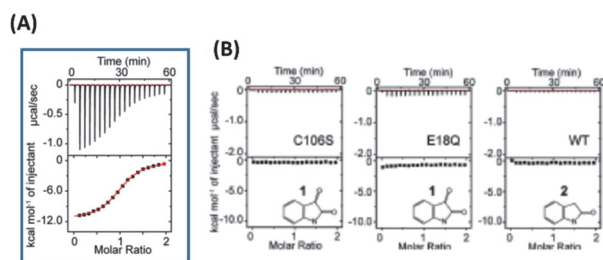


Fig.8 (A) ITC analysis of Isatin binding to DJ-1 wild type, (B) binding to mutants C106S and E18Q, along with the negative control analysis

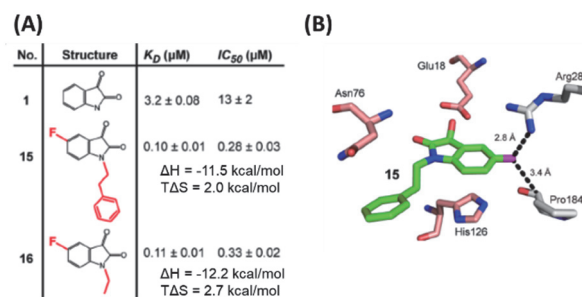


Fig.9 (A) Thermodynamic and IC₅₀ parameters of compounds binding to DJ-1 (B) Complex structure of compound #15 and DJ-1

この得られたヒット化合物について、Isatin と共に細胞内での阻害活性について検証を行った。その結果、Isatin と化合物#15 はいずれも、細胞内のグリオキサール活性を阻害することが明らかとなった (Fig.10)。さらに興味深いことにこれらの化合物は、CeTSA 評価によって細胞内の DJ-1 も有意に熱安定性を向上させることが示された (Fig.10)。以上のことから、熱的なバリデーションによって選抜した化合物は、細胞内でも標的タンパク質に対して作用することが示された。

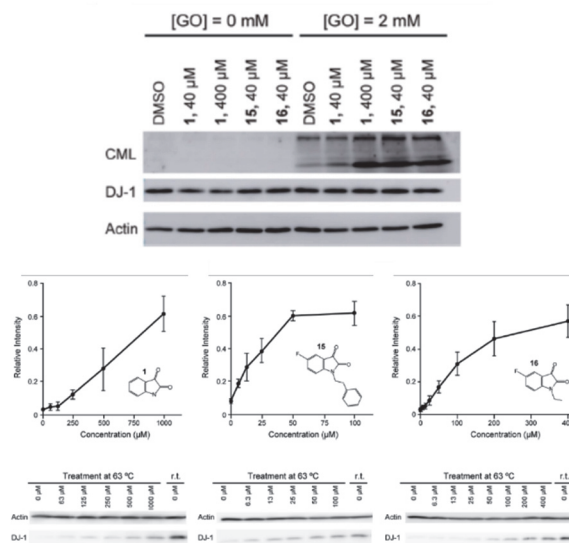


Fig.10 (Top) Evaluation of the reaction for carboxymethyl lysine-modification of DJ-1 in the presence of compounds, (Bottom) Cellular thermal shift assay of DJ-1 in the presence of compounds.

4. 最後に

このように熱的な化合物選抜によって、*in vitro* はもちろんのこと、*in cell* においても標的タンパク質に対して活性を有する化合物を選抜することができる可能性が示された。興味深いことに、これらの化合物はいずれも μM オーダーの低親和性化合物を基点にしている。このことから、化合物がエンタルピー駆動型で標的分子と相互作用する場合、その結合様式には特異性があることが期待される。さらに、本手法は、従来の高い阻害活性、高い結合親和性によるセレクションとは異なり、標的タンパク質に対する

化合物結合の質をセレクションやバリデーションの重要な指標としている。したがって、この手法は従来のスクリーニングにおいて低親和性であるがゆえに見逃してきた、特異性を有した化合物を取りこぼしていた可能性を示唆している。本研究のようなカロリメーターを活用した低分子阻害剤の探索が、新たな薬剤設計に貢献することを期待したい。

謝 辞

本研究は、東京大学大学院工学系研究科、津本研究室で行われたものである。研究に従事された大学院生、スタッフに深く感謝致します。九州大学 Caaveiro Jose 准教授には、CapF や DJ-1 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。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。本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム BINDS (課題番号 JP19am0101094)、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) V. Kairys, L. Baranauskienė, M. Kazlauskienė, D. Matulis, and E. Kazlauskas, *Expert Opin. Drug Discov.* **14**, 755-768 (2019).
- 4) J. P. Renaud, C. Chung, U. H. Danielson, U. Egner, M. Hennig, R. E. Hubbard, and H. Nar, *Nature Rev. Drug Discov.* **15**, 679-698 (2016).
- 5) 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).
- 6) T. Carbonell and E. Freire, *Biochemistry* **44**, 11741-11748 (2005).
- 7) Y. Kawasaki, M. Sekiguchi, M. Kawasaki, and Y. Hirakura, *Chem. Pharm. Bull.* **62**, 77-83 (2014).
- 8) G. Klebe, *Drug Discov. Today* **24**, 943-948 (2019).
- 9) G. Klebe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 95-110 (2015).
- 10) S. Nagatoishi, J. M. M. Caaveiro, and K. Tsumoto, *Yakugaku Zasshi* **138**, 1033-1041 (2018).
- 11) S. Nagatoishi and K. Tsumoto, *Netsu Sokutei* **44**(4), 164-170 (2017).
- 12) C. K. Lawrence, *Methods in Enzymol.* **493**, Academic Press, (2011).
- 13) K. Nakano, T. Chigira, T. Miyafusa, S. Nagatoishi, J. M. M. Caaveiro, and K. Tsumoto, *Sci. Rep.* **5**, 15337 (2015).
- 14) M. J. Devine, H. Plun-Favreau, and N. W. Wood, *Nature Rev. Cancer* **11**, 812-823 (2011).
- 15) S. Tashiro, J. M. M. Caaveiro, M. Nakakido, A. Tanabe, S. Nagatoishi, Y. Tamura, N. Matsuda, D. Liu, Q. Q. Hoang, and K. Tsumoto, *ACS Chem. Biol.* **13**, 2783-2793 (2018).



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



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