

解 説

蛋白質の機能制御を指向した熱測定に基づく 低分子リガンド開発に関する研究

長門石 暁^{a,b}

^a 東京大学医科学研究所

^b 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所

(受取日：2022 年 1 月 31 日，受理日：2022 年 3 月 8 日)

Development of Small Molecule Ligands Based on Calorimetric Analysis for Functional Regulation of Proteins

Satoru Nagatoishi^{a,b}

^a The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

^b National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

(Received Jan. 31, 2022; Accepted Mar. 8, 2022)

The use of small-molecule ligands to control biological activities at the molecular level is expected to lead not only to an essential understanding of cellular systems but also to the development of applications in medicine and diagnosis. In the conventional search for small molecule drugs, there is often insufficient information on the mechanism of action at the molecular level for the selected candidate compounds. Therefore, evaluation of the specificity of the candidate drug to the target molecule is an important step. Therefore, we hypothesized that it is crucial to capture the "quality of the interaction" that can create specificity in the binding mode even if the affinity is low, and those thermodynamic indices can capture this quality. Here, we conducted compound selection by thermal measurement using ITC and were able to select compounds with activity against the target protein in vitro and in the cell. This method is expected to create new compounds with specific binding modes that have been overlooked in conventional screening due to their low affinity.

Keywords: drug discovery, thermodynamics, small-molecule screening, enthalpy, hit validation

1. はじめに

低分子リガンドを用いて生命活動を分子レベルで制御することは、細胞システムの本質的な理解へとつながることはもちろんのこと、医療・診断などへの応用展開も期待される。低分子医薬品の開発は、標的疾患を治癒する薬効があるかどうか重要であるため、大規模な化合物ライブラリーから候補を選抜するために、モデル細胞を用いた表現型を指標とした探索、いわゆるフェノタイプスクリーニングが第一の選択肢としてとられやすい。このスクリーニングは高いスループット性を有していることから必要不可欠な手法ではあるものの、選抜される候補化合物に関する分子レベルでの作用メカニズムに関する情報は十分ではないことがしばしばある。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点や、特異性が低いま off-target 作用により毒性が発現するなどの問題が生じる。

そこで近年の薬剤探索では、副作用が少なく標的分子に対して特異性を示す、いわゆる分子標的創薬が求められて

いる。また新興感染症における新薬開発においては、安全性の高い薬剤の迅速な探索が欠かせない。そのためには、標的分子に対する候補薬剤の特異性評価のステップが重要となる。^{1,2)} 従来より特異性のあるリガンドとは、高い結合親和性を有するものであるという観点が主軸となっている。しかし我々は、その捉え方に疑問をもった。高い結合活性を示すリガンドが全て特異性のあるリガンドであると考えてよいのか。薬剤探索において、高い結合活性を示すものを選抜し、低い結合活性を示すものを闇雲に排除してよいのか。実はこの低い結合活性を示すものの中にも原石があり、その原石を起点に合理的な分子設計を行うことで高い特異性創出もあるのではないかと考えた。そのためには、低親和性であったとしても、その結合様式には特異性を創出する“相互作用の質”をしっかりと捉えることが重要なのではないかと考えた。

では“相互作用の質”とは何を意味するのか。本研究で着目したのは、古典的な分子認識の世界である。特異的な分子認識としてよく知られているモデルとして、いわゆる

鍵と鍵穴モデルがある。お互いが構造相補性を有した相互作用界面をもっており、その界面においては、複数の非共有結合が形成される。低分子リガンドと標的蛋白質の場合、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、そして物理化学的挙動などにおいて固有な特徴を見出せると考えられる。さらにその相互作用形成においては、溶媒と変化も結合エネルギーに重要な役割を果たすこともある。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蛋白質への吸着、さらには蛋白質の変性などにより、均質な結合挙動は観察されない。そして本研究で最も着目した点が、この特異的な相互作用における物理化学的挙動、特に結合エネルギー変化における熱力学的変化である。

Fig.1 に示すように、水素結合の多くは、その非共有結合形成において発熱反応を示す (Fig.1(A))。この発熱反応は熱力学的にはエンタルピー変化として観察される。ITC 測定では Fig.1(B) のようなプロファイルとなる。一方、疎水性相互作用に伴う溶媒と変化が関与している場合、その相互作用界面から脱水と反応が起こり吸熱反応を示す (Fig.1(C))。これはエントロピー変化として観察され、ITC 測定では Fig.1(D) のようなプロファイルとなる。このような結合における熱力学的なエネルギー変化を知ること、その結合における“相互作用の質”を捉えることができると考えられる。

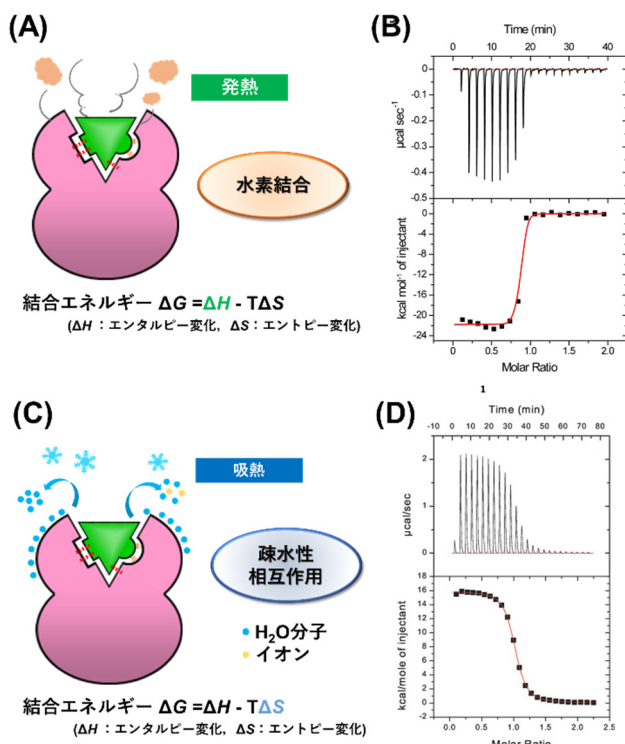


Fig.1 (A) Exothermic reaction and enthalpy change associated with hydrogen bond formation, (B) ITC profile showing exothermic reaction, (C) Endothermic reaction and entropic change associated with dehydration change, (D) ITC profile showing endothermic reaction. (Color online).

先行研究において、first-in class から best-in class に関する低分子薬剤設計に対して熱力学的な指標が有効であ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、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、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ところが大きい傾向にあった。³⁻⁵⁾ このような背景から、著者らは、ITC 測定を活用し、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”ことができると考え、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)。

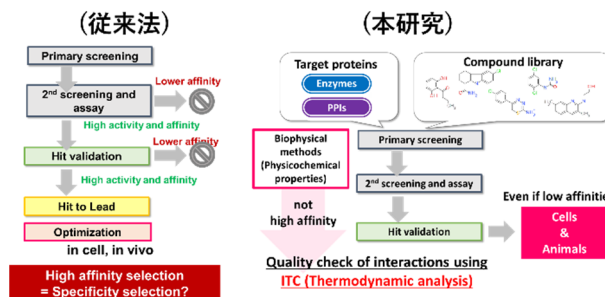


Fig.2 (Left) The conventional screening flow of selection by high affinity, (Right) Conceptual diagram of my research: the flow of selection based on thermodynamic properties by introducing this ITC measurement. (Color online).

2. 熱量測定による酵素阻害化合物の同定

本研究の POC を示すために、モデルとなる蛋白質として、黄色ブドウ球菌の莢膜を合成する酵素の 1 つ、CapF を用いることにした。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。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。CapF はこの莢膜合成を担っている主要な酵素の 1 つである (Fig.3(A))。CapF は構造も明らかになっていることから、将来的にこの構造に基づいた高活性阻害剤設計にもつながるのではないかと考えた。⁶⁾

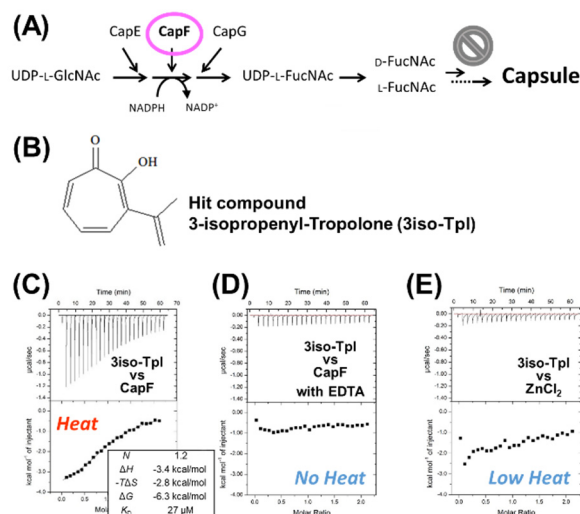


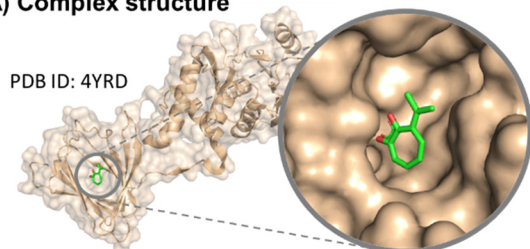
Fig.3 (A) Synthetic scheme of capsule utilizing CapF in *Staphylococcus aureus*, (B) Hit compound for CapF inhibitor, (C-E) ITC profiles of hit compound against CapF, CapF with EDTA, and Zinc ions.

阻害探索のための1次スクリーニングとして、SPRによるCapF結合化合物の選抜を行った。結合活性を示す化合物の中から、CapFの酵素阻害活性を有し、かつSPRにて濃度依存性を示す化合物に絞り込んだ。これらの選抜された化合物群に対してITC測定を行ったところ、Fig.3(B),(C)のようにCapFに対して1:1結合を示す1つの化合物を同定することに成功した。この化合物は3-isopropenyl-Tropolone (3iso-Tpl)であり、その阻害活性や結合親和性はサブmMレベルと低親和性であった。この3iso-Tpl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-Tpl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。このヒット化合物の熱力学的特性として重要な点は、1:1の結合比、発熱を伴うエンタルピー駆動の相互作用様式であったことである(Fig.3(C))。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-Tplはキレート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.3(D))。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.3(E))。このことから、3iso-Tpl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。⁶⁾

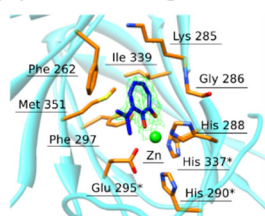
ITC測定より明らかとなったCapFとヒット化合物の結合様式を確かめるために、複合体に関するX線結晶構造解析にも成功した。その結果ITCの結果を支持する相互作用様式が明らかとなり、3iso-TplはCapFのポケットに入り、近傍の亜鉛イオンをキレートしていることが確かめられた。

(Fig.4)。興味深いことに、3iso-TplとCapFのポケットには高い構造相補性も観察された。⁶⁾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、標的蛋白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と強力な戦略となり得ることが示された。

(A) Complex structure



(B) Zinc binding



(C) Shape complementarity

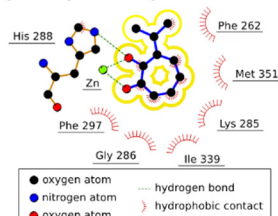


Fig.4 (A) Complex structure of CapF and 3iso-Tpl, (B, C) The binding manner of 3iso-Tpl in CapF. (Color online).

3. 熱量測定による細胞内で活性を示す化合物同定

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*) の標的蛋白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蛋白質の1つにDJ-1がある(Fig.5(A))。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(Fig.5(B))、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、新しい治療法への橋渡しになることを期待した。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.5(C))。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1:1結合比の化合物であることが分かった(Fig.5(D))。⁷⁾

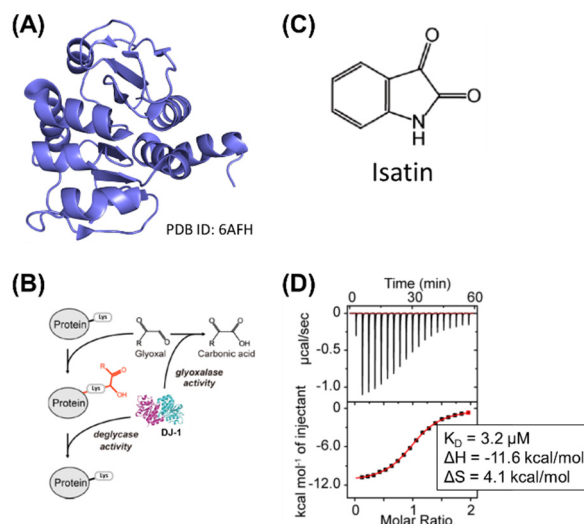


Fig.5 (A) Protein structure of DJ-1, (B) Overview of DJ-1 inhibition in the enzymatic reaction of DJ-1, (C) Chemical structure of hit compound Isatin, (D) ITC profile of isatin binding to DJ-1. (Color online).

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。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。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、#16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.6(A))。これらの化合物のITC測定を行ったところ、結合親和性の向上は主にエンタルピー得によるものであった。構造解析の結果、伸長した官能基は周辺のアミノ酸と疎水的な相互作用で結合している様子が観察された(Fig.6(B))。⁷⁾

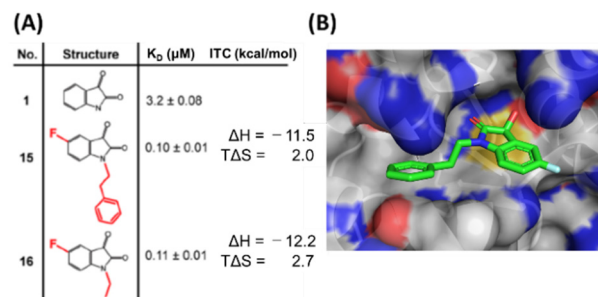


Fig.6 (A) Thermodynamic parameters and inhibitory activity of Isatin, #15, #16 binding to DJ-1, (B) Complex structure of #15 binding to DJ-1. (Color online).

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ル活性を阻害することが明らかとなった。さらに興味深いことにこれらの化合物は、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。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、細胞内でも標的蛋白質に対して作用することが示された。

4. アイソフォーム選択性を有する阻害剤に関する熱力学的特性

本研究の一般性を見出すために、既に臨床試験に上がっている医薬品候補を用いて、その熱力的特徴を解析することを試みた。そのモデルとして HSP90 阻害剤、TAS-116（一般名 Pimipitespib）と HSP-90 の結合サイトである N 末ドメイン（NTD）を用いて、ITC 評価を行った。⁸⁾ Pimipitespib の特徴は、HSP90 に対してアイソフォーム選択性が高いことが知られている。Pimipitespib は、その類縁体と HSP-90 NTD との共結晶構造が解かれている。この結合様式を観察してみると、Pimipitespib は、他の HSP-90 を阻害する化合物と同様に NTD の ATP 結合サイト（第 1 ポケットと第 2 ポケットとも呼ばれる）にはまり込んで、ATP 結合を競合阻害する（Fig.7(A),(B)）。ところが、それ以外にも結合部位が存在し、ATP 結合ポケットの奥に位置する部位（第 3 ポケットと呼ばれることもある）にも作用する化学構造を有している。この第 3 ポケットに位置している部位を切り取ったフラグメント THS-510 を設計し（Fig.7(C)）、THS-510 と NTD との結合も ITC で評価した。その結果、THS-510 は解離定数 μM オーダーの低親和性を示したが、発熱反応を有するエンタルピー駆動型の結合が観察された（Fig.7(D)）。さらに熱力学的性質を知るために、この結合エンタルピー変化の温度依存性について詳細な解析を行った。THS-510 は温度の上昇に伴い、そのエンタルピー変化は小さくなる様子が観察された（Fig.7(E)）。つまりフラグメント化合物の結合において、非熱熱容量変化が正の値を有していることが明らかとなった。一方で、Pimipitespib の非熱熱容量変化は負の値を示した（Fig.7(E)）。この ΔC_p の負の値は、溶媒分子をポケットから追い出すような結合をするリガンドについて以前に述べたように、疎水性の埋もれた領域への結合を示唆するものである。従って THS-510 の結合では蛋白質に対して何かしら特徴的な構造変化を誘起している可能性が示唆された。蛋白質と小さなリガンドの相互作用について、正の ΔC_p 熱力学を記述した以前の研究がある。正の熱容量変化は、リガンドが露出した非極性表面に結合したときに生じると考えられている。

そこで、化合物が結合した複合体における HSP-90 の構造をモデル構造計算から解析することを試みた。モデル複合体における Hsp90 の溶媒アクセス可能表面積を算出した。その結果、THS-510 複合体の Hsp90 の非極性・極性表面積（ $5809.7 \text{ \AA}^2$ と $4979.4 \text{ \AA}^2$ ）は、Pimipitespib 複合体のそれ（ $5785.9 \text{ \AA}^2$ と $4900.9 \text{ \AA}^2$ ）よりそれぞれ大きかった。この差は Hsp90 の ATP 結合ポケットが空であることに由来する。つまり THS-510 の結合により ATP リッド領域の α -helix 形成が誘導されると、ATP 結合ポケットの疎水性表面が露出すると推測された。⁸⁾

このように、Hsp90 選択的阻害剤 Pimipitespib およびその類縁体を ITC 解析した結果、Hsp90 の第 3 結合ポケットに結合する化合物はエンタルピー駆動で相互作用し、剛直なコンフォメーションを誘導することが明らかとなった。この特性がアイソフォーム選択的なリガンド設計において画期的であったと考えられる。化合物の第 3 結合ポケットは、

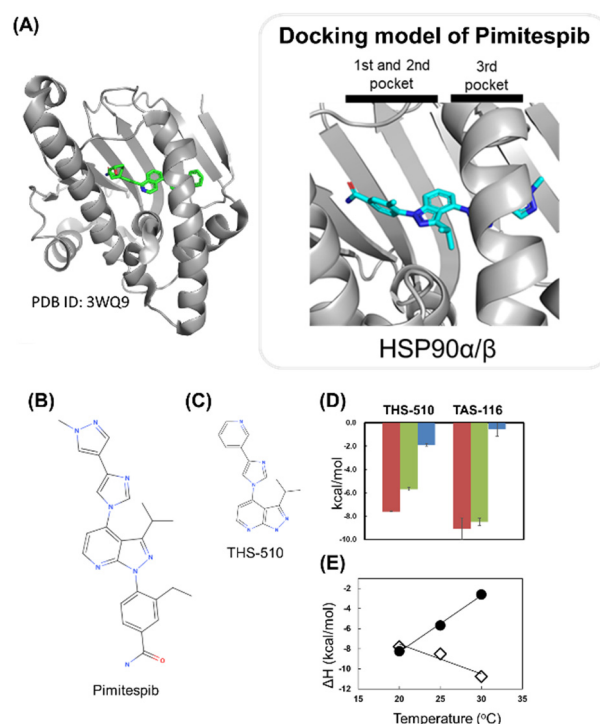


Fig.7 (A) Crystal structure of the complex Hsp90α NTD-Pimipitespib analog and docking structure of the complex Hsp90α NTD-Pimipitespib (B, C) Chemical structure of Pimipitespib and THS-510. (D) Thermodynamic parameters for the interactions of THS-510 and Pimipitespib with human Hsp90α NTD. (E) Temperature dependence of the binding enthalpy change for THS-510 and TAS-116 binding to the human Hsp90α NTD. (Color online).

Hsp90 の結合選択性と活性を決定する大きな要因と考えられる。

5. 共同研究における熱測定の活用

最後に、本研究の汎用性を示すために、著者らの共同研究例を紹介したい。マラリア感染やがん標的として近年注目されているセリン代謝酵素 (SHMT) に対する低分子阻害剤スクリーニングより選抜された化合物の中から、ITC を活用して発熱反応型のヒット化合物を同定している。⁹⁾ さらに X 線結晶構造解析の取得にも成功し、発熱反応を示すリガンドは、水素結合を含めた複数の非共有結合を形成して SHMT に結合していることが明らかとなった。¹⁰⁾ この結果より、SHMT に対して同定されたヒット化合物が特異的な相互作用様式をもって結合していることが示された。²⁾

また H. hanzawa 氏らは ITC を活用したヒット候補化合物の同定において興味深い研究を報告している。¹¹⁾ スプライシングの初期段階で機能し、抗腫瘍薬のターゲットとして知られているスプライシング因子 poly(U)-binding-splicing factor (PUF60) に対するリード化合物の探索において、2 種類のヒットフラグメント (DS89092425, DS37580150) を選抜した。これらのフラグメント化合物に関して、 ^1H - ^{15}N HSQC、X 線結晶構造、そして ITC による結合解析を実施している。ITC 測定において、DS89092425 では明確な結合反応が観察されたが ($K_D = 83 \pm 12 \mu\text{M}$)、DS37580150 では弱い反応しか得られなかった。このことから DS89092425 は PUF60 に対して特異的な結合様式が存在することが示唆された。 ^{15}N 標識した PUF60-UHM ドメインの ^1H - ^{15}N HSQC 測定では、DS89092425 存在下においていくつかの NMR シグナルが明らかにシフトしており、DS37580150 で

はわずかなシフト変化であった。PUF60 と DS89092425 の複合体の結晶構造においては、DS89092425 固有の官能基であるアミノ基が、PUF60 の Glu479 の間に静電相互作用が観察された。DS37580150 では水酸基となっているため、この静電相互作用は形成できない。実際に DS37580150 では、結合部位の電子密度が非常に低く、化合物のモデル化ができていない。以上のことから、ITC で観察された反応は、PUF60 に対する DS89092425 の特異的な相互作用を検出していると考えられる。

6. まとめと今後の展望

このように ITC を活用した熱測定による化合物選抜によって、*in vitro* はもちろんのこと、*in cell* においても標的蛋白質に対して活性を有する化合物を選抜することができた。重要なことは、これらの化合物は μM オーダーの低親和性化合物がほとんどである。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、標的蛋白質に対する化合物結合の質が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されてきた、特異的な結合様式を有した新しい化合物を発見できる可能性を示唆している。今後は、熱測定を活用した蛋白質-蛋白質間相互作用 PPI 阻害剤の探索、新興感染症に対する薬剤設計に挑戦し、新たな薬剤の種を見つけてゆきたい。

謝 辞

この度は大変光栄な賞をいただき、本学会を運営される先生方、関係者の皆様に深く感謝申し上げます。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ります。津本浩平教授には、本研究を開始してから約 10 年間、基礎から応用に至るまでの様々な観点で、常にご指導いただきました。心より厚く御礼申し上げます。また本研究に従事された大学院生、スタッフの皆さん、共同研究者の皆様にも深く感謝いたします。九州大学 Caaveiro Jose 教授には、CapF や DJ-1 等に関します結晶構造解析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) 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 JP21am0101094) の支援を受けました。さら一部は JSPS 科研費 (JP18H05425, JP18H02082, JP20H02531) 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) J. P. Renaud, C. Chung, U. H. Danielson, U. Egner, M. Hennig, R. E. Hubbard, and H. Nar, *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 679-698 (2016).
- 2) K. Gao, R. Oerlemans, and M. R. Groves, *Biophys. Rev.* **12**, 85-104 (2020).
- 3) E. Freire, *Drug Discov. Today* **13**, 869-874 (2008).
- 4) J. E. Ladbury, G. Klebe, and E. Freire, *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 23-27 (2010).
- 5) Á. Tarcsay and G. M. Keserü, *Drug Discov. Today* **20**, 86-94 (2015).
- 6) K. Nakano, T. Chigira, T. Miyafusa, S. Nagatoishi, J. M. M. Caaveiro, and K. Tsumoto, *Sci. Rep.* **5**, 15337 (2015).
- 7) 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).
- 8) C. Yoshimura, S. Nagatoishi, D. Kuroda, Y. Kodama, T. Uno, M. Kitade, K. Chong-Takata, H. Oshiumi, H. Muraoka, S. Yamashita, Y. Kawai, S. Ohkubo, and K. Tsumoto, *J. Med. Chem.* **64**, 2669-2677 (2021).
- 9) H. Nonaka, Y. Nakanishi, S. Kuno, T. Ota, K. Mochidome, Y. Saito, F. Sugihara, Y. Takakusagi, I. Aoki, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, and S. Sando, *Nat. Commun.* **10**, 876 (2019).
- 10) T. Ota, A. Senoo, M. Shirakawa, H. Nonaka, Y. Saito, S. Ito, G. Ueno, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, and S. Sando, *iScience*, **24**, 102036 (2021).
- 11) H. Hanzawa, T. Shimada, M. Takahashi, and H. Takahashi, *J. Biomol. NMR*, **74**, 501-508 (2020).



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