

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07899

研究課題名(和文) 創薬効率を高めるための計算機的フラグメントベース・ドラッグデザイン手法の開発

研究課題名(英文) Development of in silico fragment-based drug design method for rational drug discovery

研究代表者

広野 修一 (Hirono, Shuichi)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30146328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、FBDD/SBDDのための有力な計算ツールとして in silicoフラグメントマッピング手法を創案した。この手法では、まず、タンパク質-リガンド複合体のX線結晶構造から抽出したフラグメントとサブサイトのペアからなるデータベースを創製し、次にそれを用いて、知識ベースでフラグメントを標的タンパク質上にマッピングするソフトウェアを開発した。この手法を、いくつかの代表的なPPI阻害剤の系で検証した結果、良好な成績を上げることが出来た。従って、この in silicoフラグメントマッピング手法は、SBDD/FBDDのための有用かつルーチン的なツールになると確信している。

研究成果の概要(英文)：Here, we propose an in silico fragment-mapping method as a potential tool for Fragment-based drug discovery (FBDD). For this method, we created a database named Canonical Subsite-Fragment DataBase (CSFDB) and developed a knowledge-based fragment-mapping program, Fsubsite. CSFDB consists of various pairs of subsite-fragment derived from X-ray crystal structures of known protein-ligand complexes. Using three-dimensional similarity-matching between subsites on one protein and another, Fsubsite compares the surface of a target protein with subsites in CSFDB. When a local topography similar to the subsite is found on the surface, Fsubsite places a fragment combined with the subsite in CSFDB on the target protein. When all subsites in CSFDB are examined, the fragment-mapping onto the target protein is completed. As a result of several validations of the method, we are sure that the in silico fragment-mapping method is a useful tool for computational structure-based drug design and FBDD.

研究分野：計算化学・物理化学・医薬分子設計

キーワード：in silico 創薬手法 フラグメントマッピング法 SBDD FBDD

1. 研究開始当初の背景

Fragment-based drug discovery (FBDD) は、創薬プロセスの一環として、リードディスカバリーとドラッグデザインの最も重要な有用な方法の一つとなっている。実験的 FBDD 法では、生物物理学的測定 (NMR、X 線など) によって標的タンパク質に結合することができるフラグメント (1 ~ 2 個の官能基を含む小分子) を同定するが、実験的スクリーニングは時間がかかり高価である。従って、代替的あるいは補完的な計算機手法が強く望まれている。しかし、それを効率的にサポートしたり、あるいは完全に計算機で行う *in silico* FBDD 手法は、まだ充分には確立されていない。

2. 研究の目的

最新の創薬基盤技術として期待されている *in silico* FBDD 創薬手法は、まだ充分には確立されていない。そのため本研究では、FBDD の有力なツールとして *in silico* フラグメントマッピング手法を確立することを目的とする。そのために、まず、フラグメントとサブサイトのペアからなるデータベース (Canonical Subsite-Fragment DataBase (CSFDB) と名付ける) を創製し、次に、それを用いて知識ベースでフラグメントを標的タンパク質上にマッピングするプログラム Fsubsite を開発する。CSFDB は、公知のタンパク質 - リガンド複合体の X 線結晶構造から抽出された、種々のサブサイト-フラグメント対の集合である。Fsubsite は、あるタンパク質と他のタンパク質のサブサイト間の 3 次元構造特性の類似性マッチングを用いて、標的タンパク質の表面を CSFDB のサブサイトと比較する。サブサイトに類似する局所地形が標的タンパク質表面上に見出されると、Fsubsite は、CSFDB 中のサブサイトと結合したフラグメントを標的タンパク質上に置く。CSFDB 中のすべてのサブサイトが検査されると、標的タンパク質へのフラグメントマッピングが完了する。これらのフ

ラグメントを、Linking、Growing 等により成熟した分子に仕上げたり、3D-pharmacophore based virtual screening を行うことで、新規性の高い *in silico* FBDD 手法に仕上げることが目指す。

3. 研究の方法

in silico フラグメントマッピング法の全体像と流れを図 1 に示す。

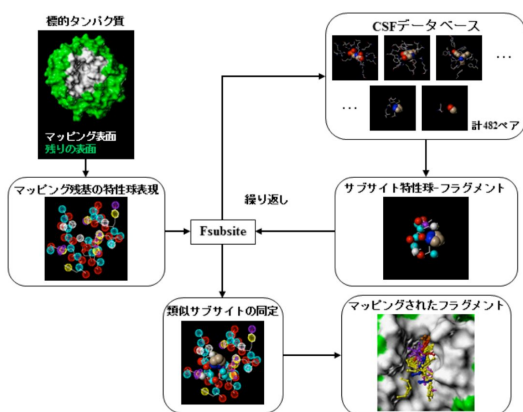


図 1 *in silico* フラグメントマッピング法の概要

この流れに沿って、方法を概略する。

(1) CSF データベースの構築

PDB からタンパク質-リガンド複合体立体構造のみを収集したデータベースである PDBbind v.2013 を利用した。今回は、配列類似性に基づき代表的なタンパク質 65 種のみを集めた core セット (195 タンパク質-リガンド複合体構造) を用いた。

PDBbind core セット内のリガンド分子について、JChem 6.3.0 (ChemAxon Ltd., 2014) に実装されている Fragmenter を用いてフラグメント分割を行った。フラグメント分割には、環から出ている単結合を切断し、環構造と側鎖構造に分割する。ただし、孤立重原子が生じたときは、環に戻す RingChainRecap ルールを用いた (図 2)。そして、SYBYL-X 2.1.1 (Certara, L.P., 2013) を用いて、分割されたフラグメントから重原子間距離 4Å 以内のアミノ酸残基を対応しているサブサイトとして抽出し、644 個のサブサイト-フラグメント・ペアを得た。

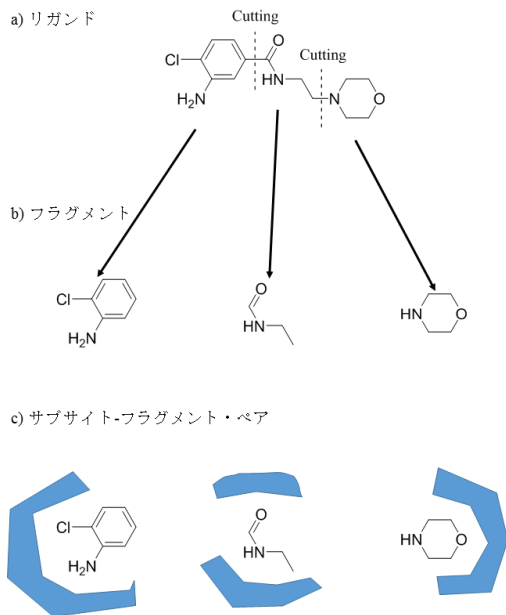


図2 リガンドのフラグメント化とサブサイト抽出

次に、サブサイト類似性(式2)75%でカノニカル化を行った。重なり得点40点未満の小さなサブサイトについては、類似性90%のカットオフを用いた。この結果、482個のカノニカル・サブサイト-フラグメント(CSF)データベースが構築された(図4)。

(2) フラグメントマッピングプログラム Fsubsite の開発

フラグメントをマッピングするプログラム Fsubsite を開発するにあたり、分子重ね合わせアルゴリズム SUPERPOSE [1]を利用した。この方法は、分子の官能基・原子団に特性球を置き、得点表(表1)を基に、並進・回転により、最大の重なり得点を持つ最適な重ね合わせ配向を求めるものである。

表1 特性球の重なり得点表

	HP	AR	HD	HA	DA	HL
HP	+3	+3	-2	-2	-2	-133
AR	+3	+4*	-2	-2	-2	-133
HD	-2	-2	+2	-2	+1	-133
HA	-2	-2	-2	+2	+1	-133
DA	-2	-2	+1	+1	+1	-133
HL	-133	-133	-133	-133	-133	-133

* 環の面が一致しない時は、+3。

データベース内のサブサイトや標的タンパク質のマッピング表面を構成するアミノ酸残基を、予め、疎水性(HP)、芳香族性(AR)、水素結合供与性(HD)、水素結合受容性(HA)、水素結合供与/受容性(DA)の5種類の特性球(図3)で表現しておき、得点表に基づいて、サブサイト間の類似性を評価する。Fsubsiteは、サブサイト間の3次元構造特性の類似性マッチングを用いて標的タンパク質の表面をCSFDBのサブサイトでスキャンして、サブサイトに類似する局所地形が標的タンパク質表面上に見出されると、CSFデータベース中のサブサイトと結合したフラグメントを標的タンパク質上に置く機能を持っている。CSFデータベース中のすべてのサブサイトが検査されると、標的タンパク質へのフラグメントマッピングが完了することになる。

[1] Iwase K, Hirono S, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **13**, 499-512 (1999).

4. 研究成果

本研究で考案した *in silico* フラグメントマッピング法の具体的な応用として、新規 PAD4 阻害剤の探索に適用した。

(1) 背景と目的

関節リウマチの原因のひとつとして、関節の滑膜に存在しているタンパク質のアルギニン残基がシトルリン化されることによって、タンパク質が非自己としてみなされ抗体が作られてしまうということが知られている。PAD4(Peptidyl Arginine Deiminase4)はカルシウムイオン存在下で活性化し、タンパク質のシトルリン化を起こす。このことから、PAD4の活性を阻害することが、関節リウマチの根本的な治療に繋がると期待されている。しかし、これまでに報告されている阻害剤は、活性やバイオアベイラビリティに問題があることから治療薬として使用されているものはない。そこで、我々が開発した「Fsubsiteプログラム」と「サブサイト-フラグメントデータベース(CSFデータベース)」を組み合

わせた *in silico* フラグメントマッピング法により、既知 PAD4 阻害剤とは異なる骨格の化合物を探索することを目的とした。

(2)方法

PAD4 の立体構造の選択

PDB(Protein Data Bank)から PAD4 の X 線結晶構造を 13 個(アポ構造:3 構造、ホロ構造:10 構造)得た。ホロ構造の 10 個をリガンド周辺残基でクラスタリングを行ない、代表構造 3 個(PDB ID:1WDA,4X8C,4X8G)をフラグメントマッピングに使用した。

フラグメントマッピング

-1. マッピング表面残基の決定

ホロ構造の 10 個各々で、リガンドから 4 以内にある残基を選択し、それらの和集合を界面残基(全 30 残基)とした。さらに、そこから 4 以内にある残基をマッピング表面残基(全 113 残基)として定義した。

-2. フラグメントマッピング

PDB ID:1WDA, 4X8C, 4X8G のマッピング表面残基に対して、*in silico* フラグメントマッピング法を適用した。

バーチャルスクリーニング

-1 3D ファーマコフォアベースドバーチャルスクリーニング

マッピングされたフラグメントの配置パターンをもとに、PDB ID:1WDA,4X8C,4X8G 各々に対して作成した 3D ファーマコフォアクエリを用いて、ナミキ化合物データベースに対して Unity での Flex search を行なった。

-2. ドッキングベースドバーチャルスクリーニング

Glide を用いて SP モード・Scaling factor:0.8 の条件でドッキングを行ない、トップポーズを選択することにより、X 線結晶構造を再現することができた。なお、検証ドッキングには、複合体立体構造が既知のリガンド 10 種類の中から選択した 6 種類(回転可能結合数 14)のリガンドと、PDB ID: 1WDA, 4X8C, 4X8G のタンパク質構造を用いた(Grid

中心:界面残基、Grid サイズ:20)。

文献から既知阻害剤 24 個の構造と活性データを得て、pIC50 値 5.00 の化合物(6 個)を「活性あり」、pIC50 3.00 の化合物(4 個)を「活性なし」と定義した。これらの化合物のドッキングスコアと化合物の回転可能結合数を用いて判別式を作成し、100%の正答率で化合物を判別することが出来た。

最終候補化合物の選別

-1 一次候補化合物の物性予測・MM-GBSA 計算

Qikprop を用いて、判別式作成に使用した 10 化合物と一次候補化合物の物性予測を行なった。「活性あり」と「活性なし」の化合物で大きく差が見られた FOSA(全溶媒接触可能表面積 SASA の疎水性成分)の値を用いて、化合物の絞り込みを行なった。

さらに、Prime を用いて一次候補化合物の MM-GBSA 計算を行ない、MM-GBSA 値があまり良くない化合物(MM-GBSA -40)は除き、その結果残った化合物を二次候補化合物とした。

-2.二次候補化合物のクラスタリング

二次候補化合物のクラスタリングを行ない(Fingerprint: MOLPRINT2D, Metric: Tanimoto simirality)、各クラスターから代表化合物を選択し、最終候補化合物とした。

最終候補化合物のアッセイ

最終候補化合物の中から納期・費用を考慮し、我々の購入できる化合物について、100 μ M での%阻害測定を行なうこととした(アッセイは BPS Bioscience 社に依頼)。

実験条件は、以下の通りである。

Buffer:50mM HEPES(pH=7.4),50mM NaCl,10mM CaCl₂,2mM DYT、タンパク質:PAD4、基質:BAEE(N⁻-Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride)、実験温度:37^oC、インキュベーション時間:30min、蛍光測定:励起波長/測定波長=413nm/476nm

(3)結果

フラグメントマッピング

フラグメントマッピングの結果、1WDA:28016 個、4X8C:22422 個、4X8G:27280 個のフラグメントがマッピングされた。マッピングされたフラグメントの中から、「サブサイトの重なり得点が 25 点以上」、かつ「タンパク質表面上に埋もれていないフラグメント」を選別した。その結果、1WDA:85 個、4X8C:56 個、4X8G:42 個のフラグメントが得られた。

バーチャルスクリーニング

3D ファーマコフォアベースドバーチャルスクリーニングの結果、合計で 717 化合物(1WDA:58 化合物、4X8C:487 化合物、4X8G:172 化合物)がヒットした。

これらの化合物のドッキングスコアと化合物の回転可能結合数で判別分析を行ない、312 化合物(1WDA:29 化合物、4X8C:197 化合物、4X8G:86 化合物)を一次候補化合物とした。

最終候補化合物

一次候補化合物を物性・MM-GBSA 値で絞り込み、190 化合物を二次候補化合物とした。最後に、190 化合物のクラスタリングを行ない、各クラスターから代表化合物を選択し、35 化合物(1WDA:3 化合物、4X8C:26 化合物、4X8G:6 化合物)を最終候補化合物とした。

最終候補化合物のアッセイ

最終候補化合物 35 個のうち、価格と納期を考慮して 4 化合物を購入してアッセイを行った。この 4 化合物と既知阻害剤(Cl-amidine、 IC_{50} 値=5.9 μ M)のアッセイ結果は以下の通りである。

化合物名	%Inhibition at 100 μ M
Compound1	6
Compound2	4
Compound3	9
Compound4	24
Cl-amidine	17

(4)まとめ

当研究室で開発した Fsubsite プログラムとサブサイト-フラグメントデータベース(CSFDB)を用いることにより、既知阻害剤とは異なる骨格を持つ化合物を選別し、実際にその化合物の阻害活性を測定した結果、非常に良好な成績を上げることが出来た。従って、本研究課題の成果である *in silico* フラグメントマッピング手法は、*in silico* SBDD/FBDD のための有用かつルーチン的なツールになると確信している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Atsushi Kato, Izumi Nakagome, Shinpei Nakagawa, KyAdachi, Sarah F. Jenkinson, Jerome Desire, Yves, Bleriot, d Robert J. Nash, George W. J. Fleet, Shuichi Hirono

In silico analyses of essential interactions of iminosugars with the Hex A active site and evaluation of their pharmacological chaperone effects for Tay-Sachs disease

Organic & Biomolecular Chemistry, **15**, 9297-9304 (2017) 査読有り DOI: 10.1039/c7ob02281f

Taro Uchida, Masaki Wakasugi, Takahiro Kitamura, Tomomi Yamamoto, Mitsutoshi Asakura, Ryoichi Fujiwara, Tomoo Itoh, Hideaki Fujii, Shuichi Hirono
Exploration of DPP-IV inhibitors with a novel scaffold by multistep in silico screening

Journal of Molecular Graphics and Modelling, **79**, 254-263 (2018) 査読有り
DOI: 10.1016/j.jmgs.2017.12.005

〔学会発表〕(計 8 件)

杉山 耀司, 山乙 教之, 吉田 智喜, 広野 修一
In silico フラグメントマッピング法を用いたリガンド結合様式予測法の開発

第 45 回構造活性相関シンポジウム 2017 年
片村 百々奈, 中込 泉, 山乙 教之, 広野 修一
In silico フラグメントマッピング法を用いた新規
PAD4 阻害剤の探索

第 45 回構造活性相関シンポジウム 2017 年
北村 祐万, 小澤 新一郎, 広野 修一
イン・シリコ フラグメントマッピングに基づく新規
Rac1 PPI 阻害剤の同定

第 45 回構造活性相関シンポジウム 2017 年
中込 泉, 楠本 彩瑛, 飯島 瑛里香, 山乙 教之,
宮本 健史, 広野 修一

筋萎縮治療薬の開発を目指したSMAD3 阻害剤
SIS3 の結合様式の同定

第 45 回構造活性相関シンポジウム 2017 年
山乙 教之, 広野 修一

SBDD のための in silico フラグメント・マッピ
ング法の開発

第 45 回構造活性相関シンポジウム 2017 年
市村 博信, 山乙 教之, 広野 修一

アミノ酸残基マッピング法を用いた PPI 界面にお
ける相互作用スポット予測手法の開発

第 45 回構造活性相関シンポジウム 2017 年
三沢 憲佑, 小澤 新一郎, 吉田 智喜, 中込
泉, 山乙 教之, 広野 修一

フラグメントマッピング法によるUSP7-HDM2 タ
ンパク質間相互作用(PPI)阻害剤の探索

第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム
2017 年
小澤 新一郎, 高橋 美貴, 広野 修一

in silico フラグメントマッピングによる新規キマ
ーゼ阻害剤の探索

第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム
2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広野 修一 (HIRONO Shuichi)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号: 30146328

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者

山乙 教之 (YAMAOTSU Noriyuki)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号: 60230322

中込 泉 (NAKAGOME Izumi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号: 30237242

(4) 研究協力者 無し