

令和元年6月2日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02420

研究課題名(和文) 物理化学的理解に基づく蛋白質間相互作用プロセス制御剤の探索と設計

研究課題名(英文) Screening and design of ligands regulating the process of protein-protein interactions based on biophysical approaches

研究代表者

津本 浩平 (Tsumoto, Kouhei)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：90271866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌疾患に関連するPPI、細菌感染に関連するPPIなど、創薬へとつながる有力なモデルPPIを選択し、熱力学、速度論、そして計算科学を駆使して、これらPPIの精密な相互作用解析と、抗体や低分子化合物によるPPIに対する阻害機構解明を行った。1つの標的蛋白質に対して、PPIのプロセスに関連する中間体構造を制御する制御剤を得ることに成功した。さらに、これら抗体と低分子それぞれに関する阻害メカニズムの分子レベルでの解析により、抗体からの低分子化によるPPI制御剤の設計に関する知見を得ることができた。本研究よりPPIに対する制御分子設計における新しい戦略指針が得られたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPIの特異的な制御は、従来、抗体によるものが主な戦術で、低分子展開は限定されていた。本研究では明確な結合ポケットが構造上では分からないPPIに対して、いくつかの低分子阻害剤を得ることに成功した。その特徴として、1) SPR, ITC, DSFなどの物理化学的解析より、標的への特異的な結合が観察され、2) 細胞アッセイレベルで活性が得られた。このように、PPIを制御するための物理化学的アプローチにより制御剤探索が可能であることは、蛋白質との特異的な相互作用による制御剤創出が可能であることを示唆し、創薬モダリティの観点において大きな学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to propose a strategy of ligand design regulating protein-protein interactions (PPIs). We have focused on the process of PPI and addressed biophysical behaviors of ligands, i.e. small molecules and antibodies which inhibit the target PPIs. Some model PPIs were selected from tumorigenesis and infection. These PPIs were biophysically characterized based on the thermodynamics, kinetics and computer simulation. We also revealed the mechanisms of inhibition of PPIs by using small molecules and antibodies. Through these experiments, we could regulate structure of a specific intermediate of PPI, which is correlated with the process of PPI, using both single-chain Fv and fragment compound. Furthermore, we have demonstrated the concept of PPI modulation through elucidation of the mechanisms for PPI inhibition at molecular level. Thus, we could propose a new strategy of the ligand design for PPI regulation in this project.

研究分野：蛋白質工学、生命物理化学、生命分子工学

キーワード：蛋白質-蛋白質相互作用 抗体 低分子 阻害剤 熱力学 速度論

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発（治療薬、診断薬）において、蛋白質を安定かつ精密に取り扱うことは必要不可欠である。例えば抗体医薬品開発では、抗体そのものの分子設計から品質管理まで、蛋白質の構造・物性に関する深い理解が求められる。低分子医薬品開発では、如何にして標的蛋白質に対して薬効の高い薬剤を分子設計できるかにかかっており、分子間相互作用における合理的な選択性・親和性の向上を目指した分子標的創薬が望まれている。このような背景の中で、疾患に関与する蛋白質-蛋白質間相互作用(PPI)の物理化学的な理解に基づく合理的な制御指針の提案が、強く求められている。

基礎科学のみならず医療展開の観点から、近年では抗体、中分子、低分子による PPI の人工制御が注目されている。抗体については、標的親和性の制御への要請が高く、合理的でかつ効率的な設計指針が求められている。中分子・低分子医薬品開発では、疾患治療における有力な標的として PPI が注目されている。標的となる蛋白質は相同性が高い分子種が少なくなく、多機能性を有することも多いことから、大きな副作用が懸念される。そこで PPI の特異的な界面に着目した制御薬剤の開発が指向されている。

申請者はこれまで、蛋白質相互作用設計の工学的アプローチとして、熱力学的解析に着目し、抗体の親和性向上(最先端プロジェクト)、低分子薬剤探索(基盤 A)、ならびに蛋白質の安定性制御への適用を試みてきた(基盤 B 等)。そのなかで、疾患に関連する相互作用の精密解析に成功しているほか、抗体の親和性向上については、相互作用における遷移状態(相互作用プロセス)に相関性があることを見出した。低分子薬剤探索では、発熱型低分子がヒット化合物として取得でき、物理化学的アプローチが有効な指標となり得ることを示してきた。さらに、抗体-抗原間相互作用は、その結合界面の広さから“面結合”、低分子-標的蛋白質間の相互作用では、その結合界面の小ささから“点結合”という作用機序の違いが物理化学的観点から議論できることを見出しつつある。以上の結果は、この物理化学的相互作用プロセスの作用機序に、特異性創出との重要な関連性があることを強く示唆するものであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、医薬品開発において重要な標的である蛋白質-蛋白質間相互作用(PPI)の制御に対し、その制御剤(抗体、低分子化合物)の物理化学的な相互作用プロセスを精査し、医薬品開発へ具体的な適用を可能にする分子設計指針の提案を試みる。具体的には、制御剤として抗体・低分子化合物について標的蛋白質との相互作用プロセスを、熱力学・速度論解析からアミノ酸レベルで詳述する。精密な構造解析と共にこれらの相互作用界面の特徴を議論し、制御剤の機能向上を試みる。その際、比較的軟かく接触面積の多い“面結合”と比較的固く接触面積の狭い“点結合”という概念で分類することを検証する。以上の結果に基づき、PPI 制御分子設計の指針となり得る重要な相互作用因子を見出す。

### 3. 研究の方法

蛋白質間相互作用 PPI の制御に関する新しい設計概念を提案するために、1) 低分子化抗体-抗原相互作用、2) 低分子化合物-蛋白質相互作用の 2 つを主軸に、代表者の津本は、低分子化抗体の相互作用解析、分担者の長門石は低分子の相互作用解析、そして分担者のカアベイロは X 線結晶構造解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗体の相互作用解析と阻害メカニズムの解明

抗体に関する PPI 制御機構を明らかにするために、以下の 3 つの観点から抗体の相互作用解析を行った。

#### ① 特徴的な抗原に対する抗体の分子認識メカニズムの解明

近年の標的 PPI の多くは明確な構造を有していない天然変性型や不安定な蛋白質が多い。そのため、ペプチドのようなフレキシブルな抗原、また翻訳後修飾を受けた抗原に対する抗体の分子メカニズムの解析は重要である。ペプチドの多くは柔軟性が高いために、抗原としての構造的特徴がほとんど分かっていなかったが、本研究で用いた CCR5 ペプチドのその抗体間の複合体構造やその熱力学的性質を詳細に解析したところ、ペプチドの分子内水素結合は抗体との親和性創出に重要な役割を果たしていることが明らかとなった(J Biochem. 164(1). 65-76, 2018)。また翻訳後修飾を受けた抗原に対する抗体との相互作用解析においても、抗原のコンホメーションが親和性に貢献することが示された(Biochemistry. 57(28). 4177-4185, 2018)。

#### ② 相互作用を制御する抗体エンジニアリング

抗体と抗原間の相互作用を精密に理解し、それを制御するための知見を得るために、いくつかの抗体エンジニアリング解析を実施した。抗体に対して電荷を有するアミノ酸を導入したり、交換することによって、抗体の親和性を大きく向上させることや、抗体設計に関する提案をすることができた(Biochem Biophys Rep. 15. 81-85, 2018, Scientific Rep. 9. 4482, 2019)。また抗 ROBO1 抗体とその抗原 sROBO1 間の相互作用界面について、Ala 変異体に関する熱力学的挙動と分子動力学シミュレーションを解析したところ、界面のわずかな変化によって、エンタルピーに貢献する相互作用の強化が観察され、エントロピーに貢献する水和変化を制御できた(Structure.27(3). 519-527, 2019)。さらには抗体の安定化に貢献する S-S 結合が抗原との結合に対

しても貢献しうることが示唆された (Protein Eng Des Sel. 31(7-8). 243-247, 2018)。

### ③ PPI のプロセスを制御する抗体の阻害メカニズム

がん関連蛋白質 P-cadherin に対する抗体を用いて、PPI のプロセスを制御できる抗体の分子メカニズムの解明を試みた。P-cadherin はホモダイマーを形成し細胞接着は増殖に重要な機能を果たしているが、そのダイマー形成において、X ダイマーと呼ばれる中間体構造を通過することが明らかになってきている。そこで、接着阻害活性を有する抗 P-cadherin 抗体 scFv を用いてダイマー阻害機構を明らかにしたところ、そのエピトープは P-cadherin の中間体形成に関連する部位に存在することが示された (Sci Rep. 7, 39518, 2017)

#### (2) 低分子化合物の相互作用解析

低分子化合物による PPI 制御機構を明らかにするために、以下の 2 つの観点から低分子阻害剤に関する相互作用解析を行った。

##### ① 低分子リガンドの物理化学的特性

低分子においては、モデル蛋白質と低分子薬剤について、その相互作用に関する物理化学的解析を行った。パーキンソン病に関連する脳内蛋白質 DJ-1 に対する阻害剤探索では、フラグメント化合物が DJ-1 の基質ポケットにエンタルピー駆動型で結合することができることを明らかにし、その熱力学的特徴や速度論的特徴を議論することにより、nM オーダーの阻害活性を示す化合物が得られることを示した (ACS Chem Biol. 13(9). 2783-2793, 2018)。低分子化合物のエンタルピー駆動型は、標的蛋白質に対する特異性を担保できる有効な指標であることを先の研究 (基盤 A) で明らかにしたが、本研究においても天然物化合物に対しても同様の知見を得ることができ、熱力学パラメータの阻害剤探索における有効性と汎用性が示された (PLoS One. 13(10). e0204856, 2018)

ミトコンドリア病に関連する新規な標的蛋白質に対して、新規低分子薬剤との物理化学的な相互作用解析も実施した。その結果、薬剤は弱いながらも (解離定数  $\mu\text{M}$  オーダー) *in vitro* にて結合していることが明らかとなった (J Am Soc Nephrol. 2016, 27, 1925)。この成果は、物理化学的解析による評価方法が、低親和性にも関わらず細胞以内で阻害活性を示す薬剤の、標的分子に対する活性の質を担保する有用なツールであることを示している。

さらに膜蛋白質 GPCR に対するリガンドとの相互作用を、物理化学的解析技術を駆使して精密に解析した。その結果、リガンド結合の親和性や速度論が、膜蛋白質の物性と密接に関与していることを明らかとなった (Biochemistry. 58. 504-508, 2019)。特に蛋白質にダイナミクスが物理化学的アプローチから解明できたことは、PPI 制御における重要な知見の 1 つになりうる。

##### ② PPI のプロセスを制御する低分子の阻害メカニズム

がん関連蛋白質 P-cadherin に対する低分子阻害剤の取得において、その PPI のプロセスを制御できるかどうかを試みた (Chem. Commun. 54. 5350-5353, 2018)。その結果、P-cadherin の X ダイマーと呼ばれる中間体構造形成をある低分子化合物が阻害している可能性が強く示唆された。

#### (3) VHH 抗体から低分子へ

P-cadherin に対するホモダイマー形成の阻害を抗体である scFv と低分子であるフラグメント化合物で達成できたことにより、PPI 制御に関する抗体と低分子の知見を同等に得ることは、合理的な PPI 制御剤の探索と設計戦略において有効な指針を与えると考えられる。そこで本研究では、抗体と低分子を橋渡しするシングルドメイン抗体 VHH に着目して、PPI を阻害する VHH や低分子化合物を取得し、そこから有効な制御剤設計ができるのではないかと考え、様々な標的 PPI に対する抗体や低分子阻害剤の取得を試みた。その結果、VHH の可変領域に関する相互作用様式から低分子化に関する有力な知見を得ることができた。

以上の成果は、標的分子の構造物性に関する精査を基にした、点結合、面結合等相互作用様式の最適化の重要性を示すものであり、近年注目されている創薬モダリティ開発研究につながる重要な基盤技術と知見を包含している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 5 件)

[1] Kudo S, Caaveiro JMM, Tsumoto K\*. Adhesive Dimerization of Human P-Cadherin Catalyzed by a Chaperone-like Mechanism. Structure. 2016, 24(9), 1523-1536. doi: 10.1016/j.str.2016.07.002. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212616301861?via%3Dihub>

[2] Kudo S, Caaveiro JMM, Nagatoishi S, Miyafusa T, Matsuura T, Sudou Y, Tsumoto K\*. Disruption of cell adhesion by an antibody targeting the cell-adhesive intermediate (X-dimer) of human P-cadherin. Sci Rep. 2017, 7, 39518. doi: 10.1038/srep39518. <https://www.nature.com/articles/srep39518>

[3] Tashima T, Nagatoishi S, Caaveiro JMM, Nakakido M, Sagara H, Kusano-Arai O, Iwanari H,

Mimuro H, Hamakubo T, Ohnuma SI, Tsumoto K\*. Molecular basis for governing the morphology of type-I collagen fibrils by Osteomodulin. *Commun Biol.* 1, 2018, 33. doi: 10.1038/s42003-018-0038-2. <https://www.nature.com/articles/s42003-018-0038-2>

[4] Nagatoishi S, Yamaguchi S, Katoh E, Kajita K, Yokotagawa T, Kanai S, Furuya T, Tsumoto K\*. A combination of 19F NMR and surface plasmon resonance for site-specific hit selection and validation of fragment molecules that bind to the ATP-binding site of a kinase. *Bioorg Med Chem.* 26(8), 1929-1938, 2018 doi: 10.1016/j.bmc.2018.02.041. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089617323349?via%3Dihub>

[5] Senoo A, Nagatoishi S, Moberg A, Nygren B L, Mitani T, Tashima T, Kudo S, Tsumoto K\*. Inhibition of homophilic dimerization and disruption of cell adhesion by P-cadherin-specific small molecules from SPR-based assays. *Chem. Commun.* 54, 5350-5353, 2018. doi: 10.1039/c8cc01964a. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/CC/C8CC01964A>

[6] Kawade R, Akiba H, Entzminger K, Maruyama T, Okumura CJ, Tsumoto K\*. Roles of the disulfide bond between the variable and the constant domains of rabbit immunoglobulin kappa chains in thermal stability and affinity. *Protein Eng Des Sel.* 31(7-8), 243-247, 2018. doi: 10.1093/protein/gzy008. <https://academic.oup.com/peds/article/31/7-8/243/5025588>

[7] Miyanabe K, Yamashita T, Abe Y, Akiba H, Takamatsu Y, Nakakido M, Hamakubo T, Ueda T, Caaveiro JMM, Tsumoto K\*. Tyrosine Sulfation Restricts the Conformational Ensemble of a Flexible Peptide, Strengthening the Binding Affinity for an Antibody. *Biochemistry.* 57(28), 4177-4185, 2018. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00592. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.8b00592>

[8] Tashiro S, Caaveiro JMM, Nakakido M, Tanabe A, Nagatoishi S, Tamura Y, Matsuda N, Liu D, Hoang QQ, Tsumoto K\*. Discovery and Optimization of Inhibitors of the Parkinson's Disease Associated Protein DJ-1. *ACS Chem Biol.* 13(9), 2783-2793, 2018. doi: 10.1021/acscchembio.8b00701. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.8b00701>

[9] Takahashi T, Nagatoishi S, Kuroda D, Tsumoto K\*. Thermodynamic and computational analyses reveal the functional roles of the galloyl group of tea catechins in molecular recognition. *PLoS One.* 13(10), e0204856, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0204856. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0204856>

[10] Kuroda D, Tsumoto K\*. Antibody Affinity Maturation by Computational Design. *Methods Mol Biol.* 1827, 15-34, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-8648-4\_2. [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-8648-4\\_2](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-8648-4_2)

[11] Yoshida K, Nagatoishi S, Kuroda D, Suzuki N, Murata T, Tsumoto K\*. Phospholipid Membrane Fluidity Alters Ligand Binding Activity of a G Protein-Coupled Receptor by Shifting the Conformational Equilibrium. *Biochemistry.* 58, 504-508, 2019. doi: 10.1021/acs.biochem.8b01194. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.8b01194>

[12] Yamashita T, Mizohata E, Nagatoishi S, Watanabe T, Nakakido M, Iwanari H, Mochizuki Y, Nakayama T, Kado Y, Yokota Y, Matsumura H, Kawamura T, Kodama T, Hamakubo T, Inoue T, Fujitani H, Tsumoto K\*. Affinity Improvement of a Cancer-Targeted Antibody through Alanine-Induced Adjustment of Antigen-Antibody Interface. *Structure.* 27, 519-527, 2019. doi: 10.1016/j.str.2018.11.002. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212618304210?via%3Dihub>

[13] Yoshida K, Kuroda D, Kiyoshi M, Nakakido M, Nagatoishi S, Soga S, Shirai H, Tsumoto K\*. Exploring designability of electrostatic complementarity at an antigen-antibody interface directed by mutagenesis, biophysical analysis, and molecular dynamics simulations. *Sci. Rep.* 9, 4482, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-40461-5. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-40461-5>

他 4 2 件

〔学会発表〕 (計 1 3 5 件)

[1] 津本浩平, Recent progress the analytical solutions for bio-pharmaceutics, APPA2017, 2017年7月12日

[2] Kouhei Tsumoto, Recent Analytical Solutions for Bio-pharmaceutical Practice, PITCON 2018, 2018年3月28日

[3] 津本浩平, 長門石曉, 蛋白質相互作用の物理化学解析に基づくリガンドスクリーニング, 日本化学会 / 日本化学会第98春季年会(2018) 中長期企画講演, 2017年3月20日

[4] 津本浩平, 長門石曉, 蛋白質相互作用の熱力学解析と創薬. 日本ケミカルバイオロジー学会 / 日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会, 2017年6月7-9日

[5] 長門石曉, Caaveiro Jose, 津本浩平, 熱分析から低分子薬剤の探索・設計に挑む, 九州分析化学若手の会、日本分析化学会九州支部 / 第30回九州分析化学若手の会 春の講演会, 2017年5月13日

[6] Kouhei Tsumoto, Recent analytical approach for evaluating protein formulation in biopharmaceuticals, PITCON2019, 2019年3月7日

[7] 津本浩平, 蛋白質相互作用解析と次世代創薬への期待, 生物工学会バイオ計測研究会 第1回シンポジウム, 2018年9月8日

他 128件

〔図書〕(計19件)

[1] 秋葉宏樹, 津本浩平, 抗体の小分子化とドラッグデリバリーへの展開, バイオインダストリー, Vol. 33, No. 2, p. 47-53 (シーエムシー出版) (2016)

[2] 長門石曉, 津本浩平, 低分子薬剤開発に活かされる熱量測定の前線, 熱測定、熱測定学会, 44(4): 2017.

[3] 津本浩平, 長門石曉, 本発次世代創薬のための化学: 抗体医薬品開発の現状と展望, 化学と工業, Vol. 70, No. 1 (日本化学会) (2017)

[4] 長門石曉, 津本浩平, 物理化学的解析技術を利用したリガンドスクリーニング, バイオサイエンスとインダストリー、バイオインダストリー協会, 75(1): 2017

[5] 長門石曉, 津本浩平(分担執筆), 医療応用のための物理化学 CSJ カレントビュー 医療・診断・創薬の化学, 化学同人, 2017.

[6] 長門石曉, 津本浩平(分担執筆), 8章 酵素 生体分子化学, 講談社, 2017.

[7] 中木戸誠, 津本浩平, 神経難病と抗体医薬による分子標的治療, 医薬ジャーナル 2018年7月号 Vol. 54, No. 7 (医薬ジャーナル社) (2018)

[8] 黒田大祐, 津本浩平, コンピュータ技術による抗体分子設計, 実験医学 2018年7月 Vol. 36, No. 11 (羊土社) (2018)

[9] 長門石曉, 津本浩平, タンパク質相互作用の創薬—物理化学を介して, 生体の科学, Vol. 69, No. 4, 349-353 (医学書院) (2018)

[10] Jose M. M. Caaveiro, 津本浩平, 黄色ブドウ球菌の鉄取り込み機構: Isd システム, 生化学, 90(3), 279-289 (日本生化学会) (2018)

[11] 長門石曉, 中木戸誠, 津本浩平, 材料創製を指向したタンパク質相互作用解析, 高分子, 68巻3月号, 126-127 (高分子学会) (2019)

他 8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

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/>

プレスリリース 2018.02.14

分子標的治療薬に対するがんの新しい薬剤耐性メカニズムを発見 RET 融合遺伝子上に生じるアロステリック効果を持つ二次変異：東京大学医科学研究所 長門石暁特任准教授、バイオエンジニアリング専攻 津本浩平教授ら

[https://www.t.u-tokyo.ac.jp/foe/press/setnws\\_201802141404181716288876.html](https://www.t.u-tokyo.ac.jp/foe/press/setnws_201802141404181716288876.html)

プレスリリース 2019.01.08

抗体医薬品設計の新しい戦略！～役立たずの“アラニン”が抗体の力を強くする～：バイオエンジニアリング専攻 津本浩平教授ら

プレスリリース 2019.02.21

セリン代謝酵素の働きをモニタリングするセンサー分子を開発 -新規の抗マalaria薬、抗がん剤候補化合物のスクリーニングへ-：化学生命工学専攻 野中 洋講師、山東 信介教授ら

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：カアベイロ ホセ

ローマ字氏名：CAAVEIRO Jose

所属研究機関名：九州大学

部局名：薬学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00536732

研究分担者氏名：長門石 暁

ローマ字氏名：NAGATOISHI Satoru

所属研究機関名：東京大学

部局名：医科学研究所

職名：特任准教授

研究者番号（8桁）：30550248

### (2) 研究協力者

該当者なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。