

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05361

研究課題名(和文) 水素-重水素交換反応を利用した共有結合型リガンドの評価法の開発研究

研究課題名(英文) A study of covalent modifier evaluation method using HDX

研究代表者

伊藤 俊将 (Itoh, Toshimasa)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80536110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品はタンパク質に結合しその振る舞いを変えることで薬効を示す。一般的な医薬品と結合相手のタンパク質の結合様式は可逆的であるが、一部の医薬品は共有結合を通して不可逆的な結合特性をもっている。代表的なものにアスピリンやペニシリンなどがあり、重要な薬も少なくない。共有結合性医薬品の開発はスクリーニングの制限のため難しかったが、本研究成果は水素-重水素交換反応を利用したタンパク質のゆらぎの変化に着目することで共有結合性を有する候補化合物の抽出に関する簡易的な手法を提案するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子のタンパク質と乖離しない性質をもつ共有結合型の医薬品には、多くの重要な治療薬が存在する。しかし、これらは偶然の産物であり、意図して共有結合型として開発されたわけではない。今回の成果は共有結合する化合物に対し、タンパク質の振る舞いを変えられるかどうかを一般的な質量分析を用い簡便に評価できるものであり、積極的な共有結合型医薬品の開発に貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Drugs bind to proteins and change their behaviour to produce a drug effect. The binding mode between a typical drug and its binding partner protein is reversible, but some drugs have irreversible binding properties through covalent bonds. Typical examples include aspirin and penicillin, and many important drugs. The development of covalent drugs has been difficult due to screening limitations, but this study proposes a simple method for extracting covalent candidate compounds by focusing on changes in protein fluctuations using hydrogen-deuterium exchange MS.

研究分野：医薬品化学

キーワード：水素-重水素交換反応 共有結合 医薬品開発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品の一つの結合様式に共有結合型がある。これは、高分子であるタンパク質や DNA などと共有結合を形成することで、それら標的分子の振る舞いを変えることで、薬理作用を発揮するものである。共有結合性医薬品はアスピリンやペニシリン、プロトンポンプ阻害薬など重要な医薬品が含まれている。これら共有結合性医薬品は医薬品の創製後に共有結合型と判明したものがその多くを占めている。共有結合性医薬品の切れ味が最近になって見直され、共有結合を狙った医薬品が登場してきた。例えば分子標的薬のゲフィチニブに対し、タンパク質のアミノ酸残基の側鎖と共役付加反応にて共有結合をするモチーフを導入し共有結合型にしたアフマチニブが挙げられる。創薬は標的タンパク質に対するスクリーニングが主流であるが、スクリーニングではあらかじめ共有結合性の化合物は除外される。理由の一つに非特異的結合により擬陽性を示してしまう確率が上昇してしまうためである。これまでに共有結合性分子の評価に関しては非特異的結合かヒットかを簡便に見つける手法はなかった。もし、簡便に共有結合型分子の共有結合を調べることができれば、共有結合性医薬品創製が行いやすくなるという背景が本課題にある。

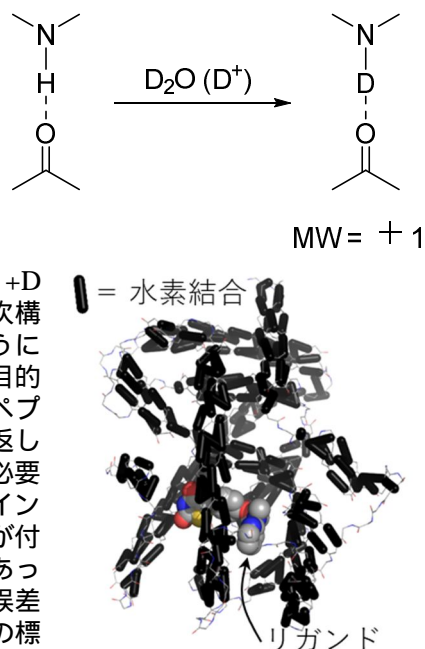
2. 研究の目的

標的タンパク質への低分子の共有結合の評価に関しては、質量分析が大きな役割を担っており、タンパク質と低分子を反応させ、前後の質量差から、共有結合しているかどうかを判断する。しかし結合部位の特定はその質量差からはわからない。Structure-Based Drug Design (SBDD) のためには、結合残基の決定が重要である。そのためには種々のアミノ酸残基を変異し、質量分析にてリガンド分の質量変化を評価する。あるいは、既に知られている強力なリガンド存在下、質量分析を行うことで、共有結合が阻害されるかどうかを結合サイトの判断材料とするなどがある。いずれも、推測の域を出ないものであり、最終的には消化実験によりペプチド断片にし、LC-MS/MS を行うか、X-線結晶構造解析を行い結合部位の特定を行うことが精密な設計に重要になる。

目指している手法は、SBDD の前段階の Fragment-Based Drug Design (FBDD) に貢献できる評価法である。SBDD のように精密な解析ではなく、化合物とタンパク質の共有結合を確認した後、それが意味のある結合なのかどうかを判定し、ヒット化合物を絞りやすくすることを目的とする。タンパク質と低分子の共有結合形成は質量差で判定できるが、その結合の結果が複合体全体の熱力学的な恩恵を与えているかはわからない。非特異的結合が少ないと考えられるリガンドは、最初にタンパク質の不安定な場所に入り込み、次いで互いに安定な配座を取った時、互いの反応点が無理なく接近し共有結合形成反応が進行する化合物である。理由は第一段階として熱力学的支配を受けているからである。反対に速度論支配による結合の場合、タンパク質表面等で、ランダムに反応が進行するため安定化が起こらない、すなわち非特異的結合となる。本研究では水素-重水素交換反応を利用したタンパク質のゆらぎの検出を利用して、熱力学的関与を見定め、共有結合性化合物群からヒット化合物を見出す手法の提案を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

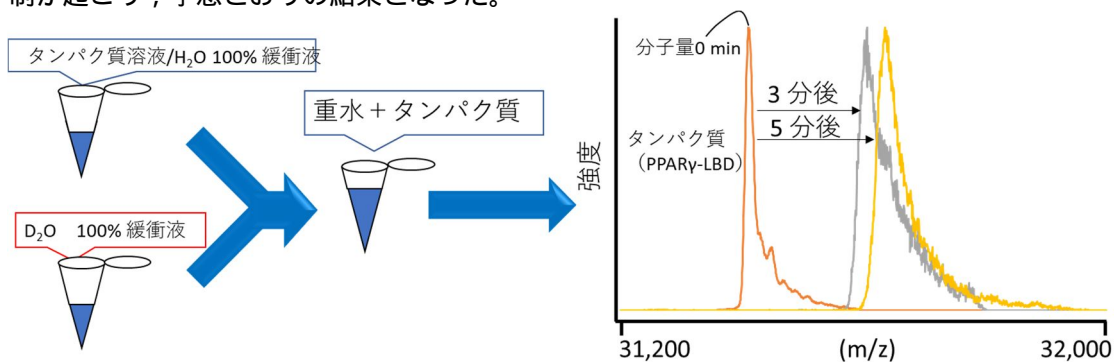
水素-重水素交換反応の原理：水素-重水素交換反応 (H-D exchange, HDX) は構造生物学的研究において 2 次構造のゆらぎの検出に適用される実験手法である。2 次構造のうち α -ヘリックス、 β -ストランドの構成因子の一つに水素結合がある。X-線結晶構造では静止しているように見えるが、水溶液中ではゆらいでいて、水素結合には水中の $+H$ と置き換わる平衡反応が存在する。水素結合を形成している原子のゆらぎが大きければ大きいほど、 $+H$ の交換が進行しやすいことになる。ここで重水 (D_2O) を添加すると、 $+D$ への置換反応が進行する (図) ため、質量差を用いて各 2 次構造に対するゆらぎの程度を知ることができる。このように HDX は、タンパク質の部分構造の安定性を比較することを目的として検討がなされるため、タンパク質の消化実験によりペプチドの断片化を行う必要から、煩雑かつ精密な実験の繰り返しが必要がある。一方、本反応をタンパク質の断片化を行わずドメインのまま行えば、誰にでもできる簡素な実験となることに気が付いた。近年の技術革新のため、一般的な ESI 質量分析機であっても、質量が数万のタンパク質であれ、1 炭素原子以下の誤差で平均質量の検出が可能になった。図は 2 型糖尿病治療薬の標的タンパク質の (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)



PPAR である。骨格のアミド(ライン)と水素結合(黒)を示しており、300 近く存在する骨格アミドのほとんどが水素結合を形成している。仮に 100 の +H が +D に置き変われば質量が 100 増加するため、質量の増加を容易に検出することができる。ここで、タンパク質に親和性のある低分子が入ると、ゆらぎが抑えられる。これにより、H D の置換が抑制される。本研究のポイントはリガンドによる安定化の大きさに応じて D 化(質量の増加)が抑制される原理を利用し、経時的な質量変化を比較することにある。

4. 研究成果

(1) 予備実験として PPAR に重水素添加後、質量の経時変化を測定したところ、時間と共にタンパク質量が増加した(図)。次いで、この増大の速さとリガンドの性質に相関関係があるかどうか検討した。その結果、すべてのリガンドで D₂O 添加による PPAR 質量の増大が抑制され、リガンドの分子量が大きいほどその効果が顕著であることが判明した。また、測定溶媒の pH を低くすると、タンパク質の質量増加は抑制し、さらに測定溶媒の粘度を上げて質量増加の抑制が起こり、予想どおりの結果となった。



(2) 上記結果をもとに購入可能な共有結合モチーフを有するフラグメント候補化合物 14 種類と PPAR の共有結合実験を行った。その結果、6 種類の化合物が PPAR と共有結合することがわかった。この 5 種類に関して、共有結合実験を行ったところ、2 種類の化合物が PPAR の質量増加を抑制したことから、PPAR のゆらぎを抑制した。ヒットとみなせる化合物を得ることができた。タンパク質の安定性は CD スペクトルを用いた熱変性実験やグアニジン変性実験でも確認することは可能であるが、温度や変性剤の条件が生体内の条件と乖離している。一方、本法はより生体内と近い条件にて測定が可能であることを示している。このような特色を有する本法により 14 種類の中から 2 種類の化合物をヒット化合物として得ることができた。これらは PPAR の共有結合型医薬品開発のフラグメントとして活用できる可能性がある。

(3) 本法を他の核内受容体に適用可能かどうか検証する目的で hepatocyte nuclear factor 4 alpha を標的分子として検討を行った。最初に非共有結合型のリガンドとして、ミリスチン酸を用いて本法を検証したところ、タンパク質の質量増加が抑制され、適用可能であることが判明した。次に共有結合モチーフを有する化合物の共有結合性に関するスクリーニングを行った。その結果、タンパク質と共有結合できたのは 2 種類であった。その 2 種類の化合物を共有結合させ、水素-重水素交換反応を検証したところ、両者ともアポ型より、不安定化することが判明した。従って、その 2 種は速度論支配の反応により共有結合した化合物であると考えられた。

以上の結果から、共有結合により安定化する化合物と不安定化する化合物の判別が本法により可能であることが示された。本法は共有結合型の医薬品創製に貢献できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島拓之、柳諒太、下平智之、樋口愛理、吉澤麻美、石田寛明、山本恵子、伊藤俊将
2. 発表標題 タンパク質のゆらぎに着目した共有結合型化合物のスクリーニング法の提案
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------