

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590043  
 研究課題名（和文） *In silico*創薬技術を用いた新規キチナーゼ阻害剤の分子設計  
 研究課題名（英文） Computer-aided rational molecular design of novel chitinase inhibitor  
 研究代表者  
 合田 浩明（GOUDA HIROAKI）  
 北里大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：60276160

研究成果の概要：キチナーゼ阻害剤には、抗真菌薬、殺虫剤および喘息治療薬としての可能性がある。そこで、我々は、環状ペプチド性キチナーゼ阻害剤、Argadin、と霊菌のキチナーゼBの複合体X線結晶構造に基づいた *in silico* 創薬研究を行った。その結果、Argadin のペプチド性環状骨格を 14 員環マクロライド骨格で分子変換することで、新規な非ペプチド性キチナーゼ阻害剤が得られる可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：キチナーゼ、阻害剤、ドッキング計算、分子動力学、結合自由エネルギー

## 1. 研究開始当初の背景

キチナーゼはキチンの加水分解を触媒する酵素で、霊菌、真菌、昆虫類からヒト（哺乳類）まで幅広く分布している。このキチナーゼの活性を阻害する化合物（キチナーゼ阻害剤）には、以下のような薬物としての可能性がある。

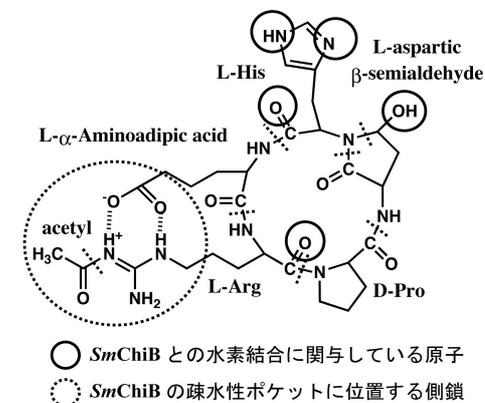
(1) 抗真菌薬、殺虫剤：キチナーゼの基質であるキチンは真菌および昆虫類の主要な構造多糖である。それ故、キチナーゼは真菌や昆虫類の生命活動に必須の酵素となっている。実際に、口腔ガンジダ症の原因となる真菌について、そのキチナーゼを阻害するこ

とで病原性を持つ糸状形への形態変換を抑制できることが示されている(*J. Antibiot.* 1996, 49, 829)。

(2) 喘息治療薬：マウス喘息疾患モデルにおいて、肺に酸性キチナーゼが大量発現していること、酸性キチナーゼを阻害することで喘息炎症反応を抑制できることが報告された(*Science* 2004, 304, 1678)。ヒト喘息患者においても、酸性キチナーゼが肺に大量発現していることが確認されている。

しかしながら、これまで、実用的なキチナーゼ阻害剤は得られていない。このような背景の中、北里生命科学研究所において、キチナー

ゼの活性を競合的に阻害する環状ペプチド性化合物 Argadin (*Chem. Pharm. Bull.* 2000, 48, 1442、図 1) が発見された。Argadin はさまざまなキチナーゼに対して nM オーダーの強い阻害活性を示す (図 1)。したがって、新規な薬物開発のためのリード化合物と言える。



キチナーゼ	Argadin の阻害活性
ヒツジキンバエ ( <i>Lucilia cuprina</i> ) 粗精製キチナーゼ群	IC <sub>50</sub> = 3.4 nM
霊菌 ( <i>Serratia Marcescens</i> ) キチナーゼ B (SmChiB)	K <sub>i</sub> = 20 nM
ヒト ( <i>Homo sapiens</i> ) キチナーゼ 1	IC <sub>50</sub> = 13 nM

図 1 : Argadin の化学構造と阻害活性 SmChiB との相互作用に重要な原子団を実線および破線の丸印で示す。

また、2002 年になって、霊菌 *Serratia marcescens* 由来のキチナーゼ B (SmChiB) との複合体構造が X 線結晶解析により決定された (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99, 9127)。これにより、Argadin は次の様な相互作用様式で SmChiB に結合することがわかった (図 1)。

- Argadin の L-His のイミダゾール環の 2 つの窒素原子と主鎖環状骨格にある 3 つの酸素原子が SmChiB との水素結合に関与している。
- Argadin の L-α-Amino adipic acid と L-Arg が分子内水素結合を形成することで自身の疎水性を高め、あたかも芳香環の様に振る舞って、SmChiB の疎水ポケットに位置している。

## 2. 研究の目的

Argadin はキチナーゼに対して非常に強い阻害活性を示す。しかし、その環状構造はペプチド性であるので、薬として考えた場合、経口投与等には適さない化合物であると言える。そこで、その主鎖ペプチド骨格を安定な他の化合物に代替することで、より実用的な薬物にすることができるとはならないかと考えた。本研究では、その代替化合物として、14 員環マクロライドである

8, 9-anhydroerythromycin A 6, 9- hemiketal (EM201、図 2) を用いることにした。それは、マクロライド系の抗生物質が薬物分子としてよく用いられていること (drug like) に加え、構造上の理由として以下の 2 つが挙げられる。

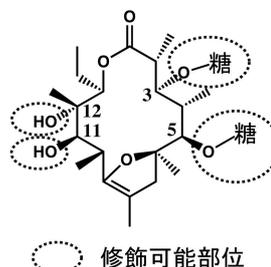


図 2 : EM201 環状骨格

(1) EM201 環状骨格の大きさが Argadin の主鎖環状骨格と同程度であり、キチナーゼと相互作用するための酸素原子がその環状骨格に存在しているため。

(2) Argadin-SmChiB 複合体の相互作用様式において重要な官能基 (イミダゾール環および L-α-amino adipic acid と L-Arg に対応する芳香環) を修飾可能部位に付加できるため。以上のことから、本研究の目的は、*in silico* 創薬技術を用いて EM201 環状骨格を母核とした新規な非ペプチド性キチナーゼ阻害剤を分子設計することである。

## 3. 研究の方法

新規な非ペプチド性キチナーゼ阻害剤を分子設計するため、次の解析を行った。

(1) Argadin 結合配座と EM201 環状骨格のアライメント

まず、自動配座解析プログラム CAMDAS (*J. Comput. -Aided Mol. Des.* 1997, 11, 305) により、EM201 環状骨格の立体配座集団を生成した。続いて、得られた配座集団と Argadin 結合配座との重ね合わせ計算を、官能基特性に基づく分子重ね合わせプログラム SUPERPOSE (*J. Comput. -Aided Mol. Des.* 1999, 13, 499) を用いて行った。SUPERPOSE は、特性球 (疎水性特性球と水素結合性特性球) を用いて分子を表現し、2 つの化合物の配座間で、同性質の特性球が最も良く重なるようにアライメントを行うプログラムである。最後に、得られた多数のアライメントの中から、次の 2 つの条件を同時に満足するアライメントを抽出した。

条件 1 : SmChiB と水素結合を形成している Argadin 酸素原子 (図 1) に配置された水素結合性特性球が 3 つとも、EM201 環状骨格におかれた同性質の特性球と重なっている。

条件 2 : EM201 の修飾可能部位の 1 つが Argadin の L-His の近傍に位置しており、さ

らに別の修飾可能部位が、L-Arg あるいは L- $\alpha$ -Amino adipic acid の近傍に位置する。

(2) EM201 環状骨格の修飾基導入に際しての検討

(1) の解析結果を基に、EM201 環状骨格の結合配座候補の修飾可能部位に、スペーサーの長さを変えたイミダゾール環、および種々の芳香環を付加した分子をそれぞれコンピュータ上で設計し、SmChiB の Argadin 結合部位に対するドッキング計算を行った。この計算には、ドッキングプログラム FlexX (SYBYL6.9 Tripos 社) を用いた。そして、得られた多数のドッキングモデルを解析し、EM201 環状骨格とイミダゾール環とを繋ぐ最適なスペーサーの長さ、そして付加すべき最適な芳香環についての検討を行い、最終候補化合物をデザインした。

(3) 最終候補化合物の SmChiB への結合親和性に関する検討

(2) の解析の結果得られた最終候補化合物の SmChiB への結合親和性について検討するため、水溶液中での最終候補化合物-SmChiB 複合体の分子動力学 (MD) シミュレーション (プログラム AMBER7 を使用) および MM-PBSA 法 (Acc. Chem. Res. 2000, 33, 889) による結合自由エネルギー計算を行った。

#### 4. 研究成果

(1) CAMDAS および SUPERPOSE により、最終的に選択されたアライメントを図 3 に示す。

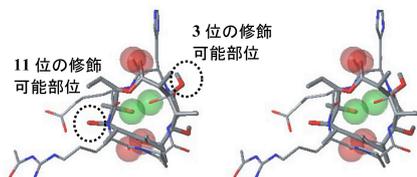


図 3 : Argadin の結合配座 (細線) と EM201 環状骨格の結合配座候補 (太線) のアライメント

EM201 環状骨格の酸素原子が、SmChiB と水素結合している Argadin 主鎖環状骨格の酸素原子 (図 1) と同じ空間的配置をとっていることがわかる。これにより、EM201 環状骨格のキチナーゼ結合配座候補が得られたことになる。この結合配座候補は、次に行うドッキング計算において保持された。また、新規化合物の分子設計では、EM201 の 3 位にイミダゾール環、11 位に芳香環を付加すればよいことがわかった。

(2) ドッキング計算の結果、EM201 環状骨格の 3 位にはメチレンを 3 つ介したイミダゾール環を、11 位には 3-phenanthryl 基を付加すれば良いということがわかり、図 4 で示すような新規非ペプチド性キチナーゼ阻害剤の最終候補化合物がデザインされた。図 5A にドッキング計算で得られた最終候補化合物と SmChiB の相互作用様式を示す。これより、

最終候補化合物は、Argadin-SmChiB 相互作用様式 (図 1 および図 5B) をよく模倣できることがわかる。

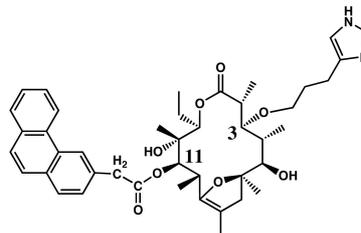


図 4 : 最終候補化合物

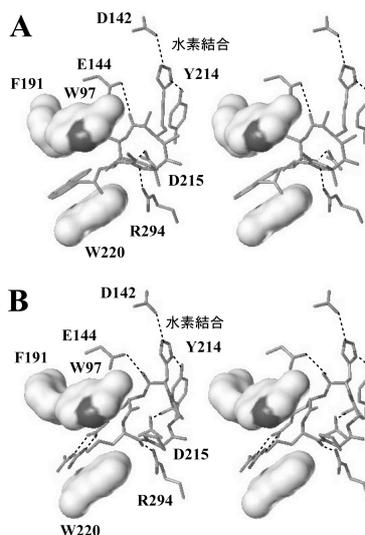


図 5 : ドッキング計算で得られた最終化合物-SmChiB 相互作用様式 (A)、X 線結晶構造で観察される Argadin-SmChiB 相互作用様式 (B)

(3) 水溶液中での MD シミュレーションの間、最終候補化合物-SmChiB 複合体の分子間相互作用 (図 5A) は安定に保たれていた。また、最終候補化合物について MM-PBSA 法により予測された結合自由エネルギー値は、-11.53kcal/mol となり、同条件で算出された Argadin についての値、-11.16kcal/mol ( $K_d$  値から見積もられる実験値、-10.92 kcal/mol、を良く再現している) に匹敵するものであった。従って、最終的にデザインされた最終候補化合物は、実際に Argadin に匹敵する結合親和性で SmChiB に結合すると期待される。

#### 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 10 件)

- ① Gouda H, Sunazuka T, Iguchi K, Sugawara A, Hirose T, Noguchi Y, Saito Y, Yanai Y, Yamamoto T, Watanabe T,

- Shiomi K, Ōmura S, Hirono S. Computer-aided rational molecular design of argifin-derivatives with increased inhibitory activity against chitinase B from *Serratia marcescens*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009 19(10) 2630-2633. 査読有り
- ② Yasuo K, Yamaotsu N, Gouda H, Tsujishita H, Hirono S. Structure-Based CoMFA As a Predictive Model-CYP2C9 Inhibitors As a Test Case. *J. Chem. Inf. Model.* 2009 49(4) 853-864. 査読有り
- ③ Nagase H, Osa Y, Nemoto T, Fujii H, Imai M, Nakamura T, Kanemasa T, Kato A, Gouda H, Hirono S. Design and synthesis of novel delta opioid receptor agonists and their pharmacologies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009 19(10) 2792-2795. 査読有り
- ④ Iwatsuki M, Koizumi Y, Gouda H, Hirono S, Tomoda H, Ōmura S. Lys17 in the 'lasso' peptide lariatin A is responsible for anti-mycobacterial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009 19(10) 2888-2890. 査読有り
- ⑤ Sunazuka T, Sugawara A, Iguchi K, Hirose T, Nagai K, Noguchi Y, Saito Y, Yamamoto T, Ui H, Gouda H, Shiomi K, Watanabe T, Omura S. Argifin; Efficient Solid Phase Total Synthesis and Evaluation of Analogues of Acyclic Peptide. *Bioorg. Med. Chem.* 2009 17(7) 2751-2758. 査読有り
- ⑥ Shimamura H, Gouda H, Nagai K, Hirose T, Ichioka M, Furuya Y, Kobayashi Y, Hirono S, Sunazuka T, Ōmura S. Structure Determination and Total Synthesis of Botbromycin A2: A Potent Antibiotic against MRSA and VRE. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2009 48 914-917. 査読有り
- ⑦ Fujimoto T, Matsushita Y, Gouda H, Yamaotsu N, Hirono S. In silico multi-filter screening approaches for developing novel  $\beta$ -secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008 18(9) 2771-2775. 査読有り
- ⑧ Gouda H, Yanai Y, Sugawara A, Sunazuka T, Ōmura S, Hirono S. Computational Analysis of the Binding Affinities of the Natural-Product Cyclopentapeptides Argifin and Argadin to Chitinase B from *Serratia marcescens*. *Bioorg. Med. Chem.* 2008 16(7) 3565-3579. 査読有り
- ⑨ 合田浩明, 柳井雄一, 広野修一 MM-PBSA法を用いたキチナーゼ阻害剤 Argadin および Argifin の結合自由エネルギー計 *Pharma VISION NEWS* No. 11(March) 7-11 2008. 査読有り
- ⑩ Villeneuve M, Kawai M, Watanabe M, Aoyagi Y, Hitotsuyanagi Y, Takeya K, Gouda H, Hirono S, Minnikin DE, Nakahara H. Conformational behavior of oxygenated mycobacterial mycolic acids from *Mycobacterium bovis* BCG. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007 1768(7) 1717-26. 査読有り
- [学会発表] (計 7 件)
- ① 合田浩明, 島村寛章, 長井賢一郎, 廣瀬友靖, 小林 豊, 砂塚敏明, 大村智, 広野修一 NMR 測定と高温分子動力学計算を組み合わせた抗生物質 Botbromycin A<sub>2</sub> の絶対構造決定 日本薬学会第 129 年会 (京都) 2009. 3. 27.
- ② 寺嶋真一, 合田浩明, 広野修一 ヒト酸性キチナーゼを標的としたキチナーゼ阻害剤 Argifin の理論的分子構造最適化 第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム (大阪) 2008. 11. 26.
- ③ 合田浩明, 井口加奈美, 菅原章公, 山本剛, 廣瀬友靖, 塩見和朗, 砂塚敏明, 大村智, 広野修一 NMR および計算化学手法を用いたキチナーゼ B と Argifin 由来ジペプチド阻害剤の相互作用解析 第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム (大阪) 2008. 11. 26.
- ④ 合田浩明, 広野修一 In silico 創薬技術を用いたキチナーゼ阻害剤 Argifin の分子構造最適化 日本薬学会第 128 年会 (横浜) 2008. 3. 28.
- ⑤ 合田浩明, 広野修一 In silico 創薬技術を用いた新規キチナーゼ阻害剤の論理的分子設計 北里大学薬学部公開シンポジウム (ハイテクリサーチ・シンポジウム) 創薬シーズ-発見から応用へ (東京) 2008. 2. 22.
- ⑥ 合田浩明, 広野修一 キチナーゼ B に対するペプチド性阻害剤 Argifin の相互作用解析とその誘導体の論理的分子設計 第 35 回構造活性相関シンポジウム (京都) 2007. 11. 16.
- ⑦ Satoh H, Koshimizu I, Yoshimi H, Watanabe T, Yaguchi S, Matsuno T, Gouda H, Yamori T, Hirono S. In silico analysis of interaction between PI3K and its potent inhibitor ZSTK474. 6th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (Istanbul, Turkey) 2007. 7. 08-11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合田 浩明 (GOUDA HIROAKI)  
北里大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60276160

(2) 研究分担者

広野 修一 (HIRONO SHUICHI)  
北里大学・薬学部・教授  
研究者番号：30146328  
山乙 教之 (YAMAOTSU NORIYUKI)  
北里大学・薬学部・助教  
研究者番号：60230322  
中込 泉 (NAKAGOME IZUMI)  
北里大学・薬学部・准教授  
研究者番号：30237242

(3) 連携研究者

なし