

令和 5 年 4 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15974

研究課題名（和文）タンパク質表面の隠れたドラッグブルポケットを同定するための新規計算機手法の開発

研究課題名（英文）Development of novel computational method for identification of druggable cryptic pocket on protein surface

研究代表者

小澤 新一郎 (OZAWA, Shin-ichiro)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：20724868

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）：リガンド結合時にはじめて形成される薬物結合ポケット（cryptic pocket）は創薬において重要である。本研究課題では、申請者らの研究室で開発した計算手法であるインシリコ・フラグメントマッピング法を用いて cryptic pocket を同定および構築するための計算条件を検討した。また、複数の創薬標的に対して本手法を適用することにより、実際に阻害活性を有する化合物を同定することに成功した。これにより、cryptic pocket を標的とした新しい創薬手法としてのインシリコ・フラグメントマッピング法の有効性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cryptic pocket は従来の薬物標的より柔軟性の高いアロステリック部位やタンパク質-タンパク質間相互作用界面に対する創薬や機能解析に重要である。これまでに cryptic pocket 探索のための計算手法が複数開発されてきたが、インシリコ・フラグメントマッピング法は従来法とは原理が異なるため、標的ごとの使い分けや適切な手法の組み合わせといった相補的な利用が想定される。これにより、これまでアンドラッグブルと見なされていた高難度標的に対する創薬の加速や、過渡的なポケット形成や準安定構造といった様々な生命現象に関わるタンパク質の動的構造解析への進展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cryptic ligand binding sites, which are not evident in the unliganded structures, are beneficial in tackling with difficult but attractive drug targets. However, cryptic pockets have thus far not been rationally pursued in the early stages of drug development. In this study, we optimized the protocol of our in silico fragment mapping method for discovery of the cryptic pockets, and then successfully identified the lead compounds for the development of the inhibitors for several drug targets. These results demonstrated the utility of our in silico fragment mapping method as a novel computational fragment-based drug design (FBDD) methodology targeting the cryptic pockets.

研究分野：計算科学

キーワード：インシリコ創薬 フラグメントベース創薬 フラグメントマッピング パーチャルスクリーニング ポケット構造予測 cryptic pocket

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

標的タンパク質の立体構造情報に基づく創薬戦略である Structure-based drug design により、薬物結合ポケットの構造や性質を反映した合理的な化合物設計・探索が可能となった。その一方で、結晶構造解析などで得られる立体構造はタンパク質に無数に存在する安定構造のうちの一つに過ぎず、タンパク質表面には官能基やフラグメントが結合可能なサイズのサブポケットが複数隠れている。このようなサブポケットは cryptic pocket (a pocket that is absent in available structures) と呼ばれ、アロステリック部位やタンパク質-タンパク質間相互作用 (PPI) 界面のように一見すると明確なポケット構造を持たない高難易度標的に対する創薬で特に重要な概念となっている。

結晶構造で見えていない cryptic pocket を他の実験手法で同定・可視化するのは容易ではない。そこで、cryptic pocket 同定のための計算機手法が複数開発されてきた。これら手法は分子動力学 (MD) シミュレーションによって多数のタンパク質構造 (およびサブポケット構造) を生成し、その中から cryptic pocket を探索する。しかしながら、大量のサブポケットの中から正しい cryptic pocket を同定するのは容易でない、シミュレーション中に cryptic pocket を生成できているとは限らない、といった問題もある。

これに対して、申請者らはこれまでに、フラグメントが結合可能なサブポケットを既知の構造情報に基づいて探索する知識ベースの計算機手法「インシリコ・フラグメントマッピング法」を開発し、複数の創薬標的の阻害剤探索に成功してきた。これまでは結晶構造ですで見えているサブポケットを主な解析対象としていたが、結晶構造では見えていないサブポケットに対しても本手法を適用できれば、従来法を補完するような新しい原理の cryptic pocket 同定手法を開発できると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、cryptic pocket を同定するための新規計算手法の開発を目的とした。具体的には、インシリコ・フラグメントマッピング法を用いた cryptic pocket 探索法の確立、同定した cryptic pocket の妥当性の検証、および実際の創薬への応用を実施することとした。手法の開発には cryptic pocket 既知の標的を用いるが、将来的には未知の高難易度標的に対する適用例を増やし、本手法を一般的創薬手法として確立することを目指す。

3. 研究の方法

Cryptic pocket 候補部位の同定

リガンド結合に伴って cryptic pocket が形成されるタンパク質について、リガンド非結合型構造に対してインシリコ・フラグメントマッピングを実施した。得られたフラグメント配置をリガンド結合型構造と比較することにより、cryptic pocket の位置を正しく同定できる計算条件を検討した。今回は、リガンド結合型、非結合型いずれの結晶構造も報告されている分子シャペロン Hsp90、血液凝固因子 FVIIa、およびセリンプロテアーゼであるキマーゼといった創薬標的タンパク質を解析対象とした。

候補部位からの cryptic pocket 構築

上記と並行して実施した。予備検討において、エネルギー極小化計算により cryptic pocket を構築する際に、フラグメント座標を拘束せずに計算するとフラグメントの位置のみが大きく変化し cryptic pocket はほとんど開かなかった。そこで本項では、フラグメント初期座標に拘束をかけた上でエネルギー極小化計算を実施した。

創薬における有効性の評価

リガンド結合型構造が未知の高難易度標的の cryptic pocket を予測し、市販化合物データベースを用いたバーチャルスクリーニングを実施した。予測した cryptic pocket を含むリガンド結合ポケットを用いて、フラグメントから構築した 3 次元ファーマコフォアモデルを用いた一次スクリーニング、ドッキング計算による二次スクリーニングという多段階の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

通常のプロトコルでインシリコ・フラグメントマッピングを実施したところ、Hsp90、FVIIa、およびキマーゼいずれのリガンド非結合型構造においても cryptic pocket に相当する部位にフラグメントがマッピングされた (図 1(b) 左下)。次に、フラグメント初期座標に 0.1 kcal/mol の拘束をかけた条件で Schrödinger Suite ソフトウェアの Prime モジュールを用いたエネルギー極小化計算 (MM-GBSA 計算) を実施したところ、リガンド結合型構造と類似した cryptic pocket 構造を構築することに成功した (図 1(c))。図 1 にはキマーゼの例を示した。

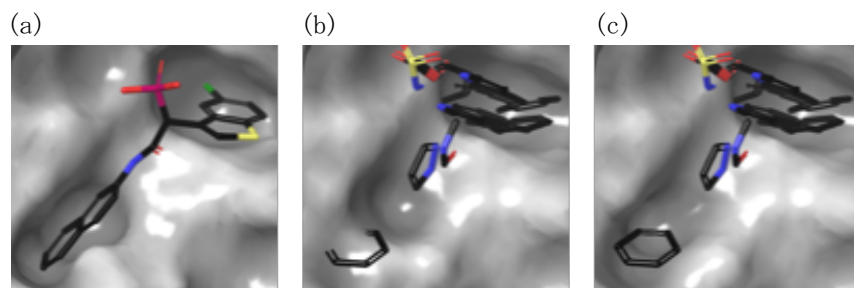


図 1 キマーゼにおける cryptic pocket の構築

- (a) リガンド結合型結晶構造
- (b) リガンド非結合型結晶構造に対するフラグメントマッピング結果
- (c) 左下領域のエネルギー極小化計算結果

次に、実際の創薬への応用を試みた。複数の創薬標的に対する解析を並行して進めたが、ここではがんや自己免疫疾患の治療標的として注目されている転写因子 STAT3 の二量体界面に結合する PPI 阻害剤の探索について報告する。インシリコ・フラグメントマッピングで得られた 13 個の代表フラグメント (図 2(a)) に基づいて構築した 3 次元ファーマコフォアモデルを用いた UNITY Flex Search (SYBYL-X 2.0 ソフトウェア) により、約 500 万個の市販化合物から 4,032 個の有望な化合物が得られた。これらを cryptic pocket を構築した STAT3 結晶構造に対してドッキングし、ドッキングスコアの良好な 15 化合物を選択した (Schrödinger Suite ソフトウェアの Glide モジュール)。インビトロ・アッセイの結果、4 化合物について濃度依存的な STAT3 阻害活性を検出した。また、関節リウマチモデルマウスを用いたインビボ・アッセイの結果、4 化合物中 1 化合物投与下で関節炎の進行が顕著に抑制された (引用文献①)。ヒット化合物の予測結合様式を図 2(b) に示した。

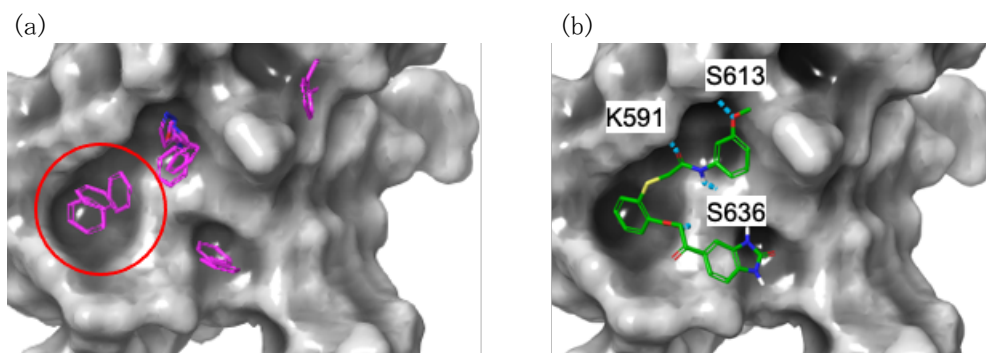


図 2 本手法を用いて同定した STAT3 阻害剤の候補化合物

- (a) フラグメントマッピング結果 (赤丸：構築した cryptic pocket)
- (b) ヒット化合物の予測結合様式

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

Cryptic pocket は従来の薬物標的より柔軟性の高いアロステリック部位やPPI 界面に対する創薬や機能解析に重要である。これまでに cryptic pocket 探索のための計算手法が複数開発されてきたが、インシリコ・フラグメントマッピング法は従来法とは原理が異なるため、標的ごとの使い分けや適切な手法の組み合わせといった相補的な利用が想定される。これにより、これまでアンドラッグابلと見なされていた高難度標的に対する創薬の加速や、過渡的なポケット形成や準安定構造といった様々な生命現象に関わるタンパク質の動的構造解析への進展が期待できる。

(3) 今後の展望

これまでの解析により、複数の創薬標的タンパク質において cryptic pocket の同定および構築に成功した。一方で、各段階での計算条件やプロトコルについては改善の余地がある。はじめに、cryptic pocket 候補部位の選択についてである。キマーゼなどではインシリコ・フラグメントマッピングにおけるスコア最上位のフラグメントを選択することで cryptic pocket 部位を同定できたが、Hsp90 や FVIIa では必ずしもそうではなかった。得られた複数の候補部位の優先順位を決定する方法や条件を検討する必要がある。また、今回は拘束付き MM-GBSA 計算によってポケット構造を構築できたが、フラグメントがタンパク質構造中により深く埋もれている場合は別の計算手法が必要となる。具体的には、タンパク質側鎖の配向を幾何学的に変化させる、主鎖のみで構造最適化した後に側鎖を生やす、などの操作でフラグメントとタンパク質の重なりを解消し、続いて全体のエネルギーを極小化することなどを検討している。

また、今後は本手法で予測した cryptic pocket を従来法の予測結果と比較する必要がある。これにより、cryptic pocket 予測性能の検証、および各手法の長所・短所などの特徴比較を行う。加えて、今後はより多くの標的タンパク質に対して本手法を適用し、標的やりガンド結合部位の種類ごとに適したプロトコル、あるいは標的横断的な統一的プロトコルの確立を目指す。

<引用文献>

- ① Kaneko Y, Ozawa S, Sato Y, Kobayashi T, Matsumoto T, Miyamoto K, Kobayashi S, Harato K, Hirono S, Matsumoto M, Nakamura M, Niki Y, Miyamoto T, The Stat3 inhibitor F0648-0027 is a potential therapeutic against rheumatoid arthritis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2022) 636(Pt 2), 133-140

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneko Yosuke, Ozawa Shin-ichiro, Sato Yuiko, Kobayashi Tami, Matsumoto Tatsuaki, Miyamoto Kana, Kobayashi Shu, Harato Kengo, Hirono Shuichi, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Niki Yasuo, Miyamoto Takeshi	4. 巻 636
2. 論文標題 The Stat3 inhibitor F0648-0027 is a potential therapeutic against rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 133 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.10.106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morishita Ko, Ito Yuma, Otake Kazuya, Takahashi Kenji, Yamamoto Megumi, Kitao Tatsuya, Ozawa Shin-ichiro, Hirono Shuichi, Shirahase Hiroaki	4. 巻 69
2. 論文標題 Synthesis and Evaluation of a Novel Series of 2,7-Substituted-6-tetrazolyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Derivatives as Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Partial Agonists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 333 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤 新一郎、彌田 桃香、佐々木 瑠梨、田中 信忠
2. 発表標題 DPP8阻害剤のフラグメントベースパーチャルスクリーニング
3. 学会等名 第50回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤 新一郎、彌田 桃香、佐々木 瑠梨、田中 信忠
2. 発表標題 インシリコ・フラグメントマッピング法によるDPP8阻害剤の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤 新一郎、北村 祐万、広野 修一、田中 信忠
2. 発表標題 インシリコ・フラグメントマッピング法によるタンパク質-タンパク質間相互作用阻害剤の探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大岩 瑞季、小澤 新一郎、田中 信忠
2. 発表標題 インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼのサブユニット間相互作用阻害剤のバーチャルスクリーニング
3. 学会等名 第49回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 谷口敦彦、伊藤進也、永田和宏、小澤新一郎、大上雅史、寺島健仁、岡田至、富澤元博	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 78
3. 書名 月刊ファインケミカル	

〔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
---------	---------