

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590046

研究課題名（和文） 計算創薬技術を用いたマクロライド骨格を持つ新規キチナーゼ阻害剤の構造最適化

研究課題名（英文） Optimization of chitinase inhibitor with macrolide scaffold based on *in silico* drug discovery techniques

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（和文）：天然由来のキチナーゼ阻害剤 argifin の環状ペプチド骨格をマクロライド骨格で置換することで得られた新規キチナーゼ阻害剤と霊菌由来のキチナーゼ B の結合様式を、分子動力学シミュレーション、分子ドッキング計算、および自由エネルギー計算により解析した。さらに、得られた結合様式に基づいて、より強い阻害活性が期待できる誘導体の分子設計を行った。

研究成果の概要（英文）：The binding mode between our recently developed chitinase inhibitor with a 14-membered macrolide scaffold and chitinase B from *Serratia marcescens* was investigated using molecular dynamics simulation, molecular docking, and free energy calculation. We further designed its derivatives expected to possess stronger inhibitory activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

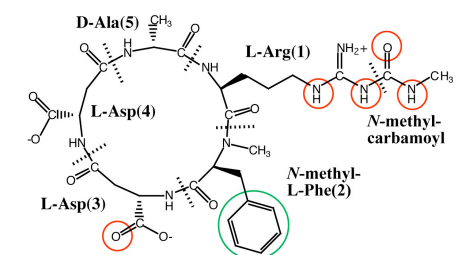
キーワード：キチナーゼ、阻害剤、ドッキング計算、分子動力学、結合自由エネルギー

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、寄生虫からヒト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）は、新規な抗真菌薬、抗寄生虫薬、および喘息治療薬となる可能性がある。この様な背景の中、北里生命科学研究所において、環状ペプチド性キチナーゼ阻害剤、argifin(図1)、が発見された(*Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 2141)。argifin はさまざまなキチナーゼに対

して μM 程度の強い阻害活性を示す。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。また、argifin と霊菌 *Serratia marcescens* 由来のキチナーゼ B (*SmChiB*) 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)。argifin との相互作用に関する *SmChiB* のアミノ酸残基(図2)は、真菌、寄生虫、およびヒトのキチナーゼにおいてもほぼ保存されている。したがって、argifin-*SmChiB* 相互作用研究は、新規薬物開発に有益

な情報を与えることができる。そこで、著者が属する分子設計グループ、合成グループ、および阻害活性測定グループの研究協力体制で argifin および SmChiB に基づいた創薬研究が開始された。



○ SmChiB のアミノ残基と水素結合している原子
 ○ SmChiB の W97 と W200 と疎水相互作用している芳香環

キチナーゼ	argifin の阻害活性
霊菌 (<i>Serratia Marcescens</i>) キチナーゼ B (SmChiB)	IC ₅₀ = 6.4 μM
ヒツジキンバエ (<i>Lucilia cuprina</i>) 粗精製キチナーゼ群	IC ₅₀ = 0.1 μM
真菌 (<i>Aspergillus fumigatus</i>) キチナーゼ B1	IC ₅₀ = 1.1 μM

図 1 : argifin の化学構造と阻害活性

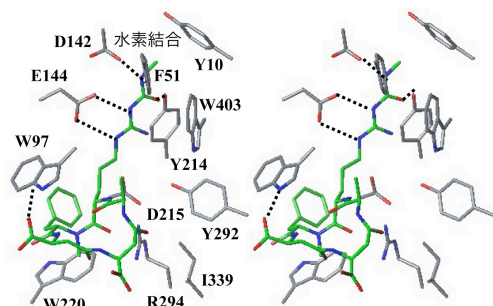


図 2 : argifin-SmChiB 複合体の X 線構造 (ステレオ図)

(2) 我々は argifin の主鎖環状骨格の大きさが抗生物質エリスロマイシン A (EM-A) の 14 員環マクロライド骨格の大きさと同程度であることを注目した。そこで、argifin 構成アミノ酸の中で SmChiB との相互作用に最も重要な L-Arg(1)側鎖 (図 1) を、EM-A の 9 位に導入した化合物① (図 3) を分子設計し、実際に合成、および阻害活性測定を行った。

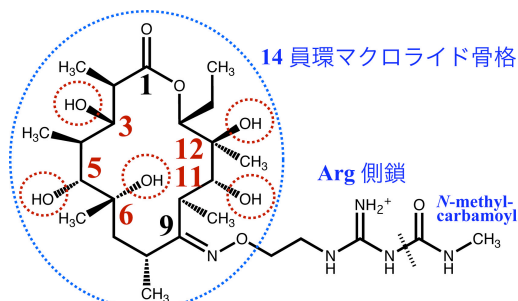


図 3 : 14 員環マクロライド骨格を持つ化合物①
 SmChiB に対して、IC₅₀ = 33 μM

○ 修飾可能 (官能基の付加が可能) な水酸基

すると、この化合物①は、若干弱いながらも argifin に匹敵する阻害活性 (IC₅₀ = 33 μM)

を示した。この結果は、非常に重要な一歩であった。すなわち、我々は argifin の非ペプチド化 (よりドラッグライクな化合物への分子変換) に成功したことを意味していた。

2. 研究の目的

我々が得た 14 員環マクロライド骨格を有する新規キチナーゼ阻害剤 (化合物①) を薬物として実用化するには、結合親和性の改善が必要であった。そこで、

- (1) 精密分子ドッキング計算より、化合物①と SmChiB の結合様式を解析すること。
 - (2) (1) で決定した結合様式に基づいて、結合親和性が改善されるように化合物①の構造最適化を行うこと。
- が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 分子ドッキング計算に用いる SmChiB の代表鍵穴構造の生成

argifin-SmChiB 複合体 X 線結晶構造 (PDB ID: 1HOI) を、コンピュータ上で水の箱に入れ、続いて水溶液中での分子動力学 (MD) シミュレーションを行なった。計算にはプログラム AMBER8 を用いた。次に、初期構造からの座標に関する RMSD をプロットすることで、MD シミュレーションが平衡に達した領域を決定した。最後に、平衡に達した領域から得られた溶液構造アンサンブルについて、触媒部位周辺のアミノ酸残基 (全 32 個) の座標に関するクラスター解析を行い、分子ドッキング計算に用いる代表鍵穴構造を選択した。

(2) 化合物①の SmChiB に対する精密分子ドッキング計算

先ず、当研究室の自動配座解析プログラム CAMDAS (*J. Comput. -Aided Mol. Des.* 1997, 11, 305) を用いて、化合物①のマクロライド骨格に焦点をあてた立体配座解析を行った。これは、一般的なドッキング計算プログラムは計算中にマクロライド骨格のような環状骨格についての柔軟性を考慮することができないためである。次に、プログラム Glide5.5 を用いて、化合物①の配座集団の SmChiB の代表鍵穴構造に対するドッキング計算を行い、多数のドッキングポーズを発生させた。そして、評価関数 Glidescore を用いて上位ドッキングポーズを選択した。続いて、MM-PBSA 法を用いて上位ドッキング複合体構造の自由エネルギー計算を行い、最も低い自由エネルギー値を与えたドッキング複合体構造を結合様式モデルとして選択した。最後に、結合様式モデルの周りにあらわな水分子を発生させてエネルギー極小化計算を行うことで、水分子を介した間接的な相互作用についても考察を行った。

(3) 化合物①の構造最適化

(2) で得られた結合様式モデルを詳細に観

察し、*SmChiB* との相互作用エネルギーを改善できるような原子団を導入した化合物①誘導体をいくつか分子設計した。この際、化合物①と *SmChiB* の間に存在し両者を水素結合で結びつける水分子（架橋水）が観察されるような場合、それを化合物①に取り込むような設計も行った。次に、分子設計した誘導体と *SmChiB* の複合体モデル構造をコンピュータ上で作製した。最後に MM-PBSA 法と同等の計算精度を有し、高速な計算が可能な MM-GBSA 法を用いた精密結合自由エネルギー計算を行い、分子設計した誘導体の結合自由エネルギーを評価した。

4. 研究成果

(1) *argifin-SmChiB* 複合体の MD シミュレーションは全部で 1700ps 行なった。初期構造に対する RMSD 解析の結果、後半 1000ps を *argifin-SmChiB* 複合体の溶液構造アンサンブル (5ps 毎に全 200 スナップショット) とした。触媒部位の構造に関するクラスター解析の結果、890ps と 1505ps の二つのスナップショットが代表構造として選択された。最後に、この 2 つの溶液構造から、水分子と *argifin* を取り除くことで、ドッキング計算に用いる代表鍵穴構造を得た。

(2) 分子ドッキング計算の結果得られた化合物①と *SmChiB* の結合様式モデルを図 4 に示す。

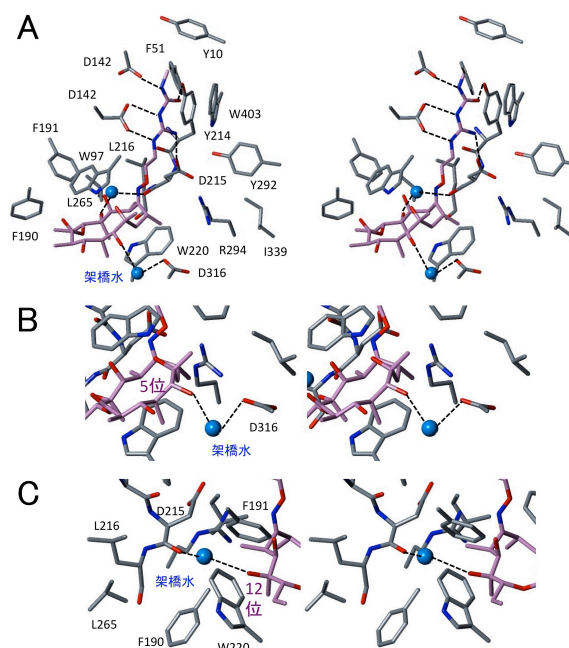


図4: (A)化合物①と*SmChiB*の結合様式モデル
(B)化合物①の5位の水酸基周辺
(C)化合物①の12位の水酸基周辺
すべてステレオ図

この結果、

① 化合物①は、*SmChiB* の 4 つのアミノ酸残基 (D142、E144、Y214、および D215) の側鎖と

全部で 5 つの直接水素結合相互作用を形成しそうであること (図 4 A)。

② 化合物①が有する 14 員環マクロライド骨格は、*SmChiB* の W97、F191、および W220 により形成される疎水性ポケットに収まり、そこで疎水相互作用を形成しそうであること (図 4 A)。

③ 化合物①の 5 位と 12 位の炭素に存在する 2 つの水酸基は、それぞれ、*SmChiB* の D316 側鎖酸素原子および D215 主鎖酸素原子と水分子を介した間接的な水素結合相互作用を形成しそうなこと (図 4 B、C)。

が明らかとなった。

(3) 先ず、図 4 の結合様式モデルより、

① 化合物①の 5 位の水酸基は水分子を介して *SmChiB* の D316 と水素結合相互作用をしている (図 4 B) ので、その水酸基をエチルアルコールのような原子団で置き換えた誘導体は、この水分子を介した水素結合相互作用を模倣できそうであること。

② 化合物①の 12 位の水酸基周辺には、*SmChiB* の F190、F191、および L265 のような疎水性アミノ酸残基が数多く位置している (図 4 C)。そこで、12 位の水酸基に疎水性アルキル鎖を付加した誘導体は、これらのアミノ酸残基と新たな疎水性相互作用、及び van der Waals 相互作用を形成できそうなこと。

が示唆された。そこで、化合物①の 5 位の水酸基をエチルアルコール、およびエチルアミンで置換した誘導体(1)、(2)、および 12 位の水酸基をメトキシ基、イソプロポキシ基、およびイソブトキシ基で置換した誘導体(3)~(5)を考案し、それぞれの誘導体と *SmChiB* の複合体モデル構造をコンピュータ上で作製した。MM-GBSA 法を用いた精密結合自由エネルギー計算を行ったところ、誘導体(2)、および誘導体(4)の結合自由エネルギーが大きく改善されそうなことがわかった (表 1、図 5)。以上の結果より、化合物①の 5 位の水酸基をエチルアミンで置換し、かつ、12 位の水酸基をイソプロポキシ基で置換した誘導体が非常に有望そうであることがわかった。

化合物①	-40.28
誘導体(1)	-47.62
誘導体(2)	-50.33
誘導体(3)	-39.32
誘導体(4)	-49.19
誘導体(5)	-44.90

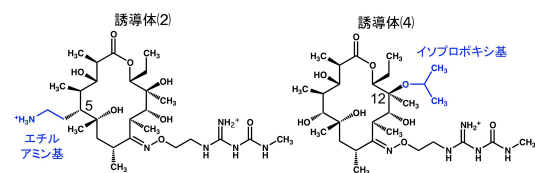


図5: より強い阻害活性が期待できる誘導体(2)および(4)の化学構造

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 12 件)

- ① Hiroshi Nagase, Junko Akiyama, Ryo Nakajima, Shigeto Hirayama, Toru Nemoto, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono, Hideaki Fujii. Synthesis of new opioid derivatives with a propellane skeleton and their pharmacology. Part 2: Propellane derivatives with an amide side chain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22(8), 2775-2779. 査読有り DOI:10.1016/j.bmcl.2012.02.082
- ② Hiroaki Gouda, Yutaka Kobayashi, Takeshi Yamada, Tetsuya Ideguchi, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose, Satoshi Ōmura, Toshiaki Sunazuka, Shuichi Hirono. Three-Dimensional Solution Structure of Bottromycin A₂: A Potent Antibiotic Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Chem. Pharm. Bull.* 2012, 60(2), 169-171. 査読有り DOI:10.1248/cpb.60.169
- ③ Akihiro Sugawara, Akito Sueki, Tomoyasu Hirose, Kenichiro Nagai, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono, Hideaki Shima, Kiyoko S. Akagawa, Satoshi Ōmura, Toshiaki Sunazuka. Novel 12-membered non-antibiotic macrolides from erythromycin A; EM900 series as novel leads for anti-inflammatory and/or immunomodulatory agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21(11), 3373-3376. 査読有り DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.04.004
- ④ Hiroaki Gouda, Toshiaki Sunazuka, Tomoyasu Hirose, Kanami Iguchi, Noriyuki Yamaotsu, Akihiro Sugawara, Yoshihiko Noguchi, Yoshifumi Saito, Tsuyoshi Yamamoto, Takeshi Watanabe, Kazuro Shiomi, Satoshi Ōmura, Shuichi Hirono. NMR spectroscopy and computational analysis of interaction between *Serratia marcescens* chitinase B and a dipeptide derived from natural-product cyclopentapeptide chitinase inhibitor argifin. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18(16), 5835-5844. 査読有り DOI:10.1016/j.bmc.2010.06.093
- ⑤ Hiroshi Nagase, Satomi Imaide, Miyuki Tomatsu, Shigeto Hirayama, Toru Nemoto, Noriko Sato, Mayumi Nakajima, Kaoru Nakao, Hidenori Mochizuki, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono, Hideaki Fujii. Investigation of Beckett-Casy model 3: Synthesis of novel naltrexone derivatives with contracted and expanded D-rings and their pharmacology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20(12), 3801-3804. 査読有り DOI:10.1016/j.bmcl.2010.04.044
- ⑥ Masumi Villeneuve, Mizuo Kawai, Motoko Watanabe, Yutaka Aoyagi, Yukio Hitotsuyanagi, Koichi Takeya, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono, David E. Minnikin, Hiroo Nakahara. Differential conformational behaviors of α -mycolic acids in Langmuir monolayers and computer simulations. *Chem. Phys. Lipids* 2010, 163(6), 569-579. 査読有り DOI:10.1016/j.chemphyslip.2010.04.010
- ⑦ Hiroaki Gouda, Shinichi Terashima, Kanami Iguchi, Akihiro Sugawara, Yoshifumi Saito, Tsuyoshi Yamamoto, Tomoyasu Hirose, Kazuro Shiomi, Toshiaki Sunazuka, Satoshi Ōmura, Shuichi Hirono. Molecular modeling of human acidic mammalian chitinase in complex with the natural-product cyclopentapeptide chitinase inhibitor argifin. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17(17), 6270-6278. 査読有り DOI:10.1016/j.bmc.2009.07.045
- ⑧ Tomoyasu Hirose, Toshiaki Sunazuka, Akihiro Sugawara, Yoshihiko Noguchi, Toshiaki Tanaka, Kanami Iguchi, Tsuyoshi Yamamoto, Hiroaki Gouda, Kazuro Shiomi, Satoshi Ōmura. Solid-phase total synthesis of the chitinase inhibitor Argadin using a supported acetal resin. *J. Antibiot.* 2009, 62(9), 495-500. 査読有り DOI:10.1038/ja.2009.57
- ⑨ Masato Iwatsuki, Yukio Koizumi, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono, Hiroshi Tomoda, Satoshi Ōmura. 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 DOI:10.1016/j.bmcl.2009.03.033
- ⑩ Hiroshi Nagase, Yumiko Osa, Toru Nemoto, Hideaki Fujii, Masayuki Imai, Takeshi Nakamura, Toshiyuki Kanemasa, Akira Kato, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono. 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 DOI:10.1016/j.bmcl.2009.03.099
- ⑪ Hiroaki Gouda, Toshiaki Sunazuka,

Kanami Iguchi, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose, Yoshihiko Noguchi, Yoshifumi Saito, Yuichi Yanai, Tsuyoshi Yamamoto, Takeshi Watanabe, Kazuro Shiomi, Satoshi Omura, Shuichi Hirono. 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 DOI:10.1016/j.bmcl.2009.04.013

- ⑫ Toshiaki Sunazuka, Akihiro Sugawara, Kanami Iguchi, Tomoyasu Hirose, Kenichiro Nagai, Yoshihiko Noguchi, Yoshifumi Saito, Tsuyoshi Yamamoto, Hideaki Ui, Hiroaki Gouda, Kazuro Shiomi, Takeshi Watanabe, Satoshi Omura. 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 DOI:10.1016/j.bmc.2009.02.047

[学会発表] (計 20 件)

- ① 小林豊, 山田健, 井手口哲也, 千成恒, 廣瀬友靖, 小林義典, 合田浩明, 広野修一, 大村智, 砂塚敏明 抗 MRSA 活性物質 Botromycin 類の固相合成研究 日本薬学会第 132 年会 (北海道) 2012 年 3 月 30 日
- ② 若杉昌輝, 合田浩明, 廣瀬友靖, 菅原章公, 山本剛, 塩見和朗, 砂塚敏明, 大村智, 広野修一 新規喘息治療薬開発に有用な *in silico* 分子設計法の確立 日本薬学会第 132 年会 (北海道) 2012 年 3 月 30 日
- ③ 半田耕一, 中込泉, 山乙教之, 合田浩明, 広野修一 ヒト CYP3A4 阻害剤の 3 次元定量的構造活性相関 -Structure-based CoMFA- 日本薬学会第 132 年会 (北海道) 2012 年 3 月 30 日
- ④ 合田浩明, 小林豊, 山田健, 井手口哲也, 菅原章公, 廣瀬友靖, 大村智, 砂塚敏明, 広野修一 抗 MRSA および抗 VRE 活性を有する天然化合物 botromycin A₂ の溶液構造決定 日本薬学会第 132 年会 (北海道) 2012 年 3 月 30 日
- ⑤ 中込泉, 豊岡尚樹, 峰平大輔, 竹田大輔, 加藤敦, 足立伊左雄, 松谷裕二, 川田耕司, 佐藤謙一, 山乙教之, 合田浩明, 広野修一 PPAR γ LBD と三環系 PPAR γ パーシャルアゴニストの相互作用解析 日本薬学会第 132 年会 (北海道) 2012 年 3 月 30 日
- ⑥ 和田亮吾, 李杰, 合田浩明, 広野修一, 水口峰之, 森寿, 豊岡尚樹 新規セリンラセマーゼ阻害剤の合成研究 日本薬学会第 132 年会 (北海道) 2012 年 3 月 30 日

- ⑦ Masaki Wakasugi, Hiroaki Gouda, Tomoyasu Hirose, Yoshihumi Saitoh, Tuyoshi Yamamoto, Kazuro Shiomi, Toshiaki Sunazuka, Satoshi Omura, Shuichi Hirono Rational drug design strategy for future development of asthma medication The 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of Medicinal Science" (東京) 2011 年 11 月 30 日
- ⑧ 山乙教之, 中込泉, 合田浩明, 広野修一 タンパク質と相互作用する分子フラグメントを同定するプログラムの開発 日本コンピュータ化学会 2011 秋季年会 (福井) 2011 年 11 月 5 日
- ⑨ 木村紗穂莉, 斎藤佳史, 菅原章公, 廣瀬友靖, 合田浩明, 広野修一, 大村智, 砂塚敏明 マクロライド骨格をテンプレートとした新規キチナーゼ阻害剤のデザインと合成 第 55 回日本薬学会関東支部大会 (千葉) 2011 年 10 月 8 日
- ⑩ 合田浩明, 広野修一 相互作用に重要な水分子を取り込んだキチナーゼ阻害剤の *in silico* 分子設計 日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 29 日
- ⑪ 中込泉, 山乙教之, 合田浩明, 広野修一, 津田孝範, 熊澤茂則 アディポネクチン発現低下を抑制するプロポリス成分化合物と PPAR γ LBD の相互作用解析 日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 29 日
- ⑫ 合田浩明 NMR 測定と *in silico* 創薬技術を組み合わせたキチナーゼ阻害剤の相互作用解析 2010 年度 第 2 回 CAC フォーラムセミナー (東京) 2011 年 3 月 4 日
- ⑬ 土井一生, 山乙教之, 合田浩明, 広野修一 分子重ね合わせ法を用いた Ligand-Based Drug Design 手法による congeneric な化合物群の 3D-QSAR モデルの構築及びその検証 第 38 回構造活性相関シンポジウム (徳島) 2010 年 10 月 31 日
- ⑭ 中込泉, 山乙教之, 合田浩明, 片根真澄, 本間浩, 広野修一 *In silico* 創薬技術に基づく D-aspartate oxidase-thiolactomycin 複合体の構造解析 第 38 回構造活性相関シンポジウム (徳島) 2010 年 10 月 30 日
- ⑮ 合田浩明, 砂塚敏明, 廣瀬友靖, 井口加奈美, 菅原章公, 野口吉彦, 齊藤佳史, 山本剛, 塩見和朗, 大村智, 広野修一 TRNOE 測定、コンピュータリガンドドッキングおよび結合自由エネルギー計算を組み合わせたキチナーゼ B と Argifin 由来ジペプチド阻害剤の相互作用解析 第 38 回構造活性相関シンポジウム (徳島) 2010 年 10 月 30 日
- ⑯ 合田浩明 天然物に基づいた新規キチナーゼ阻害剤の *in silico* 分子設計 近畿大

学薬学総合研究所・大学院薬学研究科ハイ
テク・リサーチ・センター整備事業 第8
回シンポジウム（大阪） 2010年7月10
日

- ⑰ 合田浩明, 寺嶋真一, 広野修一 ヒト酸性
キチナーゼを標的にしたキチナーゼ阻害
剤 Argifin の理論的分子構造最適化 日
本薬学会第130年会（岡山） 2010年3
月29日
- ⑱ 合田浩明, 寺嶋真一, 広野修一 ヒト酸性
キチナーゼに対して特異性を有する
Argifin 誘導体の論理的分子設計 第37
回構造活性相関シンポジウム（東京）
2009年11月12日
- ⑲ 合田浩明 ヒト酸性キチナーゼに対して
特異性を有する Argifin 誘導体阻害剤の
in silico 分子設計 SCHRODINGER ユーザ
フォーラム 2009（東京） 2009年10
月21日
- ⑳ 合田浩明 ヒト酸性キチナーゼを標的に
した *in silico* 創薬研究 構造活性フォ
ーラム 2009 化合物と標的・非標的タンパ
ク質との相互作用-創薬標的の同定と分子
設計-（東京） 2009年6月19日

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

なし

(3) 連携研究者

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・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