

## 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28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：21590122  
 研究課題名（和文）新規抗ガン剤の創製を目指した CRK-C3G 相互作用阻害剤のイン・シリコ分子設計  
 研究課題名（英文）*In silico* drug design study targeting CRK-C3G interaction for future development of anticarcinogenic agent  
 研究代表者  
 広野 修一（HIRONO SHUICHI）  
 北里大学・薬学部・教授  
 研究者番号：30146328

研究成果の概要（和文）：アダプタータンパク質 CRK とグアニンヌクレオチド交換因子 C3G を阻害する化合物は新規な抗ガン剤になる可能性がある。そこで、我々は、疎水性を指標にした標的サイトの決定、PDBbind データベースを用いた標的サイトに結合しそうなリガンド原子団の抽出、および分子ドッキング計算からなるイン・シリコ創薬技術によりこの二つの蛋白質の相互作用を阻害できそうな化合物を探索した。

研究成果の概要（英文）：The interaction between adapter protein CRK and guanine-nucleotide exchange protein C3G is an attractive target for the development of novel anticarcinogenic agent. Therefore, we explored inhibitors against this protein-protein interaction using a variety of *in silico* drug discovery technique.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：抗ガン剤、イン・シリコ分子設計、蛋白質-蛋白質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

(1) CRK は、1988 年にトリ肉腫から同定された癌遺伝子 CRK (CT10 Regulated Kinase) 由来のタンパク質であり、CRK-I (204 残基) と CRK-II (304 残基) が存在する。両者とも、共通した一つの SH2 ドメインと一つの nSH3 ドメインを有している (図 1)。CRK の生体内での機能を図 2 に示す。細胞の表面上には細胞接着斑と呼ばれるタンパク質複合体 (インテグリン、チロシンキナーゼ、p130Cas、Paxillin 等から構成される) が存在し、他の細胞との相互作用を担っている。フィブロネ

クチンのような接着タンパク質がインテグリンに結合すると、インテグリンに結合しているチロシンキナーゼを介して、p130Cas および Paxillin のチロシンリン酸化がおこる。CRK の SH2 ドメインは、この p130Cas (あるいは Paxillin) 上のリン酸化されたチロシン残基を認識する。一方、CRK の nSH3 ドメインには、C3G あるいは DOCK180 と呼ばれるタンパク質が恒常的に結合している。そのため、SH2 ドメインと p130Cas (あるいは Paxillin) の結合により、C3G あるいは DOCK180 が細胞膜内側に集まってくる。すると、C3G および

DOCK180 は、細胞膜内側に結合している Rac、R-Ras、Rap1 のような低分子量 G タンパク質を活性化する。これにより、MAP キナーゼ情報伝達系の活性化などが誘導され、細胞接着、細胞増殖、細胞運動能が促進される。すなわち、CRK は、C3G および DOCK180 等のタンパク質を細胞膜近傍に輸送することで、細胞増殖等に関与しており、それゆえアダプタータンパク質と呼ばれている。

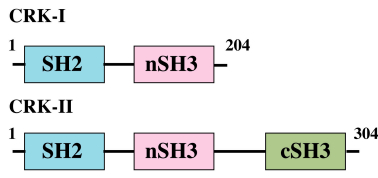


図 1 : CRK I と CRK II

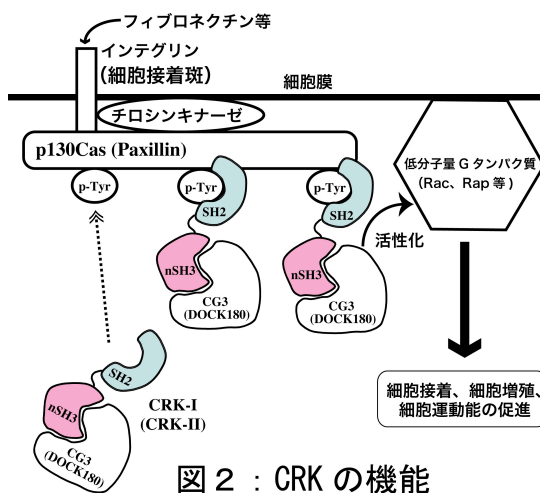


図 2 : CRK の機能

(2) 近年、CRK とガン細胞との関連について、次のような報告がなされていた。

- ① 浸潤性の強い悪性ガン細胞では、CRK の発現が増加している (*Cancer Lett.* 2002 180, 55-61)。
- ② ガン細胞では、p130Cas および Paxillin は、通常より非常に多くの箇所でチロシン酸化を受けている (*Oncogene* 2006 25, 3547-3556)。
- ③ CRK がノックダウンされたガン細胞は、野生型のガン細胞に比較して、増殖能および浸潤能がともに大きく低下する (*Oncogene* 2006 25, 3547-3556)。

これらの報告から、CRK が介するシグナル伝達を阻害することで、ガン細胞の増殖および浸潤を抑制できると考えられた。すなわち、CRK は新規な抗ガン剤開発のための標的蛋白質であると言える。

## 2. 研究の目的

上述したような背景の中、本研究の目的は、“イン・シリコ創薬技術により CRK nSH3 ドメインと C3G (あるいは DOCK180) の間の蛋白質-蛋白質相互作用を阻害するリード化合物を創製する”ことである。

物を創製する”ことである。

## 3. 研究の方法

CRK nSH3 ドメインに関しては、C3G 由来の 10 残基ペプチド PPPALPPKKR (C3G ペプチド) との複合体 X 線結晶構造が既に報告されていた (PDB: 1CKA)。そこで、この結晶構造を利用した Structure-based drug design (SBDD) を展開することにした。

(1) CRK nSH3-C3G 相互作用界面における標的サブサイトの決定

図 3 A に CRK nSH3 上の相互作用界面を示す。この相互作用界面には、 $P_{+3}$ 、 $P_{+2}$ 、 $P_0$ 、 $P_{-1}$ 、 $P_{-2}$ 、および  $P_{-4}$  と呼ばれる 6 個のサブサイトがある。まず、これらサブサイトの中から、重点的に標的とするサブサイトを決定した。これには、当研究室で開発されたリガンド結合部位予測プログラム HBOP (*Biol. Pharm. Bull.* 2008, 31, 1552) を利用した。この HBOP 計算を行うことで、リガンド結合に適した疎水性サイトを選択することができる。

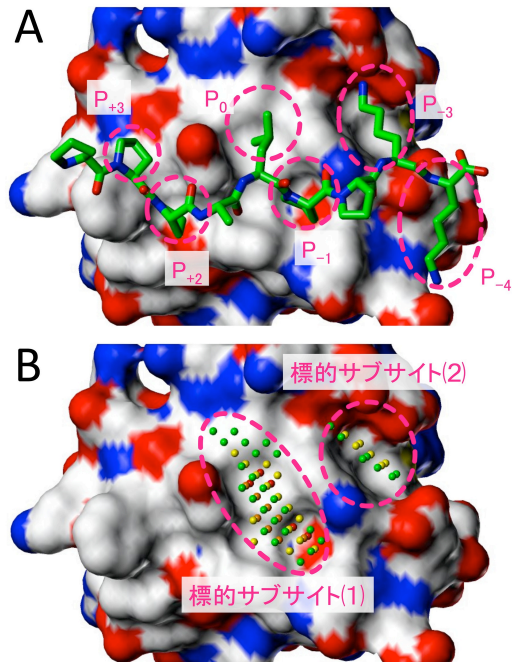


図 3A: CRK nSH3ドメインとC3G由来の10残基ペプチドとの複合体X線結晶構造(PDB:1CKA)

図 3B: CRK nSH3上の相互作用界面に対するHBOP計算の結果(疎水性が高い領域に点を表示)

(2) 標的サブサイトに結合しそうなリガンド原子団の探索

図 3 A からわかるように、蛋白質-蛋白質相互作用界面は、“広くて浅い”という特徴を有しており、これまでの SBDD が標的としてきた“深くて固い”酵素の鍵穴とは大きく異なっている。したがって、これまで酵素に対して行われてきたイン・シリコスクリーニング手法だけでは、この界面に結合する化合物を発見する可能性は極めて小さいと考えられた。そこで、まず、これまでに報告されて

いるリガンド-蛋白質複合体 X 線結晶構造群 (PDBbind データベース)の中から、本研究で標的とするサブサイトとよく似たサブサイトを検索し、そのサイトに結合しているリガンド原子団を探索することにした。これには、当研究室で開発された Superpose\_site (日本コンピュータ化学会 2011 秋季年会で発表)を使用した。この計算により同定されるリガンド原子団を含有する化合物は、高い確率で標的とするサブサイトに結合するのではないかと考えることができる。

### (3) 化合物データベースのイン・シリコスクリーニング

ここでは、先ず、上述の(2)で同定された原子団に基づいた化学構造をクエリーとし、このクエリーを有する化合物を化合物データベース(約 400 万化合物)から探索し、一次候補化合物群とした。次に、分子ドッキングプログラム Glide を用いて、一次候補化合物群の標的サブサイトに対するドッキング計算を行った。そして、結合親和性の指標となる評価関数 Glidescore を用いて一次候補化合物群を順位付けし、上位化合物を二次候補化合物群とした。さらに、二次候補化合物群に対して得られたドッキングポーズを観察し、X 線結晶構造で観察された CRK nSH3-C3G ペプチド相互作用様式 (図 3A) をよく模倣できている化合物を三次候補化合物群として選択した。最後に、三次候補化合物群について、化学構造に基づいたクラスター解析を行い、購入および阻害活性を行う化学構造的に多様な代表三次候補化合物群を決定した。

## 4. 研究成果

(1) HBOP 計算の結果を図 3B に示す。リガンド結合に適した疎水性の高いサブサイト上に点の集合が表示されている。この結果より、CRK nSH3 上の P<sub>0</sub>、P<sub>-1</sub>、および P<sub>-3</sub> サブサイトを標的とすればよいことがわかった。P<sub>0</sub> サイトと P<sub>-1</sub> サイトは非常に近接しているため、以後、合わせて標的サブサイト(1)と呼ぶことにする。また、P<sub>-3</sub> サブサイトを標的サブサイト(2)と呼ぶことにする。

(2) 先ず、PDBbind データベースの中から、標的サブサイト(1)とよく似たりガンド結合サイトを有する蛋白質を検索した。その結果、CARBONIC ANHYDRASE II を含むいくつかの蛋白質が標的サブサイト(1)とよく似たりガンド結合サイトを有していることがわかった。このリガンド結合サブサイトに結合していたリガンド原子団 (赤色で表示されている原子団)の例を図 4A に示す。この結果より、標的サブサイト(1)には芳香環やシクロプロパンのような疎水性原子団が結合できそうなことが示唆された。同様に標的サブサイト(2)に対して得られた結果を図 4B に示す。この結果より、標的サブサイト(2)には正に荷電

するアミン基を持つ 6 員環のような原子団が結合できそうなことが示唆された。

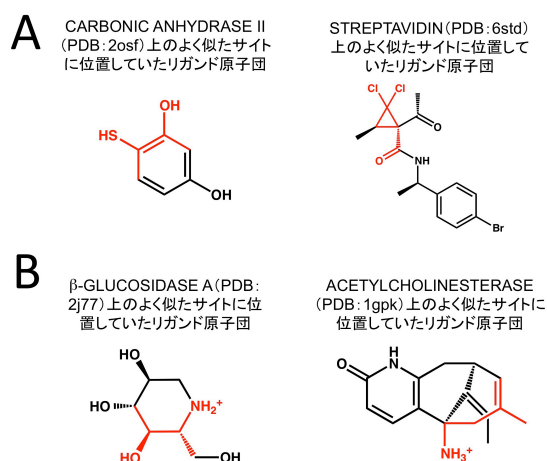


図4: PDBbindデータベースに対するSuperpose\_site計算の結果 (A): 標的サブサイト(1)とよく似たりガンド結合サブサイトに結合していたリガンド原子団 (リガンド全体の構造中、赤色で表示) (B): 標的サブサイト(2)とよく似たりガンド結合サブサイトに結合していたリガンド原子団 (リガンド全体の構造中、赤色で表示)

(3) 先ず、(2)の結果に基づいて、化合物検索のためのクエリーを決定し、ナミキ商事化合物データベース(約 400 万化合物)を検索したところ、34812 個の化合物が一次候補化合物群として選択された。次に、ドッキング計算を行い、Glidescore 上位の約 500 個の化合物を二次候補化合物群として選択した。続いて、これら二次候補化合物群のドッキングポーズを解析し、CRK nSH3-C3G ペプチド相互作用様式をよく模倣している 54 個の化合物を三次候補化合物群とした。最後に、クラスター解析の結果、20 個の化合物を選択し、代表三次候補化合物群とした。この代表三次候補化合物群の一つの結合様式モデルを図 5A に示す。図 5A のように代表三次候補化合物群は、いずれも、CRK nSH3-C3G ペプチド相互作用様式 (図 5B) をよく模倣して結合できそうなことが示唆された。これら 20 個の化合物のうち、15 個の購入が可能であった。そこで、この 15 個の化合物については既に購入した。今後、この 15 化合物について阻害活性測定を行う予定である。

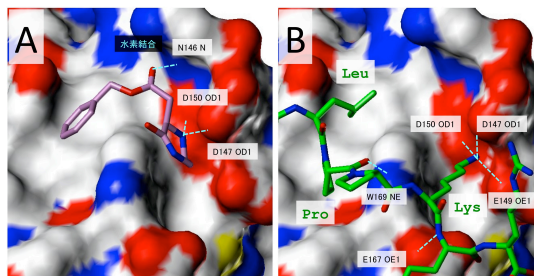


図5A: 代表三次候補化合物として選択された化合物の結合様式モデル  
図5B: X線結晶構造で観察されるCRK nSH3-C3Gペプチド相互作用様式

## 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 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 Botromycin A<sub>2</sub>: 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  $\alpha$ -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 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
- ⑨ 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
- ⑩ Hiroaki Gouda, Toshiaki Sunazuka, Kanami Iguchi, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose, Yoshihiko Noguchi, Yoshifumi Saito, Yuichi Yanai, Tsuyoshi Yamamoto, Takeshi Watanabe, Kazuro Shiomi, Satoshi Ōmura, 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



- ⑪ Hiroshi Nagase, Akio Watanabe, Toru Nemoto, Noriyuki Yamaotsu, Kohei Hayashida, Mayumi Nakajima, Ko Hasebe, Kaoru Nakao, Hidenori Mochizuki, Shuichi Hirono, Hideaki Fujii. Drug design and synthesis of a novel  $\kappa$  opioid receptor agonist with an oxabicyclo[2.2.2] octane skeleton and its pharmacology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010 20 121-124. 査読有り
- ⑫ Noriyuki Yamaotsu, Hideaki Fujii, Hiroshi Nagase, Shuichi Hirono. Identification of the three-dimensional pharmacophore of  $\kappa$ -opioid receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* 2010 18 4446-4452. 査読有り

[学会発表] (計 16 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 A<sub>2</sub> 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 $\gamma$  LBD と三環系 PPAR $\gamma$  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, Teyoshi 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 $\gamma$  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 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
- ⑬ 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
- ⑭ 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, 斎藤佳史, 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
- ⑮ 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
- ⑯ 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

広野 修一 (HIRONO SHUICHI)  
北里大学・薬学部・教授  
研究者番号：30146328

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

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