

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17882

研究課題名(和文) 相互作用活性化エネルギーに基づく蛋白質制御剤の創出

研究課題名(英文) Design of protein binders based on the activation energy of interaction

研究代表者

長門石 暁(NAGATOISHI, SATORU)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：30550248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖シグナルに関わるがん標的分子ERK2と、その既知薬剤であるFR、CAY、SCHを選択し、速度論パラメータにおける温度依存性を解析した。FRとの相互作用においては、その変異体解析の結果、遷移状態では結合サイト周辺で脱水和、及び分子内相互作用の切断による構造の緩みが起きていることが示唆された。さらにCAYとSCHの解析から、遷移状態における活性化エンタルピーはより不利に、一方活性化エントロピーはより有利に変化し、両者のエネルギー差の大きさと、阻害濃度や解離速度定数の低さに因果関係があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the process of the interaction. Since it is assumed that a small compound forms some intermediate states with various amino acids and finally binds to the energy-stable site of protein, the process is possibly differ among proteins. Here, the binding kinetic analysis was carried out to elucidate the binding process of the compound to protein. In this study, complexed energy transition in the binding process is simplified as two state reaction and the state where a compound is in process is regarded as transition state. From the analysis of thermodynamic parameters in transition state, the transition state is examined at amino acid level and the relationship between transition state and binding process is discussed. This allows us to verify the possibility of obtaining an important indicator for drug design.

研究分野：創薬物理化学

キーワード：蛋白質 薬剤 熱力学 速度論 活性化エネルギー

1. 研究開始当初の背景

蛋白質のユニークな三次構造と多様な特異性創出は、多彩な細胞システムを作り上げ、結果として治療薬・診断薬の魅力的な標的分子となっている。この作用機序は分子認識化学の観点より、多点結合、構造相補性、熱力学、そして溶媒効果のバランスによって成り立っていると考えられている。したがって蛋白質の機能制御は、これらの分子認識要素を正確に理解することが重要である。研究代表者はこれまでに蛋白質-核酸間相互作用解析を基点に、結合エンタルピー (ΔH) と特異性について、水和変化と生物学的機能について、その重要性を提唱する研究に取り組んできた。

低分子薬剤の探索・設計においても、終状態における熱力学的解析、とくに ΔH が有効な指標として評価されつつあり、研究代表者もこれまでに成果を挙げることができた。しかしながら、未だ終状態では議論できない相互作用は多く存在しており、薬剤設計に関する合理的な戦術の向上や新しい設計指針の提案は強く望まれている。熱力学的平衡は始状態と終状態の差分で議論するが、標的分子に対する従来の薬剤設計は、この終状態のみ議論しており、研究代表者はそこに弱点があると考えた。この差分の中には『プロセス』が含まれており、その熱力学も特異的分子認識に深く関与しているはずである。蛋白質-蛋白質間相互作用のプロセスに関する熱力学解析 (活性化エネルギー解析) においては、結合親和性創出の一部がプロセスに強く関連していることを研究代表者は過去に見出していることから、低分子と蛋白質間の相互作用プロセスに低分子薬剤設計に関する新しい観点があるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

そこで本研究では、化合物が蛋白質に結合するまでのプロセスに着目した。先に述べたように、従来は終状態からの観点で相互作用の解析が行われてきたことから、プロセスで何が起きているのかは現在までに解明されておらず、いわばブラックボックスの状態である。このプロセスにおいては、蛋白質の構造変化や、水和及び脱水和、化合物と蛋白質の中間体の形成など様々な事象が起こりうると考えられる。したがって、このプロセスを解明することにより薬効に重要な化合物の速度論、そして標的蛋白質への特異性など相互作用様式に関する新たな知見を得られると考えられる。そして、その知見をドラッグデザインの新たな指針として活用できないかと考えた。

3. 研究の方法

本研究における標的蛋白質には細胞増殖シグナル伝達に関わっている MAPk の一種である Extracellular regulated kinase 2、ERK2 を

選択した。ERK2 の異常はがんなどの重篤な疾患の発症につながり、治療の上で重要なターゲットとされており、また ERK2 はキナーゼ間で保存されている ATP 結合サイトを持つため、標的としても、モデルとしても最適であると考えた。いくつかの低分子化合物は、ATP 結合サイトを埋めることで ERK2 の機能を阻害することが知られている。その中より、FR180204 ($K_i=140$ nM)、CAY10561 ($K_i=2.0$ nM)、SCH772984 ($K_i=0.12$ nM) を選択した。

遷移状態における熱力学的パラメータの測定は表面プラズモン共鳴法、SPR 法を用いて実行した。SPR 法では、センサーチップ上に標的蛋白質 ERK2 を固定して、各種化合物を流し入れて、結合と解離の相互作用に関するレスポンスを検出し、そのセンサグラムの形状から蛋白質-低分子間結合の速度論パラメータを算出した。さらには、速度論パラメータに関する温度依存性を解析した。そこから van 't Hoff の式より終状態における熱力学的パラメータを得た。さらに結合速度定数 k_{on} を Eyring の式 ($\ln(k_{on}/T) = -(\Delta H^\ddagger)/R \cdot 1/T + (\Delta S^\ddagger)/R + \ln(kB/h)$, kB : ボルツマン定数, h : プランク定数) から遷移状態に関する活性化エネルギー (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger) を得た。

4. 研究成果

ERK2 と FR の相互作用に関する遷移状態エネルギーにおいて、エンタルピーに着目すると、終状態では有利に働いている一方で、遷移状態においては不利に働いているということが明らかになった。次にエントロピーに着目すると、終状態でも、遷移状態でも不利に働いていますが、終状態に比べると遷移状態での不利に寄与する度合いが小さいことが明らかになった。

次に ERK2 の変異体を作製して、遷移状態解析を行うことを試みた。プロセスについて議論するために結合サイト周辺のアミノ酸残基をアラニンに置換した 8 種の変異体を作製した。置換するアミノ酸は、極性基や芳香環など特徴のある側鎖を有し、蛋白質において熱力学的な役割を果たす見込みのあるものを中心に選択した。

野生型と比較すると、 ΔG^\ddagger は変化がないものの、変異体においては、エンタルピーが有利になり、エントロピーが不利になるという傾向が確認された。このことから、結合サイト周辺のアミノ酸残基は終状態には関わっていないが、遷移状態には熱力学的な役割を果たしているということが示唆された。アミノ酸の違いによる変化の度合いの違いは、元のアミノ酸が遷移状態において熱力学的に果たす役割の度合いを反映していると考えられた。

変異体解析において、野生型と比較してエンタルピー有利、エントロピー不利となった結果は、変異体では相互作用の切断が減少して、自由度が不利になったことを示している。したがって、野生型と FR の相互作用の遷移

状態においては、結合サイト周辺において、何らかの相互作用が切断され、自由度が向上する事象が起きていると推定できる。更にFRの結合前後のERK2の構造を比較すると、結合サイト周辺で大きな構造変化は起きていないことが分かった。以上のことを受けて、1つの結合モデルを考案した。まず遷移状態においては、結合サイト周辺の分子内相互作用の切断が起きて構造がゆるんだ状態になり、同時に脱水和も起きていると考える。そして、終状態では、分子内相互作用が再形成されるため結果的には構造変化は確認されず、また再水和も起きていると推察される。このように、遷移状態の熱力学的パラメータからプロセスでどのようなことが起こっているかを推定できる可能性が示唆された。

各化合物のパラメータを比較すると、まず ΔG^\ddagger はあまり変化しないことが分かった。次に、遷移状態においてFRよりエンタルピー不利エントロピー有利となり、脱水和がより多く起こっているであるCAYとSCHの方が、阻害定数と解離速度定数がより小さいこと明らかになった。このことから、 ΔH^\ddagger と $-T\Delta S^\ddagger$ のバランスが阻害定数と解離速度定数を左右することが示唆された。すなわち、遷移状態における脱水和が化合物の阻害能を決定する一因であるという仮説を得た。

ERK2とFRの相互作用においては、その変異体解析の結果、遷移状態では結合サイト周辺で脱水和、及び分子内相互作用の切断による構造の緩みが起きていることが示唆された。さらにCAYとSCHの解析から、遷移状態における ΔH^\ddagger はより不利に、一方 ΔS^\ddagger はより有利に変化し、両者のエネルギー差の大きさと、阻害濃度や解離速度定数の低さに因果関係があることが示唆された。

このように本研究は、蛋白質-低分子薬剤間の相互作用におけるプロセスの一部を、速度論解析による活性化エネルギー変化から明らかにした。さらに、この活性化エネルギーには結合自由エネルギー変化 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ における ΔS に関わる指標が含まれていることが示唆された。標的分子に対する薬剤設計において、Structure-based drug design (SBDD)は ΔH 制御に威力を発揮しているが、本研究より明らかとなったプロセス熱力学による観点からは、Process-based drug design (PBDD)として ΔS 制御の可能性を秘めているかもしれない。

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13件)

- 1) R. Ueta, T. Tezuka, Y. Izawa, S. Miyoshi, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, Y. Yamanashi
The carboxyl-terminal region of Dok-7 plays a key, but not essential, role in activation of muscle-specific receptor kinase MuSK and

neuromuscular synapse formation.

J. Biochem. **2017** 161, 269-277. 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvw073.

- 2) A. Pica, I. Russo Krauss, V. Parente, H. Tateishi-Karimata, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, N. Sugimoto, F. Sica
Through-bond effects in the ternary complexes of thrombin sandwiched by two DNA aptamers.
Nucleic Acid Res. **2017** 45, 461-469. 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkw1113.
- 3) S. Kudo, J.M. Caaveiro, S. Nagatoishi, T. Miyafusa, T. Matsuura, Y. Sudou, K. Tsumoto
Disruption of cell adhesion by an antibody targeting the cell-adhesive intermediate (X-dimer) of human P-cadherin.
Sci. Rep. **2017** 7, 39518. 査読有
DOI: 10.1038/srep39518.
- 4) C. Ota, S. Noguchi, S. Nagatoishi, K. Tsumoto
Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy
Pharm. Res. **2016** 33, 956-969. 査読有
DOI: 10.1007/s11095-015-1842-8.
- 5) H. Tsuchiya, S. Doki, M. Takemoto, T. Ikuta, T. Higuchi, K. Fukui, Y. Usuda, E. Tabuchi, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, T. Nishizawa, K. Ito, N. Dohmae, R. Ishitani, O. Nureki
Structural basis for amino acid export by DMT superfamily transporter YddG.
Nature **2016** 534, 417-420. 査読有
DOI: 10.1038/nature17991.
- 6) T. Suzuki, H. Yamaguchi, M. Kikusato, O. Hashizume, S. Nagatoishi, A. Matsuo, T. Sato, T. Kudo, T. Matsuhashi, K. Murayama, Y. Ohba, S. Watanabe, S. Kanno, D. Minaki, D. Saigusa, H. Shinbo, N. Mori, A. Yuri, M. Yokoro, E. Mishima, H. Shima, Y. Akiyama, Y. Takeuchi, K. Kikuchi, T. Toyohara, C. Suzuki, T. Ichimura, J. Anzai, M. Kohzuki, N. Mano, S. Kure, T. Yanagisawa, Y. Tomioka, M. Toyomizu, K. Tsumoto, K. Nakada, J.V. Bonventre, S. Ito, H. Osaka, K. Hayashi, T. Abe
Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage.
J. Am. Soc. Nephrol. **2016** 27, 1925-1932. 査読有
DOI: 10.1681/ASN.2015060623.
- 7) Y. Kado, E. Mizohata, S. Nagatoishi (equal

- cotribution), M. Iijima, K. Shinoda, T. Miyafusa, T. Nakayama, T. Yoshizumi, A. Sugiyama, T. Kawamura, Y.H. Lee, H. Matsumura, H. Doi, H. Fujitani, T. Kodama, Y. Shibasaki, K. Tsumoto, T. Inoue
Epiregulin Recognition Mechanisms by Anti-epiregulin Antibody 9E5: STRUCTURAL, FUNCTIONAL, AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION ANALYSES.
J. Biol.Chem. **2016** 291, 2319-2330. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M115.656009
- 8) T. Tashima, S. Nagatoishi, H. Sagara, S. Ohnuma, K. Tsumoto
Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils
Biochem. Biophys. Res. Commun **2015** 463, 292-296. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.053.
- 9) N. Sadhukhan, T. Muraoka, M. Ui, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, K. Kinbara
Protein stabilization by an amphiphilic short monodisperse oligo(ethylene glycol)
Chem. Commun. **2015** 51, 8457-8460. 査読有
DOI: 10.1039/c4cc10301g.
- 10) Y. Bai, S. Tashiro, S. Nagatoishi, T. Suzuki, D. Yan, R. Liu, K. Tsumoto, M. Bartlam, T. Yamamoto
Structural basis for inhibition of the Tob-CNOT7 interaction by a fragment screening approach
Protein Cell **2015** 6, 924-928. 査読有
DOI : 10.1007/s13238-015-0225-6.
- 11) K. Nakano, T. Chigira, T. Miyafusa, S. Nagatoishi, JM. Caaveiro, K. Tsumoto
Discovery and characterization of natural tropolones as inhibitors of the antibacterial target CapF from *Staphylococcus aureus*
Sci. Rep. **2015** 5, 15337. 査読有
DOI : 10.1038/srep15337.
- 12) Y. Tanabe, S. Nagatoishi, K. Tsumoto
Thermodynamic characterization of the interaction between the human Y-box binding protein YB-1 and nucleic acids.
Mol. Biosyst **2015** 11, 2441-2448. 査読有
DOI: 10.1039/c5mb00184f.
- 13) T. Chigira, S. Nagatoishi, K. Tsumoto
Differential binding of prohibitin-2 to estrogen receptor α and to drug-resistant ER α mutants
Biochem. Biophys. Res. Commun **2015** 463, 726-731. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.002.
- [学会発表] (計 17 件)
< 国外・口頭発表 >
- 1) Satoru Nagatoishi, Yumiko Tanabe, Kouhei Tsumoto
Calorimetric characterization of the interaction between an intrinsically disordered protein YB-1 and nucleic acids.
CALCON2016, Turtle Bay (Hawaii, USA), Aug. 2, 2016
- 2) Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto
SPR and ITC-based small-molecule screening to find inhibitors of protein-protein interactions.
Developments in Protein Interaction Analysis, DiPIA2016, Crowne Plaza Berlin City Center (Berlin, Germany), Jun. 13, 2016, 招待講演
- < 国内・口頭発表 >
- 3) 長門石曉
次世代の低分子創薬を拓く蛋白質-低分子間相互作用の物理化学的解析
若手シンポジウム 日本薬学会第 137 年会, 東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市), 2017 年 3 月
- 4) 長門石曉
次世代の低分子創薬を拓く蛋白質-低分子間相互作用の物理化学的解析
熱測定スプリングスクール 2017, 早稲田大学西早稲田キャンパス, 2017 年 3 月
- 5) Satoru Nagatoishi, Sou Yamaguchi, Kouhei Tsumoto
Thermodynamic elucidation of binding process for protein-ligand interactions to propose a drug design
第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, もてなしドーム地下イベント広場(石川県金沢市), 2016 年 9 月
- 6) 長門石曉・津本浩平
次世代抗体開発を指向した in silico と in vitro をつなぐ熱力学解析
バイオプロセス講演・見学会, 宇都宮大学陽東キャンパス(栃木県宇都宮市), 2016 年 6 月
- 7) Satoru Nagatoishi
Thermodynamics of the interaction between proteins and small compounds in drug discovery
分子研研究会, NINS Okazaki Conference Center, 2016 年 6 月
- 8) Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto
Biophysical approach to find the inhibitors of CapF and ERK2 enzyme in FBDD.

JCUP VII, 大手町サンスカイルーム,
2016年5月

- 9) 津本浩平・長門石曉
相互作用の物理化学的解析に基づくリガ
ンド探索と抗菌剤創出
第50回緑膿菌感染症研究会、ヒルトン東
京お台場, 2016年2月
- 10) 長門石曉
溶媒効果と熱力学解析に基づくタンパク
質相互作用の理解と、ものづくりへの挑
戦
甲南大学 FIBER Future Colloge 22、
FIBER special lecture, 甲南大学ポータ
アイランドキャンパス(兵庫県神戸市),
2015年12月
- 11) 長門石曉 (招待講演)
身近な薬“低分子医薬品”づくりの最先端
科学
甲南大学社会人向け連続講座 Nano Bio
College, 甲南大学ネットワークキャンパ
ス東京, 2015年11月
- 12) Satoru Nagatoishi, Sou Yamaguchi, Keita
Kajita, Etsuko Katoh, Hiroyuki Akiyama,
Satoru Kanai, Toshio Furuya, Kouhei
Tsumoto
Biophysical cross-validation in fragment
screening of fluorinated chemical library
toward FBDD using SPR, ITC and 19F
NMR
The 43rd Symposium on Structural Activity
Relationship 2015, The 10th Japan-China
Joint Symposium on Drug Discovery and
Development, 2015年9月, 新潟日報メデ
ィアシップ日報ホール(新潟県 新潟市)
**優秀講演賞 SAR Presentation Award 受
賞**
- 13) 長門石曉
物理化学を創薬に活かす: ITC や SPR
を活用した低分子薬剤探索
熊本大学トランスレーショナルサイク
ルを加速する循環型育薬リサーチ拠点特別
講演会, 熊本大学薬学部(熊本県熊本市),
2015年9月
- 14) 長門石曉
低分子スクリーニングにおける熱量解析
の活用
よこはま NMR 研究会第53回ワークショ
ップ, 理化学研究所横浜事業所(神奈川
県 横浜市), 2015年9月,
- 15) 長門石曉
Biacore で蛋白質間相互作用 PPI 阻害剤を
探索する
GE Life Sciences Day 2015, 2015年7月,

パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

<国内・ポスター発表>

- 16) 山口奏・長門石曉・梶谷敬太・加藤悦子・
秋山弘行・金井理・古谷利夫・津本浩平
含フッ素フラグメントライブラリを用い
た 19F NMR、SPR、ITC によるスクリー
ニング
第6回スクリーニング学研究会, 2015
年11月, ソニックシティ(埼玉県大宮市)
優秀ポスター発表賞 受賞
- 17) 長門石曉
Biacore で蛋白質間相互作用 PPI 阻害剤を
探索する
GE Life Sciences Day 2015, 2015年7月,
パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
GE Life Sciences Day 2015 ポスター賞

[図書](計 9件)

- 1) 長門石 曉・津本 浩平(分担執筆)
「医療応用のための物理化学」
CSJ カレントビュー/化学同人(2017年)
印刷中
- 2) 津本 浩平・長門石 曉
「日本発次世代創薬のための化学: 抗体
医薬品開発の現状と展望」
化学と工業, Vol.70, No.1(日本化学会)
(2017年)
- 3) 長門石 曉・津本 浩平
「物理化学的解析技術を利用したリガ
ンドスクリーニング」
バイオサイエンスとインダストリー,
Vol.75, No.1(バイオインダストリー協
会)(2017年)
- 4) 長門石 曉・津本 浩平(分担執筆)
「8章 酵素」
生体分子化学(講談社)(2017年)
- 5) 長門石 曉・津本 浩平
「抗体の品質・物性評価に関する解説
(2): プロセス・製剤における評価」
製剤機械技術学会誌, Vol.26, No.1(製剤
機械技術学会)(2017年)
- 6) 長門石 曉・津本 浩平
「生命分子相互作用解析: さらに増える
バリエーションと創薬への新展開」
BIO EX-press バイオエクス・プレス, 2016
年号(ダイアログ)(2016年)
- 7) 長門石 曉・津本 浩平
「抗体の品質・物性評価に関する解説
(1): 会合凝集形成と熱安定性の評価」
製剤機械技術学会誌, Vol.25, No.4(製剤
機械技術学会)(2016年)

- 8) 長門石 暁・津本 浩平 (分担執筆)
「第 24 章 アルギニンによる蛋白質の
構造と機能制御」
化粧品素材としてのアミノ酸・ペプチド
最前線 (シーエムシー・リサーチ) (2015
年)
- 9) 長門石 暁・楠崎佑子・津本 浩平
「結合熱力学プロファイリングによる創
薬」
ファルマシア、51 巻 12 号 (日本薬学会)
(2015 年)

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長門石 暁 (NAGATOISHI SATORU)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：30550248

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし