

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06580

研究課題名（和文）分子表面の有用構造を標的としたD-アミノ酸酸化酵素阻害剤の創出

研究課題名（英文）Discovery of D-Amino Acid Oxidase Inhibitors Targeting Molecular Surfaces

研究代表者

加藤 有介 (Kato, Yusuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・研究員

研究者番号：70596816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：D-アミノ酸酸化酵素（DAO）の外表面領域を標的としてマルチステップの構造ベースバーチャルスクリーニング（SBVS）等を行い化合物ライブラリーから絞り込みを行った。前提条件として既存のDAO阻害剤の相互作用情報は用いなかった。最終SBVSステップとコンセンサスランキングによる選択後、5個の化合物をin vitro実験で検討した。そのうちの1化合物はDAOに対して有意な阻害作用を示した。得られたドッキングポーズについて機械学習により分類し分子動力学を用いて評価した。その相互作用の特徴は既存のDAO阻害剤とは全く異なるものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症の陰性症状や認知機能障害の治療には既存の治療薬では不十分であるため、新しい治療原理による新規薬が必要とされている。本研究ではこれまでにない新しい手法で新規化合物を発見したため、大きな足掛かりになると考えている。本研究では特定の分子表面構造を標的とする阻害剤の探索に成功した。分子表面からタンパク質機能の阻害を行う化合物の探索手法はまだ十分に整備されていないため、我々が構築した方法はそうした課題の解決につながるものである。我々の手法は実験と計算科学を融合した新しい手法で幅広い応用の可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A multi-step structure-based virtual screening (SBVS) targeting the outer surface region of D-amino acid oxidase (DAO) was conducted, narrowing down compounds from a library. The interaction information of existing DAO inhibitors was not used as a prerequisite. After the final SBVS step and selection by consensus ranking, five compounds were examined by in vitro experiments. One of these compounds showed significant inhibitory activity against DAO. The obtained docking poses were classified using machine learning and evaluated with molecular dynamics. The characteristics of its interaction were entirely different from those of the other DAO inhibitors.

研究分野：計算タンパク質構造学

キーワード：バーチャルスクリーニング タンパク質表面 計算科学 分子動力学 機械学習

### 1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸酸化酵素(DAO)は、幅広い種類の D-アミノ酸を酸化的に分解する酵素である。D-アミノ酸はタンパク質を構成する L-アミノ酸の鏡像異性体であり、ヒトを含めた多様な生命体に微量に存在する。D-アミノ酸の一種 D-Ser は、グルタミン酸受容体(GluR)の活性調節を担うコアゴニストである(図1)。D-Ser の脳内量の低下は GluR の機能低下を導き、統合失調症の発症要因の1つになると考えられている。旧来より知られる発症機構仮説であるドーパミン仮説に基づいた治療(ドーパミン受容体阻害薬剤の処方)では、陽性症状以外の症状(陰性症状や認知機能障害)に対する効果が乏しい。一方、GluR の機能低下によりそうした症状が説明できることから、GluR の機能改善が統合失調症治療の決定打となる可能性が強く期待されている。そこで我々は、脳内の D-Ser を分解してしまう DAO の活性を抑制することで、GluR の機能が回復するのではないかと考えている。D-Ser の投与により統合失調症の症状が改善した報告例は複数ある。しかし、そのためにはきわめて大量の D-Ser 投与が必要であることや、そうした処方が腎機能障害等を導くことから、現実的な治療法として考えられてはいない。また、これまでに数多くの種類の DAO 阻害剤が報告されたが、いずれの阻害剤も阻害活性が不十分であったり、毒性等の問題を示したりしたことから、これまで統合失調症の治療薬として利用されていない。

我々の研究室ではこれまでにヒト DAO の結晶構造を解明し、その阻害機構を解明した(Kawazoe, Fukui et al. 2006, 2007)。以来、世界で DAO 阻害剤の開発競争が生じ、現在まで 100 種類を超える阻害剤が報告されている。これまで報告された DAO 阻害剤のほとんどが DAO の基質結合部位を標的とした化合物である。この部位にはチロシン、アルギニンと FAD が存在することから芳香環と親水基を併せ持つ化合物が阻害剤として多く報告されてきた。さまざまな阻害化合物との複合体構造が明らかにされ、この部位の基質結合ポケットが柔軟な構造をしていることが明らかになっている。このことから、今後もこの部位を標的とした新しい骨格を持つ阻害剤が開発される余地は十分に残されていると考えられる。しかし、我々は DAO 阻害剤の実用化加速に向けてこれまでの多くの阻害剤と異なる阻害原理に基づく新たなカテゴリーの化合物の探索を求めた。そのため新たな基本骨格を検討したり、基質結合部位とは異なる新しい標的部位を探索したりしてきた。

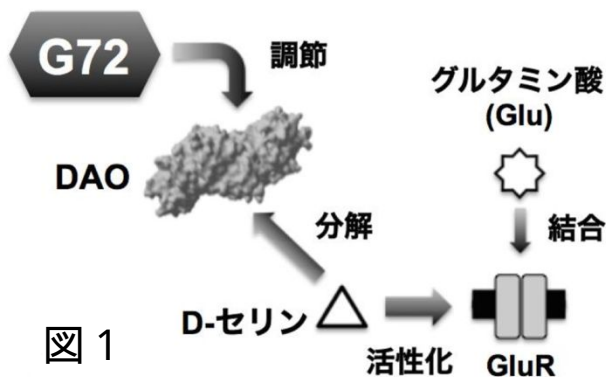


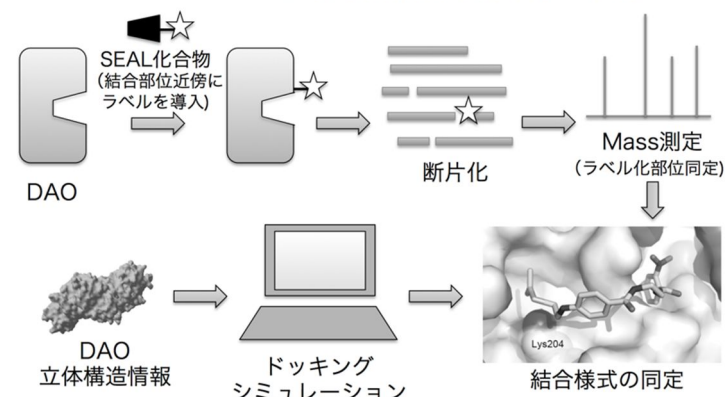
図1

### 2. 研究の目的

本研究における目的は、これまでの研究で標的にされてきた基質ポケット以外の部位を認識する阻害剤の創出である。その実現可能性については、G72 タンパク質の存在から十分に示唆される。G72 タンパク質は DAO の活性を調節する因子と考えられているが、そのサイズを考慮すると G72 が DAO 基質ポケットに侵入すると想定することは困難なため、DAO の分子表面に相互作用することで機能を発揮していると考えられている。我々は de novo 法による立体構造予測手法により G72 の構造予測を行うことに成功したが(Kato and Fukui 2017)、その阻害機構の詳細は未解明である。

一方、DAO が分子表面からの阻害を受ける可能性について、低分子化合物 4-bromo-3-nitrobenzoic acid (BNBA)を用いた我々の研究からも示された (Kohiki, Kato et al. 2017)。この研究ではまず、ドッキング解析により DAO 分子表面の有用 groove の探索を行った。ついで BNBA と結合させた SEAL 化合物を合成し DAO に反応させることで、DAO 分子表面の有用 groove の存在を実証することに成功した(図2)。SEAL 化合物は、タンパク質分子表面の groove 構造を認識し、その周辺にラベル基を転位させる性質を持つ。ラベル化された DAO を断片化、MS 解析することにより groove の位置を特定出来るため、その結果がドッキング

### 図2 SEAL化合物とドッキング解析による薬物結合様式の同定



解析の結果と一致すれば有用な表面 groove の同定に成功したと言える。こうした研究により、DAO の分子表面には BNBA との特異的結合が可能な有用 groove が 2 か所存在することが明らかになった。また、これらの groove の位置は、これまで報告された G72 結合部位の近傍であったことから、G72 による DAO 阻害機構と共通の機構により BNBA による阻害を受けている可能性もあると考えられる。

そこで本研究では、DAO の分子表面の有用 groove を標的として計算科学によるバーチャルスクリーニングを実行することで新規の阻害化合物を創出することを目指した。

またこうした研究と並行して基質結合部位を標的として新しい基本骨格を持つ阻害化合物を創出し計算科学的なアプローチで解析することも試みた。さらに新たな阻害化合物の標的部位として役立てるため、DAO 分子表面のアミノ酸置換が活性に及ぼす影響について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) FAD 結合部位周辺の表面グルーブを標的としたバーチャルスクリーニング研究  
**この研究については論文未発表のため後日改めて報告致します。**

(2) DAO 基質結合部位周辺の表面ループ領域の構造機能解析  
DAO の分子表面に存在する Lid ループにおけるアミノ酸置換変異(P219L)を導入し、大腸菌発現系を用いてタンパク質を発現させカラムクロマトグラフィーにより精製した。また、生理的 FAD 濃度における DAO を再現するためにアポ状態の DAO を調製した後に FAD を添加して DAO-FAD 複合体を再構築させた。ホロ DAO とアポ DAO について活性測定を行うことで WT と P219L の酵素キネティクスパラメータを求めた。WT と同様の結晶化条件において P219L の結晶化に取り組み、その結晶構造解析を行なった。ディフラクションデータの収集には高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー-BL5A を用い、iMosfilm, X-ray Detector Software, MolRep, Coot を用いて分子置換によるモデリングを行ない Phenix により精密化を行なった。

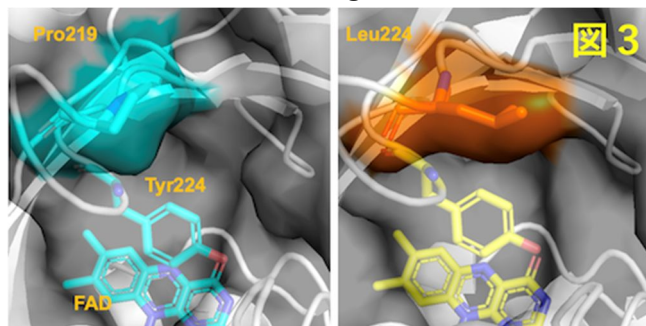
(3) 新規 DAO 阻害剤の分子動力学による阻害機構解析  
チオフェンカルボン酸誘導体の阻害活性測定はプレートアッセイによる測定で行われた。DAO の生成物の定量はペルオキシダーゼと  $\alpha$ -フェニレンジアミンの存在下で行われた。DAO は上述と同様の方法で発現、精製、結晶化がなされた。5-クロロチオフェン-2-カルボン酸(**1c**)または 5-クロロチオフェン-3-カルボン酸(**2b**)はディフラクション実験の事前に結晶に対して添加された。X 線の照射はフォトンファクトリー-AR NW12A あるいは SPring-8 BL44XU で実施された。上記と同様の方法により分子置換により構造決定された。  
分子動力学計算の初期構造として **2b** との DAO 複合体構造(PDB コード: 5zj9)および 4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylic acid (TPC)との複合体構造(PDB コード: 3znn)が用いられた。リガンドの構造と電子分布は HF/6-31G(d) 基底関数を用いて Gaussian 09 により計算された。antechamber を用いて RESP 電荷に変換され gaff 形式の力場が用いられた。ポリペプチド鎖については ff14SB 力場が用いられた。DAO-リガンド複合体初期構造モデルは TIP3P 溶媒による箱の中に構築された。NaCl 濃度は 0.15M として設定された。  
エネルギー最小化計算では non-bonded interaction について 10 のカットオフを用いた。各最小化計算の最初の 5000 ステップで steepest descent minimization を行い、引き続き 5000 ステップの conjugate gradient minimization を行なった。Particle Mesh Ewald 法を体積一定の periodic boundary condition で適用した。1 回目のエネルギー最小化計算では溶媒分子についてのみ計算を行い、2 回目で系全体について計算した。heating 分子動力学では体積一定の条件で系を 0 から 310K まで変化させ実行した。温度制御は collision frequency として 2.0 ps<sup>-1</sup> の条件で Langevin dynamics を用いて行なった。SHAKE アルゴリズムにより水素を含む結合長を固定して 2 fs のステップサイズを適用した。heating と平衡化の分子動力学では水素以外の溶質原子の運動には制約を加えた。production 分子動力学において、すべての溶質への制約は取り外し圧力一定の条件で計算を行なった。結合自由エネルギー計算は molecular mechanics with generalized Born surface area (MM/GBSA)により実行した。

### 4. 研究成果

(1) FAD 結合部位周辺の表面グルーブを標的としたバーチャルスクリーニング研究  
**この研究については論文未発表のため後日改めて報告致します。**

(2) DAO 基質結合部位周辺の表面ループ領域の構造機能解析

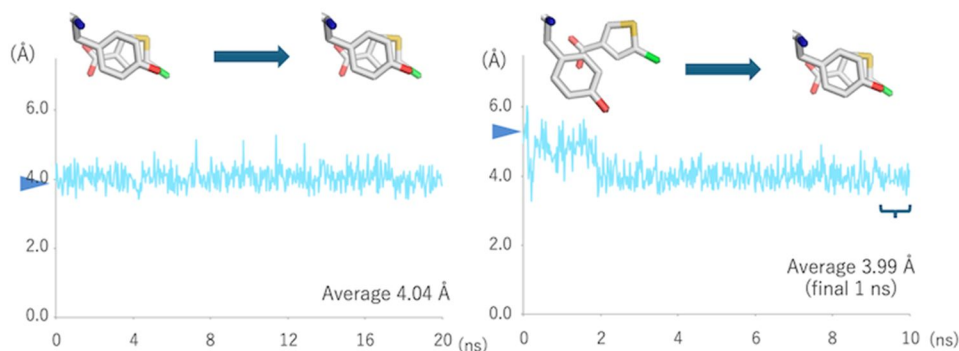
我々は、ヒト DAO の表面に露出した 219 番目のアミノ酸残基におけるプロリンからロイシンへの置換(P219L)が構造的および酵素的性質に与える影響を調べた。この部位は Lid と呼ばれる部位の一部であり活性部位近傍に位置する(図3)。219 番の残基はブタとヒトの DAO で異なるためブタ型への置換を試みた。活性測定の結果、P219L 置換タンパク質のターンオーバー数(kcat)は変わらなかったが、Km 値が野生型と比較して減少し、触媒効率(kcat/Km)が増加した。さらに、P219L は安息香酸による阻害が野生型(1.2-2.0 mM)と比較して低いKi値(0.7-0.9 mM)を示した。FAD および安息香酸と複合体を形成した P219L の 2.25 Å の分解能の結晶構造は、活性部位と Lid の構造変化を示した。P219L 複合体では、Arg283 と安息香酸の間の水素結合を形成する原子間の距離および Tyr224 と安息香酸の芳香環間の相対位置が変化していた。さらに DAO 分子表面の構造も変化していた(図3)。P219L 置換はこれらの構造変化により、基質に対する触媒効率および阻害剤への結合親和性の増加をもたらしたと考えられた。このことから新たな阻害剤の標的部としてこの部位は有望であると考えられる。P219L 構造の座標情報はコード番号 6KBP として Protein Data Bank に登録され、公開された。



### (3) 新規 DAO 阻害剤の分子動力学による阻害機構解析

一連のチオフェン-2-カルボン酸およびチオフェン-3-カルボン酸の誘導体が、新しいクラスの DAO 阻害剤として同定された。構造活性相関(SAR)研究により、チオフェン-2-カルボン酸およびチオフェン-3-カルボン酸の骨格のチオフェン環に小さな置換基が受け入れられることが明らかになった。阻害活性の高いチオフェンカルボン酸誘導体と複合体を形成したヒト DAO の結晶構造から、Tyr224 が阻害剤のチオフェン環と密接に重なり合い、他の阻害剤と DAO の複合体で見られるセカンダリポケットが消失することが示された。チオフェン誘導体との複合体の分子動力学シミュレーションにより、シミュレーションの初期状態で Tyr224 が重なっているかどうかに関わらず、Tyr224 が重なったコンフォメーションが好まれることが示された(図4)。MM/GBSA による結合自由エネルギー計算により、Tyr244 とチオフェン系阻害剤との間にかなりの疎水性相互作用があることが示された。さらに、スタックされたコンフォメーションの Tyr224 を含む広範な水素結合ネットワークにより、活性部位がしっかりと閉じられた。チオフェンカルボン酸のチオフェン環への大きな分岐側鎖の導入は、阻害活性を著しく低下させた。これらの結果は、Tyr224 の再配置によりセカンダリポケットに延びる分岐側鎖で阻害活性を増すことができる他の DAO 阻害剤とは顕著に対照的である。これらの洞察は、新しい骨格を持つ DAO 阻害剤の最適化を目指す将来の取り組みにおいて特に重要であると考えられる。また DAO の阻害剤創出において構造生物学と分子動力学による解析が DAO の詳細な阻害機構に関する洞察を生み出すことが示された。DAO-リガンド複合体構造の座標情報は PDB コード 5zj9, 5ZJA として Protein Data Bank に登録され、公開された。

図 4



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 加藤 有介, 鈴木 和男	4. 巻 40
2. 論文標題 分子動力学を利用したインフルエンザウイルス薬物耐性機構の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 シミュレーション	6. 最初と最後の頁 144-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yusuke Kato, Kazuhiro Takahashi, Fuyu Ito, Shoichi Suzuki, Kiyoshi Fukui, Masakazu Mimaki, Kazuo Suzuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Novel oseltamivir-resistant mutations distant from the active site of influenza B neuraminidase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of biomolecular structure and dynamics	6. 最初と最後の頁 3491-3500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07391102.2020.1765872	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 Rachadech Wanitcha, Kato Yusuke, Abou El-Magd Rabab M, Shishido Yuji, Kim Soo Hyeon, Sogabe Hirofumi, Maita Nobuo, Yorita Kazuko, Fukui Kiyoshi	4. 巻 168
2. 論文標題 P219L substitution in human D-amino acid oxidase impacts the ligand binding and catalytic efficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 557 ~ 567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa083	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 該当する
1. 著者名 Kohiki Taiki, Kato Yusuke, Denda Masaya, Nishikawa Yusuke, Yorita Kazuko, Sagawa Ikuko, Inokuma Tsubasa, Shigenaga Akira, Fukui Kiyoshi, Otaka Akira	4. 巻 2018
2. 論文標題 Development and application of novel protein labeling reagent "SEAL".,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 104 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Yusuke Kato, Niyada Hin, Nobuo Maita, Ajit G. Thomas, Sumire Kurosawa, Camilo Rojas, Kazuko Yorita, Barbara S. Slusher, Kiyoshi Fukui, Takashi Tsukamoto	4. 巻 159
2. 論文標題 Structural basis for potent inhibition of d-amino acid oxidase by thiophene carboxylic acids.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 23-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2018.09.040	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yusuke Kato, Nobuo Maita, Taiki Kohiki, Sumire Kurosawa, Yusuke Nishikawa, Ikuko Sagawa, Masaya Denda, Tsubasa Inokuma, Yuji Shishido, Kazuko YORITA, Akira Shigenaga, Akira Otaka, Kiyoshi Fukui
2. 発表標題 Combined approach of computation and enzymology to investigate novel D-amino acid oxidase inhibitors.
3. 学会等名 The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	福井 清  (Fukui Kiyoshi)  (00175564)	徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・非常勤講師   (16101)	

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		
タイ	Udon Thani Rajabhat University		
米国	Johns Hopkins University		