

令和 2 年 4 月 3 日現在

機関番号：32607
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K14875
研究課題名(和文) 低分子量のPPI阻害剤開発のためのインシリコ・フラグメントマッピング法の確立

研究課題名(英文) Development of in silico fragment mapping method for discovery of small-molecule PPI inhibitors

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) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質-タンパク質間相互作用(PPI)は様々な生命現象に関与するため、新しい創薬標的として注目されている。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PPI標的に適用するための計算条件を検討し、実際にPPI阻害剤を複数同定することに成功した。これにより、新しい計算機的FBDD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

PPI阻害剤の開発支援を目的とした従来の計算手法の多くは、結合フラグメント予測の際のドッキング計算の精度が問題となっていた。一方で、インシリコ・フラグメントマッピング法はドッキング計算に依らない知識ベースの計算手法であるため、従来法の弱点を補完することが可能となる。本手法の確立により、フラグメント情報に基づく化合物の高速スクリーニングや合理的設計など、高難易度なPPI標的における創薬加速が期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein-protein interactions (PPIs) are highly involved in most cellular processes, and thus the discovery of PPI inhibitors is considered as a promising therapeutic strategy for several diseases. In this study, we optimized the protocol of our in silico fragment mapping method for the PPI inhibitor searching, and then successfully identified the lead compounds for the development of the inhibitors for several PPI targets. These results demonstrated the utility of our in silico fragment method as a novel computational fragment-based drug design (FBDD) methodology.

研究分野：創薬化学

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 PPI阻害剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質-タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction: PPI) は様々な生命現象を制御する重要な過程であり、新しい創薬標的としても注目されている。PPI を標的とする阻害剤としては抗体やペプチドも報告されているが、製造コストや細胞膜透過性の観点からは分子量 500-600 以下の低分子阻害剤の開発が望まれている。

PPI を構造的に見ると、(1) 比較的狭い領域で相手タンパク質中のペプチド鎖と相互作用する PPI、および(2) タンパク質同士が広い領域で相互作用する PPI、の 2 つに大別できる。このうち、前者の PPI ではペプチド鎖を模倣した分子設計による低分子阻害剤が報告され始めている一方で、後者の PPI は相互作用界面が広く平坦であるため、タンパク質表面の深いポケット構造を標的とする従来の High Throughput Screening (HTS) やインシリコ手法では低分子阻害剤の探索や設計が困難であった。

このような状況の中で、分子量 300 以下のシンプルで小さな化合物を用いたフラグメントベース創薬 (Fragment-Based Drug Discovery: FBDD) が低分子 PPI 阻害剤を開発するための戦略として注目されている。フラグメントは広く平坦な PPI 界面に離散的に存在する小さなサブポケットに結合できるため、深いポケット構造を持たない PPI 界面に結合する低分子の探索や設計に適している。インシリコ手法は利便性や高速性の観点から FBDD における第一選択として有効であるが、これまでに報告されているインシリコ・フラグメントドッキング法は、PPI に適用する上では原理的に精度が低いという問題もあった。申請者らの研究室では、従来法とは原理の異なる知識ベースのインシリコ・フラグメントマッピング法を開発してきたため、それを PPI に適用することで従来法の欠点を補完できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、FBDD による低分子 PPI 阻害剤の開発を支援する新しいインシリコ手法の確立を目的として、インシリコ・フラグメントマッピング法の PPI 標的への適用、および本手法と従来法を単独または補完的に用いる新しいインシリコ FBDD 方法論の構築を目指した。

具体的には、(1) インシリコ・フラグメントマッピング法を PPI 標的に適用することの妥当性を示す、(2) 実際の PPI 創薬研究を通じて本手法の有効性を実証する、(3) 本手法と従来法を比較し、互いの得手不得手や本手法の特徴を明確にする、という各項目を実施することとした。

3. 研究の方法

(1) インシリコ・フラグメントマッピング法を PPI 標的に適用することの妥当性の検証

本手法を PPI に適用することの妥当性の実証を目的として、阻害剤や相互作用タンパク質との複合体構造が既知である STAT3、Interleukin-2 および Bcl-xL 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を複合体構造と比較した。

インシリコ・フラグメントマッピングには、当研究室で構築したサブサイト-フラグメントデータベースおよび類似性探索プログラムである Fsubsite を用いた。サブサイト-フラグメントデータベースは、PDBbind データベースから精選した 9,277 個のタンパク質-リガンド複合体結晶構造中のリガンドをフラグメント化し、結晶構造中で各フラグメントから 4 Å 以内に存在するアミノ酸残基をそのフラグメントが結合する部分構造 (サブサイト) と定義した後に、得られたサブサイト-フラグメントペアの構造情報をデータベース化したものである。次に、Fsubsite プログラムを用いて、標的タンパク質上でサブサイト-フラグメントデータベース中のサブサイトと構造やアミノ酸組成が類似した部位を同定した。データベース中で各サブサイトと結合しているフラグメントは標的タンパク質上の類似部位とも結合する可能性が高いため、標的タンパク質上に結合フラグメントとしてマッピングした。

(2) PPI 創薬研究におけるインシリコ・フラグメントマッピング法の有効性の検証

タンパク質同士が広い領域で相互作用する PPI として、Rac1-GEF、USP7-HDM2、およびインフルエンザ RNA ポリメラーゼの PA-PB1 サブユニット間相互作用の PPI 阻害剤を探索した。

はじめに、Rac1、USP7 および PA それぞれについて、相手タンパク質との相互作用界面に対してインシリコ・フラグメントマッピング法によるフラグメントマッピングを実施した。サブサイト類似性等を考慮して、10-20 個程度の代表フラグメントをそれぞれ選択した。

次に、代表フラグメントの物理化学的性質や標的タンパク質の相互作用様式に基づいて、芳香族性、疎水性、水素結合受容性/供与性といった特性球を配置した。標的タンパク質由来の排除体積と合わせて、3次元ファーマコフォアモデルを構築した。各 3次元ファーマコフォアモデルを満たす化合物を市販化合物データベースから探索した (SYBYL-X 2.0, UNITY Flex Search)。

得られた化合物を各標的タンパク質構造に対してドッキングし、ドッキングスコア上位の化合物を選択した (Schrödinger Suite, Glide)。化合物選択の閾値となるドッキングスコアは、既知阻害剤のドッキング結果に基づいてそれぞれ設定した。

次に、化合物の構造類似性や物性などを考慮して、それぞれ代表候補化合物を選択した。得られた代表候補化合物について、阻害活性の有無や IC₅₀ 値を *in vitro* で測定した。

(3) 従来法との比較と手法の特徴抽出 (未実施)

当初の予定では、これまでに PPI 界面上のホットスポットを同定した実績が複数報告されている FTMap プログラムなどを用いて(1)および(2)と同様の解析を行い、マッピングされたフラグメントやインシリコ・スクリーニングにおける活性化化合物のヒット率などを比較する予定であった。研究期間内での実施は困難であったが、今後の検討事項として解析を進める予定である。

4. 研究成果

(1) インシリコ・フラグメントマッピング法を PPI 標的に適用することの妥当性の検証

インシリコ・フラグメントマッピングによって得られたフラグメントを複合体構造と比較したところ、同一または類似した部分構造が多く見られた。図 1 に示した STAT3 の例では、pY705 や L706 の結合部位周辺に類似したフラグメントが多くマッピングされていた。したがって、本手法を用いることで PPI 界面に結合するフラグメントを正しく同定できると結論した。

また、得られたフラグメントの中には、対応するリガンド/アミノ酸とは構造や性質が大きく異なるものも存在した (STAT3 では、A703 の結合部位周辺や相互作用界面の右上の領域に相当する)。これらフラグメントを利用することにより、既知リガンドとは異なる分子骨格を有する阻害剤も設計できると期待される。

フラグメントマッピング結果

STAT3二量体結晶構造

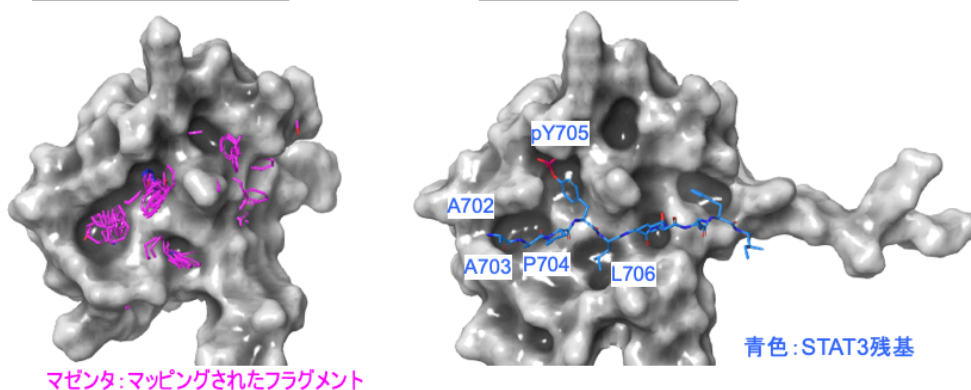


図 1 STAT3 に対するインシリコ・フラグメントマッピング結果

(2) PPI 創薬研究におけるインシリコ・フラグメントマッピング法の有効性の検証

① Rac1-GEF 間相互作用

インシリコ・フラグメントマッピングで得られた 23 個の代表フラグメントに基づいて構築した 3 次元ファーマコフォアモデル (図 2) を用いた UNITY Flex Search により、約 1,500 万個の市販化合物から 128,669 個の有望な化合物が得られた。これらを Rac1 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 8 化合物を選択した。In vitro アッセイの結果、2 化合物について各 100 μ M 存在下で 33.3%および 43.9%の阻害活性が観測された。これら化合物の Rac1 結合様式は図 3 のように予測された。

フラグメントマッピング結果

3次元ファーマコフォアモデル

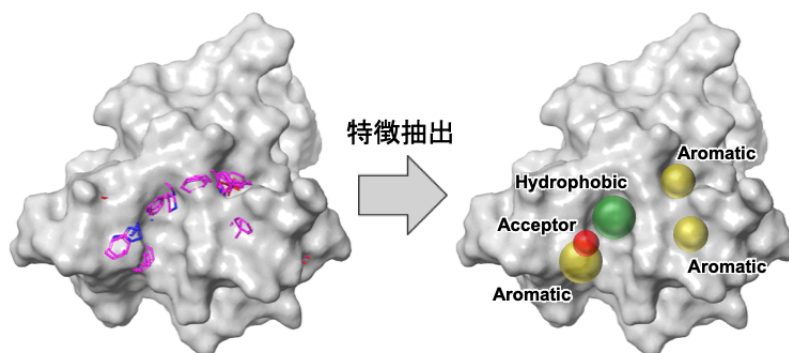


図 2 代表フラグメントおよび 3 次元ファーマコフォアモデル

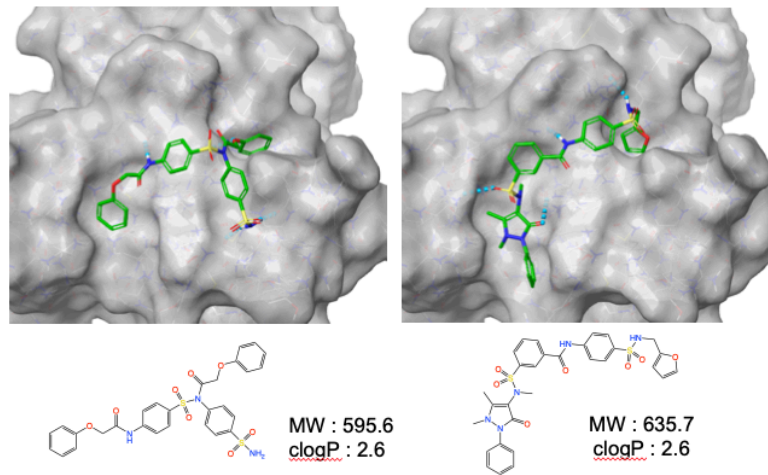


図3 ヒット化合物の Rac1 結合様式

②USP7-HDM2 間相互作用

インシリコ・フラグメントマッピングで得られた代表フラグメントに基づいて合計 6 パターンの 3 次元ファーマコフォアモデルを構築し、UNITY Flex Search を実施したところ、約 486 万個の市販化合物から合計で 19,230 個の有望な化合物が得られた。これらを USP7 の立体構造に対してドッキングし、ドッキングスコアの良い 42 化合物を選択した。最終的に選抜した 2 化合物は HDM2 ペプチドと同様の結合部位に良好なドッキングスコアで結合していることから、USP7-HDM2 間を効率的に阻害すると期待される。

③インフルエンザ RNA ポリメラーゼ PA-PB1 サブユニット間相互作用

インシリコ・フラグメントマッピングで得られた 20 個の代表フラグメント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 により、約 515 万個の市販化合物から 2,944 個の有望な化合物が得られた。これらを PA 結晶構造に対してドッキングし、ドッキングスコアの良い 9 化合物を選択した。*In vitro* アッセイの結果、2 化合物が IC₅₀ 値 42 μM および 60 μM でインフルエンザ RNA ポリメラーゼの cap-snatching 反応を阻害することが明らかとなった。これら化合物の Rac1 結合様式は図 4 のように予測された。

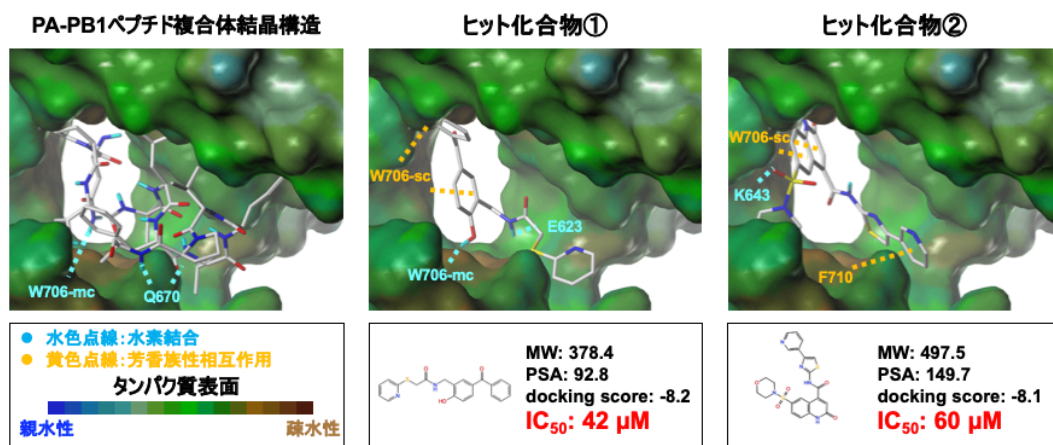


図4 ヒット化合物の PA 結合様式

以上の知見は、PPI 創薬におけるインシリコ・フラグメントマッピング法の有効性を実証するものである。今後は、これらリード化合物に基づく化合物探索・設計を進める。また、他の類似手法との性能比較を行い、本手法の有効性の更なる検証や特徴抽出を行う予定である。

最後に、本研究課題で用いたインシリコ・フラグメントマッピング法は、タンパク質表面の部分構造の類似性に基づいて結合フラグメントを予測する知識ベース手法である。最近になって、タンパク質表面の部分構造の類似性を解析する同様のインシリコ手法として、AlphaSpace や PatchSearch が報告された。しかしながら、これら手法はタンパク質表面のサブポケットの物理化学的性質や druggability の評価、あるいは結合ポケットの構造類似性に基づくドラッグリポジショニングを指向したインシリコ手法であり、PPI 阻害剤の開発を目的とした FBDD には必ずしも適していなかった。それに対して、申請者らの手法はタンパク質表面のサブポケットの同定から結合フラグメントの予測までを同時に行う。本研究課題の成果を応用することにより、フラグメント情報に基づいた高速スクリーニングや化合物の合理的設計、NMR や X 線結晶構造解析など比較的高コストの生物物理学的アッセイを実施する前のプレフィルターとしての役割などを通じて、高難易度な PPI 標的における創薬加速が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Misawa Kensuke, Ozawa Shin-ichiro, Yoshida Tomoki, Nakagome Izumi, Yamaotsu Noriyuki, Hirono Shuichi	4. 巻 139
2. 論文標題 Identifying Inhibitors of USP7-HDM2 Protein-Protein Interaction (PPI) by the <i>in Silico</i> Fragment-mapping Method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 827 ~ 835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.19-00006	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宇田 康佑, 小澤 新一郎, 広野 修一
2. 発表標題 In silicoフラグメントマッピング法によるインフルエンザRNAポリメラーゼのサブユニット間相互作用阻害剤の探索
3. 学会等名 第47回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤 新一郎, 北村 祐万, 広野 修一
2. 発表標題 Rac1-GEF間相互作用阻害剤の計算機的フラグメントベース創薬
3. 学会等名 第47回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ozawa S, Kitamura Y, Yamaotsu N, Hirono S
2. 発表標題 Discovery and development of Rac1-GEF interaction inhibitors using in silico fragment mapping method
3. 学会等名 XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2018) (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
--	---------------------------	-----------------------	----