

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07012

研究課題名(和文) 中性子線の先駆的利用によるBRD4選択的阻害剤の創出

研究課題名(英文) Development of a selective BRD4 inhibitor by neutron protein crystallographic analysis

研究代表者

横山 武司 (Yokoyama, Takeshi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：50524162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：BRD4と阻害剤複合体の中性子結晶構造解析に成功し、水素原子を含む全原子の位置を決定した。これにより、阻害剤結合部位の水分子クラスターの水素結合ネットワークの全貌を明らかにした。また、等温滴定カロリメトリーによってイソリキリチゲニンとBRD4の結合はエンタルピー駆動であり、選択的阻害に有利な特徴をもつことを明らかにした。イソリキリチゲニンはBRD4結合の際に水分子クラスターを再編成することによって好ましいエンタルピー変化を得ていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRD4を阻害する化合物はさまざまながんに対する治療薬になると期待されている。しかし、プロモドメインをもつタンパク質は多くあるため、副作用の観点から特異的にBRD4に結合し、その機能を阻害する薬剤の開発が望まれている。本研究の成果は、選択的結合に適した官能基と結合様式を同定したことであり、選択的BRD4阻害剤の開発を進めるうえで重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Neutron crystal structure of the BRD4-inhibitor complex was successfully determined, and the positions and occupancies of the hydrogen and deuterium atoms in the protein were precisely determined. This analysis revealed the whole picture of the hydrogen bond network of the water cluster located at the substrate binding site. In addition, the binding of isoliquiritigenin to BRD4 was shown to be enthalpy-driven by isothermal titration calorimetry, suggesting that isoliquiritigenin have an advantage in selective binding to BRD4. Previous X-ray crystallography showed that the binding of isoliquiritigenin to BRD4 induced an arrangement of the water clusters. Collectively, the favorable enthalpy change in the binding of isoliquiritigenin to BRD4 could be obtained by the rearrangement of the hydrogen bond network of the water cluster.

研究分野：構造生物学

キーワード：中性子結晶構造解析 BRD4 等温滴定カロリメトリー イソリキリチゲニン エンタルピー 水素結合  
水分子クラスター プロモドメイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プロモドメインはヒストンのアセチル化リシンを認識するタンパク質ドメインであり、約 110 アミノ酸からなる。プロモドメインをもつ Bromodomain-containing protein 4 (BRD4)は、ヒストンに結合することで遺伝子発現を制御する。BRD4 阻害剤は、がん遺伝子の発現を抑制することが知られており、さまざまながんの治療薬になると期待されている。JQ1 は、近年注目されている BRD4 阻害剤の一つであり、さまざまな悪性腫瘍細胞の増殖を抑えることが知られている。しかし、JQ1 は精巢特異的アイソフォーム BRDT も強く阻害するため、男性不妊等の副作用が懸念されている。副作用を抑えるためには、BRD4 を特異的に阻害する化合物の開発が必要である。

創薬研究の蓄積により、副作用の少ない薬剤は、標的タンパク質との結合がエンタルピー駆動型であることが多いことがわかってきた。つまり、副作用の少ない薬剤を創出するには有利な結合エンタルピーを獲得できるように設計する必要がある。有利な結合エンタルピーは強い水素結合などの形成によって生じるため、X 線結晶構造解析法を用いて結合様式や相互作用を観測することが、薬剤設計に有効である。しかし、X 線は電子によって散乱されるため、電子の少ない水素原子の感度が低い。タンパク質の X 線結晶構造解析では、水素原子の観測は難しく、水素結合アクセプター・ドナー、側鎖のプロトン化状態、水分子の双極子モーメントなど、水素結合を定量化するために必要な情報が欠落している。選択的に作用する薬剤を論理的に設計するには、水素原子を含んだ“完全な”複合体構造情報が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、中性子結晶構造解析法による水素原子の直接観測を基盤として、BRD4 を選択的に阻害するエンタルピー駆動型阻害剤を開発することを目的とする。BRD4 - 阻害剤複合体の中性子結晶構造解析を行い、水素結合情報を入手する。さらに、等温滴定型カロリメトリー(ITC)によって、BRD4-阻害剤の相互作用における熱力学的パラメーターを入手する。この二つの情報を統合し、特異的に BRD4 に結合する阻害剤に必要な要素を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 中性子結晶構造解析を行うための試料作製を行った。当初は BRD4 阻害剤として JQ1 を使用していたが、中性子回折実験に必要な大きさの結晶を作成することが困難であったため、最終的にコルヒチンを使用した。コルヒチンは BRD4 を阻害することが知られている天然化合物の一つである。中性子は軽水素によって強い非干渉性散乱を生じ、バックグラウンドをあげてしまう。これを避けるために、タンパク質は、重水素で作成した緩衝液(3.1 mM Tris、16.9 mM Tris-HCl、150 mM NaCl)に置換し、使用する結晶化溶液などはすべて重水で作成した。BRD4-コルヒチン複合体の大型結晶は、390  $\mu$ L のタンパク質液滴(3 mg/mL BRD4、0.5 mM コルヒチン、1.5 M ギ酸ナトリウム、8.1 mM Tris、41 mM Tris-HCl)をカバーガラス状に静置し、グリースで密封したウェルの中で 5 mL の結晶化溶液(2.9 M ギ酸ナトリウム、17 mM Tris、83 mM Tris-HCl)と平衡化することによって得られた。この方法によって、中性子回折測定に適した 2 mm<sup>3</sup>程度の大きさの結晶が得られた。回折実験はドイツの研究用中性子源ハインツ・マイヤー・ライプニッツ研究用原子炉に建設されたタンパク質回折計 BIODIFF で行った。一枚当たり 0.3 度の振動角で 30 分照射することによって、289 枚の回折画像を収集した。回折強度計算およびスケージングは BIODIFF 向けに最適化した積分強度計算ソフトウェア HKL2000 を用いた。構造精密化は X 線データと同時に XN ジョイント精密化を行い、ソフトウェア PHENIX.REFINE を用いた。精密化後の構造情報データは Protein Data Bank に登録した(登録番号:6AJZ)。

(2) 等温滴定カロリメトリーでは、化合物溶液にタンパク質溶液を滴定することによって発生する熱量を測定し、カーブフィッティングにより熱力学的パラメーターを得た。用いた化合物は JQ1、イソリキリチゲニン、そして二種類のイソリキリチゲニン誘導体である。滴定実験は、70  $\mu$ M 化合物に対して 700  $\mu$ M BRD4 を滴定し、どちらも 50 mM リン酸ナトリウム pH 7.4、50 mM 塩化ナトリウム、0.7% エタノールを含む緩衝液を使用した。測定には Malvern Instruments 社の MicroCal iTC200 を用いた。セルに充填した化合物溶液(208  $\mu$ L)に対してタンパク質溶液を 1 回目の 0.8  $\mu$ L とその後の 18 回の 2.0  $\mu$ L を滴定し、それぞれの滴定後 180 秒経過した後に次の滴定を行った。滴定中はサンプルセルを 750 rpm で攪拌した。サーモグラムの積分は NITPIC、カーブフィッティングは SEDPHAT を用いて計算した。

(3) 中性子結晶構造解析および等温滴定カロリメトリーで得られた結果から、特異的に BRD4 を阻害するために重要と思われる官能基をもつ化合物と類似性の高い化合物を選択し、BRD4 との相互作用をドッキング計算によって検証した。化合物データは、カリフォルニア大学サンフランシスコ校が運営する ZINC から仮想化合物ライブラリーを取得した。インハウスクリプトで標的化合物との類似性を数値化し、仮想化合物ライブラリーからドッキングする化合物を選定したうえで、AutoDock Vina を用いてドッキングシミュレーションを行った。

#### 4. 研究成果

(1) BRD4-コルヒチン複合体結晶をBIODIFFで回折測定を行った結果、1.85 Å分解能の中性子回折データを得た(表1)。回折データの誤差である $R_{\text{meas}}$ は12.7%で、完全性が89.3%であり、これらの数値は比較的良好なデータが得られたことを示す。X線回折データと同時に精密化するXNジョイント精密化の結果、X線回折データに対する $R$ 、 $R_{\text{free}}$ は16.3%、17.9%で、中性子回折データに対する $R$ 、 $R_{\text{free}}$ は20.4%、23.5%であった。これらの数値はどちらのデータに対しても偏りなく良好に立体構造を精密化できたことを示す。

BRD4の基質結合部位には、保存された水分子クラスターが存在する(図1)。この水分子クラスターはw0-w5の6個の水分子からなり、互いに水素結合を形成するとともに、Y97やN135と水素結合を形成していた。コルヒチンはw1から水素結合を受け入れることによってBRD4と水素結合ネットワークを形成していた。この水分子クラスターは10個の水素結合を含み、阻害剤との相互作用に大きな影響を及ぼすと考えられる。

表1. 回折データおよび構造精密化の統計値

Diffraction data	Neutron data	X-ray data
Unit cell parameters (Å)	a=36.9, b=47.1, c=79.2	a=36.8, b=47.1, c=79.1
Resolution range (Å)	30.3-1.85 (1.90-1.85)	40.5-1.3 (1.35-1.30)
Observed reflections	27170	201597 (19224)
Unique reflections	11030	33279 (3176)
Mean I/sigma(I)	7.8 (2.1)	18.9 (4)
Completeness (%)	89.3 (83.8)	96.5 (94.3)
$R_{\text{meas}}$ (%)	12.7 (52.6)	5.4 (43.1)
Refinement data		
$R_{\text{factor}}$ , $R_{\text{free}}$ (%)	20.4, 23.5	16.3, 17.9
RMSD bonds (Å), angles (°)	0.006, 0.919	
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )		
Protein, ligand, water	31.2, 25.6, 37.9	
Ramachandran plot (%)		
Favored, allowed	98.5, 1.5	
PDB ID	6A1Z	

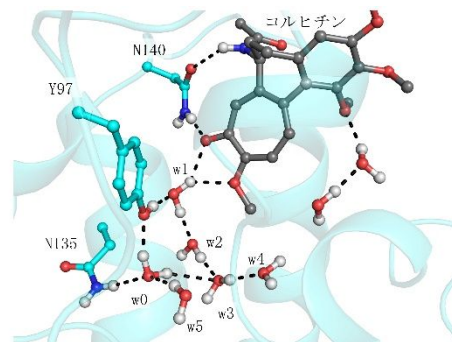


図1. BRD4-コルヒチンのXNジョイント構造

(2) 等温滴定カロリーメトリーではJQ1、イソリキリチゲニンとその2種類の誘導体を用いた。イソリキリチゲニンは、結晶構造解析スクリーニングによって筆者がBRD4阻害剤であることを明らかにした天然化合物である。BRD4-イソリキリチゲニン複合体のX線結晶構造解析から、イソリキリチゲニンはw1を排除し、Y97と直接水素結合を形成することがわかっていった。これは他の阻害剤では見られない特徴であり、この結合様式と熱力学的パラメーターの関係は、特異的阻害剤の開発に重要かもしれない。等温滴定カロリーメトリーの結果、イソリキリチゲニンのBRD4への結合はエンタルピー駆動型であることが明らかになった(表2)。解離定数 $K_d$ の値が二桁小さいJQ1と同等のエンタルピー変化であることを鑑みると、イソリキリチゲニンがいかに効率的に有利なエンタルピー変化を獲得できているかがわかる。

表2. 等温滴定カロリーメトリーによる熱力学的パラメーター

	JQ1	イソリキリチゲニン	イソリキリチゲニン 4-メチルエーテル	2',4'-ジヒドロキシ-2-メトキシカルコン
$K_d$ (μM)	0.024	9.1	5.3	11
$\Delta G$ (kcal/mol)	-10.4	-6.9	-7.2	-6.6
$\Delta H$ (kcal/mol)	-8.6	-8.2	-4.1	-5.4
$-T\Delta S$ (kcal/mol)	-1.8	1.3	-3.1	-1.2

(3) 中性子結晶構造解析と等温滴定カロリーメトリーの結果から、フェノール基をもつ化合物であれば、BRD4に結合する際にw1を追い出し、より好ましいエンタルピー変化が得られる、つまり、より選択的にBRD4に結合すると考えられる。この特徴をもつBRD4阻害剤を探索するため、まずは、ドッキング計算を行うフェノール基または類似の官能基をもつ、またはイソリキリチゲニンと類似性の高い化合物を絞り込んだ。300種類の化合物を選定し、AutoDockVinaを用いてドッキング計算を行ったところ、11種類の良好なスコア( $G = -9$  kcal/mol程度)をもつ化合物が得られた。これらの化合物を、ピオチンタグ付きのアセチル化リシンを含むヒストンペプチドを用いたプルダウン分析によってBRD4との相互作用の有無を検証した。しかし、BRD4への結合を示す結果が得られず、化合物の選定やドッキング方法を最適化する必要があると思われる。

(4) 本研究により、BRD4阻害剤結合部位内の水分子クラスター内の水素結合を詳細に特徴づけ、水素結合ネットワークの再編成により有利なエンタルピー変化が得られることが示唆された。この知見は、BRD4を選択的に阻害する化合物の開発を進めるうえで有益である。

## 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 Yokoyama Takeshi, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors: From Discovery to Current Developments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 14228 ~ 14242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.0c00934	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 Kusaka Katsuhiko, Yokoyama Takeshi, Yamada Taro, Yano Naomine, Tanaka Ichiro, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Neutron diffraction experiment with the Y116S variant of transthyretin using iBIX at J-PARC: application of a new integration method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 1050 ~ 1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320012498	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 Yokoyama Takeshi, Wijaya Peter, Kosaka Yuto, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Structural and thermodynamic analyses of interactions between death-associated protein kinase 1 and anthraquinones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 438 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320003940	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 Yokoyama Takeshi, Suzuki Ryoya, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Crystal structure of death-associated protein kinase 1 in complex with the dietary compound resveratrol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 131 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252520015614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Takeshi, Matsumoto Kazunori, Ostermann Andreas, Schrader Tobias E., Nabeshima Yuko, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 286
2. 論文標題 Structural and thermodynamic characterization of the binding of isoliquritigenin to the first bromodomain of BRD4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1656 ~ 1667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14736	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 横山武司, 水口峰之
2. 発表標題 クラウンエーテルによるトランスサイレチンアミロイド形成のアロステリック阻害
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日下勝弘, 横山武司, 山田太郎, 矢野直峰, 田中伊知朗, 水口峰之
2. 発表標題 茨城県生命構造解析装置 iBIX によるトランスサイレチン変異体の中性子回折実験
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山武司
2. 発表標題 創薬標的タンパク質の中性子結晶構造解析
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yokoyama T
2. 発表標題 Discovery of Molecular-Targeted Drugs by X-ray Crystallographic Screening
3. 学会等名 Internatinal Symposium on Diffraction Structural Bioloty 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kusaska K, Yokoyama T, Yamada T, Yano N, Tanaka I, Mizuguchi M
2. 発表標題 Neutron diffraction experiment of transthyretin variant by using iBIX at J-PARC
3. 学会等名 Internatinal Symposium on Diffraction Structural Bioloty 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山武司, 松本知憲, 北上龍太, 鍋島裕子, アンドレアス オスターマン, トビアス シュレイダー, 水口 峰之
2. 発表標題 X 線結晶解析スクリーニングによる分子標的薬の探索
3. 学会等名 日本結晶学会 令和元年(2019年)度年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------