

令和 5 年 2 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16099

研究課題名(和文)膜タンパク質に対する新規薬剤化合物の統計熱力学に基づく高速スクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Prediction Method of Drug Design for Membrane Protein on the basis of Thermodynamics

研究代表者

梶原 佑太 (Kajiwara, Yuta)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40828159

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)：新規低分子創薬開発プロセスの短期化および低コスト化に資するため、創薬標的として重要な膜タンパク質低分子化合物結合について、実験に依存せず厳密かつ高速に予測が可能な結合親和性の評価法の開発を目指した。自然現象に沿った有効な薬剤デザインを可能にするためには、その物理因子を明確にしておく必要があるため、膜タンパク質化合物の結合に伴う因子について統計熱力学理論に基づいて詳細に解析した。その結果、周辺環境における水のエントロピー効果が結合において特に重要であることが分かった。生体分子の種々の構造形成においてもこの因子は重要であるため、効率的な薬剤デザインにおいても見過ごすことができない要素であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義について：従前の水環境中における生体分子の構造形成にとって一様にして重要な水のエントロピー効果が、膜タンパク質化合物の結合においても、重要な因子であることが分かった。生体分子にとってごく自然かつ極めて重要なこの因子は効率的な薬剤開発においても重要であると考えられる。

社会的意義について：昨今バイオ医薬品の普及が期待されているが、他方で、薬効性等につき分子レベルでの理解および解析においては、低分子医薬品の開発と比べて不向きである。本件は低分子医薬品の初期開発段階における高コストが問題となっている化合物の構造最適化において、その問題解決につながる基礎研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In order to shorten and reduce small drug development process, we aim to develop a binding affinity prediction method for which we strictly and rapidly evaluate the binding of small molecules and a targeted membrane protein independent of experiments. For development of effective drug designs in line with natural phenomena, we analyzed the whole physical factors for the binding on the basis of thermodynamics.

As a result, on the binding, it is critically important that the entropy effect of water molecules in the surrounding environment. Since this factor is also necessary in various structural formations of biomolecules, therefore, it also found to be an essential element that cannot be overlooked in efficient drug design.

研究分野：理論生物物理学

キーワード：創薬 生物物理学 分子シミュレーション 計算科学 ドラッグデザイン 低分子化合物

## 1. 研究開始当初の背景

新規創薬開発の前臨床試験における化合物のスクリーニングによる標的候補化合物の同定と、その候補化合物を改変させる構造最適化の段階において、時間と労力がかかっており、新薬開発の負担となっている。コスト高となっている実験的な試行錯誤について、計算機による効率的かつ負担軽減が求められている。

計算機によって候補化合物を起点とした新薬候補化合物への構造最適化には正確な評価方法が必要であり、かつ、最適化のための試行錯誤に用いられる化合物候補は膨大にのぼるため高速に評価をする必要がある。標的蛋白質と化合物の結合親和性を正確に評価する方法としては、物理的要素から成る結合自由エネルギーに基づく方法が代表的であるが、厳密で評価する方法であるために高速に計算するためには特別な計算機を構築・設置する必要があるため、根本的なコスト削減にはつながらないのが現状である。

申請者は近年、創薬の標的として重要な膜蛋白質の構造安定性を記述できる自由エネルギー関数を開発した。膜蛋白質の構造形成において、標的の膜蛋白質と周りの周辺環境を考えると、その構造形成に伴う水素結合を代表とする静電相互作用エネルギーの獲得と、脂質分子を構成する炭化水素基の熱運動に起因するエントロピー効果が重要であるため、それらの因子に基づいた自由エネルギー関数である。その関数を用いた評価方法に基づき、膜タンパク質の耐熱化を実現できるアミノ酸置換を予測する方法論を構築し、G蛋白質共役型受容体(GPCR)に対してその有効性を実証した。多くの不活性型 GPCR Class A に共通して安定化をもたらす鍵残基とホットスポットを発見した。

本研究では、この関数を応用して、蛋白質 化合物間の結合に伴う安定性の変化量を記述する方法論を構築する。構築した方法論を用いて、膨大な数にのぼる化合物を高速で評価し、標的蛋白質に対して有効な薬剤候補化合物を提案して実験で検証する。

## 2. 研究の目的

標的膜タンパク質に関して有効な新薬候補化合物を探索すること、さらには、候補化合物を起点として膜蛋白質との結合親和性を向上させるために化合物をデザインしていくためには各々の結合親和性を正しく評価することが必要である。さらには候補となる結合状態の構造は膨大にのぼるため高速に計算する必要もある。膜タンパク質と化合物との結合について正しく評価するためにはその結合親和性を物理的観点から詳細に解析する必要があるとともに、膨大にのぼる化合物やデザインされた化合物とタンパク質との結合親和性を評価するためには、重要な因子は何かを特定して、その因子に絞った評価法を構築することが有益である。

そこで、代表的な膜タンパク質と既知化合物について、結合に伴う自由エネルギーの変化量の解析を行った。

## 3. 研究の方法

代表的な構造を持つアデノシン A2a 受容体と既知化合物(ZMA)の結合体には高解像度で構造が決定されているため、その共結晶構造を参照にした。結合前におけるタンパク質化合物各々の非結合状態や、結合後におけるタンパク質化合物結合状態の各々の構造のゆらぎを考慮するため、共結晶構造からタンパク質と化合物を引き離れたそれぞれの構造を孤立構造としてそれらの構造を用いて分子動力学シミュレーションを行った。平衡状態に達したと考察される各々の構造アンサンブルを用いて、結合に伴う自由エネルギーの変化量を解析した。

解析した自由エネルギーに関して、エネルギー項としては結合に伴う分子エネルギーや分子内相互作用エネルギー(静電相互作用およびファン・デル・ワールス相互作用)および結合に伴い損失を伴う分子 水分子間の相互作用エネルギーを解析した。エントロピー項としては結合に伴う構造エントロピー損失量の見積を計算し、溶媒のエントロピー変化量として、流体用の統計熱力学理論と物の形を定量的に扱う計測学的アプローチとの統合型理論を用いて厳密かつ高速に計算した。

## 4. 研究成果

タンパク質・化合物それぞれの非結合体構造と結合体構造の3構造について、分子動力学シミュレーションを行い、それぞれの構造が平衡状態に達したと推測されるサンプル構造を取得した。それぞれの構造を用いて、タンパク質化合物の結合に伴う自由エネルギーの変化量を計算した。当該熱力学の変化において、結合周辺箇所は水環境であるため、溶液に伴う自由エネルギー変化量は水溶媒の条件で計算した。結合に伴う変化量が大きい物理量、すなわち、結合について重要と考えられる因子に水素結合を主とする静電相互作用の獲得が挙げられるが、結合前の状態におけるタンパク質化合物といった各溶質と水分子との水素結合が切断されるため、そのことによるエネルギー損失量を勘案すると、その変化量は小さくなく、結合に重要な因子といえなかった。同様のエネルギー項として、疎水性相互作用が挙げられるが、こちらも各溶質と水分子の疎水性相互作用の損失を伴って獲得されるものであり、重要な因子とは言えなかった。各物理

因子を詳細にみると、結合に伴う水のエントロピー利得が極めて大きく、結合において特に重要な因子であることが分かった。またその結合エネルギー変化量の計算値は、実験値と約 2kcal/mol の差であり、既存の自由エネルギー予測値よりも信頼性が高かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>梶原佑太                               |
| 2. 発表標題<br>統計熱力学に基づいた膜タンパク質 化合物結合自由エネルギー関数の開発 |
| 3. 学会等名<br>第19回日本蛋白質科学会年会                     |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                         |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|-----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 林 智彦<br><br>(Hayashi Tomohiko)    | 新潟大学<br><br>(13101)   |    |
| 研究協力者 | 安田 賢司<br><br>(Yasuda Satoshi)     | 千葉大学<br><br>(12501)   |    |
| 研究協力者 | 広川 貴次<br><br>(Hirokawa Takatsugu) | 筑波大学<br><br>(12102)   |    |
| 研究協力者 | 村田 武士<br><br>(Murata Takeshi)     | 千葉大学<br><br>(12501)   |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)       | 備考 |
|-------|-----------------------------------|-----------------------------|----|
| 研究協力者 | 木下 正弘<br><br>(Kinoshita Masahiro) | 千葉大学<br><br><br><br>(12501) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |