

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03378

研究課題名(和文) 高活性化化合物を創生し創薬標的の枯渇を解消する動的構造創薬技術の確立

研究課題名(英文) Structure and dynamics based drug development to obtain highly active compounds

研究代表者

竹内 恒 (Takeuchi, Koh)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：20581284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質が機能を発揮するためには、動的な性質が極めて重要である。それはタンパク質の機能を、化合物により制御しようとする創薬科学においても同じである。本研究においては、NMR法を用いた動的構造解析により、化合物、タンパク質の両面から動的構造創薬という新しい分野の可能性を検証した。その結果、タンパク質に結合した化合物の運動性に着目し、標的タンパク質との複合体中での化合物の運動性(遊び)を定量的に評価する手法を確立した。また、創薬標的となるタンパク質の運動性に着目し、タンパク質表面の隠れた化合物結合サイト「クリプティックサイト」を同定・利用する技術を開発することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては化合物、タンパク質の両面から動的構造創薬という新しい分野の可能性を実験に基づき明確に提示し、生物学および創薬化学における新しい学術基盤を創造することを目指した。その結果、化合物の運動性に着目し高活性化化合物の創生を加速する方法、標的にできなかったタンパク質の創薬可能性(ドラッグビリティ)を再評価し創薬において大きな問題となっている創薬標的の枯渇を解消する方策を提示することに成功した。よって本研究の成果は、創薬化学に広く貢献する共に、タンパク質や化合物の機能メカニズムを解明することにも貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Dynamic properties are extremely important for proteins to perform their functions. The same is true in drug discovery, where protein functions are controlled by compounds. In this study, we examined the possibility of utilization of dynamic information obtained by solution NMR in structure-guided drug discovery. As a result, we established a strategy to quantify the mobility of each site in compounds in the target protein bound state. In addition, we succeeded in developing a strategy to identify and utilize "cryptic sites," hidden compound binding sites, on the surface of drug-target proteins.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 立体構造 運動性 薬剤設計 創薬作用点

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質が生物学的機能を発揮するためには、その動的な性質が極めて重要である。タンパク質に結合する化合物もまた、結合の際には、その配座を動的に転換する。化合物によっては、複合体中においても動的な性質が保持されることが知られており、特に近年、新たな創薬手段としての存在感を増している中分子は、その大きさも相まって、結合時の動的な傾向は顕著になる。申請者らは、ペプチドリガンドのメチル基の局所運動性に解析できる新たな NMR 手法「FCT 法」を開発し、結合界面で運動性(遊び)を残したメチル基に改変を行うことで、その親和性を改善できることを示した。本研究で、FCT 法を広く化合物に適用できるように改良することで、化合物の動的最適化への道筋を示し、高活性化合物の創生を加速することが可能になる。また、創薬標的となるタンパク質の運動性に関しては、タンパク質表面に動的に形成される隠れた化合物結合サイト「クリプティックサイト」に着目する。クリプティックサイトは、タンパク質の約 40%に存在すると試算されており(Bowman et al, PNAS, 2012)、これを活用できれば、昨今問題となっている「創薬標的の枯渇」の解消に繋がる。申請者らは NMR を用いた予備的な解析により、化合物がない状態でもクリプティックサイトを同定できることを示しており、これまで標的にできなかったタンパク質の創薬可能性(ドラッグアビリティ)を再評価することが十分に可能と考えている。すなわち、本研究を推進し、化合物や創薬標的タンパク質の動的構造を評価、活用する基盤を確立することは、今後の創薬科学の発展を促す極めて重要な基盤技術開発である。

2. 研究の目的

本研究においては、化合物と創薬標的タンパク質の運動性を溶液中で評価することで、高活性化合物の創生を加速し、創薬標的の枯渇を解消する「動的構造創薬」の基盤の確立を目指す。その際、溶液中での動的構造解析が可能な NMR 法を中心として、化合物の結合時の運動性解析から構造最適化の指針を提示する技術、タンパク質のクリプティックサイトを同定し、安定化することで創薬標的の枯渇の解消に貢献する技術を確立する。その過程においては、分子論的な親和性や熱力学特性の背景にある動的構造基盤が明らかになると期待され、本研究の推進は、生体分子の持つ運動性が、分子認識にどのような特性を生み出すか? という生物学的な問いと、その柔軟な特性を化合物の最適化にどのように利用できるか? という創薬科学的な問いに対する答えを同時に導くものである。このことにより、動的構造創薬という新しい分野の可能性を、実験に基づき明確に提示し、生物学および創薬化学における新しい学問領域の創生へとつなげる。なお、本研究の推進においては、創薬標的として重要なキナーゼ p38 および抗がん標的である Bcl-xL を用いることで、応用性と実用性を担保する。

3. 研究の方法

(1) 複合体における化合物の運動性を評価し、活性を向上させる手法の確立

申請者は、溶液 NMR 法を用いて、動的構造を創薬に活かす「動的構造創薬」の推進に取り組んできた。その結果、リガンドのメチル基の局所運動性と空間相補性を同時に解析できる新たな NMR 手法「禁制コヒーレンス転移(FCT)法」を開発した。FCT 法はその時間発展を解析することで、図 3 左下に示すように、化合物の各サイトにおける運動性や空間相補性の違いを解析可能である。当初の適用は安定同位体標識されたペプチドであったが、本研究では FCT 法を非標識の化合物の運動性解析に適用拡大することで、化合物の構造の中で、結合時に遊びが残り、相補性を向上させる余地のある部分を同定する(図 1 左)。また遊びを残す部分に改変を加えることでその活性を改善することを目指す(図 1 右)

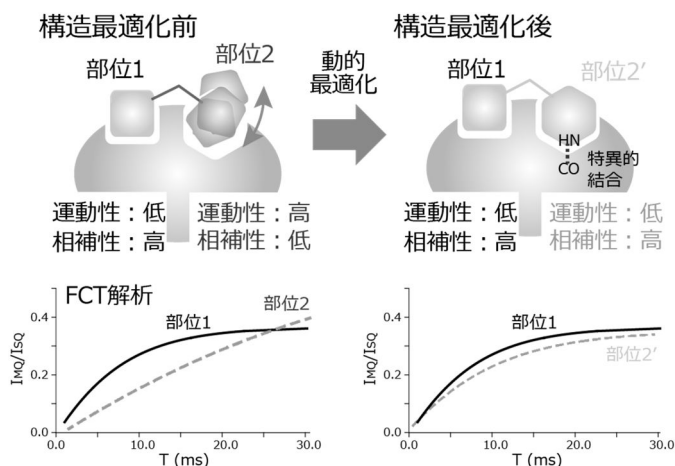


図 1: FCT 解析を用いた動的構造最適化の概念図

FCT プロファイルは運動性が低いほど傾きが急になり、相補性が高いほど最大値が小さくなる。この違いにより部位 2 の高い運動性を同定し、構造を改変する指針とする。

(2) 動的構造解析に基づくクリプティックサイトの同定・利用法の確立

本研究では、クリプティックサイトの存在が示されている抗がん標的 Bcl-xL を用いる(図 2)。非結合状態の X 線結晶構造では Bcl-xL のクリプティックサイトは閉じているが、MD 計算により

非結合状態でも一部開いた構造をとることが示唆されている (Yang et al, ACS Med Chem Lett, 2011)。そこで、低確率でも構造平衡を捉えることが可能な緩和分散法などにより、クリプティックサイトを同定する(図2左下)。申請者らの予備的検討からも非結合状態の Bcl-xL に運動性を示す残基があることが明らかとなっており(図2左下のグラフが水平でない)。その同定は十分可能である。さらに、クリプティックサイトをアロステリックに開いた状態で安定化する変異体を獲得する(図2中下)。その際には、以前の研究で確立した構造平衡を制御するアロステリック変異体を確立する手法を用いる、またその検証には、クリプティックサイト同定の際に用いた動的構造解析手法を用いる。当変異体は、クリプティックサイトへの薬剤の結合親和性が、野生形に比べ高まると期待される。そこで、2年目以降にファージディスプレイによるスクリーニングを行い、野生型よりも変異体に多くのヒットが見出されることを検証する(図2右下)。なお、変異体と野生型でクリプティックサイトの構造自体は変わらない。よって、変異体で得られたヒットは野生型に対しても結合できる。

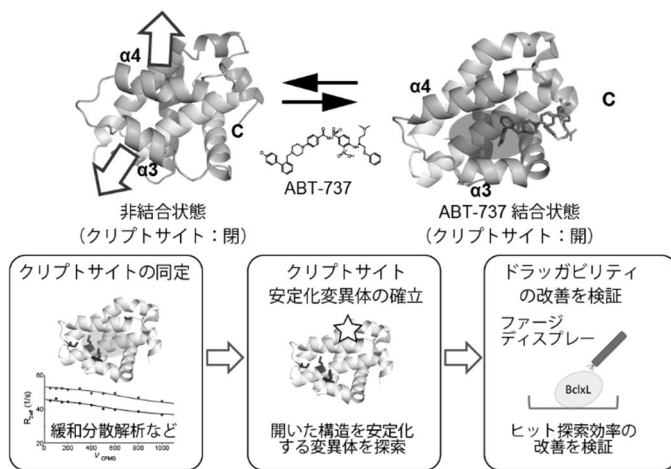


図2: Bcl-xL のクリプティックサイトと本研究の流れ

4. 研究成果

(1) 複合体における化合物の運動性を評価し、活性を向上させる手法の確立

複合体における化合物の運動性を評価し、運動性を評価し、活性を向上させる手法の確立の一環として、まず FCT 法を非標識の化合物の運動性解析に適用拡大することを目指した。FCT 法は原理的に非標識の化合物メチル基に対しても適用可能であるそこで、MAP キナーゼ p38 α の阻害剤を研究対象として、構造中に複数のメチル基を有する既知の低分子性阻害剤について、p38 α と複合体を形成した状態で、FCT 法を適用した。その結果、2つのメチル基のオーダーパラメーターをそれぞれ決定することに成功し、化合物の構造の中で、結合時に遊びが残り、相補性を向上させる余地のある部分を同定する技術を確立することができた。

そこでさらに、化合物の構造の中で特異的結合を担う箇所を区別できるかどうかを明らかにするため、化合物との特異的結合を示すアミノ酸残基に変異を加えることで、その結合活性の熱力学的変化と、化合物の結合時における運動性がどのように相関するのかを解析した。結合活性の熱力学的変化は ITC 法で、化合物の結合時における運動性は FCT 法で評価した。その結果、水素結合や芳香族相互作用といったエンタルピックで特異的結合を示す残基に変異を導入すると、そのすべてで結合時の化合物の運動性が顕著に増大することが明らかとなった。この結果は、運動性を評価することで、化合物とタンパク質の特異的でエンタルピックな結合を評価できることを示している。

(2) 動的構造解析に基づくクリプティックサイトの同定・利用法の確立

本研究ではタンパク質の運動性に関しては、タンパク質表面に動的に形成される隠れた化合物結合サイト「クリプティックサイト」に着目した。クリプティックサイトは、タンパク質の約40%に存在すると試算されており、これを活用できれば、昨今問題となっている「創薬標的の枯渇」の解消に繋がる。そこで、本研究では、抗がん剤標的タンパク質 Bcl-xL に着目した研究を行った。Bcl-xL には抗がん剤 ABT-737 などのリガンドが結合することで初めて開口するとされているクリプティックサイトが存在する(図2上)。

まず初めに、リガンドがないアポ状態においても、クリプティックサイトが開いている構造状態が一部存在するのではという期待のもと、アポ状態における構造平衡を温度依存性解析や緩和分散解析などの NMR 法により解析した。その結果、抗がん剤 ABT-737 などのリガンドが結合することで初めて開口すると考えられていたクリプティックサイトが、実は非結合状態でも滞在時間としては数%程度ではあるが、開いている状態との交換にあることが明らかとなった(図3)。

また、リガンド非結合状態における温度依存性解析を行うことで、クリプティックサイトの同定と同時に、クリプティックサイトと構造的に連動するアロステリックサイトの同定にも成功した。さらに、クリプティックサイトの開閉と連動する領域に対して複数の変異を導入し、開口に伴う化学シフト変化を指標に解析をしたところ、クリプティック

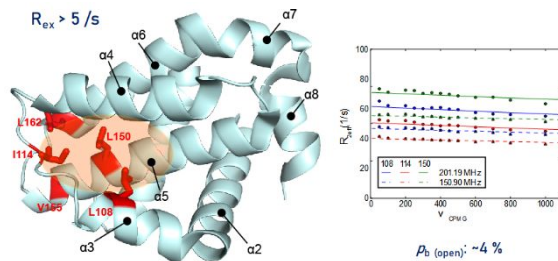


図3 リガンド非存在下での Bcl-xL 運動性

サイトを開口状態に安定化するアロステリック変異体 F143W 変異体（以下 FW 変異体）を取得することに成功した。FW 変異体はリガンド非結合状態でクリプティックサイトが約 30%程度、開口状態にあった（図 4）。

さらに FW 変異体について、クリプティックサイトに結合するペプチドに対する結合を解析したところ、親和性が約 2 倍に増大していた。さらに、FW 変異体を用いることで、クリプティックサイトに結合するリガンドのスクリーニングを効率化できることが明らかとなった。また、得られたヒットペプチドは、Bcl-xL のクリプティックサイトに結合していた。

以上の結果は動的構造解析に基づくクリプティックサイトの同定・利用を行うことで、創薬標的となりうるタンパク質の数を増大させることが可能であることを示しており、標的枯渇の問題を解消する重要な知見である。以上の結果をまとめた原著論文を執筆した(Mizukoshi et al, Sci. Adv. (2020))。

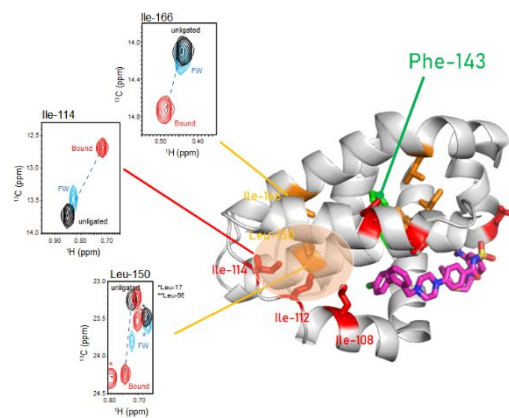


図 4 クリプティックサイト安定化変異体の NMR 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeda Fumio, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Shibasaki Misato, Sato Ryota, Shibata Takuma, Miyake Kensuke, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Shimizu Eigo, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Takeuchi Koh, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Jun Arii, Yasushi Kawaguchi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Orphan Transporter SLC35E1 in the Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0030622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00306-22	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 Takeuchi Koh, Ikeda Yoshiki, Senda Miki, Harada Ayaka, Okuwaki Koji, Fukuzawa Kaori, Nakagawa So, Yu Hong Yang, Nagase Lisa, Imai Misaki, Sasaki Mika, Lo Yu-Hua, Ito Doshun, Osaka Natsuki, Fujii Yuki, Sasaki Atsuo T., Senda Toshiya	4. 巻 30
2. 論文標題 The GTP responsiveness of PI5P4K evolved from a compromised trade-off between activity and specificity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 886 ~ 899.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2022.04.004	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 Dubey Abhinav, Viennet Thibault, Chhabra Sandeep, Takeuchi Koh, Seo Hee-Chan, Bermel Wolfgang, Frueh Dominique P., Arthanari Haribabu	4. 巻 58
2. 論文標題 ¹⁵N-Detected TROSY NMR experiments to study large disordered proteins in high-field magnets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 9512 ~ 9515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc02005j	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 Kim Jungyeon, Kobayashi Hiroka, Yokomine Marin, Shiratori Yota, Ueda Takumi, Takeuchi Koh, Umezawa Koji, Kuroda Daisuke, Tsumoto Kouhei, Morimoto Jumpei, Sando Shinsuke	4. 巻 20
2. 論文標題 Residue-based program of a -peptoid twisted strand shape <i>via</i> a cyclopentane constraint	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 6994 ~ 7000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob01300b	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 Yanagi Tomoki, Kikuchi Hiroaki, Susa Koichiro, Takahashi Naohiro, Bamba Hiroki, Suzuki Takefumi, Nakano Yuta, Fujiki Tamami, Mori Yutaro, Ando Fumiaki, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Takeuchi Koh, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Shigeomi, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 28
2. 論文標題 Absence of ULK1 decreases AMPK activity in the kidney, leading to chronic kidney disease progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 5 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12989	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 Nagata Makoto, Watanabe Mizuki, Doi Ryohei, Uemura Mai, Ochiai Nanase, Ichinose Wataru, Fujiwara Koichi, Sato Yoshihiro, Kameda Tomoshi, Takeuchi Koh, Shuto Satoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Helix-forming aliphatic homo- -peptide foldamers based on the conformational restriction effects of cyclopropane	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Organic Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 970 ~ 980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob01715f	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 Takeuchi Koh, Senda Miki, Ikeda Yoshiki, Okuwaki Koji, Fukuzawa Kaori, Nakagawa So, Sasaki Mika, Sasaki Atsuo T., Senda Toshiya	4. 巻 290
2. 論文標題 Functional molecular evolution of a <sc>GTP</sc> sensing kinase: <sc>PI5P4K </sc>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 4419 ~ 4428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16763	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 Takeuchi Koh, Kofuku Yutaka, Imai Shunsuke, Ueda Takumi, Tokunaga Yuji, Toyama Yuki, Shiraishi Yutaro, Shimada Ichio	4. 巻 11
2. 論文標題 Function-Related Dynamics in Multi-Spanning Helical Membrane Proteins Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 604 ~ 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11080604	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 Yokomine Marin, Morimoto Jumpei, Fukuda Yasuhiro, Shiratori Yota, Kuroda Daisuke, Ueda Takumi, Takeuchi Koh, Tsumoto Kouhei, Sando Shinsuke	4. 巻 61
2. 論文標題 Oligo(<i>N</i> -methylalanine) as a Peptide Based Molecular Scaffold with a Minimal Structure and High Density of Functionalizable Sites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202200119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202200119	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 Mizukoshi Yumiko, Takeuchi Koh, Tokunaga Yuji, Matsuo Hitomi, Imai Misaki, Fujisaki Miwa, Kamoshida Hajime, Takizawa Takeshi, Hanzawa Hiroyuki, Shimada Ichio	4. 巻 6
2. 論文標題 Targeting the cryptic sites: NMR-based strategy to improve protein druggability by controlling the conformational equilibrium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd0480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd0480	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 Dubey Abhinav, Takeuchi Koh, Reibarkh Mikhail, Arthanari Haribabu	4. 巻 74
2. 論文標題 The role of NMR in leveraging dynamics and entropy in drug design	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomolecular NMR	6. 最初と最後の頁 479 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-020-00335-9	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 Tokunaga Yuji, Takeuchi Koh	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of NMR in High Ordered Structure Characterization of Monoclonal Antibodies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 46 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010046	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹内恒
2. 発表標題 How does a molecule drive life?
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koh Takeuchi
2. 発表標題 Conformational plasticity defines cell permeabilization activity of cyclic Ras-inhibitor peptides
3. 学会等名 ICMRBS 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koh Takeuchi
2. 発表標題 Utilization of NMR dynamics information to improve protein druggability
3. 学会等名 The 7th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koh Takeuchi
2. 発表標題 Affinity-driven H ⁺ -coupled transport of a MATE transporter
3. 学会等名 The 61st Annual Meeting of the NMR Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koh Takeuchi
2. 発表標題 Development of inhibitors for the GTP energy system
3. 学会等名 分子生物学会年会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内 恒
2. 発表標題 NMRを用いた動的な生命現象の理解と創薬への応用
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内 恒
2. 発表標題 動的な生命現象のNMRを用いた理解と創薬への応用
3. 学会等名 日本薬学会東海支部 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内 恒
2. 発表標題 溶液NMRを用いた動的構造創薬
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室ホームページ
<https://biophys.f.u-tokyo.ac.jp/>
隠れた薬剤結合部位を発見・活用する技術の確立に成功
<https://unit.aist.go.jp/cmb5/topics/topics07.html>

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	徳永 裕二 (Tokunaga Yuji) (80713354)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教 (12601)	

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