

令和 7 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K03547

研究課題名（和文）次世代ペプチド薬の物理理論に基づく高速デザイン法の開発

研究課題名（英文）Development of a rapid design method for next-generation peptide drugs based on physical theory

研究代表者

林 智彦（Hayahshi, Tomohiko）

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：90838070

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）：本研究は、「物理理論に基づいてペプチド抗がん剤を高速に設計する手法の開発」を目的とした。その成果として、タンパク質とペプチドの結合自由エネルギーを高速に計算する手法を改良し、タンパク質-ペプチド複合体およびGPCR-リガンド複合体に適用することで、多数の偽構造の中から天然構造を高精度にスクリーニングすることに成功した。さらに、AlphaFoldなどの立体構造予測法と分子動力学シミュレーションを組み合わせることにより、タンパク質-ペプチド複合体のモデリング、および複数の変異ペプチドに対する結合能の強弱を再現することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、ペプチド抗がん剤の設計を飛躍的に高速化するための基礎研究が大きく前進した。これにより、多くの新規医薬品候補の創出が期待される点で、高い学術的意義を有する。さらに、本研究成果は、生体機能を分子レベルで解明・制御することを基盤とした「次世代生体医工学」研究領域の開拓にも貢献している。これにより、さまざまな疾病の原因解明から治療薬・予防法の開発に至るまで、我が国のライフサイエンスの推進と「健康長寿社会」の実現に寄与するという、重要な社会的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a rapid design method for peptide-based anticancer drugs based on physical theory. As a key outcome, we improved a method for efficiently computing the binding free energy between proteins and peptides, and successfully applied it to protein-peptide and GPCR-ligand complexes. This enabled accurate screening of native structures from among numerous decoy structures. Furthermore, by integrating structure prediction methods such as AlphaFold with molecular dynamics simulations, we successfully modeled protein-peptide complexes and reproduced the relative binding affinities of multiple peptide variants.

研究分野：生物物理学

キーワード：ペプチド薬 天然変性ペプチド 自由エネルギー計算 積分方程式理論 形態計測学的アプローチ

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。

## 1. 研究開始当初の背景

副作用のない抗がん剤の開発は、現代の医学・薬学において最も重要な課題の一つである。しかし、依然として有効な抗がん剤が確立されていない症例が多く存在する。このため、がんの発症メカニズムや原因となる生体分子の立体構造を明らかにする研究が盛んに行われている。ところが、標的分子やその構造が明らかになっても、それに対する**有効な抗がん剤の開発は十分に進んでいないのが現状**である。現在、臨床で広く用いられている抗がん剤は、分子量 1,000 以下の有機低分子薬が中心である。これらは細胞膜を通過しやすい利点がある一方で、標的への特異性が低く、多様な副作用を引き起こしやすい。一方、抗体医薬品などの高分子タンパク質製剤(分子量 1 万以上)は、極めて高い標的特異性と活性を有し、副作用の低減が期待される。さらに、遺伝子工学の進展により、大規模な候補ライブラリの構築も可能となっている。しかし、これらのタンパク質製剤は主に細胞外の標的を想定して設計されており、細胞内に存在することの多いがん関連分子に対する臨床応用には制約がある。したがって、**細胞内標的にも対応可能な、次世代型の抗がん剤の創出が強く求められている**。

上述の背景を踏まえ、**ペプチド抗がん剤への期待は一層高まっている<sup>1,2</sup>**。ペプチド医薬品とは、アミノ酸 10~30 残基からなる比較的低分子量(概ね 3,000 以下)のペプチドのうち、薬効を有するものの総称である。その高い活性、標的特異性および細胞内移行性が期待され、抗がん剤への応用が望まれている。しかしながら、ペプチド医薬品の開発は低分子化合物やタンパク質医薬品と比較して大きく遅れている。国内外においていくつかのペプチド抗がん剤候補は臨床試験段階に達しているが、未だ認可には至っていない。この遅れの主な原因は、**ペプチド抗がん剤の開発に莫大な手間と資金を要すること**である。わずか 10 残基程度のペプチドでも、その候補数は 10 兆を超える膨大な数にのぼる。したがって、**実験に依存せず理論的にペプチド抗がん剤を予測・設計する手法の開発が強く求められている**。

近年、国外では人工知能を用いた予測・設計法が報告され始めている<sup>3,4</sup>。しかし、**標的に効果のあるペプチドが見出されても、その有効性の根拠を解明することができない**という課題が存在する。合理的な創薬を推進するには、「ペプチドと標的の結合を成立させる物理的機構」を原子レベルの解像度で解明することが極めて重要である。さらに、多くのペプチドは天然変性ペプチド(IDP)であり、単体では一定の構造をとらないため、結合メカニズムの解明は一層困難である。

一方、本研究代表者らが独自に構築してきた物理理論に基づく手法を活用することで、上述の課題を克服し、ペプチド抗がん剤開発における突破口を開けると考え、本研究を立案した。本研究課題の核心をなす学術的問いは、以下の二点に集約される：

- ① 明確な物理的描像に基づいたペプチド医薬の設計手法を確立することが可能であるか
- ② 膨大な数にのぼるペプチド候補を、理論的に精査するために十分な計算高速性を確保できるか

## 2. 研究の目的

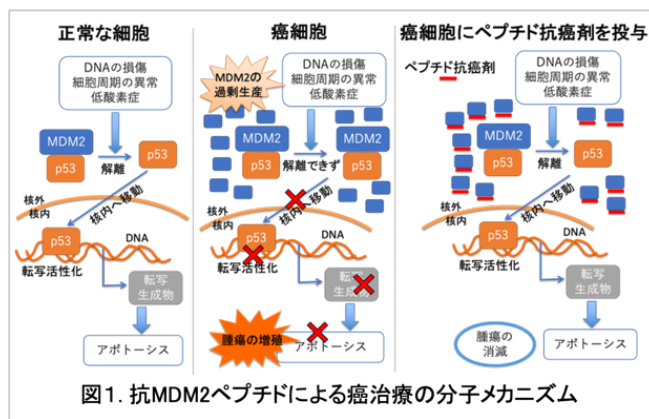
本研究は、物理理論に基づいてペプチド抗がん剤を高速に設計する手法の開発を目的とする。そのために、以下の3つの課題を設定し、これらの達成を目指す。

課題1：タンパク質-ペプチド間の結合力を高速に評価可能な自由エネルギー関数を開発する

課題2：課題1で開発した自由エネルギー関数を用いて、タンパク質-ペプチド複合体の天然構造(構造既知)を多数の擬似構造の中から高速に選別する手法を開発する

課題3：課題2の手法を拡張し、タンパク質-ペプチド複合体の天然構造が未知であると仮定した場合にも、複合体の立体構造を高速に予測する手法を開発する

本研究では、**がん原因タンパク質 MDM2 を標的としたペプチド抗がん剤**の設計を題材とする。MDM2 は、多くのがん細胞において過剰に発現し、抗がんタンパク質 p53 の機能を阻害することが知られている。MDM2 と p53 よりも高い親和性で結合するペプチドを設計することができれば、「がん細胞における p53 の抗がん活性を再活性化する新規作用機序」に基づく抗がん剤の開発が期待される (図 1)。



代表者らは、ペプチド薬の高速探索法開発に向けた試金石として、MDM2 を標的とした新規ペプチドの設計および合成に取り組んできた。これまでに、MDM2 に対して非常に高い結合能を示すペプチド (MDM2 Inhibitory Peptide, MIP) を発見し、MDM2-MIP 複合体の立体構造および結合の駆動力を解明している<sup>5,6</sup>。本研究では、MDM2-p53 および MDM2-MIP 複合体をモデル系として、立体構造および結合力の理論的予測に取り組む。

### 3. 研究の方法

物理モデルに基づく生体分子の理論計算には、一般に膨大な計算コストが伴うという課題がある。本研究ではこの課題を解決するため、以下に示す学術的独自性の高い方法論を採用する。

タンパク質-ペプチド複合体の形成といった「生体分子間の結合」を物理理論に基づいて精密に計算するには、生体分子の周囲に存在する大量の水分子の影響を的確に考慮することが不可欠である。代表者らはこれまで、**生体分子の水和自由エネルギーを高速かつ正確に計算可能な統計熱力学理論的手法 (手法1)**を開発してきた<sup>7</sup>。この手法では、水和自由エネルギーをエネルギー成分とエントロピー成分に分割することにより、生体分子の構造化を駆動する物理要因の特定が可能となる。

一方で、膨大な候補から標的タンパク質に結合する有望なペプチドを迅速に選別するには、計算の大幅な高速化が求められる。この要請に応えるため、代表者らは、**生体分子間の結合自由エネルギー $\Delta G$ を極めて短時間(秒単位)計算可能な手法 (手法2)**も開発してきた。 $\Delta G$ は、エネルギー成分 $\Delta U$ とエントロピー成分 $\Delta S$ からなり、 $\Delta G = \Delta U - T\Delta S$  ( $T$ は絶対温度)と表される。 $\Delta U$ には、水素結合の形成によるエネルギー低下および脱水和に伴うエネルギー損失を、 $\Delta S$ には水分子の並進移動に起因するエントロピー効果を、それぞれ考慮する。 $\Delta S$ の統計力学的計算は、水を粒子集団として扱うことに起因して困難であり、とりわけ生体分子の全原子を考慮する場合はその傾向が顕著である。代表者らはこの困難を克服するため、「分子性流体用積分方程式理論」と「形態計測学的アプローチ」を統合することで、生体分子の形状特性から $\Delta S$ を定量的に計算する手法を開発した<sup>6</sup>。生体分子1つの計算に要する時間は、標準的なワークステーション上で1秒未満と極めて高速である。

以上の**手法1**および**手法2**を組み合わせることで、ペプチド薬設計を明確な物理描像に基づき、かつ高速に実行するためのブレークスルーが可能となる。実際、**本研究期間中には、これらの手法のさらなる改良にも成功している**。なお、理論計算および分子動力学 (MD) シミュレーションには、代表者らが独自に開発したプログラムと、AMBER18 プログラムパッケージを併用する。

#### 4. 研究成果

本研究では以下の成果(1)~(4)を得た。成果の一部は、査読付き英語学術論文8報としてまとめられ、国際学会で1件、国内学会で4件発表した。さらに、国内特許1件として出願した。

- (1) タンパク質とペプチドの結合自由エネルギーを高速に評価可能な自由エネルギー関数  $G(\text{MM}/\text{DAH})$  の開発に成功した。従来の **手法2** では、脱水和に伴うエネルギー損失を超高速かつ定性的に考慮できたが、これまでの研究により、水和エントロピーのみならず、水和エネルギー ( $\epsilon_{\text{VH}}$ ) の定量的な評価も極めて重要であることが明らかとなった。そこで本研究では、**手法1** の計算結果を数秒以内に再現可能な新規手法 (drastically accelerated hybrid 法、以下 DAH 法) を **手法2** に導入した。結合自由エネルギー  $\Delta G$  のエネルギー成分  $\Delta U$  を精密に算出するには、分子力学 (MM) 法による構造エネルギーに加えて、 $\epsilon_{\text{VH}}$  の的確な評価が不可欠である。しかし **手法1** を用いた場合、 $\epsilon_{\text{VH}}$  の計算には1構造あたり約1時間を要し、計算効率の面で大きな制約となっていた。このボトルネックを解消するために、本研究では「**3次元 RISM 理論+連続体溶媒モデル+形態計測学アプローチ**」を統合した手法を採用した<sup>8</sup>。この手法では、 $\epsilon_{\text{VH}}$  を生体分子の構造に関する4つの幾何学量 (排除容積  $V$ , 露出表面積  $A$ , 露出表面の曲率に関連した2つの量  $X, Y$ ) および連続体モデルに基づく水和エネルギー ( $E_{\text{GB}}$ ) の線形結合として表現する ( $\epsilon_{\text{VH}} = C_1V + C_2A + C_3X + C_4Y + C_5E_{\text{GB}}$ )。ここで、係数  $C_1 \sim C_5$  は、あらかじめ3次元 RISM 理論により決定される。これにより、分子の幾何学量と  $E_{\text{GB}}$  を計算することで、 $\epsilon_{\text{VH}}$  を高精度かつ高速に評価できる。さらに水和エントロピー  $\Delta S_{\text{VH}}$  には、生体分子の電荷依存性を反映する項を、形態計測学アプローチにより導入した。これらの改良により、1構造あたりの計算時間は標準的なワークステーション上でわずか数秒と大幅に短縮されている。本研究では、計算時間を大幅に削減しつつも、**手法1** による様々な蛋白質の水和自由エネルギーを極めて高い精度で再現することに成功した。実際、7種45構造の蛋白質に対して相関係数 0.994, 平均誤差 3.5% という良好な結果が得られている (図2)。

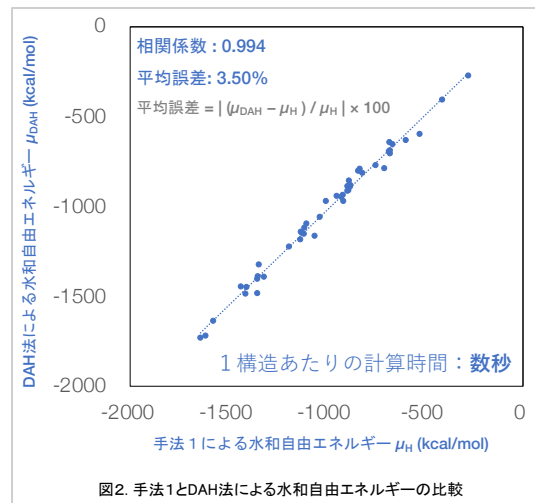


図2. 手法1とDAH法による水和自由エネルギーの比較

- (2)  $G(\text{MM}/\text{DAH})$  をタンパク質-ペプチド、および G タンパク質共役型受容体 GPCR-リガンド複合体に適用し、多数の偽構造の中から天然構造を正確に同定することに成功した (特許出願中: 特願 2023-221583)。本研究では、MDM2-MIP 複合体の立体構造を鋳型として、高温条件の MD シミュレーションにより、多数の擬構造を発生させた。この構造に対して  $G(\text{MM}/\text{DAH})$  を適用することで、天然構造を特定した。また、複合体の天然構造は水和エントロピーの観点から安定であることが判明した (図3)。さらに、この手法を GPCR-リガンド複合体にも適用し、天然構造を特定することに成功した。

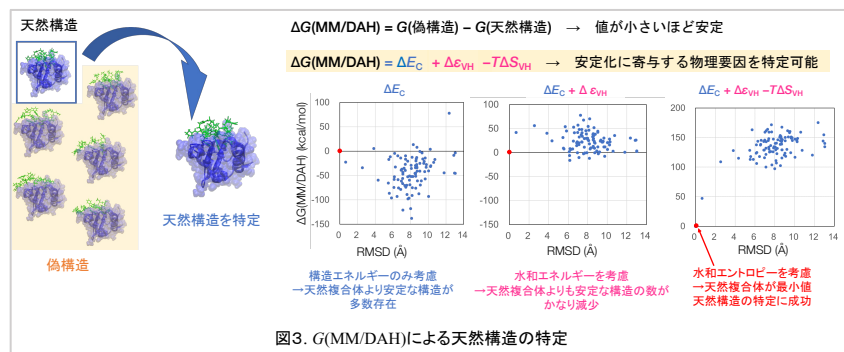


図3.  $G(\text{MM}/\text{DAH})$  による天然構造の特定

(3) タンパク質-ペプチド複合体の天然構造が未知であると仮定して、人工知能的手法である AlphaFold2<sup>9</sup> (AF2) とホモロジーモデリング (HM) を用いて構造を予測し、 $G(\text{MM/DAH})$  で安定性を評価した。分子動力学シミュレーションと併用することで、天然構造と同等の安定性を持つ構造のモデリングに成功した (図4)。さらに、複数の変異ペプチド (MDM2-p53 および MDM2-MIP) に対する結合能の強弱も再現した (図5、表1)。一方で、現状では AF2 を用いたとしても MD シミュレーションの併用による構造アンサンブルの発生が必須であり、この計算にかかる時間が依然としてボトルネックであることが明らかになった。

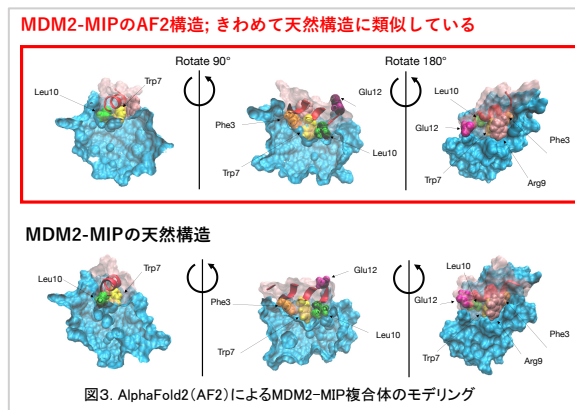


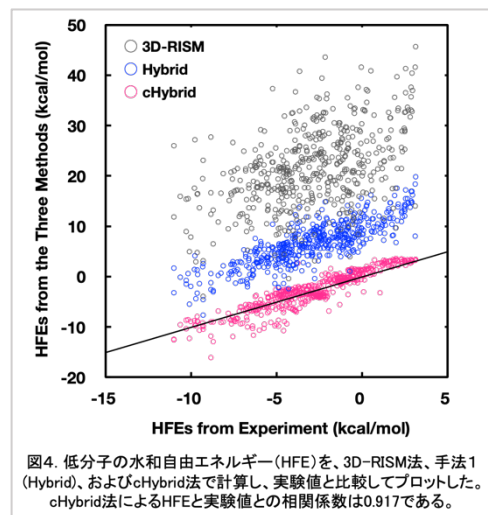
表3. タンパク質-ペプチド結合に伴う自由エネルギー変化  $\Delta G(\text{MM/DAH})$  および構成成分 1000 ns の MD シミュレーションを実施し、系が平衡状態に達した後の構造アンサンブルを取得した。各構造に対して、タンパク質およびペプチドが無窮遠から結合状態へと移行する過程を仮定し、この過程に対応する自由エネルギー変化  $\Delta G(\text{MM/DAH})$  を評価した:

$$\Delta G(\text{MM/DAH}) = G(\text{タンパク質-ペプチド}) - \{G(\text{タンパク質}) + G(\text{ペプチド})\}$$

得られた  $\Delta G(\text{MM/DAH})$  は、平均値および標準誤差として算出し、単位は kcal/mol で表記した。

	$\Delta G(\text{MM/DAH})$	$\Delta U$	$-T\Delta S$
MDM2-MIP 天然構造	$-38.6 \pm 0.6$	$62.9 \pm 0.6$	$-101.5 \pm 0.9$
MDM2-MIP AF2構造	$-45.1 \pm 1.3$	$63.1 \pm 1.4$	$-108.2 \pm 0.9$
MDM2-MIP HM構造	$-43.6 \pm 3.2$	$59.8 \pm 3.4$	$-103.3 \pm 1.6$
MDM2-p53 天然構造	$-24.6 \pm 1.4$	$65.6 \pm 1.5$	$-90.2 \pm 1.3$

(4) 低分子にも適用可能な高精度水和自由エネルギー計算法「cHybrid法」を開発した<sup>10</sup>。水和自由エネルギー計算において、高い精度・広い適用範囲・低い計算コストの両立は困難である。本研究では、角度依存積分方程式理論、3D-RISM理論、および形態計測学的手法を組み合わせ、低分子からタンパク質サイズの分子まで、分子動力学法に匹敵する精度を達成した。今後、この手法をさらに高速化することで、 $G(\text{MM/DAH})$  の低分子創薬への展開が可能となる。



#### <引用文献>

1. D. Gaspar et al., *Front. Microbiol.*, 4:294, 2013.
2. M. R. Felicio et al., *Front. Chem.*, 5:5, 2017.
3. Y.-C. Lin et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54:10370, 2015.
4. T. Müller et al., *J. Chem. Inf. Model.*, 58:472, 2018.
5. T. Nagata et al., *PLoS One*, 9:e109163, 2014.
6. T. Yamada et al., *J. Chem. Inf. Model.*, 59:3533, 2019
7. S. Hikiri et al., *J. Chem. Phys.*, 150:175101, 2019.
8. H. Oshima et al., *Biophys. J.*, 110:2496, 2016.
9. Jumper et al., *Nature*, 596:583, 2021.
10. Hayashi et al., *J. Mol. Liq.*, 406:124989, 2024.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hayashi Tomohiko, Kawamura Masato, Miyamoto Shunsuke, Yasuda Satoshi, Murata Takeshi, Kinoshita Masahiro	4. 巻 406
2. 論文標題 An accurate and rapid method for calculating hydration free energies of solutes including small organic molecules, peptides, and proteins	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 124989 ~ 124989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molliq.2024.124989	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 Inoue Masao, Hayashi Tomohiko, Yasuda Satoshi, Kato Minoru, Ikeguchi Mitsunori, Murata Takeshi, Kinoshita Masahiro	4. 巻 128
2. 論文標題 Statistical-Mechanics Analyses on Thermodynamics of Protein Folding Constructed by Privalov and Co-Workers	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 10110 ~ 10125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.4c05811	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 Kinoshita Masahiro, Hayashi Tomohiko, Nakamura Yuka, Yoshimori Akira, Katahira Masato, Nagata Takashi	4. 巻 424
2. 論文標題 A physical picture of liquid-liquid phase separation of proteins	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 127040 ~ 127040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molliq.2025.127040	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 Lin Peng, Hayashi Tomohiko, Dinh Huyen, Nakata Eiji, Kinoshita Masahiro, Morii Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Enzyme Reactions Are Accelerated or Decelerated When the Enzymes Are Located Near the DNA Nanostructure	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 15775 ~ 15792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.4c18192	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 Yasuda Satoshi, Hayashi Tomohiko, Murata Takeshi, Kinoshita Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Physical pictures of rotation mechanisms of F1- and V1-ATPases: Leading roles of translational, configurational entropy of water	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1159603 (1-23)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2023.1159603	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 Amano Ken-ichi, Furukawa Satoshi, Kubo Yuto, Nakamura Yuka, Ishii Rina, Tanase Ayane, Maebayashi Masahiro, Hayashi Tomohiko, Nishi Naoya, Sakka Tetsuo	4. 巻 39
2. 論文標題 Nonadditivities of the Particle Sizes Hidden in Model Pair Potentials and Their Effects on Physical Adsorptions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 12999 ~ 13007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.3c00968	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 Sugaya Kanna, Yasuda Satoshi, Sato Shingo, Sisi Chen, Yamamoto Taisei, Umeno Daisuke, Matsuura Tomoaki, Hayashi Tomohiko, Ogasawara Satoshi, Kinoshita Masahiro, Murata Takeshi	4. 巻 31
2. 論文標題 A methodology for creating thermostabilized mutants of G protein coupled receptors by combining statistical thermodynamics and evolutionary molecular engineering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4404	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 Yamamoto Taisei, Yasuda Satoshi, Kasai Rinshi S., Nakano Ryosuke, Hikiri Simon, Sugaya Kanna, Hayashi Tomohiko, Ogasawara Satoshi, Shiroishi Mitsunori, Fujiwara Takahiro K., Kinoshita Masahiro, Murata Takeshi	4. 巻 31
2. 論文標題 A methodology for creating mutants of G protein coupled receptors stabilized in active state by combining statistical thermodynamics and evolutionary molecular engineering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4425	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tatsuki Kawauchi, Tomohiko Hayashi, Mitsunori Ikeguchi
2. 発表標題 Hydration and Fluctuation Dynamics of a Membrane Transport Protein-Glucose Complex
3. 学会等名 IUPUB 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 河内達輝、林智彦、池口満徳
2. 発表標題 水和に着目した膜輸送タンパク質-グルコース複合体のMDシミュレーションおよび統計熱力学解析
3. 学会等名 日本物理学会新潟支部 第53回例会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shunsuke Miyamoto, Tomohiko Hayashi
2. 発表標題 A methodology for designing peptide drugs by combining structure prediction methods and statistical thermodynamics
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Tatsuki Kawauchi, Tomohiko Hayashi
2. 発表標題 膜輸送タンパク質-グルコース複合体の水和および揺らぎダイナミクス
3. 学会等名 日本物理学会第78回年次大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Shunsuke Miyamoto, Tomohiko Hayashi
2. 発表標題 Computational study for designing peptide drugs based on statistical thermodynamics
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 自由エネルギーの計算方法	発明者 村田武士、安田賢司、木下正弘、林智彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-221583	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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