

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590058

研究課題名(和文) 新規な2型糖尿病治療薬の開発を目指したSHIP2阻害剤のイン・シリコ分子設計

研究課題名(英文) In silico drug design of SHIP2 inhibitor as a novel therapeutic agent for diabetes.

研究代表者

合田 浩明 (GOUDA, Hiroaki)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：60276160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病治療薬開発のためのリード化合物であるCPDAと標的タンパク質SHIP2の結合様式について、分子動力学計算、分子重ね合わせ計算、分子ドッキング計算、及び結合自由エネルギー計算に基づいて解析を行った。その結果、CPDAはSHIP2と4つの水素結合を形成しそうなこと、及びCPDAが有する3つの芳香環がSHIP2と疎水相互作用を形成しそうなことが明らかとなった。また、CPDAの芳香環の一つにガラクトースのような糖を付加することで、SHIP2に対する結合親和性が改善されそうなことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2) plays as an endogenous negative regulator of insulin signaling. Therefore, SHIP2 is considered to have great potential as a drug target for treating obesity and type 2 diabetes. We recently identified a novel SHIP2 inhibitor, N-[4-(4-chlorobenzoyloxy)pyridin-2-yl]-2-(2,6-difluorophenyl)acetamide (CPDA). The binding mode of CPDA with SHIP2 was first investigated based on molecular docking calculation. CPDA was suggested to form a total of four hydrogen bonds with L538, K541, S564, and R571 of SHIP2. Aromatic rings of CPDA were also found to form hydrophobic interactions with side alkyl chains of T532, I534, L538, K541, T563, and R571. We next designed derivatives of CPDA based on binding free energy calculation. Derivatives with an additional monosaccharide such as galactose were expected to possess more potent inhibitory activity against SHIP2.

研究分野：生物物理化学

キーワード：分子設計 ドッキング計算 結合自由エネルギー SHIP2 阻害剤 糖尿病 インスリン

1. 研究開始当初の背景

(1) SHIP2 (SH2-Containing Inositol 5'-Phosphatase 2) は、脂肪細胞等のインスリン標的組織に発現しているホスファターゼで、インスリンシグナル伝達経路のセカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PIP3) を脱リン酸化することにより、インスリン作用の負の調節因子として機能している。したがって、SHIP2 の酵素活性を阻害できる化合物 (SHIP2 阻害剤) は、インスリン作用の増強に基づいた 2 型糖尿病治療薬となる可能性が考えられていた。

(2) 申請者は、合成グループ、及びセルベースアッセイ・動物実験グループとの研究協力体制を構築し、「新規な 2 型糖尿病治療薬の開発を目指した SHIP2 阻害剤創製研究」を展開した。ここで、申請者は、2 つの既知 SHIP2 阻害剤 AS1949490 及び NGD61338 の化学構造に基づいた Ligand-Based Drug Design (LBDD) を行った。すなわち、立体配座解析及び分子重ね合わせ計算により AS1949490 と NGD61338 の 3 次元物理化学特性が最も良く重なるような分子アライメントを決定した。そして、得られた分子アライメントに基づいて、2 つの既知阻害剤の原子団を組み合わせたようなキメラ化合物を新規 SHIP2 阻害剤候補化合物として提案した。候補化合物の合成、及びセルベースアッセイを行った結果、我々は、マウス由来の前駆脂肪細胞に対して、強力なインスリンシグナル増強作用を示す新規化合物 CPDA (*N*-[4-(4-chlorobenzyloxy)pyridin-2-yl]-2-(2,6-difluorophenyl)-acetamide) を得ることに成功した。

2. 研究の目的

(1) 我々がデザインした CPDA はマウス脂肪細胞に対して強力なインスリンシグナル増強作用を示したが、その増強作用が CPDA の SHIP2 阻害能に由来しているのかどうかは明らかではなかった。そこで、「SHIP2 触媒ドメインの大量発現系の構築」及び「SHIP2 アッセイ系の構築」を行い、CPDA の SHIP2 阻害能を評価する。

(2) CPDA の創製に成功した LBDD 研究をさらに発展させ、構造が互いに大きく異なる全 4 つの既知 SHIP2 阻害剤 AS1949490、NGD61338、NGD62448、NGD61185) について、分子アライメントを決定する。これにより、CPDA とは異なる化学構造を有する候補化合物のデザインが可能となる。

(3) SHIP2 触媒ドメインの X 線結晶構造、分子ドッキング計算、及び結合自由エネルギー計算に基づいた Structure-Based drug design (SBDD) 研究を展開し、CPDA と SHIP2 の結合様式を解析すると共に、SHIP2 に対する結合親和性が大きく改善されるような CPDA 誘導体の分子設計を行う。

3. 研究の方法

(1) CPDA の SHIP2 阻害能評価

まず、大腸菌を用いた SHIP2 触媒ドメインの大量発現系を構築し、さらに発現された SHIP2 触媒ドメインの精製法を確立する。次に、Malachite Green Phosphate Assay Kit を用いた SHIP2 の酵素活性アッセイ系を構築する。これは、基質から遊離したリン酸を、マラカイトグリーンを用いた比色法により検出することで酵素活性を評価するキットである。最後に、CPDA を共存させたときの酵素活性を評価することで、CPDA の SHIP2 阻害能を評価する。

(2) 既知 SHIP2 阻害剤についての分子アライメントの決定

まず、自動配座解析プログラム CAMDAS を用いて、解析に用いる全 4 つの既知 SHIP2 阻害剤 (AS1949490、NGD61338、NGD62448、NGD61185) の立体配座解析を行う。次に、配座解析により得られた立体配座集団を用いて、総当たりの分子重ね合わせ計算を行う。これには、自動分子重ね合わせプログラム SUPERPOSE を使用する。SUPERPOSE は、化合物の立体配座を物理化学的性質が異なる特性球 (芳香族性、疎水性、水素結合供与性、水素結合受容性、及び水素結合供与/受容性) の空間的配置で抽象的に表現して重ね合わせ計算を行うプログラムである。このため、化学構造が大きく異なる化合物間の重ね合わせ計算も可能となっている。この重ね合わせ計算により、4 つの既知 SHIP2 阻害剤の 3 次元物理化学特性が最も良く重なるような分子アライメントを決定し、SHIP2 阻害剤が有すべきファーマコホアを推定する。

(3) CPDA と SHIP2 の結合様式解析

まず、コンピュータ上で SHIP2 触媒ドメインの X 線結晶構造 (PDB_ID: 3NR8) を水の箱にいれ、水溶液中での分子動力学シミュレーションを実行する。そして、得られたトラジェクトリを用いて、触媒部位の構造に関するクラスター解析を行い、SHIP2 の代表鍵穴構造を決定する。

次に、Schrödinger 社の分子ドッキング計算プログラム Glide を用いて、SHIP2 の代表鍵穴構造に対する CPDA の分子ドッキング計算を行う。そして、得られたドッキングポーズを Glidescore の値により順位付けし、上位 20% のドッキングポーズを選択する。

最後に、Schrödinger 社のプログラム Prime を用いた MM-GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area) 計算を行い、上位 20% のドッキングポーズの結合自由エネルギー ($G_{\text{bind}}(\text{MM-GBSA})$) を評価する。そして、 $G_{\text{bind}}(\text{MM-GBSA})$ の値が最も低いドッキングポーズを選択し、CPDA の結合様式モデルとする。

(4) CPDA の構造最適化

まず、(3) で得られた CPDA と SHIP2 の結合様式モデルを詳細に観察し、CPDA に原子団を導入することで、付加的な van der

Waals (VDW) 相互作用や水素結合が形成できそうな部位を探索する。

次に、の結果に基づいて SHIP2 と付加的な相互作用が形成できそうな CPDA 誘導体を分子設計する。そして、誘導体についての分子ドッキング計算および結合自由エネルギー計算を行い、 $G_{\text{bind}}(\text{MM-GBSA})$ の値が CPDA よりも大きく改善される誘導体を選択し、合成すべき誘導体として提案する。

4. 研究成果

(1) CPDA の SHIP2 阻害能評価

大腸菌を用いて大量発現された SHIP2 触媒ドメインは、His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーにより、高純度で精製することができた。次に、精製された SHIP2 触媒ドメイン及び Malachite Green Phosphate Assay Kit を用いた酵素アッセイ系により、CPDA の SHIP2 阻害能を評価したところ、CPDA は非常に強い SHIP2 阻害能 ($\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$) を有することが明らかとなった(図1)。この結果、CPDA が有するインスリンシグナル増強作用は、インスリン作用の負の調節因子である SHIP2 の阻害に由来していることが初めて明らかとなった。

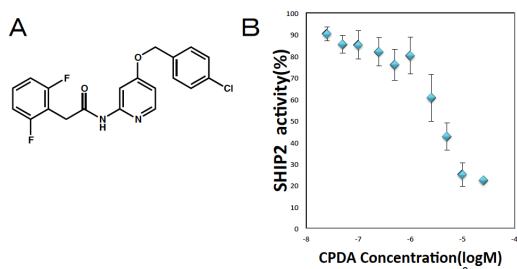


図1: CPDAの化学構造(A)とCPDAのSHIP2阻害能評価の結果(B)

(2) 既知 SHIP2 阻害剤についての分子アライメントの決定

立体配座解析の結果、4つの既知 SHIP2 阻害剤 AS1949490、NGD61338、NGD62448、NGD61185 について、それぞれ、2668個、6819個、4369個、6061個の配座集団が得られた。これら配座集団を用いた総当たりの分子重ね合わせ計算の結果、これら4つの既知阻害剤の3次元的な物理化学特性が最も良く重なるような分子アライメントが得られた(図2)。この結果、3つの芳香族あるいは疎水性特性球、2つの水素結合受容性球、1つの水素結合供与性球が、4つの既知阻害剤の間で、3次元的に共通した場所を占めることがわかった。“標的蛋白質の同じ結合部位(鍵穴)に結合する阻害剤(鍵)は、共通した3次元的な物理化学的性質を有している”と考えることができるため、この共通して見られた全部で6個の特性球の配置が SHIP2 阻害剤が有すべきファーマコホアであると推定できた。さらに、CPDA についても分子重ね合わせ計算を行ったところ、CPDA もこのファーマコホアを有していることが示唆された。また、この分子アライメントより、

AS1949490 の(4-クロロベンジル)オキシを 3S, 5R-ジメチルピペリジンカルボニルに置き換えたような化合物にも SHIP2 阻害活性が期待できることが示唆された。

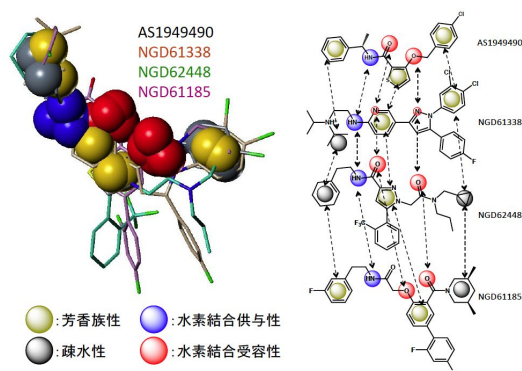


図2: 4つの既知SHIP2阻害剤に関して得られた分子アライメント

(3) CPDA と SHIP2 の結合様式解析

本研究で使用した結合様式解析手順について、SHIP2 と配列ホモロジーが高い INPP5B (Type II inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase、相似性: 49%) と PI4P の複合体 X 線結晶構造を用いて検証計算を行ったところ、結晶で観察されている結合様式を再現できることがわかった。したがって、本研究で用いた結合様式解析手順は、非常に確からしい CPDA と SHIP2 の結合様式を与えることができると言える。図3に解析の結果得られた CPDA と SHIP2 の結合様式モデルを示す。CPDA は、SHIP2 の L538 主鎖酸素原子、K541 側鎖窒素原子、S564 主鎖窒素原子、及び R571 側鎖窒素原子と計4つの水素結合を形成しそうなことが示唆された。また、CPDA の3つの芳香環が、SHIP2 の T532、G533、I534、L538、K541、T563、R571 の炭化水素鎖と VDW 相互作用及び疎水相互作用を形成していることも示唆された。この結合様式モデルにおいて、(2)の既知 SHIP2 阻害剤の分子アライメントより推定された6個のファーマコホアがすべて確認できた。この観点からも、結合様式モデルは非常に確からしいものであると考えることができる。

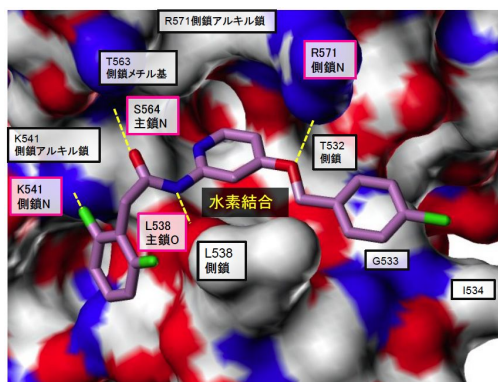
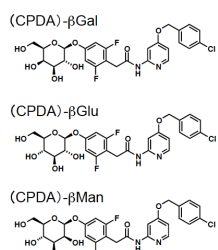


図3: CPDAとSHIP2の結合様式モデル

(4) CPDA の構造最適化

(3)で得られた CPDA と SHIP2 の結合様式モデルを観察したところ、CPDA のジフルオロベンゼンの4位の方向に SHIP2 の糖認識部位があ

ることがわかった。そこで、図4のようにジフルオロベンゼンの4位に糖を付加したような誘導体を考案した。これら誘導体について、分子ドッキング計算及び結合自由エネルギー計算を行った結果、これら誘導体は新たに導入された糖が付加的な水素結合を形成できそうなこと、及び結合親和性がCPDAより大きく改善されそうなことが示唆された。特に、-グリコシド結合でガラクトースを付加した誘導体に大きな改善が期待できることがわかった。



誘導体	$\Delta G_{\text{bind}}(\text{MM-GBSA})$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}(\text{MM-GBSA})$ (kcal/mol)
CPDA	-30.90	0.00
(CPDA)- β Gal	-41.40	-10.50
(CPDA)- β Glu	-41.06	-10.16
(CPDA)- β Man	-40.68	-9.78

図4: 分子設計したCPDA誘導体の化学構造、及びMM-GBSA計算により評価された結合自由エネルギー($\Delta G_{\text{bind}}(\text{MM-GBSA})$)の値

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

Koichi Handa, Izumi Nakagome, Noriyuki Yamaotsu, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis for Human Pregnane X Receptor for the Prediction of CYP3A4 Induction in Human Hepatocytes: Structure-Based Comparative Molecular Field Analysis. 査読有 *J Pharm Sci.* 2015, 104, 223-232. DOI: 10.1002/jps.24235

Hisashi Mori, Ryogo Wada, Jie Li, Tetsuya Ishimoto, Mineyuki Mizuguchi, Takayuki Obita, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono, Naoki Toyooka. In silico and pharmacological screenings identify novel serine racemase inhibitors. 査読有 *Bioorg Med Chem Lett.* 2014, 24, 3732-3735. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.07.003

Koichi Handa, Izumi Nakagome, Noriyuki Yamaotsu, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono. In silico Study on the Inhibitory Interaction of Drugs with Wild-type CYP2D6.1 and the Natural Variant CYP2D6.17. 査読有 *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014, 29, 52-60. DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-044

Tomoyasu Hirose, Nobuo Maita, Hiroaki Gouda, Jun Koseki, Tsuyoshi Yamamoto, Akihiro Sugawara, Hirofumi Nakano, Shuichi Hirono, Kazuro Shiomi, Takeshi Watanabe, Hisaaki Taniguchi, K. Barry Sharpless, Satoshi Ōmura, Toshiaki

Sunazuka. Observation of the controlled assembly of preclick components in the in situ click chemistry generation of a chitinase inhibitor. 査読有 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110, 15892-15897. DOI: 10.1073/pnas.1315049110

Masaki Wakasugi, Hiroaki Gouda, Tomoyasu Hirose, Akihiro Sugawara, Tsuyoshi Yamamoto, Kazuro Shiomi, Toshiaki Sunazuka, Satoshi Ōmura, Shuichi Hirono. Human acidic mammalian chitinase as a novel target for anti-asthma drug design using in silico screening. 査読有 *Bioorg Med Chem.* 2013, 21, 3214-3220.

DOI: 10.1016/j.bmc.2013.03.047

Yoshinori Ichihara, Ryohei Fujimura, Hiroshi Tsuneki, Tsutomu Wada, Kentaro Okamoto, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono, Kenji Sugimoto, Yuji Matsuya, Toshiyasu Sasaoka, Naoki Toyooka. Rational design and synthesis of 4-substituted 2-pyridin-2-ylamides with inhibitory effects on SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 2 (SHIP2). 査読有 *Eur J Med Chem.* 2013, 62, 649-660.

[学会発表](計11件)

梅田 知伸、山田 彩華、田中 信忠、小澤 新一郎、広野 修一、笹岡 利安、豊岡 尚樹、合田 浩明 インスリンシグナル増強作用を示す新規化合物CPDAのSHIP2阻害能評価 日本薬学会第135年会 2015年3月28日 デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県・神戸市)

小澤 新一郎、合田 浩明、広野 修一 新規糖尿病治療薬としての選択的SHIP2阻害剤のin silico創薬研究 日本薬学会第135年会 2015年3月27日 神戸サンボーホール(兵庫県・神戸市)

小澤 新一郎、合田 浩明、広野 修一 新規糖尿病治療薬としてのSHIP2選択的阻害剤のin silico創薬研究 第42回構造活性相関シンポジウム 2014年11月13日 くまもと森都心プラザ(熊本県・熊本市)

小澤 新一郎、中作 菜穂、合田 浩明、広野 修一 新規糖尿病治療薬としてのSHIP2阻害剤のin silico創薬研究 日本薬学会第134年会 2014年3月29日 熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)

高原 理行、市原 克則、和田 努、恒枝 宏史、笹岡 利安、広野 修一、梅田 知伸、田中 信忠、合田 浩明、豊岡 尚樹 新規インスリン抵抗性改善に基づく2型糖尿病治療薬の創製 日本薬学会第134年会 2014年3月29日 熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)

合田 浩明、和田 亮吾、李 杰、帯田 孝之、水口 峰之、森 寿、豊岡 尚樹、広野 修一

イン・シリコ創薬技術に基づいたヒトセリンラセマーゼ阻害剤の創製研究 第40回構造活性相関シンポジウム 2012年11月29日 岡崎市図書館交流プラザ・りぶら（愛知県・岡崎市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合田 浩明 (GOUDA, Hiroaki)
昭和大学・薬学部・教授
研究者番号：60276160

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

広野 修一 (HIRONO, Shuichi)
北里大学・薬学部・教授
研究者番号：30146328