

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25249115
研究課題名(和文) 物理化学的アプローチを基盤とした低分子リガンドの探索と設計

研究課題名(英文) Ligand discovery based on biophysical analyses

研究代表者
津本 浩平 (Tsumoto, Kouhei)
東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90271866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、フラグメントスクリーニングにおいて、物理化学的な解析を行い、創薬の候補となりうるヒット化合物の選別とその親和性向上において有効な技術開発を行うことを目標とした。スクリーニングより得られた低分子化合物について、ITCやDSCによる熱量解析を行い、特異的な結合を示す化合物の選別(ヒットバリデーション)よりヒット化合物を得た。これらヒット化合物と蛋白質との複合体構造解析や分子モデリング解析結果を、熱量解析と共に議論することにより、1つの蛋白質に対してnMオーダーレベルのリガンドを創出することに成功した。このことから、本アプローチは新規の合理的設計戦略として有効な指針となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied fragment-based drug discovery based on the biophysical methods, including isothermal titration calorimetry (ITC), surface plasmon resonance (SPR), and differential scanning calorimetry (DSC). The hit compounds bound specifically to target proteins; the interactions between compounds and the targets were validated using these biophysical measurements and the binding mechanisms have been characterized thermodynamically. We carried out X-ray crystallographic analyses and in silico docking simulation to discuss the thermodynamics of the interactions. The crystal structure and docking simulation supported thermodynamic data. Moreover, one hit compound was optimized to bind strongly to the target protein, of which dissociation constant showed sub-micro molar. This research provides a novel rational strategy to obtain the true-hit compounds through screening small molecule compounds.

研究分野：蛋白質工学、生命物理化学

キーワード：低分子創薬 熱力学解析 フラグメントスクリーニング 相互作用

1. 研究開始当初の背景

創薬開発において、標的とする蛋白質の機能を制御するリガンドを如何にして高い親和性と高い特異性をもって作り上げるかが重要である。本研究では、分子量 200 程度のフラグメント化合物と呼ばれる比較的分子サイズの小さい化合物群 (フラグメントライブラリー) からリガンドを設計していくアプローチを取り入れた (フラグメントスクリーニング)。このライブラリーは、従来用いられてきたハイスループットスクリーニングにおけるライブラリーよりも、低分子サイズ、高水溶性を有する化合物が多い。そのため標的蛋白質に対して、結合活性は弱い効率がよく結合している化合物を見つけ出し、リガンド設計におけるヒット化合物として採用する確率を大幅に上げることができると期待されている。

このフラグメントスクリーニングにおいてキーポイントとなるのが、いかにして標的蛋白質と特異的に結合しているフラグメント化合物を選び出すか (ヒットバリデーション) である。そのためには蛋白質とフラグメント化合物間の分子レベルでの相互作用情報が必要不可欠である。したがって、ヒットバリデーションにおいては化学的観点から論理的な選別を行わなければならない、蛋白質と化合物それぞれの物性を考慮した上での分子間相互作用に関する基礎的な解析とその蓄積が重要となる。

2. 研究の目的

本研究では、創薬スクリーニングにおいて等温滴定型カロリメーター (ITC) と示唆走査型カロリメーター (DSC) を用いた熱量測定を基に物理化学的な解析を実行することにより、フラグメントライブラリーから高親和性リガンドを設計する技術の開発と、その合理的設計戦略を提案することを目標とする。

3. 研究の方法

戦術として注目する手法が“カロリメトリック”な手法である。分子間の結合が起きる際、微量ながら結合に伴う熱量変化が生じる。これは分子間の相互作用エネルギーや分子の構造変化に伴うエネルギーに由来する。これらの微弱な熱量変化を高感度に検出することができる分析装置として、ITC と DSC がある。これらの装置は分子間の相互作用や分子の熱安定性に関する熱量変化を検出することができるため、熱力学的な定量解析が可能である。

標的とする蛋白質は、酵素 (CapF、ERK2、DJ-1) と蛋白質-蛋白質間相互作用 PPI (Tob1-CNOT7, S100-effector protein) とし、低分子化合物の結合・阻害活性と熱量解析結果の相関性に関する基盤データを集積することにより、特異的な結合・阻害を示す化合物の選別 (ヒットバリデーション) を行う。続

いてヒット化合物に対してその複合体の構造解析を実行することにより、分子モデリングを用いた高結合活性を示すと考えられる化合物探索を行い、熱量データとの関連性にフィードバックさせ、物理化学的観点に基づいたヒット化合物探索の戦略指針を確立させる。これらのアプローチを基盤に、親和性向上へ向けた化合物の設計・合成を試み、nM オーダーレベルのリガンド創出を試みる。

4. 研究成果

スクリーニングより得られた低分子化合物について、ITC や DSC による熱量測定を行い、特異的な結合を示す化合物の選別 (ヒットバリデーション) より、CapF、ERK2、DJ-1 に対するヒット化合物を得た。これらヒット化合物と蛋白質との複合体構造解析や分子モデリング解析結果を、熱量解析と共に議論することにより、1つの蛋白質に対して nM オーダーレベルのリガンドを創出することに成功した。また PPI に対する阻害剤探索においても、Tob1 や S100 蛋白質に対してフラグメント化合物にて阻害活性を示すヒットを得ることに成功した。このことから、低分子薬剤探索における熱量測定を基点とした物理化学的アプローチは、新規の合理的設計戦略としての有効な手法の 1つになると考えられる。

(1) ITC や DSC がヒットバリデーションにおいて有効に活用できることが示された

黄色ブドウ球菌に対する新規抗菌剤開発を目指して、CapF 特異的に結合し酵素反応を阻害する低分子化合物を取得するために、東大創薬機構 DDI のフラグメントライブラリーを用いることとした。1次スクリーニングとして、CapF に結合する低分子化合物を SPR より選抜した。さらに低分子化合物の特異性を、ITC を用いて熱量変化より選抜することにより、1つのヒット化合物 3-isopropenyl Tropolone を取得した ($K_D=13 \mu\text{M}$)。得られた共結晶構造解析より、ヒット化合物は CapF 内部の亜鉛イオンにキレートし、近辺の cavity に構造相補性をもって相互作用している結合様式が観察された。さらに ITC 解析では、亜鉛イオンのみでは発熱しないこと、Tropolone 骨格で異なる官能基に対して結合親和性が有意に低下することが示され、3-isopropenyl Tropolone が CapF の金属イオンとその cavity に対して特異的に結合しその相互作用は発熱反応であることが明らかとなった。このヒット化合物は、CapE と共に反応する単糖のエピマー化を阻害することも HPLC 解析の結果から示された [Sci. Rep. 2015 5, 15337.]。

抗がん剤もしくはがん解析のためのツールとしての低分子薬剤開発を目指して、DJ-1 を阻害剤する低分子化合物の探索を行った。SPR を用いたフラグメントスクリーニングによって、DJ-1 結合化合物を取得した。二次ス

クリーニングとして、ITC、結晶構造解析により詳細な結合様式を検証した。ITCの結果、発熱反応を示す親和性 $K_D=2.5 \mu\text{M}$ の結合が観察された。この値は分子量の小さなフラグメント化合物の示す親和性としては非常に強いものであった。結晶構造解析から、化合物は DJ-1 の Cys と共有結合を形成していることが明らかとなった。またこのヒット化合物は DJ-1 のグリオキシラーゼ活性阻害も示した ($IC_{50}=12 \mu\text{M}$)。

抗がん剤開発のモデル蛋白質として細胞増殖シグナルに関わる MAPk の一種 Extracellular-regulated kinase 2 (ERK2) を用いてフラグメントスクリーニングを行った。ここでは、SPR によるスクリーニング以外に、弱い相互作用の検出にも有効な NMR の特色に着目し、 ^{19}F NMR スクリーニングも行った。更に ITC での熱量解析を行い、それらの結果に基づき、蛋白質結合における特徴について分類を行ったところ、SPR、NMR と ITC では異なる結合様式を有する化合物が選抜されることが明らかになった。

(2) nM オーダーレベルのリガンドを創出することに成功した。

DJ-1 のヒット化合物構造を基本骨格として、DJ-1 に対してより親和性が高くグリオキシラーゼ活性を強く阻害する化合物の探索をおこなった。構造情報に基づいた変異体解析、類縁体解析により、ヒット化合物のいずれの原子が重要であるかを解析し、2つの部位に絞って付加を進めることを決定した。2つの部位それぞれに関して、構造情報に基づいて付加した類縁体を購入し、示差走査型蛍光測定 DSF (CFX96 装置/Bio-Rad) ITC により親和性を測定したところ、2つの部位それぞれについて親和性を向上させる類縁体が得られた。また親和性の向上に伴い DJ-1 のグリオキシラーゼ活性阻害能も向上した。これらのアプローチより、サブ nM オーダーの阻害能を示す化合物の取得に成功した。

(3) 熱量解析から蛋白質-蛋白質間相互作用 PPI を阻害するフラグメント化合物の取得にも成功した

低分子化合物と蛋白質間の相互作用に関する熱量変化に基づく化学的知見を網羅的に集積するため、PPI 阻害剤の探索も行った。mRNA の品質管理における疾患に関連する PPI の阻害剤探索として、Tob1-CNOT7 をモデルにフラグメントスクリーニングを行った。SPR にて Tob1 に結合するフラグメントを選出した後、CNOT7 との競合アッセイを行い、 μM オーダーのフラグメント化合物の取得に成功した [*Protein Cell* **2015** 6, 924-928.]。

乳がんや皮膚がんなどに高発現することが報告されている S100 を標的蛋白質とし、そのエフェクター蛋白質との PPI を阻害するフラグメント化合物の探索を行った。蛍光偏光解消法(FP)を用いてスクリーニングを行い、

続く濃度依存性の評価による偽陽性化合物を排除した。さらにこの化合物群に対し SPR を用いた競合阻害アッセイにより特異性評価を行い、ITC 測定より S100A4 と結合比 2:1 で相互作用する化合物の取得に成功した ($K_D=11 \mu\text{M}$)。DSC 測定からヒット化合物は S100 のパッキングを強める形で相互作用していることが示唆された。さらに in silico でのドッキングシミュレーションから、結合部位が S100 のダイマー界面に存在することが予測され、DSC 測定の結果を支持するものであった。

このように、フラグメント化合物を用いて熱量解析から特異的な阻害剤を取得する本アプローチは、酵素阻害開発に限らず、蛋白質間相互作用の阻害にも有用であることが示された。今後多彩な蛋白質群への応用が期待される。

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 53 件)

K. Tanaka, JM. Caaveiro, K. Tsumoto
Bidirectional Transformation of a Metamorphic Protein between the Water-Soluble and Transmembrane Native States
Biochemistry **2015** 54, 6863-6866. 査読有
DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01112.

Y. Bai, S. Tashiro, S. Nagatoishi, T. Suzuki, D. Yan, R. Liu, K. Tsumoto, M. Bartlam, T. Yamamoto
Structural basis for inhibition of the Tob-CNOT7 interaction by a fragment screening approach
Protein Cell **2015** 6, 924-928. 査読有
DOI: 10.1007/s13238-015-0225-6.

JM. Caaveiro, M. Kiyoshi, K. Tsumoto
Structural analysis of Fc/Fc γ R complexes: blueprint for antibody design
Immunol Rev **2015** 268, 201-221. 査読有
DOI: 10.1111/imr.12365. Review.

K. Nakano, T. Chigira, T. Miyafusa, S. Nagatoishi, JM. Caaveiro, K. Tsumoto
Discovery and characterization of natural tropolones as inhibitors of the antibacterial target CapF from *Staphylococcus aureus*
Sci. Rep. **2015** 5, 15337. 査読有
DOI: 10.1038/srep15337.

Y. Tanabe, S. Nagatoishi, K. Tsumoto
Thermodynamic characterization of the interaction between the human Y-box binding protein YB-1 and nucleic acids.
Mol. Biosyst **2015** 11, 2441-2448. 査読有
DOI: 10.1039/c5mb00184f.

T.Chigira, S. Nagatoishi, K. Tsumoto

Differential binding of prohibitin-2 to estrogen receptor α and to drug-resistant ER α mutants

Biochem. Biophys. Res. Commun **2015** 463, 726-731. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.002.

T. Tashima, S. Nagatoishi, H. Sagara, S. Ohnuma, K. Tsumoto
Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils

Biochem. Biophys. Res. Commun **2015** 463, 292-296. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.053.

H. Akiba, K. Tsumoto
Thermodynamics of antibody-antigen interaction revealed by mutation analysis of antibody variable regions

J. Biochem. **2015** 158, 1-13. 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvv049.

M. Kiyoshi, JM. Caaveiro, T. Kawai, S. Tashiro, T. Ide, Y. Asaoka, K. Hatayama, K. Tsumoto
Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor Fc γ RI

Nat. Commun **2015** 6, 6866. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms7866.

K. Morante, JM. Caaveiro, K. Tanaka, JM. González-Mañas, K. Tsumoto
A pore-forming toxin requires a specific residue for its activity in membranes with particular physicochemical properties

J. Biol. Chem. **2015** 290, 10850-10861. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.615211.

K. Tanaka, JM. Caaveiro, K. Morante, JM. González-Mañas, K. Tsumoto
Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid

Nat. Commun **2015** 6, 6337. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms7337.

K. Tsumoto, Y. Hagihara, D. Saerens D
Recent advances in antibody engineering

Biochim. Biophys. Acta. **2014** 1844, 1889-1890. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.08.017.

M. Nakakido, C. Aikawa, I. Nakagawa, K. Tsumoto
The staphylococcal elastin-binding protein regulates zinc-dependent growth/biofilm formation

J. Biochem. **2014** 156, 155-162. 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvu027.

S. Tashiro, JM. Caaveiro, CX. Wu,

QQ. Hoang, K. Tsumoto
Thermodynamic and structural characterization of the specific binding of Zn(II) to human protein DJ-1

Biochemistry **2014** 53, 2218-2220. 査読有
DOI: 10.1021/bi500294h.

S. Kudo, JM. Caaveiro, S. Goda, S. Nagatoishi, K. Ishii, T. Matsuura, Y. Sudou, T. Kodama, T. Hamakubo, K. Tsumoto
Identification and characterization of the X-dimer of human P-cadherin: implications for homophilic cell adhesion.

Biochemistry **2014** 53, 1742-1752. 査読有
DOI: 10.1021/bi401341g.

M. Kiyoshi, JM. Caaveiro, E. Miura, S. Nagatoishi, M. Nakakido, S. Soga, H. Shirai, S. Kawabata, K. Tsumoto

Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex

PLoS One **2014** 9, e87099. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0087099.

A. Fukunaga, K. Tsumoto
Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions

Protein Eng. Des. Sel. **2013** 26, 773-780. 査読有
DOI: 10.1093/protein/gzt053.

T. Miyafusa, JM. Caaveiro, Y. Tanaka, K. Tsumoto
Dynamic elements govern the catalytic activity of CapE, a capsular polysaccharide-synthesizing enzyme from *Staphylococcus aureus*

FEBS Lett. **2013** 587, 3824-3830. 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.10.009.

T. Ito, K. Tsumoto
Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress

Protein Sci. **2013** 22, 1542-1551. 査読有
DOI: 10.1002/pro.2340.

R. Matsunaga, S. Yanaka, S. Nagatoishi, K. Tsumoto
Hyperthin nanochains composed of self-polymerizing protein shackles

Nat. Commun **2013** 4, 2211. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms3211.

[学会発表](計120件)
口頭発表39件、ポスター発表81件

Jose M.M. Caaveiro, Koji Tanaka, Koldo Morante, and Kouhei Tsumoto
Basis of cell-membrane damage by a protein

nanopore

Todai-Tsinghua Joint Workshop for Frontiers in Bioengineering and Biomedical Engineering 2016/03/10, 東京大学 本郷キャンパス (東京都 文京区)

Koldo Morante, Jose M.M. Caaveiro, Koji Tanaka, Kouhei Tsumoto
Lipid-protein partnering during pore-formation of fragaceatoxinC
The Biophysical Society 60th Annual Meeting 2016/2/27-3/2, Los Angeles, USA

Koji Tanaka, Koji Tanaka, Jose Caaveiro, Koldo Morante, Kouhei Tsumoto
Mechanism of self-assembly of a transmembrane pore triggered by specific biomembranes
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PacificChem) 2015/12/15-20, Sheraton Waikiki, Hawaii, USA

J. M.M. Caaveiro, T. Mitani, and K. Tsumoto
Use of thermodynamic tools in the early stages of fragment-based drug discovery
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PacificChem) 2015/12/15-20, Hawaii, USA

J. M.M. Caaveiro, T. Miyafusa, T. Chigira, K. Nakano, S. Nagatoishi, and K. Tsumoto
Structural and mechanistic basis of capsular polysaccharide-synthesizing enzymes CapE/CapF, and the route to discovery novel inhibitors with antibacterial properties
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PacificChem) 2015/12/15-20, Hawaii, USA

山口奏、長門石曉、梶谷敬太、加藤悦子、秋山弘行、金井理、古谷利夫、津本浩平
含フッ素フラグメントライブラリを用いた¹⁹F NMR、SPR、ITCによるスクリーニング
第6回スクリーニング学研究会
2015年11月27日、ソニックシティ(埼玉県 大宮市)
優秀ポスター発表賞 受賞

Satoru Nagatoishi, Sou Yamaguchi, Keita Kajita, Etsuko Katoh, Hiroyuki Akiyama, Satoru Kanai, Toshio Furuya, Kouhei Tsumoto
Biophysical cross-validation in fragment screening of fluorinated chemical library toward FBDD using SPR, ITC and ¹⁹F NMR
The 43rd Symposium on Structural Activity Relationship 2015
The 10th Japan-China Joint Symposium on Drug Discovery and Development
2015年9月28日、新潟日報メディアシップ日報ホール (新潟県 新潟市)
優秀講演賞 SAR Presentation Award 受賞

長門石曉

低分子スクリーニングにおける熱量解析の活用
よこはまNMR研究会第53回ワークショップ
2015年9月16日、理化学研究所横浜事業所 (神奈川県 横浜市)

長門石曉

Biacoreで蛋白質間相互作用PPI阻害剤を探索する
GE Life Sciences Day 2015
2015年7月24日、パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
GE Life Sciences Day 2015 ポスター賞

長門石曉、中納 広一郎、宮房 孝光、Caaveiro Jose、津本浩平
Staphylococcus aureus 莢膜合成酵素 CapF と低分子化合物の物理化学的な相互作用解析
第42回構造活性相関シンポジウム
2014年11月13日-14日、くまもと森都心プラザ (熊本県 熊本市)
優秀講演賞 SAR Presentation Award 受賞

松長 遼、長門石曉、津本浩平
還元環境に应答して重合する蛋白質 Protein shackle の開発
第8回バイオ関連化学シンポジウム
2014年9月11日-13日、岡山大学 津島キャンパス (岡山県 岡山市)
部会講演賞 受賞

工藤 翔太
高機能性抗体の設計に向けた抗 P-cadherin 抗体の物性、構造解析
第12回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
2014年7月14日-15日、箱根高原ホテル(神奈川県 足柄下郡)
若手研究者奨励賞 受賞

Jose M.M. Caaveiro
Thermodynamic tools in the early stages of Drug Discovery
4th Asia-Pacific Protein Association
2014/5/17 ~ 5/20, ICC Jeju, Korea

長門石曉、津本浩平
生命分子相互作用解析 : ITC と SPR
日本薬学会第134年会
2014年3月27日-30日、くまもと県民交流会館パレアホール(熊本県 熊本市)

木吉 真人、三浦恵理、長門石曉、Jose M. M. Caaveiro M.M.、中木戸誠、曾我真司、白井宏樹、河畑茂樹、中村春木、津本浩平
親和性向上を目指した抗インターフェロン γ レセプター抗体の合理的改変
第86回日本生化学会大会

2013年9月11日-13日, パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

鈴木絃一メモリアル賞 受賞

工藤 翔太、Jose M. M. Caaveiro、長門石 暁、浜窪隆雄、児玉龍彦、松浦正、須藤幸夫、津本浩平

細胞接着蛋白質 P-cadherin の同種親和的二量体形成機構の解明

第 86 回日本生化学会大会

2013年9月11日-13日, パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

鈴木絃一メモリアル賞 受賞

長門石 暁、津本浩平

分子間相互作用をマイクロに捕らえる 表面プラズモン共鳴法と熱測定を活用

第 17 回コロイド・界面フォーラム

2013年7月18日, KKR 江の島ニュー向洋(神奈川県 藤沢市)

田中耕路、Jose M. M. Caaveiro、津本浩平
Actinoporin, FraC は二つの異なる基質 - 脂質と糖鎖を一つのポケットで認識する

第 60 回トキシシンポジウム

2013年7月17日-19日, 楓香荘(兵庫県 宍粟市)

若手奨励賞 受賞

〔図書〕(計 13 件)

長門石 暁、楠崎佑子、津本浩平

「結合熱力学プロファイリングによる創薬」
ファルマシア 51 巻 12 号 (日本薬学会)

2015 年

長門石 暁、津本浩平

化合物の“質”を評価する新しいスクリーニング系

実験医学 研究成果を薬につなげるアカデミア創薬の戦略と実例 (羊土社) **2014 年**

長門石 暁、津本浩平

物理化学的スクリーニング技術による創薬戦略と展望

技術レポート 2023 (日本能率協会総合研究所) **2013 年**

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

津本 浩平 (TSUMOTO, Kouhei)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：90271866

(2)研究分担者

長門石 暁 (NAGATOISHI, Satoru)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：30550248