

X線結晶解析スクリーニングによる分子標的薬の探索

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学） 助教

横山 武司

X線結晶構造解析法は、結晶中の原子（電子雲）位置を決定する手法であり、タンパク質と薬剤の相互作用を原子レベルで可視化できる。そのため、医薬品開発においては、リード化合物の構造最適化の補助的アプローチとして用いられる。一方で、Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) では、X線結晶構造解析法を初期スクリーニングに用いることが多い。分子量の小さいフラグメント化合物を扱う FBDD では、高濃度での実験が必要となるため、結合・阻害分析の偽陰性・偽陽性率が上昇しやすいが、X線結晶構造解析であれば、過誤を抑制できるためである。結合様式を直接観測するため、構造最適化を円滑に推進できる利点もある。X線結晶解析には高純度のタンパク質試料・良質な結晶が必要であり、X線解析スクリーニングを実行するためには多大な人的リソースを要する。そのため、X線結晶構造解析法は初期スクリーニングには不向きであるとされてきた。しかし、近年の放射光施設およびビームラインにおけるロボット化やデータ解析の自動化などの高度化により、X線結晶解析によるスクリーニングが実用的になりつつある。本発表では、インハウス化合物ライブラリを用いた X線結晶解析スクリーニングによって MutT homologue 1 (MTH1) および Bromodomain-containing protein 4 (BRD4) 阻害剤を発見した研究成果を紹介する（参考文献 1, 2）。

MTH1 は 8-oxo-dGTP などの酸化プリンヌクレオチド三リン酸をヌクレオチドリン酸と二リン酸に加水分解する酵素であり、ヌクレオチドプールの恒常性を維持することで、細胞の腫瘍化を抑制する。8-oxo-dGTP は DNA ポリメラーゼに認識されるため、DNA に組み込まれて塩基転換変異を引き起こすが、8-oxo-dGMP はグアニル酸キナーゼには認識されないため、DNA に組み込まれることなく代謝されると考えられている。がん細胞は高い活性酸素種レベルにあり、その生存は MTH1 に強く依存すると考えられていることから、MTH1 は抗がん剤の新しい標的タンパク質とみられている。これまでに報告されている MTH1 阻害剤はプリン塩基やアミノピリミジンをもつ化合物が大部分を占めており、異なる骨格をもつ MTH1 阻害剤の開発が望まれている。我々は、インハウス化合物ライブラリから 20 種類の化合物カクテルを作成し、X線結晶解析スクリーニングを行った。20 個の結晶データのうち、 α -mangostin (α -M) を含む化合物カクテル溶液に浸漬した MTH1 結晶構造の基質結合部位に、 α -M と合致する形状の電子密度が観測された。 α -M は東南アジア原産の果物マンゴスチンの果皮に含まれるキサントン化合物である。次に α -M を含む 10 種類の天然キサントン化合物の MTH1 酵素阻害活性を測定した。 α -M の IC_{50} は $0.47 \mu\text{M}$ である一方で、そのジメチルアシル基が環化した 3-isomangostin の阻害活性が最も高く、その IC_{50} は $0.052 \mu\text{M}$ だった。これまでに報告されている最も阻害効果の高い TH287 の IC_{50} が $0.020 \mu\text{M}$ であったことから、3-isomangostin は強い MTH1 阻害剤であることが明らかになった。さらに、MTH1-3-isomangostin 複合体の X線結晶構造解析を行った結果、3-isomangostin は MTH1 の核酸

認識残基 N33、D120、水分子と水素結合ネットワークを形成していた。MTH1 の基質結合部位には F27、F72、F74、W117、F139 などの疎水性アミノ酸残基が集中しており、3-isomangostin はこれらのアミノ酸残基と C-H \cdots π 、 $\pi\cdots\pi$ 相互作用を形成していた。3-isomangostin のがん細胞増殖抑制効果を検証する必要があるが、これらの結果は、3-isomangostin が抗がん剤として新規性の高いリード化合物であることを示唆している。

BRD4 は二つのプロモドメイン (BD1、BD2) をもつ。BD1 はヒストンのアセチル化リシンを認識し、BD2 は転写伸長因子 (P-TEFb) やメディエーターと結合する。BRD4 の役割は、P-TEFb やメディエーターをプロモーター領域にリクルートして転写を活性化することである。BRD4 が転写活性化する遺伝子には多くのがん遺伝子が含まれており、プロモドメインにヒストンと競合的に結合する化合物は、抗がん剤として有効であると期待されている。我々は、8 種類の化合物カクテル溶液を作成し、カクテル溶液に浸漬処理を施した BRD4-BD1 の結晶の X 線結晶解析スクリーニングを行い、イソリキリチゲニン (ISL) が BRD4 に結合することを明らかにした。BRD4-BD1 の基質結合部位には保存された水分子クラスターが存在する。この 6 つの水分子は水素結合によって安定に結合しており、BRD4 阻害剤複合体構造でも保存されている。ISL は、その内の一つの水分子を排除して、水分子クラスターおよび Y97 と直接水素結合を形成していた。これらの水素結合が ISL の結合に重要と考えられたため、水分子クラスターと相互作用する 4-OH を 4-OCH₃ に置換した ISL 4-methyl ether と BRD4-BD1 の相互作用を等温滴定型カロリメトリーで検証した。ISL と ISL 4-methyl ether の結合親和性は同程度であった。一方で、ISL はその結合がエンタルピー駆動であるが、ISL 4-methyl ether の結合にはエンタルピーとエントロピーが同程度に寄与していたことから、ISL の結合エンタルピーは水分子クラスターとの相互作用によって獲得される可能性が示唆された。次に、水分子クラスターの水素結合の詳細を知るために、BRD4 の中性子結晶構造解析を行った。中性子は X 線よりも水素の感度が高く、詳細な水素結合情報が得られる。BRD4 結晶をドイツの中性子源 FRMII-BIODIFF で中性子回折測定を行い、水素原子を含む“完全な” BRD4 立体構造を得た。中性子解析の結果、水分子クラスター内の全ての水素原子は水素結合を供与し、酸素原子は 1-2 個の水素原子から水素結合を受容することが明らかになった。このことは、ISL が結合しても水素結合数は変化せず、各水素結合の最適化によって結合エンタルピー変化が獲得されることを示唆している。エンタルピー支配的に結合する薬剤は、標的分子の選択的な阻害に有利であると考えられている。ISL がエンタルピー駆動型の有望なリード化合物であることを示し、そのエンタルピー変化の分子起源は水分子クラスターの最適化であることを示唆した。

【参考文献】

1. Yokoyama, T.; Kitakami, R.; Mizuguchi, M. Discovery of a New Class of Mthl Inhibitor by X-Ray Crystallographic Screening. *Eur J Med Chem* **2019**, 167, 153-160.
2. Yokoyama, T.; Matsumoto, K.; Ostermann, A.; Schrader, T. E.; Nabeshima, Y.; Mizuguchi, M. Structural and Thermodynamic Characterization of the Binding of Isoliquiritigenin to the First Bromodomain of Brd4. *Febs Journal* **2019**, 286, 1656-1667

略歴

学歴

2001年 大阪大学基礎工学部システム工学科生物工学専攻 卒業

2003年 横浜市立大学大学院総合理学研究科生体超分子システム科学科 博士前期課程 修了

2006年 横浜市立大学大学院総合理学研究科生体超分子システム科学科 博士後期課程 修了

職歴

2006-2008年 ヒューストン大学生物・生化学科 博士研究員

2008-2011年 茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 産学官連携研究員

2011年- 富山大学大学院医学薬学研究部（薬学） 助教