

## 異分野連携による創薬研究



研究ノート

井上 豪\*

Research for new drugs development by different field cooperation

Key Words : X-ray crystallography, Sosho project, Laser irradiation method, Stirring method, Pharmaceutical Innovation Value Chain

20世紀における科学の3大発見の1つにペニシリンの発見がある。本格的な医薬品の開発はこれを機に始まったと言われ、今では分子設計の手法も確立され、これを加速するためのコンビナトリアルケミストリー(CC)や、ロボティックスシステムを駆使したハイスループットスクリーニング(HTS)といった革新的技術も開発されている。一方、IT技術を駆使した技術開発も進み、バイオインフォマティクスによる新規ターゲットタンパク質の特定やリード化合物の探索などを行い、研究開発のための費用の圧縮と期間短縮が試みられている。また、わが国でもたんぱく3000プロジェクトなどにより、ヒトやマウスも含めた疾患関連および病因となる蛋白質の立体構造が次々と明らかとなっており、標的病因蛋白質の3次元立体構造に基づいた、より高効率な薬物設計手法である Structure-Based Drug Design(SBDD)の手法開発が重要性を増している。しかし、製薬会社における薬品開発では、標的蛋白質のうち約半分はGPCRなどの膜蛋白質であり、その結晶化は容易ではない。また、糖鎖修飾をうけていたり、産生されてのちにすぐに分解を受けるものなど、高純度サンプルの入手が困難なものも多く、3次元構造がないためにSBDDを実施できない場合が多い。

そこで我々は、まず、立体構造を基にしたSBDD

による医薬品開発を加速するため、X線構造解析のための標的蛋白質の高品質結晶化のみならず、医薬品も含めた低分子化合物の結晶化に特化したプロジェクトとして、大阪大学工学研究科を中心に「創晶プロジェクト」(<http://www.so-sho.jp/>)を立ち上げこれに参画した。通常、低分子や蛋白質の結晶化では、自然核発生とその結晶成長を静置状態の中で待つことが常識とされた。しかし、本プロジェクトでは、レーザー照射<sup>1</sup>や溶液攪拌<sup>2</sup>の新しい技術を導入した革新的な蛋白質の結晶化手法を確立し、これまで水溶性蛋白質を中心に、その結晶化にフェムト秒レーザーの照射が結晶化の確率向上と時間短縮に効果があり、溶液の攪拌が高品質化に効果があることを示している。さらに、サンプルの安定性が問題となる膜蛋白質の結晶化にも有効であることが判明し、いくつかの成功例も得られている<sup>3,4</sup>。

一方、NPO法人関西バイオグリッドを中心として、量子力学計算を取り入れた、オリジナリティーの高い新しい計算方法で、酵素の活性部位に結合しうる有機低分子化合物をスクリーニングする方法が開発されている(<http://www.biogrid.jp/np/>)。一般のインシリコ創薬では、計算機上で、標的蛋白質の基質結合部位に、化合物ライブラリーに含まれる多数の薬物分子を順次結合させ、複合体構造と結合自由エネルギー( $G$ )を予測し、ドッキングスコア(以下スコアと呼ぶ)の良い化合物をヒット化合物候補として採択する。しかし、複合体構造の予測が困難であるため、誤った予測構造からの $G$ の計算は実測値との差が大きく、ヒット率は低下する。これに対して、NPO法人バイオグリッド関西の研究グループでは、蛋白質 化合物相互作用行列を作成し、これを用いた新しいインシリコ創薬の手法である Multiple Target Screening(MTS)法<sup>5</sup>と Docking score index(DSI)法<sup>6</sup>を開発し、ヒット化合物予



\* Tsuyoshi INOUE

1966年4月生  
大阪大学・大学院工学研究科・応用精密化学専攻博士後期課程修了(1994年)  
現在、大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻 物質機能化学講座 構造物理化学領域 教授 工学博士 構造物理化学、構造生物学  
TEL : 06-6879-7408  
FAX : 06-6879-7409  
E-mail : inouet@chem.eng.osaka-u.ac.jp

測率を飛躍的に向上させることに成功しており、新しいインシリコでの化合物探索法を確立してきた。

そこで、我々は、大阪大学の創晶プロジェクトを中心に、(株)セルフリーサイエンス、(株)プロテインクリスタルなどのベンチャーの他、NEC や富士通九州など大手メーカーも結集して「創薬バリューチェーン」と呼ばれる一連の異分野連携の研究グループを結成し(図1)、公的研究機関を中心としたインシリコ創薬を可能とする研究チームを編成して製薬企業との橋渡し役を担うことを目指した。



図1. 創薬バリューチェーンの構築

創薬バリューチェーンにおける最初の研究成果は、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 由来 Orotidine 5'-monophosphate 脱炭酸酵素 (PfOMPDC) の阻害剤探索で得られた。まず創晶プロジェクトにおいて結晶を得て、2.6 分解能でのX線構造解析を行った(図2)<sup>7)</sup>。続いて、本酵素の構造情報を利用した MTS 法、および基質類似の阻害剤情報を利用した DSI 法を適用し、新規骨格を有した阻害剤の探索に関する研究を共同で行った。まず、ナミキ商事(株)のカタログから提供されて

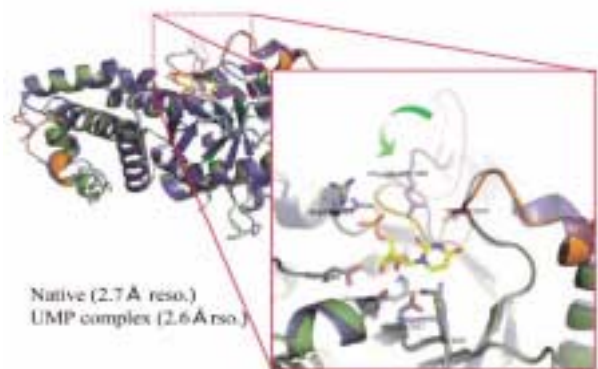


図2. PfOMPDCの2.6 分解能X線構造

いる化合物リストの中から、分子量等が適度な 100 万個を選び、その中から MTS 法、DSI 法によって、それぞれ上位 5,000 化合物をリストアップした。共通してリストされた化合物を考慮し、合計 7,622 個を選択した。続いて、MMPB(Poisson-Boltzman) SA (surface area) 法による再ドッキング計算により、上位 200 個までの化合物を発注した。一方、7,622 個の化合物の構造情報をもとに、kmeans 法や kPCA 法を使って 200 種類に分類し、その分類ごと、また化合物ごとに、溶解性、LogP 等々の物性情報をインシリコで計算し、データベースを作成した。発注品 200 個のうち 156 個が実際に購入でき、活性測定を行ったところ、100 μM 程度の IC<sub>50</sub> 値を示す化合物が 15 個存在し、ヒット率は 10 % 近い値が得られた。

次に、ヒト由来造血器型プロスタグランジン (PG)D 合成酵素(H-PGDS)のX線構造(PDBコード; 1IYH, 1IYI, 1V40, 2CVD)を利用して<sup>8,9,10</sup>、阻害剤探索に関する実証研究も行った。PGD<sub>2</sub>は、生体内で様々な機能を有する局所ホルモンとして産生される化合物であるが、中でも末梢組織ではアレルギーの媒介物質として機能するため、PGD<sub>2</sub>の産生を担う酵素 H-PGDS は、新たな抗アレルギー剤開発のターゲットとして期待されている。マラリア由来の脱炭酸酵素の場合と同様に、100 万個の化合物リストの中から MTS 法、DSI 法によって候補化合物を 6,880 個まで絞り込み、MMPBSA 法で優先順位をつけ、上位 500 個の中から 385 個を購入した。次に、各化合物について 30, 10, 3 μM の溶液を調製し、表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定による結合活性を測定した。その結果、67 個が K<sub>d</sub> 値で 20-50 μM の値を示し、活性測定の結果 2 割近い確率でヒット化合物が得られた。

なお、本手法は、既にいくつかの製薬企業によっても実証研究が進められており、100 万化合物の中から 3,229 個の候補化合物を検索し、先行して入手できた 915 個の化合物のうち、濃度 90 μM で阻害活性 50 % 以上の分子が 335 個得られた。このうち、濃度依存試験を行って IC<sub>50</sub> 値の測定を行ったところ、100 μM 以下を示した分子が 27 個、20 μM 以下を示したのが 8 個発見されている。IC<sub>50</sub> 値が 100 μM 以下を示した分子は合計で 35 個となり、やはり高ヒット率が証明されている。

以上、学術研究として意義深く、かつ、医薬品開発の標的にもなるような重要な酵素のX線構造解析を行いながら、異分野との連携により製薬企業との橋渡し研究を行うことによって、今後、公共の研究機関からリード化合物がいくつも創製されることが期待される。

なお、これらの研究は、文部科学省の大学等発ベンチャー創出支援制度をはじめ、NEDO、JST、大阪北部(彩都)地域知的クラスター創成事業、地域新生コンソーシアム研究開発事業などの支援を受けて実施しました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Adachi H., Takano K., Hosokawa Y., Inoue T., Mori Y., Matsumura H., Yoshimura M., Tsunaka Y., Morikawa M., Kanaya S., Masuhara H., Kai Y., and Sasaki T.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, 42, L798-L800 (2003).
- 2) H. Adachi, A. Niino, T. Kinoshita, M. Warizaya, R. Maruki, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, Y. Mori and T. Sasaki: *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 83 (2006).
- 3) H. Adachi, S. Murakami, A. Niino, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, A. Yamaguchi and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.*, 43, 10B, pp.L1376-L1378, (2004).
- 4) Tsukazaki T., Mori H., Fukai S., Numata, T., Perederina A., Adachi H., Matsumura H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Sasaki T., Vassilyev D. G., Nureki O. and Ito K., *Acta Cryst.*, F62, 376 (2006).
- 5) Fukunishi Y., Mikami Y., Kubota S., Nakamura H., *J. Mol. Graphics and Modelling*, 25, 61-70 (2005).
- 6) Fukunishi Y., Mikami Y., Takedomi K., Yamanouchi M., Shima H., Nakamura H., *J. Med. Chem.*, 49, 523-533 (2006).
- 7) Tokuoka, K., Kusakari, Y., Krungkrai, S. R., Matsumura, H., Krungkrai, J., Horii, T. and Inoue, T. *J. Biochem.*, 143, 69-78 (2008).
- 8) Inoue, T., Irikura, D., Okazaki, N., Kinugasa, S., Matsumura, H., Uodome, N., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Miyano, M., Kai, Y., and Urade, Y., *Nat Struct Biol* 10, 291-296 (2003).
- 9) Inoue, T., Okano, Y., Kado, Y., Aritake, K., Irikura, D., Uodome, N., Okazaki, N., Kinugasa, S., Shishitani, H., Matsumura, H., Kai, Y., and Urade, Y., *J Biochem (Tokyo)* 135, 279-283 (2004).
- 10) Aritake, K., Kado, Y., Inoue, T., Miyano, M., and Yoshihiro Urade, *J. Biol. Chem.*, 281, 15277-15286 (2006).

