

学位論文内容要旨

氏名： 三沢 憲佑

題目：

In silico フラグメントマッピング法を用いた EED-EZH2 PPI 阻害剤の合理的探索と分子設計

要旨：

【背景と目的】

DNA メチル化やヒストンアセチル化などに代表されるエピジェネティクス制御は癌細胞の増殖において非常に重要な役割を担っている。その増殖を促進する重要な因子の 1 つである enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) はメチルトランスフェラーゼ活性を有しており、多くの癌において過剰発現している。そのため、EZH2 の活性サイトを標的とした EZH2 酵素阻害剤がこれまでに数多く開発され、一部臨床試験に供試されている。近年、この酵素阻害とは異なる作用機序として、embryonic ectoderm development (EED) と EZH2 のタンパク質間相互作用 (PPI) 阻害が注目されている。EED は EZH2 と相互作用することで、EZH2 の酵素活性向上に間接的に寄与するタンパク質であり、実際、EED-EZH2 PPI 阻害剤によって EZH2 の作用が抑制され、癌細胞に対する増殖抑制活性が発現することから、近年、非常に注目されている。本 PPI 阻害剤は、EZH2 酵素阻害剤との併用による相乗効果が細胞レベルで実証され、EZH2 酵素阻害剤の効果が低い EZH2 が変異した細胞株に対しても有効性が示されていることから、より幅広い治療の選択肢となる可能性を有する新たな薬剤候補として期待されている。しかし、EED-EZH2 PPI 阻害剤の報告例 (図 1) は少ないため、阻害剤の相互作用情報は乏しく、また大規模な化合物ライブラリーに対しては計算資源の問題から、これまで著者らが検討してきた酵素活性部位を標的とする一般的なドッキング方法¹⁾だけではスクリーニングが難しいと考えた。そこで、本研究では、EED-EZH2 PPI 阻害剤の新たなシード化合物を探索するために、既報の研究²⁾を方法論的に発展させたものとして、北里大学薬学部創薬物理化学教室で開発された *in silico* フラグメントマッピング法を用いることとした。本手法は、既存のタンパク質-リガンド複合体の X 線結晶構造をサブサイト-フラグメント単位で格納したデータベースを基に、結合し得るフラグメントをタンパク表面にマッピングする手法であり、本研究に見られる相互作用情報が少ない標的に対しても合

理的なファーマコフォアモデルを構築できることが利点であると考えている（表 1）。本研究では、EED-EZH2 PPI 界面にマッピングされたフラグメントの配置パターン情報を基に、市販化合物ライブラリーに対して 3 次元ファーマコフォアベースバーチャルスクリーニングを行い、得られた阻害剤の結合様式に基づいた新規 EED-EZH2 PPI 阻害剤の合理的分子設計を行った。

表 1. 手法比較

	以前の手法 ¹⁾	本検討での手法 ²⁾
手法	ドッキングベーススクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>in silico</i> フラグメントマッピング ・ 3次元ファーマコフォアベーススクリーニング ・ ドッキングベーススクリーニング
内容	同じ母骨格を有する化合物群を標的酵素にドッキング	フラグメントマッピングにより構築したファーマコフォアモデルを満たす化合物を抽出し、その化合物を標的タンパク質にドッキング
特徴	<ul style="list-style-type: none"> ・ 化合物の最適化に強み ・ 標的によっては正確性や汎用性に課題 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 実験事実に基づいた合理的探索に強み ・ ドッキングだけでは探索が難しい標的でも適用可能

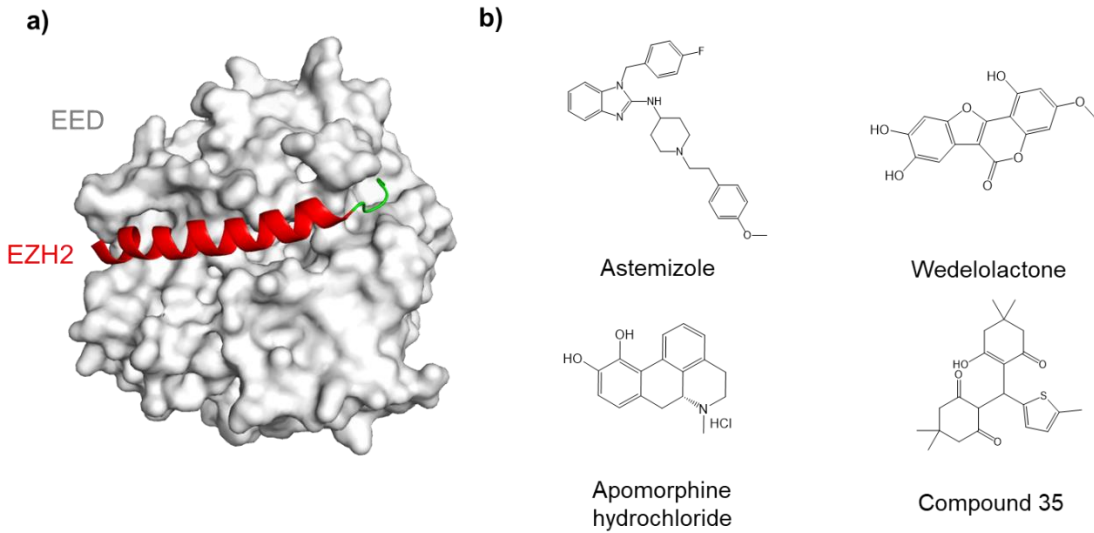


図 1. EED-EZH2 peptide 複合体と既存 PPI 阻害剤 ²⁾

a) EED-EZH2 peptide 複合体の X 線結晶構造（マウス、PDB ID: 2QXV） b) 代表的な既存 EED-EZH2 PPI 阻害剤

【方法】

以下の手順で阻害剤を探索した。

(1) *In silico* フラグメントマッピング標的構造の選定

本研究開始時に明らかになっていた EED-EZH2 peptide 複合体 (PDB ID: 2QXV) の PPI 界面において、窪みが見られる EED をフラグメントマッピングの対象として選抜した

(図 1)。また、阻害剤の結合メカニズムを考慮して、複合体の PPI 情報および目視を基に定義したマッピング残基（計 85 残基）を対象として、アポ体（PDB ID: 3JZN）に対してフラグメントマッピングを実施した。

(2) *In silico* フラグメントマッピング

北里大学薬学部創薬物理化学教室で開発された Canonical Subsite Fragment DataBase (CSFDB) および Fsubsite プログラムを用いて、*in silico* フラグメントマッピングを実施した。CSFDB は既知のタンパク質ーリガンド X 線結晶構造データベースのリガンドをフラグメントに分割し、それらフラグメント近傍におけるアミノ酸残基をサブサイトとして抽出したサブサイトーフラグメント対計 482 個で構成されるデータベースである。一方、Fsubsite は CSFDB に登録されている各サブサイトに類似した部位を標的タンパク質表面上で探索し、類似部位が見出された場合に、サブサイトに紐づいたフラグメントを配置するプログラムである。本研究では、アポ体に対してフラグメントマッピングを行い、各フラグメントのエネルギー極小化とフラグメント毎のクラスタリングを実施することで代表フラグメントを抽出後、EED 内部に埋もれていないフラグメントを目視にて選抜した。

(3) 3 次元ファーマコフォアモデルの構築とバーチャルスクリーニング

本研究では、深い窪み（ポケット）に配置されたフラグメントに対して、同種のフラグメントが同位置に複数配置されている場合にそれらが表す特性球を定義した。また、トリプトファン（Trp）残基と π - π 相互作用しているフラグメントに対応する特性球を必須として定義し、それ以外は領域ごとに目視にて部分一致を定義した。

次に、市販化合物ライブラリー（486 万化合物）を対象に、構築した 3 次元ファーマコフォアモデルを用いてバーチャルスクリーニングを実行した。抽出した化合物群に対して、ドッキングベーススクリーニングを実施後、Trp 残基との相互作用、ドッキングスコア、偽陽性化合物（pan-assay interference compounds (PAINS)）のフィルタリング、EZH2 との衝突可能性、ポーズのファーマコフォア一致度、および化合物の多様性に基づく構造クラスタリングにより、候補化合物を選抜した。

(4) 阻害活性評価

選抜した化合物群の EED-EZH2 PPI 阻害活性評価は市販のアッセイキットを用いて委託評価した。

(5) 分子動力学 (MD) シミュレーションによる結合様式評価

EED と各化合物のドッキング計算による結合様式を初期構造として、50 ns の MD シミュレーションを実施し、ポケット内での化合物重原子の root mean square deviation (RMSD) 値により、その安定性を評価した。

(6) 類似度評価

MACCS keys および Morgan fingerprint を記述子とした Tanimoto 係数を用いて、既存 EED-EZH2 PPI 阻害剤との類似度評価を行った。

【結果と考察】

(1) *In silico* フラグメントマッピングと 3 次元ファーマコフォアモデル構築

In silico フラグメントマッピングの結果、EED タンパク質内部に埋もれていない 99 フラグメントを選抜した。特に EED のポケットに多くのフラグメントがマッピングされていた。本研究の目的が新たなシード探索であったことから、PPI 界面としては使用されていないが、これまで標的として報告されていない本ポケットを対象として、フラグメントの配置パターン情報を基にした 3 次元ファーマコフォアモデルを構築した (図 2)。

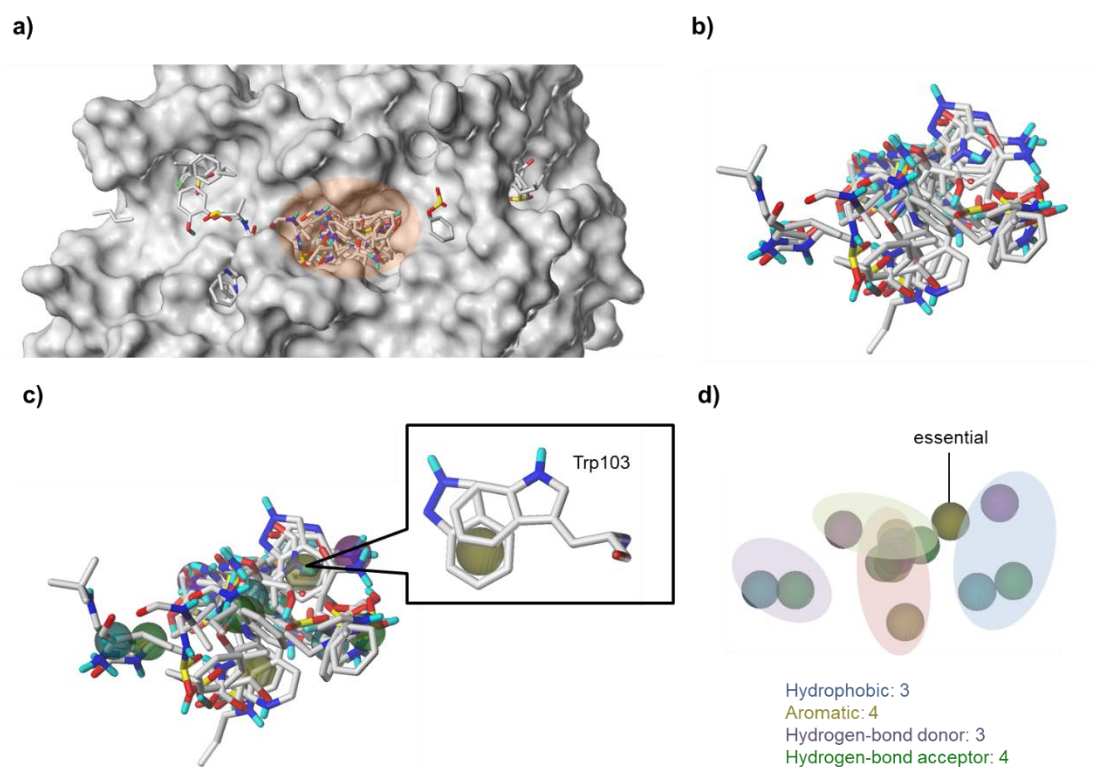


図 2. フラグメントマッピング結果を基にした 3 次元ファーマコフォアモデル構築 ²⁾

a) フラグメントマッピング結果とファーマコフォアモデル構築対象領域。塗りつぶした領域はファーマコフォアモデルを構築した領域を示す。**b)** 対象領域におけるマッピングされたフラグメント。図は視認性の観点から、**a)** において上から俯瞰した図として表示。**c)** 3 次元ファーマコフォアモデル構築 **d)** 3 次元ファーマコフォアモデル。塗りつぶした領域は色ごとに部分一致を示す。

(2) バーチャルスクリーニング

市販化合物ライブラリーを対象として、フラグメントマッピングを基にした 3 次元ファーマコフォアベーススクリーニング、およびドッキングベーススクリーニングを実施し、最終的に 16 化合物を選抜した (図 3)。

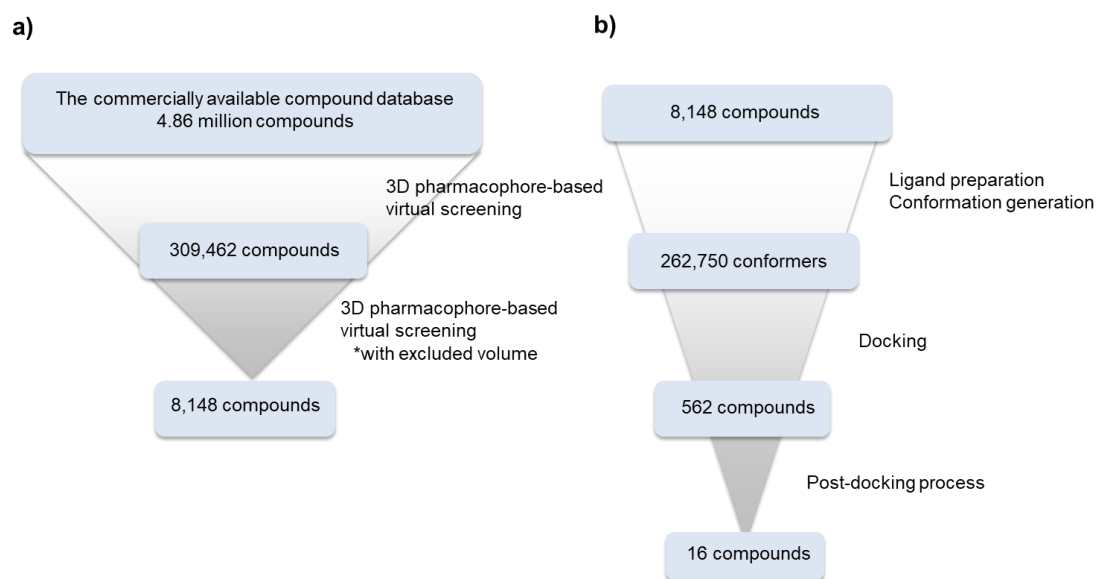


図 3. バーチャルスクリーニング²⁾


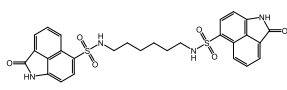
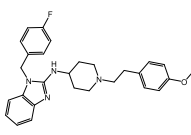
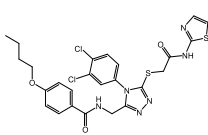
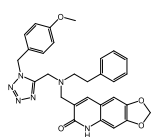
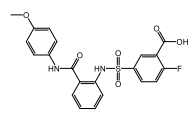
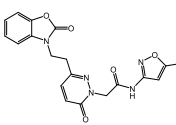
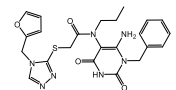
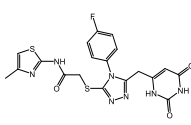
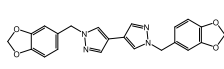
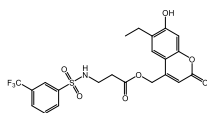
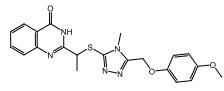
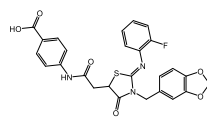
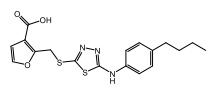
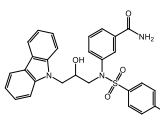
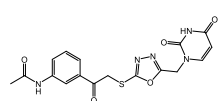
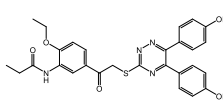
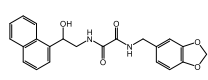
a) 3次元ファーマコフォアベーススクリーニング b) ドッキングベーススクリーニング

(3) 阻害活性評価と活性化合物に対する考察

阻害活性評価の結果、5化合物(5, 7, 8, 11, 14)に既存低分子阻害剤である Astemizole と同等以上の活性を確認した(表 2)。また、化合物 7, 14 の IC_{50} はそれぞれ 64, 32 μM であり、濃度依存性を確認した。

本研究で見出した化合物のシード化合物としての構造新規性を検証するために、過去に報告された阻害剤との比較として類似度評価を実施した(表 3)。その結果、提唱されている類似構造の目安(それぞれ類似度 0.85, 0.42)から、今回見出された化合物群は過去に報告された EED-EZH2 PPI 阻害剤とは異なる構造を有しており、新たなシード化合物として期待できると考えている²⁾。また、EED と化合物 14 の推定結合様式を図 4 に示す。本結合様式は、MD シミュレーションにて安定であったことから、妥当なポーズであると考えている。本研究では、さらなる活性向上を目的に、阻害剤の結合様式から新たな阻害剤を分子設計することとした。具体的には、14 のドッキング構造において、14 のフラン環の隣接部位に空間があることから、化合物 11 の部分構造も参照として、化合物 17, 18 を新たにデザインした(図 5)。これら化合物は想定通りドッキング計算で 14 と基本的な結合様式を維持したまま、新たな相互作用を形成可能であることが分かった。さらに、これら結合様式は MD シミュレーションで 14 と同様に安定であった。また、molecular mechanics/Generalized Born surface area (MM-GBSA) 法によって算出された結合自由エネルギーは 14 (-45.5 kcal/mol) と比較して大幅に向上(-81.8 , -75.2 kcal/mol)したことから、化合物 17, 18 は EED の窪みに結合することで、活性向上が期待できる化合物であると考えている。

表 2. 選抜化合物の活性評価結果 ²⁾

Compound	Structure ^{a)}	% inhibition ^{b)}	Compound	Structure	% inhibition ^{b)}
SAH-EZH2	Ac-FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV 	90	8		84
Astemizole		42	9		22
1		0	10		26
2		8	11		41
3		17	12		31
4		31	13		29
5		44	14		86
6		26	15		30
7		49	16		10

a) X=(S)-2-(4'-pentenyl)Ala, stapled

b) The final concentration was 100 μ M except for that of SAH-EZH2. which was 0.1 μ M.

表 3. 既存阻害剤との類似度評価²⁾

a) MACCS keys b) Morgan fingerprint (半径 3) を記述子としてそれぞれ使用。

a)

Comp	Astemizole	EGCG	Wedelolcatone	Ergonovine	Nifedipine	Oxyphen butazone	Apomorphine	Compound_35*Compound_49*	AZD_9291
5	0.55	0.35	0.38	0.44	0.31	0.45	0.41	0.32	0.45
7	0.44	0.34	0.34	0.42	0.36	0.53	0.33	0.32	0.49
8	0.39	0.21	0.24	0.41	0.26	0.38	0.32	0.26	0.43
11	0.52	0.29	0.30	0.46	0.30	0.58	0.41	0.29	0.54
14	0.39	0.28	0.34	0.34	0.29	0.52	0.33	0.32	0.48

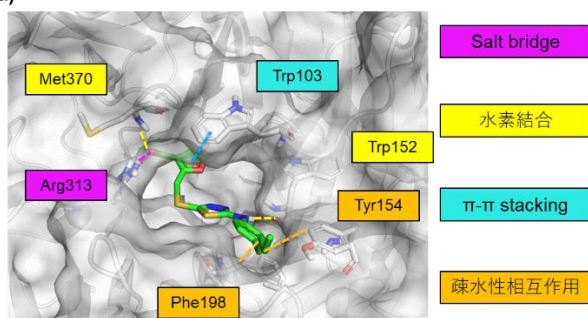
*Chem. Pharm. Bull. 68, 58-63 (2020).

b)

Comp	Astemizole	EGCG	Wedelolcatone	Ergonovine	Nifedipine	Oxyphen butazone	Apomorphine	Compound_35*Compound_49*	AZD_9291
5	0.19	0.11	0.10	0.11	0.13	0.18	0.11	0.09	0.15
7	0.16	0.12	0.11	0.10	0.11	0.19	0.11	0.08	0.16
8	0.13	0.08	0.10	0.10	0.09	0.15	0.10	0.07	0.13
11	0.16	0.08	0.08	0.10	0.13	0.21	0.10	0.09	0.15
14	0.15	0.09	0.09	0.12	0.10	0.17	0.11	0.09	0.13

*Chem. Pharm. Bull. 68, 58-63 (2020).

a)



b)

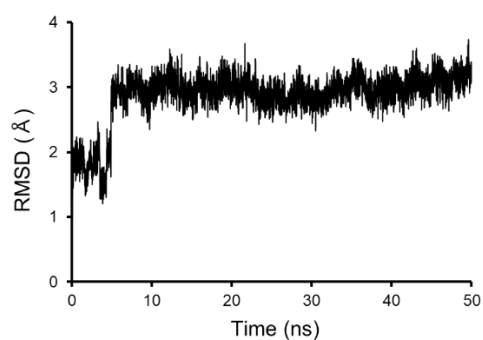


図 4. EED-化合物 14 の複合体モデルと結合様式安定性評価

a) EED-化合物 14 の推定結合様式 b) 分子動力学 (MD) シミュレーションにおけるポケット内リガンド重原子の root mean square deviation (RMSD)

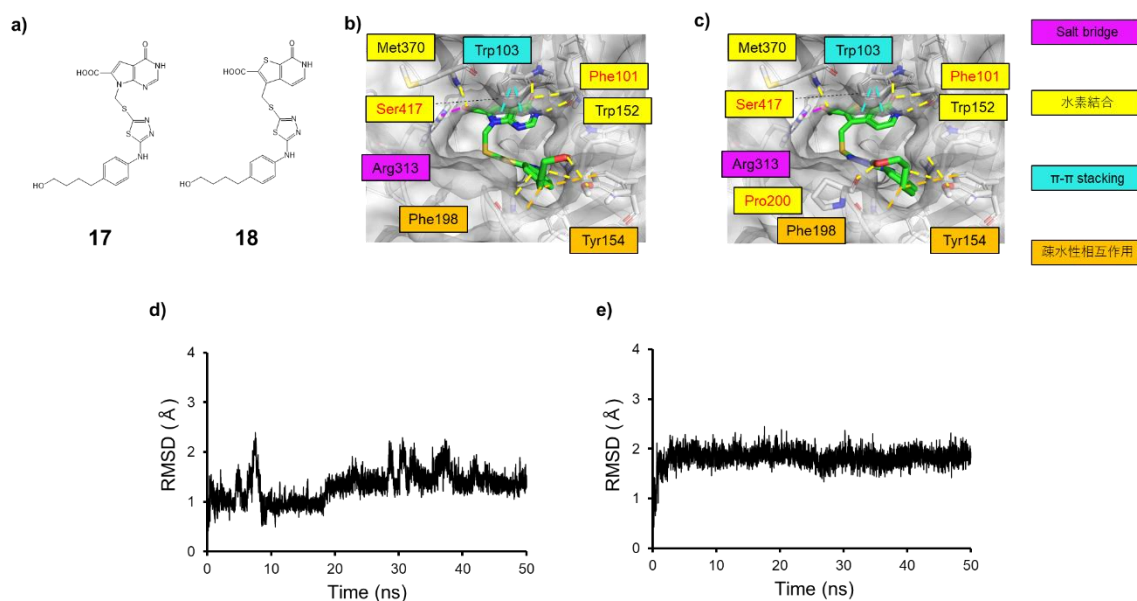


図 5. 設計化合物の結合様式と結合安定性

a) 化合物 17, 18 の化学構造 b), c) 化合物 17, 18 の結合様式。赤字は化合物 14 では相互作用を形成していないアミノ酸残基を示す。 d), e) 分子動力学 (MD) シミュレーションにおける化合物 17, 18 のポケット内重原子の root mean square deviation (RMSD)

【結論と今後の展望】

本研究で見出した化合物は、近年注目されている EED-EZH2 PPI 阻害剤における新たなシード化合物として期待できる。また、*in silico* フラグメントマッピング法は、PPI 界面など通常のコンピュータリガンドドッキング手法が苦手とする標的に対しても有効な阻害剤探索および分子設計の指針を与えることができると考えている³⁾。今後は見出した阻害剤の結合様式やフラグメントマッピングの結果に基づく誘導体展開を通して、より高活性な EED-EZH2 PPI 阻害剤の創製を目指したい。

【引用文献】

- 1) Misawa K., Suzuki Y., Takahashi S., Yoshimori A., Takasawa R., Shibuya Y., Tanuma S. Structure-based design of dipeptide derivatives for the human neutral endopeptidase. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 5935-5947 (2011). DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.064.
- 2) Misawa K., Yamaotsu N., Hirono S. Identification of novel EED-EZH2 PPI inhibitors using an *in silico* fragment mapping method. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **35**, 601-611 (2021). DOI: 10.1007/s10822-021-00378-6.
- 3) 三沢 憲佑・小澤 新一郎・吉田 智喜・中込 泉・山乙 教之・広野 修一. イン・シリコフラグメントマッピング法による USP7-HDM2 タンパク質間相互作用 (PPI) 阻害剤の探索. *薬学雑誌* **139**, 827-835 (2019). DOI: 10.1248/yakushi.19-00006.

以上