

学位論文内容要旨

氏名： 田上宇乃



題目

創薬への応用を目指した、計算科学を利用したタンパク質と化合物の相互作用解析
—トランスグルタミナーゼの基質認識機構の解明および、FABP4 とその阻害剤の相互作用解析—

1. 背景と目的

タンパク質と化合物の相互作用を解析することは、酵素反応論や結合エネルギーの理解のような学術的な興味だけではなく、その酵素を応用して利用する産業界においても非常に重要である。タンパク質と化合物の相互作用を、タンパク質改変により制御することは、医薬品の製造や食品の改質に関わるような産業用酵素の創出につながり、化合物改変により制御することは創薬につながるからである。今回、産業上重要な 2 種のタンパク質と、そのタンパク質が認識する化合物との相互作用を、計算科学を用いて詳細に解析することで、将来の開発への可能性を開いたため、この解析手法と結果と将来展望について論じる。

標的としたタンパク質のうちの一つはトランスグルタミナーゼであり、抗体医薬品等の医薬タンパク質の可溶性や安定性の向上といった高機能化に使用されているが、結合活性や特異性に問題があり、タンパク質改変が必要であった。従来、タンパク質改変はランダム変異導入法で行われてきたが、膨大な実験によるコストと時間がかかることと、ハイスループットな活性評価法の構築が必須であることが課題であった。そこで近年では、タンパク質の立体構造を基にした効率的な手法が取り入れられてきている。そのためにはタンパク質と化合物の相互作用を詳細に見積もることが必要であり、古典力学的な計算手法を用いて解析を試みた。

もう一方の標的は、脂肪細胞やマクロファージに発現する脂肪酸結合タンパク質アイソフォーム 4 (以後、FABP4) である。糖尿病、動脈硬化症の疾患に関与することが示唆されており、その阻害剤はそれらの疾患治療に有効であると考えられている。これまで報告されている FABP4 阻害剤は活性が低いという問題があったため、より高活性な FABP4 の阻害剤を作るためには、複合体構造を基にした相互作用情報が必要であった。X 線回折による結晶構造は得られていたが、より詳細な情報が必要であったため、量子力学に基づいた計算手法を用いて、FABP4 とその阻害剤の相互作用解析を試みた。

このように、適切な計算手法を用いて、産業上重要な MTG や FABP4 を詳細に解析した。本知見や技術は将来、産業界で役立つと考えられる。

2. 研究内容

2.1 トランスグルタミナーゼの基質認識機構の解明

<背景と目的>

微生物由来トランスグルタミナーゼ (microbial transglutaminase、以後 MTG) は、タンパク質中のグルタミン残基 (Gln) とリジン残基 (Lys) を架橋させる活性を持つことから、食品や医薬の分野で使用されている酵素である。医薬の分野では、抗体と薬物との結合による抗体医薬品の開発や、タンパク質医薬品の安定化、可溶化等に利用されている^{1,2)}が、その活性や特異性に課題がある。

X線結晶構造は既に決定されており、活性中心のアミノ酸残基は Cys64 であることが分かっている³⁾。しかしながら、本構造は、基質との複合体で得られていないため、結合様式は不明であり、反応メカニズムも解明されていない。

そこで、計算科学的に基質との結合様式を推定することにより、反応メカニズムを推定し、MTGの結合活性や特異性の改変に役立つ知見を得ることを試みた。

<方法と結果>

まず、MTG とモデル基質である CBZGlnGly の複合体モデル構造をドッキング手法により構築した。次に、分子動力学 (MD) 計算により、MTG と CBZGlnGly の動的挙動を観測し、MTG の活性中心の Cys64 と CBZGlnGly が反応する直前の状態を再現した構造を取得した。(図 1)。

本構造を解析した結果、基質の Gln の γ -カルボキシアミド基の酸素と、Cys64、Val65 の主鎖のアミノ基が水素結合を形成していることから、これらのアミノ酸残基が、酵素反応に必須な反応場 (オキシアニオンホール) を形成するアミノ酸残基であることを推定した(図 2)。

これにより、MTG がタンパク質を基質とする際の基質認識機構、および、反応メカニズムを解明することができた。

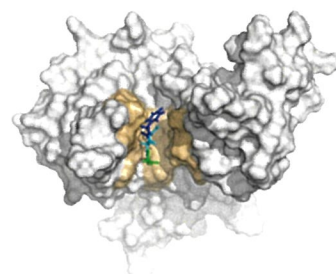


図 1 MTG と基質との推定結合様式
白 : MTG Stick model : 基質

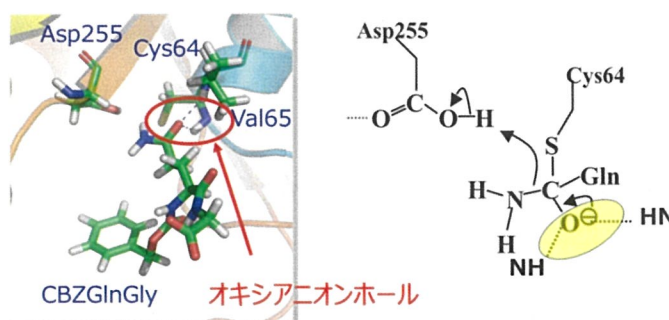


図 2 基質結合部位の拡大図

更に、MTG の変異実験により、この複合体モデル構造の妥当性を検証した。MD 計算中で基質との相互作用回数が多いアミノ酸残基を Ala に変異した結果、活性が低下した。このことから、本複

合体モデル構造は信頼性のある構造といえる。また、活性が低下したアミノ酸残基をオレンジ色で表示した(図1)結果、MTGは比較的広い範囲で基質を認識していることが判明した⁴⁾。

<まとめ>

MTGは抗体等の医薬タンパク質の高機能化に貢献することが期待されているが、その活性や特異性には課題が残っていた。本研究で、MTGの基質タンパク質の認識機構、反応メカニズムを推定したことは、今後、創薬等の産業応用に有用なMTGの改変体の設計に大いに役立つと考えられる。

2.2 フラグメント分子軌道法によるFABP4阻害剤の相互作用解析

<背景と目的>

FABP4は、脂肪酸結合タンパク質(fatty acid-binding protein)の一つで、主として細胞質内の脂肪酸輸送を担っている^{5,6)}。糖尿病や動脈硬化症へのFABP4の関与が報告されており^{7,8)}、近年、structure-based drug designでいくつかのFABP4阻害剤が報告されているが⁹⁻¹⁴⁾、更なる高活性化が望まれている。

そこで、X線結晶構造解析と計算科学を使用し、新たな高活性阻害剤を開発すると共に、FABP4との相互作用を解析した。これにより、高活性な阻害剤設計に必要な相互作用を明らかにし、更なる高活性化への知見を得ることが目的である。

<方法と結果>

まず、既知のFABP4阻害剤やそれらとFABP4の共結晶構造の情報を利用して、社内化合物ライブラリーからリード化合物を見出した。この構造を基に300化合物を設計し、FABP4阻害活性を評価し、新規なFABP4阻害剤を見出した。

次に、FABP4と阻害剤の複合体X線結晶構造を決定し、FABP4-阻害剤の構造活性相関を取得した。合成展開と計算科学を使用し構造最適化を行い、高活性な阻害剤を創出した¹⁵⁾。

FABP4と4つの阻害剤の複合体X線結晶構造のFMO計算により、相互作用エネルギー値を算出した。相互作用エネルギー値は阻害活性の強さと相関していた(表1)。

表1 阻害剤のIFIEとKi値

compound	Ki (uM)	IFIE sum (kcal/mol)	ES (kcal/mol)	EX (kcal/mol)	CT+mix (kcal/mol)	DI (kcal/mol)
1	0.03	-97.06	-88.43	103.78	-43.13	-69.28
2	0.10	-59.84	-53.88	90.60	-29.28	-67.28
3	0.12	-51.29	-26.56	49.28	-18.64	-55.36
4	>1.4	-31.80	-10.51	26.23	-13.28	-34.23

ES:静電エネルギー、EX:反発エネルギー、CT:電荷移動エネルギー、DI:分散力エネルギー

FMO法は、低分子化合物のみ可能であった量子化学計算をタンパク質のような巨大分子まで計算を可能にした唯一の方法である¹⁶⁻¹⁹⁾。また、フラグメント間相互作用エネルギー(Inter Fragment

Interaction Energy、以後、IFIE)¹⁷⁻²²⁾を算出することにより、各アミノ酸残基と阻害剤の相互作用の種類と大きさを理解することが可能な点も FMO 法の利点と言える。

本研究では、特に、高活性な compound 1 と compound 2 について議論した。両者の FABP4 との X 線結晶構造の観察で得られる水素結合や疎水結合の数からは、compound 1 の方が高活性である理由を説明できなかった (図 3)。そこで、両者の IFIE を比較した結果、Lys58 の主鎖カルボニル酸素との相互作用の有無が、活性に大きく寄与していることが解明された (図 4)²³⁾。

このことから、Lys58 との相互作用が高活性な阻害剤の設計に重要であることが解明され、今後の阻害剤開発に有用な知見となったと言える。

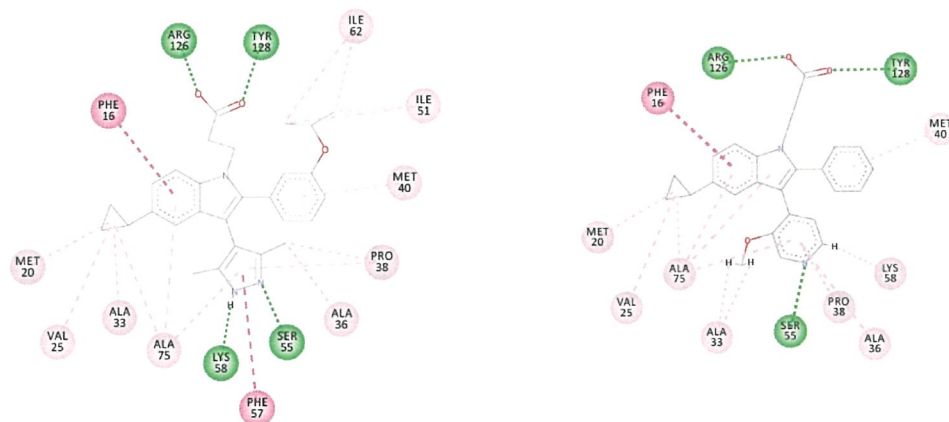


図 3 compound 1 (左) と compound 2 (右) の FABP4 との相互作用

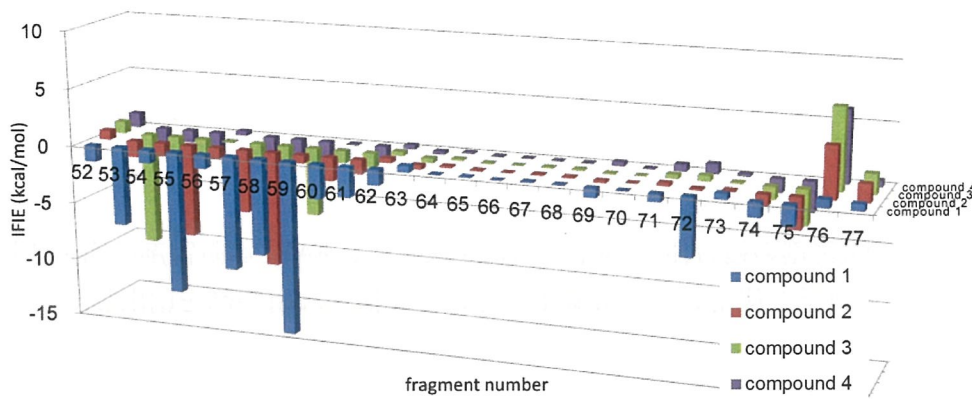


図 4 FABP4 と阻害剤の IFIE (活性部位の拡大図)

<まとめ>

FABP4 と阻害剤の X 線結晶構造解析と FMO 計算により、両者の相互作用を解明した。特に、最高活性化合物の相互作用を明確に解明し、今後の高活性阻害剤の設計に有用な知見を得た。

このことより、化合物の高活性化のための設計に X 線結晶構造解析と FMO 計算が有用であることが示された。

今後、X 線結晶構造決定と共に FMO 計算を実施し、目視だけでは解明しきれない相互作用を解明することが望ましいと考えられる。これにより重要な相互作用を見出し、新規な化合物の設計に役立つ知見を得ることが可能となるであろう。

3. 結論

産業上重要な 2 種のタンパク質と、そのタンパク質が認識する化合物との相互作用を、X 線結晶構造解析と計算科学を用いて詳細に解析した。

標的としたタンパク質のうちの一つである MTG は、医薬用タンパク質開発のためには結合活性や特異性に問題があり、タンパク質改変が必要だが、ドッキングと MD 計算という古典力学計算を用いることで基質認識機構の解明に成功し、有用な改変に繋がる知見を得た。

もう一方の標的である FABP4 は、糖尿病、動脈硬化症に関与するが、その阻害剤は活性に問題があった。X 線結晶構造解析と量子力学計算により、高活性な FABP4 の阻害剤の相互作用を解析し、今後の更なる高活性化への大きな知見を得た。

このように、適切な計算手法を用いて解析することで、産業上重要なタンパク質と化合物との相互作用を詳細に解明した。本知見や技術は、将来、産業界で役立つと考えられる。

4. 参考文献

- 1) Pavel, S. Versatility of Microbial Transglutaminase. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *5*, 855–862.
- 2) Angelo, F.; Barbara, S.; Anna, M.; Francesco, M. V. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by Transglutaminase *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 13–28.
- 3) Kashiwagi, T.; Yokoyama, K.; Ishikawa, K.; Ono, K.; Ejima, D.; Matsui, H.; Suzuki, E. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J.Biol.Chem.* **2002**, *277*, 44252–44260.
- 4) Tagami, U.; Shimba, N.; Nakamura, M.; Yokoyama, K.; Suzuki, E.; Hirokawa, T., Substrate specificity of microbial transglutaminase as revealed by three-dimensional docking simulation and mutagenesis *Protein Engineering, Design & Selection* **2009**, *22*, 747–752.
- 5) Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews, drug discovery.* 2008, *7*, 489–503.
- 6) Haurerland, N. H.; Spener, F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res.* 2004, *43*, 328–349.
- 7) Hotamisligil, G. S.; Johnson, R. S.; Distel, R. J.; Ellis, R.; Papaioannou, V. E.; Spiegelman, B.M. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996, *274*, 1377–1379.
- 8) Uysal, K. T.; Scheja, L.; Wiesbrock, S. M.; Bonner-Weir, S.; Hotamisligil, G. S. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 2000, *141*, 3388–3396.
- 9) Lehmann, F.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Lundbäck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4445–4448.
- 10) Ringom, R.; Axen, E.; Uppenberg, J.; Lundbäck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. Substituted benzylamino-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4(1H)-ones: a novel class of selective human A-FABP inhibitors. *Bioorg.Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4449–4452.

- 11) Sulsky, R.; Magnin, D. R.; Huang, Y.; Simpkins, L.; Taunk, P.; Patel, M.; Zhu, Y.; Stouch, T. R.; Bassolino-Klimas, D.; Parker, R.; Harrity, T.; Stoffel, R.; Taylor, D. S.; Lavoie, T. B.; Kish, K.; Jacobson, B. L.; Sheriff, S.; Adam, L. P.; Ewing, W. R.; Robl, J. A. Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3511–3515.
- 12) Barf, T.; Lehmann, F.; Hammer, K.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Rondahl, L.; Lundbäck, T. N-Benzyl-indolo carboxylic acids: Design and synthesis of potent and selective adipocyte fatty-acid binding protein (A-FABP) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1745–1748.
- 13) Hertzfel, A. V.; Hellberg, K.; Reynolds, J. M.; Kruse, A. C.; Juhlmann, B. E.; Smith, A. J.; Sanders, M. A.; Ohlendorf, D. H.; Suttles, J.; Bernlohr, D. A. Identification and characterization of a small molecule inhibitor of Fatty Acid binding proteins. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6024–6031.
- 14) Maria, J. P.; Jonas, U.; Stefan, S.; Thomas, L.; Tomas, Å.; Mats, W.; Johan, S.; Structure-Based Screening As Applied to Human FABP4: A Highly Efficient Alternative to HTS for Hit Generation *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11874–11880.
- 15) Miyanaga, W.; Sugiki, M.; Ejima, C.; Tokumasu, M.; Yoshida, T.; Takeshita, S., Indole derivative or salt thereof, *patent number WO2014003158*, **2014**.
- 16) Kitaura, K.; Ikeo, E.; Asada, T.; Nakano, T.; Uebayasi, M. Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *313*, 701–706.
- 17) Fedorov, D.G.; Kitaura, K. Extending the power of quantum chemistry to large systems with the fragment molecular orbital method *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 6904–6914.
- 18) Fedorov, D.G.; Nagata, T.; Kitaura, K. Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7562–7577.
- 19) Gordon, M. S.; Fedorov, D.G.; Pruitt, S. R.; Slipchenko, L. V. Fragmentation methods: a route to accurate calculations on large systems *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 632–672.
- 20) Nakano, T.; Kaminuma, T.; Sato, T.; Fukuzawa, K.; Akiyama, Y.; Uebayasi, M.; Kitaura, K. Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 475–480.
- 21) Hitaoka, M.; Harada, T.; Yoshida, T.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of sialic acid analogues with influenza virus neuraminidase-1 using ab initio MO calculations on their complex structures *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1796–1805.
- 22) Watanabe, C.; Fukuzawa, K.; Okiyama, Y.; Tsukamoto, T.; Kato, A.; Tanaka, S.; Mochizuki, Y.; Nakano, T. Three- and four-body corrected fragment molecular orbital calculations with a novel subdividing fragmentation method applicable to structure-based drug design *J. Mol. Graphics Modell.* **2013**, *41*, 31–42.
- 23) Tagami, U.; Takahashi, K.; Igarashi, S.; Ejima, C.; Yoshida, T.; Takeshita, S.; Miyanaga, W.; Sugiki, M.; Tokumasu, M.; Hatanaka, T.; Kashiwagi, T.; Ishikawa, K.; Miyano, H.; Mizukoshi, T. Interaction Analysis of FABP4 Inhibitors by X-ray Crystallography and Fragment Molecular Orbital Analysis *ACS Med. Chem. Lett.*, **2016**, *7* (4), 435–439