

TSUBAME 共同利用 令和元年度 産業利用 成果報告書

利用課題名 中分子創薬のための天然変性蛋白質と中分子の相互作用の研究

英文: Study on intrinsically denatured protein-middle molecule interactions for drug discovery

高島 一

Hajime Takashima

株式会社 PRISM BioLab  
PRISM BioLab Co., Ltd.  
<http://www.prismbiolab.com/>

蛋白質間相互作用(PPI)を指向した創薬が注目を集めているが、どのように化合物が標的蛋白質を認識し結合しているかについてはまだ十分な理解が得られていない。今回我々は、構造の柔軟な蛋白質複合体として mSin3-NRSF/REST 複合体を例にとり、その結合を阻害する  $\alpha$ ヘリックス模倣化合物 mS-11 と mSin3 の相互作用を、GA-based mD-VcMD で計算した。その結果、mS-11 はその模倣配列部分である"LIML"配列領域に最も安定に結合することを示し、またその結合過程において分子配向の秩序化が起きることが分かった。これらの結果は、PPI を指向した我々の分子創出戦略が有効である事を示しており今後の PPI 創薬やドラッグデザインへの応用が期待できる。

For drug discovery of protein-protein interaction (PPI), it is important to understand how PPI inhibitors can recognize and bind to a target protein. In this article, we calculated interaction and binding of mS-11, alpha-helical mimetic compound of NRSF/REST protein, and its binding protein mSin3 using GA-based mD-VcMD method. The calculation results showed that mS-11 binds to "LIML" sequence region, which is an alpha-helical part of NRSF/REST and corresponds to the mimetic region of mS-11. We also found ordering of molecular orientation during its binding process. These results indicate that our drug design strategy using alpha-helical mimetic compound is effective for PPI drug discovery.

*Keywords:* PPI (protein-protein interaction) inhibitor, alpha-helical mimetics, mD-VcMD, enhanced sampling, free energy

## 背景と目的

近年は蛋白質間相互作用を阻害ないし促進できる新しい分野の創薬が注目を集めており、多くの国内外企業も PPI 創薬への取り組みを始めている。従来の酵素や受容体を標的とした低分子創薬では、それらの天然の基質分子の多くが単離・同定されていることから、それらの類似構造を持つ化合物として低分子医薬品の探索が可能であった。また、酵素・基質は比較的、蛋白質立体構造が堅いものが多く、構造解析と薬物ドッキングシミュレーション計算からの医薬品の探索も可能な場合が多かった。

しかし、PPI を指向した創薬では、類似化合物の探索が困難であり、標的蛋白質の構造が柔軟であるためにドッキングシミュレーション計算での探索も困難、そして、それらの結合様式も予測が困難で分子の改良も困難である。このような状況の中、これまで株式会社

PRISM BioLab では主に  $\alpha$ ヘリックス構造を模倣した独自の中分子化合物ライブラリーを開発してきた。また、これらの新規中分子を DISC(産学協働スクリーニングコンソーシアム)にも提供してきた。このような  $\alpha$ ヘリックス構造を模倣した分子が標的蛋白質へどのように結合できるのかを計算シミュレーションで支援することで、効率的かつ低コストなドラッグデザインが実現できれば、より広く社会で PPI 創薬が普及することが期待できる。

転写制御因子 NRSF/REST は、転写コリプレッサーである mSin3 と結合することで多くの神経特異的な遺伝子の発現を制御している。我々はこれまでに、mSin3 に結合して NRSF/REST との蛋白質-蛋白質間結合を特異的に阻害する新規化合物 mS-11 を見出した(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27 (2017) 4705-4709)。mS-11 は、NRSF/REST 蛋白質の  $\alpha$ ヘリックスを形成している"LIML"配列領域

(アミノ酸1文字表記法)を模倣するよう設計された化合物である。当該研究では、mS-11とmSin3の結合と解離を司る自由エネルギー地形を、分子動力学シミュレーションを用いて算出し、結合解離過程を再現してそのメカニズムを解明し理解する事を目指した。

通常の分子動力学シミュレーションでは、分子間の結合・解離の自由エネルギー地形を算出するのは一般に困難である。そこで、シミュレーションが局所安定構造にとらわれず、構造空間を広く探索するために、共同研究者(肥後順一)の開発した「genetic-algorithm に支援された、多次元仮想系と相互作用する共役した分子動力学法(GA-based mD-VcMD)」を適用することで解決を図った。シミュレーションの実行ではTSUBAMEのGPUを用い多数の独立なrunsを流して2分子の結合・解離過程の広範な立体構造を探索し、得られた立体構造に熱力学的重みを割り付け、それを構造空間にマッピングする(すなわち、これが自由エネルギー地形の算出である)。それにより、mS-11との結合様式(最も自由エネルギーが低い複合体構造)のみならず、準安定な複数の複合体構造とその自由エネルギー値を算出することが原理上可能である。

今回、実施に256runからなるGA-based mD-VcMD計算を実行し、mS-11のmSin3蛋白質への結合様式のみならずその結合メカニズムについても考察することができた。mS-11は、その模倣配列部分に相当するNRSF/RESTの“LIML”配列結合領域に最も安定に結合することを示した。また、mS-11がmSin3に接近するにつれ、配向の秩序化が起きることを示した。

#### 概要

製薬・医療健康分野において、中分子創薬は、エピゲノム調整や遺伝子の調整に必要な蛋白質間相互作用を阻害・ないし促進できる新しい分野の薬(新規モダリティー)として注目を集めており、多くの国内企業も中分子への取り組みを始めている。しかし、中分子が実際に生体において、どうやって標的蛋白質を認識し、結合し、薬効を発揮できるのか、といったことには、十分な

理解が得られていない。今回我々は、構造の柔軟な蛋白質複合体としてmSin3-NRSF/REST複合体を例にとり、その結合を阻害する $\alpha$ ヘリックス模倣化合物mS-11とmSin3の相互作用をGA-based mD-VcMDで計算した結果、mS-11とmSin3の最安定結合様式のみならず準安定な複数の複合体構造、またその結合過程を解明することができた。

#### 結果および考察

Fig. 1aは、mSin3(緑色の分子)周囲のmS-11の存在確率を等密度マップで示したものである。H1およびH2は、mSin3に含まれる4本のヘリックスのうちの一つである。残りの二つ(H3とH4)は紙面の後ろに隠れている。マップの色が赤→青→マゼンタ→深緑となるにつれ存在密度が下がる(密度の数値を説明するには、専門的な長い説明が必要なので、ここでは述べない)。高密度の場所、つまりmS-11がそこにくと熱力学的に安定になる場所は、赤い等密度マップの部分である。ここには、二つのクラスター(A and B)が存在しており、クラスターAの方がBよりも安定である(Aの方がBよりも大きい)。mS-11はmSin3の周囲に広く分布できるが(深緑色の等密度マップ)、高密度の安定結合領域は、クラスターAとBに限られている。

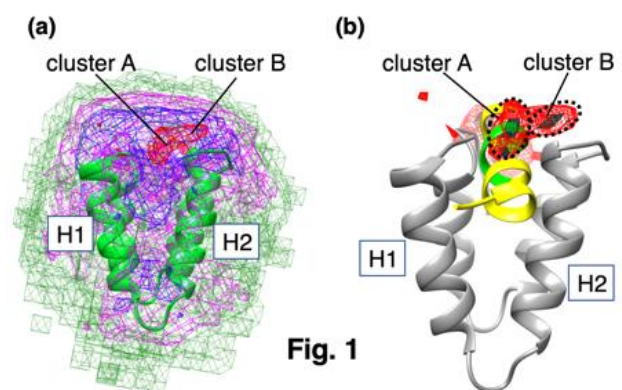


Fig. 1

Fig. 1bは、NRSF/REST(黄色と緑色の部分)がmSin3に結合した時の位置を示す。緑色の部分がNRSF/RESTの“LIML”配列であり、mS-11が模倣した部位である。図は、クラスターAがLIML配列の位置と一致することを示しており、我々の予想通りの結合が生じたことを示している。

さて、mSin3 には疎水性のクレフトがあり、NRSF/REST はそこに結合する。一方、mS-11 には長い疎水性側鎖を持っている。クラスターA に位置する mS-11 は、その長い疎水性側鎖を mSin3 のクレフトにはめ込むことで構造安定化が得られている (Fig. 2a)。図中、点線の円がその疎水性クレフトの位置を示している。なお、図では、クラスターA の中でサンプルさ

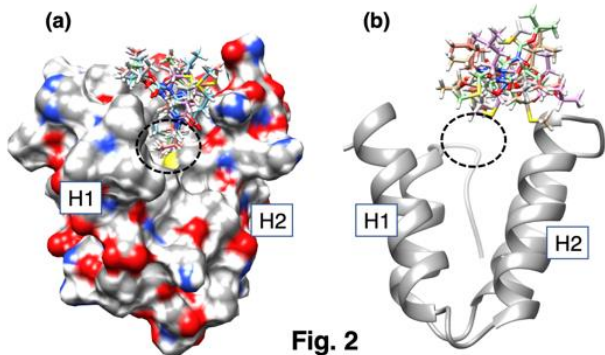


Fig. 2

れた mS-11 の構造をいくつか重ねて描いている。

一方、クラスターBに位置する mS-11 は、疎水のクレフトに mS-11 の分子のどの部分も入りこんでいない (Fig. 2b)。クラスターA が B よりも安定なのは、疎水性クレフトに mS-11 の疎水性側鎖が入り込むことが重要なのだと推測できる。これらの結果から、mS-11 は設計したコンセプトの通り NRSF/REST の”LIML”領域に結合して mSin3 に結合するのを阻害することを、計算科学的に示すことができた。

次に、mS-11 が mSin3 に接近するためのメカニズムを調べた。mS-11 は二つのリングが結合することで近似的に平面構造をとっているが、二つのリングの間に微妙な角度のずれがあり、細かく見るとアーチ型になっている (Fig. 3b)。そこで、アーチ型の凸の方向に並行

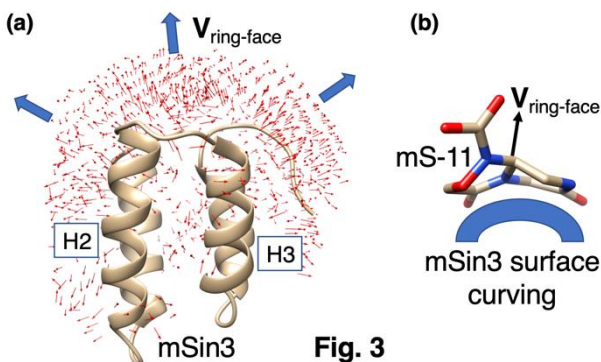


Fig. 3

なベクトル ( $V_{\text{ring-face}}$ ) を定義した。そのベクトルを mSin3 の周囲で調べると Fig. 3a のようになる。小さ

な赤い矢印の集団が、そのベクトルの場を示す。mS-11 は、自身の微妙な凹み部分を mSin3 の分子表面に当てることで、mSin3 と結合することがわかる。

まとめ、今後の課題

上記のように、本研究は、mS-11 が mSin3 のクレフトに結合する最安定なサイトでの知見 (阻害効果) だけでなく、結合していく過程に関しても知見 (分子配向のオーダーリング) を与えた。ここで紹介したことは代表的な結果であり、より深い解析から様々な知見が得られており、本研究は現在論文にまとめているところである。これらの結果は PPI 創薬を指向した我々の  $\alpha$  ヘリックス模倣分子創出戦略が有効である事を示しており、今後の PPI 創薬やドラッグデザインへの応用が期待できる。

一方、本研究から得られなかったこともある。ここでは詳細は述べなかったが、本研究では周期的境界条件を使って系を設定した。溶媒で満たされた周期 box の中心に mSin3 を置き、その周囲を mSin3 が運動する。この box の大きさは、mS-11 が mSin3 に対して会合・乖離を実現するには十分な大きさであった。しかし、mSin3 からの影響が完全に消えるほどには box が大きくなかった。つまり、本研究からは、結合自由エネルギー (結合状態と完全な解離状態の自由エネルギーの差) が算出できなかった。box をさらに大きく設定し、mS-11 がバルクな溶液中に浮かんでいるとみなせるほど mS-11 が mSin3 から離れた領域まで計算できれば、結合自由エネルギーが本研究から直接的に計算できる期待できる。それが今後の課題である。

共同研究者: 肥後順一 (兵庫県立大学)