

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)  
事後報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) NMR と計算科学の統合による糖鎖の3次元構造ダイナミクスの体系的評価法の開発  
(英語) Development of a systematic approach for a conformational ensemble of oligosaccharides based on nuclear magnetic resonance -validated molecular dynamics simulation

研究開発実施期間: 平成28年9月1日 ~ 令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 矢木 宏和  
(英語) Hirokazu Yagi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 公立大学法人名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師  
(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University • Assistant Professor

## II 研究開発の概要

糖鎖の3次元構造は莫大な数のコンフォメーションの間をダイナミクスに揺らいでおり、糖鎖認識分子はそうした多数のコンフォマーの中の特定のものを選んで結合している。それゆえ、糖鎖の構造揺らぎを合理的に制御することができれば、特定の認識分子に高い親和性と特異性を示す分子を創生することができる。つまり、糖鎖認識系を標的とした創薬を実現するためには糖鎖の配列情報のみならず原子レベルの3次元構造情報が必要不可欠である。しかしながら、糖鎖の立体構造は水溶液中でダイナミックに揺らいでいるためにそれらを標的とする分子設計は容易ではない。

こうした状況のもと、糖鎖の3次元構造の動態を理解するために分子動力学(MD)計算をはじめとする理論的アプローチが従来用いられてきた。しかしながら、シミュレーションの結果は用いるプロトコル(力場、初期構造、計算時間等)に大きく依存しており、糖鎖の真の姿を表している保証はない。したがって、計算結果を評価するためには実験的検証が必要である。NMR法は水溶液中の生体分子の構造解析に広く用いられているおり、糖鎖の動的立体構造の評価方法としても有用であることが期待される。しかしながら、糖鎖に対する従来のNMRアプローチは、多数のピークが重なりあった複雑なスペクトルを丹念に解析し、そのうえで近位原子間の距離情報のみを拾い上げるというものである。そのため、解析には多大な時間と労力を要し、しかもかならずしも十分とはいえない近距離情報のみに依存するために精度の面でも不安を残すものであった。そこで我々は、常磁性プローブを糖鎖還元末端に導入するこ

とにより、構成原子の空間配置に依存した NMR ピークの化学シフト変化を誘起し、複雑なスペクトルの単純化をもたらすと同時に、糖鎖全域をカバーする遠距離情報を一網打尽に捉える常磁性 NMR 法による構造情報の抽出を行ってきた。本研究開発では、我々の技術基盤を活用した NMR と計算科学の統合を通じて、複雑な糖鎖の 3 次元構造動態を精密かつ迅速に解析するための体系的技術を確立し、創薬標的としての糖鎖の動的構造解析へと応用することを目指した。

本研究開発を通じて、研究開発当初、分子シミュレーションで扱うことの難しかった、金属に結合性を示す糖鎖、硫酸基を有する糖鎖、非天然糖鎖を対象とした、糖鎖の分子シミュレーションのための計算プロトコルを整備することができた。さらには、再生核ヒルベルト空間への写像を利用して、糖鎖の動的構造の全自由度の情報を対象とした構造アンサンブルを解析する手法の開発することに成功した。これにより、MD シミュレーションによって明らかになった糖鎖の動的な構造アンサンブルの描像を分子全体の動きを考慮に入れ理解する基盤技術を整えることができた。

また、糖鎖の立体構造ダイナミクスを制御することにより、レクチンに対する親和性や特異性を向上するような分子設計を示すことに成功し、動的構造の制御することでタンパク質の特異性を向上させた糖鎖改変体創出の道筋を世界に先駆けて示すことができた。こうした分子設計の際には、糖鎖の動的立体構造アンサンブルとタンパク質の結晶構造とのドッキングにより、タンパク質が多数のコンフォーマーの中からどういった構造を選んで結合しているかを評価する必要がある。本解析を迅速に行うために、糖鎖の動的なアンサンブルとタンパク質のぶつかり合いを評価するアプリケーションソフトウェアを開発した。

今後、創薬標的となり得る数々の糖鎖が同定されることが期待される。質量分析法等の応用により、標的糖鎖の配列や付加部位の精密解析が進展するものと予想されるが、合理的分子設計に基盤を置く創薬を目指すにあたっては標的分子の 3 次元構造情報を得ることが不可欠のプロセスである。本研究開発は実験と理論の統合を通じて複雑な糖鎖の 3 次元構造をその揺らぎも含めて精密に決定する手法をもたらすものであり、質量分析や抗体等を利用した糖鎖解析と相補的な役割を演じることが期待される。

本研究開発の成果により、糖鎖標的に対して、糖鎖の立体構造を明にする技術基盤を構築することができており、得られた立体構造をもとにリード化合物の分子設計を実施することも可能となる。その際に、糖鎖の動的なアンサンブルとタンパク質のぶつかり合いを評価するアプリケーションソフトウェアを利用することで、より迅速に分子設計が可能な状況を構築することができる。こうしたタンパク質の特異性を向上させた糖鎖改変体創出の戦略は、*in silico* スクリーニングにおいてリード化合物が柔軟性を有する化合物やオリゴペプチドなどにも利用可能である。レクチンと糖鎖認識を標的とした高親和性化合物を創出する場合には、結晶構造で取り得るレクチンと糖鎖の相互作用をより安定化するように置換基を導入した分子をデザインすることが一般的な戦略である。動的な糖鎖のコンフォメーション空間を制御する戦略は、結合状態の構造最適化をはかる従来のアプローチと相補的に行うことができる。こうしたことから糖鎖の 3 次元構造のダイナミクスを考慮することで、新しいコンセプトの高親和性化合物の創出に繋がるものと期待している。

本研究開発は、糖鎖のみならず内部運動の自由度を伴う分子一般の設計と構造評価の効率化をもたらし、創薬研究全般に新たな道を切り拓くことを意味する。その波及効果は、感染症、生活習慣病、高齢者医療、再生医療など、現在の国際社会が抱える医療の進展につながるものと期待する。

The three-dimensional (3D) structure of glycans dynamically fluctuates in various conformations, and lectins (sugar recognition proteins) select and recognize the specific ones from a large number of conformers. Therefore, if the conformational fluctuations of glycans could be rationally controlled, molecules with high affinity and specificity to lectin could be created. The sequence information and the 3D atomic structure of glycans are essential for drug discovery targeting the glycan recognition systems. However, since the 3D structures of glycans fluctuate dynamically in aqueous solutions, it is not easy to design molecules that target them. Under these circumstances, theoretical approaches, such as molecular dynamics (MD) calculations, have been used to understand the dynamics of the 3D structures of glycans. However, since the results of the simulations are highly dependent on the protocol used (force field, initial structure, computational time, etc.), there is no guarantee that the results represent the true state of the glycans. The nuclear magnetic resonance (NMR) method is widely used for the structural analysis of biomolecules in aqueous solutions, and it is expected to be useful in evaluating the dynamic conformation of glycans. To date, we have developed a new method to extract their structural information by paramagnetic NMR, by which the spatial arrangement of the constituent atoms from the paramagnetic ion was extracted.

This research and development (R&D) aimed to establish a systematic technique for a precise throughput analysis of the 3D structural dynamics of complex glycans through a combination of NMR experimental data and computational calculation using our technology platform and to apply it to the dynamic structural analysis of glycans.

In this R&D, a computational protocol was established for the molecular simulation of glycans, including metal-binding glycans, sulfated glycans, and artificial glycans, which were difficult to handle in molecular simulation at the beginning of this study. In addition, a method was developed to analyze the dynamic structural ensemble of glycans for all degrees of freedom by mapping into reproductive kernel Hilbert space. In this study, a basic technology was established to understand the dynamic structural ensemble of glycans revealed by MD simulations, considering the dynamics of the whole molecule.

In addition, we have succeeded in designing molecules that improve the affinity and specificity of glycans for lectins by controlling the conformational dynamics of glycans. In designing such molecules, it is necessary to evaluate the conformation of a protein among various conformers by docking the dynamic conformational ensemble of glycans with the crystal structure of proteins. To accelerate this analysis, a software application was developed to evaluate the collisions between the dynamic ensemble of glycans and proteins.

This R&D provides a method to precisely determine the 3D structure of complex glycans, including their fluctuation. As an application of this method, we carried out the molecular design of molecules with high affinity to lectins by regulating the dynamic conformational space of glycans. In creating high-affinity compounds targeting the lectin-glycan recognition, a common strategy is to design molecules introducing the substituent groups to form a more stable interaction between the lectins and glycans based on their crystal structures. Our developed strategy to control the dynamic conformational space of glycans is complementary to the conventional approach to optimize the conformation of bound states. This R&D will lead to a more efficient design and structural evaluation of glycans and molecules with internal degrees of freedom of motion, such as oligopeptides, opening up new avenues for drug discovery research in general.