

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  
(革新的中分子創薬技術の開発)  
事後報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 中分子シミュレーション技術の開発  
(英語) Development of innovative drug discovery technologies for middle-sized molecules by computational science and structure biology

研究開発実施期間: 平成30年4月23日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 嶋田 一夫  
(英語) Ichio Shimada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 次世代天然物化学技術研究組合  
技術顧問 兼 国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム チームリーダー  
(英語) Technical advisor,  
Technology Research Association for Next-generation Natural Products Chemistry  
and  
Team leader  
Laboratory for Dynamic Structure of Biomolecules  
Center for Biosystems Dynamics Research (BDR)  
RIKEN

## II 研究開発の概要

(和文)

### 1. クライオ電子顕微鏡法による中分子シミュレーション技術の開発

本プロジェクトで掲げる目標と課題である、中分子創薬のための基盤技術開発を行うために、抗新型コロナウイルス薬開発を含む6項目の研究を進めた。1) 細胞間のバリア機能を担うと共に、細胞間のパラセルラーの透過制御の機能を担うタイト結合の研究を進めた。これまでに構造解析に成功しているクローディン15とクローディン19の構造解析に加えて、血液脳関門において最も重要と考えられるクローディン5と最も高いホモロジーを有するクローディン3とウェルシュ菌毒素のC末端ドメインとの複合体の構造を解析した。さらに3番目のヘリックス上に存在するP134の位置のアミノ酸が27種類存在するクローディンにおいて、P以外にはAとGのみであり、これらがタイト結合のストランドの性質を規定することを見出した (**Nature Comms**, **10**, 816 2019)。2) クライオ電子顕微鏡と単粒子解析法によりギャップ結合を構成するイネキシンの構造を脂質膜内にある状態と脂質分子がない状態で解析して、脂質分子によってチャンネルが閉じられることを解明した (**Sci. Adv.**, **6**, eaax3157, 2020)。これらの結果から、大きな径を有するギャップ結合チャンネルの gating 機構を説明するモデル

を提案した。すなわち、ギャップ結合チャンネルのようにチャンネル径が 18Å と大きい場合には、脂質分子がチャンネル内に入って脂質 2 重膜を形成することによってチャンネルを閉じる。この場合に、N 末端が押し上げられた状態になっており、膜電位やイオン濃度、リン酸化、pH などの変化によって、N 末端がチャンネル内に入ることによって脂質分子が押し出されて、チャンネルが開状態になるという gating モデルを提案した。3) イオンチャンネルは、中分子による制御が考えられる重要な標的であるが、K<sup>+</sup>チャンネルや Na<sup>+</sup>チャンネルとは異なり、バクテリア由来の Ca<sup>2+</sup>チャンネルはこれまで知られていなかったために研究が困難であった。この問題を解決するために、バクテリア由来の Ca<sup>2+</sup>チャンネルを探索した結果、バクテリア由来の Ca<sup>2+</sup>チャンネルを初めて発見することができた (*eLife*, **9**, 52828, 2020)。4) 胃薬の標的タンパク質である Ptype-ATPase の構造を 2.5Å 分解能で解析し、このプロトンポンプの阻害薬がクリプトサイトに結合していることを明らかにした (*Nature*, **556**, 214-218, 2018)。すなわち、我々の胃薬と H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase との複合体の構造解析以前に解析されていた Ptype-ATPase の構造から予想された胃薬の結合位置にはこの胃薬は結合しておらず、ポンピングサイクルの基底状態では結合する隙間の無いクリプトサイトに結合している構造が明らかになった。さらに分解能を向上させて、このプロトンポンプが 1 分子の ATP の分解で 1H<sup>+</sup>/1K<sup>+</sup>をポンピングする機構を解明した (*eLife*, **8**, 47701, 2020)。フリッパーゼの機能を有する ATP11C の構造を解析し (*J. Biol. Chem.*, **295**, 10180-10194, 2019)、さらに研究を進めて、ほとんど全ての中間体 (E2 ステートを除く中間体全て) の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて解析した (*Cell Reports*, **32**, 108208, 2020)。5) 本プロジェクトを加速するために、液体ヘリウム冷却試料ステージを搭載した高性能・高分解能クライオ電子顕微鏡の開発に成功し、遠隔での操作を可能とする遠隔操作システムの実証実験を行って、効率の良いクライオ電子顕微鏡システムを構築した。実際にこの新しいクライオ電子顕微鏡を活用して、膜タンパク質などの構造解析を効率良く進めることができた。

更に、革新的中分子創薬における技術開発、特に PPI 制御技術開発の実証例として、新型コロナウイルスが感染するときヒトの細胞の ACE2 に結合する、ウイルスのスパイクに存在する RBD に強く結合してウイルスの感染を防ぐことができる中分子の開発を進めた。その結果、非常に速くスパイクの RBD の ACE2 結合面に結合し、解離しない抗ウイルス薬の開発に成功した。

## 2. NMRによる動的立体構造情報に基づく中分子シミュレーション技術の開発

### (1) 膜透過能を有する構造的特徴を予測する、実証に基づくシミュレーション技術の開発

#### i. 膜透過性中分子の動的立体構造解析

膜透過性を示すシクロスポリン A (CsA) について、膜表面や脂質 2 重膜中を模倣する複数の溶媒における NMR 測定を行い、各状態における構造平衡を明らかにした。その結果、CsA は膜表面模倣環境における構造平衡の中に、脂質 2 重膜環境と類似の構造を持つ一方、その構造転換時間は、数百 ms と長いことが分かった。よって、CsA の膜透過において重要なのは、膜中における構造をあらかじめ持つことにあることが示唆された。

#### ii. 非透過性アナログの動的立体構造解析

CsA の非透過性アナログである CsH について同様の解析を行い、CsH が CsA と同数程度の構造多型は有しているものの、膜表面模倣環境において、脂質 2 重膜環境と類似の構造を持たないことを明らかにした。よって、CsH の膜透過活性が低いのは、多型の中に膜透過可能な構造がないことが原因であることが示唆された。

#### iii. 製薬企業の標的に対する中分子膜透過予測

抗がん活性を示す環状 Ras 阻害ペプチド 5 種について水中および膜表面を模倣する溶媒 (DMSO) 中での立体構造の関連を解析した。膜透過可能な Ras 阻害ペプチドは、水中と DMSO 中で大きく構造変化し、膜表面において芳香族残基を塩基性残基が取り囲む両親媒製構造をとった。一方、膜透過ができない環状 Ras 阻害ペプチドは、構造変化を起こす部位に、嵩高い非天然アミノ酸が存在し、両親媒性構造を取れなかった。ま

た当該部位の嵩高さを指標として、Ras 阻害ペプチド 14 種の膜透過活性を説明できた。以上の結果から、膜表面や脂質 2 重膜中を模倣する複数の溶媒における NMR 測定を行い、動的構造を明らかにすることで、膜透過活性の違いを説明し膜透過を改善する設計を提示出来ることが示された(Takeuchi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2021))。

## (2) 実証に基づく PPI などの細胞内創薬作用点に対する中分子の探索および構造最適化技術の開発

### i. BclxL などの動的構造解析

抗がん剤標的タンパク質 BclxL について NMR 動的立体構造解析を行い、リガンド結合に伴う誘導適合により初めて開くと考えられていたクリプトサイトが、非結合状態でも数%程度ではあるが開いた状態にあることを明らかにした。また、代表的な GPCR である A<sub>2a</sub>AR の NMR 動的構造解析を通じて、脂質 2 重膜中の脂質組成が構造平衡に作用し、活性構造の存在割合を変化させることでシグナル伝達活性を制御することを明らかにした (Mizumura *et al.*, *Sci. Adv.* (2019))。さらに平滑筋の弛緩に関わる β<sub>2</sub>AR について、作動薬結合状態における溶液構造を可視化し、他の構造解析手法では困難であった逆作動薬、完全作動薬との構造比較に初めて成功した (Imai *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* (2019))。これらの GPCR 研究に基づき、下流の細胞内シグナルを質的に変化させる中分子薬剤を合理的に設計できる可能性が示された。また、GPCR の NMR による動的構造解析に関して総説を執筆した (Shimada *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.* (2018))。さらに、病原菌由来の多剤耐性転写因子 QacR の動的構造解析を行い、構造平衡中の活性構造の割合の違いで、QacR の転写活性化度を説明できることが明らかとした (Takeuchi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2019))。加えて、Mg<sup>2+</sup>イオンチャネルの開閉機構 (Maruyama *et al.*, *eLife*, (2018))、G タンパク質共役型内向き整流 K<sup>+</sup>イオンチャネルの活性化制御機構 (Kano *et al.*, *Nat. Commun.*, (2019))、疾患関連変異の K<sup>+</sup>イオンチャネルの開閉に与える影響 (Iwahashi *et al.*, *Nat. Commun.*, (2020))などを NMR による動的機能解析により明らかにした。また、当初研究計画以外の成果として、GPCR や抗体医薬など、分子量が大きく重水素化が困難な標的に対して NMR 信号の生成効率を最大化する窒素核観測 CRINEPT 法 (Tokunaga *et al.*, *J Med. Chem.*, (2020))や部分重水素化とメチル標識を組み合わせた安定同位体標識法を確立した (Kofuku *et al.*, *J Biomol. NMR*, (2018))。また、in-cell NMR 法により観測することで、発がん性タンパク質 RAS の活性型割合が細胞内環境下で低下していることを発見し、Ras の活性を制御する新たな仕組みを解明した (Zhao *et al.*, *Cell Rep.*, 2020)。

### ii. クリプトサイトの同定、安定化変異体の設計

抗がん剤標的タンパク質 Bcl-xL について、リガンド非結合状態における温度依存性解析を行うことで、クリプトサイトを同定し、構造的に連動するアロステリックサイトを見出した。また NMR 情報をもとにクリプトサイトを開口状態に安定化するアロステリック変異体 (F143W, 以下 FW 変異体) を確立した (Mizukoshi *et al.*, *Sci. Adv.* (2020))。さらに、Rac1 の発がん性変異体を NMR 法により動的構造解析し、変異体に特有の Mg<sup>2+</sup> 低親性構造に、薬物が結合しうるクリプトサイトの存在を見出した (Toyama *et al.*, *Sci. Adv.* (2019a))。

### iii. 安定化変異体を用いた中分子 PPI 阻害剤の探索効率化

FW 変異がクリプトサイトに結合するペプチドに対する親和性を増大させること、FW 変異体を用いることで、クリプトサイトに結合するリガンドのスクリーニングを効率化できることを示した (Mizukoshi *et al.*, *Sci. Adv.* (2020))。本研究において確立したクリプトサイト同定・安定化戦略は、PPI 阻害剤の探索に広く資する。

## 3. インシリコ技術による構造的実証に基づく中分子シミュレーション技術の開発

### i. 天然物・中分子を含む化合物データベースの構築

化合物立体構造データベース (DB) は、薬物探索のインフラストラクチャーである。国内商社より天然物・中分子を含む市販化合物情報の提供を受け、3 次元立体構造の自動生成システムを開発、総計 1000 万化合物の立体構造 DB を作成し公開した (<http://www.mypresto5.com/ligandbox/cgi-bin/index.cgi?LANG=ja>)。本 DB は、抗新型コロナウイルス薬の探索のため、市販薬 8500 物質も含め、総計 516 ユーザーに 7010 ダウンロード配

給された。

ii. 膜透過性などの物性値を予測する機械学習 (AI 等) を含むシミュレーション技術の開発

低～中分子の膜透過性の物性計測やデータ収集を行い、新規な配座発生手法 (descgene) と自動的・段階的に学習することで過学習を防ぐ機械学習 (AI 等) 予測モデル (modelgene) の開発により、分子の多形と膜透過機構を考慮した膜透過予測モデルを開発し公開した (*Mol. Inf.* 2019, <https://www.mypresto5.jp/>)。学習データを入れ替えれば専門家でなくとも容易に予測モデルが作成できる。強力な構造探索能力をもつ厳密な MD シミュレーション (cNH 法) を開発し、水・DMSO 溶液中での環状ペプチドのリアルな膜透過に適した構造を明らかにした (*J. Chem. Inf. Model.* 2021)。その結果、受動拡散による膜透過を支配する因子として、既知因子である薬物分子の脂溶性、平均分子半径に加え、以下が特定された。

1. 水中での配座の中に、膜透過しやすいコンパクトな配座が多く含まれていること
2. 膜透過しやすいコンパクトな配座を作るとき、ヒンジとなる部分の立体障害が少ないこと
3. 分子の電気ダイポールなど水中に比べて膜表面に位置するときのエネルギーが安定であること
4. 分子形状の扁平率が高いこと
5. アミン性カチオンの溶媒接触面積が、多形によって変動しうること
6. 各配座ごとの推定 LogP (脂溶性) のばらつきが大きいこと

iii. 輸送タンパク質や膜接合タンパク質と薬物の分子の相互作用をシミュレーションする手法の開発

エネルギー推算により任意の膜蛋白質を複数種類のリン脂質よりなる膜に埋め込む膜系作成手法 (membgene) を開発・公開した。後述する mD-VcMD 法により、膜蛋白質エンドセリン受容体の系に中分子エンドセリンを加えれば、自然に精密な複合体構造が得られ、中分子結合機構を解明できた (*PEDS* 2019)。

iv. 薬物が結合可能なタンパク質構造を効率的に探索する手法の開発

蛋白質構造に対して薬物の結合構造を効率的に探索する手法 mD-VcMD 法、これを機械学習 (AI) によって計算効率を改善した GA-guided mD-VcMD 法 (*J. Comput. Chem.* 2019)、蛋白質構造が壊れにくい McMD dynamic docking simulation 法 (*J. Phys. Chem. B.* 2019)、自動的に任意の条件をサンプリングできる cNH 法 (*J. Math. Phys.* 2019; *J. Phys. A: Math. Theor.* 2020) 等を開発し、各種蛋白質への中分子結合シミュレーション等に成功した。

v. 蛋白質の動的構造変化を考慮した薬物結合部位の推定・薬物分子設計シミュレーション技術の開発

クリプトサイトの位置の特定は、PPI 阻害剤開発に必須だが、蛋白質の MD シミュレーションから、各アミノ酸残基のクリプトサイトへのなり易さ (cryptic-site index) を算出し、定量的な予測に成功した。cryptic-site index の高い残基の側鎖の運動の軌跡が医薬品候補化合物の立体構造に類似し、薬剤設計の指針となることを発見した (*J. Phys. Chem. B.* 2020)。McMD dynamic docking simulation 法により、ハブ蛋白質 Bcl-xL に対する結合様式の異なる 2 種の薬剤が、自動的にそれぞれのクリプトサイトをこじ開け正しい結合構造と活性値の再現に成功した (*Sci. Rep.* 2021)。ハブ蛋白質 14-3-3 蛋白質は、多数のパートナー配列をもつが、パートナー配列間の配列保存は低く、パートナー認識機構が未知であったが、GA-based Vcmd-MD は、14-3-3 蛋白質への中分子ペプチド結合の再現に加え、リン酸化・非リン酸化ペプチド結合でのシグナル伝達機構、アミノ酸配列上で離れた位置のホットスポット、パートナー認識メカニズムの解析に成功した (*J. Chem. Inf. Model.* 2020, *J. Chem. Theory Comput.* 2019)。

(英文)

### **Innovative drug discovery technologies for middle-sized molecules using cryo-electron microscopy.**

In order to develop innovative drug technologies for middle-sized molecules, which is the goal and issue set forth in this project, we proceeded with research on six items. 1) We analyzed complex structures of C-CPE and claudin-3 together with two mutants on the third helix, P134A and P134G, and found bend or no bend of the helix at the part define the properties of tight junction strands. 2) The structures of the Innexins that constitute the gap junction channels were analyzed with and without lipid molecules by single particle analysis utilizing cryo-electron microscopy, and it was clarified that the channel is closed by the lipid molecules. Based on research results of the other channels, we proposed a model that explains the gating mechanism of large diameter channels, such as tight junction. 3) We identified a bacterial Ca<sup>2+</sup> channel which is useful for structure and functional studies of voltage sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. 4) Structure analyses of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase binding with a stomach medicine revealed that the proton pump binds to the cryptosite without the binding gap in the previously analyzed structure at the resting state. The structures of ATP11C, which has the function of flippase, were analyzed using a cryo-electron microscopy. 5) In order to accelerate this project, we developed a high-resolution cryo-electron microscope equipped with a liquid helium-cooled sample stage. 6) We succeeded in developing an anti-SARS-CoV-2 drug as an example of innovative drug technologies for middle-sized molecules.

### **Innovative drug discovery technologies for middle-sized molecules using nuclear magnetic resonance (NMR).**

The structures of 5 cyclorasin, a series of 11-mer cyclic peptides that inhibit cancer-related protein Ras, were determined in water and a membrane surface mimicking solvent (DMSO) by using NMR. We found that the formation of an amphiphilic structure with a cluster of hydrophobic residues surrounded by basic residues is essential for cell permeability. Cell *impermeable* peptides cannot form the amphiphilic structure due to the steric hindrance between consecutive bulky sidechains (Takeuchi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2021)). The result is useful for the design of medium-sized molecules with a cell-permeable activity. We also established a strategy to identify and stabilize hidden drug-binding sites, cryptic sites. We successfully identified the cryptic site in the unligated Bcl-xL, a promising intracellular PPI target, by using NMR. A mutant that stabilizes the cryptic site *open* conformation substantially improved the hit identification efficiency in phage-display peptide screening compared to those using WT (Mizukoshi *et al.*, *Sci Adv.*, (2020)). This achievement will enable us to obtain medium-sized PPI inhibitors. We also analyzed the function-related conformational equilibrium in important biological systems, including GPCRs, ion channels, and multidrug-resistant transcription factors etc.

### **Innovative drug discovery technologies for middle-sized molecules using in silico technique with the aid of experimental data.**

We improved the membrane permeation prediction tool and discovered that the binding energy from water to the membrane surface is important for membrane permeation. By efficient molecular simulation, the structure that easily permeates the membrane and the partial structure that seems to be advantageous for membrane binding were clarified, and the consistency with the NMR experimental results was confirmed. We have expanded and released a tool for embedding arbitrary proteins in biological membranes. We have developed a quantitative predictive index for cryptic sites from molecular simulations of proteins. We

developed a method to compensate for sampling omissions in MD simulations by machine learning, and elucidated the difference in the binding mechanism of molecules with different functions and the pathway control mechanism by phosphorylation in intrinsically disordered proteins, which are the hub proteins of PPI. The extended ensemble method showed that drug molecules with different effects on Bcl-xL automatically open different cryptic sites and form different protein structures.