

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：非天然型複合体を促進する化合物の合理的設計法開発

Rational design of molecular glue using crystal-structure based drug screening

研究開発実施期間：令和5年4月15日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：林 宏典

Hironori Hayashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東北大学 災害科学国際研究所 助教

TOHOKU University, International Research Institute of Disaster Science, Assistant Professor

II 研究開発の概要

【研究開発の背景と目的】

医薬品の標的となるタンパクは生体内で（i）酵素活性、（ii）レセプター結合、（iii）タンパク間相互作用、（iv）タンパク-核酸結合や（v）膜融合といった様々な機能を持つ。過去に開発された多くの有機小分子からなる治療薬は、（i）および（ii）に該当する酵素やレセプター阻害に対しては非常に有効である。一方で、（iii）から（v）に該当する生体高分子間での相互作用阻害には有機小分子は不向きであり、事実ほとんど開発されていない。そのため、中分子以上の化合物やペプチドからなる阻害剤開発が着目されている。しかし、分子量の大きな阻害剤は、合成が困難、細胞膜透過性が低いといった問題を抱えている。ドラッグデリバリー技術の応用による改善が試みられているが、複雑な投与法や製造・製剤化過程、限定された保存方法がハードルとなり薬価や治療費の高額化が危惧される。従って、これまでの bottle neck を克服できる生体高分子間での相互作用とその機能発現阻害を可能とする有機小分子の効果的な設計戦略構築が重要課題である。

生体高分子間相互作用を標的とする化合物開発は、生体高分子間に割り込み複合体形成を阻害するという設計方針で行われてきた。近年、既存の作用機序とは全く逆の手法、すなわち、天然には生じない複合体形成（非天然複合体）を生体高分子間に誘導し、標的タンパク本来の機能を発揮させない有機小分子の同定・開発が報告され世界的にも注目されている。しかし、これまで報告された分子は全て偶発的に発見されており合理的な設計手法は確立されていない。非天然型複合体を誘導する分子の合理的設計・開発には、新たな相互作用面の形成法や、相互作用面近傍に結合する化合物の網羅的な同定法が必要となる。放射光施設 SPring-8 では、結晶構造解析を用いた化合物スクリーニングパイプラインの開発を進めており、自動 X 線回折装置やデータの自動解析ソフトの導入に加えて、結晶化ロボットや結晶観察装置、化合物を自動的に結晶に添加できるリキッドハンドラーの整備により結晶構造解析が自動化・高速化されており、理論上 24 時間で結晶 200 個のデータ取得が可能となった。このスクリーニング法の利用により標的タンパクに結合する化合物とその相互作用様式を網羅的に取得できる。本研究では、モデルタンパクとして、ウイルス由来ヌクレオタンパク（nucleoprotein; NP）を研究対象とし、結晶構造解析を用いた化合物スクリーニングを利用した非天然型複合体形成促進化合物の合理的設計法確立を目的とする。NP は、N 末端ドメイン（NTD）と C 末端ドメイン（CTD）が構造を持たないリンカー配列で連結され

た特徴的な構造を持つ。NP の NTD および CTD を用いて、NTD-NTD、NTD-CTD および CTD-CTD 間で非天然複合体を促進する化合物の設計を試みる。NP, NTD および CTD は、タンパク-DNA/RNA だけでなくタンパク-タンパク相互作用を併せ持ち、多角的な化合物の機能評価が可能となる。

【研究成果概要】

研究成果全体の概要

In silico スクリーニングおよび人工知能 (AI) を用いた化合物予測により NTD および CTD 結合性化合物を複数同定し、その内、SNR101 について結晶構造解析を用いて NTD との相互作用様式を解明した。また、結合評価、抗ウイルス活性評価を基に SNR101 より有望な NTD 結合性化合物の設計・合成・同定に成功した。2025 年に報告された CTD 結合性化合物とその構造情報を基に SNR101 と CTD 結合性化合物をリンカーで結合させた非天然複合体形成促進化合物を設計・合成し、CTD 間および NTD-CTD 間で非天然複合体を形成する化合物を 3 種類同定することに成功した。本研究は、非天然複合体を促進する化合物をゼロから設計・開発するという困難な課題に対して、同機能を有した化合物を実際に同定しただけでなく、化合物の結合により NTD の結合ポケットが構造変化することを世界で初めて解明、更に、NTD が新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 阻害剤の新規標的タンパクとして有用であることを証明するなど特筆すべき多くの成果を挙げており、有機小分子を用いた新たな創薬戦略だけでなく新規作用機序を有する SARS-CoV-2 阻害剤の発展に大きなインパクトをもたらす。以下に具体的な成果を示す。

1) 化合物スクリーニング

BINDS と連携して、NTD および CTD に結合する有機小分子の *in silico* スクリーニングを実施した。ナミキ商事の化合物ライブラリー (約 800 万種類) から分子量 300 以下の化合物かつ疎水性 (ClogP 値 < 3) や水素結合のドナー数 (H-bond donors $\leq$ 3) やアクセプター数 (H-bond acceptors $\leq$ 3) を考慮し 3 万化合物まで厳選した化合物群に対してドッキングを行い、NTD および CTD に結合が予測される 200 種類の化合物群の特定に成功した。これらの化合物群の内、スクリーニングの評価値 (スコア) と構造的多様性を考慮して各標的タンパクに対し 20 種類の化合物を選別・購入し機能評価を行った。更に、AI を用いた分子ドッキングツールである AlphaFill1 を用いて NTD および CTD に結合する化合物を予測した。

2) 化合物の活性評価および評価系の構築

SARS-CoV-2 の NTD および CTD は、RNA だけでなく DNA に対しても結合する。この特性を活かし、NP や NTD に結合する化合物を蛍光強度の変化で評価する手法を開発した。また、スクリーニングにより同定した化合物の機能を定量的に評価するために、BiacoreT200 を用いて、(i) 化合物と標的タンパクの結合力測定法の確立、(ii) NTD-DNA 間の結合を評価する実験系の構築を行った。更に、化合物によって非天然複合体が形成した場合、溶液中のタンパクの粒径が大きくなることに着目し、動的光散乱法 (DLS 法) を用いた非天然複合体形成検出法を構築した。また、液-液相分離を用いた機能評価系の構築を行った。

3) 化合物の機能評価

構築した機能評価系を用いて多様な化学構造を有する NTD 及び CTD 結合性化合物の同定に成功した。具体的には、BINDS と連携して実施した *in silico* スクリーニングによって得られた化合物群から、NTD 結合性化合物 (N シリーズ) を 13 種類、CTD 結合性化合物 (C シリーズ) を 10 種類特定した。AlphaFill1 を用いて予測した化合物およびその誘導体群から、5 種類の NTD 結合性化合物を同定した。同定した化合物群から、SARS-CoV-2 および VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた抗ウイルス活性評価および毒性評価を実施し、NTD 結合性化合物から Nirmatrelvir と同等のウイルス RNA 複製阻害効果を発揮する化合物を特定した。これらの成果は、NTD が抗ウイルス薬の新規標的タンパクとして有用であることを示している。

4) 相互作用情報取得

SARS-CoV-2 由来 NTD および CTD の発現・精製法を確立した。更に、10,000 種類以上の溶液条件を検討し、NTD および CTD の結晶化条件を複数特定した。見出した条件を用いて NTD および CTD を結晶化し、スクリーニングで得られた各化合物との複合体について、X 線結晶構造解析による網羅的な三次元構造解析を実施した。結果、NTD 結合性化合物である SNR101 と NTD からなる複合体の三次元構造の解明に成功した。構造解析結果から、相互作用様式の詳細だけでなく、SNR101 が結合することで NTD のアミノ酸側鎖の一部の向きが変化し、化合物の結合に適したポケットが形成されることを明らかにした。代表者らの知る限り NTD と化合物の複合体構造としては世界初の成果であり、化合物の結合により新規結合ポケットが出現するという報告は無い。本研究成果は、非天然複合体形成誘導化合物だけでなく SARS-CoV-2 のヌクレオタンパクを標的とした新規抗 SARS-CoV-2 阻害剤の発展に資する。

5) 化合物の合成展開

スクリーニングから得られた化合物群と結晶構造解析の結果を受けて (i) SNR101 の誘導体、(ii) NTD-NTD 間での非天然複合体形成を目的に、2 つの SNR101 を様々なリンカーで融合させた新規化合物群、(iii) NTD に結合する SNR101 と CTD への結合が報告された化合物 (ceftriaxone と ampicillin) をリンカーで融合させた新規化合物群、(iv) 代表者のグループが保有する独自ライブラリー由来の抗 SARS-CoV-2 活性化合物を基本骨格とした誘導体群の 4 系統の化合物群について設計・合成を行った。研究期間内に、合計 100 種類以上の新規化合物の合成を行い、NTD および CTD に対して結合する化合物だけでなく、Nirmatrelvir と同等のウイルス RNA 複製阻害効果を発揮する化合物を複数特定した。また、本研究開発課題で構築した非天然複合体形成検出法を用いて、化合物存在下でタンパクの粒径を変化させる化合物を 3 種類発見した。この結果は、発見した 3 種類の化合物が CTD 間および CTD-NTD 間で非天然複合体を誘導する化合物であることを示唆している。

【課題終了後の研究の進め方】

NTD 結合ユニットの最適化や CTD 結合ユニットの最適化に必要な更なる構造情報の取得やそれらのユニットを組み合わせた化合物の低分子量化を継続的に行う。研究期間内に非天然複合体誘導化合物の同定には成功したものの、設計通りの結合様式を形成しているか、どの程度の親和性を有しているかについては不明である。更に、評価を行った際に NTD 結合ユニットと CTD 結合ユニットを繋ぐリンカーの構造により違いが生じるなど新たに解明すべき課題も生じている。このため、非天然複合体誘導化合物の各タンパクに対する詳細な結合評価や化合物により誘導された NTD-CTD 複合体の構造解析により、化合物の相互作用様式の可視化とリンカーの果たす役割解明を行う。得られたデータを基にリンカー構造の最適化と非天然複合体誘導化合物の化学構造全体の最適化を行う。また、本研究成果により NTD を標的とする化合物に関しては、抗ウイルス活性を発揮することが明らかになった。抗ウイルス活性を発揮した化合物については、非天然複合体形成促進化合物のユニットとしてだけでなく抗ウイルス活性の強化に着目した最適化を繰り返し、より低毒性で強力な活性を発揮する SARS-CoV-2 由来 NTD 阻害剤として開発を進める

ABSTRACT

Although small compounds are typically unsuitable for disrupting protein-protein interactions, we sought to address this limitation by developing a rational design strategy for molecular glues capable of inducing non-native protein complexes. Rather than relying on serendipity as in previous findings, we employed an automated X-ray crystallography screening pipeline at the SPring-8 facility, specifically targeting the N-terminal (NTD) and C-terminal (CTD) domains of viral nucleoproteins. Through *in silico* screening and structural analysis, we identified more than 40 NTD- and CTD-binding compounds including SNR101. X-ray crystallography revealed that SNR101 induces a conformational change, creating a novel binding pocket. Based on this world-first structural insight, we rationally designed and synthesized novel molecules linking NTD- and CTD-binding agents. Additionally, we identified three novel compounds that induce non-native complex formation, as well as several NTD-binding compounds exerting anti-SARS-CoV-2 activity comparable to Nirmatrelvir. This study proves the feasibility of rationally designing molecular glues and validates NTD as a promising antiviral target.

Introduction

Small compounds have been highly effective at inhibiting enzymes and receptors; however, they are generally unsuitable for blocking protein-protein interactions (PPIs) and protein-DNA/RNA interactions. While larger molecules, such as peptides, can target PPIs, they face significant clinical challenges, including low cell membrane permeability and high costs associated with complex drug delivery systems. To overcome these bottlenecks, this research explores a novel therapeutic strategy: identifying small compounds that act as molecular glues to induce non-native complexes between biological macromolecules, thereby intrinsically inhibiting the target protein's function. Because previous discoveries of such molecular glues have relied largely on serendipity, establishing a systematic and rational design methodology remains a critical challenge in drug discovery.

Methodological Approach

We selected the viral nucleoprotein (NP) as a model, specifically targeting its N-terminal domain (NTD) and C-terminal domain (CTD) to design compounds capable of promoting NTD-NTD, NTD-CTD, and CTD-CTD non-native complexes. In collaboration with BINDS, we performed *in silico* screening, filtering a library of over 8 million compounds down to 200 promising candidates using parameters such as molecular weight, hydrophobicity, and hydrogen-bonding properties. The AI-based molecular docking tool AlphaFill was also employed for identifying NTD- and CTD-binding compounds. For quantitative functional assessment, we developed evaluation systems utilizing fluorescence intensity, surface plasmon resonance (Biacore T200), and dynamic light scattering (DLS) to detect the increased protein particle size indicative of non-native complex formation. To elucidate the detailed interaction modes, we performed X-ray crystallography on the target protein-binding compounds.

Results and Discussion

Our integrated approach successfully identified functional NTD- and CTD-binding compounds including SNR101. Following the establishment of crystallization conditions, we performed X-ray crystallography to elucidate the three-dimensional structure of the NTD complexed with SNR101. The structural analysis revealed that the binding of SNR101 induces a conformational change in the amino acid side chains of the NTD, creating a novel binding pocket optimized for the compound. Based on these structural and functional insights, we rationally designed and synthesized over 100 novel compounds. These included derivatives of SNR101 and bridged molecules fusing SNR101 with known CTD-binding agents (e.g., ceftriaxone and ampicillin) via various linkers. Utilizing the established DLS method, we successfully discovered three novel compounds that induce non-native complex formation between proteins. Furthermore, biological evaluations using VeroE6/TMPRSS2 cells revealed that several NTD-binding compounds exhibited antiviral activity equivalent to the clinically approved drug Nirmatrelvir, proving that the viral NTD is a highly viable novel target for SARS-CoV-2 antiviral therapeutics.

Conclusion and Future Perspectives

This study provides a critical proof-of-concept for the rational, structure-based design of molecular glues. Future efforts will focus on obtaining high-resolution structural information of the induced NTD-CTD complexes to visualize precise interaction modes and elucidate the role of the linker structures. By iteratively optimizing the binding units and linkers, we aim to enhance both the complex-inducing efficacy and antiviral activity, ultimately leading to the development of potent, low-toxicity SARS-CoV-2 inhibitors.