

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）分子モデリングに基づく高度創薬支援
（英語）Advanced Drug Discovery based on Molecular Modeling Approach

補助事業担当者 （日本語）産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター
研究チーム長 広川貴次

所属 役職 氏名：（英語）Takatsugu Hirokawa, Leader, Team, Molecular Profiling Research Center
for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

本課題では、創薬標的タンパク質を中心に、ホモロジーモデリング、ドッキング計算（タンパク質-タンパク質、タンパク質-低分子、タンパク質-核酸、核酸-低分子）、分子動力学計算等の分子モデリングおよびシミュレーション技術を統合的に活用した実用性の高いインシリコ創薬の支援研究と高度化研究を行った。以下に代表的な成果を述べる。

タンパク質 - タンパク質相互作用阻害活性を持つ天然物の作用メカニズム解析例：東北大学のグループと共に、タンパク質-タンパク質相互作用解析、天然物のドッキング計算、分子動力学計算、相互作用フィンガープリント解析など多角的な分子モデリングと、合成、NMR 測定の連携により、PAC2 複合体と複合体阻害天然物 TB1 の作用機序を提案すること成功した (Doi T et al., Chemical Science, 2014)。この研究課題では、これまでの鍵と鍵穴モデルでは説明できない結合様式を様々な要素技術の活用することで予測が可能となり、さらに実験（合成、天然物）との連携により、予測モデルが妥当であることが証明された。

タンパク質 - タンパク質複合体予測例：東京都医学総合研究のグループと共に、Parkin と Ubiquitin の活性型複合体を、実験情報を加味したタンパク質 - タンパク質ドッキングと分子動力学計算により予測した (Yamano K, J. Biol. Chem., 2015)。その後、Ubiquitin が結合した活性型 Parkin の X 構造が発表され、われわれの予測構造は、X 線構造に極めて類似していたことが明らかになった。本成果は、2015 年、JBC Best paper of the week に選定され、国際的な関心の高さが示された。特に分子動力学計算によって Parkin を不活性化状態から活性化状態へ構造変化を導いたシミュレーションの効果が注目された。

生薬成分と標的タンパク質の作用機序解析例：漢方メーカーのツムラと共に、低濃度では、アゴニストモジュレーター、高濃度では、アンタゴニスト活性を持つ生薬成分 Ignavine の標的タンパク質 (mu-Opioid 受容体) に対する結合様式と結合に伴う構造変化をドッキングと分子動力学計算により予測した (Obuchi K. et al., Sci. Rep. 2017)。シミュレーションの結果、Ignavine は、既知のアゴニストやアンタゴニストと異なる構造変化を導く作用があると推定され、この性質と mu-Opioid 受容体の二量体化により、濃度依存で活性能が変化する可能性が示唆された。

高度化研究では、創薬標的用分子モデリングノウハウのツール化と技術移転を目指して、構造変化を考慮しながら、バーチャルスクリーニングを高効率化できる新規 GPCR モデリング法を開発し、2014 年に誌上発表を行った (Sato M. and Hirokawa T., J. Chem. Inf. Model., 2014)。その成果は、CCG 社が開発している統合計算化学システム MOE 上で実行可能なモジュール「vGPCR Builder」として SVL 言語を用いて実装し、企業、アカデミアを含め多くの創薬研究者が利用できるアプリケーションとして提供した。また、RNA-RNA 相互作用予測では、フラグメントアセンブリ法による RNA-RNA 複合体予測法を開発し、誌上発表を行った (Yamazaki S., J. Chem. Inf. Model., 2014)。さらに RNA 立体構造予測も含め本解析技術は、解析ツールとして外部公開した。

In this project, we proposed the supporting and developing of in silico drug discovery using molecular modeling and simulation based on fundamental technologies such as homology modeling, docking simulation and molecular dynamics (MD) simulation. Our goal is to achieve in silico drug discovery technology having high practicability for translational research in relationships between pharmaceutical industry and academia. The followings are some of the typical results.

Characterization of natural products as a protein-protein interaction inhibitor collaboration with Tohoku University: We have characterized the inhibition of the protein-protein interaction of the homodimer of proteasome assembling chaperone (PAC) 3 with thielocin B1 (TB1), discovered from natural product sources. Integration technology of molecular modeling using protein-protein interaction analysis, docking of natural products, MD simulation, interaction fingerprint analysis suggested that TB1 exhibits distinct binding positions on the interface of the homodimer and the complex can be stabilized by five interactive residues on PAC3. Both the NMR experiments and further in silico docking studies have suggested that TB1 approaches one face of the PAC3 homodimer, not the monomer, releasing the subunit of the interface of the PAC3 homodimer by a rare pre-dissociation-independent mechanism (Doi T et al., Chemical Science, 2014).

Prediction of protein-protein complex structure collaboration with Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science: Matsuda's group analyzed interactions between phosphorylated forms of both Parkin

and ubiquitin at a spatial resolution of the amino acid residue by site-specific photo-crosslinking. Molecular modeling based on the site-specific photo-crosslinking interaction map combined with mass spectrometry and MD simulation strongly suggests that a novel binding mechanism between Parkin and ubiquitin leads to a Parkin conformational change with subsequent activation of Parkin E3 ligase activity (Yamano K, J. Biol. Chem., 2015, JBC Best paper of the week).

Characterization of natural products interacting with receptors collaboration with Tsumura & Co: Research group of Tsumura identified the ignavine molecule that augmented the responses produced by DAMGO, a representative MOR agonist, at a low concentration and inhibited it at a higher concentration. In silico simulation analysis using docking and MD simulation with principle component analysis suggested that ignavine would induce a unique structural change distinguished from those induced by a representative MOR agonist and antagonist. These data collectively suggest the possibility that ignavine could be a novel allosteric modulator of the MOR. The present results may open the way for the development of a novel pain management strategy (Obuchi K. et al., Sci. Rep. 2017).

As the results of developing the method of advanced in silico modeling, we have developed an extended template-based modeling with the fragmental template procedure in addition to typical template-based modeling methods and evaluation method for GPCR virtual screening (Sato M. and Hirokawa T., J. Chem. Inf. Model., 2014) and tertiary structure prediction of RNA-RNA complexes using a secondary structure and fragment-based method (Yamazaki S., J. Chem. Inf. Model., 2014).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 17 件)

1. Asamitsu K, Hirokawa T, Okamoto T. MD simulation of the Tat/Cyclin T1/CDK9 complex revealing the hidden catalytic cavity within the CDK9 molecule upon Tat binding. PLoS One. 2017 Feb 8;12(2):e0171727.
2. Komiyama T, Ogura A, Hirokawa T, Zhijing M, Kamiguchi H, Asai S, Miyachi H, Kobayashi H. Analysis to Estimate Genetic Variations in the Idarubicin-Resistant Derivative MOLT-3. Int J Mol Sci. 2016 Dec 22;18(1). pii: E12.
3. Ohbuchi K, Mori Y, Ogawa K, Warabi E, Yamamoto M, Hirokawa T. Detailed Analysis of the Binding Mode of Vanilloids to Transient Receptor Potential Vanilloid Type I (TRPV1) by a Mutational and Computational Study. PLoS One. 2016 Sep 8;11(9):e0162543.
4. Igawa Y, Fujiwara S, Ohura K, Hirokawa T, Nishizawa Y, Uehara S, Uno Y, Imai T. Differences in Intestinal Hydrolytic Activities between Cynomolgus Monkeys and Humans: Evaluation of Substrate Specificities Using Recombinant Carboxylesterase 2 Isozymes. Mol Pharm. 2016 Sep 6;13(9):3176-86.

5. Ohbuchi K, Miyagi C, Suzuki Y, Mizuhara Y, Mizuno K, Omiya Y, Yamamoto M, Warabi E, Sudo Y, Yokoyama A, Miyano K, Hirokawa T, Uezono Y. Ignavine: a novel allosteric modulator of the μ opioid receptor. *Sci Rep*. 2016 Aug 17;6:31748.
6. Sakuma M, Ma Y, Tsushima Y, Iida K, Hirokawa T, Nagasawa K. Design and synthesis of unsymmetric macrocyclic hexaoxazole compounds with an ability to induce distinct G-quadruplex topologies in telomeric DNA. *Org Biomol Chem*. 2016 Jun 14;14(22):5109-16.
7. Kitakaze K, Mizutani Y, Sugiyama E, Tasaki C, Tsuji D, Maita N, Hirokawa T, Asanuma D, Kamiya M, Sato K, Setou M, Urano Y, Togawa T, Otaka A, Sakuraba H, Itoh K. Protease-resistant modified human β -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model. *J Clin Invest*. 2016 May 2;126(5):1691-703.
8. Yamano K, Queliconi BB, Koyano F, Saeki Y, Hirokawa T, Tanaka K, Matsuda N. Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation. *J Biol Chem*. 2015 Oct 16;290(42):25199-211.
9. Tera M, Hirokawa T, Okabe S, Sugahara K, Seimiya H, Shimamoto K. Design and synthesis of a berberine dimer: a fluorescent ligand with high affinity towards G-quadruplexes. *Chemistry*. 2015 Oct 5;21(41):14519-28.
10. Komiyama T, Hirokawa T, Sato K, Oka A, Kamiguchi H, Nagata E, Sakura H, Otsuka K, Kobayashi H. Relationship between human evolution and neurally mediated syncope disclosed by the polymorphic sites of the adrenergic receptor gene $\alpha 2B$ -AR. *PLoS One*. 2015 Apr 10;10(4):e0120788.
11. Asamitsu K, Hirokawa T, Hibi Y, Okamoto T. Molecular dynamics simulation and experimental verification of the interaction between cyclin T1 and HIV-1 Tat proteins. *PLoS One*. 2015 Mar 17;10(3):e0119451.
12. Satoh T, Sumiyoshi A, Yagi-Utsumi M, Sakata E, Sasakawa H, Kurimoto E, Yamaguchi Y, Li W, Joazeiro CA, Hirokawa T, Kato K. Mode of substrate recognition by the Josephin domain of ataxin-3, which has an endo-type deubiquitinase activity. *FEBS Lett*. 2014 Nov 28;588(23):4422-30.
13. Sato M, Hirokawa T. Extended template-based modeling and evaluation method using consensus of binding mode of GPCRs for virtual screening. *J Chem Inf Model*. 2014 Nov 24;54(11):3153-61.
14. Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*. 2014 Jun 5;510(7503):162-6.
15. Kawamura S, Unno Y, Hirokawa T, Asai A, Arisawa M, Shuto S. Rational hopping of a peptidic scaffold into non-peptidic scaffolds: structurally novel potent proteasome inhibitors derived from a natural product, belactosin A. *Chem Commun (Camb)*. 2014 Mar 7;50(19):2445-7

16. Doi T, Yoshida M, Ohsawa K, Shin-ya K, Takagi M, Uekusa Y, Yamaguchi T, Kato K, Hirokawa T, Natsume T. Total synthesis and characterization of thielocin B1 as a protein–protein interaction inhibitor of PAC3 homodimer. Chem. Sci., 2014, 5, 1860-1868.
17. Yamasaki S, Hirokawa T, Asai K, Fukui K. Tertiary structure prediction of RNA-RNA complexes using a secondary structure and fragment-based method. J Chem Inf Model. 2014 Feb 24;54(2):672-82.
18. 広川貴次、創薬インフォマティクスによる化合物創製支援. ファルマシア. 2013, 49, 111-115.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. In silico 3D structure analysis of GPCRs, 口頭, 広川貴次, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017/3/18, 国内
2. 構造データとケモバイオインフォマティクスを融合したネオバイオ分子設計, 口頭, 広川貴次, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内
3. 複数 X 線構造を利用した GPCR バーチアルスクリーニング, 口頭, 広川貴次, 第 12 回先進科学技術活用力養成講座 構造ベース創薬, 2016/9/12, 国内
4. 3 次元最短経路探索法と教師付き分子動力学計算 によるタンパク質ーリガンド結合予測, 口頭, 本野千恵, 小河原敦, 五味雅裕, 佐藤美和, 広川貴次, 第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2016/6/24, 国内
5. 3 次元最短経路探索法を取り入れた Supervised Molecular Dynamics によるタンパク質ーリガンド結合シミュレーション, ポスター, 本野千恵, 小河原敦, 五味雅裕, 佐藤美和, 広川貴次, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/24, 国内
6. 分子シミュレーションによる創薬支援研究, 口頭, 広川貴次, フォーラム富山 創薬 第 43 回研究会, 2016/5/12, 国内
7. 分子モデリングを活用した創薬支援研究, 口頭, 広川貴次, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016/3/28, 国内
8. タンパク質構造情報に基づくインシリコ DR, 口頭, 広川貴次, 日本薬学会第 136 年会, 2016/3/27, 国内
9. Molecular modeling of GPCRs for accurate in silico screening, 口頭, 広川貴次, ICCMSE-CC 2016, 2016/3/18, 海外
10. 分子モデリングに基づく創薬支援研究, 口頭, 広川貴次, 分子標的医学研究センターシンポジウム, 2016/1/7, 国内
11. 分子モデリングによる創薬支援, 口頭, 広川貴次, 第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2015/11/27, 国内
12. 教師付分子動力学計算を取り入れたタンパク質ーリガンド結合予測, ポスター, 小河原敦, 本野千恵, 五味雅裕, 佐藤美和, 広川貴次, 第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2015/11/26, 国内
13. Protein-ligand Binding Prediction using Supervised Molecular Dynamics Simulation, ポスター, 小河原敦, 本野千恵, 五味雅裕, 佐藤美和, 広川貴次, CBI 学会 2015 年大0/2 国内

14. Molecular Modelling of G Protein-Coupled Receptors for in silico Drug Discovery, 口頭, 広川貴次, ARCSB2015-TriSys, 2015/9/1, 海外
15. 医薬品探索に向けた分子シミュレーションによるタンパク質 - タンパク質相互作用解析, 口頭, 広川貴次, 第 34 回日本糖質学会年会, 2015/8/1, 国内
16. 構造生物学データと分子モデリングの融合による創薬支援, 口頭, 広川貴次, 第 169 委員会 第 47 回研究会, 2015/7/14, 国内
17. インシリコ創薬を効率化する G タンパク質共役受容体を標的とした拡張型ホモロジーモデリング法の開発, 口頭, 広川貴次, 第 42 回生体分子科学討論会 2015, 2015/6/13, 国内
18. 分子モデリングに基づく高度創薬支援, 口頭, 広川貴次, 日本蛋白質科学会年会, 2014/6/25, 国内
19. 計算科学を用いた機能性抗体ペプチドのファルマコフォア解析, 口頭, 広川貴次, 2014/11/26, 国内
20. NMR 情報を活用したインシリコ創薬の高精度化, 口頭, 広川貴次, CBI 学会研究会, 2015/1/14, 国内
21. 創薬支援のための分子モデリング技術の紹介, 口頭, 広川貴次, PDIS 最先端セミナー, 2015/2/4, 国内
22. タンパク質構造情報に基づくインシリコ DR, 口頭, 広川貴次, 日本生化学会年会, 2014/10/17, 国内
23. タンパク質構造情報に基づくインシリコ分子設計, 口頭, 広川貴次, 第 6 回生体分子科学シンポジウム, 2014/3/20, 国内
24. 構造情報を活用したインシリコ創薬, 口頭, 広川貴次, 第 51 回構造生物応用研究会, 2014/3/11, 国内
25. 創薬インフォマティクス講座を開催している経験から, 口頭, 広川貴次, CBI 研究講演会「生物医学と創薬を変える IT」, 2013/9/25, 国内
26. タンパク質-タンパク質相互作用制御化合物のためのインシリコケミカルライブラリー設計, 口頭, 広川貴次, 第 86 回日本生化学会年会, 2013/9/11, 国内
27. インフォマティクス関連の支援項目について, 口頭, 広川貴次, 生命医薬情報学連合大会 2013, 2013/10/30, 国内
28. タンパク質-ペプチド相互作用予測と低分子化へ向けて, 口頭, 広川貴次, 生命医薬情報学連合大会 2013, 2013/10/30, 国内
29. Protein binding pocket and ligand shape comparison, ポスター, 本野千恵, 広川貴次, 日本生物物理学会第 51 回年会, 2013/10/29, 国内
30. LBDD イントロダクション, 口頭, 広川貴次, 第 330 回 CBI 学会研究講演会, 2012/9/14, 国内.
31. Molecular dynamics simulation of PA-PB1 complex for in silico drug discovery, 口頭, 広川貴次, 佐藤美和, 11th International Conference on Bioinformatics, 2012/10/3, 海外
32. GPCR 立体構造に基づくインシリコドラッグデザイン, 口頭, 広川貴次, 構造活性相関フォーラム 2012, 2012/6/22, 国内

(3)「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし