

相互作用の熱力学情報に基づく低分子リガンド設計

津本浩平,* 宇井美穂子

Rational Fragment-design Method Based on a Thermodynamic Analysis

Kouhei TSUMOTO* and Mihoko UI

Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

(Received June 17, 2009)

Thermodynamic analysis is an effective tool in drug design. Thermodynamic parameters of the interaction between a given ligand and its target protein can reveal the character of the ligand. In general, promising drug candidates achieve high affinity for a target protein through their contributions of both favorable enthalpy and entropy terms. It is, however, more difficult to optimize binding enthalpies than binding entropies in ligand-design; therefore, it is desirable to choose firstly a lead-compound based on its favorable binding enthalpy. In this study, we have explored the utility of this approach using anti-ciguatoxin antibody 10C9 as a model in the screening of a chemical library. We previously showed that 10C9 possesses an extraordinary large antigen-binding pocket that recognizes the antigen ciguatoxin by means of a favorable binding enthalpy. Here, among the many compounds tested, three of them could bind to the antigen-binding pocket of 10C9 with a few kcal/mol of favorable binding enthalpy. In addition, these compounds showed structural analogies with the proper antigen ciguatoxin: a comparison with other compounds which showed no favorable enthalpy change upon testing revealed that 10C9 rigorously identifies their cyclic structure and a characteristic hydroxyl group. In summary, this study demonstrates that enthalpy change is an effective index for ligand-design studies.

Key words—thermodynamic analysis; ligand design; ciguatoxin; antibody

1. はじめに

ここ近年の生命科学の進展, 科学技術の発展に呼応する形で, 私たちは生命の営みを分子レベルで捉え, 生体内での個々の分子の振る舞いを理解し制御することを目指すようになってきた. 本来あるべき生体の秩序から逸脱した分子の挙動はわれわれに病をもたらし, 時に死に至らしめる恐れもある. 現在用いられている治療薬の多くは, 自然界の生理活性物質等からヒントを得るなど古くからの経験則に基づいて構築されてきたものであるが, 近年ではまず病因を分子レベルで解明し, 生体機能に基づいた真に有効な医薬品をより迅速に, より合理的に開発することが可能になりつつある.

創薬研究分野において, 1990年代からスピード化を目指したハイスループットスクリーニング, コ

ンピナトリアルケミストリーが始まり, 薬剤開発に向けた大量のデータを短時間で収集し, 系統立て, 分析することが可能になった. 新しいリード化合物探索源には何万, あるいは何百万という巨大なライブラリーが作製され, また既存のリード化合物の効力と安全性を向上するためにデザインされるライブラリーでも数百種類の規模に及ぶ. このような莫大な低分子化合物ライブラリーの中からスクリーニングによって医薬品候補となる化合物が選別されてくる. したがって, いかにして効率よく有効な化合物を選別するかが大きな課題となる.

近年, 特に低分子創薬では Structure-Based Drug Design (SBDD) や Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) といった薬剤設計における熱力学情報の重要性が再認識されつつある.¹⁾ 熱力学情報を得る手段の1つとして, 等温滴定型熱量測定 (ITC) は分子間の結合親和性に加えて相互作用形成に伴う熱力学的情報を一度の測定ですべて見積もることができるといった非常に優れた測定法である. 自発的な分子間の反応においては自由エネルギー変化

東京大学大学院新領域創成科学研究科 (〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5 東大・新領域・生命棟 301)

*e-mail: tsumoto@k.u-tokyo.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第129年会シンポジウム S05 で発表したものを中心に記述したものである.

(ΔG) は常に負の値となるが、これにはエンタルピー変化 (ΔH) とエントロピー変化 (ΔS) の両者が寄与しており、そのバランスは個々の分子の相互作用によって異なる。ITC では相互作用に伴う熱量の変動を直接観測するため、コンピュータ上では再現するのが困難な水和水の変動や分子の熱運動、誘導適合によるタンパク質の構造変化などの寄与も滴定プロファイル中に反映される。

Figure 1 は、低分子化合物-標的タンパク質間相互作用における典型的な 3 種類の熱力学的パターンを示す。これら A, B, C の相互作用はいずれも同じ ΔG を持ち、同じ結合親和性を示すが、その相互作用の熱力学的特徴は大きく異なっている。Scheme A は非共有結合の形成、特に水素結合の形成に特有なパターンであり、有利な ΔH と不利な $T\Delta S$ を示す。一般に、このタイプの低分子化合物は構造の自由度が高く、また極性が高いために生体内において膜透過性に問題を起こす場合が多いと言われる。Scheme B は疎水性相互作用に特有で、有利な $T\Delta S$ と不利な ΔH を示す。一般に、このようなタイプの低分子化合物は疎水性が高いために難溶性を示し、また構造の自由度が乏しく適応性に欠けることから必然的に薬剤耐性の原因となる変異を引き起こしやすくなると言われている。それらに対して、Scheme C では、 ΔH , $T\Delta S$ ともに有利に働いており、薬剤としては最も理想的なプロファイルである。

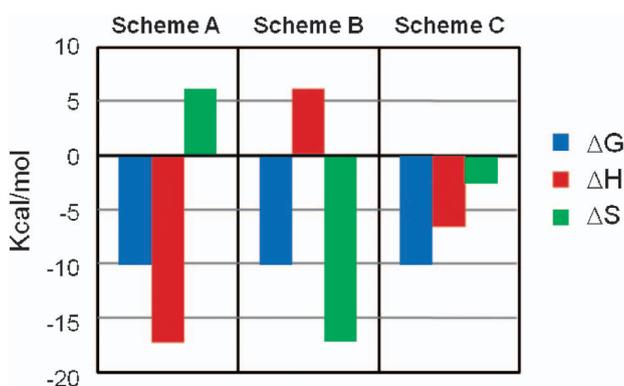


Fig. 1. A Schematic Diagram to Show the Different Thermodynamic Profiles Possibly Observed for Distinct Types of Molecular Interaction Often Observed in Biology

(Scheme A) a high degree of hydration bonding in addition to conformational changes; (Scheme B) here binding is dominated by hydrophobic interactions; (Scheme C) a small favorable contribution from hydrogen bonding along with a hydrophobic contribution.

低分子-タンパク質間において有利なエンタルピー変化は、水素結合や van der Waals 相互作用の形成によって獲得される。水素結合は、低分子と標的タンパク質上にある水素結合の電子供与体及び電子受容体が適切な相互の位置関係に置かれることによって形成され、ある一定範囲内の原子間距離や残基の指向性を要することから高い特異性に寄与する。²⁾ また、 π - π 相互作用や CH- π 相互作用なども相互の距離や位置関係が親和性に深く関与し、低分子認識の際のホットスポットとして機能する例も報告されている。^{3,4)} 特に、リード化合物は標的タンパク質に特異的に結合して安定した足場となる必要があるため、相互作用形成の際の有利な ΔH は重要な因子となる。一方、エントロピー変化に関しては、2007 年、井上らによってアビジン-ビオチンの強固な相互作用に匹敵する 10^{15} M^{-1} の結合親和性を持った人工超分子系が開発され、分子設計の際の $T\Delta S$ の重要性が示された。⁵⁾ 単位構造であるグリコールウリル 7 分子から構成される cucurbit [7] uril は、シクロデキストリンと似た樽状の分子で内部に空孔を形成する。ゲスト 3 と呼ばれる 1,1'-bis(trimethylammoniomethyl) ferrocene は、この cucurbit [7] uril が持つ空孔内に取り込まれ、 10^{15} M^{-1} もの高い結合定数を示す。この高い親和性は有利なエンタルピー変化の獲得に加え、アミノメチル化した官能基の存在や脱水和の影響などでエントロピーの損失が最小限に抑えられたことが大きな要因として挙げられている。分子デザインでは、非共有結合形成による有利なエンタルピー変化の獲得とともにエントロピー変化の最適化も重要な論点になる。

これまでに、Freire らによって ITC から得られた熱力学的情報に基づいた創薬プロセスに関する研究が報告されている。⁶⁻¹⁰⁾ 彼らは、HIV-1 プロテアーゼを標的とした阻害剤のキャラクタライゼーション、またエンタルピー-エントロピー補償の克服によって結合親和性の最適化を達成している。彼らの研究では、まず非常に有利なエンタルピー変化を



津本浩平

1995 年東京大学大学院工学系研究科博士課程退学。東北大学大学院工学研究科助手、講師、助教授をへて 2005 年より現職。1997 年博士 (工学) 取得 (東京大学)。研究テーマは、生命分子相互作用の工学的研究、改変抗体を中心としたタンパク質治療薬開発の基盤研究。

持つリード化合物を同定し、続いて疎水基の付与による最適化を行うといった戦略の有効性が示されている。¹¹⁾ 水素結合や van der Waals 相互作用など有利なエンタルピー変化を与える相互作用には、原子間の距離や方向性、さらに対イオンや水分子の影響など多くの制限や考慮すべき要因が多いのに対し、有利なエンタルピー変化は脱水和や構造の柔軟性に起因するために比較的制御しやすいといわれる。このような背景から、われわれは ITC 測定による有利なエンタルピー変化、つまり二分子間の発熱を指標とした低分子スクリーニングの有効性と必然性について抗原抗体反応をモデルとした系で議論する。

2. 抗シガトキシン抗体 10C9 の抗原抗体相互作用

タンパク質-低分子間相互作用に関する熱力学的な考察を行うためのモデル系として、われわれは抗シガトキシン抗体 10C9 に着目した。10C9 は、海洋毒素であるシガトキシン (CTX3C) (Fig. 2) の A 環側を認識する抗体としてマウスの免疫により獲得されたモノクローナル抗体である。シガトキシンはエーテル環がトランス縮合で連なった特異な構造を持つ環状ポリエーテル系毒素の 1 つであり、その巨大な化学構造を認識する抗体 10C9 には低分子

認識抗体としては比較的稀な大きさの抗原結合ポケットが存在することがこれまでの研究から明らかになっている。¹²⁾

X 線結晶構造解析により解明した抗シガトキシン抗体 10C9 の立体構造を Fig. 3 に示す。10C9 は、結晶性の向上を期待して IgG のパパイソ消化により断片化した Fab (以下 10C9Fab と呼ぶ) を構造解析に用いた。10C9Fab の可変領域は真上から見ると中央付近には奥に深い空孔が確認でき、 V_H - V_L 界面によって形成される深さおよそ 11 Å、幅およそ 7 Å の巨大な筒状の抗原結合ポケットを有している。リガンドとなるシガトキシンの部分構造 CTX3C-ABCD 及び CTX3C-ABCDE (Fig. 2) との複合体の結晶構造を見てみると、これらのリガンドはその抗原結合ポケットに対していずれも A 環をポケット内部に向けて縦に突き刺さるように結合する。また、原子間の距離からそれぞれのリガンドと抗体間には水素結合及び多数の van der Waals 相互作用が機能していることが推察されている。

10C9Fab とそれぞれのリガンド CTX3C-ABCD 及び CTX3C-ABCDE との相互作用について熱力学的に解析するため、等温滴定型熱量測定を用いて検討を行った。Figure 4 には、25°C 条件下 PBS (Phos-

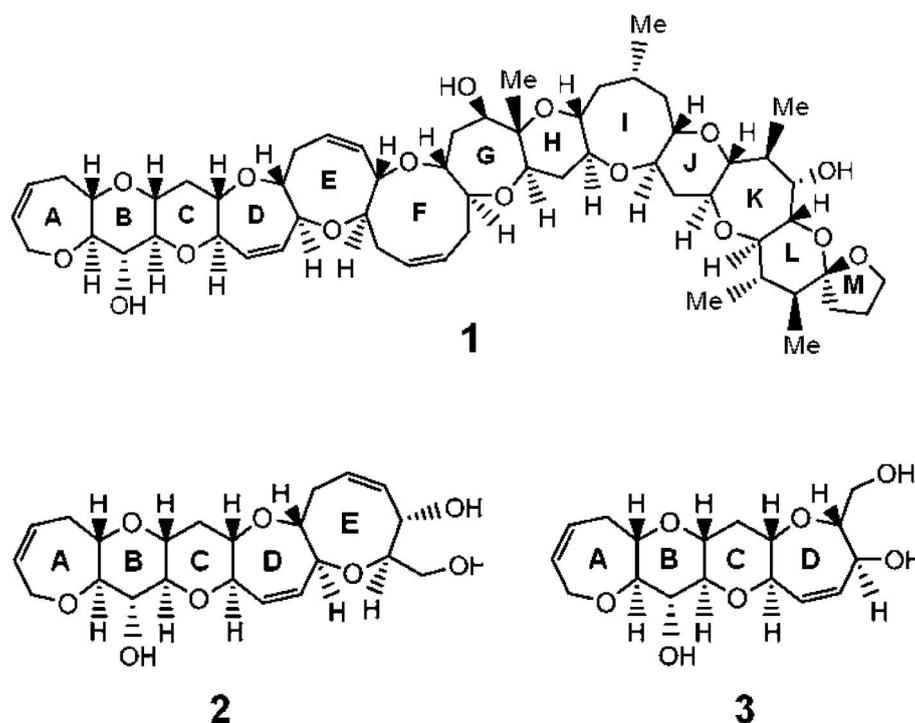


Fig. 2. Structures of Ciguatoxin Fragments: CTX3C (1), CTX3C-ABCDE (2), and CTX3C-ABCD (3)

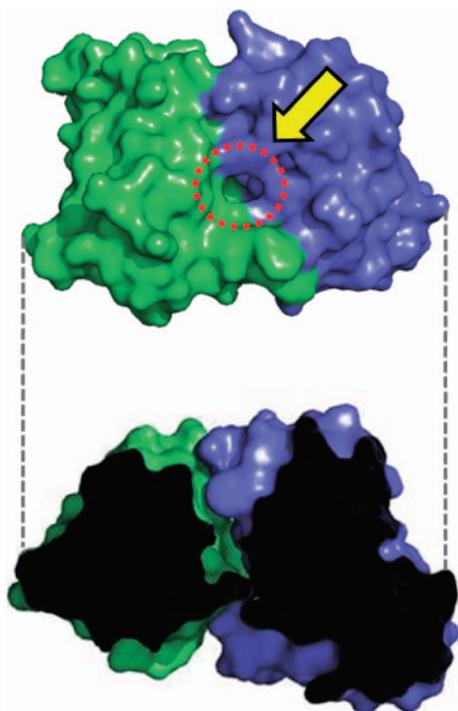


Fig. 3. Top Views (top) and Cross-section of the Antigen-binding Site (bottom) of the Variable Region of 10C9 Fab in Ligand-free Form

Red dotted line shows the entrance of an antigen-binding pocket of 10C9 Fab. Green, heavy chain of 10C9 Fab; Blue, light chain of 10C9 Fab.

phate Buffered Saline) 溶液中にて、それぞれ(A) 5 μM CTX3C-ABCD 及び(B) 5 μM CTX3C-ABCDE に対し 50 μM 10C9Fab を一定量ずつ滴下した時の滴定プロファイルを示す。10C9Fab と CTX3C-ABCD 及び CTX3C-ABCDE とのそれぞれの反応は、いずれも結合比 1 : 1 の発熱反応であった。熱力学的パラメータ及び解離定数を算出したところ、CTX3C-ABCD ではエンタルピー変化量 ΔH -45.7 kJ mol^{-1} 、エントロピー変化量 ΔS -0.015 $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ 、解離定数 K_d $6.7 \times 10^{-8} \text{M}$ となり、また、CTX3C-ABCDE ではエンタルピー変化量 ΔH -68.4 kJ mol^{-1} 、エントロピー変化量 ΔS -0.076 $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ 、解離定数 K_d $1.1 \times 10^{-8} \text{M}$ であった。10C9Fab が有する抗原結合ポケットとの形状相補性が高い CTX3C-ABCDE では、より多くの非共有結合形成によるエンタルピー的寄与が親和性創出に大きく貢献していると考えられる。一方、10C9Fab との形状相補性が相対的に低い CTX3C-ABCD では、CTX3C-ABCDE と比較してエンタルピー的寄与は低いもののエントロピーの損失は相対的に小さかつ

た。これは、CTX3C-ABCD が結合しても 10C9Fab の構造は CTX3C-ABCDE が結合した場合と比較して自由度が高い状態で保たれている可能性がある。また、結晶構造から CTX3C-ABCD の認識に伴って 10C9Fab の可変領域及び定常領域の顕著な構造変化が誘起されることが分かっており、特に定常領域においては 10C9 単独の状態と比較して高い温度因子を示していた。これらのことを考慮すると、CTX3C-ABCD では不十分な非共有結合形成によって 10C9Fab の構造変化を招き、結果的に分子の運動性が高い複合体を形成していると考えられる。

CTX3C-ABCD の結合に伴うエントロピー損失が少ないことは、10C9 との結合を飛躍的に向上させるのに貢献している可能性がある。10C9 は IgG の状態では、CTX3C-ABCDE に対する解離定数が $8.0 \times 10^{-10} \text{M}$ に対して、CTX3C-ABCD に対する解離定数は $1.8 \times 10^{-6} \text{M}$ であり、CTX3C-ABCDE と比較して CTX3C-ABCD の親和性は 1/2000 以下であることが報告されている。¹³⁾ Fab ではその親和性の差が 1/6 倍程度にまで縮まったことの 1 つには、CTX3C-ABCD 認識に伴う定常領域の運動性の増大、つまり $T\Delta S$ の損失が最小限に抑えられたことが挙げられるだろう。10C9 による抗原認識には抗原抗体間の非共有結合形成、脱水和、さらに分子運動性が結合親和力に大きく寄与する可能性がある。

3. 等温滴定型熱量測定

10C9 に結合し有利なエンタルピー変化を与える最小化合物はいかなる構造を持つのであろうか？抗原と似た構造を有するのだろうか？われわれは、この抗シガトキシン抗体 10C9 を標的タンパク質とし、低分子ライブラリーの中から発熱のエンタルピー変化を指標としてリガンド候補を選別することを試みた。前述の通り、10C9 は可変領域におよそ 400 \AA^2 の低分子を覆うことができる大きな抗原結合ポケットを有しており、また非共有結合形成によってエンタルピー駆動型の抗原結合を実現している。したがって、10C9 は抗原であるシガトキシンと類似した構造的特徴を持つ低分子化合物に対しては、抗原抗体反応に近い発熱反応を伴って結合する可能性が期待できる。

果たしてその新規リガンドとしていかなる化合物が選別され、また、実際の抗原とリガンド候補の間にはどのような構造相関がみられるのか？これら

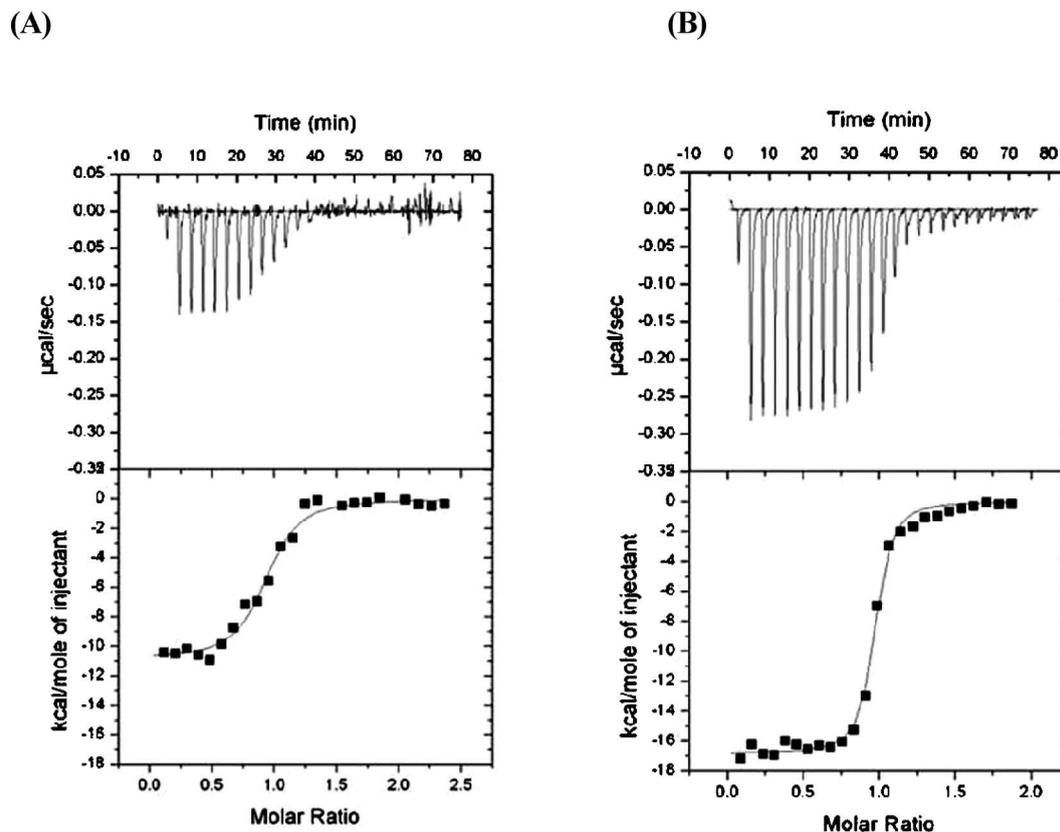


Fig. 4. Titration Calorimetry of the Interactions between 10C9 Fab and CTX3C-ABCD (A) and CTX3C-ABCDE (B)

Top, typical calorimetric titration of the antigen ($5 \mu\text{M}$) with $50 \mu\text{M}$ 10C9 Fab in PBS solution, at 25°C ; bottom, interaction plot of the data calculated from the raw data. The solid line corresponds to the best fit curve obtained by least-squares deconvolution.

の疑問を明らかにすることで、熱力学的パラメータを指標としたリード化合物の選別法の有効性を示すことができるのではないかと考え、われわれは以下の実験を行った。

まず、表面プラズモン共鳴法により同程度のシグナルが得られている低分子の中から任意に選んだ11種類に対し、等温滴定型熱量測定を用いて10C9 IgGとの結合評価を行った。30°C条件下、5% DMSO (dimethyl sulfoxide) 含有 PBS 溶液中において、 $10 \mu\text{M}$ の各種低分子に対し $50 \mu\text{M}$ 10C9 IgG を一定量ずつ滴下した。その結果、抗体の滴下に伴って発熱反応が確認できた化合物の構造を Fig. 5 に示す。これら3種の化合物については、いずれも抗体の滴下によって数 kcal/mol の発熱反応を確認することができた。得られた滴定プロファイルから最小二乗法を用いて結合定数を求めたところ、いずれも 10^5 M^{-1} 程度と低ながらも10C9 IgGとの明確な結合を確認することができた。化学量論比については抗体：低分子が0.2–0.3：1と算出され、

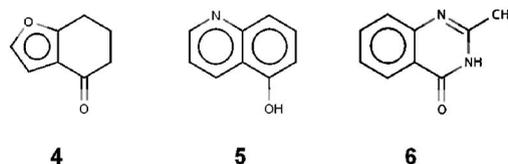


Fig. 5. Structures of the Compounds Bound to the Antigen-binding Pocket of 10C9 with a Few kcal/mol of Favorable Binding Enthalpy

10C9 IgG の1分子に対して低分子が複数結合していることが計算上で示唆されたが、これについては親和性及び測定濃度を考慮すると信頼性は低い。しかし、滴定によって明確な発熱反応が確認できたことから、10C9 IgG はこれらの低分子に対して非共有結合を形成し特異的に結合していると考えられる。この3種の化合物では、抗体滴定終了時においても平均して $0.02 \mu\text{cal/s}$ 程度の発熱が認められたが、これは滴下する抗体溶液とそれを受ける側の低分子溶液の調製に伴う DMSO のわずかな組成比の差や抗体自身の希釈熱が観察されたものと推察され

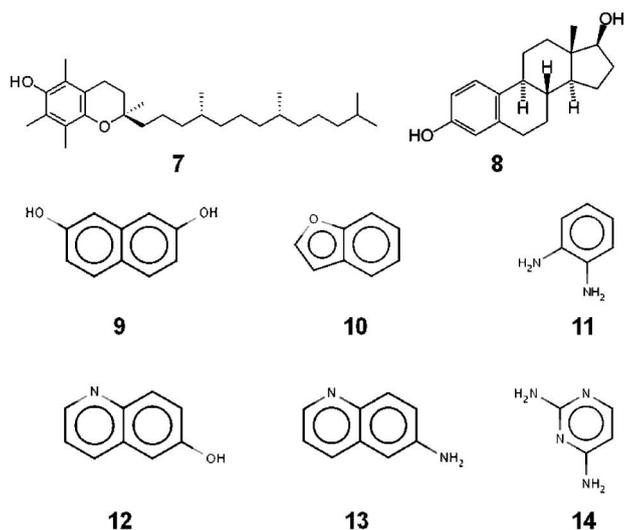


Fig. 6. Structures of the Compounds Which Showed No Enthalpy Change by Titration of 10C9

る。

一方、Fig. 6 には 10C9 IgG との間でエンタルピー変化が確認できなかった化合物の構造を示す。Figure 6 に示した化合物は、いずれも 10C9 IgG の滴定開始から滴定終了時まで一定の発熱が観察された。その発熱量は化合物によって異なり、 -5 kcal/mol 程度から -40 kcal/mol 程度のもまで確認できた。これは化合物と 10C9 IgG との相互作用による発熱を観測できているという可能性も否定できないが、上述の通り、滴下する側とされる側の試料溶媒中に含まれる DMSO の組成比の差を始めたとした種々の希釈熱が反映されている可能性が高い。

4. リガンドの構造的特徴

今回、10C9 IgG との発熱反応が確認できた 3 種の化合物について本来の抗原であるシガトキシンと化学構造を照らし合わせたところ、シガトキシンの部分構造である AB 環と類似した構造的特徴を見出すことができた。つまり、ここで選出できた 3 種の化合物はいずれも連続した環状分子であり、特定の位置に極性残基である水酸基あるいはカルボニル基を有していた。複素環のヘテロ原子の位置には一貫性がみられなかったものの、水酸基とカルボニル基の位置はいずれもシガトキシンの B 環と一致していた。したがって、熱力学的パラメータを指標とすることで実際の抗原とある程度の構造相関が認められる化合物を特定することができた。

また、10C9 IgG との結合が確認できた化合物と

明確な結合が確認できなかった化合物の構造について比較を行った。特に、化合物 4 と化合物 10 では芳香族性とカルボニル基の存在の有無に違いがみられ、また、化合物 5 と化合物 12 では水酸基の位置のみが異なっている。したがって、10C9 IgG はこのカルボニル基の有無、水酸基の位置を厳密に識別し、熱量変化として明確に区別している可能性が示唆された。このように、分子間の相互作用に伴うわずかな熱量変化の差異から特異的相互作用形成に必要なリガンドの構造的特徴を特定することができた。

5. おわりに

本稿では、近年特に注目されている熱力学的情報を基盤とした低分子創薬、リガンド設計について述べてきた。創薬におけるリード化合物の選択は、その後の薬剤開発を大きく左右する最重要段階といえる。われわれは、既知の抗原抗体反応系をモデルケースとして用い、相互作用形成による反応熱を指標とした低分子スクリーニングを展開することによって、その手法の有効性と今後の可能性について明確に示すことができた。タンパク質の構造情報と熱力学的解析を組み合わせることで多角的な方向から実際の相互作用を検証し、より合理的で迅速な薬剤開発が活発化してくるものと期待される。

謝辞 東北大学大学院理学研究科 平間正博教授、大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井郁雄教授を始めとする共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Velazquez-Campoy A., Freire E., *Nature Protocols*, **1**, 186–191 (2006).
- 2) Tóth G., Bowers S. G., Truong A. P., Probst G., *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 3476–3493 (2007).
- 3) Simeonov A., Matsushita M., Juban E. A., Thompson E. H., Hoffman T. Z., Beuscher A. E. 4th, Taylor M. J., Wirsching P., Rettig W., McCusker J. K., Stevens R. C., Millar D. P., Schultz P. G., Lerner R. A., Janda K. D., *Science*, **290**, 307–313 (2000).
- 4) Tsumoto K., Yokota A., Tanaka Y., Ui M., Tsumuraya T., Fujii I., Kumagai I., Nagumo Y., Oguri H., Inoue M., Hirama M., *J. Biol.*

- Chem.*, **283**, 12259–12266 (2008).
- 5) Rekharsky M. V., Mori T., Yang C., Ko Y. H., Selvapalam N., Kim H., Sobransingh D., Kaifer A. E., Liu S., Isaacs L., Chen W., Moghaddam S., Gilson M. K., Kim K., Inoue Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20737–20742 (2007).
 - 6) Velazquez-Campoy A., Todd M. J., Freire E., *Biochemistry*, **39**, 2201–2207 (2000).
 - 7) Velazquez-Campoy A., Kiso Y., Freire E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **390**, 169–175 (2001).
 - 8) Velazquez-Campoy A., Vega S., Freire E., *Biochemistry*, **41**, 8613–8619 (2002).
 - 9) Ohtaka H., Velázquez-Campoy A., Xie D., Freire E., *Protein Sci.*, **11**, 1908–1916 (2002).
 - 10) Ohtaka H, Schön A, Freire E., *Biochemistry*, **42**, 13659–13666 (2003).
 - 11) Freier E., *Drug Discovery Today*, **13**, 869–874 (2008).
 - 12) Ui M., Tanaka Y., Tsumuraya T., Fujii I., Inoue M., Hiramama M., Tsumoto K., *J. Biol. Chem.*, **283**, 19440–19447 (2008).
 - 13) Oguri H., Hiramama M., Tsumuraya T., Fujii I., Maruyama M., Uehara H., Nagumo Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7608–7612 (2003).