

## Fragment-Based Drug Discovery のための NMR スクリーニング

半沢 宏之,\* 滝沢 剛

### NMR Screening in the Fragment-based Drug Discovery

Hiroyuki HANZAWA\* and Takeshi TAKIZAWA

Exploratory Research Laboratories I, Daiichi Sankyo Co., Ltd.,  
1-2-58 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan

(Received September 1, 2009)

Nuclear magnetic resonance (NMR) is a versatile technique for the pharmaceutical industry. From organic chemistry to MRI, there are a number of applications of NMR. Among them, biomolecular NMR has been used for structure determination of biomolecules and analyzing the interaction between a target protein and its inhibitors. In the context of fragment-based drug discovery (FBDD), NMR has been known as a fragment screening technique, because NMR is good at detecting a weak binding compound in an accurate manner. Generally, the NMR technique for fragment screening is classified into two families: the ligand-based technique and the protein-based technique. The latter technique requires stable isotope labeled protein and also can be applied to a relatively small MW protein target. In the ligand-based technique such as saturation transfer difference (STD) and WaterLOGSY, only the NMR signals of the ligands are observed. The disadvantage of STD and WaterLOGSY is that the non-specific binding is also observed and a competition experiment is required in order to select the specific binding compound. Due to the difference in the consumption of the protein sample, the ligand-based technique has generally been used recently as a primary screening.

**Key words**—nuclear magnetic resonance; screening; fragment-based drug discovery

#### 1. はじめに

タンパク質の構造解析手法の中で NMR 法は溶液状態での解析が可能であることから、その構造と機能に関する情報取得手段として発展をしてきた。特に 3 次元構造決定手法、安定同位体を用いた 3 次元 NMR 法の確立により比較的分子量の小さいタンパク質の構造決定法として確立されている。一方創薬の分野では、構造決定の手段というより最近ではむしろタンパク質と低分子化合物の相互作用の検出、解析手法として役割を果たしてきており、特に FBDD (Fragment Based Drug Discovery) のスクリーニング手法として活用されてきている。

初期段階での創薬研究においては、製薬企業の保有する数十万もの化合物ライブラリーに対しハイスクリーン (HTS) 等を行い、標

的タンパク質への結合活性を有する化合物を見つけ出す。リード化合物と呼ばれる良好な活性を有する出発化合物を基にさらに合成化学者の最適化を経て初めて医薬品として開発されていくのであるが、最近、構造生物学の技術を活用し、HTS の代わりにリード化合物を創製する FBDD 技術が期待を集めている。<sup>1)</sup> FBDD は後にも述べるように複数の技術を統合的に活用する総合力の勝負であるが、その際には各技術毎の特徴をきちんと正確に把握していくことが極めて重要である。本稿ではそのような背景を踏まえ、NMR によるスクリーニング技術の長所・短所に関して紹介していきたい。

#### 2. FBDD と NMR

FBDD という用語・概念が広まったのは 2003 年以降であるが、分子量の小さな化合物を基に活性の強い医薬品を設計するというアイデアそのものは以前より知られていた。ルールオブファイブのような最終的な医薬品に要求される分子量などの条件を満たすためには、当然のように合成展開の出発時においても分子量の小さくて活性が適度にあるフラグメ

第一三共株式会社探索第一研究所 (〒140-8710 東京都品川区広町 1-2-58)

\*e-mail: hanzawa.hiroyuki.ta@daiichisankyo.co.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S29 で発表したものを中心に記述したものである。

ントから出発することのメリットは明らかであった。ただ、分子量が小さいフラグメントは活性も弱く、その弱い活性を高い信頼性で検出することが技術的に困難であり、現実的に実施できなかつたと言えよう。構造生物学の進歩により、NMR、X線結晶解析など構造決定の技術が進歩し、スループットが向上するに伴い、スクリーニング方法として用いられるようになったことがFBDDを技術的に可能にしたのである。その意味で1996年にAbbott社が発表したStructure-Activity Relationship (SAR) by NMR<sup>2)</sup>は画期的な手法で、当時はFBDDとは呼ばれなかったが、FBDDの先駆けと呼ぶに相応しい方法であった。その後、当時ハイスループットのX線結晶解析をビジネスモデルに登場したAstex社、Structural Genomics社等のベンチャー企業がそのX線技術によるスクリーニングによりFBDDを現実的なものにしていった。彼らは1000個程度のフラグメントをスクリーニングし、見出したフラグメントから比較的短時間で十分な活性を有する化合物を見出すことに成功し、一気に知名度が高まっていた。

現在では、FBDDは、HTSで用いるライブラリーの化合物よりも分子量の小さい化合物（これをフラグメントと呼ぶ）から出発して創薬を行う方法論として認識されている。<sup>1)</sup>そしてFBDDのメリットは主に2点ある。

- 1) 医薬品となる有機化合物の多様性は非常に大きいため、効率的なスクリーニングをするためにも、分子量が小さい方が有利である。<sup>3)</sup>HTSで100万化合物のスクリーニングをしても実は存在可能な化合物のごく一部しか探索できないのである。また余分な置換基のために立体障害を生じて結合能が落ちている場合もある。
- 2) ルールオブファイブ等の経験側に示されるように医薬品の分子量は小さめがよい。<sup>4)</sup>合成化学での最適化過程ではいろいろな官能基を付加して分子量が増大する傾向が強いのでリード化合物も分子量が小さい方が望ましい。

FBDDの実際の研究の流れをFig. 1に示すが、フラグメントから活性を向上させるにはフラグメントの構造活性相関の情報が初めから必要であり、そのためには標的タンパク質との複合体の構造解析が最も有効である。NMRで化合物スクリーニングす

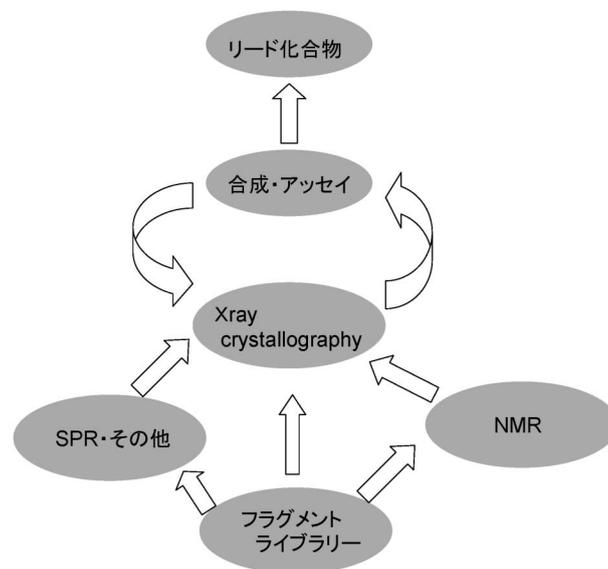


Fig. 1. Work-flow for Fragment-based Drug Discovery

る場合でも、現時点では見出したフラグメントのX線結晶解析を利用できることが望ましい。

FBDDにおいて見出したフラグメントからの展開も非常に重要であり、類縁化合物の探索・合成展開によってよいフラグメントを選出すると比較的速やかにリード化合物相当の活性まで向上させることができると言われている。その展開の方法はいくつか分類が可能であるが、大きく分けるとリンキングとグローイングに分けることができる (Fig. 2)。リンキングは当初Abbott社がSAR by NMRとして報告した手法で2個のフラグメントを見出してから最後に結合させるという手法である。理論的には結合エネルギーが2個のフラグメントからの和になると結合定数は積になることから飛躍的に結合能を獲得することができる。

当初、SAR by NMRが有名になったこともあって、FBDD=リンキングと思っている方もまだ多いのであるが、実際の創薬の現場だと2個の隣合うフラグメントを見出すことは非常に難しい。実際には1個のフラグメントから出発していろいろ工夫しながら展開してくグローイングが現在では多いのではないかと考えている。

本稿はFBDDに焦点を当てた解説であるが、創薬におけるNMR一般論についても少しコメントしておきたい。1990年代前半は<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N標識を施したタンパク質の3次元構造を各種3重共鳴の3次元NMRを用いて構造決定する方法論が開発・改良

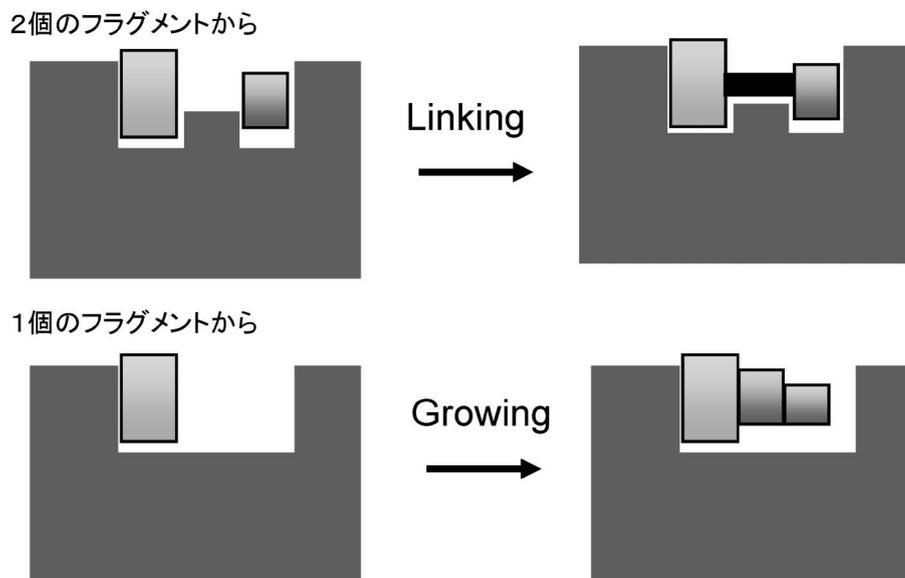


Fig. 2. Fragment Linking and Fragment Growing for Improving Affinity

Linking is ideal way to improve the affinity of the weak fragment, but the growing is more common because it is difficult to find two fragments which can be linked.

された時代であり、製薬企業においても、将来は創薬標的タンパク質と薬物化合物の複合体の構造決定をX線結晶解析の代わりに行うことができると考えられていた。しかし解析可能なタンパク質の分子量に限界があり、NMRによる構造解析が十分な進化をする以上に、X線結晶解析の進歩が大きく、2000年以降製薬企業での構造決定はほとんどX線結晶解析が占めるようになってきている。その中で多くの製薬企業では生体高分子のNMRは構造決定よりもスクリーニング・相互作用の検出系として使用される方が多くなっている。実際、今回紹介するFBDDだけでなく同じ技術を用い、HTS化合物、*in silico*スクリーニングでのヒット化合物等の評価をNMRで行うことの意義も大きいと考えている。

### 3. NMRによるフラグメントスクリーニング手法の紹介

NMRによるフラグメントスクリーニング手法は一般にタンパク質側を観測する手法とリガンド側を観測する手法に分けられる。以下ではそれぞれの手法の特徴を紹介するが、お互いのよいところを適宜利用することが実際のテーマでは重要である。

**3-1. タンパク質ベースによる手法** タンパク質のNMRシグナルを観測する手法の代表は $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを利用する方法である (Fig. 3).<sup>2)</sup> 大腸菌等の発現系を用いて安定同位体標識を施すと主鎖のアミドのすべての窒素原子に

NMR観測可能な $^{15}\text{N}$ が導入される。NMRの化学シフトは微細な構造変化・環境の変化を反映していることから化合物がタンパク質に結合することにより、その周辺由来のシグナルの化学シフト、すなわち観測される位置が変化することで結合の有無を判定することができる。Figure 3に典型的なスペクトルを示す。NMRシグナルがどのアミド由来のシグナルであるか帰属をしておく、結合の有無だけでなく標的タンパク質のどこに結合しているのかという構造情報をも取得できるのがメリットである。帰属は通常 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ の二重標識を施した標的タンパク質を調製し複数の3次元NMRを測定することで可能であるが、実際には多少時間と手間を必要とするのでシグナル帰属の必要性を考慮して決める。帰属があると目的とするポケットに入っているかどうかをも確認しながらスクリーニングできることになる。またFBDDで使用する結合の弱いフラグメントの場合は、いわゆる速い交換系を示して、化合物の添加に伴い少しずつ化学シフトの変化が観測されるのであるが、これより結合定数を解析することも可能である。いろいろメリットの多い手法ではあるが、当然のことながらデメリットも多数ある。まず $^{15}\text{N}$ 標識を施したタンパク質を、比較的多く必要とすることである。最もコストのよい方法は、大腸菌で発現できるタンパク質に最小培地等を利用し $^{15}\text{N}$ 標識した塩化アンモニウムを前駆体として用いる方法

## タンパク質ベース：通常は HSQC スペクトル

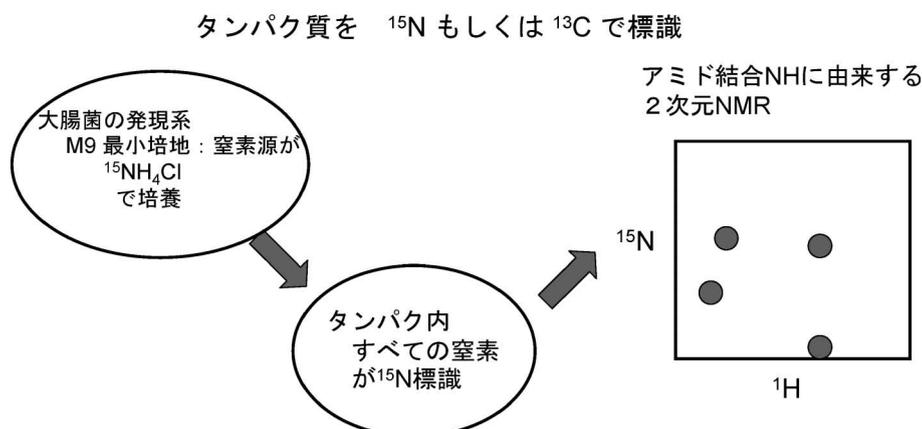


Fig. 3. Protein-based NMR Screening Methods

で、簡便に標識タンパク質を得ることができる。最近の NMR の感度の向上は著しいものがあり、100  $\mu\text{M}$  以下でも  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定できるようになってきたが、FBDD を目的とする場合、弱いフラグメントとの結合を検出するためには 100  $\mu\text{M}$  以上の濃度が必要になってしまう。さらに最大の課題は分子量の制限である。分子量が増大すると単に HSQC シグナルの数が大きくなって分離が難しくなってくるだけでなくシグナルが広幅化してスクリーニング目的には難しくなってくる。 $^{15}\text{N}$  の均一ラベルを用いる場合分子量 3 万程度までが実用上は使用可能であろう。より分子量の大きな標的の場合は  $^{15}\text{N}$  の選択的な標識、 $^{13}\text{C}$  特にメチル領域の標識等の工夫が必要になってくる。

通常のスクリーニングでは安定同位体標識を施したタンパク質のシグナルのみを観測しているため、複数の化合物共存下にてスクリーニングを実施することにより、容易にスループットを向上させることが可能である。ただし、ヒットした後に、複数の化合物から個別に測定しないと実際にどの化合物が結合したのかを同定することはできない。何化合物を同時にスクリーニングするのが最も効率がよいかは、スクリーニングのヒット率にも依存するので一概には言えないが、100 化合物を同時にスクリーニングしたという報告もある。<sup>5)</sup>

**3-2. リガンドベースによる手法** リガンドベースの手法は基本的に安定同位体標識されていないタンパク質試料でも可能である。標的タンパク質とモル比で数倍から数十倍の化合物を共存した状態で化

合物側の NMR シグナルを観測することで結合の有無を判定する手法である (Fig. 4)。測定には Saturation Transfer Difference (STD),<sup>6)</sup> WaterLOGSY,<sup>7)</sup>  $T_2$  法,  $T_{1\rho}$  法,  $T_1$  法等いろいろあるが共通する部分がある。<sup>8)</sup>

タンパク質にモル比で過剰の化合物を加えて実験をするのであるが、基本的に過剰部分、つまりタンパク質に結合していない化合物のシグナルを観測することから、タンパク質のシグナルの帰属、複合体としての化合物側のシグナルの帰属は必要がない。過剰の、つまり厳密には結合していない化合物に由来する NMR シグナルで結合の有無が観測できるため、実際には交換反応で化合物がタンパク質について離れたりしていることが必要である。そのため、交換速度が測定に大きな影響を与える。結合が非常に強くてほとんど離れない化合物はリガンドベースの各手法ではシグナルが弱いか観測できないこともあるので、一般的には注意が必要である。

## ① Saturation Transfer Difference

NMR では特定の周波数のラジオ波を照射し、その共鳴周波数を有するスピンを飽和させることができるが、分子量の大きいタンパク質分子では距離的に近い 2 個のプロトンとプロトンの間で双極子-双極子相互作用によりエネルギーが伝わり、飽和が伝播する。分かり易く言うと、タンパク質分子の一部を照射して温めると熱がタンパク分子全体に広まって分子全体が熱くなっていく。そして熱くなった部分は NMR シグナルが飽和してシグナル強度の減少として観測されるのであるが、ラジオ波照射の有無

## Saturation transfer Difference (STD)

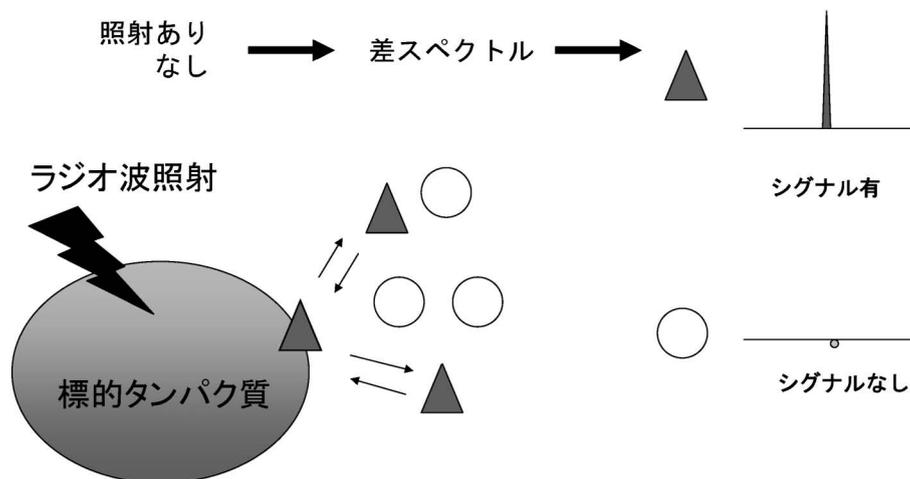


Fig. 4. Saturation Transfer Difference (STD) Methods as an Example of Ligand-based NMR Screening Method

Selective radiofrequency radiation is applied to the target protein and saturation is transferred from the protein to the small molecule which binds to the target protein.

で差スペクトルを取ると、熱が伝わった部分だけが今度はシグナルが観測されるという訳である。化合物スクリーニングに使用する場合は、タンパクに化合物を混ぜて、同様にタンパクの一部を照射するのであるが、結合した化合物にも熱が伝わっていき、化合物は結合、解離を繰り返しているの、非結合状態の化合物に相当する NMR シグナルにも熱が伝わっているようにみえることになる。標的タンパク質と全く結合しない化合物には熱が伝わってこない。化合物を複数共存下で STD スペクトルを測定すると結合した化合物のみシグナルが観測できる。

### ② 緩和時間測定 ( $T_2$ 法, $T_{1\rho}$ 法, $T_1$ 法)

NMR シグナルの緩和時間は分子量の増大に伴って短くなるので、低分子化合物のシグナルの緩和時間の変化をモニターすることで結合の有無を判定できる。みかけの横緩和時間  $T_2$  は線幅にも反映するので、理想的な場合には普通にプロトンの 1 次元 NMR を測定しただけで化合物由来のシグナルの線幅が増大していて、結合を検出することも可能である。ただし、見た目の線幅が大きく変わらない場合に  $T_2$  測定の CPMG やスピンロックによる  $T_{1\rho}$  法のスペクトルを測定することでシグナル強度の違いが観測される。原理的には縦緩和時間  $T_1$  でも同様の実験ができるので、具体例を後に示す。

### ③ WaterLOGSY

スピンの双極子-双極子相互作用によって観測される Nuclear Overhauser Effect (NOE) が分子量に依存することはよく知られており、プロトンとプロトン間の NOE シグナルが低分子量領域では正の NOE (対角ピークと反対の向き) を示すがタンパク質に結合した高分子量領域では負の NOE (対角ピークと同じ向き) を示すことから、タンパク質と化合物共存下で NOE を測定した場合、低分子化合物のプロトン同士の間での分子内の NOE シグナルの符号もタンパク質に結合すると反転することで結合の有無を判定できる。通常 2 次元の NOE を測定するが、スループットの観点からは 1 次元 NMR で同様の実験ができることが望ましい。WaterLOGSY 法は 1 次元 NMR で水分子と低分子化合物間の NOE を観測する手法である。

タンパク質に結合する化合物は負の NOE シグナルを、結合しない化合物は正の NOE を生じる。原理にはやや未解明ですっきりしない部分も残されているが、タンパク質周辺に存在する水分子が分子の運動性という観点からはタンパク質と同じような挙動を示しており、そのタンパク質に結合した水と低分子化合物との NOE も負の NOE を示すと解釈されている。経験的には弱い化合物を検出する能力の高い手法との感触がある。また STD だとプロトンが近距离に多くないと飽和が効率よく伝わっていかないので、プロトンの密度の低い核酸は STD より

も WaterLOGSY が向いていると考えられている。

これらの手法に共通するデメリットは、単に標的タンパク質と化合物を共存下で測定すると、いわゆる非特異的な結合を多く検出してしまうことになる。多くの有機化合物は溶液中でなんらかの弱い相互作用を非特異的にして、リガンドベースの NMR 法はそれをも検出してしまうのである。したがってリガンドベース法ではもうひと工夫が必要になる。それは、目的ポケットに入る事が明らかになっている化合物との競合実験を実施することである (Fig. 5)。Figure 6 に典型的な STD による競合実験のスペクトルを示す。化合物が標的タンパク質共存下で観測された STD シグナルが、ポケットに入ることが既知の化合物の濃度依存的な添加により減少していくことが観測できる。

創薬プログラムの場合、既にいくつか阻害剤・アゴニスト等が既知の場合も多くあり、また酵素の場合は基質や反応生成物、及びその構造類縁体の中で競合実験に使用可能な試料を見い出すことができる。もちろん全く新規の創薬標的の場合は、競合実験に使用できる既知化合物がよいものがない場合もあり、その場合には仕方がないので、見つけてきたフラグメントやその誘導体同士で競合実験を行うこともある。とにかく競合実験を必要とすることだけはリガンドベース法の共通の特徴である。リガンドベースのよい点はタンパク質濃度を比較的抑えても検出が可能である点であろう。通常数  $\mu\text{M}$  から数十

$\mu\text{M}$  のタンパク質濃度で、測定が可能である。

あと、リガンドベース法のデメリットとして結合が強く  $K_{\text{off}}$  の遅い化合物の検出が難しいことが指摘されている。実際、創薬の現場でも結合の強いリガンドでは STD が十分観測できないこともあり、競合実験に用いる強い化合物が NMR で結合が観測できない場合も生じる。ただし、そのことを承知しておけば、FBDD の場面で結合の弱い化合物を対象とする場合にはほとんど問題にならないと考えている。

#### 4. スクリーニングの実際

今回、当社で以前行った NMR スクリーニングに関して簡単に紹介したい。核内受容体のアゴニスト探索プロジェクトで  $T_1$  法を使用した例である (Fig. 7)。スクリーニングにはすべて競合実験を行うことにした。競合実験を行う場合、①フラグメントを強い既知化合物で追い出す場合、②非常に弱い参照化合物をフラグメントで追い出す場合の 2 通りが考えられる。この例では純粋な FBDD とは少々趣旨が異なるが、実は比較的分子量の大きい化合物を 1 万程度のスクリーニングを行うことを計画し、②の手法の適用を試みた。よい参照化合物を検索するため 500 化合物からなるフラグメントライブラリーを WaterLOGSY で探索し、既知アゴニストで追い出される参照化合物を見出した。参照化合物を探索するのは少し遠回りではあるが、いったん参照化合物を見出すとその後の探索は比較的スムーズになる。というのは次のスクリーニングでは参照

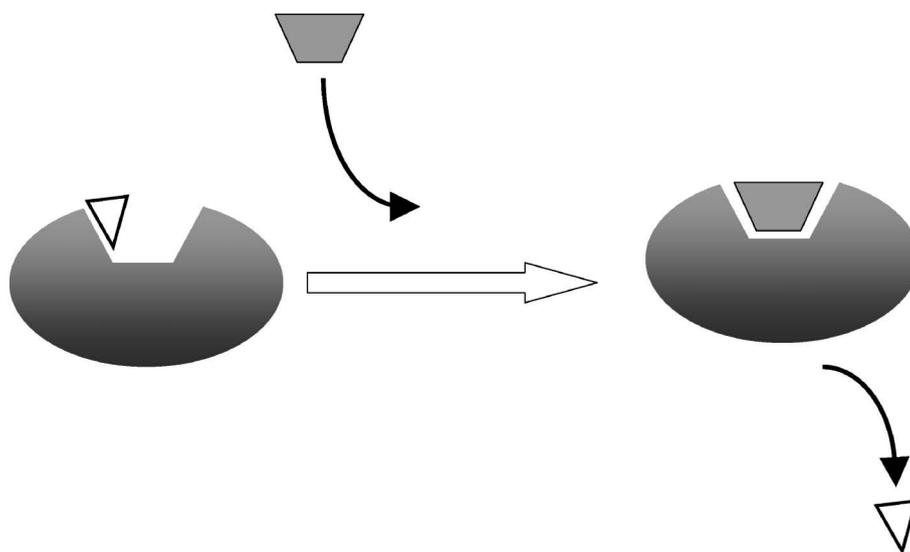


Fig. 5. Idea of Competition Experiments

In the ligand-based screening methods, the competition experiment with a known compound is essential for nonspecific binding.

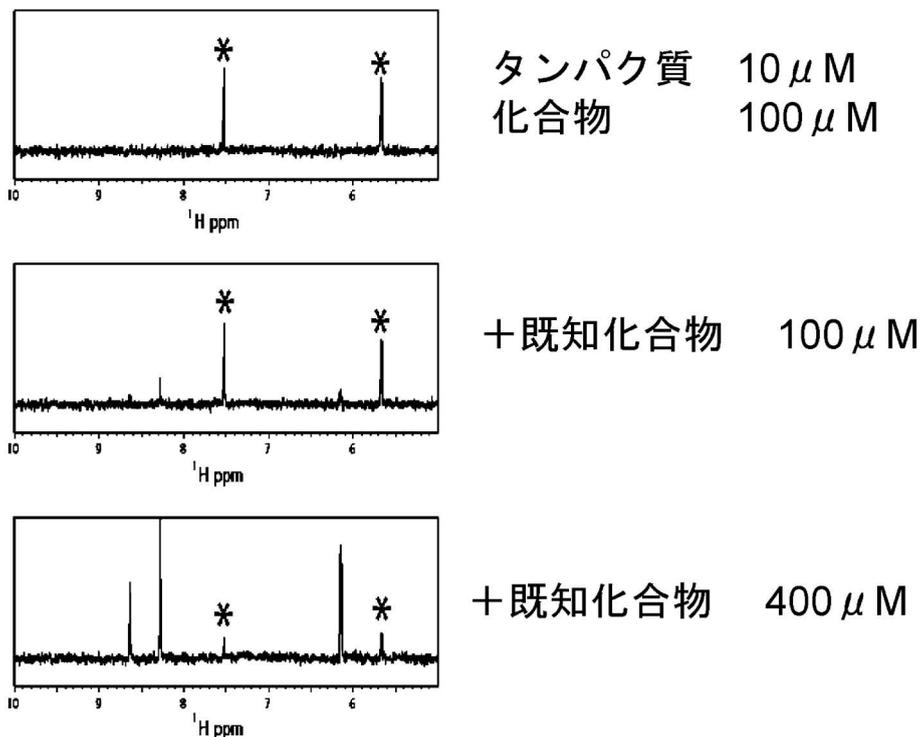


Fig. 6. Example of Competition Experiments Using STD Spectra

The STD signals with an asterisk (\*) are attenuated by adding the reference compound which is known to bind to the target protein.

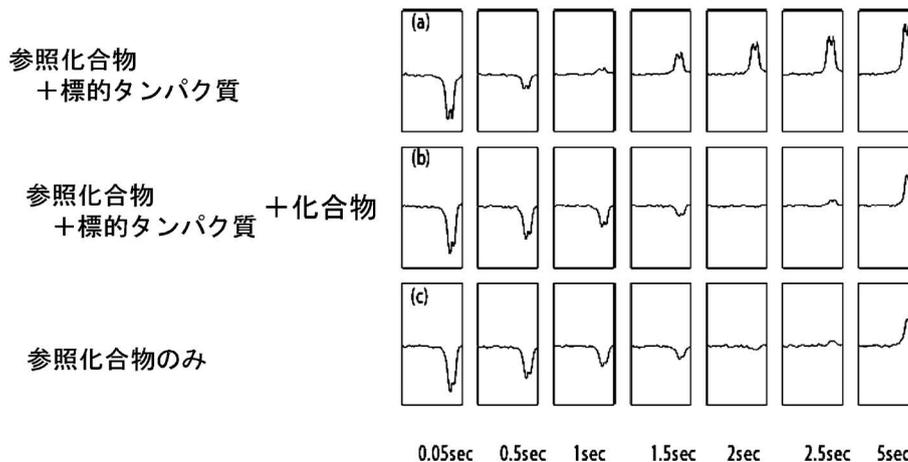


Fig. 7. Example of Competition Experiments Using  $T_1$  Method

The  $T_1$  of the reference compound molecule is shortened at the presence of the target protein (a). Addition of the known agonist recovers longer  $T_1$  (b). The measurement and analysis can easily be done by focusing on the null point. The  $T_1$  measurement of reference compound without the target protein is shown in (c).

化合物のシグナルのみを解析すればよいことから、データの解析の手間が大幅に簡便になる。また、リガンドベース法の NMR スクリーニングでは、10 化合物を混合するとシグナルの縮重は激しくなり、解析の手間は大きい。しかし、②の方法では、化合物同士のシグナルの縮重は問題にならず、多検体を同時に測定できることが大きなメリットである。今

回のように参照化合物のみを観測する場合、参照化合物の濃度を検体より高くしておくことで、容易に競合の有無を判定できることがメリットである。NMR でのスクリーニングの場合、要する時間も気になるところである。NMR の測定時間は化合物濃度に大きく依存するが、FBDD を行う場合、化合物濃度を最低でも 100–300  $\mu$ M に上げることができ

るので、10–30分程度あれば十分な場合が多い。1000化合物程度のスクリーニングであれば2–3週間の期間で、mixtureでの測定とdeconvolutionの両方を処理できる。

### 5. 今後の見通し

本稿ではNMRの手法に話題を限定したが、FBDDは様々な技術の組み合わせ・統合がとても重要な創薬手法であり、NMR単独でのFBDDというのは現実の場では考えられないということは強調しておきたい。Figure 8に示したようにNMR以外にもX線結晶解析、Surface Plasmon Resonance (SPR)等いくつかのフラグメント手法にはそれぞれ短所・長所を生かして個別の創薬プロジェクト毎に適用していくことが大事である。NMRの装置は高価なので、新規に購入するには少し投資を必要とするが、測定法のほとんどは2000年代前半には出揃っており、現在の分光機であればスクリーニングに必要なパルスシーケンスも標準に装備されており、初心者でも測定できるものと考えている。NMRは残念ながらタンパク質の消費量は最も多い手法なので、タンパク質の大量調製が難しい場合には適用が困難である。一方、タンパク質調製が比較的容易な場合、競合実験は個々の化合物のシグナルが区別可能なNMRが最もやり易く、正確なデータを得ることができるので、ぜひ適用を考えるとよいと思う。

FBDDでは相変わらず海外のベンチャーからも興味深い報告もある。例えばZoBioというオランダの企業はNMRの試料管内で標的タンパク質を固定化する技術を開発している。SPR解析装置であるピアコアと同様に一度固定化した試料に低分子化合物試料を繰り返し流すことで、使用する標的タンパク質の量を大幅に減らすことが可能という。

FBDDで良好なリード化合物を創製するためには検出したフラグメントと標的タンパク質の複合体の構造情報を得ることが非常に重要である。フラグメントは活性が弱いので当初から効率的な合成展開が求められている。X線結晶解析では、フラグメントを見つけるのと標的タンパク質との相互作用情報を得ることが同時であるが、NMRやその他のフラグメント探索手法ではそのままでは構造情報が得られない。現時点において、X線結晶解析以外のいずれかのスクリーニングによって得たフラグメントに関してはX線結晶解析を行って複合体の情報を得ることが標準的な手段になっている。フラグメントは小さく、結合が弱いことから、合成展開の開始時にどの部分に置換基を伸ばすべきかが明確であることが重要である。また、フラグメントスクリーニングで複数のヒット化合物が得られた場合、ヒットの選出基準としても複合体の情報が大事である。

生体高分子のNMRは1980–90年代、タンパク質の構造決定手法として発展してきた。したがってNMRでフラグメントと標的タンパク質との複合体の構造を決定することも原理的には可能である。通常のタンパク質構造決定と同様に複合体構造を多数のNOE情報を収集して構造決定することは現在のところ時間と手間を要するため、なかなか創薬の現場で使用することは難しい。一方、NMRの得意分野である“見たいところだけ見る”手法もいくつか報告されている。SOS-NMR<sup>9)</sup>ではタンパク質側の選択的な安定同位体標識を行い、選択的なSTDを観測し、結合した化合物の構造が決定できる。またINPHARMA<sup>10)</sup>という分子間のNOEを観測する手法も今後の発展が期待される。現時点ではこれらはまだ“手軽”ではないので、創薬の現場に適用することは少々困難ではあるが、このようなNMRでF

NMR タンパク質ベース	<ul style="list-style-type: none"> <li>・特異的な結合のみ検出</li> <li>・帰属があると結合部位もわかる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・安定同位体標識が必要</li> <li>・分子量が3万以上は困難</li> </ul>
NMR リガンドベース	<ul style="list-style-type: none"> <li>・蛋白消費量は中程度</li> <li>・競合実験が容易</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・競合実験でないと非特異的な結合も検出</li> <li>・<math>K_{off}</math>に制限がある</li> </ul>
X線結晶解析	<ul style="list-style-type: none"> <li>・構造情報も同時に得られる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・通常ソーキング法が必要</li> </ul>
SPR	<ul style="list-style-type: none"> <li>・必要なタンパク質量が少ない</li> <li>・速度定数も得られる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・固定化の必要。</li> <li>・化合物の混合は不向き</li> </ul>

Fig. 8. Comparison of the Fragment Screening Methods

ラグメントの構造情報を得る方法論が発展すれば、現在だと X 線結晶解析可能な標的タンパク質のみに適用されている FBDD の適用範囲が広がっていくことが期待される。

## 6. おわりに

SAR by NMR 等に代表される FBDD 初期の研究が NMR で行われたことから NMR を利用したフラグメントスクリーニングは多くの企業で行われている。ただし、FBDD は決して NMR 単独で行う技術ではなく、X 線結晶解析等の他の手法との“統合”が特に重要である。創薬標的であるタンパク質は、試料調製の難易度、安定性、溶解性等、それぞれ性質が異なるので、各種の手法を適宜組み合わせ活用することが肝心である。

FBDD は NMR、X 線結晶解析などの構造生物学の技術が切り開いてきた創薬技術である。しかし今後は、弱い結合を検出できる他のスクリーニング手法の進歩とともに、更なる広がりをもつ技術に成熟していくであろう。実際、高濃度の生物アッセイでも FBDD を試みる企業も報告されてきている。<sup>11)</sup> FBDD が更なる発展を遂げる中、その中で NMR も活用され、新薬の開発に貢献していけることを期待したい。

## REFERENCES

1) Rees D. C., Congreve M., Murray C. W., Carr R., *Nat. Rev. Drug. Disc.*, **3**, 660–672 (2004).

2) Hajduk P. J., Meadows R. P., Fesik S. W., *Science*, **278**, 497–499 (1997).

3) Lipinski C., Hopkins A., *Nature*, **432**, 855–861 (2004).

4) Lipinski C., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **44**, 235–249 (2000).

5) Hajduk P. J., Gerfin T., Boehlen J. M., Haberli M., Marek D., Fesik S. W., *J. Med. Chem.*, **42**, 2315–2317 (1999).

6) Meinecke R., Meyer B., *J. Med. Chem.*, **44**, 3059–3065 (2001).

7) Dalvit C., Perarello P., Tato M., Veronesi M., Vulpetti A., Sundstorm M., *J. Biomol. NMR*, **18**, 65–68 (2000).

8) Ohsawa M., Ikura M., *Tanpakushit-sukakusankouso*, **47**, 948–954 (2002).

9) Hajduk P. J., Mack J. C., Olejniczak E. T., Park C., Dandliker P. J., Beutel B. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2390–2398 (2004).

10) Sanches-Pedregal V. M., Reese M., Meiler J., Blommers M. J., Griesinger C., Carlomango T., *Agnew Chem. Int. Ed. Eng.*, **44**, 4172–4175 (2005).

11) Albert J. S., Blomberg N., Breeze A. L., Brown A. J. H., Burrows J. N., Edwards P. D., Folmer R. H. A., Geschwindner S., Griffen Ed. J., Kenny P. W., Nowak T., Olsson L.-L., Sanganee H., Shapiro A. B., *Curr. Top. Med. Chem.*, **7**, 1600–1629 (2007).