

X線による Fragment-Based Screening

山野 昭人

Fragment-based Screening by X-ray Structure Analysis

Akihito YAMANO

PharmAxess, Inc., 3-9-12 Matsubara, Akishima, Tokyo 196-8666, Japan

(Received September 1, 2009)

The first step of FBDD is fragment-based screening (FBS). There are various analytical methods used to perform FBS: NMR, X-rays, SPR, *etc.* The advantage of X-ray structure analysis in FBS is that it can cope with relatively large structural changes upon the binding of a fragment and unexpected events such as multiple binding. The first thing needed to perform FBS by X-rays is a fragment library. The library currently employed at our laboratory was designed especially for X-ray structure analysis and consists of 384 compounds. This library was built based on Ro3 and special attention was given to eliminating ambiguity when interpreting electron density. FBS by X-rays requires more than 100 times more data collection and structure analysis. Recent development of critical technologies dramatically reduced the time required for X-ray structure analysis. Additionally, development of software and the incorporation of an industrial robot to a laboratory system has enabled us to construct a fully automated structure analysis system. However, there still are some limitations to X-ray structure analysis. It demands hundreds of high quality crystals and those crystals must not only survive soaking of compounds dissolved in DMSO but also be resistant to X-ray damage. In this article, a practical example of FBS by X-rays will be presented using HSP90 along with facts on the limitations of X-rays.

Key words—X-ray structure analysis; fragment-based screening; fragment library

1. はじめに

Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) の第一段階は、フラグメント化合物を検索する段階、Fragment-Based Screening (FBS) である。FBS を実行する分析手法として最初に用いられたのは NMR である。¹⁾ 程なくして X 線構造解析も導入され、²⁾ 特に Astex の研究者たちが精力的に発展させた結果、³⁻⁵⁾ NMR に比肩する手法となっている。⁶⁾

本稿では ATP/ADP 結合部位を含む、Heat shock protein 90 (HSP90) の N 末端ドメイン (質量 23 kDa) をターゲットとした FBS の実際について記述する。HSP90 は質量 90 kDa の分子シャペロンの一つであり、タンパク質の折りたたみを介助するタンパク質である。その名の通り、細胞に熱などのストレスがかかった際に発現量が増大するが、シグナ

ル伝達に係わる数多くのキナーゼや転写因子の立体構造の安定化に寄与することにより、細胞の増殖や分化などに関与している。^{7,8)} HSP90 を阻害するとがん細胞の増殖が抑制されるため、抗がん剤のターゲットとされており、現在でも盛んに阻害剤の開発が行われている。^{9,10)}

2. FBS における X 線構造解析の特徴

X 線構造解析と一口に言っても、その内容は広範である。膜タンパク質や巨大な複合体の構造決定は、現代の最新の設備や技術をもってしても著しく困難である。しかしながら FBS に要求される X 線構造解析はこの対極にある。構造既知のタンパク質にフラグメント化合物が付着した構造は、全体としてはほとんど変化していないと見ることができる。このような場合、X 線構造解析は著しく平易である。データ測定の成功すなわち構造解析の成功であり、結晶学的な知識はほとんど要求されない。

FBS における X 線構造解析の最大の特徴は、結合したフラグメント化合物の精密な結合様式を捉えることができる点にある。結合している方向や相互

ファルマ・アクセス株式会社 (〒196-8666 東京都昭島市松原町 3-9-12)

e-mail: yamano@pharmaxess.com

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。

作用をしているタンパク質の、主鎖や側鎖の原子を具体的に特定することができる。さらに活性部位全体のどの辺に結合しており、残っている空間はどちらの方向にどのくらいの容量なのかをも知ることができる。構造最適化の具体的な方針を得られるのである。複数のヒットが得られた場合には、フラグメント化合物同士の位置関係から連結すべきフラグメントの選択や、必要な修飾の指針を得ることができる。¹⁰⁾ また、活性部位を実際に「見て」フラグメント化合物の結合の有無を判断するため、非特異的結合は自ずと排除される。

その他特記すべき点は、予想外の状況への対応力である。化合物の結合によって、ループから α -ヘリックスへの変化など、主鎖を含む比較的大きな構造変化が起こる場合もある (Fig. 1)。また、化合物のカクテルを用いた場合には、複数の異なる化合物が同時に結合したり、同一化合物が複数結合する場合もある。X線構造解析は結晶性が保たれる範囲において、これらすべての状況に対応することができる。

3. なにが必要か

X線によるFBSの実行にまず必要となるのは結晶である。必要であればタンパク質を改変するなどして、良質な結晶を大量に供給できる環境を整える必要がある。逆に結晶さえあれば、化合物のソーキング、データ測定、構造解析の順に進めればよく、比較的短時間かつ着実に結果を取得することができる。

次に必要となるのは、化合物ライブラリーである。今回使用したライブラリーは、特定のタンパク

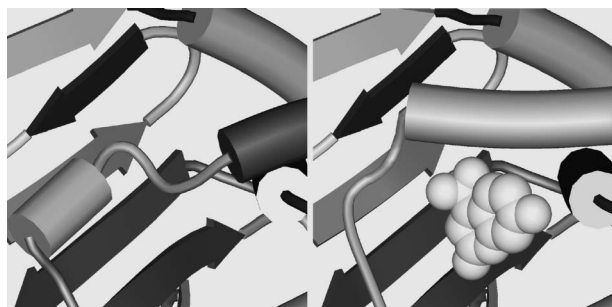


Fig. 1. An Example of a Protein Structural Change upon Binding of a Fragment Compound

The loop structure goes through a large structural change and turns into a part of the α -helix in the presence of a compound (right). X-ray structure analysis can adapt such an unexpected change as far as the crystallinity is maintained.

質を念頭に置かない汎用ライブラリーで、‘Rule of three’¹⁰⁾を満たす384化合物からなる。X線構造解析に用いるライブラリーとして重要なのは、混合物(カクテル)において異なる形状を持つ化合物が組み合わされているという点である。X線構造解析の結果得られるのは電子密度であり、カクテル中どの化合物がヒットしているのかは、形状が最大の手がかりとなるためである。化合物数が少ないということも重要である。維持費用が抑えられるほか、比較的容易にライブラリーを構築できることにもなる。巨大なライブラリーを持たなくとも実行できるのがFBSの長所となっている。

FBSを実用に耐えるスピードで実行するには、ハイスループットX線構造解析システムが利用できる。ハイスループット化に必要なのは、強力なX線源と高速検出器、試料交換の無人化である。特に昨今のX線発生に係わる要素技術の進歩は目覚ましい。製膜技術の発達により、単色化と同時に結晶位置付近にX線を集光できる、人工多層膜光学系が利用できるようになった。検出器の高感度化と相まって、データ測定に必要な時間は大幅に短縮され、条件さえ整えば1時間足らずで完了する。今回使用した測定システムをFig. 2に示す。このシステムでは、人間が介入することなく、最大60個のデータを測定することができる。¹¹⁻¹³⁾ 構造解析



Fig. 2. An Example of a High Throughput X-ray Structure Analysis System

The maximum of 60 samples can be measured automatically without any human intervention. The combination of a multi-layer optics, an ultra brilliant X-ray generator, a sample changer and a CCD detector with high sensitivity dramatically reduced time required for data collection for protein structure analysis. The system includes automated structure analysis software that enables us to acquire electron density from intensity data with one step. An HSP90 structure required only 3 min to be analyzed.

も自動化されている。タンパク質構造観察及び分子モデル修正用ソフトウェア MIFit¹⁴⁾ は、タンパク質構造解析ソフトウェア CCP4 (The Collaborative Computational Project Number 4 in Protein Crystallography: <http://www.ccp4.ac.uk/> 2009 年 10 月 28 日確認) のスクリプトを備えており、強度データを登録するだけで、分子置換法による位相決定・精密化・溶媒の割り当てを自動的に行い、1 ステップで電子密度まで計算してくれる。

4. FBS の実際

X 線による FBS はフラグメント化合物のソーキングから始まる。ソーキングの第 1 ステップでは、結晶化ドロップから結晶をループですくい、化合物を含む溶液に結晶を移す。目的のソーキング時間が経過した後、抗凍結剤の入った溶液に浸し、結晶を凍結して回折データの測定に供する (Fig. 3)。ソーキングのパラメータとしては、化合物の濃度と時間がある。分子量 150 程度の化合物は短時間で浸透し、結合することが知られている。したがってソーキング時間は 15 分程度で十分と考えられる。逆に 15 分のソーキングで結合しない化合物はその時点で棄却しても差し支えないのではないだろうか。ソーキングの条件を検索すればヒット率は上げられ

ようが、作業量が急激に増え実用性が下がる可能性がある。またヒット数が多ければ多いほどよいというものでもなく、多すぎると逆にどれを棄却すべきかの判断が困難となる。

Table 1 に実行結果をまとめる。第 1 サイクルでは、4 化合物のカクテル 96 条件についてソーキングから構造解析までを行った。1 順目で失敗した条件は 2 順目、2 順目で失敗した条件はさらに 3 順目の測定を行い全 96 条件の構造解析を完了した。第 2 サイクルでは第 1 サイクルでヒットのあったカクテルを単品に分解してソーキングから構造解析まで

Table 1. Summary of FBS Experiment Using HSP as a Target Protein

項目	結果
検索化合物数	384
凍結した結晶の数	234
測定成功数	163
測定成功率	70%
測定時間	約 120 時間
構造解析にかかった時間	約 30 時間
FBS の実行時間	延べ 150 時間 (10 日間) 程度
ヒット数	10
ヒット率	2.6%

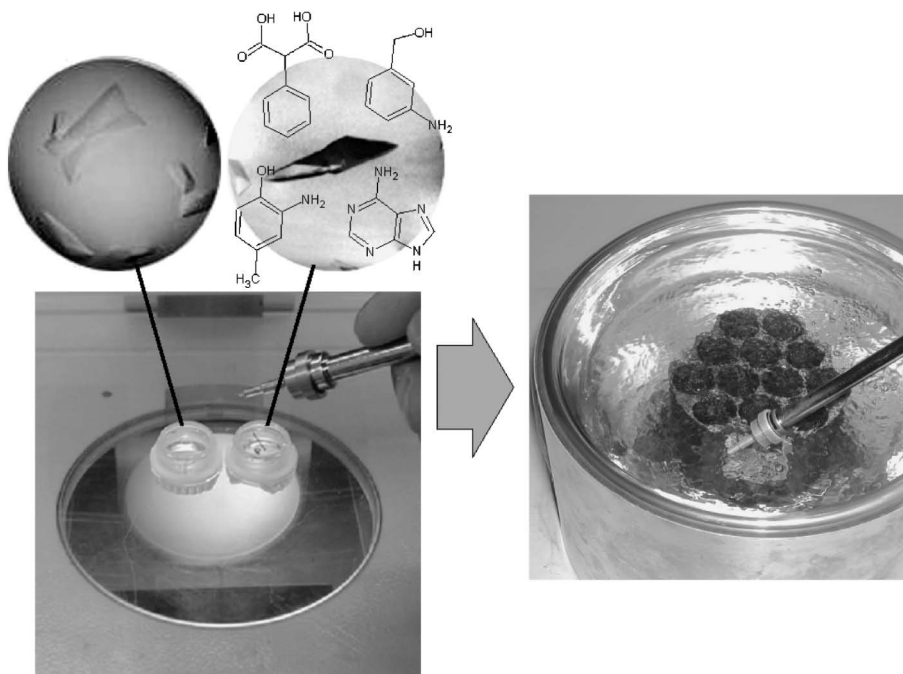


Fig. 3. Procedure from Crystal Soaking to Freezing

A crystal is scooped with a loop and soaked to solution containing fragment compounds. After an intended soaking period, the crystal is scooped again to be flash-frozen. The crystal is then transferred to the high throughput structure analysis system and subjected to data collection and successive structure analysis.

を行った。第2サイクルで単品に分解するのは、ヒット化合物にカクテルの残りの化合物が隠れている可能性があるためである。第1・第2サイクルを通じて、全234個の結晶についてソーキングを行い、163個のデータ測定に成功し構造解析を完了した。30%程度が失敗したことになるが、失敗の主な原因は、結晶サイズや結晶性の不足、ソーキングによる結晶の劣化、及び結晶を凍結する段階での失敗である。FBSの実行時間はデータ測定にかかった、およその時間を示している。X線によるFBSにかかる時間は、主にデータ測定のスピードに依存する。スケジュールを工夫すれば、ソーキングや構造解析はデータ測定と並行して進められるためである。

スクリーニングの結果10化合物のヒットがあった。ヒット率は2.6%である。Figure 4にヒットの例を示す。2種類の化合物が構造変化によりできたポケットに結合し、残り8個の化合物は既存のサイトに結合している。

Figure 5は2つの異なるポケットに結合している化合物のうち、代表的な2つの化合物を描いたものである。両者は化学的にはこのままではマージに適さないが、最近接原子間の結合距離は1.35 Åであり、幾何学的に大きなストレスを与えずにマージできる可能性を示している。

5. X線の適用範囲と問題点

これまでX線によるFBSの特徴を述べてきたが、他の分析手法と同様、適応限界やX線構造解

析特有の問題点もある。

第一に挙げられるのは、結晶の問題である。X線によるFBSを実行するにあたってもっとも重要な条件は、ターゲットとするタンパク質の結晶の量と質が確保できるか否かである。量はすなわち結晶の数である。X線回折データの測定はタンパク質結晶を凍結し、通常100 K前後で行う。X線によるダメージを含め、ノイズの低減につながるためであ

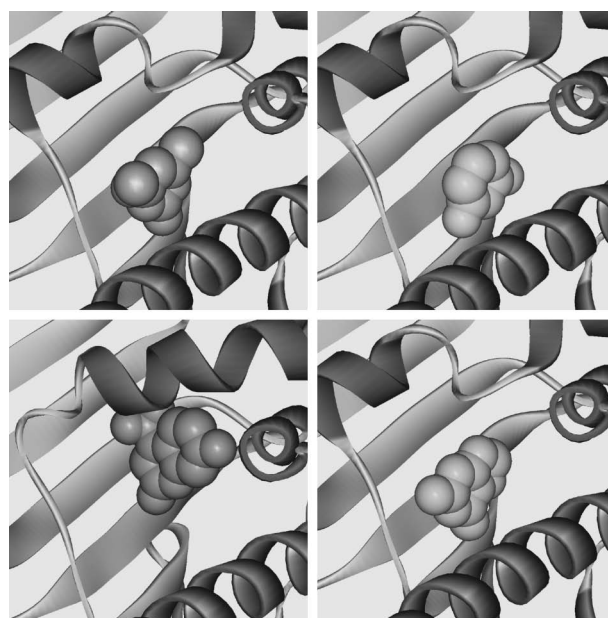


Fig. 4. An Example of a Compound in the ATP/ADP Binding Site Located in the N-terminal Domain of HSP90

The lower left compound binds to the pocket newly formed upon binding of the fragment.

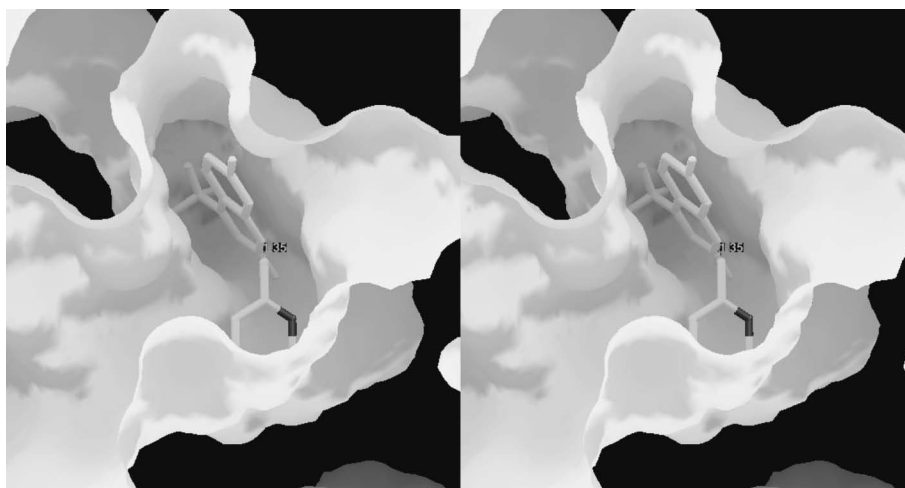


Fig. 5. A Cross-eye Stereo Representation of Compounds Located Close to Each Other

The upper fragment is binding to the pocket formed by the structural change of the protein part and the lower fragment is binding to the existing pocket. The shortest distance between those two fragments is 1.35 Å thus showing a possibility of fragment merging.

る。この結晶凍結段階での失敗や、ソーキング段階での不具合などを考慮すると、スクリーニングを行う条件数の1.2倍程度の結晶が必要となる。400化合物を4化合物のカクテルで実行する場合には100条件となり、したがって結晶も120個程度必要となる。質には結晶の大きさ、結晶性、活性部位の状態、その他がある。結晶の大きさであるが、実用的な時間内でFBSを実行するには、1結晶あたりのデータ測定時間が2時間程度である必要がある。X線源の強さや検出器の感度は変更不可であるため、データ測定時間は結晶の体積に反比例する。結晶性の良否は主に分解能に係わってくる。

FBSに用いる結晶は、活性部位に抗凍結剤や沈殿剤などが結合していない、いわゆるアポ体である必要がある。抗凍結剤については、PEGなど比較的分子量の大きな抗凍結剤を用いることにより問題を回避することも可能である。X線によるダメージに弱い結晶は不向きである。特に結晶が小さく放射光を用いる場合には重要な条件となる。フラグメント化合物は基本的に小さい分子であるために、水溶性の高いものに限ることが難しい。通常はDMSOに溶解してから結晶化母液で希釈してソーキング溶液とする場合が多い。DMSOを含む溶液でのソーキングに耐えられる結晶でなければならない。

上記のほかにも実際に実行して初めて直面する問題がある。X線構造解析の結果得られるのは電子密度である。電子密度の形状や濃淡を見てモデルを当てはめるのであるが、モデルの当てはめは実験者の判断による影響を受け易い。この曖昧さを軽減するには、分解能を上げることが肝要となるが、ソーキングの結果化合物が結合した結晶は結晶性が低下することが多く、化合物が結合したものに限って信頼度が低くなるという、X線構造解析特有のジレンマが存在する。ソーキングによって結晶が著しく劣化する場合には、原因となっている化合物を特定するため、個々の化合物に戻ってソーキングをしないおさなければならない。またヒットが得られた場合にも、単品についてソーキングを行わなければならない。残りの化合物がヒットに隠れている可能性があるためである。

不規則構造や低い分解能などにより、ネットワークを形成している水分子の電子密度がつながって見えることがある。環状構造を持たない、鎖状のフラ

グメントをソーキングした場合には、水と化合物の区別が付き難い。これを避けるには、ソーキングを行っていない、いわゆるNative結晶の構造を高分解能で解析し、水のネットワークパターンを明確にしておく、間違いを避けられる上にヒットの有無をすばやく判断することが可能となる。

6. おわりに

X線によるFBSはX線構造解析主導のような印象を持たれるかもしれないが、成功のカギとなるのは良質な結晶が多数得られるか否かにかかっている。したがって、必要に応じてタンパク質を改変する遺伝子工学技術がなければ、スタートさえすることができない。また、ライブラリーの構築には、ドラッグライクネスの判断や毒性のある官能基^{15,16}を排除するなどの創薬化学の専門家の経験と知識が必須である。結晶とライブラリーさえ整えば、X線によるFBSは比較的短時間に終了することができる。

REFERENCES

- 1) Shuker S. B., Hajduk P. J., Meadows R. P., Fesik S. W., *Science*, **274**, 1531-1534 (1996).
- 2) Nienaber V. L., Richardson P. L., Klighofer V., Bouska J. J., Giranda V. L., Greer J., *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1105-1108 (2000).
- 3) Rees D. C., Congreve M., Murray C. W., Carr R., *Nature Rev. Drug Discov.*, **3**, 660-672 (2004).
- 4) Hartshorn M. J., Murray C. W., Cleasby A., Frederickson M., Tickle I. J., Jhoti H., *J. Med. Chem.*, **48**, 403-413 (2005).
- 5) Gill A. L., Fredrickson M., Cleasby A., Woodhead S. J., Carr M. G., Woodhead A. J., Walker M. T., Congreve M. S., Devine L. A., Tisi D., O'Reilly M., Seavers L. C. A., Davis D. J., Curry J., Anthony R., Padova A., Murray C. W., Carr R. A. E., Jhoti H., *J. Med. Chem.*, **48**, 414-426 (2005).
- 6) Hajduk P. J., Greer J., *Nature Rev. Drug Discov.*, **6**, 211-219 (2007).
- 7) Miyata Y., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **121**, 33-42 (2003).
- 8) Xu W., Neckers L., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 1625-1629 (2007).
- 9) Powers M. V., Workman P., *Endocr. Relat. Cancer*, **13**, S125-S135 (2006).

- 10) Congreve M., Chessari G., Tisi D., Woodhead A. J., *J. Med. Chem.*, **51**, 3661–3680 (2008).
- 11) Pflugrath J. W., Athay R., Edwards D. P., Niemeyer T. J., Hendrixson T. L., Criswell A. R., Yang C., Crane G. K., Ferrara J. D., Nienaber T., Robertson W., Schafer R., *Acta Crystallogr., Sect. A (Suppl.)*, **58**, C72 (2002).
- 12) Abad-Zapatero C., *Acta Crystallogr., Sect. D*, **61**, 1432–1435 (2005).
- 13) Sharff A. J., *Rigaku J.*, **20**, 10 (2004).
- 14) Rigaku Americas Corporation: <http://www.rigaku.co.jp/>, cited 28 October, 2009.
- 15) Kerns E. H., Di L., “Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods,” Academic Press Inc., 2008, pp. 249–253.
- 16) Wermuth C. G., “The Practice of Medicinal Chemistry,” Part 1, 2nd ed., Technomics, Inc., Tokyo, 2004, pp. 239–255. (in Japanese)