

研究講演会レポート

第269回CBI研究講演会2006年11月1日(水)

「GPCR創薬：相互作用解析とインフォマティクス」

開催趣旨より：

GPCRは、キナーゼと並ぶ代表的な創薬標的タンパク質であるが、結晶構造解析が困難なこともあり、創薬に結びつけるためにはより多角的なアプローチが望まれている。さらにオーファンGPCRの存在やGPCR二量体形成の持つ構造・機能の多様性など標的タンパク質としてもまだミステリアスな部分を残しており、新しい創薬の切り口になるものと期待されている。このような背景の中、本研究講演会では、GPCR-化合物、GPCR-GPCRなど「相互作用」をキーワードに分子モデリング、立体構造情報、配列解析、ケモインフォマティクス等を利用したアプローチでご活躍の先生方にご講演をお願いした。いずれもGPCR創薬を支援、加速する内容であると確信している。多くの方々の御参加と活発な議論を期待する。

世話人：広川貴次（産総研CBRC）
渡辺美砂子（エーザイ株式会社）

今回は本講演会のレポーター役として、東京農工大学大学院工学府生命工学専攻 中村智子氏をお願いした。

1. GPCRの機能的リガンド認識構造



石黒正路氏

典型的なGPCRであるロドプシンのX線結晶解析により、7つの膜貫通ヘリックスの形状が明らかになった。石黒正路氏は、このロドプシンの立体構造と構造変化についてのモデルを作成し、活性化型のGPCR構造を推測、リガンドとGPCRと

プログラム

1. 「GPCRの機能的リガンド認識構造」
石黒正路（新潟薬科大・応用生命科学部）
2. 「リガンド認識仮説に基づくGPCRの立体構造を用いたバーチャルスクリーニング」
古谷利夫（株式会社ファルマデザイン）
3. 「創薬標的としてのGPCRsオリゴマー化と、そのインターフェイス予測」
根本 航（奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科）
4. 「ケミカルゲノム情報に基づくGPCR創薬」
奥野恭史（京都大学大学院薬学研究科 統合薬学フロンティア教育センター）
5. 「GPCR創薬；情報から制御へ」
藤井信孝（京都大学大学院薬学研究科 創薬科学専攻 薬品有機製造学分野）

の相互作用機序について研究をされている。本講演ではロドプシンが活性化型に至るまでの機構を中心にその概要が紹介された。

ロドプシンは、初期中間体であるバソプレシンを介し、さらに光活性型中間体のルミロドプシンを経て活性型のメタロドプシンへ至る。ルミロドプシンからメタロドプシンに至る経路には、メタロドプシン 380 を経る系とメタロドプシン b を経る系の二つあることがわかっている。

ロドプシンがバソロドプシンに変化する際、構成タンパク質のオプシンに共有結合している11-シスレチナールが11-トランスへ異性化する。このとき異性化した二重結合に約30°のねじれが生じる。これを解消するべく、7つの膜貫通セグメント(Transmembrane segment, TM3~7)のうちTM3およびTM4が構造変化を起こし外向きに動く現象がルミロドプシンへの変遷の過程で起こる。ルミロドプシンからメタロドプシンへ至る過程では、Gタンパク質との結合のため、さらなるTM3、TM4の運動が続く。特にメタロドプシン 380 を経る系では、TM3上のよく保存された3残基、Glu134、Arg135、Tyr136が特徴的な動きをする。TM3の挙動に伴い、Glu134が極性条件下から無極性環境下へ移りプロトン化される。これによりGlu134とArg135間の水素結合が解消され、Arg135は、今度はTM6上のGlu247と水素結合を形成する。この結果、TM6がTM3に近づくように回転し、Gタンパク質と相互作用ができるようになる。この状態が活性化型のメタロドプシンであり、Tyr136はこの形状を安定化する役割を果たすと考えられる。

また石黒氏はmultiple two-state modelの概念についても紹介された。GPCRには、インバースアゴニスト結合型、パーシャルアゴニスト結合型、アンタゴニスト結合型、アゴニスト結合型の4つの状態がある。ロドプシンに当てはめれば、メタロドプシンがインバースアゴニスト結合型、メタロドプシン bがアンタゴニスト結合型、メタロドプシン b380がパーシャルアゴニスト結合型、そしてメタロドプシンがアゴニスト結合型とみなすことができる。各結合型において活性・不活性どちらに平衡が傾くかは結合型によって異なるが、インバースアゴニスト結合型に限ってはGタンパク質が結合しておらず、GPCRは常に不活性であり、活性・不活性の平衡反応はない。また、結合型間の遷移もまた平衡反応であり、アンタゴニスト結合型 - パー

シャルアゴニスト結合型間、アンタゴニスト結合型 - アゴニスト結合型間、アンタゴニスト結合型 - インバースアゴニスト結合型間で、平衡反応を解したGPCR状態の変換が起こるとされている。特にアンタゴニスト結合型からインバースアゴニスト結合型へ遷移する際にはGタンパク質の解離が起こる。

今後、リガンドとGPCRの結合機序解析がさらに進められ、未知のGPCRの機能・構造推測、延いてはより効率的な創薬デザインに応用されることが期待される。

2. リガンド認識仮説に基づくGPCRの立体構造を用いたバーチャルスクリーニング



古谷利夫氏

GPCRは魅力的な創薬ターゲットであるにも関わらず、その立体構造情報が乏しいため、合理的な薬物設計がままならない現状である。そこで古谷利夫氏は、先の石黒正路氏のリガンド認識仮説に基づくGPCR立体構造モデルをベースにした、GPCR-フォーカストライブラリの構築を行っている。

データベース上にある約100万の化合物からドラッグライクな化合物約30万個にまで絞り込んでおく。アンタゴニストの創薬デザインにはアンタゴニスト結合型構造モデルを、アゴニストにはアゴニスト結合型構造モデルを作成し、ドッキングスコアと相互作用の条件を基に専門家の目視によるバーチャルスクリーニングを行い、最終的に約1000個まで絞り込む。複数のGPCRについて、この方法を適用したところ、概ね10%のヒット率(10 μM以下の結合活性)が得られ、このライブラリの有用性が実証された。さらに古谷氏は、数あるGPCRの中でも近年特に注目を集めるケモカイン受容体についてもライブラリを設計されている。こちらもヒット率が13.3%と良好な結果が得られているという。

古谷氏が構築されたフォーカストライブラリは、リガンド情報のみに依存する従来の化合物

ライブラリとは異なり、化合物の多様性があるため、新規骨格を持つ化合物を多く含有している。効率がよく、ヒット率の高いこのライブラリはGPCR 創薬に大きく貢献するものと期待される。

3. 創薬標的としてのGPCRs オリゴマー化と、そのインターフェイス予測



根本航氏

近年、ホモもしくはヘテロのオリゴマーを形成するGPCRの存在が明らかになっている。オリゴマーの形成が細胞内シグナル伝達や疾病に関与するとの報告もあり、アゴニスト・アンタゴニスト設計だけでなく、GPCR 同士の相互作用制御も重要視されている。こうした背景を受けて、オリゴマー化のためのインターフェイス領域の予測法の開発が進められている。本講演では、講演者である根本航氏らが開発した、GPCR 内の保存残基の分布を利用したインターフェイス予測法が紹介された。

先行のインターフェイス予測法として、進化トレース法(evolutionary trace, ET)が知られているが、この方法は、インターフェイスは進化の過程で変化しないという前提に基づいており、サブタイプごとの差異を考慮しないため、予測結果と実際の実験データが一致しないという事例が発生する。これに対応すべく、根本氏らの開発した手法では、進化的情報に加えて、これまでに予測されてきたGPCRの立体構造情報を利用する。とはいえ現在利用可能な構造情報が、classA、B、Cに分けられるGPCRのうちclassAに属するロドプシンに限られているため、この手法はclassA GPCRに特化している。

まず、インターフェイスを予測したいclass A GPCRファミリーの配列についてマルチプルアライメントを作成し、分子系統樹のクラスタリングを行ってターゲットとするサブタイプを特定する。このサブタイプに対して、ロドプシンの配列情報を考慮しながら再度アライメントを行い、各サイトの保存度を算出しておく。続く三

次元座標データ解析のために、1) GPCRは模式的に見て、ひずんだ筒型の構造をしている、2) インターフェイスは筒型構造の表面に位置している、3) 他の表面領域と比較して、インターフェイスには保存残基が多く存在している、の以上3つを仮定しておく。この前提に基づいて、立体構造上で、保存残基が多く見出される領域をインターフェイスとして探索する。具体的には、ロドプシンのCの座標について主成分分析を行う。細胞膜に垂直で、且つGPCRの筒型構造の中心をはしる軸を第一主成分軸として想定し、第二・第三主成分軸で規定される平面にGPCRの残基のCを射影する。すると候補残基が平面上にひずんだリング状のプロットを形成する。形成された各プロットに、算出しておいた保存度を割り当てる。このリング状のプロットの中心に扇形の領域をとり、扇形領域の位置、扇形領域の角度、保存残基の閾値を変化させて全探索を行い、インターフェイスの候補領域を特定する。

複合状態での構造がわかってきているロドプシン、実験的にインターフェイスの予測が行われている β 2アドレナリン受容体やD2ドーパミン受容体などにこの手法を応用したところ、根本氏らの方法は非常に高い精度でインターフェイスを予測できることが示された。

ただしこの方法は、GPCRのオリゴマー形成が膜貫通ヘリックス表面での相互作用に起因するものと仮定しており、他の機構(膜貫通ヘリックスのドメインスワッピングなど)が関与する可能性を考慮していないという留意点はあるが、それでもなお有効なツールと考えられ、GPCRの相互作用制御の研究へ結びつくことだろう。

4. ケミカルゲノムに基づくGPCR創薬

膨大なゲノム情報の蓄積により、GPCR研究におけるデータベースとバイオインフォマティクスの利用が必然となっている。しかし、GPCRが創薬の大きな焦点となっ



奥野恭史氏

なっているにもかかわらず、GPCR自身の生化学的情報とリガンドの化学的情報の相互リンクが十分に機能しているとは言えない。こうした背景から、ケミカルゲノミクスと呼ばれる、生物学的情報と化学的情報をゲノムスケールで統合させようという新規の情報科学が注目されるようになった。しかし、GPCRとリガ

ンドの情報はケミカルゲノミクスを応用できるほど十分ではない。そこで奥野恭史氏は新規のリレイショナルデータベース、GLIDA (GPCR-Ligand Database)の開発を進めている。本講演ではその概要が紹介された。

GLIDAは、GPCRに関する生物学的情報、リガンドの化学的情報、GPCRとリガンドの特異的な結合の組み合わせ、以上3種類の情報が組み込まれている。ユーザーは、GPCRからでもリガンドからでも検索することが可能であり、アゴニスト、インバースアゴニスト、アンタゴニスト、それぞれに対応するリガンド(もしくはGPCR)候補を調べることができる。またGLIDAは、構造類似性の探索機能も有しており、1つの検索対象に対してGPCRの場合は25、リガンドならば40の類似体を選出される。例えばGPCR側からアプローチした場合、検索対象を含めた25の構造類似体がリストアップされ、同時にそれに対応する25個のリガンド物質も表示される。これをそれぞれクラスタリングし、GPCR類似体のクラスタリング結果をx軸に、リガンド結果をy軸にとり二次元マップを描出する。これにより、GPCRとリガンドの相互作用機構およびGPCR標的薬剤候補の推定が容易になる。GLIDAの使用により、オーファンGPCRの新規リガンドの予測が可能となるかもしれない。GPCR関連創薬に、ケミカルゲノムからのアプローチとして活用されることが期待される。

またケミカルゲノミクスの確立の一環として、SVM(Support Vector Machine)が応用されていることを紹介された。化学物質情報、タンパク質情報両者をベクトルで座標化し、これをトレーニングデータとしてSVMに与え学習させる。学習したSVMは、リガンドとGPCRが相互作用するかどうか有効な判断を行えるようになる。さらにこれに主成分分析(PCA)を組み合わせれば、新規のリガンド特定にも応用できると見込まれる。

GPCR研究に関わらず、化学と生物学の融合は創薬研究における1つの大きな焦点である。化学的スペース(chemical space)と生物学的スペース(biological space)の概念が定義され、両者間の関連付けが進められている。生物学的スペース上の一点を、化学的スペースに対して投射すると、化学的スペース上のあるまとまった区域とリンクする。逆方向の投射もまた同じである。投影された区域は、統計学的に理学的かつ化学的特性が狭められており、従来の網羅的なハイスループットスクリーニングに比べ高効

率のスクリーニングアッセイを期待できる。奥野氏が開発されたGLIDAをはじめとするケミカルゲノミクス手法が、創薬研究の加速に貢献するものと考えられる。

5. GPCR創薬；情報から制御へ



藤井信孝氏

近年のゲノミクスとプロテオミクスの進歩により、リガンドやその受容体からもたらされる情報は爆発的に増加し、新規の薬理活性物質発見の可能性を高めている。しかし同時に、期待したほどの成果をゲノムサイエンスからもたらされていないこともまた事実であり、現行の創薬研究手法の効率化および革新が必要とされている。藤井信孝氏はこの創薬基盤の革新という命題に基づいて、高分子ペプチド・タンパク質の低分子化を試験されている。本講演ではその一例として、HIV感染、癌、リウマチ等各種炎症性疾患に対する病態生理と関連が深く、血球再生や生体防御の生理的恒常性維持にもきわめて重要なケモカイン受容体、CXCR4のアンタゴニスト開発研究を紹介された。

CXCR4は、HIV-1のT細胞への感染の際の第二受容体として同定され、数種類のCXCR4アンタゴニストがHIV感染阻害剤として開発されている。藤井氏らは、カプトガニの血中に存在し、抗菌抗ウイルス活性を示すタキプレッシンとポリフェムシンを基盤構造とした18アミノ酸残基長のT22ペプチドを開発し、T22がCXCR4を介したHIV-1のT細胞への感染を阻止することを実証している。さらに藤井氏らは、T22の構造を基にした低分子化、アミノ酸置換を行い、14残基長のT140ペプチドの開発に成功している。このT140はT22よりも強いCXCR4阻害能および抗HIV-1感染能を有することが実証されている。また近年CXCR4はHIV-1感染のほかにもガン細胞の転移にも関与していることが明らかとなっている。CXCR4の元来のリガンドであるケモカインCXCL12が、ガン転移の標的になりやすい組織(肺、リンパ節、肝臓、骨髄)から分泌されてお

り、ガン細胞はそれら標的組織に対して走化性を示すことが知られている。CXCR4の発現を強化すると転移現象が増大するという報告もされている。ガン転移には他の因子も寄与しているが、CXCR4の阻害はガン転移抑制のひとつの有効な手段と考えられており、実際に藤井氏らの開発したT22、T140にはガン転移抑制作用があった。

またCXCR4が仲介する化学走性反応を、CXCR4アンタゴニストとは別のアプローチで抑制しようという検討がなされている。その一例として、藤井氏はGPR54アゴニストの有用性を紹介された。GPR54はGPCRファミリーに属する受容体で、メタスチン(kisspeptin-54)をリガンドとして認識する。メタスチンは、CXCL12に対するCXCR4発現ガン細胞の走化性を妨げ、さらにCXCL12に誘引されるシグナル伝達を阻害する。つまりGPR54シグナル伝達系の活性化により、ガン転移におけるCXCR4の機能を調節できる可能性があり、藤井氏は、T22、T140のような直接的な阻害剤に加え、GPR54アゴニストの研究を進めているとのことであった。

最後に藤井氏は、創薬研究の革新を図るためには、創薬情報を医薬品リード創出に効率リンクさせることが必要であり、物理化学・有機化学・生化学・情報科学の融合的昇華、延いてはChem-Bio Informaticsの今後の発展を期待したい、との見解も述べた。

参考文献

- ・M Ishiguro. Ligand-Binding Modes in cationic Biogenic Amine Receptors, *ChemBioChem* **5**,1210-1219 (2004)
- ・ M Ishiguro, Y Oyama, T Hirano, Structural Models of the photointermediates in the Rhodopsin Photocascade, Lumirhodopsin, Metarhodopsin I, and Metarhodopsin II, *ChemBioChem* **5**,1210-1219 (2004)
- ・Nemoto W, Toh H, Prediction of Interfaces for Oligomerization of G-protein Coupled Receptors, *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **58**, 644-660 (2005)
- ・根本 航, 藤 博幸, シリーズ ポストゲノム シークエンス時代の薬理学3 バイオインフォマティクス, 日本薬理学会誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*) **125**, 159-164 (2005)
- ・Okuno Y, Yang J, Taneishi K, Yabuuchi H, Tsujimoto G, GLIDA: GPCR-Ligand database for chemical genomics drug discovery, *Nucleic Acids Research*, **34**, (Database issue) D673-D677 (2006)
- ・Fujii N, Oishi S, Hiramatsu K, Araki T, Ueda S, Tamamura H, Otaka A, Kusano S, Terakubo S, Nakashima H, Broach JA, Trent JO, Wang ZX, Peiper SC, Molecular-size reduction of a potent CXCR4-chemokine antagonist using orthogonal combination of conformation- and sequence-based libraries, *Angew Chem Int Ed Engl.* **42**, 3251-3253 (2003)
- ・Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, Kipps TJ, Burger JA, Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells, *BLOOD*, **106**(5), 1824-1830 (2005)
- ・Tomita K, Niida A, Oishi S, Ohno H, Cluzeau J, Navenot JM, Wang ZX, Peiper SC, Fujii N, Structure-activity relationship study on small peptidic GPR54 agonists, *Bioorg Med Chem.* **14**(22) 7595-603 (2006)

第271回 CBI 学会研究講演会「大規模化合物データの活用法」

開催趣旨：膨大な数の有機化合物がこれまでに合成されたり、天然から得られている。一方、これらの化合物に関しては潜在的に膨大な情報があるはずであるが、多くの情報は埋もれてしまっている。創薬分野では勿論、広く有機材料開発という立場で考えても、これらの化合物そしてそれに付随する情報を活用することは極めて重要である。創薬分野での大きな関心事は、どのような化合物が入手可能なのか、膨大な化合物から特定の目的に合う化合物をどうやって絞り込むか、そして化合物に付随する情報をどのように網羅的かつ効率的に求めるか、などである。これらの問題は重要であるが、系統的に議論されることが少ない。そこで今回は、創薬に必須の「大規模化合物データの活用」を巡る幾つかのトピックスについて議論したい。

日時：2007年2月8日(木) 13:00 - 18:00

場所：日本化学会化学会館 7F ホール

東京都千代田区神田駿河台 1-5 (JR お茶の水駅下車、徒歩4分)

世話人：平山令明(東海大学 医学部)、岡部隆義(万有製薬株式会社)

プログラム

1. 13:00-13:10 世話人の挨拶
2. 13:10-13:50 「医薬品候補、345万種収録のデータベースの開発・活用法と公開」
福西快文(産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター)
3. 13:50-14:30 「創薬のための大量化合物の物性推算」
池田博隆(株式会社菱化システム)
4. 14:30-15:10 「医薬分子探索活用できる化合物群」
Barry Johnson (Sigma Aldrich)
5. 15:40-16:20 「様々な視点から集められた医薬関連化合物の空間群」
羽島宏史(Elsevier MDL)
6. 16:20-17:00 「大学化合物プロジェクトの進捗と今後の展望」
奥山 彬(財団法人科学技術教育協会)
7. 17:00-17:40 「化合物探索研究における作用機序予測について」
David Aragoes (Prous Institute for Biomedical Research)
8. 17:40-18:00 コメントおよび議論

講演会参加費： 法人賛助会員： 無料

個人会員(非営利)：無料 個人会員(一般企業)：¥5,000

ビジター(非営利)：¥1,000 ビジター(一般企業)：¥10,000

出席を希望される方は事前に必ず事務局セミナー受付 seminar@cbi.or.jp に連絡してください。

連絡先：CBI 学会事務局 セミナー受付 E-mail : seminar@cbi.or.jp

〒158-0097 東京都世田谷区用賀 4-3-16 イイダビル 301

TEL : 03-5491-5423 FAX : 03-5491-5462 http://www.cbi.or.jp/