

医薬品分析特集②

X線構造解析による化合物の探索

山野 昭人*

1. はじめに

製薬分野における化合物の探索では、標的タンパク質との親和性の向上を目指して、構造の最適化が行われる。最適化に必要な標的タンパク質の高精度な構造は、そのほとんどが単結晶X線構造解析により得られたものである。また薬剤となる低分子化合物そのものの、絶対配置を含めた構造の決定も極めて重要である。光学異性体は生体に対して全く異なる作用を持つためである。絶対配置の決定は、単結晶X線構造解析が実用上唯一の方法である。

単結晶X線構造解析の原理は、低分子・高分子を問わず共通である(図1)。構造を決定したい物質の単結晶を作成しX線を照射すると、結晶はX線の波長程度の周期を持つ3次元スリットとして作用する。結果、回折されたX線は回折点として観測される。この回折点の強度を測定しフーリエ変換を行うと、結晶中の電子密度すなわち構造を再現することができる。これが単結晶X線構造解析の原理である。フーリエ変換の実行には位相情報が必要であるが、低分子は直接法、構造未知のタンパク質では重原子同形置換法などの実験的な手法を用いて決定する。よく似た構造が既知である場合には、分子置換法を用いることができる。構造既知のタンパク質と低分子化合物の共結晶が対象となる化合物の探索では、分子置換法が主流となる。

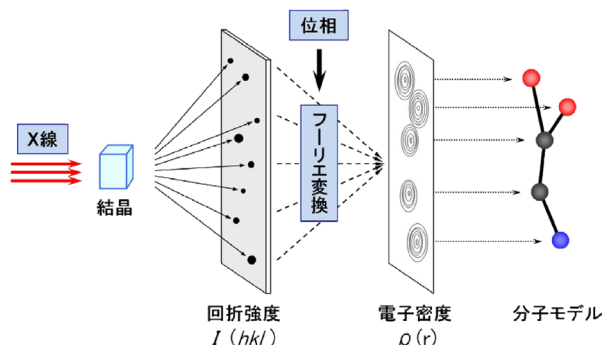


図1. 単結晶X線構造解析の原理。

単結晶X線構造解析によるタンパク質の構造決定では、単結晶の作成が不可欠であるが、結晶化が困難なタンパク質も多く存在する。生体高分子を対象とするX線小角散乱いわゆるBioSAXSでは、単結晶を作成することなく、溶液中のタンパク質の構造を決定することができる。本稿では、単結晶X線構造解析とBioSAXSの製薬分野での利用について述べる。

2. タンパク質の立体構造情報に基づく薬剤設計

新薬開発の初期段階である化合物の探索には様々な方法があるが、標的タンパク質の立体構造情報に基づく薬剤設計は、SBDD (Structure Based Drug Design) と呼ばれている。SBDDでは、タンパク質の高精度な3次元構造を基に、薬剤が結合するポケットの形状や疎水性・親水性・電荷の分布を割り出し、初期化合物に必要な特性を決定する。この条件を満たす化合物を、HTS (High Throughput Screening) などによってライブラリーから選択し、出発化合物とする。出発化合物とタンパク質の結合をコンピュータ計算や共結晶構造によって評価し、その結果に基づいて化合物を改良することにより、活性や安定性を向上させてゆく(図2)。

従ってひとたび薬剤の標的となりうるタンパク質の構造が解明されると、新薬開発の扉が開かれる。著名な例としてリボソームを挙げる。リボソームはセントラルドグマを具現化する重要な細胞内器官であり、すべてのタンパク質がここで合成される。リボソームは、3本のリボソームRNA (rRNA) と55個のタンパク質からなる巨大超分子である。イスラエルワイズマン研究所のA. E. Yonath博士、英国MRCのV. Ramakrishnan博士、米国エール大学のT. A. Steitz博士らにより、リボソームの構造が高分解能で決定されたことにより、様々な疑問に終止符が打たれた。創薬という観点では、抗生物質パロモマイシンの作用機序の解明が挙げられる(図3)⁽¹⁾。パロモマイシンは抗腸管感染薬で、30Sサブユニット (Sは遠心分離における沈降定数で、分子の大きさの尺度) の16S rRNAのデコーディング部位の近傍に作用する。パロモマイシンが結合する

*株式会社リガク X線機器事業部 応用技術センター

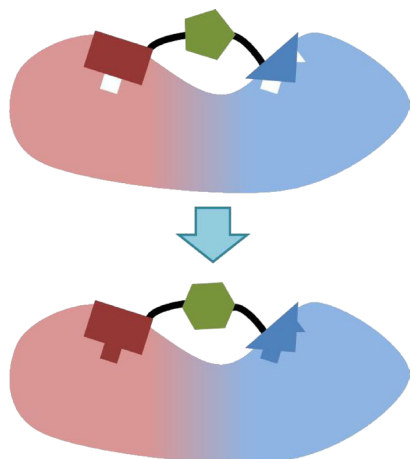


図2. SBDDの概念図。タンパク質の構造に合致するように化合物を改変する。

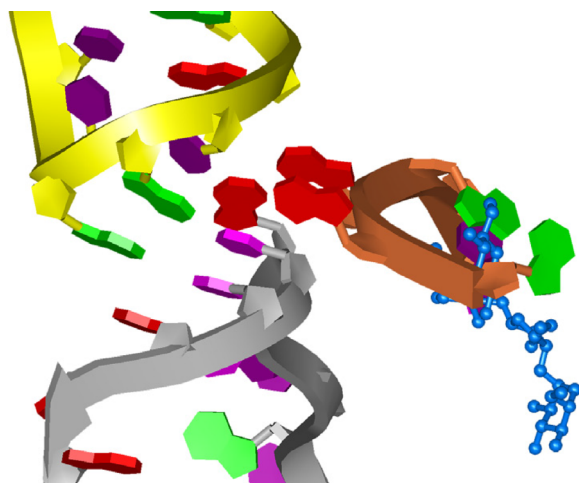


図3. パロモマイシンの結合部位の構造。アミノ酸配列の校正を行うアデニンA1492とA1493がコドン-アンチコドン(A-C-CとU-G-G)の方向に突き出ている。

と、リボソームの翻訳の精度が落ちることが知られていた。16S rRNAのアデニンA1492とA1493は、メッセンジャーRNAのコドンに対する正しいトランスファーRNA (tRNA) が結合した場合にのみ構造変化を起こし、コドン-アンチコドンの水素結合に参加することにより校正を行う。ところがパロモマイシンが結合すると、A1492とA1493がつねに構造変化を起こした状態になってしまう。結果似て非なるtRNAが来た時にも水素結合を形成してしまうため、校正機能が低下すると説明できる。この成果は薬剤耐性菌に対しても効果を持つ抗生物質の開発に繋がっている⁽²⁾。

SBDDの出発点は標的タンパク質の構造解析であるが、タンパク質の3次元構造の決定は二極化が進んでいる。新規の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非常に難しい。結晶化の困難を克服しても、結晶性が悪く十分な分解能のデータが得られない、結晶がX線によるダ



図4. 生体高分子構造解析用装置R-AXIS VII. 高輝度微小焦点X線発生装置と人工多層膜光学系VariMaX HFによる強力X線源との組み合わせ。

メージを受けやすいなどの困難を、結晶学の知識や経験を総動員して一つ一つ克服していかなければならない。しかしながらSBDDに要求されるX線構造解析はこの対極にあるX線の利用方法で、単なる分析手法としての単結晶X線構造解析である。構造既知のタンパク質に薬剤が結合した構造は、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となる。タンパク質構造解析は放射光でのみ可能であると思われる向きもあるが、特にSBDDにおける構造解析では、実験室系の装置で十分な場合も多い。図4に生体高分子構造解析用装置を示す。人工多層膜集光光学素子と微小焦点X線発生装置の組み合わせでは、結晶に照射されるX線の強度が飛躍的に向上している。

3. FBDD

10年ほど前までは、SBDDの有効性について疑問視する向きもあったが、HIVプロテアーゼをはじめとする多数の成功例が存在する今、手法そのものの有効性は疑う余地がない。しかしながらSBDDにも欠点がある。化合物ライブラリーに登録されている分子は、最終産物すなわち薬剤の平均分子量500 Da程度を持つ場合が多く、化合物を伸張する余地が少ない。官能基の変更や骨格部分の入れ替え、自由度の変更にとどまってしまう。従って出発化合物から大きく逸脱した、独創性がありかつ飛躍的に活性が高いリード化合物の導出には繋がりにくい。これらSBDDのみによる分子の探索の欠点を改善する方法として考えだされたのが、リード化合物をその部品(フラグメント化合物)から組み立てようというFBDD (Fragment Based Drug Design)である (図5)。

FBDDはリード化合物の導出に、パラダイムシフトをもたらす手法として期待されている。HTSと比較して、はるかに少ない化合物のスクリーニングでより広

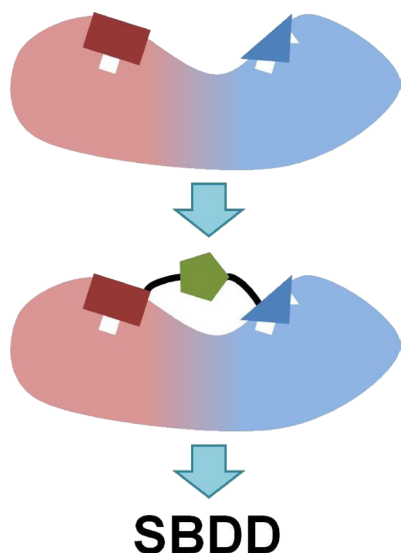


図5. FBDDの概念図。選択した部品を結合して出発物質を作成する。

いケミカルスペースを検索できる上、より活性が高くかつ独創性のある化合物に到達できるとされているからである。またHTS用のライブラリーは数十万から数百万化合物が一般的だが、FBS用ライブラリーは通常数百から数万化合物程度である。化合物の数が少ないということは重要で、ライブラリーの構築も容易である上に維持費用も抑えることができる。

FBDDの第1段階はフラグメント化合物、すなわち薬剤の部品を選定する作業である。これをFBS (Fragment Based Screening) という。FBSを実行する分析手法として最初に用いられたのはNMRであるが、程なくしてAbbottの研究者たちによりX線構造解析も導入された⁽³⁾。彼らはX線構造解析をFBSに用いるにあたり、データ測定から構造解析までの徹底的な自動化を試みた⁽⁴⁾。このとき構築されたシステムが、欧米の製薬関連企業で広く用いられている、ハイスループット構造解析システムの原型となっている (図6)^{(5),(6)}。このシステムは、人間が介入することなく最大60個のデータを測定する⁽⁷⁾。

FBSで用いられるタンパク質構造解析は、SBDD以上に簡単である。SBDDでは結晶化の段階から薬剤を導入する場合があり、結晶化条件の探索が必要になることがある。一方FBSでは、あらかじめ結晶化したNative結晶に、ソーキングにより薬剤を導入する。ソーキングでは結晶化条件が変わる可能性はなく、加えて結晶の同形性も保たれる。データ測定の完了すなわち構造解析の完了であり、結晶学的な知識もほとんど要求されない。

X線構造解析によるFBSの最大の特徴は、標的タンパク質に結合しているフラグメント化合物の様子を視覚的に捉えることができる点にある。結合している方



図6. ハイスループット単結晶X線構造解析用システム。試料交換ロボットと結晶の自動センタリング・評価機能が備わっている。評価の高い順に測定する、評価の低い結晶については測定しないなどの選択が可能。

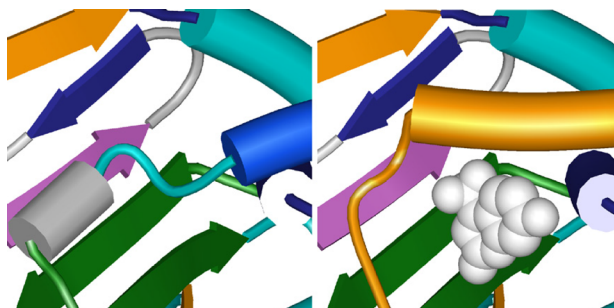


図7. 化合物の結合によるタンパク質構造が変化した例。左図でループ構造を取っている部分 (中央) が、右図ではヘリックスに変化している。

向や相互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、残っている空間の方向や容量を知ることにもできる。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。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、非特異的結合はおのずと排除される。

化合物の結合によって、ループから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 (図7)。また、スクリーニングの初期段階では効率を上げるため、複数のフラグメント化合物の混合物を用いるが、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したりする場合もある。X線構造解析は結晶性が保たれる範囲において、これらすべての予想外の状況に対応することができる。

X線構造解析はあらゆる分析手法の中で、もっとも幅広い濃度に対応できるとされている。X線構造解析でよく使われる手法に、差フーリエという

表1. HSP90をターゲットとしたX線によるFBS実験のまとめ.

項目	結果
検索化合物数	384 (4化合物混合物×96)
測定に使用した結晶の数	146
測定成功数	96
測定成功率	65.8%
測定時間	約100
構造解析にかかった時間	約20時間
FBSの実行時間	延べ120時間 (5日間) 程度
ヒット数	10
ヒット率	2.6%

手法がある。回折強度の実測値から現在の分子モデルより計算した回折強度を差し引いた値($F_o - F_c$)を係数としてフーリエ計算を行い、電子密度を算出する手法である。現在の分子モデルの不足分を検知するのに有効である。特に精度の高いデータが得られている場合には、結合率(占有率)の低い化合物も検出することが可能である。

FBSの例として、Heat shock protein 90 (HSP90)をターゲットとし、FBSを実行した結果を示す(表1)。HSP90は分子量90 kDaの分子シャペロン*で、シグナル伝達や細胞の増殖や分化などに関わる、数多くのキナーゼや転写因子の立体構造の安定化関与している^{(8),(9)}。HSP90を阻害すると癌細胞の増殖が抑制されるため、抗癌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^{(10),(11)}。HSP90に対して、384種類の化合物についてX線構造解析によるFBSを実施した。得られたヒットは10化合物であった。前出図7はヒットの一例である。

4. X線小角散乱法を用いた化合物の探索

単結晶X線構造解析には、対象となる物質の単結晶が必須である。しかしながら創薬のターゲットとなるタンパク質は人間由来のタンパク質であり、一般的に結晶化が困難か、結晶化に成功しても構造解析に必要な分解能が得られない場合が多い。

X線小角散乱を用いると、低分解能ではあるが、比較的精度の高いタンパク質の外形を決定することができる。X線小角散乱によるタンパク質の構造決定は、ダミー原子法による構造解析が実用化されたことにより、近年目覚ましい発展を遂げている。化合物探索という観点では、化合物が結合した際にタンパク質の半径や外形に変化が起こる場合には、X線小角散乱によって化合物の結合の可否を判断できる可能性がある。

*分子シャペロンとは、他のタンパク質分子のアミノ酸鎖の折りたたみに関与し、正しい3次元構造になることを介助するタンパク質の総称。



図8. BioSAXS-1000の外観.

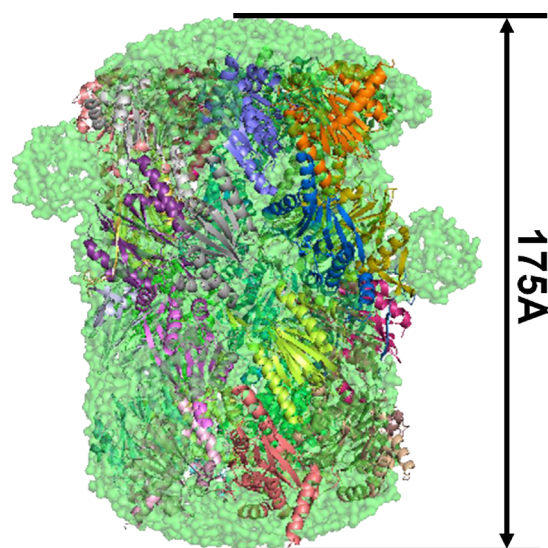


図9. BioSAXS-1000により決定した、酵母菌由来の20Sプロテアソームの構造.

BioSAXS-1000は生体高分子の溶液構造解析専用装置である(図8)。人工多層膜集光光学素子とクラツキー光学系を組み合わせている。集光点は検出器面になるよう設計されている。これにより試料位置では照射面積を稼ぎながらも、ラインフォーカスで問題となるスミアリングの問題を回避することができる。また、検出器としてハイブリッド型の半導体検出器PIL-ATUS 100 Kを搭載しているため、長時間露光が必要な場合でもS/Nの良い回折強度を測定することができる。

図9はBioSAXS-1000により決定した、酵母菌由来の20Sプロテアソームの構造である。プロテアソームは、7種類の α サブユニットから形成される α リングと、7種類の β サブユニットから形成される β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順に重なった、総サブユニット数28、分子量750 kDaの巨大タンパク質複合体である。

5. 後発医薬品とX線構造解析

後発医薬品の最大の特長は、先発医薬品よりも安価である点である。開発費用が大幅に削減できるためである。後発医薬品メーカーによっては、先発医薬品メーカーよりも収率のよい合成方法を開発することにより、収益の改善に努めている。異なる合成経路を

採った場合、合成途中の確認はNMRに代表される分光学的な方法でもよいが、最終産物の構造は単結晶X線構造解析を用いて確認することが必要である。特に医薬品では不斉炭素を持つ化合物も多く、光学異性体を見分ける必要がある。いわゆる絶対構造の決定である。絶対構造を決める手法としては、単結晶X線構造解析が唯一の方法といっても過言ではない。生体高分子単結晶X線構造解析用装置同様、低分子用単結晶X線構造解析用装置に必要な結晶の大きさも飛躍的に小さくなっている。有機物の結晶でも10 μ m角程度の大きさがあれば、構造決定に必要な精度を持つ回折データを取得できる場合もある。

近年盛んに開発がすすめられている医薬品として、タンパク質そのものを医薬品とするバイオ医薬品が挙げられる。日本発の抗体医薬品としては、抗リウマチ薬アクテムラが有名である。バイオ医薬品の後発品はバイオシミラー（類似品）とも呼ばれている。バイオ医薬品は低分子医薬品と異なり、全く同一のものを作ることができないからである。タンパク質は、アミノ酸のシーケンスさえわかっているならば作成することができるが、先発医薬品メーカーの抗体医薬と同一の3次元構造を持っているか確認するためには、構造解析が必要であると考えられる。SBDDやFBDDと同様に、この場合もタンパク質構造は既知であるため、分子置換法により解析することができる。逆に分子置換法で解析できなければタンパク質のフォールディングが異

なっている可能性があることになる。バイオシミラーの開発がさらに進めば、後発医薬品メーカーがタンパク質構造解析を必要とするようになると予想できる。

参考文献

- (1) V. Ramakrishnan and P. B. Moore: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10** (2001), 144–154.
- (2) 内海利夫：遺伝子医学MOOK4, RNAと創薬, (2006), 181–188.
- (3) V. L. Nienaber, P. L. Richardson, V. Klighofer, J. J. Bouska, V. L. Giranda and J. Greer: *Nature. Biotechnol.*, **18** (2000), 1105–1108.
- (4) S. W. Muchmore, J. Olson, R. Jones, J. Pan, M. Blum, J. Greer, S. M. Merrick, P. Magdalinos and V. L. Nienaber: *Struct. Old. Des.*, **8** (2000), R243–R246.
- (5) J. W. Pflugrath, R. Athay, D. P. Edwards, T. J. Niemeyer, T. L. Hendrixson, A. R. Criswell, C. Yang, G. K. Crane, J. D. Ferrara, T. Nienaber, W. Robertson and R. Schafer: *Acta Cryst.*, **A58**, c72 (2002).
- (6) C. Abad-Zapatero: *Acta. Cryst.*, **D61** (2005), 1432–1435.
- (7) A. J. Sharff: *The Rigaku Journal (English version)*, **19/20** (2003), No.2/1, 5–10.
- (8) 宮田愛彦：日薬理誌, **121** (2003), 33–42.
- (9) W. Xu and L. Neckers: *Clin. Cancer Res.*, **13** (2007), 1625–1629.
- (10) M. V. Powers, P. Workman: *Endocrine-Related Cancer*, **13** (2006), S125–S135.
- (11) M. Congreve, G. Chessari, D. Tisi and A. J. Woodhead: *J. Med. Chem.*, **51** (2008), 3661–3680.