

# 天然変性タンパク質を標的とした創薬 ～その可能性と課題～

Targeting intrinsically disordered proteins as drug targets: perspective and problems

廣明 秀一 Hidekazu Hiroaki\*<sup>1</sup>

## [SUMMARY]

天然変性タンパク質 (IDP) は、生理条件下において単独でコンパクトな立体構造をもたないポリペプチド鎖である。近年、その性質からタンパク質相互作用ネットワークのハブに現れやすいこと、液-液相分離 (LLPS) に関わるタンパク質の多くが IDP であることから、IDP が創薬標的として適しているかどうか、関心が高まっている。しかし、単独では低分子薬剤が強固に結合するポケットをもたないこと、X線結晶解析やクライオ電子顕微鏡で精密立体構造が決定しにくいことなどから、論理的設計や仮想スクリーニングなどの、近年確立されてきた創薬加速手法の恩恵が受けられにくいことが、課題として考えられる。本稿では、IDP の細胞内機能の理解に基づいた IDP 創薬の基本戦略と、IDP を標的とした医薬品探索の成功例について考察する。

Intrinsically disordered protein (IDP) is a polypeptide that does not adopt a compact fold under a physiological condition. It tends to be appeared at the hub position in the intracellular protein-protein network, thereby considered as an attractive drug target. Recently, many examples of IDPs' implication in liquid-liquid phase separation (LLPS) have also emerged. Nevertheless, targeting IDP sounds still difficult, because the lack of highly accurate three-dimensional structure of IDP may hamper application of many modern structure-guided drug design and discovery techniques. Only the solution NMR based strategy, but not either the X-ray crystallography or cryo-electron microscopy, is available to solve the structure of IDP for further virtual screening.

Keyword ● structural ensemble, coupled folding and binding, conformational selection, c-Myc inhibitors, alpha-synuclein inhibitors

## 1. はじめに

ゲノムプロジェクト進展に伴う比較ゲノム学の成果の1つとして、生物のゲノム中に多数コードされる、生体内で特定のコンパクトな立体構造をとらない天然変性タンパク質 (Intrinsically disordered proteins: IDP)、あるいはタンパク質の部分配列である天然変性領域 (Intrinsically Disordered Region: IDR) の存在が明らかになった<sup>1)</sup>。IDR の中には、同じアミノ酸の連続配列や、少数のアミノ酸の単調な繰り返し配列、いわゆる低複雑性 (low complexity: LC) 領域が含まれる。このうちポリグルタミン領域やジペプチドリピート、アルギニンとグリシンに富む RGG リピートなど、液-液相分離 (LLPS) に関連する LC 領域の多くは、IDR である<sup>2)</sup>。そのため、LLPS が支配する多彩な細胞機能が明らかになるにつれ、創薬標的としての IDP/IDR への関心も高

まった。本稿では、IDP が創薬標的として適しているかどうかについて、いくつかの IDP を直接標的とする低分子探索研究の例を参考にしつつ考察する。なお、特に区別が必要でない箇所については、本稿では IDR も含めて IDP と記す。

## 2. IDP の性質と IDP 創薬の戦略

IDP には以下のような物理化学的・生物学的性質があることが知られている<sup>3,4)</sup>。

- (1) タンパク質表面に露出しており柔軟性に富む
- (2) 他のタンパク質の結合サイトや翻訳後修飾サイトを含む
- (3) promiscuous 相互作用 (単一の結合サイトが複数のタンパク質から認識される)<sup>5)</sup>
- (4) 構造領域に比較して進化的保存性が低い
- (5) アミロイド線維など凝集体を形成しやすい配列が含まれる
- (6) LLPS を起こすタンパク質によく見られる

\*1 東海国立大学機構名古屋大学 大学院創薬科学研究科 教授  
Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University

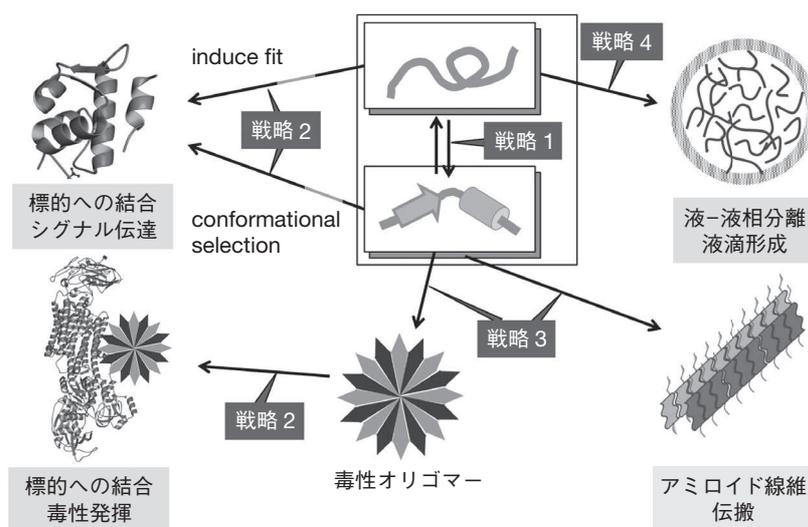


図1 IDP創薬における化合物による介入の戦略 (Fuentesらの総説<sup>11)</sup>を改変、加筆)  
 IDPは溶液中では複数のコンフォメーションの平衡状態にある。戦略1ではIDPに直接相互作用する低分子により、この平衡状態を偏らせることで、パートナー分子との結合を起りにくくしたり、毒性オリゴマーやアミロイド線維の形成を阻害する。相互作用パートナーとの結合時に特定の立体構造をとるIDPは多く、そのメカニズムは「induced fit」または「conformational selection」のいずれかの経路となる。パートナー分子が構造をもつタンパク質の場合には、従来の仮想スクリーニングなどの創薬手法により、パートナー分子を阻害する戦略が効果的である(戦略2)。毒性オリゴマーとその標的受容体の結合阻害薬も、同じ手法で探索可能である。一方、IDPの毒性オリゴマー形成や線維形成が試験管内で容易にモニター可能な場合には、ハイスループットスクリーニング手法などでこの過程を阻害する化合物が探索できる(戦略3)。同様に試験管内あるいは細胞内でLLPSによる液滴形成をモニターしながらそれを阻害する分子の探索が可能である(戦略4)。

- (7) 多重局在性を示すタンパク質によく見られる<sup>6)</sup>  
 (8) 構造をもつタンパク質に比べて、未アノテーションのタンパク質が多い<sup>7)</sup>  
 (9) 構造ドメインに比べて、分子機能未知の領域が多い  
 これらのうち性質1~3により、長大なIDPに複数のタンパク質結合部位が連続するハブ(足場)タンパク質がしばしば観察される。特に疾患関連IDPの多くが、ハブタンパク質であることが知られている。そのためゲノム創薬の手法で創薬標的候補をリストアップする過程において、IDPが目立つようになったとしても不思議ではない。他方、立体構造既知のシグナリング酵素や代謝酵素など、立体構造に指南された創薬(structure-guided drug discovery: SGDD)の手法が適用可能な、新規かつ魅力的な標的は枯渇しつつある。未だ新薬が開発されていない標的が、配列情報解析の結果IDPと予測された場合には、それを標的とすることは避けて通れない。

これらを勘案したうえで、IDP創薬において、特に低分子を探索・設計する際に、IDPが機能ないし分子病態を発現する過程における化合物の代表的な4つの介入戦

略を概観したのが図1である。

### 3. 創薬標的としてのIDPと、それに直接結合する化合物に見られる傾向

これまでいくつかのIDP創薬に関する総説が執筆され、多くはないもののIDPに直接結合する化合物も知られるようになってきた<sup>8,9)</sup>。すでに多くの化合物取得の試みがなされた創薬標的では、がんに関するものと、認知症など神経変性疾患に関するものが多い。後者のいくつかはいわゆるアミロイド病であり、IDPがアミロイド線維や毒性オリゴマーなどの異常凝集体を形成する際に、IDPの構造多型間の平衡に介入する化合物(図1における戦略1)と、多量体化を直接阻害する化合物(同、戦略3)が含まれている。

北京大学のRuanらは、c-Myc阻害剤などのIDP直接阻害剤を30のグループに分類し、その化学的性質の記述子を統計的に解析し、FDA既認可の医薬品と比較した<sup>8)</sup>。その結果、IDP阻害剤は、FDA医薬品に比べて、

疎水性と芳香族性が高く、また環状化合物として環の数も多い傾向がある、としている。注意すべきは、解析対象のIDP阻害剤は試験管内で活性があるシード化合物が中心で、他方、比較対象であるFDA医薬品は経口薬が多数含まれている点である。この差は母集団の性質にそもそも存在するバイアスの差とも考えられる。

#### 4. IDP創薬を加速するバイオインフォマティクス

さて、第2項でも述べたように、IDP/IDRは構造をもつタンパク質と較べて、その分子機能のアノテーションが進んでいない分子が多いことが知られている。さらに、鍵と鍵穴のスキームに従い、生理的な酵素基質やリガンドを参考にしたり、形状からポケットを探索するなどしたあとに阻害剤を設計するという、化合物による単純な介入戦略が適用しがたい。それは前述の図1のように、IDP/IDRが生理機能や病態を発揮するためのメカニズムが複数想定されるためである。そのためIDP創薬を進めるためには、まず標的となるIDP/IDRの機能を、系統だてて予測しなければならない。

やや古くなるが2014年にvan der LeeらがまとめたIDPの機能分類に関する総説には<sup>7)</sup>、バイオインフォマティクスと実験を組み合わせてこれを効率よく予測するためのスキームが詳細に記されている。具体的には、(1) まずは候補タンパク質のIDRを複数のサーバや予測プログラムを利用して予測したあと、(2) タンパク質相互作用に関わる認識モチーフ(リニアモチーフ)を予測してその相互作用相手をリスト化する、(3) 並行してリン酸化などの翻訳後修飾に関わる残基を予測により特定する、(4) 他方、ドメイン全体がIDRであるドメインがいくつか知られているので、その有無を探す、(5) 明確な配列モチーフがない場合でもIDPの相互作用に関わる領域に特徴的なアミノ酸組成などを指標に、重要な部位を予測する、といった解析法が紹介されている。筆者はこの解析スキームにさらに、(6) タンパク質の細胞内凝集やアミロイド形成しやすいアミノ酸領域の予測と、(7) LLPSに関与する領域の予測、の2項目を加えたい。予測ののちに、組換えタンパク質を利用して試験管内で予測が検証できれば、化合物スクリーニング系の構築も容易になるはずである。

#### 5. IDP創薬を加速する溶液NMRとインシリコ創薬の併用スキーム

D. E. Shaw研究所(創薬を対象とした分子動力学(MD)計算に特化したコンピュータを開発している米国企業)のRobustelliらは、最近、溶液NMRとMDシミュレーションを組み合わせて $\alpha$ -シヌクレインの凝集阻害薬を探索・開発するとともに、そこに用いられた手法を公開した<sup>10)</sup>。 $\alpha$ -シヌクレインは140アミノ酸のIDPであり、微小管や細胞膜に結合し、神経細胞が正常に機能するのに必要なタンパク質である。最初期にハイスループットスクリーニングにより得られてきた化合物fasudilと $\alpha$ -シヌクレインを共存させた長時間のMD計算により、以前にNMR法で決定されていたIDP/薬剤複合体の構造がMD計算のみでも再現できた、と報告した。ただしMD計算からは、化合物に複数存在する官能基とIDPの相互作用が同時に起こるわけではなく、その一部が交互にIDPと接触するという、動的な分子認識機構をとるものであった。分子設計により個別の相互作用を最適化しつつ、変化した相互作用様式やポケット構造を逐次MD計算とNMR法で確認・検証して反映していくことで、化合物最適化が達成できた。

図2は、Robustelliらの報告に着想を得て、IDPの柔軟な性質を克服しつつ計算科学による創薬支援を活用するために適した、溶液NMR実験と仮想スクリーニングの「混合サイクル」を示した。前述のようにIDPは単独では明確な安定な立体構造をもたないため、ポケットの立体構造も定まらず、仮想スクリーニングによる高速化の恩恵は受けにくい。反対に、結合する候補化合物が入手できれば、化合物に誘起されたポケットの立体構造をNMRにより決定することはさほど難しくない。しかし、メディシナルケミストの手による化合物展開を経て誘導体を得られた場合、その誘導体により誘起されるIDP上のポケット構造は、母体となったポケット構造とは異なる可能性が高いことも、併せて示された。そのため、アフィニティーの高い化合物を得るためには、新たな候補化合物が発見・合成されるたびに、その複合体構造を何回でも決定していくという、図2のサイクルを連続的に回す必要があると考えられる。

#### 6. おわりに

本稿では、promiscuousな配列認識や複数の標的タン

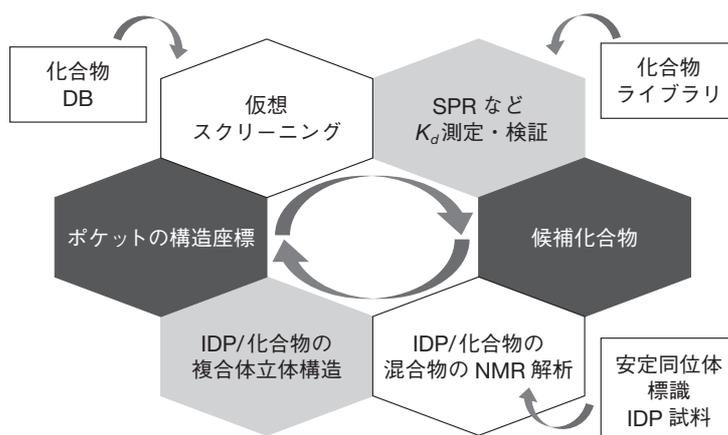


図2 核磁気共鳴法（NMR）と仮想スクリーニング手法を併用したIDPを標的とした創薬の加速戦略

IDP単独では複数のコンフォーマーの平衡状態であるため、溶液NMRを測定したとしても立体構造は収束しない。またIDP単独では特定の立体構造をもたないため、仮想スクリーニングによる候補化合物は選定できない。しかし小規模のスクリーニングで標的IDPに結合する最初期の候補化合物が得られれば、溶液NMRで結合状態の複合体の構造決定が可能である（図中、下半分のサイクル）。ポケットの座標が得られれば、従来のSGDD手法により上半分のサイクルを回すことができ、サイクルが完結する。

パク質に結合するという性質ゆえに、IDPが創薬標的として着目されやすいと述べた。そのうえで、IDP創薬を加速する仮想スクリーニング技術などの恩恵を受けるためには、溶液NMR法が必須であると考えられた。特に、IDP上の薬物結合ポケットはcrypticであり、化合物の存在により誘起され、さらに化合物の化学構造がわずかも変化するとポケット構造も変化することがわかった。そのため、計算にも構造決定にも、通常の創薬以上に負担がかかる可能性を覚悟しなければならない。にもかかわらず、今後、LLPSの細胞内機能解明が進めば、さらに魅力的な天然変性状態の創薬標的は増えるであろう。IDP創薬の実践的手法も併せて進化し、新しい創薬理論の誕生につながるかも知れない。

#### 参考文献

- 1) 西川建, 生物物理, **49**, 004-010 (2009)
- 2) 吉澤拓也, 生物物理, **59**, 030-031 (2019)
- 3) 廣明秀一, 相分離生物学の全貌 (現代化学増刊46), 124-128

- (2020)
- 4) 廣明秀一, 医学のあゆみ, **278**, 653-662 (2021)
- 5) 福地佐斗志他, 細胞工学, **33**, 764-769 (2014)
- 6) 太田元規他, 生物物理, **57**, 085-089 (2017)
- 7) van der Lee, R., *et al.*, *Chem. Rev.*, **114**, 6589-6631 (2014)
- 8) Ruan, H., *et al.*, *Drug Discov. Today*, **24**, 217-227 (2019)
- 9) Hosoya, Y., *et al.*, *Molecules*, **26**, 2118 (2021)
- 10) Robustelli, P., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **144**, 2501-2510 (2022)
- 11) Fuertes, G., *et al.*, *Intrinsically Disordered Proteins*, 275-327 (2019)

#### AUTHOR



廣明 秀一 (ひろあき ひでかず)

1992年 大阪大学大学院薬学研究所博士課程修了 博士 (薬学)  
 同年 日本ロシュ株式会社 研究所分子遺伝部  
 1996年 株式会社生物分子工学研究所 研究員  
 2001年 横浜市立大学大学院総合理学研究科超分子システム科学専攻 助教授  
 2007年 神戸大学大学院医学研究科 特命教授  
 2011年 名古屋大学大学院理学研究科 教授  
 2012年 名古屋大学大学院創薬科学研究科 教授  
 2013年より 名古屋大学細胞生理学研究センター長 (併任)  
 2021年より 名古屋大学大学院創薬科学研究科長 (併任)

