

2013 年度(平成 25 年度)

## 博士論文

G タンパク質共役型受容体を標的としたドラッグデザイン

吉川 寧

## 目次

第 1 章 緒言	
1.1 タンパク質立体構造を用いたドラッグデザイン	1
1.2 GPCR の機能と分類	4
1.3 GPCR の構造予測とドラッグデザイン	5
1.4 本研究の目的	10
参考文献	11
第 2 章 CXCR4–FC131 複合体モデル構造の構築	
2.1 緒言	13
2.2 実験と方法	15
2.3 結果と考察	18
2.4 まとめ	25
参考文献	26
第 3 章 GPCR–リガンド複合体モデル構築法の開発	
3.1 緒言	28
3.2 実験と方法	30
3.3 結果と考察	34
3.4 まとめ	45
参考文献	46
第 4 章 GPCR–リガンド複合体モデル構築法の改良と CXCR7 バーチャルスクリーニングへの応用	
4.1 緒言	48
4.2 実験と方法	50
4.3 結果と考察	55
4.4 まとめ	83
参考文献	84
第 5 章 結論	87
第 6 章 謝辞	90
公表論文	91

## 略語

GPCR, G-protein-coupled receptor; CXCR4, CXC Chemokine receptor 4; CXCR7, CXC Chemokine receptor 7; HIV, human immunodeficiency virus; LGA, Lamarckian genetic algorithm; MD, molecular dynamics; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; PDB, protein data bank; RMS, root mean square; RMSD, root mean square deviation; SBVS, Structure-Based Virtual Screening; SAR, structure activity relationships; SCR, structure conserved region; SD, standard deviation; SDM, site-directed mutagenesis; SVR, structure variable region; TM, transmembrane; TPRP, the Target Protein Research Program; VDW, van der Waals;

## 第1章 緒言

### 1.1 タンパク質立体構造を用いたドラッグデザイン

近年のコンピュータと計算科学技術の発達により、創薬の現場ではコンピュータは新薬創製に積極的に活用されている。探索研究段階において既知の実験情報を用いて合理的に新規開発する手法は合理的医薬品設計 (Rational drug design) と呼ばれる。特にターゲット受容体とそれに結合したリガンドの構造情報を用いて、新規のリガンドを発見する手法はタンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計 (Structure-based drug design; SBDD) と呼ばれる。この手法を用いたエネルギー的に安定な受容体とリガンドの相互作用の予測結果 (例: 静電相互作用、水素結合、ファンデルワールス及び疎水性の接触) は、計算化学者やメディシナルケミストにとって、ドラッグデザインを行う際の有用な情報となる。これらの情報を利用すれば、リガンドの親和性に影響を与えずに水溶性や選択性を上昇させることも可能になる。また、タンパク質とリガンドの構造情報をリード化合物の最適化に利用され、実際に上市されている医薬品も増えている<sup>1,2</sup>。

SBDD を活用して開発された有名な医薬品の例として、HIV (Human immunodeficiency virus) プロテアーゼ阻害剤である nelfinavir, amprenavir, lopinavir や、インフルエンザ治療薬として知られる、ノイラミニダーゼ阻害剤の zanamivir や oseltamivir などの例がある<sup>3</sup>。他の例としては、主に癌治療薬のターゲットとして注目されているキナーゼ阻害剤がある。キナーゼは数百の類縁タンパク質から構成されており、これらの中から、1 つまたは複数のキナーゼターゲットに対する選択的な阻害剤を開発する目的で行われている。良く知られたキナーゼ阻害剤の例として BCR-ABL 阻害剤である imatinib (Gleevec, Novartis) がある<sup>4</sup>。この薬は慢性骨髄性白血病の治療薬として 2001 年に上市された。その他、キナーゼ阻害剤に関しては世界的に多くの研究がなされ、いくつかの癌に対して有効な治療薬 (erlotinib/Tarceva, dasatinib/Sprycel, nilotinib/Tasigna, sunitinib/Sutent, lapatinib/Tykerb) が開発されている。

タンパク質の立体構造情報を利用して、コンピュータを用いて、化合物ライブラリの中から活性化化合物を予測する手法を構造ベースのバーチャルスクリーニング (Structure-based virtual screening) もしくはイン

シリコスクリーニング (*in silico screening*) と呼ばれる。この手法は、タンパク質 X 線結晶構造を用いてタンパク質のリガンド結合ポケットに適合する化合物を探索する。ドッキングさせる際は、リガンドのエネルギー的に許容されるコンフォメーションを探索し、ドッキングさせる。また、結合に重要な相互作用が推定できる場合は、3D ファーマコフォアを利用することがある。そして、VDW 相互作用や水素結合などの相互作用のエネルギーを用いて、仮想の化合物ライブラリ中の優先順位をつけるためのスコア計算に用いられ、活性候補化合物の選抜に利用される。このようなバーチャルスクリーニングはハイスループットスクリーニング (High-throughput screening; HTS) の相補的なアプローチとして広く用いられており、多数の報告例がある<sup>5-7</sup>。

この方法は、既存の化合物ライブラリや市販の化合物ライブラリ、また合成可能な化合物で構成されるバーチャルライブラリ中の化合物に対して行い、ヒット化合物候補の優先付けを行う。また、ランダムスクリーニングと比べて高いヒット率を持つターゲット用のフォーカストライブラリ (Focused library) を作る事もある。これは HTS 向きではないスクリーニングアッセイの場合に有用である。またバーチャルスクリーニングは、既存の HTS ライブラリに存在しない母核を持つ化合物を発見でき、購入すべき化合物を検討する際の参考になる。

創薬プロジェクトにおいて、一般的に好ましくない物理化学的な性質 (例えば大きな分子量や高い脂溶性のもの) や好ましくない官能基を持つ分子は除去される。これはプロジェクトの目的に適した化合物を作るためである。例えば中枢神経系の創薬ターゲットでは、酸性の官能基や高い極性表面積を持つものは中枢系では排除されがちなので予め除去される。高い反応性の官能基を持つ化合物などのメディシナルケミストにとって好まれない化合物もこの段階で除去される。ヒット化合物の数やヒット率だけでなく、このようなフィルタリングを行うことはメディシナルケミストに有用な化合物を提供する際に重要である。また、多くの種類の母核を持つヒット化合物があれば、良いリード化合物につながる可能性が高まる。これは、類似した多くのアナログ化合物を見つける事よりも価値のあることであり、タンパク質の構造ベースのバーチャルスクリーニングがリガンドベースの類似性検索に対する利点である。

バーチャルスクリーニングを行うにあたり、まずタンパク質の立体構造情報が必要となる。タンパク質の X 線結晶構造解析によって得られた立体構造から、結合サイトを構成している低分子との相互作用や水分

子の情報が得られるためである。リガンド結合サイトにおいて、そのリガンドの結合に必須な”hot spot”を決めることができれば、バーチャルスクリーニング結果からヒット化合物を選抜する際の有用な情報になり得る。もし X 線結晶構造が得られない場合は、ホモロジーモデリング法によりタンパク質の三次元構造を予測する。経験的に、配列一致度が 30%以上あればタンパク質の全体的な立体構造が同じであると考えられているので、遺伝的に関連のある類縁タンパク質の構造情報に基づき、立体構造を予測することができる。このモデル構造の精度は、既知の結晶構造が、どの程度の数が見つかっているか、またどの程度の配列一致度のものが明らかにされているかによって変わる<sup>8</sup>。例えばキナーゼのような、多くの結晶構造が明らかにされているものに対しては、高い精度でのモデル構造を構築する事が可能である。

タンパク質とリガンドの複合体の X 線結晶構造を用いる SBDD は、製薬企業の創薬研究に大きな影響を与えており、多くの創薬プロジェクトに組み込まれている。しかし、全ての創薬ターゲットのタンパク質に対して結晶構造が得られている訳ではない。このような場合は、メディシナルケミストの経験とリガンドのみの情報を用いて研究を行わなければならない。比較的最近まで、G タンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) はこのような状況に置かれていたが、近年の X 線結晶構造解析の進展により、GPCR についてもキナーゼやプロテアーゼなどの他のファミリーと同様に SBDD によるドラッグデザインが可能になりつつある<sup>9</sup>。

## 1.2 GPCR の機能と分類

GPCR は、7 回膜貫通型 (Seven transmembrane; 7TM) 受容体として知られている。GPCR は細胞膜内に発現しており、細胞外からの多様な反応を受け取り、ファーストメッセンジャーとして情報伝達を仲介する。GPCR は生体内で分泌された神経伝達物質やホルモンなどの内在性のリガンドや、匂い物質などの外来性の分子を認識する。ヒトにおいては、800 以上の GPCR によりスーパーファミリーを構成している。嗅覚受容体を除いても 360 以上の GPCR が存在する。GRAFs 分類法<sup>10</sup>では、GPCR は 5 つのファミリーに分けられる。ロドプシンファミリー (Kolakowski の分類<sup>11</sup>では、クラス A と分類される)、Adhesion 及びセクレチン受容体ファミリー (この 2 つは、クラス B として分類される)、グルタミン酸受容体ファミリーは (クラス C)、Frizzled 受容体ファミリー (クラス F) がある。細胞内のタンパク質とカップリングして、GPCR は細胞の機能外の機能を生化学的なシグナルとして、生理的、病理学的な機能に関わる。このような機能を持つために、GPCR は多くの疾患に関わり、医薬品市場で最も大きなシェアを持つ創薬ターゲットとなっており<sup>12</sup>、現在でも創薬における最も重要なターゲットとして、非常に多くの研究がなされている。

### 1.3 GPCR の構造予測と用いたドラッグデザイン

#### GPCR のホモロジーモデリングとドッキング

2008 年に  $\beta 2$  アドレナリン受容体の立体構造が明らかにされて以来、10 以上の GPCR の立体構造が明らかにされているが、それまでは 2000 年に立体構造が明らかにされたウシロドプシンの X 線結晶構造に基づいたホモロジーモデリングがなされていた。

多くの成功例は、受容体と低分子リガンドの複合体を構築する際に生化学的な実験やリガンドの構造活性相関 (Structure–activity relationship; SAR) などの情報を活用している。Costanzi らは、ウシロドプシンを鋳型構造として構築した  $\beta 2$  アドレナリン受容体とその X 線結晶構造を比較し、ホモロジーモデルの精度を評価した<sup>13</sup>。GPCR の細胞外第 2 ループ (Extracellular loop 2; ECL2) の構造を精度よく予測することは難しく、*de novo* 予測を行った結果では、リガンド結合ポケットを塞いでいた。しかし、結晶構造リガンドの *crazolol* の変異実験 (Site–directed mutagenesis; SDM) から想定される相互作用を用いて、ドッキング構造をマニュアルで調整することで、予測精度を向上させることができた。この研究では、それぞれのアミノ酸残基のわずかな間違いによる、不正確な形状のポケットが、リガンドの正しい結合ポーズの予測の妨げになることを示している。そのため、複数のモデルを生成し、SDM や SAR の情報を用いることが、精度の高いモデルを構築するために重要である。

Wacker らは、低分子リガンドが結合している  $\beta 2$  アドレナリン受容体の 3 つの X 線結晶構造 (*crazolol* と *timolol*) に対して 5 つのリガンドを用いてクロスドッキングを行った<sup>14</sup>。結晶構造リガンドそのものを用いた結果が、最も精度が良かったが、リガンド結合サイトは構造的に保存されているため、その他のリガンドの場合でも結果は十分に精度の高いモデルを構築する事ができた。

Ivanov らは、様々な既知リガンドをロドプシンと  $\beta 2$  アドレナリン受容体構造に基づいたアデノシン A2a 受容体のホモロジーモデルにドッキングさせた<sup>15</sup>。ウシロドプシンに基づくモデル構造に比べ、 $\beta 2$  アドレナリン受容体を鋳型とすることでより精度の高いモデルを構築することができた。ZM241385 のドッキングは、水分子を考慮することや、実験情報による拘束を用いる事によって改善できると期待される。NECA



等のアゴニストのモデル構築の結果、リガンドのリボース環が Ser277<sup>7,42</sup> や Thr88<sup>3,36</sup> と相互作用していた。これは、アゴニストが関与し、アンタゴニストには関与しないという実験結果からの予測と矛盾しない。

de Graaf と Rognan は  $\beta 2$  アドレナリン受容体の X 線結晶構造に基づき、パーシャルアゴニストとフルアゴニストが結合するモデル構造を構築した<sup>16</sup>。このモデル構造は、リガンドのカテコールアミンの水酸基と相互作用する受容体構造の Ser<sup>5,32</sup> と Ser<sup>5,46</sup> のロータマーを変更している。これらの構造に対し、デコイとパーシャル、フルアゴニストのドッキング計算を行ったところ、各リガンドを精度良く分離することができた。著者らは、このような改変モデル構造を用いて、アゴニストを同定することが可能になるとしている。

上述のとおり、近年の GPCR の X 線結晶構造解析の発展は、GPCR のホモロジーモデリング及びリガンドとの複合体のモデル構築にも大きく影響を与えている。また、それぞれの受容体構造を用いた予測の検証ができるようになるので、受容体モデル構築法の改良に生かせると期待される。

## GPCR Dock

Michino らはコミュニティーワイドで GPCR-リガンド複合体モデリングのアセスメント (Community-wide assessment of GPCR structure modeling and ligand docking; GPCR Dock 2008) を行い、当時の GPCR 構造予測精度の評価を試みた<sup>17</sup>。X 線結晶構造解析を行ったアデノシン A2a 受容体の構造を公開する前に、参加グループが構造予測を行い、結果を比較することで予測精度を評価している。29 のグループが合計 206 モデル構造を提出した。膜貫通ヘリックス部分は全体的に良く予測できていたが、ループ部分については予測が難しい事が明らかになった。ドッキングについても予測結果に大きなばらつきが見られた。最も良いモデルではリガンドの重原子の RMSD は 2.8 Å で、結合サイトの残基の RMSD は 3.4 Å であり、SAR, SDM などの実験情報を利用すると精度の高いモデル構造に結びつくことが示唆された。

同様のアセスメントが 2010 年に開催され、この時のターゲット受容体は、ドーパミン D3 受容体と低分子アンタゴニスト (eticlopride)、CXCR4 との低分子アンタゴニスト (IT1t) と CXCR4 と環状ペプチド (CVX15) であった<sup>18</sup>。35 グループが、結晶構造 GPCR Dock 2008 と同様に、公開の前に受容体構造の予測を行った。比較的近縁な鋳型構造が存在するドーパミン D3 受容体では、生化学的な情報や SAR の情報を参考にして精度の高いモデル構造を構築できていた。一方で、CXCR4 の複合体は、相互作用

の情報が少なかったことと、既知構造から遠縁であったこともあり、正確な予測は難しい事が分かった。また、GPCR の構造的に保存されている TM 領域が数多く決定されたとしても、分子設計者は結合に影響のあるリガンド結合領域の構造の多様性とヘリックス構造を考慮する必要がある事も明らかになった。CXCR4 の TM2 のキックと回転など、いくつかの点は実験データを用いて予測することは可能と考えられたが、多くの参加者は正しく予測することはできなかった。

2013 年には、セロトニン受容体と ergotamine 複合体及び Class F に属する GPCR である、smoothened 受容体について、同様のアセスメント(GPCR Dock 2013)が行われており、結果の報告が待たれる<sup>19</sup>。

### GPCR の立体構造に対するバーチャルスクリーニング

GPCR の立体構造を用いたバーチャルスクリーニングは以前より興味を持たれており、X 線結晶構造及びホモロジーモデルを用いた成功例が報告されている。

Carlsson らは、アデノシン A2a 受容体-T4L 複合体の X 線構造の構造を用いて、140 万の化合物を用いてバーチャルスクリーニングを行った。選抜された 20 化合物のうち、7 化合物(35%)が、200 nM–8.8 mM のアンタゴニスト活性を有していた<sup>20</sup>。ヒット化合物の結合様式は、X 線構造と ZM241385 と同じように Asn253<sup>6.55</sup> と Glu169<sup>ECL2</sup> と水素結合としていた。ほとんどのヒット化合物は、アデノシン A2a に対する活性が比較的低いにも関わらず、よく似ているアデノシン A1 及び A3 受容体に対する選択性が見られた。同様に Katritch らはアデノシン A2a-T4L の構造を用いて約 430 万の化合物を用いてバーチャルスクリーニングを行った<sup>21</sup>。アッセイした 56 化合物のうち 23 化合物(41%)が 30 nM–10 mM の活性を持っていた。Carlsson らの結果と同様に、全てのヒット化合物はアンタゴニストであったが、A1 サブタイプに対しても弱い活性を持つ化合物も存在した。ヒット化合物の結合様式は Carlsson らのモデル構造と良く一致していた。ヒット化合物の 1 つは予想外に高いアデノシン A1 受容体アンタゴニスト( $K_i=6\text{nM}$ )活性を保ち、アデノシン A2a 受容体とは 20 倍の選択性を持っていた。アデノシン A2a 受容体に対するバーチャルスクリーニングからのヒット化合物は、化合物最適化の指標の一つである ligand efficiency (LE) 値<sup>22</sup>も、比較的良い値をであった。この事は、GPCR に対するバーチャルスクリーニングの有用性を示している。

Kolbらはβ2アドレナリン受容体の結晶構造を用いて、約100万のリード様化合物ライブラリを用いてバーチャルスクリーニングを行った<sup>23</sup>。25の候補化合物から、6化合物のヒット化合物( $K_i=9\text{ nM}-3.2\text{ mM}$ )を同定した。これは24%のヒット率であり、大まかに2つのケミカルクラスに分類された。Topiolらはβ2アドレナリン受容体を用いて、in-houseと市販化合物ライブラリを用いてバーチャルスクリーニングを行った<sup>24,25</sup>。その結果、化合物のヒット率は、in-houseと市販化合物の2つのデータベースのそれぞれ、36%、12%のヒット率( $K_i\ 0.1\text{ nM}-21\text{ mM}$ と $K_i\ 14\text{ nM}-4.3\text{ mM}$ )であった。これはランダムに選択した化合物セットのスクリーニング結果のヒット率0.3%と比べ良い結果であった。両方のスクリーニング結果では、β2受容体のよく知られているhydroxylamineケモタイプが存在していた。

de Graafら<sup>26</sup>は、ヒスタミンH1受容体に対する、構造ベースのバーチャルフラグメントスクリーニング法を開発し、ヒスタミンH1受容体アンタゴニスト探索に適用した。この方法は、分子ドッキングからの化合物の選抜に相互作用フィンガープリントを用いている。その結果、73%という非常に高いヒット率でのフラグメント様(重原子数22原子以下)のヒスタミンH1受容体アンタゴニストを発見した。活性値を評価した26のフラグメントのうち、19化合物は、6nMから10μMの親和性を持っていた。

Carlssonら<sup>27</sup>は、上述のアデノシンA2a受容体バーチャルスクリーニングに加えてドーパミンD3受容体に対するバーチャルスクリーニングを行っている。この研究では、結晶構造を用いた場合とホモロジーモデリングを用いた場合の両方の構造を用いて、それぞれの結果を比較している。まず、ホモロジーモデルに対して約330万の化合物を用いてドッキング計算を行い、26の高いランキングの化合物が結合能を測定した。その結果、6化合物が、0.2μM-3.1μMの活性を持っていた。続いて、公開された結晶構造を用いて、ドッキング計算を再度行った。選抜された25化合物のうち、5化合物が0.3-3.0μMの阻害活性を有していた。また、ホモロジーモデルからのバーチャルスクリーニングで得られた活性リガンドは、化合物最適化により最適化81nMまで親和性が向上させることに成功している。

## GPCRの立体構造情報を用いたSBDD

最近のGPCRのX線結晶構造数の増加は、バーチャルスクリーニングだけでなく、化合物のリード最適化にも大きな影響を与えている。Pastorinらは、ZM241385が結合したアデノシンA2a受容体を鋳型構

造として、アデノシン A2a 受容体のホモロジーモデリングを行い、新規 triazolopyrimidine 誘導体を発見した<sup>28</sup>。また、モデル構造からアデノシン A3 受容体の E2 ループの大きなアミノ酸 (Val169) が、ヘテロ環のコアのアミノ基の置換において、アデノシン A2a、A3 受容体の選択性に関わることが示唆された。

Soriano-Ursua<sup>29</sup>らは、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体のモデル構造を参考にして、既存のジオールアゴニストより高い活性を持つホウ素含有アゴニストを設計に成功した。服部らのグループは、いくつかの $\beta$ 3 アドレナリン受容体アゴニストについて、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体を利用して、合理的に説明した<sup>30</sup>。モデル構造上選択的リガンドは、結合サイトの構造が他のサブタイプとは異なる部分に伸びていた。

Allegretti はケモカイン CXCR1 と、非拮抗的 CXCL8-induced human PMN chemotaxis の阻害剤である (R)-ketoprofen の分子モデルを構築した<sup>31</sup>。モデル構造は、リガンドと活性に重要な残基の相互作用をうまく説明でき、アラニンスキャニングの結果と photochemical cross-linking とも矛盾しなかった。この研究の結果は、臓器機能障害治療薬として臨床試験に進んでいる repertaxin の発見に至っている。

Sela らは、20 以上の様々な GPCR に対して構造ベースのスクリーニングとリード最適化で成功を収めている<sup>32</sup>。4 年のうちに 4 つの臨床試験化合物を発見している。

これまでに記した GPCR バーチャルスクリーニング及びリード最適化の成功例は、ロドプシンファミリーに属する GPCR は SBDD に適している可能性を示している。比較的脂溶性もしくは芳香性で、水素結合を形成するようなキーとなる残基が存在し、深いリガンド結合ポケットを持つターゲットはインシリコドッキングに適したターゲットになりうる<sup>32</sup>。

## 1.4 本研究の目的

本研究では、GPCR について、リガンドとの複合体構造モデルを構築する手法の開発及び、バーチャルスクリーニングを用いた GPCR に対する新規のリガンドの発見への応用を目的としている。GPCR に対するドラッグデザイン手法の開発と応用は、新規医薬品開発の発展に貢献することが期待される。

第 2 章では、CXC ケモカイン受容体 4 (CXC chemokine receptor 4; CXCR4) の X 線結晶構造に対して、環状ペプチドリガンドである FC131 の NMR 構造を利用してドッキング計算を行い、リガンドと受容体の相互作用の検討を行った。第 3 章では、新しい GPCR ホモロジーモデリングとリガンドドッキング手法を開発し、その精度を検証した。また、GPCR Dock 2010 に参加し、本手法の予測精度を検討した。第 4 章では、第 3 章のモデリング手法をさらに改良し、複数鋳型に基づく手法でホモロジーモデリング法を開発した。この手法を用いて CXC ケモカイン受容体 7 (CXC chemokine receptor 7; CXCR7) とリガンドの複合体モデルを構築した。このモデル構造を利用してバーチャルスクリーニングを行い、市販化合物から 623 の候補化合物を選抜した。生物学的なアッセイを行い、21 化合物の新規 CXCR7 アンタゴニストの発見に結びついた研究について述べる。

## 参考文献

1. Congreve, M., Murray, C. W. & Blundell, T. L. Structural biology and drug discovery. *Drug Discov. Today* **10**, 895–907 (2005).
2. Mittl, P. R. & Grütter, M. G. Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 769–775 (2006).
3. von Itzstein, M. *et al.* Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**, 418–423 (1993).
4. Druker, B. J. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv. Cancer Res.* **91**, 1–30 (2004).
5. McInnes, C. Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 494–502 (2007).
6. Talele, T. T., Khedkar, S. A. & Rigby, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. *Curr. Top. Med. Chem.* **10**, 127–141 (2010).
7. Villoutreix, B. O., Eudes, R. & Miteva, M. A. Structure-based virtual ligand screening: recent success stories. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **12**, 1000–1016 (2009).
8. Cavasotto, C. N. & Phatak, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov. Today* **14**, 676–683 (2009).
9. Schlyer, S. & Horuk, R. I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov. Today* **11**, 481–493 (2006).
10. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).
11. Kolakowski, L. F., Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* **2**, 1–7 (1994).
12. Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993–996 (2006).
13. Costanzi, S. On the applicability of GPCR homology models to computer-aided drug discovery: a comparison between in silico and crystal structures of the beta2-adrenergic receptor. *J. Med. Chem.* **51**, 2907–2914 (2008).
14. Wacker, D. *et al.* Conserved binding mode of human beta2 adrenergic receptor inverse agonists and antagonist revealed by X-ray crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 11443–11445 (2010).
15. Ivanov, A. A., Barak, D. & Jacobson, K. A. Evaluation of homology modeling of G-protein-coupled receptors in light of the A(2A) adenosine receptor crystallographic structure. *J. Med. Chem.* **52**, 3284–3292 (2009).
16. de Graaf, C. & Rognan, D. Selective structure-based virtual screening for full and partial agonists of the beta2 adrenergic receptor. *J. Med. Chem.* **51**, 4978–4985 (2008).
17. Michino, M. *et al.* Community-wide assessment of GPCR structure modelling and ligand docking: GPCR Dock 2008. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 455–463 (2009).
18. Kufareva, I., Rueda, M., Katritch, V., Stevens, R. C. & Abagyan, R. Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment. *Structure* **19**, 1108–1126 (2011).
19. <http://gpcr.scripps.edu/GPCRDock2013/>
20. Carlsson, J. *et al.* Structure-based discovery of A2A adenosine receptor ligands. *J. Med. Chem.* **53**, 3748–3755 (2010).
21. Katritch, V. *et al.* Structure-based discovery of novel chemotypes for adenosine A(2A) receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **53**, 1799–1809 (2010).
22. Hopkins, A. L., Groom, C. R. & Alex, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **9**, 430–431 (2004).
23. Kolb, P. *et al.* Structure-based discovery of beta2-adrenergic receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6843–6848 (2009).
24. Topiol, S. & Sabio, M. Use of the X-ray structure of the Beta2-adrenergic receptor for drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 1598–1602 (2008).
25. Sabio, M., Jones, K. & Topiol, S. Use of the X-ray structure of the beta2-adrenergic receptor for drug discovery. Part 2: Identification of active compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 5391–5395 (2008).
26. De Graaf, C. *et al.* Crystal structure-based virtual screening for fragment-like ligands of the human histamine H(1) receptor. *J. Med. Chem.* **54**, 8195–8206 (2011).
27. Carlsson, J. *et al.* Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 769–778 (2011).

28. Pastorin, G. *et al.* Synthesis and pharmacological characterization of a new series of 5,7-disubstituted-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as adenosine receptor antagonists: A preliminary inspection of ligand-receptor recognition process. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2524–2536 (2010).
29. Soriano-Ursúa, M. A., Trujillo-Ferrara, J. G. & Correa-Basurto, J. Scope and difficulty in generating theoretical insights regarding ligand recognition and activation of the beta 2 adrenergic receptor. *J. Med. Chem.* **53**, 923–932 (2010).
30. Allegretti, M. *et al.* 2-Arylpropionic CXC chemokine receptor 1 (CXCR1) ligands as novel noncompetitive CXCL8 inhibitors. *J. Med. Chem.* **48**, 4312–4331 (2005).
31. Sela, I. *et al.* G protein coupled receptors -in silico drug discovery and design. *Curr. Top. Med. Chem.* **10**, 638–656 (2010).
32. Bondensgaard, K. *et al.* Recognition of privileged structures by G-protein coupled receptors. *J. Med. Chem.* **47**, 888–899 (2004).

## 第 2 章 CXCR4-FC131 複合体モデル構造の構築

### 2.1 緒言

ケモカイン受容体ファミリーは、GPCR 内のファミリーの一つであり、ケモカインと結合する受容体である<sup>1,2</sup>。ケモカイン受容体の一つである CXCR4 は、CXCL12 (SDF-1a, ストローマ細胞由来因子 1a と呼ばれる) を内在性リガンドとし、免疫システムにおける白血球遊走、前駆細胞の遊走<sup>3</sup>、循環器系<sup>4</sup>、造血<sup>5</sup>、及び中枢神経系<sup>6,7</sup> における発生に関わる。さらに、CXCR4 は病態生理学に、乳癌の転移<sup>8</sup>、HIV 感染<sup>9,10</sup>、白血病 や関節リウマチ<sup>11</sup> との関連が示されており、魅力的な創薬ターゲットと考えられている。

これまでに、我々は CXCR4 に対する複数のペプチドアンタゴニストを同定しており、その一つである T140 は 14 残基からなる環状ペプチドであり、カプトガニの抗菌ペプチドに対する構造活性相関研究から見いだされた<sup>12,13</sup>。T140 とその類縁体は、HIV-1 エントリー阻害剤<sup>12</sup>、抗癌剤<sup>14,15</sup>、抗リウマチ剤<sup>16</sup> として作用する。FC131 は T140 のアナログの構造活性相関研究に基づきデザインされた環状ペプチドライブラリから同定され(図 1)<sup>17</sup>、この構造活性相関研究では、D-Tyr1, Arg3, Nal4 の 3 残基が CXCR4 の結合に必須であることが示されている<sup>18,19</sup>。

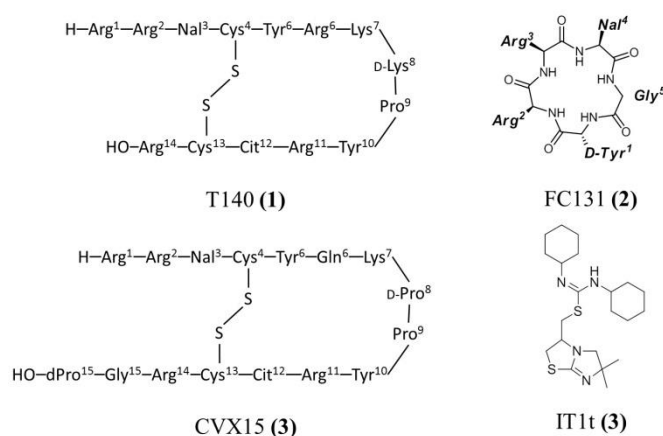


図 1. T140 (1) , FC131 (2) , CVX15 (3) , IT1t (4) の構造。

CXCR4 とそのアンタゴニストの立体的な結合様式を理解することは、CXCR4 に対する低分子アンタゴニストの開発を行う際に有用である。これまでに、我々は FC131 とその類縁体の 3 次元構造 NMR 研究



により解明している<sup>18,19</sup>。また、いくつかのファーマコフォアモデルおよびホモロジーモデリング法で構築された CXCR4 との結合モデルについての研究が報告されている<sup>20-22</sup>。しかし、他の既知の GPCR 構造からの CXCR4 のホモロジーモデル構築は、鋳型構造となる GPCR のアミノ酸配列の低い配列一致度のために結晶構造そのものを用いた場合より精度が低い。近年、CXCR4-CVX15とCXCR4-IT1tの2つの CXCR4-アンタゴニスト複合体結晶構造が公開された<sup>23</sup>。そこで本研究では、CXCR4-CVX15 複合体の結晶構造を用いて、CXCR4 と FC131 及びそのアナログとの複合体モデル構築を試みた。

## 2.2 実験と方法

環状ペプタペプチドである FC131 は回転可能な結合角が多いフレキシブルなペプチドリガンドであるが、AutoDock<sup>24</sup>を用いた CXCR4 に対するドッキング計算では、その環状部分コンフォメーションは新たに生成されない。この問題を解決するため、ドッキング計算を行う前にリガンドの MD 計算を行って、計算結果をサンプリングし、サンプリングしたリガンドを CXCR4 にドッキングさせた。また、AutoDock の計算条件を検討するために CXCR4 結晶構造中のペプチドリガンドである CVX15 の再ドッキング計算を行った。方法の詳細を以下に記す。

### FC131 の分子動力学計算と構造サンプリング

これまでの FC131 の NMR 解析により得られた 12 構造の立体構造を初期構造として用いて、エネルギー極小化計算と MD 計算を行い、計算トラジェクトリ中の構造をサンプリングした。まず、リガンド端から 6Å のマージンをとった周期境界条件を設定し、周期境界のボックス内に水分子を配置した。続いてエネルギー極小化計算を 100 ステップ行い、好ましくない衝突を除去した。続いて MD 計算を行った。計算の際は、100 ピコ秒かけて温度を 0K から 300K に昇温させ、その後 300K で 100 ピコ秒かけて平衡化し、平衡化後、300K で 1 ナノ秒計算を行った。エネルギー極小化と MD 計算の際、力場は MMFFs<sup>25,26</sup>を用いた。カットオフ距離とタイムステップはそれぞれ 10 Å と 1 フェムト秒に設定し、温度制御には Nosé-Poincaré-Andresen 法<sup>27</sup>を用いた。全ての MD 計算の後に、リガンドのコンフォメーションを 50 ピコ秒ごとにサンプリングした。

### FC131 と CVX15 の CXCR4 構造へのドッキング計算

AutoDock を用いた FC131 の CXCR4 へのドッキング計算の前に、AutoDock のラマルク進化を導入した遺伝的アルゴリズム (Lamarckian genetic algorithm; LGA) の計算回数パラメータ (ga\_run) を設定の最適化を CVX15 を用いたドッキング計算を行い検討した。CVX15 が結合している CXCR4 の結晶構造 (PDB: 3OE0) を受容体へのドッキング計算に用いた。ドッキング計算を行う際のグリッドボックスは

CXCR4 のリガンドである CVX15 と IT1t 結合部位の周囲に設定した。CVX15 の回転可能な結合角は、AutoDock の取り扱える最大値を超えているため、主鎖の二面角と CVX15 の Tyr10 の側鎖の二面角は固定して回転可能な結合角の数を減らした。ga\_run の値は 10, 200, 20,000 にそれぞれ設定して、出力ドッキングポーズを比較した。ga\_run 以外の設定はデフォルト値を用いた。最もスコアの良かった結合ポーズを選抜し、結晶構造と比較した。

CVX15 の CXCR4 へのドッキングシミュレーションに続き、FC131 の CXCR4 結晶構造へのドッキング計算を試みた。FC131 の MD 計算の結果から得られた、240 コンフォメーションのリガンド構造を用いて CXCR4 に対する AutoDock のドッキング計算に用いた。CVX15 の計算結果を参考にして、FC131 のコンフォメーション一つあたり、ga\_run の値は 1,000 に設定した。その他の AutoDock の設定は、ga\_run 以外は CVX15 と同じデフォルト設定を用いた。ドッキング結果から適切な結合ポーズを選抜するため、分子形状類似性検索ソフトウェア ROCS<sup>28</sup> を用いて CVX15 と FC131 の結合ポーズの類似性を計算した。シェイプクエリは、CXCR4 結晶構造中の CVX15 の三次元座標に基づき生成した。CXCR4 の X 線結晶構造解析と構造活性相関研究から、CVX15 の 2 つの残基、Arg2 と Nal3 は CXCR4 に対する結合に必須と考えられている。ROCS の “Color features” の重みについて、Arg3 のグアニジド部分と Nal3 のナフチル部分は 3 倍にした。そして、シェイプスコアの上位の 10,000 のドッキングポーズを選抜した。これらの計算のあと、スコア上位 50 程度の結合ポーズを目視による確認を行い、実験情報に最も矛盾のない結合ポーズを選抜した。最終的なモデルはマニュアルで微調整した後に、CXCR4 の結晶構造中の受容体構造とともにエネルギー極小化計算を行うことで構築した。エネルギー極小化計算は、まず最急降下法で行い、続いて共役勾配法で行った。リガンド結合部位の水分子は適宜配置した。表 1 の他のリガンドと CXCR4 の複合体構造は、FC131 と CXCR4 の結晶構造に基づき、マニュアルで構築し、エネルギー極小化計算を行うことで作製した。

MD 計算と分子の操作は統合計算化学システム MOE<sup>29</sup> を用いて行い、MD 計算とドッキング計算は Intel(R) Xeon (R) CPU E5400@2.83Ghz x24 プロセッサー (96 コア) の Linux クラスタシステムを用いて実行した。

表 1. FC131 類縁体の CXCR4 結合活性<sup>a</sup>

化合物番号	アミノ酸配列 (cyclo)	IC <sub>50</sub> (nM)	FC131 との主鎖コンフォメーションの比較
2 (FC131)	cyclo(-D-Tyr1-L-Arg2-L-Arg3-L-Nal4-Gly5-)	0.004	-
5	cyclo(-D-Phe1-L-Arg2-L-Arg3-L-Nal4-Gly5-)	0.051	-
6	cyclo(-D-Tyr1-L-Arg2-L-Arg3-L-Nal4-L-Ala5-)	0.17	L-Nal4-L-Ala5 間のアミド結合の配向が反転する
7	cyclo(-D-Tyr1-L-Arg2-L-Arg3-L-Nal4-D-Ala5-)	0.011	アミド結合の配向は同じ
8	cyclo(-D-Tyr1-D-Arg2-L-Arg3-L-Nal4-Gly5-)	0.008	D-Tyr1-D-Arg2 間のアミド結合の配向が反転する
9	cyclo(-D-Tyr1-L-Lys2-L-Arg3-L-Nal4-Gly5-)	0.097	-
10	cyclo(-D-Tyr1-L-Ala2-L-Arg3-L-Nal4-Gly5-)	0.063	-
11	cyclo(-D-Tyr1-L-MeArg2-L-Arg3-L-Nal4-Gly5-)	0.023	-
12	cyclo(-D-Tyr1-D-MeArg2-L-Arg3-L-Nal4-Gly5-)	0.003	アミド結合の配向は同じ

<sup>a</sup>実験値は文献 18,19 の結果を引用した。

## 2.3 結果と考察

環状のペプチドである FC131 は、AutoDock を用いたドッキング計算中にリガンドの環部分のコンフォメーションを生成しない。AutoDock でフレキシブルな FC131 の主鎖構造を考慮するため、これまでの NMR 研究から得られた 3 次元構造に基づき、MD 計算を行った。そして、各トラジェクトリからコンフォメーションをサンプリングした。これらの主鎖構造はそれぞれ類似しているものであったが、このわずかな違いが比較的大きな側鎖の多様性をもたらした(図 2)、ドッキング計算の際に MD 計算をしない場合と比べて、広いコンフォメーション空間を探索できるようになる。

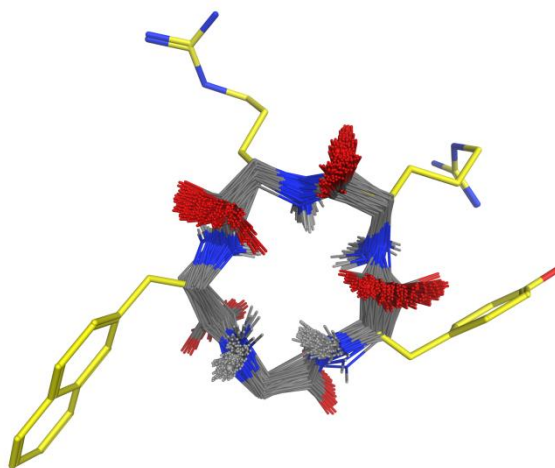


図 2. MD 計算結果のトラジェクトリからサンプリングした 240 の FC131 構造と NMR 構造との比較。MD トラジェクトリの構造は、重原子と極性水素原子のみを示し、炭素原子は灰色で示す。FC131 の NMR 構造は炭素が黄色のスティック表示で示す。全てのコンフォメーションは C $\alpha$ を用いて重ね合わせている。

AutoDock を用いた FC131 のドッキング計算に適したパラメータを決めるために、この計算に先立ち、CVX15 のドッキング計算を ga\_run の数を 10, 200, 20,000 に設定して計算を行い、出力される結合ポーズを比較した。各条件において最もスコアの良かった CVX15 の結合ポーズを図 3 に示す。ga\_run の値を 10 に設定した場合は、結晶構造中の CVX15 とはあまり重ならない結果が得られた。ga\_run の値を 200 に設定した場合は、出力結果は、結晶構造と同じポケットを共有していたものの、逆向きに結合していた。ga\_run の値を 20,000 に設定した場合は、最もスコアの良い結合ポーズは、結晶構造中の CVX15 の結合

様式を正しく再現しており、FC131 の CXCR4 に対するドッキング計算に適切と思われた。このことから、FC131 を CXCR4 に結合させる際に `ga_run` を大きな値に設定することで正確な結合ポーズを得られると考えられた。

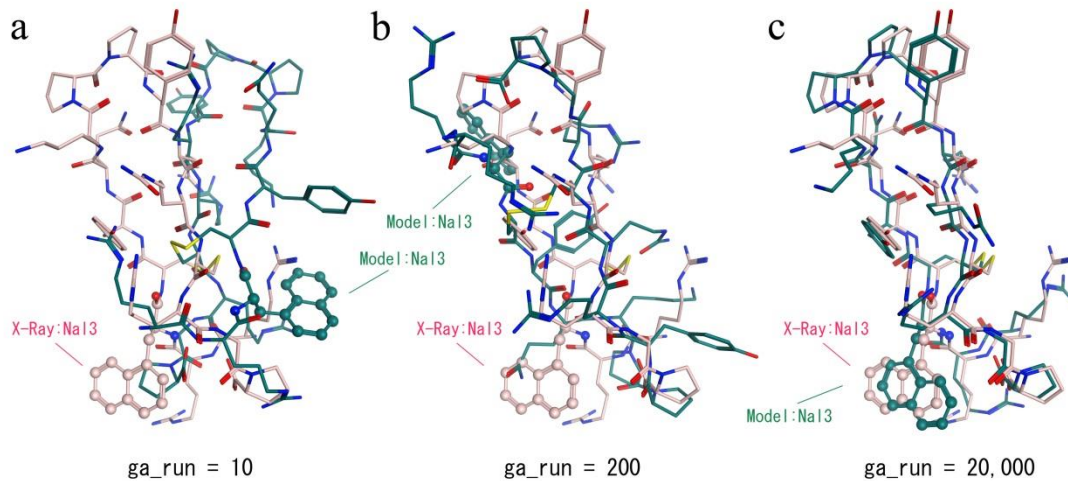


図 3. CXCR4 の結晶構造を用いた CVX15 のドッキング計算結果。AutoDock の `ga_run` の値を 10 (a), 200 (b), 20,000 (c) に設定して計算した結果を示す。ドッキング結果の結合ポーズは炭素原子が緑のスティック表示で示している。CVX15 との複合体結晶構造 (PDB: 3OE0) は炭素原子は桃色のスティック表示で示す。Na1 部分はボール&スティック表示にしている。

続いて、我々は FC131 の 12 構造の NMR 構造に基づき MD 計算を行い、そのトラジェクトリ中から合計 240 の構造を抽出した。それぞれの分子について `ga_run` は 1,000 に設定して AutoDock を用いたドッキング計算を行った。出力された結合ポーズについて ROCS を用いたシェイプスコアを計算することで評価した。構造活性相関 (Structure Activity Relationship; SAR) 情報からは、リガンドのアルギニンとナフチルアラニンの側鎖構造は CXCR4 に対する結合活性を持つに必須であることが示されている。そのため、計算を行う際、ROCS の "Color features" の重みパラメータ Arg3 のグアニジノ基と Na14 のナフチル基は、重みを 3 倍にした。残った結合ポーズのうち、スコアの上位 50 程度の結合ポーズを目視で確認し、最も実験情報と矛盾しない結合ポーズ選抜した。最後に受容体構造とともに複合体構造のエネルギー極小化計算を行い最終的なモデルとした。

FC131 と結晶構造中の CVX15 の結合ポーズの比較を図 4 に示す。FC131 は T140 からの Na1, Tyr と 2 つの Arg 残基を含む、環状ペプタペプチドライブラリから同定されたため、FC131 は T140 およびその

類縁体である CVX15 と類似した結合ポーズを持つと考えられていた。しかし、FC131 と L-Arg3 と L-Nal4 の位置は、CVX15 の Arg3 と Nal3 と立体構造上、対応していたものの、その他の残基はリガンド結合ポケットの異なる位置に結合していた。

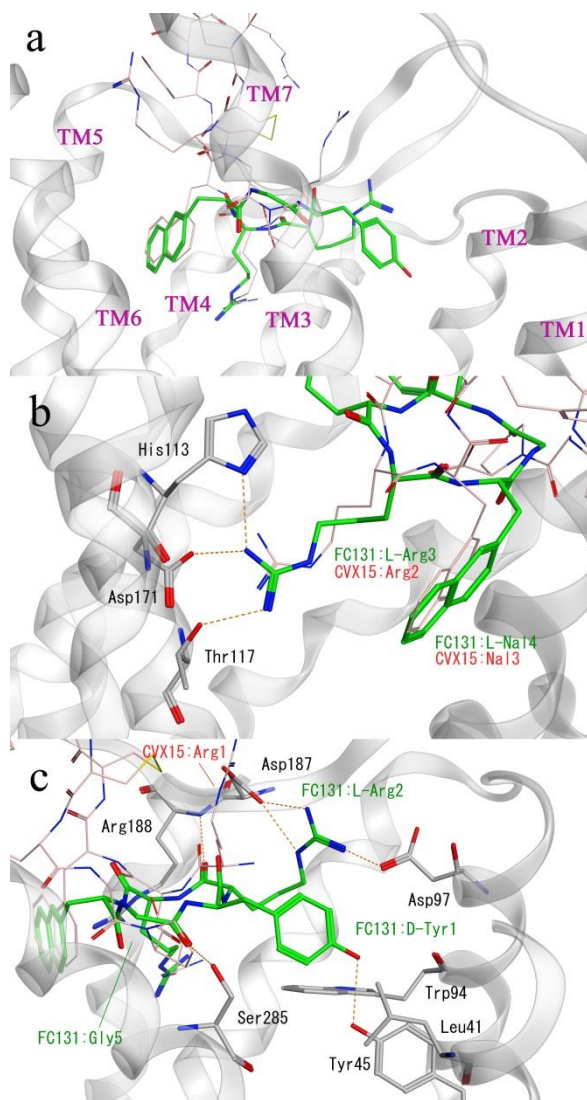


図 4. FC131 と CVX15 の結合ポーズの比較。(a) FC131 の全体的な結合ポーズ。(b) FC131 の L-Arg3、 L-Nal4 部分と CXCR4 の相互作用。(c) FC131 の D-Tyr1、 L-Arg2 部分の相互作用。FC131 は炭素が緑色のスティックで示す。CVX15 は炭素原子が桃色のライン表示で示す。CXCR4 の残基は炭素原子が白のスティック表示で示す。窒素、酸素原子はそれぞれ青色、赤色で示す。CXCR4 の主鎖構造はリボンで示す。

CXCR4-FC131 複合体モデル構造では、FC131 の L-Arg3 の側鎖は、CXCR4 の His133<sup>3,29</sup>, Thr117<sup>3,33</sup>, Asp171<sup>4,60</sup> と水素結合を形成していた(上付き文字は Ballesteros-Weinstein による残基番号<sup>30</sup>を示す。細胞外ループ 2 は”ec12”と示す。)。これらの相互作用は結晶構造での CVX15 の Arg2 の相互作用と同じである(図 4b)。FC131 の L-Nal4 の側鎖の座標も CVX15 とほぼ一致する。FC131 の側鎖コンフォメーションは NMR 構造とほとんど同じだったが(図 5)が、FC131 の L-Arg3-L-Nal4 と CVX15 の Arg2-Nal3

の主鎖部分の構造には違いが観察された。これは、FC131は2-naphthylの置換である一方で、CVX15は1-naphthylの置換位置が違うためである。

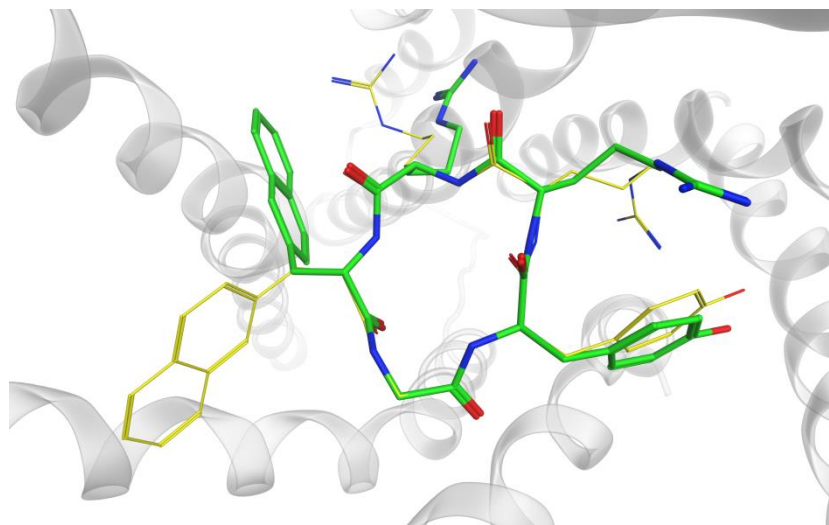


図 5. FC131 の結合モデルにおける構造と NMR 構造の主鎖構造の比較。複合体モデル構造中の FC131 は炭素原子を緑色のスティックで示す。NMR 構造は炭素を黄色のスティックで示す。これらの構造は C $\alpha$ 原子を重ね合わせている。CXCR4 の主鎖構造はリボン表示で示す。

FC131 の D-Tyr1 と L-Arg2 の側鎖はモデル構造上では、TM1, TM2 と TM7 の間に存在していた (図 4a, c)。これらの位置には CVX15 は結合していない。しかし、低分子アンタゴニストである、IT1t が結合している (PDB: 3OE6) では同じ位置を占めている。FC131 の D-Tyr1 の側鎖は CXCR4 の Leu41<sup>1,35</sup>, Tyr45<sup>1,39</sup>, Tyr94<sup>2,60</sup>, Ser285<sup>7,36</sup> から形成されるポケットに伸びている。これまでの研究で FC131 の D-Tyr1 を Phe に置換したものは結合活性が下がる事を示されている<sup>31</sup>。また、CXCR4 の Tyr45<sup>1,39</sup> や、他のケモカイン受容体の対応する残基の変異実験の研究でも、このチロシン残基はリガンド結合に重要であることが示されている<sup>32-35</sup>。

これらの結果は、FC131 の D-Tyr1 と CXCR4 の Tyr45<sup>1,39</sup> がリガンドと受容体の結合に関わる可能性を示唆している。FC131 の L-Arg2 グアニジノ基は、CXCR4 の Asp97<sup>2,64</sup> と Asp187<sup>ec12</sup> と極性相互作用をしている。CVX15 は CXCR4 の Asp97<sup>2,64</sup> が構成するポケットに存在していないが、いくつかの変異実験から、Asp97<sup>2,64</sup> は CXCR4 の低分子リガンドが結合するのに必須である事が示唆されている<sup>32,36</sup>。CXCR4 の結晶構造においては低分子アンタゴニスト IT1t も CXCR4 の Asp97<sup>2,64</sup> と相互作用している<sup>35</sup>。CXCR4 の Asp187<sup>ec12</sup> は SDF-1 と相互作用に関わる上、結晶構造では、CVX15 の Arg1 と相互作用している。



FC131 の L-Arg2 の主鎖のカルボニル酸素原子は、CXCR4 の Arg188<sup>ec12</sup> と相互作用している。この相互作用は、CXCR4-CVX15 構造でも見られた。加えて、FC131 の Gly5 の主鎖のカルボニル酸素原子は、CXCR4 の Ser285<sup>7,36</sup> と極性相互作用を形成していた。

これまでの変異実験の研究では、CXCR4 の Asp262<sup>6,58</sup> は、リガンド結合に重要な残基であることが示唆されている<sup>37</sup>。結晶構造中では、CVX15 の Arg14 の側鎖は CXCR4 の Asp262<sup>6,58</sup> の近傍に位置する。一方で、今回構築したモデル構造では、FC131 の 2 つのア르기ニンの側鎖が、この近傍には位置しなかった。CXCR4 の Glu288<sup>7,39</sup> もリガンド結合に重要な残基であり、結晶構造中では水を介したリガンドとの相互作用が観察される。モデル構造中、FC131 は CVX15 と同様に CXCR4 の Glu288<sup>7,39</sup> は 2 つの水分子を含む水素結合ネットワークを形成していた(図 6 の **w1**, **w2**)。CXCR4-CVX15 複合体の結晶構造中に見られた水分子とともに、CXCR4-FC131 モデル構造のエネルギー極小化計算を行ったところ、FC131 の L-Nal4 カルボニル酸素原子と CXCR4 の Glu288<sup>7,39</sup> と Glu288<sup>7,39</sup> の側鎖と Tyr255<sup>6,51</sup> の水酸基が水(**w1**)を介した水素結合ネットワークを形成していた。そして、FC131 の L-Arg2 のアミド窒素は、CXCR4 の Glu288<sup>7,39</sup> と水分子(**w2**)を介した水素結合をしていた。この水分子(**w2**)は D-Tyr1 の芳香環部分と OH- $\pi$  の相互作用を形成していた(図 6a)。

FC131 の NMR 構造の研究から、FC131 とその誘導体は、異なる主鎖のコンフォメーションを持つ事が明らかにされている<sup>19</sup>。L-Ala5-substituted ペプチド(**6**)は、L-Nal4-L-Ala5 の間のアミド結合が反転している。一方で、D-Ala5 誘導体(**7**)は FC131 と同じ主鎖のコンフォメーションを持つ。D-Arg2 に変換した FC131 誘導体(**8**)は D-Tyr1-D-Arg2 間のアミド結合が反転している。一方で、D-N-methylarginine (D-MeArg)を変換したもの(**10**)は FC131 と同じ主鎖コンフォメーションを示していた。これらのコンフォメーションの違いを表 1 に示す。続いて、構造活性相関情報と照らし合わせ、可能性のある結合様式を調査した。

ペプチド **6** は FC131 に比べて 40 倍以上結合活性が弱く、ペプチド **7** は 3 倍弱い。上に示した通り、我々のモデルでは、FC131 の L-Nal4 と Gly5 の間のペプチド結合は、Tyr255<sup>6,51</sup>, Glu288<sup>7,39</sup> と水を介した水素結合ネットワークを形成している。ペプチド **6** の反転した L-Nal4-L-Ala5 のペプチド結合は、**w1** の水素結合ネットワークを壊す。一方で、ペプチド **7** は FC131 の水素結合ネットワーク及び CXCR4 との結

合活性は保持される。ペプチド **6** と **7** のこの活性違いは、Nal4 と Ala5 の周辺のコンフォメーションの違いによるものと考えられる。

ペプチド **8** は比較的大きな構造の違いがあるにも関わらず、FC131 と比べて 2 倍だけ活性が低い。そこで、ペプチド **8** の結合モデルを CXCR4-FC131 の複合体モデルを参考にして構築した。最適化したモデルを図 6b に示す。ペプチド **8** の主鎖は、FC131 と比べ、わずかに細胞外側に移動している。ペプチド **8** の D-Arg2 の側鎖は、細胞外側に伸び、CXCR4 の Asp187<sup>ec12</sup> とのみ相互作用している。**8** の D-Arg2 のグアニジノ基は不都合な衝突なく、Asp187<sup>ec12</sup> と 2 カ所で水素結合を形成している。これは、FC131 が CXCR4 の Asp97<sup>2,64</sup> と Asp187<sup>ec12</sup> と結合していて受容体の内部の空間に存在する L-Arg2 の側鎖とは対照的である。水分子 w2 と FC131 が形成する水素結合ネットワークも、構造活性相関に関わる。L-MeArg の置換 (**9**) は FC131 より 6 倍弱い活性を持つ。これは、L-Arg2 の NH と w2 の間の水素結合が壊れるためであると考えられる。一方、エピマーペプチドで D-MeArg2 を持つ **10** は D-Arg2 を持つペプチド **8** より 2 倍の活性を持つ。これは、w2 を介する水素結合ネットワークがペプチド結合の N-methylation があるため、ペプチド結合はどの水素結合にも影響を及ぼさないためだと説明できる。以前の NMR 研究では、ペプチド **10** の D-Tyr1-D-MetArg2 のコンフォメーションは水溶液では FC131 と同じであるとされていたが、ペプチド **10** の CXCR4 との結合モデルからは結合している状態では、ペプチド **8** である方が好ましいと考えられた。

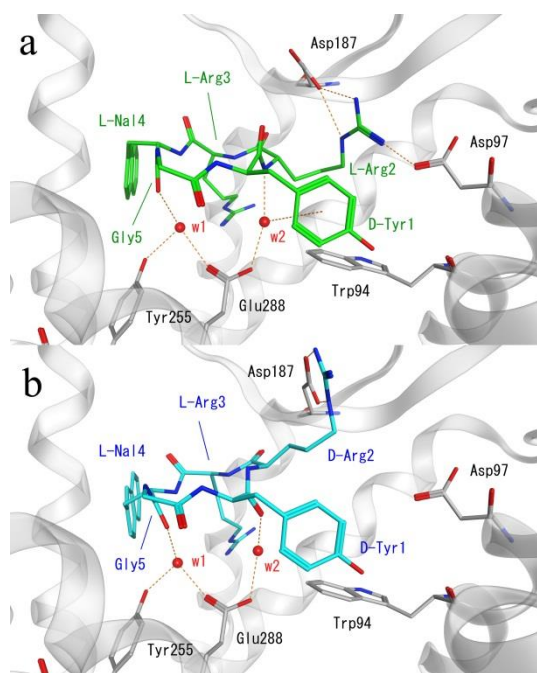


図 6. CXCR4 とそのリガンドの水を介した相互作用。(a) FC131 と CXCR4 の結合様式。(b) ペプチド **8** の結合様式。FC131 とペプチド **8** はそれぞれ緑色と水色で示している。CXCR4 の主鎖構造はリボン表示で示している。w1 と w2 は結晶構造中でも存在していた水分子である。

FC131 の L-Lys2 に変換した誘導体 (**11**) と L-Ala2 誘導体 (**12**) は、FC131 と比較して、それぞれ 24, 16 倍活性が下がっていた。我々の結合モデルからは、FC131 の L-Arg2 の側鎖は、Asp97<sup>2,64</sup> と Asp187<sup>ec12</sup> の間にできた空間に密にパッキングしている。そのため、このグアニジノ基に対する置換は、結合活性に影響を与え、わずかな側鎖の置換でも大きく活性を下げる事になる。一方で、D-Arg2 に置換したペプチド (**8**) では、D-Arg2 が存在するポケットは CXCR4 の細胞外側の空間に近く、CXCR4 とはタイトには相互作用していない。そのため、D-Arg2 は L-Arg2 に比べて、変換は結合活性に大きな影響を与えないと考えられる。最近になり、CXCR4 の X 線結晶構造を用いて分子モデリングを行った報告がなされていた<sup>38</sup>。この文献の著者らは、二量体ペプチドリガンドを用いてモデルを構築していた。これは、**8** の D-Arg2 を D-オルニチン (D-Om) に変換し、二量体を作るため、2 つのペプチドを共役させている。かれらの結合様式は我々のモデルとは異なっているものの、D-Om は我々の **8** のモデルの D-Arg2 と同じ所に位置していた。この側鎖は細胞外側に伸びていて Asp187<sup>ec12</sup> と相互作用していた。これは、ペプチド **8** の Arg2 は他の残基への変換に寛容であることを示している。

## 2.4 まとめ

本研究では、FC131のNMR構造を用い、分子動力学計算結果から得られたリガンド構造を利用しドッキング計算を行い、CXCR4-FC131複合体構造モデルを構築した。最適化したモデル構造は、FC131のL-Arg3とL-Nal4はCVX15のArg2とNal3に対応していた。興味深い事に、FC131のD-Tyr1とL-Arg2はCVX15の結合ポケットとはシェアしていなかった。FC131とCVX15の異なる結合様式は、水を介した水素結合ネットワークを含み、実験情報を上手く説明することができた。加えてFC131のいくつかの類縁体の構造活性相関も結合モデルから説明できた。本研究で構築したモデル構造は、CXCR4-リガンド複体の相互作用様式の理解と、新たなCXCR4アンタゴニストのデザインに役立つと考えられる。

## 参考文献

1. Mackay, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.* **2**, 95–101 (2001).
2. Murphy, P. M. *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev* **52**, 145–176 (2000).
3. Nagasawa, T. *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**, 635–638 (1996).
4. Tachibana, K. *et al.* The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**, 591–594 (1998).
5. Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T. & Gutierrez-Ramos, J. C. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* **185**, 111–120 (1997).
6. Stumm, R. K. *et al.* CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J. Neurosci.* **23**, 5123–5130 (2003).
7. Zhu, Y. *et al.* Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat. Neurosci.* **5**, 719–720 (2002).
8. Müller, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56 (2001).
9. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872–877 (1996).
10. Oberlin, E. *et al.* The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**, 833–835 (1996).
11. Nanki, T. *et al.* Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol.* **165**, 6590–6598 (2000).
12. Tamamura, H. *et al.* A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 877–882 (1998).
13. Tamamura, H. *et al.* Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 2633–2637 (2000).
14. Takenaga, M. *et al.* A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 226–232 (2004).
15. Tamamura, H. *et al.* T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett.* **550**, 79–83 (2003).
16. Tamamura, H. *et al.* Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett.* **569**, 99–104 (2004).
17. Fujii, N. *et al.* 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).
18. Tamamura, H. *et al.* Identification of novel low molecular weight CXCR4 antagonists by structural tuning of cyclic tetrapeptide scaffolds. *J. Med. Chem.* **48**, 3280–3289 (2005).
19. Ueda, S. *et al.* Structure-activity relationships of cyclic peptide-based chemokine receptor CXCR4 antagonists: disclosing the importance of side-chain and backbone functionalities. *J. Med. Chem.* **50**, 192–198 (2007).
20. Våbenø, J., Nikiforovich, G. V. & Marshall, G. R. A minimalistic 3D pharmacophore model for cyclopentapeptide CXCR4 antagonists. *Biopolymers* **84**, 459–471 (2006).
21. Våbenø, J., Nikiforovich, G. V. & Marshall, G. R. Insight into the binding mode for cyclopentapeptide antagonists of the CXCR4 receptor. *Chem. Biol. Drug. Des.* **67**, 346–354 (2006).
22. Kawatkar, S. P. *et al.* Computational analysis of the structural mechanism of inhibition of chemokine receptor CXCR4 by small molecule antagonists. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **236**, 844–850 (2011).
23. Wu, B. *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**, 1066–1071 (2010).
24. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).

25. Halgren, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.* **20**, 720–729 (1999).
26. Halgren, T. A. MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.* **20**, 730–748 (1999).
27. Bond, S. D., Leimkuhler, B. J. & Laird, B. B. The Nosé–Poincaré Method for Constant Temperature Molecular Dynamics. *J. Comput. Phys.* **151**, 114–134 (1999).
28. ROCS ROCS; OpenEye Scientific Software: Santa Fe, NM.
29. MOE MOE; Chemical Computing Group: 1010 Sherbrooke St. W, Suite 910, Montreal, Quebec, Canada H3A 2R7. <http://www.chemcomp.com>.
30. Ballesteros, J. & Weinstein, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* **25**, 366–428 (1995).
31. Tamamura, H. *et al.* Structure-activity relationship studies on CXCR4 antagonists having cyclic pentapeptide scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 4392–4394 (2005).
32. Wong, R. S. Y. *et al.* Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocyclam, and noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1485–1495 (2008).
33. De Mendonça, F. L. *et al.* Site-directed mutagenesis of CC chemokine receptor 1 reveals the mechanism of action of UCB 35625, a small molecule chemokine receptor antagonist. *J. Biol. Chem.* **280**, 4808–4816 (2005).
34. Berkhout, T. A. *et al.* CCR2: characterization of the antagonist binding site from a combined receptor modeling/mutagenesis approach. *J. Med. Chem.* **46**, 4070–4086 (2003).
35. Dragic, T. *et al.* A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 5639–5644 (2000).
36. BreLOT, A., Heveker, N., Montes, M. & Alizon, M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 23736–23744 (2000).
37. Gerlach, L. O. *et al.* Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor. *Biochemistry* **42**, 710–717 (2003).
38. Demmer, O. *et al.* Design, synthesis, and functionalization of dimeric peptides targeting chemokine receptor CXCR4. *J. Med. Chem.* **54**, 7648–7662 (2011).

## 第3章 GPCR-リガンド複合体モデル構築法の開発

### 3.1 緒言

GPCR は、大きなタンパク質ファミリーを形成する上に、承認されている医薬品の主なターゲットであるため、創薬研究における最も重要なターゲットファミリーと考えられている<sup>1</sup>。GPCR をターゲットとした創薬研究プロセスにおいて、その成功確率を上げるために GPCR の正確な立体構造情報が必要とされている<sup>2</sup>。

しかし、2009 年時点で、明らかになっていた GPCR-リガンド複合体の X 線結晶構造はロドプシン<sup>3</sup>、 $\beta 1^4$ 、 $\beta 2^5$  アドレナリン受容体<sup>6</sup>、アデノシン A2a 受容体<sup>7</sup> の 4 種類の受容体のみであった。2013 年の時点では活性化状態の構造を含む 10 種類以上の受容体構造<sup>8-22</sup> が明らかになっているものの、その数は新規医薬品開発のターゲットになり得ると考えられている 360 種類以上の GPCR<sup>23</sup> と比べて少ない。また、各 GPCR 間のアミノ酸配列一致度は低く、特にリガンド結合部位は構造の多様性も見られるため<sup>24</sup>、ホモロジーモデルを用いた正確なリガンドとの複合体モデル構築は難しい。そのため GPCR に最適化したリガンド複合体の高精度な立体構造予測法が必要とされている。

これまでに複数の GPCR-リガンド複合体モデリング手法が報告されているが<sup>25-27</sup>、依然として精度の良いモデルを構築する事は難しい。最近までは明らかになっている GPCR 構造の数が少なく、モデリング手法の予測精度を検証する手段がなかったが、複数の GPCR 構造が明らかにされたことで予測結果の検証が可能になった。

本研究では、GPCR とリガンドの結合様式を予測する複合体モデル構築法を開発し、その方法と精度について検証した。まず、ヒトアデノシン A2a 受容体をターゲットとして、ヒト  $\beta 2$  アドレナリン受容体構造を鋳型としたホモロジーモデリングを行い、モデル構造と結晶構造を比較することで、その精度について検討した。第 1 回コミュニティワイドの GPCR 構造モデリングとリガンドドッキングの“アセスメント”GPCR Dock 2008”の他の参加者との結果<sup>28</sup>を比較した。続いて同じ手法を用いて、アデノシン A2a 受容体  $\beta 2$  アドレナリン受容体を異なる鋳型構造(ロドプシン、 $\beta 2$  アドレナリン受容体、アデノシン A2a 受容体)を用いて構

築して、それぞれについて結果を比較検討した。そして、第 2 回のアセスメント”GPCR Dock 2010”<sup>29</sup>に  
参加したことについて述べる。



### 3.2 実験と方法

本研究で開発した GPCR-リガンド複合体モデル構築手法は、大きくホモロジーモデリング、ドッキング及び候補化合物の選抜の3つの段階に分けることができる。その作業フローを図1に示す。以下にアデノシン A2a 受容体-アンタゴニスト複合体モデル構築の詳細について述べる。

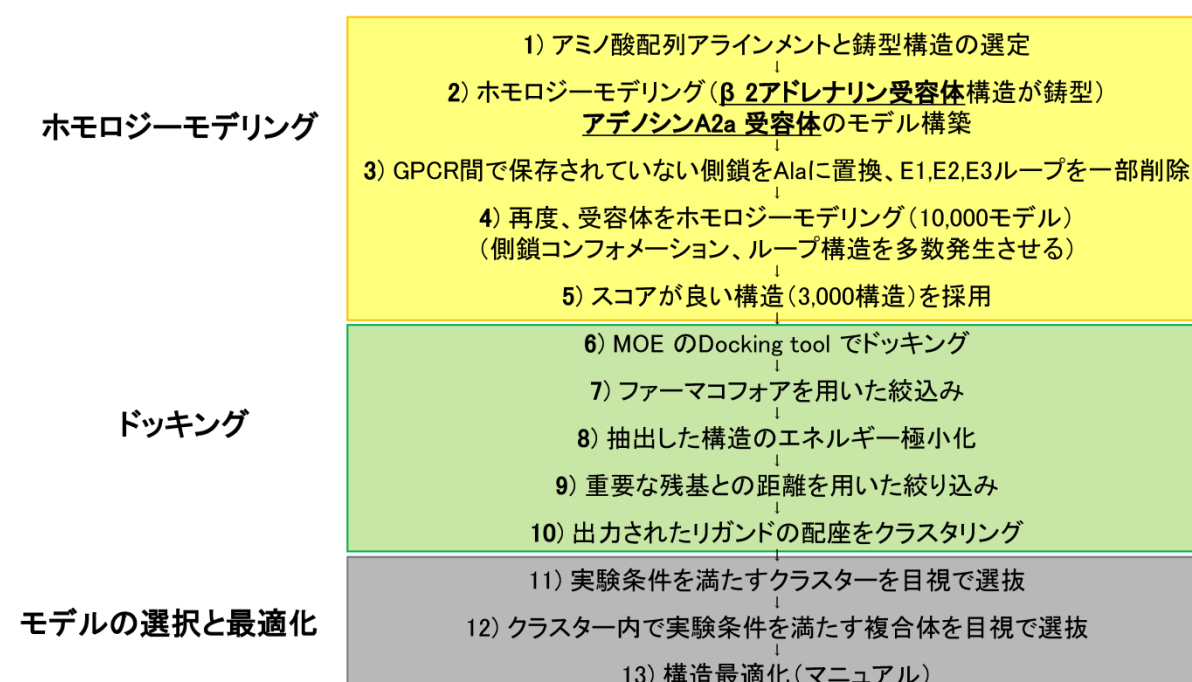


図1. 本研究における GPCR モデリングの作業スキーム。ホモロジーモデリングは黄色のボックスに示す。ドッキング計算のステップは緑のボックスで示す。結合ポーズ選抜は灰色のステップで示す。

#### ヒトアデノシン A2a 受容体構造のホモロジーモデリングとリガンドのドッキング計算

##### アラインメントと進化系統樹の作製およびホモロジーモデリングの鋳型構造の選定

まず、嗅覚受容体を除く全ての種の GPCR アミノ酸配列を用いて配列アラインメントを作製した。マルチプルアラインメントプログラム ClustalW<sup>30</sup> を用いて大まかなアミノ酸配列アラインメントを作製後、SeaView アラインメントエディタ<sup>31</sup> を用いてマニュアルで修正した。その際は、既知 X 線結晶構造や近縁

受容体のアミノ酸配列を注意深く観察し、膜貫通ヘリックス部分に挿入欠失残基が存在しないように修正した。

#### ヒトアデノシン A2a 受容体ホモロジーモデルの生成

配列一致度や進化系統樹による受容体の比較の結果、 $\beta 2$  アドレナリン受容体 (PDB: 2RH1) は、アデノシン A2a 受容体進化的に比較的近縁であり、 $\beta 1$  アドレナリン受容体 (2VT4) よりも解像度が高いため、今回のアデノシン A2a 受容体のホモロジーモデリングの鋳型構造として適当であると考えられた。上記のアラインメントを用いて一度、ホモロジーモデルを構築した。その後、多様な側鎖及びループ構造を生成するために、この構造を鋳型として、多数のホモロジーモデル構造を構築し直した。新たに側鎖構造を割り付けるために、再度ホモロジーモデルを生成する際、アラインメント上、GPCR 間で保存されていない残基をアラニンに置換した。新規にループ構造を生成させるため、鋳型構造の細胞外ループ領域も削除した。この修正した鋳型構造を用いて、ホモロジーモデルを 10,000 構築した。各ホモロジーモデルのエネルギー極小化の際は、膜貫通領域の主鎖構造は固定した。カットオフは計算時間短縮のため 5Å に設定した。力場は AMBER99<sup>32</sup> を用いた。エネルギー極小化計算後、各モデル構造ポテンシャルエネルギーを計算して、上位 3,000 構造を、続くドッキング計算に用いた。

#### MOE Dock を用いたドッキング計算

構築した 3,000 構造のホモロジーモデルを用いて、MOE Dock<sup>33</sup> を用いてドッキング計算を行った。ドッキング計算に用いたリガンドは、アデノシン A2a 受容体結晶構造 (3EML) に結合している低分子アンタゴニストである ZM241385 を用いた。ドッキング計算にてリガンドの配置に利用する "Wall" パラメータの設定は膜貫通領域の細胞外側半分の位置に設定した。リガンドのコンフォメーションは MOE の "Conformation Import" ツールを用いて発生させ、ドッキング計算ではリガンドの 1 コンフォメーションにつき 100 の結合ポーズを出力させた。

#### 出力された結合ポーズの絞り込み

MOE Dock の出力結合ポーズから 3D ファーマコフォア検索を行い、実験情報を満たす結合ポーズを選抜した。変異実験情報と構造活性相関情報<sup>34</sup> から、リガンド結合に重要だと明らかにされている Asn253 の近傍にファーマコフォア球を設定した。続いて行う受容体との複合体のエネルギー極小化計算の計算量を減らすため、出力結合ポーズをランダムに 6 万化合物を選抜し、これらを用いてエネルギー極小化計算を行った。エネルギー極小化計算の際は膜貫通ヘリックスの主鎖構造を固定している。計算後、さらに結合ポーズの数を減らすため、Asn253 の側鎖の酸素原子との ZM241385 の縮合環部分に結合している窒素原子との距離を測定し、その距離が 3.5Å 以内の結合ポーズを選抜した。選抜された結合ポーズの座標を用いて、クラスタリング計算を行った。そして、クラスター内の結合ポーズの多いクラスターを選抜した。そして、受容体との複合体のポテンシャルエネルギーを計算し、最もポテンシャルエネルギーの小さい複合体モデル構造を選抜した。

#### 結晶構造との比較

構築したモデルを結晶構造と比較し、モデル構造の精度を検証した。その際は受容体の主鎖の C $\alpha$ 原子を用いた RMSD とリガンドの重原子を用いた RMSD を計測した。

#### GPCR Dock 2008 の参加モデルとの結果の比較

”GPCR Dock 2008”での結果を文献中の同じ指標を用いてモデルの精度を計算し、結果を比較した。結果の評価は、リガンドの重原子の RMSD、フェノキシ部分を除いたリガンドの重原子の RMSD、リガンド結合領域の残基の重原子の RMSD、膜貫通ヘリックスの C $\alpha$ 原子の RMSD を測定することで行った。

#### 異なるターゲット受容体と鑄型構造を用いたモデル構築結果の比較検討

アデノシン A2a 受容体モデル構築の手法で、鑄型構造を変更した場合にモデル構築結果がどのように変化するか検証するため、ロドプシン(1HZX)、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体(2RH1)、アデノシン A2a 受容体(3EML)を鑄型構造として、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体、アデノシン A2a 受容体のモデル構造をそれぞれ構築した。モデル構築法は、基本的に前述のアデノシン A2a モデル構築と同じであるが、 $\beta$ 2 アドレナリ

ン受容体を予測する際は2箇所(Asp113とTM5の近傍)に3Dファーマコフォア球を設定した。ロドプシンに関しては、11-cis レチナールがロドプシンの Lys296 とシッフ塩基を介した共有結合を形成しており、今回のドッキング計算には適していないためモデルを構築していない。

#### GPDR Dock 2010 への参加

上記に示した検証では、既に立体構造が明らかにされている受容体を対象として、モデル構造の精度を検証している。続いて、未知の受容体に対して実際にどの程度の結果が得られるか検証するために、コミュニティーベースの GPCR ホモロジーモデリングとドッキングのアセスメント “GPCR Dock 2010” に参加した。ターゲット受容体は、ヒトドーパミン D3 受容体-低分子アンタゴニスト(eticlopride)複合体、ヒト CXCR4-低分子アンタゴニスト(IT1t)複合体、及びヒト CXCR4-ペプチドアンタゴニスト(CVX15)の複合体であった。

### 3.3 結果と考察

#### ヒトアデノシン A2a 受容体構造のホモロジーモデリングとリガンドドッキング

本研究開始時に X 線結晶構造が明らかにされていたウシロドプシン、トリβ1 アドレナリン受容体、ヒトβ2 アドレナリン受容体、ヒトアデノシン A2a 受容体を用いたアミノ酸配列アラインメントの結果を図 2 に示す。また、各アミノ酸配列間の配列一致度を表 1 に示す。主要な GPCR を用いて作製した進化系統樹を図 3 に示す。β2 アドレナリン受容体はアデノシン A2a 受容体とのアミノ酸配列一致度が比較的高く(全長で 25.5%、膜貫通領域で 33.3%)進化的に近縁であり、かつ X 線結晶構造の解像度の高い X 線結晶構造 (2RH1) が明らかにされているので、アデノシン A2a 受容体のモデル構築の鋳型構造として用いた。アラインメントから示されるように GPCR はヘリックス構造を持つ膜貫通領域においても、配列一致度は低く、特にリガンド結合部位近傍の残基は多様性が見られる。ホモロジーモデリングプログラムは側鎖生成の際に、鋳型構造の側鎖構造情報を利用してモデル構造の側鎖構造を生成する。そのため、誤った側鎖構造が割り当てられ、その結果、間違った構造のリガンド結合ポケットが生成される可能性がある。この問題を解決するために 2 回目のホモロジーモデリングを行う前に、その鋳型構造中の保存されていないアミノ酸残基は全てアラニンに置換した。この操作を行う事でホモロジーモデリングプログラムは側鎖構造生成の際に側鎖ロータマーライブラリを用いて新規に多様な側鎖構造を発生させることができる。細胞外ループ領域も同様に削除し、新規ループ構造を生成させた。既知の結晶構造を比較すると、膜貫通ヘリックスの構造は比較的保存されているものの、ループ領域は多様性を持つ<sup>6</sup>。このため、側鎖構造の生成と同様の理由で、ループ部分は除去した。図 4 に 2 回目のホモロジーモデリングを行う前の構造を示す。アラニンに変換していない側鎖のみを表示している。図 5 に再構築したホモロジーモデルのうち、ポテンシャルエネルギーの低い 30 構造を示す。多様なループ構造(図 5A)側鎖構造(図 5B)を持つモデル構造が生成されている事が分かる。また、ドッキング計算の際にリガンドの配置に利用される alpha 球を図 6 に示す。モデル構造により alpha 球の位置が変わり、多様な形状のポケットが生成されていることが分かる。続いて、これらの構造を用いたリガンドのドッキング計算を行った。

表 1. 構造既知 GPCR のアミノ酸配列一致度

	OSPD_BOVIN	ADRB1_MELGA	ADRB2_HUMAN	AA2AR_HUMAN
OSPD_BOVIN	—	0.179 (0.209)	0.190 (0.213)	0.190 (0.232)
ADRB1_MELGA	0.179 (0.209)	—	0.488 (0.689)	0.242 (0.343)
ADRB2_HUMAN	0.190 (0.213)	0.488 (0.689)	—	0.255 (0.333)
AA2AR_HUMAN	0.190 (0.232)	0.242 (0.343)	0.255 (0.333)	—

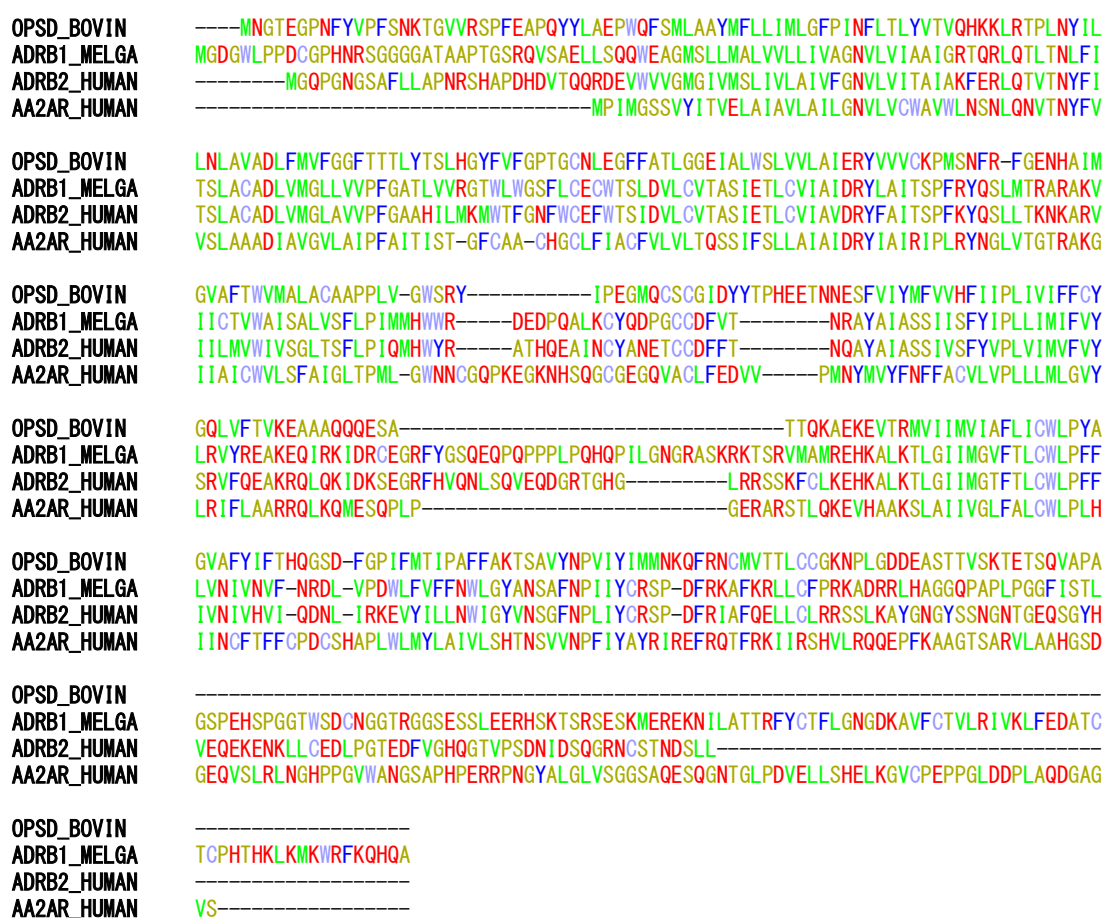


図 2. GPCR の配列アラインメント。OSPD\_BOVIN はウシロドプシン、ADRB1\_MELGA はトリβ1 受容体、ADRB2\_HUMAN はヒトβ2 受容体、AA2AR\_HUMAN はヒトA2a 受容体。アラニン(A), グリシン(G), プロリン(P), セリン(S), スレオニン(T)は黄色、イソロイシン(I), ロイシン(L), メチオニン(M), バリン(V)は緑色、アスパラギン酸(D), グルタミン酸(E), ヒスチジン(H), リジン(L), アスパラギン(N), グルタミン(Q), アルギニン(R)は赤色、フェニルアラニン(F), チロシン(Y)は青色、システイン(C), トリプトファン(W)は水色で示す。

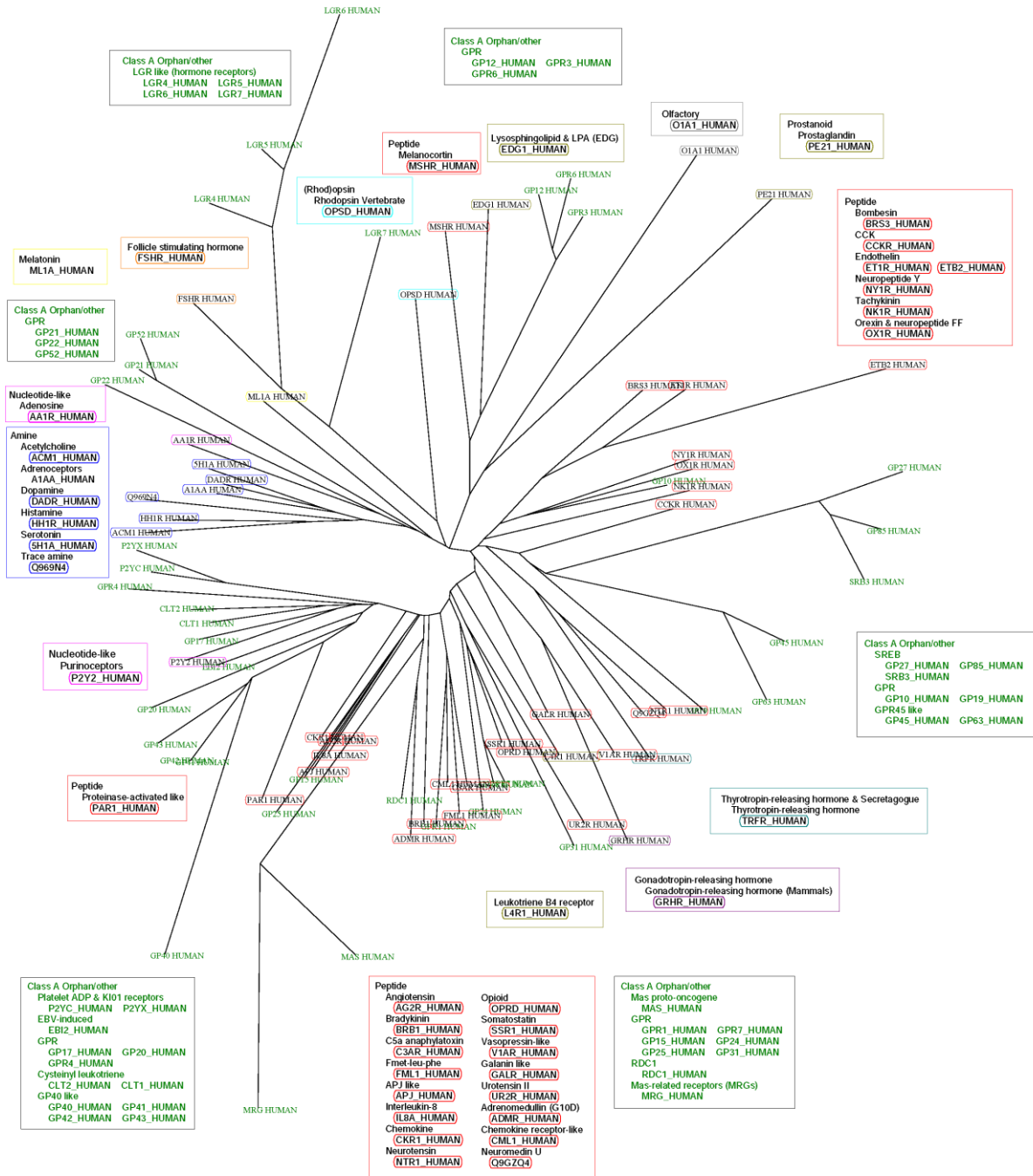


図 3. アラインメントに基づき作製した GPCR の進化系統樹

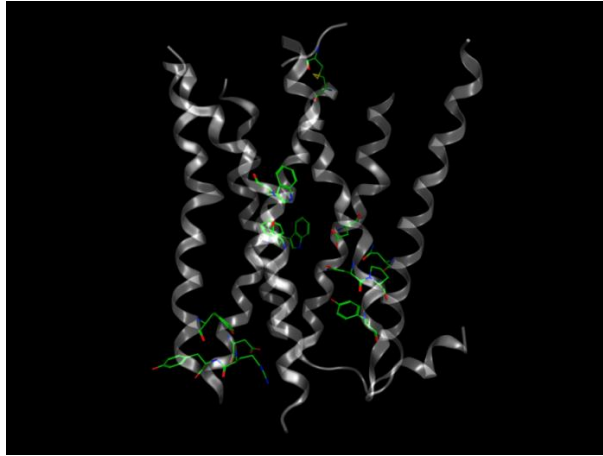


図4. アデノシン A2a 受容体ホモロジーモデルの再構築に用いた鋳型構造。残基を変更しなかったものをスティック表示で示す。受容体の主鎖構造は透明なリボン表示で示す。

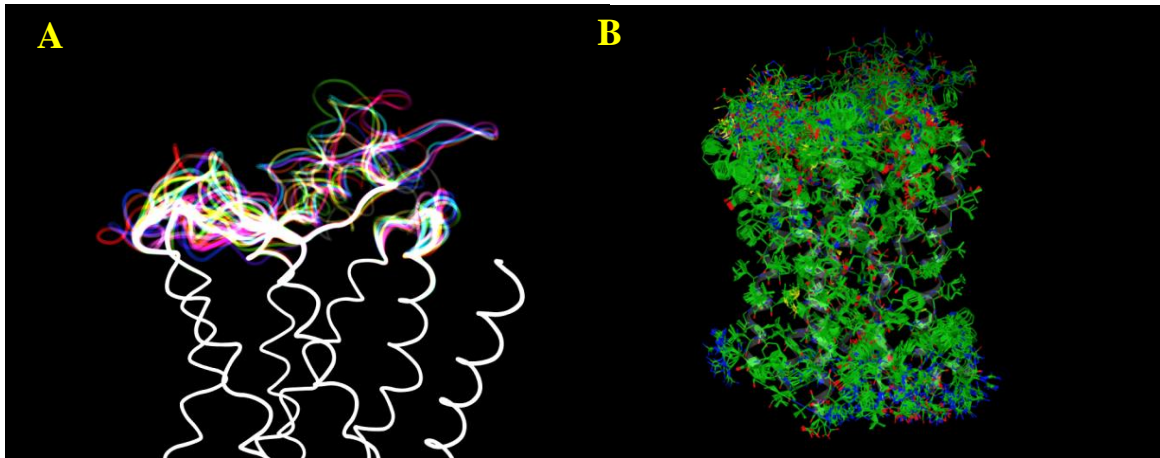


図5. ポテンシャルエネルギーの低いホモロジーモデリング結果の構造。A) TM ヘリックス部分をリボン表示したモデル構造。B) 側鎖も含めてスティック表示したモデル構造。受容体モデル構造の炭素原子は、緑で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。

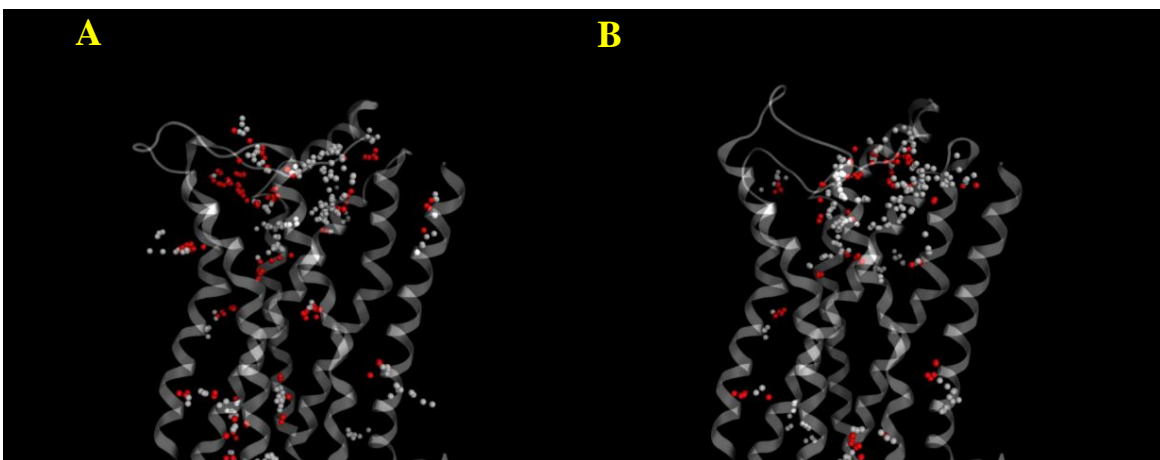


図6. Alpha 球の例。最もポテンシャルエネルギーが低かったモデル(A)と8番目にポテンシャルエネルギーが低かったモデル(B)の alpha 球を示す。赤い球は極性原子に好ましい位置、白い球は非極性原子に好ましい位置を示す。



## ヒトアデノシンA2a 受容体アンタゴニスのドッキング計算

アデノシン A2a 受容体アンタゴニスト(ZM241385)を、3,000 構造のアデノシン A2a 受容体のホモロジーモデルに対してドッキング計算を行った。出力結合ポーズ(60,000 ポーズ)からランダムに 300 構造を選抜し、表示させたものを図 7 に示す。リガンド結合ポケットの形状に応じて多様な結果が得られていることが分かる。変位実験と化合物の構造活性相関から、Asn253 はリガンドの縮合環に結合している窒素原子との相互作用に関わる事が示唆されていたため<sup>34</sup>、この相互作用を結合ポーズ絞り込みの条件として利用した(図 8)。

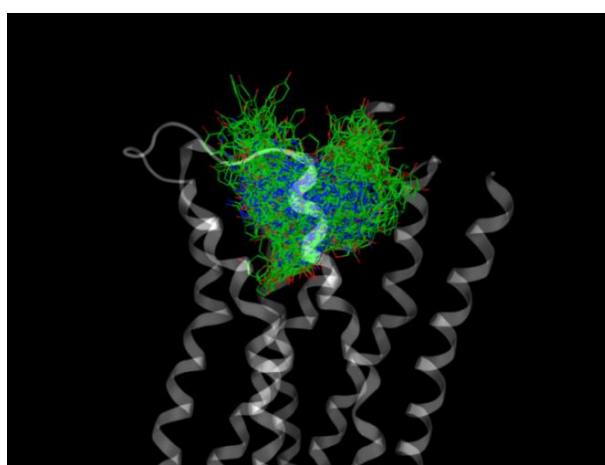


図 7. 出力したリガンドの結合ポーズの例。ランダムに選抜した 300 の出力ドッキングポーズを表示させている。リガンドの炭素原子は緑で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。受容体の主鎖構造は透明なリボン表示で示す。

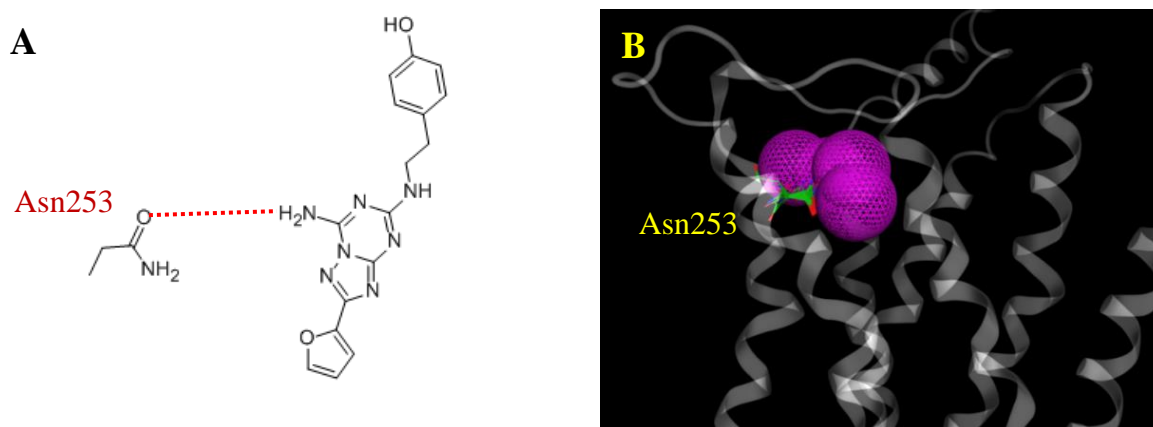


図 8. 結合ポーズ絞り込み条件に設定したに利用した相互作用(A)と 3D ファーマコフォア(B) Asn253 はスティック表示で示す。リガンドの炭素原子は緑で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。受容体の主鎖構造は透明なリボン表示で示す。

出力結合ポーズのクラスタリング後、最も大きなクラスターを形成していた結合ポーズを図 9 に表示する。また、このクラスター中で、複合体構造のポテンシャルエネルギーが低かった複合体構造と実際の X 線結晶構造との重ね合わせた構造を図 10 に示す。受容体は TM ヘリックスの C $\alpha$ 原子を用いて重ね合わせている。リガンドの重原子の RMSD は 2.8 Å であった。これは、 $\beta$ 2 アドレナリン受容体とアデノシン A2a 受容体では、TM6 の位置が若干異なり、相互作用の条件に加えた Asn253 も位置が異なるため、その影響で ZM241385 のリガンド結合ポーズもずれていた。フェノール部分に関しては、結晶構造と異なり TM1, 2 側に向くコンフォメーションを取っていた。前述の通り、ループ部分は、その構造多様性のため予測が難しい部分である。後に明らかにされた、結晶形の異なるアデノシン A2a 受容体-ZM241385 複合体の結晶構造 (PDB: 3PWH) では、3EML の構造と異なりフェノール部分は、TM1,2 側に向いているため、フェノール部分は複数の結合様式が許容されるようだ。

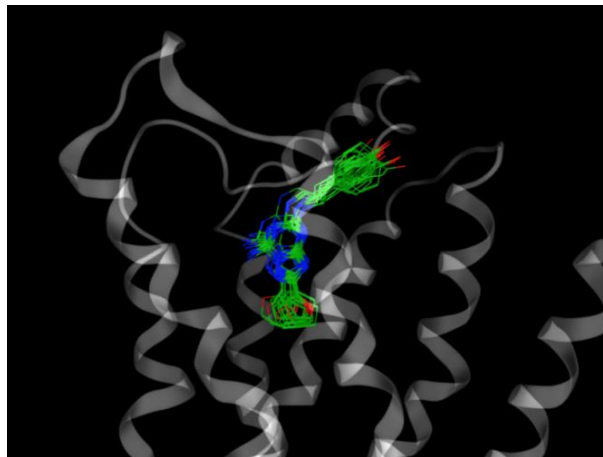


図 9. モデル構築結果。最も大きなクラスターのリガンド結合ポーズをスティック表示で示す。リガンドの炭素原子は緑で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。受容体の主鎖構造は透明なリボン表示で示す。

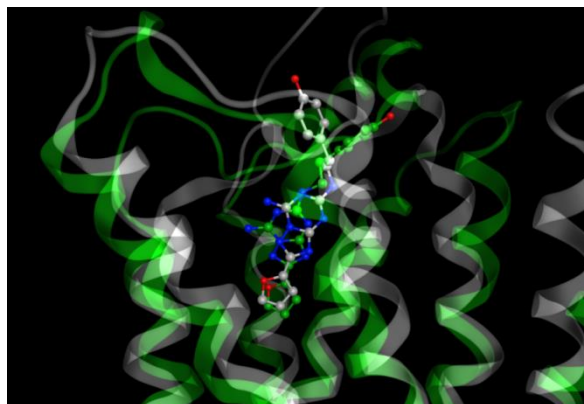


図 10. 結晶構造モデル構造の比較。結晶構造とモデル構造のリガンドの炭素原子は、それぞれ白、緑で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。結晶構造とモデル構造の受容体の主鎖構造はそれぞれ白、緑の透明なリボン表示で示す。

アデノシン A2a 受容体の ZM241385 の縮合環部分は、X 線結晶構造中 Phe168 と  $\pi$ - $\pi$  相互作用している(図 11A)。アデノシン A2a 受容体の E2ループの Phe168 は、最もスコアの良かった結合ポーズでは、側鎖コンフォメーションが正しくなかった(図 11B)が、5 番目にポテンシャルエネルギーが低かった構造は、Phe168 は正しく ZM241385 と相互作用していた(図 11C)。3D ファーマコフォアフィルタなどの相互作用のフィルタによって候補となる結合ポーズの数を減らせるが、最終的には目視による選抜で正しい受容体構造とリガンドの結合ポーズ予測に有用であると考えられる。

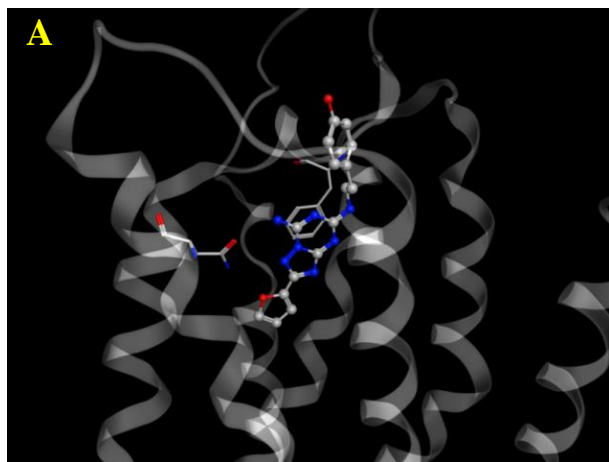
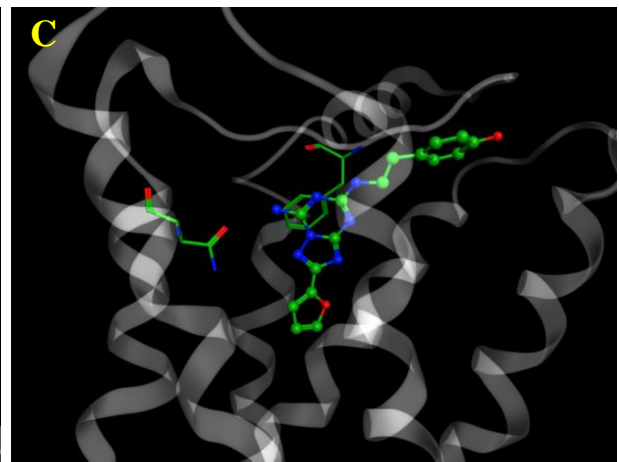
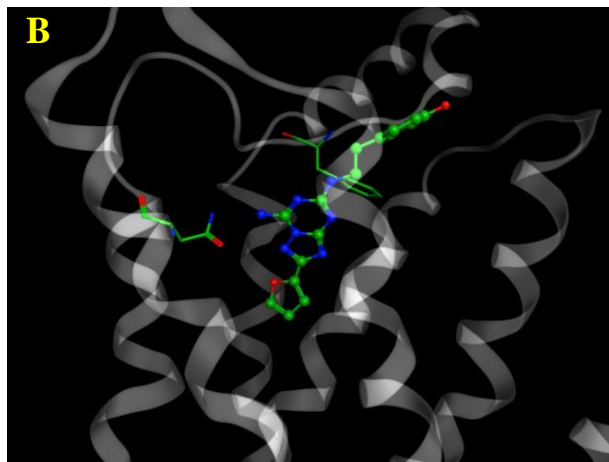


図 11. モデル構築結果。最も大きなクラスターのリガンド結合ポーズをスティック表示で示す。結晶構造を(C)に示す。最もポテンシャルエネルギーが低かった結果を(A)に、5 番目に低かった物を(B)に示す。結晶構造とモデル構造のリガンドの炭素原子は、それぞれ白、緑で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。結晶構造とモデル構造の受容体の主鎖構造はそれぞれ白、緑の透明なリボン表示で示す。



#### GPCR Dock 2008 の結果との比較

2008 年にコミュニティーベースの GPCR 立体構造予測アセスメント“GPCR Dock 2008” が開催された。各参加者により予測されたアデノシン A2a 受容体のモデル構造と実際の結晶構造が比較され、その結果が文献 28 にまとめられている。ターゲット受容体はアデノシン A2a 受容体-ZM241385 が予測のターゲット

ット受容体であった。我々の結果と他の参加者のモデル構造精度を比較したところ、我々のモデルは、X線結晶構造との比較でリガンド部分の RMSD は 2.8 Å で特にフェノキシ部分を除いた場合は 1.6Å と高い精度で予測できていた。また、受容体についても全体の C $\alpha$ 原子の RMSD は 3.1 Å で、リガンド結合サイトの受容体の RMSD は 3.7Å であった。この結果は、このアセスメントで最も成績の良かった Costanziらの結果と同等で、リガンドの RMSD においては、それを上回るものであった。各項目において、GPCR Dock 2008 と我々の結果を比較した表を表 2 に示す。

表 2. GPCR Dock 2008 の各参加者のモデル構築結果と、我々のモデルのモデル構築結果の比較\*

Group name	Rank (total number of models)	Ligand RMSD(Å)	Ligand RMSD without phenoxy group (Å)	Number of correct contacts	Binding site residues RMSD (Å)	Protein C $\alpha$ RMSD (Å)	TM I-VII C $\alpha$ RMSD (Å)	ECL2 C $\alpha$ RMSD (Å)	Combined z-score (average $\pm$ SD)
Costanzi	2 (4)	2.8	2.7	34	3.4	3.0 (266)	2.5 (212)	3.8 (8)	3.02 (0.86 $\pm$ 1.48)
Katritch & Abagyan	1 (10)	6.2	4	40	3.5	4.0 (283)	2.7 (214)	8.9 (23)	2.76 (1.89 $\pm$ 1.13)
Lam & Abagyan	1 (3)	5.7	3.6	33	3.3	4.1 (283)	3.6 (214)	7.3 (23)	2.42 (0.88 $\pm$ 1.34)
Davis, Barth & Baker	4 (5)	5.8	5.4	18	4.0	3.5 (283)	2.1 (214)	8.4 (23)	1.46 (0.16 $\pm$ 0.86)
Maigret	8 (10)	2.6	2.1	5	7.3	5.1 (283)	4.1 (214)	9.1 (23)	1.23 (0.05 $\pm$ 0.57)
Jurkowski & Elofsson	2 (8)	5.3	5.2	10	3.9	6.2 (283)	2.9 (214)	12.7 (23)	1.04 (-0.02 $\pm$ 0.98)
Kanou	7 (10)	5.4	5.5	8	6.9	3.5 (279)	2.8 (214)	7.1 (23)	0.91 (-0.61 $\pm$ 0.11)
Goddard	8 (10)	5.0	3.9	5	4.8	4.3 (284)	2.5 (214)	10.7 (23)	0.78 (0.16 $\pm$ 0.37)
Bologa	3 (10)	6.7	2.8	9	3.9	3.4 (278)	2.5 (213)	7.2 (19)	0.72 (-0.14 $\pm$ 0.39)
Olson	1 (9)	4.8	4.7	3	5.8	3.5 (284)	2.3 (214)	7.5 (23)	0.69 (-0.14 $\pm$ 0.58)
<b>PharmaDesign</b>	<b>-</b>	<b>2.8</b>	<b>1.6</b>	<b>-</b>	<b>3.7</b>	<b>3.1</b>	<b>2.0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

\*各参加者の結果は文献 28 より引用

## 異なるターゲット受容体と鋳型構造を用いたモデル構築結果の比較検討

アデノシン A2a 受容体を用いた検証で、GPCR Dock 参加者と比べて良い精度で GPCR-リガンド複合体モデルを構築することが示された。続いて、アデノシン A2a 受容体と $\beta 2$  アドレナリン受容体、ロドプシンを鋳型として、アデノシン A2a 受容体と $\beta 2$  アドレナリン受容体のモデル構築を行い、結果を比較した。結晶構造とモデル構築中のリガンド結合ポーズを比較した結果を表 3 に示す。アデノシン A2a 受容体、 $\beta 2$  アドレナリン受容体共にターゲット受容体と同じ受容体構造を鋳型してモデル構築を構築した場合は、それぞれ、RMSD が 1.8 Å, 1.3Å と高い精度の結果を得られた。 $\beta 2$  アドレナリン受容体から構築したアデノシン A2a 受容体モデル構築も比較的结果が良かった(2.8Å)が、アデノシン A2a 受容体を鋳型として $\beta 2$  アドレナリン受容体のモデルを構築した場合は適切な結合ポーズは、2 番目に大きなクラスターの結合ポーズで RMSD は 2.7 Å であった。これは、 $\beta 2$  アドレナリン受容体は比較的狭いポケットにタイトに結合しているため、ホモロジーモデリングでは正しい形状のリガンド結合ポケットが生成されづらいためと考えられた。ロドプシンを鋳型とした場合、 $\beta 2$  アドレナリン受容体のモデルを構築できなかった。アデノシン A2a 受容体モデル構築へのドッキング結果でも、比較的良い結合ポーズは 7 番目に大きなクラスターに出現し、リガンドの RMSD は 7.8 Å と精度は悪かった。これは、ロドプシンは、 $\beta 2$  アドレナリン受容体と比較してアデノシン A2a 受容体とは進化的に遠縁であることと、構造的にも狭いポケットに 11-cis-レチナールが結合しているため、モデル構築構築に適していないと考えられた。このように、遠縁の受容体のホモロジーモデルを構築する際には、さらなる応用が必要と考えられた。

本手法では、結合ポーズ選抜の際、ドッキングスコアではなくクラスター内の結合ポーズの多いクラスターを優先している。 $\beta 2$  アドレナリン受容体のように受容体内部の深い位置結合している場合は、正しいリガンド結合ポケットが生成されにくく、そのため結果が悪かった可能性がある。また、アデノシン A2a 受容体と $\beta 2$  アドレナリン受容体の構造を比較すると、リガンド結合に関わる TM5 の位置の変異が大きいので、この事もアミン受容体の予測に悪影響を及ぼしているようだ。このため、結合ポーズの選抜法はさらなる改良が必要である。

表 3 鋳型構造を変更した場合のモデル構造の精度

鋳型	ターゲット	リガンドの RMSD
β2 アドレナリン受容体 (2RH1)	アデノシン A2a 受容体 (3EML)	2.8Å
アデノシン A2a 受容体 (3EML)	アデノシン A2a 受容体 (3EML)	1.8Å
β2 アドレナリン受容体 (2RH1)	β2 アドレナリン受容体 (2RH1)	1.3Å
アデノシン A2a 受容体 (3EML)	β2 アドレナリン受容体 (2RH1)	2.7Å <sup>*1</sup>
ロドプシン (1HZX)	アデノシン A2a 受容体 (3EML)	7.8Å <sup>*2</sup>

\*1 相互作用の条件を 2 ヶ所設定し、2 番目に大きなクラスターを用いて測定した。

\*2 7 番目に大きなクラスターを用いて測定した。

### GPCR Dock 2010 の参加

上記の検証で、既に X 線結晶構造が明らかにされている構造を用いたモデル構築精度の検証では、比較的精度良く受容体-リガンド複合体モデル構造を構築できる事が示された。次に、ターゲット受容体構造が完全に未知な場合に実際にどの程度の精度で構築できるか検証するため、GPCR Dock 2010 に参加した。これは 2010 年に開催された構造予測アセスメントで、GPCR Dock 2008 と同様に参加者が GPCR-リガンド複合体モデル構造を予測する。そして、後日公表された X 線結晶構造と比較し、ホモロジーモデリングとドッキングの精度を検証している。今回のターゲットは、CXCR4-低分子 (IT1t) 複合体と CXCR4-ペプチドリガンド (CVX15) 複合体、ドーパミン D3 受容体-低分子アンタゴニスト (eticlopride) 複合体であった。今回開発した手法により、どの程度の精度の結果を得られるか検証した。GPCR Dock 2010 には、35 グループが参加していた。他のグループの結果を含む内容の詳細は文献 29 に記されている。我々の予測結果は、CXCR4 の構造予測において、受容体モデリングに関しては上位であり、特に、CXCR4 リガンド結合部位の予測と E2 ループの予測に関しては、最も良い予測精度であった。一方で、リガンドのドッキングの結果は芳しくなく、この点については改良の余地があることが分かった。理由を検討したところ、CXCR4-IT1t 複合体モデル構築では、アミノ酸配列アラインメントの時点で、TM2 の TXP モチーフが、他の GPCR 既知構造と比べて欠失になっていることを正しく予測できず、それによりリガンドとの結合に必須な TM2 の Asp97 とリガンドの相互作用を予測ができなかった。その一方、受容体モデルの大部分は比較的精度良く構築できており、リガンド結合ポケットの予測は参加者中で最も良い精度

(49%)であった。しかし、この精度はドーパミン D3 受容体のポケット予測結果(81%)と比較して低いものであった。これは単一の鋳型を用いたモデル構造の精度の限界であると考えられる。ドーパミン D3 受容体-eticlopride 複合体モデル構築については、受容体モデルの精度自体は、上位であった。一方で、リガンドのドッキングに関しては、最後の結合ポーズの目視選抜の段階で実験情報を参考にして選抜したものの、目視選抜での正しい結合ポーズの選抜に失敗していた。そのためドーパミン D3 受容体は、ドッキングポーズの選択手法に改良の余地があると考えられた。一方で、CXCR4 の受容体構造予測の結果から、我々の手法は特に遠縁の受容体のモデル構造構築に強みを持つことが示された。

### 3.4 まとめ

本研究では、GPCR に最適化した新しいリガンド複合体モデル構築に最適化した手法を開発した。この方法は、鋳型構造の保存されていない側鎖をアラニンに置換し、ループ部分を削除したものを鋳型構造として、多数のホモロジーモデルを構築する。そのモデル構造に対しドッキング計算を行う。変異実験や構造活性相関の情報を用いた 3D ファーマコフォアを設定し、ドッキング計算結果を絞り込み、結合ポーズの座標を用いてクラスタリング計算を行った。そして、クラスター内の結合ポーズの多いクラスターから最も適切なリガンド結合ポーズを選抜する。そのなかから最も実験情報と矛盾しないモデル構造を選んで複合体を構築する。β2 受容体を鋳型として、アデノシン A2a 受容体のモデルを構築した結果、比較的良い精度でモデルを構築することができた。

続いて異なる鋳型構造を用いて、アデノシン A2a 受容体とβ2 アドレナリン受容体のモデル構築を行った。ロドプシン、β2 受容体、アデノシン A2a 受容体を鋳型としてモデル構築した。ターゲット受容体そのものを鋳型構造としたものに加えて、アデノシン A2a 受容体から構築したβ2 アドレナリン受容体モデル構造、β2 受容体から構築したアデノシン A2a 受容体も比較的精度の良いモデル構造を構築する事ができた。しかし、ロドプシンを鋳型とした場合は、リガンド複合体モデル構築を構築する事ができなかった。

完全に未知のターゲットに対するモデル構築精度を知るため、GPCR Dock 2010 に参加したところ、CXCR4 のリガンド結合ポケットで最も精度の良くモデルを構築する事ができた。しかし、この予測精度はドーパミン D3 受容体とリガンド結合ポケット予測結果と比較して、その精度は低く、これはヘリックス部分の構造多様性に起因すると考えられた。このため多様性を考慮した方法の改良が必要と考えられた。

第 4 章では、新たにヘリックス多様性を考慮した、複数の鋳型を用いたホモロジーモデリングの開発および、CXCR7-アンタゴニスト複合体モデルの構築、バーチャルスクリーニングによる新規アンタゴニストの探索について報告する。



## 参考文献

1. Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993–996 (2006). Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739–745 (2000).
2. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007).
3. Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265 (2007). Warne, T. *et al.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486–491 (2008).
4. Jaakola, V.-P. *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211–1217 (2008).
5. Wu, B. *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**, 1066–1071 (2010).
6. Chien, E. Y. T. *et al.* Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **330**, 1091–1095 (2010).
7. Shimamura, T. *et al.* Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**, 65–70 (2011).
8. Hanson, M. A. *et al.* Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* **335**, 851–855 (2012).
9. Haga, K. *et al.* Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **482**, 547–551 (2012).
10. Wu, H. *et al.* Structure of the human  $\kappa$ -opioid receptor in complex with JD1c. *Nature* **485**, 327–332 (2012).
11. Manglik, A. *et al.* Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature10954
12. Granier, S. *et al.* Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* **485**, 400–404 (2012).
13. Thompson, A. A. *et al.* Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* **485**, 395–399 (2012).
14. Zhang, C. *et al.* High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* **492**, 387–392 (2012).
15. White, J. F. *et al.* Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* **490**, 508–513 (2012).
16. Wang, C. *et al.* Structural Basis for Molecular Recognition at Serotonin Receptors. *Science* (2013). doi:10.1126/science.1232807
17. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta$ (2) adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–180 (2011).
18. Choe, H.-W. *et al.* Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* **471**, 651–655 (2011).
19. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2011).
20. Xu, F. *et al.* Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* **332**, 322–327 (2011).
21. Vassilatis, D. K. *et al.* The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4903–4908 (2003).
22. Katritch, V., Rueda, M., Lam, P. C.-H., Yeager, M. & Abagyan, R. GPCR 3D homology models for ligand screening: lessons learned from blind predictions of adenosine A2a receptor complex. *Proteins* **78**, 197–211 (2010).
23. Shacham, S. *et al.* PREDICT modeling and in-silico screening for G-protein coupled receptors. *Proteins* **57**, 51–86 (2004).
24. Evers, A. & Klabunde, T. Structure-based drug discovery using GPCR homology modeling: successful virtual screening for antagonists of the alpha1A adrenergic receptor. *J. Med. Chem.* **48**, 1088–1097 (2005).
25. Cavasotto, C. N. *et al.* Discovery of novel chemotypes to a G-protein-coupled receptor through ligand-steered homology modeling and structure-based virtual screening. *J. Med. Chem.* **51**, 581–588 (2008).
26. Michino, M. *et al.* Community-wide assessment of GPCR structure modelling and ligand docking: GPCR Dock 2008. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 455–463 (2009).
27. Kufareva, I., Rueda, M., Katritch, V., Stevens, R. C. & Abagyan, R. Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment. *Structure* **19**, 1108–1126 (2011).

28. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
29. Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221–224 (2010).
30. Cornell, W. D. *et al.* A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2309–2309 (1996).
31. MOE. Molecular Operating Environment.
32. Kim, J., Wess, J., van Rhee, A. M., Schöneberg, T. & Jacobson, K. A. Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A2a adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 13987–13997 (1995).

## 第4章 GPCR-リガンド複合体モデル構築法の改良と CXCR7 バーチャルスクリーニングへの応用

### 4.1 緒言

GPCR は、大きなタンパク質ファミリーを形成する上に、承認されている医薬品の主なターゲットであるため、創薬研究における最も重要なターゲットファミリーと考えられている<sup>1</sup>。GPCR をターゲットとした創薬研究プロセスにおいて、その成功確率を上げるために GPCR の正確な立体構造情報が必要とされている<sup>2</sup>。

2,000 年にウシロドプシンの結晶構造<sup>3</sup>が明らかにされた後に、この 10 年あまりの間に  $\beta 2$  アドレナリン受容体<sup>4,5</sup>を始め、複数の X 線結晶構造が明らかにされている<sup>6-16</sup>。これまでに X 線結晶構造<sup>17-20</sup>やホモロジーモデル<sup>20-23</sup>を用いたいくつかのバーチャルスクリーニングによる新規活性化合物探索の成功例報告されている。しかし、構造既知の GPCR との低いアミノ酸配列一致度と受容体構造の多様性のため、ホモロジーモデルを用いたドッキング構造の予測は非常に難しく、ターゲットの重要性に比べて成功例は限られている。Class A に属する GPCR の立体構造は膜貫通ヘリックスのトポロジーは保存されているものの、ループ領域は構造多様性があり、膜貫通領域に関してもヘリックスのコンフォメーションにも多様性が見られる<sup>24</sup>。これらの構造の多様性は内在性リガンドの選択性に寄与していると考えられる。モデル構築の際、受容体の変異実験などの実験情報は、受容体モデル構築の側鎖の最適化の役に立ち、バーチャルスクリーニングの成功につながる<sup>25,26</sup>。いくつかの *de novo* 及び複数の鋳型構造を用いたホモロジーモデリン法が報告されている<sup>24,27-29</sup>。

第3章に示したように、我々は独自の GPCR 立体構造モデル構築法を開発している。この方法は多数のターゲット受容体のホモロジーモデルを構築し、リガンドをそれぞれモデル構造にドッキングさせて、SAR や SDM の情報を最も適切に説明できる結合ポーズを探索する。特に、本手法ではリガンド結合ポケットに近接する残基の側鎖ロータマーと細胞外のループの多様性に特に着目している。この方法は、GPCR Dock 2010 において CXCR4 のリガンド結合部位の予測で最も良い予測結果を残している<sup>30</sup>。しか

し、この  $\beta 2$  アドレナリン受容体を鋳型構造として予測した CXCR4 の精度は 49% で、ドーパミン D3 受容体の最も良かった結果の 81% より低いものだった。これは、単一の鋳型構造に基づく GPCR ホモロジーモデリング法の限界であると考えられる。したがって、遠縁の GPCR にもホモロジーモデリングにより正確な構造を構築できるように第 2 世代の GPCR モデリング手法を開発した。

CXCR7 はインターフェロン誘導性 T 細胞  $\alpha$  誘因物質 (I-TAC/CXCL11) とストロマ細胞由来因子 1 (CXCL12) を認識する<sup>31,32</sup>。CXCR7 は、がん細胞の成長<sup>33</sup>、生存<sup>32</sup> や転移<sup>32</sup> に関わる。また CXCR7 の発現は、肝細胞癌<sup>34</sup>、乳癌及び肺癌<sup>33</sup>、前立腺癌<sup>35</sup>、グリオーマ<sup>36</sup> に関わるため、CXCR7 は悪性腫瘍の治療薬の潜在的なターゲットと考えられている。しかし、これまでに限れた数の CXCR7 リガンドのみしか報告されていない<sup>37-44</sup> ため、さらなるリガンドの発見が期待されている。本章では GPCR モデル構築法の開発及び、CXCR7-アンタゴニスト複合体モデル構築と構造ベースのバーチャルスクリーニングによる新規 CXCR7 アンタゴニストの発見について述べる。

## 4.2 実験の方法

### GPCR の残基番号の付け方

文中のアミノ酸の各残基番号についている上付き文字は、Ballesteros–Weinstein による番号<sup>45</sup>を用いている。細胞外ループ 2 については”E2”と示している。

### GPCRs のアラインメント

GPCRs のアミノ酸配列を UniProt<sup>46</sup> から入手し、ClustalW<sup>47</sup> を用いてアラインメント計算を実行した。計算後、SeaView 配列エディタ<sup>48</sup> を用いてマニュアルでアラインメントを修正した。ウシロドプシンの結晶構造 (PDB: 1HZX), ヒトβ2 アドレナリン受容体 (2RH1), トリβ1 アドレナリン受容体 (2VT4), ヒトアデノシン A2a 受容体 (3EML), ヒト CXCR4 (3OE6) を PDB<sup>49</sup> から入手した。結晶構造のアミノ酸配列は入手した PDB ファイルから抜き出して、GPCR のアミノ酸配列とのアラインメントを作製した。

### CXCR7 ホモロジーモデリングのための鋳型構造の構築

分子の操作と解析は統合計算化学システム MOE<sup>50</sup> の SVL スクリプトと自作の Perl/Python スクリプトを用いて行った。GPCR の構造のコンタクトマップは、それぞれの残基の C $\alpha$ 原子の距離を測定することで作製した。作製したコンタクトマップは、それぞれのアラインメントの位置における数値を比較し、標準偏差を測定した。アラインメントの位置における残基ペアの標準偏差 (Standard deviation; SD) が 0.8 Å のものを数え上げた。それぞれのヘリックス内で、より多くカウントされた残基は構造保存領域 (Structure-conserved regions; SCRs) として、その他の部分を構造可変領域 (Structure-variable regions; SVRs) とした。ヒト CXCR4 (3OE6) は”主鋳型”、他の構造は (1HZX, 2VT4, 2RH1 及び 3EML) ”副鋳型”と指定した。

“主鋳型”の残基は、以下のように、さらに 3 つの部分に分類した。(A) 残基の  $\phi$  と  $\psi$  の二面角と座標の両方を動かし、”主鋳型”と”副鋳型”の中間の角度にする。(B) 二面角は動かさないが、他の残基の

角度の変化に応じ、座標は動かす。(C)残基は固定した。各中間構造は”主構造”と”副構造”の二面角の割合は 7:3 に設定して構築した。

### CXCR7 のホモロジーモデリング

MOE の 2007 年版の pro\_Model 関数を用いて CXCR7 のホモロジーモデルを構築した。鋳型構造の保存されていない残基はアラニンに置換して、保存されていない細胞外ループは鋳型構造から取り除いた。5 つの各鋳型構造あたり、4,000 のホモロジーモデル(合計 20,000 構造)を構築した。構築されたホモロジーモデルはエネルギー極小化計算により構造最適化した。計算には AMBER99<sup>51</sup> ポテンシャルを用いて、距離依存性で誘電率を 1 に設定し、5Å のカットオフ値を用い、最急降下法による計算を行い、続いて共役勾配法でエネルギー極小化した。最大ステップ数は 100 ステップにして、二乗平均平方根(root mean-square; RMS)の勾配は 0.01 に閾値として設定した。構築されたホモロジーモデルのポテンシャルエネルギーを計算し、エネルギーの低い 2,000 構造を続くドッキング計算に利用した。

### 既知化合物のドッキング計算

図 1 に示す既知の CXCR7 のアンタゴニストのうち、化合物 1-3 を CXCR7 のモデル構造へドッキングさせた。MOE Dock を用いて”Affinity dG”のスコア関数を既知化合物のドッキング計算に用いた。リガンドのコンフォメーションは MOE の”Conformation Import”ツールを用いて生成し、それぞれのコンフォメーションをドッキングさせた。リガンドのコンフォメーションあたりの出力する結合ポーズ数は 100 に設定した。残りのパラメータはデフォルト値にした。出力された結合ポーズは Asp179<sup>4,61</sup>, Glu213<sup>5,39</sup>, Asp275<sup>6,58</sup> の近傍にセットしたカチオン性の 3D フェーマコフォア球を用いてフィルタリングした。残った結合ポーズのうち、30,000 の結合ポーズをランダムに選抜し、受容体構造とともにエネルギー極小化した。

エネルギー極小化計算には、MMFF94x (MMFF94s<sup>52</sup> の改良版)ポテンシャル関数を用いた。他のパラメータは CXCR7 のホモロジーモデリングと同じ設定を用いた。エネルギー極小化計算後、リガンドのプロトン化した窒素と結合する可能性のある、リガンド結合ポケットに存在する Asp179<sup>4,61</sup>, Glu213<sup>5,39</sup>, Asp275<sup>6,58</sup> のカルボキシル酸素原子との距離を測定し、最短の距離が 3.2Å より大きいものは削除した。

化合物 **1** と **2** の座標は、自作のクラスタリングプログラムを用いた座標のクラスタリング計算の結果を参考にしている。クラスターの大きい順に結合ポーズを観察し、実験情報と最も矛盾しない結合ポーズを選抜した。化合物 **3** については、化合物 **1** の結合ポーズとの重なりスコアを、MOE の Flexible Alignment tool<sup>53</sup>を改変したスクリプトを用いて計算した。化合物 **1-3** の選択された複合体モデルはエネルギー極小化計算を行った。化合物 **4** のモデルは化合物 **1** のモデルに基づきマニュアルで計算した。

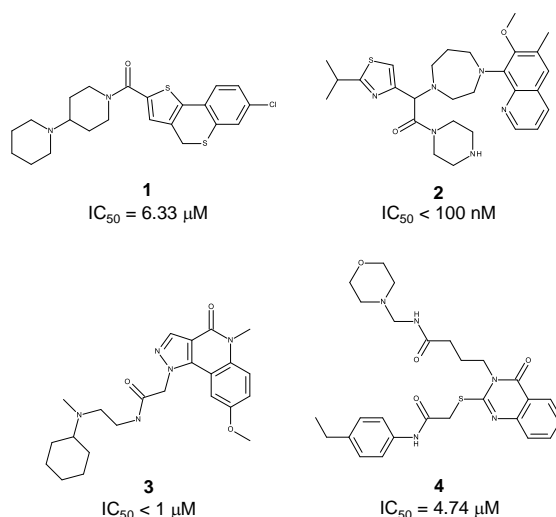


図 1. ドッキング計算に用いた既知活性化合物

#### バーチャルスクリーニング計算のための受容体構造と化合物データセットの準備

受容体構造は MultiCopyMD<sup>54</sup> を用いてバーチャルスクリーニング用に構造精密化を行った。この方法は、1つの受容体内に、全ての活性リガンドがバーチャルに共存できるようなモデルを構築し MD 計算を行う。リガンドの部分電荷とファンデルワールス(van der waals; VDW)パラメータはリガンドの数で割っている。また、各リガンド間の相互作用エネルギーはゼロに設定している。化合物 **1-3** を計算に用いた。我々は、エネルギー極小化後に 30 ピコ秒の MD 計算を行った。MD 計算の後、その構造は再度エネルギー極小化した。小規模なバーチャルスクリーニングの予備計算の結果を参考にして、受容体構造をマニュアルでわずかに改変して、繰り返し調整した。

バーチャルスクリーニングに用いる化合物データセットは、ナミキ商事株式会社 (<http://www.namiki-s.co.jp/>; 4,802,035 化合物)、キシダ化学株式会社 (<http://www.kishida.co.jp/>;

1,633,245 化合物) 及びターゲットタンパクプログラム (TPRP; 195,697 化合物) から入手した購入可能な化合物データセットを用いた。データセット中の化合物構造は、MOE の”Wash” ツールを用いて、マイナー化合物の除去、プロトン化状態の調整、水素原子の付加を行った。ナミキ商事とキシダ化学の化合物データセットは SMILES 記法<sup>55</sup> を用いて比較し、重複化合物を削除した。そして、ドラッグライクネスフィルタリングにより医薬品開発に適した化合物を選抜した (ドラッグライクネスフィルタの詳細は平山らの論文<sup>56</sup> に記載されている)。化合物データは”amine”と”non-amine”のデータセットに分類して以降の作業に用いた。続いて、化合物構造の MACCS フィンガープリント<sup>57</sup> を計算し、Bayon クラスタリングソフトウェア<sup>58</sup> を用いて化合物のクラスタリングを行い、各クラスターの中から代表構造を選抜した。バーチャルスクリーニングのための ”amine”, “non-amine”と TPRP の各データセット化合物の 3 次元構造は corina<sup>59</sup> を用いて生成した。

#### CXCR7 モデル構造に対するバーチャルスクリーニング計算

バーチャルスクリーニング計算は、これまでに我々が開発している CONSENSUS-DOCK<sup>54</sup> を用いて行った。まず、小規模のバーチャルスクリーニング計算をドッキング計算のパラメータを設定するために行った。”amine”と”non-amine”データセットからランダムに選抜した 1,000 化合物を用いて検証した。続いて、大規模のバーチャルスクリーニングを”amine”と”non-amine” および TPRP データセットを用いて行った。出力ドッキングポーズから最も適切なものを以下の方法で選抜した。化合物の分子量とドッキングスコアを用いた回帰分析を行い、実際のドッキングスコアが分子量からの予測値よりも高い(悪い)ものは除去した。また、ドッキングスコアが-80 以上のものは除去した。

水素結合ドナーの 3D フェーマコフォア球を Asp179<sup>4,61</sup> と Asp275<sup>6,58</sup> の周りに配置した。そして、Trp100<sup>2,61</sup> の近傍には芳香環の 3D フェーマコフォア球を配置した。ドッキングポーズは、これらの 3D フェーマコフォアフィルタによって絞り込まれた。残ったドッキングポーズは受容体構造とともに絞り込まれた。最終的にエネルギーの低い 2,000 構造を目視で確認して選抜した。

#### 2D 構造類似性検索



MACCS キーを用いて 2D フィンガープリント検索を行った。既知活性化合物をクエリとして、バーチャルスクリーニング用の化合物データセットに対して検索を行い、各クエリの中で Tanimoto 係数が最も高い結果を利用してランク付けをした。

### CXCR7 阻害活性の測定

生物学的アッセイは、京都大学薬学部の藤井研究室にて測定していただいた。以下に方法を記す。

#### [<sup>125</sup>I]-SDF-1 結合阻害実験

各化合物の CXCR7 受容体結合阻害活性は、[<sup>125</sup>I]-SDF-1 の CXCR7 への結合活性の阻害率として評価し、IC<sub>50</sub> 値を算出した ( $n = 3$ )。アッセイに用いる CXCR7 膜画分は、CXCR7 発現 CHO 細胞から調製した。アッセイ緩衝液[25 mM HEPES pH 7.4, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 140 mM NaCl, 250 mM スクロース, 0.5 % BSA]中にそれぞれ調製した化合物溶液(50 μL)、[<sup>125</sup>I]-SDF-1α溶液(25 μL、0.2 nM/well、パーキンエルマー)、膜画分-ビーズ溶液[25 μL、膜画分:9 μg/well、PVT-PEI type A ビーズ(GE ヘルスサイエンス):0.5 mg/well]を白色 96 穴プレート上で混合し、室温下 1 時間インキュベートした。その後、[<sup>125</sup>I]-SDF-1 の CXCR7-ビーズ複合体への結合シグナルを 1 min/well で TopCount(パーキンエルマー)により定量した。

### 3.3 結果と考察

#### GPCR に最適化したホモロジーモデリング、ドッキング、バーチャルスクリーニング手法

本研究の目的は受容体構造ベースのバーチャルスクリーニングによって CXCR7 に対する新規アンタゴニストを発見することである。そのために我々は GPCR-リガンド複合体モデル構築に最適化したホモロジーモデリング及びリガンドドッキング手法を開発した。本手法は特にリガンド結合ポケットの正確なモデリングに焦点を当てている。作業の手順以下に示す。また作業スキームを図 2 に示す。(1)まず Class A GPCRs の全てのアミノ酸配列を用いてアラインメントを作製した。(2)続いて GPCRs の構造多様性に基づき、続くホモロジーモデリングのために改変した主鎖構造を生成した。(3)改変した 20,000 構造の CXCR7 ホモロジーモデルを生成した。ホモロジーモデル構築の前に膜貫通領域の保存されていない側鎖や細胞外ループの情報を除くために削除した。そして、2,000 の低エネルギー構造を選抜する。(4)既知の活性化化合物をこれらのホモロジーモデルにドッキングさせた。実験情報を満たす最も適切な結合ポーズを選抜して構造最適化し、これを複合体モデル構造とした。

続いて、購入可能な化合物のデータセットを用いて、CXCR7 受容体モデルを用いてバーチャルスクリーニングシミュレーション計算を行った。(5-1) MultiCopyMD シミュレーションを行うことで、バーチャルスクリーニングに適した受容体構造を生成した。(5-2)購入可能な化合物データセットに対しドラッグライクネスフィルタリングとクラスタリング計算を行い化合物の準備をした。(6)予備的に 1,000 化合物程度の化合物を用いてバーチャルスクリーニング計算を行い、既知活性化化合物が上位にランキングされるよう、ドッキングモデルとパラメータを繰り返し調整した。続いて、大規模バーチャルスクリーニング計算を実行して、候補化合物をドッキングスコアと結合ポーズに基づき選抜した。(7)候補化合物の生物学的にアッセイを行い、阻害活性を確認した。

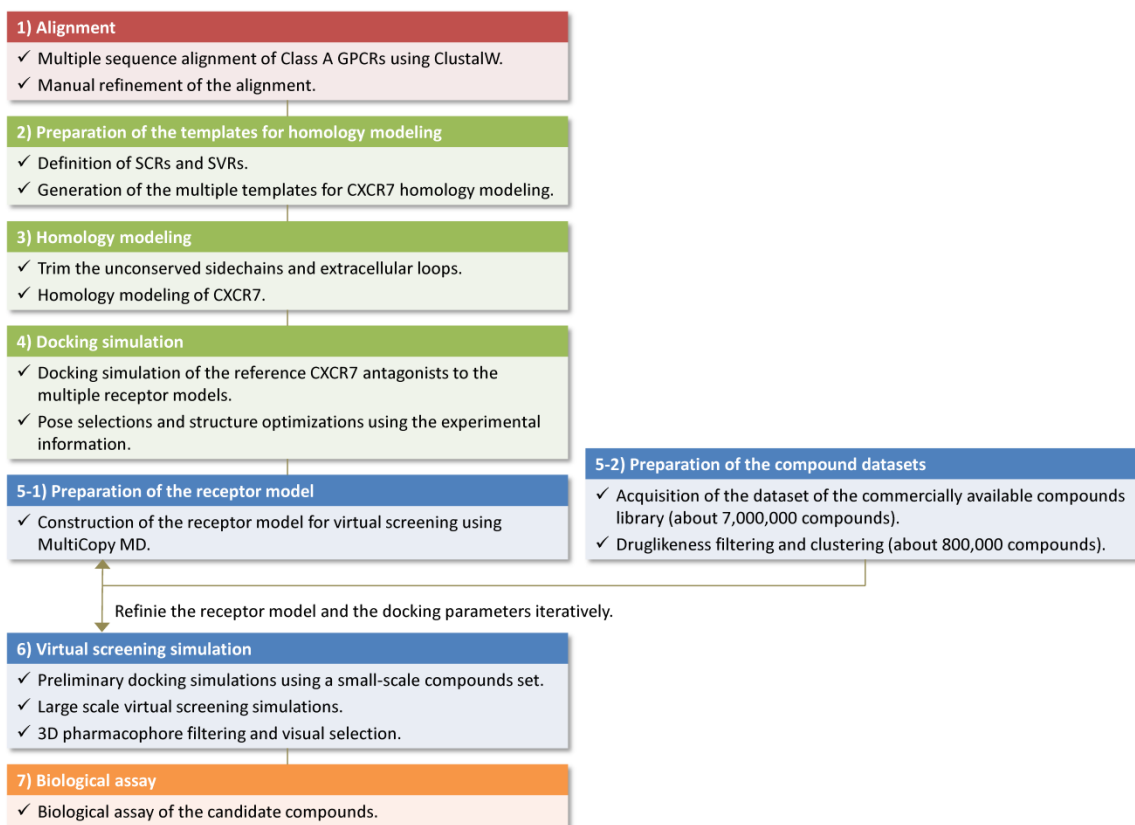


図 2. 本研究における GPCR モデリングの作業スキーム。アミノ酸配列アラインメントのステップは赤いボックスに示す。ホモロジーモデリングとドッキングのステップは緑のボックスで示す。構造ベースのバーチャルスクリーニングのステップは青いボックスで示す。橙のボックスは生物学的なアッセイのステップを示す。

## Class A GPCRs のアミノ酸配列のアラインメント

CXCR7 のホモロジーモデリングを構築するに当たって、嗅覚受容体を除く全ての種の Class A GPCRs のアミノ酸配列アラインメントを作製した。まず始めに、ClustalW を用いて大まかな配列アラインメントを作製した。続いて GPCR 間の低い配列一致度を補うため、膜貫通ヘリックス 3 (TM3) の D/ERY モチーフや TM7 の NPxxY モチーフなどの GPCRs 間で保存されている配列モチーフを参考にしてマニュアルで修正した。細胞外の挿入及び欠失領域は GPCR の構造や異なる種と同じ受容体の配列アラインメントに基づき慎重に修正した。例えば、細胞外第 1 ループ (E1 ループ) のトリプトファン残基 (ヒトβ2 アドレナリン受容体の Trp99 に対応する残基) や TM4 の細胞外部分に近い部分の残基 (ヒトβ2 アドレナリン受容体の Trp173 に対応する残基) は良く保存されており、結晶構造中でも立体的に同じ位置に存在している。

GPCR の X 線結晶構造からアミノ酸配列を抽出して、アラインメントに追加した。CXCR7 と GPCR の X 線結晶構造のアミノ酸配列を用いて作製したアラインメントを図 3 に示す。

#### CXCR7 のホモロジーモデリングのための鋳型構造の準備

GPCR 間の低い配列一致度は、膜貫通ヘリックスにおいても低いため、その主鎖構造の多様性構造にも多様性が見られる。この配列の多様性のため、ホモロジーモデリングにより側鎖構造を正確に予測することは難しい。わずかな主鎖構造の違いが間違った側鎖構造を持つホモロジーモデルを生成し、間違ったリガンド結合ポケットの生成に繋がる事がある。CXCR4 と CXCR7 は共に CXC ケモカイン受容体ファミリーに属するものの、そのアミノ酸配列一致度は全長では 25.4%であり、膜貫通領域でも 32.4%と低い。また、保存されている残基は受容体の細胞内側半分である。また、CXCR4 で低分子 (IT1t) の結合に必要な Asp97<sup>2,64</sup> は CXCR7 では保存されていない。

CXCR4 と CXCR7 の間では、膜貫通ヘリックスの細胞外側半分のアミノ酸配列は保存されていないので、主鎖の多様性を考慮したホモロジーモデリングとドッキング計算を試みた。本研究では、既知の GPCR を比較して、SCR と SVR を設定した。続く作業で SVR の主鎖構造を変更することで、CXCR7 のホモロジーモデリングのための複数の鋳型構造を生成した。

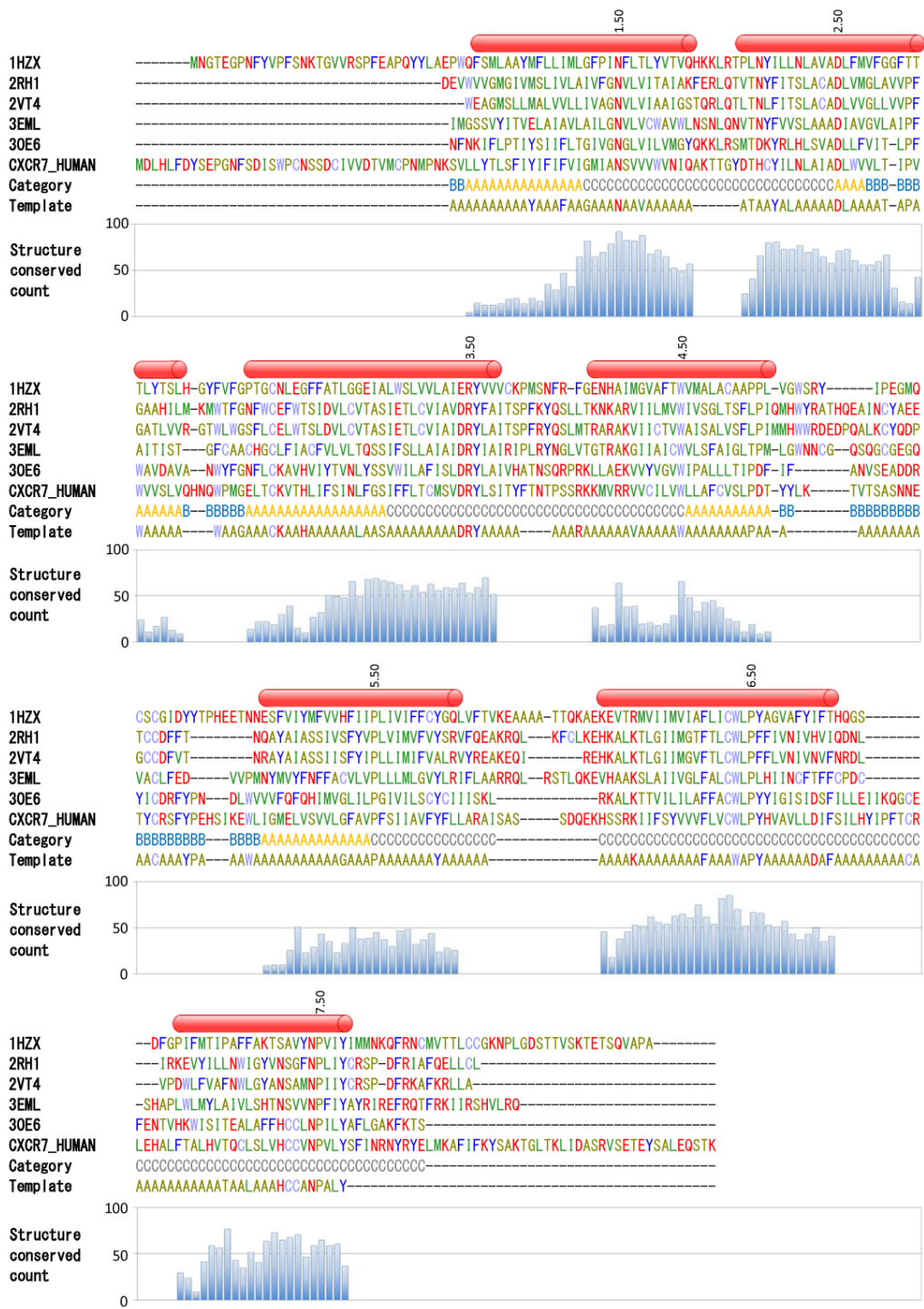


図 3. CXCR7 と構造既知 GPCR の配列アラインメント。ウシロドブシン (PDB: 1HZX)、ヒトβ2 アドレナリン受容体、トリβ1 アドレナリン受容体、ヒトアデノシン A2a 受容体 (3EML)、ヒト CXCR4 (3OE6)、及び CXCR7 (UniProt: CXCR7\_HUMAN) のはアミノ酸配列を用いている。アミノ酸残基は、残基名によって色分けしている。Ala, Gly, Ser は黄色、Val, Ile, Met は緑、Asp, Asn, Glu, Gln は赤、Phe, Tyr, His は青、Cys, Trp は水色でそれぞれ記している。アラインメントの下の“Category”は、鑄型構造の改変の際に用いたカテゴリ (A,B,C) を示している。カテゴリ A, B, C はそれぞれ、黄色、青、灰色で示している。“Template”は、CXCR7 のホモロジーモデリングに用いた、改変後の鑄型構造である。“Structure conserved count”は、SD 値が 0.8 未満だった数を示している。その際、膜貫通領域 (1.31–1.59, 2.38–2.66, 3.22–3.53, 4.39–4.61, 5.36–5.60, 6.31–6.60, 7.22–7.53) のみ計算に用いている。

## SCRs と SVRs の設定

本研究を開始した 2010 年当時、既知の GPCR 立体構造としてウシロドプシン、トリ  $\beta$ 1 アドレナリン受容体、ヒト  $\beta$ 2 アドレナリン受容体、ヒトアデノシン A2a 受容体およびヒト CXCR4 の 5 構造であった。我々は、これらの構造のコンタクトマップを作製し、コンタクトマップを比較することで、SCRs と SVRs に属する残基の定義をした。それぞれの GPCR の膜貫通領域にあたる残基 (Ballesteros–Weinstein 番号で 1.31–1.59, 2.38–2.66, 3.22–3.53, 4.39–4.61, 5.36–5.60, 6.31–6.60, 7.22–7.53) の C $\alpha$ 原子間の距離を測定し、SD 値を計算した。2 つの残基間の SD 値が高い場合は、この部分は立体構造の多様性を示すことになる。一方で、低い SD 値の場合は、このアミノ酸残基の構造は保存されている事を示す。例として、CXCR4 受容体のコンタクトマップを図 4 に示す。コンタクトマップの比較は図 5 に示す。

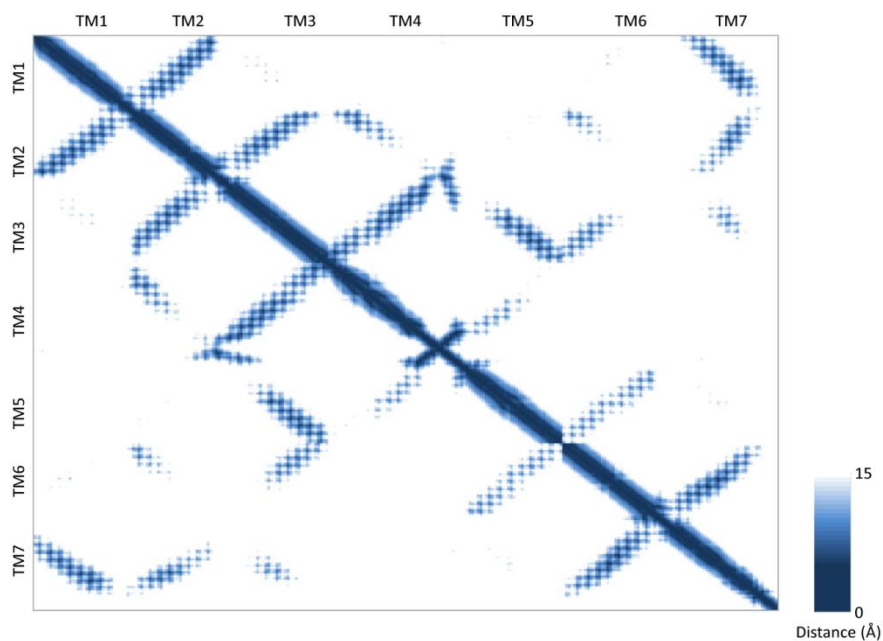


図 4. ヒト CXCR4 (3OE6) のコンタクトマップ。それぞれの残基の C $\alpha$ 原子の距離を測定して、距離が近くなるほど青くなるように示している。

このコンタクトマップの比較を観察すると、GPCR は膜貫通領域のうち、細胞内側の半分は立体構造上保存されていることが分かる。この保存性は、GPCR 活性化の機能に必要な構造であるため考えられる。一方でリガンド結合サイトは構造の多様性を持つ。これはリガンドの選択性に関わるためと考えられる。そ

それぞれの膜貫通ヘリックスを観察するとTM1, TM2, TM3はヘリックスの細胞外の半分はヘリックスの中程(1.43, 2.55, 3.32)でキンクしているが、 $\alpha$ ヘリックス自体としては保存されている。TM4では、これらの位置では $\alpha$ ヘリックスとしても保存されていない。TM5では、細胞外側の半分は結晶構造ではヘリックスが壊れている。TM6とTM7ではGPCR間で構造は保存されている。活性化状態のGPCRにおいてTM6とTM7の構造は、不活性化状態とは異なる構造を持つことが明らかにされている<sup>60-63</sup>。そのため、TM6, 7の構造の保存性は、不活性化状態における保存された構造なのであろうと考えられる。続いて、それぞれのアラインメント上の位置で、SD値が0.8Å未満の残基数をカウントした。カウントした結果を図3の棒グラフにその数を示す。最後に、これらのカウントを参考にしてSCRsとSVRsを決定した。本研究では、1.45-1.59, 2.38-2.55, 3.32-3.53, 4.39-4.54, 5.39-5.60, 6.31-6.60, 7.35-7.53の残基をSCRsに、1.31-1.44, 2.56-2.66, 3.22-3.31, 4.55-4.61, 5.36-5.38, 7.32-7.34の残基をSVRsに設定した。SCRのC $\alpha$ 原子に基づき重ね合わせた構造を図6に示す。

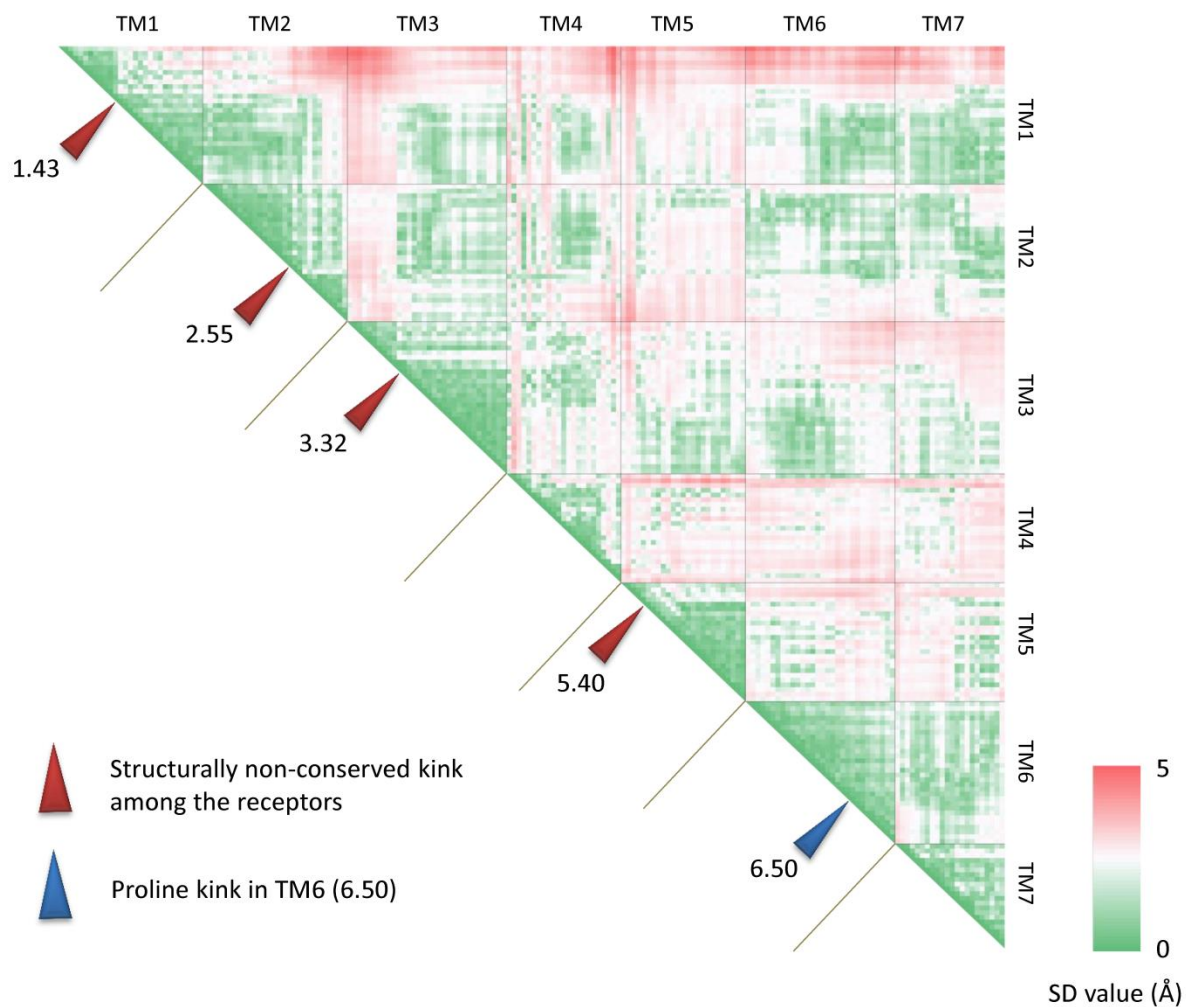


図5. コンタクトマップ比較図。低いSD値を持つ部分は緑、高いSD値を持つ部分はピンク、中程度のSD値を持つものは白で示している。受容体間で構造が保存されていないキंक(1.43, 2.55, 3.32, 5.40)は、赤い矢印で示す。TM6のプロリンのキंक(6.50)は青い矢印で示す。



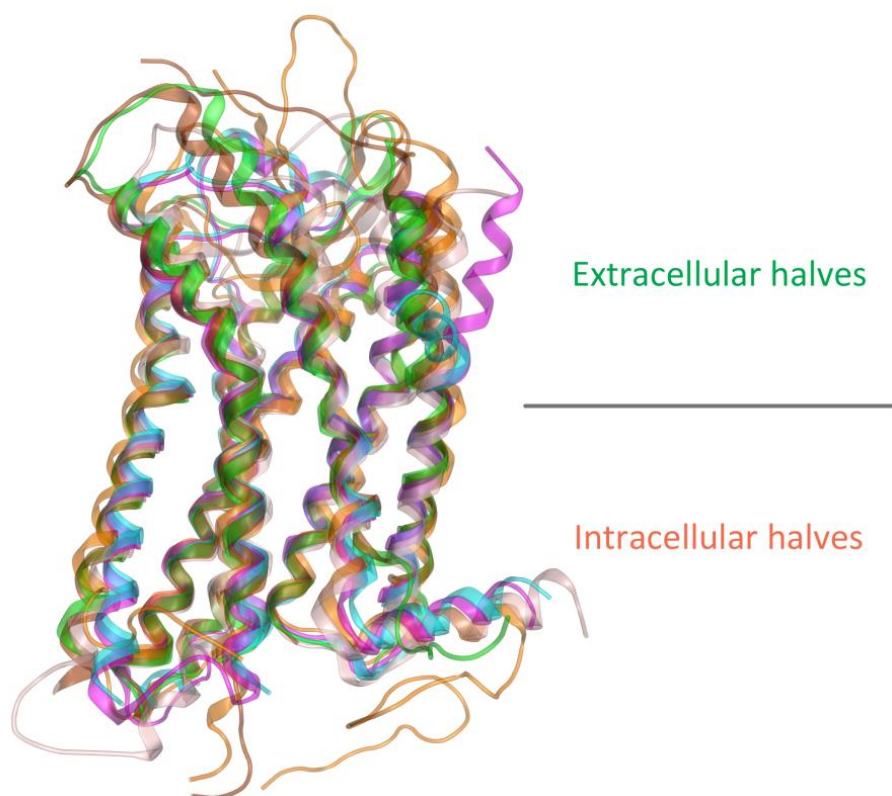


図 6. 構造既知 GPCR の X 線結晶構造の重ね合わせ。ウシロドプシン (PDB code: 1HZX,) は薄茶、ヒト $\beta 2$  アドレナリン受容体 (2RH1) はピンク、トリ $\beta 1$  アドレナリン受容体 (2VT4) は水色、ヒトアデノシン A2a 状態 (3EML) は薄桃、ヒト CXCR4 受容体 (3OE6) 緑のリボン表示で示す。

#### “主鑄型”と“副鑄型”構造を用いた、CXCR7 ホモロジーモデリングの鑄型構造の生成

CXCR7 のホモロジーモデリングのために、膜貫通ヘリックスの細胞外側半分の構造多様性を考慮した複数の鑄型構造を生成した。ヒト CXCR4 (PDB code: 3OE6) を”主鑄型”構造として用いた。これは、CXCR7 と最も進化的に近いためである。ウシロドプシン (1HZX)、ヒト $\beta 2$  アドレナリン受容体 (2RH1)、トリ $\beta 1$  アドレナリン受容体 (2VT4)、ヒトアデノシン A2a 受容体 (3EML) を”副鑄型”として用いた。”主鑄型”と”副鑄型”の割合は 7:3 にして、CXCR4 の主鎖構造を改変した。側鎖構造は、CXCR4 のものを用いた。”主鑄型”と 4 つの”副鑄型”の受容体構造を CXCR7 ホモロジーモデリングに用いた。

4 つの中間構造生成の際は、SVR 残基を 3 つのカテゴリ (A,B,C) に分類した。カテゴリ A の残基は”主鑄型”と”副鑄型”の中間の $\phi$  と  $\psi$  の二面角と座標を持つ。カテゴリ B の残基は”主鑄型”と同じ主鎖二面角を持つが、座標はカテゴリ A の残基の構造変化に応じて変わる。TM2 のケモカイン受容体で保存さ

れている TXP モチーフとその周辺と細胞外ループはカテゴリ B にした。E2 ループは TM3 の構造変化に応じて動くようにした。カテゴリ C に設定した SVR 残基と SCR 残基は、”主鑄型”と同じ二面角と座標に設定した。各残基のカテゴリについては、図 3 と図 7 に示す。

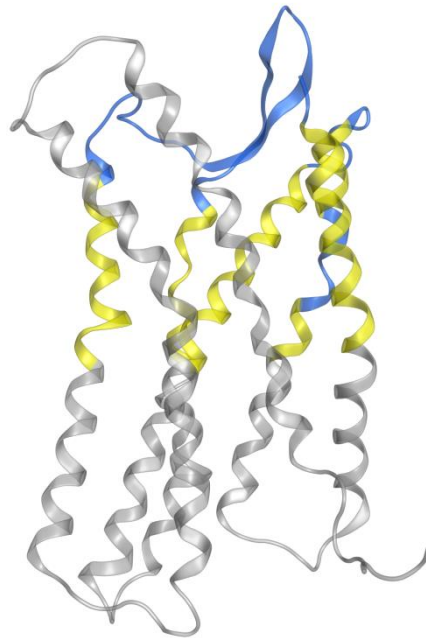


図 7. カテゴリに応じて色分けをしたリボン表示でしめた鑄型構造 (CXCRC4)。カテゴリ (A) の残基は黄色、カテゴリ (B) の残基は青、カテゴリ (C) の残基は白で示す。

### CXCRC7 立体構造のホモロジーモデリング

CXCRC7 のホモロジーモデルを作製した 5 つの鑄型構造を用いて生成した。GPCR で保存されていない側鎖構造をアラニンに置換し、細胞外ループ構造を削除した。2007 年版の MOE は、ホモロジーモデリングでの側鎖構造発生の際、高解像度の X 線結晶構造を用いて作られたロータマーライブラリからランダム残基を選抜しに側鎖構造を割り当てる。同様に削除された細胞外領域ループ部分も、ループライブラリから構造が割り当てられる。このため、これらの削除された側鎖及びループ構造は、鑄型構造を参照せずに新たな構造が生成される。

鑄型構造と GPCR の間の低いアミノ酸配列一致度と構造多様性から推測される、ホモロジーモデルの低い予測精度を補うため、本研究では多数のモデルを構築し、それらに対しドッキング計算を行っている。今回は、鑄型構造 1 種類につき 4,000 構造の合計 20,000 構造の CXCRC7 のモデル構造を構築した。そ

して、その中からポテンシャルエネルギーの低い2,000構造を続くドッキング計算に用いた。その結果のうち、“主鑄型”由来のものは429構造、ウシロドプシン、ヒト $\beta$ 2アドレナリン受容体、トリ $\beta$ 1アドレナリン受容体、ヒトアデノシン A2a 受容体の”副鑄型”由来の中間モデル由来の構造数は、それぞれ、71, 1,295, 137, 68 構造であった。図 8 に 20 のランダムに選抜した出力モデルを示す。これらのモデル構造は複数鑄型構造を利用してモデルを構築しているので、膜貫通領域の細胞外側半分の主鎖構造と細胞外ループに多様性を持っている(図 8A)。そして、側鎖のロータマーについても多様性が見られる(図 8B)。これらの違いは、多様なリガンド結合ポケットの生成につながる。続いてドッキング計算を行い、構造活性相関(SAR)と変異実験の情報と矛盾しないモデルを選抜した。

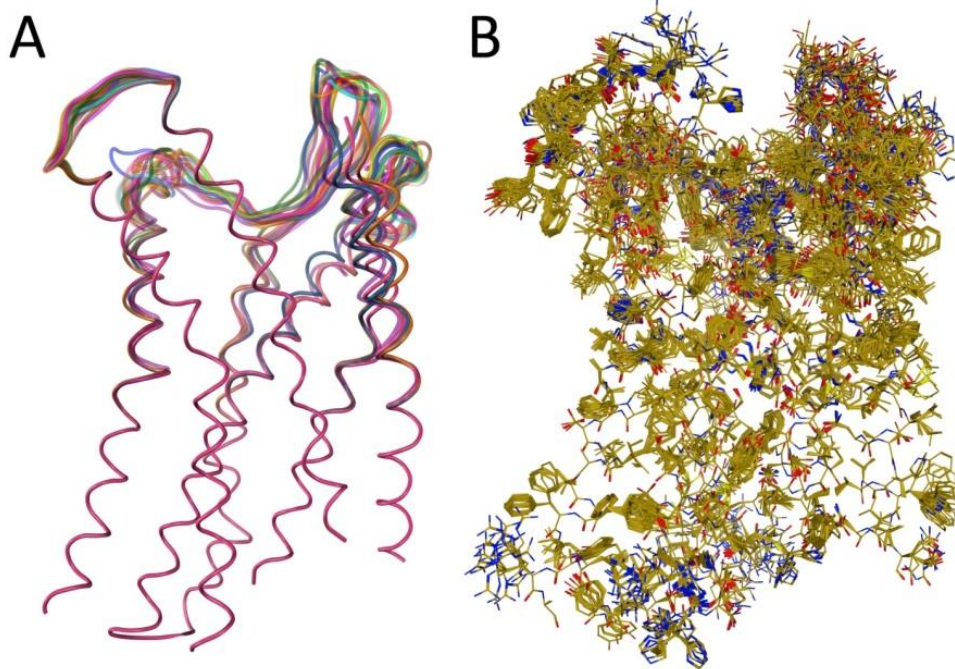


図 8. ドッキング計算に用いる CXCR7 構造モデルの例。構築した 2,000 の受容体モデルからランダムに 20 構造選抜した構造を示す。(A) それぞれの受容体モデルの主鎖構造を、それぞれ異なる色のリボンで表示している。(B) モデル構造をスティック表示したもの。炭素原子は金色で示す。酸素、窒素、硫黄原子はそれぞれ、赤、青、黄色で示す。

## CXCR7 受容体モデルに対するリファレンス化合物を用いたドッキング計算

CXCR7 のホモロジーモデルを構築後、既知の CXCR7 アンタゴニストを受容体モデルに対してドッキング計算を行った。

### 既知活性化合物を用いたドッキング計算

我々のこれまでの研究で2つの $\mu\text{M}$ オーダーのアンタゴニスト活性を持つ CXCR7 アンタゴニスト(化合物 **1**, **4**)を ChemDiv “Diversity-set” 及び “GPCR-focused” 化合物ライブラリ<sup>64</sup>から発見している。サブ $\mu\text{M}$ 程度のアンタゴニスト活性を持つ CXCR7 リガンド(化合物 **2**, **3**)も大まかな SAR 情報とともに特許情報として報告されていた(図 1)ため、これらの既知化合物を用いて、MOE Dock を用いてドッキング計算を行った。

今回使用している Affinity dG スコア関数の反発項は一般的な 6-12 レナードジョーンズポテンシャルよりも弱く、ソフトコアポテンシャルのようになっており、ホモロジーモデルにおける間違っただ鎖コンフォメーションもある程度許容されドッキングされる。このスコア関数はリガンドに比べてリガンド結合ポケットが小さい場合でも適切にタンパク質にドッキングできるように設計されている。既知活性化合物 **1-3** を 2,000 構造の CXCR7 のホモロジーモデルに対してドッキング計算を行った。計算の際、各モデル構造あたり 10 個のドッキングポーズを出力させているので、最終的に化合物 **1** では、1,120,000 個、化合物 **2** では 1,600,000 個、化合物 **3** では 1,540,000 個の結合ポーズをこの計算では出力した。このドッキング計算は次のステップでフィルタリングした。それぞれのステップにおける出力結合ポーズ数は表 1 に示す。

表 11. 既知活性化合物 **1-3** のドッキング計算で出力された結合ポーズの絞り込み。

	Compound 1	Compound 2	Compound 3
Generated ligand conformations	56	80	77
Output docking poses	1,119,994	1,600,000	1,539,970
3D pharmacophore filtering	305,301	630,477	280,352
Energy minimizations	30,000	30,000	30,000
3.2 Å distance filters with oxygen atoms of acidic residues	6,214	14,304	5,768

### 3D ファーマコフォアフィルタリングとモデルの最適化

出力されたドッキングポーズから適切なものを選抜するために、CXCR4 の変異実験データを参考にし、CXCR7 リガンド結合に関わる残基を推定し、3D ファーマコフォアを用いたフィルタリングを行った。CXCR7 に関する変異実験に関する情報がなかったが、CXCR4 では変異実験の結果から、複数の酸性残基がリガンド結合に重要であることが示唆されている<sup>65-70</sup>。CXCR4 の結晶構造からは、これらの残基は、直接及び水を介して間接的にリガンドと結合していることが明らかにされている。CXCR4 と CXCR7 のリガンド結合に関わる可能性のある酸性残基を表 2 に示す。

表 2. CXCR7 と CXCR4 のリガンド結合部位と推測される領域の酸性残基 (計算の先に (方法の所?))

	CXCR7	CXCR4	Comment
TM2	Ser103 <sup>2.64</sup>	Asp97 <sup>2.64</sup>	IT1t interacts with CXCR4
TM4	Asp179 <sup>4.61</sup>	Asp171 <sup>4.61</sup>	CVX15 interacts with Asp171 <sup>4.61</sup> of CXCR4
TM5	Glu213 <sup>5.39</sup>	Gln200 <sup>5.39</sup>	
TM6	Asp275 <sup>6.58</sup>	Asp262 <sup>6.58</sup>	CVX15 interact with Asp262 <sup>6.58</sup> of CXCR4
TM7	Gln301 <sup>7.40</sup>	Glu288 <sup>7.40</sup>	

2 つの酸性残基 (CXCR4 の Asp171<sup>4.61</sup>, Asp262<sup>6.58</sup> 及び CXCR7 の Asp179<sup>4.61</sup>, Asp275<sup>6.58</sup>) は CXCR4 と CXCR7 の間で保存されていた。しかし、CXCR4 の Asp97<sup>2.64</sup> と Glu288<sup>7.40</sup> は CXCR7 では酸性残基としては、保存されていなかった。CXCR4 の Asp97<sup>2.64</sup> は IT1t を含む低分子アンタゴニストの結合に必須の残基であるが、CXCR7 では保存されていない。CXCR4 の Gln200<sup>5.39</sup> は CXCR7 では Glu213<sup>5.39</sup> となっていた。我々は、CXCR7 リガンド結合に関わると推測される部分の酸性残基はリガンドの塩基性官能基と相互作用する可能性があると推測した。CXCR4 のリガンドの実験情報に基づき、我々はカチオンの 3D ファーマコフォア球を CXCR7 のモデルの酸性残基の周囲に配置した (図 9)。CXCR7 の 3D ファーマコフォアフィルタによって、適切である可能性のある結合ポーズを選抜した。

続いて、化合物 **1-3** のフィルタリングした結合ポーズをエネルギー極小化計算を用いて最適化した。計算リソースの都合で、これらのうち 30,000 の結合ポーズをランダムに選抜して、エネルギー極小化計算した。計算後、我々はリガンドの塩基性窒素原子と酸性残基のカルボキシル酸素原子の距離を測定した。最短の距離が 3.2Å 以上の結合ポーズは削除した。化合物 **1** と **2** については、残った結合ポーズの座標

を用いてクラスタリング計算を行った。クラスターのサイズの大きい順に目視で確認を行い、最も適切と思われる結合ポーズをモデル構造とした。

選抜の際は、ドッキングスコアよりも結合ポーズのサイズを重要視した。これは、受容体モデル構造の間違った側鎖とループ構造によりスコアが悪くなるためである。選抜後、ベストの結合ポーズを受容体に配置して、不適切な衝突や歪みがないようにマニュアルによるわずかな改変を行った後、エネルギー極小化計算を行った。化合物 **3** については、リガンドの高いフレキシビリティのため SAR 情報を満たすようなリーズナブルな結合ポーズは得られなかった。そのため、化合物 **1** との重なりスコアを MOE の Flexible Alignment ツールを改変して、算出し、最も良かった結合ポーズをモデルに用いた。

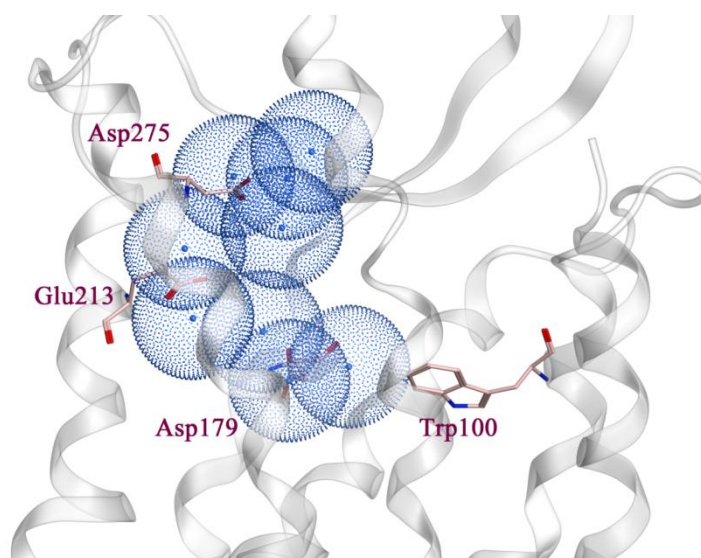


図 9. 既知活性化合物のドッキング計算の出力結合ポーズの絞り込みに用いた 3D ファーマコフォア。Asp179<sup>4,61</sup>, Glu213<sup>5,39</sup>, Asp275<sup>6,58</sup> の近傍にカチオンのファーマコフォア球を配置した。これらの酸性残基と Trp100<sup>3,28</sup> を薄桃色のスティックで表示した。酸素原子、窒素原子はそれぞれ、赤、青で示す。受容体の主鎖構造は半透明のリボン表示で示す。

### ドッキング計算の結果

既知活性化合物 **1-3** と CXCR7 の複合体モデル構造を図 10 に示す。化合物 **1** は他の既知リガンドと比べて比較的にリジッドであるため、今回のドッキング計算に適していると考えた。化合物 **1** の結合モデルを図 10A に示す。結合ポーズの最大クラスター中で、CXCR4 と  $\beta 2$  受容体の中間構造が最も多く含まれ

ていたため、このホモロジーモデルに基づき作製している。モデル構造中、Asp275<sup>6,58</sup>は化合物**1**のピペリジンのプロトン化した窒素原子と相互作用していた。これは、変位実験情報<sup>70</sup>や CXCR4–CVX15 複合体の X 線結晶構造から、Asp275<sup>6,58</sup>がリガンド結合に重要であることと同様であると推測される。化合物**1**の縮合環の Trp100<sup>2,61</sup>と  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用も同様に観察された。このトリプトファン残基は、CCR8 と CCR10 以外の全てのケモカイン受容体で保存されており、CCR5 では低分子リガンドである TAK-779 の結合に重要である<sup>71</sup>。CXCR4–IT1t 複合体では CXCR4 の Trp94<sup>2,61</sup>と IT1t の間で疎水性相互作用が見られる。

化合物**2**は特許情報<sup>44</sup>では活性化合物の多くの類縁活性化合物は縮合ヘテロ環を持つ。この部分構造は、化合物**1**の3環性構造と同じく、高い結合活性を持つのに必要な部分構造であると考えられる。化合物**2**のキノリン環の7位の変換は、水素結合アクセプターや酸性の残基があるが、これらの置換は許容される。化合物**2**のピペラジン部分の窒素原子は活性に影響を及ぼすが、CXCR7の高い結合活性には必ずしも必須ではない。化合物**2**の結合モデルを図 10B に示す。化合物**1**と同じように化合物**2**のキノリン環は Trp100<sup>2,61</sup>と  $\pi$ - $\pi$  スタッキングで相互作用している。このため Trp100<sup>2,61</sup>の近くには 3D ファーマコフォア球はセットしなかったが、化合物**1**と**2**は同じ相互作用をしていた。これは、Trp100<sup>2,61</sup>は重要な残基であることが予想される。このアスパラギン酸残基は CXCR4 でも保存されており、CXCR4–CVX15 複合体では CVX15 の Arg2 との相互作用に関わっている。キノリン部分の7位の置換は、細胞外側であり、極性の残基 (Tyr195<sup>E2</sup>, Arg197<sup>E2</sup>, His298<sup>7,37</sup> など) に置換基の周りが囲まれているので、どの官能基にも変換できる。ドッキング計算の小さいクラスターに見られた他の結合ポーズは Asp275<sup>6,58</sup> と結合するものも見られた (図 12)。両方の結合ポーズは、歪みなどは見られなかったが、最終的により大きなクラスターからの最も適切と考えられる結合ポーズを選抜した。

化合物**3**の結合ポーズは**1**と同じリガンド結合ポケットに結合する。このドッキングポーズは、化合物**1**で選抜したポーズと同じである (図 10C)。化合物**1**と同様に、Asp179<sup>4,61</sup>との極性相互作用と Trp100<sup>2,61</sup>の  $\pi$ - $\pi$  スタッキングが見られた。このピラゾロキノリン環のカルボニル部分は、His121<sup>3,29</sup>と相互作用する。



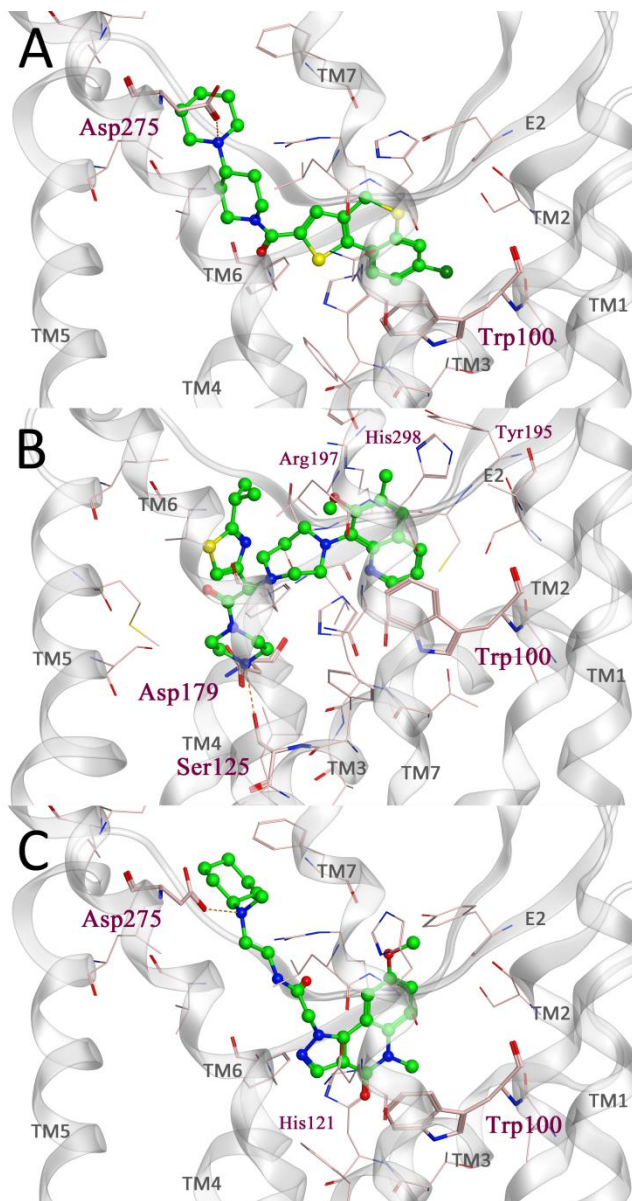


図 10. 既知活性化合物 1(A), 2(B), 3(C)の結合モデル。リガンド構造はボール& スティックモデルで示してある。リガンド近傍の残基は、線で示してある。Trp100<sup>2,61</sup>と Asp275<sup>6,58</sup>はスティック表示で示す。リガンドと受容体の炭素原子は、それぞれ緑と桃色で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。受容体の主鎖構造は透明なリボン表示で示す。

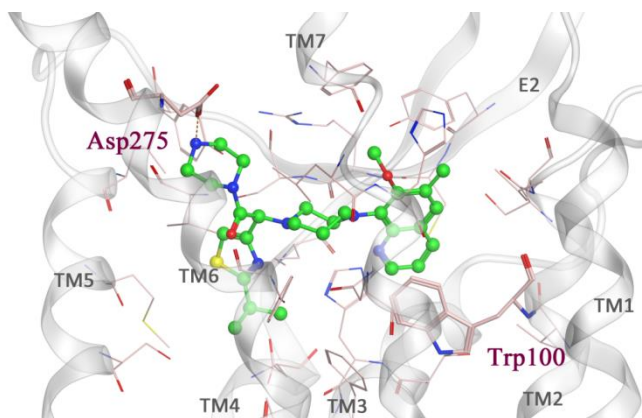


図 11. 化合物 2 の予測されたもう一つの結合モデル。リガンド構造はボール& スティックモデルで示してある。リガンド近傍の残基は、線で示してある。Trp100<sup>2,61</sup>と Asp275<sup>6,58</sup>はスティック表示で示す。リガンドと受容体の炭素原子は、それぞれ緑と桃色で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。受容体のシユア構造は透明なリボン表示で示す。



化合物 **4** を **1** の複合体構造を参考にして受容体にドッキングさせた。これは、化合物 **4** は、15 の回転可能な結合角を持っているフレキシブルな化合物であり、この研究での自動ドッキングには不向きなためである(図 12)。化合物 **4** の結合ポーズは、**1** と **3** に類似していて、フェニルアミド部分は細胞外領域に伸びていた。

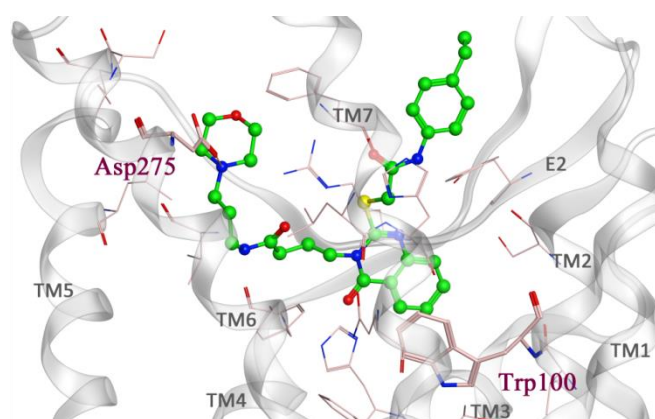


図 12. 既知活性化合物 **4** の結合モデル。リガンド構造はボール&スティックモデルで示してある。リガンド近傍の残基は、線で示してある。Trp100<sup>2,61</sup> と Asp275<sup>6,58</sup> はスティック表示で示す。リガンドと受容体の炭素原子は、それぞれ緑と桃色で示す。酸素、窒素、硫黄原子は、それぞれ赤、青、黄色で示す。受容体のシユア構造は透明なリボン表示で示す。

最終的に化合物 **1-4** を結合させた CXCR7 の受容体モデルは大きな歪みのないモデルを構築することができた。さらに化合物 **2** は、実験情報と矛盾しないものであった。続いて、化合物 **1-3** の複合体モデルを用いてバーチャルスクリーニング計算を行った。

### CXCR7 リガンドのバーチャルスクリーニング計算の準備

#### バーチャルスクリーニングのための CXCR7 構造モデルの構築

バーチャルスクリーニングのための受容体モデルを自作の MOE 用のスクリプト MultiCopy MD を用いて構築した。このスクリプトは、1つの受容体内に、複数の活性リガンドが仮想的に共存できるようなモデルを構築する MD 計算中を行う。リガンドの部分電荷とファンデルワールス (VDW) パラメータはリガンドの数で割っている。また、それぞれのリガンド間の相互作用エネルギーはゼロに設定している。バーチャルスクリーニングのためのモデル構築には、**1-3** の結合ポーズを利用した。

#### バーチャルスクリーニングのための化合物データセットの準備

購入可能な化合物のデータセットはナミキ商事(4,802,035 化合物)とキンダ化学(1,633,245 化合物)とターゲットタンパクプログラム(195,697 化合物)から入手した。これらの化合物データセットは、化合物の構造情報を用いてマージした後に“amine”と“non-amine”のデータセットに分割した。これは、報告されている CXCR7 のアンタゴニストの多くは、構造中に塩基性のアミノ基を含んでいるためである。ドラッグライクネスフィルタリングとクラスタリング計算の後の“amine”と“non-amine”の化合物データセットの中の化合物数は、それぞれ 187,185 と 401,707 構造であった。TPRP データセットは変更せずそのまま用いた。

### CXCR7 モデル構造に対するバーチャルスクリーニング

#### 小規模バーチャルスクリーニングと計算条件設定

バーチャルスクリーニングのためのモデルの構造とドッキングパラメータを CONSENSUS-DOCK を使った小さなスケールのドッキング計算を用いて評価した。化合物 **1-3** と“amine”と“non-amine”データセットからランダムに選んだ 1,000 化合物を計算に用いた。最終的に出力された 989 化合物中のうち、化合物 **1-3** のランキングは、それぞれ 6 位、2 位、3 位だった。分子量とドッキングスコアの散布図を図 13 に示す。我々の CONSENSUS-DOCK のドッキングスコアは分子量に相関が見られるが、全ての活性化合物は、同じ分子量の化合物と比べて良い結果を示していた。我々は、活性化合物が十分上位に濃縮されていると考え、続く大規模バーチャルスクリーニング計算を行った。

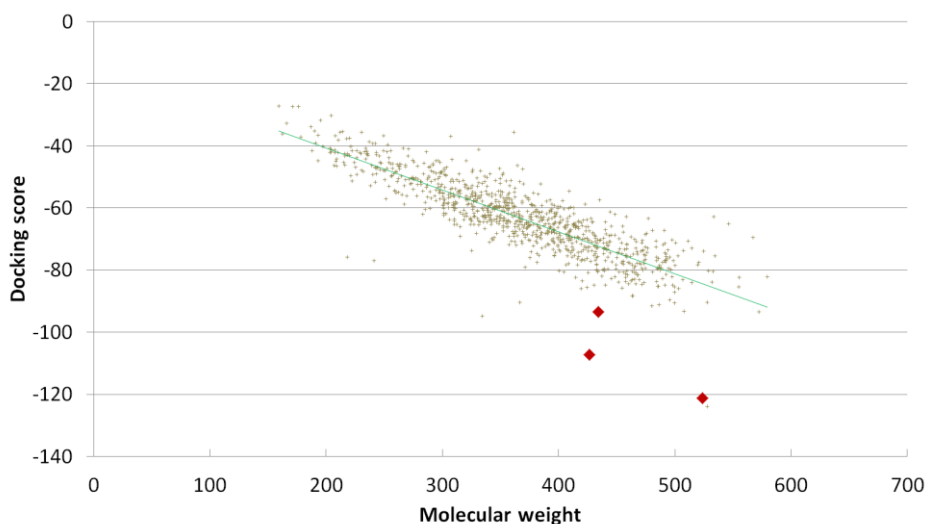


図 13. 小規模の予備的なドッキング計算から得られた、分子量と出力ドッキングスコアの散布図。既知活性リガンドは赤い菱形で示す。小規模データセットは茶色の小さな十時で示す。分子量とドッキングスコアから得られた回帰直線は緑の線で示す。

#### 大規模バーチャルスクリーニング計算

“amine”, ”non-amine” と TPRP の化合物データセットを用いて大規模バーチャルスクリーニングを行った。出力ドッキングポーズはドッキングスコアと 3D ファーマコフォア球を用いてフィルタリングした。分子量に比べて高い(悪い)スコアの化合物を削除するために、分子量とドッキングスコアを用いて回帰分析を行った。続いて、分子量からのスコアの予測値よりも高いドッキングスコアを持つ化合物は削除した。ドッキングスコアが-80 以上のものも同様に削除した。残ったドッキングポーズは 3D ファーマコフォア検索によりフィルタリングした。既知活性構造の結合モデル構造を参考にして、Trp100<sup>2,61</sup> の近傍には芳香環のファーマコフォア球を配置して、Asp179<sup>4,61</sup> と Asp275<sup>6,58</sup> の近傍には、水素結合ドナーのファーマコフォア球を設置した(図 14)。

受容体の構造をエネルギー極小化した後、目視で最も適切な化合物を選抜した。選抜の際には、Asp179<sup>4,61</sup> と Asp275<sup>6,58</sup> との極性相互作用と Trp100<sup>2,61</sup> との相互作用を重視した。出力されたドッキングポーズにて、受容体との相互作用に不要な水素結合ドナーとアクセプターを持つものは目視で削除した。最終的に”amine”と”non-amine”のデータセットからそれぞれ、310, 79 化合物、TPRP データセットからは 310 化合物が CXCR7 アンタゴニストの候補化合物そして選抜された。

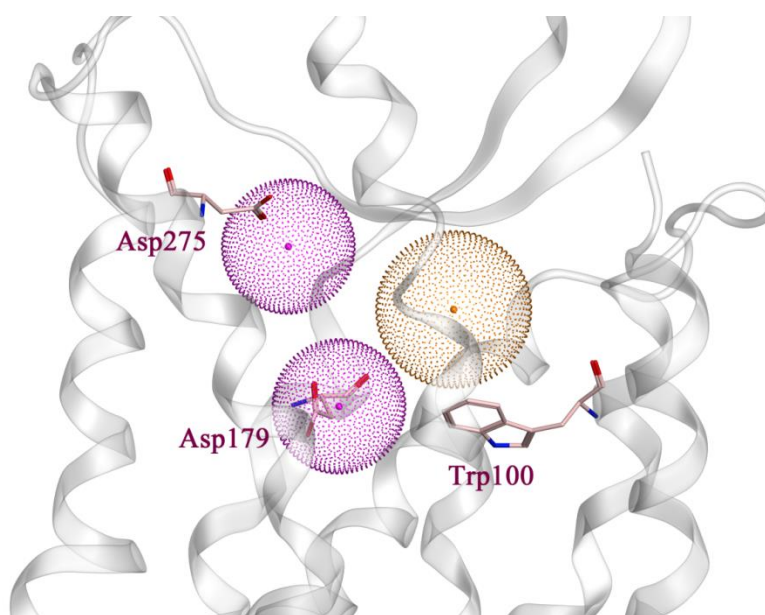
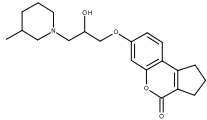
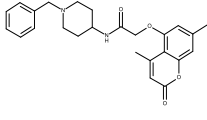
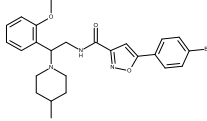
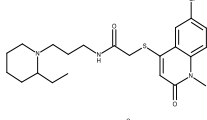
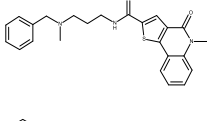
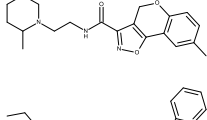
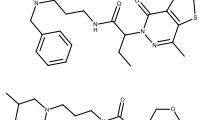
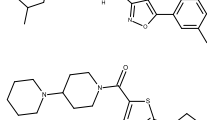
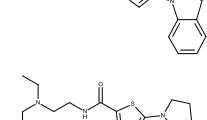
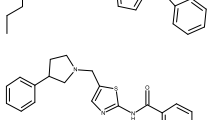
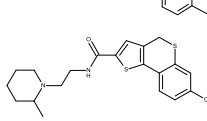
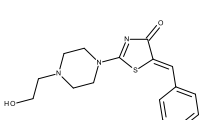



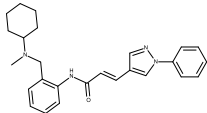
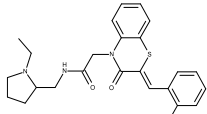
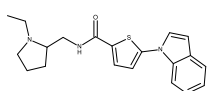
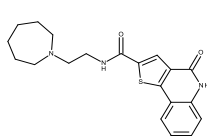
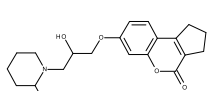
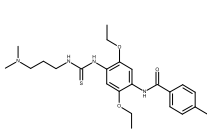
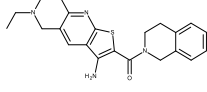
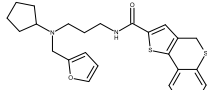
図 14. 大規模バーチャルスクリーニング計算の結果をフィルタリングする際に用いた 3D フェーマコフォア球。水素結合ドナーの 3D フェーマコフォア球(ピンク)は、Asp179<sup>4,61</sup> と Asp275<sup>6,58</sup> の近傍に配置した。芳香環の 3D フェーマコフォア球(橙)は、Trp100<sup>3,28</sup> の近傍に配意した。Asp179<sup>4,61</sup>, Asp275<sup>6,58</sup>, Trp100<sup>3,28</sup> は、スティック表示で示す。受容体の主鎖構造は半透明なリボンで示す。

### 生物学的活性の評価とヒット化合物の結合様式

626 の候補化合物について CXCR7 阻害アッセイにより阻害活性の測定を行った。その結果、21 化合物が CXCR7 の SDF-1 結合阻害を IC<sub>50</sub> 値で 1.29–11.4μM のアンタゴニスト活性を持つ事が分かった。ヒット化合物の構造と活性値を表 3 に示す。また、CXCR4 の阻害活性を表 4 に示す。

表 3. ヒット化合物の CXCR7 に対する結合親和性と物理化学的特性

Compound	Structure	IC <sub>50</sub> (μM)	SlogP	MW
5		1.29	3.82	357.4
6		1.49	3.74	420.5
7		1.87	5.41	498.4
8		2.16	4.16	436.0
9		2.21	4.52	419.5
10		2.64	3.41	355.4
11		2.78	5.15	476.6
12		2.92	3.91	383.5
13		3.2	4.53	395.6
14		3.89	4.29	371.5
15		4.35	4.96	377.5
16		5.27	5.54	407.0
17		5.36	1.33	360.5

18		5.84	5.56	414.5
19		6.19	3.91	439.6
20		6.75	3.90	353.5
21		7.00	3.90	383.5
22		8.02	3.96	357.4
23		9.79	4.28	458.6
24		10.0	3.99	392.5
25		11.4	6.71	452.6

化合物 **5**, **7**, **17** の結合モデルを図 15 に例として示す。ヒット化合物は多様な母核をもつが、その結合ポーズは共通している。候補化合物中、79 化合物が "non-amine" データセットから選抜したものの、この中にヒット化合物はなく、全てのヒット化合物は陽イオン化し得る窒素原子を持っていた。既知構造の複合体モデルからは、CXCR7 の Asp179<sup>4,61</sup> と Asp275<sup>6,58</sup> にプロトン化した窒素と相互作用する可能性が示唆されていたが、全てのヒット化合物のドッキング結果は Asp275<sup>6,58</sup> が相互作用する結合ポーズになっていた。イオン化した窒素原子の周辺が嵩高い置換基に変換されている(化合物 **7**, **11**, **21**, **25** など)が、これは受容体の細胞外側に近く、CXCR7 の結合に許容される。Trp100<sup>2,61</sup> との  $\pi$ - $\pi$  スタッキングは全ての結合モードにおいて観察された。

特にヒット化合物のうち、8 化合物は既知化合物 **1** と **3** のように 5-6-6 の三環性の母核を持つ。一方、単環及び二環性の母核を持つヒット化合物もあり、不都合な歪みなく受容体と結合できる結合ポーズを

持っていた。19 化合物のヒット化合物において、芳香環部分とプロトン化した窒素の間のリンカー部分にカルボニル基が存在した。既知化合物のモデリングの際はこのカルボニル部分の影響は考慮していなかったが、モデル構造上、His121<sup>3,29</sup>, Arg197<sup>E2</sup>, Gln301<sup>7,40</sup> は、このカルボニル炭素の近傍に存在し、極性相互作用に関わる可能性が示唆される。注目すべき点として、バーチャルスクリーニングからの候補化合物は、Trp100<sup>2,61</sup>, Asp179<sup>4,61</sup>, Asp275<sup>6,58</sup> との相互作用に基づき選抜されている。これらの上記のカルボニル基の予測していなかった極性相互作用がドッキング計算により示唆された。

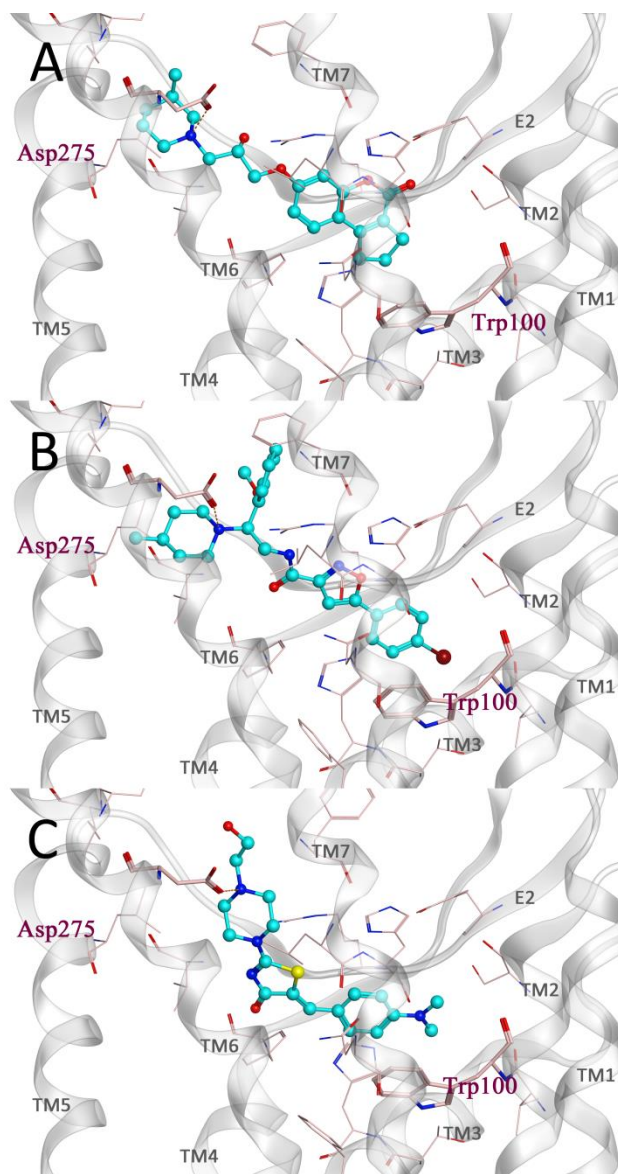


図 15. ヒット化合物の予測された結合ポーズ。(A),(B),(C)はそれぞれ化合物 5,7,17 の結合ポーズである。リガンドはボール&スティック表示で示す。リガンド近傍の残基はライン表示で示す。Trp100<sup>2,61</sup> と Asp275<sup>6,58</sup> はスティック表示で示す。リガンドの炭素原子は水色で、受容体の炭素原子は薄桃色で示す。酸素、窒素、硫黄、臭素原子はそれぞれ赤、青、黄色、茶色で示す。主鎖構造は透明なリボンで表示している。

7つのヒット化合物が縮合ヘテロ環上に存在した。特にクマリン骨格の化合物(化合物 5,6と22)は比較的良い $IC_{50}$ 値であった。結合モデルでは、いくつかの極性残基(Ser103<sup>2,64</sup>, Tyr195<sup>E2</sup>, His298<sup>7,37</sup>など)は、カルボニル酸素の近傍に存在するので、極性の作用が存在する可能性がある。

今回のドッキング計算において、最初のドッキング計算の結果では、ヒット化合物のランキングはあまり高くなかった。(表5)。これらは、3Dファーマコフォアサーチによって数が減らされているので、この3Dファーマコフォアフィルタが活性化合物の選抜に寄与しているようだ。MACCS キーを用いた単純な2Dフィンガープリントを用いた類似性検索結果と比較した。既知リガンドをクエリとして、バーチャルスクリーニング用データセットの順位をTanimoto係数の値を算出し、各クエリの中で最も高い結果を用いたランク付けをした。“amine”及びTPRP化合物データセットの出力化合物数は、それぞれ186,083、194,610化合物であった(表6)。TPRPデータセットには40,071のカチオン性化合物が含まれていた。化合物13は、1と共通の[4-(1-piperidyl)-1-piperidyl]-(2-thienyl)methanone部分を持つため非常に高かった。しかし、他の化合物は既知活性化合物とは低い構造類似性であった。これは、受容体の構造ベースのバーチャルスクリーニングが、新規の部分構造を持つ活性リガンドの発見に有用であることを示している。

図16は候補化合物とヒット化合物のオクタノール/水分配係数の予測値(SlogP)を示す。ヒット化合物は候補化合物に対して比較的高いSlogP値を持っていた。候補化合物の平均は3.3であり、ヒット化合物の平均4.1であった。本研究では、バーチャルスクリーニングの計算用のデータセットは、あらかじめクラスタリング計算を行うことで減らしている。さらなるリード最適化の際に、オリジナルの市販化合物データセットを用いる事で、よりよい物理化学的特性を持つ化合物を得られると期待される。



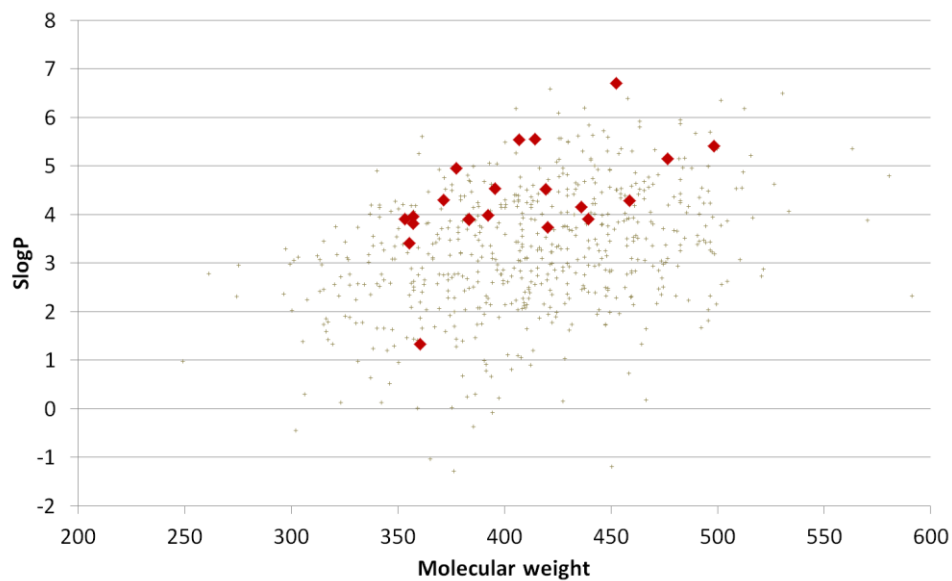


図 16. 候補化合物の分子量と SlogP 値の散布図。ヒット化合物は赤い菱形で示す。候補化合物は薄茶色い十時で示す。

表 4. ヒット化合物の CXCR4 に対する SDF-1 結合阻害活性

Compound	% inhibition at 10 $\mu$ M (CXCR4)
5	32
6	10
7	8
8	4
9	11
10	3
11	2
12	6
13	23
14	16
15	23
16	4
17	12
18	4
19	4
20	4
21	19
22	2
23	13
24	3
25	9

表 5. ドッキング計算結果中の活性化化合物のランキング

Compound	Rank in amine dataset (Rank at visual selection stage)	Rank in TPRP dataset (Rank at visual selection stage)
5	180,841 (1,529)	32,391 (2,266)
6	n/a	14,242 (1,200)
7	132,158 (1,135)	n/a
8	262,368 (2,114)	n/a
9	42,087 (334)	17,407 (1,431)
10	222,984 (1,832)	n/a
11	52,073 (421)	n/a
12	169,900 (1,429)	n/a
13	n/a	66,446 (3,472)
14	178,946 (1,510)	n/a
15	298,940 (2,348)	41,685 (2,645)
16	401,904 (2,804)	n/a
17	290,117 (2,297)	n/a
18	n/a	24,012 (1,827)
19	114,005 (955)	n/a
20	n/a	62,338 (3,353)
21	n/a	50,260 (2,986)
22	n/a	34,972 (2,367)
23	n/a	7,993 (752)
24	n/a	51,241 (3,019)
25	111,574 (943)	n/a

表 6. MACCS フィンガープリントを用いた活性化化合物に対する類似性検索結果。

Compound	Rank in amine dataset	Rank in TPRP dataset (Rank in cationic compounds)
5	90,382	31,462 (17,426)
6	n/a	9,906 (7,272)
7	13,600	n/a
8	41,029	n/a
9	48,831	11,764 (8,334)
10	3,790	n/a
11	27,867	n/a
12	11,904	n/a
13	n/a	21 (20)
14	51,523	n/a
15	38,985	10,059 (7,299)
16	2,547	n/a
17	38,288	n/a
18	n/a	9,666 (7,096)
19	63,530	n/a
20	n/a	24,401 (14,608)
21	n/a	8,987 (6,621)
22	n/a	21,455 (13,332)
23	n/a	31,527 (17,477)
24	n/a	5,219 (4,149)
25	13,765	n/a

### GPCR-リガンド複合体モデル構築法の限界と今後の展望

これまでに我々の開発した GPCR モデリング法は、GPCR Dock 2010 において CXCR4 のリガンド結合ポケット予測においてトップに成績を収めている。CXCR4 の研究の結果から、我々の方法は、4 つのカスタマイズが高精度リガンド結合ポケットの予測に寄与していると考えている。第一の理由は高精度のアミノ酸配列アラインメントである。第二は保存されている膜貫通領域の座標は極力固定して構造最適化していることである。CXCR4 受容体モデル構築の際は、ヘリックス部分は主鎖構造については鋳型構造そのものを用いてモデリングを行い、49%のリガンド結合ポケットの精度であった(しかし GPCR Dock 2010 では最も良い結果だった)ので、当時では最も良い方法だったと考えられる。第三に、鋳型の保存されていない部分の情報を取り除くため、保存されていない残基はアラニンに変換して、保存されていない細胞外ループは取り除いた。トリミングした受容体の構造を使って、多数の受容体モデルを生成して、その受容体構造に対しドッキング計算を行った。第四のカスタマイズは、ターゲットとなるリガンド(IT1t と

CVX15)に加えて、他の低分子アンタゴニスト<sup>70</sup>の構造も同様に構築を試みたことである。これらは実験情報を利用したフィルタリングを行い、最も良いモデルを選抜した。しかし、CXCR4のTM2のTXPモチーフによる欠失を予測できず、結果的にIT1tのポーズは上手く予測できなかった。

本研究ではCXCR4のモデル構築の結果を参考にして、CXCR7の研究をさらに改良した。まず、アミノ酸配列のアラインメントを改良した。正確な膜貫通ヘリックスのアラインメントは正確なリガンド結合ポケットの予測に大きく寄与するためである。次に我々はCXCR7ホモロジーモデリングの際に主鎖構造を変えた中間モデルを作製した。これは、“主鋳型”と“副鋳型”の中間の $\varphi$ と $\psi$ の二面角の構造を持っている。それぞれの鋳型構造のわずかな主鎖構造の違いが、正しいヘリックスの位置の予測の可能性をあげ、リガンド結合部位の側鎖のロータマーが正しく予測する可能性をあげる。

しかし、さらに正確な構造予測を行うには改良の余地がある。これは、結晶構造とコンタクトマップの比較によって、ヘリックスの移動が見られるためである。図17にSCR残基のヘリックスの軸を計算したものを示す。ヘリックスの軸は、各残基のC $\alpha$ 原子からの最短距離を通る直線の方程式である。各受容体の軸の比較から、TM4とTM5では移動していることが分かる。そのため、次世代のモデリングの方法では、ヘリックスの移動をさせることで、GPCR構造の予測精度を上げることができると考えている。

近縁のGPCRsにもヘリックス領域に多様性が存在する。例えば、 $\beta$ 1と $\beta$ 2アドレナリン受容体は、アミノ酸配列一致度は十分に高い(全長で49.1%。膜貫通領域で70.2%)が $\beta$ 1アドレナリン受容体のTM1は $\beta$ 2アドレナリン受容体と比べてキックしていた。我々のホモロジーモデリング手法は、多様な結晶構造からのGPCRの主鎖構造を用いていて、アドレナリン受容体のように近縁の受容体にも適用できる。

ドッキング計算では、出力ドッキングポーズはクラスタリングされ、クラスター内のポーズ数の大きい順に目視で確認していた。これはドッキングスコアは不正確な側鎖のロータマーにより不正確であると考えたためである。本研究では、MOEの“Affinity dG”というスコア関数を用いた。これは、リガンド結合サイトに比べリガンドが大きい場合に適用できるように設計されている。この関数はホモロジーモデリングにおいて、ある程度の側鎖のロータマーの間違いは許容されるようになるが、その弱い反発項のため、ドッキング関数自体の精度は良くないと考えられる。このため、ドッキング計算のスコアとポーズの選択の方法は、さらなる改良の必要であると考えられる。

本研究では、21 化合物の  $\mu\text{M}$ -order の様々な母核を持つ CXCR7 阻害活性を持つヒット化合物をバーチャルスクリーニングで選抜した 626 化合物から発見した。このヒット率は ChemDiv 化合物ライブラリからのランダムスクリーニングよりも 100 倍高く有用な手法であると考えられる。

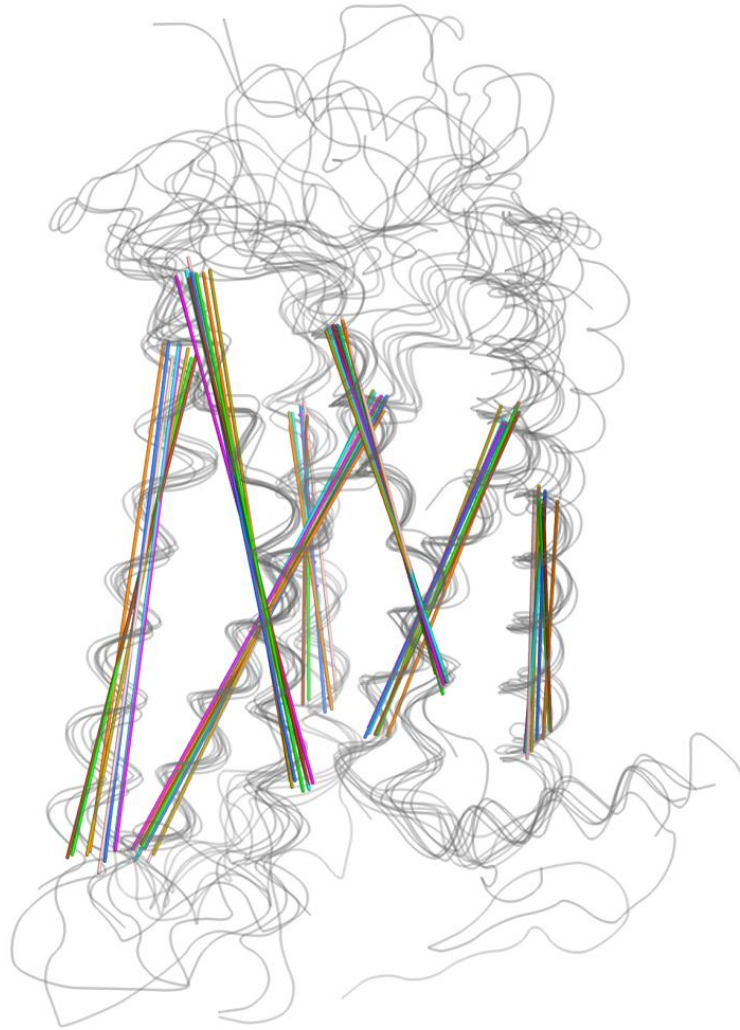


図 17. 膜貫通ヘリックスの SCR 部分の軸。ウシロドプシン (1HZX)、ヒト $\beta$ 2 アドレナリン受容体 (2RH1)、トリ $\beta$ 1 アドレナリン受容体 (2VT4)、ヒトアデノシン A2a 受容体 (3EML)、ヒト CXCR4 ケモカイン受容体 (3OE6) の軸を、それぞれ、薄茶、ピンク、水色、薄桃、緑で示す。主鎖構造は灰色のライン表示で示す。

### 3.4 まとめ

本研究では、複数の鋳型構造を用いた GPCR-リガンド複合体モデル構築法を開発し、CXCR7 のリガンド探索のためのバーチャルスクリーニング計算を行った。既知 GPCR の X 線結晶構造から作製したコンタクトマップの比較から、TM1, TM2, TM3, TM4 では、細胞内側半分の膜貫通領域は構造が保存されており、細胞外側半分は GPCR 間で多様性が見られた。TM6 と TM7 は、構造的に保存されていた。この結果を用いて、SCRs と SVRs を定義した。CXCR7 のホモロジーモデリングの際に CXCR4(主鋳型)を含む 5 つの構造(副鋳型)を用いて 4 つの中間構造を用いた。この中間構造は、SVR から選んだ残基において、主鋳型と副鋳型の中間の  $\phi$  と  $\psi$  の主鎖二面角を持つ。ホモロジーモデル構築の際は、鋳型構造の保存されていない側鎖構造と細胞外側のループを削除した。20,000 の生成したホモロジーモデルから、ポテンシャルエネルギーの低い 2,000 構造を選抜し、既知の報告されている CXCR7 リガンドに対してドッキング計算を行った。

生物学的な実験情報に基づき、適切と考えられた結合ポーズは、リガンドのプロトン化した窒素原子と Asp179<sup>4,61</sup> もしくは Asp275<sup>6,58</sup> の側鎖の酸素原子が相互作用していた。加えて、Trp100<sup>2,61</sup> とリガンドの  $\pi$ - $\pi$  スタッキングも重要であると考えられた。リガンドの結合ポーズは、CXCR4 と低分子リガンド(IT1t)とも異なっていた。受容体構造ベースのバーチャルスクリーニングを行う事で、626 の購入した候補化合物のうち、21 のヒット化合物を得る事ができた。このヒット率は市販化合物ライブラリからのランダムスクリーニングよりも 100 倍高く、我々の開発したバーチャルスクリーニングのための GPCR 構造モデリング手法は、新規の GPCR の医薬品候補を開発できることを示している。さらにこれらのヒット化合物は、新規の CXCR7 リガンドの開発の良いスタートポイントになると考えられる。

単一鋳型構造を用いたホモロジーモデリングと比べ、我々の複数の鋳型を用いたホモロジーモデルは、より広いコンフォメーション空間を探索できる。膜貫通ヘリックスの移動を考慮したさらなる改良を行うことで、既知の鋳型構造を用いて、より遠縁の GPCR の構造を精度良く予測できるようになると期待される。

## 参考文献

1. Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug. Discov.* **5**, 993–996 (2006).
2. Borshell, N., Papp, T. & Congreve, M. Deal watch: Valuation benefits of structure-enabled drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **10**, 166 (2011).
3. Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739–745 (2000).
4. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007).
5. Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265 (2007).
6. Warne, T. *et al.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486–491 (2008).
7. Jaakola, V.-P. *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211–1217 (2008).
8. Wu, B. *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**, 1066–1071 (2010).
9. Chien, E. Y. T. *et al.* Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **330**, 1091–1095 (2010).
10. Shimamura, T. *et al.* Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**, 65–70 (2011).
11. Hanson, M. A. *et al.* Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* **335**, 851–855 (2012).
12. Haga, K. *et al.* Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **482**, 547–551 (2012).
13. Manglik, A. *et al.* Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* (2012).doi:10.1038/nature10954
14. Granier, S. *et al.* Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* **485**, 400–404 (2012).
15. Thompson, A. A. *et al.* Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* **485**, 395–399 (2012).
16. Wu, H. *et al.* Structure of the human  $\kappa$ -opioid receptor in complex with JD1c. *Nature* **485**, 327–332 (2012).
17. De Graaf, C. *et al.* Crystal structure-based virtual screening for fragment-like ligands of the human histamine H(1) receptor. *J. Med. Chem.* **54**, 8195–8206 (2011).
18. Carlsson, J. *et al.* Structure-based discovery of A2A adenosine receptor ligands. *J. Med. Chem.* **53**, 3748–3755 (2010).
19. Kolb, P. *et al.* Structure-based discovery of beta2-adrenergic receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6843–6848 (2009).
20. Carlsson, J. *et al.* Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 769–778 (2011).
21. Tikhonova, I. G. *et al.* Discovery of novel agonists and antagonists of the free fatty acid receptor 1 (FFAR1) using virtual screening. *J. Med. Chem.* **51**, 625–633 (2008).
22. Engel, S. *et al.* A virtual screen for diverse ligands: discovery of selective G protein-coupled receptor antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5115–5123 (2008).
23. Kiss, R. *et al.* Discovery of novel human histamine H4 receptor ligands by large-scale structure-based virtual screening. *J. Med. Chem.* **51**, 3145–3153 (2008).
24. Katritch, V., Rueda, M., Lam, P. C.-H., Yeager, M. & Abagyan, R. GPCR 3D homology models for ligand screening: lessons learned from blind predictions of adenosine A2a receptor complex. *Proteins* **78**, 197–211 (2010).
25. Cavasotto, C. N. *et al.* Discovery of novel chemotypes to a G-protein-coupled receptor through ligand-steered homology modeling and structure-based virtual screening. *J. Med. Chem.* **51**, 581–588 (2008).
26. Evers, A. & Klabunde, T. Structure-based drug discovery using GPCR homology modeling: successful virtual screening for antagonists of the alpha1A adrenergic receptor. *J. Med. Chem.* **48**, 1088–1097 (2005).
27. Shacham, S. *et al.* PREDICT modeling and in-silico screening for G-protein coupled receptors. *Proteins* **57**, 51–86 (2004).

28. Abrol, R., Bray, J. K. & Goddard, W. A., 3rd Bihelix: Towards de novo structure prediction of an ensemble of G-protein coupled receptor conformations. *Proteins* (2011).doi:10.1002/prot.23216
29. Worth, C. L., Kleinau, G. & Krause, G. Comparative sequence and structural analyses of G-protein-coupled receptor crystal structures and implications for molecular models. *PLoS ONE* **4**, e7011 (2009).
30. Kufareva, I., Rueda, M., Katritch, V., Stevens, R. C. & Abagyan, R. Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment. *Structure* **19**, 1108–1126 (2011).
31. Balabanian, K. *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 35760–35766 (2005).
32. Burns, J. M. *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.* **203**, 2201–2213 (2006).
33. Miao, Z. *et al.* CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 15735–15740 (2007).
34. Monnier, J. *et al.* CXCR7 is up-regulated in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by endothelial cells. *Eur. J. Cancer* **48**, 138–148 (2012).
35. Wang, J. *et al.* The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **283**, 4283–4294 (2008).
36. Hattermann, K. *et al.* The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res.* **70**, 3299–3308 (2010).
37. Wijtmans, M. *et al.* Synthesis, modeling and functional activity of substituted styrene-amides as small-molecule CXCR7 agonists. *Eur. J. Med. Chem.* **51**, 184–192 (2012).
38. Gravel, S. *et al.* The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* **285**, 37939–37943 (2010).
39. Kalatskaya, I. *et al.* AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol. Pharmacol.* **75**, 1240–1247 (2009).
40. Melikian, A., Burns, J., McMaster, B., E., Schall, T. & Wright, J. J. Inhibitors of the binding of chemokines I-TAC or SDF-1 to the CXCR2 receptor. *Patent WO2004058705* (2004).
41. Melikian, A. & Wright, J. J. K. Substituted arylamides. *Patent WO2006038989* (2006).
42. Thomas, W. D., Leleti, M. R. & Pennell, A. M. K. CXCR4 modulators. *Patent WO2007115231* (2007).
43. Leleti, M. R., Thomas, W. D., Zhang, P. & Pennell, A. M. K. CXCR4 modulators. *Patent WO2007115232* (2007).
44. Chen, X. *et al.* Modulators of CXCR7. *Patent WO2010054006* (2010).
45. Ballesteros, J. & Weinstein, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* **25**, 366–428 (1995).
46. The UniProt Consortium The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Research* **38**, D142–D148 (2009).
47. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
48. Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221–224 (2010).
49. Bernstein, F. C. *et al.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535–542 (1977).
50. MOE Molecular Operating Environment.
51. Cornell, W. D. *et al.* A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2309–2309 (1996).
52. Halgren, T. A. MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *Journal of Computational Chemistry* **20**, 730–748 (1999).
53. Labute, P., Williams, C., Feher, M., Sourial, E. & Schmidt, J. M. Flexible alignment of small molecules. *J. Med. Chem.* **44**, 1483–1490 (2001).
54. Okamoto, M. *et al.* Identification of death-associated protein kinases inhibitors using structure-based virtual screening. *J. Med. Chem.* **52**, 7323–7327 (2009).
55. Weininger, D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Modeling* **28**, 31–36 (1988).
56. Horio, K., Muta, H., Goto, J. & Hirayama, N. A simple method to improve the odds in finding ‘lead-like’ compounds from chemical libraries. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 980–984 (2007).
57. MDL Information Systems, Inc. MACCS Keys.
58. Bayon: a simple and fast clustering tool <http://code.google.com/p/bayon/>



59. Sadowski, J. & Gasteiger, J. From atoms and bonds to three-dimensional atomic coordinates: automatic model builders. *Chemical Reviews* **93**, 2567–2581 (1993).
60. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2011).
61. Xu, F. *et al.* Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* **332**, 322–327 (2011).
62. Choe, H.-W. *et al.* Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* **471**, 651–655 (2011).
63. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta$ (2) adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–180 (2011).
64. ChemDiv Inc. ChemDiv Chemical Database.
65. Brelot, A., Heveker, N., Montes, M. & Alizon, M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 23736–23744 (2000).
66. Gerlach, L. O., Skerlj, R. T., Bridger, G. J. & Schwartz, T. W. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 14153–14160 (2001).
67. Hatse, S. *et al.* Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Mol. Pharmacol.* **60**, 164–173 (2001).
68. Gerlach, L. O. *et al.* Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor. *Biochemistry* **42**, 710–717 (2003).
69. Rosenkilde, M. M. *et al.* Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J. Biol. Chem.* **279**, 3033–3041 (2004).
70. Wong, R. S. Y. *et al.* Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocylam, and noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1485–1495 (2008).
71. Hall, S. E. *et al.* Elucidation of binding sites of dual antagonists in the human chemokine receptors CCR2 and CCR5. *Mol. Pharmacol.* **75**, 1325–1336 (2009).

## 第5章 結論

本研究では、GPCR-リガンド複合体モデル構造予測法の開発を行い、この手法を CXCR4-FC131 の立体構造モデルの構築、及びCXCR7の受容体構造ベースのバーチャルスクリーニングへ応用した新規リガンドの探索を試みた。

まず、CXCR4のX線結晶構造を用いて、ペプチド性CXCR4アンタゴニストであるFC131複合体モデル構造構築を行った。ドッキングさせるFC131の構造は、実験的に得られたNMR構造を用い、分子動力学計算結果からサンプリングした構造をドッキング計算に用いた。構築した複合体モデル構造は、FC131のL-Arg3とL-Nal4はCXCR4の結晶構造リガンドであるCVX15のArg2とNal3に対応していた。一方で、この結合様式はFC131のD-Tyr1とL-Arg2はCVX15の結合部位とは異なる位置に結合していた。しかし、FC131とCVX15の異なる結合様式は、水を介した水素結合ネットワークを含み、実験情報を矛盾なく説明することができた。加えてFC131のいくつかの類縁体の構造活性相関も結合モデルから説明できた。本研究で構築したモデル構造は、CXCR4-リガンド複合体の相互作用様式の理解と、新たなCXCR4アンタゴニストのデザインに役立つと考えられる。

次にGPCRのホモロジーモデル構造とリガンドの複合体モデル構造構築法を開発した。配列一致度の低い遠縁のGPCRの予測を行うため、ホモロジーモデリングを行う際、保存されていない側鎖構造の情報を除去するため、GPCR間で保存されていない残基をアラニンに置換した。そして、多数のホモロジーモデリングを構築し、それに対してドッキング計算を行った。この操作を行うことで、可能性のある多様な側鎖構造を持つモデル構造を発生させることができる。続いてスコア上位の多数のホモロジーモデル構造に対し、リガンドドッキング計算を行った。ドッキング計算には、MOE DockのAffinity dGスコア関数を用いた。これは、評価関数の反発項が弱い、ソフトコアポテンシャルとなっている。このスコア関数を用いる事でドッキング計算の際に側鎖ロータマーの間違いも、ある程度許容されてドッキング結果が出力されるようになる。出力されたリガンド結合ポーズはリガンドの座標のクラスタリングを行った。大きなクラスターの結合ポーズから、最も実験情報と矛盾しないポーズを目視選択して、複合体モデルとした。この方法を用いて $\beta 2$  アドレナリン受容体からアデノシン A2a 受容体を予測したところ、RMSD 2.8 Å の精

度の良い結果が得られた。より客観的に本手法の精度の評価を行うために、GPCR Dock 2010 に参加した。その結果、CXCR4リガンド結合ポケット予測で、最も良い結果を得る事ができた。CXCR4と構造既知で鋳型として用いた $\beta$ 2アドレナリン受容体の配列一致度は膜貫通領域においても25.8%と低く受容体構造のモデル構築は難しいが、このようなケースでも比較的精度の良い受容体構造モデルを構築できる事を示すことができた。

上記の GPCR モデリング法を改良し、複数の鋳型構造を用いた GPCR-リガンド複合体モデル構築法を開発した。そして CXCR7-リガンド複合体モデル構築に適用し、さらにリガンド探索のためのバーチャルスクリーニング計算を行った。既知 GPCR の X 線結晶構造から作製したコンタクトマップの比較から、TM1, TM2, TM3, TM4 では、細胞内側半分の膜貫通領域は構造が保存されており、細胞外側半分は GPCR 間で多様性が見られた。TM6 と TM7 は、構造的に保存されていた。この結果を用いて、SCRs と SVRs を定義した。CXCR7 のホモロジーモデリングの際に CXCR4 (主鋳型) を含む 5 つの構造 (副鋳型) を用いて 4 つの中間構造を用いた。この中間構造は、SVR から選んだ残基において、主鋳型と副鋳型の中間の  $\phi$  と  $\psi$  の主鎖二面角を持つ。ホモロジーモデル構築の際は、鋳型構造の保存されていない側鎖構造と細胞外側のループを削除した。20,000 の生成したホモロジーモデルから、ポテンシャルエネルギーの低い 2,000 構造を選抜し、既知の報告されている CXCR7 リガンドに対してドッキング計算を行った。

生物学的な実験情報に基づき、適切と考えられた結合ポーズは、リガンドのプロトン化した窒素原子と Asp179<sup>4,61</sup> もしくは Asp275<sup>6,58</sup> の側鎖の酸素原子が相互作用していた。加えて、Trp100<sup>2,61</sup> とリガンドの  $\pi$ - $\pi$  スタッキングも重要であると考えられた。リガンドの結合ポーズは、CXCR4 と低分子リガンド (IT1t) とも異なっていた。受容体構造ベースのバーチャルスクリーニングを行う事で、626 化合物の購入した候補化合物のうち、21 化合物のヒット化合物を得る事ができた。このヒット率 (3.3%) は、ランダムスクリーニングと比べて 100 倍のヒット率であった。これらの結果は、我々の開発したバーチャルスクリーニングのための GPCR 構造モデリング手法は、新規の GPCR の医薬品候補を開発できることを示している。さらにこれらのヒット化合物は、新規の CXCR7 リガンドの開発の良いスタートポイントになると考えられる。

本研究で開発した GPCR モデル構築手法により、これまでの手法では困難であったフレキシブルなリガンドや、遠縁の GPCR をターゲットとしたモデル構築が可能となった。単一鑄型構造を用いたホモロジーモデリングと比べ、我々の複数の鑄型を用いたホモロジーモデルは、より広いコンフォメーション空間を探索できる。膜貫通ヘリックスの移動を考慮したさらなる改良を行うことで、既知の鑄型構造を用いて、より遠縁の GPCR の構造を精度良く予測できるようになると期待される。

## 6章 謝辞

本研究は立命館大学大学院 生命科学研究科 生命情報学専攻 計算生命化学研究室にて菊地武司教授の指導の下行われました。菊地先生には東京理科大学、倉敷芸術科学大学時代も含め大変お世話になりました。心より感謝いたします。

株式会社ファルマデザイン 代表取締役社長 古谷利夫博士には大変お世話になりました。この分野における多くの成長の機会と博士号のためのテーマのご提供を頂いた事に心より感謝いたします。

京都大学大学院薬学研究科 ケモゲノミクス・薬品有機製造学専攻 藤井信孝教授には素晴らしい研究テーマを与えて頂き、博士号取得への道を開いていただきました。心より感謝いたします。大石真也博士には、CXCR4-FC131 複合体モデル構築と CXCR7 バーチャルスクリーニングの研究全般についてお世話になりました。特に英文論文執筆の際には、大変丁寧なアドバイスを頂きました事に感謝いたします。小林数也博士には、合成化学者の観点から CXCR4 と FC131 の相互作用についてのご意見を頂き、モデル構造の最適化に協力していただきました。久保達彦氏、棚原憲子氏には CXCR7 のアンタゴニストのアッセイにご協力いただきました事に感謝いたします。

東京大学大学院 薬学系研究科 長野哲雄教授、東京大学 創薬イノベーションセンター小島宏建教授には、新規 CXCR7 アンタゴニストの発見に至る化合物のご提供を頂いた事に感謝いたします。

株式会社ファルマデザインの同僚の皆様には大変感謝しております。研究や論文執筆についてのアドバイスをいただき、大変お世話になりました。

最後に暖かい目で見守ってくださった家族に感謝いたします。

2013 年

吉川 寧

## 公表論文

1. Yoshikawa, Y., Kobayashi, K., Oishi, S., Fujii, N. & Furuya, T. Molecular modeling study of cyclic pentapeptide CXCR4 antagonists: new insight into CXCR4-FC131 interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 2146–2150 (2012).
2. Yoshikawa, Y. *et al.* Optimized Method of G-Protein-Coupled Receptor Homology Modeling: Its Application to the Discovery of Novel CXCR7 Ligands. *J. Med. Chem.* (2013). doi:10.1021/jm400307y