

分子凝集をトリガーとする酵素阻害の現象解明と 新規創薬分野への展開

森田 健太^{*1} 原田 隆平^{*2}

Novel Enzyme Inhibition by Small Molecule Aggregation: A New Avenue in Drug Discovery

Kenta MORITA^{*1} and Ryuhei HARADA^{*2}

Molecular-targeted drugs have advanced cancer treatment, but traditional small-molecule drug discovery faces challenges. While antibody drugs offer high specificity, their high costs drive the need for alternative approaches. This study reveals that Mannan 007 (Mn007), a small molecule initially identified for Fukuyama congenital muscular dystrophy, forms aggregates that selectively inhibit DNase I, a virulence factor in *Streptococcus pyogenes*. Unlike conventional inhibitors, Mn007 aggregates interact with specific hydrophobic pockets on DNase I, as shown by computational and experimental analyses. By designing derivatives, we found that stronger aggregation enhances inhibition. However, when C12-R2, an optimized derivative, was incorporated into liposomes, it lost activity, suggesting that random aggregation is key to inhibition. Our findings challenge the notion that molecular aggregation leads to non-specific inhibition and propose a novel strategy for small-molecule-based enzyme inhibitors, opening new possibilities for drug discovery.

1. 研究の背景と目的

この10年で、がん治療において「分子標的薬」という言葉が一般化した。近年では、がんだけでなく様々な分野で分子標的薬の適用が拡大している。分子標的薬には大きく分けて低分子薬と抗体薬がある。いずれも、特定の酵素や受容体といった生体分子（タンパク質）に結合し、その機能を阻害、あるいは亢進させることで治療を行う。しかし、低分子薬は従来の創薬戦略であるハイスループットスクリーニングの効率が劇的に低下しており、新薬開発が滞っている。一方で、抗体薬は高い特異性と生体適合性を持つことから盛んに開発が進んでいるが、生産コストが低分子薬と比して極めて高く、医療費のひっ迫を加速させているという問題がある。分子標的薬については未だ、創薬のパラダイムシフトが強く求められている。

その中で、筆者らは、福山型筋ジストロフィの治療薬候補化合物として報告されたMn007¹⁾が水中の溶解度をを超えて不溶になり始めると、DNA分解酵素（DNase）に対する阻害活性が現れることを発見した（図1²⁾）。さらに検討を重ねたところ、化合物1はDNaseを特異的に阻害することを見出した（図2）。凝集して働く酵素阻害剤は過去に報告されているが、その阻害機構は物理吸着であり特定の酵素に対する特異性が無いと結論付けられていた³⁾。つまり、申請者らが発見した酵素阻害様式は、低分子化合物の凝集体が酵素特異的な阻害活性を示すという全く新しいものである。

DNaseは溶血性連鎖球菌（溶連菌）感染症と深く関連している。溶連菌はDNaseを多量に分泌することで人体の免疫システムから逃れ、人体内で増殖していく。劇症型溶連菌は人食いバクテリアとも呼ばれ、感染すると急速に多臓器不全が進行し、敗血症性ショックを引き起こす。抗菌薬の薬効スピードが追いつかず、現代においても致死率30%に達する疾患である。ここにDNase阻害剤を投与すれば人体の免疫システムを正しく機能させることができる。DNaseの阻害剤としてはEDTA等の金属キレート剤が報告されているが、毒性が高く実用的ではない。

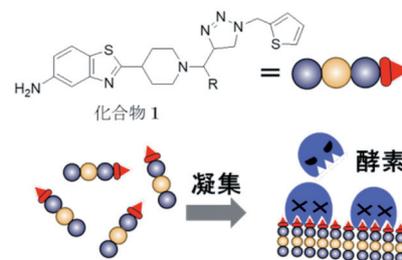


図1 本研究で用いる新規酵素阻害剤とその分子凝集による酵素阻害のイメージ。

2025年2月20日 受理

^{*1} 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

^{*2} 筑波大学計算科学研究センター

そこで本研究では、Mn007の凝集体がDNase Iを阻害する様式について計算科学的手法と実験科学的手法の両面から解析し、低分子凝集体が引き起こす酵素阻害機構を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

Mn007とDNase Iのドッキング計算

Mn007とDNase Iの複合体構造（ドッキングポーズ）を機械学習に基づくドッキングソフトであるDiffDockにより予測した。DNase Iの構造は実験構造（PDBid: 4AWN）を用い、Mn007モノマーとの複合体構造を予測した。また、DiffDockによる予測構造をクラスタリングすることで、DNase I表面に分布すると予想されるMn007の結合ポケットを割り出した。

分子動力学（MD）計算によるMn007誘導体の凝集性評価

Mn007とその誘導体の凝集性評価として、それぞれの化合物を80個シミュレーションボックス（ $100 \times 100 \times 100 \text{ \AA}^3$ ）に詰め込んだ混雑システムをモデリングし、300 Kから800 Kにわたる温度領域でそれぞれ200 nsのMD計算を実行した。解析として、化合物間のコンタクト数を計算し、凝集度合いを示す指標とした。

Mn007の誘導体分子合成

Mn007, および, Mn007誘導体M71, M72はナード株式会社に合成を委託した。

また、1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl] carbodiimide (EDC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP) を用いて、Mn007の部分構造である1-(2-thienylmethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid (R2) と dodecylamine を縮合させC12-R2を合成した。合成の確認は ^1H NMRとMALDI-TOF/MSを用いて行った。

DNase Iアッセイ

DNase I, C12-R2のDMSO溶液, および, 蛍光修飾DNAを MgSO_4 -Tris HCl Buffer (pH 7.5) へ加え, 蛍光光度測定を行った (Ex/Em = 495/515)。終濃度は, DNase I 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DMSO 5%, 蛍光修飾DNA 100 nM, Mg^{2+} 6 mMである。単位時間当たりの蛍光強度変化を酵素の反応速度とした。

光散乱強度測定

DLS装置を用いて、DNase Iアッセイの反応溶液の静的光散乱強度を測定した。

リボソームの作製

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)/1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)/Cholesterol = 40:40:20の物質質量比でクロロホルムに溶解した。C12-R2もしくはその類縁体(Comp. 2 ~ Comp. 6)を添加し溶媒を留去して薄膜化した。 MgSO_4 -Tris HCl Bufferを加え、凍結融解法により阻害剤を脂質膜上に配列したリボソームを作製した。終濃度は、DOPC 30 μM , DPPC 30 μM , Cholesterol 15 μM , 阻害剤 60 μM である。

3. 結果と考察

まず、Mn007が結合し得るDNase Iの部位を検討するため、Mn007モノマーとDNase Iのドッキングシミュレーションを行った。その結果、DNase Iの持つ疎水的な2つのポケットが主要なクラスタとして表れた。これは、Mn007凝集体として2つの結合部位が存在することを示唆している。ただし、Mn007凝集体が阻害しないグルコース酸化酵素とMn007のドッキングシミュレーションにおいてもMn007が結合し得るクラスタが確認されたため、より定量的な分析手法によってMn007とDNase Iの結合状態を解析する必要がある。

次に、Mn007の凝集をMD計算によって再現し、さらに分子の凝集性を評価した。比較対象として、Mn007の誘導体の中でMn007よりも凝集性が高いことが予想されるM71と、凝集性が低いことが予想されるM72を設計し、同時に評価した。それぞれの化合物をシミュレーションボックスに化合物を80個詰め込み、温度を300 K から800 Kの温度領域においてMD計算を実行した。凝集性を特徴づける指標としてスナップショット当たりの化合物同士のコンタクト数を平均値として計算した。M71は温度に依存せず、コンタクト数は高く維持され、強い凝集性を示すことが示唆された。

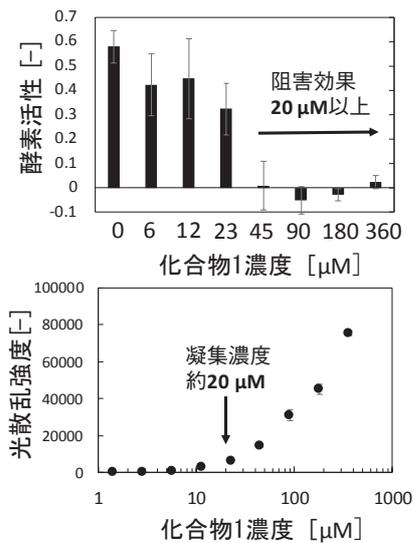


図2 Mn007によるDNA分解酵素の阻害（上）およびMn007の凝集濃度測定（下）。

これに対して、残り2つの誘導体は温度依存的にコンタクト数が低下したが、各温度におけるコンタクト数の比較から、Mn007よりもM72の凝集性が低いことが示唆された。

計算科学的な化合物の凝集性評価が正しいことを確認するため、実際にM71とM72を作製し、これらの凝集性を実験科学的に評価した。Mn007, M71, M72のDMSO溶液を緩衝液と混合し、静的光散乱測定を行うことで凝集の程度を評価した。その結果、M71は10 μM 以下で、Mn007は約20 μM で凝集開始した(図2, 図5)。M72は100 μM までの濃度において凝集体を形成しなかった。この結果は、計算科学的に予測された凝集性の強弱と一致している。以上から、低分子の水中での凝集性は、実際に分子を合成して評価実験を行わずとも計算科学的に予測可能であることが示された。

今回、Mn007より凝集性の高い分子として得られたM71についてDNase I阻害効果を検討したところ、凝集体の形成に伴ってDNase Iを阻害した(図5)。M71はMn007より低濃度でDNase Iを阻害する点で優れた阻害剤であるといえる。しかし、Mn007は比較的複雑な構造をしており、誘導体の合成も容易でない。そこで、より簡素な分子構造への最適化を検討した。Mn007のチオフェン環を含む部分構造の類似体R2に炭素数12の凝集性炭素鎖を結合させたC12-R2を合成した。C12-R2は水中において5 μM 以下で凝集開始し、凝集に伴いDNase Iを阻害した(図6)。この結果は、R2がMn007のDNase I阻害に関わる部位であり、C12-R2は新たな凝集性DNase I阻害剤であることを示している。

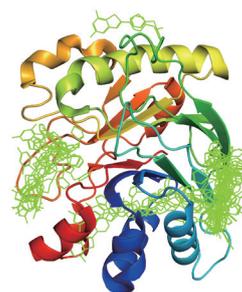


図3 Mn007とDNase Iのドッキングシミュレーション。

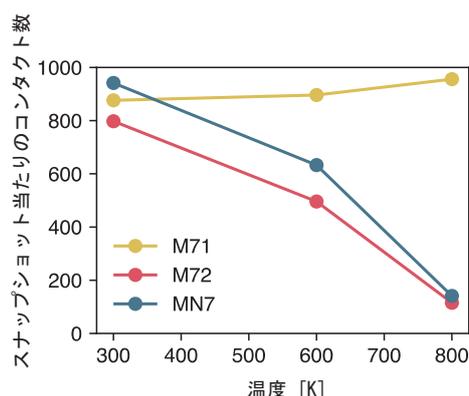


図4 Mn007およびMn007誘導体M71, M72のMD計算による凝集性評価。

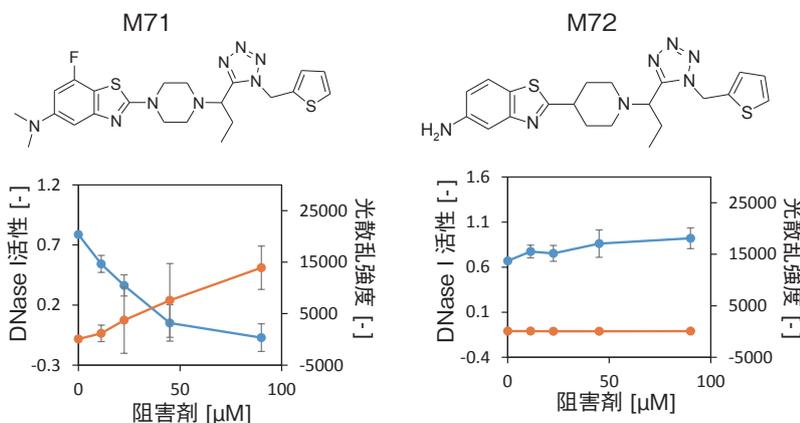


図5 Mn007誘導体であるM71とM72のDNase I阻害と凝集評価。

C12-R2凝集体はDNase Iを阻害したが、その凝集体の大きさは全く制御することができない。しかし、凝集性酵素阻害剤を治療薬として体内で用いるうえで、凝集性の制御は必要不可欠である。ここで、筆者らはMn007ならびにC12-R2の凝集体は薬効部位R2を表面に露出しており、R2が配列した表面がDNase Iと結合することでDNase Iを阻害していると仮定した。この仮定を元にするると、リポソーム表面にR2を配列することで、空間的に制御されたDNase I阻害剤を実現可能と考えた。DOPC, DPPC, コレステロールで構成されたリポソームはDPPCからなるLo相とDOPCとコレステロールからなるLd相に相分離することが知られている。直鎖の炭化水素を持つC12-R2はLd相と親和性が高いため複合体化し、Ld相上にC12-R2が配列することが予想される。筆者らは、DOPC, DPPC, コレステ

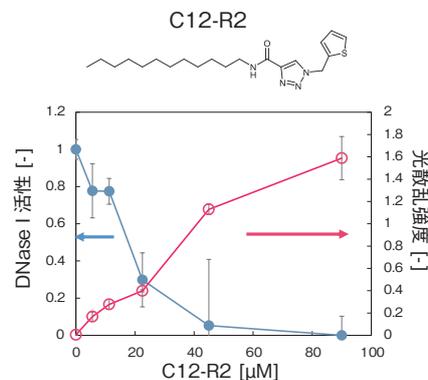


図6 C12-R2のDNase I阻害と凝集評価酵素阻害のイメージ。

ロール, C12-R2を原料としてリポソームを作製し, そのDNase I阻害活性を評価した. すると, 予想に反し, C12-R2を配列したリポソームは, C12-R2の濃度によらずDNase Iを阻害しなかった (図7). 以上の結果より, DNase Iの阻害に寄与しているのはR2が平面上に配列した構造ではなく, R2のランダムな凝集構造, あるいはR2と疎水的部位が同時に露出した構造であることが示唆された. 今後, DNase I阻害のための低分子凝集体開発においては, R2のランダムな凝集構造を保ったまま水中でサイズの制御を行う分子設計が必要である.

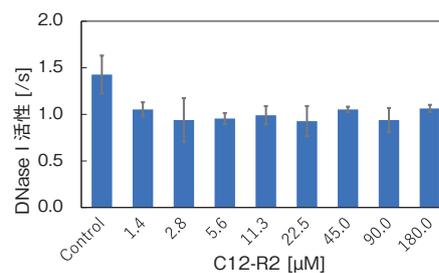


図7 C12-R2のDNase I阻害と凝集評価.

4. 結論

本研究では, 低分子凝集体がDNase Iを特異的に阻害する新しい酵素阻害様式を解明することを目的とし, 計算科学的手法と実験科学的手法を組み合わせ解析を行った. その結果, Mn007の凝集体がDNase Iを阻害することを明らかにし, さらにMn007の誘導体であるM71がより低濃度でDNase Iを阻害することを示した. また, 簡素化した構造であるC12-R2を合成し, 低濃度での凝集およびDNase I阻害効果を確認した. しかし, リポソーム表面にC12-R2を配列させた系ではDNase I阻害が観察されなかった. この結果から, DNase I阻害に寄与するのはR2が秩序立った平面上に配列した構造ではなく, ランダムな凝集構造またはR2と疎水的部位が同時に露出した構造であることが示唆された. したがって, 今後の低分子凝集体を利用したDNase I阻害剤の開発においては, ランダムな凝集構造を維持しつつ, 水中でのサイズ制御を可能にする分子設計が必要である. 本研究の成果は, 低分子凝集体を利用した新たな創薬戦略の可能性を示すものであり, 特にDNase Iを標的とした治療薬の開発に寄与することが期待される.

REFERENCES

- 1) F. Lv, *Bioorg. Med. Chem.*, **23** (2015) 7661-7670.
- 2) K. Morita, *et al.*, *JACS Au*, **4**, 6 (2024) 2262-2266.
- 3) K. E. D. Coan and B. K. Shoichet, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 29 (2008) 9606-9612.