構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
山本　雅貴（理化学研究所・部門長）

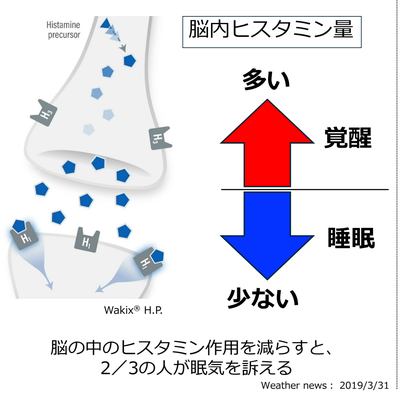
FTP

過眠症をターゲットとした創薬研究

補助事業分担者（所属・職名）
岩渕　好治（東北大学 大学院薬学研究科・教授）、広川　貴次（筑波大学 医学医療系生命医科学域・教授）、辻川　和丈（大阪大学　大学院薬学研究科・教授）

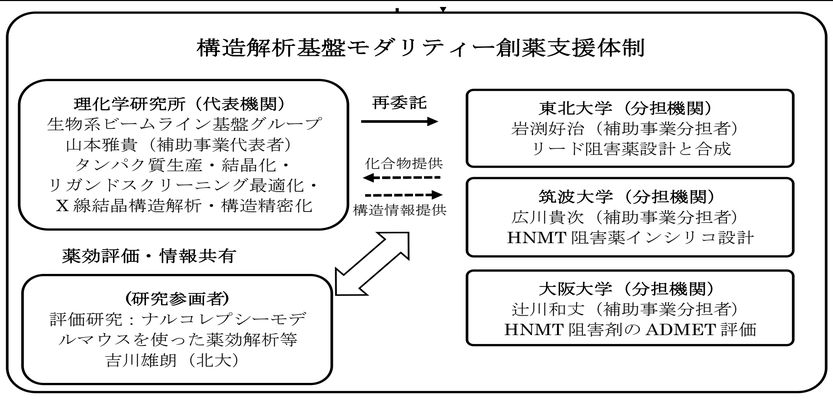
Fast Track Project　背景・目的

過眠症は、夜に十分眠っているにもかかわらず、日中に強い眠気が続いて日常生活に支障をきたす睡眠障害である。原因は、睡眠時無呼吸症候群などの身体的病気、うつ病などの精神疾患、生活リズムの乱れ、脳内の覚醒維持機能の異常と多岐にわたるとされる。特に睡眠発作や情動脱力発作などの症状を示すナルコレプシーは、日本での有病率が世界的に高い傾向があり、さらに発症年齢も若年層であることもあり、日常生活に深刻な影響をもたらすものである。これらの治療薬は既に存在するものの効果や依存性の課題が残っており、新規な作用機序の開発が求められている。本研究では、北大医の吉川雄朗教授による脳内ヒスタミン代謝酵素であるヒスタミンメチルトランスフェラーゼ（以下、HNMT）阻害薬開発研究を基盤とした新たな過眠症治療薬のアカデミア創薬研究を実現するために連携研究を進めている。



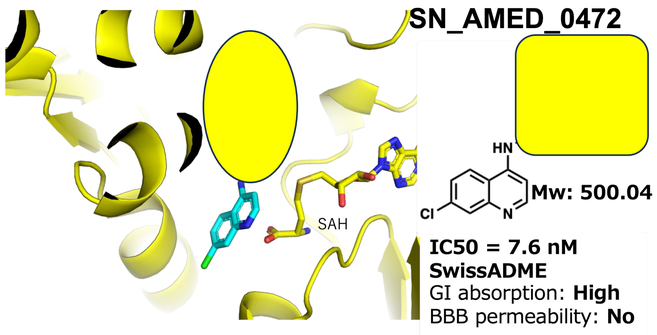
脳の中のヒスタミン作用を減らすと、
2／3の人が眠気を訴える
Weather news： 2019/3/31

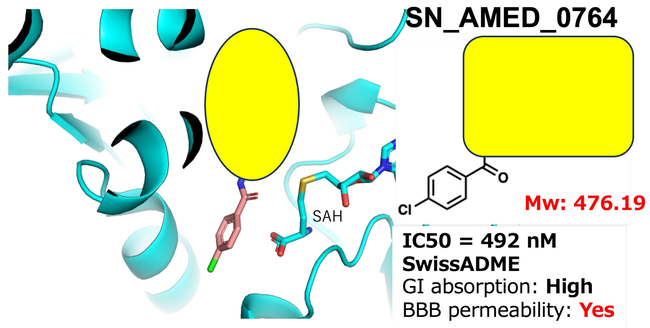
Fast Track Project　連携体制



Fast Track Projectの成果

理研ではHNMT阻害薬候補の複合体構造解析パイプラインを構築し（1週間以内に構造取得。分解能は1.5Å前後を達成。）、阻害剤モダリティー合成（岩渕教授）、インシリコ設計（広川教授）、ADMET評価を化合物合成の初期段階から行う（辻川教授）ことで、より創薬を志向した阻害剤設計を可能にする体制を構築してきた。そして吉川教授はマウス脳内ヒスタミン濃度評価や薬効解析を行う体制を確立しており、これらの研究チームが連携することで、ヒット化合物「SN_AMED_0764」の開発に成功している。



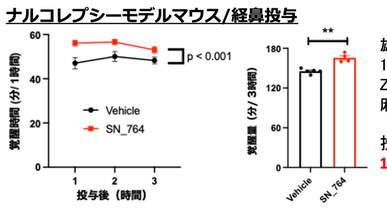


化合物	logD	PBS溶解度 (uM)	PAMPA膜透過性 Papp (10^{-6}cm/sec)	PAMPA膜透過性 Class	肝Ms中安定性（残存率%） ヒト 10min	ヒト 60min	マウス 10min	マウス 60min	備考
Metoprine	3.0	93.6	11.4	High	101.0	93.0	101.0	91.9	
SN-AMED-0472	4.4	8.7	0.0	低	32.7	7.5	7.2	3.9	
SN_AMED_0764	**3.8**	**8.6**	**0.8**	**Middle**	**73.0**	**26.7**	**11.7**	**5.8**	

・膜透過性を含むADMEパラメーターが改善。
・0764は0472のキノリンオミットにより、分子量を低減、BBB透過率が改善。
・結晶構造からHNMTとの相互作用に影響はなかった。

SN-AMED-0764はヒット化合物として有望である

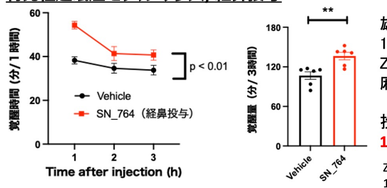
ナルコレプシーモデルマウス/経鼻投与



雄性ナルコレプシーマウス5匹
100 mM 5 μL(500 nmol)
ZT12に経鼻投与
麻酔なし

投与後3時間の覚醒時間
145分→166分に延長

特発性過眠症モデルマウス/経鼻投与



雄性特発性過眠症マウス6匹
100 mM 5 μL(500 nmol)
ZT12に経鼻投与
麻酔なし

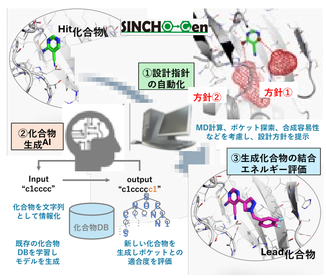
投与後3時間の覚醒時間
107分→136分に延長

ZT12:
12h明期・12h暗期環境において**暗期開始**

吉川教授による疾患モデルマウスを用いたSN-AMED_0764の薬効解析実験において、尾静脈投与で覚醒時間の延長が確認され、さらに経鼻投与によってその薬効がさらに延長されるという結果を得ている。このことから、経鼻投与の強み（Nose-to-Brain）が示された。
さらに、0764の合成展開を実施しており、0764と同等のIC50値を示す新規化合物0835の獲得に成功している（現在、構造解析を含めた評価実験中）。

今後の課題

・0764（もしくは0835）を起点としたリード化合物の開発
・生成AIを利用した薬効・代謝安定性が向上した誘導体の取得 *SINCHO-Gen（右図）
・合成展開化合物の薬効評価+ADME+構造解析
・企業導出に向けた取り組み

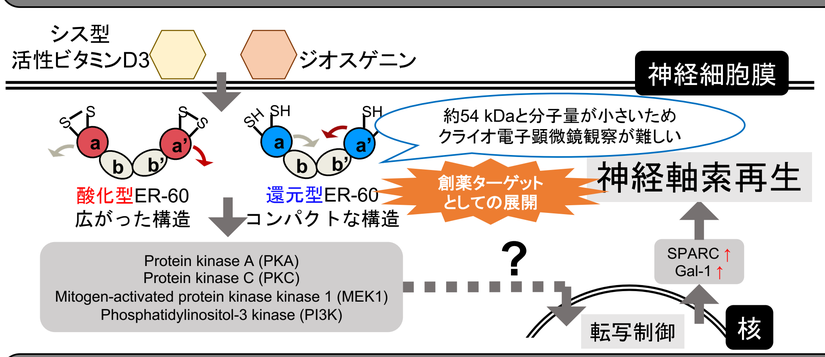


クライオ電子顕微鏡観察による低分子量マルチドメインタンパク質の高分解能単粒子解析

若手枠代表者（所属・職名）
奥田　綾（京都大学　複合原子力科学研究所・准教授）

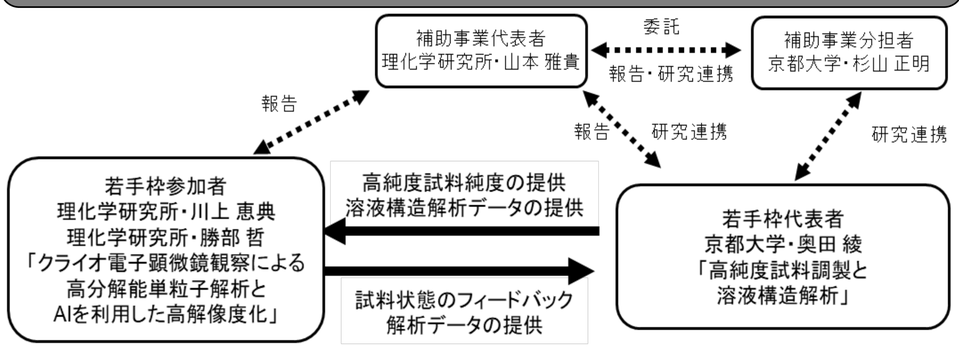
補助事業分担者（所属・職名）
川上 恵典（理化学研究所放射光科学研究センター・研究員）
勝部 哲（理化学研究所放射光科学研究センター・特別研究員）

Fast Track Project　背景・目的



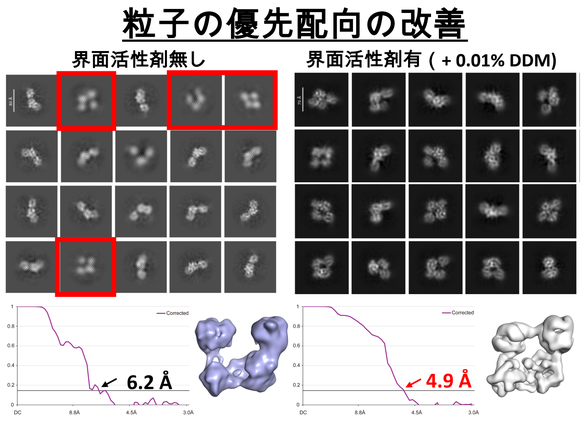
酸化的フォールディング酵素ER-60は、タンパク質の構造形成や神経軸索再生に関与し、創薬標的として期待されています。しかし、リガンド結合時の構造や、神経再生を誘導する詳細なシグナル伝達機構は未解明のままです。ER-60の作用機構を解明するには、クライオ電子顕微鏡を用いたリガンド結合状態の構造解析が有効です。しかし、ER-60は54kDaと非常に低分子量であるため、従来の手法では高分解能での構造解析が困難でした。この技術的課題を解決するため、独自に開発してきたAIを活用した粒子解析技術と、高分解能化解析法を組み合わせます。これにより従来の限界を突破し、低分子量タンパク質であるER-60の高分解能構造解析に挑戦した。

Fast Track Project　連携体制



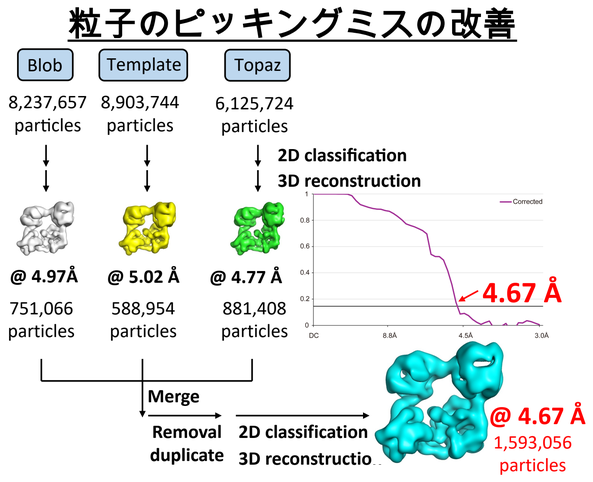
Fast Track Projectの成果

粒子の優先配向の改善



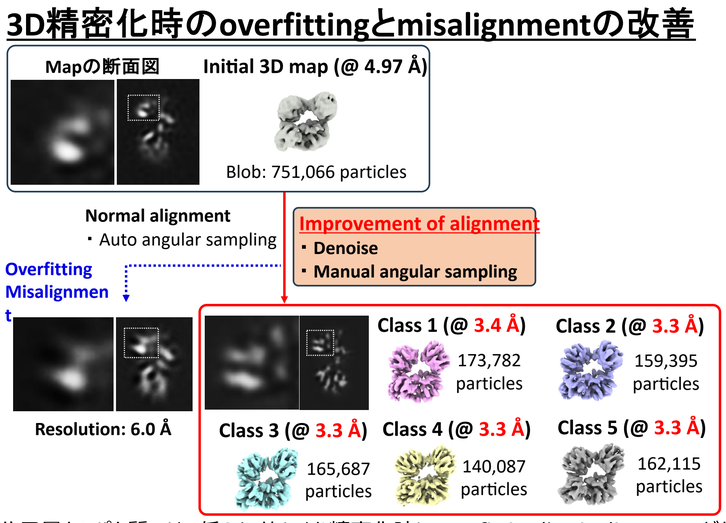
気水界面での粒子の優先配向や変性を防ぐため、タンパク質の電荷に影響しない非イオン性界面活性剤DDMを0.01%添加した。界面活性剤無しではER-60の4つのドメインが全て見える粒子がほぼ観測されず(赤枠)、再構築マップの分解能は6.2 Åにとどまった。一方、DDM添加により全ドメインが見える方位の粒子数が増加し、初期マップで4.9 Åの分解能に到達した。DDM添加が粒子の方位分布と分解能の向上に寄与した。

粒子のピッキングミスの改善



低分子量タンパク質はサイズが小さくピッキングミスが生じやすいため、複数のプログラムを併用して粒子数を増やす手法を構築した。各プログラムでピッキング・2Dクラス分け・マップ再構築を行った選別粒子を統合し、重複や異物を除去して3D再構築を行うことで、最終的に4.67 Å分解能のマップを得ることに成功した。

3D精密化時のoverfittingとmisalignmentの改善



低分子量タンパク質では、低S/N比により精密化時にoverfittingやmisalignmentが生じ、分解能が低下する。そこで、精密化中のデノイズ処理と手動アライメント調整を導入し、分解能を向上させる解析フローを構築した。それにより、分解能3.3-3.4 Åまで向上させることに成功した。還元型ER-60がマルチコンフォーマーであることも確認している。

今後の課題

✓更なる高分解能化への挑戦
粒子選別・アライメント精度の向上、最新のデノイズ精密化手法により、原子モデル構築可能な分解能を目指す。
本成果については低分子量タンパク質の高分解能単粒子解析例として論文化進行中。

✓リガンド結合状態の構造解析の実現
シス型活性ビタミンD3やジオスゲニンなどの外来リガンド結合状態のER-60構造を明らかにし、受容体としての作用機構解明を目指す。

✓動的構造情報の取得
分子状態の平衡や構造揺らぎを捉えるための解析条件を検討するとともに、分子動力学計算との統合解析を推進する。

✓機能解析との連携強化
生化学的・細胞生物学的解析と連携し、構造変化と機能の相関解明につなげる。

高分解能構造情報を基盤としたER-60の機能解明と創薬研究への貢献を目指す