構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
近藤　次郎（上智大学 理工学部・教授）

FTP

RNAターゲット創薬のための新規スクリーニング手法の開発とリード創出

補助事業分担者（所属・職名）　市川　聡（北海道大学薬学研究院）

Fast Track Project　背景

近年、タンパク質に代わる創薬標的としてRNAが注目されてきている。しかし、RNAは部分的・過渡的に立体構造を形成し、リン酸基に由来する強い負電荷で分子表面が覆われているというタンパク質とは異なる性質を持つために、タンパク質をターゲットとした従来のドラッグスクリーニング手法を適用しにくい。例えば、ITC（等温滴定カロリメトリー）、Biacore（表面プラズモン共鳴）、質量分析などの相互作用解析技術を用いたスクリーニング例はいくつか報告されているものの、コストがかかるうえにスループット性が低いのが課題である。また、RNAに特化したスクリーニング手法としては、吸光光度計（塩基対の解離による濃色効果を利用）や蛍光光度計（蛍光共鳴エネルギー移動FRETを利用）による二本鎖融解温度（T_m）測定が比較的広く用いられているが、必ずしも薬剤の結合がRNA二本鎖を安定化させるとは限らないため、かなり多くの医薬品候補化合物がスクリーニングから脱落している可能性がある。

以上のように技術的に脆弱な状況にあるRNAターゲット創薬にブレイクスルーを起こすには、RNAに特化し、なおかつ従来の技術とは全く異なる斬新なドラッグスクリーニング技術を開発すること、そのうえでRNAターゲット用の化合物ライブラリーを確立することが必要である。

Fast Track Project　連携体制

上智大学 理工学部（代表機関）
近藤 次郎（補助事業代表者）
スクリーニング手法の開発・実施

- ◆RNAの構造特性評価技術の開発
- ◆RNAに特化した新規スクリーニング手法の開発
- ◆化合物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施
- ◆X線結晶解析とStructure-Based Drug Design

化学合成
抗菌活性
ヒト細胞毒性

スクリーニング
X線結晶解析

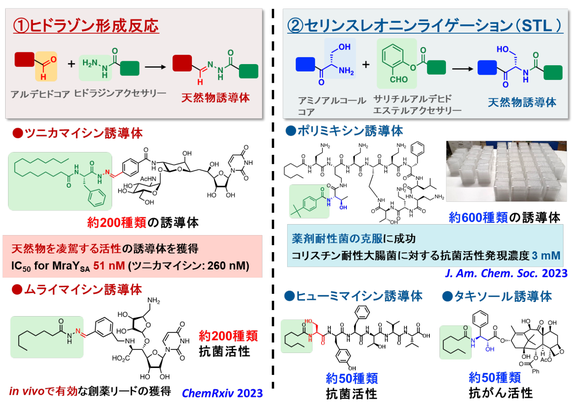
【BINDS支援（東大創薬機構）】
- ◆ヒット化合物のPK, ADMETの評価

北海道大学 大学院薬学研究院
市川 聡（補助事業分担者）
山本 一貴（補助事業参加者）
化合物ライブラリーの開発
薬剤感受性試験の実施

- ◆化合物ライブラリーの構築
- ◆抗菌活性・細胞毒性の評価
- ◆ヒット化合物の構造最適化
- ◆相互作用解析

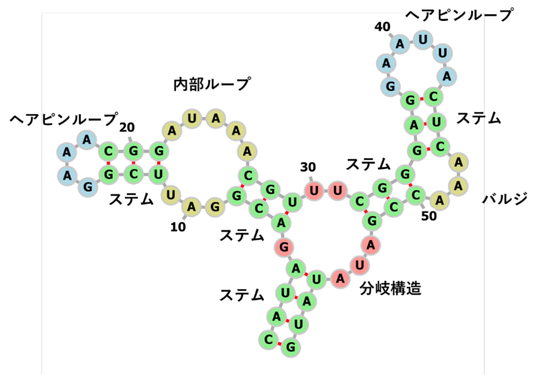
Fast Track Projectの概要

① 化合物ライブラリーの構築（北大）



2種類の反応を用いた短期間での効率的なビルドアップライブラリー構築

② スクリーニング法の開発と実践（上智大）



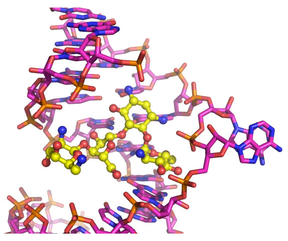
RNA塩基と親和性の高い金属原子を用いた創薬標的RNA構造モチーフの特性評価と化合物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施

③ 抗菌活性・細胞毒性評価（北大）



ESKAPE, 薬剤耐性菌、臨床分離株を用いて抗菌活性評価

④ 構造解析（上智大）



高度化した結晶化・構造解析技術を活用

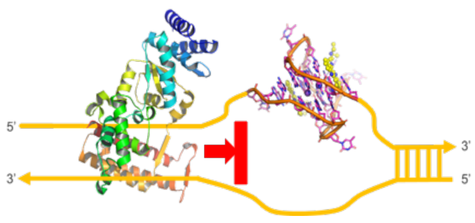
本研究では、以下の2つの核酸を標的として抗生物質のリード創出を目指しつつ、RNAターゲット創薬の基盤技術となる新規スクリーニング手法の開発を実施する。

- ◆黄色ブドウ球菌ゲノムのPQSにみられるG4構造：クインドリン誘導体
- ◆細菌リボソームの活性部位AサイトのRNA分子スイッチ：ネオマイシン誘導体

Fast Track Projectの成果

黄色ブドウ球菌ゲノムPQSを標的としたクインドリン誘導体

黄色ブドウ球菌ゲノム中には141個のPQS（G4構造形成可能配列）が存在し、これらが複製や転写、組換えを調節することで毒性や薬剤耐性を制御している。そこで、G4構造を特異的に安定化させる新しいタイプの抗生物質を開発するために、G4バインダーであるクインドリンの誘導体ライブラリーを構築し、スクリーニングを実施した。



PQSがとるG4構造を安定化することでG4ヘリカーゼの働きを阻害する

新手法によるスクリーニングの結果

立体構造が既知の２種類のG4-DNA（C-myc・Telomere）に対してスクリーニングを実施し、G4結合能をもつ化合物を選別した。

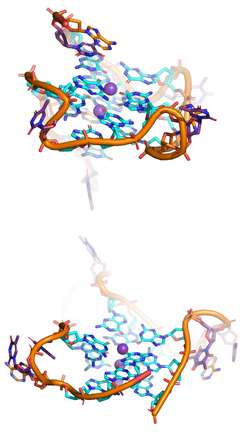
AA22	AA85	AA136	AA153
AA61	AA123	AA140	AA154
AA64	AA124	AA141	AA155
AA80	AA129	AA142	AA157
AA81	AA130	AA143	AA158
AA82	AA132	AA149	AA164
AA83	AA133	AA150	AA167
AA84	AA134	AA151	AA168

C-myc G4-DNA

AA1	AA51	AR53
AA17	AA60	AA18
AA20	AA135	
AA38	AA144	
AA39	AA145	
AA40	AA146	
AA43	AA156	
	AA163	

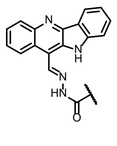
Telomere G4-DNA

高い抗菌活性を示した化合物



抗菌活性試験の結果

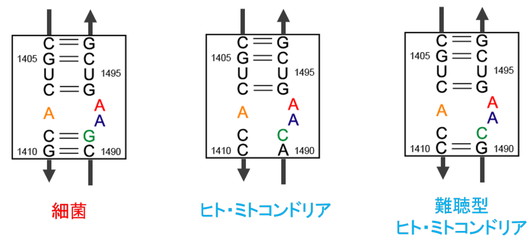
クインドリン誘導体の抗菌活性評価（ESKAPE）



MIC (μg/mL)	*E. faecium* ATCC 35667	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*K. pneumoniae* ATCC 13883	*A. baumannii* ATCC 19606	*E. cloacae* ATCC 13047	*MRSA* JE2	*E. coli* SME98/pmrB34
AA130	8	4	128	>128	>128	128	>128	4	>128
AA142	16	16	>128	>128	>128	>128	>128	16	>128
AA145	8	4	>128	64	32	>128	64	8	64
AA151	64	32	>128	>128	>128	>128	>128	32	>128
AA157	16	8	>128	>128	>128	>128	>128	16	>128
AA150	8	8	128	>128	128	64	>128	8	>128
AA158	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
AA40	16	4	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128
vancomycin	1	1	>128	>128	>128	>128	>128	1	>128
ampicillin	8	4	64	>128	>128	>128	>128	64	32
levofloxacin	4	<0.13	<0.13	1	<0.13	0.25	<0.13	4	16

細菌リボソームAサイトを標的としたネオマイシン誘導体

細菌リボソームの活性部位にはRNA分子スイッチが存在し、構造のON/OFFスイッチングによって正しいtRNAの取り込みを制御している。このスイッチングを固定することで殺菌効果を示すネオマイシンの誘導体ライブラリーを構築し、ヒトのAサイトには結合しない安全な抗生物質を開発するためにスクリーニングを実施した。



細菌とヒト（細胞質・ミトコンドリア）のAサイト配列の類似性

新手法によるスクリーニングの結果

AR9	AR21	AR33	AR42	AL7	AA38	AA46	AA55	AA102	AA120	AA133	AA143	AA160
AR10	AR25	AR35	AR47	AA18	AA39	AA47	AA57	AA103	AA121	AA134	AA146	AA161
AR12	AR26	AR37	AR49	AA21	AA40	AA49	AA58	AA105	AA124	AA135	AA148	AA164
AR13	AR27	AR38	AR51	AA22	AA42	AA50	AA64	AA106	AA129	AA136	AA149	AA169
AR17	AR29	AR39	AR53	AA31	AA43	AA52	AA82	AA113	AA130	AA140	AA155	core
AR18	AR30	AR40	AL2	AA36	AA44	AA53	AA84	AA116	AA131	AA141	AA158	
AR20	AR32	AR41	AL6	AA37	AA45	AA54	AA85	AA119	AA132	AA142	AA159	

細菌

AR31	AA59	AR44
AR50	AA60	AL1
AR52		AA144
AL4		AA163
AA56		AA165
		AA168

ミトコンドリア

AL5

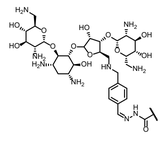
AR36	AA114	AA152
AR43	AA115	AA153
AR45	AA117	AA154
AR46	AA118	AA156
AR48	AA145	AA157
AL3	AA147	AA162
AA51	AA150	AA166
AA112	AA151	AA167

細胞質

抗菌活性試験でのヒット化合物

抗菌活性試験の結果

ネオマイシン誘導体の抗菌活性評価（ESKAPE）



MIC (μg/mL)	*E. faecium* ATCC 35667	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*K. pneumoniae* ATCC 13883	*A. baumannii* ATCC 19606	*E. cloacae* ATCC 13047	*MRSA* JE2	*E. coli* SME98/pmrB34
AR10	>128	2	8	>128	2	>128	64	2	>128
AR20	>128	2	4	128	2	>128	16	2	>128
AR33	64	2	8	128	2	128	8	2	>128
AA1	128	2	4	>128	1	>128	4	2	>128
neomycin	32	4	2	>128	1	32	2	1	>128
vancomycin	1	1	>128	>128	>128	>128	>128	1	>128
ampicillin	8	4	64	>128	>128	>128	>128	64	32
levofloxacin	4	<0.13	<0.13	1	<0.13	0.25	<0.13	4	16