

## インシリコスクリーニング技術を用いた 抗シャーガス病の治療薬探索

吉野龍ノ介<sup>1,2</sup> 安尾信明<sup>1,3</sup> 萩原陽介<sup>1,4</sup> 石田貴士<sup>1,2,3</sup> 稲岡健<sup>5,6</sup>  
天野靖士<sup>4</sup> 立石幸寛<sup>4</sup> 大野一樹<sup>1,4,7</sup> 生田目一寿<sup>4</sup> 新美達也<sup>4</sup> 折田正弥<sup>4</sup>  
北潔<sup>5,6</sup> 秋山泰<sup>1,2,3</sup> 関嶋政和<sup>1,2,3</sup>

**概要:** 顧みられない熱帯病の一つとして知られているシャーガス病は、寄生原虫である *Trypanosoma cruzi* によって引き起こされる感染症で、米国南部や中南米などの約 20 カ国で影響を及ぼす病気である。ニフルチモックスとベンズニダゾールは、既存のシャーガス病治療薬として使用されているが、重大な副作用や慢性期に効果が薄いなどの欠点を有する。そこで我々は、シャーガス病の新たな医療薬候補の探索を目的とし、標的タンパク質であるスペルミジン合成酵素に対してドッキングシミュレーションや分子動力学シミュレーションなどのバーチャルスクリーニングを行い、*in vitro* 試験及び X 線構造解析による複合体構造の詳細な解析を行った。ドッキング結果の上位 176 化合物の *in vitro* 試験によって評価を行った結果、IC<sub>50</sub> が 10 μM オーダーのヒット化合物が得られ、更に X 線構造解析によってヒット化合物と標的タンパク質の複合体構造を明らかにした。

**キーワード:** インシリコスクリーニング, ドッキングシミュレーション, 分子動力学, シャーガス病

## Drug Discovery for Anti-Chagas Disease by *in-silico* Screening Technique

Ryunosuke Yoshino<sup>1,2</sup> Nobuaki Yasuo<sup>1,3</sup> Yohsuke Hagiwara<sup>1,4</sup> Takashi Ishida<sup>1,2,3</sup>  
Daniel Ken Inaoka<sup>5,6</sup> Yasushi Amano<sup>4</sup> Yukihiro Tateishi<sup>4</sup> Kazuki Ohno<sup>1,4,7</sup>  
Ichiji Namatame<sup>4</sup> Tatsuya Niimi<sup>4</sup> Masaya Orita<sup>4</sup> Kiyoshi Kita<sup>5,6</sup>  
Yutaka Akiyama<sup>1,2,3</sup> Masakazu Sekijima<sup>1,2,3</sup>

**Abstract:** Chagas disease is an infectious disease caused by the parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). This disease affects people from approximately 20 countries, particularly those living in the southern United States and Latin America, with 15 million people estimated to be infected. Nifurtimox and Benznidazole are currently available for treatment of Chagas disease. However, there are serious problems associated with their use, including adverse effects and limited effectiveness during the chronic phase of this disease. Thus, developing new therapeutic agents against *T. cruzi* infection is warranted. In order to develop a novel anti-trypanosoma drug, protein-ligand docking simulation was carried out to discover drug candidate. Furthermore, *in vitro* assay was conducted to determine IC<sub>50</sub> of the selected compounds against a target protein. And protein-ligand complex structures were determined by X-ray analysis. We performed protein-ligand docking simulation for target protein active site using medicine-like compounds approximately 4,800,000 and evaluated medicine-like compounds with high docking score by *in vitro* assay. As a result, we obtained active compounds which inhibit target protein with values for IC<sub>50</sub> of 10 μM order.

**Keywords:** *in silico* screening, Docking simulation, Molecular Dynamics, Chagas, Chagas disease

### 1. はじめに

WHO によって定められた 17 種の熱帯病は、発展途上国の多い東南アジア、アフリカ、南アメリカなどの熱帯地域に多発する。これらの病気は先進国でほとんど症例がないため「顧みられない熱帯病」として問題となっている。寄生性の原虫である *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) によって引き起こされる感染症であるシャーガス病は、米国南部や中南米などの約 20 カ国で影響を及ぼす病気であり[1]、約 1500 万人が感染していると見積もられている[2]。ニフルチモックスとベンズニダゾールの二種類存在が現在有効な

治療薬として使用されているが、副作用や慢性期に効果が薄いなどの重大な欠点を有するため、新たな治療薬の開発が求められている[3]。本研究では、スペルミジン合成酵素 (Spermidine synthase: SpdSyn) と呼ばれるタンパク質に着目した。SpdSyn はポリアミンの代謝経路を担う酵素であり、プトレシンを基質としてスペルミジンを合成する酵素である。図 1 に標的タンパク質である SpdSyn を示す。このタンパク質の活性中心には、補酵素である decarboxylated S-adenosylmethionine (dcSAM)、基質であるプトレシンが結合している。また、SpdSyn は RNAi 等の実験によってトリ

1. 東京工業大学 情報生命博士教育院  
2. 東京工業大学 科学技術創成研究院 スマート創薬研究ユニット  
3. 東京工業大学 情報理工学系 情報工学系 知能情報コース  
4. アステラス製薬株式会社 研究本部創薬化学研究所

5. 東京大学 大学院医学系研究科 国際保健学専攻  
6. 長崎大学 大学院熱帯医学 グローバルヘルス研究科  
7. 株式会社カタリスト

パノソーマ原虫の生存に必須であることが報告されている。そのため、シャーガス病の治療薬開発の標的として有望である[4]。本研究では、*in silico* スクリーニングの技術を用いて SpdSyn を阻害する新たな化合物の探索を行い、*Trypanosoma cruzi* への阻害活性を有するリード化合物の獲得を目的とする。

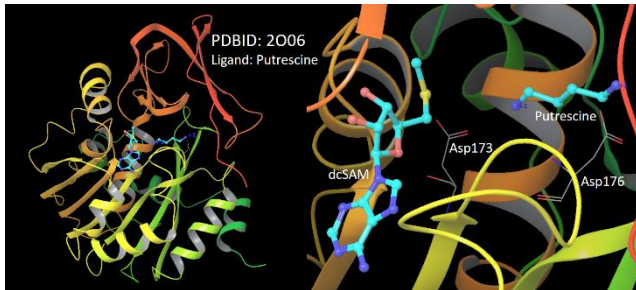


図 1. スペルミジン合成酵素の全体構造と活性中心

## 2. 手法

### ・2.1 ドッキングシミュレーション

本研究では新たな SpdSyn 阻害化合物を得るため、ドッキングシミュレーションによる候補化合物の絞り込みを行った。ドッキングシミュレーションは Glide ver. 5.8[5]を使用し、ドッキングするリガンドは Namiki DB に登録されている Drug like な化合物約 480 万個を使用した。ドッキングはドッキングシミュレーションの結果で評価の高かった化合物は、酵素アッセイ系で阻害能の測定を行い、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を決定した。

### ・2.2 *in vitro* アッセイ試験

本研究では、ドッキングシミュレーション結果の上位の化合物に対して *in vitro* アッセイ試験を行い、IC<sub>50</sub> の決定を行った。*in vitro* アッセイは図 3 に示す系を用いた。

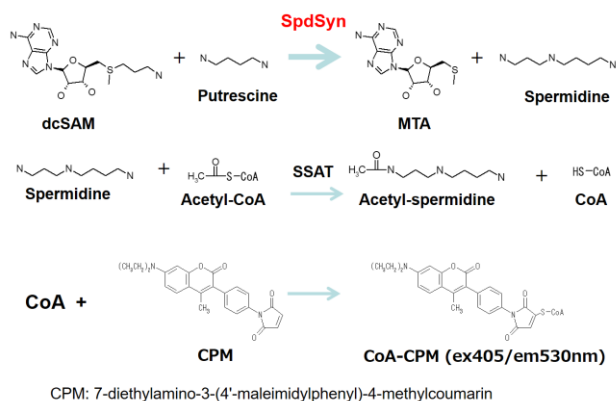


図 2. SpdSyn 阻害剤探索のための *in vitro* アッセイ試験系

## 3. 結果

標的タンパク質である SpdSyn の活性中心に対してドッキングを行い、上位 176 化合物の *in vitro* アッセイ試験

を行った結果、4 つのヒット化合物の取得に成功した。図 3 にヒットした 4 化合物の構造を示す。これらのヒットのうち、化合物 1 と SpdSyn の複合体構造に対して X 線構造解析を行った結果、化合物 1 は SpdSyn の活性中心に結合し、Asp171 などのアミノ酸残基と塩橋を形成していることが明らかになった。本研究では、ドッキングシミュレーションと同時に分子動力学法によるタンパク質の構造解析を併用したスクリーニングも行っているが、詳細は口頭発表にて説明する予定である。

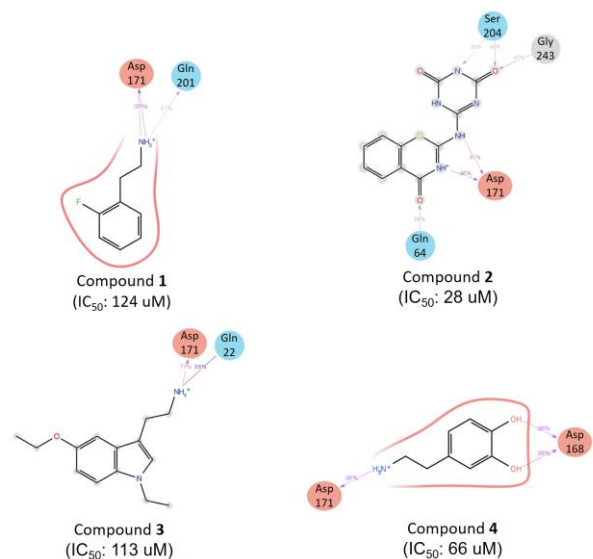


図 3. ヒット化合物の構造式と IC<sub>50</sub>

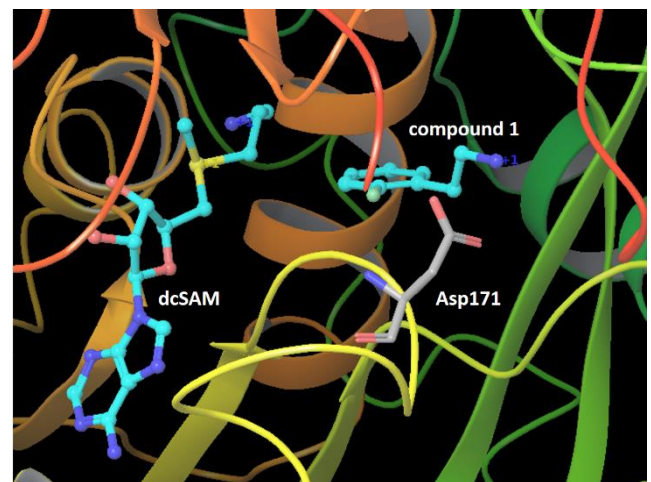


図 4. 化合物 1 と SpdSyn の結晶構造 (PDB: 5B1S)

## 参考文献

- [1] Schmunis G.A., et al., Acta Trop., 115 (2010) 14-21
- [2] World Health Organization(TDR/GTC/09 2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico. Ginebra: World Health Organization.
- [3] Van den Bossche H., Nature, (1978) 626-630
- [4] Ariyanayagam, M. R. et al. Biochem. J. 391 (2005) 425-432, doi:10.1042/bj20050911
- [5] Richard A. F., et al., J. Med. Chem., 47 (2004) 1739-1749