

## 様式第4号-1

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	林 美和	
学位の種類	博士 (理学)	
学位記番号	甲 第 1377 号	
学位授与の日付	平成 27年3 月25日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学位論文題目	Extended Template-Based Modeling and Evaluation Method Using Consensus of Binding Mode of GPCRs for Virtual Screening	
主研究指導教員	木寺詔紀	
論文審査委員	(主査) 佐藤 衛	教授
	(副査) 高橋 栄夫	教授
	(副査) 岡田 眞里子	大学院客員教授
	(副査) 川路 英哉	大学院客員准教授

## 論文内容の要旨

Gタンパク質共役受容体 (G Protein Coupled Receptor : 以下、GPCR) は、真核生物の全タンパク質中、最大のスーパーファミリーを形成する膜タンパク質であり、7本の膜貫通ヘリックスとそれらを繋ぐループから構成される。GPCRは細胞外のシグナルを細胞内へと伝達する機能を担い、多くの疾患に関与しているため、重要な創薬ターゲットとなっている。コンピュータを用いた医薬品探索の一つとしてバーチャルスクリーニング

(Structure Based Virtual Screening : 以下、SBVS) があり、医薬品候補化合物の探索に貢献しているが、タンパク質の立体構造情報が必要となる。GPCRはおよそ800種類あるとされているが、立体構造が明らかにされているGPCRは僅か25種類である。そのため、立体構造が解明されていないGPCRについては、予測した立体構造を用いてSBVSが行われている。タンパク質の立体構造予測は既知の類似構造を鋳型としてターゲットの立体構造を予測するテンプレートベースモデリングという手法が主に用いられており、高い予測精度が得られている。しかし、テンプレートベースモデリングは鋳型と大きく異なる構造を作ることが難しく、限られた鋳型の中では適用できるターゲットが限定され、GPCRの配列の多様性、認識する化合物の多様性を考慮すると、既知構造の種類は不足していると言わざるを得ない。また、一般的な水溶性タンパク質では配列の類似度に従って鋳型が選ばれる

が、GPCR においては、各ヘリックスに存在するモチーフの有無が 2 次構造の特徴を決めているため、ヘリックス毎に参照する鋳型が異なることが指摘されている。そこで、SBVS に利用可能な信頼性の高いモデルを構築するために、GPCR のリガンド結合領域の多様性を反映した多様な構造を発生し、その多様な構造から最適な構造を選ぶための評価方法が必要となる。本研究では多様なモデルの構築とそのモデル構造の評価という二つの課題に対して、新たな手法を開発した。モデル構築方法としては、既存のシングルテンプレート、マルチテンプレートに加え、ヘリックス毎に鋳型を変えるフラグメントベースモデリングを開発することで、多様な構造を構築した。次に、これらの多様な構造から SBVS に利用可能な構造を選び出すため、ドッキングポーズを評価の軸に加えた Protein Ligand Interaction Fingerprint (PLIF) による評価手法 (PLIFTc50、以下 Tc50) を考案した。一般的に行われている ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線から算出される AUC (Area Under Curve) による評価と組み合わせて使用することで、AUC では考慮されていなかった相互作用残基の共通性を評価することができる。本手法を結晶構造既知の 3 ターゲット、及び構造未知の 1 ターゲットについて適用し、手法の評価を行った。

作成したモデル構造の多様性を評価するため、モデル構造について主成分解析 (PCA) を行った。いずれのターゲットについてもシングルテンプレートやマルチテンプレートでは作成できなかったモデル構造がフラグメントベースモデリングで発生することができ、結晶構造に近い構造を含め、多様なモデルの構築に成功していることが確認できた。多様なモデル構造に対して、それぞれ ROC/AUC によるリガンドとデコイ化合物の識別能を評価した結果、いずれのモデルでも複数のモデル構造が高い AUC を与えた。これら AUC の高かったモデル構造に対して、PLIF による評価方法 Tc50 を適用した結果、いずれのターゲットにおいても、結晶構造に最も近い構造が高い Tc50 を与え、SBVS に利用可能な構造として選び出すことができた。特に、ヒスタミン H1 レセプターでは結晶構造とは大きく異なるモデル構造でも高い AUC を与えるものがあったが、それらは Tc50 による評価では低いスコアとなり、候補モデル構造から除外することに成功した。このモデル構造を正しく評価し、結果として結晶構造に最も近い構造が選ばれたことは Tc50 が効果的であったことを意味している。また、評価に用いたターゲットのうち、唯一異なるサブファミリーの GPCR であったデルタオピオイドレセプターでは、新規に決定された GPCR の結晶構造を鋳型として使用することで、構造の探索領域が変わることが示された。今後さらに増えていく GPCR の結晶構造情報を利用することで、より幅広いターゲットに適用できると期待される。最後に、構造未知のセロトニンレセプター 2A に適用した結果、高い AUC、高い Tc50 を与えるモデル構造を選び出すことができ、選ばれたモデルは、変異実験で明らかになったリガンド認識に重要なアミノ酸残基と相互作用を形成しており、構造未知のターゲットについても適用可能な手法であることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本論文の審査は、4名の審査員（主査：佐藤衛、副査：高橋栄夫、岡田真里子、川路英哉）によって、提出論文と平成26年12月18日の博士論文発表会における発表と質疑応答、平成27年1月5日に行われた審査会における口頭試問の質疑応答に基づき行われた。

そこで行われた質疑応答の概要を以下に記す。質問の内容は、論文の主要な二つの方法、フラグメントベースモデリングと構造評価法（Tc50）に関わるものであった。

フラグメントベースモデリングに関わる質問としては、高橋副査が、鋳型とする構造既知のタンパク質について、鋳型を3つ使っていることの原因を問うた。それに対して申請者は、最低限、確からしいモデルとするためにモデリング対象と同じサブファミリーに属するGPCRと、構造多様性を増すためにそれ以外のサブファミリーのGPCRを選ぶ必要があると答えた。また、用いる鋳型GPCRの数の上限は、どれだけの数のフラグメントの組み合わせをドッキングシミュレーションによって評価できるかという計算資源の限界によって決まると回答した。さらにそれに関連した質問として、モデリング対象と同じサブファミリーに属するGPCRがないときはどうするかと質問したが、申請者はそのようなGPCRがないときは適切なモデルが構築できなくなる可能性があるという方法の限界についての認識を示した。さらに、比較しているマルチプルテンプレートモデル、分子動力学法との差違についての説明を求めたことに対して、いずれの方法もフラグメントベースモデリングと比較して十分な構造多様性を与えることができないと説明した。川路副査からは、鋳型とする結晶構造は薬剤が作用する環境における構造を十分に反映しているかという問いがなされた。それに対して申請者は、鋳型に用いる結晶構造は数多くの変異実験情報があり、それらの結果は少なくともリガンド結合部位については結晶構造で十分に説明可能であるところから、モデルの鋳型として適切であると答えた。さらに、鋳型にないループ部分のモデルの重要性について問われたことに対して、申請者は結合部位はGPCRの比較的深部にあるところから、ループ部分はMODELLERによるモデリングで十分であるという考えを述べた。また、フラグメントベースモデリングはどれほど申請者独自のものであるかという質問に対しては、既存の方法についてその文献を示しつつその問題点を指摘し、構造多様性を与える目的でフラグメントを用いるところは初めての試みであることを説明した。

構造評価法（Tc50）についての質問としては、佐藤主査は、AUCとTc50を併用するに至った経緯について尋ねた。申請者は、AUCは標準的な方法であるが、多くの偽陽性があると言われていたところから新たな評価基準が求められていた、その後GPCRの結晶構造解析の進展に伴い多数の結晶構造が共通の結合モードを示したことによって、AUCによる結果

をさらに評価する方法として Tc50 を考案した、と回答した。岡田副査は、AUC と Tc50 は相補的な評価方法であるかと問うたが、申請者は AUC の高いモデルのみに対して Tc50 を用いてさらに選別するという方法を取り、AUC 単独よりも優れた結果を得ているところから、その評価方法の範囲で十分に相補的であると言えると答えた。川路副査からの共通した結合部位が必ず用いられる必要があるのかという問いについては、allosteric 部位に結合する薬剤については共通部位が結合に用いられず、Tc50 での評価には用いることができないと回答した。高橋副査からそれに関わって、共通の結合モードを使うものに限定するのであれば、バーチャルスクリーニングでは多様な形の薬剤を見いだすことは困難ではないかという指摘があった。これに申請者は同意したが、これまでの置換基の置き換えのようなバーチャルスクリーニングと比較すればより多様な構造が得られていると付け加えた。さらにこれに関連して、作動薬、拮抗薬などの区別はつかないのかという問いがあり、申請者は共通した結合部位を持つ以上それらは区別がつかず、それらの違いは薬剤が結合した後起こる GPCR の応答に現れると考えられていると答えた。

最後により一般的な立場からの質問として、岡田副査から、実際の創薬でヒット率が上がったというデータがあるかという質問があり、それに対して、具体的にはそのようなデータはないが製薬企業にソフトを供与し利用してもらっているという回答があった。また、GPCR 以外での汎用性について問うたが、フラグメント法は GPCR 以外にはすぐには使えないが、評価法である Tc50 は一般性があるという答えであった。佐藤主査から、結晶構造の情報がさらに増大した将来における展望を問われたのに対して、結晶構造は結合しているリガンドに特化した構造であり、より広く薬剤の構造を探索するためにモデル構造を構築する本法は、その段階でも有用であると回答した。

関連科目について、高橋副査は、GPCR の結晶構造解析が進展した技術革新について説明するよう求めた。申請者の答えは、若干抽象的なレベルに止まったが、概ね妥当なものであった。佐藤主査は、GPCR が関わるシグナル伝達について説明を求めたが、全体像を与えるところまでは到らなかったものの、その初期過程については答えることができた。川路副査は、GPCR のファミリー内で多様性の大きなものの例を上げるよう求めたが、それについては十分な回答が得られた。岡田副査は、インシリコ創薬の成功例、著名な創薬ターゲットを上げるよう求めたが、それぞれについて概ね妥当な回答をした。英語の口頭試問として、スライド 1 枚を英語で説明するよう求めたが、訥々とした話し方ではあったものの、説明を完了することができた。

以上のことから、専門知識は十分な経験に裏打ちされた確からしい知識を持っており、関連科目、英語についても概ね妥当なレベルにあったとして、全員一致で申請者が博士号の授与に値すると結論した。