

## 薬剤探索の新たな戦略：NMR 独自の視点の活用

井上 直也<sup>1</sup>, 白木 琢磨<sup>1,2</sup>, 米澤 康滋<sup>2,3</sup>, 櫻井 一正<sup>1,2</sup>

### 要旨

本稿では近年みられる薬剤の探索戦略の変遷と、その中で見られる核磁気共鳴法(NMR)の役割について概説する。1957年のタンパク質分子の立体構造の報告から、Structure-Based Drug Discovery (SBDD) という戦略が生まれた。タンパク質の立体構造を基に「活性部位をピンポイントで狙う」薬剤分子を人工的にデザインするという発想である。しかし SBDD 薬剤には、副作用や細胞馴化の問題が生じている。そこでアロステリック薬剤という新発想が生まれた。「タンパク質分子全体のダイナミクスを変化させることで、活性を任意に変化させる」薬剤分子のデザインという発想であり、従来の「活性部位をオフにする」発想とは異なる。ガン細胞の馴化への対策などに有望だと考えられている。また、Protein-Protein Interaction (PPI) 阻害薬という新戦略も生まれた。多くの PPI が病気に関連していることが知られていることから、SBDD と機械学習が組み合わせられ、特定のタンパク質間相互作用を阻害する分子を探索するものである。NMR は構造決定だけでなく生体高分子の運動性も理解できる手法であり、アロステリック分子や PPI 阻害薬の探索に有用な情報を与える。NMR には様々な手法があり、本稿でいくつかの適用例を示す。この解説を通じてお伝えしたいのは、創薬戦略がタンパク質分子の「機能に関わる残基」だけでなく「全ての残基を含めた分子全体のダイナミクス」に影響を与える薬剤分子の探索に移りつつあり、技術的にだけでなくその新戦略のコンセプトに NMR という手法が適しているということである。

キーワード：Fragment-Based Drug Discovery, タンパク質-タンパク質相互作用、アロステリック分子、NMR

### 1. 緒論：活性阻害薬探索の戦略の変遷

一般的に薬剤とは、体内の生体分子、特に特定の機能を持った酵素に結合し、その機能を変化させる分子のことである。歴史的に薬といえば天然物由来であり、自然に存在する動植物から抽出された物質のうち、経験的に薬効のあるものが使用されてきた。しかし 1957年にケンドリューによってタンパク質の立体構造が報告されて以来、タンパク質の活性部位に結合する分子を人間が新たに作り出す、という発想が生まれた(1)。このような発想を SBDD (Structure-Based Drug Discovery) といい、近年の新規の薬剤はこの発想に基づいてデザインされた分子が主である。よく知られた例はリレンザであり、決定されたインフルエンザノイラミニダーゼの構造を基に、活性部位に結合するようデザインされたものである(2)。SBDD の主流の方法に FBDD (Fragment-Based Drug Discovery) がある。FBDD は、高親和性と選択性を持つリード化合物を開発する手法として登場した。それまでのハイスループットスクリーニングとは異なり、数百から数千の小規模なライブラリーで低分子量の化合物（フラグメント）を標的タンパク質に対してスクリーニングする（図 1）。20年以上にわたり広く用いられ、多くの薬剤候補が臨床試験段階に進んでいる。FBDD では、ターゲットタンパク質とフラグメントの弱い相互作用の検出や、フラグメントの結合部位の同定な

原稿受付 2024年1月12日

本課題は近畿大学 21世紀研究開発奨励金 KD2003、科学研究費基盤 C 22K06106 の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生体システム工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

どに複数の生物物理学的手法が用いられ、これらの情報が薬剤の設計の最適化に必要となる。

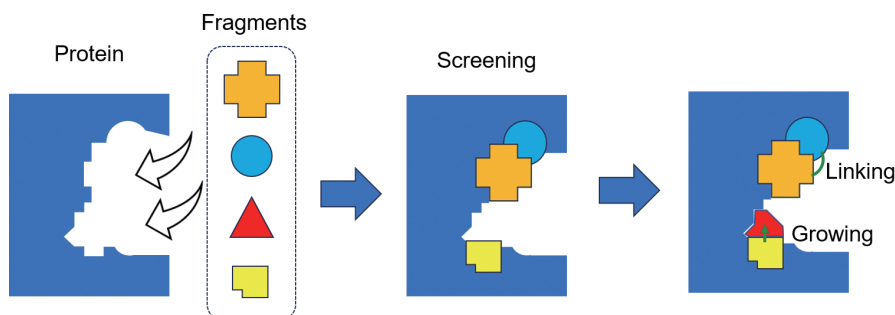


図1 FBDDにおけるフラグメントスクリーニングとその後のステップの概念図。

## 2. 従来のFBDD分子の特徴と解決すべき問題点

FBDDによって生み出される分子は、主に拮抗阻害薬や競合阻害薬である。つまり、ターゲットの酵素の活性部位に結合し、本来の基質の結合を阻害する。つまり活性部位に「ピンポイントで」作用する。しかしこの方法で発見される分子にもいくつかの問題が指摘されるようになってきた。ひとつは副作用の問題である。拮抗阻害薬は本来の基質と構造が似ているため、同じ分子を基質とする別の酵素の阻害も引き起こし、想定外の生体内反応にも影響を及ぼすのである。もう一つは細胞の馴化という問題である。ガンでよくみられるが、ひとつのシグナル伝達系の酵素を完全に阻害すると、細胞内の別のシグナル伝達系を促進してしまい、結果阻害剤が効かなくなる(3)。そこで完全に活性をオフにするのではなく、適度に活性を変化させることで、細胞馴化を抑える必要がある。近年、これらの問題を回避するような異なる視点の薬剤探索が報告されつつある。そのひとつにアロステリック分子の探索、もう一つにPPI阻害薬の探索がある。本解説でこれらの方法に焦点を合わせ、発想、方法とその適用例について紹介する。

### 2. 1 アロステリック構造変化分子の探索

上述の新創薬のアプローチのひとつとしてアロステリック現象の利用がある。従来の薬剤設計はタンパク質の静的構造に注目し、活性部位の形状に合致する分子を探すというものであった(4)。しかしこの方法だと、上述の通り副作用や細胞馴化の問題が起こる。そこで、基質結合部位とは異なる部位に結合し、標的タンパク質分子の動きを変化させることで、その活性をオフではなく適度に变化させるアロステリック分子を開発するのである(図2左)。

アロステリック分子の作用機序は、タンパク質の構造平衡を変えることで酵素活性を変えるものと理解されている。元々天然でもGタンパク質共役型受容体(GPCR)のように、アロステリック現象を用いた活性制御がみられる(5)。このアロステリック創薬の発想はこのような分子を人工的に創出する試みである。このような分子の発見のために重要な点は、酵素は複数の構造状態(例えば開構造と閉構造)の間の動的平衡にあり、活性は状態間の交換速度( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ )に依存していること、そしてアロステリック分子はこの動的平衡を変化させること、を理解することである。そのため、ターゲットタンパク質分子の動的平衡の変化を検出できる物理化学的手法が必要となる。また同様にアロステリック分子は活性部位以外に結合して、残基間の相互作用ネットワークに影響を与えて作用するものなので、ターゲットタンパク質分子上の結合部位や、残基間相互作用の変化を同定できる方法も必要となる。

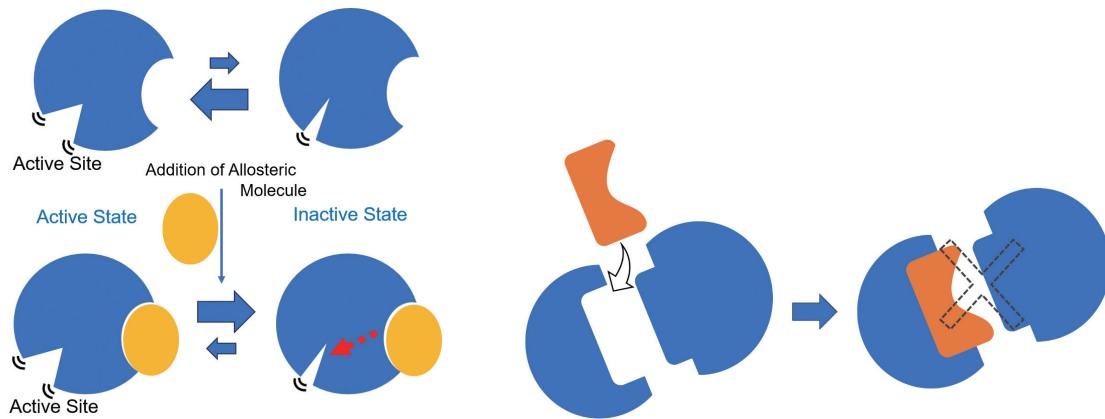


図2 アロステリック分子（左）と PPI 阻害剤（右）の作用機構の概念図。

## 2. 2 PPI 阻害薬探索の戦略：PPI 界面被覆剤

もうひとつの新戦略はタンパク質-タンパク質相互作用（Protein-Protein Interaction: PPI）創薬である。生体内の分子は他の分子と相互作用することで機能を発揮する。インタラクトームとは生体内で発生する相互作用の全体を指す。インタラクトームには転写因子が特定の DNA 配列と結合して遺伝子の転写を制御するような核酸-タンパク質相互作用や、リン酸化などの修飾で変化する相互作用が含まれる。なかでも、PPI は代謝経路の制御や免疫応答、遺伝子発現などの多くの生体内のイベントに関わっており、インタラクトームの中で主要な相互作用の形態である。ヒトには 650,000 もの PPI が存在し、その多くが人間の疾患に関連していることが知られている(6)。ガンや神経変性疾患などの病気では、異常な相互作用が見られることから、その異常相互作用を改変するように、PPI を標的とした新しい薬剤開発が進められている。PPI 界面は個々に特有の形状であるため、競合阻害剤のような副作用は起こりにくい。

しかし、PPI 界面はタンパク質表面の比較的広範な領域に存在することから、平坦で特定の結合ポケットがなく、小分子薬剤は PPI 界面に十分に結合しないことが多い。これは、小さな分子が基質の場合、酵素や受容体の結合部位にはそれらが特異的に結合できるような結合ポケット構造があることと対照的である。そこで、PPI 分子探索には PPI に特化したフラグメントライブラリを用いることがよく行われている。複数のフラグメントが発見されたのち、従来の FBDD のようにそれらを化学的につなぎ合わせるほか、検出されたフラグメントの特徴を機械学習し、その学習結果から効率的な PPI 阻害分子を生成するといった方法も最近では報告されている（図2右）。(7)

## 3. アロステリックおよび PPI 阻害薬探索に有用な NMR の特性

上の戦略を進めるうえで、リガンド分子、ターゲットのタンパク質分子の挙動の理解やフラグメントのスクリーニングのために、様々な観測手法が用いられる。その中で、特有で有用な情報を与えるものとして NMR が挙げられる。この項では上記の戦略に有用な情報を NMR からどのように得られるか説明したいが、その前に NMR という装置の特徴について述べたい。

もともと核磁気共鳴（Nuclear Magnetic Resonance: NMR）という言葉は「“磁場”中で原子“核”が特定の周波数の電磁波と“共鳴”してエネルギーを吸収する」という現象を指すものである。実際は原子核から放たれる電磁波を検出しており、そこからその原子の化学結合の情報が得られると分かったため、未知の化学分子の分子構造を決定するツールとして使われるようになった。ここでいう分子構造とは“化学構造”、つまり化学構造式で表現できる情報のことである。

しかし時代が進むと装置の高磁場化、データ取得法と解析法の発展などにより、より高分子量の物質の分子構造情報も得られるようになってきた。ここでいう分子構造情報とは“コンフォメーションのアンサンブル”の情報を指す。注意点は、X線結晶構造解析やクライオ電顕のようにタンパク質分子の静的構造を高分解能に決定することよりも、溶液中にてタンパク質分子がどのようなコンフォメーション状態を行ったり来たりしているかの情報を得ることにNMRは長けている、ということである。つまり、NMRは構造決定の手法、だけではなく、溶液中の生体高分子のふるまいを理解する手法、と捉えてほしいと筆者らは考える。こういった特徴が、上記のアロステリック阻害剤やPPI阻害薬の探索に適しているのだが、それらの具体的な説明を以下に述べる。

### 3. 1 アロステリック分子の特定および作用機構の理解に利用可能なNMRの測定法

アロステリック分子の探索では、一般的に活性部位と異なる部位に結合するものを探す。これは化学シフト撮動法で容易に確認できる。同位体標識されたターゲットタンパク質の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定すると、このスペクトル上にはターゲットタンパク質の各アミノ酸残基に対応した信号が観測される(図3左)。その信号のスペクトル上の位置のことを化学シフトと呼ぶが、これは微細な構造変化でも変化するため、リガンド添加に伴い化学シフトの変化で結合部位の同定ができる。すなわち、リガンドを添加した際、化学シフト変化が活性部位と異なる残基で見られたら、アロステリック分子であると判断できる(図3左、残基A, B)。さらに、アロステリック分子は“結合は活性部位と異なるものの、活性部位に構造変化や運動性の変化をもたらす”ものであるため、活性部位やアロステリック分子結合部位を含む特定の残基群が連動して構造変化をもたらしていると考えられる。こういった残基群をAllosteric Communityといい、その残基群間の動きの連動をCommunity Networkと呼ぶ。化学シフト撮動法から、この残基群の特定も可能である(図3左、残基A, B, E)。(8)

さらに、アロステリック分子が活性をどのように変化させているかの分子メカニズムを理解するうえでNMR信号のRelaxation(緩和)現象を解析することが行われている。分子メカニズムとは、例えばアロステリック分子結合に伴い活性が減少した時に、活性部位の構造が活性をもたないものに変化したからなのか、運動性が下がった(つまり活性に必要な運動の頻度が減った)からなのかといった説明を与えることである。Relaxation解析は分子の構造や相互作用に関する詳細な情報が得られることから、創薬の分野でも利用されている。Relaxation法では $T_1$ (縦緩和時間:平衡の縦磁化までの回復時間)と $T_2$ (横緩和時間:各NMR信号のブロードさ)を測定する。詳細は割愛するが、化合物結合時におこる $T_1$ や $T_2$ の変化を解析することで、各残基の運動性がどのように変化するか(例えば、結合時に活性部位の運動性が減少し、触媒能が下がるなど)が分かる。(9, 10)

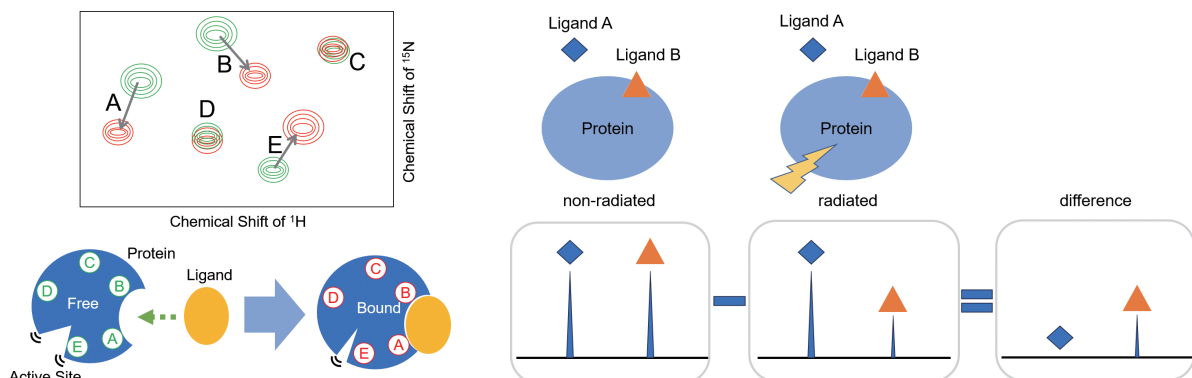


図3 化学シフト撮動法(左)とSTD法(右)の測定原理の概念図。



### 3. 2 PPI 阻害剤探索の FBDD に利用可能な NMR の測定法

PPI 創薬は、従来の FBDD に沿ったプロセスを経て行う。FBDD の初めの段階は、ターゲットのタンパク質に弱く相互作用するフラグメントの探索、である。このような弱い相互作用分子を効率よく見つけるのに、Saturation Transfer Difference (STD 法) は有効な手法である(11, 12)。STD 法の基本原理はタンパク質分子に対してラジオ波を照射し、信号を飽和させることで結合するリガンドの信号強度を減少させるものである。ラジオ波照射の有無で差スペクトルをとると、飽和の移動によって影響を受けたリガンドの信号強度が正のスペクトルとして観測される (図 3 右)。この STD 法ではリガンド候補分子を複数共存させての測定が可能であり、FBDD で挙げられた薬剤候補分子のスクリーニングの効率化に有効である。

タンパク質に結合することが分かったフラグメントが複数見つかったら、そのいずれをリンクさせるか決めないといけない。そのためにはそれぞれのフラグメントのターゲットタンパク質上の結合部位を調べ、結合位置が近い組み合わせを見つける必要がある。結合位置は、各フラグメント存在下で同位体標識したターゲットタンパク質の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し、上記の化学シフト摂動を調べれば直接理解できる (図 3 左) (11, 12)。また INPHARMA という NMR 測定方法は、STD のようにフラグメント側の NMR 信号から、近い位置に結合するフラグメントの組み合わせを調べられるものである。実験的には 2 種類のフラグメント (X と Y とする) とターゲットタンパク質 (同位体標識は必要ない) 混在下で測定する。こちらも詳細は割愛するが、もし X と Y がターゲットタンパク質上で近傍に結合する場合は、両者の NOE 相関ピークと呼ばれる信号が観測されるため、その信号の有無で結合位置が近傍であるかどうかを判断できる。(13)

なお、NMR 測定サンプル中のタンパク質や薬剤分子の濃度は、作用を想定した体内よりも何オーダーも高くなる。よって、生体内では起きないような高次の非特異的な相互作用が NMR 測定中で起きていないか常に検証しないとけない。そのような相互作用が疑われる場合は、その相互作用を抑えるような溶媒条件に替えたり、濃度外挿したりするなどして、サンプルに応じた対策が必要であることも付け加えておく。

## 4. PPI およびアロステリック阻害剤探索における NMR の活用例と展望

上述した NMR の特性を活用して、FBDD に基づいた薬剤の探索だけでなく、その薬剤機能の分子機構を理解することができる。以下では PPI 阻害剤やアロステリック分子の機構解明に利用した例をいくつか紹介し、そのあとこれらの特性をさらに活用できる新戦略の可能性について述べたい。

### 4. 1 ユビキチン化酵素の PPI 阻害剤の作用機序

PPI 改変分子には、理屈上 PPI disruptor (剥離剤) と PPI stabilizer (安定化剤) の 2 つの異なるタイプがありうるが、そのどちらも報告例がある。前者の例に USP7/ユビキチン(Ub)相互作用の阻害剤の GNE6776 がある。USP7 は脱ユビキチン酵素で、プロテアソーム系分解対象のタンパク質を脱ユビキチン化し分解から保護する。GNE6776 は USP7 特異的な阻害剤として開発された分子で (図 4 a)、以下のように NMR を使用して作用機序が解明された。USP7 の活性ドメインの  $^{15}\text{N}$  安定同位体標識体単独の  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC スペクトルを測定し (図 4 b 緑)、続いて Ub 存在下 (赤)、さらに Ub, GNE6776 存在下 (黒) でも測定した。その結果、USP7 の基質認識残基 (Q287, E371) の化学シフトが Ub 存在下では変化した。Ub/GNE6776 共存下では元に戻ったのである。このことは、GNE6776 が USP7/Ub の相互作用を弱めて阻害剤として機能することを明確に示している (14)。USP7 と Ub 結合界面には正電荷のリジン(K48<sup>Ub</sup>)と負電荷のアスパラギン酸(D305<sup>USP7</sup>)の間の静電相互作用があるが、実際 GNE6776 はそのアスパラギン酸近傍に結合して、その相互作用を阻害することが分かった。この一方で、PPI を強めるという逆の機構で働く阻害

剤もある。CC0651 は E2 ユビキチンリガーゼである Cdc34A を標的とする阻害剤だが、Cdc34A と Ub の相互作用を増強することが分かった。Cdc34A/Ub/CC0651 の 3 者複合体構造を見ると、Cdc34A の活性に必要な残基 (Ser129 と Glu133) の周辺に CC0651 が結合し、それらの周辺環境を変化させることが分かった。結果、PPI を安定化させつつユビキチンリガーゼを阻害することが分かった(15)。

これらの PPI disruptor と PPI stabilizer は対照的な性質を持ちつつ、どちらも PPI 界面に結合する。したがって、タンパク質-複合体安定分子の構造情報は PPI disruptor の設計にも用いることができ、その逆も可能である。Milroy らは、14-3-3 というタンパク質とリン酸化タウ(pTau)の複合体を安定化する fusicoccin A の 3 者複合体の構造情報を基に、新規 14-3-3/Tau disruptor 分子を設計した。新規分子存在下で 14-3-3/Tau 複合体の NMR 測定を行ったところ、参考にした fusicoccin A と同じ部位に結合していながら、pTau と 14-3-3 の結合を弱めていることを示した。この研究も、NMR 技術が PPI 改変分子の開発においてうまく活用された例である(16)。

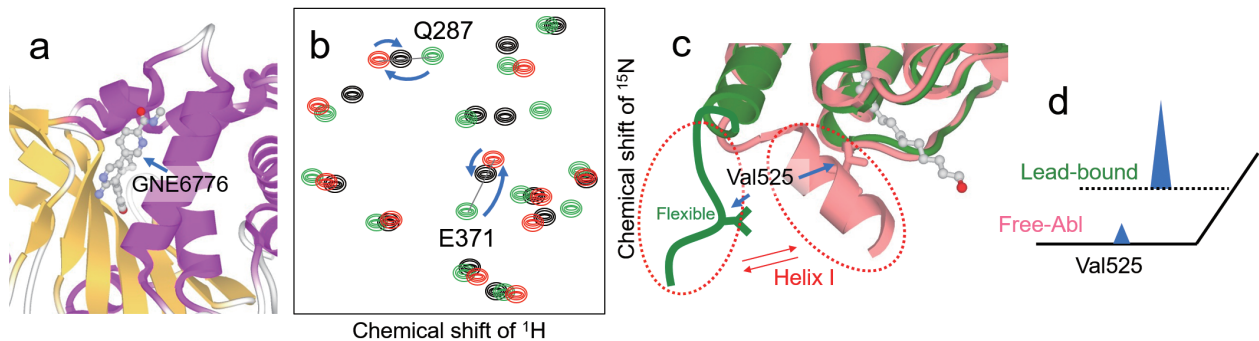


図 4 (a,b)USP7 と候補分子の結合、および(c,d)Abl キナーゼと候補分子の結合の実験。

#### 4. 2 Abelson チロシンキナーゼ病原性変異体のアロステリック阻害剤の作用機序

Abelson チロシンキナーゼ(Abl キナーゼ)は造血幹細胞中で細胞の成長や分化シグナル伝達の制御をする働きを持つ。通常の c-Abl キナーゼの活性は、自己阻害メカニズムを持つ。タンパク質中に共有結合したミリスチン酸が c-Abl の N 末端ドメインと C 末端ドメインをつなぎとめ、Abl 分子全体の揺らぎを抑えることで活性を自己抑制するのである。ここで、ある患者体内では ABL1 遺伝子と BCR(Breakpoint Cluster Region)遺伝子の相互転座により、Bcr-Abl 融合タンパク質が形成される。この融合タンパク質ではミリスチン酸結合部位が欠如しているため上記のような自己阻害が起こらず、常に活性状態となり慢性骨髄性白血病の原因となる。元々この Bcr-Abl 融合タンパク質の阻害剤としてイマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブなどが知られていたが、全て ATP 結合ドメインに結合することが知られており、それらの耐性化例も報告されていたので、Abl キナーゼのミリスチン酸ポケットに結合して、不活性状態を誘導する新方針のアロステリック阻害剤の探索が行われた。ポイントは、Abl キナーゼの阻害には、C 末端ドメインのヘリックス I の構造変化が必要であると分かったので、この構造変化を引き起こす分子の探索を目指した点である (図 4 c)。まずイマチニブ存在下でフラグメントライブラリから Abl キナーゼに結合する分子を NMR 用いてスクリーニングを行った。候補分子からさらに上記のヘリックス I の構造変化を引き起こす分子を NMR で同定し (図 4 d)、これをリード化合物として分子改良を行った結果、アスチミニブという新規の阻害剤開発につながった(17)。一連の研究で、Abl キナーゼが ATP サイトおよびアロステリック阻害剤と結合した際の新しい構造状態である"open inhibited state"も発見され、このような新規の構造状態に基づく新しいアプローチが見いだされたきっかけにもなった(9)。

#### 4. 3 アロステリック分子による PPI 制御を目指した新規創薬戦略

ここで上記の PPI とアロステリック分子の発想を組み合わせた創薬も考えられないだろうか。上記のアロステリック現象はリガンドの結合部位と離れた位置の活性部位の構造やダイナミクスを変化させて活性を変化させるという発想であった。しかし、もしそれが他のタンパク質との相互作用部位だったとすると、そのタンパク質が関わる PPI にも影響を与えることになる。この戦略は変異の多く起こるようなウイルスの感染防御への応用が期待できる。最近の例を挙げると、2020 年にパンデミックを引き起こした SARS-CoV-2 は、感染の初期段階でウイルスのスパイク(S)タンパク質の一部のドメイン(Receptor Binding Domain: RBD)がヒトの ACE2 という細胞表面タンパク質に会合する。この結合の中和抗体産出を意図して RBD 領域をコードした mRNA ワクチンが広く用いられたが、オミクロン株などこの RBD 領域に多くのアミノ酸置換変異が生じた変異株が何度も発生し、免疫回避の問題がくり返されている。

ここで、S タンパク質のコンフォメーションには、大きく UP 型と DOWN 型という二つの型があり、DOWN 型は RBD が S タンパク質の内部を向くため、中に埋もれて ACE2 との会合能が下がることが示唆されている(18)。なので、会合面に相当する RBD 部ではなく、この DOWN 型を固定するようなアロステリック分子の創出が、変異に伴う免疫回避に対する対策となると考えられる。SARS-CoV-2 に対してそのような戦略に基づく創薬はまだ報告はないが、翻訳後修飾によって UP 型と DOWN 型のコンフォメーション平衡が変化することが報告されているため(19)、可能性の高いアプローチだと考えられる。そのためには、小分子がどのようなアロステリック現象を引き起こすのかを NMR をはじめとした物理化学的手法を駆使して詳細に理解することが今後重要になるだろう。

#### 5. まとめ

以上、薬剤探索法として一般的に用いられている FBDD 法や、最近進められている PPI 阻害薬やアロステリック阻害薬指向性の戦略の概要と、それらの場で用いられている NMR の解析法と活用例を述べた。オリジナルの SBDD は、タンパク質の静的構造情報を基に特定の残基をピンポイントで狙う発想であった。しかし上述の通り、タンパク質分子全体のダイナミクスを改変するような発想に転換しつつある。これはある単一の機能を持つと考えられる遺伝子をノックアウトすると、細胞内の代謝ネットワークが複雑に変化するため、想定以外の細胞の挙動・表現型の変化が起こることとよく似た現象である。そして、本稿中で述べたとおり、NMR とは本来、原子核が電磁波を放つ現象のことで、その電磁波にタンパク質分子や薬剤分子の物理化学的挙動、特に構造や状態の動的変化の情報を含む。その電磁波からタンパク質分子の動的変化の情報を抽出する分析方法は数多く報告されており、本稿ではとても紹介しきれない。しかしいずれの方法でも生態環境に近い条件下で「どの分子が」ターゲットタンパク質と結合し、タンパク質分子が「どのような」構造変化や運動変化を示すかが分かるもので、新規創薬戦略に技術的にも概念的にもマッチした方法である。今回は創薬における活用に注目して述べたが、もちろん生体内でのタンパク質分子の活性制御の理解にも NMR は活用されている。以上のような特性を活かして、本高圧力蛋白質研究センター NMR 装置による創薬やタンパク質分子機能の理解をさらに進めていきたい。

#### 謝辞

高圧力蛋白質研究センターの日頃の研究活動や運営のご支援を頂き、先端技術総合研究所の松本和也所長、生物理工学部の梶山慎一郎先生、および多くの先生方、職員の方にこの場を借りて感謝申し上げます。また本稿は、近畿大学 21 世紀研究開発奨励金(代表、近畿大学薬学部森川敏生教授)、科学研究費基盤 C(代表、櫻井)の研究の一環として作成いたしました。

## 参考文献

- (1) Kendrew, J. C. *et al.* (1960) Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å. resolution. *Nature*. 185, 422–427.
- (2) von Itzstein, M. *et al.* (1993) Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363, 418–423.
- (3) Weinberg, R. A. (2014) Coming full circle—from endless complexity to simplicity and back again. *Cell*, 157, 267–271.
- (4) Batool, M., Ahmad, B., Choi, S. (2019) A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci*, 20, 2783.
- (5) Shimada, I. *et al.* (2019) GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat Rev Drug Discov* 18, 59–82.
- (6) Stumpf, M. P. H., *et al.* (2008) Estimating the size of the human interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 6959 – 6964.
- (7) Ikeda K. *et al.* (2023) DLiP-PPI library: An integrated chemical database of small-to-medium-sized molecules targeting protein–protein interactions. *Front. Chem.* 10, 1090643. doi: 10.3389/fchem.2022.1090643
- (8) Aoto, P.C., Martin, B.T., Wright, P.E. (2016) NMR Characterization of information low and allosteric communities in the MPA kinase p38γ. *Sci. Rep.* 6, 28655.
- (9) Skora, L., Jahnke, W. (2015) Contributions of Biomolecular NMR to Allosteric Drug Discovery. *Chimia* 69, 421–424.
- (10) Dubey, A., *et al.* (2020) The role of NMR in leveraging dynamics and entropy in drug design. *J. Biomol. NMR* 74, 479–498.
- (11) 半沢宏之, 滝沢剛(2010) Fragment-Based Drug Discovery のための NMR スクリーニング. *薬学雑誌* 130, 325–333.
- (12) Shi, L., Zhang, N. (2021) Applications of Solution NMR in Drug Discovery. *Molecules* 26, 576.
- (13) Sanchez-Pedregal, V. M. *et al.* (2005) The INPHARMA method: Protein-mediated interligand NOEs for pharmacophore mapping. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4172.
- (14) Kategaya, L. *et al.* (2017) USP7 small-molecule inhibitors interfere with ubiquitin binding. *Nature* 550, 534–538.
- (15) Huang, H. *et al.* (2014) E2 enzyme inhibition by stabilization of a low-affinity interface with ubiquitin. *Nat. Chem. Biol.* 10, 156–163.
- (16) Milroy, L.G. *et al.* (2015) Stabilizer-Guided Inhibition of Protein-Protein Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 15720–15724.
- (17) Schoepfer, J. *et al.* (2018) Discovery of Asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1. *J. Med. Chem.* 61, 8120–8135.
- (18) Xu, C. *et al.* (2021) Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM. *Sci. Adv.* 7, eabe5575.
- (19) Mori, T., *et al.* (2021) Elucidation of interactions regulating conformational stability and dynamics of SARS-CoV-2 S-protein. *Biophys. J.* 120, 1060–1071.



## Distinct NMR Views Leverage New Strategies in Drug Discovery

Naoya Inoue<sup>1</sup>, Takuma Shiraki<sup>1</sup>, Yasushige Yonezawa<sup>2,3</sup> and Kazumasa Sakurai<sup>1,2</sup>

This review provides an overview of the evolution of drug discovery strategies in recent years and the role of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in these strategies. The strategy known as Structure-Based Drug Discovery (SBDD) emerged following the first report on the three-dimensional structure of protein molecules in 1957. This approach involves the artificial design of drug molecules specifically targeting "actively important sites" based on the three-dimensional structure of proteins. SBDD drugs, however, have encountered issues such as side effects and cell habituation. Consequently, a new concept "allosteric molecule exploration" was born. This involves the design of drug molecules that "change the dynamics of the entire protein molecule to selectively alter activity," a concept distinct from the conventional approach of "turning off active sites." It is considered promising for addressing issues like habituation in cancer cells. Additionally, another new strategy called Protein-Protein Interaction (PPI) inhibitor exploration has emerged. As many PPIs are known to be associated with diseases, SBDD and machine learning are combined to explore molecules that inhibit specific interactions between proteins. NMR is a technique that not only facilitates structural determination but also enables an understanding of the mobility of biomacromolecules, providing valuable information for the exploration of allosteric molecules and PPI inhibitors. Various NMR methods exist, and some application examples are presented in this review. Through this review, we aim to convey that drug discovery strategies are transitioning towards exploring drug molecules that affect the dynamics of the entire target protein molecule, including all residues, not just those related to the function of the protein molecules. Both technically and conceptually, NMR is deemed highly suitable for this new strategy.

**Key words: Fragment-Based Drug Discovery, Protein-Protein Interaction, Allosteric molecule, NMR.**

---

1. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Major in Biological Systems Engineering, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan