

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

### ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体のリガンド認識機構の研究 —非競合的拮抗薬の理論的創薬—

氏名 田城孝雄

分子生物学の進歩により、多くの膜7回貫通型受容体の遺伝子がクローニングされ、核酸配列が決定された。これにより受容体蛋白のアミノ酸一次配列が決定された。またバクテリアロドプシンの結晶のX線解析の結果に基づき、バクテリアロドプシンの三次元構造をテンプレートとし、コンピューターを用いて、幾つかのG蛋白結合型受容体の三次元構造の推定・推測が行われている。

ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体に於いては、イヌ・ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体に点変異を導入した受容体を培養細胞に発現させた系を用いて、ヒスタミンとヒスタミンH<sub>2</sub>受容体の結合部位を検討し、ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体の第3膜貫通領域の98番のアスパラギン酸残基 (Asp98)と、第5膜貫通領域の186番のアスパラギン酸残基 (Asp186)、190番のスレオニン残基 (Thr190)の3つのアミノ酸残基が、ヒスタミンと結合するポケットを形成することが報告されている。しかし、アンタゴニストが受容体分子と結合するモデルの検討はなされていなかった。

新しく合成されたヒスタミンH<sub>2</sub>受容体拮抗薬 T-593 は、amino methyl furan と  $\beta$ -hydroxyphenethylamine moiety を flexible chemical chain で結んだ化学構造をしており、複素環部分は ranitidine の構造式に類似している。T-593 は guinea pig の摘出右心房にてヒスタミン刺激による陽性変時作用において、時間依存性に非競合的 (unsurmountable) なH<sub>2</sub>受容体拮抗作用を示すことが報告されている。

競合型拮抗薬 (classical competitive antagonist) と非競合的拮抗薬 (unsurmountable antagonist) の薬理学的特徴の違いは、これらの antagonist と受容体蛋白分子との相互作用・結合の様式の違いによるものかを、化学構造式の類似しているヒスタミンH<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の ranitidine (classical competitive antagonist) と、T-593 (unsuountable antagonist) の両者を、I. リガンドである拮抗薬の構造式と、II. リガンドが結合する受容体の構造 (蛋白のアミノ酸残基) の双方から検討した。

## I. リガンドである拮抗薬の構造式の研究

### (1) 方法

イヌ・ヒスタミンH<sub>2</sub> 受容体遺伝子を発現させた培養細胞系 Hepa cell を用いて、ヒスタミン刺激による cAMP 産生を指標に、ranitidine, T-593 および T-593 の構造同族体 (アナログ体) の薬理作用を比較検討した。

### (2) 結果

1) ranitidine は、ヒスタミン刺激による cAMP 産生の用量反応曲線を右に平行にシフトしたが、最大反応は抑制せず、競合的拮抗作用を示した。

2) T-593 の拮抗作用は時間依存性に強化され、ヒスタミン刺激による cAMP 産生の最大反応を抑制した。さらに、T-593 の拮抗作用は洗浄により、消失しなかった。これらのデータから T-593 は非競合的拮抗作用を持つことが示された。

3) T-593 の分子から phenol 基を取り去り、ranitidine に類似した構造式の T-649 は、ranitidine と同様にヒスタミン刺激の最大反応を抑制しなかった。

### (3) 考察

側鎖末端の phenol 基は非競合的拮抗作用に必要であると考えられる。

T-593 は ranitidine と同じ複素環 (furan 環) を持つが、競合的拮抗作用を持つ ranitidine と異なり、ヒスタミンの用量反応曲線の最大反応を抑制する非競合的拮抗作用を示した。さらに、T-593 のアナログ体を用いて検討した結果、T-593 の非競合的拮抗作用は、分子に含まれる phenol 環が関与していると考えられた。

## II. リガンドが結合する受容体の構造の検討

### (1) 方法

1) ヒスタミン結合ポケットの3つのアミノ酸残基を点変異させた変異受容体を発現させた Hepa cell を用いて、ヒスタミン刺激による cAMP 産生に対する T-593 の抑制作用の非洗浄性を検討した。

2) ウサギとイヌの単離胃粘膜細胞における <sup>14</sup>C-aminopyrine uptake を用いて、ヒスタミン刺激に対する酸分泌を指標にして、T-593 の拮抗作用の非洗浄性に対する種差と、クローニングにより得

られた、核酸配列から推測されるウサギとイヌのヒスタミンH<sub>2</sub>受容体のアミノ酸配列の違いを比較検討した。

3) コンピューターを用いて、バクテリオロドプシンの結晶構造をもとに、構築されたヒスタミンH<sub>2</sub>受容体の三次元モデルを作製した。さらに、ヒスタミン、ranitidine, T-593 を結合させた複合体のエネルギー最小化計算により、最適化した結合体三次元モデルを構築した。

#### (2) 結果

1) T-593 の unsurmountable antagonism は、ヒスタミン結合ポケットを形成する3つのアミノ酸残基とは関与しないことが、明らかになった。

2) T-593 の拮抗作用の非洗浄性に対する、ウサギとイヌの単離胃粘膜細胞の種差と、クローニングにより得られた、核酸配列から推測されるアミノ酸配列の違いより、イヌ・ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体の77番のアミノ酸残基のフェニルアラニンが unsurmountable antagonism に関与することが、示された。

3) この結果は、バクテリオロドプシンの結晶構造をもとに、コンピューターを用いて構築されたヒスタミンH<sub>2</sub>受容体の三次元モデルにT-593 を結合させた複合体のエネルギー最小化計算による、最適化した結合体三次元モデルにおいて、T-593 と、77番のアミノ酸残基のフェニルアラニンが相互作用する位置に配位される結果と合致した。

#### (3) 考察

1) ヒスタミン-ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体複合体の三次元構造モデルでは、点変異受容体を発現させた細胞を用いた研究で示された Asp98, Asp186, Thr190 の3つのアミノ酸残基と相互作用する位置にヒスタミンが配位された。

2) 第一世代H<sub>2</sub>ブロッカーで、ラニチジン-ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体複合体の三次元構造モデルでは、ラニチジンは、ヒスタミンと同じ3つのアミノ酸残基と相互作用する位置に配位された。

3) 第二世代H<sub>2</sub>ブロッカーで、非競合的拮抗薬の T-593-ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体複合体の三次元構造モデルでは、T-593 はヒスタミン結合ポケットを形成する3つのアミノ酸残基の他に、イヌとウサギの種差により指摘された第2膜貫通領域の77番のフェニルアラニン残基 (Phe77) と相互作用出来る位置に、配位された。これによりフェノール環が $\pi$ - $\pi$ 相互作用し、ラニチジンより強固な結合をしている可能性が示された。

### III. まとめ

antagonist が、agonist と同じ結合部位において受容体分子と結合している場合は、高濃度の agonist は、質量作用の法則に従って、antagonist を完全に置き換えること (exclude) が可能である。この場合 antagonist は、競合的拮抗薬 (competitive antagonist) となる。

antagonist が、agonist の結合部位以外の結合部位で、強固な結合をしている場合は、高濃度の

agonist をもってしても, antagonist を完全に exclude することは出来ない。この antagonist は, 非競合的拮抗薬 (unsurmountable antagonist) となる。この結合は agonist で replace 出来ない結合であり, agonist と受容体との結合を形成する水素結合やイオン結合より強い結合または分子間力であると考えられる。

#### IV. 結語

受容体分子の内側ポケットにある芳香族アミノ酸を探し, その残基と  $\pi$ - $\pi$  相互作用可能な位置に配位できる芳香環をもつ拮抗薬をデザインすれば, より強力で持続時間の長い拮抗薬を効率よく分子設計し, 創薬することが可能となる。

G 蛋白質結合受容体拮抗薬は, 重要な薬剤であり広く臨床応用されている。G 蛋白質結合受容体についての知見は多いが, 拮抗薬の創薬には生かされておらず, agonist の構造式を元に推察し, またはランダムスクリーニングでリード化合物を発見し, 構造活性相関により, より良い化合物を探すという手法が取られている。G 蛋白質結合受容体の創薬は, G 蛋白質結合受容体のアミノ酸配列や三次元構造に対する考察が進んだ現在でも, 経験と試行錯誤によっていると言える。この為, 医薬品の開発に膨大な時間と費用を要する。

他の多くの膜 7 回貫通型受容体と, その非競合的拮抗薬との結合に関する分子モデルの情報を集積することにより, アミノ酸の一次配列の判明した受容体の最適な拮抗薬を, 理論的に創薬できる可能性が拓かれる。