

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目            心不全用薬を目的とした $\beta$ ARK1 選択的阻害剤の獲得

氏 名                飯 野     稔

慢性心不全は左心室の機能不全による心臓のポンプ機能の低下を伴う疾患である。心不全の初期においては心機能の低下に伴い交感神経系が活性化し心筋の活動を促進して機能低下を補う。しかし慢性的な交感神経系の活性化は心筋細胞 $\beta$ 2受容体を脱感作させる結果、応答性が低下し慢性心不全は悪化・伸展する。したがって $\beta$ 2受容体の脱感作の抑制は心不全治療法の候補と考えられる。脱感作には、 $\beta$ 2受容体細胞内 C 末端のリン酸化、受容体の発現量抑制、internalization 等が関与する。 $\beta$ -Adrenergic kinase 1( $\beta$ ARK1)は活性化 $\beta$ 2受容体を選択的にリン酸化するとともに、 $\beta$ 2受容体/ $\beta$ -arrestin 複合体の形成を通じ $\beta$ 2受容体の internalization 等にも関与する (図 1)。加えて、心不全患者では $\beta$ ARK1 の活性、mRNA 量とも上昇していることから、 $\beta$ ARK1 は心不全における $\beta$ 2受容体脱感作の中心的役割を担うと考えられている。したがって $\beta$ ARK1 阻害剤は慢性心不全治療薬として期待される。

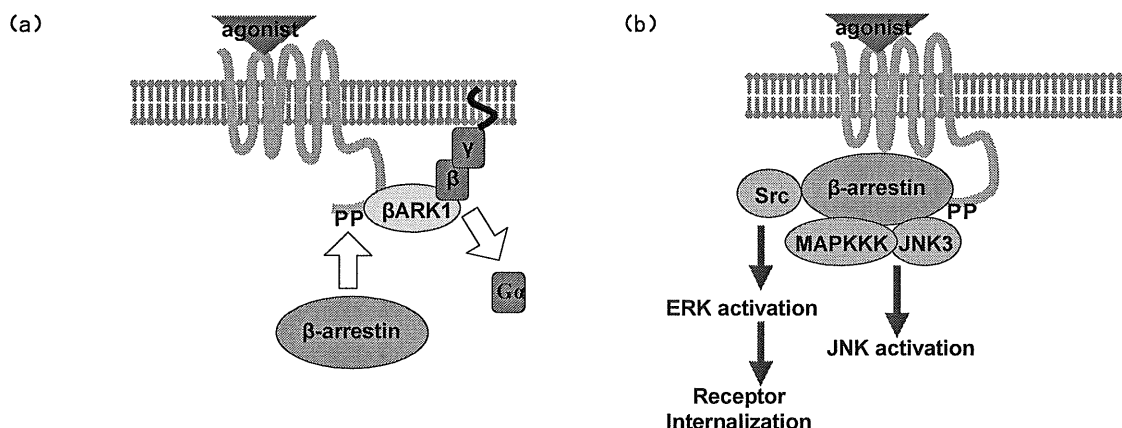


図 1  $\beta$ 2 受容体に対する $\beta$ ARK1 の働き (a)アゴニストにより $\beta$ 2 受容体が活性化されると $\beta$ ARK1 が  $\beta$ 2 受容体をリン酸化し  $G\alpha$  の乖離と  $\beta$ -arrestin の  $\beta$ 2 受容体への結合が起こる (b)  $\beta$ -arrestin の仲介により JNK 活性化および ERK 活性化が起こり後者は  $\beta$ 2 受容体の internalization を起こす  $\beta$ 2-AR :  $\beta$ 2-adrenergic receptor,  $G\alpha$  : G-protein  $\alpha$ -subunit,  $\beta$  : G-protein  $\beta$ -subunit,  $\gamma$  : G-protein  $\gamma$ -subunit,  $\beta$ ARK1 :  $\beta$ -adrenergic receptor kinase 1, P : phosphorylated residue, Src : src-family tyrosine kinase, JNK3 : c-Jun N-terminal kinase 3, MAPKKK : mitogen-activated protein kinase kinase kinase, ERK : extracellular-regulated kinase

$\beta$ ARK1 を含むセリン／トレオニンリン酸化酵素は一般に ATP 結合部位と基質結合部位を有する。ATP 結合部位は深いポケット状のアデニン結合部位等から構成され、この部位のアミノ酸残基およびリガンド認識機構は高度に保存されている。一方、基質結合部位はセリン／トレオニンリン酸化酵素間で差異が比較的大きく、一般に空間的に比較的広範囲にわたる複数の相互作用部位を通じて基質を認識する。加えて、現在までに得られているリン酸化酵素低分子阻害剤の多くがアデニン結合部位に結合すること、リン酸化酵素間で交叉阻害活性を示すことから、アデニン結合部位は低分子が高親和性を持ち得るもののリン酸化酵素間の選択性は持ちにくく、基質結合部位は選択性が期待されるものの低分子が高親和性を持ちにくいと推測される。 $\beta$ ARK1 もこの一般的な傾向をもつと仮定した場合、いずれか一方の結合部位との結合では高い親和性と選択性を両立し難いと予測される。そこで、アデニン結合部位および基質結合部位の双方に同時に相互作用する分子を獲得すれば選択性と高親和性を両立できると考えた。加えて、 $\beta$ ARK1 選択的な低分子阻害剤ははまだ報告されておらず、心不全治療の観点からも有用と考えた。したがって本研究では $\beta$ ARK1 のアデニン結合部位および基質結合部位の双方に注目し、この部位を阻害する分子を見出す理論的手法を考案し、この方法を用いて心不全治療薬を指向した阻害剤の獲得を目指した。

本研究の阻害剤設計戦略に必須である $\beta$ ARK1 の立体構造は未知である。そこでホモロジーモデリング法を用いて $\beta$ ARK1 立体構造モデルを構築することとした。まず $\beta$ ARK1 とアミノ酸配列の相同性が高い立体構造既知タンパクを検索し PKA を見出した。複数ある PKA 結晶構造解析のうち、基質類似ペプチド阻害剤 PKI[5-24]が結合した PKA の構造を鋳型としてホモロジーモデリング法により $\beta$ ARK1 立体構造をモデリングした。

つぎに PKA と PKI[5-24]の相互作用様式を分子力場により解析するとともに、各種ペプチドの PKA に対する親和性の報告例を参照し、PKA-PKI[5-24]相互作用を解析した。その結果、PKA は、s-11、s-6、s-3、s-2、s+1 位で基質側鎖に特異的な認識を、s-7、s-2、s、s+1 位で基質主鎖の認識を行っていると考えられた。つづいて対応する $\beta$ ARK1 立体構造モデルの各部位を PKA と比較した。その結果、PKA の s-11、s-6、s-2、s+1 位がそれぞれ疎水性、酸性、酸性、疎水性であるのに対し $\beta$ ARK1 の対応する部位は親水性、中性、塩基性、親水性と異なる性質を有し両酵素は基質特異性が異なると予測された。一方、s-3 位は両酵素とも酸性で静電的性質は共通するものの、アスパラギン酸とグルタミン酸の側鎖の差異をはじめとする立体的な差があった。

そこで、予測した基質認識の差に基づき、 $\beta$ ARK1 選択的な阻害剤を獲得する方策を考察した。まず、 $\beta$ ARK1 選択的な阻害剤を設計する前提条件として、 $\beta$ ARK1 と類似性の高い PKA を阻害しない $\beta$ ARK1 阻害剤は、 $\beta$ ARK1 との類似性がより低い他のリン酸化酵素を阻害する可能性も低いと仮定した。さらに、アデニン結合部位と基質結合部位の双方に結合するためには両部位間の距離は薬物分子として相応しい分子量の化合物が到達しえる範囲内にある必要があると考え、両部位間の距離を推測した。その結果、両酵素間で大きな差異があり選択性が期待される s-11、s-6、s-2、s+1 位はアデニン結合部位から比較的遠い一方、s-3 位はアデニン結合部位に近く低分子で両結合部位を同時に阻害することは可能と考えられた。そこで以後 s-3 位に注目することとした。

$\beta$ ARK1 モデル構造の検証として、 $\beta$ ARK1 の s-3 位が基質認識に関与している傍証を実験的に得る必要があると考えた。 $\beta$ ARK1 モデル構造の s-3 位は Asp278、Ala321、Ile485 から形成され、Asp278 を疎水性、塩基性アミノ酸にすると s-3 位全体の性質が変わると推測した。さらに変異型 $\beta$ ARK1 モデル構造を用いてこれを考察し、いずれの変異体も $\beta$ 2 受容体を認識できなくなると予測した。そこで実際に変異体を作成し、これらの仮説を検証することとした。Sf-9 細胞で野生株と同じ条件で変異タ

ンパクを生産しβ2 受容体のリン酸化能を調べたところ、いずれの変異体もβ2 受容体をリン酸化しなかった。この結果はモデル構造に基づく予測結果と一致することから、モデル構造の妥当性を支持する傍証となると考えた。

既知の阻害剤とタンパクの複合体立体構造情報および構造活性相関情報から、アデニン結合部位は一般に芳香環と水素結合性原子を併せ持つ化合物を認識すると考えられる。そこで本研究でもこの条件を満たす低分子化合物を探すこととした。標的タンパクの立体構造情報に基づき理論的に阻害化合物を獲得する方法のひとつにバーチャルスクリーニング法がある。しかしながら芳香環と水素結合性原子を同時に検索式とするプログラムは入手できる範囲で報告されていない。そこで芳香環と水素結合性原子を同時に検索し、リガンドのフレキシビリティを考慮して標的タンパクとのドッキングを行うバーチャルスクリーニングプログラム ARCHER (Automatic & Rational Complementary Hit-compound ExploreR) を作成した(図 2)。さらに ARCHER の動作検証として 5 種のタンパク-リガンド複合体構造を ARCHER で予測した結果、結晶構造を概ね再現できた。したがって ARCHER の動作が妥当であると結論した。

ARCHER によるバーチャルスクリーニングは技術上の理由からアデニン結合部位のみを標的とするほうが計算効率が高い。そこで、第一段階として ARCHER によりアデニン結合部位に結合する化合物を絞り込み、第二段階として s-3 位に注目した PKA との比較ドッキングスタディによりβARK1 選択的阻害剤を選出した。

まず標的とするβARK1 モデル構造の精度不足を補うと同時に、アミノ酸側鎖の運動性を考慮するため、βARK1 のアミノ酸側鎖に 2 種のコンフォーマーを設定した。つぎに、他のリン酸化酵素とそれらのリガンドの相互作用を参照しながら、ARCHER 入力用の検索式としてβARK1 のアデニン結合部位を記述するファーマコフォアを構築した。つづいて ARCHER によりバーチャルスクリーニングを実施した。検索対象とした Available Chemical Database (ACD、267,733 化合物) に対し、まず 2 次元構造から 3 次元構造への変換、立体異性体の付加、分子量 (200-650) による選別を行い、データベースを 263,334 化合物に絞り込んだ。つぎに化合物のフレキシビリティを考慮しながらファーマコフォアへの合致の可否を自動判定し 112,314 化合物に絞った。さらにファーマコフォアをβARK1 モデル構造に置き換えて候補化合物構造をβARK1 モデル構造に自動ドッキングし、評価エネルギー値の上位計 4,000 化合物から化学的に不安定な化合物を除いて 3,680 化合物とした。つづいて、ここまで得られた候補化合物-βARK1 複合体モデル構造をグラフィクスディスプレイ上で目視し、アデニン結合部位での水素結合、同部位での疎水相互作用、複合体形成時のコンフォメーション、の 3 点に注目しつつ類似骨格化合物を省き 280 化合物とした。

第二段階として、280 の候補化合物-βARK1 複合体モデル構造に PKA 結晶構造を重ね合わせ、PKA との比較ドッキングスタディを実施した。比較に際しては、候補化合物と PKA の s-3 位の Glu127

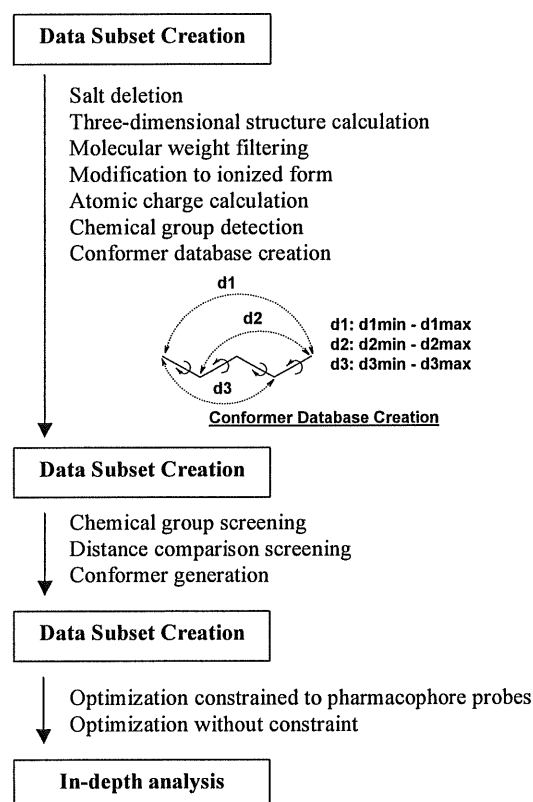


図 2 ARCHER の動作概略

側鎖、Thr51 主鎖等との間で立体反発が起こるか否かに注目し、最終的に 11 化合物を候補として選出した (図 3)。

まずこれらのβARK1 阻害活性を測定した結果、3 化合物がβARK1 を IC<sub>50</sub> 126 - 563 μM で阻害した (表 1)。一方、陰性対象として乱数的に選出した 11 化合物はいずれも 1mM でβARK1 を阻害しなかった。つぎにβARK1

阻害活性を示した 3 化合物の PKA 阻害活性を測定したところ、1mM でも阻害しなかった (表 2)。以上より、これら 3 化合物がβARK1 を選択的に阻害することが示された。これら 3 化合物のβARK1 阻害作用ははまだ報告されておらず、したがって本結果は新規の知見である。

以上まとめると、第一に、βARK1 立体構造モデルを作成し、類似リン酸化酵素である PKA との比較に基づき Asp278 が基質認識に重要であると予測し、変異株の作製と活性測定を通じてこれを実験的に証明した。第二に、水素結合部位および芳香環結合部位を認識する低分子化合物をデータベース中から検索するバーチャルスクリーニングソフトウェア ARCHER を作製した。第三に、アデニン結合部位に注目して ARCHER を用いて市販化合物からβARK1 阻害剤を検索し、続いて s-3 位に注目した PKA との比較ドッキングスタディで候補化合物を選別し、βARK1 選択的な阻害剤 3 化合物を見出した。

本研究は、β2 受容体の脱感作を担うβARK1 を選択的に阻害する化合物を初めて見出した。これらは慢性心不全におけるβ2 受容体脱感作を抑制するという新規治療法を検証する上で有用な研究ツールを提供するものと確信する。加えて、リン酸化酵素の選択的阻害化合物を理論的に獲得する方法を考案し実証した。本手法は数多くの疾患の治療薬標的である各種リン酸化酵素に対し選択的阻害剤を獲得する際に共通して貢献できるものだと考える。

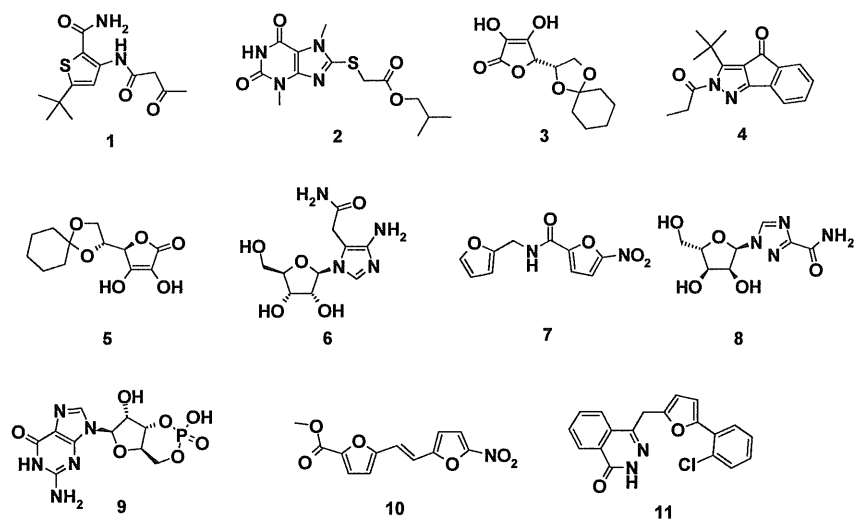


図 3 データベース検索により選出したβARK1 阻害候補 11 化合物

表 1 βARK1 阻害候補化合物のβARK1 阻害活性およびβARK1 との相互作用エネルギー予測値

Compound	Inhibition at 1 mM <sup>a</sup> (% of control value)	IC <sub>50</sub> (μM)
1	37.3	
2	0.0	
3	20.4	
4	52.7	563
5	0.0	
6	60.7	557
7	37.7	
8	0.0	
9	24.2	
10	88.4	126
11	67.3	

<sup>a</sup> 阻害値が負値の場合は 0 とした

表 2 化合物 4、6、10 の PKA 阻害活性

Compound	Inhibition (%of control value)
4	-2.2% at 1 mM
6	-6.5% at 1 mM
10	1.8% at 1 mM
PKI[5-24] <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> = 0.003 μM

<sup>a</sup> 陽性対照