

審査の結果の要旨

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。心不全初期には交感神経系が活性化し心筋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 β 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 β 2受容体の脱感作抑制は心不全治療法の候補と考えられている。脱感作には、 β 2受容体細胞内C末端リン酸化、受容体の発現量抑制、internalization等が関与する。 β -Adrenergic kinase 1(β ARK1)は活性化 β 2受容体を選択的にリン酸化して脱感作し、さらにこのリン酸化が β 2受容体のinternalization等にも関与する(図1)。さらに β ARK1は心不全患者で活性、mRNA量が上昇していることから β 2受容体脱感作の中心的役割を担うとされる。したがって β ARK1阻害剤は慢性心不全治療薬として期待されるものの、 β ARK1選択的な低分子阻害剤はいまだ報告されていない。

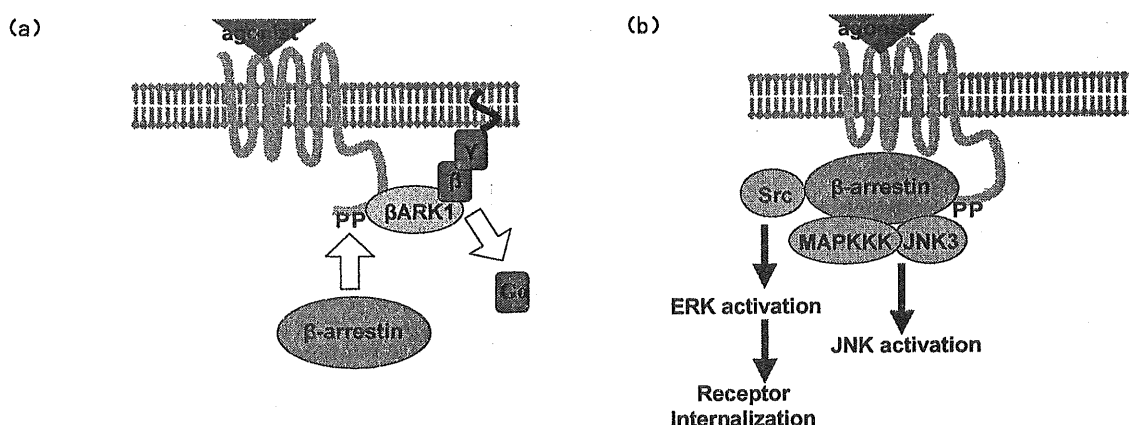


図1 β 2受容体に対する β ARK1の働き (a)アゴニストにより β 2受容体が活性化されると β ARK1が β 2受容体をリン酸化し $G\alpha$ の乖離と β -arrestinの β 2受容体への結合が起こる (b) β -arrestinの仲介によりJNK活性化およびERK活性化が起こり後者は β 2受容体のinternalizationを起こす β 2-AR: β 2-adrenergic receptor, $G\alpha$: G-protein α -subunit, β : G-protein β -subunit, γ : G-protein γ -subunit, β ARK1: β -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

β 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。一般に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ている。本研究では β ARK1もこの傾向を示すと仮定し、アデニン結合部位および基質結合部位の双方に相互作用することにより選択性と高親和性を併せ持つ β ARK1阻害剤の獲得を目指している。

本研究では阻害剤設計に必要な β ARK1の立体構造が未知のため、まず β 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てPKAを見出し、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 β ARK1立体構造をモデリングしている。

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うえで、対応するβARK1 立体構造モデルの各部位との間で比較を行っている。その結果として、PKA とβARK1 の間で、s-11、s-6、s-2、s+1 位は静電的性質が異なり、s-3 位は静電的性質は類似するものの立体的な差があると推測している。さらに以上の各基質結合部位とアデニン結合部位の距離をモデル構造に基づき推測し、s-3 位のみが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のに好都合であると推測し、以後 s-3 位に注目している。

まずβARK1 モデル構造の検証としてβARK1 の s-3 位が基質認識に関与している傍証を実験的に得ている。すなわち、βARK1 モデル構造の s-3 位を形成する Asp278、Ala321、Ile485 のうち Asp278 を Ala または Arg に変異したタンパクを作成し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とから、モデル構造の妥当性を支持する傍証としている。

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、一般にリン酸化酵素のアデニン結合部位は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される。本研究でもこの条件を満たす低分子化合物を探すことを目指し、その手段として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バーチャルスクリーニング法を選択している。ただし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が現状で報告されていないため、本研究では新規にバーチャルスクリーニングプログラム ARCHER (Automatic & Rational Complementary Hit-compound ExploreR) を作成している(図 2)。さらに ARCHER の動作検証として 5 種のタンパク-リガンド複合体の結晶構造を ARCHER で概ね再現し、ARCHER の動作の妥当性を示している。

化合物検索に際しては、技術上の理由からまず ARCHER によってアデニン結合部位に結合する化合物を絞り込み、つぎに 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ている。またβARK1 のアミノ酸側鎖には 2 種のコンフォーマーを設定し、モデル構造の精度不足を補いアミノ酸側鎖の運動性を考慮している。βARK1 のアデニン結合部位を記述する検索式は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設定している。

バーチャルスクリーニングの手順として、検索対象の Available Chemical Database 約 27 万化合物に対し、3 次元構造の算出、立体異性体の付加、分子量による選別、ファーマコフォアへの合致判定、βARK1 モデル構造へのドッキング、不安定化合物除去、相互作用様式の目視確認、類似骨格化合物除去を順に実施し 280 化合物を選出している。

続いてこれらの候補化合物とβARK1 の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、最終的に 11 化合物を選出している(図 3)。

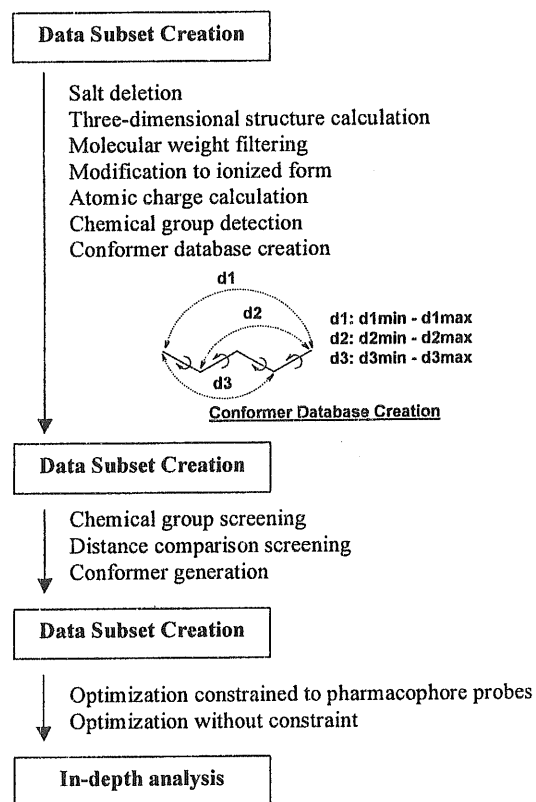


図 2 ARCHER の動作概略

さらに阻害活性測定実験により、11 化合物中 3 化合物が IC₅₀ 126 - 563 μM のβARK1 阻害活性を有すること (表 1)、これら 3 化合物は 1mM でも PKA を阻害しないこと (表 2) を確認し、これら 3 化合物がβARK1 を選択的に阻害するという新規の知見を得ている。

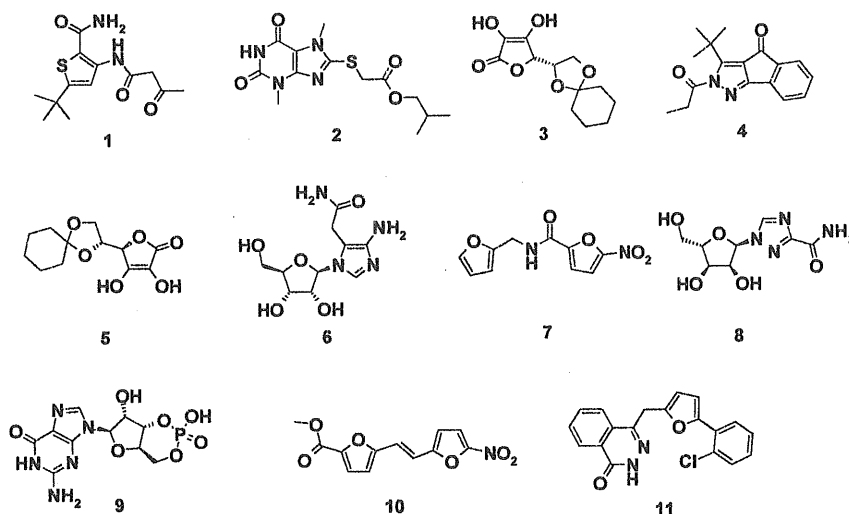


図 3 データベース検索により選出されたβARK1 阻害候補 11 化合物

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 ^a (% of control value)	IC ₅₀ (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	

^a 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] ^a	IC ₅₀ = 0.003 μM

^a 陽性対照

研究を総括すると、第一に、βARK1 立体構造モデル構造および変異株の活性測定を通じ基質認識における Asp278 の重要性を指摘している。第二に、水素結合部位および芳香環結合部位を同時に検索できるバーチャルスクリーニングソフトウェア ARCHER を作製しその妥当性を既知の系で確認している。第三に、ARCHER を用いて市販化合物からβARK1 阻害剤を検索し、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 化合物を見出している。

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ており、慢性心不全の新規治療法を検証する有用な研究ツールを提供するものといえる。加えて、本研究で考案・実証しているリン酸化酵素の選択的阻害化合物獲得法は、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広く応用できるものと期待される。

以上、飯野 稔の研究成果は医薬化学、構造生物学に資するところ大であり、博士 (薬学) の学位を授与するに十分なものと認めた。