

論文の内容の要旨

論文題目 酵素の三次元構造に基づく阻害剤の相互作用解析と設計に関する研究

氏名 岩田依子

1. アルドース還元酵素阻害剤の設計

アルドース還元酵素 (AR) はグルコースをソルビトールに変換する酵素であり、糖尿病での高血糖状態では AR で生成されるソルビトール量が増え、細胞外に出にくいことなどから細胞内に蓄積され、細胞障害を誘起し、糖尿病合併症が発症すると考えられている。このことから、AR 阻害剤が糖尿病合併症治療薬として開発されてきている。そこで新しい阻害剤を見つけるべく、AR の X 線結晶構造を基にした阻害剤の設計と合成を行った。

1-1. 蛋白質三次元構造における、His、Asn、Gln 側鎖の flip の有無と His 側鎖の水素付加型の評価

AR の X 線結晶構造を利用するにあたり、His、Asn、Gln 側鎖の flip の有無と His 側鎖の水素付加型の評価を行った。その理由としては AR の X 線結晶構造において、リガンド結合部位に位置する His の 1 つが flip している可能性が考えられたからである。そこでこれらの推定を行うために、簡便で効果的な方法を開発した。本法を trypsin などに適用した結果、従来法と同等以上の結果を与えることがわかった。

1-2. 三次元データベース検索と複合体モデリングによる阻害剤設計

上述のように構造確認を行った AR の X 線結晶構造のリガンド結合部位を基に、試薬 (ACD) の三次元データベース検索を Itai 等による ADAM&EVE プログラムにより実施した。検索ならびに構造の絞込みにより 36 種の化合物を購入して生物活性を調べた。その結果、10 種の化合物に 15 $\mu\text{g/ml}$ で 40%以上の AR 阻害活性が確認された。阻害活性の最も強かった化合物 1 (インドメタシン) をリードとして最適化を行った。化合物の設計にあたり Trp20 の側鎖との水素結合および Lys21、Pro23 などとの疎水性相互作用を考慮した。その結果 IC_{50} が 0.21 μM という最も強力な化合物 2 が得られた (図 1)。それは親化合物である化合物 1 と比較して約 20 倍の活性増強であった。本結果は、三次元データベース検索とそれに続く設計と合成による新規な AR 阻害剤の発見の最初の例であると思われる。

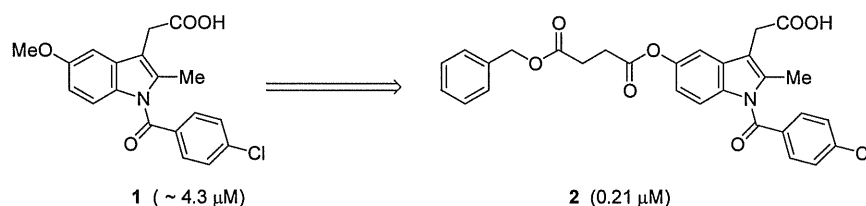


図 1. 化合物 1 からの構造変換 (阻害活性値)

1-3. de novo design の手法による阻害剤設計とその合成

リガンド結合部位にフィットすると考えられる構造を自動構築する LEGEND プログラムが Itai 等により開発されており、それをを用いて AR の X 線結晶構造のリガンド結合部位にフィットする 200 個の化学構造を構築した。それらを類似構造に分類するとともに、コンピュータグラフィクスを用いた検討から代表化合物を選択した。合成の容易さも考慮してその中の 2 つの設計化合物 3, 4 と、設計構造 5 に非常に近い 2 つのアナログ 6, 7 を合成した (図 2)。その結果、それら化合物は IC_{50} が 17~91 μM という活性を示すことがわかった。このように少数の化合物を合成し、合成化合物すべてに AR 阻害活性がみられたことは、効率的に阻害剤合成が行えたことを端的に示すものである。また、本研究は標的構造

に基づいた de novo design により、薬物開発のリードと成りうる非ペプチド性の新規阻害剤が得られた初めての成功例と考えられる。

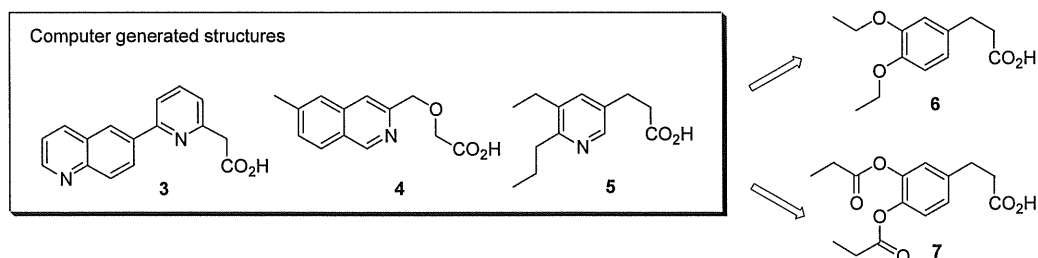


図 2. LEGEND による設計化合物ならびに合成化合物

2. MAP kinase p38 とピリジルピロール系化合物の複合体モデリング

MAP kinase は細胞内シグナル伝達経路において重要な分子であり、MAP kinase p38 阻害剤は IL-1 β 、TNF- α の炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られている。一連のピリジルピロール化合物の MAP kinase p38 阻害活性は、中心骨格がイミダゾール環と異なるものの類似の全体構造を有する既知化合物 **8** (SB203580) よりも IC₅₀ = 0.007~0.054 μ M とかなり強力であった (図 3)。そこでピリジルピロール化合物と SB203580 の kinase との相互作用に関して知見を得るために複合体モデリングを実施した。イミダゾール環とピロール環の骨格による結合様式に違いはみられず、それら環上の芳香族置換基の特徴的な相互作用は共通であった。一方、スルホキシ基のアルキル側鎖部分については、それらと相互作用する kinase のアミノ酸残基を特定した。ピリジルピロール化合物の 1 つであるアジド化合物 **9** の置換基-SOR の O 原子は Arg173、Lys152 と水素結合し、アジド基は Asp150、Ser154 と静電的相互作用をしていた。これらの相互作用を考慮に入れることは、今後の阻害剤の構造修飾につながるものである。

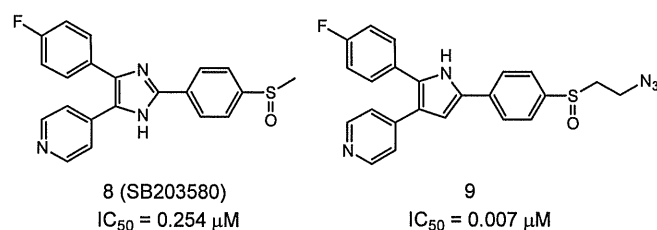


図 3. 阻害剤の構造と活性 (IC₅₀)

3. ゼラチナーゼ活性ドメインのホモロジーモデリングと阻害剤との複合体モデリング

ゼラチナーゼは血管の基底膜を破壊して癌転移を引き起こすことが知られ、その阻害剤は癌転移阻害剤になり得ると考えられている。ゼラチナーゼはX線結晶構造解析されていなかったが、その活性ドメインと～56%のホモロジーがあるコラーゲナーゼは解析されていた。しかし当初コラーゲナーゼのX線結晶構造座標は公開されていなかった。そこで C_{α} トレースのステレオ図から C_{α} の三次元座標を計算するプログラムを開発した。本法により構築したコラーゲナーゼの構造からホモロジーモデリングによりゼラチナーゼ A モデルを、後に公開されたコラーゲナーゼのX線結晶構造からゼラチナーゼ B モデルを構築した。そのモデルを基に阻害剤とのドッキングスタディを実施し、相互作用様式を考察した(図4)。アミド型阻害剤 10 のゼラチナーゼ A とのドッキングでは、コラーゲナーゼ複合体結晶構造中の他のアミド型阻害剤と同様の結合様式が得られた。ヘキサヒドロピリダジン型阻害剤 11 はゼラチナーゼ B の Gly179、Leu181 などとの主要な水素結合および疎水性相互作用はアミド型と同様になることがわかった。また S1'サブサイトが細長く疎水性であることは、P1'のアルキル鎖が長くなるにつれ、阻害活性が上昇することと一致するものであった。スルホンアミド型阻害剤 12 は、アミド型阻害剤などと若干異なるものの、最近報告された他のスルホンアミド型阻害剤の複合体モデルにおける結合様式と基本的に一致していた。

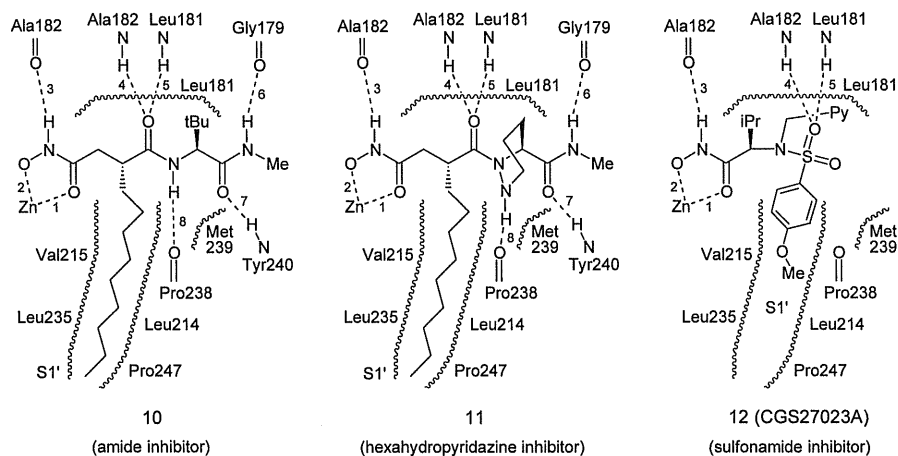


図4. ゼラチナーゼ B モデルと各阻害剤の相互作用の模式図

疎水性相互作用は波線で表示した。極性相互作用は点線で表示し、原子間距離も示した。