

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 黒野 益夫

アルドース還元酵素(AR)はグルコース代謝の副経路であるポリオール経路の律速酵素で、NADPH を補酵素としてグルコースをソルビトールに還元する。近年、高血糖下でのポリオール経路の亢進が糖尿病合併症の成因の一つとして注目されており、この経路の律速酵素である AR の活性を制御することが新たな治療薬に繋がると期待され AR 阻害剤(ARI)の開発研究が行われてきた。本学位論文は、新規 ARI の創製過程で見いだされたスピロスクシンイミド構造を有する化合物が生体内で関与する (1)種々の pH の水溶液、(2)血漿タンパク、および (3)標的酵素 AR との分子間相互作用に関する研究結果をまとめたものである。当該スピロスクシンイミド型化合物は不斉炭素を有し光学異性体(*R*体および*S*体)が存在する。構造類似のスピロスクシンイミド型 ARI に関しては、光学異性体が相互変換するためラセミ体として開発された場合があり、当該スピロスクシンイミド型 ARI でも、*R*体と*S*体間の相互変換や加水分解による薬効低下の懸念が持たれた。そこで、上記の分子間相互作用を構造化学的な視点から明らかにする目的で、速度論、分光学的手法および分子モデリングなどを相補的に活用して分子レベルまでの解明を進めている。

本論文は5章からなり、第1章では当該新規スピロスクシンイミド型ARIの生体内での相互作用相手分子である水分子、血漿タンパク質、そして標的酵素について概観し、研究の背景と意義について述べている。第2章から第4章はそれぞれの分子間相互作用についての検討結果と考察を、最後に第5章では、本研究の総括的なまとめと考察を行っている。

第2章では、薬物の生体内での安定性に影響を与える種々の pH およびイオン強度の水溶液中における当該化合物の安定性と加水分解の速度論的解析を行っている。当該化合物は擬一次反応に従って加水分解され、その擬一次反応速度定数(k_{obs})は pH 増加に伴い増大したが、消化管内 pH 相当領域では、経口剤として開発可能な安定性を有することを明らかにした。一方、pH-log k_{obs} プロファイルから得られた pK 値 3.7 は親化合物の pK 値 5.7 より 2pH unit 低く、酸性官能基を有する中間体の存在を示唆した。さらに加水分解過程のキラル HPLC 分析より、*R*体と*S*体間の相互変換は起こらないこと、およびスクシンイミド環が開環したラセミ体分解物(Compound

1)の構造解析から加水分解機構を推定し、R体とS体間の相互変換が起こらない理由を考察した。また、標的酵素AR存在下での加水分解安定性解析を行うことで、ARと化合物間の相互作用とARI候補化合物としての可能性についても考察を加えている。

第3章では、当該ARIとヒト血漿タンパクの主成分であるヒト血清アルブミン(HSA)との相互作用を検討している。R体およびS体はいずれも、HSA上の主要な薬物結合部位であるサイトIとサイトIIの両方に結合したが、R体の方がHSAとの親和性が約5倍高く、HSA結合により遊離時の約40倍、結合時のS体に比べても約2倍安定化された。このことより、血中でのHSAとの結合が、当該ARIの安定化に寄与すると推察され、特にR体の場合で安定性と薬理効果の持続性がより向上すると考えられた。

一方、サイトIIへの結合性を低下させる遊離脂肪酸の増加や糖化により、R体とS体間の立体特異性が5倍から1.7倍へと1/3に減少した。そこで、スクシンイミド環の5位カルボニル炭素を¹³C標識してHSA結合時の¹³C NMRシグナルを観測したところ、スクシンイミド環は通常脱プロトン化に近い状態で結合することが示されたが、サイトIIに結合したR体のみ一部プロトン化した状態で結合していたことから、サイトIIにおけるR体とS体の結合様式の違いが立体特異性の一因であることを明らかにした。さらに当該ARIがHSA上の複数部位に結合できることにより、結合率は高血糖時の遊離脂肪酸や糖化率の増加の影響を受けにくいこと、また併用他剤との間でHSA結合に起因する薬物-薬物相互作用が生ずる可能性は小さいことなど臨床的意義を考察している。

第4章では、標的酵素ARとR体およびS体との相互作用について広範な比較研究を行っている。これまでは、カルボン酸型ARIを除いてはARIとARとの相互作用解析例はあまりなく、特にARの立体特異性や阻害選択性についての分子レベルまでの考察はほとんどなかった。まず、ARの正反応方向および逆反応方向における詳細な酵素反応解析より、R体およびS体とARとの結合はいずれも可逆的であり、反応サイクル中ではAR-NADP⁺複合体に作用するが、R体はその阻害剤定数が $3\sim 4 \times 10^{-10}$ MとS体より約2000倍強い阻害剤であることを明らかにした。次いで、R体とS体のAR結合が、NBSを用いた化学修飾によるARの活性低下に対して活性保護効果を示したことや、阻害剤定数のpH依存性においてAR活性残基のpK値を反映したことから、R体とS体はいずれも活性(基質結合)部位に結合することを示した。

そして、これらの実験結果および、ベンジル基2位フッ素原子の¹⁹F-NMR挙動の差異をも反映した精度の高いAR-当該ARI複合体の分子モデリングを構築し、R体のスクシンイミド環がAR側活

性残基と水素結合ネットワークを形成可能であることを示し、当該スピロスクシンイミド型ARIの立体特異性について分子レベルで明らかにしている。さらにR体の2位フッ素原子がARに特異的に保存されているLeu300の主鎖NHと水素結合可能であることに注目し、実際にARと近縁酵素であるアルデヒド還元酵素(ALR)間の阻害選択性を検討した。その結果、ARのLeu300と相互作用しないS体では阻害選択性はなかったが、R体では約800倍のAR選択性を確認しており、AR阻害選択性向上の一つの指針を示した点で評価できる。

以上、本研究は新規スピロスクシンイミド型化合物の水溶液中での物理化学的安定性を明らかにし、標的酵素ARおよび血漿タンパクHSAとの相互作用を解析したものであり、経口剤としての特性および作用機序面での基盤情報を提供するものである。中でも、当該化合物のAR結合における立体特異性と阻害選択性を構造化学的に提示できたことは、ARによる分子認識の理解促進および有用なARI設計に大きく貢献するものである。加えて、本研究で用いた手法およびその組合せは、他の標的タンパク-候補化合物間の相互作用研究に広く適用できるものと期待される。これらの成果は博士(薬学)の学位に相応しいものと判断した。