

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 岡本 雅子

岡本雅子は「新規 DAPK 阻害剤 –インシリコ技術を用いた活性化合物の探索と構造活性相関–」と題し、以下の研究を行った。

DAPK (Death-Associated Protein Kinase) は、細胞死・ガン抑制に関連するプロテインキナーゼとして知られ、様々な細胞死刺激により活性化され細胞死を導くことが報告されており、DAPK 阻害剤は、細胞死を阻止する作用により、脳梗塞を初めとする各種の神経細胞死を伴う疾患の進行の阻止又は遅延を可能とすることが期待される。しかし DAPK 阻害剤の報告数・構造的多様性は非常に少ない状況であった。

一方、代表的な活性化合物探索手法としては HTS があるが、実施にコストが嵩むことなどが問題となってきた。そこで、それを補う方法として 1990 年代後半より *in silico* スクリーニング手法が開発されてきた。しかし現時点では、コンピュータ計算に頼るバーチャルスクリーニングは、網羅的に膨大な化合物群に対するドッキング計算をただ実施するにとどまり、必ずしも効率的とはいえない。

以上の背景から第一に、新規 DAPK 阻害剤開発のための有用な化合物スキファールドを得ること、ならびにその技術を確立すること、を目的に設定した。さらに、新規スキファールドが得られた際には、その構造展開において構造活性相関情報の取得が必須となる。そこで、第二に、本研究で提案する新規 DAPK 阻害剤スキファールドに関する構造活性相関情報を獲得することを目的とした。

1. Structure-Based Virtual Screening (SBVS) による新規 DAPK 阻害剤の探索

新規 DAPK 阻害剤探索のために、これまで膨大な化合物群に対するドッキング計算をただ実施し必ずしも効率的とはいえなかったバーチャルスクリーニングの課題を解決するため、約 500 万化合物の市販化合物データベースに対し、重複化合物の除去は当然行うとともに、さらに構造式の特徴が類似するものの中から代表的なものを選抜するため、化合物の特性を表すフィンガープリントを各化合物に対して計算した上でクラスタリングを行い、VS 用データベースを作成した。

また、創薬標的タンパク質に結合しうる化合物として多様なスキファールドを有する新規阻害剤候補化合物を得るため、一つの X 線複合体結晶構造のタンパク構造に対し、4 つのリガンドを同時に結合させた状態で、分子動力学計算を実施することにより複合体モデルを構築した (Fig.1)。

構築したタンパク質–リガンド複合体モデルの三次元構造を使用し、VS 用データベース (約 40 万化合物) を対象として、CONSENSUS-DOCK によるドッキング計算を実施した。計算終了後、ドッキングスコアおよびファ

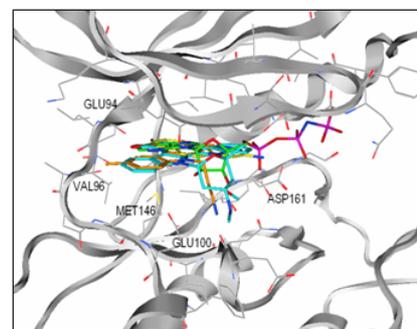


Figure 1

一マコフオアにより絞り込んだ化合物群に対し、コンピュータ画面を用いた目視を行い、阻害剤候補化合物リストを作成した。

阻害剤候補 100 化合物について DAPK 阻害活性試験を実施した結果、化合物濃度が $10 \mu\text{M}$ で DAPK 阻害活性が 50%以上であったヒット化合物が 4 つ見出され、いずれも DAPK 阻害剤としては新規なスキファールドを有するものであった。中でも comp3 (Fig.2) は、化合物濃度 $1 \mu\text{M}$ でも 71%の阻害活性を示し、分子量は 250.3 と今後の化合物展開が十分可能な化合物であった。これにより、上述のバーチャルスクリーニング技術を用いることにより、構造既知・活性未知の化合物群から効率的に目的の活性を有する化合物をピックアップすることに成功した。

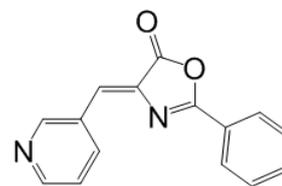


Figure 2

2. ヒット化合物を基礎とした活性向上のための構造展開

次に後の構造展開作業に指針を与えるべく、得られた新規スキファールドに関する構造活性相関情報を取得する研究を展開した。そのためにまず、1st スクリーニングで最も DAPK 阻害活性の強かった comp 3 について、ドッキング計算の出力結果から ATP 結合領域での結合様式を解析した。その結果、comp 3 ピリジニル基窒素原子とヒンジ領域の主鎖の水素結合、及び周辺アミノ酸側鎖との疎水性相互作用により、安定な結合様式をとるため高阻害活性を示すと予想した。

本予想結合様式を実際に化合物間の活性比較により確認し、更に活性発現に必須の構造を決定することを目的として、comp 3 をクエリとした類縁化合物検索を実施した。Comp 3 との類似度が高いものから、特にピリジニル基・オキサゾロン環・フェニル基の各部分構造の活性発現への重要性の理解に寄与しうる化合物を目視により選択した。

選択した化合物の DAPK 阻害活性から、予想結合様式でヒンジ領域との水素結合点を提供すると予想されるピリジニル基、そしてオキサゾロン環は活性発現に必須の部分構造であり、comp 3 のフェニル基部分は、置換基を有するフェニル基が特に有望であると考えた。

フェニル基に置換基を有する高活性化合物中、Comp 14 は $\text{IC}_{50} = 148 \text{ nM}$ であり、現在知られている DAPK 阻害剤の中で最も強い活性を有する化合物であることがわかった (Fig.3)。

また、本研究で見出した新規 DAPK 阻害剤に対し、キナーゼ選択性試験を行った。その結果、試験を行った 5 化合物全てに DAPK に対する高い選択性があることが明らかとな

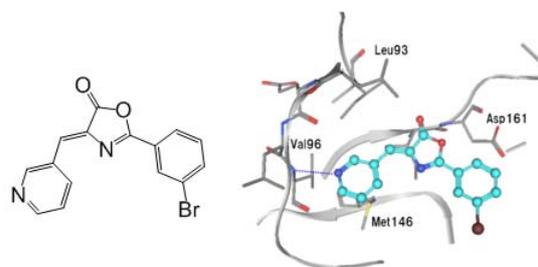


Figure 3

った。したがって、本研究で見出した新規 DAPK 阻害剤は、現在報告されている中でも高活性かつ高選択性を有するものであり、脳梗塞を初めとする各種の神経細胞死を伴う疾患の治療薬開発の一助となると考えられる。

以上の業績は、薬学分野における医薬品化学の進歩に貢献するものと考えられ、博士 (薬学) の授与に値するものと考えられる。