

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	創薬標的タンパク質に作用する化合物の同定と作用機構に関する結晶学的研究
Title(English)	
著者(和文)	天野靖士
Author(English)	Yasushi Amano
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第4126号, 授与年月日:2016年3月31日, 学位の種類:論文博士, 審査員:中村 聡,小林 雄一,丹治 保典,和地 正明,福居 俊昭,村上 聡,八波 利恵
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第4126号, Conferred date:2016/3/31, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

創薬標的タンパク質に作用する化合物の同定と  
作用機構に関する結晶学的研究

天野 靖士

## 略号一覧

17 $\beta$ -HSD5	17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrognase type 5 5 型 17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素
4MCHA	trans-4-methylcyclohexylamine トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン
9,10-PQ	9,10-phenanthrenequinone 9,10-フェナントレンキノン
ACU	<i>N</i> -adamantyl- <i>N'</i> -dicyclohexylurea <i>N</i> -アダマンチル- <i>N'</i> -シクロヘキシル尿素
AdoDATO	<i>S</i> -adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane <i>S</i> -アデノシル-1,8-ジアミノ-3-チオオクタン
ARB	angiotensin II receptor blocker アンジオテンシン II 受容体拮抗薬
BIPA	5-(1 <i>H</i> - benzimidazol-(2-yl)pentan-1-amine 5-(1 <i>H</i> -ベンズイミダゾール-2-イル)ペンタン-1-アミン
CRPC	castration resistant prostate cancer 去勢抵抗性前立腺がん
dcSAM	decarboxylated <i>S</i> -adenosylmethionine 脱炭酸 <i>S</i> -アデノシルメチオニン
DCU	<i>N,N'</i> -dicyclohexylurea <i>N,N'</i> -ジシクロヘキシル尿素
DHET	dihydroxyeicosatrienoic acid ジヒドロキシエイコサトリエン酸
DHT	dihydrotestosterone ジヒドロテストステロン
EET	epoxyeicosatrienoic acid エポキシエイコサトリエン酸
FBDD	fragment-based drug discovery フラグメント化合物を利用した創薬研究

GPCR	G protein-coupled receptor G タンパク質共役型受容体ファミリー
HsSpdSyn	<i>Homo sapiens</i> spermidine synthase ヒト由来スペルミジン合成酵素
HTS	high-throughput screening ハイスループットスクリーニング
LBD	ligand binding domain リガンド結合ドメイン
LE	ligand efficiency リガンド効率
NMR	nuclear magnetic resonance 核磁気共鳴
PDB	Protein Data Bank タンパク質構造データベース
PfSpdSyn	<i>Plasmodium falciparum</i> spermidine synthase <i>Plasmodium falciparum</i> 由来スペルミジン合成酵素
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$
SBDD	structure-based drug design タンパク質の立体構造に基づく薬剤設計
sEH	soluble epoxide hydrolase 可溶性エポキシド加水分解酵素
SpdSyn	spermidine synthase スペルミジン合成酵素
SPR	surface plasmon resonance 表面プラズモン共鳴
SRC1	steroid receptor coactivator 1 1型ステロイド受容体活性化補助因子
<i>t</i> -AUCB	<i>trans</i> -4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoic acid トランス-4-[4-(3-アダマンタン-1-イル-ウレイド)-シクロヘキシルオキ

	シ]-安息香酸
TcSpdSyn	<i>Trypanosoma cruzi</i> spermidine synthase <i>Trypanosom cruzi</i> 由来スペルミジン合成酵素
TSA	thermal shift assay 熱シフトアッセイ
WHO	World Health Organization 世界保健機構

# 目次

## 第1章 序論

1-1	創薬研究の流れ .....	9
1-2	創薬研究におけるタンパク質結晶構造解析.....	11
1-3	フラグメント化合物を利用した創薬研究.....	12
1-4	ハイスループットスクリーニングに由来する低分子化合物の構造解析.....	14
1-5	結晶構造解析による医薬品の作用機構解明.....	15
1-6	本研究の目的と意義 .....	16
1-7	引用文献 .....	17

## 第2章 可溶性エポキシド加水分解酵素阻害剤の同定と相互作用解析

2-1	緒言 .....	21
2-2	材料と方法 .....	23
2-2-1	発現と精製.....	23
2-2-2	結晶構造解析.....	24
2-2-3	フラグメント化合物のスクリーニング.....	29
2-2-4	阻害活性評価.....	29
2-3	結果と考察 .....	31
2-3-1	阻害活性評価によるフラグメント化合物のスクリーニング.....	31
2-3-2	阻害活性スクリーニングに由来するフラグメント化合物の結合様式.....	34
2-3-3	結晶構造解析によるフラグメント化合物のスクリーニング.....	43
2-3-4	結晶構造解析スクリーニングに由来するフラグメント化合物の結合様式.....	44
2-3-5	結晶構造に基づいた阻害剤探索.....	50
2-4	結論 .....	52
2-5	引用文献 .....	53

### 第3章 *Trypanosoma cruzi* 由来スペルミジン合成酵素の非競合阻害機構

3-1	緒言 .....	58
3-2	材料と方法 .....	60
3-2-1	発現と精製.....	60
3-2-2	結合活性評価.....	60
3-2-3	阻害活性評価.....	61
3-2-4	結晶構造解析.....	62
3-3	結果と考察 .....	65
3-3-1	ヒト由来スペルミジン合成酵素との比較.....	65
3-3-2	基質結合部位に結合するフラグメント化合物.....	70
3-3-3	二量体界面に結合するフラグメント化合物.....	73
3-3-4	非競合阻害機構.....	75
3-4	結論 .....	79
3-5	引用文献 .....	80

### 第4章 5型17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素における誘導適合機構

4-1	緒言 .....	83
4-2	材料と方法 .....	88
4-2-1	発現と精製.....	88
4-2-2	結晶構造解析.....	89
4-2-3	阻害活性評価.....	89
4-3	結果と考察 .....	91
4-3-1	化合物の結合様式.....	91
4-3-2	新規結晶系.....	101
4-3-3	タンパク質構造変化による誘導適合.....	103
4-4	結論 .....	106
4-5	引用文献 .....	107

## 第5章 ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ に対するテルミサルタンの活性化機構

5-1	緒言 .....	110
5-2	材料と方法 .....	111
5-2-1	結晶構造解析.....	111
5-3	結果と考察 .....	113
5-3-1	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ とテルミサルタンの複合体構造	113
5-3-2	テルミサルタンの結合様式.....	113
5-3-3	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ 部分的活性化機構の分子基盤 ....	117
5-3-4	アンジオテンシンII受容体拮抗薬とペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ の相互作用に関する構造学的洞察.....	119
5-4	結論 .....	121
5-5	引用文献 .....	122

## 第6章 総括

6-1	要約 .....	126
6-2	今後の展望 .....	128

## 謝辞

## 第1章

### 序論

## 1-1 創薬研究の流れ

医薬品の研究開発には、基礎研究の開始から最終的に新薬として承認されるまで、10年以上の期間を要するといわれている。この期間をできる限り短縮し、より早く患者に新薬を届けることが求められている。医薬品の研究開発は大きく2つの段階に分けることができる。前半は、創薬標的の探索や薬剤候補物質の同定、最適化、さらには動物を用いた安全性試験といった、いわゆる創薬研究と呼ばれる段階である。後半は、ヒトへの投与を行い、安全性、薬効、既存薬剤との比較などを行う、いわゆる臨床開発と呼ばれる段階である。臨床開発は、健常人へ投与し安全性を確認するフェーズ1、少数の患者へ投与し有効性、安全性、薬物動態などを検討するフェーズ2、多数の患者に投与し有効性の証明などを行うフェーズ3に分かれる。創薬研究と臨床開発は、それぞれ5年以上の期間を要するといわれている。また、基礎研究も含め、研究開発が中止される確率がもっとも高いのは臨床開発のフェーズ2であり、期待するような薬効が確認できなかったり、毒性との十分な乖離がみられなかったりするようなケースが多くを占める。基礎研究の段階においても、動物モデルで薬効がみられなかったり、毒性や吸収性に問題があったりなど様々な理由により研究開発が中止されることがある。ある創薬標的に基づいて開始された研究から新薬の上市へつながる確率は約0.4%とする試算もされている [1]。

研究開発の効率を高め、より早く確実に新薬を患者に届けるため、様々な努力がなされている。その例としては、基礎研究において臨床予測性の高い動物モデルを採用する、低分子医薬品よりも標的を強く抑えることができる抗体医薬品の開発に取り組むなどといった、臨床試験で高い薬効が期待できるような薬剤の開発があげられる。また、研究開発の期間を短縮することによってコストを下げ効率を上げるような取り組みも行われている。例えば、ハイスループットスクリーニング (HTS) は、数十万種類から百万種類の化合物を含む大規模な化合物ライブラリーを、ロボットや自動分注装置を組み合わせ高速に評価することによって短期間で有望な薬剤候補物質を同定する技術である。新しい生命科学技術を取り入れることにも積極的であり、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を分化させて様々な細胞を作製し、再生医療や薬剤の評価に用いる試みも始まっている [2, 3]。創薬研究におけるタンパク質結晶構造解析の活用も、生命科学技術の進歩を取り入れた1つの例といえる。タンパク質結晶構造解析

は、SPring-8 [4]、European Synchrotron Radiation Facility [5]、Advanced Photon Source [6] といった大型放射光施設の建設のみならず、X線集光技術の向上、検出器の感度向上といった放射光ビームラインの高度化により大きな発展をとげている。その成果の最たるものが、近年数多く報告されているGタンパク質共役型受容体ファミリー（GPCR）の結晶構造である[7-13]。GPCRは有望な創薬標的でもあり、実際にGPCRの立体構造情報を利用して薬剤候補化合物の創製に成功した事例も報告されつつある [14, 15]。また、放射光ビームラインにおいて、サンプル交換ロボットの開発、自動測定システムの開発などが進み、ハイスループット構造解析が実現した [16-23]。それによって、後に述べるフラグメント化合物を利用した手法やHTSで見出された多数の化合物と標的タンパク質の複合体構造解析などが現実的なものとなり、創薬研究の中で実践されている。

## 1-2 創薬研究におけるタンパク質結晶構造解析

タンパク質の立体構造に基づく薬剤設計 (SBDD) は、タンパク質結晶構造解析を創薬研究に応用する効果的な手法の 1 つであり [24]、20 年以上にわたって発展してきた [25, 26]。SBDD では、まず標的タンパク質の立体構造および薬剤候補化合物との複合体構造を解析し、立体構造に基づいた化合物の設計、設計された化合物の合成、標的タンパク質との複合体構造解析のサイクルを繰り返すことによって、薬剤候補化合物を創製する。構造解析には、結晶構造解析以外にも、核磁気共鳴 (NMR) [27] といった実験的手法や計算機を使ったシミュレーション [28] が利用される。結晶構造解析は、試料を結晶化しなければならないという制約があるが、原子レベルの分解能で信頼性の高い構造を決定できる、適用可能なタンパク質の分子量範囲が広いといった点でもっとも強力な手法といえる。近年では、創薬研究の早期の段階において標的タンパク質に作用する低分子化合物の同定や選別にもタンパク質結晶構造解析が活用されている [29]。一方、創薬研究の終盤あるいは臨床開発の段階において、薬効を有することがわかっているが、その作用機構が明確でない薬剤について、結晶構造解析により作用機構を明らかにすることもできる [30]。さらには、低分子医薬品だけでなく抗体医薬品をはじめとしたバイオ医薬品の開発研究においても結晶構造解析が利用されつつある [31]。

### 1-3 フラグメント化合物を利用した創薬研究

この 10 年以上にわたって、フラグメント化合物を利用した創薬研究 (FBDD) が新規薬剤候補化合物を創製する効果的な手法として発展してきた [32, 33]。FBDD の概念図を Figure 1-1 に示す。FBDD は創薬研究の初期段階、すなわち標的タンパク質に作用する低分子化合物の同定から薬剤候補化合物へ最適化する最終段階に至るまで、立体構造情報を最大限に活用する手法である。FBDD の第 1 段階では、フラグメント化合物と呼ばれる低分子量 (概ね 300 以下) のリガンドを同定する。フラグメント化合物と標的タンパク質との親和性は低く、その作用も弱いため、標的タンパク質に作用するフラグメント化合物を探索する際には、生化学的な手法よりもむしろ物理化学的な手法が主に用いられる。物理化学的な手法としては、表面プラズモン共鳴 (SPR) [34]、NMR [35]、熱シフトアッセイ (TSA) [36]、さらに結晶構造解析 [29] が用いられる。NMR や結晶構造解析は、標的タンパク質への作用を直接観測することができ、またフラグメント化合物の結合様式を解明できる、という点で FBDD には欠かすことのできない手法である。FBDD の第 2 段階では、標的タンパク質により強く結合するようにフラグメント化合物に比較的大きな置換基を導入するなど、立体構造情報に基づいた設計がなされる。設計に基づいて実際に合成された化合物では標的タンパク質への作用が強まっていることが期待される。実在の化合物だけでなく、仮想分子も含んだ空間を指すケミカルスペースという概念がある [37]。ケミカルスペースには 10 億以上の化合物が含まれているといわれているが、FBDD はこのケミカルスペースを効率よく探索できる最も効果的な手法の 1 つである。すなわち、第 1 段階においてフラグメント化合物の分布する狭いケミカルスペースを探索し、第 2 段階においてフラグメント化合物の立体構造情報に基づいて広大なケミカルスペースの中から目的の化合物を絞り込むことができる [38]。近年、FBDD により多数の薬剤候補化合物が創製されており、現在臨床研究が進められている [32]。

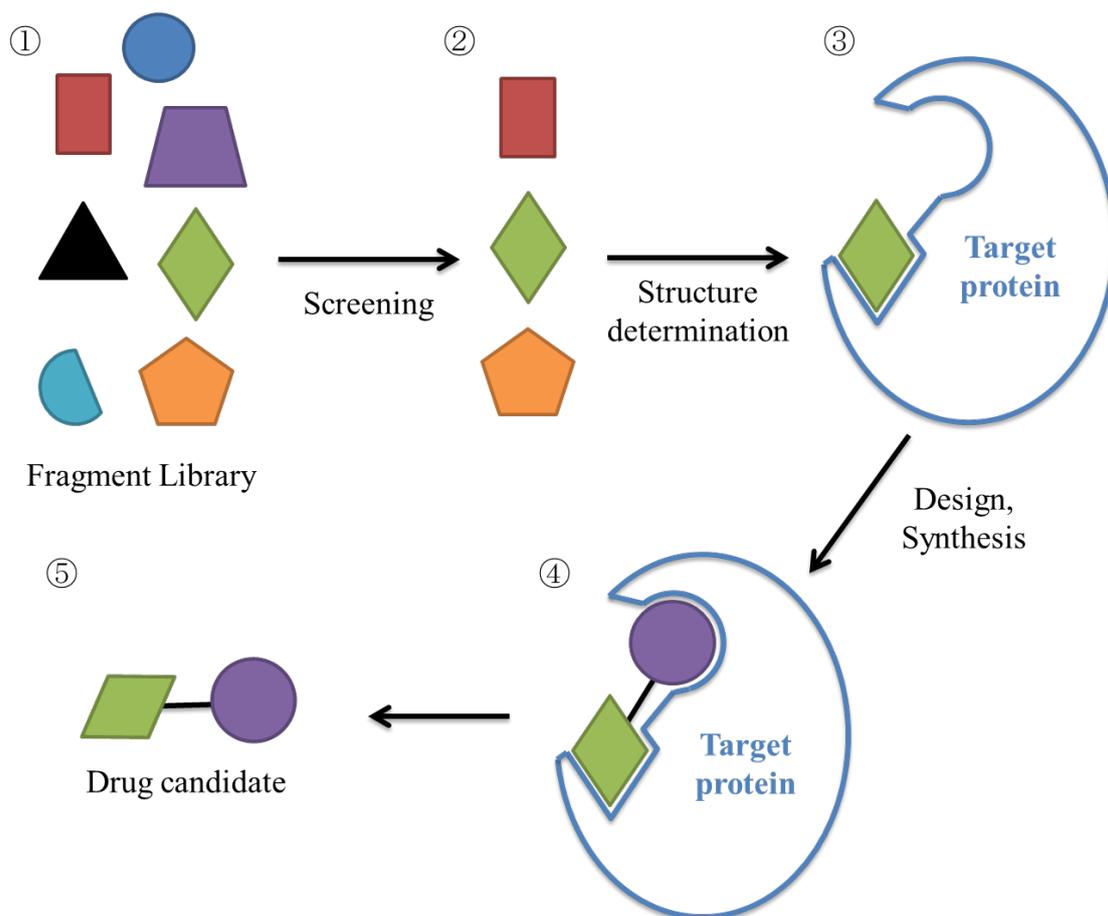


Figure 1-1 FBDD の概念図

まず、低分子量の化合物ライブラリー（フラグメントライブラリー、①）をスクリーニングして標的タンパク質に作用する化合物を同定する（②）。次に結晶構造解析、NMR などにより化合物と標的タンパク質の複合体構造を決定する（③）。さらに複合体構造に基づいた化合物の設計、合成によって、標的タンパク質に対して高い親和性をもつ化合物をつくる（④）。得られた化合物は強い作用をもつことが期待され、薬剤候補物質としてさらに研究が進められる（⑤）。

#### 1-4 ハイスクリーンングに由来する低分子化合物の構造解析

前述のとおり、HTS は有望な薬剤候補化合物を効率的に同定できる手法の 1 つであるが、多様性の高い化合物ライブラリーを評価するが故に、同定される化合物群もまた様々な分子量、化学構造をもっていることが一般的である。HTS により同定される化合物の数は、化合物ライブラリーの規模や標的タンパク質の特性、評価方法などに依存するが、一般的には数百から数千となる。当然ながら、すべての化合物に対して最適化研究を行うことは不可能であるから、異なる評価系、例えば細胞内での作用を評価する系や類縁タンパク質との選択性を評価する系を組み合わせることによって、数種類の有望な化合物群に絞り込んだ後に最適化研究が進められる。この段階において標的タンパク質と化合物の複合体構造を決定することにより SBDD を活用することが可能となる [39-41]。しかしながら、初期に同定され多様な化学構造が含まれる数百から数千の化合物群に対して結晶構造解析を行うことによっても、有用な立体構造情報を取得できる可能性がある。例えば、標的タンパク質の活性中心アミノ酸残基に結合する新規の化学構造や予想されていなかった化合物の結合部位などである。従来、数百から数千の化合物群について結晶構造解析を行うことは容易ではなかったが、高輝度の放射光ビームラインとサンプル交換ロボットの組み合わせにより自動かつ高速に測定することが可能となり、現実的な手法となってきた [16-18, 23]。

## 1-5 結晶構造解析による医薬品の作用機構解明

臨床試験で薬効が確認され販売が承認された医薬品の中には、その作用機構が明確でないものも存在する。例えば、表現型スクリーニング、すなわち病態を模した細胞や生物の反応を直接観察する手法で薬効を評価し、薬剤候補物質の同定や最適化研究を進めた場合、薬剤候補物質が直接作用する標的タンパク質を特定せずに臨床開発へと進められる場合がある [42]。また、研究開発の過程あるいは上市後の研究により、本来の標的タンパク質だけではなく、他のタンパク質への作用を併せもつ、いわゆるオフターゲット作用をもっていることが明らかになる場合もある。これらの医薬品あるいは薬剤候補物質の作用機構を解明することは、薬効や安全性を改善した次世代の医薬品開発や適応症拡大のための臨床研究などを進めるために大変重要である [43, 44]。結晶構造解析により標的タンパク質と医薬品の相互作用を原子レベルで解析することは、生化学実験やその他の物理化学実験とともに、作用機構の解明に大きく寄与することができる。

## 1-6 本研究の目的と意義

タンパク質結晶構造解析は、従来の SBDD にとどまらず、創薬研究の初期段階において新規候補化合物の同定や標的タンパク質に関する立体構造情報の取得に威力を発揮する。本研究では、既知の薬剤候補化合物の情報が乏しい、あるいは既知化合物の構造多様性が低い、3つの疾患関連タンパク質を標的として、結晶構造解析を活用した低分子化合物の探索を行った。1つ目は可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) であり、高血圧や炎症との関連が示唆されている。2つ目はシャーガス病の原因となる寄生原虫、*Trypanosoma cruzi* に由来するスペルミジン合成酵素 (TcSpdSyn) である。以上の2つの標的タンパク質については、FBDDによる新規阻害剤の創製を目的とし、フラグメント化合物の探索およびその相互作用の解析を行った。3つ目は5型17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (17 $\beta$ -HSD5) であり、前立腺がんへの関与が示唆されている。17 $\beta$ -HSD5については、HTSで同定された多種多様な化合物との複合体構造解析により、新たな立体構造情報を得ることを目的とした。いずれの標的タンパク質についても既知の候補化合物の情報が乏しく、本研究により創薬研究が発展することが期待される。

加えて、アンジオテンシンII受容体拮抗型の降圧剤であるテルミサルタンがペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )を部分的に活性化する機構を明らかにすることを目的として、複合体構造解析を行った。テルミサルタンのPPAR $\gamma$ 活性化作用に着目した研究は世界中で行われており、本研究によりさらなる進展が期待される。

本論文の構成は以下の通りである。

第2章では、sEHに作用するフラグメント化合物の探索およびsEHと各種フラグメント化合物との複合体構造解析結果について述べる。

第3章では、TcSpdSynに作用するフラグメント化合物の探索およびTcSpdSynと各種フラグメント化合物との複合体構造解析結果について述べる。

第4章では、17 $\beta$ -HSD5を標的とするHTSにおいて同定された低分子化合物と17 $\beta$ -HSD5との複合体構造解析結果について述べる。

第5章では、テルミサルタンとPPAR $\gamma$ との複合体構造解析結果について述べる。

第6章では、本研究を総括し、今後の展望について述べる。

1-7 引用文献

- [1] Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R. & Schacht, A. L. (2010). *Nat Rev Drug Discov* **9**, 203-214.
- [2] Mochiduki, Y. & Okita, K. (2012). *Biotechnol J* **7**, 789-797.
- [3] Singh, V. K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A. & Chandra, R. (2015). *Front Cell Dev Biol* **3**, 2.
- [4] Ueki, T. & Yamamoto, M. (1999). *Structure* **7**, R183-187.
- [5] Lindley, P. F. (1999). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 1654-1662.
- [6] Argonne National Laboratory *Advanced Photon Source*, <https://www1.aps.anl.gov/>.
- [7] Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. & Stevens, R. C. (2007). *Science* **318**, 1258-1265.
- [8] Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G. & Schertler, G. F. (2008). *Nature* **454**, 486-491.
- [9] Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P. & Stevens, R. C. (2008). *Science* **322**, 1211-1217.
- [10] Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S. M., Schuerer, S. C., Sanna, M. G., Han, G. W., Kuhn, P., Rosen, H. & Stevens, R. C. (2012). *Science* **335**, 851-855.
- [11] Chien, E. Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G. W., Hanson, M. A., Shi, L., Newman, A. H., Javitch, J. A., Cherezov, V. & Stevens, R. C. (2010). *Science* **330**, 1091-1095.
- [12] Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F. C., Hamel, D. J., Kuhn, P., Handel, T. M., Cherezov, V. & Stevens, R. C. (2010). *Science* **330**, 1066-1071.
- [13] Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G. W., Kobayashi, T., Stevens, R. C. & Iwata, S. (2011). *Nature* **475**, 65-70.

- [14] Andrews, S. P., Brown, G. A. & Christopher, J. A. (2014). *ChemMedChem* **9**, 256-275.
- [15] Cooke, R. M., Brown, A. J., Marshall, F. H. & Mason, J. S. (2015). *Drug Discov Today*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.08.003>.
- [16] Hiraki, M., Watanabe, S., Phonda, N., Yamada, Y., Matsugaki, N., Igarashi, N., Gaponov, Y. & Wakatsuki, S. (2008). *J Synchrotron Radiat* **15**, 300-303.
- [17] Hiraki, M., Yamada, Y., Chavas, L. M., Wakatsuki, S. & Matsugaki, N. (2013). *J Synchrotron Radiat* **20**, 890-893.
- [18] Yamada, Y., Phonda, N., Matsugaki, N., Igarashi, N., Hiraki, M. & Wakatsuki, S. (2008). *J Synchrotron Radiat* **15**, 296-299.
- [19] Wasserman, S. R., Koss, J. W., Sojitra, S. T., Morisco, L. L. & Burley, S. K. (2012). *Trends Pharmacol Sci* **33**, 261-267.
- [20] Cohen, A. E., Ellis, P. J., Miller, M. D., Deacon, A. M. & Phizackerley, R. P. (2002). *J Appl Crystallogr* **35**, 720-726.
- [21] Karain, W. I., Bourenkov, G. P., Blume, H. & Bartunik, H. D. (2002). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1519-1522.
- [22] Jacquamet, L., Joly, J., Bertoni, A., Charrault, P., Pirocchi, M., Vernede, X., Bouis, F., Borel, F., Perin, J. P., Denis, T., Rechatin, J. L. & Ferrer, J. L. (2009). *J Synchrotron Radiat* **16**, 14-21.
- [23] Chavas, L. M., Matsugaki, N., Yamada, Y., Hiraki, M., Igarashi, N., Suzuki, M. & Wakatsuki, S. (2012). *J Synchrotron Radiat* **19**, 450-454.
- [24] Blundell, T. L., Jhoti, H. & Abell, C. (2002). *Nat Rev Drug Discov* **1**, 45-54.
- [25] Klebe, G. (2000). *J Mol Med (Berl)* **78**, 269-281.
- [26] Gane, P. J. & Dean, P. M. (2000). *Curr Opin Struct Biol* **10**, 401-404.
- [27] Roberts, G. C. (1999). *Curr Opin Biotechnol* **10**, 42-47.
- [28] Joseph-McCarthy, D. (1999). *Pharmacol Ther* **84**, 179-191.
- [29] Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Cleasby, A., Frederickson, M., Tickle, I. J. & Jhoti, H. (2005). *J Med Chem* **48**, 403-413.
- [30] Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W. & et al. (1995). *Nature* **378**, 641-644.

- [31] Gilliland, G. L., Luo, J., Vafa, O. & Almagro, J. C. (2012). *Methods Mol Biol* **841**, 321-349.
- [32] Baker, M. (2013). *Nat Rev Drug Discov* **12**, 5-7.
- [33] Hubbard, R. E. & Murray, J. B. (2011). *Methods Enzymol* **493**, 509-531.
- [34] Shepherd, C. A., Hopkins, A. L. & Navratilova, I. (2014). *Prog Biophys Mol Biol* **116**, 113-123.
- [35] Jhoti, H., Cleasby, A., Verdonk, M. & Williams, G. (2007). *Curr Opin Chem Biol* **11**, 485-493.
- [36] Lo, M. C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M. & Ellestad, G. (2004). *Anal Biochem* **332**, 153-159.
- [37] Bohacek, R. S., McMartin, C. & Guida, W. C. (1996). *Med Res Rev* **16**, 3-50.
- [38] Hall, R. J., Mortenson, P. N. & Murray, C. W. (2014). *Prog Biophys Mol Biol* **116**, 82-91.
- [39] Gradler, U., Czodrowski, P., Tsaklakidis, C., Klein, M., Werkmann, D., Lindemann, S., Maskos, K. & Leuthner, B. (2014). *Bioorg Med Chem Lett* **24**, 4141-4150.
- [40] Wang, Y., Connors, R., Fan, P., Wang, X., Wang, Z., Liu, J., Kayser, F., Medina, J. C., Johnstone, S., Xu, H., Thibault, S., Walker, N., Conn, M., Zhang, Y., Liu, Q., Grillo, M. P., Motani, A. & Coward, P. (2014). *Bioorg Med Chem Lett* **24**, 2885-2891.
- [41] Leahy, J. W., Buhr, C. A., Johnson, H. W., Kim, B. G., Baik, T., Cannoy, J., Forsyth, T. P., Jeong, J. W., Lee, M. S., Ma, S., Noson, K., Wang, L., Williams, M., Nuss, J. M., Brooks, E., Foster, P., Goon, L., Heald, N., Holst, C., Jaeger, C., Lam, S., Loughheed, J., Nguyen, L., Plonowski, A., Song, J., Stout, T., Wu, X., Yakes, M. F., Yu, P., Zhang, W., Lamb, P. & Raeber, O. (2012). *J Med Chem* **55**, 5467-5482.
- [42] Lee, J. A. & Berg, E. L. (2013). *J Biomol Screen* **18**, 1143-1155.
- [43] Lee, J. & Bogyo, M. (2013). *Curr Opin Chem Biol* **17**, 118-126.
- [44] Bantscheff, M. & Drewes, G. (2012). *Bioorg Med Chem* **20**, 1973-1978.

## 第2章

### 可溶性エポキシド加水分解酵素阻害剤の同定と 相互作用解析

## 2-1 緒言

可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) は、エポキシエイコサトリエン酸 (EET) から相当するジヒドロキシエイコサトリエン酸 (DHET) への加水分解を触媒する酵素である。EET はシトクロム P450 によってアラキドン酸から生成され、抗炎症作用をもつことや血管、腎臓および心臓の血圧制御に関わっていることが知られている [1]。EET のもつこれらの特徴から、sEH を阻害し EET 量を増やすことは、高血圧や炎症の治療に有効であることが示唆されている [1]。

sEH によるエポキシドの開環反応機構は、分光学的手法および結晶学的手法により明らかにされていて、活性部位に存在する 2 つのチロシン残基、Tyr383 と Tyr466 が Asp335 によるエポキシド環の加水分解を活性化している [2, 3]。すなわち、これらの 3 つのアミノ酸残基により触媒 3 残基 (catalytic triad) が形成されている。N,N'-ジシクロヘキシル尿素 (DCU)、N-アダマンチル-N'-シクロヘキシル尿素 (ACU) といった尿素誘導体が強い sEH 阻害活性を有することが知られている (Figure 2-1) [4]。尿素誘導体と sEH との複合体結晶構造解析により、尿素部分のカルボニル酸素が、触媒 3 残基中の 2 つのチロシン残基に対して水素結合受容体として働き、一方、窒素が Asp335 に対して水素結合供与体としては働くことが明らかとなっている。このような触媒 3 残基との相互作用に関する立体構造情報に基づき、尿素あるいはアミド誘導体が、強い sEH 阻害剤として開発されている [5-7]。sEH の触媒 3 残基と水素結合を形成する化学基は他にも報告されていて、ベンズオキサゾール、アミノピリミジン、スルホキシド、アミノチアゾールが知られている [8-14]。

結晶構造解析により、sEH は L 字型の基質結合ポケットを有することが明らかとなっている [15]。分岐した 2 つの枝の長さはそれぞれ 10 Å と 15 Å であり、便宜上、ショートブランチおよびロングブランチと呼ぶ。ショートブランチ、ロングブランチいずれも多様な官能基を許容するが、基本的には疎水性であり、アダマンチル基、ビフェニル基、ハロゲン類といった脂溶性官能基の導入により、尿素誘導体の阻害活性が強まることがわかっている [4, 16]。しかしながら、これらの官能基の水溶性は低いため、医薬品としては不適である。この問題を解決するため、カルボン酸、スルホン、アルコールといった極性官能基を尿素誘導体の末端に導入する試みがなされている。いくつかの極性官能基は阻害活性を減弱することなく、水溶性を向上させることに成功している [17]。

結晶構造あるいはシミュレーション結果から、これらの官能基は溶媒側を向いていることが予想されている [5, 17]。

本研究では、sEH に作用するフラグメント化合物を探索し新規の sEH 阻害剤を同定するとともに、結晶構造解析によりその相互作用を解析することで sEH の基質結合ポケット内の構造的特徴を明らかにすることを試みた。フラグメント化合物の探索においては、阻害活性評価によるスクリーニングと結晶学的スクリーニングの 2 通りの手法を適用し、より多くの化合物の同定および立体構造情報の取得を試みた。

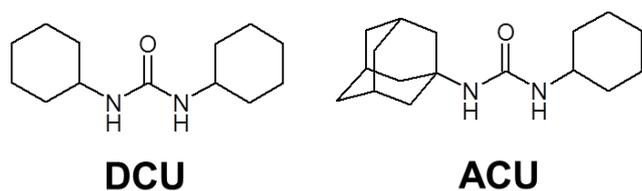


Figure 2-1 既知 sEH 阻害剤の代表例

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 発現と精製

ヒト由来 sEH の全長 cDNA を pET-30b ベクター (Merck Millipore) に組み込み、C 末端に 6×ヒスチジンタグが融合したタンパク質として、*Escherichia coli* BL21(DE3)株で発現した。菌体は TB 培地 (20 g/L 酵母エキス、10 g/L ポリペプトン、4.33 g/L リン酸水素二ナトリウム、2.65 g/L リン酸二水素カリウム、4 ml/L グリセロール) を用いて、OD<sub>600</sub> の値が 3 ないし 4 に達するまで 37°C で培養した。温度を 15°C まで低下させた後、イソプロピル-β-D-チオガラクトシドを終濃度 1 mM となるように添加し、菌体をさらに 44 時間培養した。菌体は遠心により回収し -80°C に保存した。凍結した菌体ペレットを溶解バッファー (500 mM リン酸カリウム、pH 7.4、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、0.1% (v/v) β-メルカプトエタノール、0.2 mg/ml リゾチーム) に懸濁した。超音波破碎後、遠心により残渣を取り除いた。ポリエチレンジオキシエタレンを終濃度 0.05% (v/v) となるように添加し遠心した。遠心後の上清に 60% 飽和濃度となるように硫酸アンモニウムを加え遠心した。沈殿物をバッファー A (10 mM リン酸カリウム、pH 7.4、250 mM 塩化ナトリウム、10% グリセロール、20 mM イミダゾール) に懸濁し、バッファー A で平衡化した Ni-NTA Superflow カラム (Qiagen) に添加した。カラムをバッファー A で洗浄した後、イミダゾール濃度を 250 mM に上げて吸着物を溶出した。限外ろ過を繰り返し、溶出液から塩化ナトリウムおよびイミダゾールを除去した後、Q-Sepharose Fast Flow イオン交換カラム (GE Healthcare) を用いて精製した。塩化ナトリウムの段階的濃度勾配により溶出させ、sEH を含む分画を収集して、HiLoad 16/60 Superdex 200 ゲルろ過カラム (GE Healthcare) によりさらに精製した。ゲルろ過カラムによる精製の際はバッファー B (100 mM リン酸化カリウム、pH 7.4、300 mM 塩化ナトリウム、2 mM ジチオスレイトール) を用いた。結晶化のため、バッファー C (100 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4、3 mM ジチオスレイトール) に対して透析した後に、限外ろ過により 15 から 20 mg/ml に濃縮し、-80°C で保存した。

## 2-2-2 結晶構造解析

シッティングドロップ蒸気拡散法により室温にて結晶化を行った。既報の方法 [15] に基づき sEH の結晶化を試みたところ、ヘキサゴナル型でシリンダー様の結晶が得られ、3.0 Å分解能までの回折が認められた。続いて、結晶化条件の最適化およびマイクロシーディング法の適用により、ロッド様の結晶が得られ、2.0 Å分解能までの回折が認められた。リザーバー溶液の組成は、0.1 M リン酸化カリウム、pH 7.5、0.2 M リン酸二水素アンモニウム、22%(w/v) ポリエチレングリコール 3350 であった。フラグメント化合物あるいは阻害剤との共結晶化は、タンパク質溶液にフラグメント化合物を終濃度 5 mM となるように添加し、氷上で 1 時間静置した後に結晶化することにより行った。フラグメント化合物あるいは阻害剤のソーキングは、sEH の結晶を、終濃度 5 mM のフラグメント化合物を含む母液に移し、室温で 4 時間静置することにより行った。

X 線回折データの収集は、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設（茨城県つくば市）の BL5A、AR-NW12A、AR-NE3A ビームラインおよび R-AXIS VII X 線検出器（リガク）を搭載した FR-E+ Superbright X 線発生装置（リガク）のいずれかにおいて実施した。BL5A、AR-NW12A、AR-NE3A ビームラインで収集した X 線回折データの処理は *HKL2000* [18] を用いて、FR-E+ Superbright で収集した X 線回折データの処理は *CrystalClear*（リガク）を用いて行った。sEH の結晶構造は、タンパク質構造データバンク (PDB) に登録されている既報の sEH 結晶構造 (PDB ID: 1S8O) を鋳型とし *AMoRe* [19] を用いた分子置換法により決定した。*REFMAC* [20] による構造精密化を実施した後、*AFITT* (OpenEye Scientific) を用いて *Fo-Fc* 電子密度マップに化合物分子を当てはめた。*Coot* [21] を用いた水分子のピックアップと手動での構造修正、および *REFMAC* による構造精密化を繰り返し、最終的な結晶構造を決定した。最終構造は PDB に登録した。データ収集および構造精密化における統計値を Table 2-1 に示す。

Table 2-1 データ収集および構造精密化における統計値（次頁以降へつづく）  
最外殻の値は括弧内に示す。

Compound	1	2	3	4	5
PDB ID	3WK4	3WK5	3WK6	3WK7	3WK8
Space group	<i>P</i> 6 <sub>5</sub> 22				
<i>a</i> = <i>b</i> (Å)	93.1	93.0	91.9	92.7	92.5
<i>c</i> (Å)	244.3	243.8	243.8	244.5	243.9
$\alpha$ = $\beta$ (°)	90	90	90	90	90
$\gamma$ (°)	120	120	120	120	120
Wavelength (Å)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Resolution (Å)	31.10-2.11 (2.17-2.11)	46.48-2.10 (2.16-2.10)	30.84-2.77 (2.85-2.77)	30.11-2.20 (2.26-2.20)	43.23-2.20 (2.26-2.20)
$R_{\text{merge}}^a$	6.4 (37.3)	6.5 (30.7)	9.8 (40.2)	9.3 (37.2)	16.8 (43.5)
No. of reflections	34933	35442	15390	30088	30641
Completeness (%)	99.4 (100.0)	100.0 (99.9)	99.6 (99.6)	97.6 (99.2)	99.9 (99.3)
No. of atoms in refinement	4437	4499	4353	4414	4464
$R_{\text{work}}^b$	21.1	19.6	18.1	20.4	19.9
$R_{\text{free}}$	25.7	25.0	25.3	25.9	25.4
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	37.9	28.2	41.6	36.7	25.7
RMSD bond length (Å)	0.019	0.020	0.012	0.017	0.018
RMSD bond angle (°)	2.139	2.199	1.743	2.019	2.141
Ramachandran plot (%)					
Preferred	96.0	96.9	96.0	96.0	96.5
Allowed	2.2	2.4	3.1	2.9	2.6
Outliers	1.8	0.7	0.9	1.1	0.9

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i - I|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i}$ , where  $I_i$  is the intensity of an individual reflection and  $I$  is the mean intensity obtained from multiple observations of symmetry related reflections.

<sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ ; 5% randomly omitted reflections were used for  $R_{\text{free}}$ .

Table 2-1 (前頁からのつづき)

Compound	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
PDB ID	3WK9	3WKA	3WKB	3WKC	3WKD
Space group	<i>P</i> 6 <sub>5</sub> 22				
<i>a</i> = <i>b</i> (Å)	92.5	92.3	92.5	92.5	92.8
<i>c</i> (Å)	245.2	242.9	245.0	243.4	245.3
$\alpha$ = $\beta$ (°)	90	90	90	90	90
$\gamma$ (°)	120	120	120	120	120
Wavelength (Å)	1.000	1.5418	1.000	1.000	1.000
Resolution (Å)	30.05-2.20 (2.26-2.20)	19.99-2.01 (2.06-2.01)	28.59-2.20 (2.26-2.20)	46.26-2.20 (2.26-2.20)	31.08-2.48 (2.54-2.48)
$R_{\text{merge}}$ <sup>a</sup>	9.5 (36.7)	10.1 (28.3)	8.5 (38.6)	9.5 (47.6)	8.2 (35.0)
No. of reflections	30670	39143	30018	30416	19515
Completeness (%)	99.6 (99.9)	98.8 (97.6)	97.7 (98.3)	99.4 (96.4)	89.3 (93.0)
No. of atoms in refinement	4408	4420	4417	4448	4360
$R_{\text{work}}$ <sup>b</sup>	20.3	22.6	20.4	19.7	20.8
$R_{\text{free}}$	25.2	27.5	27.1	24.8	26.9
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	39.6	25.9	42.0	33.6	39.9
RMSD bond length (Å)	0.018	0.017	0.017	0.018	0.014
RMSD bond angle (°)	2.138	2.067	2.105	2.093	1.948
Ramachandran plot (%)					
Preferred	96.5	95.8	96.1	97.2	96.1
Allowed	2.8	3.5	2.9	1.7	3.1
Outliers	0.7	0.7	0.9	1.1	0.7

Table 2-1 (前頁からのつづき)

Compound	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
PDB ID	4Y2J	4Y2P	4Y2Q	4Y2R	4Y2S
Space group	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>
<i>a</i> = <i>b</i> (Å)	92.8	93.1	92.5	92.3	92.7
<i>c</i> (Å)	244.0	244.7	243.6	244.1	244.2
$\alpha = \beta$ (°)	90	90	90	90	90
$\gamma$ (°)	120	120	120	120	120
Wavelength (Å)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Resolution (Å)	80.33-2.15 (2.21-2.15)	80.59-2.05 (2.10-2.05)	76.13-2.40 (2.46-2.40)	75.96-2.45 (2.51-2.45)	76.29-2.30 (2.36-2.30)
$R_{\text{merge}}^a$	6.1 (37.2)	6.0 (42.6)	7.9 (42.2)	8.5 (43.9)	9.3 (37.2)
No. of reflections	32758	37865	23708	22315	26936
Completeness (%)	99.3 (100.0)	99.0 (98.9)	99.8 (97.7)	99.9 (99.0)	99.5 (98.9)
No. of atoms in refinement	4449	4463	4389	4384	4416
$R_{\text{work}}^b$	19.3	19.2	19.6	19.3	19.5
$R_{\text{free}}$	24.8	22.6	25.7	25.0	23.3
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	27.7	30.9	33.4	30.2	29.2
RMSD bond length (Å)	0.018	0.020	0.014	0.015	0.017
RMSD bond angle (°)	2.074	2.199	1.849	1.934	2.001
Ramachandran plot (%)					
Preferred	96.1	97.2	96.5	96.0	96.3
Allowed	3.1	2.0	2.6	3.5	2.9
Outliers	0.7	0.7	0.9	0.6	0.7

Table 2-1 (前頁からのつづき)

Compound	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
PDB ID	4Y2T	4Y2U	4Y2V	4Y2X	4Y2Y
Space group	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>	<i>P6<sub>5</sub>22</i>
<i>a</i> = <i>b</i> (Å)	92.4	92.3	92.2	92.7	92.7
<i>c</i> (Å)	244.2	243.4	244.3	243.3	243.8
$\alpha = \beta$ (°)	90	90	90	90	90
$\gamma$ (°)	120	120	120	120	120
Wavelength (Å)	1.000	1.000	1.000	1.5418	1.5418
Resolution (Å)	76.02-2.40 (2.46-2.40)	79.95-2.75 (2.82-2.75)	79.85-2.40 (2.46-2.40)	80.31-2.50 (2.57-2.50)	80.26-2.30 (2.36-2.30)
$R_{\text{merge}}$ <sup>a</sup>	7.9 (41.1)	10.0 (42.4)	11.7 (44.2)	24.0 (46.2)	15.2 (49.4)
No. of reflections	23556	15017	23411	20770	25975
Completeness (%)	99.0 (96.5)	94.4 (96.3)	99.1 (98.5)	98.2 (99.9)	96.2 (95.6)
No. of atoms in refinement	4394	4354	4390	4357	4384
$R_{\text{work}}$ <sup>b</sup>	19.4	18.0	20.0	22.0	20.3
$R_{\text{free}}$	26.0	25.3	26.2	27.8	26.5
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	31.5	33.7	29.1	35.9	34.8
RMSD bond length (Å)	0.015	0.012	0.014	0.012	0.014
RMSD bond angle (°)	1.902	1.768	1.838	1.707	1.881
Ramachandran plot (%)					
Preferred	96.0	95.2	96.1	95.8	96.0
Allowed	3.5	3.9	3.1	3.3	3.7
Outliers	0.6	0.9	0.7	0.9	0.4

### 2-2-3 フラグメント化合物のスクリーニング

フラグメント化合物のスクリーニングは、次項で述べる sEH 阻害活性評価によるスクリーニングと、結晶構造解析によるスクリーニングの 2 通りの方法で行った。

阻害活性評価によるスクリーニングは、4200 化合物を対象として実施した。2 mM の濃度で阻害が認められ、かつ濃度依存的な阻害が認められた化合物については、IC<sub>50</sub> 値を算出した。

結晶構造解析によるスクリーニングは、800 化合物を対象として実施した。まず、800 化合物をそれぞれ終濃度が 100 mM となるようにジメチルスルホキシドに溶解した。次に、10 種類の化合物溶液を混合し、80 種類の化合物混合溶液 (各化合物を終濃度 10 mM として含む) を調製した。化合物混合溶液 1  $\mu$ l と 9  $\mu$ l の母液 (0.1 M リン酸化カリウム、pH 7.5、0.2 M リン酸二水素アンモニウム、25%[w/v] ポリエチレングリコール 3350) を混合した溶液に sEH の結晶を移し、室温で 4 時間静置することによりソーキングを実施した。これを 80 種類の化合物混合溶液各々について実施した。sEH の結晶は前項で述べた方法により調製した。結晶構造解析は前項で述べた方法により実施し、化合物に由来する電子密度が観測されるか否かを判断した。電子密度が観測された場合は、その由来と推測される化合物単独でのソーキングを実施し、結晶構造解析を行って結晶構造を決定した。

### 2-2-4 阻害活性評価

基質として使用した PHOME は Cayman Chemical Company より購入した。反応バッファーの組成は、25mM bis-Tris HCl、pH 7.0、0.02%(v/v) Triton X-100 であった。反応を開始する前に、sEH と化合物を混合し、室温で 15 分静置した。反応は、PHOME を終濃度 50  $\mu$ M となるように添加して開始した。室温で 50 分静置した後、ARVO マイクロプレートリーダー (PerkinElmer) により蛍光を測定した。用量応答曲線を作成し、IC<sub>50</sub> 値を算出した。本法により、DCU の IC<sub>50</sub> 値は 25.3 nM と算出され、既報の値と同等であった。低分子化合物が標的タンパク質に効率的に結合しているかどうかを示す指標である LE (ligand efficiency) 値は、次に示す数式により算出した [22, 23]。

$$LE = \frac{\Delta G}{HAC} \approx \frac{-RT\ln(IC_{50})}{HAC}$$

※HAC: 非水素原子数

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 阻害活性評価によるフラグメント化合物のスクリーニング

4200 化合物について sEH 阻害活性を評価した結果、307 化合物で IC<sub>50</sub> 値の算出に至った。IC<sub>50</sub> 値の範囲は、0.7 μM から 1.7 mM であった。続いて、阻害機構を解明するため、これらのフラグメント化合物と sEH の複合体結晶構造解析を試みた。共結晶化の結果、307 化合物のうち約半数で良質な結晶が得られた。その他のフラグメント化合物は結晶成長を抑制する可能性が示唆された。共結晶化で結晶が得られなかったフラグメント化合物については、sEH 結晶にソーキングすることにより結晶を調製した。X 線回折データの測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設の BL5A、AR-NW12A または AR-NE3A ビームラインを利用して行った。これらのビームラインにはサンプル交換ロボットが設置されており、自動かつ連続で最大 288 種類の結晶からの X 線回折データを測定することが可能である [24, 25]。回折データの測定と並行して、処理が行われた [26]。処理されたデータは、CCP4 [27]および AFITT (OpenEye Scientific) を用いて解析した。

最終的に、126 種類のフラグメント化合物と sEH の複合体結晶構造を決定した。これは、結晶構造解析を試みたフラグメント化合物 307 種類のうち 41%に相当する。次に、結合部位に基づきフラグメント化合物を分類した。83 種類のフラグメント化合物は触媒 3 残基に結合し、3 残基のうち少なくとも 1 残基と水素結合を形成していた。29 種類のフラグメント化合物がショートブランチに、9 種類のフラグメント化合物はロングブランチに結合し、触媒 3 残基とは相互作用をしていなかった。また、5 種類の複合体構造中では、2 つの同じ化合物分子が 1 つの sEH に結合していた。Figure 2-2 にそれぞれの結合部位に結合した代表的なフラグメント化合物の重ね合わせを示す。フラグメント化合物は L 字型ポケットの概ね全領域を覆っていることから、各フラグメント化合物の結合様式を精査することにより、sEH と低分子化合物の相互作用機構について理解することが可能と考えられた。次項で、126 種類のフラグメント化合物複合体構造のうち、Table 2-2 に示す 10 種類の化合物の結合様式について述べる。

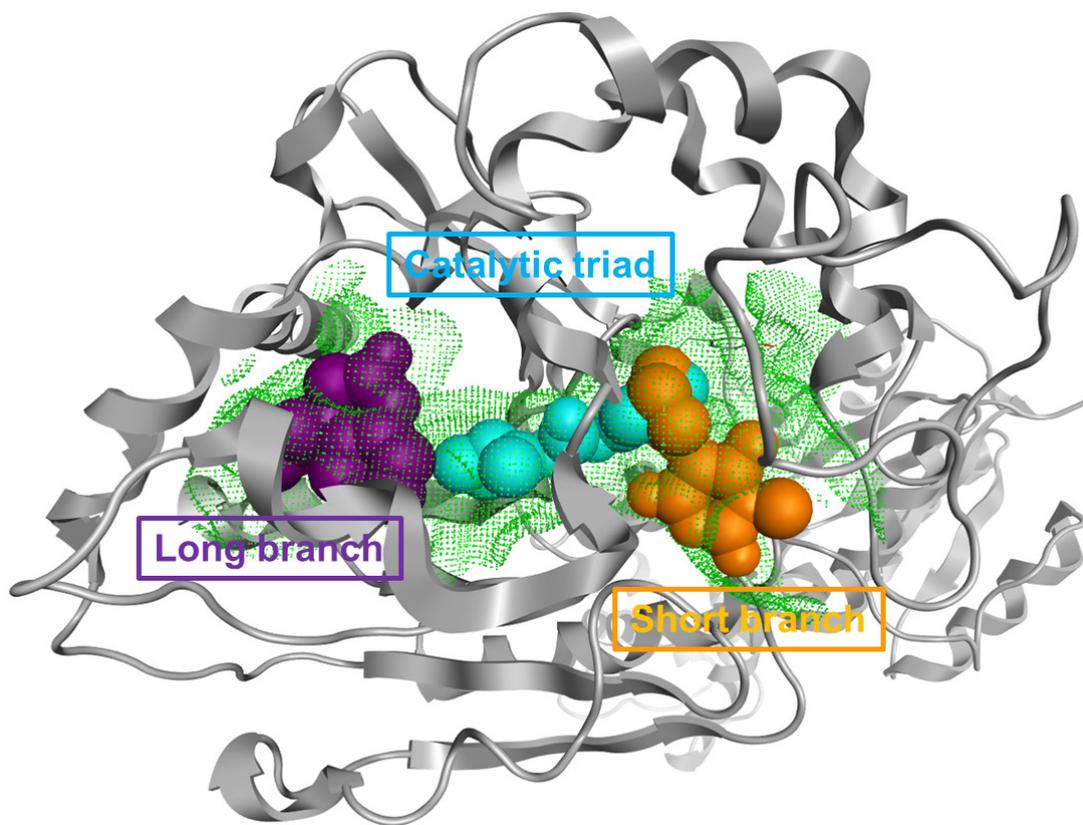
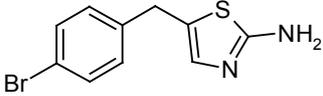
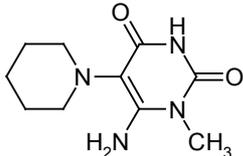
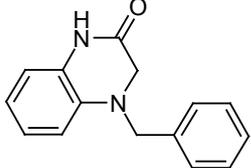
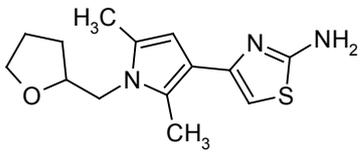
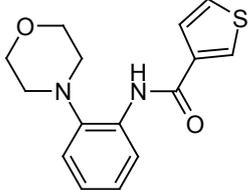


Figure 2-2 触媒ポケットの全体図

それぞれの部位に結合したフラグメント化合物の代表例を空間充填モデルで示す。(触媒3残基: シアン; ショートブランチ: 橙; ロングブランチ: 紫)

Table 2-2 フラグメント化合物の構造式、sEH 阻害活性、LE 値および結合部位

Compound	Structure	sEH IC50 ( $\mu\text{M}$ )	LE	Binding site
6		70	0.41	Short branch
7		29	0.39	Short branch
8		61	0.32	Long branch
9		195	0.27	Long branch
10		171	0.26	Long branch

## 2-3-2 阻害活性スクリーニングに由来するフラグメント化合物の結合様式

はじめに、阻害活性評価によるスクリーニングに由来するフラグメント化合物の結合様式について考察する。複合体結晶構造の決定に至った 126 化合物のうち、特徴的な結合様式を示した 10 化合物について詳細に解析した。

化合物 **1**、**2**、**3**、**4** は、触媒 3 残基に結合していた。**1** および **2** は、それぞれ尿素部分、アミド部分を有し、本研究で同定されたフラグメント化合物の LE 値としては最も高い値 (0.47) を示した。**1** は、既知の尿素誘導体と同様な様式により触媒 3 残基に結合していた [5]。また、**1** は、Trp336 および Phe267 と疎水性相互作用を形成していた (Figure 2-3A)。また、**2** も、既知のアミド誘導体と同様な様式により触媒 3 残基と結合していた (Figure 2-3B)。非尿素かつ非アミド構造のフラグメント化合物でも、触媒 3 残基への結合がみられた。**3** では、ジヒドロチアゾール環とアミノ基が触媒 3 残基に結合していた (Figure 2-3C)。すなわち、ジヒドロチアゾール環の窒素原子が Tyr383 および Tyr466 と、アミノ基が Asp335 と水素結合を形成していた。また、ジヒドロチアゾール環の硫黄原子は Asp335 と S-O 相互作用を形成していた。ジヒドロチアゾール環上に置換されたメチル基は Trp336 と CH- $\pi$  相互作用を形成し、フェニル環は Phe267、Phe387、Leu408、Met419 と疎水性相互作用を形成していた。興味深いことに、**3** は、触媒 3 残基に効率よく結合していると考えられる **1**、**2** と同等の LE 値 (0.47) を示した。**1**、**2**、**3** の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 7.4、15、6.3  $\mu$ M であった。**4** も触媒 3 残基に結合し、その IC<sub>50</sub> 値および LE 値はそれぞれ 127  $\mu$ M および 0.35 であった (Figure 2-3D)。これらの値から **4** の結合は強くはないことが示唆されるが、興味深い結合様式がみられた。すなわち、ベンズイミダゾール環が触媒 3 残基に囲まれた狭い領域に入り込み、Asp335 および Tyr383 と水素結合を形成していた。Tyr466 のヒドロキシル基とベンズイミダゾール環の窒素原子との距離は 3.15 Å であり、弱い水素結合を形成していることが示唆される。ベンズイミダゾール誘導体は、sEH 阻害剤として報告されており、その結合様式がシミュレーションにより提案されている。シミュレーションの結果では、ベンズイミダゾール環中のベンゼン環と Trp336 との  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用が提唱されているが [28, 29]、今回の結晶構造においては、ベンゼン環は触媒 3 残基をはさんで反対側に結合しており、Phe267 と疎水性相互作用を形成していた。

2-3-1 項で述べたように、L 字型ポケットのショートブランチには、29 種類のフラグ

メント化合物が結合していた。うち 20 種類が、ショートブランチを形成するアミノ酸残基の側鎖または主鎖と水素結合を形成していた。これら 20 種類は互いに異なる構造をもつ化合物群である。フラグメント化合物と直接（水分子が仲介することなく）水素結合を形成していたアミノ酸残基は 5 種類存在し、うち Phe497 が最も高い頻度で水素結合を形成していた (Figure 2-4)。次に頻度が高かったのは Asp496 であった。ショートブランチに結合していたフラグメント化合物の中で、LE 値が 0.4 を超えたのは化合物 5、6 のみであった。5 の IC<sub>50</sub> 値および LE 値は、それぞれ 49 μM および 0.42 であった。アミノチアゾール部分が Asp496 と水素結合を形成し、Phe497 とは保存された水分子を介して水素結合を形成していた (Figure 2-5A)。チアゾール環は、His524 のイミダゾール環と π-π 相互作用を形成しているが、2 つの環の重なりは良くないため、強い相互作用ではないと考えられる。トリフルオロメチル基は Phe267、Phe387、Leu408 および Leu428 と疎水性相互作用を形成していた。6 (IC<sub>50</sub> = 70 μM、LE = 0.41) も 5 と同様に Asp496 および水分子と水素結合を形成していた (Figure 2-5B)。5、6 とともにアミノチアゾール部分を有するが、両者の間でアミノチアゾールは反転していた。この反転により、6 のチアゾール環と His524 のイミダゾール環の重なりが良くなり、強い π-π 相互作用を獲得していた。ブロモフェニル基は、Phe267、Phe387、Leu397、Leu408 および Leu428 によって形成された疎水性ポケットに深く結合していた。化合物 7 (IC<sub>50</sub> = 29 μM、LE = 0.39) は Asp496 および Phe497 の主鎖と水素結合を形成していた (Figure 2-5C)。7 のカルボニル酸素が、Phe497 に結合し 5、6 と水素結合していた水分子に置き換わっていた。さらに、7 は、触媒 3 残基の 1 つである Asp335 と水分子を介して水素結合を形成していた。この水分子は、リガンドを含まない sEH 結晶構造中では観測されていないことから、7 の結合に伴って結合したものと考えられる。

2-3-1 項で述べたように、L 字型ポケットのロングブランチには 9 種類のフラグメント化合物が結合していた。化合物 8 (IC<sub>50</sub> = 61 μM、LE = 0.32) は Gln384 側鎖、および Trp465、Asn468 の主鎖に結合した水分子と水素結合を形成していた (Figure 2-5D)。Trp336、Met339、Tyr343、Ile375、Met469 とのファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用も観測された。化合物 9 (IC<sub>50</sub> = 195 μM、LE = 0.27) はポケット内部の広い表面に結合しており、Met469 主鎖に結合した水分子と水素結合するとともに、Trp336、Met339、Ile375、Gln384 とファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用を形成していた (Figure 2-5E)。化合物 10 は Asn472 側鎖、および Trp465、Asn468 の主鎖に結合

した水分子と水素結合を形成するとともに、Met310、Trp336、Met339、Tyr343、Ile375、Met469、Asn472、Trp473 とファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用を形成していた (Figure 2-5F)。10 の弱い阻害活性 ( $IC_{50} = 171 \mu M$ 、 $LE = 0.27$ ) は、10 が浅いサブポケットにはまり込んでいて基質の結合を妨げにくい可能性があるためと考えられる。

Baker らは、フラグメント化合物を用いたアプローチに由来する 9 種類の臨床開発中化合物について報告している [30]。そのうち、3 化合物 (vemurafeb、LY2886721、PLX3397) の開発の基礎となったフラグメント化合物は、高濃度化合物の酵素アッセイによるスクリーニングによって見出されている。一方、4 化合物は NMR によるスクリーニング、2 化合物は結晶構造解析によるスクリーニングに由来する。また、vemurafeb、LY2886721、PLX3397 の基礎となったフラグメント化合物は、結晶構造解析により標的タンパク質に作用することが確認されてから合成展開が行われている [28, 31, 32]。これらの結果から、有望なフラグメント化合物は高濃度化合物の酵素アッセイだけでは見出せないことが示唆される。その理由の 1 つとして、高濃度化合物の酵素アッセイで見出された化合物群には多数の偽陽性あるいは偽陰性化合物が含まれていることがあげられる [33]。本研究においても、酵素アッセイで見出された 307 化合物の中には一定数の偽陽性化合物が含まれていたものと考えられるが、その 41% に相当する 126 化合物で sEH 複合体構造の決定に成功しているのは特筆すべき点である。一方、筆者の経験では、約 15% が平均的な構造決定成功率である。Hubbard らは、2 つの事例、熱ショックタンパク質 Hsp90 とペプチジルプロリン異性化酵素 Pin1 について報告している [33]。Hsp90 では高濃度化合物アッセイで見出された化合物のうち、約 1/4 未満が、NMR、結晶構造解析などといった生物物理学的な手法で標的タンパク質への作用を確認している。Pin1 では、高濃度化合物アッセイで見出された 51 化合物のうち 6 化合物については、生物物理学的な手法で標的タンパク質への作用を確認している。これらの事例と比較すると、本研究における結晶構造決定の割合はかなり高いことがわかる。その理由としては、共結晶化とソーキングを組み合わせて実施したことがあげられる。また、触媒 3 残基とフラグメント化合物の間の相互作用は特異性が非常に高く、高親和性の結合に寄与している。スクリーニングで見出された 307 化合物の中には、128 のアミドまたは尿素構造を含むフラグメント化合物が含まれていたが、そのうち 62% に相当する 79 化合物で複合体構造を決定できている。予想されたとおり、79 化合物中 74 化合物 (94%) のフラグメン

ト化合物が、既知の尿素誘導体と同様な様式で触媒 3 残基に結合していた。このことから、触媒 3 残基との強固な相互作用により結晶中のフラグメント化合物の結合様式を一定に保持することが電子密度マップ上での明瞭な観測につながっているものと考えられる。

**3** および **4** は、アミドまたは尿素構造をもたず、かつ触媒 3 残基に結合していたが、特に、**3** の sEH 阻害活性および LE 値は、**1** および **2** といったアミドまたは尿素構造を含むフラグメント化合物と同等であった。**3** と触媒 3 残基の 1 つである Asp335 との水素結合様式は、アミドまたは尿素誘導体とは異なっていた。例えば、sEH 阻害剤である *N*-シクロヘキシル-*N'*-(4-ヨードフェニル)尿素の、尿素構造中の窒素原子は Asp335 に対して水素結合供与体として働いているが、一方、**3** のアミノ基は水素結合供与体と受容体の両方の可能性がある。アミノ基が水素結合受容体として働いているとすれば、これは Asp335 が水素結合供与体として働いている最初の事例となる。さらに、ジヒドロチアゾールの窒素原子は、触媒 3 残基中の Tyr383 および Tyr466 と、尿素誘導体のカルボニル酸素原子と同様な様式で水素結合を形成している。その高い LE 値と、触媒 3 残基との強固な相互作用から、**3** は FBDD の出発化合物として有望な候補化合物であると考えられる。

エポキシドの加水分解反応における触媒 3 残基の役割は既に明らかとなっているが [15]、ショートブランチおよびロングブランチの役割は不明である。sEH は幅広いエポキシド類の加水分解を触媒することから [34]、これらの領域は基質の非特異的な相互作用に関わっている可能性がある。しかしながら、本研究においては、フラグメント化合物とショートブランチ内のアミノ酸残基との特異的な相互作用が見出されている。特に **5** から **7** は、高い LE 値を示すとともに、Asp496 と水素結合を形成している。このことから、Asp496 との相互作用は、sEH と基質あるいは阻害剤の重要な相互作用の 1 つであることが示唆される。なお、Asp496 は、ヒト、マウス、ラットおよびブタ由来 sEH ホモログの間で保存されている。さらに、Phe497 主鎖の窒素原子は 13 種類のフラグメント化合物と相互作用していた。これはショートブランチに結合していたフラグメント化合物の 45%に相当する。これら 13 化合物の中で、**7** は保存された水分子と置き換わって Phe497 と直接水素結合を形成し、一方、**5** および **6** は水分子を介して相互作用していた。これら 2 種類の水素結合パターンにより、水素結合供与体および受容体のどちらも許容可能となっている。Asp496 と Phe497 の生理学的な意義は不明であるが、阻害剤

開発において相互作用獲得の標的となり得ると考えられる。さらに、これらのアミノ酸残基と特異的に結合したフラグメント化合物の基本骨格は、フラグメント化合物同士を融合したり、結び付けたりする際にも利用可能である。

ロングブランチに結合したフラグメント化合物の中には、触媒 3 残基やショートブランチに結合したフラグメント化合物と同等の LE 値を示すものはなかった。この領域が、強固なファンデルワールス相互作用や疎水性相互作用を形成するには広すぎるものがその一因であると考えられる。また、ロングブランチは幅広い基質認識における非特異的相互作用に寄与しているものと考えられる。このように、ロングブランチはフラグメント化合物が結合するポケットとしては好ましくないが、いくつかの化合物では特異的な相互作用が見出された。例えば、**8** および **10** はいずれも、Trp465 および Asn468 に結合した水分子に結合している。この水分子は、我々の研究グループがこれまでに決定した他の sEH 結晶構造および報告されている sEH 結晶構造 (PDB ID: 3ANS および 3I28) においても観測されており [35, 36]、親水性の基質や阻害剤と極性基を介して相互作用している可能性がある。**9** は、これとは別の水分子、Met469 主鎖の酸素原子に結合した水分子と水素結合を形成していた。しかしながら、この水分子は **9** が結合した場合のみ観測されており、その sEH の構造と機能における役割は不明である。

Figure 2-6 に、ショートブランチおよびロングブランチにおいて見出された特異的な相互作用の概観を示す。これらの相互作用に関わるアミノ酸残基および水分子は触媒 3 残基の中心から 12 Å 以内に位置していた。このことから、触媒 3 残基に結合したフラグメント化合物を基に修飾合成を進めることにより、ショートブランチおよびロングブランチにおいて特異的な相互作用を獲得し、高い活性と、薬剤として適した物理化学的性質をもった薬剤候補物質の創製につながることを期待できる。また、ショートブランチおよびロングブランチにおいて水素結合を獲得できるように sEH 阻害剤に極性基を導入することによって、活性を減弱させることなく、溶解性の改善や薬物間相互作用のリスク低減を図ることが可能である。

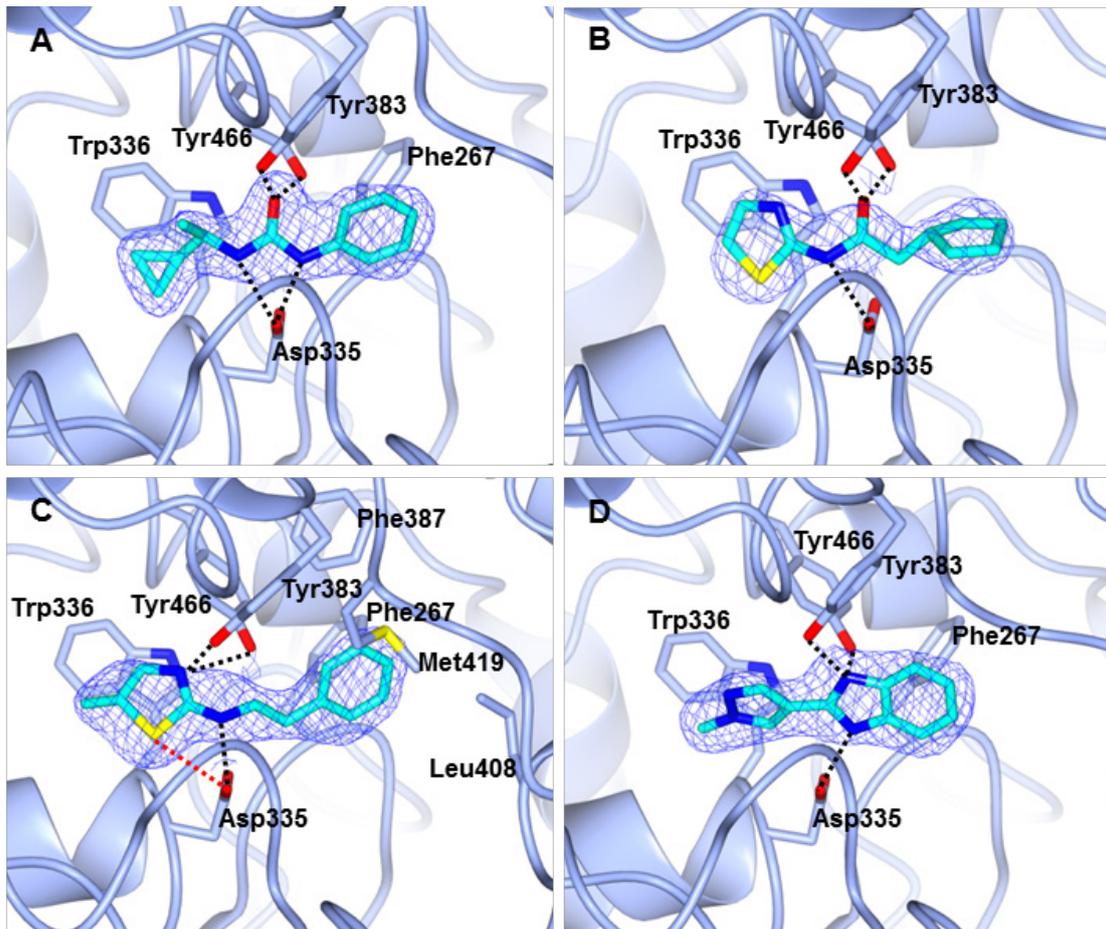


Figure 2-3 触媒 3 残基に結合したフラグメント化合物の複合体構造

(A) 化合物 1、(B) 化合物 2、(C) 化合物 3、(D) 化合物 4。フラグメント化合物はシアンで示す。フラグメント化合物との相互作用に関わるアミノ酸残基は水色で示す。 $F_o - F_c$  オミット電子密度マップ ( $2.5\sigma$ ) を青で示す。黒い点線は水素結合を、赤い点線は S-O 相互作用を示す。

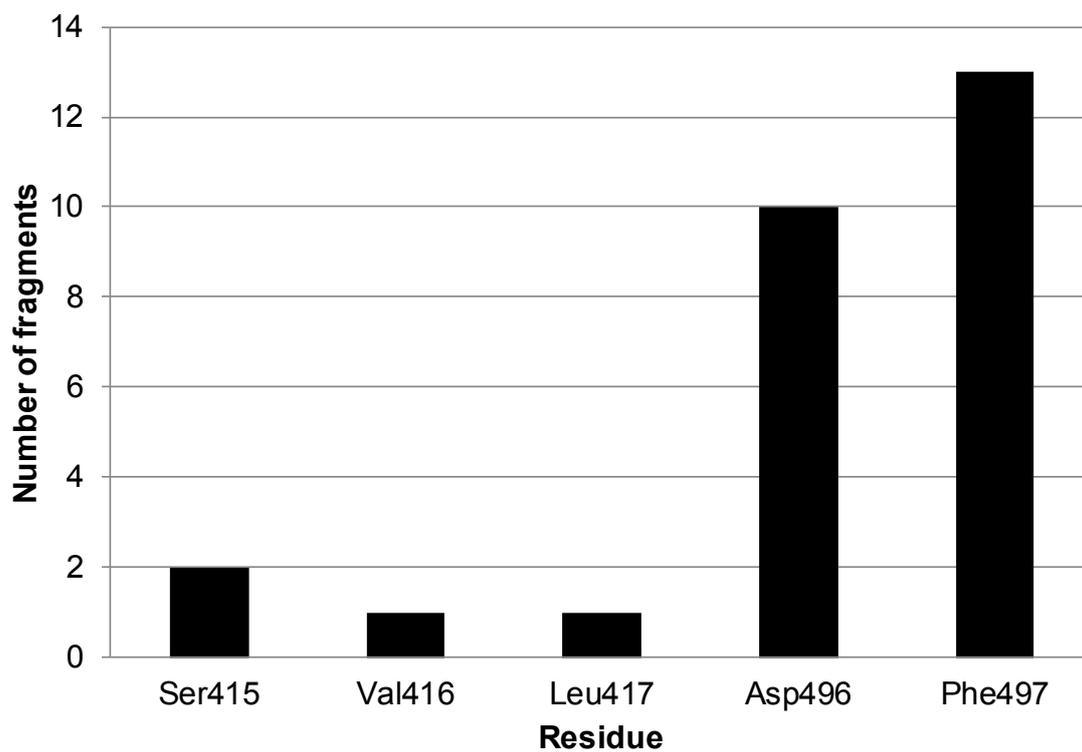


Figure 2-4 ショートブランチ内のアミノ酸残基ごとの相互作用頻度

ショートブランチ内でフラグメント化合物と水素結合を形成したアミノ酸残基について、それぞれ水素結合したフラグメント化合物の数を示す（水分子を介した水素結合は含まない）。

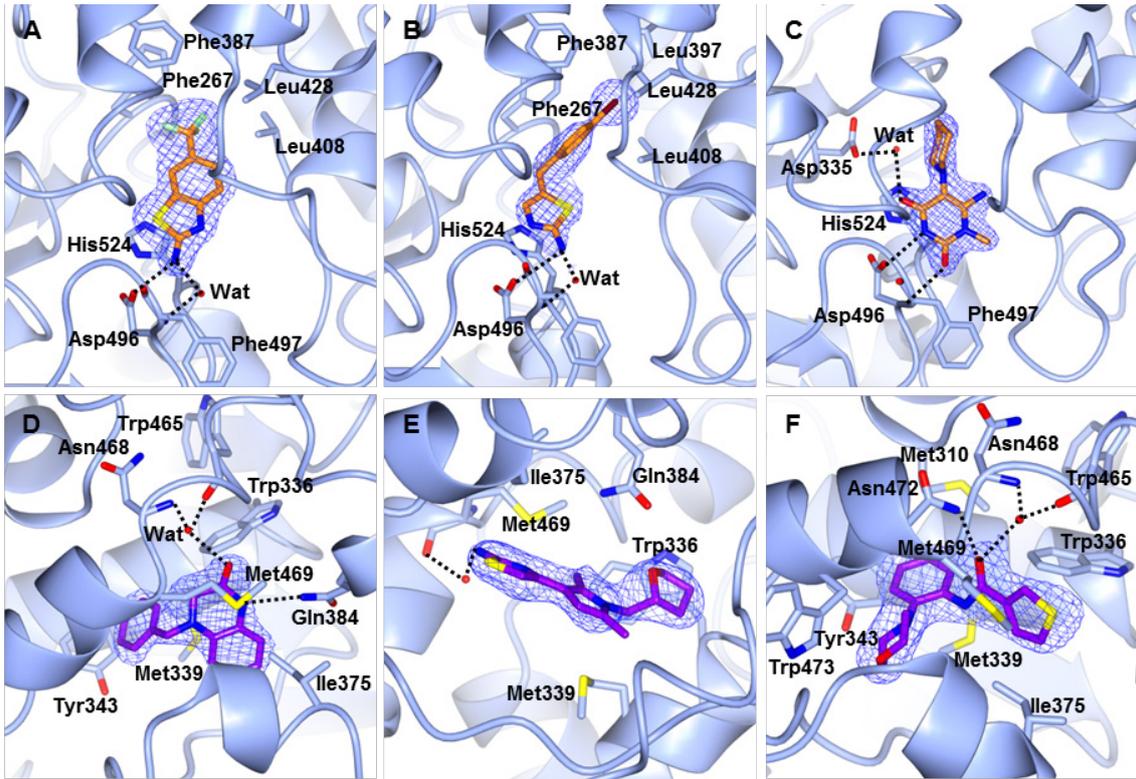


Figure 2-5 ショートブランチおよびロングブランチに結合したフラグメント化合物の複合体構造

(A) 化合物 5、(B) 化合物 6、(C) 化合物 7、(D) 化合物 8、(E) 化合物 9、(F) 化合物 10。  
 フラグメント化合物は橙（ショートブランチ）あるいは紫（ロングブランチ）で示す。  
 フラグメント化合物との相互作用に関わるアミノ酸残基は水色で示す。水分子は赤い球  
 で示す。 $F_o - F_c$  オミット電子密度マップ ( $2.5\sigma$ ) を青で示す。点線は水素結合を示す。

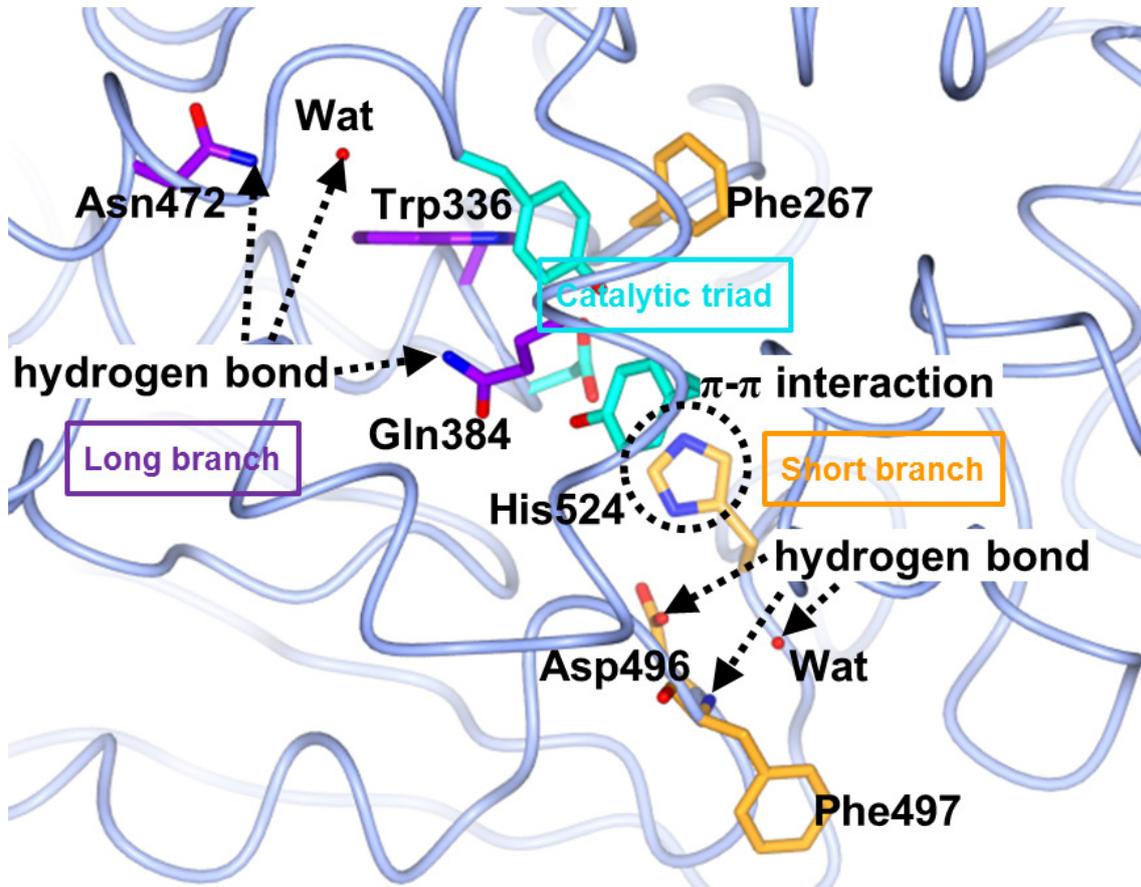


Figure 2-6 ショートブランチおよびロングブランチでみられた特異的相互作用  
 触媒3残基をシアンで示す。ショートブランチおよびロングブランチで特異的相互作用  
 に関わるアミノ残基は、それぞれ橙および紫で示す。同様に特異的相互作用に関わる  
 水分子を赤い球で示す。

### 2-3-3 結晶構造解析によるフラグメント化合物のスクリーニング

10 種類の化合物を混合した溶液を 80 種類作成し、それぞれを用いて sEH 結晶へのソーキングを行うことにより、800 化合物のスクリーニングを実施した。スクリーニングの対象とした 800 化合物は、市販の化合物より選択した。sEH 阻害剤として新規の構造を有するフラグメント化合物を見出すため、尿素またはアミド構造を有する化合物はあえて除外した。化合物混合溶液の調製においては、結合した化合物の推定を容易にするため、同一溶液中に類似した構造をもつ複数の化合物が含まれないように化合物を選択した。

取得した sEH 結晶は、ソーキング後においても 2.0 から 2.7 Å と十分に高い分解能での構造解析が可能であった。結晶構造解析により結合が確認されたフラグメント化合物は 8 種類であり、全体の 1% に相当した。Figure 2-7 に各化合物のオミット  $F_o - F_c$  電子密度マップを示す。いずれも明瞭に観測できていることがわかる。これら 8 化合物について阻害活性を評価した結果、うち 7 化合物の  $IC_{50}$  値の範囲は 52 から 2200  $\mu\text{M}$  であったが、**14** の  $IC_{50}$  値は算出できなかった。化合物の蛍光が、基質の蛍光測定に影響を与えた可能性が考えられる。後述する Figure 2-8、2-9 に各化合物の構造式、 $IC_{50}$  値および LE 値を示した。

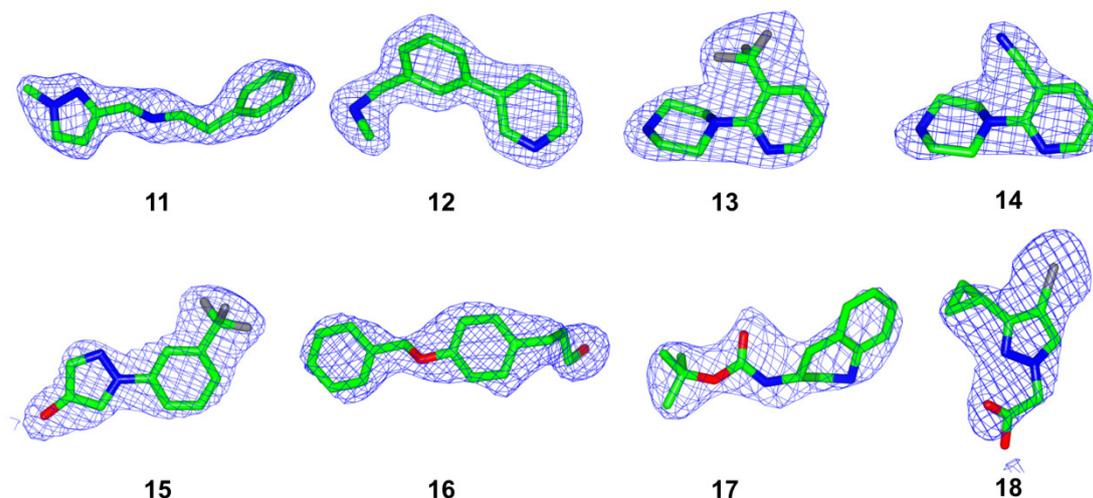


Figure 2-7 フラグメント化合物の  $F_o - F_c$  オミット電子密度マップ ( $2.5\sigma$ )

#### 2-3-4 結晶構造解析スクリーニングに由来するフラグメント化合物の結合様式

化合物 **11** は、2 級アミン部分を介して触媒 3 残基に水素結合していた (Figure 2-8)。**11** の窒素原子から、水素結合相手となっている酸素原子までの距離は、Asp335 が 2.81 Å、Tyr383 が 3.09 Å、Tyr466 が 2.45 Å であった。これらの水素結合に関わる原子の位置関係から、**11** の窒素原子は、Asp335 または Tyr383 に対しては水素結合受容体として、また Tyr466 に対しては水素結合供与体として働いている可能性が高い。この 2 級アミン構造は、1 種類の窒素原子のみで触媒 3 残基と水素結合を形成しているという意味では、これまでにない特徴的な構造であるといえる。**11** のフェニル部分はショートブランチに結合し、Phe267、Leu408、Met419、Leu428 とファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用を形成していた。メチルピラゾール部分はロングブランチに浅く結合し、Trp336 とファンデルワールス相互作用を形成していた。**11** の阻害活性は  $IC_{50} = 800 \mu M$  と低く、LE 値も 0.26 と低かった。

化合物 **12** も、**11** と同様、2 級アミンを有しており、触媒 3 残基と相互作用していた (Figure 2-8)。しかしながら、**12** の窒素原子と Tyr383 側鎖の酸素原子との間の距離は遠く (3.67 Å)、水素結合を形成しているとは考えにくい。**12** の 2 級アミン部分は、Asp335 に対して水素結合受容体として、Tyr466 に対して水素結合供与体として働いていると考えられる。また、フェニル部分は **11** と同様にショートブランチに結合し、ピリジン環の窒素原子は Phe497 主鎖に結合した水分子と水素結合を形成していた。このように、2 つの芳香環 (ベンゼン環とピリジン環) が、ショートブランチを埋めるように結合し、さらに水素結合も形成していたが、その阻害活性は **11** よりもさらに低かった ( $IC_{50} = 2.2 \text{ mM}$ 、LE = 0.24)。このことから、阻害活性を向上させるには触媒 3 残基すべてとの水素結合と Trp336 との相互作用を獲得することが必要であることが示唆される。

化合物 **13** と **14** は、類似した化学構造を有している。ピリジニルピペラジン部分は共通しており、ピリジン環のオルト位が、**13** ではトリフルオロメチル基に、**14** ではニトリル基に置換されている。トリフルオロメチル基とニトリル基はいずれも疎水性であり、また嵩高いという点で両者に大きな違いはない。実際、これら 2 つの化合物はよく似た結合様式を示した (Figure 2-8)。**12** と同様に、ピペラジン環の窒素原子が Asp335 および Tyr466 と水素結合を形成している一方、Tyr383 とは水素結合を形成するには遠かった。オルト位が置換されたピリジン環は、ショートブランチに結合して、ファンデルワー

ルス相互作用および疎水性相互作用を形成していた。ピリジン環の位置は、**12** とはやや異なっており、水分子との水素結合は形成していなかった。**13** の  $IC_{50}$  値は 1.2 mM、LE 値は 0.25 であった。**14** の阻害活性は評価できなかったが、結合様式からは **13** と同程度の活性であることが示唆される。

化合物 **15** は触媒 3 残基と水素結合を形成していなかったが、ヒドロキシル基が Phe497 主鎖の窒素原子および Lys495 主鎖に結合した水分子と水素結合を形成していた (Figure 2-9)。また、トリフルオロメチル基が Phe267、Leu408、Met419、Trp525 と疎水性相互作用を、ベンゼン環が His524 と  $\pi$ - $\pi$  相互作用を形成していた。触媒 3 残基との水素結合がないにも関わらず、**15** は中程度の阻害活性を示した ( $IC_{50} = 52 \mu\text{M}$ 、LE = 0.36)。トリフルオロメチル基による疎水性相互作用は、阻害活性の低かった **13** でもみられていることから、His524 との  $\pi$ - $\pi$  相互作用が阻害活性に寄与しているものと考えられる。

化合物 **16** は、ロングブランチ側に結合するとともにそのヒドロキシル基が触媒 3 残基と水素結合を形成していた (Figure 2-9)。中央のベンゼン環は Gln384 とファンデルワールス相互作用を、Trp336 と疎水性相互作用を形成していた。一方、末端のベンゼン環は Ile375 と疎水性相互作用を形成していた。ヒドロキシル基および 2 つのベンゼン環は、それぞれフレキシブルなリンカーでつながれており、互いの結合位置を強くは制約しないと考えられることから、ベンゼン環の結合位置はロングブランチにおいて化合物が結合しやすい領域であることが示唆される。このような構造情報は化合物の最適化において有用である。

化合物 **17** は触媒 3 残基と水素結合を形成していた (Figure 2-9)。カーバメート部分のカルボニル酸素原子が Tyr383 および Tyr466 に対して水素結合受容体として、窒素原子が Asp335 に対して水素結合供与体として働いていた。これらの相互作用は既知のアミドあるいは尿素誘導体と同様である。また、テトラヒドロキノリン部分は Phe267 主鎖の酸素原子と水素結合を形成していた。

化合物 **18** はショートブランチ側に結合していたが、水素結合は形成していなかった (Figure 2-9)。臭素原子が Phe267、Phe387、Leu428 によって形成された疎水性領域を占めていた。また、ピラゾール環は His524 の近くに位置しており、弱い  $\pi$ - $\pi$  相互作用を形成しているものと考えられる。水素結合を形成していないにも関わらず、**18** は中程度の阻害活性と高い LE 値を示した ( $IC_{50} = 91 \mu\text{M}$ 、LE = 0.42)。

フラグメント化合物の結合様式から、3 つの官能基、2 級アミン、ヒドロキシル基、

カーバメートが、触媒 3 残基と水素結合を形成する官能基として見出された。スクリーニングの対象とした 800 化合物は構造的多様性があり、アミン誘導体に偏っていたわけではないが、**11** から **14** は共通して 2 級アミンを有していた。この 2 級アミンは特徴的な結合様式を示した。アミドや尿素誘導体の複合体結晶構造によれば、アミドまたは尿素の窒素原子は Asp335 に対して水素結合供与体として働いている [4-7, 9, 36-39]。対照的に、**11** から **14** のアミンの窒素原子は、Asp335 に対して水素結合供与体として働いているとは考えにくい。Figure 2-10 に、強い sEH 阻害活性を示す尿素誘導体、トランス-4-[4-(3-アダマンタン-1-イル-ウレイド)-シクロヘキシルオキシ]-安息香酸 (*t*-AUCB) [40] と **11** の結合様式および推定される水素結合パターンを示す。*t*-AUCB では尿素の窒素原子が Asp335 側鎖のカルボン酸に水素を供与していると考えられるが、**11** では逆に Asp335 側鎖のカルボン酸が **11** の窒素原子上の非共有電子対に水素を供与していると考えられる。また、Tyr383 および Tyr466 側鎖のヒドロキシル基は *t*-AUCB のカルボニル酸素に水素を供与していると考えられるが、**11** では窒素原子が Tyr466 に水素を供与し、Tyr383 から水素を供与されていると考えられる。2 級アミンの相互作用は特徴的であるが、**11** から **14** の LE 値は低く、FBDD の開始点としては不十分であった。そこで、より効率的に sEH に結合し阻害活性を発揮する化合物を探索した。

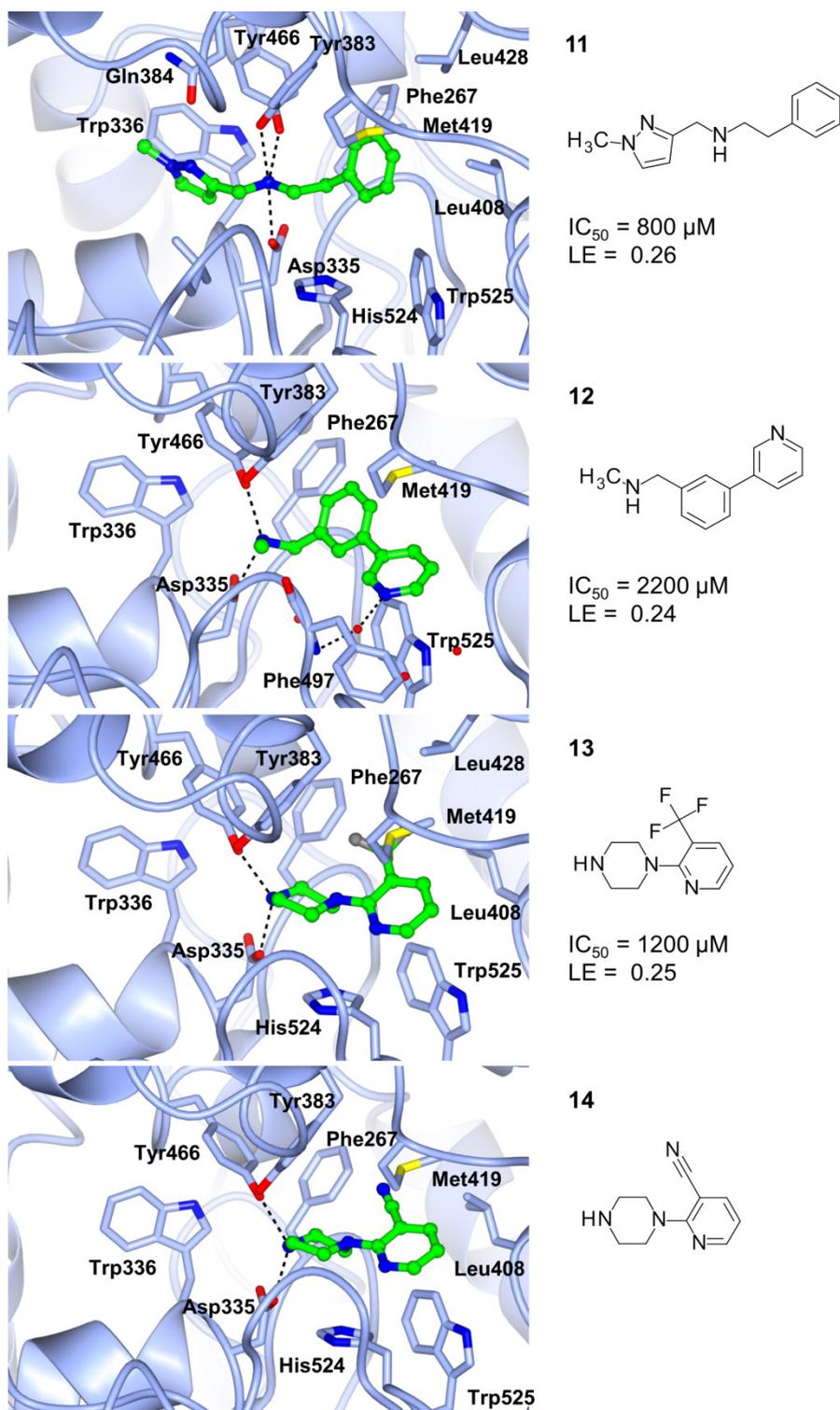


Figure 2-8 化合物 11 から 14 の複合体結晶構造

化合物は緑のボール&スティックモデルで示す。タンパク質は、水色のリボン図およびスティックモデルで示す。水分子は赤い球で示す。点線は水素結合を示す。

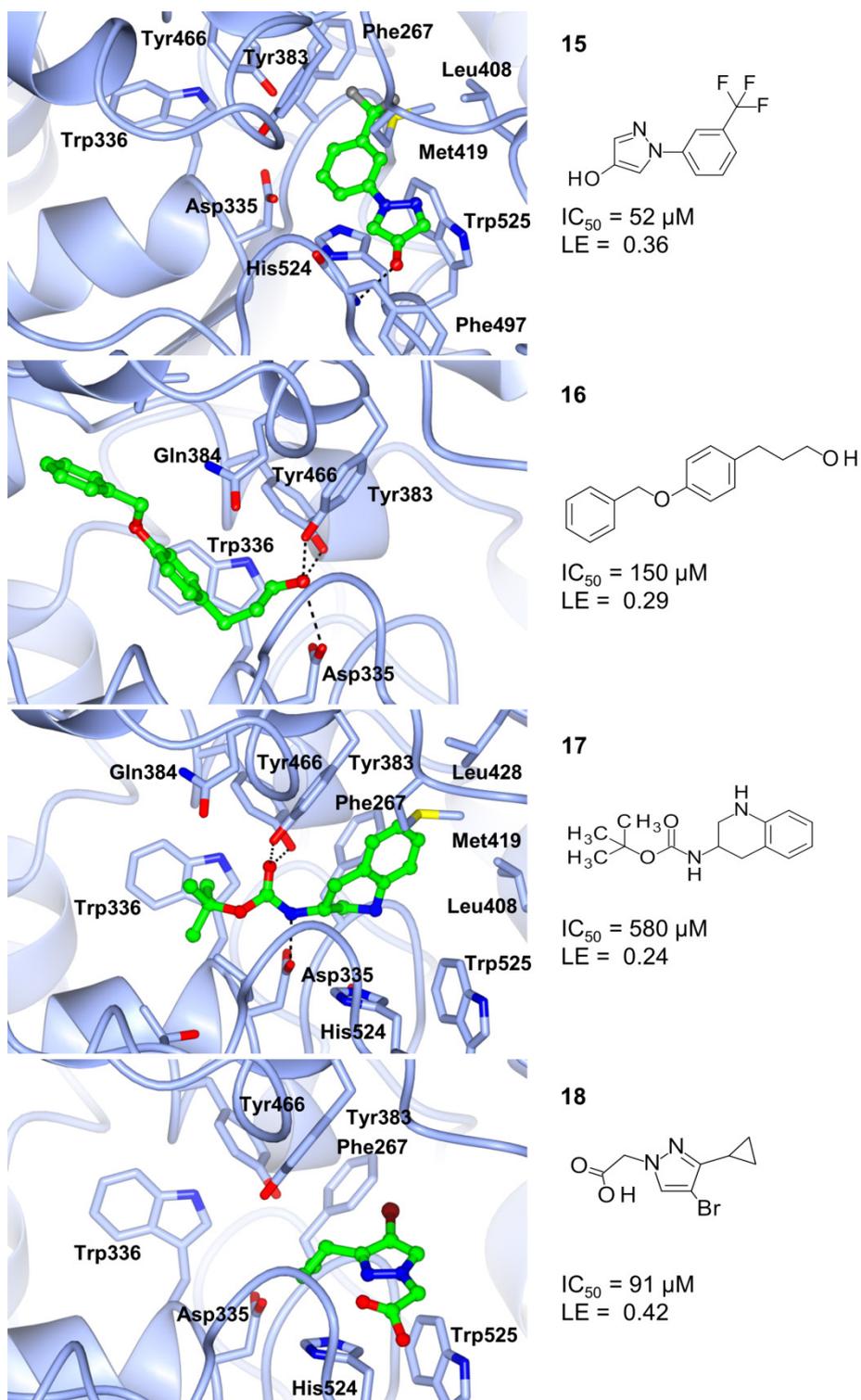


Figure 2-9 化合物 15 から 18 の複合体結晶構造

化合物は緑のボール&スティックモデルで示す。タンパク質は、水色のリボン図およびスティックモデルで示す。水分子は赤い球で示す。点線は水素結合を示す。

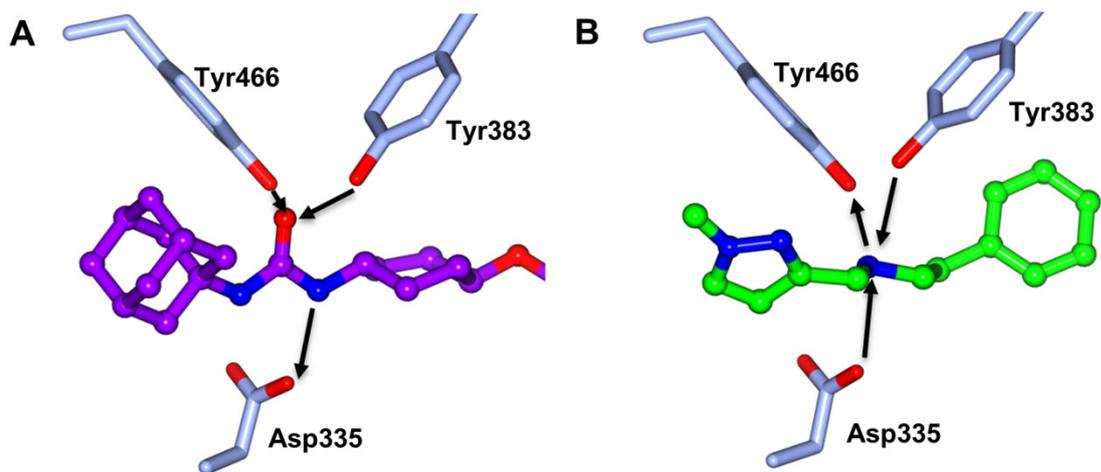


Figure 2-10 触媒 3 残基との水素結合パターンの比較

(A) *t*-AUCB (PDB ID: 3WKE)、(B) 化合物 **11**。矢印は、水素を供与する方向を推測して示したものである。

### 2-3-5 結晶構造に基づいた阻害剤探索

11 から 14 の中でも、特に 11 の有する骨格、*N*-エチルメチルアミンに着目した。なぜならば、11 だけが、ショートブランチ側とロングブランチ側の両方のサブポケットにまたがって結合しているからである (Figure 2-8)。阻害活性を向上させるには、より嵩高く大きな官能基に変換し、Phe267、Phe387、Leu408、Met419、Leu428 によって囲まれた疎水性領域を占有することが必要と考えられた。2-3-2 項および 2-3-4 項で述べたフラグメント化合物の結合様式も、この領域には、トリフルオロメチル基、ブロモ基、ニトリル基といった疎水的で嵩高い官能基が好ましいことを示唆している。また、1-メチルピラゾールをより疎水的な官能基に置換することによって、Trp336 との相互作用を強めることができると考えられた。

上述の構造情報を踏まえ、14 化合物を、保有している化合物ライブラリーより選択し、阻害活性評価を行った。その結果、0.51  $\mu\text{M}$  の  $\text{IC}_{50}$  値を示した化合物 19 および 9.0  $\mu\text{M}$  の  $\text{IC}_{50}$  値を示した化合物 20 を見出した。19、20 の LE 値はそれぞれ 0.41、0.40 であり、FBDD の開始化合物として十分に高い値である。結合様式を明らかにするため、19 および 20 と sEH との複合体結晶構造をそれぞれ決定した。予想通り、19 は、11 と同様に、窒素原子を介して触媒 3 残基と結合していた (Figure 2-11)。窒素原子と Asp335、Tyr383 との距離は、それぞれ 2.90、3.01 Å であり、水素結合を形成していると考えられるが、Tyr466 との距離は 3.36 Å であり、水素結合を形成していない可能性が高い。一方、フェノール部分のヒドロキシル基が Tyr466 と水素結合していた (3.11 Å)。さらに、ヒドロキシル基は Tyr383 (2.91 Å)、Gln384 (2.79 Å) とともに水素結合していた。つまり、5 本の水素結合が 19 のアミノ基およびフェノールと触媒 3 残基および Gln384 との間に形成されていることになる。また、アダマンチル基は期待通り、Phe267、Phe387、Leu408、Met419、Leu428 に囲まれた疎水性領域を占有していた。このように、強い水素結合ネットワークと疎水性相互作用が 19 の高い阻害活性に寄与しているものと考えられる。

20 もその窒素原子を介して触媒 3 残基に結合していた (Figure 2-11)。窒素原子は、Asp335 (2.68 Å)、Tyr466 (2.59 Å) と水素結合している一方、Tyr383 (3.42 Å) とは水素結合していないと考えられた。メチルチオフェン部分は Trp336 および Met339 と疎水性相互作用およびファンデルワールス相互作用を形成していた。また、フルオロフェニル部分は Phe267、Leu408、His524、Trp525 と疎水性相互作用およびファンデルワール

ス相互作用を形成していた。しかしながら、フルオロフェニル部分は疎水性領域を十分に占有していないと考えられた。フルオロフェニル部分をアダマンチル基のような嵩高い官能基に変換することでさらに阻害活性が向上することが期待される。

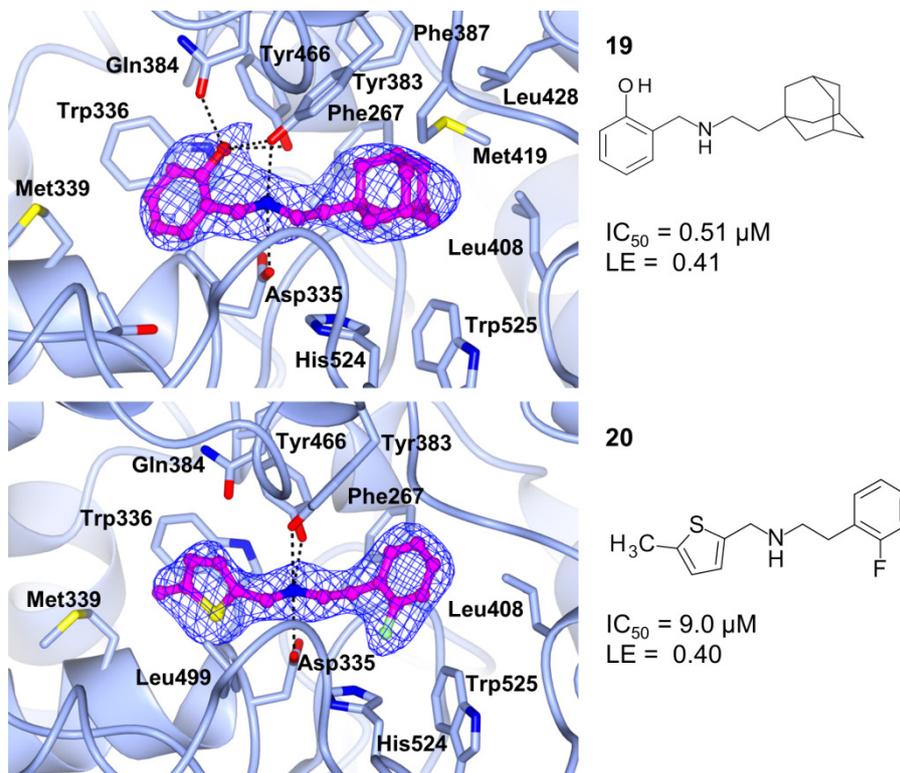


Figure 2-11 化合物 **19** および **20** の複合体結晶構造

化合物はマゼンタのボール&スティックモデルで示す。水色のリボン図とスティックモデルはタンパク質を示す。 $F_o - F_c$  オミット電子密度マップ ( $2.5\sigma$ ) を青で示す。点線は水素結合を示す。

## 2-4 結論

阻害活性評価によるフラグメント化合物のスクリーニングから見出された化合物について、sEH-化合物複合体結晶構造解析を実施した。その結果、sEH の触媒 3 残基に結合する、既存阻害剤とは異なる基本骨格を見出した。また、基質結合ポケットのショートブランチ側およびロングブランチ側で、sEH と化合物との特異的相互作用を複数見出した。

さらに、結晶構造解析によるフラグメント化合物のスクリーニングを実施し、sEH に結合するフラグメント化合物を見出した。特に、**11** が有する *N*-エチルメチルアミンは、sEH の特徴的な L 字型ポケットにぴったりと合う阻害剤を開発する基礎となることが期待される。*N*-エチルメチルアミンの、sEH 阻害剤の基本骨格としての潜在的可能性は、**19** および **20** の高い阻害活性からも示唆される。*N*-エチルメチルアミン誘導体の最適化研究により、新規の強い sEH 阻害剤の創製につながることを期待される。

2-5 引用文献

- [1] Morisseau, C. & Hammock, B. D. (2013). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**, 37-58.
- [2] Borhan, B., Jones, A. D., Pinot, F., Grant, D. F., Kurth, M. J. & Hammock, B. D. (1995). *J Biol Chem* **270**, 26923-26930.
- [3] Argiriadi, M. A., Morisseau, C., Hammock, B. D. & Christianson, D. W. (1999). *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10637-10642.
- [4] Morisseau, C., Goodrow, M. H., Dowdy, D., Zheng, J., Greene, J. F., Sanborn, J. R. & Hammock, B. D. (1999). *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8849-8854.
- [5] Gomez, G. A., Morisseau, C., Hammock, B. D. & Christianson, D. W. (2006). *Protein Sci* **15**, 58-64.
- [6] Eldrup, A. B., Soleymanzadeh, F., Farrow, N. A., Kukulka, A. & De Lombaert, S. (2010). *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 571-575.
- [7] Lo, H. Y., Man, C. C., Fleck, R. W., Farrow, N. A., Ingraham, R. H., Kukulka, A., Proudfoot, J. R., Betageri, R., Kirrane, T., Patel, U., Sharma, R., Hoermann, M. A., Kabcenell, A. & Lombaert, S. D. (2010). *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 6379-6383.
- [8] Xing, L., Goulet, R. & Johnson, K. (2011). *J Chem Inf Model* **51**, 1582-1592.
- [9] Xing, L., McDonald, J. J., Kolodziej, S. A., Kurumbail, R. G., Williams, J. M., Warren, C. J., O'Neal, J. M., Skepner, J. E. & Roberds, S. L. (2011). *J Med Chem* **54**, 1211-1222.
- [10] Moser, D., Achenbach, J., Klingler, F.-M., Estel la, B., Hahn, S. & Proschak, E. (2012). *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 6762-6765.
- [11] Curran, M. & Wiseman, L. (2001). *Drugs* **61**, 807-813; discussion 814.
- [12] Liu, Y., Dang, H., Li, D., Pang, W., Hammock, B. D. & Zhu, Y. (2012). *PLoS One* **7**, e39165.
- [13] Moser, D., Wisniewska, J. M., Hahn, S., Achenbach, J., Buscato, E., Klingler, F. M., Hofmann, B., Steinhilber, D. & Proschak, E. (2012). *Acs Med Chem Lett* **3**, 155-158.
- [14] Achenbach, J., Klingler, F. M., Blocher, R., Moser, D., Hafner, A. K., Rodl, C. B., Kretschmer, S., Kruger, B., Lohr, F., Stark, H., Hofmann, B., Steinhilber, D. & Proschak, E. (2013). *Acs Med Chem Lett* **4**, 1169-1172.
- [15] Gomez, G. A., Morisseau, C., Hammock, B. D. & Christianson, D. W. (2004).

- Biochemistry* **43**, 4716-4723.
- [16] Morisseau, C., Goodrow, M. H., Newman, J. W., Wheelock, C. E., Dowdy, D. L. & Hammock, B. D. (2002). *Biochem Pharmacol* **63**, 1599-1608.
- [17] Hwang, S. H., Tsai, H. J., Liu, J. Y., Morisseau, C. & Hammock, B. D. (2007). *J Med Chem* **50**, 3825-3840.
- [18] Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol* **276**, 307-326.
- [19] Navaza, J. (2001). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1367-1372.
- [20] Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255.
- [21] Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.
- [22] Abad-Zapatero, C. & Metz, J. T. (2005). *Drug Discov Today* **10**, 464-469.
- [23] Hopkins, A. L., Groom, C. R. & Alex, A. (2004). *Drug Discov Today* **9**, 430-431.
- [24] Hiraki, M., Watanabe, S., Phonda, N., Yamada, Y., Matsugaki, N., Igarashi, N., Gaponov, Y. & Wakatsuki, S. (2008). *J Synchrotron Radiat* **15**, 300-303.
- [25] Chavas, L. M., Matsugaki, N., Yamada, Y., Hiraki, M., Igarashi, N., Suzuki, M. & Wakatsuki, S. (2012). *J Synchrotron Radiat* **19**, 450-454.
- [26] Yamada, Y., Phonda, N., Matsugaki, N., Igarashi, N., Hiraki, M. & Wakatsuki, S. (2008). *J Synchrotron Radiat* **15**, 296-299.
- [27] Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-763.
- [28] Tsai, J., Lee, J. T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N. K., Sproesser, K., Li, L., Smalley, K. S., Fong, D., Zhu, Y. L., Marimuthu, A., Nguyen, H., Lam, B., Liu, J., Cheung, I., Rice, J., Suzuki, Y., Luu, C., Settachatgul, C., Shellooe, R., Cantwell, J., Kim, S. H., Schlessinger, J., Zhang, K. Y., West, B. L., Powell, B., Habets, G., Zhang, C., Ibrahim, P. N., Hirth, P., Artis, D. R., Herlyn, M. & Bollag, G. (2008). *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 3041-3046.
- [29] Buscato, E., Buttner, D., Bruggerhoff, A., Klingler, F. M., Weber, J., Scholz, B., Zivkovic, A., Marschalek, R., Stark, H., Steinhilber, D., Bode, H. B. & Proschak, E. (2013). *ChemMedChem* **8**, 919-923.
- [30] Baker, M. (2013). *Nat Rev Drug Discov* **12**, 5-7.

- [31] Zhang, C., Ibrahim, P. N., Zhang, J., Burton, E. A., Habets, G., Zhang, Y., Powell, B., West, B. L., Matusow, B., Tsang, G., Shellooe, R., Carias, H., Nguyen, H., Marimuthu, A., Zhang, K. Y., Oh, A., Bremer, R., Hurt, C. R., Artis, D. R., Wu, G., Nespi, M., Spevak, W., Lin, P., Nolop, K., Hirth, P., Tesch, G. H. & Bollag, G. (2013). *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 5689-5694.
- [32] May, P. C., Dean, R. A., Lowe, S. L., Martenyi, F., Sheehan, S. M., Boggs, L. N., Monk, S. A., Mathes, B. M., Mergott, D. J., Watson, B. M., Stout, S. L., Timm, D. E., Smith Labell, E., Gonzales, C. R., Nakano, M., Jhee, S. S., Yen, M., Ereshefsky, L., Lindstrom, T. D., Calligaro, D. O., Cocke, P. J., Greg Hall, D., Friedrich, S., Citron, M. & Audia, J. E. (2011). *J Neurosci* **31**, 16507-16516.
- [33] Hubbard, R. E. & Murray, J. B. (2011). *Methods Enzymol* **493**, 509-531.
- [34] Spector, A. A., Fang, X., Snyder, G. D. & Weintraub, N. L. (2004). *Prog Lipid Res* **43**, 55-90.
- [35] Tanaka, D., Tsuda, Y., Shiyama, T., Nishimura, T., Chiyo, N., Tominaga, Y., Sawada, N., Mimoto, T. & Kusunose, N. (2011). *J Med Chem* **54**, 851-857.
- [36] Eldrup, A. B., Soleymanzadeh, F., Taylor, S. J., Muegge, I., Farrow, N. A., Joseph, D., McKellop, K., Man, C. C., Kukulka, A. & De Lombaert, S. (2009). *J Med Chem* **52**, 5880-5895.
- [37] Lee, K. S., Liu, J. Y., Wagner, K. M., Pakhomova, S., Dong, H., Morisseau, C., Fu, S. H., Yang, J., Wang, P., Ulu, A., Mate, C. A., Nguyen, L. V., Hwang, S. H., Edin, M. L., Mara, A. A., Wulff, H., Newcomer, M. E., Zeldin, D. C. & Hammock, B. D. (2014). *J Med Chem* **57**, 7016-7030.
- [38] Pecic, S., Pakhomova, S., Newcomer, M. E., Morisseau, C., Hammock, B. D., Zhu, Z., Rinderspacher, A. & Deng, S. X. (2013). *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 417-421.
- [39] Thalji, R. K., McAtee, J. J., Belyanskaya, S., Brandt, M., Brown, G. D., Costell, M. H., Ding, Y., Dodson, J. W., Eisennagel, S. H., Fries, R. E., Gross, J. W., Harpel, M. R., Holt, D. A., Israel, D. I., Jolivet, L. J., Krosky, D., Li, H., Lu, Q., Mandichak, T., Roethke, T., Schnackenberg, C. G., Schwartz, B., Shewchuk, L. M., Xie, W., Behm, D. J., Douglas, S. A., Shaw, A. L. & Marino, J. P., Jr. (2013). *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 3584-3588.

- [40] Chaudhary, K. R., Abukhashim, M., Hwang, S. H., Hammock, B. D. & Seubert, J. M. (2010). *J Cardiovasc Pharmacol* **55**, 67-73.

## 第3章

### *Trypanosoma cruzi* 由来スペルミジン合成酵素の 非競合阻害機構

### 3-1 緒言

顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Disease; NTD) は、原虫、ぜん虫、細菌あるいはウイルスによって引き起こされ、熱帯の国々の貧困層の間で蔓延する感染症の総称である。世界中で 10 億人以上が NTD に感染しているといわれており、NTD への感染により貧困が悪化し、また長期化している [1]。世界保健機構 (WHO) は、149 ヶ国で流行している 17 の NTD への対策を優先することとし、これらの疾患を制御するための政策および戦略を制定した [2]。これら 17 の NTD の 1 つであるシャーガス病は、トリパノソーマ類に属する *Trypanosoma cruzi* によって引き起こされる。シャーガス病はラテンアメリカで流行しており、800 万から 1000 万人が感染しているといわれている [3, 4]。現在、ニフルチモックスとベンズニダゾールがシャーガス病の治療薬として使われているが、その治療効果は限定的でかつばらつきがあり、また副作用を引き起こすという問題がある [5]。

トリパノソーマ類およびリーシュマニア類の薬剤開発における標的として、ポリアミン-トリパノチオン経路が近年注目されている [6, 7]。トリパノチオン [ $N^1, N^8$ -ビス(グルタチオニル)スペルミジン] は、トリパノソーマ類およびリーシュマニア類に必要な不可欠な代謝物であることがわかっているが、哺乳類には存在しない [8]。トリパノチオンは、トリパノソーマ類およびリーシュマニア類が酸化ストレスから身を守るために必要である [9-11]。したがって、ポリアミン-トリパノチオン経路を阻害することはシャーガス病を治療する有効な方法であることが期待される。ポリアミン-トリパノチオン経路に存在する重要なタンパク質の 1 つがスペルミジン合成酵素 (SpdSyn) である。SpdSyn は、脱炭酸 *S*-アデノシルメチオニン (dcSAM) のアミノプロピル基がプトレシンに転移しスペルミジンが合成される反応を触媒する [12]。副産物としてメチルチオアデノシンも生成する。続いて、1 分子のスペルミジンと 2 分子のグルタチオンがトリパノチオン合成酵素により結合されることにより、トリパノチオンが生成する [6]。

これまでに、基質を模倣した SpdSyn 阻害剤の報告はあるが、*T. cruzi* 由来スペルミジン合成酵素 (TcSpdSyn) に選択的な阻害剤の報告はない。*S*-アデノシル-1,8-ジアミノ-3-チオオクタン (AdoDATO) は、遷移状態に類似した阻害剤であり、哺乳類、トリパノソーマ類および細菌に由来する SpdSyn を強く阻害する (Figure 3-1) [13, 14]。また、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン (4MCHA) も SpdSyn に対して中程度の阻害

活性を有する (Figure 3-1) [15]。 *Plasmodium falciparum* 由来スペルミジン合成酵素 (PfSpdSyn) とこれらの阻害剤の複合体結晶構造解析により、阻害様式が明らかにされている [16]。 AdoDATO は、 dcSAM 結合ポケットとプトレシン結合ポケットを同時に占有しており、 dcSAM とプトレシンの両方に拮抗していると考えられる。 一方、 4MCHA は、 プトレシン結合ポケットのみを占有し、 dcSAM とともに結合していることから、 プトレシンに対しては拮抗し、 dcSAM に対しては拮抗しないと考えられる。 近年、 5-(1*H*-ベンズイミダゾール-2-イル)ペンタン-1-アミン (BIPA) が PfSpdSyn に強く結合する化合物として見出された [17]。 BIPA と PfSpdSyn の複合体結晶構造は、 BIPA のベンズイミダゾール部分が、 dcSAM のアミノプロピル基が結合する領域とプトレシン結合ポケットを同時に占有することを示した [18]。

上述したように、 PfSpdSyn 阻害剤の報告はあるものの、 TcSpdSyn 選択的な阻害剤の報告はない。 本研究では、 TcSpdSyn 阻害剤の同定を目的として FBDD を実施することとし、 フラグメント化合物のスクリーニングおよびそれによって見出された化合物と TcSpdSyn の複合体結晶構造解析を行った。

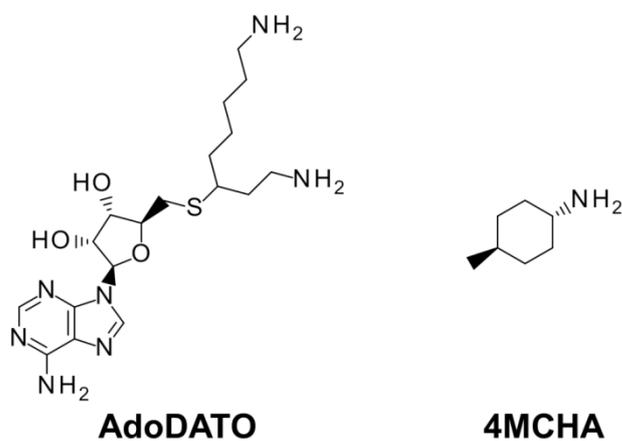


Figure 3-1 既知の SpdSyn 阻害剤

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 発現と精製

N 末端に 6×ヒスチジンタグを融合した TcSpdSyn (Tc00.1047053510339.50) を *Escherichia coli* BL21(DE3)株で発現させた。発現ベクターには pET-30 (Merck Millipore) を使用した。菌体は LB 培地を用い 30°C で培養し、OD<sub>600</sub> が 0.7 に到達したところでイソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシドを終濃度 1 mM となるように添加して発現誘導した。さらに 6 時間培養した後、菌体を回収し、−80°C で凍結保存した。菌体を溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM 塩化ナトリウム、5%(v/v) グリセロール、5 mM イミダゾール、10 mM β-メルカプトエタノール、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド) に懸濁し、超音波破碎した。破碎液を遠心した後、その上清を、あらかじめバッファーA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM 塩化ナトリウム、5%(v/v) グリセロール、20 mM イミダゾール、10 mM β-メルカプトエタノール) で平衡化した Ni-NTA Superflow カラム (Qiagen) に添加した。カラムをバッファーA で洗浄した後、イミダゾール濃度を 250 mM に上げてタンパク質を溶出した。次に、限外ろ過操作を繰り返すことで、バッファーをバッファーB (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ジチオスレイトール) に置換した。タンパク質溶液を Resource Q 陰イオン交換カラム (GE Healthcare) に添加し、0 から 1 M の塩化ナトリウム濃度勾配により溶出した。TcSpdSyn を含む分画を回収し、バッファーC (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM 塩化ナトリウム) で平衡化した Superdex 75 ゲルろ過カラム (GE Healthcare) でさらに精製した。結晶化のため、限外ろ過を繰り返して 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 のバッファーに置換するとともに 25 mg/ml に濃縮し、−80°C に保存した。酵素アッセイ用に、N 末端に 6×ヒスチジンタグを融合したヒト由来 1 型スペルミジン/スペルミン N<sup>1</sup>-アセチル基転移酵素 (SSAT1) を、既報の方法と同様にして発現、精製した [19]。N 末端の 6×ヒスチジンタグはトロンビン処理により切除し、Ni-NTA Superflow カラムにより除去した。

### 3-2-2 結合活性評価

表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイには Biacore 4000 system (GE Healthcare) を用

いた。TcSpdSyn は、標準アミンカップリング法により CM7 センサーチップ (GE Healthcare) 上に固定した。固定化は、100  $\mu\text{M}$  S- (5'-アデノシル) -3-チオプロピルアミン (Sigma-Aldrich) の存在下で行った。結合活性評価は、HBS-P+ (GE Healthcare)、2%(v/v) DMSO、1 mM ジチオスレイトール、12.5  $\mu\text{M}$  dcSAM (ペプチド研究所) をラニングバッファーとし、各フラグメント化合物を終濃度 250  $\mu\text{M}$  となるように添加して、25°Cで実施した。

熱シフトアッセイ (TSA) を実施するため、10 mM HEPES pH 7.4、150 mM 塩化ナトリウム、5 $\times$  SYPRO orange (Life Technologies)、0.05 mg/ml TcSpdSyn、4 mM dcSAM、および終濃度 2 mM の各フラグメント化合物を含む反応溶液を調製した。反応は、384 ウェル PCR プレート上で CFX384 リアルタイム PCR 装置 (Bio-Rad Laboratories) を用いて実施した。各プレートには、フラグメント化合物を含まないウェルを準備し、同時に測定を行うことでネガティブコントロールとした。25°Cで 1 分静置した後、温度を 25°Cから 80°Cまで 0.5 刻みで上昇させた。各温度では 10 秒の平衡化時間を設け、蛍光を測定した。変性曲線の作成と  $T_m$  値の算出は、CFX Manager ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories) を用いて行った。 $T_m$  値を、ネガティブコントロールウェルの  $T_m$  値と比較することによって、フラグメント化合物が TcSpdSyn の熱安定性を向上させたかどうかを判断した。

### 3-2-3 阻害活性評価

各化合物の阻害活性は、TcSpdSyn と SSAT1 の酵素カップリングアッセイにより評価した。SSAT1 は、アセチルコエンザイム A からスペルミジンへのアセチル基の転移を触媒する酵素であり、副産物としてコエンザイム A を生成する。7-ジエチルアミノ-3-(4'-マレイミジルフェニル)-4-メチルクマリン (Thermo Fisher Scientific) を用いて、コエンザイム A を定量した。以下の反応溶液を化合物存在下および非存在下で 30 分静置することにより反応を行った：50 mM HEPES pH 7.5、10  $\mu\text{M}$  EDTA、0.01%(v/v) Tween 20、143 nM TcSpdSyn、50  $\mu\text{M}$  dcSAM、50  $\mu\text{M}$  プトレシン、15  $\mu\text{M}$  アセチルコエンザイム A、0.83 nM SSAT1。励起波長を 405 nm、蛍光波長を 510 nm として、蛍光シグナルを Paradigm プレートリーダー (Molecular Devices LLC) で測定した。IC<sub>50</sub> 値は 2 回に独立した実験の平均値として算出した。本アッセイで 4MCHA の IC<sub>50</sub> 値は 1.7  $\mu\text{M}$  と算出され、既報

値と同等であった。

#### 3-2-4 結晶構造解析

シッティングドロップ蒸気拡散法により室温にて結晶化を行った。結晶化の前に、15 mg/ml の TcSpdSyn に終濃度 2 mM の dcSAM を添加した。化合物との共結晶化では、各化合物を TcSpdSyn、dcSAM 混合溶液に終濃度 5 mM となるように添加した。リザーバー溶液の組成は、100 mM bis-Tris、pH 5.5-6.5、200 mM 硫酸アンモニウム、10-15%(w/v) ポリエチレングリコール 4000 であった。析出した結晶は、抗凍結剤として 20%(v/v) グリセロールを含む人工母液に移してから、液体窒素で瞬間冷却した。X 線回折データは、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設（茨城県つくば市）の AR-NE3A ビームラインにおいて、サンプル交換ロボットと自動データ収集システムを用いて収集した [20-22]。構造は、*Phaser* [23]を用いて分子置換法で決定した。タンパク質構造データバンク（PDB）に登録されている TcSpdSyn のアポ体構造（PDB ID: 3BWB; Structural Genomics of Pathogenic Protozoa Consortium, unpublished work）をサーチモデルとして用いた。サーチモデルではディスオーダーしていた部分は *Coot* [24]を用い、手動で構築した。*REFMAC* [25, 26]による構造精密化後、dcSAM および各化合物を電子密度マップ上で明瞭に観測し、*AFITT*（OpenEye Scientific）を用いてフィッティングした。dcSAM および各化合物のディクショナリーは *AFITT* を用いて生成し、*REFMAC* で構造精密化した。最終構造は PDB に登録した。データ処理および精密化の統計値を Table 3-1 に示す。

Table 3-1 データ収集および構造精密化における統計値（次頁へつづく）  
最外殻の値は括弧内に示す。

Compound	dcSAM	dcSAM + 4MCHA	dcSAM + <b>21</b>	dcSAM + <b>22</b>
PDB ID	4YUV	4YUW	4YUX	4YUY
Space group	$P2_1$	$P2_12_12$	$P2_1$	$P2_1$
$a$ (Å)	44.4	95.2	44.8	44.8
$b$ (Å)	92.4	141.2	93.9	94.1
$c$ (Å)	68.3	43.7	68.0	68.2
$\alpha$ (°)	90	90	90	90
$\beta$ (°)	99.8	90	100.2	100.4
$\gamma$ (°)	90	90	90	90
Resolution (Å)	24.71-1.60 (1.64-1.60)	31.39-1.97 (2.02-1.97)	24.84-1.60 (1.64-1.60)	31.58-1.58 (1.62-1.58)
Multiplicity	3.5 (3.3)	6.0 (5.7)	3.6 (3.4)	3.7 (3.2)
Average $I/\sigma(I)$	14.0 (3.4)	37.9 (14.6)	10.0 (4.0)	38.6 (9.6)
$R_{\text{merge}}^a$ (%)	6.0 (15.7)	7.4 (15.6)	5.9 (11.3)	10.4 (22.2)
No. of reflections	65545 (4971)	39164 (2741)	62982 (4859)	71049 (5283)
Completeness (%)	96.8 (99.9)	97.2 (94.0)	91.1 (95.8)	98.8 (99.2)
$R_{\text{work}}^b$ (%)	19.6	18.5	17.8	19.8
$R_{\text{free}}^c$ (%)	24.2	23.3	21.8	23.6
Average $B$ factor (Å <sup>2</sup> )				
Protein	21.6	12.8	18.6	17.0
dcSAM	17.3	13.9	14.8	13.3
Ligand	-	11.3	19.4	24.2
Water	27.5	18.8	25.4	24.3
RMSD bond length (Å)	0.023	0.019	0.024	0.022
RMSD bond angle (°)	2.302	1.994	2.283	2.206
Ramachandran plot (%)				
Preferred	95.6	96.2	95.5	95.4
Allowed	3.8	3.1	3.6	4.1
Outliers	0.5	0.7	0.9	0.5

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i - I|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i}$ , where  $I_i$  is the intensity of an individual reflection and  $I$  is the mean intensity obtained from multiple observations of symmetry related reflections. <sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$  <sup>c</sup> 5% randomly omitted reflections were used for  $R_{\text{free}}$

Table 3-1 (前頁からのつづき)

Compound	dcSAM	dcSAM	dcSAM	dcSAM
	+	+	+	+
	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>
PDB ID	4YUZ	4YU0	4YU1	4YU2
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
$a$ (Å)	43.5	43.6	43.4	43.7
$b$ (Å)	99.7	99.8	99.3	100.3
$c$ (Å)	134.6	135.0	135.1	71.4
$\alpha$ (°)	90	90	90	90
$\beta$ (°)	91.7	90.6	90.5	107.7
$\gamma$ (°)	90	90	90	90
Resolution (Å)	29.73-1.97 (2.02-1.97)	29.61-1.95 (2.00-1.95)	34.15-1.85 (1.90-1.85)	26.66-2.17 (2.23-2.17)
Multiplicity	3.4 (3.0)	3.4 (3.3)	3.6 (3.5)	3.4 (3.4)
Average $I/\sigma(I)$	35.5 (8.5)	26.5 (4.3)	23.5 (3.1)	8.6 (1.6)
$R_{\text{merge}}^a$ (%)	14.9 (25.4)	6.9 (35.5)	6.9 (44.6)	7.1 (35.0)
No. of reflections	74896 (5204)	76898 (5559)	92299 (6826)	28723 (2122)
Completeness (%)	97.6 (92.7)	96.3 (94.9)	99.5 (99.5)	97.5 (98.4)
$R_{\text{work}}^b$ (%)	20.0	20.9	19.6	22.0
$R_{\text{free}}^c$ (%)	25.0	25.3	24.5	28.2
Average $B$ factor (Å <sup>2</sup> )				
Protein	30.9	29.1	24.7	37.4
dcSAM	35.1	31.6	28.4	36.9
Ligand	40.4	32.8	43.0	45.2
Water	32.5	30.0	28.3	32.3
RMSD bond length (Å)	0.018	0.019	0.018	0.015
RMSD bond angle (°)	1.978	2.057	2.000	1.943
Ramachandran plot (%)				
Preferred	96.1	96.4	96.0	95.0
Allowed	3.3	3.0	3.3	4.6
Outliers	0.6	0.6	0.6	0.4

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 ヒト由来スペルミジン合成酵素との比較

TcSpdSyn と dcSAM の複合体結晶構造を 1.6 Å 分解能で決定した。TcSpdSyn はホモ二量体を形成しており、dcSAM は各単量体に 1 分子結合していた。全体構造は、ヒト由来スペルミジン合成酵素 (HsSpdSyn) に類似していた (Figure 3-2A) [27]。HsSpdSyn は、N 末端  $\beta$  シートドメイン、セントラルコアドメイン、C 末端ドメインによって構成されている。TcSpdSyn と HsSpdSyn の顕著な違いは N 末端および C 末端ドメインにみられた。TcSpdSyn では、3 つのアミノ酸残基、Lys50、Gly51、Pro52 が、HsSpdSyn の Thr58 と Tyr59 (TcSpdSyn の Pro49 と Trp53 に相当) の間に挿入されていた (Figure 3-2B)。これらの 3 残基は溶媒に露出している。C 末端ドメインにおいては、HsSpdSyn では Gln268 から Met274 にかけて短い  $\alpha$  ヘリックスが形成されている一方、TcSpdSyn では相当する領域に Pro266 を含むために  $\alpha$  ヘリックスは形成されていない (Figure 3-2C)。この領域もまた溶媒に露出している。したがって、TcSpdSyn と HsSpdSyn の違いは、基質結合ポケットを含むセントラルコアドメインには影響しないものと思われた。

既に報告されているように、HsSpdSyn の残基番号 174 から 182 までの領域はフレキシブルな「ゲートキーピング」ループを形成している [27]。HsSpdSyn-MTA 複合体構造ではゲートキーピングループは依然フレキシブルであるが、プトレシンまたはスペルミジンが HsSpdSyn-MTA に結合することによって、ループの構造が安定化し、活性ポケットが形成されることが明らかとなっている。このループ中に含まれる Asp176 は、プトレシンの  $N^4$ -アミノ基あるいはスペルミジンの  $N^6$ -アミノ基と水素結合している。この水素結合は活性ポケット形成にとって重要な相互作用と考えられる。同様に、TcSpdSyn もゲートキーピングループ (残基番号 169-177) を有している。TcSpdSyn アポ体構造 (PDB ID: 3BWB) では、ゲートキーピングループはディスオーダーしている。一方、本研究で決定した TcSpdSyn-dcSAM 複合体構造においては、ゲートキーピングループを明瞭に観測することができた (Figure 3-3A)。したがって、TcSpdSyn においては、dcSAM のみの結合によってもゲートキーピングループが安定化されることが明らかとなった。HsSpdSyn の Asp176 に相当する Asp171 の側鎖は、ホモ二量体中のチェーン A と B との間で異なるコンフォメーションをとっていた。チェーン A では Asp171 の側鎖がポケッ

トの外側を向いている一方、チェーン B ではポケットの内側を向いていた。このことから、活性ポケットは dcSAM の結合だけでは完全に安定化されないことが示唆された。なお、TcSpdSyn に対する dcSAM の結合様式は、HsSpdSyn に対するものと同様であった。すなわち、アデニン環が Asp149、Pro175、Gly150 主鎖の窒素原子とそれぞれ水素結合し、リボース上の 2 つのヒドロキシル基が Gln40、Asp118 と水素結合し、アミノプロピル基の窒素原子が Asp98 および Asp168 と水素結合していた (Figure 3-3B)。

TcSpdSyn、dcSAM および 4MCHA の 3 者複合体の構造も決定した。Asp171 の側鎖は、チェーン A、B のどちらにおいてもポケット内側を向き、4MCHA のアミノ基と水素結合していた (Figure 3-3C)。この 3 者複合体構造におけるゲートキーピンググループの構造は TcSpdSyn、dcSAM の 2 者複合体構造のそれと概ね同様であったが、Ala173 と Gly174 の間のペプチド結合がフリップしている点のみ異なっていた。4MCHA のアミノ基は、Glu14 および Glu203 にそれぞれ結合した 2 つの水分子とも水素結合していた。さらに、シクロヘキシル部分は Tyr237 のフェニル環とファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用を形成していた。

フラグメント化合物のスクリーニングは、TSA および SPR アッセイにより実施した。スクリーニングの当初の目的は、4MCHA 同様、プトレシン結合ポケットに結合する阻害剤を同定することにあつた。なぜならば、dcSAM は強固に結合しており、また、フラグメント化合物では dcSAM 結合ポケットを十分に占有することは難しいと思われたためである。上述の構造解析結果に基づき、dcSAM の結合によって形成されたプトレシン結合ポケットに結合するフラグメント化合物を同定するため、TSA および SPR アッセイは dcSAM 存在下で行った。TSA および SPR アッセイは、各フラグメント化合物の濃度を 1 種類に固定して実施した。次に、TSA において TcSpdSyn-dcSAM 複合体の  $T_m$  値を上昇させたフラグメント化合物および SPR アッセイで同複合体への結合がみられたフラグメント化合物をそれぞれ選択して、TcSpdSyn、dcSAM、フラグメント化合物の 3 者複合体の結晶構造解析を試みた。本章では、Figure 3-4 に示す化合物 **21** から **26** との複合体構造を報告する。**21** から **26** は TcSpdSyn を化合物濃度依存的に阻害し、その  $IC_{50}$  値が算出できた。Figure 3-4 に示すように、各フラグメント化合物は結晶構造中で明瞭に観測された。次項ではフラグメント化合物の結合サイト、結合様式および阻害機構について議論する。

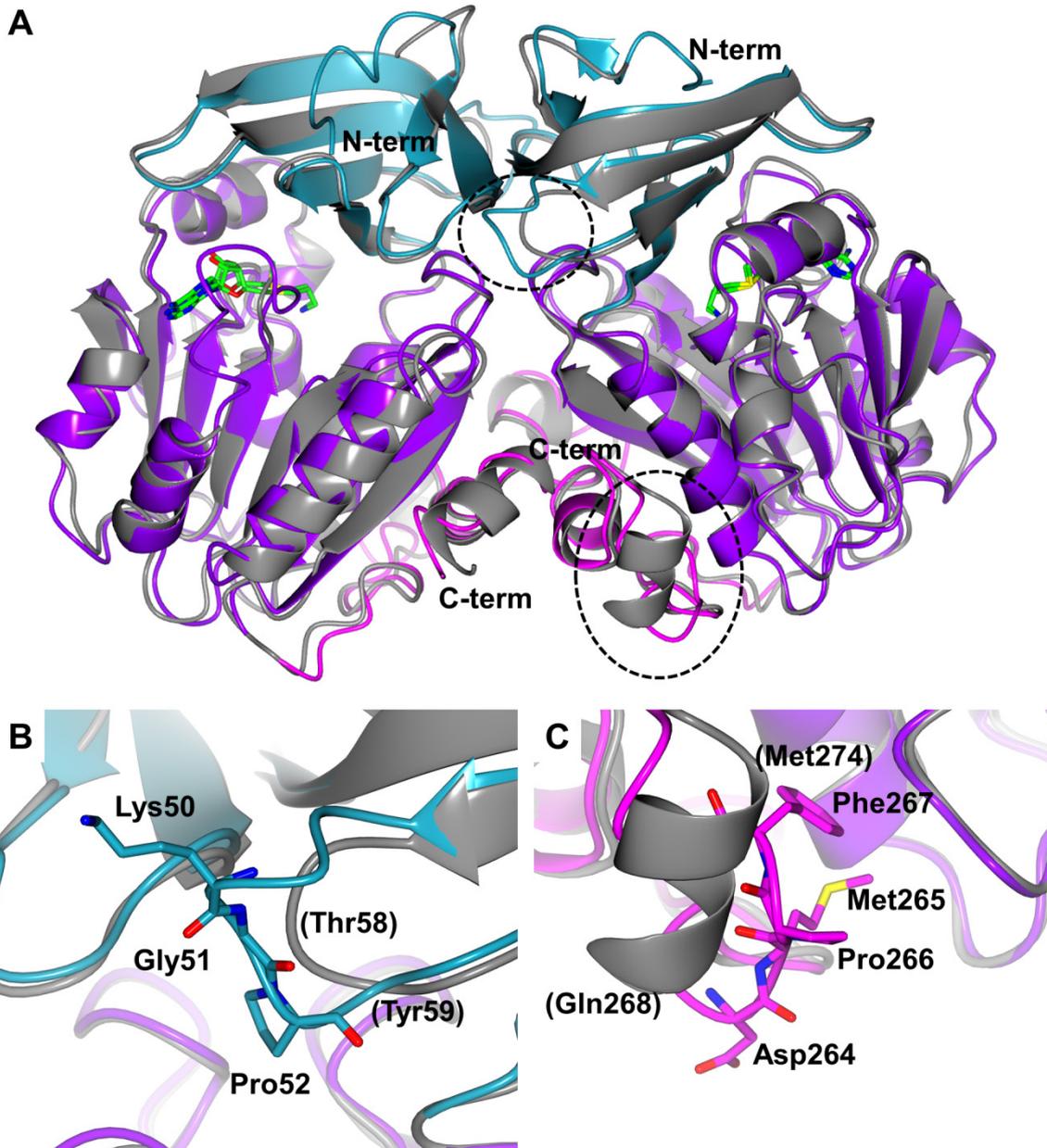


Figure 3-2 TcSpdSyn と HsSpdSyn の比較

(A) TcSpdSyn と HsSpdSyn の二量体構造を重ね合わせ、リボン図で示した。TcSpdSyn の N 末端ドメインをシアン、セントラルコアドメインを紫、C 末端ドメインをマゼンタで示す。HsSpdSyn は灰色で示す。dcSAM は緑のスティックモデルで示す。TcSpdSyn と HsSpdSyn との間で異なる構造をとっている領域を破線で示した。(B、C) N 末端ドメイン(B)、C 末端ドメイン(C)における TcSpdSyn と HsSpdSyn の違いを示す。HsSpdSyn のアミノ酸ラベルは括弧で括った。

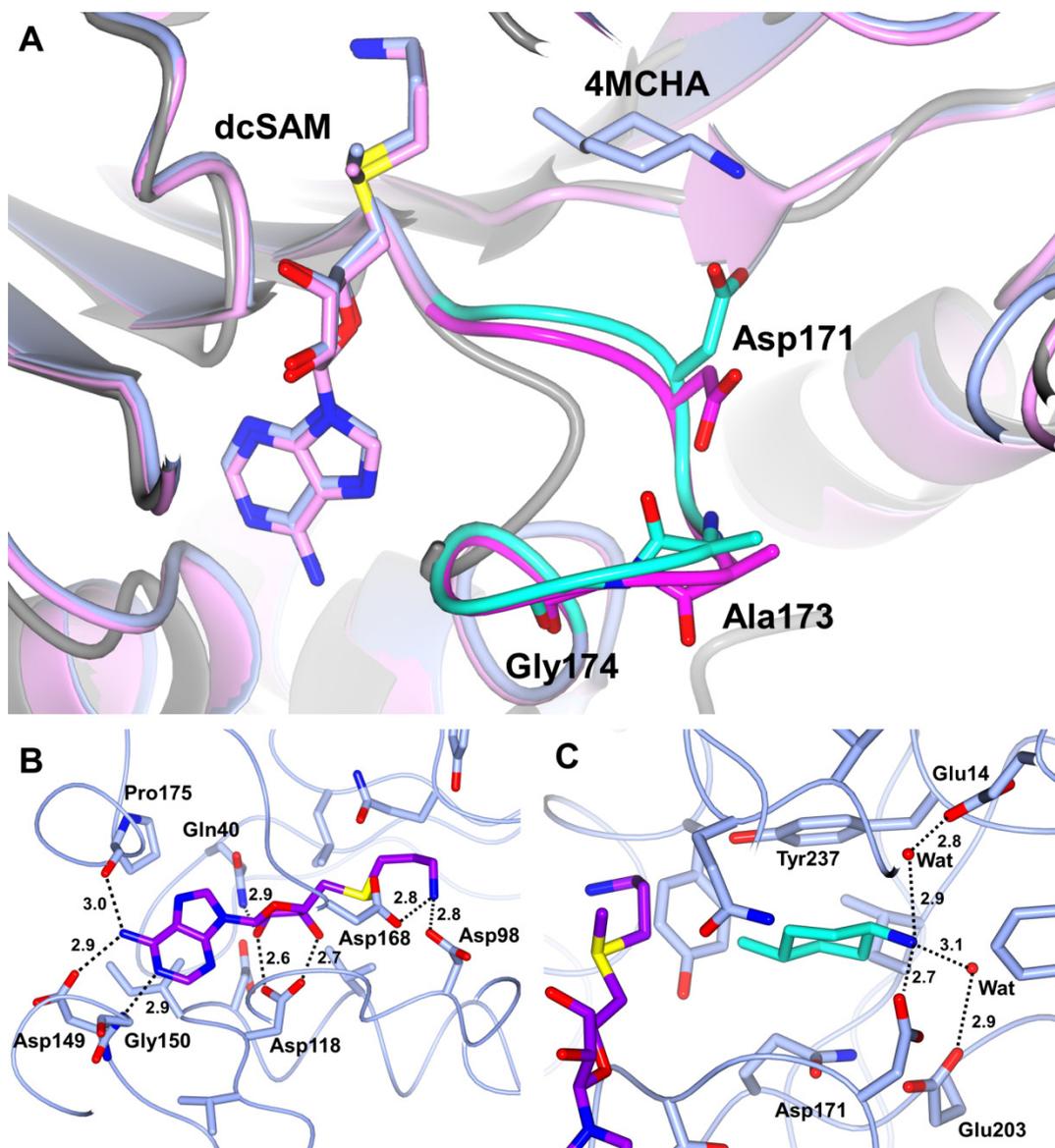
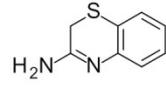
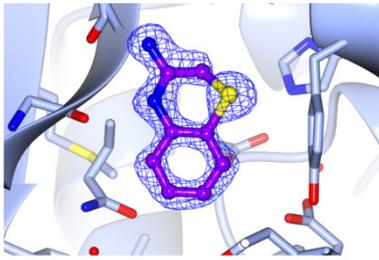
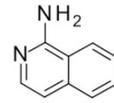
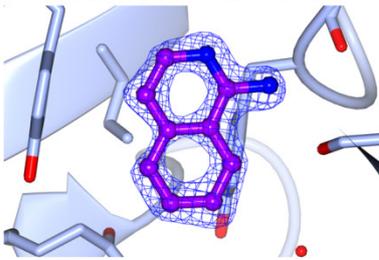


Figure 3-3 TcSpdSyn 基質結合ポケットの構造および dcSAM、4MCHA の結合様式

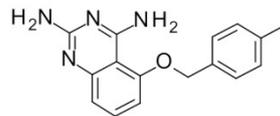
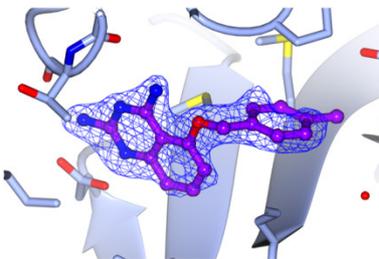
(A) TcSpdSyn のアポ体 (PDB ID: 3BWB)、dcSAM との 2 者複合体、dcSAM、4MCHA と 3 者複合体の重ね合わせ。dcSAM と 4MCHA はスティックモデルで示す。タンパク質はリボン図で示す。アポ体は灰色、2 者複合体はピンク、3 者複合体は水色で示す。2 者複合体のゲートキーピンググループはマゼンタ、3 者複合体はシアンで示し、Asp171、Ala173、Gly174 をスティックモデルで併せて表示した。(B) 2 者複合体中の dcSAM の結合様式。dcSAM を紫のスティックモデルで示す。dcSAM と相互作用するアミノ酸残基を水色のスティックモデルで示す。(C) 3 者複合体中の 4MCHA の結合様式。4MCHA はシアンのスティックモデルで示す。4MCHA と相互作用するアミノ酸残基は水色のスティックモデルで示す。水素結合は、距離 (Å) とともに点線で示す。



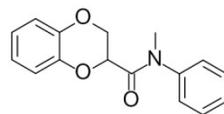
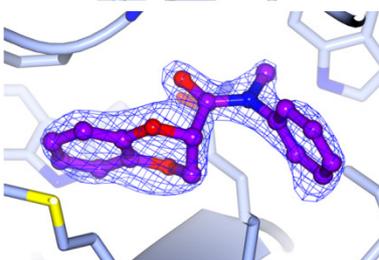
**21**  
 $IC_{50} = 180 \mu M$



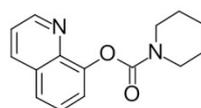
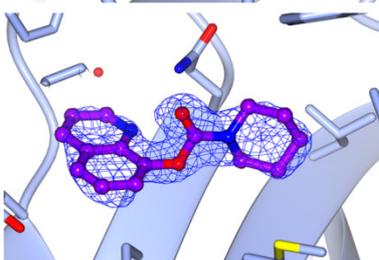
**22**  
 $IC_{50} = 460 \mu M$



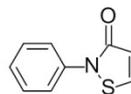
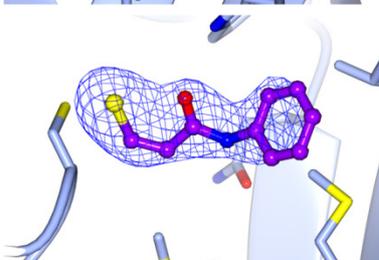
**23**  
 $IC_{50} = 9.1 \mu M$



**24**  
 $IC_{50} = 530 \mu M$



**25**  
 $IC_{50} = 830 \mu M$



**26**  
 $IC_{50} = 0.051 \mu M$

Figure 3-4 化合物 **21** から **26** の  $F_o - F_c$  オミット電子密度マップ ( $2.5\sigma$ ) および構造式  
化合物は紫のボール&スティックモデル、タンパク質は水色のリボン図とスティックモデルで示す。阻害活性評価における  $IC_{50}$  値を併せて表示した。

### 3-3-2 基質結合部位に結合するフラグメント化合物

フラグメント化合物複合体の結晶構造解析により、2つの結合部位が存在することが明らかとなった (Figure 3-5)。一方は、当初の予想通りプトレシン結合ポケットであり、他方は二量体界面であった。**21** および **22** は、プトレシン結合ポケットに結合していた (Figure 3-6)。どちらの化合物もプトレシン結合ポケットで生じた誘導適合 (induced-fit) 機構により認識されていた (Figure 3-6A)。すなわち、Tyr237 側鎖が下方にフリップしたことで、Asp69 および Thr236 の側鎖、Ile63、Gln64 および Thr236 の主鎖の酸素原子がポケット内に露出し、これらの側鎖および主鎖が化合物の認識に関わっていた。**21** のアミノ基は Thr236 の側鎖および主鎖と水素結合していた (Figure 3-6B)。さらに、**21** は Asp69 側鎖に結合した水分子と水素結合していた。チアジン環の窒素原子はプロトン化され、Ile63 に対する水素結合供与体として働いている可能性が高いと考えられた。ベンゼン環は dcSAM のプロピル基とファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用を形成していた。**22** も Ile63 および Thr236 主鎖と水素結合し、**21** と同様にベンゼン環が dcSAM のプロピル基とファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用を形成していた (Figure 3-6C)。どちらの化合物も Asp171 と相互作用していなかったが、ゲートキーピンググループの構造は TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA 複合体と同様であり、TcSpdSyn-dcSAM 複合体とはやや異なっていた。すなわち、Asp171 がポケット内側を向き、Ala173 と Gly174 との間のペプチド結合は 4MCHA 複合体と同様であった (Figure 3-6D)。このことから、ゲートキーピンググループの構造安定化には必ずしも Asp171 との相互作用が必要というわけではなく、むしろ、リガンドがプトレシン結合ポケットを占有することが必要であることが示唆された。**21** および **22** の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 180、460 μM であり強い阻害活性を示さなかったが、誘導適合機構により **21** および **22** の周囲に生じた空間を埋めるように最適化合成を行うことで、阻害活性の向上を図ることができる。

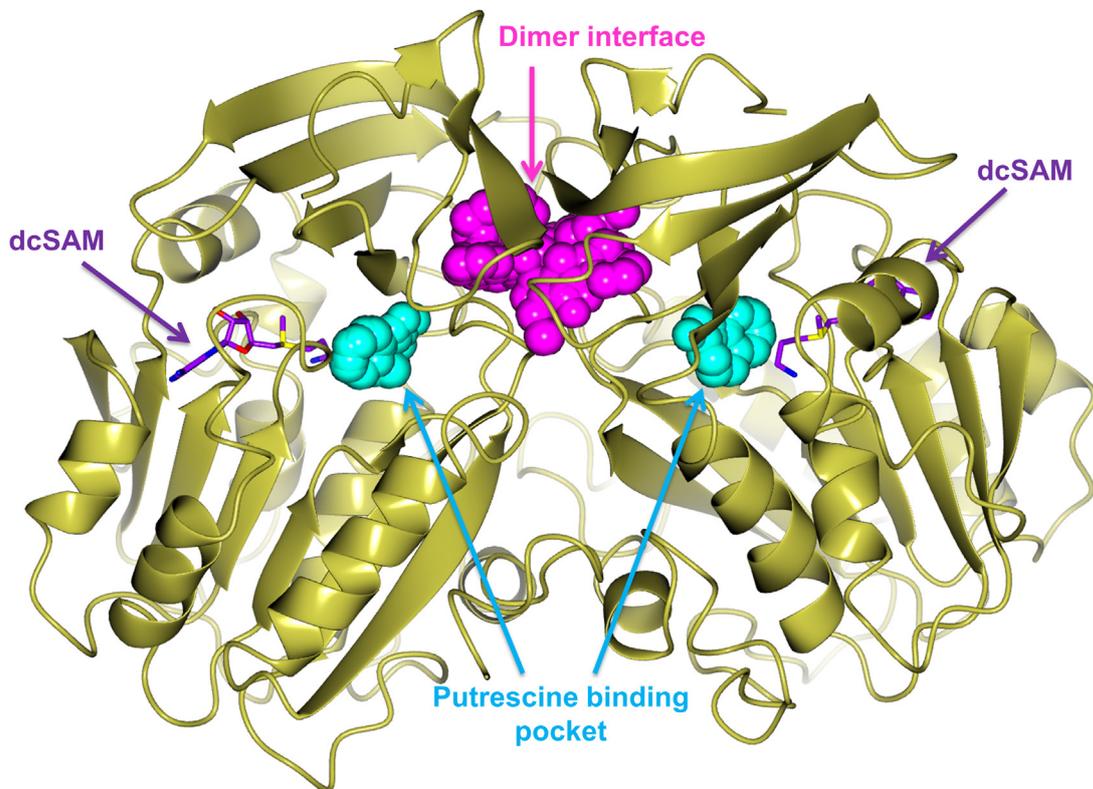


Figure 3-5 フラグメント化合物結合部位の概観

TcSpdSyn はリボン図で示した。dcSAM は紫のスティックモデル、プトレシン結合ポケットに結合した化合物はシアン空間充填モデル、二量体界面に結合した化合物はマジェンタの空間充填モデルで示す。

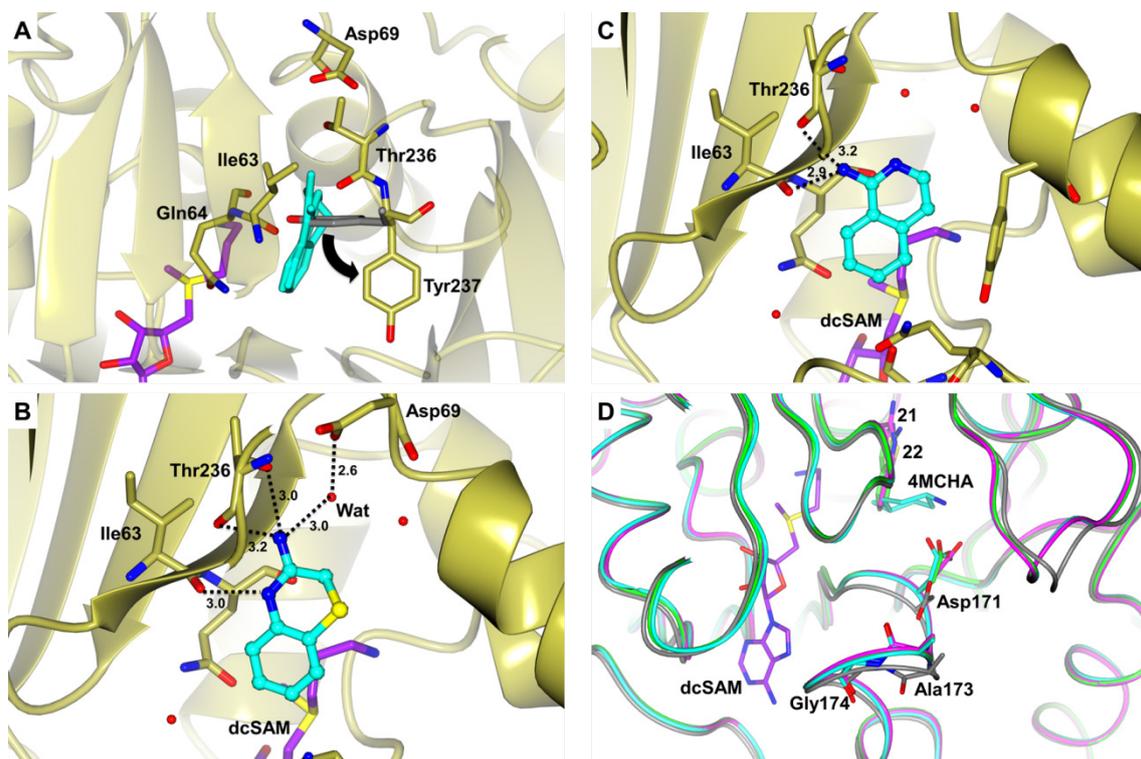


Figure 3-6 プトレシン結合ポケットに結合した化合物の結合様式

各々の図で化合物 **21** および **22** はシアン、dcSAM は紫、水分子は赤い球で示す。TcSpdSyn は、ゴールドのリボン図およびスティックモデルで示す。(A) 化合物の結合による誘導適合。TcSpdSyn-dcSAM 複合体における Tyr237 の側鎖を灰色のスティックモデルで示す。(B、C) **21** (B) および **22** (C) の結合様式。水素結合を距離 (Å) とともに点線で示す。(D) TcSpdSyn-dcSAM (灰色)、TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA (シアン)、TcSpdSyn-dcSAM-**21** (マゼンタ) および TcSpdSyn-dcSAM-**22** (緑) の重ね合わせ。

### 3-3-3 二量体界面に結合するフラグメント化合物

化合物 **23** から **26** は、当初予想されていなかった TcSpdSyn ホモ二量体の界面に結合していた (Figure 3-7)。**23** から **25** については、1 分子の化合物が二量体界面に生じた空間を占有するように結合していた。もしも二量体界面が完全に対称であったならば、2 分子の化合物が界面に観測され占有率はどちらも 0.5 となるはずだが、結晶中のタンパク質分子のパッキングが影響し完全には対称とならなかったために、1 分子のみが観測されたものと思われた。一方、**26** は、2 分子が界面に結合し、TcSpdSyn と共有結合を形成していた。

**23** は二量体界面において一方の単量体と 4 本の水素結合を形成していた (Figure 3-7A)。キナゾリン 2 位のアミノ基は Glu14 の側鎖および Thr236 主鎖の酸素原子と水素結合を形成し、4 位のアミノ基は Pro235 主鎖の酸素原子と水素結合していた。キナゾリンのベンゼン部分と Met24 の *S*-メチル基は CH- $\pi$  相互作用を形成していた。**23** のメチルベンジル基は、もう一方の単量体中の Pro238 と CH- $\pi$  相互作用を形成していた。**24** と **25** は、互いによく似た結合様式を示した (Figure 3-7B、C)。**24** のカルボキサミドの酸素原子および **25** のカーバメートの酸素原子がどちらも Cys239 主鎖の窒素原子と水素結合していた。**24** のベンゾジオキシンおよび **25** のキノリンは Pro238 とファンデルワールス相互作用を形成していた。これらの 3 つの化合物の中では、**23** がもっとも強い阻害活性を示し、IC<sub>50</sub> 値は 9.1  $\mu$ M であった。一方、**24**、**25** の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 530、830  $\mu$ M と、**23** と比較して 50 倍以上大きい値であった。この顕著な違いは結合様式の違いに明らかに相関していると思われた。すなわち、二量体界面への強固な結合は強い阻害活性につながると考えられた。

**26** の結合様式からも、二量体界面への結合の強さと阻害活性の強さに相関があることを示している。**26** の分子量は、**23** から **25** と比較して小さく、2 分子の **26** が界面に結合していた (Figure 3-7D)。イソチアゾロン環は Cys239 のチオール基によって開環し、ジスルフィド結合が形成されていた。酵素アッセイと共結晶化はいずれも非還元状態で実施していることから、酵素反応時においてもこのジスルフィド結合が形成されているものと考えられた。イソチアゾロンはシステインのチオール基とジスルフィド結合を形成することが知られているが、**26** は、Cys239 の他にある 6 種類のシステイン残基には結合していなかった。したがって、**26** は二量体界面に特異的に結合し Cys239 とジスル

フィド結合を形成しているものと思われる。この結合により、**26** は非常に強い阻害活性を示した ( $IC_{50} = 0.051 \mu M$ )。

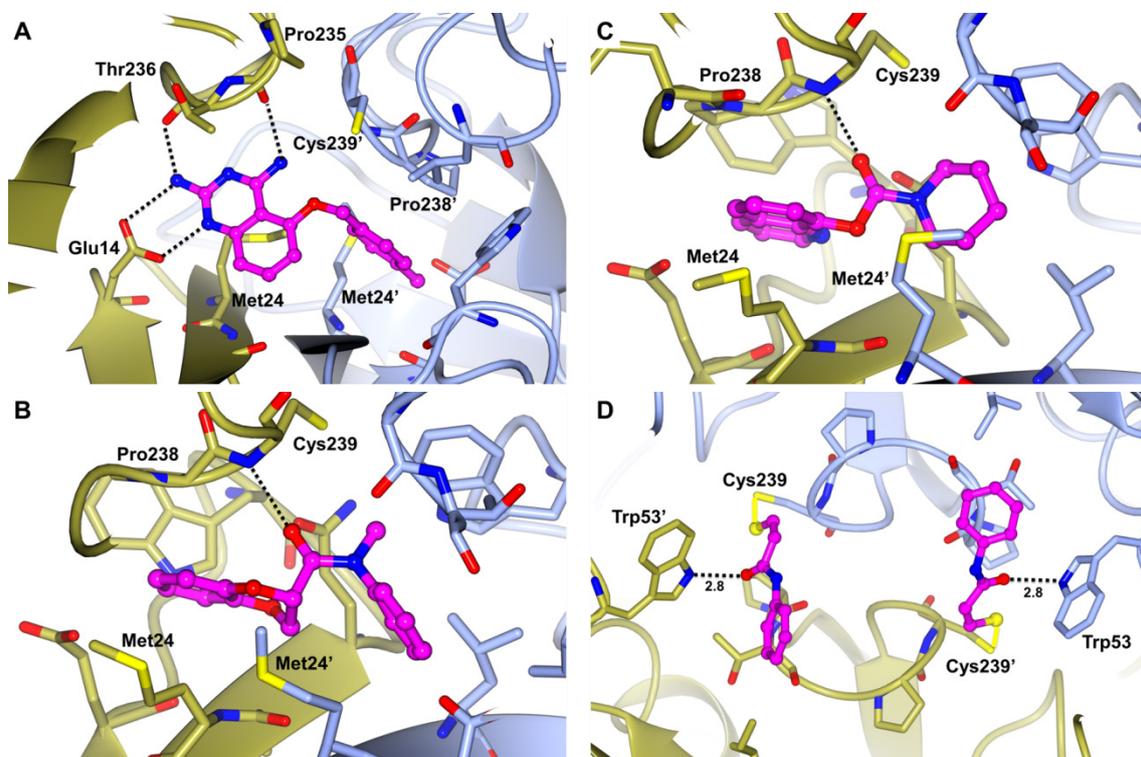


Figure 3-7 二量体界面に結合したフラグメント化合物の結合様式

(A) 化合物 **23**、(B) 化合物 **24**、(C) 化合物 **25**、(D) 化合物 **26**。**23** から **26** はマゼンタのボール&スティックモデルで示し、TcSpdSyn の各モノマーはゴールドと水色でそれぞれ示す。プライムを付したアミノ酸ラベルは反対側のモノマーのアミノ酸残基を示す。水素結合を距離 (Å) とともに点線で示す。黄色の線はジスルフィド結合を示す。

### 3-3-4 非競合阻害機構

**26** の阻害機構について詳細に検討した。TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA 複合体では、Cys239 の硫黄原子と Gln22 側鎖の酸素原子との距離が 3.5 Å であった (Figure 3-8A)。これは、S-O 相互作用に相当する距離である。Gln22 は、二量体にまたがって形成された β シートの中の 1 つの β ストランドの N 末端に存在する。一方、Asn16 から Gln22 までのループ構造はプトレシン結合ポケットの形成を促進していると考えられる。Gln18 の側鎖は、ゲートキーピンググループにある Ala173 主鎖の窒素原子および Asn16 の側鎖と水素結合していた。さらに Trp19 は Asp171 (プトレシンのアミノ基を認識する) とファンデルワールス相互作用を形成していた。*T. cruzi*、*Trypanosoma brucei*、*Leishmania major*、*P. falciparum*、ヒトおよびマウスに由来する SpdSyn のアミノ酸配列を比較すると、トリパノソーマ類だけが、これらの重要なアミノ酸残基、Asn16、Gln18、Trp19、Gln22、Asp171、Cys239 のすべてを保存している。したがって、上述した構造安定化機構はトリパノソーマ類特有のものであるといえる。

**26** は、Cys239 とジスルフィド結合を形成することにより、明らかに Gln22 と Cys239 の相互作用を破壊している (Figure 3-8B)。Gln22 は Cys239 から遠ざかり、Asn16 から Gln22 のループ構造も大きく変化した。このループはプトレシン結合ポケットから離れ、Gln18 側鎖は溶媒側を向いていた。その結果、ゲートキーピンググループはディスオーダーし、プトレシン結合ポケットは形成されていない。これらのことから、Gln22 と Cys239 の相互作用はプトレシン結合ポケットの形成に必須であることが示唆される。逆にいえば、この相互作用を破壊することにより酵素活性を阻害できることになる。

**26** のように共有結合していない **23** から **25** の中では、**23** が明らかに Gln22 に干渉し、Cys239 との相互作用を妨げていた (Figure 3-9A)。**24**、**25** は、Met24 の主鎖および側鎖が動いて生じた空間に結合していたが、Gln22、Ala23 も動いていた (Figure 3-9B、C)。結果として、**24**、**25** も Gln22 と Cys239 の相互作用を破壊している。いうまでもなく、**23** から **25** が結合した TcSpdSyn の構造中ではゲートキーピンググループがディスオーダーしており、プトレシン結合ポケットが形成されていなかった。これは **26** の結合した構造と一致している。

これらの事実から、Gln22 から Met24 のアミノ酸残基はプトレシン結合ポケットの形成において重要な役割を担っているといえる。これらのアミノ酸残基は Asn16 から

Gln22 のループ構造（ゲートキーピンググループと水素結合およびファンデルワールス相互作用を形成している）に影響している。Gln22 から Met24 の近傍にある二量体界面に化合物が結合することによりプロテイン結合ポケットの形成を妨げ、酵素阻害活性が発揮されることになる。二量体界面に結合した化合物は、明らかに基質と直接拮抗しておらず、これは非競合阻害機構であるといえる。

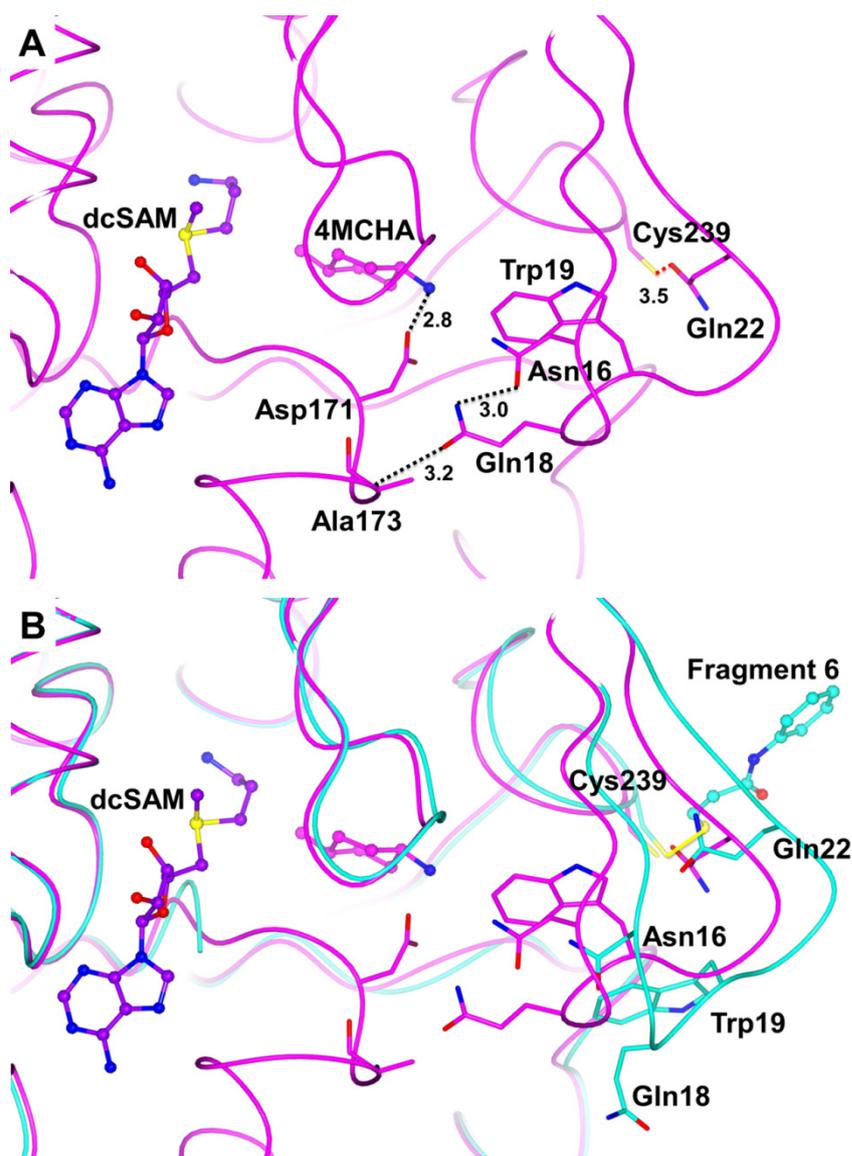


Figure 3-8 化合物 **26** の結合による TcSpdSyn の構造変化

(A) TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA 複合体における N 末端ドメインとプロレシン結合ポケットの相互作用。赤い点線は S-O 相互作用を、黒い点線は水素結合を示す。結合距離 (Å) を併せて示した。(B) TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA 複合体と **26** 複合体の重ね合わせ。TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA をマゼンタ、TcSpdSyn-dcSAM-**26** をシアンで示す。黄色の線はジスルフィド結合を示す。

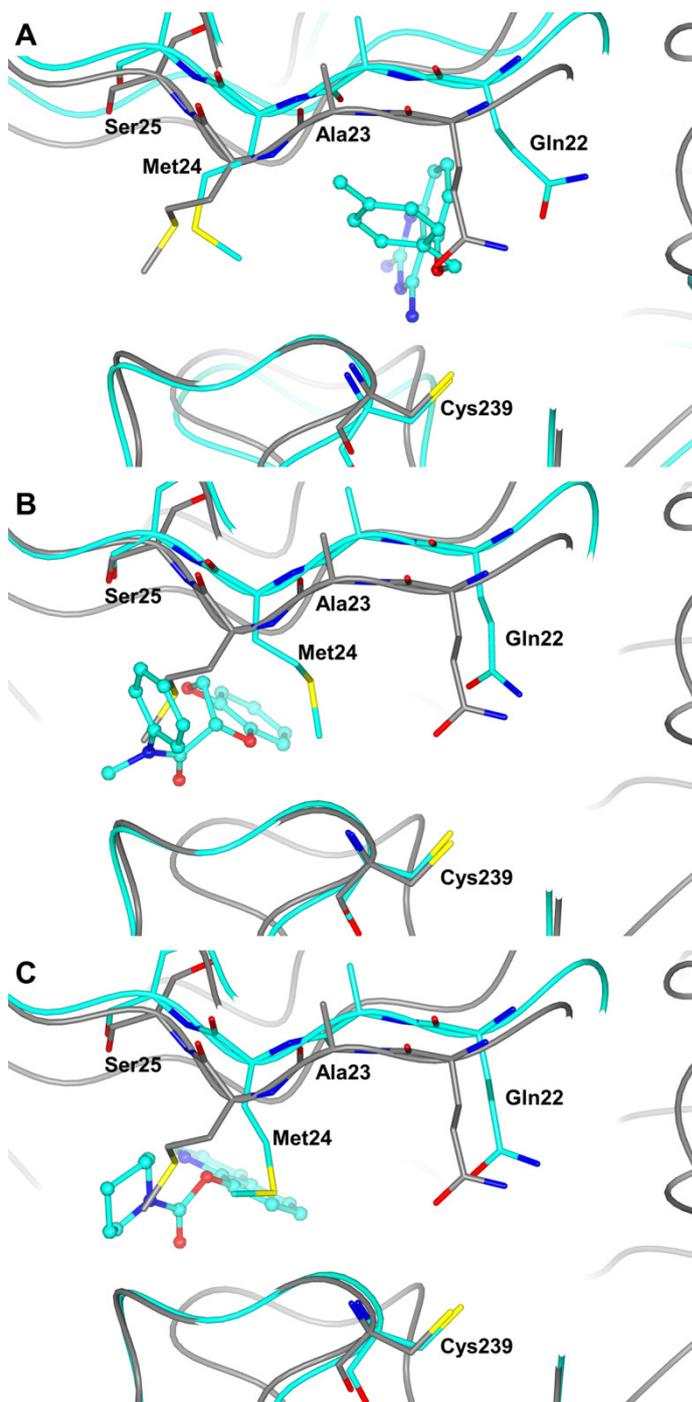


Figure 3-9 化合物 23 (A)、24 (B)、25 (C) の結合による Gln22 と Cys239 の相互作用の破壊

化合物はシアン色のボール&スティックモデルで示す。化合物の結合した TcSpdSyn をシアン、TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA 複合体を灰色で示す。

### 3-4 結論

TcSpdSyn-dcSAM 複合体および TcSpdSyn-dcSAM-4MCHA 複合体の結晶構造をはじめて決定した。そして、dcSAM の結合によってゲートキーピンググループの構造が安定化し、さらに、プトレシンを模倣した阻害剤である 4MCHA の結合によってプトレシン結合ポケットが完全に形成されることを明らかにした。プトレシン結合ポケットの構造は、N 末端ドメインにあるループ構造によっても支えられていることがわかったが、この領域は TcSpdSyn ホモ二量体の界面を形成していた。

フラグメント化合物複合体の結晶構造解析により、2 つの特徴的な阻害機構を明らかにした。一方はプトレシン結合ポケットにおける誘導適合機構であり、他方は二量体界面における非競合阻害機構である。プトレシン結合ポケットでは、誘導適合機構によりポケットが拡張しており、生じた空間を埋めるように、フラグメント化合物を基にした最適化合成を行うことで阻害活性の向上した化合物の取得が期待できる。プトレシン結合ポケットを形成するアミノ酸残基は、TcSpdSyn と HsSpdSyn との間で保存されているが、非競合阻害機構に関わるアミノ酸残基の多くは保存されていない。したがって非競合型阻害剤は TcSpdSyn に対して高い選択性を有することが期待される。本研究において明らかにした TcSpdSyn の構造情報あるいは阻害機構は、新たなシャーガス病治療薬として期待される強力な TcSpdSyn 選択的阻害剤の早期獲得を後押しするものと考えられる。

3-5 引用文献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (2011). *Neglected tropical diseases*, <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/>.
- [2] World Health Organization (2013). *Neglected tropical diseases* [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/).
- [3] World Health Organization (2015). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention (2013). *Chagas disease*, <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>.
- [5] Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Rassi, A., Jr., Marin-Neto, J. A., Dantas, R. O., Maguire, J. H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L. V., Gilman, R. H., Reyes, P. A., Salvatella, R. & Moore, A. C. (2007). *Jama* **298**, 2171-2181.
- [6] Maya, J. D., Salas, C. O., Aguilera-Venegas, B., Diaz, M. V. & Lopez-Munoz, R. (2014). *Curr Med Chem* **21**, 1757-1771.
- [7] Colotti, G., Baiocco, P., Fiorillo, A., Boffi, A., Poser, E., Chiaro, F. D. & Ilari, A. (2013). *Future Med Chem* **5**, 1861-1875.
- [8] Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T. & Cerami, A. (1985). *Science* **227**, 1485-1487.
- [9] Flohe, L., Hecht, H. J. & Steinert, P. (1999). *Free Radic Biol Med* **27**, 966-984.
- [10] Krauth-Siegel, R. L. & Comini, M. A. (2008). *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1236-1248.
- [11] Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M. & Radi, R. (2013). *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3199-3216.
- [12] Ikeguchi, Y., Bewley, M. C. & Pegg, A. E. (2006). *J Biochem* **139**, 1-9.
- [13] Pegg, A. E., Poulin, R. & Coward, J. K. (1995). *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 425-442.
- [14] Coward, J. K. & Pegg, A. E. (1987). *Adv Enzyme Regul* **26**, 107-113.
- [15] Shirahata, A., Morohoshi, T. & Samejima, K. (1988). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **36**, 3220-3222.
- [16] Dufe, V. T., Qiu, W., Muller, I. B., Hui, R., Walter, R. D. & Al-Karadaghi, S. (2007). *J Mol Biol* **373**, 167-177.

- [17] Jacobsson, M., Garedal, M., Schultz, J. & Karlen, A. (2008). *J Med Chem* **51**, 2777-2786.
- [18] Sprenger, J., Svensson, B., Halander, J., Carey, J., Persson, L. & Al-Karadaghi, S. (2015). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **71**, 484-493.
- [19] Zhu, Y. Q., Zhu, D. Y., Yin, L., Zhang, Y., Vonnrhein, C. & Wang, D. C. (2006). *Proteins* **63**, 1127-1131.
- [20] Hiraki, M., Watanabe, S., Phonda, N., Yamada, Y., Matsugaki, N., Igarashi, N., Gaponov, Y. & Wakatsuki, S. (2008). *J Synchrotron Radiat* **15**, 300-303.
- [21] Hiraki, M., Yamada, Y., Chavas, L. M., Wakatsuki, S. & Matsugaki, N. (2013). *J Synchrotron Radiat* **20**, 890-893.
- [22] Yamada Y., H. M., Sasajima K., Matsugaki N., Igarashi N., Amano Y., Warizaya M., Sakashita H., Kikuchi T., Mori T., Toyoshima A., Kishimoto S., Wakatsuki S. (2009). *AIP Conf Proc* **1234**, 415-418.
- [23] McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674.
- [24] Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.
- [25] Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355-367.
- [26] Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255.
- [27] Wu, H., Min, J., Ikeguchi, Y., Zeng, H., Dong, A., Loppnau, P., Pegg, A. E. & Plotnikov, A. N. (2007). *Biochemistry* **46**, 8331-8339.

## 第4章

### 5 型 $17\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素における 誘導適合機構

#### 4-1 緒言

5型 17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (17 $\beta$ -HSD5) は、AKR1C3 とも呼称され、AKR1C サブファミリーに属している。AKR1C サブファミリーは、ケトステロイド類からケトプロスタグランジン類への還元反応を触媒する酵素群である [1]。17 $\beta$ -HSD5 は、ヒトの前立腺に発現し、アンドロステンジオンからテストステロンへの変換を触媒する [2]。テストステロンはさらにジヒドロテストステロン (DHT) に変換されるが、DHT は去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) 患者の前立腺において高い濃度で存在している [3]。したがって、17 $\beta$ -HSD5 の阻害は、CRPC の治療法として有望であると考えられる。

これまでに、30 種類の 17 $\beta$ -HSD5 結晶構造がタンパク質構造データバンク (PDB) で公開されている [4-11]。Lovering らは 17 $\beta$ -HSD5 の結晶構造をはじめて報告したが、アミノ酸配列アライメントから予想されたように、17 $\beta$ -HSD5 は典型的なアルド-ケト還元酵素の構造をとっていた (Figure 4-1) [4]。すなわち、その触媒ポケットは主に 3 つのループ、A (残基番号 116-143)、B (残基番号 217-238)、C (残基番号 298-323) によって形成されていた。既に報告されているように、17 $\beta$ -HSD5 のリガンド結合ポケットは、5 つの区画、すなわちオキシアニオンサイト、ステロイドチャンネルおよび 3 つのサブポケット、SP1、SP2、SP3 に分けることができる (Figure 4-2) [1]。オキシアニオンサイトは、補酵素である NADP<sup>+</sup> と触媒残基である Tyr55、His117 によって構成される。Tyr55 と His117 は AKR1C サブファミリーで保存されているアミノ酸残基である。ステロイドチャンネルは Tyr24、Leu54、Ser129、Trp227 によって形成され、溶媒に向かって開いた構造となっており、基質をオキシアニオンサイトへ誘導する役割を担うと考えられている。SP1 ポケットはリガンド結合ポケットの内部に位置し、Ser118、Asn167、Phe306、Phe311、Tyr319 によって囲まれた領域である。SP2 ポケットは、リガンド結合ポケットの浅い部分に位置し、Trp86、Leu122、Ser129、Phe311 によって囲まれている。さらに、SP3 ポケットは NADP<sup>+</sup> のリン酸部分の近くに位置しており、Tyr24、Glu192、Ser221、Tyr305 によって囲まれている。

主要な 17 $\beta$ -HSD5 阻害剤は、フルフェナミック酸やインドメタシンといった非ステロイド性抗炎症薬を基盤として開発されてきた [12]。これらの阻害剤はカルボン酸部分を含み、オキシアニオンサイトに結合して Tyr55 および His117 と強い水素結合をつくる [4, 13]。カルボン酸部分は強い阻害活性に寄与するが、一方で細胞内への取り込み

にも影響する。近年、いくつかの非カルボン酸阻害剤が同定されている。Heinrich らは、カルボン酸をピロリジノンへ変換することによって新しいタイプの阻害剤を創製している。興味深いことに、それらの阻害剤は強い阻害活性を有するにも関わらず、結晶構造解析の結果、Tyr55 あるいは His117 と直接水素結合していないことが明らかとなった [8]。同じ研究グループは次に、ハイスループットスクリーニング (HTS) によってモルフォリル尿素誘導体を見出した。結晶構造解析により、尿素部分のカルボニル酸素原子がオキシアニオンサイトに結合し、Tyr55 と水素結合することを明らかにしている [10]。

アステラス製薬は、社内に保有する化合物ライブラリーに対して HTS を実施し、非カルボン酸阻害剤を見出している [14]。詳細は報告されていないが、HTS においては、その他にも様々な化学構造をもった非カルボン酸阻害剤が見出されている。本研究では、これらの阻害剤と 17 $\beta$ -HSD5 の相互作用、特にオキシアニオンサイトとの相互作用を明らかにするため、複合体結晶構造解析を行った。Figure 4-3 に本章で複合体構造を報告する 6 種類の化合物およびその阻害活性値を示す。

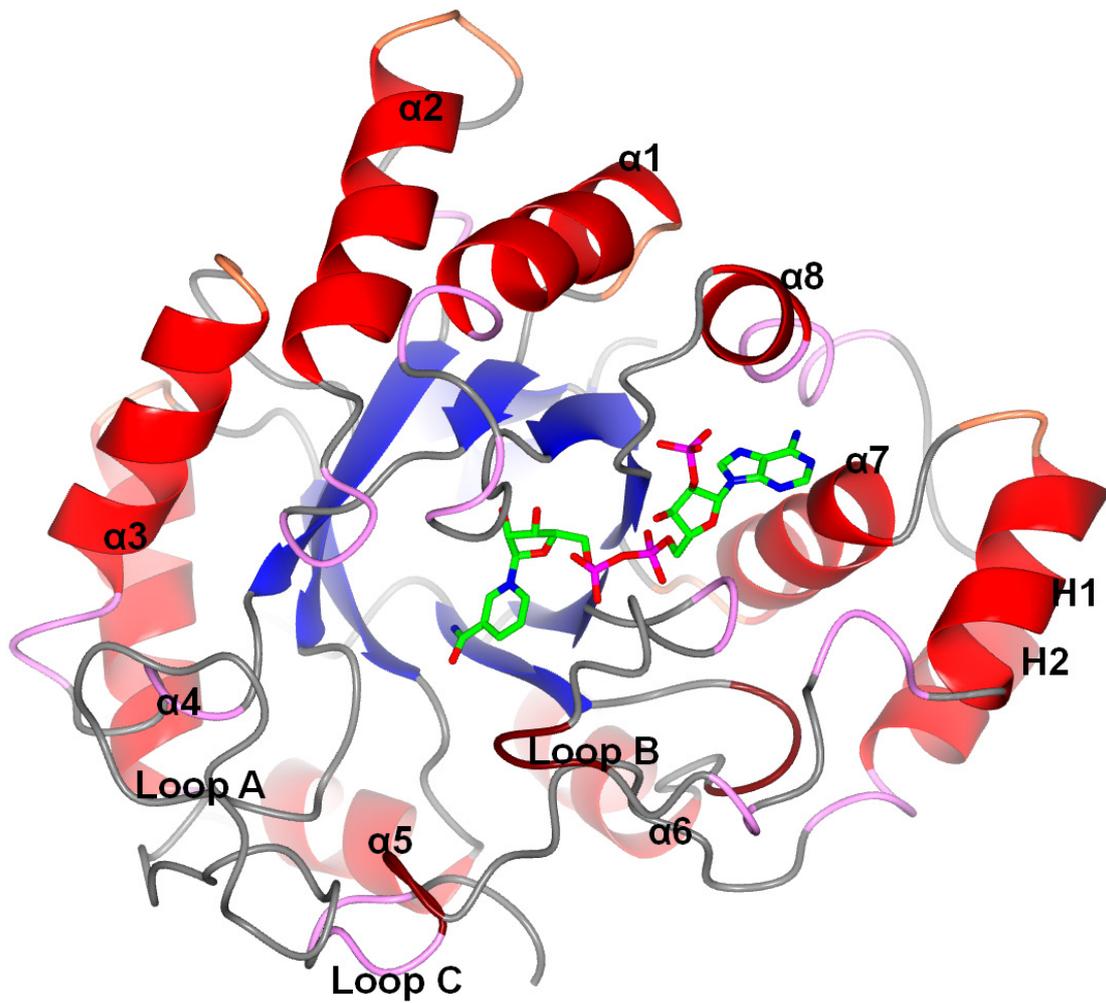


Figure 4-1 17β-HSD5 全体構造のリボン図 (PDB ID: 1S1P)

緑のスティックモデルはNADP<sup>+</sup>を示す。

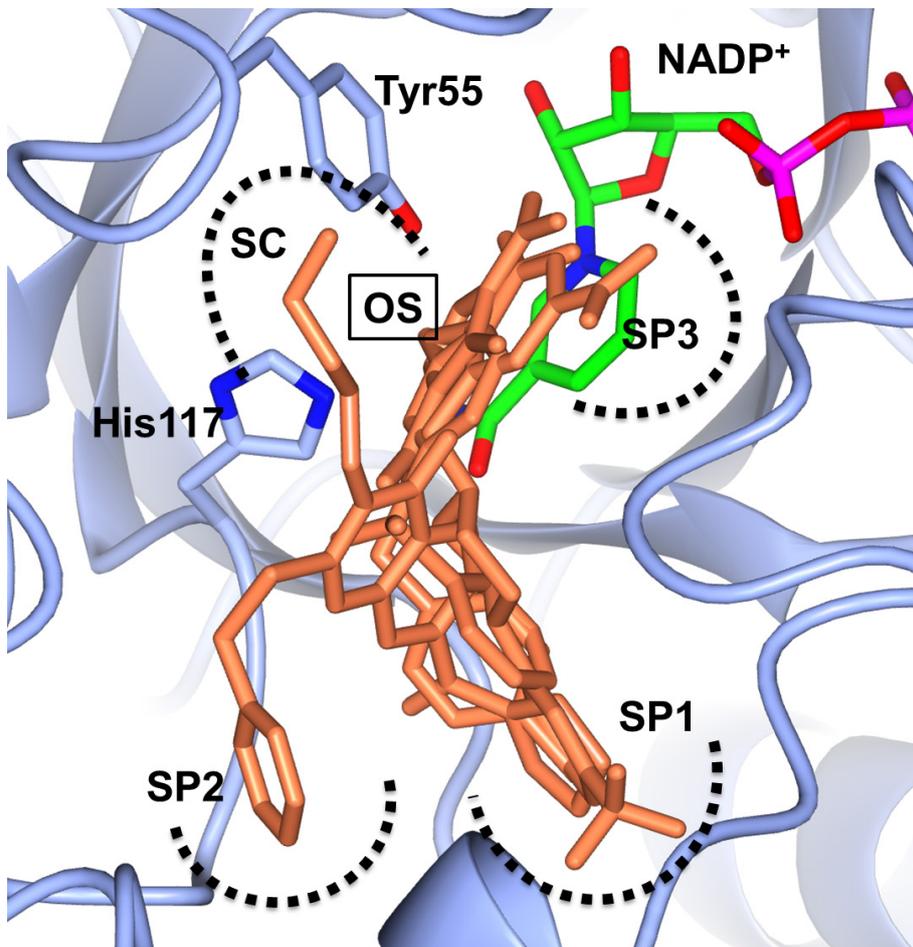


Figure 4-2 化合物 27 から 30 と 17β-HSD5、NADP<sup>+</sup>の 3 者複合体の重ね合わせ  
 橙のスティックモデルが化合物を、緑のスティックモデルが NADP<sup>+</sup>を示す。オキシア  
 ニオンサイト (OS) の位置を文字で示す。サブポケット 1 から 3 (SP1 から 3)、ステロ  
 イドチャンネル (SC) の位置を点線で示す。

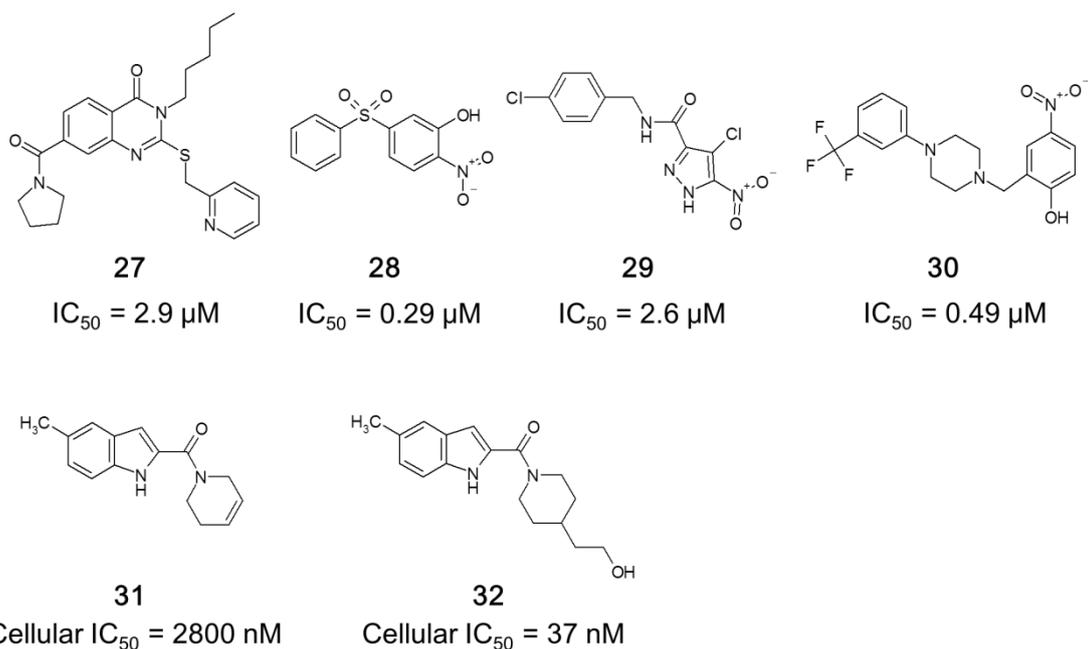


Figure 4-3 化合物 **27** から **32** の構造式

**27** から **30** の  $IC_{50}$  値は 17 $\beta$ -HSD5 酵素阻害活性評価に由来する。**31**、**32** の細胞  $IC_{50}$  値は既報 [14]の値である。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 発現と精製

17 $\beta$ -HSD5 組換えタンパク質の設計、発現および精製は、既報の方法に基づいて行った [4]。ヒト由来 17 $\beta$ -HSD5 の全長 cDNA (GenBank accession No. NM\_003739) を、pET-22 ベクター (Merck Millipore) に組み込み、C 末端にポリヒスチジンタグを融合したタンパク質として、*Escherichia coli* BL21(DE3) で発現した。菌体は TB 培地 (1 リットルあたり、酵母エキス 20 g、ポリペプトン 10 g、リン酸水素二ナトリウム 4.33 g、リン酸二水素カリウム 2.65 g、グリセロール 4 ml を含有) を用い、OD<sub>600</sub> が 3 ないし 4 に達するまで 37°C で培養した。温度を 15°C まで下げた後、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトシドを終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 44 時間培養した。菌体は遠心により回収し、-80°C で保存した。凍結した菌体を溶解バッファー (500 mM リン酸カリウム pH 8.0、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド、0.1%(v/v)  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.2 mg/ml リゾチーム) に懸濁し、超音波破碎した。残渣は遠心によって取り除いた。ポリエチレンジアミンを終濃度 0.05%(v/v) となるように添加し、沈殿物を遠心より取り除いた。硫酸アンモニウムを 60% 飽和濃度となるように加えた後、遠心により上清を取り除き、沈殿物をバッファー A (10 mM リン酸カリウム、pH 7.4、300 mM 塩化ナトリウム、10% グリセロール、20 mM イミダゾール) に溶解した。溶解液を Ni-NTA Superflow カラム (Qiagen) に添加し、カラムをバッファー A で洗浄した後に、イミダゾール濃度を 250 mM に上げてタンパク質を溶出した。溶出液を、バッファー A から塩化ナトリウムとイミダゾールを除いたバッファーで 2 倍希釈してから、Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換カラム (GE Healthcare) に添加し、塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出した。17 $\beta$ -HSD5 を含む分画を回収し、さらに HiLoad 16/60 Superdex 200 ゲルろ過カラム (GE Healthcare) により精製した。ゲルろ過カラムにはバッファー B (10 mM リン酸カリウム、pH 7.4、500 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1 mM ジチオスレイトール) を用いた。結晶化のため、限外ろ過を繰り返して塩化ナトリウムを除去した後、15 mg/ml に濃縮して 4°C に保存した。

#### 4-2-2 結晶構造解析

シッティングドロップ蒸気拡散法により室温にて結晶化を行った。化合物 **27** から **30** と 17 $\beta$ -HSD5 の共結晶は、17 $\beta$ -HSD5 に対してモル比で 5 倍および 3 倍となるように NADP<sup>+</sup> (同仁化学研究所) および化合物をそれぞれ添加して共結晶化することにより得た。**27** から **30** の共結晶化におけるリザーバーの組成は、0.1 M クエン酸ナトリウム、pH 5.5、0.4 M 酢酸アンモニウム、2.5%(v/v) 2-メチル-2,4-ペンタンジオール、22-30%(w/v) ポリエチレングリコール 4000 であった。化合物 **31**、**32** の共結晶化におけるリザーバーの組成は、0.1 M HEPES pH 6.5、0.2 M リン酸二水素アンモニウム、20-25%(w/v) ポリエチレングリコール 3350 であった。**27** から **30** の共結晶の X 線回折データは、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 (茨城県つくば市) の AR-NW12A ビームラインにて収集した [15]。**31**、**32** の共結晶の X 線回折データは、R-AXIS VII (リガク) を搭載した FR-E+ Superbright X 線発生装置 (リガク) により収集した。X 線回折データは *HKL2000* [16] で処理し、既報の 17 $\beta$ -HSD5 結晶構造 (PDB ID: 1S1P) [4] をサーチモデルとして *MOLREP* [17] を用いた分子置換法により構造解析を行った。*REFMAC* [18] による初期精密化後、化合物は明瞭に観測された。*AFITT* (OpenEye Scientific) によりディクショナリを作成し、*REFMAC* による精密化、水分子のピッキングを行い、最終的に結晶構造を決定した。最終構造は PDB に登録した。統計値は Table 4-1 に示す。

#### 4-2-3 阻害活性評価

17 $\beta$ -HSD5 酵素阻害評価は、既報の方法に基づいて実施した [14]。9,10-フェナントレンキノン (9,10-PQ) (Sigma-Aldrich) を基質として用い、340 nm の吸光度を測定することにより、酸化された NADPH を測定した。反応溶液 (100 mM リン酸カリウム、pH 6.0) に、精製した酵素、9,10-PQ、NADPH を、それぞれ終濃度が 10  $\mu$ g/ml、4  $\mu$ g/l、200  $\mu$ M となるように添加した。さらに、被験化合物を添加し、10 から 20 分室温で静置した後、SAFIRE 分光光度計 (TECAN) を用いて 340 nm の吸光度を測定した。用量反応曲線を作成し、IC<sub>50</sub> 値を算出した。

Table 4-1 データ収集および構造精密化における統計値

最外殻の値は括弧内に示す。

Compound	27	28	29	30	31	32
PDB ID	4XVE	4WDT	4WDU	4XVD	4WDW	4WDX
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$I4$	$P1$	$P2_1$
$a$ (Å)	55.3	55.5	55.4	145.8	55.1	60.0
$b$ (Å)	62.6	62.6	62.3	145.8	57.9	77.2
$c$ (Å)	95.7	96.2	96.0	74.3	60.3	72.2
$\alpha$ (°)	90	90	90	90	81.0	90
$\beta$ (°)	90	90	90	90	69.7	97.6
$\gamma$ (°)	90	90	90	90	79.1	90
Resolution (Å)	41.4-1.55 (1.59-1.55)	38.1-1.50 (1.54-1.50)	38.0-1.70 (1.74-1.70)	40.7-2.81 (2.89-2.81)	14.6-1.94 (1.99-1.94)	14.3-1.64 (1.68-1.64)
Multiplicity	3.5 (3.1)	3.9 (3.8)	4.3 (4.1)	3.2 (3.1)	1.9 (1.8)	3.6 (3.3)
Average $I/\sigma(I)$	16.0 (2.1)	18.7 (2.8)	17.3 (2.4)	11.0 (2.6)	6.9 (1.8)	6.7 (1.3)
$R_{\text{merge}}^a$ (%)	10.1 (45.4)	8.1 (39.3)	9.4 (46.2)	10.1 (45.4)	6.0 (23.4)	6.0 (41.5)
No. of reflections	46111 (3277)	47351 (3393)	29604 (2282)	16372 (1202)	44978 (3159)	72670 (5139)
Completeness (%)	99.4 (97.4)	91.5 (91.8)	83.4 (88.0)	90.4 (91.2)	93.6 (91.3)	95.7 (93.2)
$R_{\text{work}}^b$ (%)	18.0	17.8	19.9	20.9	20.2	21.6
$R_{\text{free}}^c$ (%)	20.3	20.4	23.1	25.9	25.3	24.9
Average $B$ factor (Å <sup>2</sup> )	14.9	12.9	15.9	33.6	30.5	27.6
RMSD bond lengths (Å)	0.026	0.026	0.021	0.012	0.019	0.022
RMSD bond angles (°)	2.575	2.532	2.186	1.628	2.131	2.253
Ramachandran plot (%)						
Preferred	96.5	96.8	97.1	96.1	95.9	96.9
Allowed	2.6	2.2	1.9	3.6	2.9	2.7
Outliers	1.0	1.0	1.0	0.4	1.2	0.3

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i - I| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i$ , where  $I_i$  is the intensity of an individual reflection and  $I$  is the mean intensity obtained from multiple observations of symmetry related reflections. <sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|$ . <sup>c</sup> 5% randomly omitted reflections were used for  $R_{\text{free}}$

## 4-3 結果と考察

### 4-3-1 化合物の結合様式

**27** と 17 $\beta$ -HSD5 の複合体結晶は空間群  $P2_12_12_1$  に属し、PDB 登録構造 1S1P と同様な格子定数をもっていた (結晶系 I)。興味深いことに、**27** は Tyr55 あるいは His117 と水素結合していなかった。その代わりに、オキシアニオンサイトに顕著な電子密度が確認された。オキシアニオンサイトに結合した分子を推定することはできなかったが、この分子により **27** の結合様式が影響を受けていることはないと考えられる。**27** のアミド部分の酸素原子は Ser118 の側鎖と水素結合し、ピリジン環の窒素原子は Ser87 と水分子を介して水素結合していた。リンカーの硫黄原子は Ser129 と S-O 相互作用を形成していた。ピロリジン部分は SP1 ポケットに、ピリジン部分は SP2 ポケットに、ペンチル部分はステロイドチャンネルに結合していた。**27** の結合した 17 $\beta$ -HSD5 の全体構造は、PDB 登録構造 1S1P のそれとよく似ていたが (r.m.s.d. = 0.55 Å)、ループ A は溶媒方向に動いており、Phe311 の構造が変化していた。この構造変化は、ループ A に含まれる Val137 の側鎖と、ループ C に含まれる Phe311 の側鎖との間に **27** のピリジン環が挿入されたことによって生じたと考えられる。PDB 登録構造 1S1P では、ループ A とループ C は、Val137 主鎖の窒素原子と Ser310 主鎖の酸素原子との間の水素結合を介して相互作用している。ピリジン環の挿入はこの相互作用を直接破壊していて、それによりループ A がタンパク質の核の部分から離れていると考えられる。ループ A の構造変化により、SP2 ポケットが拡張して溶媒領域へつながるトンネル様ポケットが形成されている。**27** のように SP2 ポケットの奥深くに結合する阻害剤は、ループ A と C の相互作用を破壊する可能性が高い。さらに新しく形成されるトンネル様ポケットと相互作用できるように修飾することでタンパク質との親和性を高めることができると考えられる。

**28** と 17 $\beta$ -HSD5 の複合体結晶は結晶系 I に属していた。**28** は、オキシアニオンサイトおよび SP1 ポケットに結合し、ヒドロキシル基が Tyr55 および His117 と水素結合していた。ニトロ基も Tyr55 および SP3 ポケット内の水分子クラスターのうちの 1 つと水素結合していた。リンカー部のスルフォンは特異的な相互作用に関わっていなかったが、化合物の立体構造を鋭角 (105°) に保つことで、ベンゼン環が SP1 ポケットに結合できるようになっていた。ベンゼン環パラ位の炭素原子は、SP1 ポケットの底部に位置する

Tyr319 と 5 Å 以上離れている。パラ位への置換基導入によって、SP1 ポケットを占有し阻害活性を向上できるものと考えられる。全体構造は PDB 登録構造 1S1P と非常に近く (r.m.s.d. = 0.15 Å)、ループ A と C の相互作用も保持されていた。このことは、**28** が触媒ポケットの奥深くに結合し、SP2 ポケットには侵入していないことと一致する。

**29** と 17β-HSD5 の複合体結晶も結晶系 I に属していた。**29** はオキシアニオンサイトおよび SP1 ポケットに結合していた (Figure 4-5C)。興味深いことに、ピラゾール環の 2 つの窒素原子が、Tyr55 および His117 と水素結合していた。これは、窒素原子と 17β-HSD5 の触媒残基が水素結合している最初の事例である。可能性のある水素結合パターンは、Tyr55 が水素結合供与体として、His117 が水素結合受容体として働いているか、またはその逆である。加えて、アミド部分の窒素原子は、NADP<sup>+</sup>のニコチンアミド部分と水素結合していた。クロロフェニル基は SP1 ポケットの奥深くに結合し、ピラゾール環上の塩素原子は Trp227 および Phe306 とファンデルワールス相互作用を形成していた。全体構造は PDB 登録構造 1S1P と非常に近く (r.m.s.d. = 0.26 Å)、触媒ポケット内のアミノ酸残基の位置、構造もよく似ていた。ループ A と C の相互作用も 1S1P あるいは **28** との複合体構造と同様であった。このことは、**29** が、**28** 同様 SP2 ポケットには結合せずループ A と C の相互作用に干渉していないことと一致する。

**30** と 17β-HSD5 の共結晶化では、空間群 I4 に属する新しい結晶系が得られた (結晶系 II)。非対称単位に 2 分子の 17β-HSD5 が含まれ (チェーン A および B)、**30** はそのどちらにも結合していた。**30** の結合様式およびタンパク質の構造は、2 つのチェーンの間で保存されており (r.m.s.d. = 0.44 Å)、本項ではチェーン A の構造に基づいて記述する。**30** は、オキシアニオンサイト、SP1 ポケットおよび SP3 ポケットの浅い部分に結合していた。ニトロフェノール部分のヒドロキシル基が Tyr55 および His117 と水素結合し、ニトロ基は NADP<sup>+</sup>のリン酸部分および Gln222、Arg223、Asp224 主鎖の窒素原子と、水分子を介して相互作用していた。トリフルオロメチル基は SP1 ポケットの奥深くに結合していた。全体構造は PDB 登録構造 1S1P と似ていたが (r.m.s.d. = 0.80 Å)、ループ C の構造は、主鎖の構造も含め異なっていた。この構造変化は、トリフルオロメチル基が SP1 ポケットに結合することによって生じていると考えられる。ループ A と C の相互作用は、それぞれのループの構造変化により破壊され、どちらも溶媒側に動いていた。さらに Trp227 の側鎖は、**30** のニトロ基が SP3 ポケットに結合したことによってフリップし、ピペラジン部分とファンデルワールス相互作用を形成していた。フリップした

Trp227 は、ループ C に含まれる Phe311 がもともと占めていた位置に干渉していることから、ループ C の構造変化は Trp227 のフリップと関連しているといえる。SP1 ポケットと SP3 ポケットは触媒ポケットの中で反対側に位置しており、互いに独立していると考えられていたが、**30** の複合体構造から互いに干渉しあうことが明らかとなった。

**31** と 17 $\beta$ -HSD5 の複合体結晶構造解析においては、その他の化合物とは異なる結晶化方法が必要とされた。はじめに、既に報告されている方法に基づいて共結晶化を実施したが、結晶は得られなかった。次に、酢酸の結合した 17 $\beta$ -HSD5 の結晶に **31** をソーキングした。ソーキング時間を長くする、化合物濃度を高くする、結晶母液の組成、pH を変更するといった幅広い条件を検討したが、ソーキング後の結晶を用いた構造解析では **31** に相当する電子密度は観測されなかった。最終的に、新しい結晶化条件を探索し、結晶系 I、II のいずれとも明らかに外観の異なる結晶が得られた。この新規結晶系について X 線回折データの収集および構造解析を行った結果、**30** に相当する電子密度を明瞭に観測することができた。結晶は空間群 *P1* に属していた (結晶系 III)。非対称単位には 2 分子の 17 $\beta$ -HSD5 が含まれていて (チェーン A および B)、そのどちらにも **31** が結合していた。チェーン A と B の構造はよく似ていて (r.m.s.d. = 0.42 Å)、**31** の結合様式も保存されていた。しかしながら、チェーン B の Phe306 は、チェーン A のそれよりも明瞭に観測されていて、さらにチェーン A でディスオーダーしている Asn307 と Ser308 がチェーン B では観測されていることから、本章ではチェーン B の構造について記述することとする。**31** のカルボニル酸素原子は Tyr55 および His117 と水素結合し、インドール環の窒素原子は NADP<sup>+</sup> のニコチンアミドと水素結合していた。一方、Asp309 以降の C 末端のアミノ酸残基はすべてディスオーダーしており、したがって SP2 ポケットは形成されていなかった。SP2 ポケットの消失は、SP3 ポケットの入り口にジヒドロピリジン部分が結合することによって生じていると考えられる。ジヒドロピリジン部分を受け入れるために、ループ B に含まれる Trp227 および Phe306 の側鎖がフリップするとともにそれらの C <sup>$\alpha$</sup>  原子の位置が動いている。Phe306 の動きは、それに続く Asn307 の位置も変化させている。一方、PDB 登録構造 1S1P では、ループ B と C が、Trp227 主鎖の酸素原子と Asn307 主鎖の窒素原子との間の水素結合を介して相互作用している。つまり、**31** の結合によって Trp227 と Phe306 が動くことで、ループ C の構造を不安定化させていると考えられる。さらに Phe306 のフェニル環は、**31** のインドール環とファンデルワールス相互作用および弱い CH- $\pi$  相互作用を形成している。**31** のインドール環

はまた、Phe306 の反対側にある Trp86 のインドール環と相互作用している。このサンドイッチ様の結合様式は Phe306 の構造を安定化し、ループ C の構造の不安定化につながっているものと考えられる。加えて、ループ A も、ループ C との相互作用が失われたことによって、溶媒側に移動している。この新たに発見された 17 $\beta$ -HSD5 の構造は結晶中でのみ見られるものではないと考えている。その理由は 2 つあり、1 つは結晶が **31** の存在下でのみ得られていること、もう 1 つは、非対称単位中の他方の 17 $\beta$ -HSD5 分子あるいは対称分子のいずれもループ A、B、C の構造に影響していないことである。

**32** は、**31** にヒドロキシエチル基を導入することにより得られた [14]。**32** は 17 $\beta$ -HSD5 に対して強い阻害活性を示し、それは **31** の 75 倍に相当した。この阻害活性の大幅な増強の理由を明らかにするため、**32** と 17 $\beta$ -HSD5 の複合体結晶構造解析を行った。共結晶化は、**31** の共結晶化条件に基づいて行い、良質な結晶を得ることができた。**32** の共結晶は、**31** よりも回折能が高く、1.64 Å 分解能で結晶構造を決定することができた。空間群は  $P2_1$  であり、**31** の共結晶とは異なっていたが、結晶のパッキングには顕著な違いはなかったことから、**31** と同じ結晶系 III に属するものと判断した。**32** は **31** と同様にオキシアニオンサイトに結合し、Tyr55、His117 および NADP<sup>+</sup> のニコチンアミドと水素結合していた。ヒドロキシルエチル部分は SP3 ポケットに結合し、ヒドロキシル基が NADP<sup>+</sup> のリン酸部分および Gln222 主鎖の窒素原子と水素結合していた。ヒドロキシル基はさらに、Asp224 主鎖の窒素原子と水分子を介して相互作用していた。PDB 登録構造 1S1P では、ヒドロキシル基の位置に水分子が結合しており同様な相互作用を形成していることから、ヒドロキシル基はこの水分子を模倣しているといえる。ループ C は誘導適合 (induced-fit) 機構による構造変化を示した。ループ C の構造が変化し、新たに Asn307 主鎖の酸素原子と Ser310 主鎖の窒素原子の間に水素結合が生じている。Ser310 に隣接する Phe311 の側鎖は、**32** のインドール環とファンデルワールス相互作用および弱い CH- $\pi$  相互作用を形成していた。また、Trp86 側鎖と Phe306 側鎖は、**31** の複合体構造でみられたようにインドール環と相互作用しており、これらのアミノ酸残基によって疎水性のトンネル様ポケットが形成されている。まとめると、**32** の強い阻害活性は、ヒドロキシル基による水素結合ネットワークおよび新たに形成された疎水性トンネルへのインドール環の結合によるものと考えられる。**32** は、アステラス製薬において最適化合成が進められ、経口で生物学的利用能を示す阻害剤 ASP9521 の創製につながった [19, 20]。

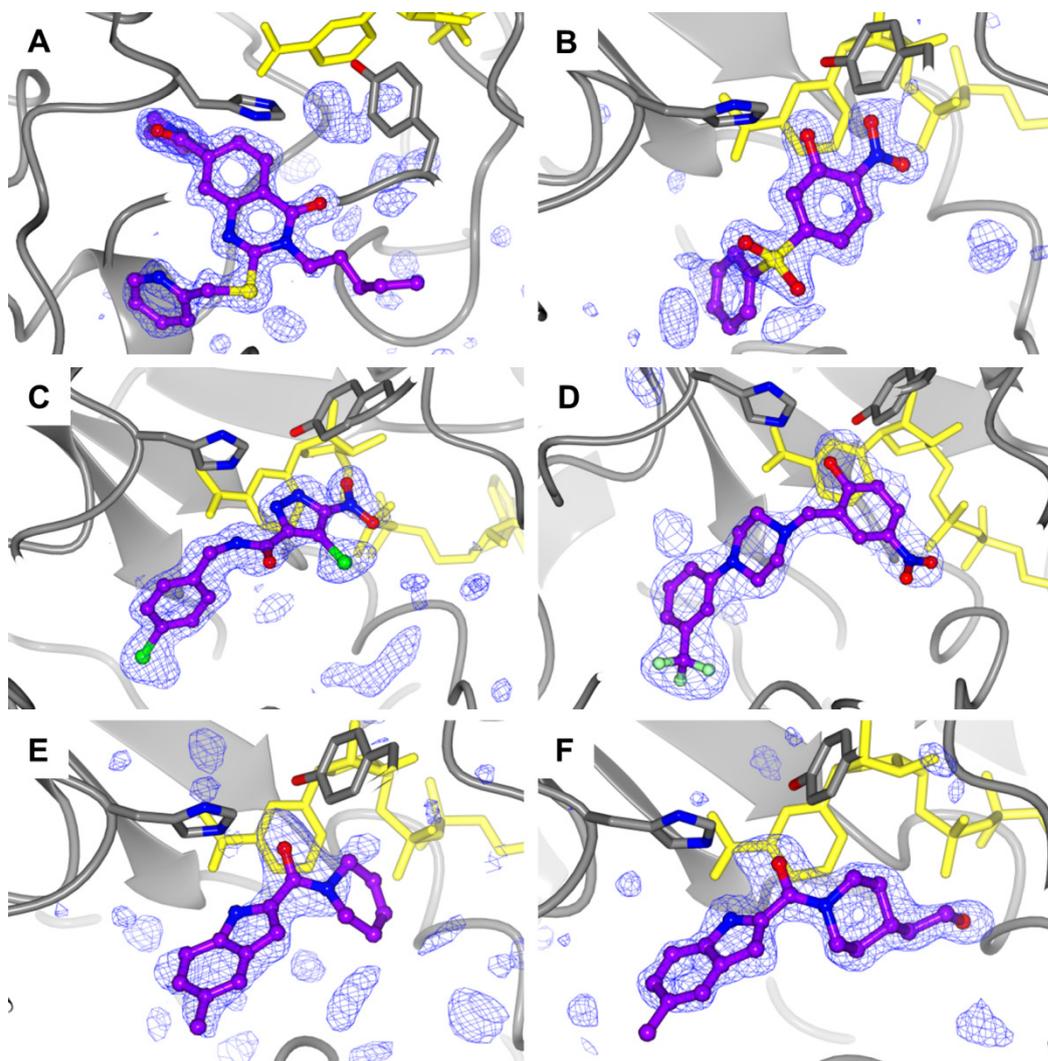


Figure 4-4 17β-HSD5 の触媒ポケット内で観測された *Fo-Fc* オミット電子密度マップ (A) 化合物 **27** ( $3.0\sigma$ )、(B) 化合物 **28** ( $3.0\sigma$ )、(C) 化合物 **29** ( $2.5\sigma$ )、(D) 化合物 **30** ( $2.0\sigma$ )、(E) 化合物 **31** ( $2.0\sigma$ )、(F) 化合物 **32** ( $2.0\sigma$ )。紫のボール&スティックモデルは化合物を、黄色のスティックモデルは  $\text{NADP}^+$  を示す。灰色のリボン図およびスティックモデルはタンパク質を示す。

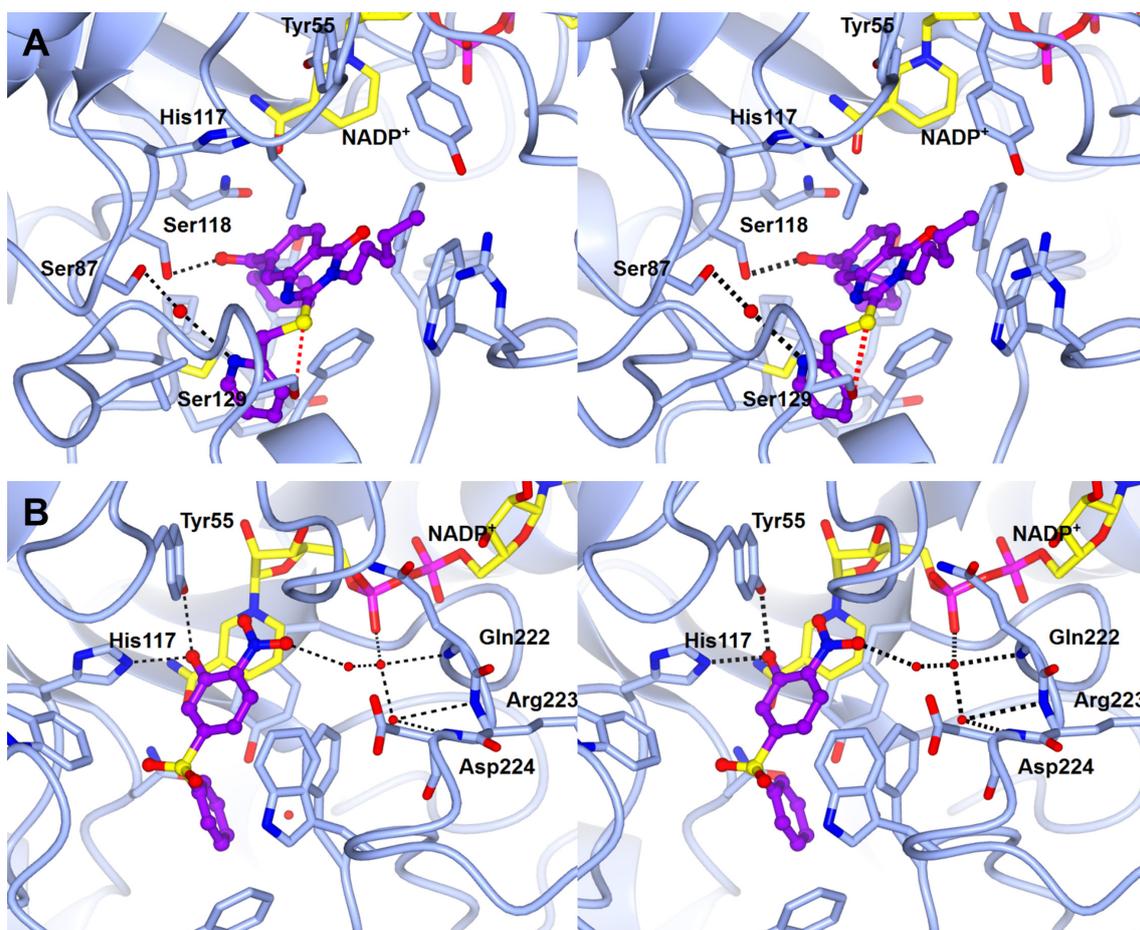


Figure 4-5 17 $\beta$ -HSD5 と化合物の複合体結晶構造のステレオ図 (次頁へつづく)

紫のボール&スティックモデルは化合物 **27** (A)、**28** (B)、**29** (C)、**30** (D) を示す。

黄色のスティックモデルは NADP<sup>+</sup>を示す。赤い球は水分子を示す。黒い点線は水素結合を、赤い点線は S-O 相互作用を示す。

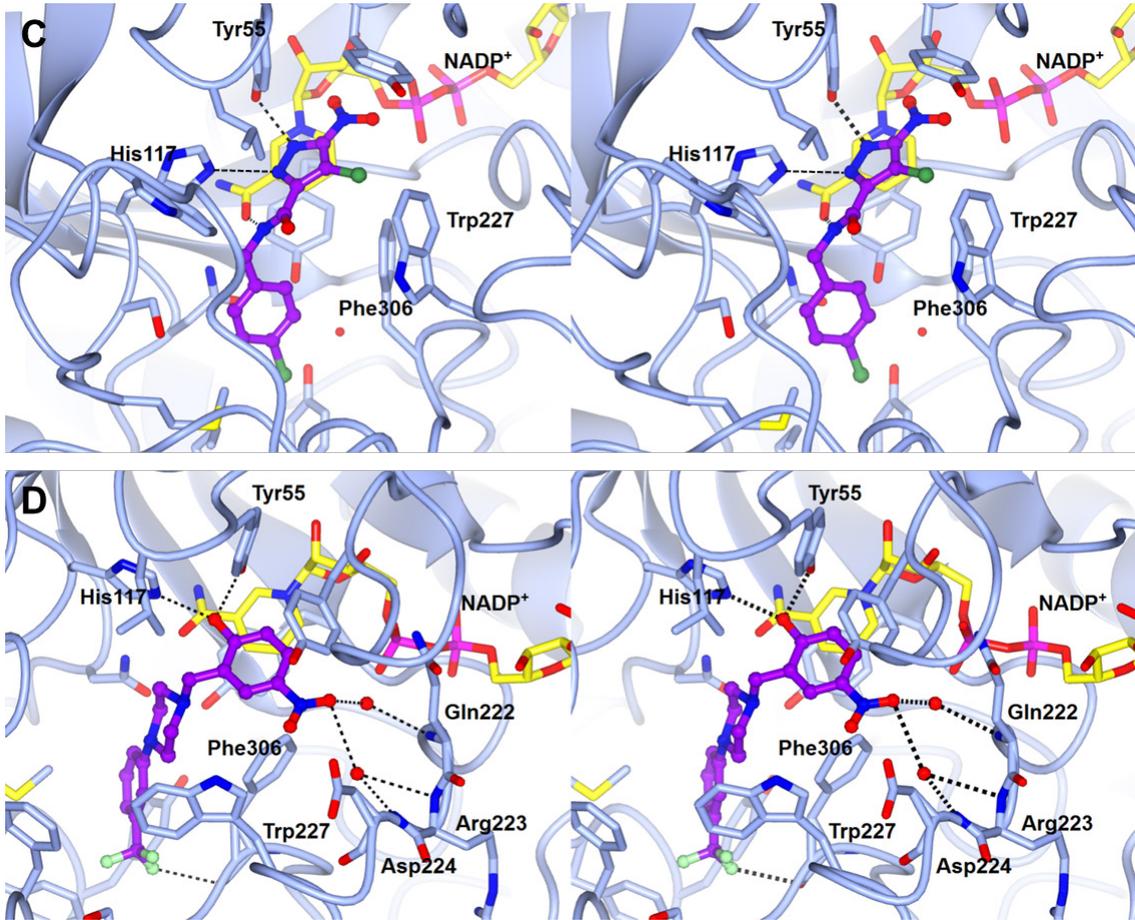


Figure 4-5 (前頁からのつづき)

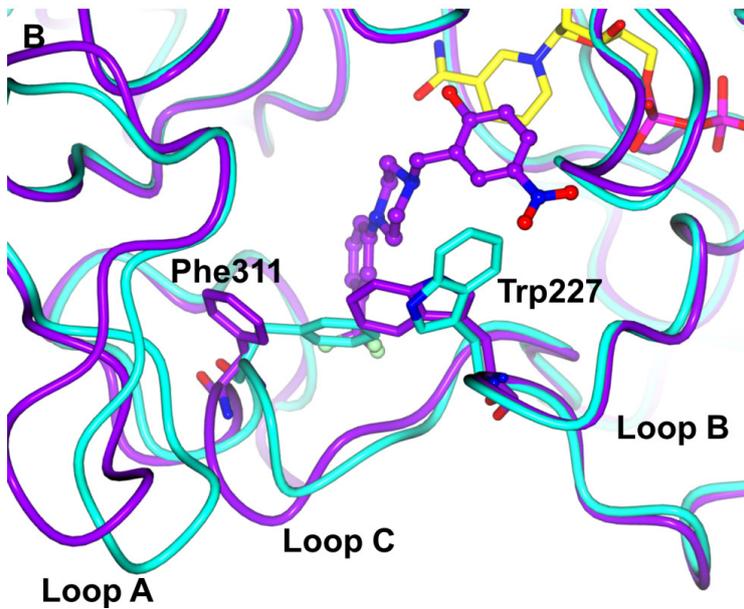
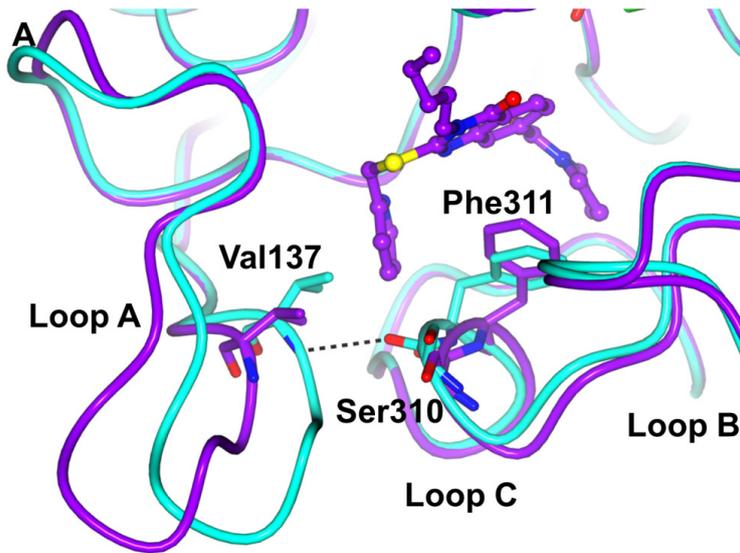


Figure 4-6 化合物の結合によるループ A、B、C の構造変化

シアンは酢酸の結合した 17 $\beta$ -HSD5 (PDB ID: 1S1P) を示す。黄色のスティックモデルは NADP<sup>+</sup>を示す。(A) 紫は化合物 **27** の結合した 17 $\beta$ -HSD5 を示し、ボール&スティックモデルは化合物を示す。(B) 紫は化合物 **30** の結合した 17 $\beta$ -HSD5 を示し、ボール&スティックモデルは化合物を示す。

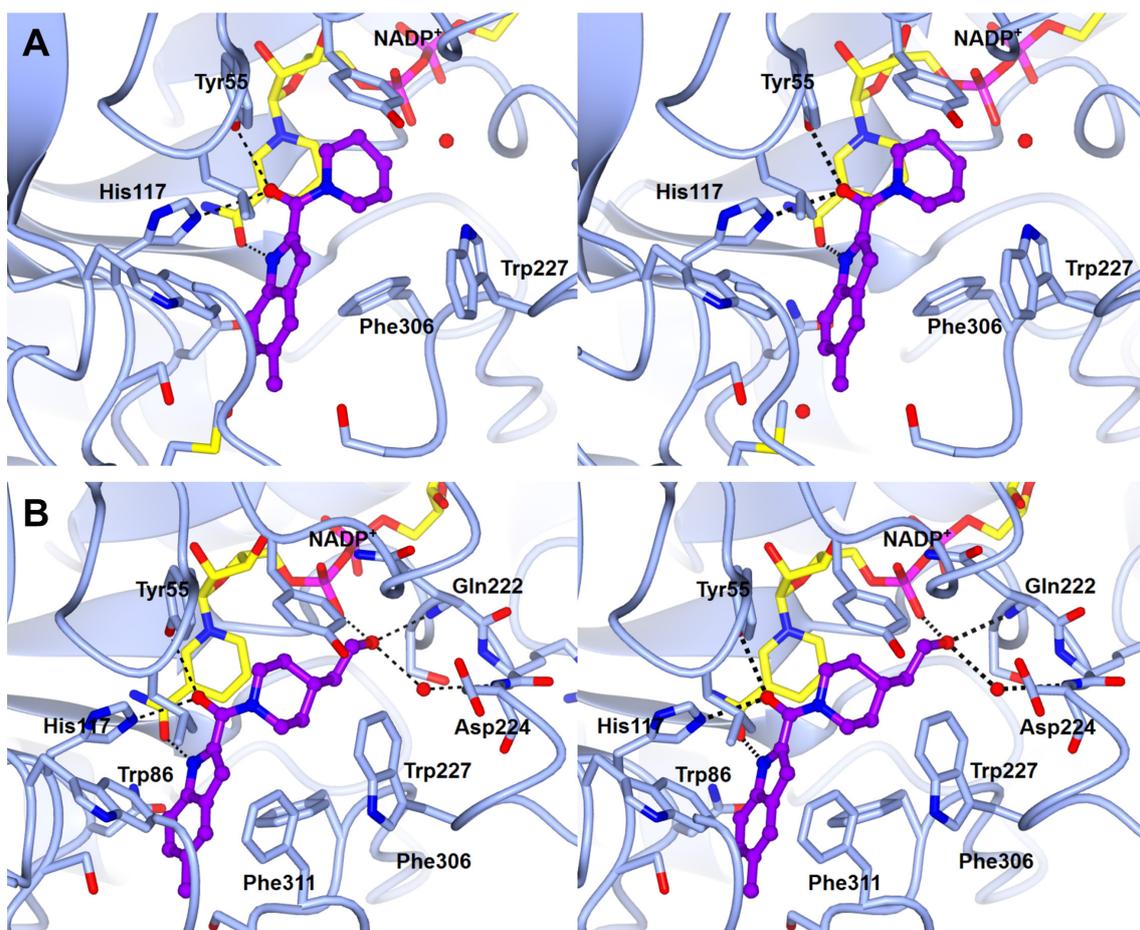


Figure 4-7 17 $\beta$ -HSD5 と化合物の複合体結晶構造のステレオ図

紫のボール&スティックモデルは化合物 **31** (A)、**32** (B) を示す。黄色のスティックモデルは NADP<sup>+</sup> を示す。赤い球は水分子を示す。点線は化合物と 17 $\beta$ -HSD5 の間の水素結合を示す。

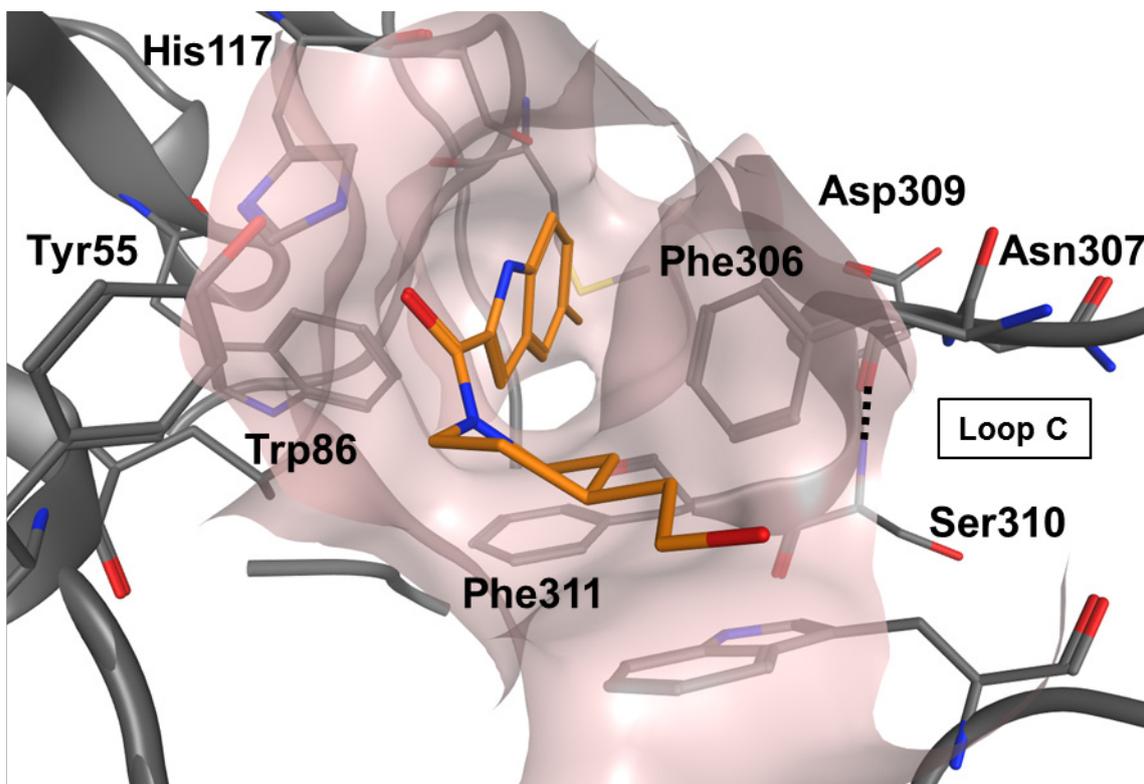


Figure 4-8 化合物 **32** の結合による誘導適合によって生じた疎水性トンネル  
 橙のスティックモデルは **32** を示す。灰色のリボン図およびスティックモデルはタンパ  
 ク質を示す。薄茶色は **32** 周辺のタンパク質表面を示す。点線はタンパク質内部の水素  
 結合を示す。

#### 4-3-2 新規結晶系

これまでに 30 種類の 17 $\beta$ -HSD5 結晶構造が PDB 上で公開されている。うち、21 種類は 1S1P と同じ結晶系に属している（結晶系 I）。本研究では、2 つの新しい結晶系、II と III が見出された。結晶系 I では、ループ C に含まれる、Asn307、Ser308、Asp309、Ser313、Pro315 が結晶学的対称分子との相互作用に関わっている。これらのアミノ酸残基の側鎖および主鎖の原子は、結晶学的対称分子と 9 本の水素結合を形成している。ループ C による、この強い水素結合ネットワークは結晶系 I を析出させるために必須であると考えられる。**30** から **32** はループ C の構造を大きく変化させるため、これらと共結晶化した際には結晶系 I が析出しなかったものと思われる。一方、結晶系 II では、ループ C の中で Pro315 のみが結晶学的対称分子と近くなっており、ファンデルワールス相互作用を形成している。ループ C の大部分は結晶学的対称分子との相互作用には関わっていないことから、結晶系 II は、**30** のようにループ C の構造を大きく変化させるようなリガンドとの複合体構造解析に適しているといえる。**31** と **32** は、ループ C の構造を変化させるだけでなく、C 末端の少なくとも 10 残基 (Pro315 を含む) をディスオーダーさせるために、**31**、**32** との共結晶化では結晶系 I、II のいずれも析出しなかったものと考えられる。

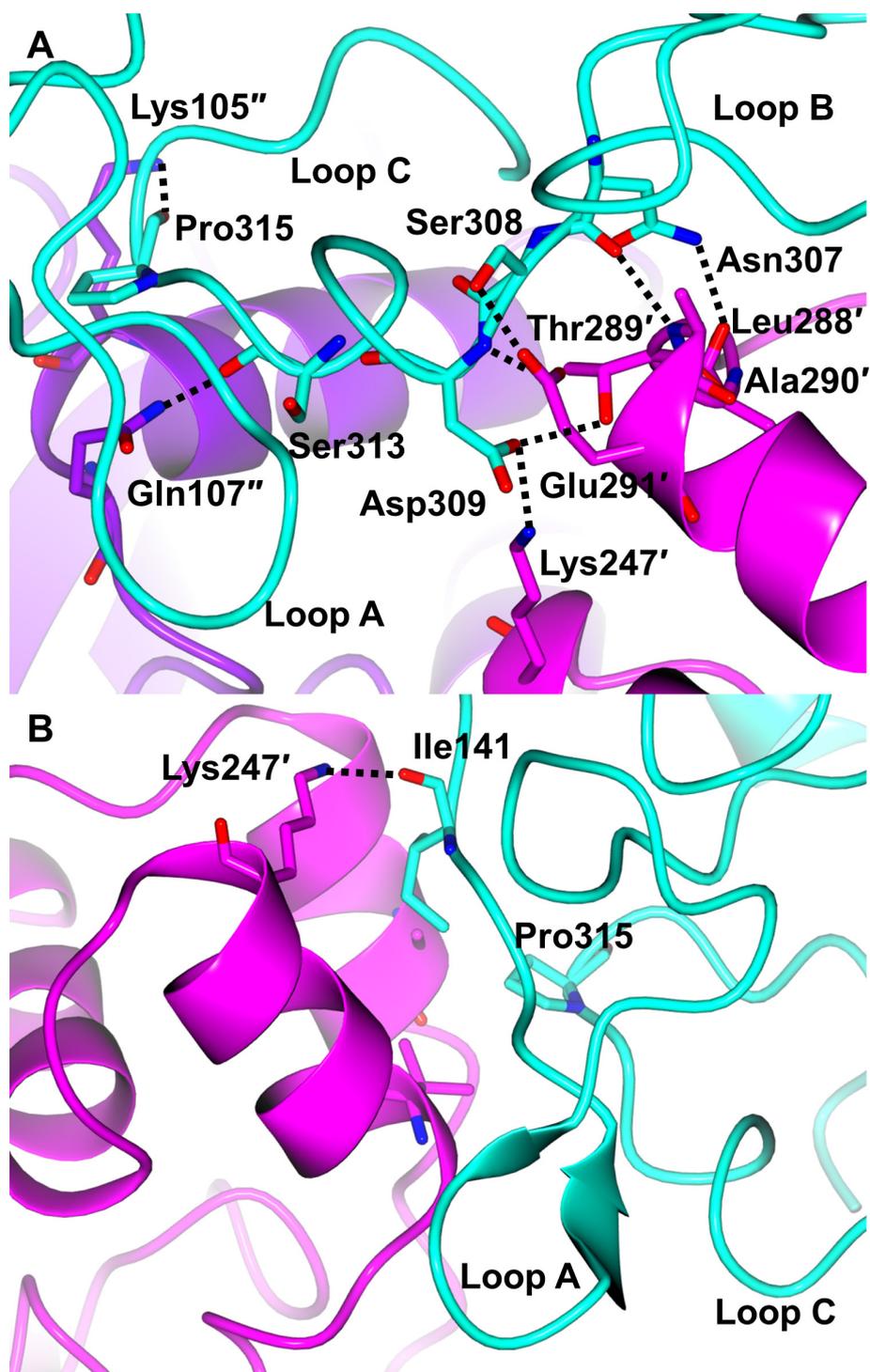


Figure 4-9 ループ A、B、C と結晶学的対称分子との間の相互作用

(A) 結晶系 I (PDB ID: 1S1P)。(B) 結晶系 II (化合物 **30** 複合体)。残基番号に付したプライム、ダブルプライムは結晶学的対称分子であることを示す。シアンはループ A、B、C を示す。結晶学的対称分子はマゼンタおよび紫で示す。水素結合は点線で示す。

#### 4-3-3 タンパク質構造変化による誘導適合

30 から 32 との複合体構造から、ループ C、特に Phe306 から Phe311 が、化合物の結合において誘導適合による構造変化を示すことが明らかとなった。これらのアミノ酸残基に着目し、既報の結晶構造および本研究で決定した結晶構造を詳細に解析した。Figure 4-10 に、PDB 登録構造 1S1P に対する Phe306 から Phe311 の全原子および主鎖の原子の r.m.s.d 値をそれぞれ示す。既報の構造にみられる構造変化のパターンは、大きく 2 つのグループに分けられる。PDB 登録構造 1S2A [4]、3R8H、3UG8、3UGR [9] は、全原子では高い r.m.s.d 値を示すものの主鎖の原子では低い。これらの構造では、Phe306 および Phe311 の側鎖がフリップしているために全原子でのみ高い r.m.s.d 値となっている。PDB 登録構造 1RY0、1RY8 [5]、2F38 [6] では、全原子だけでなく、主鎖の原子も高い r.m.s.d 値を示している。これらの構造では、Phe306、Phe311 の側鎖のフリップだけでなく、主鎖構造の再構成もみられる。この 3 つの構造は、互いに良く似ていて、r.m.s.d 値は 0.40 から 0.69 Å の範囲であった。

一方、32 の複合体構造は 1RY0、1RY8、2F38 と比べても、主鎖原子が高い r.m.s.d 値を示した。32 の複合体構造中の Phe306 から Phe311 の構造は、既報の構造のいずれとも大きく異なっており (r.m.s.d. 値は 2.82 から 4.04 Å の範囲)、これは構造変化の機構が異なるためと考えられる。1RY0、1RY8、2F38 では、リガンドが SP1 ポケットの奥深くに結合し、Phe311 側鎖がフリップするとともに、主鎖原子を含むアミノ酸残基の動きにより SP1 ポケットが拡張している (Figure 4-11A)。一方、32 は SP1 ポケットの奥深くには結合せず、SP3 ポケットに結合している。Phe306 および Phe311 の側鎖は 32 のインドール環に近づくように動き、主鎖の原子もまたポケット内部に向かって動くことで、ポケットが小さくなっている (Figure 4-11B)。32 は、このようにして生じた小さなポケットに効率的に結合することによって、低分子量 (286.37) にも関わらず、強い阻害活性を發揮しているといえる。

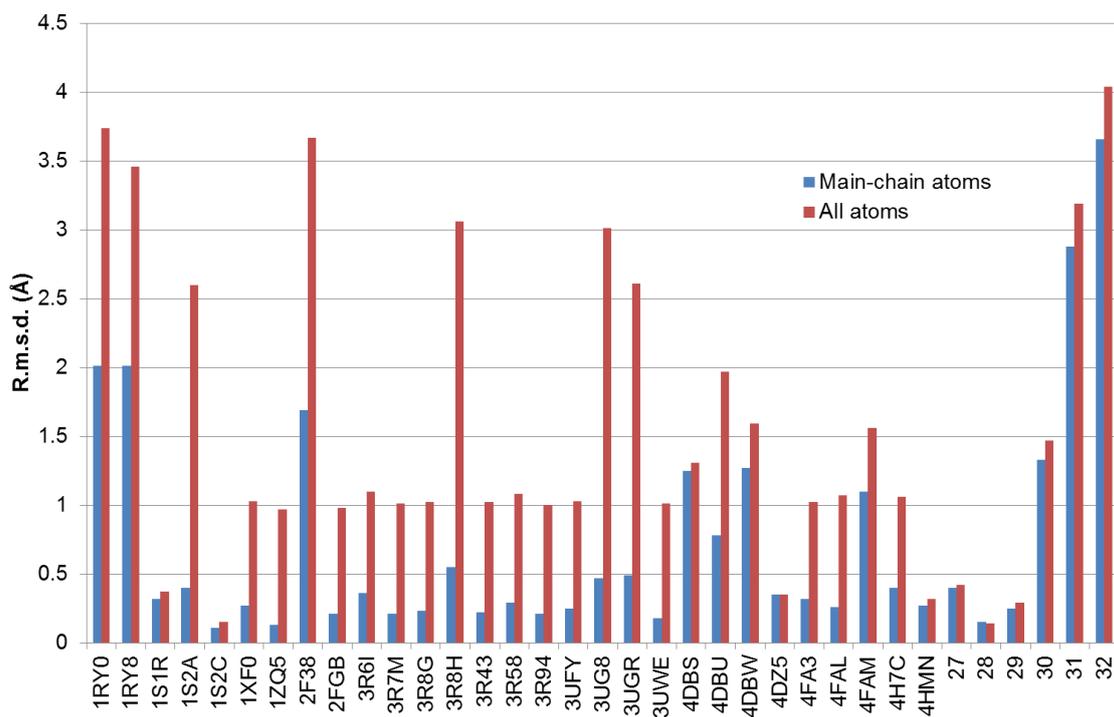


Figure 4-10 Phe306 から Phe311 の領域における構造の違い

PDB 登録構造 1S1P に対する r.m.s.d 値を示す。青いバーは主鎖原子のみでの値。赤いバーは全原子での値。

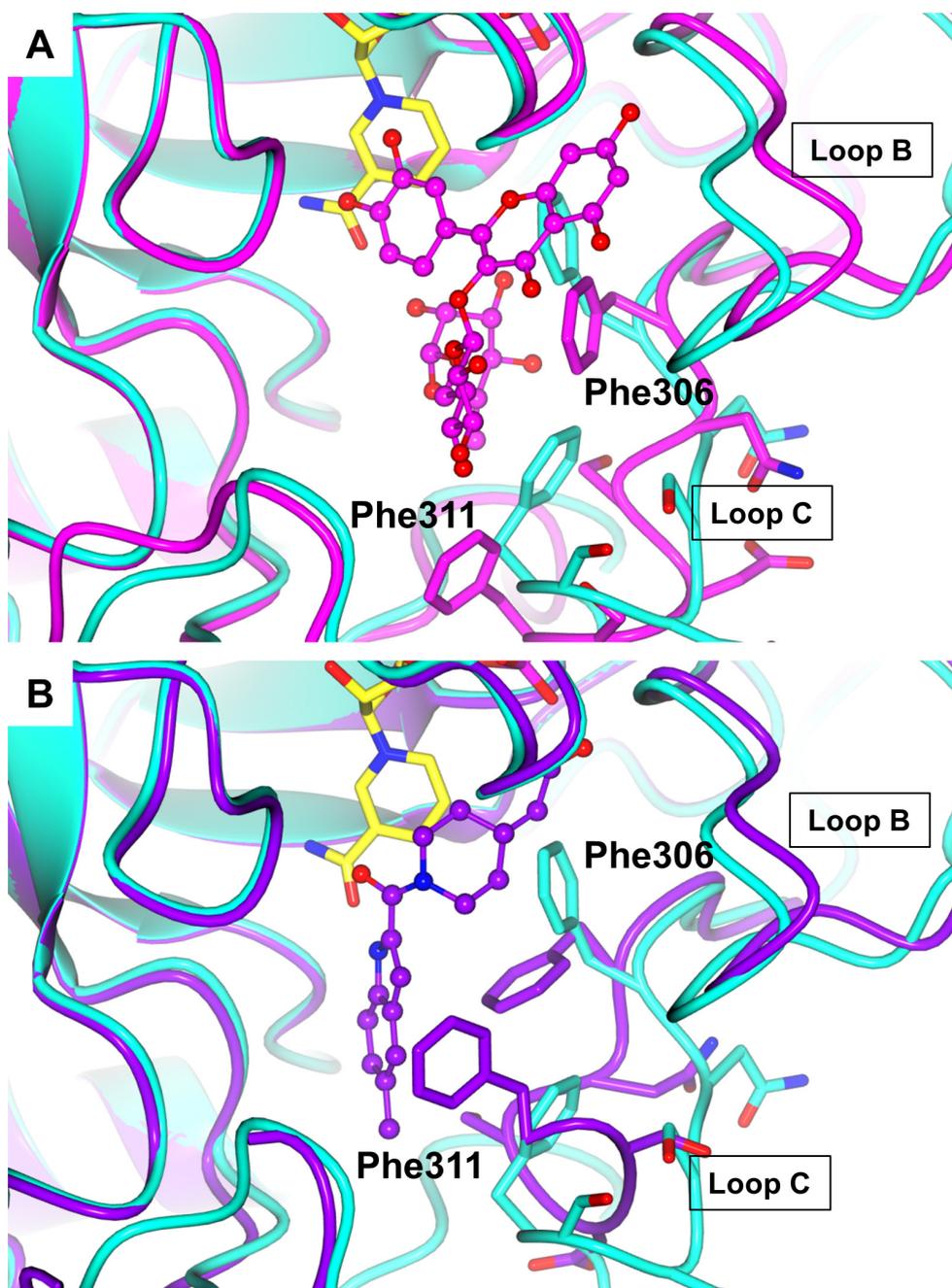


Figure 4-11 17 $\beta$ -HSD5 の誘導適合機構

(A) PDB 登録構造 1RY8 と 1S1P の重ね合わせ。マゼンタは 1RY8 を示す。(B) 化合物 **32** 複合体構造と 1S1P の重ね合わせ。紫は **32** 複合体を示す。(A)、(B) ともシアンは 1S1P を示す。ボール&スティックモデルは化合物を示し、スティックモデルは Phe306 から Phe311 の側鎖を、黄色のスティックモデルは NADP<sup>+</sup>を示す。

#### 4-4 結論

本研究では、多様な化学構造をもつ阻害剤と 17 $\beta$ -HSD5 の複合体構造を決定した。これらの構造から、オキシアニオンサイトに結合する新たな基本骨格が見出された。特に、化合物 **29** ではピラゾール環の窒素原子がオキシアニオンサイトへ結合していた。これは酸素原子以外がオキシアニオンサイトに結合している最初の例である。この発見は、カルボン酸あるいはカルボニル酸素をもつ既知の阻害剤とは異なる物理化学的性質をもった阻害剤の開発につながる可能性がある。

また、阻害剤の結合によるループ C および C 末端の構造変化も見出された。これらの構造変化により結晶系 II および III という新しい結晶系が生じた。本研究で見出されたループ C の新しい構造は、既報の 17 $\beta$ -HSD5 結晶構造のいずれとも大きく異なっており、化合物 **32** が強い阻害活性を発揮する機構を解明するものであった。

本研究の成果により、SBDD による 17 $\beta$ -HSD5 阻害剤の開発が促進され、CRPC の治療法の確立につながることを期待される。

4-5 引用文献

- [1] Byrns, M. C., Jin, Y. & Penning, T. M. (2011). *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**, 95-104.
- [2] Penning, T. M., Burczynski, M. E., Jez, J. M., Hung, C. F., Lin, H. K., Ma, H., Moore, M., Palackal, N. & Ratnam, K. (2000). *Biochem J* **351**, 67-77.
- [3] Labrie, F. (2011). *Nat Rev Urol* **8**, 73-85.
- [4] Lovering, A. L., Ride, J. P., Bunce, C. M., Desmond, J. C., Cummings, S. M. & White, S. A. (2004). *Cancer Res* **64**, 1802-1810.
- [5] Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K. & Takusagawa, F. (2004). *Biochemistry* **43**, 2188-2198.
- [6] Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K., Woodward, D. F. & Takusagawa, F. (2006). *Biochemistry* **45**, 1987-1996.
- [7] Jamieson, S. M., Brooke, D. G., Heinrich, D., Atwell, G. J., Silva, S., Hamilton, E. J., Turnbull, A. P., Rigoreau, L. J., Trivier, E., Soudy, C., Samlal, S. S., Owen, P. J., Schroeder, E., Raynham, T., Flanagan, J. U. & Denny, W. A. (2012). *J Med Chem* **55**, 7746-7758.
- [8] Heinrich, D. M., Flanagan, J. U., Jamieson, S. M., Silva, S., Rigoreau, L. J., Trivier, E., Raynham, T., Turnbull, A. P. & Denny, W. A. (2013). *Eur J Med Chem* **62**, 738-744.
- [9] Flanagan, J. U., Yosaatmadja, Y., Teague, R. M., Chai, M. Z., Turnbull, A. P. & Squire, C. J. (2012). *PLoS One* **7**, e43965.
- [10] Flanagan, J. U., Atwell, G. J., Heinrich, D. M., Brooke, D. G., Silva, S., Rigoreau, L. J., Trivier, E., Turnbull, A. P., Raynham, T., Jamieson, S. M. & Denny, W. A. (2014). *Bioorg Med Chem* **22**, 967-977.
- [11] Jackson, V. J., Yosaatmadja, Y., Flanagan, J. U. & Squire, C. J. (2012). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**, 409-413.
- [12] Adeniji, A. O., Chen, M. & Penning, T. M. (2013). *J Steroid Biochem Mol Biol* **137**, 136-149.
- [13] Chen, M., Adeniji, A. O., Twenter, B. M., Winkler, J. D., Christianson, D. W. & Penning, T. M. (2012). *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 3492-3497.
- [14] Watanabe, K., Kakefuda, A., Yasuda, M., Enjo, K., Kikuchi, A., Furutani, T., Naritomi,

- Y., Otsuka, Y., Okada, M. & Ohta, M. (2013). *Bioorg Med Chem* **21**, 5261-5270.
- [15] Chavas, L. M., Matsugaki, N., Yamada, Y., Hiraki, M., Igarashi, N., Suzuki, M. & Wakatsuki, S. (2012). *J Synchrotron Radiat* **19**, 450-454.
- [16] Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Method Enzymol* **276**, 307-326.
- [17] Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 22-25.
- [18] Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355-367.
- [19] Loriot, Y., Fizazi, K., Jones, R. J., Van den Brande, J., Molife, R. L., Omlin, A., James, N. D., Baskin-Bey, E., Heeringa, M., Baron, B., Holtkamp, G. M., Ouatas, T. & De Bono, J. S. (2014). *Invest New Drugs* **32**, 995-1004.
- [20] Kikuchi, A., Furutani, T., Azami, H., Watanabe, K., Niimi, T., Kamiyama, Y., Kuromitsu, S., Baskin-Bey, E., Heeringa, M., Ouatas, T. & Enjo, K. (2014). *Invest New Drugs* **32**, 860-870.

## 第5章

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  に対する  
テルミサルタンの活性化機構

## 5-1 緒言

アンジオテンシン II は、レニン-アンジオテンシン系における主要な生理活性物質である。アンジオテンシン II は、1 型アンジオテンシン II 受容体との相互作用を介して、腎臓、心臓、血管における様々な生物学的機能を担っている [1, 2]。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) によるレニン-アンジオテンシン系の阻害は、高血圧患者の組織保護を目的とした治療法として有効であると考えられている [3-5]。ARB は降圧作用を有することが知られているが、この作用は投与した ARB の種類に依存する [6, 7]。最近のメタ解析によれば、テルミサルタンは、本態性高血圧患者のほとんどで降圧作用を示した [7]。

近年、一部の ARB がペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) を誘導することが報告され、中でもテルミサルタンがもっとも強く作用することが示されている [8, 9]。PPAR $\gamma$  は脂肪組織でもっとも多く発現しているサブタイプで、インスリン感受性の制御において重要な役割を担っている [10]。ピオグリタゾンやロシグリタゾンといったチアゾリジンジオン類は、PPAR $\gamma$  に対する高い親和性と完全な活性化作用をもち、2 型糖尿病の治療薬として使われている。チアゾリジンジオンは、インスリン感受性、耐糖能、脂質プロファイルを改善することが報告されているが、体重増加、浮腫、腎臓における水分貯留といった副作用を有する [11]。これらの臨床的所見から、メタボリック症候群への効果を保ちながら、副作用を生じることのない、新しい PPAR $\gamma$  リガンドの開発が求められている。

最近の研究で、テルミサルタンが PPAR $\gamma$  選択的作動薬としてふるまうことが示された [8]。強い ARB として、また PPAR $\gamma$  選択的作動薬としての機能をもつことから、テルミサルタンは、心血管疾患と糖尿病という 2 つの関連した疾患の治療に効果があることが期待されている。事実、多数の臨床試験および実験的研究が既に実施されており、2 型糖尿病、メタボリック症候群、肥満に対して効果があるとする結果が得られている [12-18]。

PPAR $\gamma$  選択的作動薬による薬効の分子機構は明らかになっていないが、部分的活性化は PPAR $\gamma$  選択的作動薬の典型的かつ重要な特徴であり、テルミサルタンはこの重要な特徴を有している [8, 19]。本研究では、部分的活性化の機構を明らかにすることを目的として、PPAR $\gamma$  とテルミサルタンの複合体構造解析を行った。

## 5-2 材料と方法

### 5-2-1 結晶構造解析

ヒト由来 PPAR $\gamma$  のリガンド結合ドメイン (LBD) (残基番号 225-505) は既報 [20]の方法にしたがって調製し、16 mg/ml に濃縮した。結晶化の前に、テルミサルタンおよびヒト由来 1 型ステロイド受容体活性化補助因子 (SRC1) に由来する短いペプチド断片 (残基番号 685-700、ERHKILHRLQLQEGSPS) (Life Technologies) と混合して 1 時間静置した。テルミサルタンおよび SRC1 ペプチドの終濃度はそれぞれ 0.5 mM、1 mM とした。タンパク質溶液を等量のリザーバー (0.1M Tris-HCl、pH 7.0、0.8 M クエン酸ナトリウム) と混合し、293K にてシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化した。厚みのある板状の結晶が 3 から 5 日後に析出した。X 線回折データを収集するため、凍結防止剤として 30%(v/v) グリセロールを含む母液に結晶を移した後、100K にて瞬間凍結した。回折データは、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 (茨城県つくば市) の AR-NE3A ビームラインにて収集し、*HKL2000* [21]を用いて処理した。ヒト由来 PPAR $\gamma$  LBD の構造は、*MOLREP* [22]を用いた分子置換法により決定した。結晶は空間群  $P2_12_12$  に属し、 $a = 132.9 \text{ \AA}$ 、 $b = 53.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 53.9 \text{ \AA}$  の格子定数をもっていた。*REFMAC* [23]による剛体精密化および高速精密化を行い、差電子密度マップを使ってリガンドの座標を決定した。モデル構築は *Coot* [24]を用いて行った。最終構造には、残基番号 263 から 272 の領域を除く PPAR $\gamma$  LBD、SRC1 ペプチド (残基番号 686-696)、47 の水分子が含まれていた。最終構造はタンパク質構造データベース (PDB) に登録した。データ収集および精密化における統計値は Table 5-1 に示す。

Table 5-1 データ収集および構造精密化における統計値

Structure	PPAR/talelmisartan/SRC1 peptide
PDB ID	3VN2
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
<i>a</i> (Å)	132.9
<i>b</i> (Å)	53.5
<i>c</i> (Å)	53.9
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90
Resolution (Å)	26.93-2.18 (2.24-2.18)
Multiplicity	6.3 (6.9)
Average <i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	41.8 (7.1)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (%)	6.7 (37.8)
No. of reflections	18784 (1344)
Completeness (%)	95.5 (89.3)
<i>R</i> <sub>work</sub> <sup>b</sup> (%)	25.0
<i>R</i> <sub>free</sub> <sup>c</sup> (%)	30.9
Average <i>B</i> factor (Å <sup>2</sup> )	57.4
RMSD bond length (Å)	0.024
RMSD bond angle (°)	1.900
Ramachandran plot (%)	
Preferred	95.1
Allowed	3.0
Outliers	1.9

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i - I|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i}$ , where  $I_i$  is the intensity of an individual reflection and  $I$  is the mean intensity obtained from multiple observations of symmetry related reflections.

<sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ ; 5% randomly omitted reflections were used for  $R_{\text{free}}$

## 5-3 結果と考察

### 5-3-1 ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ とテルミサルタンの複合体構造

テルミサルタンによる PPAR $\gamma$  活性化機構を明らかにするため、PPAR $\gamma$  LBD とテルミサルタンの複合体結晶の調製を試みた。はじめに既報の方法にしたがって結晶化を試み、板状結晶を取得した [25-27]。この結晶は、既報の PPAR $\gamma$  LBD と各種アゴニストとの複合体結晶と同じ空間群 C2 に属し、同等の格子定数をもっていたが、構造解析の結果、テルミサルタンを観測することはできなかった。

複合体を安定化するため、また新たな結晶のパッキング面を供するため、PPAR $\gamma$  の活性化補助因子である SRC1 に由来する短いペプチドを用いることとした。ペプチドの設計にあたっては、既報の 3 者複合体構造を参照した [26]。期待どおり、ペプチドを添加して結晶化することで新たな結晶を取得することができた。X 線構造解析の結果、SRC1 ペプチドは結晶中で隣接する分子と相互作用していた。剛体精密化および初期の拘束精密化後の  $F_o-F_c$  差電子密度マップ上で、テルミサルタンが観測された。

最終的に、分解能 2.18 Å で、PPAR $\gamma$  LBD、テルミサルタン、SRC1 ペプチドの 3 者複合体の結晶構造を決定した。PPAR $\gamma$  LBD の全体構造は、既報のアポ体あるいは複合体構造と同様で [25-27]、12 本の  $\alpha$  ヘリックス (H1 から H12) と 4 本の  $\beta$  ストランドによる小さな  $\beta$  シート領域によって形成されていた。また、H2 ヘリックスと H3 ヘリックスの間に短い  $\alpha$  ヘリックス (H2') が形成されている点も既報構造と同様である。テルミサルタン複合体構造を、ロシグリタゾン複合体 (PDB ID: 2PRG) [26]、2-BABA 複合体 (PDB ID: 1WM0) [27]、アポ体 (PDB ID: 1PRG) [26] の構造とそれぞれ重ね合わせると、r.m.s.d 値はそれぞれ 0.64、0.69、0.93 Å であった。

### 5-3-2 テルミサルタンの結合様式

PPAR $\gamma$  のリガンド結合部位は、約 1400 Å<sup>3</sup> の体積をもつ広い Y 字型の空間で、3 つに分岐した構造を有する [28]。それぞれの分岐を、ブランチ I、ブランチ II、ブランチ III と呼称する。ブランチ I は、H3、H5、H11、H12 ヘリックスに囲まれていて、主に親水的性質をもち、リガンド依存性の活性化機能 (AF-2) を発揮するためのタンパク質表面

を供する。ロシグリタゾンの親水性置換基はブランチ I を占有し、Ser289、His323、Tyr327、His449、Tyr473 と水素結合ネットワークを形成している [26]。ブランチ II は疎水性の空間で、H2'、H3、H6、H7 ヘリックスおよび  $\beta$  シート領域によって形成されている。ブランチ III は、H2、H3 ヘリックスおよび  $\beta$  シート領域の親水性アミノ酸残基によって形成されている。ファルグリタザールなどいくつかの化合物は、Phe363 側鎖の移動を誘発し、その結果、付加的な領域（ブランチ I'）が生じている。ブランチ I'は、H3 と H7 の間に存在し、ブランチ I に対して直角を成している [25]。

これまでに、テルミサルタンと PPAR $\gamma$  の結合様式として、3つの様式がドッキングシミュレーションにより提唱されている。1つ目の様式では、2つのベンズイミダゾール環がブランチ II を、中央のベンゼン環とプロピル基がブランチ III を占有し、ブランチ I はほぼ空いている [8, 29, 30]。2つ目の様式では、ビフェニル部分と中央のベンズイミダゾール環がブランチ II と III をそれぞれ占有し、末端のベンズイミダゾール環がブランチ I の方に向いているが、水素結合は形成していない [31]。3つ目の様式では、ビフェニル部分と中央のベンズイミダゾール環がブランチ I' と I をそれぞれ占有し、末端のベンズイミダゾール環がブランチ II を占有している。この様式でも H12 ヘリックス周辺で水素結合は形成していない [32]。

本研究において決定した結晶構造中で観測された結合様式では、テルミサルタンは U 字型の構造をとっており、上述の3つの予測された様式のいずれとも異なる。中央のベンズイミダゾール環はブランチ I を占有し、その N3'窒素原子が H12 ヘリックスの Tyr473 と水素結合している。His323 の側鎖は、他の複合体構造において観測されている位置から押し出され、新たに生じた空間をプロピル基が埋めている。この相互作用はテルミサルタン特有のものであり、1つを除き PDB に登録された他の複合体構造ではみられていない [33]。

プロピル基をより短いアルキル鎖に置換すると活性が消失することがわかっていることから [34]、His323 のフリップを伴うプロピル基の相互作用はテルミサルタンの PPAR $\gamma$  活性化作用において重要であることが示唆される。中央のベンズイミダゾール環の中のベンゼン環は、His449 との T 字型の  $\pi$  スタッキング相互作用を形成している。一方、末端のベンズイミダゾール環は、H9 ヘリックス中の Phe363 と  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用を形成するとともに、1'-メチル基が Phe282 とファンデルワールス相互作用を形成している。これは、1'-メチル基の欠失により活性が減弱するという事実と一致す

る [34]。ビフェニル部分はブランチ II とブランチ III に存在し、H5 から H7 ヘリックス中の Ile326、Leu330、Ile341、Leu353、Met364 と疎水性相互作用を形成している。既報のドッキングモデルでは、カルボン酸が Ser342、Arg288 と水素結合することが予測されていたが [31]、結晶構造中では、カルボン酸はいずれのアミノ酸残基とも水素結合していない。報告されているテルミサルタンの構造活性相関においても、結合様式から示唆されるように、カルボン酸が置換可能であることが示されている [34]。

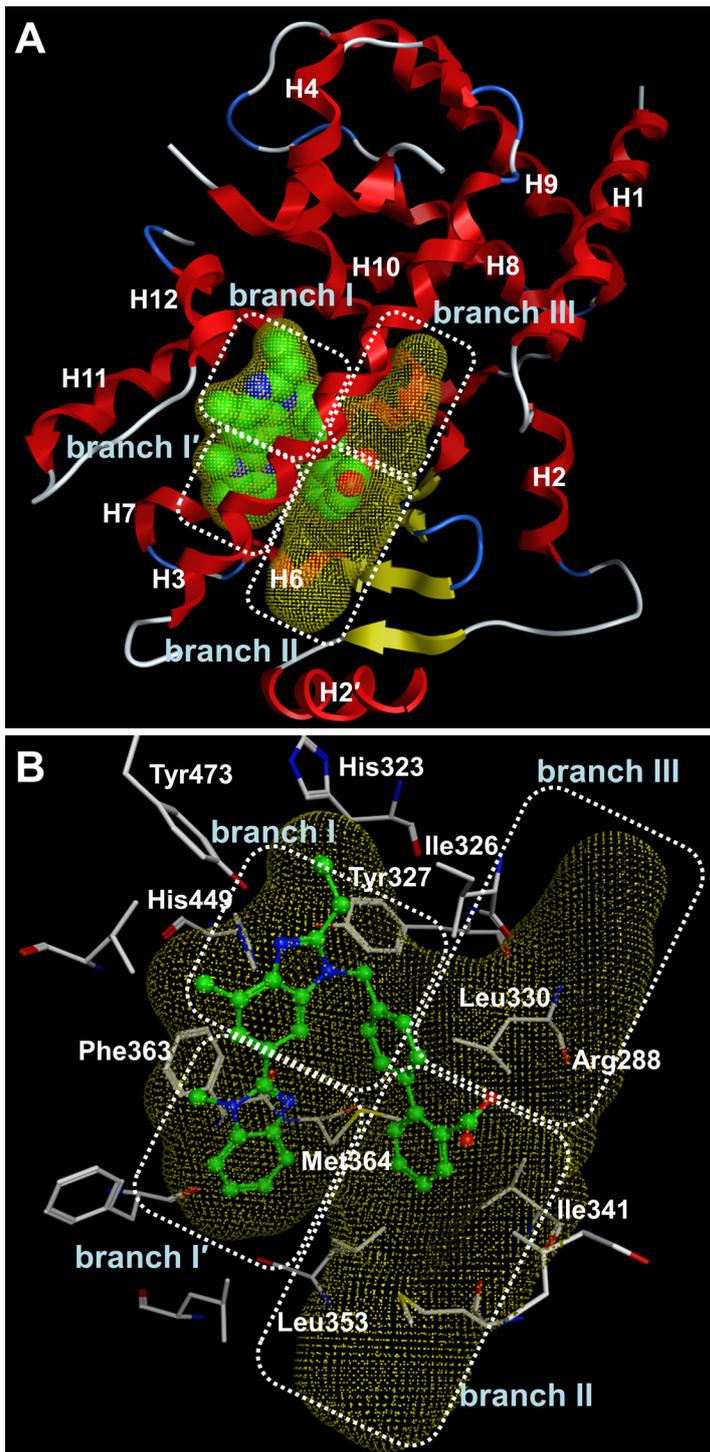


Figure 5-1 PPAR $\gamma$  とテルミサルタンの複合体構造

(A) 全体構造。リガンドが結合する空間は黄色のドットで示し、4つのブランチを白い点線で示した。(B) テルミサルタンが結合した PPAR $\gamma$  のリガンド結合ポケット。テルミサルタンとの相互作用に関わるアミノ酸残基を白色で示した。

### 5-3-2-1 ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ 部分的活性化機構の分子基盤

これまでの PPAR $\gamma$  に関する構造学的研究から、完全活性化作用を有するリガンド（フルアゴニスト）と部分的活性化作用を有するリガンド（パーシャルアゴニスト）の活性化機構は異なることが示唆されている。完全活性化作用を発揮するためには、H12 ヘリックスを適切な位置に安定化し、活性化補助因子の結合を促進するためのいくつかの要素を満たす必要があると考えられている。それは、既報の PPAR $\gamma$  複合体構造で見られているように、リガンド側のカルボン酸あるいはその生物学的等価体と、Ser289、His322、His449、Tyr473 といったアミノ酸残基との水素結合、およびこれら 4 つのアミノ酸残基と Tyr327 との分子内水素結合である [35]。さらに、ブランチ II あるいは III をある程度占有することが、高い親和性の獲得に必要なだと考えられる。

対照的に、パーシャルアゴニストと PPAR $\gamma$  の複合体では、この水素結合ネットワークが欠失しているか、あるいは最適な形ではない。これにより、活性化補助因子が結合するには不安定あるいは好ましくない構造となっている。その代わりに、パーシャルアゴニストはブランチ II または III との疎水性相互作用を示し、H12 ヘリックスよりもむしろ、H3 ヘリックスと  $\beta$  シート領域を安定化する [35]。この 2 つのブランチの境界にある Ser342 との水素結合がいくつかのパーシャルアゴニストで見られ、相互作用を補強している。この H12 ヘリックス非依存的な活性化機構がパーシャルアゴニストの特徴といえる。

テルミサルタンの部分的活性化機構は、H12 ヘリックス周辺の水素結合ネットワークの欠失により説明できる。テルミサルタンは Tyr473 との水素結合しか形成していないが、フルアゴニストであるロシグリタゾンおよびファルグリタザールは、それぞれ 3 本（Ser289、His323、Tyr473）、4 本（Ser289、His323、His449、Tyr473）の水素結合を形成している [25, 26]。さらに、プロピル基が His323 を押しつけている。H12 ヘリックス周辺で見られる、テルミサルタンの非標準的な水素結合ネットワークは活性化補助因子の動員を妨げていることが示唆される。事実、テルミサルタンの部分的活性化作用と、H12 ヘリックス安定化の相関は弱い。フルアゴニストであるトログリタゾンやピオグリタゾンでは、Tyr473 を変異させると PPAR $\gamma$  活性化作用が減弱するが、テルミサルタンの場合は減弱がみられない [36]。

テルミサルタンの結合様式とロシグリタゾンの結合様式は異なるが、3 者複合体にお

ける SRC1 由来ペプチドと PPAR $\gamma$  の相互作用は、ほぼ同じである。相互作用に必須である SRC1 の ‘LXXLL’ モチーフが、PPAR $\gamma$  の Lys301 と Glu471 の間にはさまれている [26]。この事実は、テルミサルタンの部分的活性化作用が、活性化補助因子にとって最適でない構造を安定化することに由来しているのではなく、動的な構造の中で、活性化補助因子にとって最適な構造が占める割合が少ないことに由来することを示唆する。この動的な構造は結晶構造中で観測することは難しい。既報の PPAR $\gamma$  とパーシャルアゴニストとの複合体構造解析においても、活性化補助因子の結合様式はロシグリタゾンと同様であると予測されている [27, 37]。テルミサルタンを含むいくつかのパーシャルアゴニストは、活性化補助因子に対する選択性を有することが知られているが、この点についても複合体構造からその理由を考察することは難しい。この選択性は、動的な構造における少しの違いによって生じている可能性があるからである。

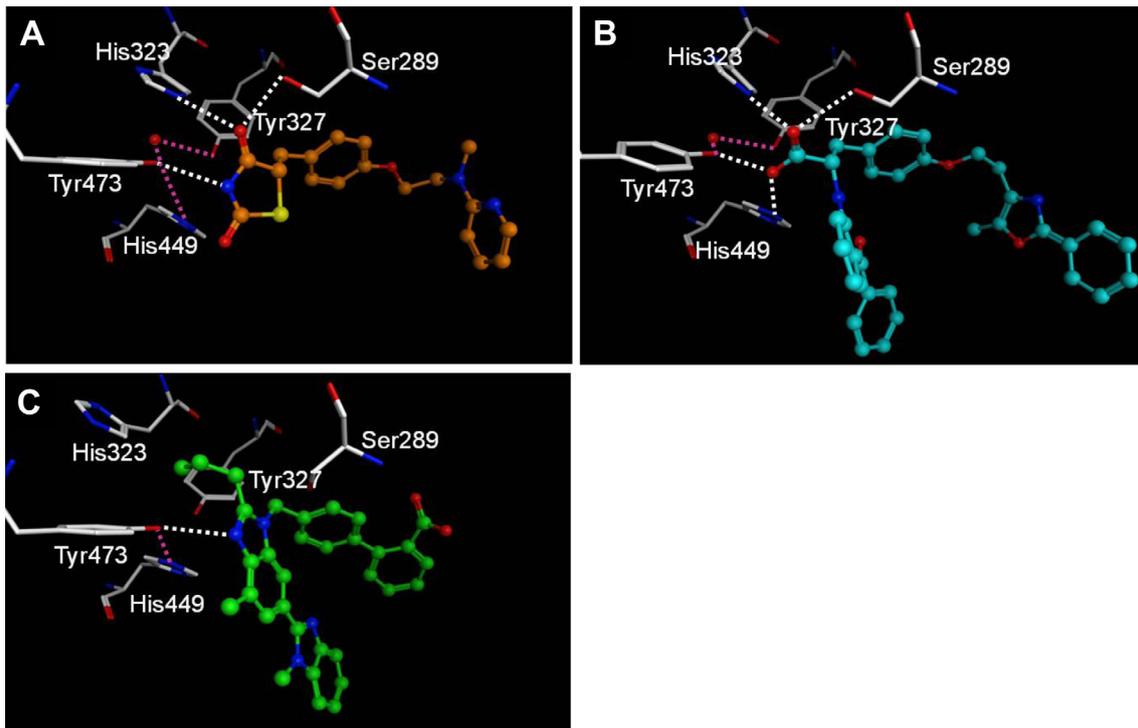


Figure 5-2 PPAR $\gamma$  複合体構造における H12 ヘリックスとの水素結合の比較

各種リガンドはボール&スティックモデルで示した。白色の点線はリガンドと PPAR $\gamma$  の分子間水素結合を示し、紫の点線は PPAR $\gamma$  の分子内水素結合および水分子との水素結合を示す。(A) ロシグリタゾン (橙) 複合体。(B) ファルグリタザール (シアン) 複合体。(C) テルミサルタン (緑) 複合体。

### 5-3-3 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬とペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ の相互作用に関する構造学的洞察

テルミサルタンは、ARB の中で最も強い PPAR $\gamma$  活性化作用を有し、次に強い活性化作用を示すのはイルベサルタンとロサルタンである。バルサルタン、カンデサルタン、オルメサルタン、エプロサルタンは最小限の活性化作用のみ有する [8, 9]。テルミサルタンのみが、通常の経口投与量での血漿中濃度 (1-5  $\mu\text{mol/l}$ ) よりも低い濃度で PPAR $\gamma$  を活性化する [8]。他の ARB ではテルミサルタンよりも低い効果が示されている理由を構造的な面から明らかにするため、これらの ARB が PPAR $\gamma$  のリガンド結合部位に結合できるかどうかを検討した。ARB に共通する構造は、カルボン酸またはテトラゾールが結合したビフェニル部分と、アルキル鎖を有するイミダゾール環である。これらが PPAR $\gamma$  のリガンド結合部位内でテルミサルタンと同じ位置を占有すると仮定した場合、他の ARB はリガンド結合部位にうまく結合できないと考えられる。それは、テルミサルタンの中央のベンズイミダゾール環内のベンゼン環と、他の ARB の相当する部分との構造の違いに起因する。このベンゼン環は、His449 と Cys285 の間の疎水的な環境に位置しているが、この領域は狭く、平面的な構造のみを許容する。この領域は、バルサルタン、オルメサルタン、エプロサルタンがもつ嵩高い構造を許容できないと考えられる。また、バルサルタン、オルメサルタン、エプロサルタン、カンデサルタン、およびロサルタンの主代謝物である EXP3174 がもつカルボン酸のように親水性の高い置換基も好ましくない。さらに、テルミサルタンのベンゼン環は、His449 と T 字型の  $\pi$  スタッキング相互作用を形成しているが、他の ARB のほとんどはこの位置に芳香環をもっていない。カンデサルタンとアジルサルタンは例外的で、これらはビフェニル部分とカルボン酸が衝突するためにテルミサルタンと同じ結合様式をとることができない。これらの構造学的洞察により他の ARB がもつ PPAR $\gamma$  活性化作用を説明することが可能である。

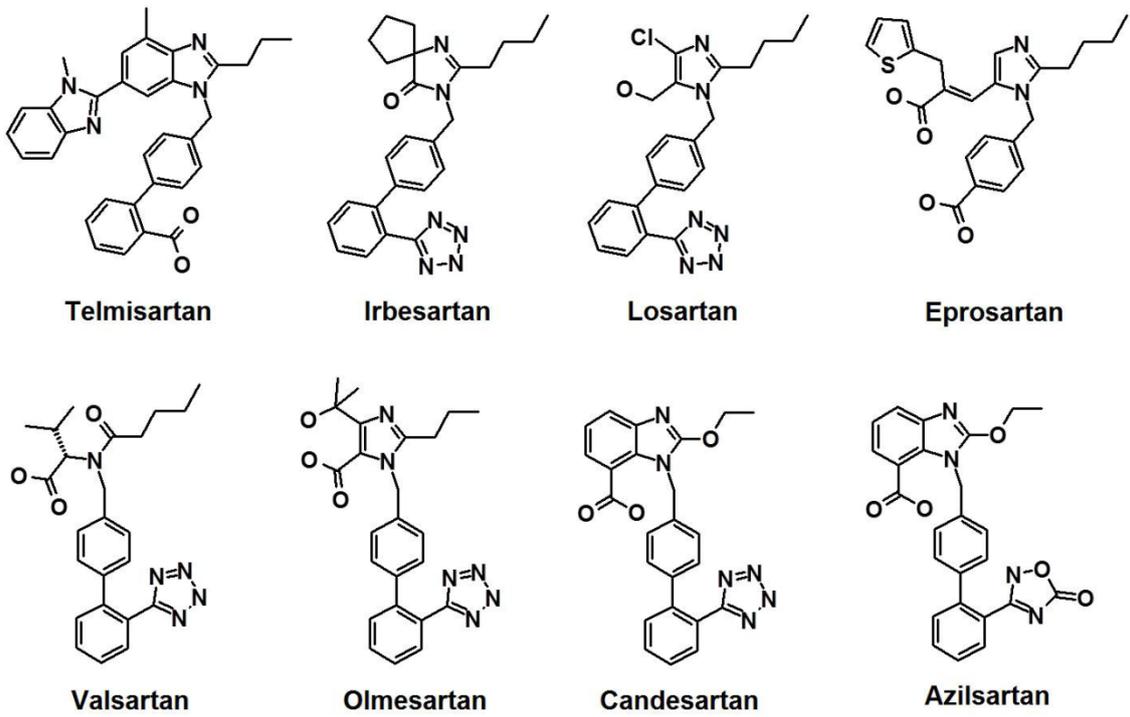


Figure 5-3 代表的な ARB の構造式

#### 5-4 結論

本章では、PPAR $\gamma$ 、テルミサルタン、SRC1 ペプチドの3者複合体の結晶構造を決定した。テルミサルタンは、予想されていなかった特有の結合様式を示した。テルミサルタンによる部分的活性化作用は、H12 ヘリックス周辺の不完全な水素結合ネットワークに由来するものと考えられ、それはテルミサルタンの特徴的な構造、特に中央のプロピルベンズイミダゾール部分によるものであった。この部分構造は、テルミサルタンと、PPAR $\gamma$  活性化作用が弱い他の ARB との違いを決定づけるものでもある。本研究により、ARB による PPAR $\gamma$  部分的活性化機構が原子レベルではじめて解明された。

5-5 引用文献

- [1] de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. & Unger, T. (2000). *Pharmacol Rev* **52**, 415-472.
- [2] Mehta, P. K. & Griendling, K. K. (2007). *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C82-97.
- [3] Turnbull, F., Neal, B., Pfeffer, M., Kostis, J., Alpert, C., Woodward, M., Chalmers, J., Zanchetti, A. & MacMahon, S. (2007). *J Hypertens* **25**, 951-958.
- [4] Brenner, B. M., Cooper, M. E., de Zeeuw, D., Keane, W. F., Mitch, W. E., Parving, H. H., Remuzzi, G., Snapinn, S. M., Zhang, Z. & Shahinfar, S. (2001). *N Engl J Med* **345**, 861-869.
- [5] McMurray, J. J., Ostergren, J., Swedberg, K., Granger, C. B., Held, P., Michelson, E. L., Olofsson, B., Yusuf, S. & Pfeffer, M. A. (2003). *Lancet* **362**, 767-771.
- [6] Lacourciere, Y., Krzesinski, J. M., White, W. B., Davidai, G. & Schumacher, H. (2004). *Blood Press Monit* **9**, 203-210.
- [7] Nixon, R. M., Muller, E., Lowy, A. & Falvey, H. (2009). *Int J Clin Pract* **63**, 766-775.
- [8] Benson, S. C., Pershadsingh, H. A., Ho, C. I., Chittiboyina, A., Desai, P., Pravenec, M., Qi, N., Wang, J., Avery, M. A. & Kurtz, T. W. (2004). *Hypertension* **43**, 993-1002.
- [9] Schupp, M., Janke, J., Clasen, R., Unger, T. & Kintscher, U. (2004). *Circulation* **109**, 2054-2057.
- [10] Picard, F. & Auwerx, J. (2002). *Annu Rev Nutr* **22**, 167-197.
- [11] Staels, B. & Fruchart, J. C. (2005). *Diabetes* **54**, 2460-2470.
- [12] de Luis, D. A., Conde, R., Gonzalez-Sagrado, M., Aller, R., Izaola, O., Duenas, A., Perez Castrillon, J. L. & Romero, E. (2010). *Nutr Hosp* **25**, 275-279.
- [13] Derosa, G., Fogari, E., D'Angelo, A., Cicero, A. F., Salvadeo, S. A., Ragonesi, P. D., Ferrari, I., Gravina, A., Fassi, R. & Fogari, R. (2007). *J Clin Pharm Ther* **32**, 261-268.
- [14] Fujimoto, M., Masuzaki, H., Tanaka, T., Yasue, S., Tomita, T., Okazawa, K., Fujikura, J., Chusho, H., Ebihara, K., Hayashi, T., Hosoda, K. & Nakao, K. (2004). *FEBS Lett* **576**, 492-497.
- [15] Miura, Y., Yamamoto, N., Tsunekawa, S., Taguchi, S., Eguchi, Y., Ozaki, N. & Oiso, Y. (2005). *Diabetes Care* **28**, 757-758.

- [16] Mori, Y., Itoh, Y. & Tajima, N. (2007). *Am J Hypertens* **20**, 431-436.
- [17] Negro, R., Formoso, G. & Hassan, H. (2006). *J Endocrinol Invest* **29**, 957-961.
- [18] Shimabukuro, M., Tanaka, H. & Shimabukuro, T. (2007). *J Hypertens* **25**, 841-848.
- [19] Berger, J. P., Petro, A. E., Macnaul, K. L., Kelly, L. J., Zhang, B. B., Richards, K., Elbrecht, A., Johnson, B. A., Zhou, G., Doebber, T. W., Biswas, C., Parikh, M., Sharma, N., Tanen, M. R., Thompson, G. M., Ventre, J., Adams, A. D., Mosley, R., Surwit, R. S. & Moller, D. E. (2003). *Mol Endocrinol* **17**, 662-676.
- [20] Cronet, P., Petersen, J. F., Folmer, R., Blomberg, N., Sjoblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E. L. & Bamberg, K. (2001). *Structure* **9**, 699-706.
- [21] Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Method Enzymol* **276**, 307-326.
- [22] Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 22-25.
- [23] Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355-367.
- [24] Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.
- [25] Gampe, R. T., Jr., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T. M. & Xu, H. E. (2000). *Mol Cell* **5**, 545-555.
- [26] Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. & Milburn, M. V. (1998). *Nature* **395**, 137-143.
- [27] Ostberg, T., Svensson, S., Selen, G., Uppenberg, J., Thor, M., Sundbom, M., Sydow-Backman, M., Gustavsson, A. L. & Jendeberg, L. (2004). *J Biol Chem* **279**, 41124-41130.
- [28] Markt, P., Schuster, D., Kirchmair, J., Laggner, C. & Langer, T. (2007). *J Comput Aided Mol Des* **21**, 575-590.
- [29] Chittiboyina, A. G., Mizuno, C. S., Desai, P. V., Patny, A., Kurtz, T. W., Pershadsingh, H. A., Speth, R. C., Karamyan, V. & Avery, M. A. (2009). *Med Chem Res* **18**, 589-610.
- [30] Mizuno, C. S., Chittiboyina, A. G., Patny, A., Kurtz, T. W., Pershadsingh, H. A., Speth, R. C., Karamyan, V. T. & Avery, M. A. (2009). *Med Chem Res* **18**, 611-628.
- [31] Goebel, M., Wolber, G., Markt, P., Staels, B., Unger, T., Kintscher, U. & Gust, R. (2010).

*Bioorg Med Chem* **18**, 5885-5895.

- [32] Marshall, T. G., Lee, R. E. & Marshall, F. E. (2006). *Theor Biol Med Model* **3**, 1.
- [33] Trump, R. P., Cobb, J. E., Shearer, B. G., Lambert, M. H., Nolte, R. T., Willson, T. M., Buckholz, R. G., Zhao, S. M., Leesnitzer, L. M., Iannone, M. A., Pearce, K. H., Billin, A. N. & Hoekstra, W. J. (2007). *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 3916-3920.
- [34] Goebel, M., Clemenz, M., Staels, B., Unger, T., Kintscher, U. & Gust, R. (2009). *ChemMedChem* **4**, 445-456.
- [35] Bruning, J. B., Chalmers, M. J., Prasad, S., Busby, S. A., Kamenecka, T. M., He, Y., Nettles, K. W. & Griffin, P. R. (2007). *Structure* **15**, 1258-1271.
- [36] Tagami, T., Yamamoto, H., Moriyama, K., Sawai, K., Usui, T., Shimatsu, A. & Naruse, M. (2009). *Endocrinology* **150**, 862-870.
- [37] Hopkins, C. R., O'Neil S, V., Laufersweiler, M. C., Wang, Y., Pokross, M., Mekel, M., Evdokimov, A., Walter, R., Kontoyianni, M., Petrey, M. E., Sabatakos, G., Roesgen, J. T., Richardson, E. & Demuth, T. P., Jr. (2006). *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 5659-5663.

## 第6章

### 総括

## 6-1 要約

医薬品の研究開発は、長い期間を要する一方、その成功確率は低い。より早く、より確実に新薬を患者へ届けるために、様々な工夫がなされている。その1つが、タンパク質結晶構造解析を活用した創薬研究である。結晶構造解析により、創薬標的タンパク質の構造や作用する薬剤候補物質の結合様式を原子レベルで解明することができ、薬剤候補物質の最適化合成や作用機構の解明を促進し、研究期間の短縮や研究の進展に寄与することができる。

本研究では、創薬研究の初期段階にある3つの創薬標的タンパク質、可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH)、*Trypanosoma cruzi* 由来スペルミジン合成酵素 (TcSpdSyn)、5型 17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (17 $\beta$ -HSD5) に着目し、結晶構造解析を活用して、それらに作用する低分子化合物の同定ならびに作用機構の解明を行った。また、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の1つであり高血圧治療に用いられるテルミサルタンがペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) を部分的に活性化する機構を、結晶構造解析により明らかにした。

以下に、本研究で得られた成果を要約する。

第2章では、降圧剤あるいは抗炎症剤の有望な標的タンパク質である sEH に作用する低分子化合物を同定するため、フラグメント化合物のスクリーニングおよび複合体結晶構造解析を行った。解明されたフラグメント化合物の結合様式から、既知の sEH 阻害剤とは異なる基本骨格、ジヒドロチアゾール、ベンズイミダゾール、エチルメチルアミンが触媒3残基と水素結合することが明らかとなった。また、広いL字型の触媒ポケットの中の様々な部位に化合物が結合する様子が認められ、化合物と特異的あるいは非特異的に相互作用する部位を特定することができた。これらの構造情報に基づき、強い sEH 阻害剤を探索した結果、0.51  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> 値を示す化合物 **19** の同定に至った。

第3章では、シャーガス病の原因となる寄生原虫である *T. cruzi* に対する薬剤候補物質を同定するため、*T. cruzi* の生存に必須であると考えられる TcSpdSyn を標的としてフラグメント化合物のスクリーニングおよび複合体結晶構造解析を行った。フラグメント化合物の結合部位は、プトレシン結合ポケットと二量体界面の2種類があった。プトレ

シン結合ポケットには誘導適合機構が存在することが明らかとなった。一方、二量体界面では、非競合阻害機構が存在することが明らかとなった。

第4章では、去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) の治療法として有望な 17 $\beta$ -HSD5 阻害剤の開発に向け、HTS に由来する低分子化合物との複合体結晶構造解析を行った。化合物の結合によりタンパク質構造が大きく変化することが明らかとなり、その結果、新しい2つの結晶系が生じた。化合物 **29** は、ピラゾール環がオキシアニオンサイトに結合し、その窒素原子が2つの触媒残基、Tyr55、His117 と水素結合していたが、これは酸素原子以外が、17 $\beta$ -HSD5 の触媒残基と水素結合するはじめての例である。化合物 **31**、**32** の結合、特に **32** の結合においては、誘導適合機構により、新たにトンネル様の疎水性ポケットが形成されることが明らかとなった。この機構により、**32** が低分子量ながら強い阻害活性を有していると考えられた。

第5章では、テルミサルタンと PPAR $\gamma$ 、さらに活性化補助因子 SRC1 に由来するペプチドの3者複合体の結晶構造を決定した。テルミサルタンの結合様式から、その PPAR $\gamma$  活性化作用は、ピオグリタゾンなどの強い PPAR $\gamma$  アゴニストと同様に、H12 ヘリックスの構造を活性化補助因子が結合できるような形に安定化させていることで生じていると考えられた。一方、活性化が部分的である理由として、H12 ヘリックスとの相互作用が十分でなく、動的な構造の中で活性化補助因子にとって最適な構造が占める割合が少ない可能性が示唆された。

## 6-2 今後の展望

本研究では、複数の創薬標的タンパク質について、それらに作用する低分子化合物の同定ならびに複合体結晶構造解析による作用機構の解明を行った。

sEH については、阻害剤が相互作用する相手として最も重要な触媒 3 残基に結合する新たな化合物の基本骨格を見出すとともに、触媒ポケット内で化合物が相互作用し得る部位ならびにその相互作用様式を明らかにした。今後は、これらの基本骨格を基に、触媒ポケット内でより多くの相互作用を獲得できるように化合物を設計し、合成することにより、強力かつ新規の構造をもった sEH 阻害剤を早期に創出できるものと期待される。また、既存の sEH 阻害剤を基にした最適化研究においても、触媒ポケット内の相互作用に関する立体構造情報は有用であり、sEH 阻害剤研究さらには高血圧、抗炎症治療薬の創出に向けた開発研究を促進するものと考えられる。

TcSpdSyn については、阻害剤が結合し得る 2 つの部位が存在することを示すとともに、それぞれの部位において、誘導適合機構、非競合阻害機構を明らかにした。強力な阻害剤の同定には至っていないが、本研究で同定された化合物およびその結合部位の立体構造情報を基に、より多くの相互作用を獲得できるように化合物を設計、合成することによって、強い阻害活性をもつ化合物が創出されることが期待される。スペルミジン合成酵素が *T. cruzi* の生存に必須であるかどうかはいまだ明らかになっていないが、強力な阻害剤を作用させることによってその検証を行うことも可能である。

17 $\beta$ -HSD5 については、触媒残基と水素結合する化合物の基本骨格を複数同定するとともに、化合物の結合による誘導適合が生じることを明らかにした。これらの立体構造情報を基に、新規 17 $\beta$ -HSD5 阻害剤として ASP9521 が創製されており、今後 CRPC の治療などに効果を示すことが期待される。また、ピラゾールなど新たに同定された化合物の基本骨格を基に化合物探索や最適化合成を実施することで、既存阻害剤とは物理化学的性質の異なる新規の阻害剤が創出されることも期待される。

ARB の中でもっとも強い PPAR $\gamma$  部分的活性化作用を示すテルミサルタンについて、その活性化機構を明らかにした。これは、テルミサルタンが PPAR $\gamma$  部分的活性化作用を示す強力かつ直接的な証拠でもある。この事実に基づいて新たな臨床研究が行われれば、テルミサルタンの適応症拡大につながることを期待される。また、テルミサルタンの結合様式に基づいた最適化合成により、ARB としての薬理活性を保持しながら、

PPAR $\gamma$  との相互作用、特に H12 ヘリックスとの相互作用を強めることができれば、糖尿病と心血管疾患という関連した疾患群に対して高い治療効果を示す薬剤の創製につながることを期待される。

本研究では、タンパク質結晶構造解析を最大限に活用して創薬研究を実施し、低分子化合物の同定やその作用機構の解明を行った。フラグメント化合物の利用や、ハイスループットスクリーニング (HTS) に由来する化合物の解析など先進的な取り組みを含んでいる。本研究での取り組みは、創薬研究を効率的かつ迅速に進めるために、今後も大いに参考にすべきものであると考えている。タンパク質結晶構造解析を十二分に活用することにより、より早く、より確実に新薬が患者のもとへ届けられることを期待している。

## 謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京工業大学教授 中村聡先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言をいただきましたアステラス製薬株式会社 阪下日登志氏（現産業技術総合研究所）、新美達也氏に心より御礼申し上げます。

本研究に際し、多岐にわたりご協力いただきましたアステラス製薬株式会社 生田目一寿氏、山口智彦氏、立石幸寛氏、本坊和也氏、田辺英紀氏に感謝致します。

共に研究を行い、ご助言、ご支援をいただきましたアステラス製薬株式会社 割鞆雅一氏ならびに X 線構造解析チームの皆様感謝致します。