

学位論文内容要旨

氏名 若杉 昌輝



新規喘息治療薬開発を目指したヒト酸性キチナーゼ阻害剤のイン・シリコ創薬研究

【背景・目的】

キチナーゼは N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)が β -1,4 結合で直鎖状に連なったポリマーであるキチンの加水分解を触媒する酵素であり、昆虫、線虫、真菌、細菌、植物からヒトを含む哺乳類まで幅広く分布している。ヒトなどの哺乳類は基質となるキチンを持たないので、哺乳類のキチナーゼはキチンを構成成分とする病原体に対する防御機構に働くと考えられているが、その生体内での役割は明確ではない。一方、2004 年に喘息モデルマウスと喘息症患者の肺において酸性キチナーゼが大量に発現していること、およびキチナーゼ阻害剤が喘息モデルマウスの炎症を緩和できることが報告されたことから、ヒトの酸性キチナーゼ(hAMCase)が喘息症に関与していることが示唆され、hAMCase を阻害する化合物は新規な喘息治療薬となる可能性があると考えられるようになった。

キチナーゼ全般に関しては、これまでに allosamidin、argadin、Argifin などの天然物由来のパン・キチナーゼ阻害剤が報告されており、キチナーゼ研究において汎用されている。しかし、allosamidin は複雑な糖構造を有する化合物であり、その全合成および誘導体合成は非常に難しいことが知られている。また、argadin および argifin は合成が比較的容易なペプチド性化合物ではあるが、その構造は薬物動態を左右する ADME に関して大変不利である。したがって、これら 3 つの天然物に基づいた創薬研究は非常に困難である。

そこで我々は、イン・シリコスクリーニング法を用いて市販化合物データベースの中から hAMCase を阻害する低分子化合物を同定し、その化合物の hAMCase に対する結合様式に基づいた新規喘息治療薬（新規 hAMCase 阻害剤）開発のための医薬分子設計を行った。

【方法】

1. 多段階イン・シリコスクリーニングに基づいた新規低分子阻害化合物の探索

まず、ナミキ化合物データベース（約 400 万化合物）から、パン・キチナーゼ阻害剤の部分構造（キチナーゼとの結合に重要な部分構造）とよく似た化学構造を有し、かつ創薬研究のための低分子化合物が有するべき指標として知られている Oprea's スコア（水素結合供与基 < 5, 水素結合受容体 < 8, 分子量 < 450, LogP < 4.5, 環の数 < 4, 回転可能な結合数 < 10）を満足する化合物を一次候補化合物群として抽出する。次に、一次候補化合物群の hAMCase の X 線構造に対する高速ドッキング計算を行うことで、活性部位に結合しそうな候補化合物を素早く選別し、二次候補化合物群を得る。さらに、二次候補化合物群について、簡易的な配座解析及びその配座集団

を用いた精密ドッキング計算を行い、ドッキングスコアのトップ構造を選択する。さらに、*hAMCase* に対するトップ構造の相互作用様式に関する基準 (*hAMCase* の触媒残基と水素結合しているかどうか) を満足する化合物を三次候補化合物として選別する。最後に、より少数の候補化合物で化合物空間をなるべく広く探索するために分子の構造類似性に基づいた三次候補化合物のグループ分けを行い、各グループから最も中心に近い化合物をそのグループの代表三次候補化合物とする。この代表三次候補化合物を実際に購入し、*hAMCase* に対する阻害活性値 (IC_{50} 値) を測定することでヒット化合物 (低分子阻害化合物) を同定する。

2. *hAMCase* に対するヒット化合物の結合様式解析

まず、当研究室で開発された自動立体配座解析プログラム CAMDAS を用いて、ヒット化合物の精密な配座解析を行う。このプログラムは簡易的な配座解析とは異なり、環構造についての配座解析を行うことができるため、広範な配座集団のサンプリングが可能である。次に、得られた配座集団を用いた精密ドッキング計算を行い、スコアにより結合ポーズの順位付けを行う。最後に、ドッキングスコアのトップ構造を選択することで、各ヒット化合物の *hAMCase* に対する結合様式モデルを得る。

3. *hAMCase* に対するヒット化合物の結合様式に基づいたイン・シリコ最適化

まず、得られたヒット化合物の結合様式モデルに基づき、付加的な相互作用を形成しそうな誘導体 (デザイン化合物) を分子設計する。そして、デザイン化合物の簡易的な結合様式モデルの構築 (ヒット化合物の結合様式を保持した結合様式モデルの構築)、および MM-GBSA 法による *hAMCase* に対する結合親和性評価を行うことで有望なデザイン化合物を素早く選別する。さらに、有望なデザイン化合物については手順 2 の精密な結合様式解析を行うことで、*hAMCase* に対するより確からしい結合様式モデルを構築し、もう一度 MM-GBSA 法を用いて結合親和性を評価する。最終的に、ヒット化合物よりも結合親和性が大幅に改善されると予想されるデザイン化合物のみを合成依頼する。

【結果】

1. 多段階イン・シリコスクリーニングに基づいた新規低分子阻害化合物の探索

本研究では、化合物類似性検索プログラム Topomer Search で用いるクエリー (query) として、既知キチナーゼ阻害剤 argifin の(methylamino)(3-methylureido) methaniminium 原子団を用いた。これは、argifin と各種キチナーゼの複合体結晶構造 (PDB ID : 1h0i) において、キチナーゼの活性中心にあるアミノ酸残基と水素結合を形成していたからである。そこで、ナミキ化合物データベースから similarity 距離が 185 以下 (デフォルト値) の原子団をもつ化合物を検索し、続いて Oprea's スコアを満足する化合物を選択したところ、一次候補化合物群として 2529 化合物を抽出した。

次に、ドッキングプログラム Glide の HTVS モードを用いた高速ドッキング計算を行い、一次

候補化合物群 2529 化合物から Glide スコアが上位の 500 化合物を二次候補化合物群として選択した。さらに、Glide SP モードによる精密分子ドッキング計算を行い、Glide スコアのトップ構造を観察したところ、500 個中 301 個の化合物が、*hAMCase* の活性中心にあるアミノ酸残基 (W99, D138, E140, Y212, Y213, および W360) の内 2 残基以上と水素結合を形成することが示唆された。これにより、三次候補化合物として 301 化合物を抽出した。

最後に、化学構造に関するクラスター解析を行い、Merge Distance が 0.6Å の基準でグループ分けしたところ、三次候補化合物群を全 23 グループに分類することができた。そして、各グループから最も中心に近い化合物を選択することで、23 個の代表三次候補化合物を抽出した。実際に、これら 23 化合物を購入し、*hAMCase* に対する阻害活性測定を行ったところ、IC₅₀ 値で 100μM 以下の強い阻害活性を有する 7 個のヒット化合物を同定することができた。また、本研究でのヒット率は 30.4% であり、通常のインシリコスクリーニングに比べ非常に高いヒット率を示すことができた。このことは、我々が構築した多段階インシリコスクリーニング手順が非常に有効であることを示している。

2. *hAMCase* に対するヒット化合物の結合様式解析

7 個のヒット化合物の結合様式解析を行い、結合様式を観察した。中でも、*hAMCase* に対して最も強い阻害活性を示すヒット化合物①の結合様式を図 1 に示す。まず、強い阻害活性を示したヒット化合物①と②は、図 2 で示すクエリーに相当する原子団が触媒残基である E140 やその周辺の W99、D213 と水素結合を形成することが観察された。さらにベンゼン環やヘテロ環が W360 と π - π 相互作用を形成し、F58・Y27・W360・Y267 からなる疎水性結合部位とうまく相互作用することが観察された。また、ヒット化合物③と④は E140 との水素結合は形成しないが、多環芳香族ヘテロ環 (furo[2,3-*b*]pyridine や benzo[*d*]oxazole) が W360 と強く π - π 相互作用を形成することで強い阻害活性を示したと考えられる。したがって、触媒残基である E140 やその周辺の W99、D213 と水素結合を数多く形成し、さらに疎水性結合部位においては W360 と π - π 相互作用を形成するような化合物が、*hAMCase* に対して強い阻害活性を有すると予想される。一方、ヒット化合物⑥と⑦は阻害活性が弱かったが、それらの分子内のベンゼン環が、W99・W218・Y141 からなる疎水性結合部位とうまく π - π 相互作用を形成することが示唆された。したがって、この結合部位も比較的重要な相互作用ポイントであると考えられる。そのため、W99・W218・Y141 との付加的な π - π 相互作用を形成するようにヒット化合物①や②をデザインすることができれば、さらに強い阻害活性を示す阻害剤になると考えられる。

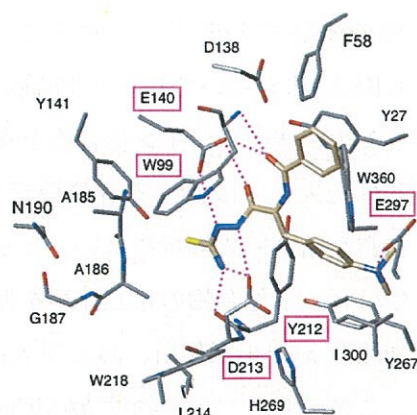


図 1. *hAMCase* に対するヒット化合物①の結合様式

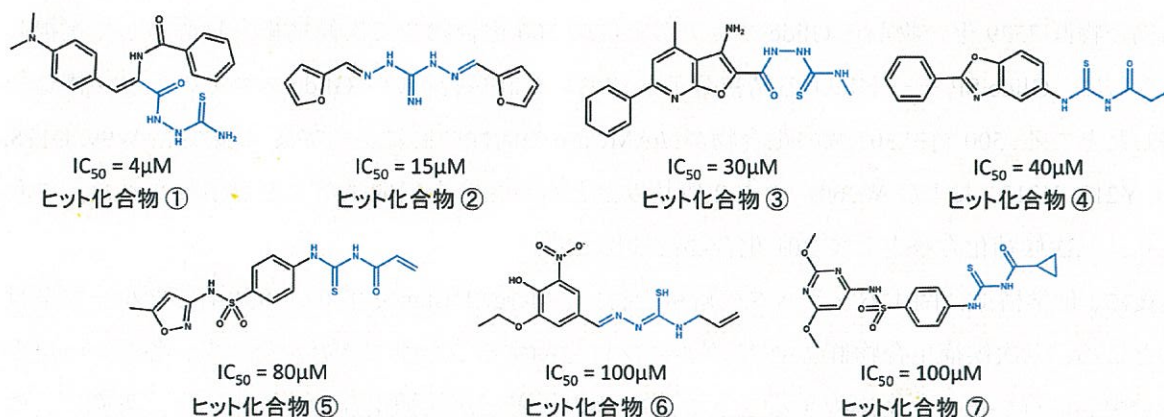


図2. *hAMCase* 阻害活性を有する7個のヒット化合物の化学構造と阻害活性値 (IC₅₀ 値)

クエリーに相当する原子団を青で示す。

3. *hAMCase* に対するヒット化合物の結合様式に基づいたイン・シリコ最適化

結果2の考察から、ヒット化合物①の結合様式に基づいて誘導体のデザインを行った。まず、図3に示すクエリー構造を考案し、自動分子設計プログラム Muse を用いて全部で240個の誘導体をデザインすることができた。そして、MM-GBSA法を用いてヒット化合物①よりも結合親和性を改善する193個のデザイン化合物を素早く選別した。特に結合親和性を大きく改善する有望なデザイン化合物について

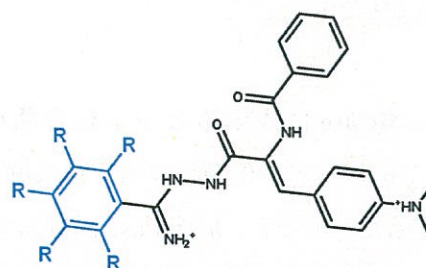


図3. デザインに用いたクエリー構造

は、精密な結合様式解析を行い、ヒット化合物の結合様式と比較した。その結果、このデザイン化合物はヒット化合物の相互作用を保持した上に、W99・W218・Y141 からなる疎水性結合部位と付加的な π - π 相互作用、および A186 や M210 との付加的な水素結合を形成していた。したがって、このデザイン化合物は *hAMCase* に対して強い阻害活性を有すると期待されるため、今後、全合成ならびに阻害活性測定の依頼を検討している。