

学位論文内容要旨

氏名：増 田 陽 介

題目：水分子の動的解析によるセリンプロテアーゼの可逆的共有結合性阻害剤の研究

要旨：

序章 創薬における可逆的共有結合性阻害剤研究の重要性

共有結合性阻害剤は、共有結合を形成し標的蛋白質の働きを阻害する。その長所は、少ない投与量と投与回数で阻害でき、また多くの場合、薬剤耐性を示す変異型の標的蛋白質も一定程度阻害できることである。一方短所は、標的以外の蛋白質と反応し特異的毒性を発現する場合があることである。可逆的共有結合性阻害剤は、不可逆的共有結合性阻害剤よりも、特異的毒性を示す可能性が低い。そこで、可逆的共有結合性阻害剤として有望な化合物を、有望でない化合物と判別するための手法の確立を目標とし、研究を行った。

共有結合性阻害剤の一般的な薬物標的であるセリンプロテアーゼのうちトリプシンを、本研究における標的酵素とした。その反応機構では、His 57 N_ε原子によってプロトンを引き抜かれた Ser195 O_γ原子が、ペプチド結合のカルボニル炭素を求核攻撃し、第1の四面体中間体を経てアシル-酵素中間体を形成する（アシル化）。その後、切断されたペプチドのC末端側が活性ポケットから脱離し、活性化された水分子がアシル基のカルボニル炭素を求核攻撃し、第2の四面体中間体を経て、生成物-酵素複合体が生じる（脱アシル化）。まず、基質と構造が類似した可逆的共有結合性阻害剤であるガベキサート（GB）のアシル-トリプシン中間体の結晶構造を解析し、既に報告済みの基質様化合物のアシル-トリプシン中間体の結晶構造と比較することで、ある化合物が阻害剤となる要因が解明できると考え、研究を行った。

第1章 背景研究：可逆的共有結合性阻害剤ガベキサートのアシル-トリプシン中間体の結晶構造解析

[背景]

GB（図1）は、トリプシンの可逆的共有結合性阻害剤である。トリプシンの硫酸アンモニウム析出結晶にGBを浸潤させるとアシル-酵素中間体を得られるが、活性部位に硫酸イオンが結合しており、脱アシル化反応を阻害しているものと思われた。そこで、脱アシル化反応を阻害する硫酸イオンを除いた結晶

を作成し、アシルー酵素中間体を生理的 pH において原子レベルで解析することとした。

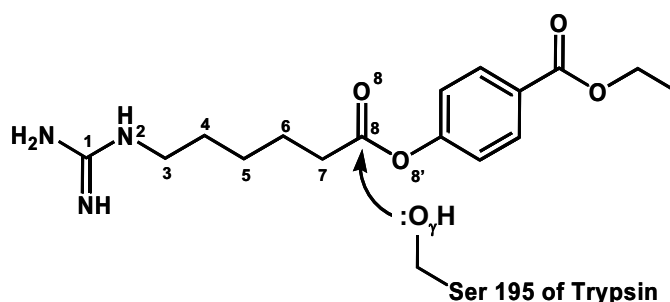


図 1. ガベキサート

[方法]

市販のトリプシン (Sigma) からβ-トリプシンを精製した. 0.7 mM β-トリプシンに, 阻害剤ベンザミジンを 400 mM 加え, 硫酸アンモニウムを用いて, 低充填密度型の斜方晶系結晶を選択的に析出させた.

硫酸イオンを除くために, 結晶をグルタルアルデヒド含有 3.2 M 硫酸アンモニウム溶液で 2 時間架橋処理し, 結晶の物理的強度を高めた. 次に, ポリエチレングリコール (PEG) 8000 を含み, 硫酸アンモニウムを含まない母液に架橋処理した結晶を一晩浸漬させた. このバックソーク済み架橋処理結晶について X 線回折実験を行い, 活性ポケットに硫酸イオンおよびベンザミジンが存在しないことを分解能 2 Å で確認した. GB は 3.2 M 硫酸アンモニウム溶液に 1 mM しか溶けないが, PEG8000 含有母液にはよく溶解する. 10 mM GB 含有 30% w/v PEG8000 溶液 (pH 7.0) に, バックソーク済み結晶を 2 時間浸漬させた架橋処理済み結晶を用い, 放射光施設 SPring-8 においてマイクロ X 線ビームを用いて 116 K の窒素気流下で回折強度データを測定した.

[結果と考察]

架橋処理していない結晶は 30% w/v PEG8000 含有母液に溶解してしまう. 一方, 架橋処理した結晶は, 18% w/v PEG8000 に溶解するものの, 30% w/v PEG8000 には溶解しなかった. 構造精密化を行ったデータセット (分解能 1.94 Å) の基質結合ポケットには, GH の電子密度が存在する. GH のグアニジノ基は Asp189 と水素結合しており, ヘキサノイル部分は活性残基の Ser195 O_γ 原子と共有結合している. 得られた結晶構造はアシルー酵素中間体である 6-グアニジノヘキサノイルトリプシン (GHT) を反映している. 硫酸イオンは活性部位に存在せず, 代わりに水分子 1 (Wat1) が存在し, His57 N_ε, 水分子 2 (Wat2),

水分子 3 (Wat3) と水素結合している。これらの水素結合は、Wat1 をアシル平面の垂直方向、アシル基のカルボニル炭素 (C_{acyl}) 原子の上方に固定している (図 2)。Wat1 は、脱アシル化において C_{acyl} 原子を攻撃する求核的水分子であると考えられる。

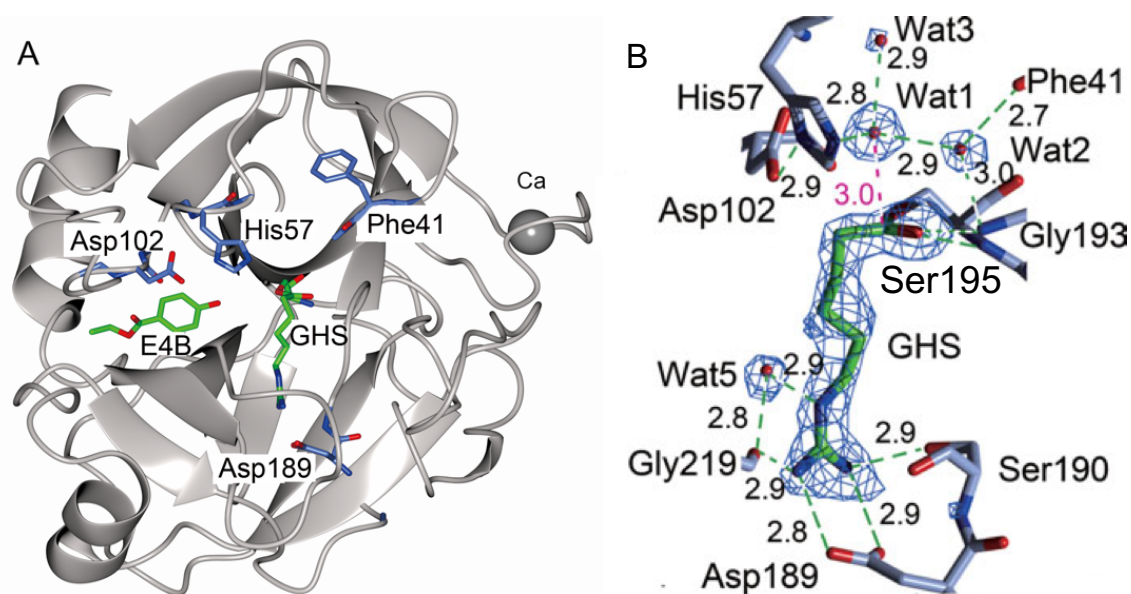


図 2. アシルトリプシン中間体の全体図と活性部位

A: GHTの全体図。GHS : 6-グアニジノヘキサノイルセリン, E4B : エチル-4-ヒドロキシベンゾエート. **B:** GHと周辺残基。緑破線：水素結合，桃色破線：Wat1と C_{acyl} 原子とのファン・デル・ワールス相互作用。

求核的水分子周辺の構造に基づき阻害剤と基質様化合物を判別できれば、創薬に役立つ可能性がある。GHT と、蛋白質構造データバンク (PDB) に報告されている他のアシルトリプシン中間体における求核的水分子周辺の構造を比較した (図 3 及び表 1)。その結果、幾何的パラメータは阻害剤と基質様化合物の間で類似しており、静的構造により阻害剤と基質様化合物を判別することは困難であると考えられた。

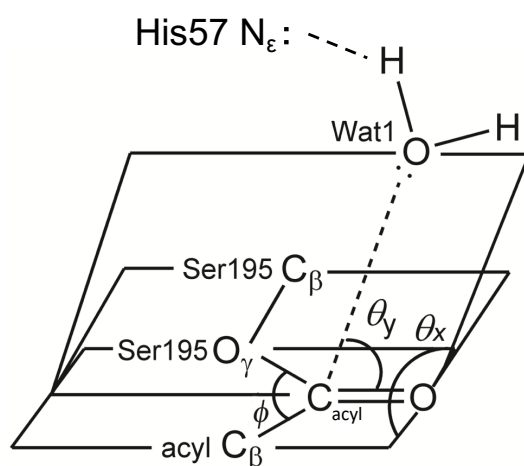


図 3. 求核的水分子周辺の配置

表 1. 幾何的パラメータの比較

| 共有結合性 リガンド名 | 属性 | PDB ID | HOH No. | $k_{cat}(\text{sec}^{-1})$ | Wat1 O— C _{acyl} (Å) | Wat1 O— His57N _ε (Å) | θ_x (deg) | θ_y (deg) |
|----------------|--------|--------|---------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------|------------------|
| Nafamostat | 阻害剤 | 2AH4 | 1220 | 3.2×10^{-5} | 3.90 | 2.78 | 129.3 | 53.9 |
| Gabexate | 阻害剤 | 3VPK | 507 | 8.0×10^{-4} | 3.02 | 2.75 | 95.3 | 97.8 |
| suc-AAPK-pNA | 基質様化合物 | 2AGG | 526 | 41 | 2.47 | 2.73 | 94.2 | 96.1 |
| suc-AAPR-pNA | 基質様化合物 | 2AGE | 526 | 91 | 3.03 | 2.92 | 102.1 | 83.8 |

灰色行：阻害剤，白色行：基質様化合物，赤字：類似の値．

第 2 章 基礎的研究：求核的水分子の動的解析

[背景]

静的構造による判別が困難であったため，水分子を動的に解析する水和熱力学解析を行い，求核的水分子の熱力学的特性と酵素反応速度との関係を調べた．

[方法]

GHT のほか 4 つのアシルトリプシン中間体の結晶構造を初期構造とし，2 ns の分子動力学シミュレーションをプログラム *Desmond* (Schrödinger) により行った後，クラスタリングにより，蛋白質の水溶液中の代表構造を 1 つの初期構造につき 3 つ取得した．その各々に対し，2 ns の水和熱力学解析をプログラム *WaterMap* (Schrödinger) により行った．活性部位周辺に予測された水サイト (図 4) のうち，His 57 N_ε 原子までの距離と C_{acyl} 原子までの距離の和が最小の

サイトを求核的水サイトとし、バルクの水分子と求核的水サイトでの水分子のギブズ自由エネルギーの差 (ΔG_{wat}) と、酵素反応速度定数 (k_{cat}) の実験値との関係を調べた。

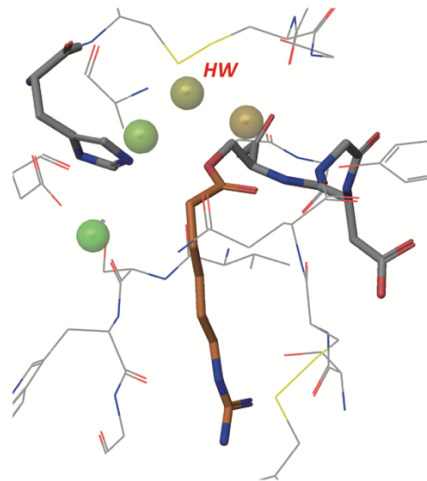


図 4. 水和熱力学解析の結果の一例（リガンド：GB）

球：予測された水サイト，HW：求核的水サイト

[結果と考察]

全ての ΔG_{wat} は正の値を示し、 ΔG_{wat} が小さいほど、 k_{cat} も小さい傾向を示した（図 5）。阻害剤の求核的水分子は、ギブズ自由エネルギー的にあまり活性化されていないため、求核攻撃が緩徐に進む一方、基質様化合物の求核的水分子はギブズ自由エネルギー的に活性化されており、求核攻撃が迅速に進むと考えられる。 ΔG_{wat} は、ある共有結合性リガンドが阻害剤と同等の k_{cat} を呈するか、あるいは基質様化合物と同等の k_{cat} を呈するかを予測する上で良い指標となり得ると考えられた。

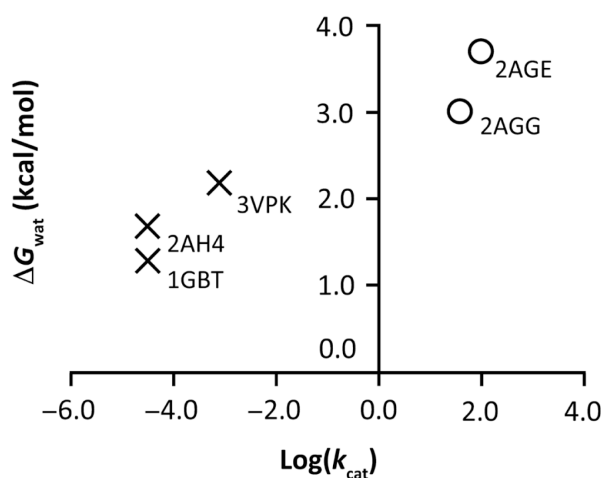


図 5. $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ と ΔG_{wat} の関係

×：阻害剤，○：基質様化合物

第3章 創薬研究への応用：線形判別分析による阻害剤と基質様化合物の判別

[背景]

前章の結果を受け，より多くのリガンドを用い，可逆的共有結合性阻害剤の候補として有望な化合物と有望でない化合物を判別するインシリコ手法を確立することを目標に研究を行った．

[方法]

PDB に結晶構造が報告されていないものの， k_{cat} の実験値が報告されている共有結合性リガンドを文献から抽出した．これらのリガンドのアシルトリプシン中間体の立体構造を，プログラム *Phase* (Schrödinger) によるフレキシブル分子重ね合わせにより構築した後，前章と同様の手法により ΔG_{wat} を求めた．さらに，共有結合性リガンド部分の反応性の指標として，アシル化された Ser195 のカルボニル結合の反結合性分子軌道 (π^*) の軌道エネルギー (E_{orb}) を，プログラム *MOPAC2016* を用いた半経験的分子軌道計算により求めた (図 6)．

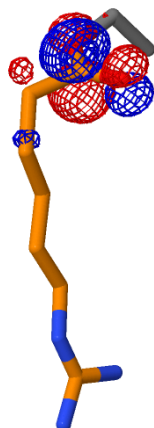


図 6. 反結合性分子軌道 (π^*) の一例
(リガンド：GB)

次に，学習用セットのリガンド (10 化合物) を用いて， ΔG_{wat} と E_{orb} を指標とした線形判別モデルを構築した．その後，検証用セットのリガンド (4 化合物) により，構築したモデルを評価した．

[結果と考察]

学習用セットにより構築された線形判別モデルは，学習用セットのリガンドを阻害剤と基質様化合物とに完全に分離した．さらに，このモデルは，検証用セットのリガンドを阻害剤と基質様化合物とに完全に正しく判別した．(図 7)．よって本手法は，阻害剤と基質様化合物との判別に有用であると言える．また，リガンドは，求核的水分子がギブズ自由エネルギー的に安定な場合や，共有結

合性リガンド部分の反応性が小さい場合に、阻害剤となると考えられる。

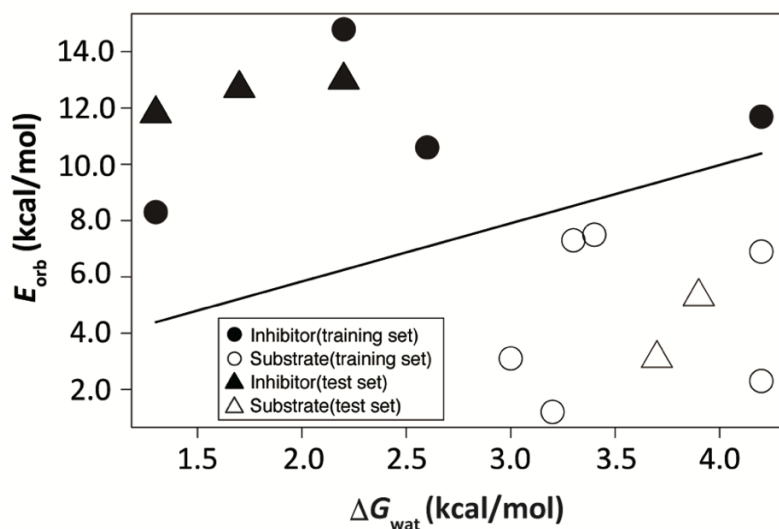


図 7. ΔG_{wat} 及び E_{orb} による線形判別分析

- : 阻害剤, ○ : 基質様化合物 (いずれも学習用セット)
▲ : 阻害剤, △ : 基質様化合物 (いずれも検証用セット)

第 4 章 今後の展望

本手法は、標的蛋白質が加水分解酵素であること、酵素反応の律速段階が水分子の求核攻撃であること、求核的水分子が脱プロトン化され加水分解反応が進行することの 3 点のみを前提としており、幅広い加水分解酵素に適用可能と考えられる。また、創薬の現場では、非共有結合性阻害剤の阻害能改善のため、共有結合性阻害剤への改変が試みられることがあるが、その際にも本手法は適用可能と考えられる。また本手法は、少ない指標により判別が可能であるため、計算コストの低い効率的な方法であると言える。

以上