

機関番号：33101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20611018

研究課題名（和文）

匂い受容体のリガンドデザインと分子認識機構の研究

研究課題名（英文）

Studies on the Molecular Recognition and Design of Ligands of Olfactory Receptors

研究代表者

石黒 正路 (ISHIGURO MASAJI)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：10280687

研究成果の概要（和文）：

多様な匂い物質は約500種の匂い受容体で感知される。OR7D4 と名づけられた匂い受容体はアンドロスタジエノンと呼ばれるステロイド誘導体を感じ取る。アンドロスタジエノンが結合した受容体の立体構造モデルから、このステロイドを結合する受容体の残基を予測し、その結合に関与するステロイドの特に $\Delta 16$ の部分構造を修飾した誘導体をデザインした。また、これらの誘導体をデヒドロエピアンドロステロンから合成した。

研究成果の概要（英文）：

Various odorants are recognized by about 500 kinds of odorant receptors. OR7D4, an odorant receptor binds androstadiene, a steroid derivative. Through modeling of the receptor-ligand complex structure, important residues involved in the ligand binding and the moieties which interact with the residues are selected and the steroid derivatives modified at the D16 portion were synthesized from dehydroepiandrosterone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：匂い受容体、GPCR、フルアゴニスト、CH- π 相互作用、デヒドロエピアンドロステノン、ステロイド、OR7D4、アンドロステノン

1. 研究開始当初の背景

ロドプシンのリガンドであるレチナール

の光異性化にともなうロドプシン蛋白質（オプシン）の構造変化モデルは申請者らが世界

に先駆けて行ったコンピュータ・シミュレーションから得られ、GPCR で高く保存されているアミノ酸残基が構造変化に重要な役割を持つことを示してきた。このモデルからロドプシンの構造変化が他の GPCR においても共通したものであることが示され、神経情報伝達性アミンとその受容体の認識様式の解析に適用された。また、オピオイド関連ペプチド・ノシセプチンとその受容体においては受容体-リガンド複合体構造モデリングと受容体の部位特異的アミノ酸残基変異実験を併用して生体内ペプチドリガンドや合成ペプチドリガンドとその受容体の分子認識様式の解析に適用した。これらの研究から、最近の GPCR リガンドの薬理学研究によってインバースアゴニスト、アンタゴニスト、パーシャルアゴニスト、フルアゴニストとして区別されるリガンドの機能に対応した立体構造がひとつの GPCR にそれぞれ存在することを示した。この構造変化モデルは GPCR の構造変化研究から支持されるが、最近明らかにされたインバースアゴニストが結合した β -アドレナリン受容体の結晶構造が申請者らが構築したインバースアゴニスト結合構造と良く符合することからも支持される。

これらの結果から、生体内生理活性分子およびその関連リガンド分子が機能に対応した異なる受容体立体構造に結合することと同様に、匂い分子と受容体の分子認識様式もリガンドと多様な受容体機能構造との多様な組み合わせからなるという考えに至った。すなわち、ひとつの匂い分子は異なる受容体の異なる機能構造に結合することにより、その特異的なパターンが匂いとして認識されると予想される。

一方、ロドプシン構造変化中間体構造モデルをもとにした種々の GPCR の機能構造モデルから新規リガンドのデザインも可能である。申請者らはロドプシンの結晶構造のクロモフォア（レチナル）結合部位には適合せず、ロドプシンの構造変化中間体構造モデルのクロモフォア結合部位に適合するレチナルアナログがデザインでき、これらのアナログは実際に予測通りオプシンへの結合とレチナルとは異なる異性化過程を示した。これは構造変化中間体構造モデルを基に、機

能の異なる新規 GPCR リガンドのデザインが可能であることを示している。そこで、この方法を匂い受容体と匂い分子との分子認識様式に適用すると、匂い受容体の機能の異なる構造（たとえばアンタゴニスト結合構造）を認識できる匂い分子のデザインが可能になる。

2. 研究の目的

花の香りからゴミの悪臭まで匂い物質は多様で匂い物質の種類は $10^{6\sim7}$ とも言われる。匂い物質を認識する受容体は7回膜貫通型蛋白質であるG蛋白質結合型受容体（GPCR）に属し、GPCR全体の半数以上の約500を占めているとされている。しかし、匂い物質の種類に比較すると受容体の種類は極めて少なく、その多様な匂い物質を認識する受容体の分子認識の多様性機序は現在のところ不明である。匂い受容体はひとつの細胞に1種類しか発現しないが、ひとつの受容体は複数の匂い分子を認識し、ひとつの匂い分子は複数の受容体に結合する。匂い受容体はそのアミノ酸配列相同性から視覚受容体であるロドプシンファミリーに属する。本課題は申請者らが長年行ってきたロドプシンの光受容による蛋白質構造変化中間体モデル研究から、ロドプシンの光による活性化と匂い受容体の匂い物質による活性化機構は基本的に同じであるという考えに基づいており、ロドプシンの光活性化中間体構造モデルから構築する匂い受容体の多種類の機能構造モデルをもとにして、匂い受容体リガンドの分子デザインを行うことを目的としている。これによって匂い受容における最も重要な分子認識機構を受容体の立体構造レベルで解析し、多様なリガンドの認識の生物科学的意義を明らかにする。

匂い受容体による匂い分子の認識と情報伝達の分子機序を受容体の立体構造レベルで明らかにする。

このため、系統的、網羅的な受容体立体構造モデル構築と匂い分子との複合体構造解析によって、従来から知られている匂い分子の多様な受容体結合と情報伝達の仕組みを明らかにする。匂いの受容は生体外情報としての化学分子情報を取得する最初のステップであり、

ヒトが直感的に「記憶」を実感できる数少ないイベントのひとつである。また、匂いの受容体は生体内の細胞表面に最も広く存在するGタンパク質結合型受容体(GPCR)のファミリーとして最大のファミリーを形成していることを考慮すると、匂い分子とその受容体との分子認識機序は広くGPCRに適用でき、合理的な薬物設計に応用可能であるとともに、アロマセラピーの分野におけるアロマ効果についての分子レベルでの解明に貢献をはかる。

3. 研究の方法

(1) ヒト匂い受容体OR7D4のリガンド認識の解析

特定の匂い分子として本課題ではヒト匂い受容体(OR7D4)が明らかとなっているアンドロステノンおよびアンドロスタジエノンを選び、OR7D4のフルアゴニストおよびパーシャルアゴニスト結合構造モデルを構築し、複合体構造モデル構築によってふたつのステロイド化合物がフルアゴニストまたはパーシャルアゴニストのいずれかであるか予測する。また、最近のSNPs研究からOR7D4の変異を持つヒトでは、アンドロステノンおよびアンドロスタジエノンが通常の心地よい香りから汗臭さの匂いとして感知することが明らかにされており、変異部位が及ぼすリガンド認識様式への変化についてリガンド-受容体複合体構造の観点から明らかにする。

(2) ヒト匂い受容体OR7D4のアンタゴニスト化合物のデザインと合成

OR7D4のアンタゴニストおよびインバーサゴニスト結合構造モデルを構築し、受容体アンタゴニストとなるアンドロステノンおよびアンドロスタジエノン関連化合物をデザインする。また、デザインした誘導体を網羅的かつ効率よく合成する経路と方法を開発する。合成した誘導体のアンタゴニストが与えるアンドロステノンおよびアンドロスタジエノンの匂いへの影響について明らかにする。なお、匂いの変化は担当研究者により感知できることから、特に細胞系などを用いるアッセイ系の使用は本課題期間では予定していない。

(3) マウスおよびヒト匂い受容体のリガンド認識の解析

現在リガンドと受容体の双方が知られているマウスの一連の受容体(現時点で4-5種程度)について機能的構造モデル(フルアゴニストおよびパーシャルアゴニスト結合構造モデル)とリガンドとの複合体構造モデルを構築し、匂い物質と受容体の認識様式(特に相互作用するリガンドの官能基と受容体のアミノ酸残基の対応)について明らかにする。この情報をもとに、アンタゴニストとして働く匂い分子と受容体の組み合わせの検索法を検討する。また、500種程度存在するほとんどのヒト匂い受容体と匂い分子(リガンド)の対応が不明であるため、機能的構造から結合する匂い分子の構造(または部分構造と官能基)の予測方法を追求する。

4. 研究成果

(1) ヒト匂い受容体OR7D4のリガンド認識の解析

匂い分子としてアンドロステノンおよびアンドロスタジエノンを選び、そのヒト匂い受容体OR7D4のフルアゴニストおよびパーシャルアゴニスト結合構造モデルをウシロドプシンの光活性化中間体構造モデルから構築した。さらに、アンドロステノンおよびアンドロスタジエノンとの複合体構造モデルをそれぞれ構築して、ふたつのステロイド化合物がフルアゴニストであると予測できる複合体構造モデルを得た。さらに、SNPs研究から明らかとなっているOR7D4の変異部位が及ぼすリガンド認識様式への変化についてリガンド-受容体複合体構造から検討したところ、直接リガンドと相互作用するリガンド結合部位にはないことが明らかとなった。また、その結合様式からリガンドのD環上の二重結合が受容体の特定の芳香環残基とCH- π 相互作用により結合することが強く示唆された。一方、3-Oxo基はTM3のG1n99と水素結合する役割を持つものと考えられる。構築したOR7D4の構造モデルとアンドロステノンとの複合体構造モデルを図1に示す。

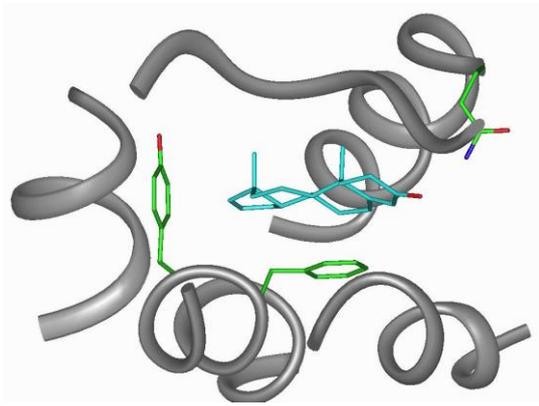


図 1

(2) ヒト匂い受容体 OR7D4 のアンタゴニスト化合物のデザインと合成

①受容体アゴニストの合成

OR7D4 の受容体アゴニストとなる関連化合物を受容体-リガンド複合体モデルからデザインし、それらの誘導体を網羅的かつ効率よく合成する経路をパラジウム試薬を用いた方法について検討し、その経路を開発した。また、AB 環上の二重結合がもたらす平面的構造が、受容体のリガンド結合部位で形成される芳香環ポケットに良く適合することも示唆されることから、このような構造に関連した構造からアンタゴニストをデザインすることを試み候補化合物のデザインを行った。特に、 $\Delta 16$ 上にメチル基を導入した化合物と環拡大して 6 員環とした化合物を目的とした。図 2 と図 3、4、5 にそれぞれ $\Delta 16$ に焦点を当てデザインした関連誘導体とデヒドロエピアンドロステロンからそれぞれを合成する経路を示す。

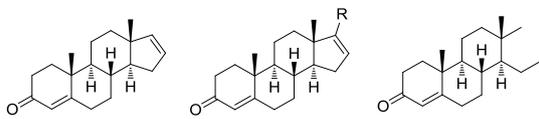


図 2

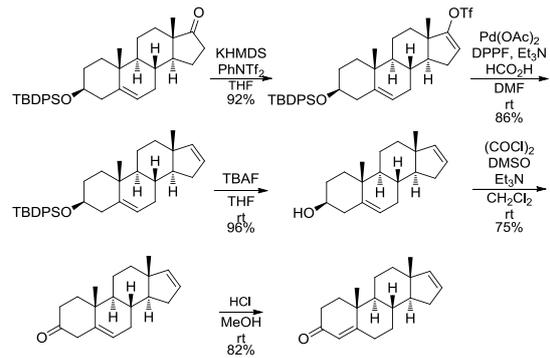


図 3

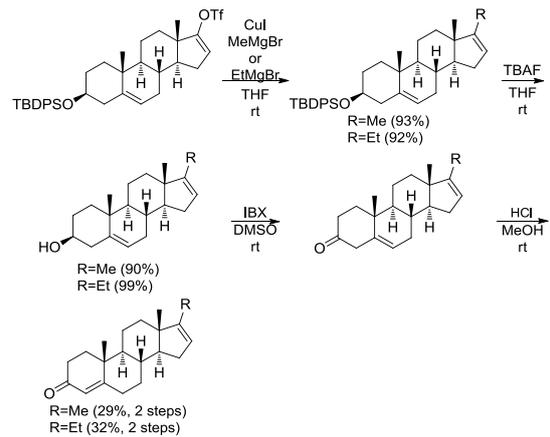


図 4

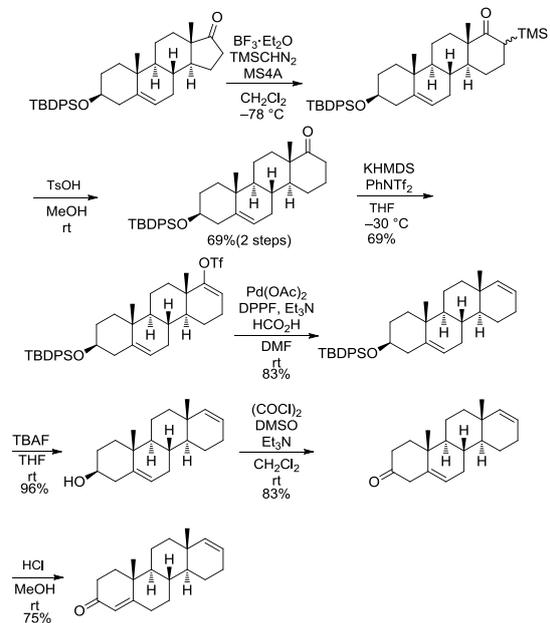


図 5

②新しい Beayer-Villiger 反応の開発

デヒドロエピアンドロステロンを出発原料として $\Delta 16$ および $\Delta 15$ 誘導体の合成を試みる反応において 17-keto 体から 15-en-17-one

体への誘導について Pd(OAc)₂ を用いる三枝酸化反応を試みたところ、予期に反して酸素挿入反応が進行し、ラクトン体が得られた。条件を詳細に検討したところ、図6に示すような条件で、Baeyer-Villiger 反応が効率よく進行することが見出された。

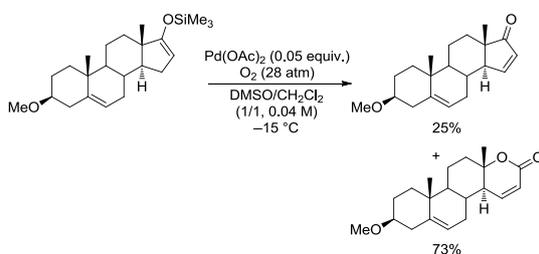


図 6

(3) マウスおよびヒト匂い受容体のリガンド認識の解析

匂い分子は非常に多いため、特にステロイドなど揮発性が低い、分子量の比較的大きい分子について検索し、データベースを作成している。このような分子は脊椎動物由来のものが多く、ここで取り上げた OR7D4 などのステロイド化合物などが代表的なものとして挙げられた。現在、さらに検索を進めている。最終的には研究室の HP に掲載する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① □ Minoru Tamiya, Futa Takada, Nobuhisa Isaka, Nahoko Iimura, and Masaji Ishiguro, Modification of D-ring Moiety of Steroids—A Novel Palladium Catalyzed Baeyer–Villiger Type Rearrangement of Cyclic Silylenol ether Derivatives, *Heterocycles*, 査読有、**82** 巻 **2010** 1119-1125

[学会発表] (計 2 件)

- ① □ 田宮 実、高田楓太、石黒正路、パラジウムを用いた新規 Baeyer-Villiger 型環拡大反応 (口頭発表) 第 60 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム平成 22 年 12 月 4 日 (新潟薬科大学)

- ② 高田楓太、井坂修久、田宮 実、石黒正路、パラジウムを用いた新規 Baeyer-Villiger 型環拡大反応 (口頭発表) 日本薬学会第 130 年会平成 22 年 3 月 30 日 (岡山大)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nupals.ac.jp/~ishiguro-yoned>
[a/Chemical%20Biology%20Lab/Top.html](http://www.nupals.ac.jp/~ishiguro-yoned/a/Chemical%20Biology%20Lab/Top.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 正路 (ISHIGURO MASAJI)
 新潟薬科大学・応用生命科学部・教授
 研究者番号：10280687

(2) 研究分担者

米田 照代 (YONEDA TERUYO)
 新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授
 研究者番号：30265714
 田宮 実 (TAMIYA MINORU)
 新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
 研究者番号：10468960