

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790103

研究課題名(和文) 酵素を区別する人工補酵素の開発と次世代型基質 - 補酵素複合体医薬品開発への応用

研究課題名(英文) Development of coenzyme with enzyme selectivity and substrate-coenzyme complex inhibitor

研究代表者

藤井 幹雄 (FUJII, Mikio)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：20311996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円、(間接経費) 450,000円

研究成果の概要(和文)：生体内のビタミンである補酵素NADは様々な働きをもっています。そのため色々な酵素に結合し、NADを改良した薬を開発する際には、目的の酵素以外の酵素にも結合するため、副作用となります。この研究では、NADが酵素の中に入った時の形の変化と酵素の種類の関係を新しく見出し、それをもとに、目的の酵素と他の酵素を区別できるかどうか確かめる実験をしました。NADの形を固定することで、酵素を区別できることを明らかにしました。将来的には、これが可能になると、薬を開発する段階で、副作用を軽減できるようにする工夫が施せるようになり、最終段階で毒性のために医薬品となれない薬を減らすことができると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Coenzyme NADs can bind to many enzymes such as alcohol dehydrogenase and hydrolases. NAD modified compound can affect to both targeted enzyme and untargeted enzymes and it may cause side effect of drug. In this study, I study the relationship with conformation of NAD in an enzyme and family of enzymes to find the rule of the conformation of NAD in an enzyme. I succeeded in the construction of map of the conformation of NAD. Next the conformation-fixed compounds were made to test the compounds with conformational differences select a targeted enzyme. The conformational modification of NAD could bind the targeted enzyme stronger than the other enzymes. This concept is useful for drug design.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：NAD 酵素 補酵素 立体配座 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

生体内で特定の酵素だけを働かせる新規分子プローブの開発は、これまで不明であった酵素あるいは生体の機能解明、医薬品開発、物質の発酵生産の分野を大きく発展させる可能性がある。補酵素 NAD (ニコチンアミドアデノシン二リン酸) は脱水素酵素の補酵素として有名であるが、同時に NAD 加水分解酵素、ADPR (アデノシン二リン酸リボース) 環化酵素、PARP (ポリアデノシルジホスホリボシルポリメラーゼ)、ヒストン脱アセチル化酵素の補酵素や基質としても働く。したがって、補酵素 NAD をリード化合物とした創薬研究を行う際、TAD (J. Med. Chem. 2007, 50, 5745) のように非常に強力な阻害剤が開発されているが目的以外の酵素の働きまで阻害するため毒性が高い。申請者は、酵素の立体構造を調査した結果、補酵素の結合様式、特に二リン酸部位の立体配座が脱水素酵素と加水分解酵素で大きく異なるという事実があることに気付いた。酵素中での補酵素の立体配座は、創薬において、毒性を軽減する可能性があるにもかかわらず、酵素中の補酵素の立体配座に関する研究は、創薬や化合物デザインに生かされていない。

2. 研究の目的

本研究では、補酵素の立体配座を基にした酵素の分類を行い、補酵素の立体配座と酵素のファミリーとの関係を可視化し、得られた分類を基に、補酵素の配座を固定した阻害剤や化合物をデザイン合成し、配座固定化合物が目的の酵素に対して選択性があるか？ないか？を検証する。

3. 研究の方法

(1) 酵素 - 補酵素立体配座の相関図作成：PDB (protein data bank) から酵素の NAD, NADP を含む酵素の立体構造を抽出し、補酵素の二リン酸部位の立体配座を解析し、NAD の立体配座と酵素のファミリーとの関連性を数値化、あるいは可視化し、創薬や化合物デザインに役立つモデルを作成する。

(2) 配座固定化合物の合成：酵素分類を基に、リン酸基を単純な炭素官能基に変換し、角度を固定した化合物をデザインし、その合成法を確立する。酵素の立体構造に合った角度を持つ化合物を数種合成する。

(3) 角度固定化合物の酵素に対する親和性測定：合成した阻害剤の酵素に対する親和性を測定する。配座を目的の酵素に対し固定した阻害剤とそれ以外に固定した阻害剤とで親和性が変わるかのであれば、我々の酵素分類が、酵素選択性 (図 1) をもたらすことができ、創薬の分野で有用であることが示すことができたことになると考えている。

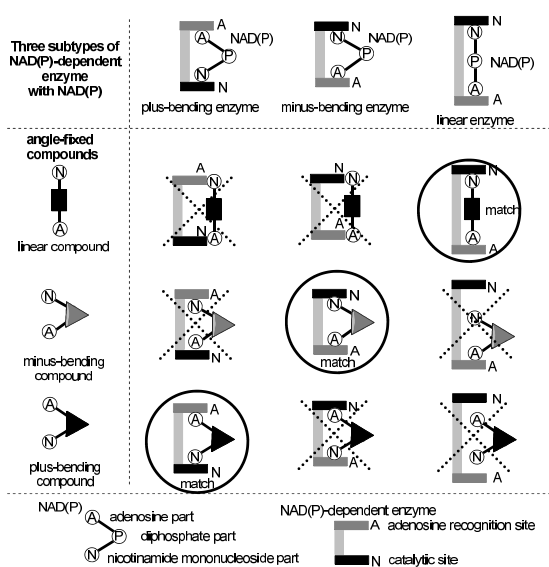


図 1 酵素選択性の概念図

(4) 基質 補酵素複合型阻害剤の作成：補酵素に基質を結合させた化合物の合成法の確立をめざし、より強力な阻害剤の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) 酵素 - 補酵素立体配座の相関図作成：Protein Data Bank に登録されている約 1300 個の NAD(P) 依存酵素 - NAD(P) 複合体の立体構造から NAD(P) の二リン酸部位の立体配座の調査をおこない、O-P-P-O の 2 面角 (図 2) が酵素によって大よそ同程度の値を持ち、酵素を分類するのに適した値であることが分かった。一般には、このような結合のない部分の結合角を取る方法は用いられないが、この結合角は、補酵素の反応点と認識部位の配置を示すため、補酵素の機能と密接にかかわっていることが考えられる。私の提唱するとファミリーとの関連性を調べ、相関図を作成した (図 3)。

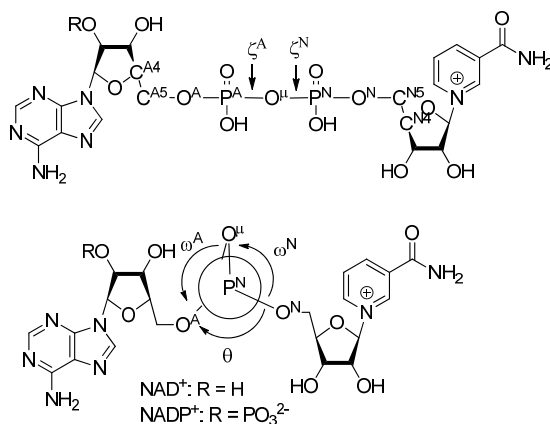


図 2 NAD の構造と 2 面角

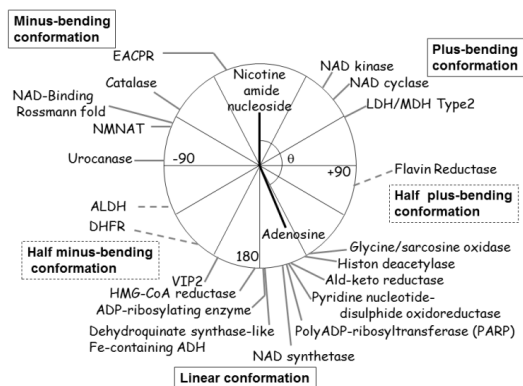


図3 NADの立体配座を基にした酵素分類図

2面角を基にすると、一般的なアルコール脱水素酵素などのNAD結合タンパク質は -70 度 ± 30 度の結合角を持つことが分かった。タンパク質の構造上同じファミリーに属しているが、二重結合還元酵素に関しては、 -30 度付近の結合角を持ち、アルデヒド酸化酵素では $+100$ 度の角度を持ち、酵素の種類によって、若干異なることが分かった。電子伝達系や酸化、ADPリボシル化、加水分解酵素では直線的な配向(180 度付近)を取ることが分かった。NADキナーゼやNAD環化酵素に関しては、 $+60$ 度付近の角を持つことが示された。このように、大よそ3つのタイプに酵素を分類することができた。

(2) 阻害剤のデザインと合成:

TADはNADの反応点をチアゾール基に変換したNAD修飾阻害剤であり、その二リン酸部位をフマル酸および、光学活性なシクロヘキサン-1,2-ジカルボン酸で修飾したNAD修飾阻害剤TAD誘導体を合成した(図4)。フマル酸修飾阻害剤(TAD-180)は、直線型阻害剤であり、グルタチオン還元酵素や、NAD依存加水分解酵素の配座を模倣した阻害剤である。(1R,2R)-シクロヘキサン-1,2-ジカルボン酸誘導体(TAD-(-60))は、一般的な酸化還元酵素の配座を、(1S,2S)-シクロヘキサン-1,2-ジカルボン酸誘導体(TAD-(+60))は、一般的な酸化還元酵素の配座を模倣した阻害剤である。合成法は、カルボン酸と2',3'-O-イソプロピリデンアデノシンの光延反応によるカルボン酸との縮合反応により5'位選択的にエステル化が行えることが分かった。

(3) 酵素阻害実験:

合成したTAD類の酵素阻害実験を行った。イースト由来のアルコール脱水素酵素や乳酸脱水素酵素など5種のアルコール脱水素酵素に対する阻害実験を行った結果、何れの酵素においても、配座を -60 度に固定したTAD-(-60)がNADに対し最も強い競合阻害作

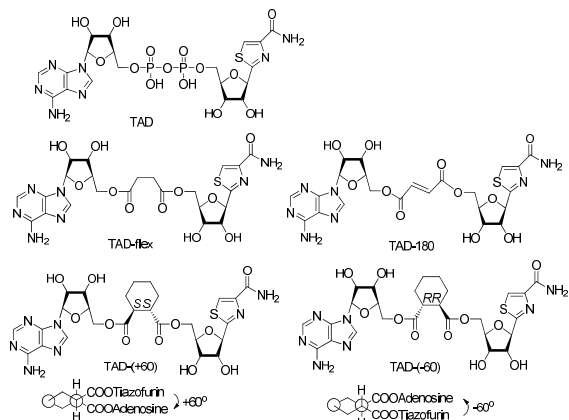


図4 角度固定TAD修飾阻害剤

用を示すことが確認できた。直線的なNAD依存酵素としてイースト由来グルタチオン還元酵素、ならびに、アルドース還元酵素に対する阻害実験を行った。その結果、アルドース還元酵素に対しては、TAD類は阻害作用を示さなかった。これは、アルドール還元酵素がNADP由来で、NADPに対する親和性が弱いためであると考えられる。一方で、グルタチオン還元酵素に対しては、強い阻害作用($K_i = 25 \mu M$)が観測された。この値はNADPのグルタチオン還元酵素に対する K_m 値とほぼ同程度の値である。詳細な、結合様式の解析の結果、TAD-180は、FAD(図5)とNADPの両方に対し、競合阻害をすることが明らかになった。

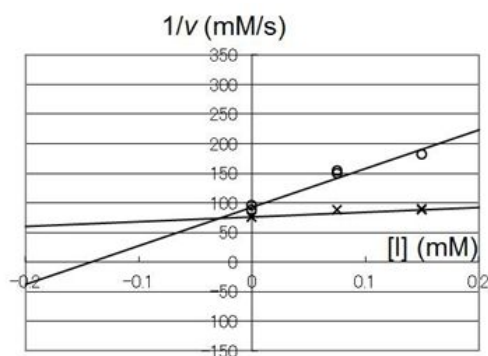


図5 FADに対する競合阻害図 (Dixon's plot ($1/v$ vs $[I]$)). \circ : FAD無添加, \times : $[FAD] = 2.6 \mu M$

また、NADキナーゼに対する阻害実験を行った。その結果、TAD-(+60)の阻害作用が他の阻害剤よりも強いことが分かり、各グループの酵素に対し、配座固定阻害剤が選択的に作用することが確かめられた。

人口補酵素の合成も試みているが、化合物の安定性の問題があり、純粋な化合物を得る

ことに成功しなかった。

(4) 基質 補酵素複合型阻害剤の合成

アルドース還元酵素に対する基質 補酵素複合型阻害剤の設計を行った。基質として、グルコースが開環した鎖状のエステル構造を持つ基質修飾部位と補酵素の芳香環とリボースユニットを持つ阻害剤 1 の合成を試みた。グルコースが鎖状になっているので、グルコースよりも高い親和性を持つ阻害剤が作成できると期待したデザインである。

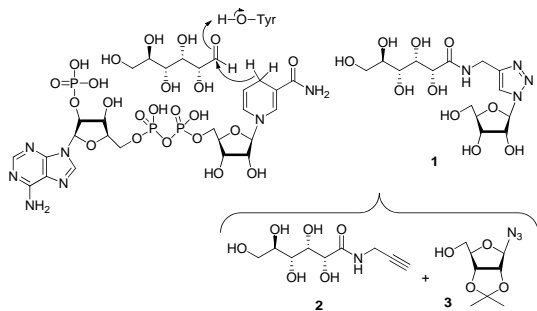


図6 アルドース還元酵素阻害剤

化合物 2 と 3 のクリック反応により化合物 1 の合成を達成した。しかしながら、目的の酵素に対し、阻害作用が確認できなかった。しかしながら、本合成法は、穏やかな条件で、基質 補酵素複合型阻害剤を合成する方法として有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Mikio Fujii, Shinji Sudo, Yasuyuki Kitagawa, Keisuke Kato
Efficient Synthesis of a Water-Soluble Glucoamide Inhibitor Against Human Aldose Reductase by Click Chemistry
J. Carbohydrate Chem. 査読有 2013,32 巻,424-437.
DOI: 10.1080/07328303.2013.816852.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 藤井 幹雄、北川 康行 酵素選択性を持つ NAD 修飾阻害剤の開発 第 17 回生体触媒化学シンポジウム (2013 年 12 月 20 日). 岡山理科大学 50 周年記念館 (岡山県)

2. 藤井 幹雄、北川 康行、加藤 恵介: 補酵素 NAD の立体配座を利用するバイオインフォマティクス 日本薬学会第 133 年会. (2013 年 3 月 29 日). パシフィコ横浜 (横浜)

3. 藤井 幹雄、北川 康行、加藤 恵介
補酵素 NAD の立体配座による酵素分類に基

づいた阻害剤の作成 第 56 回日本薬学会 関東支部大会. (2012 年 10 月 13 日). 昭和大学旗の台キャンパス (東京都)

4. 須藤 真司、藤井 幹雄、北川 康行、加藤 恵介 補酵素 NAD の立体配座に基づく酵素分類とデータベースの作成

第 56 回日本薬学会関東支部大会. (2012 年 10 月 13 日). 昭和大学旗の台キャンパス (東京都)

5. 渡辺 優沙、小野寺 優介、梅田 知伸、日下部 吉男、田中 信忠、北川 康行、藤井 幹雄、飯田 珠惟、加藤 恵介 NAD 依存酵素阻害剤の開発を目指した阻害剤と酵素複合体の結晶化 第 56 回日本薬学会関東支部大会. (2012 年 10 月 13 日). 昭和大学旗の台キャンパス (東京都)

6. 藤井 幹雄、飯田 珠惟、北川 康行、加藤 恵介: NAD 依存酵素の立体配座による化学的な分類 日本薬学会第 132 回年会. (2012 年 3 月 30 日). 北海道大学 札幌キャンパス (北海道)

7. 藤井 幹雄、飯田 珠惟、北川 康行、加藤 恵介: "NAD ニリン酸の立体配座に着目した NAD 依存酵素阻害剤の合成" 第 15 回生体触媒化学シンポジウム. (2011 年 12 月 22 日). 慶應義塾大学薬学部 芝共立キャンパス (東京都)

8. 藤井 幹雄、飯田 珠惟、北川 康行、加藤 恵介: "ニコチンアミドジヌクレオチドの立体配座による酵素分類" 第 15 回生体触媒化学シンポジウム. (2011 年 12 月 22 日). 慶應義塾大学薬学部 芝共立キャンパス (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 幹雄 (FUJII, Mikio)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号: 20311996