

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15312

研究課題名(和文)立体構造解析に基づくPDK4阻害剤の改良とその心不全治療応用

研究課題名(英文)Improvement of the PDK4 inhibitors based on the tertiary structure analysis and application for the treatment of heart failure

研究代表者

永井 良三 (Nagai, Ryozo)

自治医科大学・医学部・学長

研究者番号：60207975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：PDK4阻害薬を改良するには、その化合物がPDK4蛋白質にどのように結合するか、という情報をX線結晶構造解析という方法で得ることが重要である。無細胞蛋白質合成法を用いることにより、結晶化実験に適したPDK4蛋白質を大量に調製することに成功した。反応性官能基を持つ人工的なアミノ酸をPDK4蛋白質の指定した位置に導入し、クリックケミストリー法により化合物と共有結合させる新技術を開発した。さらに、心不全モデルマウスを用いて、2種類の新規PDK4阻害薬が心不全治療に有用なことを見い出した。

研究成果の概要(英文)：It is important to improve the PDK4 inhibitors on the basis of X-ray crystallographic analyses of the PDK4 inhibitors bound to the PDK4 protein. We successfully prepared, by the cell-free protein synthesis method, a large amount of the PDK4 protein sample suitable for crystallization. We developed a novel method to form a PDK4 protein covalently bonded with an inhibitor by introducing an unnatural amino acid designed for click chemistry in a specified position of the PDK4 protein. Furthermore, using a heart failure model mouse, we showed that two kinds of new PDK4 inhibitors were useful for the treatment of heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：PDK4 心不全 癌 立体構造解析 in silico解析

1. 研究開始当初の背景

これまでの心不全の薬物治療は、心不全状態で活性化される神経・体液性因子を標的とした心保護療法（アンギオテンシン受容体拮抗薬、β遮断薬など）であった。しかしながら、現状の薬物療法でも心不全患者は増加しており、より病態の本質に基づいた新しい治療法の開発が望まれている。

PDK4はTCAサイクルを抑制し、細胞内代謝を糖質から脂質へと転換させる酵素である。PDK4活性は心不全時に活性が亢進する。最近、申請者はPDK4阻害薬(KIS化合物)が心不全を著明に改善することを明らかにした。しかし、これらの化合物は活性がまだ低く、安全性も不明である。

従来、創薬は大規模な化合物ライブラリーの中からスクリーニングを重ね、化合物の絞り込みを行う方法が主流であった。これは多大な労力と資金を必要とする。そこで、本研究は、蛋白とその阻害剤の複合体の詳細な立体構造の解析を、X線結晶構造解析とNMR（核磁気共鳴）解析による構造情報に基づき、約100万種類の化合物構造情報が登録されたデータベースの中から、コンピュータ上でタンパク質の活性部位と化合物とを結合させるドッキングシミュレーションによるin silicoスクリーニング(in silico解析)を加え、シードの最適化を行う(図3)。このように、最先端の手法を創薬に導入することにより、効率よく、少ない労力で、治療効果の高い薬物の開発を推進することができる。

2. 研究の目的

本研究では、PDK4とPDK4阻害薬間の蛋白-薬物間複合体の立体構造解析とin silico解析を行う。また、このデータをもとに、PDK4阻害薬の化学構造を改良し、低用量で阻害活性の高いPDK4阻害薬を開発する。さらに、動物モデルにおいて、改良したPDK4阻害薬の心不全に対する薬理効果を検証する。PDK4阻害薬が臨床応用されれば、急性心不全のみならず、ショック、癌、呼吸不全等の病態を改善する新しい治療法の開発としても期待される。また、構造生物学とin silico解析を組み合わせた方法は、これからの循環器創薬のモデルになると考えられる。

3. 研究の方法

(1) PDK4蛋白質とPDK4阻害薬の複合体のX線結晶構造解析

立体構造に基づくin silico設計によってPDK4阻害薬(KIS化合物)の化学構造を改良し、既存のPDK4阻害薬より有効な化合物を開発するため、PDK4蛋白質・KIS化合物複合体を結晶化し、X線結晶構造解析を行う。

まず、広範囲の結晶化条件を探索するのに

十分な量の、安定で結晶化に適したPDK4蛋白質試料を得られるように、発現と精製の方法を改良し、基質結合型または非結合型のPDK4蛋白質試料の結晶化再現性と結晶の分解能を指標に最適化する。このPDK4蛋白質の結晶化条件を含む広範囲の条件で、PDK4阻害薬であるダイクロロ酢酸またはKIS化合物の存在下でのPDK4蛋白質結晶化を行う。得られた結晶についてX線結晶構造解析を行い、PDK4蛋白質に結合したPDK4阻害薬の電子密度を捉えられる条件を探索する。良い条件を見出したら、PDK4阻害薬の結合様式を解明し、in silico設計による改良を施す。このようにして、有効で安全な心不全治療効果を有するPDK4阻害薬を開発する。この研究は、PDK4蛋白質と他のPDK4阻害剤(M77976)の複合体の立体構造を解明した実績を有する理研・横山博士の研究グループと共同で行う(Acta Cryst 2011;D67:763)。

(2) PDK4阻害薬の心不全治療効果のマウスモデルによる検証と治療効果の高いPDK4阻害薬の選択

雄性8週齢C57BL/6Jマウスを用いて心機能の指標となる左室駆出率(EF)を測定し、その後、横行大動脈縮窄手術により心不全モデルマウスを作成する。手術後4週間に再びEFを測定し、その時点より7日間新規PDK4阻害薬を投与し、投与完了後に再びEFを測定することにより、心不全治療効果の高いPDK4阻害薬を選択する。

4. 研究成果

(1) PDK4蛋白質とPDK4阻害薬の複合体のX線結晶構造解析

①化合物のソーキングによるPDK4蛋白質・PDK4阻害薬複合体のX線結晶構造解析

PDK4の結晶化は、これまで、PDK4単独ではなく、ATPを結合した試料について成功してきた。そこで、ソーキングによるPDK4

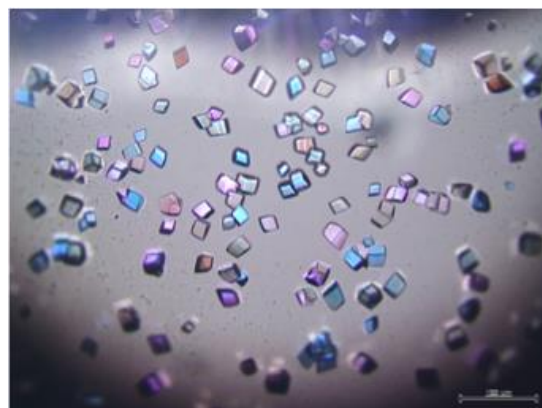


図1 PDK4とATPとの共結晶

と化合物の複合体結晶を得るため、まず、バキュロウイルス昆虫細胞系で調製した PDK4 (残基番号 20~411) と ATP を混合し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行ない、PDK4 と ATP との共結晶を得た (図 1)。

この共結晶に、各種の化合物 (ジクロロ酢酸ジイソプロピルアミン (DADA)+グルコン酸、複数の KIS 化合物) をソークした。大型放射光施設にて X 線回折データセットを収集し、解析を行ってモデルを構築した (図 2)。

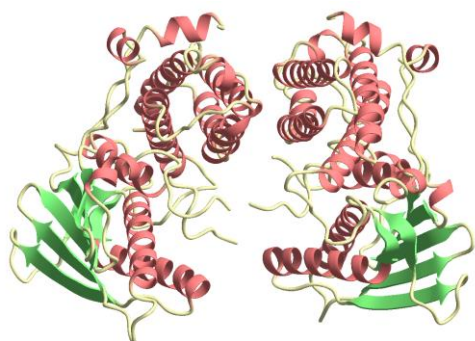


図 2 決定した PDK4 の構造

1 例として、PDK4 阻害活性の強い KIS 化合物 (KIS095) をソークした結晶から得られた分子モデルを示す (図 3)。ATP 結合部

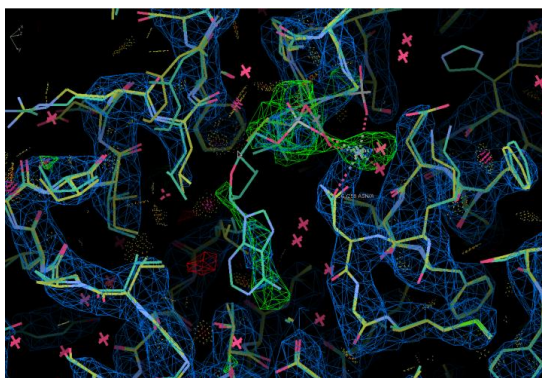


図 3 PDK4 と KIS095 との複合体の電子密度図。KIS095 の電子密度と ATP を重ね合わせた (図中央部)。

位に、ATP とは部分的に一致しない電子密度が観測された。この電子密度に、KIS095 の化学構造を重ね合わせたが、それとも完全には一致しなかった。このことにより、KIS095 によっては ATP を完全に追い出すことができず、ATP または KIS095 を結合した PDK4 の混合物によって構成された結晶であると考えられた。他の PDK4 阻害薬についても、ソークした化合物による ATP の置換は十分には行っていないと考えられた。

ソーキング法と並行して、バキュロウイルス昆虫細胞系で調製した PDK4 試料について、ATP とではなく、KIS 化合物 (10 種類) との共結晶化を、ATP の場合の条件と類似の条件で行なった。しかし、検討できた範囲の条件では、いずれの化合物とも共結晶は、結晶構造解析に十分な大きさが得られず、形状

からも、結晶構造解析に適さないと結論された。これは、PDK4 タンパク質の立体構造が、PDK4 阻害薬が結合すると、ATP と比較して異なるものに変化することを示唆する。この結果から、より幅広い条件探索が必要であることがわかった。

②大腸菌無細胞タンパク質合成法等による PDK4 調製法の確立

更に広い結晶化条件検討を行なうためには大量の試料が必要となるため、大腸菌のコード使用頻度に適合し、ヘアピン構造などを形成しない塩基配列を設計し、化学合成によって PDK4 発現コンストラクトを作製した。これを用いて、大腸菌無細胞タンパク質合成法による PDK4 の調製を行ったところ、バキュロウイルス昆虫細胞系の場合より大量の PDK4 が得られ、さらに、精製条件等の探索を行なった。大腸菌無細胞タンパク質合成法により調製した PDK4 で、ATP との共結晶は得られた (図 4)。これにより、大量調製が



図 4 無細胞タンパク質合成法により調製した PDK4 と ATP との複合体の結晶

可能な大腸菌無細胞タンパク質合成法を採用することとした。しかし、ゲル濾過によって、ミスフォールディングした PDK4 の存在が示唆されたので、試料を質量分析し、ミスフォールドした PDK4 に結合して混入したと思われるシャペロンを検出した。したがって、PDK4 の正しいフォールディングにはシャペロンが必要であることが分かった。このような無細胞タンパク質合成法の利点である条件探索の容易さを活用して、様々な条件検討を行い、シャペロン存在下で無細胞系発現を行って、精製途中でシャペロンと分離操作を施し、過度な濃縮を避けつつ、多量体化している画分をゲルろ過精製等で十分に分離させることにより、高純度で結晶性の高い試料を得ることに成功した。

さらに、ATP 結合 PDK4 の結晶への化合物のソーキングに関して、化合物による ATP の置換を容易にするように結晶化の条件を探索し、それまでより ATP の結合が弱くなる条件を見出した。

また、PDK4 は酵素活性に関して、活性化

型と不活性化型の2状態の平衡であることが知られていることから、不活性化型に結合するタイプの阻害剤を想定して、不活性化型を安定化する変異を導入したコンストラクトを作製し、ATP存在下での結晶性を確認した。

これらの条件で、化合物のソーキングと共結晶の条件を探索したが、化合物の電子密度を検出することはできなかった。これにより、用いることのできたPKD4阻害薬は、結合親和性が低く、ソーキングではATPを置換しきれず、共結晶化では、十分な結晶成長が得られないと考えられた。化合物の水溶性は高くなく、さらに高濃度での結晶化試料への添加を試すことは不可能であった。これにより、タンパク質と化合物を共有結合し、これらの問題を解決することを考案した(次項③)。

③タンパク質と化合物を共有結合する手法の開発

タンパク質・化合物複合体結晶構造解析のため、非天然型アミノ酸を利用する新たな技術の開発を検討した。化合物にタンパク質に共有結合させる部位を指定するため、横山らが開発してきた拡張遺伝暗号技術を活用することとした。また、共有結合は、水溶液系で効率のよいクリックケミストリーを用いることとした。反応性官能基を持つ非天然型アミノ酸(アジド基を有するリシン誘導体)を、ピロリシル tRNA 合成酵素変異体を用いてUAG認識 tRNA にエステル結合し、PDK4をコードする塩基配列では、導入部位をUAGコドンで指定した。これらを用いて無細胞タンパク質合成法を行い、PDK4の指定した部位に特異的に非天然型アミノ酸を導入したタンパク質試料を調製することに成功した。アルキンやシクロオクチン等をもち、アジド基と反応する蛍光試薬を用いて、導入するアジド含有非天然型アミノ酸の種類、導入するPDK4の部位を比較検討して、最適の条件を確立した。これによって、KIS化合物側にアルキンをもつ置換基をもつものとのクリックケミストリー反応を行う準備を完了することができた(図5、図6)。今後、PDK4とKIS化合物との共有結合と結晶化を行う予定である。

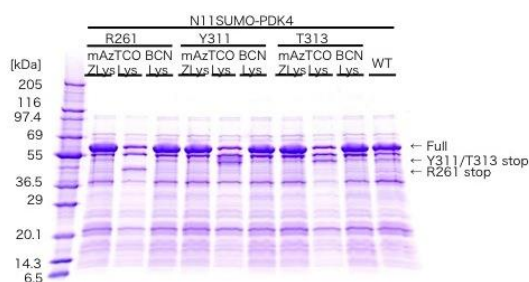


図5 PDK4に導入する非天然型アミノ酸の種類を検討及び導入部位の検討

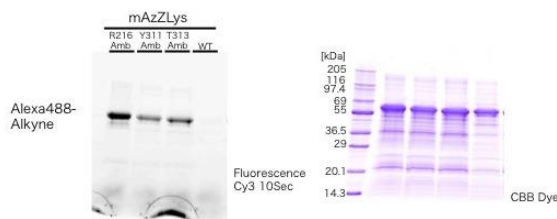


図6 PDK4に導入した非天然型アミノ酸(mAzZLys)に、クリックケミストリーでクロスリンクした蛍光化合物の導入効率の検討

(2) PDK4阻害薬の心不全治療効果のマウスモデルによる検証と治療効果の高いPDK4阻害薬の選択

横行大動脈縮窄手術後4週間のマウスのEFは手術前のマウスのEFと比較して有意な低下が見られた。またPDK4阻害薬投与完了後にはDCA(コントロール)群に比べて2種類の新規PDK4阻害薬群でEFが有意に上昇していた。本研究より、2種類の新規PDK4阻害薬が心不全治療に有用である可能性を示した。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 良三 (NAGAI, Ryozo)
自治医科大学・医学部・学長
研究者番号: 60207975

(2) 研究分担者

横山 茂之 (YOKOYAMA, Shigeyuki)
理化学研究所・横山構造生物学研究室・上席研究員
研究者番号: 00159229

相澤 健一 (AIZAWA, Kenichi)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70436484

仲矢 丈雄 (NAKAYA, Takeo)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：80512277

(3)連携研究者
なし