

審査の結果の要旨

氏 名 佐山 美紗

佐山 美紗は、「リゾリン脂質の膜受容体への結合経路および受容体活性化におけるモジュール構造の役割」の研究題目のもと研究を行い、リゾリン脂質の1つであるリゾホスファチジルセリンのそれぞれのモジュールと受容体との相互作用がリガンドの受容体結合および活性化にどのような役割を果たすのかという疑問にアプローチし(1) リガンドであるリゾリン脂質の受容体外テール領域の構造展開により結合経路の考察および(2) リゾリン脂質の親水性モジュールの展開を行いアンタゴニストの創成を行った。

リゾリン脂質は、細胞膜の構成成分であるリン脂質から脂肪酸が酵素的に切り出されることで生じる脂質分子であり、シグナル分子として膜受容体を活性化する。リゾホスファチジルセリン(Lysophosphatidylserine: LysoPS)は親水性部にセリンを有するリゾリン脂質の一種である(図1)。LysoPSは、ヒトで3種のGタンパク質共役型受容体(GPCR)、GPR34, P2Y10, GPR174を特異的に活性化し、免疫系に関与することが示唆されているが、これら受容体機能の詳細は未だ解明が十分になされていない。所属研究室では、受容体機能解明のためのツールとして有用な、受容体に対して高い活性および受容体サブタイプ選択性を有するLysoPS誘導体の創生が進められてきた。

LysoPSの化学構造は、親水性のホスホセリン部位、疎水性の脂肪酸部位、両者を連結するリンカー部位という3つの明確な部分構造(モジュール構造)に分けられる(図1)。それぞれのモジュールは個別に構造展開可能であり、最適化された構造を連結する戦略で多くのLysoPS受容体アゴニストが創生されてきた。

また、各々のモジュール構造が受容体にどのように認識されるかを知るため、GPR34に高い活性を示すアゴニスト **1** と GPR34の結合モデルを作成した(図2)。誘導体 **1** は GPCRの膜貫通ヘリックスに囲まれたポケットに結合し、親水性モジュール

に対して疎水性モジュールはより細胞内側に位置した。また、誘導体 **1** と GPR34の結合モデルにおいて、疎水性モジュールの末端は膜貫通ヘリックス4、5

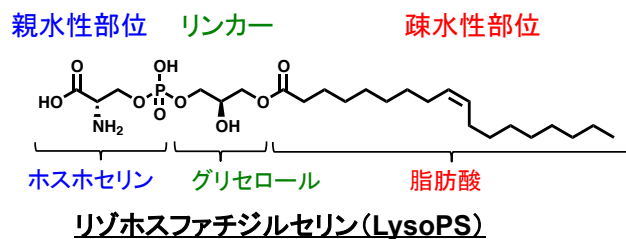


図1 LysoPSのモジュール構造

(TM4, TM5) 間に存在した。TM4, TM5 間には受容体外の細胞膜領域に対して開いた出入り口が存在し、化合物 **1** の D 環はこの出入り口を通して受容体外に突き出て、

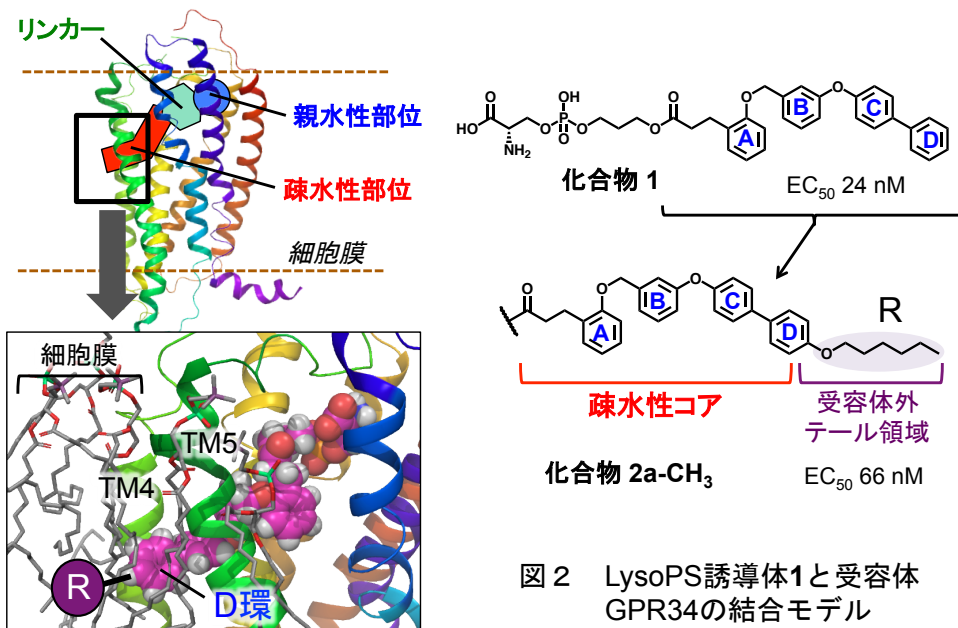


図2 LysoPS誘導体1と受容体 GPR34の結合モデル

細胞膜脂質と相互作用すると予想された。GPR34-化合物 **1** 結合モデルにおいて、完全に受容体外に位置する D 環パラ位に疎水性置換基 R を導入しても、誘導体の受容体結合は妨げられず、GPR34 活性は損なわれないと考えられる。実際に **2a-CH₃** のようにノルマルヘキシルオキシ基を導入した誘導体は **1** と同様の高い GPR34 活性を示した。このように、受容体外に位置する疎水性モジュール末端部位（受容体外テール領域）は、誘導体活性を損なうことなく構造展開可能である。すなわち、図1に示した3つのモジュール（親水性モジュール、疎水性モジュール、リンカー）に加えて受容体外テール領域も誘導体の構造展開可能な4つ目のモジュールとみなすことができる。本研究では、LysoPS のそれぞれのモジュールと受容体との相互作用がリガンドの受容体結合および活性化にどのような役割を果たすのかという疑問にアプローチすべく、（1）受容体外テール領域および、（2）親水性モジュールの展開を目的とした。

結果と考察

（1）受容体外テール領域への膜脂質模倣体の連結による LysoPS 誘導体の GPR34 への Membrane approach の検証

脂質リガンドの GPCR への結合経路として、一旦リガンドが細胞膜に挿入されてから細胞膜上の側方拡散を介して受容体に侵入する Membrane approach が示唆されている。図2に示した GPR34-リガンド結合モデルにおける細胞膜側に向けて開いた結合ポケットは、LysoPS 誘導体が Membrane approach により受容体に結合することを示唆している。そこで本研究では、GPR34 への誘導体の Membrane approach を計算科学および実験の両側面から検証することを目的とした。

まず、分子動力学 (MD) シミュレーション中、受容体に結合したリガンドを指定した方向に引き抜く Steered Molecular Dynamics シミュレーションを行ったところ、受容体に結合した誘導体 **2a-CH₃** を TM4, TM5 の間を通して細胞膜方向へと引き抜く

ことができた。このことから、TM4, TM5 の間から、逆にリガンドが入っていく経路も分子レベルで確かに可能であると考えられる。

次に、実験的に Membrane approach を検証すべく、誘導体の受容体外テール領域に膜脂質模倣体として異なる長さのアルコキシアミンを付与することで、疎水性モジュールの細胞膜への挿入を制限した誘導体を設計、合成した。膜脂質サロゲート末端のアミノ基は細胞外の水分子により水和されるため、細胞膜に挿入されにくいと考えられる。そのため、短いアルコキシ鎖を有するサロゲートを連結した **2b-NH₂** は膜脂質に浅く挿入される一方、長いアルコキシ鎖を有するサロゲートを連結した **4b-NH₂** は、GPR34 における疎水性モジュール結合ポケットの存在する細胞膜中心付近まで深く挿入可能と考えられる (図3)。実際に、誘導体を細胞膜モデルに挿入して行なった MD シミュレーションから、本予想が妥当であることを確認した。

TGF α shedding assay により、受容体活性化の下流で起こるイベントを定量することでヒト GPR34 に対する誘導体活性を評価したところ、**2b-NH₂** はほぼ GPR34 活性を示さなかった一方、**4b-NH₂** は誘導体 **1** と同等の高い GPR34 活性を示した。本結果は、**4b-NH₂** が末端アミノ基の水和を維持したまま Membrane approach により GPR34 に結合可能であるという予想に合致した。

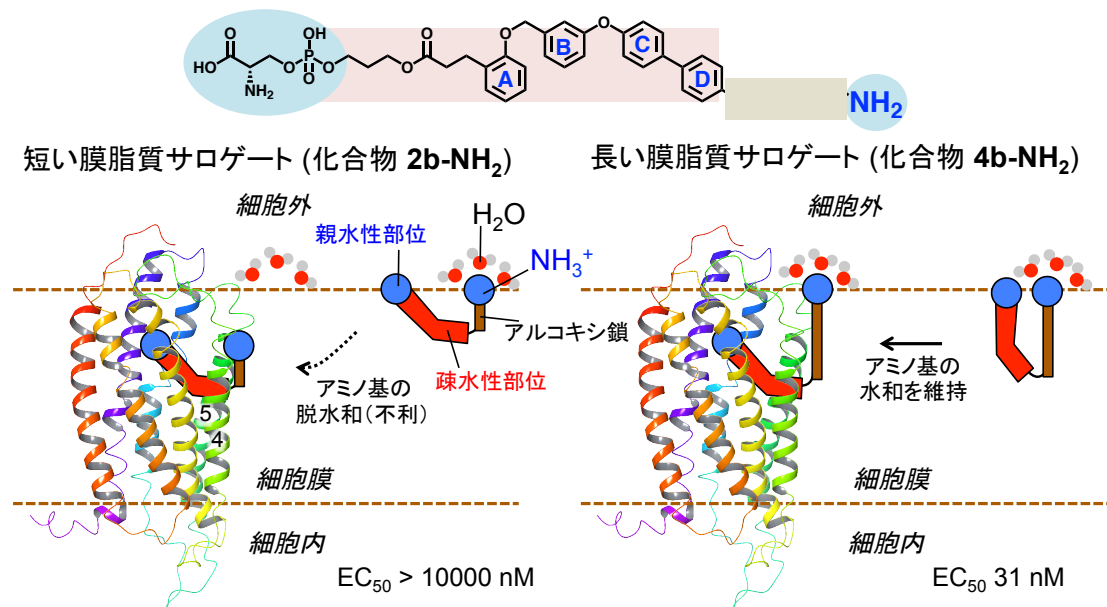


図3 膜脂質サロゲート (アルコキシ鎖) の長さによるLysoPS誘導体の受容体結合の可否

4b-NH₂ はその末端アミノ基をメチル基とした **4a-CH₃** よりも高い GPR34 活性を示した。このことから、末端アミノ基が細胞外の水に水和されていること自体が受容体活性を高めるのではないかと考えられる。そこで、末端親水性部位の活性への影響を調べるため、末端アミノ基をアセチル化してプロトン化を抑制した **4c-NHAc** と、アミノ基を2つにしてジプロトン化を可能とした **4d-diNH₂** を合成、活性評価した。結果、**4c-NHAc** は **4b-NH₂** より高い活性を示す一方、**4d-diNH₂** は **4b-NH₂** より低い活性を示し、正電荷がない方が GPR34 に対し高い活性を示す結果となった。**4c-NHAc** あるいは **4d-diNH₂** と GPR34 との複合体モデルを構築し、MD シミュレーション中での膜脂質サロゲート末端の親水性基の動きを観察したところ、**4c-NHAc** は正電荷を有する受容体表面にとどまる傾向がある一方、**4d-diNH₂** では正電荷を有するアンモニウムとの反発で逆に離れる傾向が見られた。この結果から、受容体外テール領

域の変換により受容体表面との相互作用を獲得することで、誘導体活性を高めることができると考えられ、受容体外テール領域の構造展開の有用性が示された。

(2) 親水性部位の受容体活性化への GPR174 への影響

本研究では、GPR174 に対してこれまでにあまり研究がなされてこなかった親水性モジュールのアミノ基の変換の構造要求性を調べることを目的とした。グリセロール部位と脂肪酸を連結するエステル結合をアミドとし、脂肪酸部位にメタ置換ベンゼン環を導入することで GPR174 活性および選択性が向上することが先行研究により明らかであったので、本骨格を用い、カルボキシ基 α 位に種々の置換基を導入した(図4)。結果、置換基によるアゴニストとアンタゴニストの変換を実現した。

TGF α shedding assay により、マウス GPR174 に対する化合物活性を評価した。R に内因性 LysoPS と同様にアミノ基を有する誘導

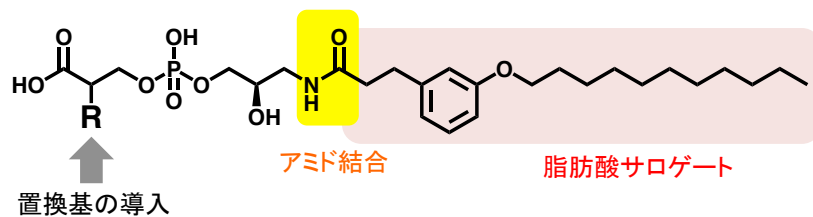


図4 GPR174に最適化された基本骨格を用いた構造展開

体 **5a** は高い GPR174 アゴニスト活性を示したが、置換基 R を変えることにより GPR174 活性が大幅に減弱あるいは消失した誘導体を得られた。これらの化合物が受容体阻害活性を示すか、レファレンスアゴニストの存在下、化合物濃度を変えた際の受容体活性化を定量した。結果、高濃度においてレファレンスアゴニストによる受容体活性化が阻害され、GPR174 アンタゴニストが得られたことがわかった。さらに置換基を展開したところ、受容体活性化の E_{max} が R によって変化することがわかり、パーシャルアゴニストを得た。なぜ親水性モジュールカルボニル α 位の構造展開によりアゴニスト、アンタゴニストのスイッチが起こるのかという疑問にアプローチするため、GPR174 と LysoPS 誘導体の複合体モデルを作成した。GPR174 の三次元構造は報告されていないため、類縁のリゾリン脂質受容体であるリゾホスファチジン酸受容体 (LPA $_6$) 結晶構造を用いたホモロジーモデリングにより GPR174 モデルを構築した。アゴニストあるいはアンタゴニストとの複合体モデルを作成したところ、両方で疎水性モジュールの結合位置は一致していた一方、親水性モジュールの相互作用が異なっていた。

本研究は、LysoPS 誘導体の構造展開可能部位として、受容体外テール領域および親水性モジュールに着目し、それぞれのリガンドの受容体結合経路および受容体活性化における役割を知るべく研究を進めた。これらの結果はメディシナルケミストリーに貢献するばかりでなく、受容体のリガンド認識の分子機構という根源的な課題にも考察を与えるものである。

よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。