

論文の内容の要旨

論文題目 非アデノシン骨格を有する新規ホモシステイン合成酵素阻害剤の発見と
X線複合体解析研究

氏名 中尾 朗

[背景]

ホモシステインは含硫アミノ酸の1つであるメチオニンの代謝産物の1つであり、その前駆体 *S*-アデノシル-L-ホモシステインの加水分解によって、アデノシンとともに合成される。ホモシステインは2つの代謝経路、すなわち、葉酸、ビタミン B12 等が関与する再メチル化によりメチオニンへ戻る経路と、ビタミン B6 が関与する含硫基移動によってシステインへと変換される経路がある。1969年、McCully はホモシステインが動脈硬化、心筋梗塞といった血管性病態の原因になりうることを報告した。以降それを検証するため多くの臨床試験が行われ、今日では高ホモシステイン状態は心筋梗塞や脳梗塞の独立したリスクファクターであると言われている。マウスを用いた実験では、高ホモシステイン状態にさせたマウスを脳梗塞にすると梗塞体積の増加や神経症状の悪化が見られることが報告されている。また、近年ではホモシステインはアルツハイマー病、うつ病、統合失調症といった精神神経疾患への関与も示唆されている。これら既存の情報から、我々はホモシステイン合成酵素である *S*-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素 (AdoHcyase) を阻害し、高ホモシステイン状態を正常化させることにより脳梗塞あるいは心筋梗塞等冠動脈疾患の予防、治療が期待できるのではないかと考えた。研究開始当初から今日に至るまで AdoHcyase 阻害剤として知られているものはアデノシン骨格変換体のみであり、その多くが不可逆阻害剤であった。不可逆阻害剤による毒性、アデノシン誘導体の非酵素選択性といった課題を解決するため、我々は非アデノシン骨格を有する新規リード化合物の探索を開始した。可逆阻害剤の取得を志向した自動リガンド識別スクリーニング技術を用いたハイスループットスクリーニング (HTS) を実施した結果、1系統の化合物群を HTS ヒット化合物として見出した (図1)。得られた HTS ヒット化合物は2つのアミド構造、すなわち一方は脂溶性アミド、もう一方は末端にアミノ基を有する鎖状アミドを有していた。そのうち3化合物(化合物 **8a - c**) は脂溶性アミド部位に *N*-メチル基を有する3級アミド構造を有しており、他のものより酵素阻害活性が強かった。一般に2級アミドは平面構造をしており、シス体よりもトランス体として存在し、その二重結合性によりほぼ異性化は起こらないとされている。

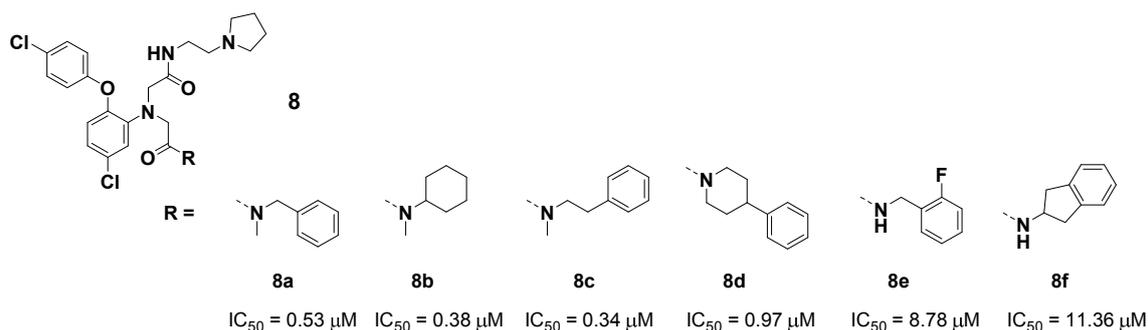


図 1

HTS ヒット化合物の中で化合物 **8f** は 2 級アミドを含む構造を有しているが、*N*-メチル基を有する化合物 **8a - c** と比較し、その活性が弱いことに着目した。すなわち、「化合物 **8a - c** が AdoHcyase と相互作用する際、脂溶性アミド部位はシス型をとっている。一方、化合物 **8f** はトランス-シス異性化が制限されていてシス型をとりにくいため活性が弱い。**8f** のアミドをメチル化すればトランス-シス変換により活性コンフォメーションを取ることが容易となり、酵素阻害活性が大幅に向上する。」という仮説を立て合成展開を開始した (図 2)。

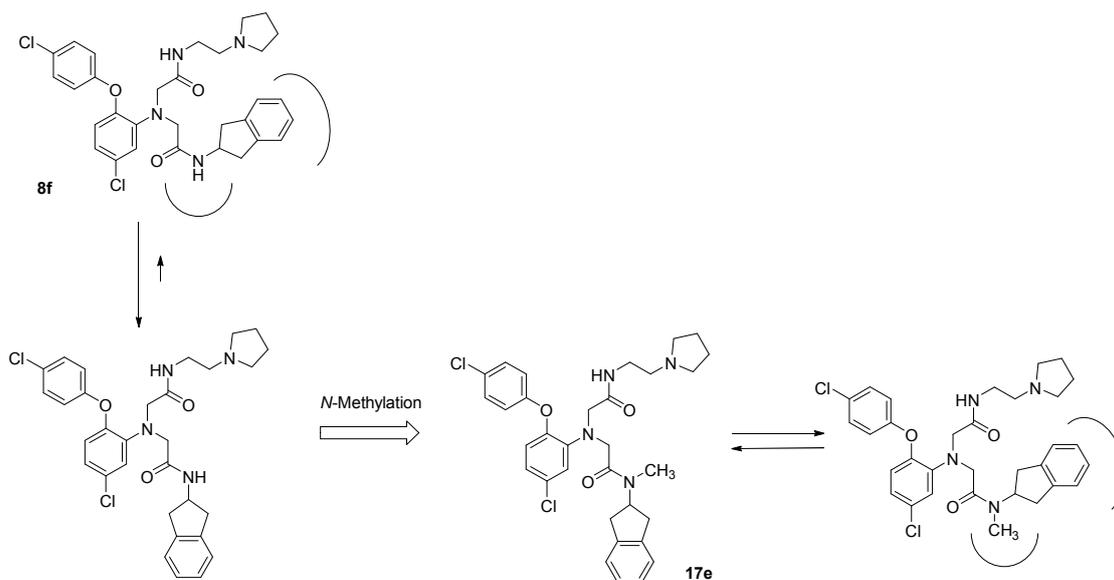


図 2

[化合物の合成、薬理評価結果と考察]

まずは「脂溶性アミド部位」の変換を行った。シスアミド仮説を検証するため、HTS ヒット化合物 **8f** の 2 級アミドを *N*-メチル化した化合物 **17e** (図 2) を合成した。その結果、**17e** は **8f** と比較し約 200 倍近く酵素阻害活性が向上した。**17e** のプロトン NMR を精査したところ、2-インダニルメチルアミド付近のメチンプロトン、メチル基、およびカルボニル基の α 位のメチレンのプロトンピークがいずれも 2 : 3 の比率で別々に観測され、シス-トランス異性体の存在が

示唆された。また、インダニル基の回転に伴う異性体も考えられ、多様な異性体の存在は化合物が酵素タンパクと相互作用する際に不利に働くと予想された。2 - アミノインダニル基のメチン炭素部位を窒素に変換することで、少なくともインダニル基の回転異性の可能性は排除できると考え、イソインドリン基へ変換した化合物 **17n** (図3左側) を合成、評価したところ、さらなる活性の向上が見られた。**17n** のプロトン NMR のスペクトルデータにおいて、イソインドリンの2つのメチレン基、メチル基、およびカルボニル α 位のメチレン基のピークから異性体の存在は確認されず、シスまたはトランス体どちらか単一の状態、あるいはシストランス相互変換が非常に早い状態として存在していることが示唆された。次に「水溶性アミド部位の変換」を行った。化合物 **17e** の末端アミノ基をピロリジンからピペリジン、ジメチルアミンへ変換したところ活性が低下したが、2級アミンへの変換、すなわちピロリジンのメチルアミン、エチルアミン、イソプロピルアミンへの変換では、同等の活性を示すことが確認された。「脂溶性アミド部位」、「鎖状アミド部位」それぞれの変換から最適パーツの組み合わせを行った結果、化合物 **22a,b** (図3右側) は 10^{-9} オーダーの非常に強い酵素阻害活性を示した。また、**22a** の酵素阻害様式を確認したところ、阻害様式は拮抗阻害であり、 $K_i = 1.5 \text{ nmol/L}$ であった。

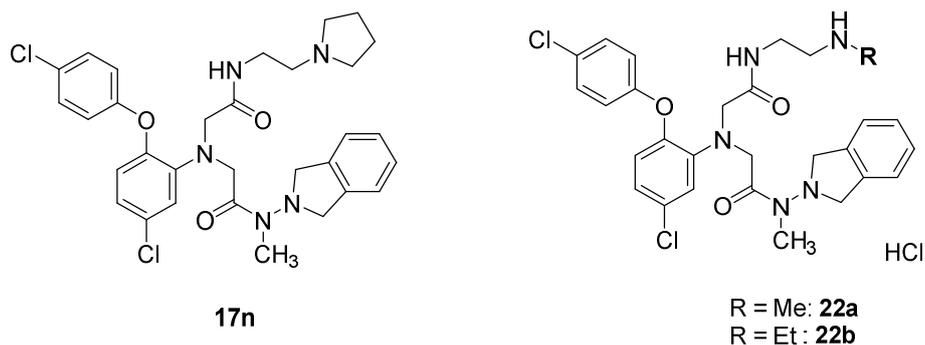


図 3

酵素中での阻害剤の活性コンフォメーションを確認するため、X線共結晶構造解析を行った。化合物 **22a** とヒト由来 *S*-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素から X線結晶構造解析が可能な単結晶を取得し回折強度測定を行った。プロテインデータベースにはヒトおよびその他の種の AdoHcysase 単体、および阻害剤との複合体が登録されている。AdoHcysase は 4 量体として存在し、それぞれの単量体には触媒ドメインと NAD 結合ドメインが存在し、その間に基質の結合部位が存在することが知られている。基質や阻害剤を含まない AdoHcysase はおもに open form として存在し、基質や阻害剤を含む複合体は closed form として存在することが報告されている。分子置換法による構造解析の結果、4 量体として存在する AdoHcysase の単量体にそれぞれ、化合物 **22a**、および補酵素の NAD^+ が含まれていることが分かった。また、**22a** は触媒ドメインと NAD 結合ドメインの間に挟まれた状態で存在することが確認され、単量体 AdoHcysase は open form に近いドメイン配置をとっていることが分かった。**22a** のイソインドリン部位は NAD^+ のニコチンアミド芳香環と約 3.9 \AA の距離で平行に位置し、カチオン- π ス

タッキング相互作用をしていることが示唆された。置換アニリン部分の芳香環は2つのドメインに挟まれた状態で位置し、脂溶性相互作用をしていることが示唆された。**22a**には4つの水素結合、すなわち、鎖状アミド部位側のカルボニル酸素と触媒ドメイン中のスレオニン 57 の側鎖水酸基との水素結合、メチルアミノ基と触媒ドメインのグルタミン酸 59 の側鎖カルボキシル基との水素結合、脂溶性アミド部位側のカルボニル酸素と NAD 結合ドメイン中のヒスチジン 353 主鎖アミドとの水素結合、および **22a** の鎖状アミド部位のアミドの NH と脂溶性アミド部位側のカルボニル酸素との分子内水素結合が示唆された。また、脂溶性アミド部位の3級アミド部位はカルボニル酸素に対し、*N*-メチル基がシス型に位置していることが判明し、化合物最適化戦略時に立てた『シスアミド仮説』を支持する結果となった。X線複合体解析の結果、脂溶性アミド部位の3級アミドがシス型をとり、さらに分子内8員環水素結合をしていることが示唆されたが、これは化合物 **22a** が AdoHcysase および NAD⁺と相互作用することによって生じた結果であると考えられた。これを検証するため、阻害剤単体の立体構造を X線単結晶構造解析により明らかにしようと考えた。化合物 **22a** の単結晶を取得することはできなかったが、**22a** と構造が非常に近い化合物 **17n** の単結晶作成に成功した。X線構造解析の結果、**17n** は化合物 **22a** と同様に、脂溶性アミド部位の3級アミドがシス型を取っており、さらに分子内で8員環水素結合をしていることが確認された。

化合物 **17n** のプロトン NMR 解析の結果、X線単結晶構造解析の結果、および化合物 **22a** の X線複合体解析の結果から、*N*- (イソインドリン - 2 - イル) - *N*-メチルアミド構造を有する化合物群は、少なくとも酵素タンパクとの結合部位や非極性有機溶媒中といった疎水性環境下において、脂溶性アミド部位の3級アミドはシス型をとり、さらに分子内8員環水素結合を形成していることが強く示唆された。

[結論]

高ホモシステイン状態を正常化させることにより脳梗塞等の疾患の予防、治療ができるのではないかと考え、その合成酵素である *S*-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素の阻害剤の探索最適化研究を実施した。阻害剤が酵素と相互作用する際の立体構造を予測し、3級アミド部位がシス型をとることが活性発現に重要であると考えた。化合物最適化研究によって得られた阻害剤 **22a** と酵素との X線複合体解析の結果から、複合体中の酵素は open form として存在していることが確認された。また酵素中での阻害剤の3級アミド部位はシス型をとっていることが示され、分子内で8員環水素結合をとっていることが示唆された。X線単結晶構造解析の結果、阻害剤 **17n** は分子内で8員環水素結合をとるとともに、その3級アミド部位はシス型をとっていることが確認された。化合物 **22a** の酵素阻害様式が拮抗阻害であることを示し、*K_i* 値は *K_i* = 1.5 nmol/L であった。これまでにない非アデノシン骨格を有する高活性な化合物 **22a,b** は高ホモシステイン状態を改善する薬剤の研究におけるリード化合物となり得るだけでなく、その構造活性相関情報、および X線複合体解析情報は我々の今後のさらなる最適化研究の一助となると考えている。