

論文の内容の要旨

論文題目 NMRを用いたTRAF6を標的とするタンパク質間相互作用阻害剤の創製

氏名 守谷 潤

序論

タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction; PPI) は、シグナル伝達、免疫応答および細胞認識など、生体機能の発現において重要な役割を果たすため、有望な創薬標的である。しかし、PPI 界面は一般的に広く平面的であるため、低分子阻害剤の探索は難度が高い。したがって、PPI に対する効果的な初期ヒット化合物探索手法および化合物デザイン手法の開発は重要な研究課題である。

Tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6) は TNF 受容体スーパーファミリー (TNF receptor superfamily; TNFRSF) の細胞内ドメインなどとの結合を通じてシグナル伝達を仲介するアダプタータンパク質である。これらのシグナル伝達により破骨細胞の活性化などのさまざまな免疫応答が誘起されるが、いずれの経路においても TNFRSF などに含まれる共通配列が TRAF6 の共通表面を認識することによりシグナルが伝達される。したがって、この TRAF6 表面に結合する化合物は複数のシグナル伝達経路を同時に遮断し、関節リウマチ等に著効を示すことが期待される。しかし TRAF6 に対して、上記内在性リガンドよりも高い結合親和性を有する低分子阻害剤はこれまで報告されていなかった。そこで私は、本 PPI を標的とした低分子阻害剤の創製を目的として研究を行った。

初期ヒット化合物の探索と特徴づけ

TNFRSF の一つである RANK 受容体の細胞内ドメインペプチド (以後 RANK ペプチド) と TRAF6 の複合体結晶構造は既に解明されており (図表 a)、その相互作用は、結合面に沿って主に鉛直方向に形成される水素結合、および共通配列に保存されたプロリン残基と TRAF6 の浅い疎水性表面 (以後 Pro site) により形成されるファンデルワールス相互作用 (以後、鍵相互作用) により特徴付けられることが知られている。私はまず、鍵相互作用を阻害する化合物取得を企図し、machine-learning score function modified-multi target screening (MSM-MTS) 法による *in silico* スクリーニングを行った。MTS 法は、標的を含む複数のタンパク質に対してドッキング計算を行い、標的に対して最も高いスコアを獲得する化合物をヒットとする手法である。本スクリーニングにおいてはさらに、TRAF6 結合分子である RANK ペプチドのドッキングスコアが相対的に高くなるように、各タンパク質とのドッキングスコアに重み付けを行い、その重み付けを化合物評価にも適

用した (MSM 法)。本法などを用い、100 万化合物からスコア上位 2000 化合物を選抜した。これら候補化合物について、表面プラズモン共鳴法を用いた TRAF6-RANK 結合阻害およびマウス骨髄由来の単球から破骨細胞への分化阻害の評価を行い、両アッセイにおいて活性の認められた 4 化合物をヒット化合物とした。これら化合物のうち、TRAF6 の凝集を誘起せずに特異的に結合する化合物 (TRI1) を選択した。TRI1 の構造は図表 b に示す。均一 ^{15}N 標識した TRAF6 に TRI1 を混合し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの変化を解析した結果、RANK ペプチド結合部位由来のシグナルに化学シフト変化が観測されたことから、本化合物は RANK ペプチドと同様の部位に結合することが示された。そこで、立体構造に基づく化合物合成展開を企図し、TRAF6 の RANK ペプチド結合部位に対する TRI1 のドッキング計算を行った。その結果、ドッキングスコア上位 10 構造モデルの中には、TRI1 が Pro site と相互作用を形成するモデルとしないモデルの 2 種類が含まれていた (図表 c)。そこで、確からしいモデルを実験的に選択するため、自身が開発した常磁性効果を利用した分子間結合界面決定手法を活用し、TRI1 結合に伴う Pro site の溶媒露出度変化を解析することとした。

常磁性物質を用いた新規分子間結合界面解析手法の開発と TRAF6 相互作用への応用

はじめに、本手法の原理と開発について記述する。溶液中を自由拡散する常磁性物質は、タンパク質中の溶媒露出原子に常磁性効果を及ぼすことが知られている。したがって、結合相手を添加することにより常磁性効果が減弱する原子は、添加した結合相手との界面に存在すると考えられる。特に常磁性物質であるニトロキシラジカル TEMPOL などが有する不対電子は、観測対象原子 (特に ^{13}C 原子) との直接的な軌道共有により、観測原子核の化学シフト変化を誘起する。本現象は常磁性シフト (paramagnetic shift; PS) と呼ばれる。従来用いられてきた常磁性緩和促進効果と比べ、PS は測定が容易であるだけでなく、PS の大きさはタンパク質の分子量や運動性に影響を受けない特性を有するため、PPI も含めた種々の相互作用界面を溶媒露出度に基づいて正確に決定できると考えた。私は、PS を観測パラメータとして PPI 界面を正確に決定できることを証明するために、ubiquitin の yeast ubiquitin hydrolase との結合界面検出を試みた。その結果、複合体形成に伴い、結合界面の PS 値は減少した一方、それ以外の原子の PS 値については、結合に伴う 4 倍の分子量増加にもかかわらずほとんど変化しなかった。このことから、PS は複合体形成に伴う分子量や運動性の変化に影響を受けることなく、正確に結合界面の検出が可能なパラメータであることが証明された。

そこで、TRAF6-TRI1 複合体モデル選択のために、TRAF6 の Pro site を形成する残基の一つである Y473 の芳香族炭素に着目し、TRI1 添加に伴う PS 値の変化を解析した。その結果、この炭素核に由来するシグナルの PS は TRI1 添加に伴い明らかに減少した。この結果は Y473 の芳香族炭素が TRI1 結合に伴い溶媒から遮蔽されることを意味し、TRI1 が Pro site と相互作用する構造モデルを支持する (図表 d)。そこで、これら構造モデルの

うち最安定モデルを選択し(図表 e)、本構造に基づいた化合物合成展開を行うこととした。

得られたモデル構造を用いた化合物合成展開

得られた TRAF6-TRI1 構造モデルに RANK ペプチドを重ね合わせたところ、TRI1 のカルボン酸から先に利用可能な結合サイトが存在することが示唆された(図表 e)。そこで、カルボン酸からの延伸を主な合成展開方針とした。200 程度の化合物合成展開を行った結果、カルボン酸をアシルスルホンアミド-クロルメトキシベンゼンで置換・延伸した TRI4 (図表 f) の結合親和性は TRI1 の 50 倍以上に向上し、内在性リガンドである RANK ペプチドを上回ることが確認された。そこで、TRI4 の親和性獲得メカニズムを立体構造の観点から明らかにするために TRAF6-TRI4 複合体の立体構造決定を試みた。

TRAF6-TRI4 複合体の立体構造解析

TRAF6-TRI4 複合体の結晶構造は得られなかったため、NMR により得られる結合界面の構造情報と計算科学的手法を組み合わせ、高精度立体構造モデル構築を行った。はじめに、標的高分子に競合的に結合する 2 種類のリガンドの間に観測される間接的 NOE を利用してリガンド間の相対配置を明らかにする INPHARMA 法を用いた解析を行った。RANK ペプチド、TRI4 および TRAF6 を混合し、NOESY スペクトルを測定した結果、RANK ペプチドのプロリン残基の β , γ 水素核と TRI4 の ring-1 の水素核間に、NOE シグナルが観測された。この検討から、RANK ペプチドのプロリン残基と TRI4 の ring-1 は Pro site において TRAF6 上の結合サイトを共有することが明らかとなった。

続いて、TRI4 の ring-2 および ring-3 に関する構造情報を得るため、DIRECTION 法を用いた解析を行った。DIRECTION 法は、化合物側の各水素原子の標的タンパク質との距離を定量化する手法である。DIRECTION 実験結果との一致度をドッキングスコアに組み込んで計算を行ったところ、INPHARMA 実験結果と矛盾しない構造モデルが得られたため、本構造モデルを最終構造とした(図表 g)。

得られた複合体構造モデルの考察 (図表 g)

TRI4 の ring-1 および ring-2 は、RANK ペプチドとの相互作用において鍵となる TRAF6 のアミノ酸残基と相互作用を形成する。これらの相互作用は、RANK ペプチドの TRAF6 への結合を直接的に阻害していると考えられる。このことは、MSM-MTS 法によって企図した、鍵相互作用を阻害する化合物が得られたことを意味する。一方 ring-3 に関しては、導入により活性が大きく向上したことおよびペプチド結合部位とは異なる部位に結合していたことから、純粋な親和性向上にのみ寄与するものと考えられる。このように、TRI4 の ring-1,2 と ring-3 が異なる役割を担い、協働することが、TRI4 の PPI 阻害メカニズムである。

本研究のまとめ

本研究においては、NMR と計算科学的手法を組み合わせ得た立体構造モデルを活用して TRAF6 に対する新規 PPI 阻害剤を見出しただけでなく、その作用メカニズムを解明した。得られた結果から、PPI 阻害のためには必ずしも広い界面全体を直接阻害する必要は無く、一部の鍵相互作用阻害で十分な場合もあることを明らかとした。本研究から得られた知見は、他の PPI 阻害化合物探索においても応用可能と考える。

(図表)

