

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

令和5年6月

近畿大学大学院

薬学研究所

学位論文審査結果の報告書

氏名

赤木 辰央

生年月日

昭和52年4月23日

本籍(国籍)

大阪府

学位の種類

博士 (薬科学)

学位記番号

第 193 号

学位授与の条件

学位規程第 5 条該当

(博士の学位)

論文題目

ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDHK) に対する

新規低分子阻害剤の創薬研究

学位論文受理日

令和 5年 5月 11日

学位論文審査終了日

令和 5年 5月 15日

審査委員

(主査) 仲西 功

(副主査) 川崎 直人

(副主査) 前川 智弘

指導教員

論文審査結果の要旨

ピルビン酸脱水素酵素 (Pyruvate Dehydrogenase : PDH) は、解糖系と糖質酸化を繋ぐ重要な役割を担う酵素であり、この PDH をリン酸化して不活性化するキナーゼが PDHK である。様々な糖代謝異常の疾患で、PDHK の誘導や活性化に伴う PDH 活性の低下が認められ、解糖系と糖質酸化の連動不全が生じている。PDHK を阻害する事で病態の改善が期待できることから、PDHK アイソフォームで保存された ATP 結合サイトを標的とした創薬研究が世界中で進められてきたが、既知阻害剤 (先行品) は類縁酵素との選択性を獲得するために分子量が 500 を超えており、経口剤の開発には大きな課題が存在している。

以上の背景のもと本研究では、先行品に比べてリガンド効率 (Ligand Efficiency : LE) に優れた PDHK 阻害剤を創出する事で、経口剤の取得確度が向上すると考え、ATP 結合サイトに対して Fragment Screening を起点とした創薬研究を行った。その結果、複合体構造情報に基づく化合物デザイン (Structure-based drug design : SBDD) により、LE 値と選択性プロファイルに優れた新規リード化合物を見出すことに成功した。本論文は、Fragment Screening による独創性の高いケモタイプの創出から、リード化合物の取得に至る SBDD、および計算機化学を用いた構造活性相関解析を 3 章にわたって論述している。

第 1 章では、PDHK4 に対して X 線 Fragment Screening を実施し、SBDD を通じて 3 種類のリード候補化合物を見出した。Fragment Hit の複合体構造情報から、ポケット深部に存在する水のエネルギー状態を WaterMap 法で評価し、脂溶性基で水を排斥する SBDD 戦略を立てている。WaterMap 計算の活用により、わずか非水素原子 4 つの導入で阻害活性を mM レベルから μM レベルに向上している点は高く評価できる。また、複合体構造情報を組み合わせた Fragment Merge により 3 種類のリード候補化合物を見出しており、X 線 Fragment Screening による新規ケモタイプ創出の成功例を示している。

第 2 章では、三環性リード候補化合物から ATP サイト外側のリボース・リン酸結合部位に対して SBDD を行い、先行品に比べて LE 値と選択性プロファイルに優れたリード化合物を見出した。類縁体との複合体結晶構造における、フレキシブルな PDHK ATP-lid 領域が構造化した知見を活用し、ATP-lid 中の Phe326 側鎖部をリガンドに Merge するという斬新な発想により、酵素阻害活性が nM レベルに到達する化合物を見出している。また、三環性化合物 C3 位からの検討で得られた相互作用情報を C4 位からの展開に活用し、ドッキング計算で有望な結果を与えたピロリジン類縁体で、阻害活性を保ちながら LE 値を改善している。この事は、本研究で得られた相互作用情報が転用可能であることを示しており、PDHK 阻害剤の研究領域において大きな価値のある知見を提供している。

第 3 章では、荷電性残基が複雑な水素結合ネットワークを形成する PDHK ATP サイトに対して、結合自由エネルギー計算を通じた構造活性相関研究を行った。原子電荷を固定した分子力学法では実測値との相関が認められなかった事から、相関を改善する目的で量子力学法であるフラグメント分子軌道法 (Fragment Molecular Orbital Method : FMO 法) を用いた計算を検討した。その結果、溶媒効果を分極連続体モデル (Polarizable Continuum Model, PCM) で算出する事で、実測値との相関が R 値で 0.73 まで向上する事を見出した。また、FMO-PCM 計算で相関が改善した要因の解析を行い、水素結合ネットワークでの電荷移動を計算条件に取り込むことの重要性を明らかとした。電荷移動の寄与が大きい計算系において、原子電荷を固定した分子力学法で計算を行う事の問題点を提起し、FMO-PCM 計算による解決法を示している。

以上のように本研究は、PDHK ATP サイトでの創薬研究が抱えていた低い LE 値の問題を克服するため、Fragment Screening を起点とした創薬研究を行い、既知化合物よりも LE 値と選択性プロファイルに優れた複数の新規リード化合物を取得した。また、ポケット深部に存在する水の排斥効果、ならびにポケット外側での親和性向上に繋がる相互作用情報を明らかとした。さらに、PDHK ATP サイトでの結合自由エネルギー計算の検討を通じて、FMO-PCM 法での計算が精度向上に重要である事、複雑な極性相互作用から構成される水素結合ネットワークを計算対象とする場合、電荷移動の効果を計算条件に取り込むことが重要である事を明らかとした。

これらの成果は、PDHK の阻害剤創出研究における有用な知見を与えるだけでなく、今後の創薬化学と計算機化学に大きく貢献するものであり、博士の学位を授与するに値するものと認める。

論文審査結果の要旨

ピルビン酸脱水素酵素 (Pyruvate Dehydrogenase : PDH) は、解糖系と糖質酸化を繋ぐ重要な役割を担う酵素であり、この PDH をリン酸化して不活性化するキナーゼが PDHK である。様々な糖代謝異常の疾患で、PDHK の誘導や活性化に伴う PDH 活性の低下が認められ、解糖系と糖質酸化の連動不全が生じている。PDHK を阻害する事で病態の改善が期待できることから、PDHK アイソフォームで保存された ATP 結合サイトを標的とした創薬研究が世界中で進められてきたが、既知阻害剤 (先行品) は類縁酵素との選択性を獲得するために分子量が 500 を超えており、経口剤の開発には大きな課題が存在している。

以上の背景のもと本研究では、先行品に比べてリガンド効率 (Ligand Efficiency : LE) に優れた PDHK 阻害剤を創出する事で、経口剤の取得確度が向上すると考え、ATP 結合サイトに対して Fragment Screening を起点とした創薬研究を行った。その結果、複合体構造情報に基づく化合物デザイン (Structure-based drug design : SBDD) により、LE 値と選択性プロファイルに優れた新規リード化合物を見出すことに成功した。本論文は、Fragment Screening による独創性の高いケモタイプの創出から、リード化合物の取得に至る SBDD、および計算機化学を用いた構造活性相関解析を 3 章にわたって論述している。

第 1 章では、PDHK4 に対して X 線 Fragment Screening を実施し、SBDD を通じて 3 種類のリード候補化合物を見出した。Fragment Hit の複合体構造情報から、ポケット深部に存在する水のエネルギー状態を WaterMap 法で評価し、脂溶性基で水を排斥する SBDD 戦略を立てている。WaterMap 計算の活用により、わずかに非水素原子 4 つの導入で阻害活性を mM レベルから μM レベルに向上している点は高く評価できる。また、複合体構造情報を組み合わせた Fragment Merge により 3 種類のリード候補化合物を見出しており、X 線 Fragment Screening による新規ケモタイプ創出の成功例を示している。

第 2 章では、三環性リード候補化合物から ATP サイト外側のリボース・リン酸結合部位に対して SBDD を行い、先行品に比べて LE 値と選択性プロファイルに優れたリード化合物を見出した。類縁体との複合体結晶構造における、フレキシブルな PDHK ATP-lid 領域が構造化した知見を活用し、ATP-lid 中の Phe326 側鎖部をリガンドに Merge するという斬新な発想により、酵素阻害活性が nM レベルに到達する化合物を見出している。また、三環性化合物 C3 位からの検討で得られた相互作用情報を C4 位からの展開に活用し、ドッキング計算で有望な結果を与えたピロリジン類縁体で、阻害活性を保ちながら LE 値を改善している。この事は、本研究で得られた相互作用情報が転用可能であることを示しており、PDHK 阻害剤の研究領域において大きな価値のある知見を提供している。

第 3 章では、荷電性残基が複雑な水素結合ネットワークを形成する PDHK ATP サイトに対して、結合自由エネルギー計算を通じた構造活性相関研究を行った。原子電荷を固定した分子力学法では実測値との相関が認められなかった事から、相関を改善する目的で量子力学法であるフラグメント分子軌道法 (Fragment Molecular Orbital Method : FMO 法) を用いた計算を検討した。その結果、溶媒効果を分極連続体モデル (Polarizable Continuum Model, PCM) で算出する事で、実測値との相関が R 値で 0.73 まで向上する事を見出した。また、FMO-PCM 計算で相関が改善した要因の解析を行い、水素結合ネットワークでの電荷移動を計算条件に取り込むことの重要性を明らかとした。電荷移動の寄与が大きい計算系において、原子電荷を固定した分子力学法で計算を行う事の問題点を提起し、FMO-PCM 計算による解決法を示している。

以上のように本研究は、PDHK ATP サイトでの創薬研究が抱えていた低い LE 値の問題を克服するため、Fragment Screening を起点とした創薬研究を行い、既知化合物よりも LE 値と選択性プロファイルに優れた複数の新規リード化合物を取得した。また、ポケット深部に存在する水の排斥効果、ならびにポケット外側での親和性向上に繋がる相互作用情報を明らかとした。さらに、PDHK ATP サイトでの結合自由エネルギー計算の検討を通じて、FMO-PCM 法での計算が精度向上に重要である事、複雑な極性相互作用から構成される水素結合ネットワークを計算対象とする場合、電荷移動の効果を計算条件に取り込むことが重要である事を明らかとした。

これらの成果は、PDHK の阻害剤創出研究における有用な知見を与えるだけでなく、今後の創薬化学と計算機化学に大きく貢献するものであり、博士の学位を授与するに値するものと認める。

博士学位論文最終試験結果の報告書

令和5年5月9日

審査委員	主査	仲西 功
	副主査	川崎 直人
	副主査	前川 智弘
学位申請者氏名	赤木 辰央	
論文題目	ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDHK)に対する新規低分子阻害剤の創薬研究	
<p>最終試験は、令和5年5月8日17時から同18時30分まで、本学38号館9階 創薬分子設計学研究室において、パワーポイントを用いた口頭発表・試問の形式で行なわれた。</p> <p>公聴会時には時間の関係で議論されなかったより詳細な点に関する質問がなされ、これらに対し適切な応答が出来ていた。</p> <p>本研究の成果として、X線 Fragment screening により mM オーダーの阻害活性を有する複数のヒット化合物を見出し、それらの Fragment growing あるいは Fragment merging により、活性が約 1000 倍増強された新規なリード候補化合物を得ている。また、PDHK との複合体構造に基づくドラッグデザインを行い、リガンド効率の高い nM オーダーの阻害活性を有するリード化合物の創出に成功している。さらに、量子化学計算を用いた構造活性相関解析により、実測値との高い相関を示す結合自由エネルギー計算法を見出すとともに、複雑な水素結合ネットワークを有する系においては、電荷移動の効果を計算条件に取り込むことが重要であることを明らかとしている。これらの成果は、PDHK の阻害剤創出研究における有用な知見を与えるだけでなく、今後の創薬化学と計算機化学に大きく貢献するものであり、博士の学位を授与するに値するものである。</p> <p>以上により、申請者は最終試験に合格したものと認める。</p>		