

## 薬学研究科・創薬分子設計学研究室

### 1. 研究課題名

「タンパク質の立体構造に基づくシード・リード最適化および新規リガンド探索研究」

### 2. 研究メンバー

仲西 功	近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室・教授
中村 真也	近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室・助手
高平 和典	近畿大学大学院薬科学研究科創薬分子設計学研究室・修士課程2年生
島田 和子	近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室・4年生

### 3. 研究成果

糖尿病の特効薬としてインドやスリランカの伝統医学アーユルヴェーダでは、*salacia*属植物である*S. reticulata*や*S. oblonga*などが用いられている。これらの植物から、糖尿病治療薬acarboseやvogliboseに匹敵する強い $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示し、チオ糖スルホニウム硫酸分子内塩構造を有するsalacinolやkotalanolが単離されている<sup>1,2</sup>。両化合物をシードとした化合物展開が生命有機化学研究室において実施されているが、より論理的な医薬品設計を進めるために、当研究室ではこれらの化合物と $\alpha$ -グルコシダーゼとの複合体構造の解析に着手し、これらの知見から10倍の活性を持つ化合物を得ることに成功した<sup>3</sup>。 $\alpha$ -グルコシダーゼはヒトでは数種のタンパク質から構成されているため、複数種のタンパク質を同時に阻害することができればより高い効果を持つことが期待できる。そのためホモロジーモデリングの手法を用いて、立体構造が未知である $\alpha$ -グルコシダーゼの構造を予測し、salacinol類縁体の結合様式を推定した。また既存の報告された類縁体についても構造活性相関を計算化学的見地から検討した。

#### 3-1. ヒト ctSI のホモロジーモデリング

ヒトの $\alpha$ -グルコシダーゼはMaltase-Glucoamylase (MGAM)やSucrase-Isomaltase (SI)などから構成されている。そのため、複数種の酵素を同時に阻害する方がより効率的に治療効果を発揮できると考えられる。MGAMとSIにはそれぞれN末端触媒ドメイン (ntMGAM, ntSI)、C末端触媒ドメイン(ctMGAM, ctSI)が存在しているが、その立体構造に関してはntMGAM、ntSIしか判明していない。そこで、別種の $\alpha$ -グルコシダーゼも考慮に入れたデザインのため、ホモロジーモデリングにより立体構造の予測を試みた。前年度までに、ヒトのctMGAMの予測を行っており、本年度はヒトctSIの構造予測を行った。

##### 3-1-1. モデル構造の評価

ヒトctSIのアミノ酸配列(HSA:6476)をゲノムネット<sup>4</sup>から入手し、ntMGAMをテンプレート構造として、前年度までと同様、MODELLER<sup>5</sup>を用いてモデリングおよび構造最適化を行った。構造の妥当性は、Profile-3Dスコア<sup>6</sup>とラマチャンドラン-プロット<sup>7</sup>により評価した。Profile-3Dのスコアは、371.46であり、このタンパク質での基準となる184.46を大きく上回った。図1は、

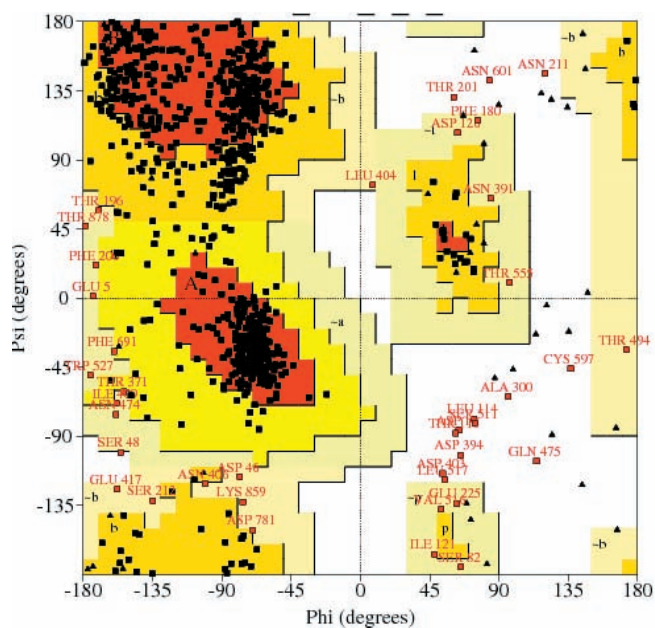


図1 ctSIのモデル構造のラムチャンドラン-プロット

白は許容範囲外、薄黄色は一般的な許容内、黄色は薄黄色より優良、赤色は最良領域を示す。▲はグリシンとプロリン、■はグリシンとプロリン以外のアミノ酸残基を表しており、赤字で示したアミノ酸残基は許容範囲外、あるいは許容内ではあるが好ましくない領域のアミノ酸残基である。

構築したモデル構造のラムチャンドラン-プロットである。不適領域に存在するアミノ酸残基数は全体の1.8%にあたる14であり、少ないものと考えられる。これらのアミノ酸残基は活性部位から遠くに位置し、またループ構造を形成しているアミノ酸残基であった。Profile-3D スコア及びラムチャンドラン-プロット共に特に大きな異常値はないため、構築したモデル構造は、フォールディング上の問題は無いと考えられる。従って、以降はモデル構造の活性部位に焦点を当て詳細に考察する。

### 3-1-2. 活性部位の構造比較

ctSIのモデル構造を、ntMGAMとntSIの結晶構造および、ctMGAMモデル構造と重ね合わせ、活性部位の構造を中心に比較したものを図2に示す。図2 aは、ntMGAMの結晶構造(PDBid:3L4Z)<sup>8</sup>において、サラシノールの水酸基と水素結合を、あるいはスルホニウムイオンと塩橋を形成するアミノ酸残基を表示したものである。これらのアミノ酸残基は4つの触媒ドメインに全て保存されており、各構造における差は、ほとんど観察されない。したがって、サラシノールとの水素結合や塩橋相互作用は、全ての活性部位において共通の様式で存在すると考えられる。図2 bは、サラシノールの結合部位において、アミノ酸残基に変異のある部分を示している。すなわち、ntMGAMでは、THR205、TYR299、TRP406、ALA576及びGLY602に相当する部位である。まず、ntMGAMでTHR205に相当する部分のアミノ酸残基の違いは、サラシノールとの距離が遠いために相互作用にあまり影響を与えないと考えられる。しかし、LEU233となるntSIでは硫酸基部分に大きな置換基が導入されると、結合部位が狭くなって

るため影響が出る可能性が考えられる。

ntMGAM において TYR299 が位置する部位では、ntSI のみがトリプトファンであり、それ以外ではこの部位はチロシン残基が保存されている。チロシン残基の水酸基は、他のアミノ酸残基と水素結合を形成しており、リガンドとの水素結合に寄与しないため、トリプトファンに変化しても極性相互作用の差は極小さいと考えられる。しかし、ntSI においてトリプトファン残基に置換されることにより、結合ポケットが狭くなり大きい置換基が入りにくくなると考えられる。次に、ntMGAM において TRP406 に相当する部分であるが、ctSI のみプロリン残基となっている。ntMGAM と ntSI の硫酸基の酸素原子が側鎖のインドール環の CH と CH $\cdots$ O 相

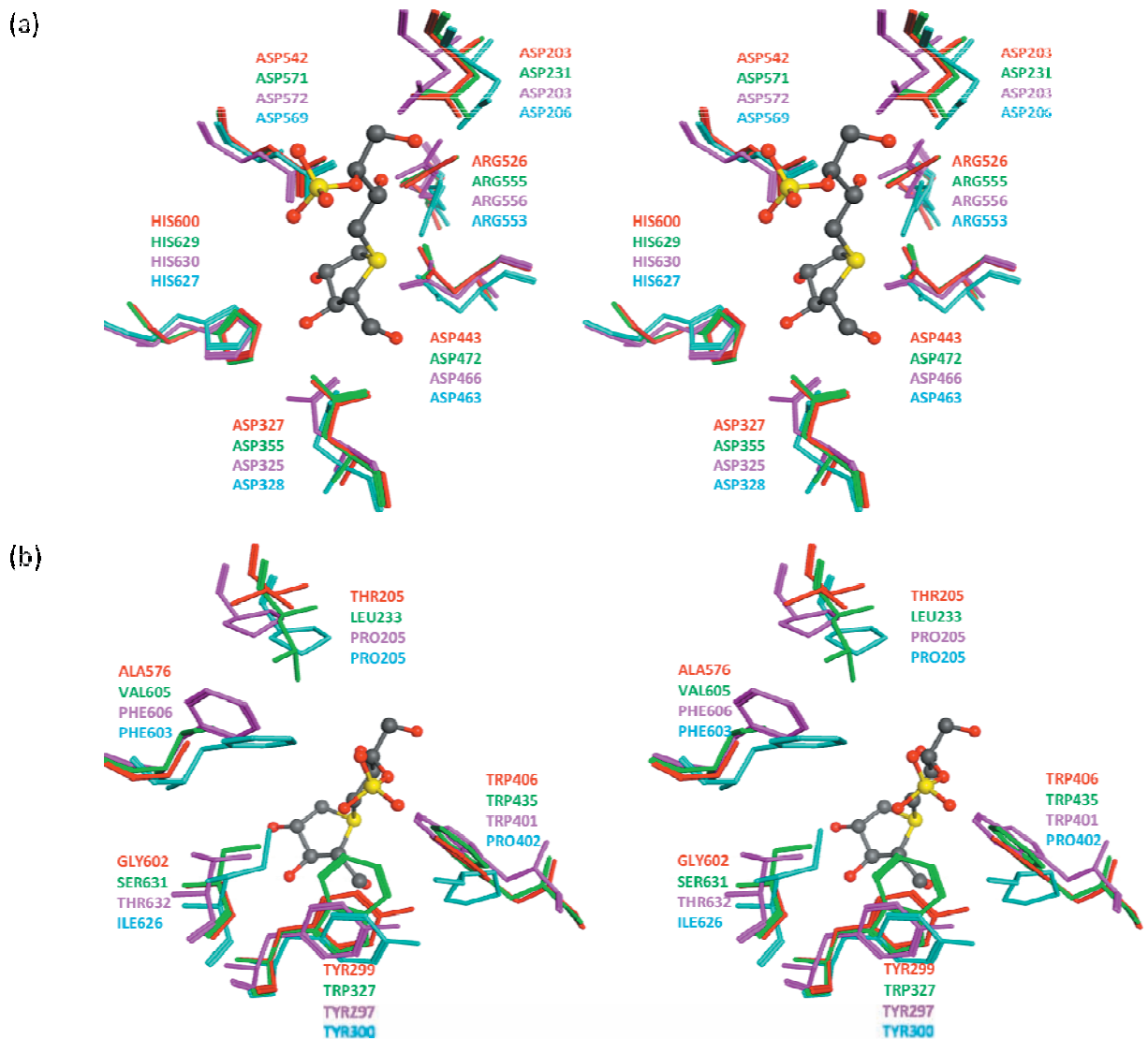


図2 4つの触媒ドメインのリガンド結合部位の重ね合わせ(ステレオ図)

(a)リガンドと水素結合および塩橋を形成するアミノ酸残基 (b)変異のあるアミノ酸残基、赤:ntMGAMの結晶構造(PDBid:3L4Z)<sup>8</sup>、緑:ntSIの結晶構造(PDBid:3LPP.chainB)<sup>9</sup>、紫:ctMGAMのホモロジーモデル、青:ctSIのホモロジーモデル、原子別色:ntMGAMの結晶構造(PDBid:3L4Z)

に含まれるサラシノール。

相互作用により安定化されると考えられるため、ctSIは、この部位においてサラシノールとの相互作用が弱くなると考えられる。ntMGAMにおいて、ALA576に相当する部分は、ntSIではバリン、ctMGAM及びctSIではフェニルアラニンである。MGAMおよびSIともにC末端側の触媒ドメインでは、この部分のスペースが狭くなるため、基質あるいは阻害剤の選択性に影響を与える可能性が大きいと考えられる。最後にntMGAMのGLY602に相当する部位は、全ての触媒ドメインにおいてアミノ酸残基が異なる。ntMGAMでは、グリシンであるため、顕著な相互作用はないと考えられる。ntSIとctMGAMではそれぞれ側鎖に水酸基を有するセリン及びスレオニンとなるが、硫酸基と水素結合するには距離が遠く、弱い静電相互作用の寄与しかないと考えられる。しかし、これらの水酸基と水素結合できる官能基を有する化合物は、活性の向上が期待出来ると考えられる。ctSIではイソロイシンであるが、やや嵩高い疎水性基であるため、極性の相互作用も無く、硫酸基とは弱いファンデルワールス相互作用が働く程度であると考えられる。

次に、各触媒ドメインの結合部位 (ntMGAMの結晶構造(PDBid:3L4Z))に含まれるサラシノールから5Å以内のアミノ酸残基)の分子表面を図3に示す。これにより、ctSI、ctMGAM、ntSI、ntMGAMの順に結合ポケットが深いことが分かる。特にctSIでは、サラシノールの硫酸基の溶媒への露出が完全になくなっている。結合部位が深い程、嵩高い疎水性置換基の付加により疎水性相互作用の増加が期待出来る。また浅い結合部位に、過剰に大きい置換基を付加しても溶媒側への露出が起こるだけであり、安定性の獲得につながらない。

また、ntSIとctSIの両触媒ドメインの結合部位では、サラシノール側鎖末端の延長部分に塩基性のアミノ酸残基が存在しており(図3 bおよびd\*)、この領域がプラスに荷電していることが1つの特徴である。このことからサラシノールの側鎖末端にマイナスの電荷与えることで静電的な相互作用が期待出来る。以上のように、構築したモデル構造から、サラシノールの構造変換に関し、定性的な方向性を示唆することが出来た。

### 3-1-3. salacinol 類縁体と ctSI のドッキング

さらなる高活性の化合物をデザインするため、図4に示す既知化合物(サラシノール、化合物a, b, c)および前年度までの結果から高活性を期待する新規化合物(化合物d)のドッキングシミュレーションをctSIに対しても実施した。ドッキングツールにはMOE-Dock<sup>10</sup>を用い、候補ポーズを100個発生させ、それらをLondon dGスコアで評価することで50ポーズに絞り込み、これらについてMolecular Mechanics/Generalized Born(MM/GBMV)法<sup>11</sup>にて構造最適化し、最終の結合エネルギーを得た。

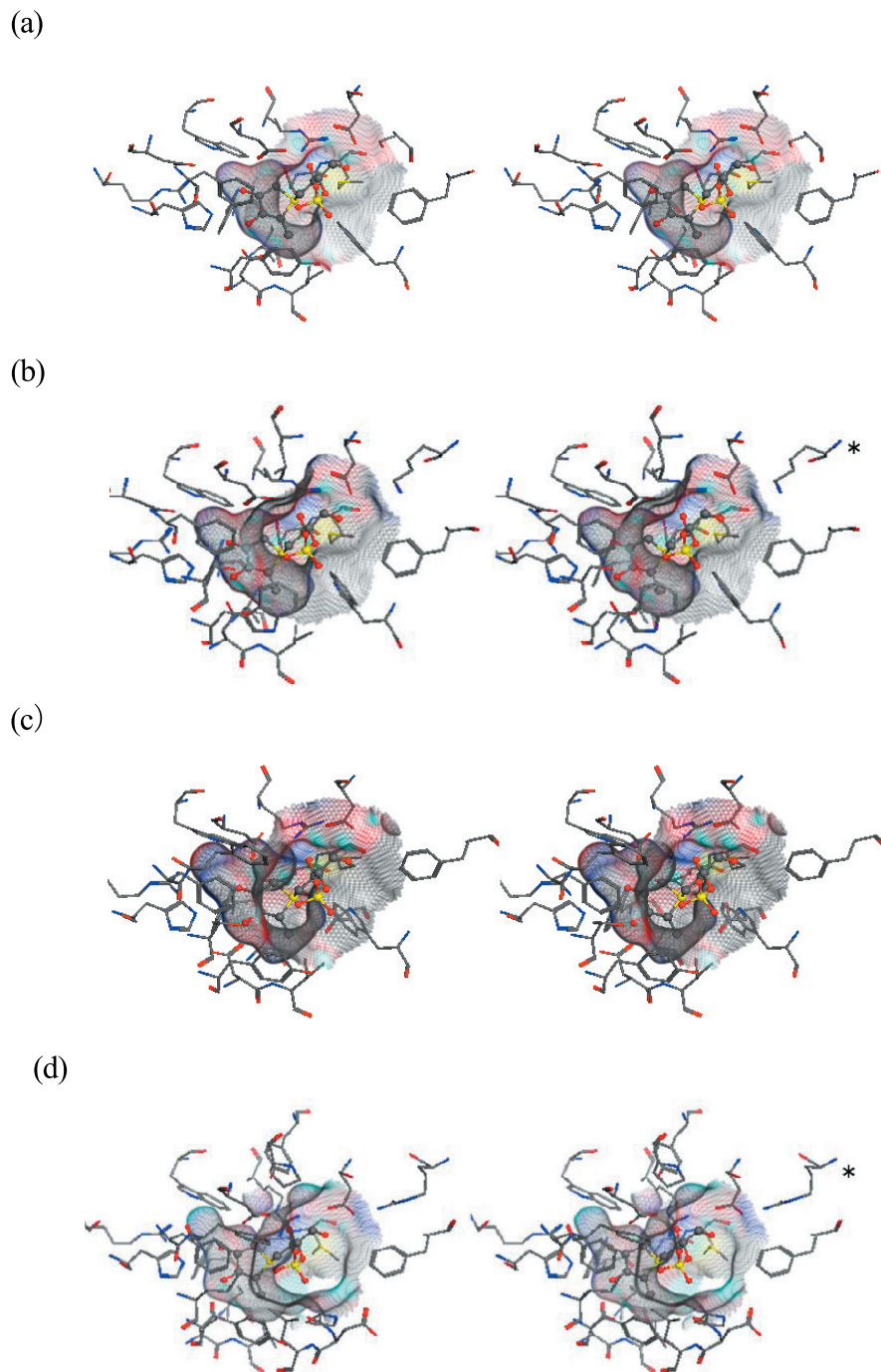
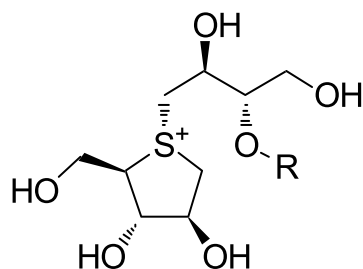


図3 4つの触媒ドメインのリガンド結合部位の分子表面(ステレオ図)、(a) ntMGAM、(b) ntSI、(c) ctMGAM、(d) ctSI、各触媒ドメインのリガンド結合部位の表面をメッシュで示す。ボールスティックでntMGAMの結晶構造(PDBid:3L4Z)に含まれるサラシノールを重ね合わせて表示。\*は、ntSIとctSIに特徴的なリジン残基。





	-R	Maltase( pIC <sub>50</sub> )
サラシノール	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.28
化合物 a	-Me	5.28
化合物 b	-Et	5.77
化合物 c	-Bz	6.36
化合物 d	-Np	N. D.

図4 salacinol およびその類縁体と阻害活性値

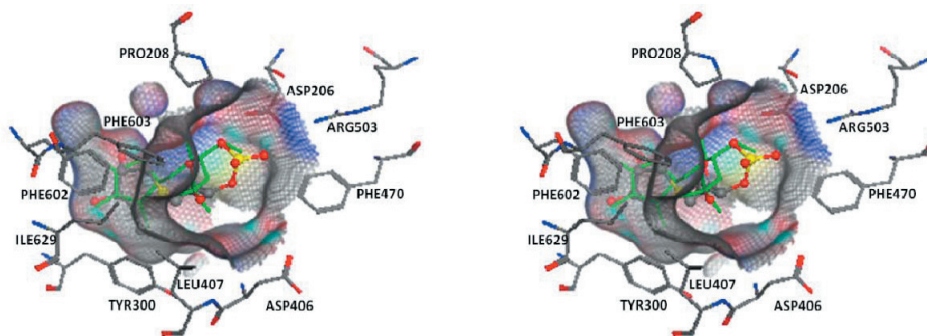


図5 ctSI のホモロジーモデルに対するサラシノールの予測結合様式(ステレオ図) グリーン:ntMGAM の結晶構造(PDBid=3L4Z)中のサラシノール、ball&stick:予測したサラシノール

サラシノールのドッキング結果を図5に示す。硫酸基は、硫酸基結合部位に位置せず、側鎖末端結合部位に結合すると予想された。その代わりに、C4' 位の水酸基が硫酸基結合部位に位置していた。この原因として、硫酸基結合部位にふたをするように PHE603、 ILE629 および LEU407 が配置されているためにポケットが狭まり硫酸基が存在出来なくなり、より小さい水酸基が配置されやすくなったこと、プラスの電荷を持つ ARG503 にマイナスの電荷を持つ硫酸基が引き付けられたことが原因として考えられる。

サラシノール類縁体の結果を図6に示す。化合物 a のメチル基および化合物 b のエチル基も側鎖末端結合部位に位置し、PHE470 と弱いファンデルワールス相互作用を形成している。ARG503 により、側鎖末端結合部位は ntSI と同様に狭くなるが、化合物 c のベンジル基は PHE470、ASP206、ARG503 とともに相互作用出来る位置にくる。化合物 d のナフチル基は、その大きさから、結合部位のアミノ酸と接触しないよう活性部位の中央に存在し、硫酸基結合部位の、LEU407、PHE603、 ILE629、側鎖末端結合部位の PHE470 とファンデルワールス相互作用 (-2.0 kcal/mol) を形成していた。

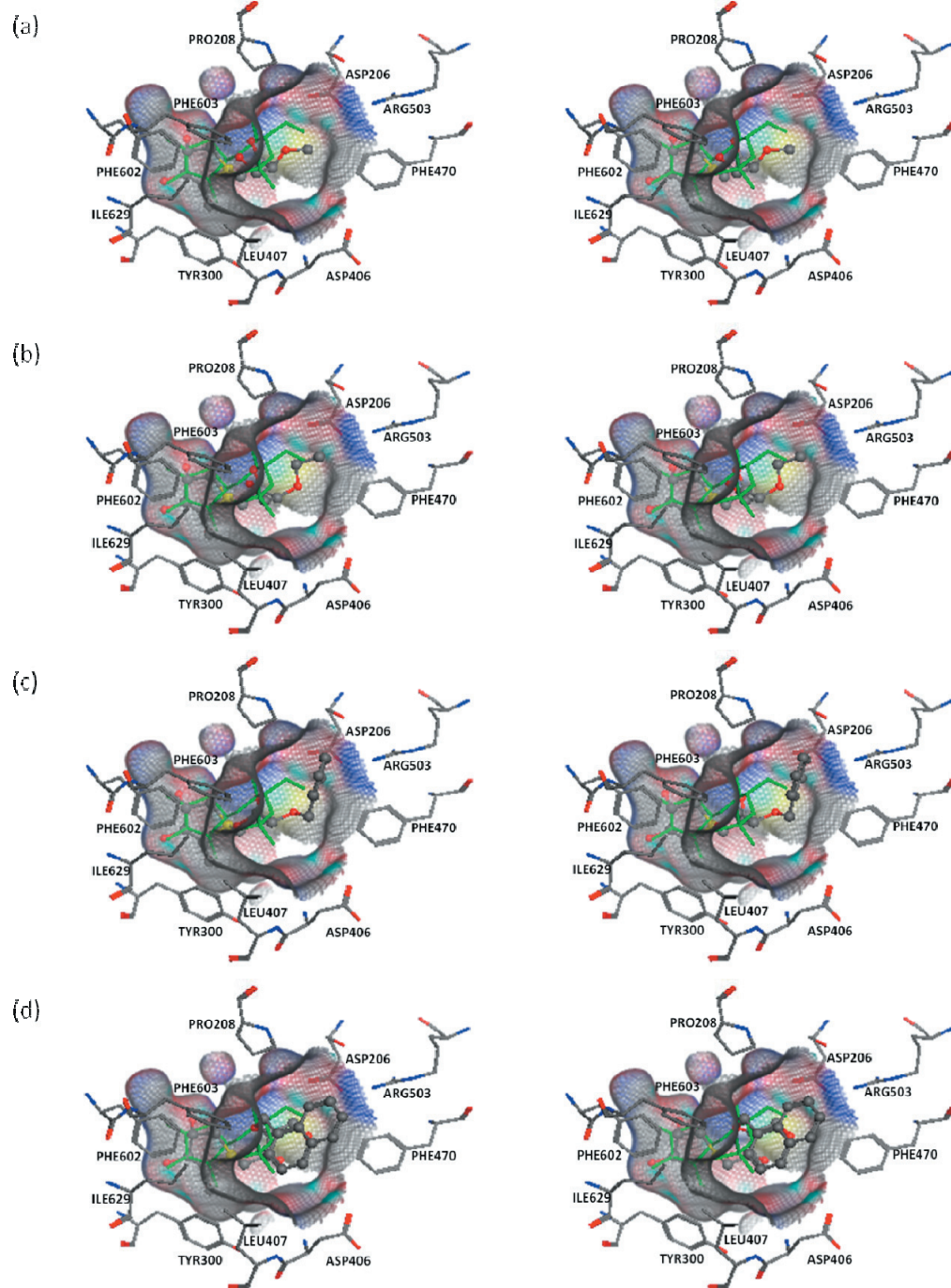


図6 ctSI に対するサラシノール類縁体の予測結合様式 (ステレオ図) (a)化合物 a、(b)化合物 b、(c)化合物 c、(d)化合物 d、結合部位表面をメッシュで、相互作用に関与する結晶構造中のアミノ酸残基も示す。ntMGAM の結晶構造中のサラシノールをグリーンで、類縁体を ball&stick で示す。

### 3-1-4. MMPBSA 法による結合自由エネルギーの解析

表 1 は、村岡らによって測定されたサラシノール類縁体のラット $\alpha$ グルコシダーゼによるマルトース、イソマルトースおよびスクロースの加水分解に対する阻害の強さを $IC_{50}$ 値で示したものである。それぞれの基質の分解に対する阻害をマルターゼ、イソマルターゼおよびスクラーゼに対する阻害活性とみなしている。マルターゼに対する阻害は、サラシノールや化合物aと比較して、化合物bは3倍以上、化合物cは5倍以上阻害活性が強い。イソマルターゼに対する阻害は、サラシノールや化合物cと比較して、化合物aは3倍以上、化合物bは約5倍阻害活性が強い。スクラーゼに対する阻害は、サラシノールや化合物cと比較して、化合物aは3倍程度、化合物bは10倍以上阻害活性が強い。

これまでに、4つの触媒ドメイン別の阻害剤の活性は報告されていないが、ntMGAM と ntSI のマルトースとイソマルトースの加水分解に対する阻害活性の違いは明らかにされている。両触媒ドメイン間でマルトースに対する活性の違いはあまりないが、イソマルトースに対する活性は、ntMGAM と比較して ntSI の方が 20 倍程度強い活性を持つ。このことより、サラシノール類縁体による阻害活性は、ntMGAM の場合には、マルトースに対してのみ、ntSI の場合には、マルトース、イソマルトースの両者に対する阻害活性を考慮しなければならない。

表 2 に、4つの触媒ドメインに対するサラシノール及びサラシノール類縁体の結合自由エネルギーをMM/PBSA法<sup>12</sup>により算出した結果を示す。ntMGAMとntSIに対する阻害活性は、ntMGAMでは、サラシノール、化合物a、化合物bともほぼ同じ程度であるが、ntSIでは、化合物aと化合物bは、サラシノールと比較して、やや強めと予想される。これは、表 2-2 のイソマルトースの加水分解はntSIの影響が大きい、表 2-1 のイソマルトースに対する阻害活性は化合物a、化合物bがサラシノールより強いという実験によるデータと一致する。化合物cは4つの触媒ドメイン全てで、サラシノール、化合物a及び化合物bよりも、強いと予想された。これは、表 2-1 のマルトースに対する加水分解の阻害活性の実験データに一致している。

このように、マルターゼやイソマルターゼ活性においては、MM/PBSA 法による活性予測値が実験データを再現出来る傾向にある。しかし、イソマルターゼやスクラーゼ活性において、化合物cの活性が化合物aや化合物bと比較して低いということに関して、MM/PBSA 値は矛盾した結果を与えている。この点において、今回の活性予測法には、モデル構造を含めて、改良すべき点があることを示唆している。化合物dの阻害活性の実験値は現在測定されていないが、今回の方法ではntMGAM以外には、他のリガンドに比べて強いと予想されている。これは、

表 1 ラット $\alpha$ -グルコシダーゼに対するサラシノール類縁体の阻害活性 $IC_{50}(\mu M)$

化合物	Maltase	Isomaltase	Sucrase
サラシノール	5.20	1.30	1.60
化合物 a	5.30	0.39	0.46
化合物 b	1.70	0.27	0.12
化合物 c	1.00	0.95	1.30



表2 サラシノール類縁体の予測結合自由エネルギー(kcal/mol)

	ntMGAM	ntSI	ctMGAM	ctSI
サラシノール	-20.8	-21.9	-22.6	-25.2
化合物 a	-19.9	-23.8	-23.5	-20.9
化合物 b	-20.1	-24.4	-23.7	-27.2
化合物 c	-27.8	-27.8	-25.9	-29.5
化合物 d	-19.7	-31.8	-29.4	-36.0

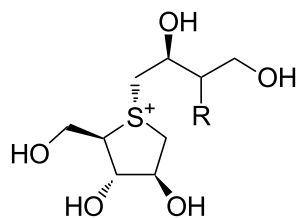
ntMGAM では、他の触媒ドメインと比較して活性部位が浅く溶媒に露出しているために、疎水性相互作用を得にくいからと考えられる。この予測値が正しいか否か実験による検証が待たれるが、より多くの構造活性相関データを集めることにより、未知化合物の活性予測に成功する確率を高めることが出来ると考えている。

### 3-2. サラシノール類縁体の構造活性相関

サラシノール類縁体について、C3' 位の立体反転を行った化合物群 (表 3) に関して構造活性相関を検証するために、ドッキングシミュレーションを行い計算化学的見地から検討を行った。シミュレーション手順は前年度と同様であり、ntMGAM とサラシノールとの複合体構造 (PDBid:3L4Z) に対して MOE-Dock を用いて計算を行い、MM/GBVI 法による相互作用も同じく、活性値と共に表 3 に記載した。

特に化合物 a' や化合物 b' では活性が低下するのに対し、化合物 c' では再び活性が同程度まで復帰する点について計算化学的に検討する。図 7 に化合物 c' の結合様式を示すが、化合物 a' および化合物 b' はちょうどこの結合位置からメチレン鎖を短縮させるように結合しているため、この図を元に考察を行う。まず化合物 a' に関して、C3' 位の水酸基の近位には ASP542 が存在しているが、すでに C2' 位の水酸基が水素結合を行っており、立体構造的に同時に水素結合を構成することが困難であり、負電荷の ASP542 の方向に酸素原子が向かざるを得ない。このことから静電的な不利が生じ低下したものと考えられる。同様に、化合物 b' は水酸基がメチレン鎖に変わっているが硫酸基結合部位にはメチル基が届かず溶媒面に露出してしまい、疎水基と溶媒との相互作用によりさらに不利が生じてしまい、さらなる活性低下が生じたと考えられる。一方化合物 c' は硫酸基結合部位とは異なるが別の窪みにメチレン鎖が届くことで、活性が復帰したものと考えられる。

表3 C3'位の立体反転を行ったサラシノール類縁体



	-R	Maltase (pIC <sub>50</sub> )	相互作用 (kcal/mol)
サラシノール	( <i>S</i> ) -OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.28	-38.56
化合物 a	( <i>S</i> ) -OH	5.10	-36.85
化合物 b	( <i>S</i> ) -OMe	5.28	-37.50
化合物 c	( <i>S</i> ) -OEt	5.77	-38.01
化合物 a'	( <i>R</i> ) -OH	4.47	-35.06
化合物 b'	( <i>R</i> ) -OMe	ca. 4.0	-34.42
化合物 c'	( <i>R</i> ) -OEt	ca. 5.5	-35.64

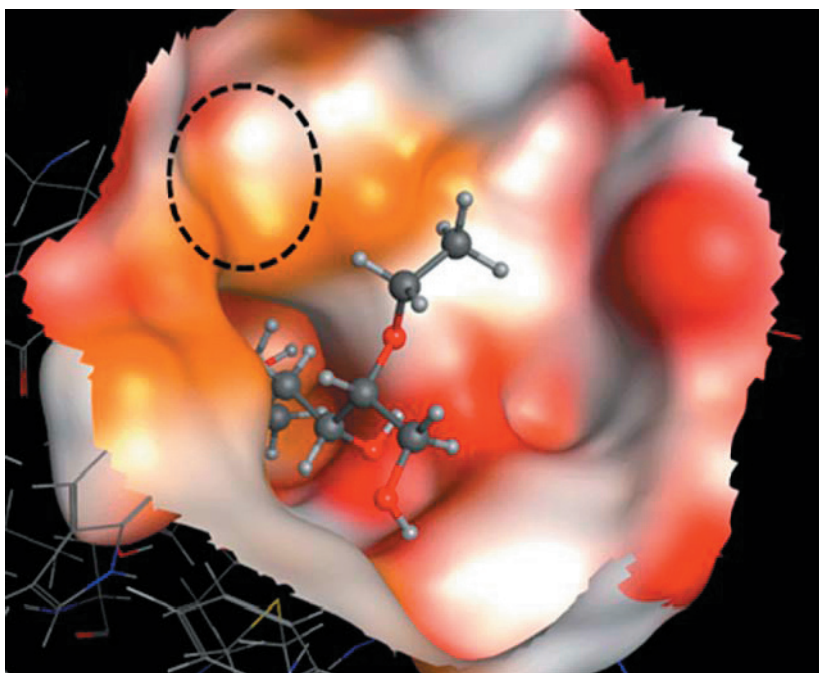


図7 化合物 c' と ntMGAM のドッキング結果  
点線で硫酸基結合部位の位置を示している

## 引用文献

- 1) Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G., Muraoka O. : *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8367-8370 (1997).
- 2) Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H. : *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1339-1340 (1998).
- 3) Tanabe G, Otani T., Cong W., Minematsu T., Ninomiya K., Yoshikawa M., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 3159-3162 (2011)
- 4) GenomeNet, <http://www.genome.jp/ja/>
- 5) Šali, A., Blundell, T. L.,: Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**, 779-815(1993).
- 6) Eisenberg, D., James, Luthy,R., Bowie, J.U., *Nature*, **356**, 83-85.( 1992)
- 7) Sheik, S.S., Sundararajan, P., Hussain, A.S.Z., Sekar, K. *Glycobiology*, **20**(8), 1034-1045(2010).
- 8) Sim L., Jayakanthan K., Mohan S., Nasi R., Johnston B.D., Pinto B.M., Rose D.R. *J. Mol. Biol.*, **375**, 782-792 (2008).
- 9) Sim,L., Willemsma,C., Mohan,S., Naim Y.H., Pint B.M., Rose,D.R., *J. Biol. Chem.*, **285**,17763-17770 (2010).
- 10) MOE-Dock, 2011.09 Chemical Computing Group, Inc., Montreal, Quebec, Canada, <http://www.chemcomp.com>
- 11) Labute P. *J. Comput. Chem.* **29**, 1693-1698 (2008).
- 12) Kollman,P.A., Massova,I., Reyes,C., Kuhn,B., Huo,S., Chong, L., Lee,M., Lee,T., Duan,Y., Wang,W., Donini,O., Cieplak,P., Srinivasan, J., Case, D.A., Cheatham,T.E.3rd.,*Acc. Chem. Res.*, **33**, 889-897 (2000).