



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structural studies of ligand-protein complex : the importance of structural change for drug design [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中島, 愛子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第6916号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56256
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Aiko_Nakajima_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 中島 愛子

学 位 論 文 題 名

Structural studies of ligand-protein complex: the importance of structural change for drug design

（蛋白質と低分子リガンド複合体の構造学的研究：ドラッグデザインにおける構造変化の重要性について）

創薬研究において SBDD (Structural Based Drug Design or Discovery) は新しい薬剤候補を見出したり，見出された薬剤候補化合物の構造を変換，最適化したりする際の有力な手段として広く認知されている．生体内において疾病に関わる酵素・受容体などの蛋白質は多岐にわたるが，創薬研究において重要な点は目的とする疾病の原因蛋白質（ターゲット蛋白質）に対し強い活性を示し，それ以外の蛋白質に対しては活性を示さないことである．そのため SBDD においてもターゲット蛋白質のみならず，オフターゲット蛋白質との相互作用についても構造情報を取得することが重要になる．このことは kinase 阻害剤を開発する場合のように，活性部位の類似した蛋白質が多数存在する場合には特に重要になる．

本研究では，類似の活性部位を持つ MK2 (Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2) と CDK2 (Cyclin-dependent kinase2) に対し，異なる阻害活性を示す阻害剤について，それぞれの酵素との複合体の構造解析を行い，阻害活性の差を構造に基づいて解明しようとした．

MK2 は p38 MAP kinase シグナル経路の末端に位置する Ser/Thr kinase の一種で，上流の p38 MAP kinase により直接リン酸化され，活性化された MK2 は heat shock protein 27 を基質としてリン酸化し，TNF- α , IL-6, IL-11 などの炎症性サイトカインの産生を調節する．TNF- α はリウマチなどの炎症性疾患に関与しており，いくつかの抗 TNF- α 抗体はリウマチの効果的な治療薬としてすでに臨床応用されている．このような背景から，MK2 は TNF- α の産生抑制剤として魅力的なターゲットであり，我々は抗炎症剤の開発において，SBDD を用いた効率的な創薬を行うことを目的として MK2 とその阻害剤である TEI-I01800 との複合体の構造解析を行った．

その結果，MK2-TEI-I01800 複合体は，kinase に共通に見られる通常 β シート構造を形成している Gly-rich ループが α ヘリックスに構造変化しており，Gly-rich ループの二次構造変化を伴った低分子リガンド複合体構造であることを世界で初めて見出した．この特徴的な構造は既に構造解析されていたアポ体の MK2 においてのみ観察され不活性型構造として認識されていたが，その後の低分子リガンド複合体の解析例において α ヘリックスとなる構造は見出されておらず，構造変化のメカニズムは不明であった．そこで我々は，本構造から得られた情報から TEI-I01800 と Leu70 の間に生じる衝突がトリガーとなり Gly-rich ループが β シートから α ヘリックスに変化する機構を提唱した．

一方、TEI-I01800 は他の kinase に対して強い選択性を示し、MK2 には CDK2 よりも 177 倍強い阻害活性を示す。この選択性の差を考察するために CDK2-TEI-I01800 複合体の構造解析を実施した。CDK2 複合体において、MK2 複合体に見られた Gly-rich ループの二次構造変化は起こっておらず、その構造は他の CDK2-低分子リガンド複合体と同じ β シート型であった。先に解析した MK2 複合体との比較により、CDK2 に結合している TEI-I01800 のコンフォメーションは、MK2 に結合しているものに比べてより平面的な構造であることがわかった。TEI-I01800 のコンフォメーション解析を実施したところ、分子内に生じる立体障害により、TEI-I01800 の安定コンフォメーションは非平面的となり、この構造は MK2 に結合しているものと同様であることがわかった。すなわち、TEI-I01800 は MK2 に対しては安定なコンフォメーションを保ったままで MK2 の構造を変化させて結合し、CDK2 に対しては CDK2 の構造を変化させることができず、自分自身を不安定なコンフォメーションに変化させて結合しているのである。この違いが TEI-I01800 が CDK2 と MK2 に対して選択性を発揮している理由と考えられた。

さらに、MK2 以外に CDK2 をはじめとする種々の kinase に対して阻害活性を持つ TEI-L03090 と MK2 との構造解析も実施した。TEI-L03090 は TEI-I01800 が Leu70 との衝突により引き起こす Gly-rich ループの二次的構造変化に重要な置換基を取り除いた平面構造の化合物であるが、その複合体構造において Gly-rich ループは予想どおり β シートを形成しており、我々が提唱した TEI-I01800 が Leu70 との衝突をトリガーとして構造変化を起こし、その非平面構造が高い選択性を示すメカニズムを強く示唆していた。

蛋白質はそれ自身が機能を発揮するための特徴的な構造を有していることは既に多数の蛋白質の構造が解析されて明らかになっている。一方、その構造は剛体ではなく柔軟性に富み、特に活性化状態においては最大の機能を獲得できるように構造変化を伴って常に変動していると考えられる。したがって蛋白質の阻害剤開発の際には、こうした構造変化を考慮して薬剤設計を行う必要があることは良く知られている。kinase 阻害剤の開発においては ATP ポケットが類似していることから選択性を持たせることが難しいとされているが、本研究では、化合物自身が活性部位の構造を結合に適したポケットへと大きく変化させる現象を見出した。こうした構造変化を利用すれば、ドラッグデザインの可能性は大きく広がることが予想される。一方、タンパク質自身の性質やリガンド構造においては、想定どおりの構造変化を誘導することは困難であり、先に報告した *Pyrococcus hosikosii* OT3 由来 ACCD ホモログタンパク質 (phAHP) においては、アポ構造、基質類似体複合体においてこのようなドラスティックな構造変化を確認することはできなかった。従って、創薬研究においては早期ヒット化合物取得段階で複数のバリエーションに富んだ骨格を持つ化合物を用いて複合体構造解析を行い、その結合モードを確認しながらデザインを実施することが重要である。

以上、本研究においては、低分子リガンドの結合により蛋白質がひとつのアミノ酸側鎖の動きをトリガーとして二次構造変化を起こす現象を明らかにし、induced fit メカニズムを積極的に利用することで、より活性と選択性の高い化合物を取得することができると可能性を見出した。