



Title	苦味を抑える薬の理論設計
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101284
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	ふくながはるな 福永陽奈	学部 学科	薬学部薬学科	学年	2年									
ふりがな 共同 研究者氏名	しらくらかの 白倉花野	学部 学科	薬学部薬学科	学年	2年									
	みきりさこ 三木理紗子		薬学部薬学科		2年									
	わたなべみさき 渡邊美咲		薬学部薬学科		2年									
アドバイザー教員 氏名	福澤薫	所属	薬学研究科											
研究課題名	苦味を抑える薬の理論設計													
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)													
【研究目的】 薬物治療において、特に子供は苦味の強い薬の服用に対して、強く抵抗感を感じる人が多い。そこで、我々は患者の苦痛やアドヒアランスを向上させるために、薬の苦味に対する新たな対処法を開発する研究を進めている。 苦味はヒトの体内に存在する苦味受容体(TAS2R)に対する薬物結合により生じ、その感覚伝達経路に影響を与える。この受容体に関する研究によると、特定のリガンドが結合することで、TAS2R46の結合部位近傍の Tyr241 が変化し、細胞内シグナル伝達プロセスが活性化されることがわかっている。 [1] したがって、我々は”苦味受容体に結合し、かつ苦味受容体と反応を起こさないリガンド化合物が薬の苦味を緩和する”という仮説を設定した。本研究は、苦味受容体 TAS2R の生理学的機能及び計算科学的なアプローチを用いて、薬の苦味を緩和する効果的なアンタゴニストの合理的な設計を行った。														
【研究方法】 ・方法概要 TAS2R46 受容体に対して苦味感受物質(以下 res 化合物と呼ぶ)と非苦味感受化合物(以下 nonres 化合物と呼ぶ)をドッキングさせた。その予測複合体構造に対して FMO 計算を実施して、これらの化合物の結合様式の特徴を同定するために、フラグメント分子軌道法 FMO(Fragment Molecular Orbital)法を用いて IFIE (Inter-Fragment Interaction Energy) 及び PIEDA(Pair Interaction Energy Decomposition Analysis)による相互作用を評価した。 ・受容体構造処理とドッキング計算 AutoDock Vina を用い、PDB に登録されている TAS2R46 のうち、結晶構造再現性が高い受容体 7XP6 をベースとして使用することで Tyr241 のフリップを考慮した。また Tyr241 非フリップ状態である 7XP5 もドッキングと相互作用計算に用い、Tyr241 のフリップの有無によるリガンドと受容体間の相互作用特性を評価した。														

各構造の前処理は MOE2022.02 の Structure Preparation 機能を用い、部分電荷の計算、欠損残基の補完を実施した後、Protonate3D を用いて水素原子を付与した。共結晶リガンドであるストリキニーネの位置を考慮してドッキングサイトを設定した。その後、85 種のリガンドと阪大ライブラリーの化合物をドッキングした。ドッキング条件の検証のために共結晶リガンドであるストリキニーネのリドッキング計算を行い、そのドッキング性能を確認した。

・ FMO 計算の実施と解析

得られた予測結合様式に対して FMO 計算により各構造におけるリガンドと受容体間の IFIE および PIEA を求めた。さらに、これらのより詳細な相互作用を評価するために PIEDA の成分である静電相互作用(ES)、分散相互作用(DI)、電荷移動相互作用(CT+mix)の各成分、及び残基間の近接距離(DIST)を解析した。特に Tyr241 がフリップしている状態の 7XP6 と 26 種類の res 化合物をそれぞれドッキングさせた構造(以降状態①と呼ぶ)と、Tyr241 非フリップ状態の 7XP5 と 59 種類の nonres 化合物をドッキングさせた構造(以降状態②と呼ぶ)で比較し、アゴニスト設計に重要な受容体残基間のネットワークを FMO 計算値や予測構造から推定した。

【結果】

・ 受容体構造の選定について

我々は苦味に関する研究において、そのメカニズムを解明し、効果的な苦味遮断剤や薬物開発を目的としている。特に、口腔内に発現する TAS2R46 という苦味受容体をターゲットとして選択した。

文献調査の結果、TAS2R46 は実験的に構造が確認されており、これはクライオ電子顕微鏡により得られたものである。この受容体は口腔内に発現しており、苦味を感知する。先行研究では、この受容体に苦味をもたらすリガンドが結合すると、Tyr241 残基が 90 度フリップを起こし、これが苦味発生のメカニズムである。

このことから、受容体構造に基づく薬物設計(SBDD)アプローチが可能であると判断された。そこで、私たちは TAS2R46 を研究対象とし、強い結合性を示し、かつ Tyr241 のフリップを抑制する化合物の開発をすることを目標とした。

・ 受容体構造及び既存の苦味に関与するリガンド分子 85 種のモデリング

MOE を用いて、TAS2R46 の結合ポケットの位置と、ストリキニーネと Trp88 との間の π - π 相互作用、またストリキニーネと Glu265 との間に形成されるアミンと水素による静電相互作用などを確認できた。

・ 既知化合物 85 種ドッキング計算及び FMO 計算

実験的に確認されている 85 種の既知リガンド(res 化合物と nonres 化合物の両方)を AutoDock Vina を使って 7XP5 または 7XP6 にドッキングした後、これらの複合体の FMO 計算をスーパーコンピュータ富岳上で実施し、リガンド-受容体相互作用を詳細に分析した。

・ FMO 計算による相互作用解析

参考文献を基に、受容体の残基-リガンド間相互作用を以下の基準を設定した[4]。すなわち、ES 値が -15~-10kcal/mol かつ CT+mix 値が -3kcal/mol 以下の場合に水素結合性相互作用、DI 値が -5kcal/mol 以下の時 π - π 相互作用が形成されているとした。26 種類 res 化合物をドッキングさせた状態①で何%が、59 種類化合物をドッキングさせた状態②で何%が ligand-残基間や残基-残基間で特定の相互作用を形成したかを調べ、状態①、②でどのような相互作用の違いがあるのかを調べていく。

・ 受容体構造のフリップ構造の特徴と水素結合ネットワークの関係性

私たちは当初、Trp88 に着地したリガンドが直接 Tyr241 と相互作用を形成しフリップを誘導する

と予想していた。しかし、研究を進めるうちに結合ポケットと Tyr241 の最近接原子の距離が約 6.7 Å もあることがわかり、強力な相互作用が形成しているとは考えにくいことがわかった。したがって、ポケット近傍の残基を起点とした残基間ネットワークを介してリガンドの結合によるシグナル伝達が Tyr241 に伝わり、フリップを誘導しているのではないかと考え、研究を進めることにした。

【文献1】より、Tyr241 の付近に存在する Phe188 と Tyr271 は立体的に Tyr241 のフリップを阻害する重要な残基であることがわかっている。よって、この2つの残基をネットワークの終点とした。終点の残基の近傍残基 (4.0 Å 以内) から状態①と状態②で結合のエネルギーを比較するために t 検定を行い、有意差があったものを選ぶ。(尚、慣例に則り、p 値がごく小さい場合は $p < 0.001$ と示す。) この操作を繰り返してポケット近傍の残基まで辿り、その残基を起点とした。この検証により、Phe188 ネットワークと Tyr241 ネットワークの2つのネットワークの存在の可能性が示唆された。

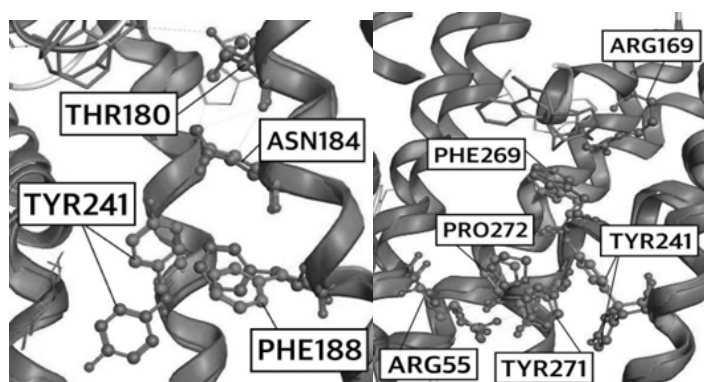


Fig. a) Phe188 ネットワーク Fig. b) Tyr241 ネットワーク

【図1-1】より、Phe188 ネットワークは Thr180 を起点として、Thr180-Asp184-Phe188 で構成されており、Thr180 がリガンドと相互作用を形成することによるコンフォメーション変化が、ネットワーク構成残基に変化可能性が示唆された。

【図1-2】より、Tyr271 ネットワークは Glu265 を起点として、Glu265-F269-Pro272-Arg55-Tyr271 で構成されており、Tyr271 がリガンドと相互作用を形成するによってネットワーク間に変化が起きていることが確認できた。また、7xp5 ではループの一部がリガンド結合ポケットを隠す“蓋”のように存在しており、このループがリガンド結合ポケットを露出したときにリガンドがはまる。このループ中の残基の一つである Arg169 が Tyr241 ネットワーク関わっていることである。ここで注目したいのは、MOE 上で確認したところ、ペプチドが“蓋”をすることで Glu265 が Arg169 を避けるために Ser248 の方向に移動していることが確認できたことである。

当該ネットワークを構成する残基には Phe や Tyr などの芳香性残基が多く π 電子が関与する結合が多い事が推定されたことから、上記の内容についてより詳しく解析するために、分散力を精密に評価可能である FMO 計算を適用する事とした。

Phe188 ネットワークについて

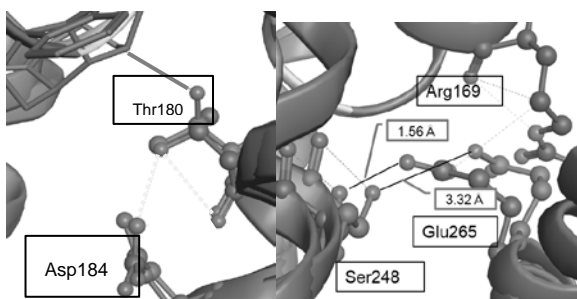


Fig.(c)Thr180-Asp184 Fig.(d)T-stacking 灰色の残基が 7xp6、橙色の残基が 7xp6 リガンドはストリキニーネ

Thr180-Asp184 間($p < 0.001$)の相互作用に着目すると、状態②では 80.4%の化合物で Thr180 の側鎖にあるヒドロキシ基が Asp184 のアミノ基と水素結合 ($E_{\text{Save}} = -15.3 \text{ kcal/mol}$ 、 $CT + \text{mixave} = -2.91 \text{ kcal/mol}$)を形成しており、リガンドとの相互作用($IFIE_{\text{ave}} = -1.76 \text{ kcal/mol}$)は微弱なものであることが確認された。一方で、状態①では Thr180 のヒドロキシ基がリガンドと相互作用($IFIE_{\text{ave}} = -4.50 \text{ kcal/mol}$)を形成することにより、Thr180-Asp184 間の水素結合が切断、または結合強度の減弱が考えられる。実際、状態②では上記のように ES 値や $CT + \text{mix}$ 値であるのに対し、状態①では $E_{\text{Save}} = -5.70 \text{ kcal/mol}$ 、 $CT + \text{mixave} = -0.739 \text{ kcal/mol}$ となっており、結合強度が極端に小さくなっていることが確認されている。この変化に伴い、Asp184 の空間的位置が変化し、その影響が波及することで Phe188 の位置も Tyr241 から見て外側に 0.98 \AA 分、つまりベンゼン環 0.7 個分変化することが確認された。次に、Phe188-Tyr241 間($P < 0.0376$)の相互作用を解析すると、状態①ではすべての res 化合物で π -H 相互作用($DI_{\text{ave}} = -5.25 \text{ kcal/mol}$)が形成されており、特に Phe188 と Tyr241 の間では T 型スタッキングという安定した π - π 相互作用が確認された。実際に、状態①のフラグメント間最短距離は 2.34 \AA であり、この数字は T 型スタッキングが形成されたときの理論値である 2.5 \AA に非常に近い数字となっていた。よって、この T 型スタッキングは、Tyr241 がフリップした際に顕著に形成され、残基のふらつきが抑えられることで Phe188 が安定な構造をとることが予想される。一方、状態②では Phe188-Tyr241 間で特定の相互作用($IFIE_{\text{ave}} = -2.47 \text{ kcal/mol}$)は確認されなかった。状態①と状態②を比較すると、相互作用の強度や安定性に大きな差が見られた。

Phe188 ネットワークと Tyr241 のフリップについてさらに詳しく見ると、フリップ前の状態では前述の通り Thr180-Asp184 間の水素結合が形成されているため、Phe188 が立体的に Tyr241 のフリップを阻害する位置に存在している【文献 1】。しかし、リガンド（特に res 化合物）が Thr180 のヒドロキシ基と相互作用することで、Thr180-Asp184 間の水素結合が切断され、Asp184 および Phe188 の空間的位置が変化する。この結果、Phe188 は Tyr241 から見て外側に 0.98 \AA 分、つまりベンゼン環 0.7 個分遠い位置に移動し、Tyr241 のフリップを誘導するような位置に再配置される。

以上の解析結果をまとめると、Phe188 ネットワークはリガンドの結合状態に応じてその相互作用が変化し、これが Tyr241 のフリップに重要な影響を及ぼしていることが示唆された。具体的には、状態②では Thr180-Asp184 の水素結合によって Phe188 が Tyr241 のフリップを阻害する。一方、状態①ではリガンドの結合による Thr180-Asp184 間水素結合の切断が Phe188 の位置変化を引き起こし、Tyr241 のフリップを促進する相互作用モデルが示唆された。

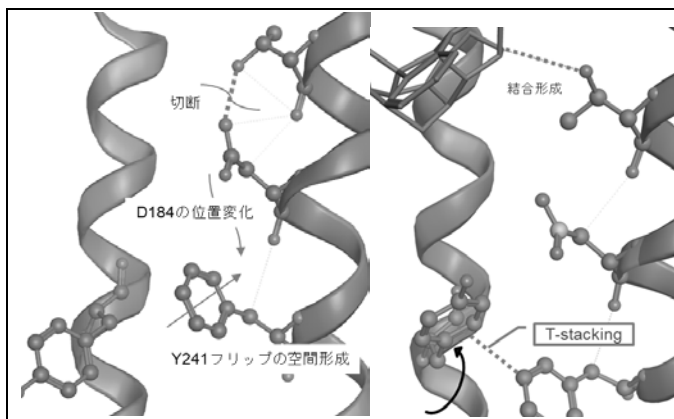


Fig.(e)Thr188 ネットワークフリップ前 Fig.(f)Thr188 ネットワークフリップ後

Tyr241 ネットワークについて

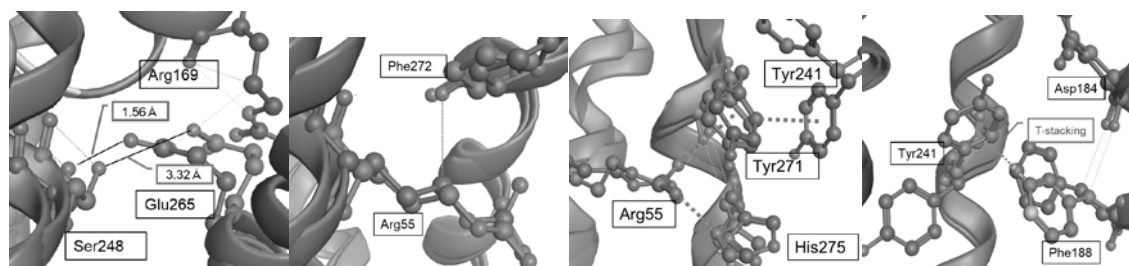


Fig.(g)Arg169-Glu265

Fig.(h)Glu265-Phe269

Fig.(i)Pro272-Arg55

Fig.(j)Tyr241 ネットワーク

まず、状態②に特有の“蓋”のようなループ残基の一部である Arg169 と Glu265 の関係を確認した。Arg169-Glu265 間ではかなり強力な相互作用が形成されており ($IFIE_{ave} = -90.3 \text{ kcal/mol}$)、23.9%の化合物が水素結合 ($ESave = -88.0 \text{ kcal/mol}$ 、 $CT\text{-}mixave = -5.25 \text{ kcal/mol}$) を形成し、全ての化合物で $\pi - \pi$ 相互作用が形成されていた ($DI_{ave} = -6.74 \text{ kcal/mol}$)。さらに Glu265 の空間的位置について、Ser248 の位置を絶対的な場所とし Glu265-Ser248 間のフラグメント間最短距離を調べたところ、状態①では 3.32 \AA 、状態②では 1.56 \AA となっており、約 2 倍の差がある。この結果から、Arg169 によって状態①と状態②における Glu265 の空間的位置の差が生じていることが確認できた。

ligand-Glu265 の相互作用に関する解析では、状態①において 69.2%の化合物で水素結合が形成され ($ESave = 0.692 \text{ kcal/mol}$ 、 $CT\text{-}mixave = -3.75 \text{ kcal/mol}$)、53.8%の化合物で $\pi - \pi$ 相互作用が確認された ($DI_{ave} = -4.45 \text{ kcal/mol}$)。一方、状態②では 91.7%の化合物で水素結合が形成され ($ESave = -27.0 \text{ kcal/mol}$ 、 $CT\text{-}mixave = -6.94 \text{ kcal/mol}$)、全ての化合物で $\pi - \pi$ 相互作用が形成されている ($DI_{ave} = -10.3 \text{ kcal/mol}$) ことが分かった。この結果から、res 化合物と nonres 化合物の間で明確な相違を断定するのは難しいものの、少なくとも nonres 化合物は高確率で Glu265 と安定した水素結合や $\pi - \pi$ 相互作用を形成することが示された。この ligand-Glu265 間で起こる挙動は、Glu265 と強力な相互作用を形成する Arg169 と類似している可能性が示唆される。

Glu265-Phe269 間 ($p < 0.001$) については、状態① ($IFIE_{ave} = -18.2 \text{ kcal/mol}$) と状態② ($IFIE_{ave} = -10.2 \text{ kcal/mol}$) の間で結合の強さや種類に大きな違いは見られなかったが、リガンドが結合することで Glu265 の位置が変化 (Ser248 から 1.73 \AA 離れる) し、それに連動して Phe269 が Glu265 によって Pro272 方向へ 0.914 \AA 移動する挙動が FMO 計算の結果から予想された。さらに、この変化が Pro272 にも影響を及ぼし、Phe269 に押される形で Pro272 が 0.368 \AA 分下向きに変位することが考えられる。Pro272-Arg55 間 ($p < 0.001$) の相互作用では、状態①では水素結合が形成されていない ($ESave = -$

11.1kcal/mol、CT+mixave=-1.92kcal/mol)のに対し、状態②では Pro272-Arg55 間で 97.8%の化合物で水素結合が形成される割合が高いことが確認された (ESave=-18.3kcal/mol、CT+mixave=-4.13kcal/mol)。また、nonres 化合物では、状態②では IFIE_{ave} 値が-19.3kcal/mol、残基間距離が 1.83 Å で標準偏差が 0.0821 と安定性が高い結合が形成されていることがわかった。

His275-Arg55 間(p<0.001)の相互作用に関しては、状態①では全ての化合物で水素結合 (ESave=-30.4kcal/mol、CT+mixave=-4.85kcal/mol)と π - π 相互作用(DI_{ave}=-6.04kcal/mol)が確認された。一方、状態②では 23.9%の確率で水素結合 (ESave=-10.7kcal/mol、CT+mixave=-2.37kcal/mol)と π - π 相互作用(DI_{ave}=-3.85kcal/mol)が同時に形成されていることが確認された。残基の側鎖と位置関係を考慮すると、状態①では Arg55 の側鎖にある 2つのアミノ基が H275 の側鎖イミダゾール環の窒素と水素結合を形成し、状態②では特定の相互作用は形成していないと考えられる。

Arg55-Tyr271 間(p<0.001)では、状態①では全ての化合物で水素結合や π -H 相互作用が形成されていない (ESave=-9.52kcal/mol、CT+mixave=-1.56kcal/mol、DI_{ave}=3.80kcal/mol)のに対し、状態②では 34.8%で水素結合が、37.0%の割合で π - π 相互作用が形成されていた (ESave=-15.0kcal/mol、CT+mixave=-2.57kcal/mol、DI_{ave}=-4.56kcal/mol)。さらに、残基の側鎖と位置関係を考慮すると、状態②では Arg55 の主鎖のアミノ基が Tyr271 の側鎖のベンゼン環と水素結合や π - π 相互作用を形成していると考えられる。

Tyr271-Tyr241 間(p<0.001)では、状態①で 11.5%の化合物で π - π 相互作用(DI_{ave}=-4.29kcal/mol)が確認された一方、状態②では全ての化合物において π -H 相互作用(DI_{ave}=-10.3kcal/mol)が形成されていることが分かった。残基の側鎖と位置関係を考慮すると、状態②で Arg55 の主鎖アミノ基が Tyr271 の側鎖ベンゼン環と相互作用を形成していると考えられる。

以上をまとめると、Tyr271 ネットワークではフリップ前後で以下のような相互作用の変化が予想される。リガンドが結合していない状態では、Arg55 と Tyr271 間に水素結合や π - π 相互作用が形成され、安定した構造を保っている。この際、Tyr271 は Tyr241 のフリップを阻害する役割を果たす。一方で、res 化合物が結合すると Glu265 の位置が変化し、“蓋”であるループが外れることで F269-Pro272-Arg55-His275 の、空間的な配置が変化する。この変化により Pro272 と Arg55 間で水素結合が形成され、Arg55 と H275 間では 2 本の水素結合が形成される。その結果、Arg55 と Tyr271 間で形成されていた水素結合や π - π 相互作用が切断され、Tyr271 は Tyr241 から外側に移動することで Tyr241 のフリップが可能となることが示唆された。

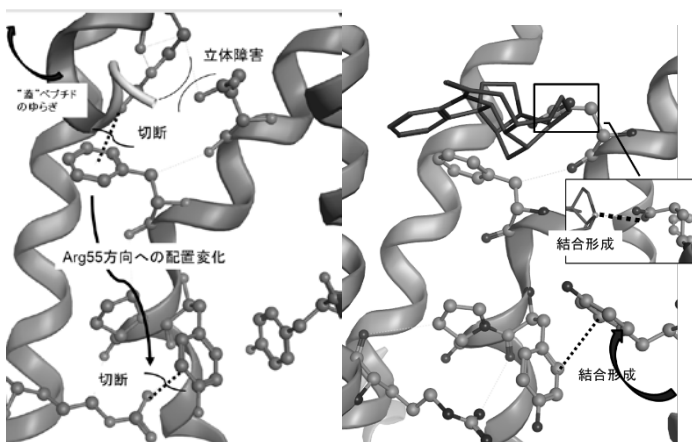


Fig.(k)Tyr241 ネットワークフリップ前

Fig.(l)Tyr241 ネットワークフリップ後

【考察】

アンタゴニスト設計において、今回の結果より提案できる設計方針を以下にまとめる。まず、1 つ目

の条件として、リガンドが Thr180 と水素結合を形成せず、Thr180-Asp184 間の水素結合を安定化させる構造を持つことが重要である。このために、リガンドの立体構造を調整し、Thr180 のヒドロキシ基に直接接触しない疎水性基や立体的にかさばる基を導入することが考えられる。また、Thr180-Asp184 間の水素結合を補助する機能性基をリガンドに設計することで、結合の安定性をさらに向上させることが可能である。2 つ目の条件として、Asp169 のアミノ基の性質を模倣し、Glu265 を Ser248 方向に誘導する構造が必要である。これに対して、D169 の役割を模倣する官能基として、グアニジノ基やアンモニウム基など、アミノ基よりも強い水素結合形成能を持つ官能基をリガンドに取り入れることが有効だと考えられる。また、Glu265 との相互作用を強化することで、Phe188 ネットワークをより安定化させ、Tyr241 のフリップ阻害効果を高めることも考慮される。

【今後の展望】

選定した化合物に見られる傾向をもとに、Alvadesc を用いて苦味受容体のアンタゴニストとして適した化合物をデザインする。

また、デザインした化合物と、阪大化合物ライブラリからスクリーニングして得られた苦味を抑える化合物として有力な構造を持つ化合物に加え、文献に記載されていた 85 個の内数個を参考として苦味評価を評価する。

【参考文献】

[1]Xu, W.; et al. Structural Basis for Strychnine Activation of Human Bitter Taste Receptor TAS2R46. *Science* 2022, 377 (6612), 1298–1304.

[2]Maehashi, K.; et al. Bitter Peptides Activate hTAS2Rs, the Human Bitter Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 365 (4), 851–855.

[3]杉村博之.”分子間相互作用入門”.京都大学大学院.2009.

<https://www.nsa.mtl.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2014/05/Intermolecular-interaction.pdf>

(参照 2024-12-10)

[3]Daisuke T. FMO DB: The World's First Database of Quantum Mechanical Calculations for Biomacromolecules Based on the Fragment Molecular Orbital Method. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2021, CC-BY-NC-ND 4.0 .

【謝辞】

ドッキング計算及び FMO 計算はスーパーコンピュータ富岳（課題番号: hp240162）の計算資源を用いて行った。