



Title	Structural Study of Novel Macrocyclic Inhibitors of Elastases
Author(s)	仲西, 功
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42953">https://hdl.handle.net/11094/42953</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	仲 西 功
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 0 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 12 月 9 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Structural Study of Novel Macrocyclic Inhibitors of Elastases (新規大環状エラスターゼ阻害剤の構造化学的研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 株 祐 次 (副査) 教 授 大 森 秀 信    教 授 小 林 資 正    教 授 高 木 達 也

## 論 文 内 容 の 要 旨

セリンプロテアーゼは、その構造と機能について最も良く研究されているプロテアーゼの一つであり、動・植物から微生物に至るまで広く分布し、生命の維持・進展に重要な役割を果たしている。ヒト好中球が生産するエラスターゼ (HLE: Human Leukocyte Elastase) は、セリンプロテアーゼの一種で極めて強力な蛋白質分解作用を有し、細菌や異物の食作用に関与している。また、エラスチンを含む弾性繊維やコラーゲン、プロテオグリカン、ラミニン、フィブロネクチン等のさまざまな細胞外マトリックス等にも基質特異性を示す。HLE は通常、生体内阻害剤である  $\alpha 1$ -プロテアーゼ・インヒビターや  $\alpha 2$ -マクログロブリンなどによりその活性が抑制されているが、炎症局所ではこれら阻害剤は好中球が放出する他の酵素や活性酸素等により不活化され、本来の作用を発揮するようになる。しかし、炎症の場が広がり好中球の活性化が大量に起こるようになると、その領域にある生体側の局所細胞や組織も HLE の攻撃を受けるようになる。その結果、エラスチンをはじめとする HLE に特異性のある細胞外マトリックスを多く有する組織が破壊され、炎症性の疾患、例えば肺気腫や成人呼吸促迫症候群、肺炎、リウマチ等を惹起すると考えられている。従って、HLE 阻害剤を創出することは臨床上極めて意義が深く、世界中の多くの研究者により探索研究がなされている。

FR901277 と FR134043 は、放線菌 (*Streptomyces resistomicificus*) の培養濾過液から単離された天然物及びその半合成ジスルホン酸ナトリウム誘導体である。その化学構造はアミノ酸分析や MS、NMR などのスペクトル解析により決定され、4 個の通常アミノ酸と 3 個の異常アミノ酸、そしてイソプロピルカルボニル基を N 末端に有するユニークな二環性大環状ペプチド化合物である。両化合物ともに強い HLE 阻害活性を有し、また、エラスターゼ以外のセリンプロテアーゼには高い選択性を示す。しかしながらこれらの化合物は、薬物分子としての溶解性や大きさ (分子量) 等いくつか改善すべき項目が考えられた。これらをリード化合物として創薬研究を進めていく上で問題となるのは、どこをどのように修飾すべきかの判断が非常に難しいことである。なぜなら、天然物由来の化合物であるため合成上の問題があるうえ、阻害活性に重要な酵素との相互作用を考えるのに、その立体構造を容易にイメージできないということもあるからである。一方で、これらの分子構造をもとに新規骨格を有するより低分子量の化合物をデザインす

ることも可能であると考えられる。これらのデザインを効率良く実施するためには、阻害剤分子の立体構造のみならず、酵素との複合体構造を得ることが不可欠であると考えられる。そこで、申請者らはできるだけ素早く阻害剤及び複合体の構造情報をメディシナルケミストに提供すべく、以下に示す様々な方法でこれら化合物の構造、及び酵素との複合体構造を決定あるいは推定した。

まず最初に NMR 測定と SA 計算による FR134043 分子の溶液中での立体構造解析を行った。化学構造決定の段階では両化合物とも AA(4) と AA(6) 残基の C $\alpha$  原子および AA(4) 残基の C $\delta$  原子の絶対配置を決定することは不可能であったため、これらの絶対配置を含めた溶液構造を決定した。その結果分子内のすべてのアミノ酸は L 配置であり、AA(4) 残基の C $\delta$  原子の絶対配置は R であることがわかった。また N 末端を含めた疎水性のアミノ酸側鎖は、分子の外側に位置していた。複数の絶対配置が不明な不斉原子を持つ天然の構造解析に NMR 測定と SA 計算による解析法が有効であることを示すことができた。

次に FR901277 の単結晶が得られたため、その構造解析を行い、決定した構造を用いて HLE への結合シミュレーションを計算化学的手法により行った。その結果 FR901277 の結晶構造は FR134043 の溶液構造に非常に似ており、また 2 環性の大環状骨格は分子内水素結合や CH/ $\pi$  相互作用により安定化されていることが明らかとなった。一方 HLE への結合シミュレーションにより、疎水性のアミノ酸側鎖が HLE の疎水性の結合ポケットにうまくフィットする合理的な結合モードを示すことができた。

最後に、HLE に最もよく似た活性部位構造を有する PPE (Porcine Pancreatic Elastase) と FR901277 との複合体結晶構造解析を行った。その結果 FR901277 分子はその疎水性の原子団を用いて、PPE の S4 から S2' 結合部位までの疎水性ポケットを連続的に占有しながら結合していた。その結合モードは、S4 部位を除いて先にシミュレーションを行った HLE への結合モードと非常に似ており、計算化学的なシミュレーションの妥当性を示せた。最も興味のある PPE の S1 認識ポケットには FR901277 のエチリデン基が結合していた。その際 PPE の Ser-195 残基の  $\beta$  位の水素原子とエチリデン基が CH/ $\pi$  相互作用していた。セリンプロテアーゼの S1 ポケットのリガンド認識に CH/ $\pi$  相互作用が関与していた例はこれまでに無いものである。

解析した三つの構造を重ね合わせると、これら阻害剤分子の 2 環性大環状骨格はかなり堅固な構造であるが、分子が置かれる環境により微妙にその構造を変化させることが明らかとなった。

今回の一連の研究を通し、FR901277 及び FR134043 分子の構造的特徴が明らかとなり、標的酵素との結合状態に関する情報を得ることができた。この情報は、これらの化合物の改良研究やこれらの化合物をもとにした新規骨格を持つエラスターゼ阻害剤の探索研究に重要な役割を果たすと思われる。また、この研究を通し、天然物由来の複雑な骨格を持つ天然物からの創薬研究において、構造化学的・計算化学的手法が様々な局面において有効利用できることを示せたと考える。

## 論文審査の結果の要旨

仲西功君は放線菌 (*Streptomyces resistomicificus*) の培養濾過液から単離された二環性大環状ペプチド化合物で、ヒト好中球が産出するエラスターゼ (HLE ; Human Leukocyte Elastase) の阻害作用を示す FR901277 とその半合成ジスルホン酸ナトリウム誘導体である FR134043 を取り上げ、医薬としての HLE 阻害剤の設計を目指して、それらの立体構造解析を行った。まず NMR により FR134043 の主鎖、側鎖の絶対配置を含めた溶液構造を解析し、次に FR901277 の結晶構造解析を行った。得られた構造情報を用いて HLE への結合シミュレーションを計算化学的手法により行った。最後に HLE と似た活性部位を持つ PPE (Porcine Pancreatic Elastase) と FR901277 との複合体結晶構造解析を行った。この一連の系統だった構造解析より、酵素と阻害剤の結合様式を詳細に検討でき、これらの天然の化合物から得た情報が新規医薬品の設計に貢献することが期待される。さらにこの一連の研究戦略は他の SBDD (Structure-Based Drug Design) のひとつ指針を与えるものと考えられ、本研究は学位に値するものと認める。