



Title	構造情報からの創薬を目指した機能性人工蛋白質の構造活性相関に関する研究
Author(s)	向, 洋平
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57946">https://hdl.handle.net/11094/57946</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">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	むかい とうへい
博士の専攻分野の名称	博士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 23463 号
学位 授 与 年 月 日	平成 22 年 2 月 23 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	構造情報からの創薬を目指した機能性人工蛋白質の構造活性相関に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中川 晋作
	(副査) 教 授 宇野 公之 教 授 堤 康央 准教授 大久保忠恭

### 論文内容の要旨

周知の通り、一般に、新薬の誕生までには、数百～数千億円もの莫大な経費と十数年以上もの長期間を要することが殆どである。また、2008年3月現在の新薬誕生の成功確率は20,000分の1と、極めて低いことが知られている。これは、現存の創薬研究の多くが、標的とする病態・蛋白質の情報が乏しい中、膨大な化学物質ライブラリから医薬品シーズを宝探し的にスクリーニングするという、極めて非効率的な手法によって行われることに起因している。さらには、新薬開発のための多くの臨床研究が、薬事法などの公的な規制によって慎重かつ長期間に渡り実施されることをも考慮に入れると、前臨床段階において創薬プロセスをより合理化し優れた医薬品候補を絞り込むことが、新薬誕生の確率の向上、さらには、開発期間及びコストの軽減に極めて重要であるものと考えられている。このような合理的な創薬プロセスを実践するポストゲノム創薬として、疾患関連蛋白質の構造情報(バイオインフォマティクス)の有効活用によって医薬品を分子設計しようとする「構造情報からの創薬」の躍進に注目が集まっている。

しかし、このような「構造情報からの創薬」において、広い結合面積を有するリガンド-レセプター結合を認識できる低分子阻害薬を設計することは困難を極め、現在の標的の多くは、元来低分子基質と結合する酵素蛋白質に限定されてしまっている。それに加え、サイトカインなどの創薬標的の多くは、多種類のレセプターに結合し、多様な *in vivo* 生理作用を有することが知られており、安全かつ有効性を確保するためには、特定のレセプターへの選択性を導入せねばならないといった、さらに高度な阻害剤設計が必要となってくる。従って、このような次世代型阻害剤の合理設計を実現するためには、従来までのように、1つの複合体の構造からの分子設計では限界があり、特定の蛋白質に焦点を絞り、複数の複合体構造、あるいは、様々な機能性人工蛋白質(ミュータント)の構造情報を取り揃えることによる、バイオインフォマティクスの確度向上が必要不可欠であると考えられる。

以上の観点から本論文では、「構造情報からの創薬」を推進するために有用な情報収集をキーワードとし、炎症性サイトカインとして知られる創薬標的蛋白質TNFに焦点を絞った構造学の基礎研究を実施した。第一に、TNFが結合する2種のレセプターの内、未だ構造が明らかとされていない、Type II受容体(TNFR2)との複合体構造を解明した。その結果、既に構造が明らかとなっているType I受容体(TNFR1)とTNFR2の構造の詳細を比較することで、受容体選択性の阻害剤設計のための構造差異を見出した。また、今回明らかにしたTNF-TNFR2複合体構造と、過去に解明されたTNF-TNFRスーパーファミリーの複合体構造の構造学的特徴にヒントを得、細胞表面でのTNF-TNFR2複合体がいくつものクラスターを形成する、超分子複合体の存在を明らかとした。これら知見は、未だ謎に包まれているTNF-TNFRスーパーファミリーのシグナル伝達開始機構に必須な構造変化であるものと考えられ、これまでの阻害剤とは別の角度からの阻害剤設計を可能にするものであった。

次に、これらサイトカイン受容体の複合体構造情報から、ドラッグデザインに有益な情報を収集するための方法論として、ファージ表面提示法による網羅的な人工TNFの創製を通じ、そのTNFの変異とそれに伴う構造変化、さらにはレセプター結合様式に与える影響などについて一挙に解析可能な手法を提唱した。本手法からは、TNFR1選択性を発揮するための構造情報、アンタゴニスト活性を発揮しうる構造情報といった、TNF-TNFR複合体構造のみでは得られない新規の知見を多数得ることに成功しており、複合体構造情報とそれらに対する分子標的治療薬開発の架け橋となり得る基盤技術として、今後の構造情報からの創薬の推進に重要な役割を担うものと期待できる。

現在、抗体医薬やサイトカイン医薬など蛋白性医薬品の台頭が目覚ましく、様々な分子に結合する分子が医薬品シーズとして注目を集めている。しかしながら、全ての蛋白性医薬品に共通するコスト面の問題が課題として残されており、現在多くの研究者により、それらの低分子化、低コスト化が実施されている。そのうえ、昨今のバイオ医薬の薬害問題の頻発を背景に、社会的に、安全・安心に対するニーズが高まり、有効性だけでなく、高度な安全性も強く求められている。そのような社会的背景を鑑みても、今回の複合体構造及び機能性人工蛋白質の構造情報を応用した構造情報からの創薬が実施できれば、近未来的に必須の技術となるであろう、ペプチド、低分子化合物による蛋白質機能のレギュレーションが実現できるものと期待できる。今後は、本研究成果が、現在進展著しいバイオインフォマティクスと密に連携してゆくことにより、次世代型の「構造情報からの創薬」の進展の一助となることを期待したい。

#### 論文審査の結果の要旨

近年の国家プロジェクトであるタンパク3000プロジェクトなどによって、「構造情報からの創薬」の基幹を成す蛋白質の3次元構造が数多く解明され、「構造情報からの創薬」を推進するための準備は整ったかに見えた。しかしながら、2010年を迎えた現在となっても、依然として、このような創薬の標的は、チロシンキナーゼを中心とした酵素蛋白質などに限定されてしまっており、疾患関連蛋白質として極めて重要なサイトカイン受容体や、他の膜受容体などへの展開は、大きく制限されてしまっているのが現状である。この原因として、①構造決定が困難とされる膜蛋白質やこれらとリガンドなどとの複合体の3次元構造情報が決定的に不足していること、②低分子化合物の結合ポケットを有する酵素蛋白質に比べ、広い面積での相互作用する蛋白質-蛋白質間相互作用に基づいて機能発現する受容体蛋白質に対する阻害剤をデザインすることが困難であることなどが挙げられる。

本博士論文では、これらの問題点を踏まえたうえで、構造情報からの創薬を推進するための技術として、X線結晶構造解析とファージ表面提示法を融合的に展開する手法の有用性を検証してきた。その応用例としてTNF-TNFR相互作用に着目することで、以下の結論を得た。

1. 新規構造であるTNFR2、ならびにTNF-TNFR2の複合体の結晶構造を世界に先駆けて明らかとした。
2. TNF-TNFR2複合体とLT- $\alpha$ -TNFR1複合体の結晶構造からTNFR1選択性の阻害剤の開発に有効な創薬標的部位を見出した。
3. 細胞表面でのTNF-TNFR2ネットワークの形成を検出し、シグナル伝達開始機構に関する仮説を提唱した。
4. 変異TNF提示ファージライブリから、TNF-TNFR相互作用に関する配列と活性の相関情報を網羅的に収集し、TNFR1選択性の阻害剤の開発のためのリード分子としてのTNFR1選択性変異TNFを複数単離した。
5. 最もTNFR1選択性に優れていたR1-6に関してX線結晶構造解析にてその構造を決定し、レセプター選択性に重要な構造を見出した<sup>44</sup>。また、アンタゴニスト活性を有するTNF-RiantTNF-T8のX線結晶構造解析によりその構造を決定し、アンタゴニスト活性発揮が、レセプター結合の保持時間による可能性を示した。

以上、本論文は、TNF-TNFR2、ならびに独自に創製したTNF変異体の構造を解明するなど、TNFに対する創薬研

究を推進するための多くのシーズを見出した。この一連の技術は、複合体構造情報とそれらに対する分子標的治療薬開発の架け橋となり得る基盤技術として位置付けられ、今後の「構造情報からの創薬」の推進に不可欠な役割を担うものと期待でき、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考える。