

論文内容要旨

TAMRA/TAMRA 複合体形成を利用した 亜鉛酵素阻害剤の親和性解析

主指導教員：小池 透 教授

(医系科学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：木下 英司 准教授

(医系科学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：熊谷 孝則 准教授

(医系科学研究科 微生物医薬品開発学)

草本 寛

(医歯薬保健学研究科 薬科学専攻)

【序論】

酵素は、酸化還元反応、転移反応、加水分解反応、脱離反応、異性化反応、化学結合形成の6つに大別される化学反応の生体触媒（オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ）である。また、酵素には金属イオンを活性発現に利用するものがあり、それらは金属酵素と呼ばれている。亜鉛(II)イオンを必須因子とする亜鉛酵素は、上記6種類の酵素群すべてに存在している。それら亜鉛酵素に保持された4~5配位の亜鉛イオンは、水溶液中の亜鉛(II)水和イオン（6~7配位）よりも強いLewis酸としての性質をもち、活性中心に取り込まれた基質分子の分極を高めて、酵素反応を促進している。酵素に保持された亜鉛イオンは、生態系では常に2+の酸化状態が維持されているため、基質が酵素に捕捉された場合でも酸化数の変化を伴う電子の授受は行わない。現在、亜鉛酵素の機能を抑制する阻害剤（錯体医薬の一種）は、利尿薬、降圧薬、向精神薬、嫌酒薬、緑内障治療薬として使用されている。それら亜鉛酵素阻害剤の化学構造のデザインは、亜鉛酵素反応の阻害定数など分子全体のマクロ的な化学データや既知の低分子亜鉛錯体の安定性順位などを基礎として進められてきた。本研究では、Lewis酸性度の高い亜鉛イオンと金属配位性酵素阻害剤（低分子リガンド）の相互作用をより簡便に比較検討することを目的として、亜鉛酵素の活性中心モデルである亜鉛サイクレン（ZnL：Lewis酸性度の高い4配位亜鉛錯体）誘導体と低分子リガンドの親和性順位や配位結合の強さを検討する簡便な分析手法を開発した。

【実験方法】

カルボキシテトラメチルローダミン（TAMRA）のNHSエステルとアミノ基を持つサイクレン誘導体をCHCl₃中で縮合反応させた後、アミノシリカゲルを担体としたカラムクロマトグラフィで精製し、TAMRAをもつ4座配位子（L：TAMRA-cyclen）を合成した。TAMRA-cyclenの水溶液に1当量の塩化亜鉛を加えて亜鉛サイクレン誘導体（TAMRA-ZnL）を調製した。受託合成したTAMRA標識システイン（TAMRA-Cys）とTAMRA-ZnLを用いて、モル分率に依存した吸光度変化をpH 7.4の水溶液中、25°C、0.10 M NaClの条件下で測定し、1：1 TAMRA/TAMRA複合体の安定度定数： K [M⁻¹]を決定した。さらに、同条件下で阻害剤（HA）を添加する競合実験を行い、阻害剤結合型亜鉛酵素モデル：TAMRA-ZnL-Aの安定度定数を検討した。

【結果と考察】

TAMRA-ZnLとTAMRA-Cysが生理pHの水溶液中で1：1複合体を形成すると、TAMRAの吸収極大波長が低波長側に大きく移動した。この変化は2つのTAMRA基の近接によるものであり、それを利用してTAMRA-ZnLに対するTAMRA-Cysの親和性定数（ $4.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ）を決定した。システイン、グルタチオン、カプトプリル（ACE阻害剤）などチオール基含有リガンドの結合定数は、 $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。一方、スルホンアミド系リガンドのアセタゾラミド（利尿薬）とカルボン酸系亜鉛酵素阻害剤のエナラプリラト（ACE阻害剤）は、チオール化

化合物に比べ顕著に低い $1/10 \sim 1/100$ の親和性を示した。フリーのチオール化合物は、水溶液中で一部が酸解離型のチオラート型になり、溶存酸素によりジスルフィドやスルフィン酸に酸化される。pH 7.4 の水溶液中では、TAMRA-Cys は 24 時間後には 62% がジスルフィド体へ酸化された。一方、溶液に過剰の亜鉛サイクレンを添加しておくこと、TAMRA-Cys のジスルフィド体の割合は、24 時間後でも 17% に抑えられた。この事実は、チオラートの強い亜鉛配位結合 ($RS-ZnL$) はイオン性が小さく共有結合性が大きいこと、すなわちチオラートの電荷は亜鉛イオンに強く引きつけられていることを示している。

【結論】

以上、本研究では、亜鉛酵素モデルに対する低分子リガンド (阻害剤部分骨格) の親和性を検討する簡便な分光分析法を開発した。TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の複合体の形成反応を利用して、亜鉛酵素阻害剤などの他のリガンドの結合定数を決定することができる。配位性官能基の中では、カルボン酸 < スルホンアミド < チオールの順に亜鉛に対する親和性が高いことが明らかとなった。一般的に、酵素阻害剤には 10^6 M^{-1} より強い酵素親和性 (解離定数 $K_d < 10^{-6} \text{ M}$) が必要である。したがって、実用的な亜鉛酵素阻害剤の化学構造のデザインでは、亜鉛配位結合以外の分子間相互作用 (疎水性相互作用や水素結合など) を持つ官能基の導入の検討が必要である。本研究成果は、亜鉛酵素の亜鉛イオンとリガンドとの配位結合を利用した次世代の錯体医薬のデザイン開発に役立つ化学情報を提供するものである。