

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬科学）	氏名	草 本 寛
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当		
論文題目			
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			
論文審査担当者			
主 査	教 授	松 浪 勝 義	印
審査委員	教 授	熊 本 卓 哉	
審査委員	准教授	山 野 幸 子	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>酵素は，酸化還元反応，転移反応，加水分解，脱離反応，異性化反応，化学結合形成の6種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）よりも強いルイス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，生体系では常に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，ルイス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：ルイス酸性度の高い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。</p> <p>赤紫色のテトラメチルローダミン（TAMRA）を結合した亜鉛サイクレン（TAMRA-ZnL）とアミノ基をTAMRAでラベル化したシステイン（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。この波長変化は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（<math>4.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}</math>）を決定した。さらにTAMRA-ZnLに競合的に配位結合する低分子リガンドを</p>			

このTAMRA/TAMRA複合体系に添加した時の吸光度の変化から、TAMRA-ZnLに対する各種リガンドの親和性定数を決定した。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、チオール化合物に比べ顕著に低い $1/10 \sim 1/100$ の親和性を示した。また、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、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（ $\text{RS}^- \text{-ZnL}$ ）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。

以上、本研究では、亜鉛酵素モデルに対する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  $10^6 \text{ M}^{-1}$  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。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬科学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。