

シッフ塩基金属錯体によるトリプシン活性阻害機構

居弥口大介

Inhibition Mechanism of Trypsin by Schiff Base Metal Chelate Inhibitors

Daisuke IYAGUCHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido,
1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

(Received May 26, 2011)

Studies on trypsin-specific compounds are useful for the design of clinically useful compounds. It is well known that several benzamidine derivatives are potent competitive inhibitors of trypsin and trypsin-like enzymes. Many kinds of Schiff base metal chelate containing either amidine or guanidine have been synthesized and their inhibitory activities against trypsin have been characterized. Recently, the interactions of the Schiff base metal chelate inhibitors with trypsin enzyme have been determined by X-ray crystal structure analysis. The structural information and inhibitory activity data for amidine- and guanidine-containing Schiff base metal chelate inhibitors provide new avenues for designing novel inhibitors against physiologically important trypsin-like serine proteases.

Key words—trypsin; inhibitor; Schiff base metal chelate; crystal structure

1. はじめに

セリンプロテアーゼの1つであるトリプシンは基質特異性が高く、その触媒機能及び結晶構造なども詳細に解明されていることから、ドラッグデザインのモデルタンパク質として好都合である。また、血液凝固、線溶、血圧調節などの生理機能において重要な役割を担うトロンビン、プラスミン、カリクレイン、ウロキナーゼなどはトリプシンと類似の基質認識及び活性機構をもっており、トリプシン様酵素とも呼ばれている。このため、トリプシン阻害剤の開発は、汎用的な酵素阻害剤開発手法の基盤づくりに役立つとともに、消化器疾患、血栓症、止血治療薬などの医薬品開発にも直接的につながる重要なテーマである。

2. トリプシン阻害剤

トリプシンの阻害剤を開発するための標的となる部位は、大きく分けて活性部位、基質認識部位、及びカルシウム結合部位の3カ所が挙げられる (Fig.

1)。トリプシンに結合しているカルシウムは、主にトリプシンの構造安定化に寄与していると考えられており、基質認識及び酵素活性に対して直接的には影響を与えない。また、カルシウム結合部位はトリプシン様酵素群の中で完全には保存されておらず、

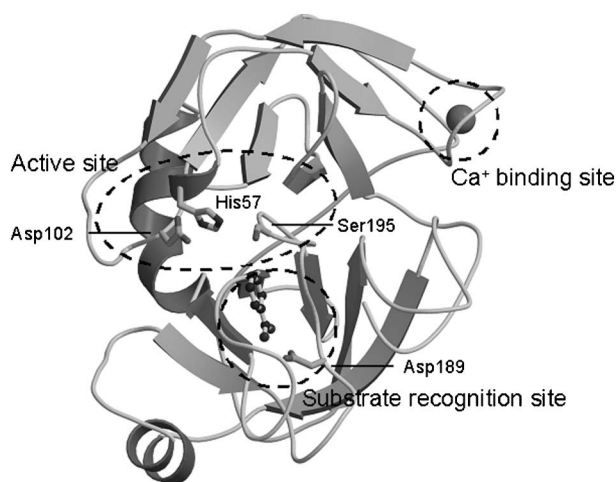


Fig. 1. Overall Structure of Bovine Trypsin Complexed with Benzamidine

Three residues His57, Asp102, and Ser195 in the active site, forming the catalytic triad, are shown. Ser195 is the most important residue in the active site because the hydroxyl of Ser195 performs a nucleophilic attack on the substrate amide bond in the first reaction step. Substrate recognition residue Asp189 is also shown.

北海道医療大学薬学部 (〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757)

e-mail: iyaguchi@hoku-iryu-u.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

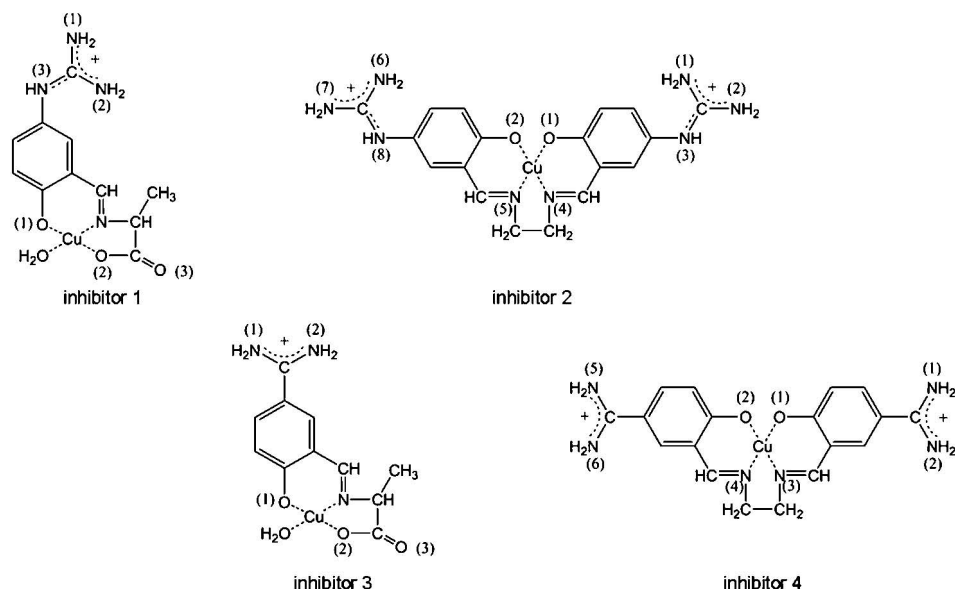


Fig. 2. Chemical Structures for the Inhibitors

Inhibitor 1: *m*-guanidinosalicylidene-*L*-alaninato (aqua) copper (II) hydrochloride, inhibitor 2: [*N,N'*-bis(*m*-guanidinosalicylidene) ethylenediaminato] copper (II), inhibitor 3: *m*-amidinosalicylidene-*L*-alaninato (aqua) copper (II) hydrochloride, inhibitor 4: [*N,N'*-bis(*m*-amidinosalicylidene) ethylenediaminato] copper (II).

阻害剤開発の標的としては利用し難い。

トリプシンの基質認識部位は 189 番目のアスパラギン酸を中心に形成されており、トリプシン様酵素の 1 つであるトロンビンも含め、主にこのアスパラギン酸を標的とした阻害剤開発が行われている経緯がある。特にベンズアミジンやアルギニンをその一部として含む阻害剤が合成され、阻害効果が検討されている。¹⁻⁶⁾

3. シッフ塩基金属錯体によるトリプシン様酵素の阻害

ベンズアミジンやフェニルグアニジンの誘導体を用いた多様な陽イオン性の分子が合成され、これらの阻害効果が確認される中、⁷⁻⁹⁾ サリチルアルデヒドが α -アミノ酸、金属と非常に安定なシッフ塩基金属錯体を形成することを利用して、アミノ基あるいはグアニジノ基を含む多種多様なシッフ塩基金属錯体が合成され、これらのトリプシンあるいはトロンビンに対する阻害活性が確認された。¹⁰⁻¹³⁾ 使用するアミノ酸の種類、金属の種類、アミノ基又はグアニジノ基の選択、そして異性体も含め、数百種類のシッフ塩基金属錯体が系統的に合成され、そしてトリプシンあるいはトロンビンに対する阻害定数が決定された。

シッフ塩基金属錯体の構造の違いにより、阻害活性の強さは非常に広範囲に分布し、 10^{-5} M から

10^{-8} M の阻害定数を有することが明らかになっている。また、トロンビンとトリプシンとは高阻害活性を与える阻害剤の構造的特徴が異なることから、酵素の基質結合ポケットの性質及び形状に合わせたシッフ塩基金属錯体阻害剤の選択が可能になると考えられた。¹⁰⁻¹³⁾

4. シッフ塩基金属錯体によるトリプシン阻害

ターゲットとなる酵素を特異的に阻害するシッフ塩基金属錯体を設計するためには、シッフ塩基金属錯体による酵素阻害メカニズム及びこれらの阻害剤の構造と阻害活性との相関を明らかにする必要がある。このため、構造的特徴の異なる 4 種類のシッフ塩基金属錯体が合成され、トリプシンに対する阻害活性の強さが比較された。¹⁴⁾

Figure 2 に、これら 4 種類のシッフ塩基金属錯体の構造を示す。阻害剤 1 と阻害剤 2 はグアニジノ基をもつ阻害剤であり、一方、阻害剤 3 と阻害剤 4 はアミノ基をもつ阻害剤である。また、阻害剤 2 と阻害剤 4 はシッフ塩基を 2 つ含む構造的特徴がある。



居弥口大介

北海道医療大学薬学部・講師。北海道大学理学部卒業、北海道大学大学院理学研究科博士後期課程修了。2006 年北海道医療大学・助手。2009 年より現職。専門：構造生物学。

4種類の阻害剤について、それぞれトリプシンに対する阻害定数 (K_i) を測定したところ、アミノ基をもつ阻害剤の阻害定数は、対応するグアニジノ基をもつ阻害剤と比較して (阻害剤1に対して阻害剤3, 阻害剤2に対して阻害剤4) およそ10分の1の値を示した。すなわち、アミノ基をもつ阻害剤はグアニジノ基をもつ阻害剤よりも阻害活性が大きいことが明らかになった。さらに、2つの Schiff 塩基をもつ阻害剤2及び阻害剤4の方が、Schiff 塩基をもつ阻害剤1及び阻害剤3よりも阻害活性が強いことも明らかになった (Table 1)。

5. Schiff 塩基銅錯体のトリプシン阻害メカニズム

4種類の Schiff 塩基銅錯体について、トリプシン阻害活性の違いを構造学的に明らかにするため、これら4種類の阻害剤とトリプシンとの複合体の結晶

構造がそれぞれ解析された。^{14,15)} 各阻害剤とトリプシン間に形成されている相互作用について、結合距離を Table 2 に示している。

Figure 3 は、阻害剤1とトリプシンとの結合 [Fig. 3(A)] 及び阻害剤3とトリプシンとの結合 [Fig. 3(B)] を示している。これにより、Schiff 塩基構造を1つだけもつ阻害剤について、グアニジノ基とアミノ基のトリプシン結合における相互作用の違いが明らかになる。どちらの阻害剤の場合も、基質認識残基であるアスパラギン酸189及び活性残基であるヒスチジン57と結合している。しかしながら、グアニジノ基をもつ阻害剤1の方がアミノ基をもつ阻害剤2よりも分子の長さが長く、その影響によりトリプシンとの相互作用に変化が生じている。一般的に、ベンズアミジン誘導体を用いた阻害剤の場合、最も重要な結合は基質認識残基である Asp189 及びその周辺にある Gly219, Ser190 とアミノ基との間で形成される静電相互作用を含む4本の結合であることが知られている。アミノ基を含む阻害剤3の場合は、このような基本の結合様式が維持されているが [Fig. 3(B)], 一方、グアニジノ基を含む阻害剤1ではこの基本構造が崩壊している [Fig. 3(A)]. しかしながら、分子が長くなった影

Table 1. Inhibition Constants of the Inhibitors for Trypsin-catalyzed Hydrolysis of Benzoyl-L-arginine *p*-Nitroanilide

Guanidine-based inhibitors	K_i (M)	Amidine-based inhibitors	K_i (M)
inhibitor 1	3.1×10^{-5}	inhibitor 3	2.8×10^{-6}
inhibitor 2	9.0×10^{-6}	inhibitor 4	2.4×10^{-7}

Table 2. Hydrogen Bonds and Coordination Bond Distances

	Distance (Å)			
	Inhibitor 1 ^a	Inhibitor 2 ^b	Inhibitor 3 ^c	Inhibitor 4 ^d
Ser195 O ^γ -SB ^e O1	2.3	2.7	2.6	
Ser195 O ^γ -Cu				2.6
His57 N ^{ε2} -Cu	2.3		3.1	
His57 N ^{ε2} -SB O2		3.1		3.0
Ser214 O-Water1	2.8	3.0	2.8	
Water1-Cu	2.8		2.4	
Asp189 O ^{β2} -SB N1	2.8	2.9	3.1	2.9
Asp189 O ^{β1} -SB N2			3.0	
Ser190 O-SB N1		3.0		
Ser190 O ^γ -SB N1			2.8	3.1
Ser190 O ^γ -SB N3		3.2		
Ser190 O ^γ -Water2	2.2	2.8		
Val226 O-Water2		3.1		
Trp215 O-Water2		3.1		
Water2-SB N1	2.3			
Water2-SB N3	2.4	3.2		
Gly219 O-SB N1	3.2			
Gly219 O-SB N2	2.4	2.8	2.8	1.9

^a PDB code 3AAC, ^b PDB code 3AAU, ^c PDB code 1G3D, ^d PDB code 3AAV, ^e SB, Schiff base.

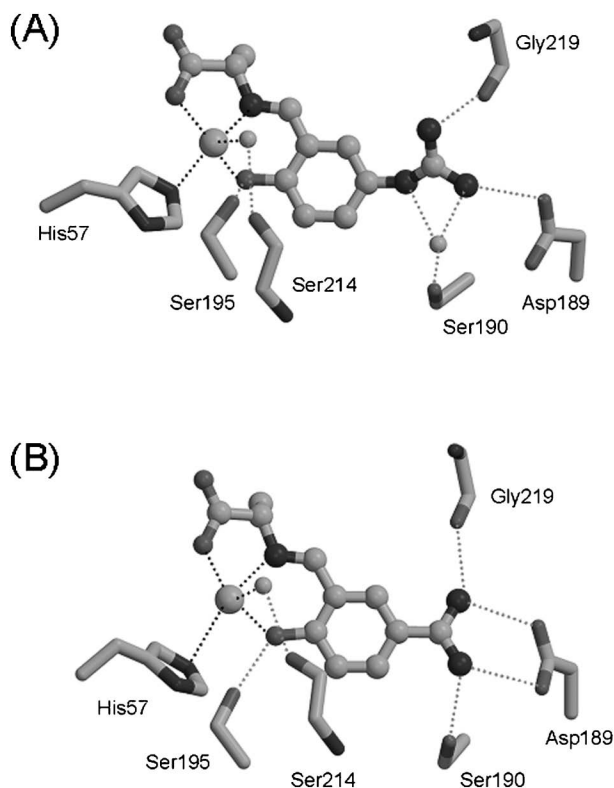


Fig. 3. Detailed View of the Interactions between Inhibitor (1, 3) and Trypsin

(A) Trypsin-inhibitor 1 complex. (B) Trypsin-inhibitor 3 complex. Hydrogen bonds and coordination bonds are indicated as dashed lines. Water molecules and the copper(II) ion are shown as small and large spheres, respectively. Residue numbers are labeled.

響により阻害剤とトリプシンの活性部位との距離が近くなり、銅原子と His57 の結合距離 (2.3 Å) が、阻害剤 3 とトリプシンの相互作用における結合距離 (3.1 Å) に比べて短く、強い結合が得られている。このことから、分子をさらに長くすることによって、189 番のアスパラギン酸との結合様式を維持しながら活性残基とも強い結合をもつ、より阻害活性の強い分子が得られる可能性がある。

Figure 4 は、阻害剤 2 とトリプシンとの結合 [Fig. 4(A)] 及び阻害剤 4 とトリプシンとの結合 [Fig. 4(B)] を示している。これにより、シッフ塩基構造を 2 つもつ阻害剤について、グアニジノ基とアミノ基のトリプシン結合における相互作用の違いが明らかになる。いずれの阻害剤の場合も、シッフ塩基が 2 つになったことにより、57 番目のヒスチジンは銅原子ではなく酸素原子と結合するようになっている。しかしながら、基質認識残基である Asp189 との結合では両者に違いがみられた。アミ

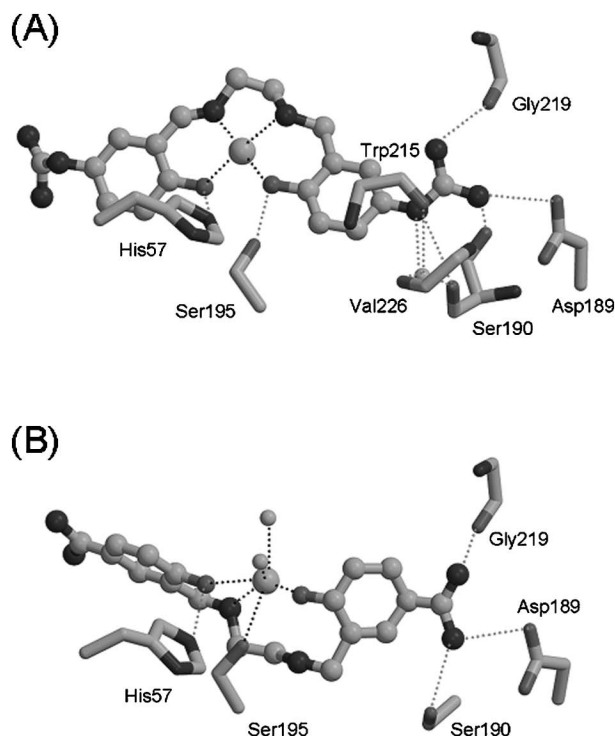


Fig. 4. Detailed View of the Interactions between Inhibitor (2, 4) and Trypsin

(A) Trypsin-inhibitor 2 complex. (B) Trypsin-inhibitor 4 complex. Hydrogen bonds and coordination bonds are indicated as dashed lines. Water molecules and the copper(II) ion are shown as small and large spheres, respectively. Residue numbers are labeled.

ジノ基をもつ阻害剤 4 では、上述した Asp189 を含む 4 本の基本の結合様式をある程度維持しているが [Fig. 4(B)], 一方、グアニジノ基をもつ阻害剤 2 ではこのような結合様式が崩壊している [Fig. 4(A)]. さらに阻害剤 4 では、他の阻害剤ではみられない特徴的な構造変化が生じている。いずれの阻害剤も銅原子を中心とした八面体構造をとるが、しかしながら阻害剤 4 はトリプシンと結合することにより、この配位構造が大きく歪んでいる [Fig. 4(B)]. そしてこの構造変化の影響により、最も中心的な活性残基である 195 番目のセリンが銅原子と結合することが可能となっている。このことが、4 種類の阻害剤の中で阻害剤 4 が最も強い阻害活性をもっている理由となっている可能性が考えられる。

以上のことから、Asp189, Gly219, Ser190 との間で形成される結合様式を維持するとともに、活性残基である Ser195 との相互作用を可能とする阻害剤設計が高親和性阻害剤の創出に有効であること、また、これを達成するために分子の長さの微調整が効果を上げる可能性があることが明らかになった。さ

らに、これらの結晶構造を利用することにより、このような条件を満たす阻害剤設計が可能になる。

6. おわりに

生体内で重要な役割を担っているセリンプロテアーゼは非常に多い。特にその中でもトリプシン様セリンプロテアーゼは基質特異性も比較的高く、阻害剤開発において非常に重要なターゲットとなっている。阻害剤開発においては高い親和性ととも高い特異性が重要であるといわれているが、そのような阻害剤を開発する上で構造を基盤とした分子設計は非常に役立つ手法である。今後、アラニン以外のアミノ酸を含む阻害剤との複合体構造も決定することで、さらに阻害剤とトリプシンとの相互作用に関する構造情報が蓄積され、より高い親和性かつ特異性をもったトリプシン様プロテアーゼの設計が可能になると考えられる。

謝辞 本総説で紹介した研究は、北海道医療大学・薬学部・薬品物理化学教室において行われたものであり、終始多くのご鞭撻を賜りました豊田栄子教授を始め、研究室の皆様に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、ご協力頂きました北海道大学・先端生命科学研究院・X線構造生物学研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ni-nomiya K., Maruyama A., Sugano M., Tamao Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 440–446 (1981).
- Stürzebecher J., Prasa D., Hauptmann J., Vieweg H., Wikström P., *J. Med. Chem.*, **40**, 3091–3099 (1997).
- Wagner J., Kallen J., Ehrhardt C., Evenou J.-P., Wagner D., *J. Med. Chem.*, **41**, 3664–3674 (1998).
- Steinmetzer T., Renatus M., Künzel S., Eichinger A., Bode W., Wikström P., Hauptmann J., Stürzebecher J., *Eur. J. Biochem.*, **265**, 598–605 (1999).
- Hauel N. H., Nar H., Priepke H., Ries U., Stassen J.-M., Wiene W., *J. Med. Chem.*, **45**, 1757–1766 (2002).
- Lee K., Park C. W., Jung W.-H., Park H. D., Lee S. H., Chung K. H., Park S. K., Kwon O. H., Kang M., Park D.-H., Lee S. K., Kim E. E., Yoon S. K., Kim A., *J. Med. Chem.*, **46**, 3612–3622 (2003).
- Mares-Guia M., Shaw E., *J. Biol. Chem.*, **240**, 1579–1585 (1965).
- Mares-Guia M., Shaw E., Cohen W., *J. Biol. Chem.*, **242**, 5777–5781 (1967).
- Mares-Guia M., Shaw E., *J. Biol. Chem.*, **242**, 5782–5788 (1967).
- Toyota E., Chinen C., Sekizaki H., Itoh K., Tanizawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1104–1106 (1996).
- Toyota E., Miyazaki H., Itoh K., Sekizaki H., Tanizawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 116–119 (1999).
- Toyota E., Sekizaki H., Itoh K., Tanizawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 625–629 (2003).
- Toyota E., Sekizaki H., Takahashi Y. U., Itoh K., Tanizawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 22–26 (2005).
- Iyaguchi D., Kawano S., Takada K., Toyota E., *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 2076–2080 (2010).
- Toyota E., Ng K. K., Kuninaga S., Sekizaki H., Itoh K., Tanizawa K., James M. N., *J. Mol. Biol.*, **324**, 391–397 (2002).