

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 構造に基づいた水チャネルアクアポリン4とその阻害剤の研究

氏名 亀川 亜希子

論文内容の要旨

哺乳類の脳において水チャネルアクアポリン-4 (AQP4) は、細胞内外の浸透圧差に従って水を移動させ、脳内の水バランスを調節して脳の恒常性維持を担っている。とりわけ血管周囲を取り巻くアストロサイトのエンドフィート部分や、温度や浸透圧のセンサーとして機能する視床下部等で多く発現しており、様々な脳疾患や脳損傷に伴う脳浮腫の病態に関与していることも知られてきている。最近では自己免疫疾患である視神経脊髄炎 (NMO) 患者の血清中に抗 AQP4 抗体が検出され病原性が疑われている。また、AQP4 ノックアウトマウスにおいては水中毒や脳虚血、髄膜炎に伴う細胞障害性脳浮腫の発症が抑制されることが報告されていることから、AQP4 選択的な水透過阻害剤に関する研究に期待が集まりはじめている。当研究室を含めた複数の先行実験から、炭酸脱水酵素阻害剤であるアセタゾラミド (AZA) が非常に低いアフィニティではあるものの AQP4 の水透過を阻害することが明らかになってきた。しかし、AZA の AQP4 に対する相互作用機序を含め不明な点が多い。本研究では、AQP4 と阻害剤である AZA との複合体の立体構造を原子分解能で解析することによって、水透過阻害機構の詳細を明らかにすることで、創薬開発における重要な情報を得ることを目的とした。

AZA の AQP4 に対する水透過阻害に関しては、阻害効果がないという報告もあり論争に決着はついていない。そこで AZA が AQP4 の種に依存して阻害効果が異なる可能性を仮定し、ストップフロー法によりラットあるいはヒト AQP4 を含むプロテオリポソームの水透過を測定し AZA に対する阻害影響を調べた。その結果、AZA はラット AQP4 の水透過を阻害するが、ヒト AQP4 の水透過を阻害できないことが明らかとなった。そこでヒトとラットのアミノ酸配列の違いに着目し、異なるアミノ酸残基の変異体を作製し水透過阻害活性測定を行なうことで、AZA が水透過を阻害するために必要なアミノ酸残基を特定できた。この結果から、AQP4 と阻害剤 AZA との複合体

構造を決定する際には、ラット野生型 AQP4 を用いることが最適であることがわかった。

AQP4 の水透過阻害に最適な化合物探索における手がかりを得るために、極低温電子顕微鏡を用いてラット AQP4 と AZA の複合体の共結晶二次元結晶の電子顕微鏡像を収集し 5 Å分解能での構造解析を行った。AQP4 の立体構造に大きな変化は認められなかったが、細胞外側のチャンネルポア付近に AZA に相当する密度を確認することができ、ドッキングシミュレーションの計算結果からも AZA 結合部位であることが支持された。しかし、この分解能では AQP4 と AZA の相互作用を原子レベルで明らかにするには至らなかった。

次に AQP4 と AZA の結合様式をより詳細に知る為に構造解析の分解能向上を目指し、電子顕微鏡像と電子回折図形を同じ結晶から収集することで、位相と振幅の三次元的なデータを集めた。この解析によって 3 Å分解能の構造を得ることができ、5 Å分解能での構造解析で認められたほぼ同じ位置に AZA 由来の密度を観察することができ、相互作用しうるアミノ酸残基を特定できたが、AZA のコンフォメーションを特定することができなかつたため、より高い分解能情報が必要であることが示唆された。

創薬開発における化合物設計において、相互作用様式が原子レベルで明らかであることは極めて重要であるため、分解能の向上を目指してコンストラクトから結晶化条件に至るまで再検討を行った。様々な検討実験の結果、アミノ末端のヒスチジンタグから AQP4 までのリンカー部分の長さを短くすることによって分解能を向上させることに成功し、非傾斜試料の回折パターンからは 2.4 Å分解能を超える反射点も確認することができ、最終的に 2.8 Å分解能での立体構造解析が可能となった。得られた密度図から、AQP4 に結合した状態の AZA のコンフォメーションを決定することができた。結合時の AZA は、水溶液中での最も安定なコンフォメーションと異なり一部歪みが生じていてエネルギー的に不安定であり、AQP4 と AZA との結合力を弱める原因の 1 つであることがわかった。また、AZA のチアジアゾール環にメチル基が結合したメタゾラミド(MZA)の場合、AQP4 の水透過阻害能が見られないことは、得られた複合体構造の結合様式からうまく説明できた。

本研究で得られた情報を用いることで、より正確なドッキングシミュレーションを用いた化合物探索や、活性や安全性向上を目指した化合物の構造改変を行うことが可能となる。これまで経験や運や勘で行われていた創薬とは異なり、構造に指南された創薬(Structural Guided Drug Development, SGDD) に資する情報の一端を提供することができ、三次元構造に基づいた創薬探索を加速することが期待される。