

氏 名（本 籍）	おお やま たか ひろ 大 山 貴 央（千葉県）
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	乙第 19 号
学位授与の日付	2018 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	チロシナーゼ活性制御化合物の構造的特性と 制御機構の解明

論 文 審 査 委 員      （主査）教授 内海 文彰  
教授 内呂 拓実      教授 樋上 賀一  
嘱託教授 田沼 靖一      准教授 秋本 和憲

## 論文内容の要旨

チロシナーゼはメラニン生合成の鍵となる酵素であり、活性中心に 2 つの銅原子を含む。チロシナーゼは、モノフェノラーゼ活性とジフェノラーゼ活性の 2 つの反応を触媒している。モノフェノラーゼ活性は、モノフェノール(L-チロシン)のオルト位の酸化の過程を経てオルトキノン(ドパキノン)に変換する。ジフェノラーゼ活性は、オルトジフェノールを酸化してオルトキノンに変換する。生成されたオルトキノンは生理的条件化では自然に酸化され、その酸化物が重合して黒色の高分子であるメラニンとなる。チロシナーゼは、放線菌からヒトまで自然界に広く存在しており、皮膚や網膜の黒化、食品の褐変などに関わっている。このことから、チロシナーゼの阻害剤は、化粧品、医薬品、農業、食品流通という様々な観点から求められてきた。特に、美白は古くから日本人女性の目指す美の一形態であり、チロシナーゼ阻害剤は美白作用を持つ素材として開発が行われている。一方、欧米人の中には肌の色を黒くすることが健康の指標となるという思いから、チロシナーゼの活性化剤が求められている。これまでに、天然化合物または新規合成化合物の中から数多くのチロシナーゼ阻害剤が見出されてきたが、いずれにおいても系統立てて活性を評価し、その作用機序まで究明しているものは少ない。よって、どのような化合物の構造がチロシナーゼ阻害剤として適正であるのか、また、その阻害機序に関してチロシナーゼ活性中心における構造的な洞察もほとんど行われていないのが現状である。さらに、活性化作用を持つ化合物がごく少数報告されているが、これらの活性化機序についても不明な点

が多く残されている。その理由の1つとして、チロシナーゼが3種類の構造(*deoxy*-型、*oxy*-型、*met*-型)を取りうる点にあると考えられる。モノフェノラーゼ活性においては、活性中心に酸素分子が配位した *oxy*-型酵素が L-チロシンを酸化し、最終的に酸素分子を失った *deoxy*-型となる。*deoxy*-型酵素は水溶液中の酸素を捕捉し、再び *oxy*-型となる。ジフェノラーゼ活性では、*oxy*-型酵素が L-DOPA を酸化する過程で1つの酸素原子を失い、活性中心に1つの水酸化物イオンを含む *met*-型酵素となる。*met*-型酵素は L-DOPA の酸化活性のみを有し、その過程で残っていた酸素を失い *deoxy*-型となる。阻害剤を評価した論文において、これら3種類の構造を区別して議論しているものはほとんどない。もう1つの理由は、チロシナーゼの種間相同性が低いことであると考えられる。既存のチロシナーゼ阻害剤の多くは、マッシュルームチロシナーゼを用いて評価されているが、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼとの配列相同性は約23%と低いため、ヒトへの美白剤の適用という観点から問題を生じている。また、ヒトチロシナーゼのX線結晶構造は現在のところ得られていないため、その活性中心の構造学的な理解が遅れているのも事実である。本研究では、酵素反応速度論及びコンピュータシミュレーション解析を用いて、マッシュルームチロシナーゼ及びヒトチロシナーゼの活性中心の構造と阻害剤及び活性化剤の作用メカニズムについて明らかにし、両者を比較することで、ヒトに対して適用可能なチロシナーゼ活性制御化合物の探索、及び制御機序を解明することを目的とした(第1章)。

これまでの研究から、チロシナーゼ活性阻害作用に重要な構造的特徴として、活性中心に配位する銅原子に作用できる官能基とそれに続く $\pi$ 電子系が重要な構造として挙げられている。そこで、第2章では、基本的な阻害剤構造である安息香酸を選択し、それにフェニル基を付加した新評価化合物：「フェニル安息香酸(phenylbenzoic acid : PBA)の異性体」について酵素反応速度論的及び立体構造的解析を行った。その結果、最も阻害能の強い異性体として 3-PBA を見出し、3-PBA と相互作用する可能性のあるマッシュルームチロシナーゼのアミノ酸残基として Asn260 を同定した。3-PBA のカルボキシ基は、エステル化により活性が消失したことから、阻害活性に重要であることが判明した。次に、基質である L-チロシンがパラ位にヒドロキシ基を持つことに着目し、PBA 異性体の 4'-位にヒドロキシ基を持つ化合物及びそのメチルエステル化体について同様に評価したが、3-PBA よりも強い活性をもつ化合物は見られなかった。一方で、4'-ヒドロキシ化及び4'-メトキシ化した 4-PBA の阻害活性が増強された。4'-ヒドロキシ化 4-PBA と 4'-メトキシ化 4-PBA の *in silico* ドッキングスタディの結果も併せ、カルボキシ基及びヒドロキシ基が重要構造(ヘッド構造)であることが明らかとなった。4-PBA 類縁体の場合には、Phe264 との T 型  $\pi$ - $\pi$ 相互作用とそれを支持する Arg268 が新たに重要であることが示唆された。また、側鎖構造部分が相互作用しうるアミノ酸残基として Val248 を見出した。

次に、第3章では、これらの化合物がモノフェノラーゼ活性とジフェノラーゼ活性の

どちらの活性をより強く阻害するのかを解析する指標として、 $R \text{ 値} = \log[\text{Substrate}]IC_{50}$  を定義した。既知阻害剤であるコウジ酸の活性値を用いたところ、 $R$  値と酵素ユニットに線形相関のあることが判明した。また、本研究で評価したフェニル安息香酸誘導体の阻害活性からも、モノフェノラーゼ活性阻害活性の  $R$  値とジフェノラーゼ活性阻害活性のそれとの間に線形相関が見出された。このことから、両活性に対する  $IC_{50}$  を比較解析することが可能となり、その差を *Index* とした。これにより、*Index* の大小でモノフェノラーゼ活性とジフェノラーゼ活性の阻害に対する寄与度を評価することができるようになった。これらの化合物の見かけの阻害様式は、競合もしくは非競合阻害様式であった。モノフェノラーゼ活性を単純化したモデルから、*met*-型酵素や *deoxy*-型酵素に競合阻害様式で結合した場合、見かけ上非競合モデルとなることを示し、*Index* と組み合わせることで、フェニル安息香酸誘導体が *oxy*、*deoxy*、*met*-型のどの型を阻害するのかを理論的に推察することを可能とした。

マッシュルームチロシナーゼにおいて、基質結合部位への結合が予測されるにもかかわらず、活性化作用を示す化合物が、フェニル安息香酸誘導体の中にもあることを見出した(第4章)。特に、強いジフェノラーゼ活性化作用を持つ化合物、化合物 5・2 はそれ自身が代謝を受けることが示され、そのことが活性化作用に重要である可能性を示唆した。また、*Index* を活性化化合物にも適用し、活性化化合物を 2 種類に分類した。*in silico* 解析より、マッシュルームチロシナーゼの活性中心の Asn260、Arg268 との水素結合が活性化作用に関与していることが予測された。

次に、第 5 章では、ヒトチロシナーゼの活性中心において、阻害剤との相互作用に関わる構造学的な洞察を行うことを目的とし、PBA 異性体及び対照化合物として、コウジ酸及び  $\beta$ 、 $\gamma$ -ツヤプリシンのヒトチロシナーゼに対する阻害能を調べた。ヒトメラノーマ細胞株 G-361 から抽出したメラノソーム系を用いた解析により、マッシュルームチロシナーゼで阻害作用を示した 4-PBA がヒトチロシナーゼでは阻害作用を示さないことが判明した。3-PBA やコウジ酸では阻害能はみられたが、マッシュルームチロシナーゼに対する阻害活性よりも減弱した。一方で、 $\beta$ 、 $\gamma$ -ツヤプリシンは大きく活性を減弱させることはなかった。次に、ヒトチロシナーゼの活性中心に対するこれらの化合物の結合様式について解析した。ヒトチロシナーゼの X 線回折構造は未だ得られていないため、ホモロジーモデリングの手法を用いて、ヒトチロシナーゼの 3 次元立体構造を構築した。マッシュルームチロシナーゼで基質の保持に重要な Val283 は、Val377 として保存されていた。*in silico* ドッキングスタディにより、マッシュルームチロシナーゼで 3-PBA との相互作用に重要であると考えられた Asn260 は、Asn364 として保存されていたが、空間的な位置が離れており、ヒトチロシナーゼでは相互作用が減弱した。このことが、3-PBA の阻害活性低下の原因であると考えられる。一方で、 $\beta$ 、 $\gamma$ -ツヤプリシンは構造的に大きな反発を示さなかった。これらの

ことから、マッシュルームチロシナーゼを用いて得られた知見のうち、ヒトに応用できる部分は限られることが示唆される。これらのことから、本研究で作成したヒトチロシナーゼホモロジーモデルの有用性が示されるとともに、美白剤の評価をヒトメラノソーム抽出系を用いて行うことの重要性が示唆される。

本研究により、低分子化合物を用いてマッシュルームチロシナーゼ活性を正または負に制御するための新たな構造学的知見を得ることができた。一方で、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼでは構造が大きく異なり、要求される阻害剤の構造も異なることも明確となった。コンピュータシミュレーションを用いた *in silico* 手法は、ヒトチロシナーゼ活性を制御する化合物の相互作用解析に極めて有用であり、さらに、メラノソーム系を用いた制御化合物の評価実験をそこに紐付けていくことが、ヒトチロシナーゼに適用可能な阻害剤及び活性化剤の効率的な探索及び分子設計に貢献するものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

皮膚の色調は、美容的観点だけでなく疾患が体表面へ表れるシグナルでもある。自らの望む容姿を得られることは、精神衛生上の安定をも促す。その色調を決定する鍵となる酵素がチロシナーゼであり、本論文では、その制御メカニズムについて深く考察がなされている。まず、序論では背景知識、2~4 章でマッシュルームチロシナーゼの活性中心の構造と活性の関連性を明らかにした後、ヒトチロシナーゼ分子構造を *in silico* 創薬手法を応用したモデリングに基づいて示すことに成功し、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼの酵素活性中心の三次元的な違いについても明確に示されている。

序論では、チロシナーゼの構造などの背景について述べられているとともに、これまでのチロシナーゼ研究の問題点が指摘されている。チロシナーゼは、皮膚の色調の制御において鍵となる酵素であるため、これまではその阻害剤の探索が中心的に進められてきたが、安価で簡便であることなどを理由にほとんどマッシュルームチロシナーゼを用いた方法によりなされてきた。マッシュルームとヒトのチロシナーゼの配列相同性は約 23%ということは示されているが、ヒト酵素のアッセイでは、細胞生物学的なアプローチがメインで、ヒトチロシナーゼの構造に関する報告はほとんどなされていない。ヒトチロシナーゼの酵素活性中心を示し、阻害剤との相互作用に重要なアミノ酸を明らかにすることは、ヒトにおける阻害剤の創製研究のために必須である。本序論では、生物種の異なる 2 つのチロシナーゼの構造と機能における違いについて詳しく解説した。

第 2 章では、極めて単純ではあるが重要な物質、フェニル安息香酸 (PBA) 誘導体を用いて阻害剤の構造として重要なユニットが考察されている。9 種の誘導体の阻害能評価と *in silico* ドッキングポーズの比較解析からカルボン酸またはフェノール基の重要性を



指摘するとともに、阻害作用に重要なアミノ酸として Asn260、Phe264、Ar268、Val248 が見出された。これらのアミノ酸のなかには既に関与が報告されているものもあるものの、本章ではさらにその立体的な位置関係の推測にまで発展させている点が重要である。

第 3 章では、第 2 章で得られた阻害能のデータセットに基づいて作用メカニズムが議論されている。これまで、多くの阻害剤と同様、PBA 類縁体カイネティックス解析から見いだされた阻害剤は非競合阻害様式を示すものが多かった。そのような阻害様式は一般にアロステリック阻害と考えられているが、本論文ではコンピュータ上でのポケット部位の探索を実施し、独自の近似計算方法によって反応基質が活性中心に対して結合しながらも非競合阻害様式を呈する可能性を指摘している点に新規性あるいは独創性が認められる。この問題に複雑性を与えているのはチロシナーゼが活性中心の銅イオンと酸素原子の状態の変化に依存して 3 つの異なる状態を持つということである。これまでの阻害剤の結合フォームの推定では、この 3 者は区別されていなかった。本章では、その 3 つの状態を別個のものとして取り扱い、阻害剤がどの状態におけるフォームに結合すると、見かけ上どのような阻害様式が得られるかについて考察されている。さらにチロシナーゼの反応の複雑性は、L-チロシンと L-DOPA の両者とも基質として代謝することができる点にも関係している。それぞれを基質とした酵素活性はモノフェノラーゼ活性およびジフェノラーゼ活性として別個に扱われている。これらを包括的に解決するために、本章では両活性に相関性を見出し、両者を結びつけた Index 値を使って、阻害剤を Type O、Type M、Type D の 3 種類に分類した。チロシナーゼ阻害剤はこれまで系統的にまとめられていないので、この分類法は重要な意味を持つ。

第 4 章では、低分子化合物によるチロシナーゼ活性化の考察がなされている。これまでもチロシナーゼを活性化する物質は得られているが、アロステリック部位が決定されていないため、その活性化メカニズムは正確に解明されているわけではない。本章では PBA 誘導体のいくつかに活性化作用物質を見出した。第 3 章で述べられている Index 値とチロシナーゼの 3 つの異なるフォームを理解することによって、活性化剤にも少なくとも 2 つのグループがあることが説明された (Type I 及び Type II 活性化)。さらに、*in silico* ドッキングスタディを行い、Type I 活性化では Asn260 と Arg268、Type II 活性化では His85 が重要なアミノ酸残基として見出された。また、活性化剤がチロシナーゼの基質となって代謝される可能性もまた深く考慮されなければならない。欧米（特に北欧）では、皮膚の色調を黒くすることが美と健康の象徴となることもあり、非常に重要視されているが、これまでヒトチロシナーゼ活性化物質は見出されておらず、製品化に至っていない。本章では、ヒトチロシナーゼ活性化に関係する構造（変化）が明らかとされたが、これは科学的根拠に基づいた実用的な開発への第一歩である。

第 5 章では、ヒトチロシナーゼの活性中心について考察がなされている。ヒトチロシナーゼは膜結合型酵素であり、結晶構造が得られていない。本章では、ホモロジーモデリングを用いてコンピュータ上でヒトチロシナーゼの構造を構築することに成功した。これまでに、マッシュルームチロシナーゼを用いて評価のなされてきた PBA 異性体につ

いてメラノーマ細胞株 G-361 から抽出したメラノソーム抽出液系に適用し、ヒトチロシナーゼでの活性評価を行った。この活性評価系では、3-PBA のみに阻害作用が認められた。しかしながらマッシュルームチロシナーゼに対して強い阻害作用を示す 4-PBA には全く阻害作用が見いだされなかった。*in silico* ドッキングスタディを用いて構造を確認すると、4-PBA は立体的に活性中心を占めることができないことが予測された。活性中心をマッシュルーム酵素と比較すると、基質の保持に重要な Val377 (マッシュルームでは Val283) と Asn364 (マッシュルームでは Asn260) 以外のアミノ酸はほとんど一致せず、マッシュルームチロシナーゼによる活性評価系は、チロシナーゼ阻害剤探索には適さないことが明確に示された。さらに、ヒトリコンビナント系とメラノソーム抽出液系の比較も実施した結果、膜結合型ヒトチロシナーゼの含まれるメラノソーム抽出液系が最も活性評価系として適していることが確かめられた。

第 6 章は総括、展望について述べられている。本論文では、従来から用いられているマッシュルームチロシナーゼによる美白剤の評価法では不十分であると結論されたが、一方で、最も強いヒトチロシナーゼ阻害剤として  $\gamma$ -ツヤプリシンを挙げている。*in silico* 解析の結果では、 $\gamma$ -ツヤプリシンに目立った相互作用部位は確認されていない。ヒトチロシナーゼの活性中心の構造に関する知見 (Figure 5.4.1) は、非常に重要なコンセプトであり、それを根拠とすることによってより効果的な阻害物質の創製も期待できる。

ヒトチロシナーゼの構造と制御メカニズムの解明は美白研究のみならず、チロシナーゼ不全から生じる疾患等の新規治療法開発に大きく貢献できる。これまではマッシュルームチロシナーゼ阻害剤についての研究が中心的であった。本論文では、マッシュルームとヒトのチロシナーゼの比較によって、これまでの知見を活用し発展させるべきであると提案している点が重要である。以上、本論文に示された研究成果により申請者には博士 (薬科学) の学位を与えるに十分であると評価された。