

脂肪酸の構造ダイバーシティを活用する生理活性物質創製

東京大学大学院薬学系研究科

大和田 智彦

There are scattered reports that fatty acids have different effects on ω -3 and ω -6; supplements of DHA and EPA, which are ω -3 fatty acids, are available, but not so often for ARA, which is an ω -6 fatty acid. Fatty acids have a high degree of structural diversity in terms of the total number of carbons, the number of double bonds, the position of the double bonds, and the geometric isomerism of the carbon-carbon double bonds, since they usually contain Z-olefines also E-olefines. The structural diversity of fatty acids not only refers to the diversity of molecular formulae due to geometric isomerism and differences in the number of carbons, but also refers to the fact that there are many conformations of a single fatty acid based on bond rotations. There should be present endogenous ligands that are fatty acids themselves or have fatty acids as substructures, and there are corresponding receptor proteins. It is certain that fatty acids are involved in a part of the signal transduction mechanism *in vivo*. We studied herein rational design and synthesis of molecules with fixed conformations based on the structure of fatty acids, which will lead to the creation of substances with bioactive functions such as cosmetology and pharmaceutical supplements.

1. 緒言

脂肪酸は、カルボキシル基とメチル基を持つ炭素鎖長の異なる分子である。多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は、2つ以上の二重結合を含む脂肪酸分子のグループで、 ω -3 (炭素数3) と ω -6 (炭素数6) PUFA の2つの主要なグループに分かれ、これらのグループのメンバーは生物活性脂質メデイエーターの多くのレパートリーの前駆体である。 ω -3 脂肪酸の役割は、中性脂肪を減らし、血圧を下げ、動脈のプラークの蓄積を遅らせると報告されている。 ω -6 脂肪酸の役割は、血糖値のコントロールと血圧の低下作用が報告されているが詳細な機構は不明である。脂肪酸は ω -3 と ω -6 で作用が異なるという報告が散見される。 ω -3 脂肪酸である DHA や EPA のサプリメントは販売されているが、 ω -6 脂肪酸である ARA は違う。脂肪酸は全長の炭素数、二重結合の数、二重結合の位置、通常は Z 体であるが E 体を含むため炭素-炭素二重結合の幾何異性の区別など高い構造ダイバーシティを有している。脂肪酸の構造ダイバーシティとはこのような幾何異性や炭素数の違いによる分子式のダイバーシティを意味するだけでなく、1種類の脂肪酸 (たとえば DHA: ドコサヘキサエン酸) についても、結合回転に基づく多数の立体配座が存在することを指している (図1)^{1, 2)}。

サプリメントだけではなく、脂肪酸そのもの、あるいは



Creation of Bioactive Substances by Utilizing Structural Diversity of Fatty Acids

Tomohiko Ohwada

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

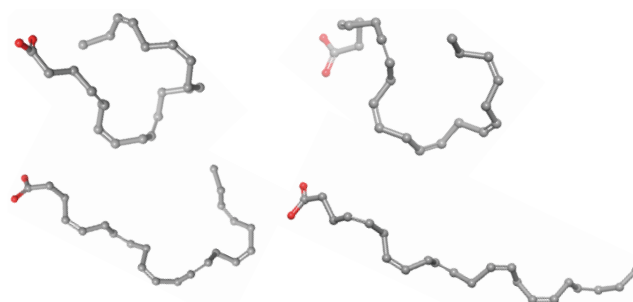


図1 Diversity of Conformations of DHA

脂肪酸を部分構造として持つ内因性リガンドが存在し、対応する受容体タンパク質が存在している。脂肪酸が生体内シグナル伝達機構の一端に関与しているのは確実である。脂肪酸の構造を利用し立体配座を固定した分子を合理的に設計合成すれば、コスメトロジーをはじめ医薬品のサプリメントなど生理活性機能を有する物質創製につながるはずである。

2. 方法

溶媒や膜中、受容体結合サイト内などの様々な周辺環境で脂肪酸 (DHA) の長時間MDやレプリカ交換、メタダイナミックス計算を実施する。構造探索の網羅性が重要であり、複数の計算理論を実施・比較する。構造を類似性で分類し、各小分類から複数の代表構造を選択する。特に DHA について研究し、方法論の妥当性を検討する。

溶液中の脂肪酸の立体配座は加速型分子動力学法の一種 replica exchange with solute tempering (REST) 法にて網羅的に発生させた^{3, 4)}。相似行列 (similarity matrix) を、Schrödinger 社製の Canvas によって生成される 3D pharmacophore fingerprint と Tanimoto 類似度 (Tanimoto similarity metric) から作成した。クラスタリングは各脂肪

酸について収集したすべての立体配座について行い、重要な立体配座を抽出するのに用いた。クラスター数は30以下になるようにして、Kelly's基準値とクラスター間のdistanceを考慮してクラスターをmergeした。

3. 結果

脂肪酸サロゲートのデザイン

DHA サロゲートは cis-炭素-炭素二重結合をベンゼン環で置き換えることによってデザインした。炭素数を同じように揃えるようにした(例を Fig.3 に示した)⁵⁾。

PUFAの立体配座空間の収集

PUFAの立体配置空間の収集において加速分子動力学シ

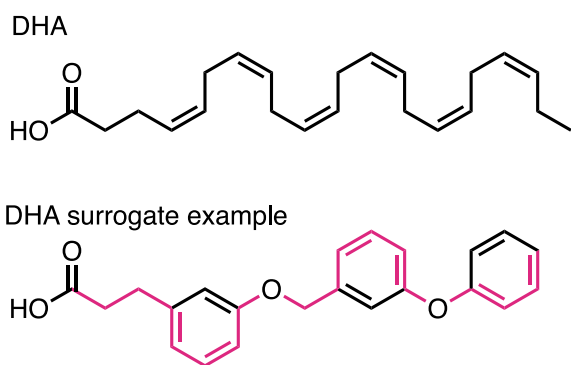


図2 DHAサロゲートの例

ミュレーションの利用した。DHAを含む柔軟なPUFAの全立体配座空間を収集するために、加速分子動力学シミュレーションの一つであるREST法を用いて、多数の立体配置を生成した。RESTは、レプリカ交換法による分子動力学シミュレーションの一種で、対象となる分子を選択的に加熱する一方で、周囲の環境は低温のままにしておく方法である。対象分子を選択的に加熱することで、立体配座間の交換が促進され、少ないレプリカ数でもアクセス可能な立体配座を保存することができる。本研究では、カルボン酸イオンが生物学的環境で一般的に観察されることから、PUFAのイオン化形態を最小化して使用した。ピコ秒ごとに立体配座を抽出することで、1000個のユニークな立体配座が収集された。立体配座の性質をよりよく理解するために、クラスタリングを行い、DHAの立体配座の傾向を調べた。結果的にこの手法で効率的に立体配置が得られることが分かった。

立体配座のクラスタリング法

立体配座を分類するための最適な条件を確立するために、いくつかの典型的なクラスタリング手法をテストした。

重み付けセントロイド連結法

DHAがとる主要な立体配座を出力すると考えられたため、最初に重み付けセントロイド結合を選択した。クラスター数を Kelly's Penalty 10 の最小値に設定したところ、

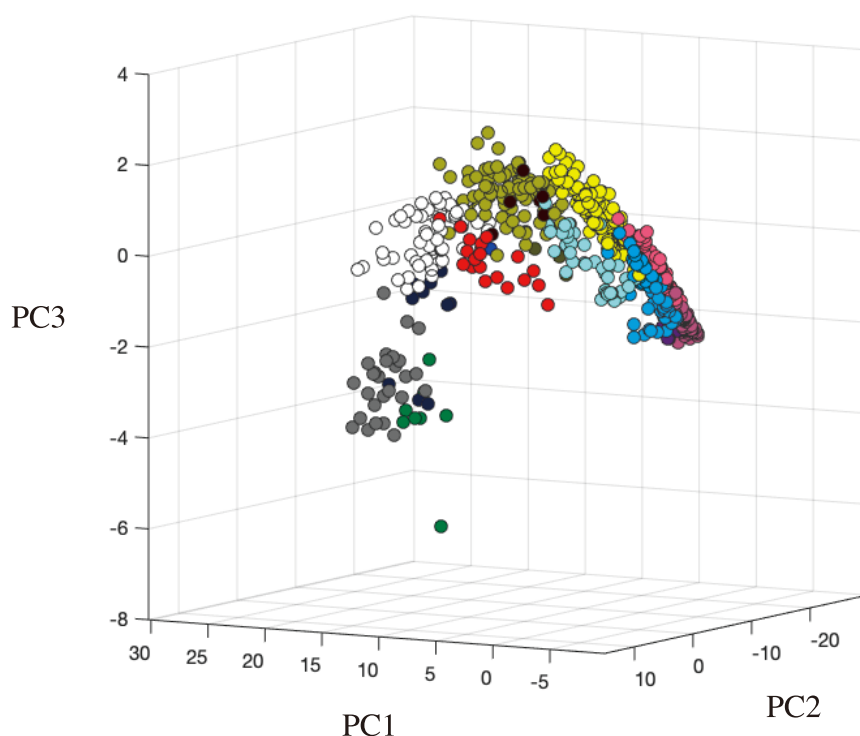


図3 DHAの立体配座の分類(主成分解析の場合)

加重セントロイド結合では、全体の70-90%をカバーする高度に変形した過密なクラスターが得られ、結合法の信頼性が低いことに気付いた。例えば、水中のDHAコンフォーマーの場合、1000個の立体配座を加重セントロイド結合法で20個のクラスターにクラスタリングすると、871個の立体配座が同じクラスターに入る。しかし、この主要なクラスターに含まれる立体配座は、高い類似性を持っているわけではない。クラスター分散は、メンバー数が10以下のマイナークラスターに比べて著しく大きい。そのため、より適切な結合方法を模索する必要がある。

記述子の選択

PUFAの単純で柔軟な構造をさらに特徴づけるために、我々は現在利用可能な分子記述子のリストを測定した。一般に、分子指紋や分子記述子は、QSAR/SAR解析、仮想分子スクリーニング、標的分子のランク付け、薬物のADME予測などの創薬プロセスで使用される。そのため、ほとんどの分子指紋や記述子は、2次元的な構造の違いを説明するものとなっている。つまり、トポロジー的に異なる分子を区別することしかできない。我々の研究では、立体配座を区別したいだけなので、限られた数の指紋や記述子を評価することができる。実際、3Dファーマコフォア指紋は、使用できる唯一の指紋でありながら、前節で述べた階層型クラスタリングに有効であることが分かった。一方で、いくつかの3次元記述子は、立体配座の特性評価において、ユニークな視点を与えた。FOSAとFISAは我々が重要な記述子として選択した2つの記述子で、それぞれ全溶媒到達表面積(SASA)の疎水性成分と親水性成分を表している。表面積は立体配座のフォールディングに大きく依存し、フォールディングの度合いが高いほどSASAは低くなる。私たちは、これらの3つの記述子を、末端炭素距離とともに、3Dプロットの座標として用いることで、最小限のデータで立体配座を表現することを考えた。DHAの1000個の立体配座をプロットし、色でクラスターを区別している。図3に示すように、この3つの記述子、末端炭素距離と疎水性(FOSA)と親水性(FISA)がうまくクラスターを区別している。

しかし、研究を進めるとこの記述子のセットには致命的な問題があることが判明した。表面積は大きさに依存する

ため、分子サイズの異なる分子では、立体配座の類似性が高いにもかかわらず、互いに離れた座標を与えてしまう。この点は、PUFA立体配座とそのサロゲート立体配座を比較する際に問題となる。したがって、立体配座を3次元空間にプロットするためには、別の記述子が必要となり現在検討を継続している。

4. 考 察

多価不飽和脂肪酸の立体配座を水中またはn-オクタノール中で、それぞれREST法で網羅的に発生させたところ、この2つの極性の異なる溶媒中での立体配座の和で、全立体配座空間をカバーできることが分かった。このことは、タンパク質に結合する際、脂肪酸の立体配座は、多数のDHAの溶液立体配座から選択される可能性を示唆している。

(引用文献)

- 1) Horrocks LA, Yeo YK; Health benefits of docosahexaenoic Acid (DHA). *Pharmacol. Res.*, 40, 211, 1999.
- 2) Dyall SC; Interplay between N-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids and the endocannabinoid system in brain protection and repair, *Lipids*, 52, 885, 2017.
- 3) Liu P, Kim B, Friesner RA, Berne BJ; Replica exchange with solute tempering: a method for sampling biological systems in explicit water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 13749, 2005.
- 4) Wang L, Friesner RA, Berne BJ; Replica exchange with solute scaling: a more efficient version of replica exchange with solute tempering (REST2). *J. Phys. Chem. B*, 115, 9431, 2011.
- 5) Jung S, Inoue A, Nakamura S, Kishi T, Uwamizu A, Sayama M, Ikubo M, Otani Y, Kano K, Makide K, Aoki J, Ohwada T; Conformational constraint of the glycerol moiety of lysophosphatidylserine, an emerging lysophospholipid mediator, affords compounds with receptor subtype selectivity, *J. Med. Chem.* 59, 3750, 2016.