

152. ドーパに関する新規受容体探索および構造活性相関解析

増川 太輝

横浜市立大学 医学部

Key words : L-DOPA, 下位脳幹孤束核, 構造活性相関

緒言

我々は、L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA、ドーパ) が神経興奮によって伝達物質様に遊離され、ドパミン (DA) への変換を介さない薬理作用を示すことなどを明らかにし、ドーパが神経伝達物質として機能するという仮説を提唱してきた [1, 2]。我々は、下位脳幹部背側に存在する孤束核 (NTS) において、ドーパ自体の降圧・徐脈作用を発見し、ドーパが、NTS に終末する圧受容体からの一次求心性線維における有力な神経伝達物質候補の一つであることを証明してきた [3]。しかしながら、ドーパ受容体の存在は未知であった。そうした中、*ocular albinism 1* (眼白子症) の遺伝子解析から同定された G 蛋白質連関型受容体 (GPCR) の 1 つである OA1/GPR143 が、ドーパ結合活性を持つことが報告された [4]。この知見を踏まえ、我々は、NTS における GPR143 の発現を、shRNA により抑制すると、ドーパ応答が消失することを発見した [5]。しかしながら、GPR143 がドーパ応答を媒介する唯一の受容体であるか否か、さらには、ドーパリガンドに関する情報は不明である。そこで本研究では、ドーパ活性を持つ安定な化合物を得る目的で、NTS における降圧応答を指標に、複数のドーパ類似化合物を用いてリガンドスクリーニングを試みた。

方法

Wistar 雄性ラット (280~350 g, 8~12 週齢) をウレタン (1.2 g/kg) 麻酔し、大腿動脈から観血的に血圧を測定した。まず、ドーパ 60 ng の NTS への微量注入が 20 mmHg 以上の降圧を示したことを確認した後、29 種類のドーパ類似化合物 (30, 60, 100 ng) による降圧応答を解析した。ドーパ類似化合物 (DO1~14) 100 ng による降圧応答が 10 mmHg 以上であるものを活性陽性であると判断した。降圧応答陽性化合物と陰性化合物の構造的特徴を比較し、活性に必要な構造活性相関の特徴を予測した。また、予測した特徴を用いてベイズ解析を行い、それぞれの化合物が活性を持つ確率を求めた。

結果および考察

1. ドーパおよびドーパ関連化合物による降圧応答

まず、ドーパに関する構造活性相関を特定するために、ラット NTS にドーパおよびドーパ類似化合物 (30~100 ng) を微量注入し、降圧応答を測定した。その結果、ドーパ (30, 60, 100 ng) による降圧作用の程度は、それぞれ 12.2 ± 3.1 , 23.7 ± 2.0 , 12.2 ± 3.1 mmHg であった。また、試験した 14 種類のドーパ類似化合物 (DO1~14) のうち、12 種類の化合物 (100 ng) が 10 mmHg 以上の降圧応答を示した (表 1)。さらに、15 種類のカテコラミン関連化合物についても検討したが、降圧応答は認められなかった。これらの活性陽性化合物と陰性化合物を比較することにより、化合物が活性を持つためには、(1)、(2) 芳香環のパラ位およびメタ位に水素結合アクセプター (酸素) があること、(3) 芳香族環があること、(4) 芳香族環の C1 から 4 番目の位置に sp² 酸素があること、(5) 芳香族環の C1 から 3 番目の位置に正電荷に帯電する原子があること、(6) A1, A2 はカテコール基より sp² 酸素かエーテルの方が好まれること、(7) 芳香族環の C1 から 2 番目の位置は窒素かメチル基が好まれること (N>C)、(8) 芳香族環の C1

から4番目の位置は窒素か酸素が好まれること (N>O)、(9) 余計なヒドロキシル基が存在しないことが必要であることが明らかとなった (図1)。

表1. ドーパ関連化合物による降圧応答

Compound name	ΔmmHg			n
	30ng	60ng	100ng	
DO1	7.02 ± 1.91	13.94 ± 2.26	21.86 ± 3.14	4
DO2	10.72 ± 3.84	16.96 ± 6.22	23.74 ± 6.73	4
DO3	8.77 ± 2.63	19.33 ± 2.60	22.87 ± 3.85	4
DO4	9.19 ± 1.57	15.08 ± 1.48	23.22 ± 1.95	6
DO5	4.67 ± 1.48	15.31 ± 3.53	20.27 ± 2.01	4
DO6	3.77 ± 0.67	8.63 ± 1.29	13.75 ± 1.54	4
DO7	2.70 ± 0.37	6.81 ± 0.70	14.54 ± 2.05	4
DO8	7.72 ± 2.68	13.49 ± 2.85	16.60 ± 1.60	3
DO9	4.93 ± 1.61	16.55 ± 2.00	27.02 ± 3.02	8
DO10	7.47 ± 2.34	19.84 ± 2.34	25.33 ± 1.85	7
DO11	8.28 ± 0.56	14.31 ± 1.36	24.9 ± 5.03	4
DO12	3.21 ± 1.79	4.30 ± 1.30	9.06 ± 1.22	3
DO13	1.47 ± 1.01	5.17 ± 1.77	8.30 ± 3.22	3
DO14	1.25 ± 0.28	1.49 ± 1.97	2.57 ± 0.92	3

ラットにおける 30、60、100 ng のドーパ関連化合物に対する降圧応答の程度の平均。平均値±標準誤差 (n = 3~8)。

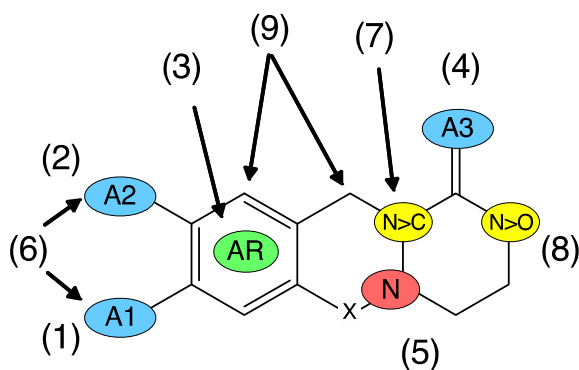


図1. ドーパ様活性に必要な9つの特徴

2. ドーパの構造活性相関に関するベイズ解析

次に、9つの構造的特徴に基づいて、ベイズ解析を行い、それぞれの化合物が活性を持つ確率を求めた。その結果、確率の順は、DO3、DO8>DO1>DO5、DO6、DO9、DO10>DO4>ドーパ、DO7、DO11、DO12、DO13、カルビドパ、3- σ メチルドパ>DO2 その他であった。この確率は、化合物の活性と一致した(表2)。ベイズ解析の結果から、DO12、DO13、カルビドパ、3- σ メチルドパはドーパと同程度の活性を持つ確率を示したが、実際には活性を持たなかった。このことは、これらの化合物が有する立体障害によって受容体との結合が阻害されていることを示唆する。

表2. 9つの構造的特徴を用いたベイズ解析

The nine characters for pharmacophore		(1)A1	(2)A2	(3)AR	(4)A3	(5)N	(6)OH	(7)H>C	(8)N>O	(9)Extra OH	
Probability of being active if it has characters		0.50	0.50	0.38	0.58	0.44	0.28	0.46	0.92	0.00	
Probability of being active if it has no characters		0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.43	0.34	0.28	0.42	
Active	1 DO3	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0.187
	2 DO8	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0.187
	3 DO1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0.140
	4 DO5	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0.043
	5 DO6	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0.043
	6 DO9	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0.043
	7 DO10	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0.043
	8 DO4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.038
	9 L-DOPA	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.028
	10 DO7	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.028
	11 DO11	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.028
	12 DO2	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0.025
Inactive	13 DO12	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.028
	14 DO13	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.028
	15 Carbidopa	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.028
	16 3- σ -methyldopa	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.028
	17 alpha-methyl- ρ -tyrosine	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0.007
	18 L-threo-DOPS	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0.000
	19 Benserazide	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0.000
	20 Adrenaline	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0.000
	21 Propranolol	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.000
	22 Dopamine	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0.000
	23 D14	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0.000
	24 Phentermine	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0.000
	25 Phenylalanine	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0.000
	26 Yohimbine	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.000
	27 Clonidine	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0.000
	28 Phenoxybenzamide	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.000
	29 Amantadine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000
	30 Prazosin	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0.000
Exception		8.00	10.00	1.00	11.00	5.00	17.00	24.00	26.00	26.00	
Applicable		22.00	20.00	29.00	19.00	25.00	13.00	6.00	4.00	4.00	

1: 特徴あり、0: 特徴なし。上部の値は、(1~9)の特徴を持つと活性を持つ確率と、特徴を持たないと活性を持つ確率を示している。右部の値はそれぞれの化合物が活性を持つ確率を示している。活性を持つ確率はヒートマップを用いて表した。

3. GPR143 非依存的なドーパおよびドーパ類似化合物応答

ドーパによる降圧応答は、アデノウイルスを用いて *GPR143* を shRNA ノックダウンすると消失する [3]。しかしながら、アデノウイルスはそれ自体により毒性、免疫系の活性化、非特異的反応を起こす可能性がある [6, 7]。したがって、異なる実験系を用いて、*GPR143* がドーパ応答を媒介するか否かを検証する必要がある。そこで、*GPR143* 遺伝子欠損ラットを作製し、同ラットを用いて、ドーパおよびドーパ類似化合物の降圧応答の有無を検討した。その結果、*GPR143* 遺伝子欠損ラットにおいても、野生型ラットと同程度の降圧応答が認められた(未発表データ)。このことは、NTSにおけるドーパ応答が *GPR143* 以外の受容体を介して降圧応答を起こすことを示唆する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター3D 分子設計チーム研究チーム長の福西快文博士、愛知医科大学医学部動物実験部門准教授の松下夏樹博士である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Goshima Y, Kubo T, Misu Y. Transmitter-like release of endogenous 3,4-dihydroxyphenylalanine from rat striatal slices. *J Neurochem.* 1988 Jun;50(6):1725-30. PMID: 2897424
- 2) Misu Y, Goshima Y. Is L-dopa an endogenous neurotransmitter? *Trends Pharmacol Sci.* 1993 Apr;14(4):119-23. Review. PMID: 8100096
- 3) Kubo T, Yue JL, Goshima Y, Nakamura S, Misu Y. Evidence for L-dopa systems responsible for cardiovascular control in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Neurosci Lett.* 1992 Jun 22;140(2):153-6. PMID: 1501771
- 4) Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS. L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol.* 2008 Sep 30;6(9):e236. PMID: 18828673 DOI: 10.1371/journal.pbio.0060236
- 5) Hiroshima Y, Miyamoto H, Nakamura F, Masukawa D, Yamamoto T, Muraoka H, Kamiya M, Yamashita N, Suzuki T, Matsuzaki S, Endo I, Goshima Y. The protein Ocular albinism 1 is the orphan GPCR GPR143 and mediates depressor and bradycardic responses to DOPA in the nucleus tractus solitarii. *Br J Pharmacol.* 2014 Jan;171(2):403-14. PMID: 24117106 DOI: 10.1111/bph.12459
- 6) Barcia C, Thomas CE, Curtin JF, King GD, Wawrowsky K, Candolfi M, Xiong WD, Liu C, Kroeger K, Boyer O, Kupiec-Weglinski J, Klatzmann D, Castro MG, Lowenstein PR. In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *J Exp Med.* 2006 Sep 4;203(9):2095-107. Epub 2006 Aug 21. PMID: 16923851
- 7) Thomas CE, Birkett D, Anozie I, Castro MG, Lowenstein PR. Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther.* 2001 Jan;3(1):36-46. PMID: 11162309