

# I. セリンラセマーゼ (SR) を標的とした 神経変性疾患治療薬の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 教授 森 寿

## 【各班のまとめ】

高齢化を迎えている現代社会では、痴呆、記憶障害、情動障害などの原因となる神経変性疾患に対する治療薬を開発する事が、社会保健の観点や高齢者の生活の質を保持する観点から、医学的、社会的に解決すべき重要な課題である。現在いくつかの神経変性疾患に対する治療薬が開発されつつあるが、いまだ十分とは言えない。新たな神経変性疾患治療薬の開発は、高齢化を迎える社会において非常に大きな市場ニーズがある。

脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患では、神経細胞死に伴う過剰なグルタミン酸の放出と、それに伴う NMDA 型グルタミン酸受容体 (GluR) の過剰活性化が、神経変性疾患の進展に関わる共通機構と考えられている。研究代表者の森らは、NMDA 型 GluR の作動を制御する内在性コアゴニストとしての D-セリンの役割に注目し、D-セリンの産生に関わるセリンラセマーゼ (SR) の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その機能解析を進めて来た。その結果、SR-KO マウスは、神経細胞死を引き起こす NMDA、あるいはアルツハイマー病の原因のひとつと考えられている A $\beta$  ペプチドの脳内投与による興奮毒性に対して、抵抗性を示す事を明らかにした (Inoue et al., 2008)。また、他の研究グループの SR-KO マウスを用いた研究により、実験的脳梗塞による神経細胞死に対しても抵抗性を示す事も明らかにされている (Mustafa et al., 2010; Wolosker and Mori, 2012)。さらに、井上、森らは、抑制性神経伝達を阻害するペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与で誘発される全般性てんかん発作が、SR-KO マウスで軽減すること、PTZ 投与後の神経細胞の活性化状態を示す分子マーカーのひとつである c-Fos タンパク質の発現誘導が脳皮質や海馬等で減少していること、海馬歯状回で PTZ 誘発性の細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じないこと等を見出し報告した (Harai et al, 2012)。従って SR は、ヒトで生涯発症率が 0.5-1% と報告されているてんかん発作軽減のあらたな薬物標的となる可能性も示唆された。このように、SR により生産される D-セリンは、NMDA 受容体の過剰活性化状況において大きく関与している可能性が示唆され、SR の阻害薬は、神経変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となりうると考えられる。

本研究では、班員のそれぞれ専門分野での研究手法を活かし、1) ヒト SR に対する新たな阻害薬候補の詳細な活性測定を *in vitro* の系で行い、SR 阻害薬のリード化合物を決定する (森)。2) マウス

SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を作製し、ヒト SR に対する阻害薬の効果を *in vivo* で検証する(井上)。3) 阻害薬候補に化学的修飾を行い、特異性が高く、脳透過性を高めた新たな化合物をデザインし合成する(豊岡)。4) 阻害薬-SR 複合体の立体構造を明らかにして、作用機構の分子機構を明らかにする(水口)、のそれぞれの役割分担と達成目標のもとに研究班を組織した。

最終年度の本年度は、1) *in vitro* で阻害薬候補化合物の活性評価を実施した。また、NMDA 受容体の活性依存的な遺伝子発現をモニターできる Arc-Luc Tg マウス (Izumi et al., 2011) を用いた *in vivo* の薬物効果評価を実施した(森)。2) マウス SR の遺伝子座にヒト SR cDNA を導入したヒト型 SR を持つマウス系統の作製を試みた。また、皮膚での SR の機能解析を進めた(井上)。3) SR 阻害薬リード化合物から合成を進め、新規 SR 阻害薬の合成と活性評価を行った(豊岡)。4) 立体構造解析のための野生型 SR タンパク質の大量発現と結晶化解析を進めた。(水口)

本研究班の薬剤開発の手法は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなると期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める手法を確立する事は、研究開発型の富山県の薬業振興に資する可能性も非常に大きいと考えられる。

## 【研究全体の背景と目的】

高齢化を迎えている現代社会では、痴呆、記憶障害、情動障害などの原因となる神経変性疾患に対する治療薬を開発する事が、社会保健の観点や高齢者の生活の質を保持する観点から、医学的、社会的に解決すべき重要な課題である。現在いくつかの神経変性疾患に対する治療薬が開発されつつあるが、いまだ十分とは言えない。例えば、現在、アルツハイマー病に対して日本の臨床現場で使われている薬物は、脳内アセチルコリンの濃度を高めるために、アセチルコリンの分解酵素であるエステラーゼを標的としたドネペジル、ガランタミン、リバスチグミンの3種類と、NMDA 受容体を標的としたメマンチンの合計4種類であり、新たな分子標的に対する治療薬の開発は、神経変性疾患治療薬の新規開発の観点から、高齢化を迎える社会において非常に大きな市場ニーズがある。

脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患では、神経細胞死に伴う過剰なグルタミン酸の放出と、それに伴う NMDA 受容体の過剰活性化、カルシウム流入、カルシウム依存的酵素群の恒常的活性化、ミトコンドリア膜電位の異常上昇などの一連の反応に伴う興奮毒性が、ネクロシスやアポトーシスによる神経変性疾患の進展に関わる共通機構と考えられている。

我々は、NMDA 受容体の作動を制御する内在性コアゴニストとしての D-セリンの役割に注目し、D-セリンの産生に関わるセリンラセマーゼ (SR) の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その機能解析を進めて来た。その結果、SR が高次脳機能を担う前脳神経細胞に主に発現し、産生された D-セリンが NMDA 受容体の機能制御に関わる事を個体レベルで世界に先駆けて明らかにした (Inoue et al., 2008)。さらに、SR-KO マウスが、神経細胞死を引き起こす NMDA、あるいはアルツハイマー

病の原因のひとつと考えられている A $\beta$  ペプチドの脳内投与による興奮毒性に対して、抵抗性を示す事を明らかにした (Inoue et al., 2008)。また、他の研究グループの SR-KO マウスを用いた研究により、実験的脳梗塞による神経細胞死に対しても抵抗性を示す事も明らかにされている (Mustafa et al., 2010; Wolosker and Mori, 2012)。さらに、我々は、抑制性神経伝達を阻害するペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与で誘発される全般性てんかん発作が、SR-KO マウスで軽減すること、PTZ 投与後の神経細胞の活性化状態を示す分子マーカーのひとつである c-Fos タンパク質の発現誘導が脳皮質や海馬で減少していること、海馬歯状回で PTZ 誘発性の細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じないこと等を見出した (Harai et al, 2012)。従って、SRは、ヒトで生涯発症率が0.5-1%と報告されているてんかん発作軽減のあらたな薬物標的となる可能性を示唆した。一方で、NMDA 受容体の機能を直接阻害する事は、記憶・学習などの高次脳機能の障害や、精神症状の発症に関わる可能性が示唆されているが、SR-KO マウスでは通常の記憶・学習行動に異常は見られず、精神症状様の異常行動も示さない (Mori and Inoue, 2011)。さらに最近 D-セリンは神経伝達物質が情報伝達を行うシナプスでの NMDA 受容体を選択的に活性化することで、神経細胞死を引き起こす事も脳スライス標本を用いた実験で報告されている (Papouin et al., 2012)。これらの事から、NMDA 受容体の機能修飾に関わっているSRから産生される D-セリンは、NMDA 受容体の過剰活性化状況においてより大きく関与している可能性が示唆される。

また我々は、SR が皮膚の角質細胞の最終分化過程で発現していることと、SR-KO マウスでは、皮膚の保湿バリア機能が低下し、相補的にバリア機能に関わる遺伝子発現が上昇している事を見出した (Inoue et al., in press)。本研究は、皮膚の NMDA 受容体の機能にSR由来のD-セリンが重要である事を示唆するのみならず、本研究で開発される SR 阻害薬や D-セリンを適切に使用することで、皮膚バリア機能の向上作用が期待される可能性を示唆している。

以上の背景から、SR の阻害薬は、神経系では神経変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬と、皮膚ではバリア機能の調節薬物となりうると考えられる。

既に、申請代表者らは大腸菌に発現させたヒトの SR を用いて *in vitro* 酵素活性測定系を確立した。また、北里大学薬学部の広野修一教授のグループと共同し、ヒト SR の結晶立体構造情報 (Smith et al., 2010) を元に、*in silico* スクリーニングにより、400万種の化合物の中から阻害薬候補を19種にまで絞り込んだ。さらに、*in vitro* での酵素活性測定系により、この19種の化合物の中から従来報告されている阻害薬より活性の高い化合物を1種類、同程度の活性の化合物を3種類見出した。

従って、本研究では班員のそれぞれ専門分野での研究手法を活かし、1) ヒト SR に対する新たな阻害薬候補の詳細な活性測定を *in vitro* の系で行い、SR 阻害薬のリード化合物を決定する (森)。2) マウス SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を作製し、阻害薬の効果を *in vivo* で検証する (井上)。3) 阻害薬候補に化学的修飾を行い、特異性が高く、脳透過性を高めた新たな化

合物をデザイン合成して評価する（豊岡）。4) 阻害薬-SR複合体の立体構造を明らかにして，作用機構の分子機構を明らかにする（水口），のそれぞれの役割分担をもつ研究班を組織した。

本研究の手法は，様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなると期待される。また，和漢薬からも新たな SR 阻害作用のある物質を見出す事が期待される。これら，一連の研究を連携推進し，新規薬物創製を進める手法を確立する事は，研究開発型の富山県の薬業の振興に資する可能性も非常に大きいと考えられる。

## I - 1 SR の酵素活性測定と阻害薬のスクリーニング

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 教授 森 寿

### 【研究目的】

本研究では、SR 阻害薬リード化合物を同定し、新規SR阻害薬候補をスクリーニングするために、大腸菌でのリコンビナント SR の発現ならびに精製を行い in vitro および培養細胞系での、SR 活性測定系の確立と SR 阻害薬候補のスクリーニングを実施することを目的とする。また、個体レベルでの阻害薬の効果を検証するために、NMDA 受容体活性化に依存して発現する遺伝子を発光計測できる Arc-Luc Tg マウス系統 (Izumi et al., 2011) を用いた評価を行う。

### 【研究方法ならびに結果】

昨年までに in vitro スクリーニングで見いだした SR 阻害効果の高い新規化合物（特許申請のため構造は示さない）の濃度-阻害効果を in vitro で評価した（図1）。その結果，化合物 4 が，非常に強い SR 活性阻害作用を示した。

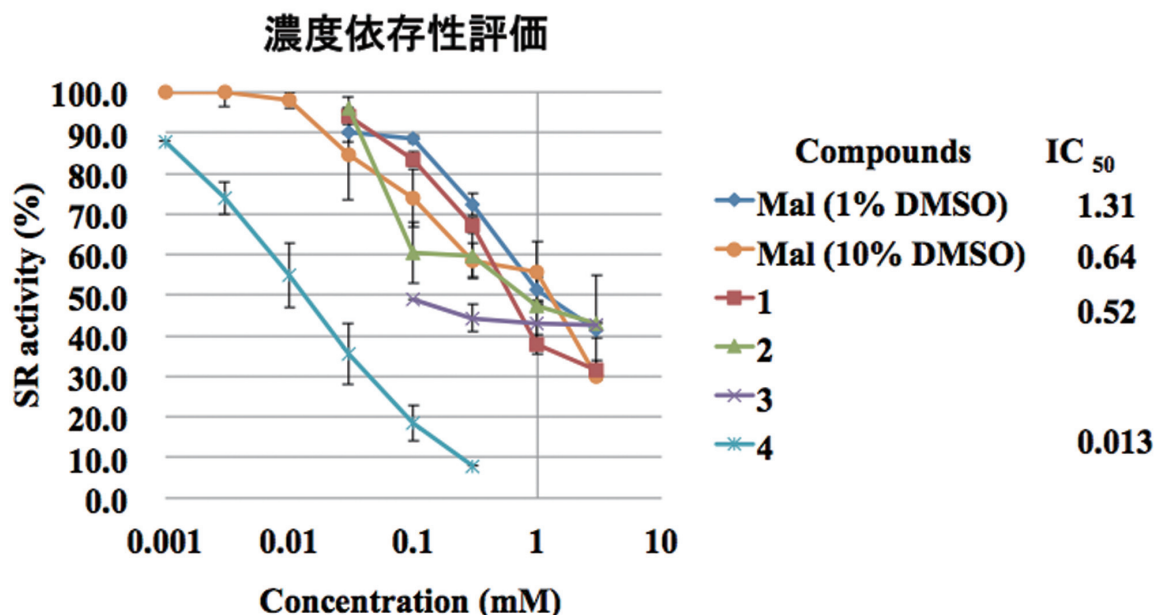


図1 新規合成化合物の濃度-SR 活性曲線

SR 阻害標準化合物のマロン酸 (Mal) と同等か，より強い阻害作用を示した。

次に、Arc-Luc Tg マウス系統 (Izumi et al., 2011, 図 2) を用いて、個体レベルでの化合物評価解析を進めた。なお、個体レベルでの解析は、研究分担者の井上と共に実施した。

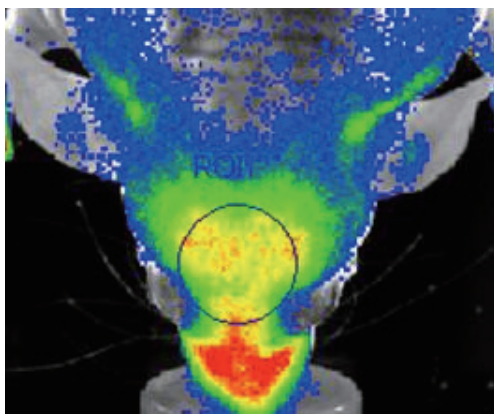


図2 Arc-Luc Tg マウスで観察される NMDA 受容体活性依存的発光

Arc-Luc Tg マウスでは、NMDA 受容体活性依存的に発現する Arc 遺伝子にホタル由来発光タンパク質 (ルシフェラーゼ Luc) 遺伝子を連結したトランスジーンが組み込まれている。

図は背側より頭部を発光観察したものであり、通常飼育状態でも NMDA 受容体は機能しているため、脳からの発光 (円内) が観察できる。

また、Arc-Luc Tg マウスでの発光計測を容易とするために、成長に伴い自然脱毛するヘアレス (HR; (株) 星野試験動物飼育所) 系統遺伝子を導入した HR-Arc-Luc Tg マウス系統を作製し本研究では用いた。このマウス系統での、発光変化が NMDA 受容体特異的チャンネルブロッカー MK-801 の前投与により抑制されることは、既に確認している。

個体レベルでの薬物作用を評価するために、様々な薬物投与溶媒、投与方法、発光計測プロトコルを検討し、以下の実験方法を確立した (図 3)。まず、溶媒には毒性が低く脂溶性化合物の溶解が容易な PEG400 を用いた。また、薬物投与方法は経口投与とした。薬物ならびに溶媒を実験開始 3 時間前に経口投与し、NMDA 受容体の活性化に伴う発光上昇を引き起こすカイニン酸 (KA) を腹腔内注射投与し、2 時間おきに頭部よりの発光を計測して評価した。

### In vivo imaging protocol (Arc-Luc Tg hairless mice)

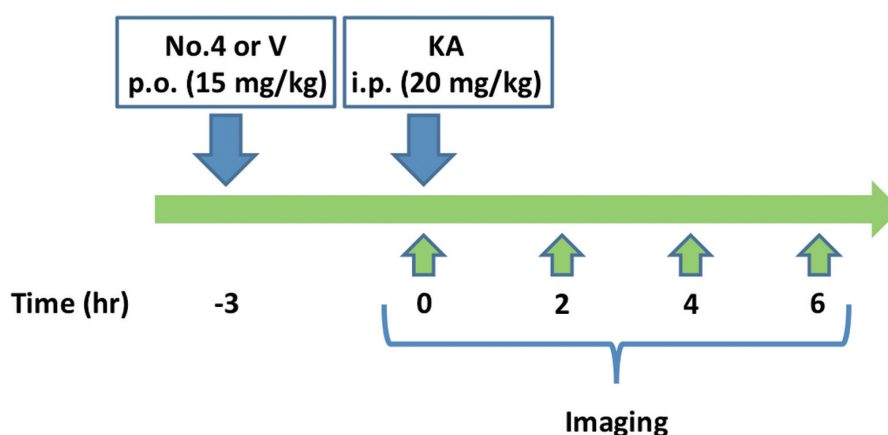


図3 発光計測プロトコル

カイニン酸 (KA) 投与 3 時間前より、薬物あるいは溶媒を経口投与した。KA 投与直前、投与 2、4、6 時間後にそれぞれ発光計測を実施した。

得られた発光計測結果の一例を、以下に示す (図 4)

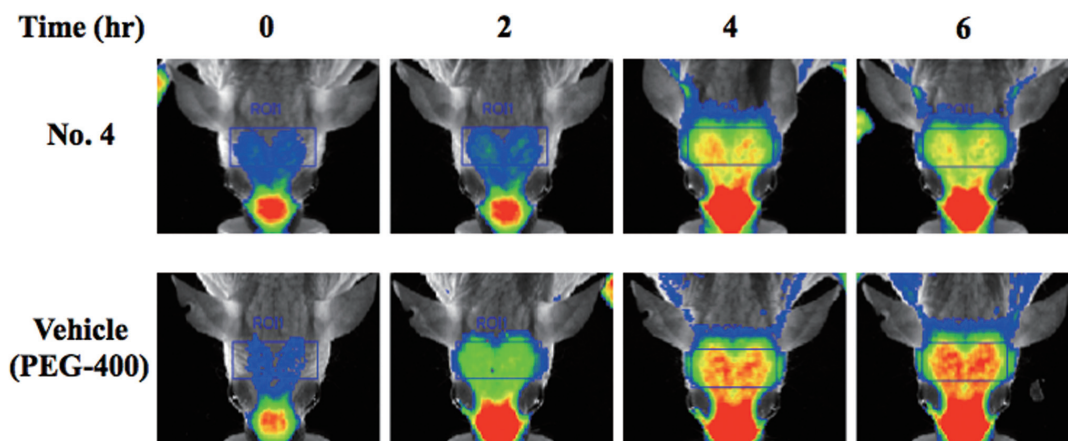


図4 化合物前投与, KA 投与後のマウス発光計測

化合物 No. 4 の投与により, コントロール (Vehicle) 投与に比べ発光上昇が抑制された。

発光計測を解析した結果, No.4 化合物投与群で, 発光上昇が有意に抑制された (図 5)。

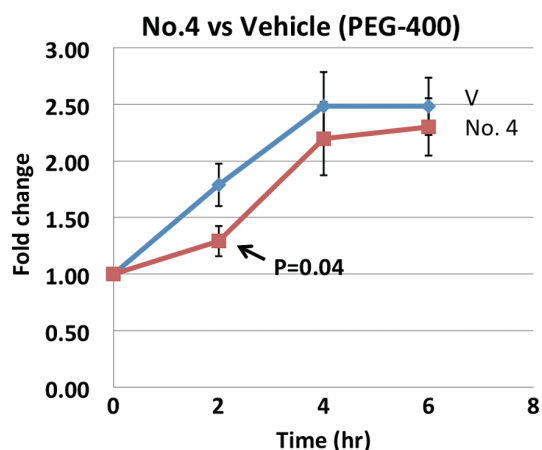


図5 薬物投与による発光の抑制

薬物投与群で発光上昇変化が抑制される傾向が観察され, KA 投与 2 時間後では, 発光が有意に抑制された。

### 【考察と今後の展望】

本研究により, *in silico* スクリーニングにより見いだしたリード化合物の構造を元に新規合成した SR 阻害化合物が, マウス個体レベルで NMDA 受容体の活性化を抑制することが示唆された。このことは, 新規薬物がマウス脳内 SR の活性を阻害して, 結果的に D-セリン濃度を低下させ, NMDA 受容体の過剰活性化を抑制したと考えられる。このことは, 本研究の酵素結晶構造-*in silico* スクリーニング-*in vitro* 評価-*in vivo* 評価の論理的かつ複合的アプローチが新薬開発に有効なことを示している。Arc-Luc Tg マウスで観察される発光は, 脳内神経細胞に由来することから, この化合物は血液脳関門を透過し, 中枢神経系に作用したと考えられる。また, 経口投与で作用する薬物は, ヒトへの適応を考える場合に重要である。現時点では, マウスの SR に直接作用しているのか明らかではない。従って今後は, この薬物投与が脳内 D-セリン量に与える影響を, マイクロダイアリシス法などで評価する必要がある。さらに, アルツハイマー病等の神経変性疾患モデル動物に対する薬物作用を評価することで, ヒト神経変性疾患の新規治療薬開発につながると期待される。

## I - 2 ヒト型 SR 発現マウスの開発と個体レベルでの 阻害薬効果の解析

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 助教 井上 蘭

### 【研究目的】

SR の阻害薬は、神経系の疾患に対しては変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となりうると思われる。また、皮膚ではバリア機能の維持に寄与する可能性がある。in silico スクリーニングにより見出したヒト SR に対する阻害薬候補19種を用いて、SR に対する阻害効果を in vitro で測定する過程で、ヒト SR に対する阻害効果を示す化合物とは異なる化合物がマウス SR に対して阻害効果を示すことが明らかとなった。また、ヒト SR (NCBI Accession: CAG33581.1) とマウス SR (NCBI Accession: CAI24252.1) のアミノ酸配列を比較すると、ヒト SR が340アミノ酸 (a.a.) から構成されるのに対し、マウス SR は、339 a.a. と1a.a. 少なく、また、全体のアミノ酸配列の比較で、ヒトSR とマウス SR のアミノ酸同一性は、89%である。これらのことから、本研究で開発するヒト SR に対する阻害薬は、個体レベルでの活性検討の際に用いるマウス SR に対する効果が、ヒトSRとは異なる可能性がある。従って、本研究では、SR 阻害薬の効果を in vivo で検証するために、マウス SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を作製することを目的とする。

### 【研究方法と結果】

本研究は、マウス SR 遺伝子座にヒト SR cDNA を挿入した標的遺伝子組換えベクターを構築し、マウス胚性幹 (ES) 細胞に導入し、目的の遺伝子組換えが行われた ES 細胞からキメラマウスの作製により、ヒト型 SR 発現マウス系統を作製するものである。昨年度、遺伝子組換えベクターの構築を行い、ヒト SR cDNA がマウス SR 遺伝子座に挿入された ES 細胞クローンを取得した。本年度は、この ES 細胞を用いてマウス個体作製を試みたが、目的のキメラマウス系統は、まだ得られていない。

### 【考察と今後の展望】

ヒト型 SR 発現マウス系統作製のための、標的遺伝子組換えベクターの構築を終え、遺伝子組換えベクターは完成した。また、ES 細胞に導入して、目的の遺伝子組換えが起きたクローンを得たので、マウス系統作製を継続して進める。



## I - 3 SR に対する改変修飾阻害薬の創製

富山大学・大学院理工学研究部 生体機能性分子工学研究室 教授 豊岡尚樹

### 【研究の目的, 方法, 結果】

最終年度は、最後のヒット化合物の誘導体合成を行い *in vitro* でのセリンラセマーゼ阻害活性評価を実施したところ、これまでに合成した3種類の誘導体と比較してかなり強力な阻害活性を示す化合物を見出した。(Table 1, 誘導体15, 23) これらについては、数種類の *in vivo* 評価を検討している。尚、本誘導体の詳細な構造は、LSIP ファンドとの兼ね合いにより公表を控えさせていただきます。

Table 1

LW	structure	% human SR at 1 mM	LW	structure	% human SR at 1 mM
No. 6	ヒット化合物	27 (64 Mal)	19*	誘導体 19	31 (63 Mal)
1*	誘導体 1	23 (64 Mal)	20*	誘導体 20	52 (63 Mal)
2*	誘導体 2	33 (64 Mal)	21*	誘導体 21	49 (57 Mal)
3*	誘導体 3	35 (64 Mal)	22*	誘導体 22	-----
4*	誘導体 4	24 (64 Mal)		誘導体 23	18 (0.3 mM)
5*	誘導体 5	22 (64 Mal)			41 (0.1 mM)
6*	誘導体 6	27 (64 Mal)			58 (0.03 mM)
7*	誘導体 7	28 (64 Mal)			5 (61 Mal)
8*	誘導体 8	28 (64 Mal)	23*	誘導体 24	31 (57 Mal)
9*	誘導体 9	55 (75 Mal)	24*	誘導体 25	24 (54 Mal)
10*	誘導体 10	48 (75 Mal)	25*	誘導体 26	45 (54 Mal)
11*	誘導体 11	47 (75 Mal)	26*	誘導体 27	31 (54 Mal)
12	誘導体 12	45 (63 Mal)	27	誘導体 28	41 (54 Mal)
13*	誘導体 13	44 (63 Mal)	28*	誘導体 29	74 (77 Mal)
14*	誘導体 14	38 (63 Mal)	29*	誘導体 30	67 (77 Mal)
15*	誘導体 15	20 (63 Mal)	30	誘導体 31	70 (57 Mal)
		28 (0.3 mM)	31*	誘導体 32	40 (57 Mal)
		46 (0.1 mM)			72 (1 mM)
		51 (0.03 mM)			81 (0.3 mM)
	11 (61 Mal)			64 (0.1 mM)	
16	誘導体 16	46 (63 Mal)	32*	誘導体 33	
17*	誘導体 17	32 (63 Mal)	33*	誘導体 34	
18*	誘導体 18	61 (63 Mal)	34*	誘導体 35	

### 【考察と今後の展望】

in vitro において強力なセリンラセマーゼ阻害活性を示した誘導体15, 23について, Arc-Luc Tg hairless mice を用いた in vivo での評価およびアルツハイマー病モデルマウスを用いた評価を現在進めており, これらの結果を踏まえ, さらなる化合物デザインへと展開する予定である。

## I - 4 SR-阻害薬複合体の立体構造解析

富山大学・大学院医学薬学研究部 構造生物学研究室 教授 水口 峰之

### 【研究目的】

SRの阻害薬は、神経変性疾患の新たな治療薬になりうると期待されている。SRを標的とした新たな神経変性疾患治療薬を開発するには、ヒトSRの阻害剤の作用機構を三次元立体構造から解明する必要がある。得られる立体構造は、新たな薬物デザインの根拠となる重要な情報になると期待される。従って、本研究は、ヒトSRとその阻害薬の立体構造をX線結晶構造解析によって明らかにし、阻害剤の作用機構を解明することを目的として実施した。

### 【研究結果】

#### 1) 野生型ヒトSRの発現と精製

タンパク質のX線結晶構造解析を成功させるには、高純度のタンパク質試料が数十ミリグラム必要である。また、タンパク質が不安定な場合には結晶化が困難であるため、安定なタンパク質試料を得ることも重要である。ヒトSRは340アミノ酸残基からなるタンパク質であり、Cysを7つ有する。昨年度の研究により、Cys2とCys6をAspに置換した変異型ヒトSRの発現・精製方法を改良し、高収率で目的タンパク質を得ることができた。今年度は、改良した発現・精製方法を野生型ヒトSRに適用し、十分量のタンパク質を得ることに成功した。

#### 2) 野生型ヒトSRの結晶化

野生型ヒトSRの結晶化はシッピングドロップ蒸気拡散法で行った。10 mg/mLの野生型ヒトSR溶液1  $\mu$ Lと沈澱剤溶液1  $\mu$ Lとをプレート上で混合し結晶化ドロップを作成した。結晶化プレートのリザーバーに400  $\mu$ Lの沈澱剤溶液を入れ、結晶化プレートをシールで密閉して20°Cで静置し野生型ヒトSRを結晶化した。初期スクリーニングにおける沈澱剤溶液は、Hampton Research社のCrystal Screen 1とIndexを用いた。初期スクリーニングの結果、以下の2条件で野生型ヒトSRの結晶を得た。

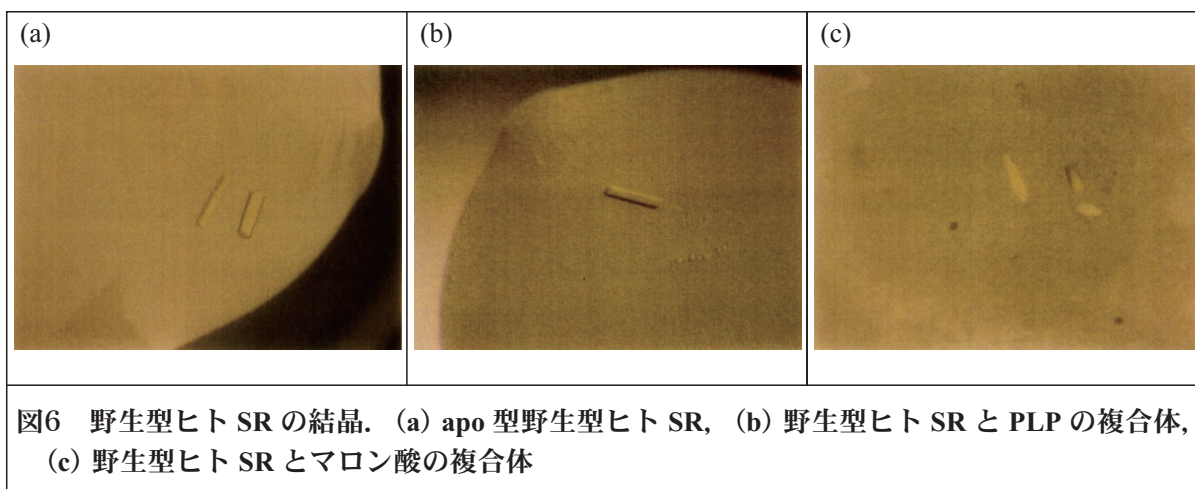
条件1：0.2 M magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5), 20% w/v polyethylene glycol (PEG) 8000

条件2：0.2 M sodium acetate trihydrate, 0.1 M tris hydrochloride (pH 8.5), 30% w/v PEG4000

さらに良質な結晶を得るために結晶化条件の最適化を行った。最適化は、上記の条件 1, 2 の pH を変えたり、PEG の種類や濃度を変えて行った。その結果、apo 型の野生型ヒト SR について良質な結晶が得られた (図 6a)。また、野生型ヒト SR と PLP の複合体についても良質な結晶が得られた (図 6b)。

さらに、野生型ヒト SR とマロン酸の複合体についても結晶化条件の探索を行った。マロン酸との複合体を得る際には、野生型ヒト SR はピリドキサルリン酸 (PLP) を加えずにゲルろ過を行い、その後マロン酸が 5 mM, PLP が 50  $\mu$ M となるようにそれぞれ加えた。Crystal Screen 1 を用いた初期スクリーニングでは、上記の条件 2 で結晶が見られた。さらに、結晶化条件を最適化することで良質な結晶を得ることに成功した (図 6c)。

野生型ヒト SR と阻害剤 (original 63) の複合体についても結晶化条件を探索した。阻害剤 (original 63) が溶解する条件を調べたところ、10% ジメチルホルムアミド (DMF) 中では 0.6 mM の濃度で阻害剤を溶解することができた。そこで、野生型ヒト SR と阻害剤 (original 63) の複合体を 10% DMF 存在下で調製し結晶化条件を探索したが、複合体の結晶を得ることはできなかった。



### 3) X線結晶構造解析

Apo 型の野生型ヒト SR, 野生型ヒト SR-PLP 複合体, 野生型ヒト SR-マロン酸複合体の結晶に、終濃度が 30% になるようにグリセロールを加えて凍結保護し、液体窒素中で保存した。回折データの収集は、大型放射光施設 Spring8 の構造生物学ビームライン (BL38B1, BL41XU) において、結晶を 100K に冷却して行った。データ処理は iMosflm と Scala を用いて行い、分子置換法による位相決定とモデルの精密化を試みた。その結果、野生型ヒト SR-PLP 複合体について、図 7 に示す立体構造を得

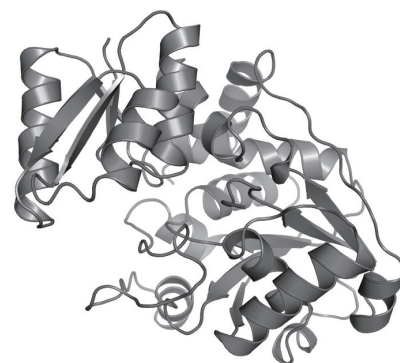


図 7 X線結晶構造解析によって得られた野生型ヒト SR-PLP 複合体の立体構造.

ることができた。しかし、回折データの質が不十分であったため、今回は精密な解析を行うことができなかった。In silico スクリーニングで新規阻害剤の探索を進めるためには、今後も継続して野生型ヒト SR の X 線結晶構造解析に取り組む必要がある。

### 【全体の今後の展望】

神経変性疾患ならびにてんかん発作等の神経細胞の過剰興奮が引き起こす病態に関わる SR を標的として、分子生物学、分子遺伝学、有機合成化学、構造生物学が共同する本研究は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなり、さらに和漢薬資源等からも新たなSR阻害作用物質を見出す事が期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める一連の手法を実施する事は、富山県の薬業の振興にも資すると考えられる。

### 【文献】

- Inoue, R., Hashimoto, K., Harai, T., Mori, H. NMDA- and  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub>-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. **J. Neurosci.** 28: 14486-14491, 2008.
- Inoue, R., Yoshihisa, Y., Tojo, Y., Okamura, C., Yoshida, Y., Kishimoto, J., Luan, X., Watanabe, M., Mizuguchi, M., Nabeshima, Y., Hamase, K., Matsunaga, K., Shimizu, T., Mori, H. Localization of serine racemase and its role in the skin. **J. Invest. Dermatol.** In press.
- Izumi, H., Ishimoto, T., Yamamoto, H., Nishijo, H., Mori, H. Bioluminescence imaging of Arc expression enables detection of activity-dependent and plastic changes in the visual cortex of adult mice. **Brain Struct. Funct.**, 216:91-104, 2011.
- Harai, T., Inoue, R., Fujita, Y., Tanaka, A., Horio, M., Hashimoto, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. Decreased susceptibility to seizures induced by pentylenetetrazole in serine racemase knockout mice. **Epilepsy Research** 102:180-187, 2012.
- Mori, H., Inoue, R. Serine racemase knockout mice. **Chemistry & Biodiversity** 7:1573-1578, 2010.
- Mustafa AK, Ahmad AS, Zeynalov E, Gazi SK, Sikka G, Ehmsen JT, Barrow RK, Coyle JT, Snyder SH, Doré S. Serine racemase deletion protects against ischemia and excitotoxicity. **J. Neurosci.** 30:1413-1416, 2010.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J-P., Oliet, S.H.R. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor are gated by different endogenous coagonists. **Cell** 150:633-646, 2012.
- Smith MA, Mack V, Ebner A, Moraes I, Felicetti B, Wood M, Schonfeld D, Mather O, Cesura A, Barker J. The structure of mammalian serine racemase: evidence for conformational changes upon inhibitor binding. **J. Biol. Chem.** 285:12873-12881, 2010.
- Wolosker, H. and Mori, H. Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. **Amino Acids** 43:1895-1904, 2012.