

低分子化合物による蛋白質の形とはたらきの制御

「形とはたらき」領域 袖岡 幹子

要 旨

低分子化合物による蛋白質の形とはたらきの制御のしくみを検証するため、発癌プロモーションとも深い関わりをもつプロテインキナーゼC (PKC) を例に、その“不活性型”コンホマーを安定化するという新しい作用機序による阻害剤の開発研究を行った。活性化剤として知られるホルボールエステルとPKCのリガンド結合部位との複合体の構造を参考に、より合成が容易で適当な結合能を有すると期待されるベンゾラクトン構造を新規なリガンドとして設計し、合成法を確立した。実際に疎水性側鎖を導入したベンゾラクトンが確かにPKCのリガンド結合部位に結合することを確認した。そこでPKCの不活性型コンホマーにぴったりと合う化合物の開発を目指し、ベンゾラクトンの芳香環部またはアシル基を様々な長さのリンカーでつないだ二量体を合成した。その結果、芳香環部の場合は $C_{10} \sim C_{13}$ 程度、アシル基の場合は $C_{10} \sim C_{12}$ 程度のメチレン鎖でつないだ二量体がそれぞれ他の長さのものよりも強くPKCに結合することが判った。

1. 研究のねらい

癌をはじめとする難治疾患の多くは、細胞情報伝達にかかわる蛋白質の機能の異常に起因していることが明らかになりつつある。これら細胞内の情報伝達を担う酵素は、素早い活性のon-offを必要とされ、その活性は特定のアミノ酸残基のリン酸化や低分子リガンドの調節領域への結合などにより巧妙にコントロールされている。申請者は、特に低分子リガンドによる活性調節に着目した。低分子化合物の結合が、酵素に大きな高次構造変化や他の蛋白質との相互作用の変化をもたらす活性が変化すると考えられている。ではいかにして“小人”の低分子リガンドが“巨人”の蛋白質の形を制御することができるのだろうか？おそらくリガンドの結合により活性化する酵素は、もともと“活性型”と“不活性型”のふたつのコンホマーの平衡混合物として存在し、活性型に高い親和性をもつアゴニスト分子が結合すると平衡が活性型側に偏り酵素活性が上昇し、不活性型に高い親和性をもつアンタゴニスト分子が結合すると不活性型側に偏り阻害を示すと考えると、小さなリガンド分子の劇的な効果を理解できる(図1)。

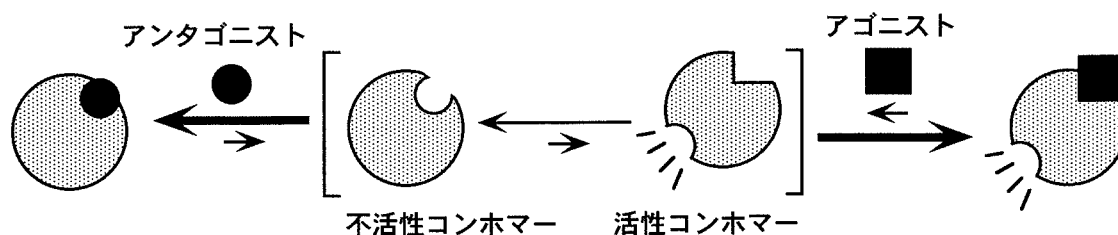


図1. 低分子化合物による活性調節のしくみ

本研究では、上記の仮説を基に細胞情報伝達酵素プロテインキナーゼC (PKC) をとりあげ、そのアンタゴニストおよびスーパーアゴニストを設計合成し、仮説の妥当性を検証することをめざす。PKCは細胞増殖をはじめとする様々な重要な細胞内情報伝達に関っており、実際PKCの強力な活性化剤として知られる天然物はいずれも発癌プロモーション活性を示す。従ってPKCの阻害剤は抗癌剤などの医薬としての可能性が期待され、これまでに多くの阻害剤が報告されている。しかしそのほとんどは他のキナーゼとホモロジーの高い触媒活性中心に結合するため、他の様々なプロテインキナーゼにも阻害活性を示し、選択性に問題が残っている。一方、生理的リガンドであるジアシルグリセロール (DG) の結合部位に結合する化合物として数多くのグリセロール誘導体が合成され、また全く構造が異なるホルボールエステルなどいくつかの天然物も報告された。しかしいずれも強力なPKC活性化能をもつアゴニストであり、アンタゴニスト活性をもつものは見いだされていない。そこで上記の考え方に基づき、PKC活性化の分子メカニズムを推定し、不活性コンホマーに親和性の高い低分子化合物を設計することによりPKC活性化を阻害するアンタゴニストを得ることを計画した。このようなアプローチによりPKCの高選択的阻害剤が得られれば、既存のものとは全く異なる画期的抗癌剤の開発にもつながると期待される。

まず、PKCの一次構造情報、部分的に得られている三次構造情報、ならびに生化学的、分子生物学的実験により得られている情報などをもとにその高次構造と活性化のメカニズムを推定した。PKCの活性化には Ca^{2+} 、ホスファチジルセリン (PS)、そしてDGが必要とされる。PKCの構造は、これらが結合する調節領域と触媒領域 (Cat.) とに大きく分けて考えることができる。調節領域はさらに Ca^{2+} が結合するドメイン (Ca)と、DG及びPSが結合するリガンド結合ドメインに分かれている。さらにこのリガンド結合ドメインはシステインに富む2回の繰り返し配列 (Cysteine Rich Domain: CRD1, CRD2) からなり、その各々がそれぞれ1分子のリガンドと結合しうることがわかっている。またリガンド結合部位

のN-末端側に擬基質配列と呼ばれるキナーゼの活性中心と親和性をもつ配列がある。以上の事実を総合すると図2に模式的に示したように考えることができる。すなわち、PKCはDGなどアゴニスト活性を示すリガンドが存在しない場合には、偽基質配列が活性中心にフタをした形の不活性コンホマーとして大部分細胞質中に存在している。細胞外からの刺激を受けて活性化したホスホリパーゼC (PLC) により細胞膜中で生成したDG (または外来のホルボールエステル等) がCRDに結合すると、PKCの調節領域が大きな高次構造変化をおこし膜に結合した活性コンホマーが安定化される。PKC δ のCRD2のX線結晶構造が既に報告され、ホルボールエステルが結合してもその構造がほとんど変化しないことが明らかになっていることから、この際におこる高次構造変化は、CRD自身の構造が大きく変わるのではなく、CRD1とCRD2の相対位置が変化するものと思われる。この活性化のメカニズムに着目すれば、2つのCRDにそれぞれひとつずつ存在するリガンド結合部位と相互作用する構造 (▼) をリンカーで繋いだ二量体分子は、そのリンカーの種類によってアゴニストまたはアンタゴニスト活性を示すと期待される。

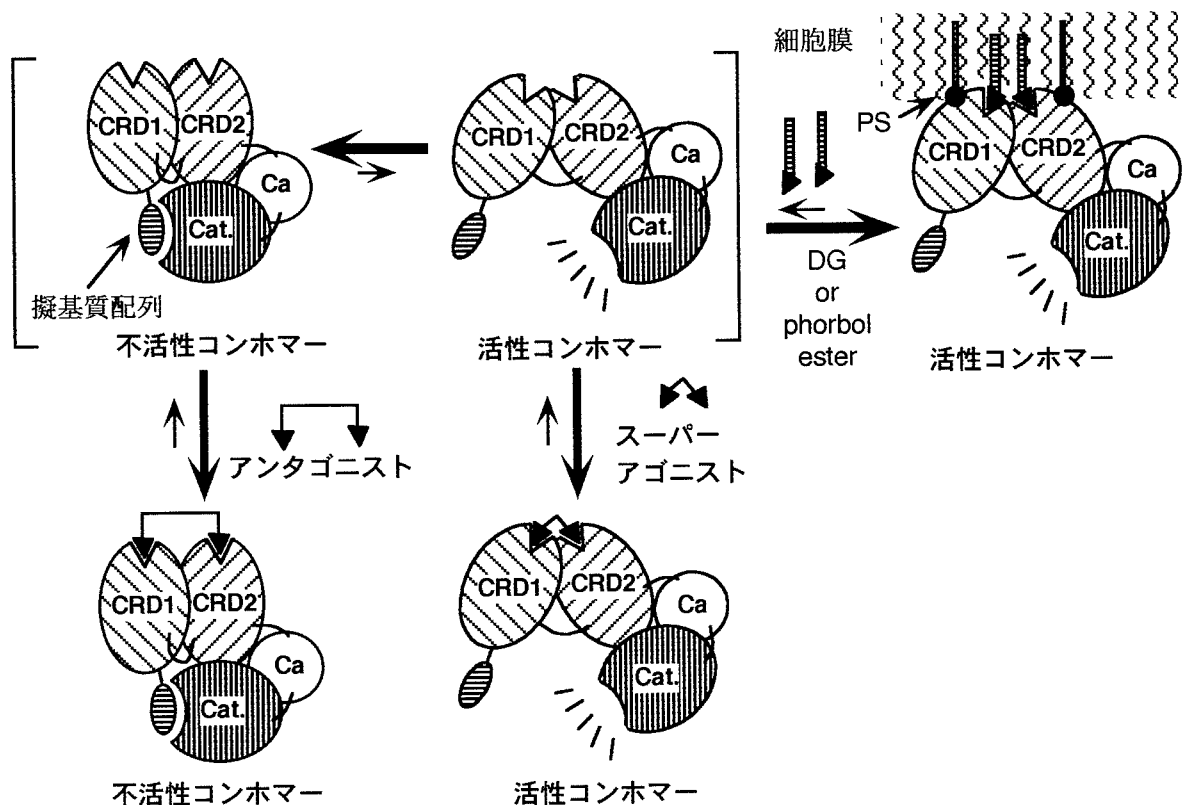


図2. PKC 活性化の推定分子メカニズムと各コンホマーを安定化する分子

すなわち、不活性コンホマーにぴったりとはまるリンカーでつないだ分子は、不活性コンホマーを安定化してアンタゴニスト活性を示し、PKCの選択的阻害剤となりうる。また逆に、活性コンホマーにぴったりとはまるリンカーでつないだ分子は活性コンホマーのみを安定化して強力なアゴニスト活性を示すものと期待され、PSや膜が存在しない状態でもPKCを活性化しうるスーパーアゴニストとなる可能性がある。膜の存在によりX線結晶解析やNMRといった通常の解析手段ではPKCの活性コンホマーの構造を解析する事は困難であると予想されるが、このようなスーパーアゴニストを用いればその解析が可能になるであろう。

2. 研究方法と成果

現在のところ、PKC活性化に伴い2つのリガンド結合ドメインが相対的にどのような位置変化をおこすかについての知見がないため、リガンド結合部位と相互作用する構造(▼)を様々な長さや角度をもつリンカーで繋いだ二量体をいろいろ合成し、そのPKCに対する結合能の比較により、逆に2つのリガンド結合ドメイン間の相対的な関係を推測し、最終的に強力なアゴニスト、アンタゴニストを作り出すという戦略をとる。

2-1 リガンド結合部位と相互作用する新しい基本構造の設計

計画したような不活性または活性コンホマーにぴったりとはまる二量体分子は、2つのリガンド結合部位に同時に相互作用するため、単量体タイプのリガンドの結合よりもエントロピー的にかなり有利であり結合能の大きな上昇が期待される。従って、本研究目的の為の基本となるリガンド構造(▼)としては、単量体として非常に強力に結合するものよりも、単量体の結合能はそこそこで、PKCにぴったりとはまるようなリンカーで繋いで二量体となったときに初めて高い結合能が観測されるものが好ましいと思われる。PKCの強力なリガンドとしてはホルボールエステル(PMAなど)が知られているが、合成の困難さが予想され、また上記の観点からは結合が強力すぎると思われた。一方生理的リガンドであるDGはPKCと相互作用するジアシルグリセロール部分はフレキシブルな構造であるが、2本の疎水性側鎖が脂質膜に挿入することによりコンホメーションが相互作用に有利な形に制御され、リーズナブルな結合能を獲得していると思われる。しかし、そのような疎水性側鎖の作用なしでは十分な結合能をもたないと予想された。そこで、合成的な事を考慮した上でジアシルグリセロールよりももう少しリジッドなリガンドとなりうる基本構造をまず設計することとした。

PKC δ のCRD2とホルボール-12-アセテートとの複合体の結晶構造解析が行われ、図3に示すようにPMAにおけるホルボール部位がPKCのリガンド結合部位と相互作用していることが報告された。特にホルボールエステルの20位の水酸基と3位のカルボニル基はペプチド中のアミノ酸残基との間に複数の水素結合を形成しており、これらの相互作用が結合に極めて重要である事が判った。これらに相当する位置に水酸基とカルボニル基をもち、全体の形、側鎖の位置や方向なども考慮し、グリセロール誘導体の構造活性相関の知見なども参考にして、ベンゾラクトン (BL)を設計した (図3)。

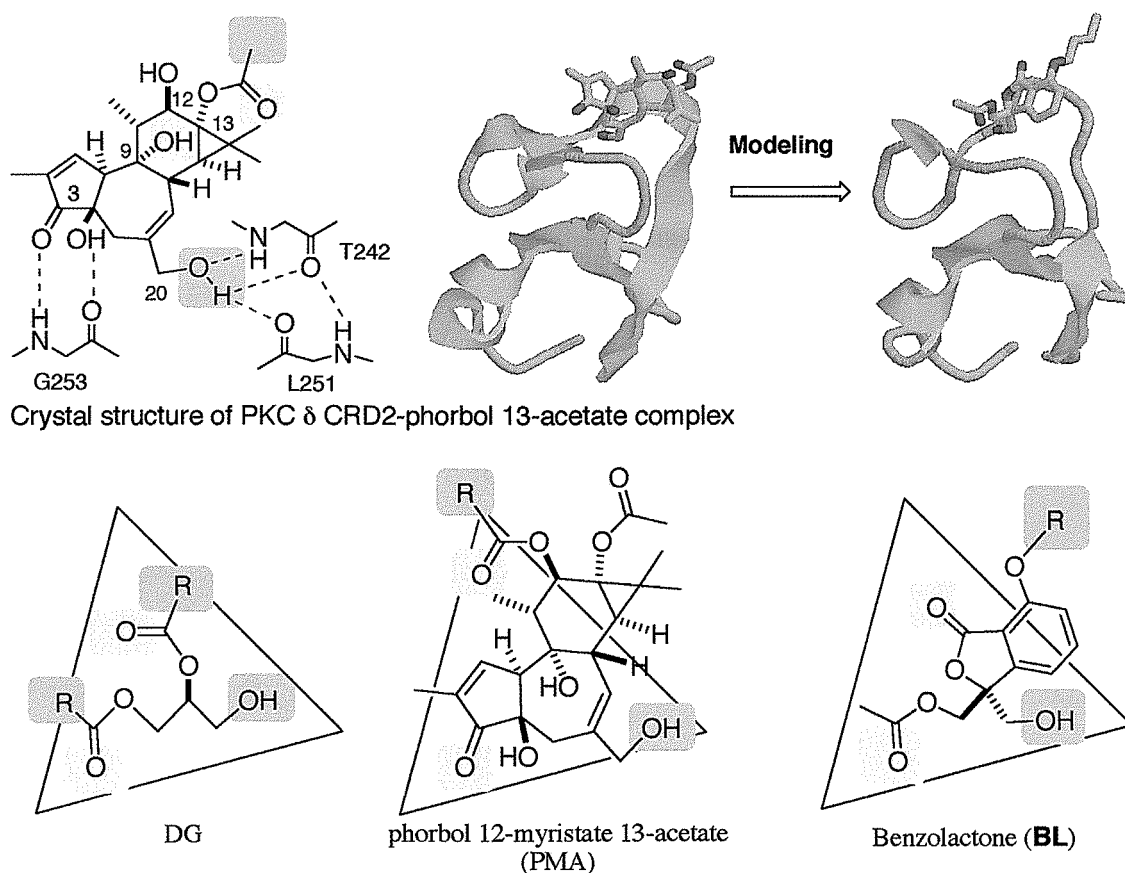


図3. ホルボールエステルとPKCの相互作用とベンゾラクトンの設計

2-2 ベンゾラクトンの合成とPKC α 結合能

ここでまず種々合成法を検討した結果、図4に示すベンゾラクトン (BL) 誘導体の効率良い合成ルートを確認することが出来た。すなわちサリチル酸アミドを出発物質として用い、保護したのちにリチオ化しジヒドロキシアセトンユニットと反応させ、C3 ユニットを導入した。塩基性条件下での閉環、保護基の脱着、さらにジオール1のモノアセチル化反応により、鍵中間体2を得ることに成功した。上記のモデリングの結果から四級不斉炭素の絶対配

置は(*R*)-体でなければならないと予想されたことから、2の両光学異性体を光学異性体分離カラムにより分離した。光学異性体の絶対配置は、片方の異性体を camphanic acid ester へと誘導しそのX線結晶解析を行うことにより決定した。

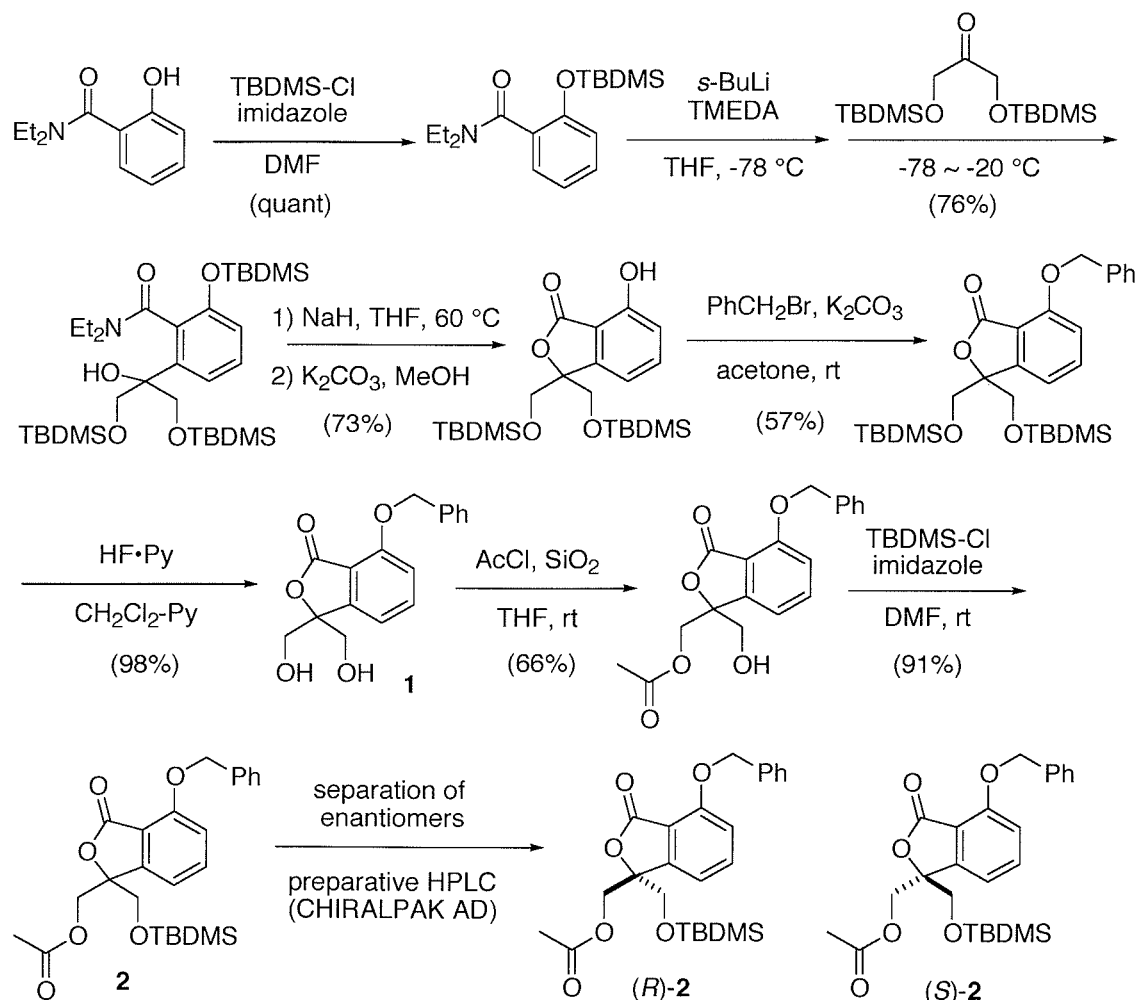


図4. ベンゾラクトン構造の合成

合成に成功したベンゾラクトンの PKC に対する結合能を確かめる為、両光学異性体にそれぞれ適当な疎水性側鎖を導入した誘導体を合成し、PKC α に対する結合能を [3 H]-PDBu (放射性ラベルした phorbol dibutyrate) の結合阻害実験によって測定した (図5)。その結果、ある程度の長さの疎水性側鎖をもつベンゾラクトン誘導体はいずれも PDBu の結合を拮抗阻害し、ベンゾラクトン構造がホルボールエステルと同じ PKC の CRD 領域に結合することが判った。モデリングから予想した通り、(*R*)-の絶対配置をもつものが(*S*)-の絶対配置をもつものよりも強く結合し、IC₅₀ 値から生理的リガンドである DG (diolein : 側鎖が両方オレイン酸) に近い結合能を持つことが明らかとなった。

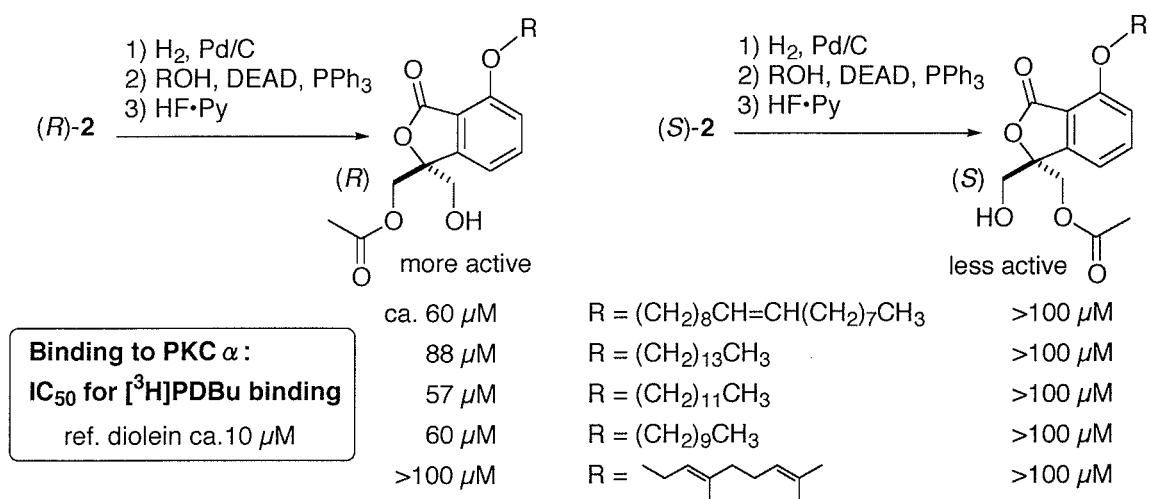


図5. ベンゾラクトン誘導体の PKC 結合能

2-3 二量体の合成

上記の実験から、設計したベンゾラクトンが予想どおり PKC のリガンド結合部位と相互作用する基本構造として機能しうる事が判ったので、次に二量体合成を行った。前述したように PKC のふたつのリガンド結合部位の距離に関する情報が無いため、まず様々な長さのフレキシブルなメチレン鎖リンカーで繋いだ二量体を合成し、その PKC に対する結合能を調べるにより逆に二つの結合部位間の距離を推定しようと考えた。また、モデリングの結果から、ホルボールの12位側鎖の位置に対応する芳香環の部分以外にアセチル基の部分から側鎖を延ばす事も可能と考えられたので、図6に示すようなふたつのシリーズの二量体、BL-X-BL 及び BL-Y-BL を合成し、二つの結合部位の相対的な向きに関する情報も得る事を計画した。

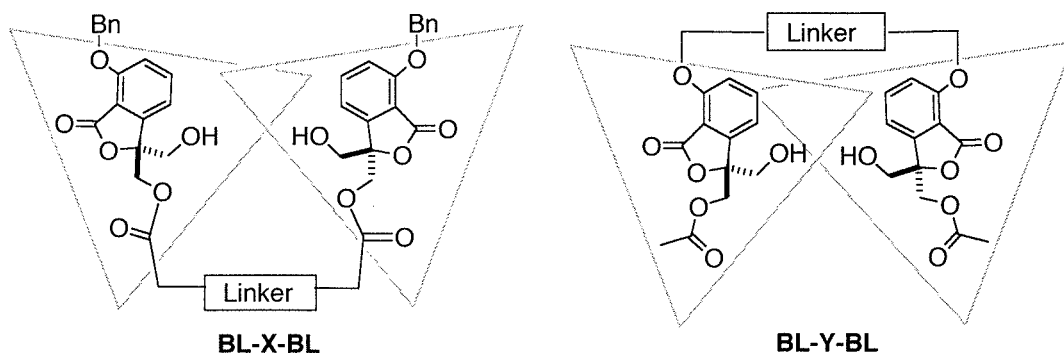


図6. 二量体の設計

BL-X-BL シリーズの合成は、ジオール1の片方をモノシリル化したものを光学分割し、得られた光学活性モノオール(*R*)-3と対応するジカルボン酸の酸クロリドを反応させ、脱保護することにより行った(図7)。BL-Y-BL シリーズは、(*R*)-2と様々なジオールとの光延反応、続く脱保護により合成した。

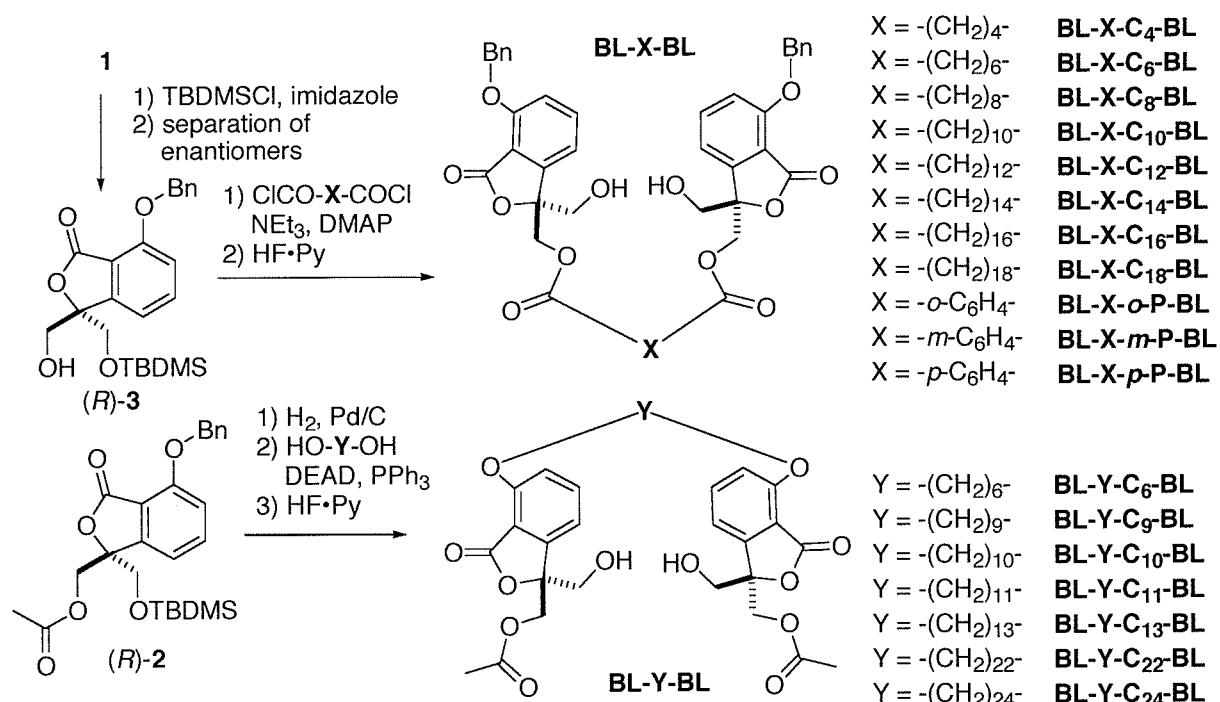


図7. 二量体の合成

2-4 二量体の PKC 結合能

BL-X-BL、BL-Y-BL 両シリーズの二量体化合物の PKC α に対する結合能を [³H]-PDBu の結合阻害実験により測定した(図8)。その結果、アシル基部位をフレキシブルなメチレン鎖でつないだ BL-X-BL シリーズの場合、C₁₀~C₁₂ のものが最も強く結合し、それより長くても短くても結合能が低下する傾向を示した。また、ベンゼン環で直接つないだリジッドな二量体化合物は、いずれも結合能が弱く、100 μ M でも 20% 以下の阻害しか認められなかった。さらに芳香環部分でつないだ BL-Y-BL シリーズの場合にも C₁₀~C₁₃ の長さのリンカーで繋いだ化合物がより強く結合する傾向が見られた。リンカーの長さがちょうどよい場合にはふたつの BL が同時にふたつのリガンド結合部位と相互作用し結合能が上がるとすると、これらの実験事実はふたつのリガンド結合部位間の距離情報を示すものと考えられる。これらの結果がそれぞれ活性、不活性どちらのコンホマーについての情報を表しているのかは、今後酵素活性試験を行って確認する必要がある。

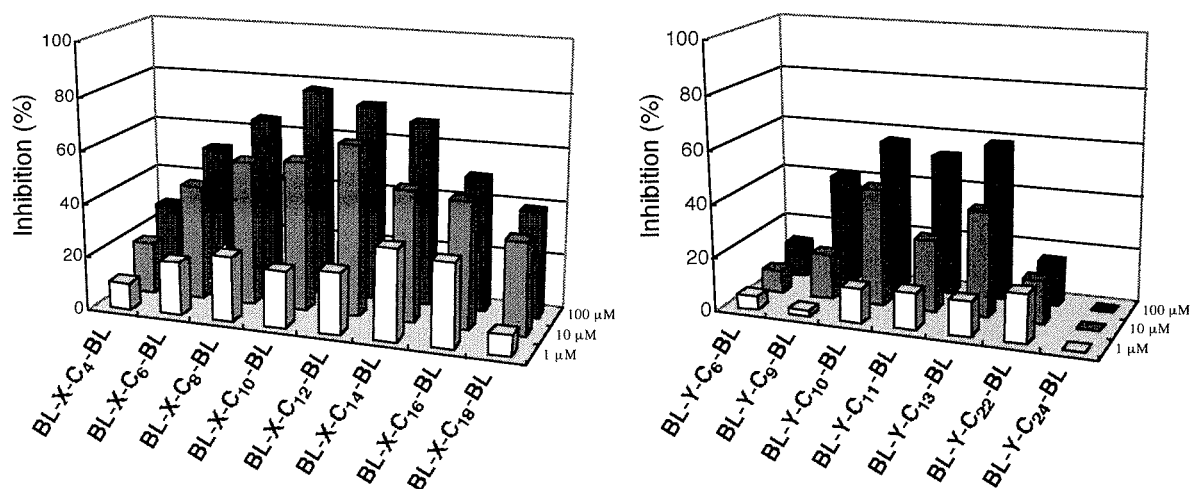


図8. 二量体の PKC 結合能

また、今後リンカー部分の自由度を制限した二量体を種々合成し、より強力な結合能をもつ分子を探索する際に、リンカー部分をコンビナトリアルケミストリー手法を応用して数多く合成する必要がある。そこでカラムクロマトグラフィーなど煩雑な精製操作を必要とせず、に純粋な生成物を得る為の新しい方法論として、ポリスチレン樹脂に担持した活性エステルを用いてアミドを簡便に合成する技術を開発することができた。

3. 今後の展望

今後さらによりリジッドなリンカーを用いた二量体合成を行い、構造活性相関情報が蓄積してきたら、さらにそれらの情報をもとにモデリングにより不活性コンホマーの構造を予測する。それを基にふたつの BL を適切な距離と角度で固定できるリンカーを設計し、PKC のアンタゴニストタイプの強力な阻害剤を開発する。

また、本研究で行った様々なフレキシブルな長さのリンカーで繋いだ二量体をシリーズで合成し、その結合能により PKC のふたつのリガンド結合部位間の距離を推測しようという「分子メジャー」アプローチは、PKC だけでなく様々なふたつのリガンド結合部位を持つ蛋白質にも応用可能な方法論であると考えている。さらに本研究の基本概念である“不活性コンホマー”にぴったりとはまって安定化する分子を創製することにより阻害剤が得られることを実証することができたら、PKC 以外の蛋白質に対する阻害剤開発への応用も可能になると考えている。

4. 発表リスト

論 文

- M. Katoh and M. Sodeoka. "Polymer-Bound N-hydroxysuccinimide Esters: A column-Free Fluorescent-Labeling Method." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 881-884 (1999).

解 説

- 袖岡幹子、“有機合成化学から生命科学へのアプローチ” 有機合成化学協会誌、59, 480-481 (2001)

口頭発表

- 馬場良泰、柳澤武史、袖岡幹子、真弓聡、橋本祐一、“蛋白質の高次構造を認識する機能性分子の開発研究－PKC結合分子の設計と評価－” 日本薬学会第121年会（札幌）2001.3.28.-30.
- Miho Kato, Yoshiyasu Baba, Takafumi Shimizu, Mikiko Sodeoka, "A Column-Free Synthesis of Various Amides, Carbamates, and Ureas Using Polymer-Bound N-Hydroxysuccinimide" 第18回国際複素環会議（横浜）2001.7.29.-8.3.
- 袖岡幹子、“蛋白質の高次構造を制御する分子の開発”、平成12年度 KAST 科学技術セミナー「バイオの科学と技術」（川崎）2001.3.1.
- 袖岡幹子、“有機合成化学から生命科学へのアプローチ” 日本薬学会第121年会依頼講演（札幌）2001.3.28.-30.
- 袖岡幹子、“蛋白質リン酸化制御プローブの開発” 「生体内分子科学」公開シンポジウム（名古屋）2000.11.30.
- 袖岡幹子、“細胞内情報伝達を制御する分子をめざして” 理研シンポジウム「マルチバイオプローブ」（東京）1999.11.26.
- 袖岡幹子、“細胞内情報伝達を制御する分子をめざして”、先端生命有機化学シンポジウム（熊本）1999.10.2.
- 袖岡幹子、“細胞情報伝達を制御する分子をめざして－手法の開発と標的分子の設計” 日本薬学会東海支部薬学特別講演会（名古屋）1999.10.5.
- 袖岡幹子、“細胞内情報伝達を制御する分子をめざして” 東京大学分子細胞生物学研究所セミナー（東京）1999.10.8.