

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05846

研究課題名(和文) 炎症-抗炎症スイッチングに着目したVibsanin類の構造展開と作用機序解析

研究課題名(英文) Structure and activity study and analysis of mechanism of action of vibsanins focused on pro-/anti-inflammatory switching

研究代表者

柳田 亮 (Yanagita, Ryo)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：10598121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴジュ由来のPKCリガンド・vibsanin Aが、これまで知られている中で最もPKC-C1A/C1Bドメイン結合選択性を持つことを明らかにした。分子動力学シミュレーションでは、vibsanin AとPKCとの結合様式を予測し、vibsanin AとC1ドメインとのCH-O相互作用が結合に関与している可能性を提示した。

また、vibsanin Aの低い化学的安定性が酸化され易さに起因していることをLC-MS解析により示した。7員環vibsanin類のvibsanin Cの5,10-di-epi型異性体がPKCリガンドとしての潜在性を持つことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Vibsanin AのPKC結合活性と化学的安定性についての基礎的な知見は、今後vibsaninの作用機序解析や誘導体開発を行ううえでの基盤となる。PKC活性化剤はがん、アルツハイマー病、HIV感染などの治療薬候補として研究が行われており、vibsanin類やその誘導体・アナログはこういった疾患に対する治療薬開発のリードとして有望である。

研究成果の概要(英文)：Vibsanin A, a protein kinase C (PKC) activator isolated from *Viburnum odoratissimum* tree, was found to have about 4000-fold binding selectivity between PKC-C1A and -C1B domains, which is the highest among known PKC ligands. Molecular dynamics simulation presented the binding mode of vibsanin A with the PKC-C1B domain, wherein CH-O interactions are involved. LC-MS analysis suggested that the chemical instability of vibsanin A is attributable to its susceptibility to oxidation. Furthermore, we found that (8Z)-5,10-di-epi-vibsanin C (vibsanin D), not vibsanin C, has the potential as a lead scaffold for developing novel PKC ligands.

研究分野：天然物化学

キーワード：プロテインキナーゼC 構造活性相関 分子動力学シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

C1 ドメインはプロテインキナーゼ C (PKC) をはじめとする 40 種類以上のタンパク質に含まれている (*Curr. Drug Targets* **2008**, 8, 641)。PKC は細胞の増殖、分化、アポトーシスに加えて、アルツハイマー病の原因物質である β アミロイドの分解、潜伏性 HIV の活性化にも関与しているため、PKC を活性化する C1 ドメインリガンドはこれらの疾患に対する治療薬の候補として注目されている (*Curr. Drug Targets* **2008**, 8, 641)。

C1 ドメインリガンドとしては TPA を含む発がんプロモーターがよく知られているが、発がん促進活性を示さないものも見出されている (*Cancer Res.* **1993**, 53, 2507、他多数)。一例として海洋天然物の bryostatin 1 (Bryo-1) がある (*Carcinogenesis* **1987**, 8, 1343)。Bryo-1 は発がん促進活性を示さないため副作用が少ないことが期待され、がん (特に白血病) やアルツハイマー病に対する治療薬として臨床試験が行われてきたが、これまで第 III 相試験まで進めていない。この原因としては、Bryo-1 には期待に反して重度の筋肉痛や頭痛といった副作用があったことが挙げられる (*Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1841)。また最近、Bryo-1 の構造を一部改変したアナログが発がんプロモーター様作用を示したことが明らかにされており (*Biochem. Pharmacol.* **2011**, 81, 1296)、発がんプロモーター様作用を示すような Bryo-1 代謝物が重篤な副作用の原因となっている可能性も考えられる。

最近、ガマズミ属樹木サンゴジュに含まれる vibsantin A が C1 ドメイン結合活性・PKC 活性化能を持つことが明らかにされた (*Cancer Res.* **2016**, 76, 2698)。Vibsantin A は *in vivo* で抗白血病活性を示すにもかかわらず、皮膚に対しては抗炎症誘導作用を示すことから (*Cancer Res.* **2016**, 76, 2698)、副作用の小さい新規創薬シードとして注目されている。Yu らはサンゴジュに含まれる 8 種類の vibsantin 類縁体の活性評価を行い、vibsantin A のみが白血病細胞分化活性を示すことを見出した (*Cancer Res.* **2016**, 76, 2698)。構造活性相関研究としては、vibsantin A の全合成中間体の PKC 活性化能を評価した研究が一例のみ存在する (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 4536)。本研究代表者の研究グループでも vibsantin A が発がんプロモーターに匹敵する高い C1 ドメイン結合能 (解離定数サブ nM オーダー) を示すことを確認している。

C1 ドメインリガンドの作用機序には、標的タンパク質の活性化とその場所、その後の分解など様々な因子が関与している。C1 ドメインリガンドには発がんプロモーターと非発がんプロモーターが存在し、非発がんプロモーターもわずかな構造改変によって発がんプロモーター様活性を示しうる。どちらも標的タンパク質を活性化するという点で、これらはアゴニスト-アンタゴニストの関係とは異なる。なぜこういった対照的な活性が現われるかについては様々な仮説が提示されているものの (*Mol. Pharmacol.* **1994**, 46, 840、他多数) 不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、抗炎症誘導活性を示すユニークな C1 ドメインリガンドである vibsantin A をリードとして発がんプロモーター様活性を示す誘導体を開発するための基盤として、vibsantin A の PKC に対する結合能を C1 ドメインレベルで精密に調べること、vibsantin A 類縁体と合成誘導体の結合能評価ならびに計算化学的手法による C1 ドメインとの結合様式の精密な予測、そして vibsantin A の特異な生物活性の一因と推測される化学的不安定性の原因について調べることも目的とする。

また、vibsantin A 様の 11 員環 vibsantin 類以外の類縁体の PKC C1 ドメイン結合能を評価する。

3. 研究の方法

(1) Vibsantin A のアイソザイム選択性ならびに C1 ドメインレベルの選択性の評価

全長のリコンビナント PKC α および δ 、ならびに化学合成した PKC α -C1A、 α -C1B、 δ -C1A、 δ -C1B ペプチドに対する結合能を評価する。

(2) Vibsantin A の構造活性相関研究

サンゴジュから単離した 11 員環 vibsantin 類と、vibsantin A から合成した誘導体の PKC C1 ドメ

イン結合能を評価する。

(3) Vibsantin A と PKC C1 ドメインとの結合様式の予測

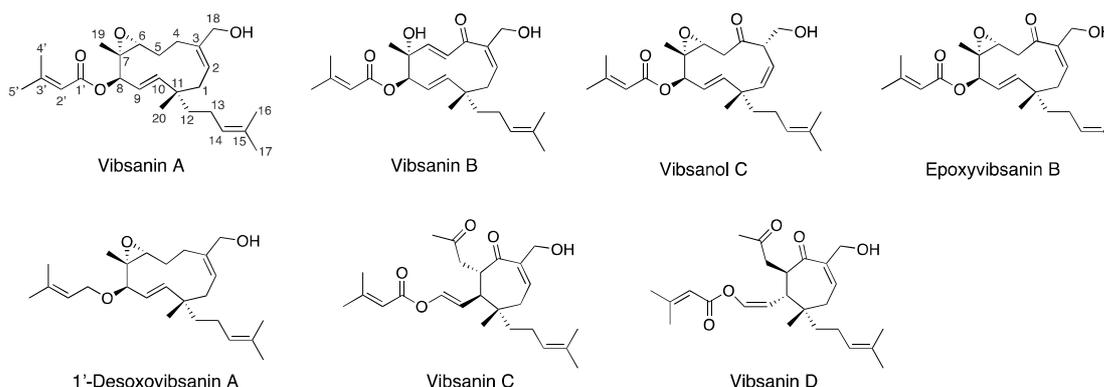
脂質二重膜と PKC C1 ドメインと vibsantin A の複合体の分子動力学シミュレーションと結合自由エネルギー計算を行う。

(4) Vibsantin A の安定性試験

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中での半減期を調べる。PBS 溶液の液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) 解析を行い、分解物を推定する。

(5) 11 員環 vibsantin 類以外の類縁体の活性評価

Vibsantin B から誘導できる類縁体の PKC 結合能を評価する。



4. 研究成果

(1) Vibsantin A のアイソザイム選択性ならびに C1 ドメインレベルの選択性の評価

PKC アイソザイムのうち、ユビキタスに発現している PKC α および δ に対する結合能をトリチウム標識したホルボールエステル誘導体 [^3H]PDBu 競合結合試験により評価した。Vibsantin A の PKC α および δ に対する結合阻害定数 K_i はそれぞれ 12 nM および 14 nM で、Yu ら (*Cancer Res.* **2016**, 76, 2698) によって報告されている値と大きな違いはなかった。その一方で、[^3H]PDBu 結合阻害曲線は特に PKC δ において顕著な二相性を示したことから、vibsantin A が PKC 中の 2 つの C1 ドメイン、すなわち C1A および C1B ドメイン間で大きな結合選択性を持つことが示唆された。そこで次に、化学合成した PKC α -C1A、 α -C1B、 δ -C1A、 δ -C1B ペプチドに対する結合能を評価した。Vibsantin A の α -C1A、 α -C1B、 δ -C1A、 δ -C1B ペプチドに対する結合能はそれぞれ 1100 nM、42 nM、1400 nM、0.28 nM だった。発がんプロモーターは PKC α では C1A、PKC δ では C1B ドメインが主要結合部位であることが知られている。Vibsantin A の α -C1A/ δ -C1B に対する K_i の比は約 4000:1 とこれまで知られている PKC リガンドの中で最も δ -C1B 選択性が高かった。

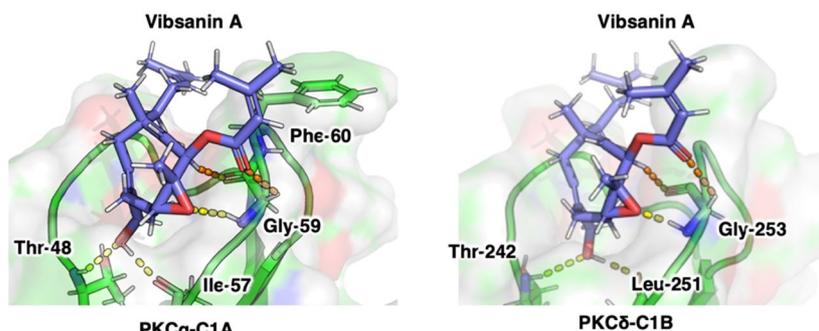
(2) Vibsantin A の構造活性相関研究

サンゴジュから単離した 11 員環 vibsantin の vibsantin B、vibsantinol C、epoxyvibsantin B と、vibsantin A の 1' 位カルボニル基を除去した 1'-desoxovibsantin A の PKC C1 ドメイン結合能を評価した。Vibsantin B、vibsantinol C、epoxyvibsantin B は α -C1A に全く結合せず、 δ -C1B に対する K_i はそれぞれ 230 nM、50 nM、75 nM だった。この結果は、11 員環上のエポキシ基が PKC 結合能に重要であることを示唆している。一方、1'-desoxovibsantin A の α -C1A および δ -C1B に対する K_i はそれぞれ 1800 nM および 3.3 nM であり、vibsantin A よりも結合能が低下していたため、エステル基の存在が vibsantin A の高い結合能と δ -C1B に対する結合選択性に寄与していることが明らかとなった。

(3) Vibsantin A と PKC C1 ドメインとの結合様式の予測

脂質二重膜中での vibsantin A または 1'-desoxovibsantin A と PKC α -C1A ドメインまたは PKC δ -C1B ドメインとの複合体の分子動力学シミュレーションを行った。次に Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) 法と経験的な予測膜移行エネルギーを組み合わせて、リガンドと C1 ドメインの結合自由エネルギーを予測した。構造活性相関の結果と一致して、vibsantin A のエポキシ基は C1 ドメインと水素結合を形成していた。一方で、エステル基の 1'-カ

ルボニル基は C1 ドメインと水素結合ではなく CH-O 相互作用を主に形成していた。予測結合自由エネルギーと MM-PBSA エネルギーのアミノ酸残基毎の分解からは、vibsanin A と 1'-desoxovibsanin A の結合自由エネルギー差が 23 番目のグリシン残基との相互作用の差によること、vibsanin A の高い α -C1A/ δ -C1B 選択性は特定のアミノ酸残基との相互作用に起因するものではないことが示された。



(4) Vibsanin A の安定性試験

Vibsanin A がなぜ炎症誘導活性を示さないかについて、その化学的不安定性によって PKC の長期的な活性化とそれに続く分解が起こらず、細胞内に機能的な PKC アイソザイムが残存する、という仮説が考えられる。そこで、まず vibsanin A および 1'-desoxovibsanin A のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、37 °C での半減期を調べた。半減期はそれぞれ 20.0 時間、10.7 時間であり、エステル基の加水分解が水溶液中での不安定性の原因ではないことが示唆された。そこで次に、インキュベーション後の vibsanin A の PBS 溶液の液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) 解析を行った。LC-MS では vibsanin A の分子イオンピークの m/z よりも 14 大きい m/z のイオンが広い保持時間範囲で観察された。この結果は、vibsanin A の水溶液中での主要な分解経路の始まりが、酸化によるものであることを示唆している。今後、vibsanin A の酸化を受け易い部位を修飾した誘導体を合成することで、化学的安定性が向上した vibsanin A 等価体の開発が期待できる。また、化学的安定性が高い vibsanin A 等価体は、vibsanin A が炎症誘導活性を示さない理由を探るための比較対象分子として利用することができる。

以上の成果は文献 1 で発表済である。

(5) 11 員環 vibsanin 類以外の類縁体の活性評価

Yu ら (*Cancer Res.* **2016**, *76*, 2698) は、1 員環型 vibsanin 類 7 種類の HL-60 細胞分化誘導活性を評価しているが、11 員環以外で評価を行ったのは 7 員環型の vibsanin C のみであった。そこで、11 員環以外の vibsanin 類の PKC リガンドとしての潜在性を調べるために、vibsanin C と vibsanin D ((8Z)-5,10-di-*epi*-vibsanin C) の PKC δ -C1B に対する結合能を評価した。その結果、vibsanin C が全く結合能を示さなかったのに対して、vibsanin D はわずかながら δ -C1B ペプチドに対して結合した。この結果は vibsanin D 型の立体配置を持つ vibsanin 類が PKC リガンドとしての潜在性を有していることを示唆しており、11 員環型以外の vibsanin 類は新規骨格を有する PKC リガンドのリードとして利用できる可能性がある。

引用文献:

- 1) Yanagita, R. C.; Otani, M.; Hatanaka, S.; Nishi, H.; Miyake, S.; Hanaki, Y.; Sato, M.; Kawanami, Y.; Irie, K. Analysis of binding mode of vibsanin A with protein kinase C C1 domains: An experimental and molecular dynamics simulation study. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1260*, 132866.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yanagita Ryo C., Otani Mao, Hatanaka Satoshi, Nishi Hiroto, Miyake Shota, Hanaki Yusuke, Sato Masashi, Kawanami Yasuhiro, Irie Kazuhiro	4. 巻 1260
2. 論文標題 Analysis of binding mode of vibsanin A with protein kinase C C1 domains: An experimental and molecular dynamics simulation study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Structure	6. 最初と最後の頁 132866 ~ 132866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molstruc.2022.132866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川浪 康弘 (Kawanami Yasuhiro) (30169742)	香川大学・農学部・教授 (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関