

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22350074

研究課題名（和文） たんぱく質間相互作用を制御する有機分子の創製

研究課題名（英文） Design of synthetic agents that disrupt protein-protein interactions

研究代表者

大神田 淳子 (OHKANDA JUNKO)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50233052

研究成果の概要（和文）：平坦で広い作用面が関わるたんぱく質間相互作用(PPIs)に対し、合成有機分子を基盤とする阻害剤を設計する新規な手法として、モジュールアセンブリ法を検討した。対象となるたんぱく質表面を構造上の特徴に基づいて分割し、局所的な表面と相補的に結合する低分子モジュールを設計し、これらをスペーサーによる共有結合、金属錯体形成、標的たんぱく質表面上でのケミカルライゲーション反応、によって組み上げることにより、たんぱく質表面に対して複数の作用点を持つ集積体を導いた。一例として、活性ポケットと表面を認識するモジュールを連結したアンカー型酵素阻害剤は、K-Ras と FTase の過渡的 PPI を nM で阻害することを明らかにできた。さらに、ペプチドミメティクスとグアニジル基の導入で、sub μ M で細胞活性を示す化合物の取得に成功した。

研究成果の概要（英文）：Low-molecular-weight compounds that disrupt protein-protein interactions (PPIs) have tremendous potential applications as clinical agents and as chemical probes for investigating intracellular PPI networks. However, disrupting PPIs is extremely difficult due to the large, flat interfaces of many proteins, which often lack structurally defined cavities to which drug-like molecules could bind in a thermodynamically favorable manner. In this study, we examined the module-assembly strategy for designing PPI inhibitors, in which small module compounds are designed and assembled either by covalent linking with a linker, metal coordination, or chemical ligation on the targeted protein surface, to create a multivalent agent. For example, covalent linking of two modules designed for an active site and a PPI interface led to a potent bivalent agent that disrupt transient protein-protein interactions between protein prenyltransferases and K-Ras protein. These agents demonstrated significant inhibition activity against both farnesylation and geranylgeranylation of K-Ras C-terminal oligopeptide. Furthermore, structural modification by introducing guanidyl groups and peptidomimetics improved the cell permeation of agents, resulting in submicromolar inhibitors for FTase in cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物有機化学・医薬品化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：たんぱく質間相互作用、阻害剤、分子設計、金属錯体、K-Ras、プレニル転移酵素、14-3-3 たんぱく質

1. 研究開始当初の背景

(1) たんぱく質間相互作用 (protein-protein interactions; PPIs) は分化・増殖、細胞死、老化等多様な生体反応を司る情報伝達系において重要な働きを担っており、近年新薬の標的として広く注目されている。ところがその作用面は浅く広いために drug-like な低分子合成化合物を用いた創薬が極めて難しい。

(2) 抗体医薬はたんぱく質の広い作用面を特異的に認識し結合するため、たんぱく質間相互作用の制御を可能とするが、細胞透過性の欠如、経口投与が不可能、高い生産コスト等、の課題が残されており、抗体と相補的に用いることのできる合成分子を基盤とする薬剤設計法の開発が望まれている。

(3) 1997年、Schepartz、Hamilton に代表される欧米のグループによって、たんぱく表面構造を模倣した抗体様のマクロ分子を使うプロテオミメティクス研究が開始され、抗体様の中サイズ分子を用いることで、生体内のたんぱく質間相互作用を制御できることが示された。だが、これらの分子はいずれも分子量が大きく、抗体が持つ本質的な問題の解決には至っていない。

2. 研究の目的

(1) 予め適当な官能基を導入した有機低分子化合物を以下に示す種々の手法で組み上げて、中分子サイズの PPI 阻害剤を構築するモジュールアセンブリ法を開発する。この戦略は、低分子量の単分子を用いる PPI 薬剤設計では達成が難しい、1. 結合部位選択性の向上、2. 分子量の軽減、3. 簡便な構造多様性の導入、4. 膜透過性の向上、等の課題に対する有効なアプローチになると期待される。研究期間内では、以下(2)~(4)に示す手法の検討を行う。各々においては、主として、モジュールの合理的設計と合成、集積化の手法の確立、遺伝子組み換えたんぱく質を用いた *in vitro* での活性評価、(2)については細胞活性評価までを検討する。検討結果に基づいて総合的に、新規 PPI 阻害剤の分子設計法としてのモジュールアセンブリ法の可能性を検証する。

(2) アンカー型酵素阻害剤：

PPI 阻害剤の結合選択性の確保と分子サイズの軽減を達成するために、活性ポケットに結合するモジュール分子と、K-Ras との PPI 作用面へ結合する表面モジュールを、適切な長さのスペーサーで連結したアンカー型酵素阻害剤を調製し、活性ポケットへの結合を足掛かりに、i) 平坦なたんぱく質表面上へ最小限にサイズを絞った低分子モジュールを配

置することが可能か、ii) モジュールの組み合わせで PPI 阻害能が向上するか、iii) 結合選択性が確保されるか、iv) 細胞透過性を持ち、細胞内標的に対する阻害活性を示すか、を検証する。作業仮説検証のためのモデルとして、抗がん剤標的として研究が進んでいるプレニル転移酵素 FTase、GGTase-I と K-Ras の過渡的 PPI に焦点を当て、酵素の結晶構造に基づいたアンカー型阻害剤の合理的設計と、*in vitro* 評価と細胞活性評価を検討する。

(3) 金属錯体：

構造多様性に富むライブラリの創出へ応用が期待される金属錯体を基盤とした PPI 阻害剤の創出法を検討する。サイズと官能基に変化を持たせた種々のビピリジン配位子を使い、6 配位 8 面体の対称・非対称 Ru 錯体を合成し、Hela 細胞アポトーシス抑制効果の評価、各種プロテアーゼ類の選択的阻害活性を持つ錯体を探索する手法を開発する。また、広い分子表面の供与に有効と考えられる平面 4 面体の Pd 錯体のたんぱく質表面認識能を検討する。

(4) 標的たんぱく質表面上での Chemical Ligation：

標的たんぱく質表面上で隣接して結合すると、局所濃度の上昇によってケミカルライゲーション反応を起こす反応点をそれぞれ導入した 2 個のモジュールを設計し、標的たんぱく質上で PPI 阻害剤へ変換するモデル系を構築する。仮説の検証には、リン酸化信号伝達経路の制御たんぱく質である 14-3-3 たんぱく質とリン酸化ペプチドと安定な三者会合体を形成するジテルペン系天然物フシコクシンを用い、フシコクシン誘導体とリン酸化ペプチド間のケミカルライゲーション反応に対する 14-3-3 たんぱく質の鑄型効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) アンカー型酵素阻害剤：

酵素活性ポケットに結合するアンカーモジュールとして、テトラペプチド CVIM もしくは膜透過性と生体内安定性に優れた CVM ペプチドミメティクスを、FTase と GGTase-I に共通する酸性 PPI 作用面を認識するモジュールとして塩基性官能基を導入した没食子酸誘導体を設計し、スペーサーで連結した化合物を有機合成化学的に調製する。遺伝子組み換え型 FTase または GGTase-I と K-Ras モデルペプチドの酵素反応を蛍光強度の時間変化を指標としたアッセイにより、合成分子の PPI 阻害活性を評価する。一方、BODIPY 蛍光タグを付与した化合物を合成し、ヒト肺がん細胞を用い共焦点蛍光顕微鏡にて膜透過

性を検証する。アミノ基のグアニジル基への変換とテトラペプチド CVIM 部位のペプチドミメティクス化を検討し、膜透過性の改善を図る。また、表面認識モジュールの置換基の位置や数を変化させた誘導体を種々合成し、構造活性相関を検討する。

細胞透過性を示す化合物について、Ras 変異由来膀胱がん細胞を用いたアッセイを行い、細胞内 FTase に対する阻害活性を評価する。

(2) 金属錯体：

種々の構造と官能基を持つルテニウムビピリジン錯体のたんぱく質表面認識能と酵素阻害活性の相関関係の検討、パラジウムビピリジン平面錯体のたんぱく質認識能の評価、を通じ、金属錯体の PPI 阻害剤としての応用を検討する。対称および非対称ルテニウムビピリジン錯体は段階合成法で調製し、錯体の構造とキモトリプシンとチトクローム c に対する結合能と阻害活性、これらと構造の相関を比較検討する。HeLa 細胞に対する錯体の細胞透過性とアポトーシス抑制活性を評価する。

(3) 標的たんぱく質表面上での Chemical Ligation：

14-3-3 たんぱく質と天然物フシコクシンおよびリン酸化ペプチドの複合結晶構造に基づいたモジュールの設計を行う。フシコクシンの 19 位水酸基を選択的に化学修飾し、アルキルスパーサーを介してエポキシドを付与したモジュールを有機合成化学的に調製する。また、Fmoc 固相合成法により、C 末端にシステインを持つペプチドモジュールを各種合成する。一方、遺伝子組み換え型 14-3-3 たんぱく質は大腸菌より発現し、His-tag 法により精製したのち、His-tag の除去、ゲルろ過による精製の後、*in vitro* 評価に用いる。等温滴定カロリーメトリーにより、14-3-3 とモジュール類の結合定数の測定を行う。モジュール間ライゲーションの反応速度における 14-3-3 誘導体効果を HPLC で検討する。

4. 研究成果

(1) アンカー型酵素阻害剤：

難治性がんに見出される変異 K-Ras たんぱく質は、FTase と GGTase-I との過渡的たんぱく質相互作用を通して異常に活性化される。本研究では、FTase の活性ポケット認識モジュールとして調製したテトラペプチドと、酸性 PPI 作用表面を認識するモジュールとして設計した 1 級アミノ基含有没食子酸誘導体を連結したアンカー型化合物が、標的酵素の表面と活性ポケットを同時認識すること、その結果、K-Ras4B モデルペプチドのファルネシル

化を 5 nM と極めて低濃度で阻害すること、モジュール類は活性が μM 程度に留まるか、もしくは全く不活性であり、モジュールの組み合わせによる加算性が認められる、FTase と GGTase-I の共通表面構造を認識するモジュールを取り付けることで、両者に対する dual 阻害剤を得ることができる、等を明らかにすることができた。

一方、これらの化合物に BODIPY を付与した蛍光プローブを用い、細胞膜透過性を評価したところ、CVIM テトラペプチドモジュール部位のペプチドミメティクス化が、細胞透過性の改善に有効であることが分かった。そこで、アミノ基をグアニジル基に改変し、導入位置を変化させるなどしたペプチドミメティクス含有アンカー型誘導体 20 種類を合成し、構造活性相関を検討した。その際、FTase および GGTase-I に対する *In vitro* 阻害活性評価を効率良く実施するために、蛍光基質による High-Throughput スクリーニング法を確立した。この方法により、従来よりもアッセイに要する時間を 1/7 程度と大幅に短縮できた。構造活性相関の検討結果として、グアニジル基が 3 個持つ化合物は 2 個のものよりも活性が高く、2 位置換の化合物は立体障害により活性が著しく低下するなど、芳香族環に導入したグアニジル基の位置と数に明らかな相関関係が認められ、グアニジル基が FTase の酸性領域に適正に配置されることが重要であった。またグアニジル基誘導体は対応するアミノ基含有誘導体に比較して約 5 倍の活性を示し、グアニジル基が酸性たんぱく質表面との相互作用に優れた官能基であることも見出した。

Ras 変異由来膀胱がん細胞を用いた増殖抑制試験において、グアニジル基含有誘導体はアミノ基含有の化合物に比べて高い細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。さらに、HDJ-2 たんぱく質のファルネシル化に対する阻害活性を Western blot で評価したところ、nM レベルの阻害活性を示すことを明らかにできた。

以上より、本研究では、細胞活性を有するアンカー型阻害剤を得ることに成功した。本阻害剤は、K-Ras たんぱく質間相互作用阻害剤の開発に向けたリード化合物として期待される。

(2) 金属錯体：

非対称トリスルテニウムビピリジン錯体を合成し、錯体の構造とキモトリプシンとチトクローム c に対するたんぱく質表面認識能との相関を検討した。その結果、フェニルアラニンを導入したビピリジンから調製した対称錯体と、1 個の配位子を無置換ビピリジンに

置換した非対称錯体では、標的となるたんぱく質の大きさによって会合体形成時の量論比が変わることを見出し、錯体のトポロジーを意図的に変化させることで、金属錯体—たんぱく質複合体の構造を制御することが可能であることを明らかにした。また、共焦点顕微鏡による観察結果から、ビピリジン錯体は A549 細胞に対して良好な膜透過性を示したが、細胞内チトクローム c の PPI 阻害に基づくアポトーシス阻害活性は認められず、少なくとも 20 μM では細胞毒性を示さなかった。この結果は、発光性ルテニウム錯体の細胞内プローブとして応用できる可能性を示唆している。一方、ビピリジンの 4,4'位にイソフタル酸を介してフェニルアラニン、グルタミンを導入した配位子を合成し、酢酸パラジウムとの反応により、ビスビピリジンパラジウム錯体の合成を達成した。最終段階で保護基の除去を種々の条件下で検討したが、錯体が分解し、目的物を得るには至らなかった。平面錯体の検討を進めるうえでは合成経路の見直しが必要であり、今後の検討課題である。

(3) 標的たんぱく質表面上での Chemical Ligation :

合成したモジュールの 14-3-3 たんぱく質への結合能を等温滴定熱量測定により評価した。50mM トリス緩衝液中、14-3-3 とリン酸化ペプチド QSYpTC の解離定数は 0.41 μM であり、QSYpTV に比べてやや高い親和性を示した。フシコクシン誘導体を共存させて同様の滴定実験を行うと、解離定数は低下し ($K_d = 0.046 \mu\text{M}$)、フシコクシンによる 3 者会合体安定化効果が観察された。

一方、フシコクシン誘導体と QSYDC を上述の条件下で混合し、反応開始 8 時間後の 1:1 付加体の生成量比を、HPLC で分析した結果、スペーサーがなくエポキシドが直結した化合物に 14-3-3 を共存させると、付加体の生成量は 14-3-3 が無い場合の 37% とむしろ抑制されたが、スペーサーを導入した誘導体では、いずれも 14-3-3 存在下で付加体生成量が増加し、その程度はスペーサー長により変化した。メチレン鎖数が 2 のとき増加率は最大となり、200% であった。これらの結果から、スペーサーの導入によりエポキシドとチオールが反応に適切な位置に配置されることが重要であることが分かった。

以上のように、14-3-3 たんぱく質のリン酸化ペプチド結合溝におけるケミカルライゲーション反応を検討し、結晶構造に基づき論理的に設計した天然物 FC 由来およびリン酸化ペプチド由来のモジュールをそれぞれ化学合成した。これらのモジュールの構造改変を通じて反応性と反応点の位置調整を行い、14-3-3 たんぱく質表面がこれらモジュールの

ケミカルライゲーション反応を促進する鑄型として機能することを明らかにできた。今後は、それぞれの FC 誘導体から得られる付加体の、14-3-3 たんぱく質への親和性を検討し、14-3-3 たんぱく質間相互作用の阻害剤としての機能評価を行う必要がある。これらの知見に基づいて、細胞内でのモジュールアセンブリを基軸とする 14-3-3 信号伝達系の制御に向けて展開していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① D. Hayashi, N. Kato, T. Kuzuyama, Y. Sato, J. Ohkanda, Antimicrobial *N*-(2-chlorobenzyl)-substituted hydroxamate is an inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, *Chemical Communications*, 査読有, 2013, in press, DOI: 10.1039/c3cc40758f.
- ② S. Machida, M. Tsubamoto, N. Kato, K. Harada, J. Ohkanda, Peptidomimetic modification improves cell permeation of bivalent farnesyltransferase inhibitors, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 査読有, 2013, in press. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.09.061.
- ③ T. Maki, A. Kawamura, N. Kato, J. Ohkanda, Chemical ligation of epoxide-containing fusicoccins and peptide fragments guided by 14-3-3 protein, *Molecular BioSystems*, 査読有, 2013, 20, 583-593. DOI: 10.1039/c2mb25388g.
- ④ Y. Yamaguchi, N. Kato, H. Azuma, T. Nagasaki, J. Ohkanda, Protein recognition of hetero-/homoleptic ruthenium (II) tris(bipyridine)s for \bullet -chymotrypsin and cytochrome c, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 2012, 22, 2354-2358. DOI:10.1016/j.bmcl.2011.12.087
- ⑤ S. Machida, N. Kato, K. Harada, J. Ohkanda, Bivalent inhibitors for disrupting protein surface-substrate interactions and for dual inhibition of protein prenyltransferases, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, 2011, 133, 958-963. DOI:10.1021/ja1086112.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 大神田淳子, K-Ras タンパク質間相互作用

- 用の制御を指向したグアニジル基含有アンカー型ファルネシル転移酵素阻害剤の細胞活性評価、日本化学会第93春季年会、2013年3月22日、立命館大学(滋賀県)
- ② 大神田淳子、たんぱく質表面を標的とする有機分子の創製」、産研テクノサロン、2013年2月1日、大阪大学産業科学研究所(大阪府)
- ③ 大神田淳子、Toward selective inactivation of K-Ras: Bivalent dual inhibitors for disrupting protein-protein interactions of protein prenyltransferases, 16th SANKEN International Symposium 2013, 2013年1月23日、大阪大学(大阪府)
- ④ 大神田淳子、たんぱく質間相互作用(PPIs)に対する低分子創薬の可能性を追って～モジュールアセンブリによる中分子の創製とPPIs制御および検出～、第13回CTCセミナー東京理科大学がん医療基盤科学技術研究センター、2012年10月30日、東京理科大学(千葉県)
- ⑤ 大神田淳子、Assembling small molecules for disrupting and detecting protein-protein interactions, 2012年10月8日、Department of Pharmaceutical Sciences of College of Pharmacy, University of South Florida(フロリダ、アメリカ)(招待講演)
- ⑥ 大神田淳子、Assembling small molecules for disrupting and detecting protein-protein interactions, Institute for Chemical Research, Kyoto University, 領域講演会、2012年7月18日、(京都府)
- ⑦ 大神田淳子、Assembling small molecules for disrupting and detecting protein-protein interactions, 2012年6月7日、Department Seminar, Department of Chemistry, University of Minnesota, Minneapolis(ミネソタ、アメリカ)
- ⑧ 大神田淳子、Assembling small molecules for disrupting and detecting protein-protein interactions, 2012年6月5日、Department Seminar, Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco(カリフォルニア、アメリカ)
- ⑨ 大神田淳子、タンパク質間相互作用の制御を目指したグアニジル基含有ファルネシル転移酵素阻害剤の設計と機能、日本化学会第92春季年会、2012年3月27日、慶応大学(神奈川)
- ⑩ 大神田淳子、細胞内たんぱく質間相互作用の制御を目指して:グアニジン含有アンカー型酵素阻害剤を創る、第14回生命化学研究会、2011年12月3-4日、白浜(和歌山)
- ⑪ 大神田淳子、フシコクシン誘導体による14-3-3たんぱく質の細胞内蛍光標識化、第67回産業科学研究所学術講演会、2011年11月22日、大阪大学(大阪)
- ⑫ 大神田淳子、Bipyridine metal complexes for protein surface recognition, 14th Asian Chemical Congress, 2011年9月6日、バンコク国際会議場(バンコク、タイ)(招待講演)
- ⑬ 大神田淳子、たんぱく質-たんぱく質間相互作用を制御する有機分子を創る-抗体医薬を補えるか?低分子創薬の可能性を追って-、有機合成化学協会関西支部セミナー化学千一夜、2011年7月30日、花王(株)有田研修所(和歌山)
- ⑭ 大神田淳子、たんぱく質-たんぱく質間相互作用を制御し検出するための有機分子の創製、理研ケミカルバイオロジー研究領域勉強会、2011年4月27日、理研・和光研究所(埼玉)
- ⑮ 大神田淳子、Assembling small molecules for disrupting and detecting protein-protein interactions, CBC Department Seminar, 2011年3月9日、Nanyang Technological University, (シンガポール)
- ⑯ 大神田淳子、Module assembly for disrupting protein-protein interactions and dual inhibition of prenyltransferases. Pacifichem2010, 2010年12月16日、ハワイコンベンションセンター(ハワイ、アメリカ)(招待講演)
- ⑰ 大神田淳子、Module assembly for disrupting protein-protein interactions, AIST Colloquium for Future-Pioneering 2010年12月10日、奈良先端技術大学院大学(奈良、日本)(招待講演)
- ⑱ 大神田淳子、たんぱく質間相互作用の制御・検出のための有機分子の創製、2010年10月8日、九州大学先端化学研究所講演会、九州大学先端化学研究所(福岡)
- ⑲ 大神田淳子、たんぱく質-たんぱく質間相互作用を制御する有機分子の設計、2010年8月3日、第43回若手ペプチド夏の勉強会、淡路島(兵庫)
- ⑳ 大神田淳子、Module assembly for disruption and detection of protein-protein interactions, Gordon Research Conference, Bioorganic Chemistry, Poster Talk, 2010年6月13日、Proctor Academy, Andover(ニューハンプシャー、アメリカ)(招待講演)

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大神田 淳子 (OHKANDA JUNKO)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50233052

(2) 研究分担者

該当なし