

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05567

研究課題名(和文) ペプチドデホルミラーゼによって活性化される生物種選択的MetAP阻害剤の創成

研究課題名(英文) Preparation of species-selective MetAP inhibitors activated by peptide deformylase

研究代表者

長田 聡史 (OSADA, Satoshi)

佐賀大学・理工学部・准教授

研究者番号：50284609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質成熟に関わるメチオニンアミノペプチダーゼ(MetAP)はほぼ全ての生物において関与しており、生物種選択的なMetAP阻害剤により抗菌薬の創生を目指す必要がある。本研究ではバクテリアに特有なペプチドデホルミラーゼ(PDF)により活性化されMetAP阻害剤となるような作用機序を目指すため、既存の基質ミミック型の阻害剤候補のホルミル化誘導体のPDFによる活性化の可能性、PDFに認識されるMetAP阻害ユニットを含む化合物の合成を行った。酵素アッセイの結果、PDFにより認識可能でMetAPを阻害可能なペプチド結合ミミックとして、オキサジアゾール環を持つ化合物が有望であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬には副作用の低減のために選択性の向上が求められるが、選択性の高さは狭い適用範囲の医薬品となるトレードオフの問題がある。本研究ではタンパク質合成酵素阻害剤をバクテリア選択的な阻害剤として設計するのではなく、候補となる阻害剤をバクテリア特有の酵素で活性化させる作用機序による選択性の発現を目指して阻害剤の分子設計を行った。異なる2種の酵素に認識される構造要件を探索することは困難ではあるが、病態に関連する酵素を複数狙った相乗効果をもつ薬剤の分子設計にも適用できるものと期待できる。

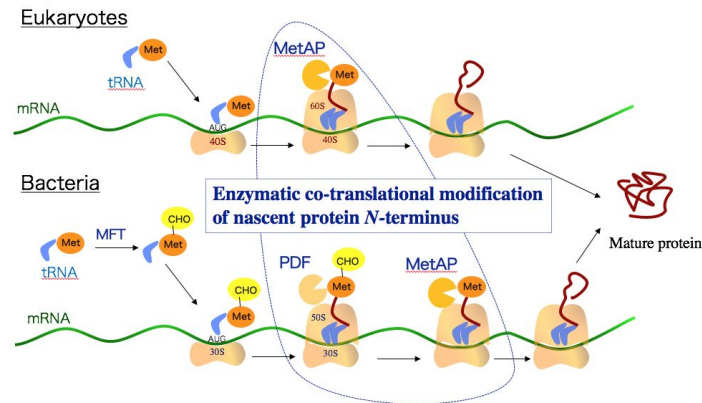
研究成果の概要(英文)：Methionine aminopeptidase (MetAP) which concerning protein maturation is involved in almost all species, and it is necessary to create species-selective MetAP inhibitors to be used as antimicrobials. In this study, we aimed at the action mechanism to be activated by bacterial-specific peptide deformylase (PDF) to release a MetAP inhibitor. Therefore, PDF activation of the formylated derivative of the existing substrate mimic type inhibitor candidates and the synthesis of the compound containing the MetAP inhibitory unit recognized in PDF were attempted. The results of enzyme assay showed that the compounds containing an oxadiazole ring are promising as peptide mimics that can be recognized by PDF and can inhibit MetAP.

研究分野：生物有機化学

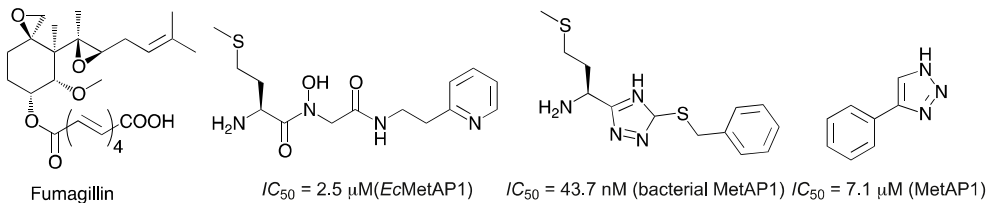
キーワード：酵素阻害剤 メチオニン メチオニンアミノペプチダーゼ ペプチドデホルミラーゼ ペプチドミミック

1. 研究開始当初の背景

タンパクの生合成において、AUG を開始コドンとしてメチオニン(真核生物)あるいは N-ホルミルメチオニン(原核生物, ミトコンドリアおよび葉緑体)が導入され, 後に翻訳後修飾によって成熟タンパクへ移行する際に当該残基が切断される。原核生物においては N-ホルミル基を除去する役割をもつペプチドデホルミラーゼ (PDF) によって脱ホルミル化の段階を経由した後, 真核生物, 原核生物ともに N-末端メチオニン切出しを引き起こす金属酵素であるメチオニンアミノペプチダーゼ (MetAP) の作用により成熟タンパクへと導く。PDF も MetAP も新生タンパクの成熟化に関わる金属酵素であるため, 細胞増殖抑制剤の標的酵素として期待されているが, 特に MetAP 遺伝子の削除は細菌には致死であることが示されており, 原核生物の MetAP 阻害は新たな抗菌性薬候補として特に期待できる。



MetAP は 2 つのサブタイプに分類でき, バクテリアは MetAP-1 だけを有するが, 真核細胞は MetAP-1 と MetAP-2 の双方をもつ。ヒト MetAP-2 (HsMetAP-2) の不活性化は, 不可逆阻害剤 Fumagillin とその誘導体により血管新生の抑制を引き起こす一方, HsMetAP-1 の抑制は G2 から M への細胞周期抑制を引き起こし, かつ白血病細胞株のアポトーシスを引き起こすと報告されており, MetAP は抗ガン剤標的としても着目されている。MetAP 遺伝子の削除は細菌には致死であることから魅力的な創薬的ではあるが, 抗菌薬として MetAP-1 阻害を考慮する場合, ヒトを含む真核生物内の MetAP-1 の阻害を避けなくてはならないため, 酵素阻害剤としていくつかの化合物が見いだされてはいるものの, 抗癌剤としての探索研究に比べてほとんど展開されていない。

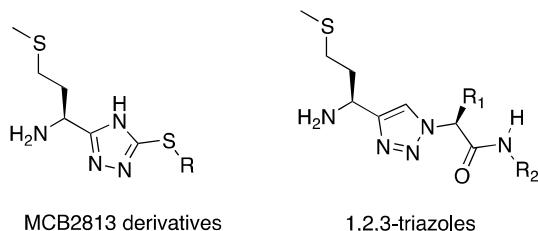


2. 研究の目的

本研究では 原核生物が真核生物と異なり PDF 酵素を必要とするタンパク合成機構を利用し, MetAP 阻害剤となる候補化合物のホルミル化前駆物質が PDF による N 末端ホルミル基切除の後, MetAP 阻害剤として機能する機構を想定した。これにより HsMetAP-1 阻害を回避する標的バクテリア内で活性化型阻害剤を創生できれば, 新たな作用機序をもつ生物種選択的抗菌物質の展開に繋がる。また, 本研究による構造活性相関による PDF と MetAP-1 の認識機構の情報から, 非ペプチド型単独阻害剤の創成も同時に進行させることが出来る。本研究により得られる阻害ユニットは生物種由来の異なる PDF を用いて行うことで抗ガン作用や抗マラリア作用への展開, 標的をアイソザイムである MetAP-2 への拡張することで血管新生抑制剤や細胞周期抑制剤などへの展開を期待した。

3. 研究の方法

本研究での阻害剤探索は, 1) 既存のメチオニン残基含有 MetAP 阻害剤の誘導体をベースにした N-ホルミル化化合物が PDF により処理される構造要件を探索, 2) PDF により処理される N-ホルミルメチオニン残基含有トリアゾール系化合物を探索し, その MetAP 阻害能を調査する 2 つのアプローチで行った。既存のメチオニン残基含有 MetAP 阻害剤としてはメチオニン含有誘導体として知られている SaMatAP 阻害剤の MCB2813 を選択したが, 本化合物の合成法は論文報 1 告されていないので誘導体化も含めて合成方法から検討した。PDF により処理される N-ホルミルメチオニン残基含有トリアゾール系化合物はクリック反応によるトリアゾール合成を利用した PDF 基質合成とその脱ホルミル体の MetAP 阻害能を検証することにした。当時, MetAP 阻害についてはアッセイ系を確立していなかったため, その条件設定も行った。

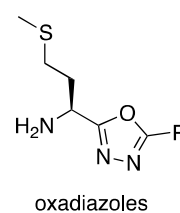


4. 研究成果

大腸菌由来ペプチドデホルミラーゼ(EcPDF)の基質ペプチドミミック分子としての1,2,3-トリアゾール含有疑ペプチドを設計し、メチオニンから誘導したアルキンとジペプチドのN末端合成した。L-メチオニンから誘導されるアルキン誘導体については、再現性が低く極めて低い収率で得ていたが、反応条件の検討の結果、前駆体アルデヒドの合成条件をSwern酸化からParikh-Doering酸化に変更、アルデヒドの一炭素ホモログ化による末端アルキン合成法の反応試薬系をトリフェニルホスフィン-CBr₄条件からヘキサメチルリン酸トリアミド(HMPT)-CBr₄へ改良することで安定してアルキン体を確保できるようになった。トリアゾール合成におけるもう一方の原料となるアジ化物の調製は、ジアゾ転移試薬ADMPを用いたジアゾ転位反応をジペプチドのN末端アミノ基に対して行い、アジド化ペプチドを満足な収率で得た。これらの化合物のクリック反応により、1,2,3-トリアゾール含有化合物群を得た。トリアゾール含有基質のS2とS3に相当する位置には通常のアミノ酸から誘導できるもの以外にアミノ酸、芳香族アミンを導入し、PDFにより認識可能な構造を探索した。評価の結果、S2位置には脂肪族アミノ酸残基とS3位置には芳香族アミノ酸残基が必要であることを見いだした。見いだした構造要件は既存のMetAP阻害剤に類似した構造であり、次の段階が有望であることが期待できる。一方で柔軟性の高すぎるアミノ酸、直鎖アミンは多様な配座をとるためかPDF認識には適していなかった。S1はノルロイシンに置換すると大幅に認識が低下することから、メチオニン残基の維持は不可避と考えていたが、ペプチド系の実験からチエニルアラニンが充分認識可能であることを見いだした。

一方、大腸菌由来ペプチドデホルミラーゼ(EcPDF)の基質ペプチドミミック分子として、すでにMetAP阻害能が既知であるMCB2813を母核にしてN末端にホルミル基を導入した化合物群の合成検討を行なった。MCB2813は共結晶として得られた阻害剤としての報告があるものの、化合物自身の合成条件等は全く未知であったために合成条件検討を行なった。当初、Boc-Met-OHをセミカルバジド誘導体としたのち、続いてハロメチル化合物によるアルキル化を行う段階的合成により、MCB2813を合成することができた。化合物スクリーニングを考慮に入れ、より簡易な合成反応条件の検討の結果、エタノール中にて炭酸セシウムで環化反応とアルキル化をワンポットで行うより高収率な条件を見出し、MCB2813類縁体ならびにそのホルミル誘導体の合成を達成した。ホルミル型誘導体の合成においては先のPDF処理能における構造要件を考慮し、芳香族官能基を配した化合物を合成した。

MCB2813の類縁体ならびにそのホルミル誘導体がEcPDFによる脱ホルミル化を受ける基質として挙動するか否かを検証したが、期待に反していずれの誘導体もPDFによる脱ホルミル化を受けなかった。これらがEcPDFに対する阻害剤として機能している可能性についても検証したが、阻害能は見出されず基質ポケットに親和性を持たないことがわかった。同時並行して合成したチエニルアラニン含有MCB2813類縁体についても同様であり、構造活性相関検討の結果、MetAP阻害に有効な1,2,4-トリアゾールユニットのNHの水素供与性がEcPDFによる認識に不利に働いたものと結論づけた。このため窒素を酸素に置換したオキサジアゾールをアミドミミックとして含む化合物群を新たに評価対象化合物として基本設計に加え合成を行った。



MetAP阻害アッセイについてはタンパク発現とMetAMCを用いた蛍光アッセイ条件の確立後、既知阻害剤MCB2813の再評価を行った。研究当初のホモロジー検索により大腸菌と黄色ブドウ球菌由来のMetAPの活性中心と保存性が高く、MetAP1阻害に対する種依存性は低いと見積もっていたが、EcMetAP1には阻害作用をもたず、SaMetAP1に選択的な阻害剤であったことが明らかになった。しかしながらMCB2813の誘導体にはEcMetAP1に対する阻害活性が認められたため、汎阻害剤化も可能と考えている。また1,2,4-トリアゾールの代わりにオキサジアゾールとした誘導体はEcMetAP1阻害活性が有意に認められた。フランスの研究グループにより別途報告されたPDF阻害剤の構造から、このオキサジアゾール誘導体はペプチドデホルミラーゼ(PDF)により基質認識されると推定でき、当初想定していた作用機序に適合したアミドミミックの構造要件を見いだすことができた。1,2,3-トリアゾール含有化合物群のMetAP阻害能については期間内での評価には至らなかったが、継続研究により明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. H. Osako, J. Taira, Y. Higashimoto, H. Kodama, S. Osada, Peptide Deformylase

Processable Triazole-containing Formyl Peptide Mimetics, Peptide Science 2015,
159-162 2015.
<https://www.prf.or.jp/psb.html>

〔学会発表〕(計 7件)

1. 立川拓真, 大石友佳理, 高見悠里, 平順一, 兒玉浩明, 長田聰史, N-ホルミル化された MCB2813 誘導体のペプチドホルミラーゼ基質としての評価, 第 55 回化学関連支部合同九州大会, 2017.
2. 大石友佳理, 高見悠里, 平順一, 兒玉浩明, 長田聰史, Can peptide deformylase produce methionine aminopeptidase inhibitors from their formylated-precursors?, 第 54 回ペプチド討論会, 2017.
3. 大石友佳理, 兒玉美瑛, 平順一, 兒玉浩明, 長田聰史, 基質ベース型 MetAP 阻害剤と PDF による活性化のための N-ホルミル化誘導体の合成, 第 54 回化学関連支部合同九州大会, 2017.
4. 兒玉美瑛, 平順一, 兒玉浩明, 長田聰史, Peptide deformylase に認識されるトリアゾール含有擬ペプチド性基質の探索, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 2016.
5. 古川 旺, 平順一, 兒玉浩明, 長田聰史, トリアゾール含有 peptide deformylase 阻害剤の合成と評価, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 2016.
6. 大迫拓輝, 平順一, 東元祐一郎, 兒玉浩明, 長田聰史, Peptide deformylase processable triazole-containing formyl peptide mimetics, 第 52 回ペプチド討論会, 2015.
7. 大迫拓輝, 兒玉浩明, 長田聰史, Peptide deformylase によって活性化される MetAP 阻害候補化合物, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 兒玉 浩明

ローマ字氏名: Hiroaki Kodama

所属研究機関名: 佐賀大学

部局名: その他部局等

職名: 理事

研究者番号(8桁): 80205418

研究分担者氏名: 平 順一

ローマ字氏名: Junichi Taira

所属研究機関名: 九州工業大学

部局名: 大学院情報工学研究院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 20549612

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。