

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18691

研究課題名(和文) 非PKC型ジアシルグリセロール受容タンパク質選択的リガンドの開発

研究課題名(英文) Development of C1 domain ligand with selectivity for non-PKC type C1 domain-containing proteins

研究代表者

柳田 亮 (Yanagita, Ryo C.)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖やがん化といった細胞内シグナル伝達に関与するC1ドメインの新規リガンドとしてセリ科植物由来のセスキテルペンラクトンであるタプシガルギンに着目し、様々なタンパク質のC1ドメインに対するその結合能を評価した。タプシガルギンは既知のC1ドメインリガンドが強く結合するnovelプロテインキナーゼC (PKC) にはほとんど結合せず、RasGRP4やChimaerinのC1ドメインに一桁 μ Mの結合阻害定数を示した。したがって、タプシガルギンはこれらのタンパク質選択的リガンドのシードとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：C1 domain is involved in 1,2-sn-diacylglycerol signaling and also bind natural tumor promoters including phorbol esters. We focused on thapsigargin (Tg), a sesquiterpene lactone isolated from *Thapsia garganica*, as a candidate for C1 domain ligand, and evaluated its affinity for C1 domains from various proteins. Tg exhibited little ability to bind to C1B domains of novel protein kinase C isozymes, main targets of natural tumor promoters, but exhibited substantial ability to bind to C1 domains of RasGRP4 and β -chimaerin. These results suggest the potential of Tg as a seed for C1 domain ligand with unique selectivity for subset of C1 domain-containing proteins such as RasGRP4 and β -chimaerin.

研究分野：農学

キーワード：C1ドメイン タプシガルギン がん

1. 研究開始当初の背景

1,2-*sn*-ジアシルグリセロール (DAG) は、細胞膜上の受容体からのシグナルを細胞内ターゲットへ中継する内因性のセカンドメッセンジャーである。生理的条件下において、DAG は G タンパク質共役型膜受容体からのシグナルにより活性化したホスホリパーゼ C (PLC) がホスファチジルイノシトールニリン酸 (PIP₂) を加水分解することによって生成する。DAG の主要なターゲットは細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) である。DAG は 8 種類の PKC アイソザイムの調節領域に存在する C1 ドメイン (図 1) に結合し、これらのアイソザイムを活性化する。

近年、ヒトにおいて PKC 以外にも C1 ドメインを有するタンパク質が 60 種類以上存在することが明らかにされている。本研究代表者の所属する研究グループでは、これらの非 PKC 型タンパク質の C1 ドメインを化学合成し、亜鉛を用いて *in vitro* でフォールディングさせることで、これらのうち約 15 種類 (図 1: ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) β および γ; プロテインキナーゼ D (PKD) 1, 2, 3; RasGRP1, 3, 4; Chimaerins (α1, α2, β1, β2); Munc13s) が顕著な発がんプロモーター結合活性を有していることをこれまでに明らかにした (K. Irie *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9159; K. Irie *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4575)。

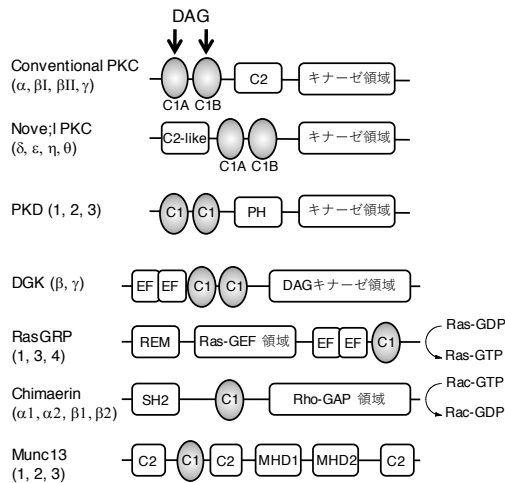


図 1 プロテインキナーゼ C (PKC) およびその他の DAG 受容タンパク質の構造および機能。

これら非 PKC 型 DAG 受容タンパク質の中でも、RasGRP や Chimaerin は、細胞の増殖やアポトーシスに関与していることが明らかにされ、医薬品の標的候補タンパク質として注目されている。RasGRP は、がん遺伝子産物である Ras に結合した GDP の GTP への交換を促進することで、Ras を特異的に活性化する機能を果たしている。一方、Chimaerin

は Rho ファミリーに属する Rac や Cdc42 に結合した GTP の GDP への加水分解を促進し、これらのタンパク質の機能を抑制する。したがって、これらの非 PKC 型 DAG 受容タンパク質の活性を選択的に制御する低分子リガンドの開発が強く望まれている。しかし、天然の発がんプロモーターや DAG は、PKC とこれらの非 PKC 型 DAG 受容タンパク質との間で顕著な結合選択性を示さない。また、これまでに、DAG を分子内で環化させた DAG-lactone 誘導体の一種が、PKCα よりも RasGRP1 に対して強く結合することが Marquez らによって報告されているが、その結合選択性は約 50 倍程度であった (Y. Pu, *et al. J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27329)。

2. 研究の目的

非 PKC 型 DAG 受容タンパク質に高い選択性を示す化合物の開発には、DAG や既存の発がんプロモーターの骨格に依らない新たな骨格を基にした分子設計が必要であると考えられる。

以前、橋本らは酸化型コレステロールの yakkasteroid 類や非 TPA 型発がんプロモーターであるタブシガルギン (図 2) が cytosolic-nuclear tumor promoter-specific binding protein (CN-TPBP) に結合する一方、PKC には結合活性を示さないことを報告している (Y. Hashimoto and K. Shudo, *Jpn. J. Cancer Res.* **1991**, *82*, 665)。タブシガルギンはセリ科植物 *Thapsia garganica* から単離されたセスキテルペンラクトンであり、筋小胞体 Ca²⁺-ATP アーゼ (SERCA) の阻害剤として知られている。CN-TPBP には TPA などの発がんプロモーターも結合することから、CN-TPBP は C1 ドメインを含む未知タンパク質であり、タブシガルギンは C1 ドメインリガンドであると考えられた。

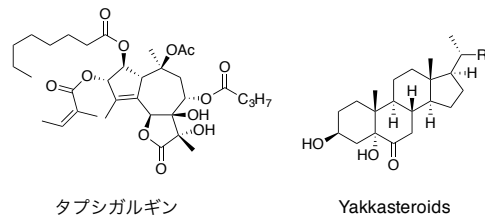


図 2 タブシガルギンおよび Yakkasteroid 類の構造。

そこで本研究では、タブシガルギン骨格をリードとした非 PKC 型 DAG 受容タンパク質、特に RasGRP や Chimaerin 選択的なリガンドの開発を目的とした。

非 PKC 型 DAG 受容タンパク質選択的なリガンドが開発できれば、DAG シグナル経路の解析のためのツールや、抗がん剤候補化合物に発展する可能性が期待できる。

3. 研究の方法

(1) タブシガルギンの C1 ドメイン選択性の評価

タブシガルギンの RasGRP4 や Chimaerin を含む様々なタンパク質の C1 ドメインに対する結合能を、本研究代表者らの研究グループが開発した合成 C1 ペプチド (約 30 種類) を用いて評価した。タブシガルギンは、試薬メーカーより購入した。各化合物の C1 ペプチドに対する結合能は、放射性同位元素で標識されたホルボールエステル誘導体 (^3H]phorbol 12,13-dibutyrate, PDBu) の特異的結合の阻害度によって評価した。放射性同位元素を用いた本結合試験は非常に感度が高く、正確に結合能を評価することができる (N. A. Sharkey and P. M. Blumberg, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 19). 結合能はタブシガルギンの濃度が $10^{-4.5}$ M の時の残存 ^3H]PDBu 結合度 (%) および結合阻害定数 (K_i) で表した。 K_i は、C1 ペプチドと ^3H]PDBu の特異的結合を 50% 阻害する時のリガンド濃度 (IC_{50}) と ^3H]PDBu の解離定数 (K_d) を用いて、Goldstein and Barret 式 (A. Goldstein and R. W. Barrett, *Mol. Pharmacol.* **1987**, *31*, 603) により算出した。また、残存 ^3H]PDBu が 50% を下回らない場合は、Dandliker の式 (W. B. Dandliker *et al. Methods Enzymol.* **1981**, *74*, 3) から K_i を算出した。

(2) タブシガルギンの 8 位改変体および 3 位アンゲリル基飽和体の合成と C1 ドメイン選択性の評価

タブシガルギンの 8 位ブタノイル基を改変した誘導体 (**1-3**, 図 3) を合成し、構造活性相関を明らかにするため、それらの PKC δ C1B および RasGRP4 C1 ドメインに対する結合能を評価した。タブシガルギンの 8 位改変体は市販のタブシガルギンから 2 段階の反応で得た。また、二重結合を接触水素添加で飽和させた誘導体 (**4**, 図 3) についても活性評価を行った。

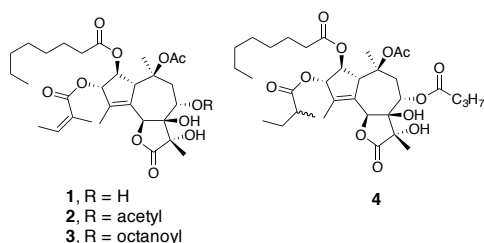


図 3 タブシガルギン誘導体 **1-4** の構造。

(3) タブシガルギンと RasGRP4 C1 ドメインのドッキングシミュレーション

タブシガルギンと RasGRP4 C1 ドメインの結合様式を予測するため、ドッキングシミュレーションを行った。RasGRP4 C1 ドメインの立体構造は未知のため、RasGRP1 C1 ドメインの立体構造をテンプレートとしたホモロジーモデリングにより作成した。ホモロジ

ーモデリングには MODELLER (version 9.17), ドッキング計算には AutoDock (version 4.2.6) を使用した。

(4) タブシガルギン単純化アナログの設計と合成

合成の簡略化と幅広い誘導体展開を可能とするには、機能を保持したまま構造を単純化した単純化アナログの開発が有望である。得られた構造活性相関の知見から、タブシガルギンのシクロペンテン環を除去または芳香環で置き換えた単純化アナログ (**5** および **6**) を設計した。また、タブシガルギンの 7 員環を 6 員環に置き換え、さらにシクロペンテン環を除去した単純化アナログ (**7** および **8**) を設計し、これらの合成を試みた。

4. 研究成果

(1) タブシガルギンの C1 ドメイン選択性の評価

タブシガルギンは RasGRP1 C1, RasGRP4 C1, PKC α C1A, PKC γ C1A, β -chimaerin C1, DGK β C1A, および DGK γ C1A ペプチドに対して 10 μM 前後の K_i で結合し、RasGRP4 C1 ペプチドに最も強く結合した (K_i , 1.9 μM).

一方で、発がんプロモーターの主要なターゲットである novel PKC アイソザイムの PKC δ , ϵ , η , および θ -C1B ペプチドには試験した最も高い濃度の $10^{-4.5}$ M でも全く結合しなかった。また、PKC β C1A および PKD C1B ペプチドに対してはそれぞれ K_i が 79 および 26 μM と若干の結合能を示した (表 1).

表 1 タブシガルギン (Tg), インドラクタム V (ILV), および ^3H]PDBu の C1 ドメインに対する結合能

C1 peptides	K_i of Tg (μM)	K_i of ILV ^a (nM)	K_d of ^3H]PDBu ^a (nM)
PKC α -C1A	6.8	21	1.1
PKC β -C1A	79	19	1.3
PKC γ -C1A	6.7	140	1.5
PKC δ -C1B	>110	1.1	0.53
PKC ϵ -C1B	98	7.7	0.81
PKC η -C1B	>110	5.5	0.45
PKC θ -C1B	>150	8.7	0.72
RasGRP1 C1	11	13	0.72
RasGRP4 C1	1.9	8.4	1.1
β -chimaerin C1	8	120	4.5
PKD C1A	10	53	2.5
PKD C1B	26	210	2.7
DGK β C1A	5.3	1900	15
DGK γ C1A	4.1	580	2.8

^a K. Irie *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4575.

既知の発がんプロモーターであるインドラクタム V (ILV) および ^3H]PDBu が novel PKC C1B ペプチドに対して強く結合するのに対して、タブシガルギンはこれらに全く結

合しなかった. C1 ドメイン結合能の相関係数は ILV と [³H]PDBu で 0.96 であり, 非常に近い結合選択性を示したのに対して, タブシガルギン-ILV およびタブシガルギン-[³H]PDBu の相関係数はそれぞれ-0.32 および-0.27 であり, 大きく異なる結合選択性を有していることが示された.

タブシガルギンのように novel PKC には全く結合能を示さないリガンドの例はこれまで例がなく, タブシガルギンが PKC 以外の C1 ドメイン含有タンパク質選択的リガンドのシードとなり得ることが示唆された. しかしその結合能は既知の C1 ドメインリガンドより 1000 倍以上弱いと, 誘導体展開やアナログ合成により絶対的な結合能を大幅に上げる必要がある.

(2) タブシガルギンの 8 位改変体および 3 位アンゲリル基飽和体の合成と C1 ドメイン選択性の評価

市販のタブシガルギンを出発原料として, 8 位ブタノイル基を除去したデブタノイルタブシガルギン (**1**) を合成し, 次に 8 位水酸基をアセチル化した **2** およびオクタノイル化した **3** に誘導した. 2 位アンゲロイル基の二重結合の飽和は水酸化パラジウムを用いた接触水素添加により行った.

これら 4 種の誘導体 (図 3) の PKC δ -C1B および RasGRP4 C1 ペプチドに対する結合能を評価した. 誘導体 **1-4** はタブシガルギンと同様に PKC δ C1B ペプチドに対して全く/ほとんど結合しなかった. 一方, RasGRP4 C1 ペプチドに対しては, **1** および **3** は全く結合せず, **2** および **4** はタブシガルギンと同程度の活性を示した. これらの結果から, タブシガルギンの C1 ドメイン結合活性には 8 位にブタノイル基程度の長さのアシル基が必要であること, アンゲリル基の二重結合およびエノン構造は結合に関与していないこと, そして 3 つの環のうち右側の 2 つの環側が結合に重要である可能性が示唆された.

(3) タブシガルギンと RasGRP4 C1 ドメインのドッキングシミュレーション

ドッキングシミュレーションで得られた 100 個の複合体構造をクラスター解析 (rms tolerance = 3.0), 39 個のクラスターを得た. その中で 4 つのクラスター (図 4A-D) において, 誘導体の活性評価から結合に重要であることが示唆された 8 位ブタノイル基が C1 ドメインの結合窪みの底部と相互作用していた. AutoDock によって計算されたこれら 4 つのモデルの結合エネルギーの差は, AutoDock エネルギーの標準偏差以内であり, 4 つのうちどのモデルがより安定かをエネルギー値から議論することはできなかった.

DAG や発がんプロモーターといった C1 ドメインリガンドは共通構造モチーフとして, 1 級または 2 級水酸基を有し, これらの水酸基は C1 ドメインの 12 番目の残基の主鎖 NH

基および 21 番目の残基の主鎖 CO 基と水素結合ネットワークを形成すると考えられている. しかし, タブシガルギンは 1 級または 2 級水酸基を有していない. さらに, ドッキングシミュレーションで予測された結合様式では 12 および 21 番目の残基と水素結合を形成している官能基はなかった. したがって, この水素結合の欠如が, タブシガルギンの弱い C1 ドメイン結合能の原因の一つであると考えられる.

これらの予測結合モデルは今後 C1 ドメインを標的としたタブシガルギンアナログを設計するうえでの基盤となるものである.

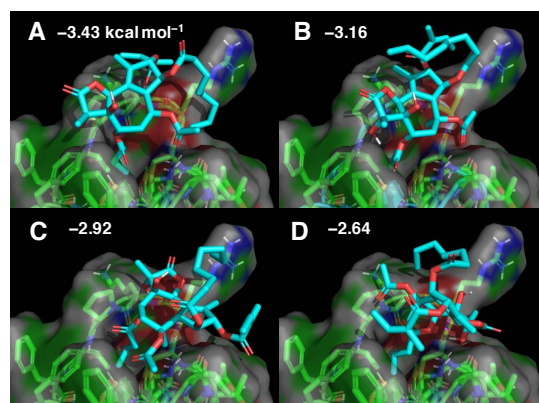


図 4 ドッキングシミュレーションにより予測されたタブシガルギンと RasGRP4 C1 ドメインの結合様式. 各パネル上の数値は AutoDock により計算された結合エネルギー.

(4) タブシガルギン単純化アナログの設計と合成

得られた構造活性相関の知見と予測結合モデルから, タブシガルギンと C1 ドメインとの結合には γ -ラクトン環と 7 員環の 2 つの環がより重要であると予想した. そこで, シクロペンテン環を除去または芳香環で置き換えた単純化アナログ **5** および **6** (図 5) を設計し, Andrews らのタブシガルギン全合成経路 (S. P. Andrews *et al. Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5688) を参考にして合成計画を立てた. しかし, 合成初期のアルデヒドおよびケトンの不斉アリル化が目的通りに進行しなかった.

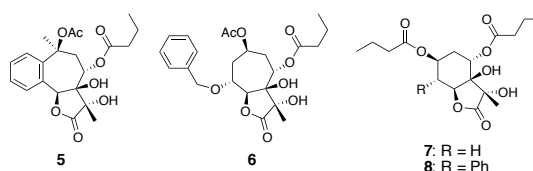


図 5 設計したタブシガルギン単純化アナログ (**5-8**) の構造.

そこで, さらに合成が容易な単純化アナログの設計を行うことにした. タブシガルギンの 7 員環がねじれいす形配座を取っていることに着目し, これをいす形配座の 6 員環に置

き換えた単純化アナログ **7** および **8** (図 5) を設計した。分子モデリングにより、**7** および **8** の水素結合性官能基がタプシガルギンに近い空間的配置を取り得ることを確認した (図 6)。これらの合成経路は最近報告された Chu らによるタプシガルギン全合成経路 (H. Chu *et al. ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 47) を参考に立案した。

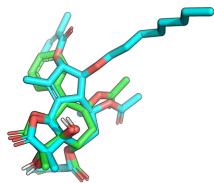


図 5 タプシガルギン (水色) とアナログ **8** (緑色) の立体構造の重ね合わせ。

アナログ **8** の合成は (*E*)-cinnamyl alcohol を出発原料として、香月・シャープレス不斉エポキシ化と立体特異的ビニル化により、2 つの不斉点を高い立体選択性で構築した。その後、官能基の保護、増炭反応、官能基変換により、6 員環を形成する閉環メタセシス反応の環化前駆体を得た。

本研究期間中には単純化アナログの合成は完了できなかったが、アナログに必要な炭素原子を全て含む鍵中間体を合成することができた。今後、閉環と続いて酸化反応を繰り返すことで、目的とするアナログ **8** の合成が期待できる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 高橋知世, 柳田亮, 川浪康弘, 入江一浩 : Thapsigargin の C1 ドメインに対する結合能と結合選択性の評価, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌), 平成 28 年 3 月 28 日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/charlesy/>

6. 研究組織

(1) 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