

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 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究（C）

研究機関：2009～2011

課題番号：21603015

研究課題名（和文） セリン・スレオニンプロテインホスファターゼ阻害剤の開発

研究課題名（英文） Development of Inhibitors for Serine-Threonine Protein Phosphatase

研究代表者

宮下 和之 (MIYASHITA KAZUYUKI)

大阪大谷大学・薬学部・教授

研究者番号：10166168

研究成果の概要（和文）：細胞内シグナル伝達機構解明へ寄与すべく、タンパク質中のリン酸化セリン・スレオニンの脱リン酸化を行うセリン・スレオニンプロテインホスファターゼ PP1 および PP2A、それぞれに対する特異的阻害剤の開発を目的として研究に着手した。特異的阻害剤開発の方法として、まずそれぞれの酵素に対する特異的な基質を探索し、次に構造改変により特異的阻害剤へと導くことを考えた。その結果、PP1 に対する特異的基質を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）： We were interested in development of specific inhibitors for PP1 and PP2A, which would be expected to contribute to mechanistic elucidation of a cellular signal transduction as a final goal. For the purpose, we tried to search for specific substrates for the enzymes, PP1 and PP2A, as a first step. We expected that the specific substrate could be transformed into a specific inhibitor by a partial structural transformation. As a result, we succeeded to find the specific substrate for PP1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：プロテインホスファターゼ・阻害剤・シグナル伝達・酵素

1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達の仕組みの一つとしてタンパク質のリン酸化・脱リン酸化はよく知られており、これに関わるアミノ酸残基としてチロシン、セリン、スレオニン、ヒスチジンが知られている。チロシンのリン酸化・脱リン酸化の機構や阻害剤に関しては、比較的研究が進んでいるが、それと比較するとセリン・スレオニンのリン酸化・脱リン酸化に関する研究はあまり進んでいない。セリン・スレオニンの脱リン酸化に関わる4種類の主要

酵素(PP1, PP2A, PP2B, PP2C)の内、PP1 および PP2A は、あらゆる真核生物の細胞質中に普遍的に存在し、リン酸化が関与する様々なシグナル伝達系において数々の重要な役割を担っていることから、これら酵素の阻害剤は酵素の機能を解明するためのツールとして、あるいは医薬品としての応用が期待され非常に注目を集めている。

例として代表的な阻害剤を図1に示すが、これら阻害剤の構造は多様性に富んでおり、また、その生物活性も腫瘍化促進作用やアポ

トーシス誘導活性、利尿作用など様々である。これら阻害剤を PP1 および PP2A に対する特異性の観点から見ると、これら阻害剤はそれほど高い特異性を示すものは無く、tautomycin (1) が PP1 に対して ($K_i(\text{PP1})/K_i(\text{PP2A}) = 0.013$)、okadaic acid (2) が PP2A に対して ($K_i(\text{PP1})/K_i(\text{PP2A}) = 4700$)、それぞれ比較的高い特異性を示す阻害剤として知られている程度であった。

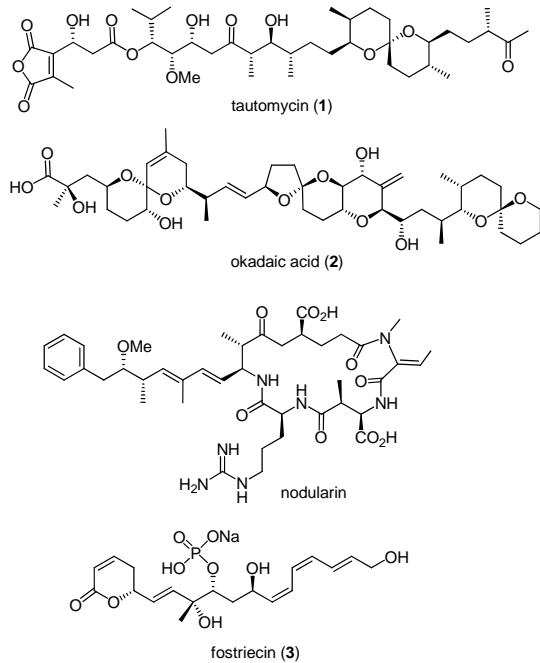


図 1 代表的な PP 阻害剤

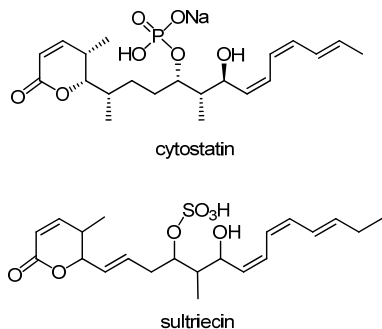
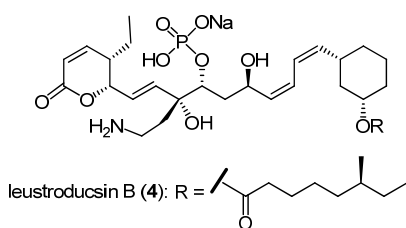


図 2 Fostriecin 類縁天然物

1983 年に Warner-Lambert/Parke-Davis 社において単離された fostriesin (3) は、okadaic acid (2) を凌ぐ高い PP2A 特異的阻害作用を示す ($K_i(\text{PP1})/K_i(\text{PP2A}) = 41000$) こ

とが報告され、有望な細胞内シグナル伝達系の研究試薬として注目を集めるようになった。一般に PP 阻害剤は腫瘍化促進作用を示すものが多いにも関わらず、fostriecin (3) は抗腫瘍活性を示すため、PP2A 特異的阻害作用と抗腫瘍作用の関連性も含めた作用メカニズムにも多に興味を持たれた。

Fostriecin ファミリーに属する天然物として、図 2 に示す化合物が知られているが、これら類縁化合物も PP2A 特異的阻害作用を示し、またがん転移抑制作用や抗菌作用など様々な生物活性を示すことから、PP2A 特異的阻害作用との関連性に非常に興味を持たれている。

このような背景から fostriecin およびその類縁化合物はその特徴的な構造とも相まって合成化学者の標的化合物として注目を集め、世界中で全合成研究が展開された。その結果、我々の研究グループも含めて数多くの全合成が報告された。我々の全合成の特徴は、図 3 に示すように fostriecin の構造を 3 個のセグメント A, B, C に分割し、収束型合成経路により合成するもので、fostriecin 類縁天然物を含め、生物活性機能発現に必要な構造単位を探索するための誘導体を効率的に合成可能である。我々は、この合成戦略に従い天然物である fostriecin (3) と leustroducsin B (4) の全合成を達成し、その有用性を証明した。

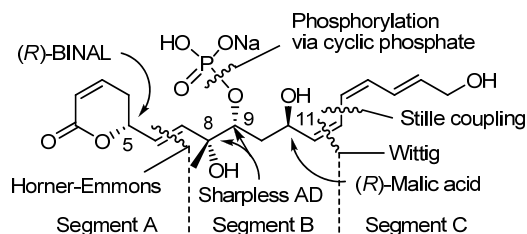


図 3 我々の fostriecin 合成

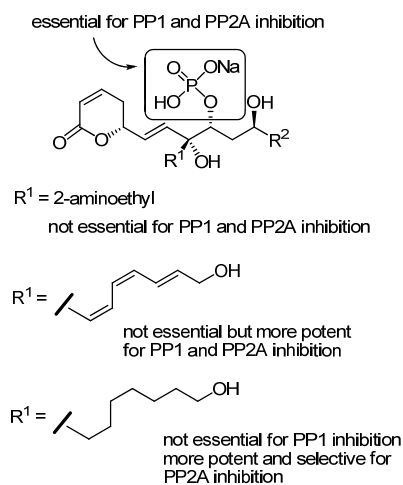


図 4 PP 阻害作用

全合成研究とともに、PP2A 阻害活性についての構造と活性の相関に関する研究も世界中で展開され、我々も図 3 に示した合成経路を活用し、いくつかの誘導体を合成し、図 4 に示す構造-活性相関に関する知見を得た。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景に示した構造と PP 阻害活性に関する知見を基に、合成の容易さを考慮して fostriecin (3) の骨格を持たない、より簡単な構造を有する PP1 および PP2A それぞれに特異的な阻害剤を開発する。

3. 研究の方法

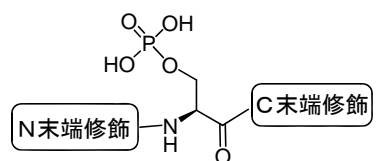
阻害剤の開発研究としては、酵素の立体構造やメカニズムを基に、最初から阻害剤を設計・合成し、評価系としても阻害活性を指標としてリード化合物から最適化していく方法が当然考えられ、一般的である。しかし、本研究に当たっては、以下に示す理由(1)~(3)から図 5 に示すように、まずリン酸化セリンの N 末端および C 末端の修飾により PP1 および PP2A に特異的な基質を探索し、最後に部分的な構造変換により阻害剤へと導くことを考えた。

(1) アッセイが容易であり得られる情報が多いこと：PP の阻害活性のアッセイの場合、基質となるリン酸化セリンあるいはスレオニンを含むペプチドを基質として用い、本反応の阻害を評価することとなるが、基質ペプチドが高価であり、また、用いる基質ペプチドの種類により阻害活性が変化することも報告されている。単純に基質となり得るかを評価する方が操作的にも簡単であり、また Michaelis plot により得られる k_{cat} と K_m 値から、親和性と反応性に関する情報も得られる。

(2) 候補化合物の絞り込み：基本的に PP1 および PP2A は細胞内に普遍的に存在し、様々なタンパク質のリン酸化セリン・スレオニンの脱リン酸化を担っていることから、幅広い基質特異性を持っていると考えられる。ダイナミックな構造の違いがある基質を用いて得られる k_{cat} と K_m 値の情報から、親和性と反応性に寄与する構造単位を明らかにすることにより、特異的な基質としての構造の絞り込みがやりやすいのではないかと考えた。

(3) 構造変換による基質から阻害剤への変換：PP1 および PP2A に対する特異的な基質が探索できれば、阻害剤への変換は、リン酸エステル構造を「切断できないリン酸エステル」構造（例えばチオリン酸エステルやホスホン酸エステル構造）へと変換することにより達成できるのではないかと考えた。チオリン酸エステルへの変換は、リン酸エステル合成の際、中間体の亜リン酸エステルのイオウ処理、

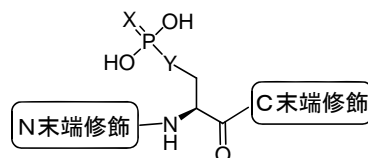
あるいはシステインを原料としてリン酸化することにより容易に合成可能と考えた。また、リン酸化セリンのホスホン酸アナログに関しては、すでに文献既知である。



Step 1: PP1, PP2A 特異的な基質の探索



Step 2: 構造変換による阻害剤への変換



(X = S, Y = O), (X = O, Y = S) or (X = O, Y = CH₂)

図 5 今回の阻害剤開発研究の流れ

2005 年以降、PP1, PP2A の X 線結晶解析が相次いで報告され、予想通り触媒ドメインの立体構造は非常によく似ていることが明らかになった。アミノ酸配列の違いにおいて、PP1 の 276 番目の Phe が PP2A では 269 番目 Cys に対応することから、fostriecin (3) の PP2A 特異性は、不飽和ラクトン構造への Cys チオール基の 1, 4-付加に基づくことはすでに明らかとなっている。そこで我々は、酵素タンパク質表面の脂肪族鎖がはまり込む溝に着目し、具体的には、我々が fostriecin 類縁体を用いた構造と活性の相関に関する研究で得た知見の中でも特に C12 位からの脂肪族側鎖に注目することとした。すなわち N 末端はアセチル基で固定し、C 末端側に末端に置換基を有する各種脂肪族側鎖で修飾することとした。

4. 研究成果

(1) 各種誘導体の合成について
各種脂肪族側鎖の長さをかえた基質誘導体の合成は、図 6 に示す経路で行った。N-アセチルセリンエステル 4 より導いたリン酸化セリン 5 と、アミノアルコール 6 より合成したアミン体 8 とを縮合し、脱保護により目的化合物 9 を得た。この際、保護基として Cbz 基を用いた場合、TLC 上で各種呈色試薬で検出できなかったため、精製が困難であったが、p-ニトロベンジル誘導体を保護基として用いることにより、この問題を解決した。

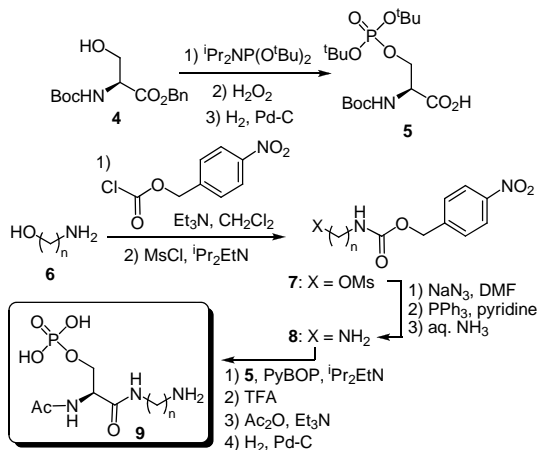


図6 基質誘導体の合成

(2) 炭素鎖の長さについて

脂肪酸側鎖の長さ ($n = 8, 10, 12, 14$) を変えたリン酸化セリンアミド **9a-d** (図7) を用い、PP1 および PP2A の基質になり得るかを調べたところ、 $n = 12$ の化合物 **9c** だけが PP1 により脱リン酸化を受けることが明らかとなった。この化合物 **9c** は PP2A によって脱リン酸化は受けず、PP1 特異的基質であることがわかった。

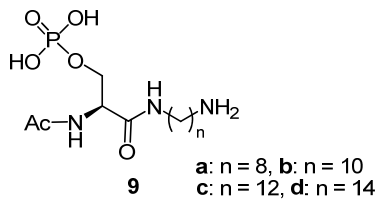
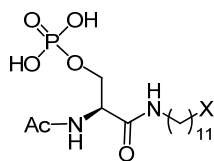


図7 脂肪酸側鎖長の異なる誘導体の構造

(3) 末端置換基について

化合物 **9c** (図7) について、末端アミノ基の効果を検証するため、末端アミノメチル基部分をカルボキシル基、エチル基にそれぞれ変換したリン酸化セリンアミド **10, 11** (図8) を合成し、同様に PP1 および PP2A による脱リン酸化を検討した。その結果、末端アミノ基をメチル基に変換した化合物 **11** は、PP1 に対してアミノ体より弱いながら基質となるが、カルボン酸 **10** は脱リン酸化を受けなかった。PP2A ではいずれの化合物も脱リン酸化を受けなかった。



9a: $X = \text{CH}_2\text{NH}_2$, **10:** $X = \text{CO}_2\text{H}$, **11:** $X = \text{CH}_2\text{CH}_3$

図8 末端置換基の異なる誘導体

以上(2)、(3)の結果から、脂肪酸側鎖の炭素鎖長が 12 で、末端にアミノ基を有するリン酸化セリンアミド **9c** は PP1 により特異的に脱リン酸化を受け、炭素鎖長、末端アミノ基はその特異性に重要であることが明らかになった。

(4) PP1 阻害剤への変換について

PP1 に対する特異的な基質を見出すことに成功したので、リン酸エステル構造を切断されないリン酸エステルとして、チオリン酸エステル構造へ変換することとした。セリンエステル **4** を亜リン酸化し、Beaucage 試薬と処理することによりチオリン酸化セリンエステル **12** を得た。現在、本化合物から目的化合物 **13** への変換を検討中である。

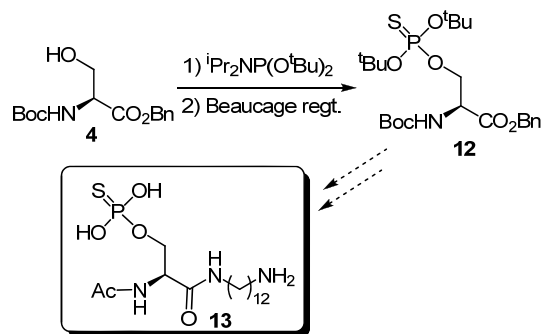


図9 チオリン酸エステル誘導体の合成

5. 主な発表論文等
発表準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 和之 (MIYASHITA KAZUYUKI)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号：10166168

(2) 研究分担者

池尻 昌宏 (IKEJIRI MASAHIRO)
大阪大谷大学・薬学部・講師
研究者番号：00412396