

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21603016

研究課題名（和文） 新規プロテインキナーゼC阻害剤の作用機序の解明研究

研究課題名（英文） Clarification research for molecular mechanism of a novel type of protein kinase C inhibitor

研究代表者

袖岡 幹子 (SODEOKA MIKIKO)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・主任研究員

研究者番号：60192142

研究成果の概要（和文）：

本研究では、PKCの生理的リガンドである diacylglycerol (DAG) を元に設計した新規 isobenzofuranone (IB) 誘導体を用いて、PKCの活性化機構を分子レベルで明らかにすることを目指した。IB誘導体は、同様の骨格を有しながら PKC・を活性化する場合と阻害する場合がある。本研究の主目的は IB-15Aの作用機序解明であるが、活性化剤の作用機序も併せて理解する必要があった。この3年間で、まず種々の活性型 IB誘導体の特徴を明らかにした。さらに IB-15Aが、典型的な活性化剤とはおそらく異なる位置に結合し、PKC・と脂質との相互作用に影響を及ぼして阻害活性を発揮していることまで突き止めることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this research grant, we intended to clarify the activation mechanism of protein kinase C (PKC) at molecular level by utilizing isobenzofuranone (IB) derivatives, which were designed based on the physiological activators, diacylglycerols (DAG), for PKC. IB derivatives showed either activation or inhibition of PKC・ depended on their substituents. Although the main subject of

this research was clarification of the inhibition mechanism of PKC inhibitor IB-15A, analysis of the PKC activators was also necessary. In these three years, we first revealed the features of several PKC activators. And then we found that a potent PKC inhibitor IB-15A showed inhibition of PKC・ by probably through the distinct binding site from that of the typical PKC activator and by disturbing the interaction of PKC with lipid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：プロテインキナーゼC、酵素阻害剤、Isobenzofuranone 誘導体、ホスファチジルセリン、構造活性相関、有機合成

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ C (PKC) は、細胞増殖をはじめとするさまざまな重要な細胞内情報伝達に関する重要なタンパク質リン酸化酵素である。また、PKC の強力な活性化剤として知られるホルボールエステル (PMA など) は、発癌プロモーション活性を示すことから、PKC の阻害剤は抗癌剤などの医薬としての可能性も注目されてきた。しかし、アイソザイムが 11 種も存在し、いまだその多様な生理機能の分子レベルでの働きは明らかになっていない (Figure 1)。これらの解明のためには、特異的な阻害剤の開発が求められる。既に、スタウロスポリン類をはじめとする多くの阻害剤が報告されているが、そのほとんどは、ATP 結合部位に結合するタイプの化合物である。しかし、ATP 結合部位の構造は、数多くのプロテインキナーゼで類似しているため、ひとつのキナーゼのみを特異的に阻害する阻害剤を得る事は難しい。我々は、多くのキナーゼに共通する触媒部位ではなく、PKC のみがつまみユニークな調節部位 (リガンド結合部位: C1A 及び C1B) に着目した阻害剤開発を世界に先駆けて検討してきた。

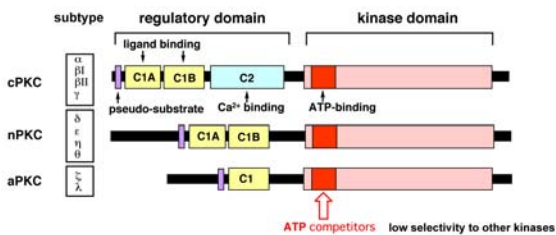


Figure 1. PKC の1次配列

PKC は、通常は細胞質中に不活性型で存在し、カルシウムイオン、脂質膜中に存在するホスファチジルセリン (PS) ならびにジアシルグリセロール (DAG) が調節部位に結合する事によって、脂質膜上で、コンホメーション変化を起こし活性化すると考えられている (Figure 2)。しかし、どのようなコンホメーション変化を起こしているのかは未だ明らかになっていない。そこでまず我々は、脂質膜との相互作用を阻害する事により膜移行を妨げるというコンセプトで阻害剤を設計した。すなわち、PKC に結合することが知られているホルボールとホスファチジルセリン (PS) の疎水性側鎖を除いた分子をリンカーでつないだ化合物 PEPS (1) を設計・合成したところ、PKC に対し阻害活性を示すことを見いだした (JACS 1998, 120, 457)。しかし、リン脂質部位をもつ本化合物は、細胞への透過性が低く、細胞内での PKC の働きを調べるプローブとしては不適当であった。

そこで次に、脂質膜上でコンホメーション変化を制御するという新しいコンセプトに基づく阻

害剤開発に取り組みことを考えた。このためには、自在に様々な置換基を有する化合物を合成可能な新しい PKC リガンド分子を設計する必要があった。そこで、DAG を基盤とし、コンホメーションを固定し、置換基修飾を容易にしたイソベンゾフラン (IB) 誘導体を設計・合成した (BMCL 2004, 14, 2963, 2969)。ホルボールエステル PMA と同じ向きにフェノール性側鎖を持つ誘導体 2 は、ホルボールエステルと同様、強い PKC α 活性化能を示したのに対し、異なる向きに同じ側鎖を有する 3 は、PKC α に結合しても活性化能を示さないという特性を示すことがわかった (ChemMedChem 2007, 2, 1006)。これらの結果から、疎水性側鎖と脂質膜との相互作用が、2 では活性コンホマーの、3 では不活性コンホマーの安定化に寄与していることが考えられ、「脂質膜上でのコンホメーション制御による PKC 活性制御」というコンセプトが有効であることを確認している。

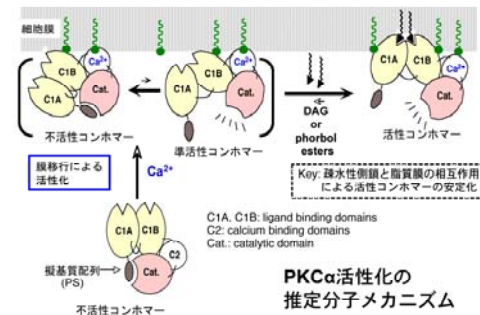


Figure 2. PKC α の活性化メカニズム

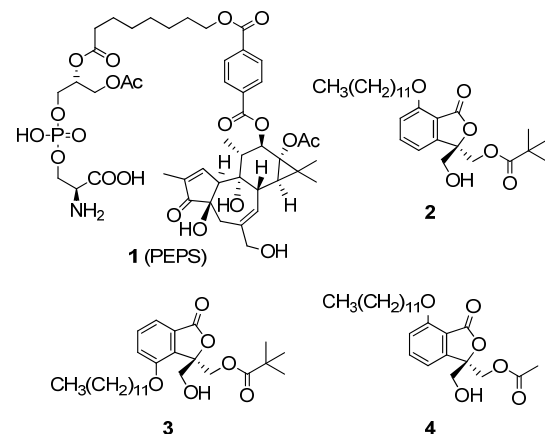


Figure 3. これまでに開発した分子

さらに最近、興味深い事に 2 と同じ骨格、同じ向きに疎水性側鎖をもつにも関わらず、アセチル基をもつ誘導体 4 は、PMA で誘導される PKC α 活性化を阻害することを見いだした。これは、これまでに知られている構造活性相関の知

見からは予想できないユニークな現象であった事から、**4** の阻害のメカニズムを明らかにすることは、PKC 活性化の分子機構を明らかにすることに繋がり、さらに全く新しい PKC 阻害剤設計の指針を与えるものであると期待された。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、**4** の PKC α 阻害活性発現メカニズムを解明することを第一の目的とした。しかしながら、ここに大きな障害があった。PKC α の活性化機構は、前述のように模式的には示されているが、その分子レベルでのコンホメーション変化などは、研究を開始した当時は全く知られていなかった。2011年に PKC β II の X 線結晶構造解析によって、触媒サイト (kinase domain) と C1B ドメインの不活性コンホマーと活性化機構に関する知見が報告されたが、後述するように我々が注目している C1A ドメインに関しては、議論されていない (*Cell* **2011**, *144*, 55)。ATP 結合サイト以外で PKC 活性化を阻害できる場所・機構に関しては未知であり、いったいどのような PKC 活性化メカニズムを IB 誘導体 **4** が阻害しているのかは皆目検討がつかない状態であった。このことから、**4** の阻害活性発現メカニズムの解明は、PKC α の活性化機構を解明することとほぼ同義と言え、PKC 活性化作用を示す IB 誘導体に関する解析も同時に必要であった。そこで本研究では、新たな PKC 活性化リガンドに関しても、その特性について、詳細に解析することとした。

3. 研究の方法

- 1) PKC α を活性化する IB 誘導体に関して、これまで合成してきたすべての化合物の結合能と活性化能の詳細を明らかにする。
- 2) 2つの C1 ドメインの活性化機構に対する機能を調べるために、それぞれを区別するリガンドの創製を目指す。
- 3) 阻害活性を有する **4** の構造活性相関研究に取り組む。

4. 研究成果

- 1) 化合物 **2** タイプの IB 誘導体の不斉合成法の確立と結合能・活性化能の相関 (*Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3609)

IB 誘導体の C1 ドメインへの結合能と PKC α 活性化能を詳細に調べるため、化合物 **2** タイプを効率良く合成できる不斉合成法を確立した。

ホルボールエステルと DAG は共に C1 ドメインリガンドとなり PKC を活性化するが、2003年に Cho らはこれら2つのリガンドはそれぞれ異なる C1 ドメインに結合することを示した。すなわち、ホルボールエステルは C1B ドメインに優先的に結合し、DAG は C1 ドメインに選択的に結合するというもので

ある。一方で、Irie らや Blumberg らの結果ではホルボールエステルは C1A、C1B 共に同程度結合することを報告しており、未だはっきりとした結論は導かれていない。我々は、ホルボールエステルと DAG の構造を考慮し、かさ高く枝分かれしたアルキル基と直鎖状アルキル基を IB 誘導体に組み込んだ4種の化合物 **5**~**8** を合成した (Figure 4)。

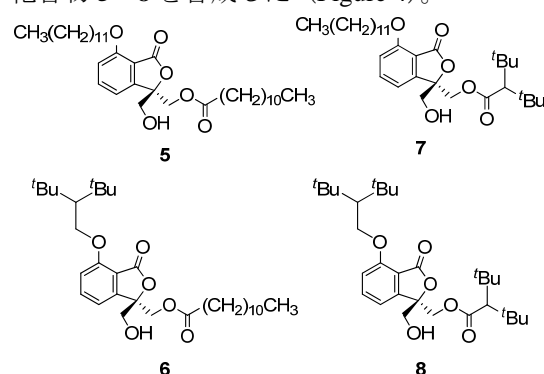


Figure 4. 新規 IB 誘導体 **5**~**8** の構造

これらの PKC α C1 ドメインへの結合能を ^3H ラベル化したホルボールエステルの PDBu をトレーサーとした競合的結合阻害試験によって評価した。その結果、**5** の結合能は非常に低く、**6**→**7**→**8** の順に結合能が高くなった。IB 誘導体 **8** の結合能は、 K_i 値 2.1 nM であり、強力な C1 ドメインリガンドであることも分かった。一方、PKC α 活性化能を評価すると、その活性化度は C1 ドメイン結合能と相関せず、結合能の低い **6** が結合能の高い **7** や **8** と同等の活性化能を示した。また、結合能が極めて低かった **5** も、顕著な PKC α 活性化能を示した。このことは、結合能評価試験系において、Cho らの報告どおりトレーサーであるホルボールエステルが C1B ドメインに選択的に結合することを基に説明できる。すなわち、結合試験系ではトレーサーが結合する C1B ドメインへの親和性を評価しており、もうひとつの C1A ドメインへのリガンドの結合は評価できていないとすると説明がつく。結合試験で C1 ドメインへの親和性が低いと評価された **5** や **6** は、C1B ドメインに結合しにくい C1A に結合し、PKC α を活性化していたと考えられることができる。実際には、C1A ドメインへの結合を直接評価することができていないので、はっきりしたことは言えないが、IB 誘導体はホルボールエステル結合サイトとは異なる位置に結合して、PKC α を活性化できることが明らかとなった。

- 2) "Out of Pocket" 相互作用を利用した選択的 C1 ドメイン結合リガンド創製 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *21*, 3587)

上記で説明したように、PKC α の 2 つの C1 ドメインには、それぞれ異なるリガンドが結合する可

能性がある。それぞれの C1 ドメインに選択的に結合する分子を創製できれば、ホルボールエステルや DAG の機能、さらにそれぞれの C1 ドメインの機能の解明に寄与できる。しかしながら、2 つの C1 ドメインの相同性は高く、単純な構造活性相関研究や分子設計では、実現できる可能性は低いと考えた。一方で、計算構造から導き出されたそれぞれの C1 ドメインの構造は似通ってはいるが、リガンド結合サイトの外側に顕著なアミノ酸残基の違いが見られた。そこで、リガンドポケットの外側をうまく認識するリガンド設計 (out of pocket 相互作用を活用するリガンド設計) を考案した。具体的には、IB 誘導体に剛直なリンカー (アルキン部) を導入し、その末端にイノシトール構造を連結したリガンドを設計した。Myo-イノシトール構造は、対称面を有し、置換基 R5 を導入できる。R5 の置換基が C1 ドメイン外側のアミノ酸を区別して結合すれば、2 つの C1 ドメインそれぞれに選択的なリガンドを創製できると期待した。

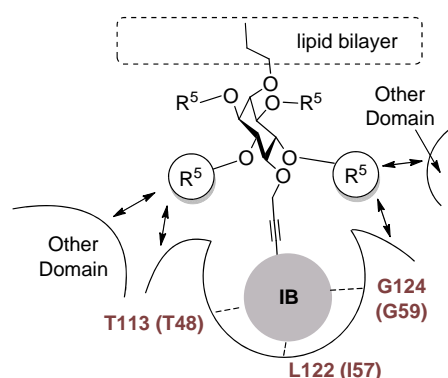


Figure 5. "Out of Pocket"相互作用の概念図

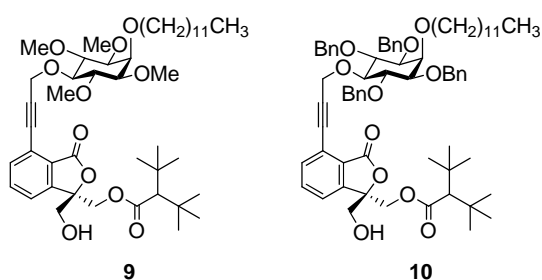


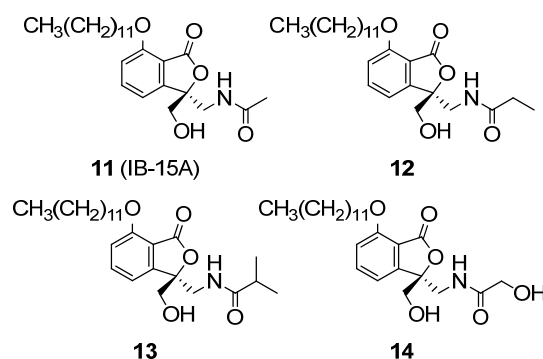
Figure 6. 新規 IB 誘導体 9、10 の構造

いくつかの化合物を合成したところ、化合物 9 と 10 のおいて興味深い現象を見出した。先に示した C1 ドメインへの結合阻害では、9 では顕著な結合親和性を示したが、10 は全くホルボールエステル結合サイトには結合しなかった。一方、PKC α 活性化は両者ともほぼ同等であった。このことは、10 がホルボールエステル結合サイトとは異なる場所に結合し、PKC α 活性化を活性化していると解釈することができる。我々は、Cho らの報告から 10 が C1A ドメインに結合して、PKC α 活性化していると考えている。

3) PKC α 阻害活性を示す 4 の構造活性相関 (未発表)

本研究内で 4 の構造活性相関研究を推進した。当初 4 の阻害活性発現メカニズムの可能性の 1 つとして、4 のアセチル基が C1 ドメインに多数存在するリジン残基に転位している可能性を考えた。そこで、転位しにくいアミド型の IB-15A (11) を合成した。その結果、11 は 4 とほぼ同等もしくはそれよりもわずかに高い阻害活性を示した。また、PKC α と 4 を混合した後に、抗アセチル化リジン抗体でウェスタンブロッティングを検討したが、バンドは観察されなかった。このことから、アセチル基の転位の可能性は低いことが実証された。そこで、11 の構造活性相関研究を進めた。その結果、アミド置換基は立体的に小さい方が阻害活性は高く、12、13 では顕著に阻害活性が低下した。また、疎水性置換基でなければ 11 に導入可能であり、14 では 11 とほぼ同等の阻害活性を示した。また、フェノール性水酸基の炭素数 12 の直鎖アルキル基は、阻害活性に重要であり、炭素数 6 では阻害活性は全く見られなかった。

いくつかの化合物に対して、先に示したホルボールエステル結合サイトへの結合阻害試験を検討した。その結果、阻害活性とホルボールエステル結合サイトへの親和性には全く相関は見られなかった。このことから、本阻害活性はホルボールエステルの C1 ドメインの結合を阻害しているのではなく、むしろ活性化剤であるホルボールエステルは結合していても、PKC α 活性化を阻害できることが分かった。



4) IB 誘導体の PKC α 阻害機構の解析

PKC α の酵素活性を阻害した化合物 4、11 とその誘導体を用いて、作用機序解明を目指した解析を検討した。まず、ATP 拮抗型の阻害剤である Gö6983 の阻害活性は、系内の ATP 濃度依存的にキャンセルされたのに対し、化合物 4、11 の阻害活性は、系内の PS 濃度に依存してキャンセルされた。このことから化合物 4、11 は、PKC α と PS との結合に影響を与えている可能性が示唆された。さらに C1A

と C1B に対して結合する活性化リガンド (DAG 及び PMA) を同時に処理して PKC α を活性化させた場合、化合物 **11** は阻害できないことがわかった。つまり化合物 **11** は、C1A と C1B どちらかが空いた状態の時に、DAG 及び PMA の結合部位近傍に結合して、PKC を阻害している可能性が示唆された。

また蛍光融合タンパク質 (Venus) を用いた解析から、化合物 **11** はホルボールエステル (PMA) 依存的な PKC α の細胞膜移行を阻害しなかった。このことから化合物 **11** は、C2 ドメインではなく C1 ドメインと PS との相互作用に影響を与えていると考えた。実際、表面プラズモン共鳴による観察から、C1A ドメインは PS と相互作用し、化合物 **11** はその結合を阻害している可能性が示唆された。さらに酵素活性を有する 3FLAG-PKC α の作製にも成功しており、今後は C1A ドメイン内の PS と相互作用する部位近傍のアミノ酸に変異を入れ、化合物 **11** の活性に重要な残基を調べる予定である。

また細胞レベルにおいては、化合物 **4** は単剤で K562 細胞に対して強力な細胞毒性を示したが、単剤の化合物 **11** は、細胞死誘導能を持たなかった。ところが化合物 **11** は、トポイソメラーゼ阻害剤であるカンプトテシンと併用することで、カスパーゼ依存的細胞死を誘導することを明らかにし、細胞レベルでの効果が確認できた。

今後は 3FLAG-PKC α と光親和性基を導入した化合物を用いた結合部位の同定、さらに PKC α と PS との相互作用に着目し、IB 誘導体の詳細な作用機構解明を目指した研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- Hirai, G., Ohkubo, M., Tamura, Y. and Sodeoka, M. “Design and synthesis of protein kinase C α activators based on ‘out of pocket’ interactions” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 3587-3590 (2011) 査読有
- Hirai, G., Ogoshi, Y., Ohkubo, M., Tamura, Y., Watanabe, T., Shimizu, T. and Sodeoka, M. “Asymmetric synthesis of isobenzofuranone derivatives and their unique character as protein kinase C α (PKC α) activators” *Tetrahedron Lett.* **50**, 3609-3612 (2009) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- 酒井 基成、田村 結城、平井 剛、袖岡 幹子 「Isobenzofuranone 誘導体を基盤とした Protein Kinase C 阻害剤の開発」日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月

31 日

- Yuki Tamura, Go Hirai, Megumi Ohkubo, Mikiko Sodeoka “Novel isobenzofuranone derivatives having Protein Kinase C inhibitory activity” EMBO Conference Series, Chemical Biology 2010 (Heidelberg, Germany) September 24 2010
- 田村 結城、平井 剛、袖岡 幹子 「新規イソベンゾフランオン誘導体の PKC 阻害機構の解析」日本がん分子標的治療学会 第 14 回学術集会 (東京) 2010 年 7 月 6-8 日
- Yuki Tamura, Go Hirai, Megumi Ohkubo, Mikiko Sodeoka “Study on PKC inhibition by novel isobenzofuranone derivatives and their mechanism of action” The 25th NAITO Conference on Chemical Biology [II] (Sapporo) September 8-11, 2009
- 田村 結城、平井 剛、大窪 恵、袖岡 幹子 「新規 Isobenzofuranone 誘導体の PKC 阻害活性と作用機序に関する研究」日本ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会 (神戸) 2009 年 5 月 18-19 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

袖岡 幹子 (SODEOKA MIKIKO)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・主任研究員

研究者番号：6 0 1 9 2 1 4 2

(2) 研究分担者

平井 剛 (HIRAI GO)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・専任研究員

研究者番号：5 0 3 5 9 5 5 1

田村 結城 (TAMURA YUKI)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・客員研究員

研究者番号：5 0 4 4 2 9 8 4

(3) 連携研究者

なし