低分子によるたんぱく質間相互作用の制御

研究室紹介

加　藤　修　雄*

Regulation of protein-protein interactions by small organic molecules

Key Words：structure-based design, protein-protein interactions, protein surface recognition, proteomimetics, anti-cancer agents

医薬品の多くは，疾病にかかわる酵素の活性サイトを標的として開発されて来た．もちろんこの手法は，少なくとも近未来的には主要な創薬手法であり続けるであろう．しかし，たとえば，遺伝子発現に至る細胞内信号伝達経路上において，多くのたんぱく質－たんぱく質相互作用が関与していることからすれば，この相互作用の制御も標的となりえるはずであり，実際そうした研究展開の重要性が指摘されつつある．

我々，産業科学研究所・医薬品化学研究分野においても，構造生物学の成果として提出されるたんぱく質の３次構造を「眺め」つつ，できれば，論理的分子設計を駆使して，上記相互作用を制御し得る有機低分子化合物を創出すべく研究を行っている．

コチレニン／フシコクシン誘導体

ジテルペン配糖体であるコチレニン（CN）およびフシコクシン（FC）は，休眠種子の発芽を強力に誘起するなど，特異な植物ホルモン様活性を持つことで古くから知られていた。この活性は，植物形質膜状の H^+-ATPase の C 末端リン酸化部位と 14-3-3 たんぱく質の会合安定化に起因しており，図１に示すように 14-3-3 たんぱく質/リン酸化ペプチド/ FC３者会合体の結晶構造も明らかにされている．

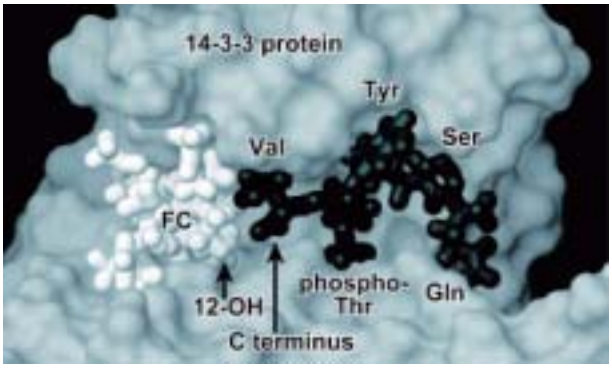
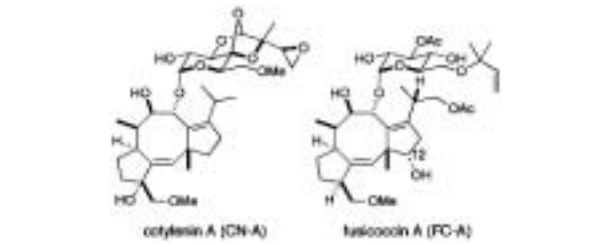


図１．light gray: 14-3-3たんぱく質，dark gray: H^+-ATPaseのC末端（QSYpTV），white: フシコクシン［Würtele M. *et al., EMBO J.*, 22, 987 (2003)］.

この活性発現機構および３者会合体の構造は極めて興味深い．すなわち，i）14-3-3 たんぱく質は，真核細胞生物の広範な細胞内に普遍的に発現し，Ser/Thr キナーゼによってリン酸化される多くのたんぱく質と会合体を形成することで，細胞内信号伝達を制御している，ii）CN/FC は 14-3-3 たんぱく質とリン酸化された H^+-ATPase の２者会合体が形成するクレフトに，いわばジグソーパズルの３つ目のピースとして嵌り込み，安定な３者会合体を形成している，点である．i）の事実は，植物のみならず，動物細胞内でも CN/FC が 14-3-3 たんぱく質の機能制御を通して何らかの活性を示す可能性を示唆する．一方，ii）は，CN/FC がたんぱく質－たんぱく質相互作用を増強していることに他ならない．「化学的」な言葉で言えば，14-3-3 たんぱく質はリン酸化状態

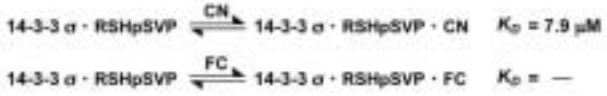


*Nobuo KATO
1951年6月生
東北大学大学院理学研究科化学第二専攻博士課程修了（1980年）
現在．大阪大学産業科学研究所　機能分子科学研究部門医薬品化学研究分野
教授　理学博士　医薬品化学、有機合成化学、化学生物学
TEL：06-6879-8470
FAX：06-6879-8474
E-mail：kato-n@sanknen.osaka-u.ac.jp

の「保護基」であり，CN/FC はその保護能の増強剤と看做せる．

恐らく上述の発現機構と関連すると考えているが，CN がヒト白血病細胞に対して細胞分化誘導活性を示すことが明らかになった．しかも，単剤としての血液系腫瘍に対する分化誘導活性だけではなく，インターフェロンαと併用すると各種固形癌に対してアポトーシスを誘導し，顕著な腫瘍増殖抑制効果を示す．ヌードマウスへのヒト卵巣癌の異種移植片に対しても，毒性を示すことなく高い確率で完全治癒をもたらした．しかし，少なくとも HL-60 に対する分化誘導活性は CN に特有のもので，植物に対しては同等の活性を有するFCは全く活性を示さない．我々は，14-3-3 たんぱく質によって捕捉されるリン酸化ペプチドは一般に …RSXpSXP… の配列を持つことに着目した．つまり，図１の H^+-ATPase の場合はリン酸化 Thr の次の Val がこのたんぱく質の C 末であり，むしろ特異な例と捉えるべきで，通常ペプチド鎖は Pro を挿んでさらに伸長している．ただし，Pro の存在によって後続の C 末側ペプチド鎖は 14-3-3 たんぱく質の結合溝から逸脱できるので，結合溝に CN/FC が存在したとしても，Pro までが収納できれば …RSXpSXP… に対しても図１と同様の３者会合体形成を期待することができる．図１のペプチド C 末にさらに Proが存在することを想定すると，12 位水酸基の有無が鍵になると考えられる．つまり，この水酸基を持たない CN は３者会合体を形成し得るが，存在する FC はペプチド鎖との立体障害により，安定な３者会合体を形成し得ず，そのことが分化誘導活性の有無と関連すると仮想することができよう．

そこで， RSHpSVP と 14-3-3 たんぱく質の２者会合体に対する CN/FC の会合体形成能を等温滴定熱量（ITC）測定によって評価したところ下式の結果を得た．CN は３者会合体を形成するが，FC は形成



しない．この会合能の相違が分化誘導活性と関連するなら，12 位水酸基を持たない FC 誘導体に活性があっても良いことになる．

以上を踏まえ，ISIR-005 とコードした 12-デオキシ FC 誘導体とその 12 位水酸化誘導体（ISIR-021）を合成し，HL-60 に対する分化誘導活性を評価した．（図２）予想通り，ISIR-005 には CN に匹敵する分化誘導活性が認められ，ISIR-021 に活性はない．12 位水酸基の有無が活性発現に決定的な要因となっていることが明白である．実は，良好な抗がん活性を持ちながら CN の医薬開発が行われて来なかったのは，未登録生産菌の CN 生産能が消失し、供給の道が断たれていることによる．したがって，植物病原菌（*Phomopsis amygdali*）からの永続的な供給が行えるFCから，CN と同等の活性を有する誘導体を創出できたことの意義は大きく，現在，ISIR-005 をリードとした抗がん剤開発に取り組んでいる．

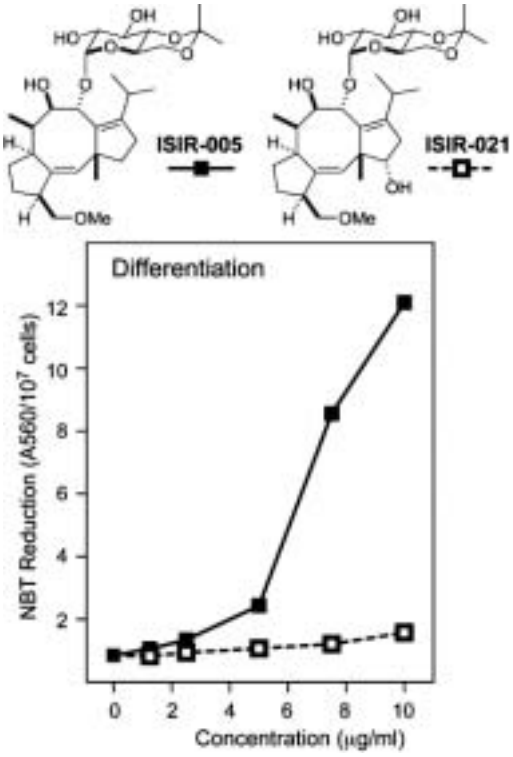


図２．NBT還元能を指標とした分化誘導活性評価．HL-60, 6 days

GGTase-I 阻害剤

上記の例はたんぱく質間相互作用の制御の一例と言えるが，14-3-3/FC ２者会合体を１つのたんぱく質と看做せば，そこに形成されるクレフトに低分子を嵌め込んでいるわけで，従来の酵素活性ポケットを標的とする手法とさほど変わりはない．一方，たんぱく質の広い外部表面間の相互作用を低分子によって制御することはより難しく，魅力的であるが困

難な課題である．

Type-Iゲラニルゲラニル転移酵素（GGTase-I）は，細胞内信号伝達経路で重要な機能を果たすGTP-結合たんぱく質の翻訳後修飾を担う酵素であり，抗がん剤の分子標的としても注目されている．GGTase-Iには活性ポケットの周辺外部表面に酸性アミノ酸クラスターによる負電荷領域が存在し，基質たんぱく質の認識に関与していることが示唆されている．つまりGGTase-Iは，内部表面（活性ポケット）と周辺外部表面に独立した機能を有するたんぱく質と看做せる．

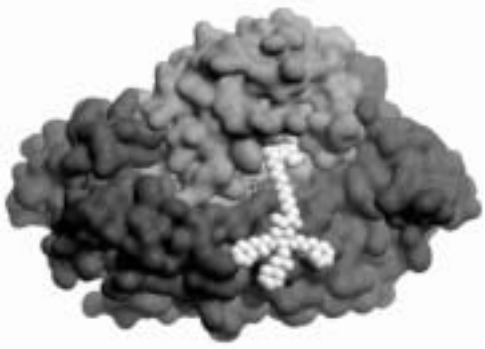


図３．GGTase-I 結晶構造（dark gray: α-subunit, light gray: β-subunit）とハイブリッド型化合物２（white）の重ね合わせモデル．活性ポケットを正面から見た図．

そこでGGTase-Iの基質テトラペプチドのCVILと，外部表面認識部位である１級アミノ基含有没食子酸誘導体を，スペーサーを介して連結した化合物を合成した．この化合物はGGTase-Iの内部表面とその周辺の外部表面を同時に認識することで単独モジュールよりも強い親和性を獲得すると期待したからである．実際，CVIL，没食子酸誘導体それぞれに比較してハイブリッド型化合物のGGTase-Iに対する親和性は加算的に増加した．

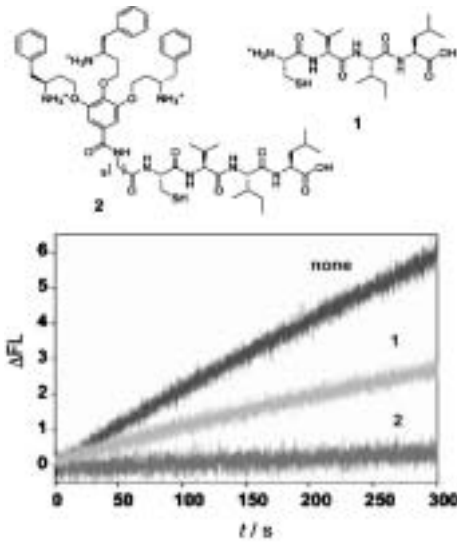


図４．蛍光強度の時間変化（520 nm）を指標としたGGTase-I 阻害活性評価．阻害剤濃度= 5 μM

冒頭に述べたように，今後，たんぱく質間相互作用解明を指向した外部表面認識型有機低分子の創出が重要であり，ハイブリッド型分子設計は，外部表面認識型化合物の分子量と結合選択性に関する潜在的な問題に対する，新しい方法論であると考えている．

第一のテーマは，新田孟助教とともに展開している．第二のテーマは，大神田淳子准教授によって主導された成果であり、異なる手法によるたんぱく質外部表面認識手法についても研究を行っている．また標題とは方向性を異にするが，バクテリアのクオラムセンシングなど，幾つかの異なる標的を対象とした阻害剤の創出研究や，医薬候補化合物の合成プロセスの確立，分子材料解析研究分野所属の開發邦宏助教との緑茶成分の抗ウィルス活性に関する研究等，多岐に亘る研究テーマに取り組んでいる．