

氏 名	ふじ 藤 田 美 か こ 藤 田 美 歌 子
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 371 号
学位授与の日付	平 成 8 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	亜鉛フィンガー蛋白質を標的とした人工配位子の分子設計に関する研究

(主 査)
論文調査委員 教 授 杉 浦 幸 雄 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 横 山 陽

論 文 内 容 の 要 旨

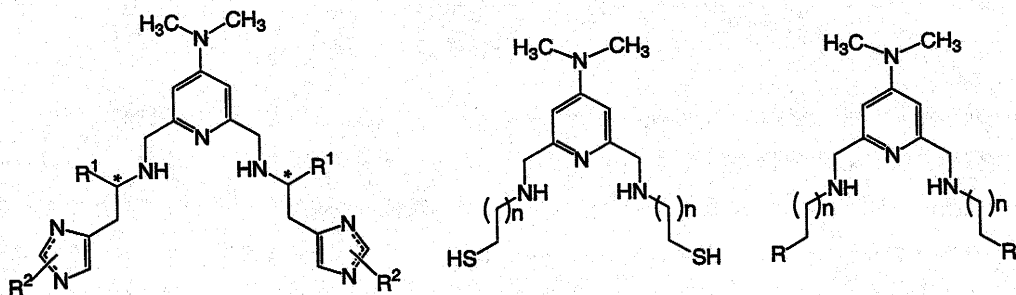
近年の分子生物学の発展に伴い、遺伝子の発現調節を担う転写因子などの蛋白質の構造や機能が明らかになってきた。特定の転写因子の機能を阻害することができれば、その転写因子が調節する特定の遺伝子の発現が選択的に抑えられると考えられる。このアプローチは、医薬品の開発や遺伝子発現機構の解明に寄与すると期待される。遺伝子の機能を阻害する化合物として DNA に作用する天然物や合成化合物はこれまでに多く報告されているが、特定の転写因子を標的とした阻害剤はほとんど知られていない。本研究では、亜鉛フィンガー蛋白質を始めとする転写因子の機能制御を目的とした人工化合物の分子設計、合成、活性評価を行い、以下のような幾つかの興味深い知見が得られた。

第一章 イミダゾール配位子による HIV-EP1 の DNA 結合の阻害

HIV-EP1 はエイズのプロウイルスの DNA に結合する転写因子で、DNA 認識部位として 2 つの C_2H_2 型亜鉛フィンガーを持っている。亜鉛を強固にとりこむ配位子を設計することができれば、HIV-EP1 から立体構造を構築している亜鉛を除去し、その機能を阻害できると考えた。そこで亜鉛酵素の亜鉛結合部位に見られるイミダゾール基やカルボキシル基を持った複素環配位子 1-4 およびそのジメチルアミノ誘導体 7 を合成した。これらの化合物が亜鉛配位能力を持つことは NMR スペクトルを用いて確かめられた。次にゲルシフト実験を行った結果、1-4 は EDTA より強く HIV-EP1 と DNA の結合を阻害した。その中でも 1 や 4 は特に強い阻害効果を示した。これに対して 7 の阻害活性は弱く、イミダゾール基の有効性が確かめられた。さらに 1 や 4 によって阻害された HIV-EP1 と DNA の結合は亜鉛を加えると回復することから、この阻害は予想通り亜鉛フィンガーからの亜鉛の除去に起因することが示唆された。しかし、必ずしも亜鉛に高い配位能力を持つ化合物が強い阻害効果を示さなかった。これは、配位子による電子的効果や立体障害などが阻害反応に寄与しているためと考えられる。

第二章 メルカプト配位子による効率的な阻害

すべての亜鉛フィンガー蛋白質が亜鉛結合部位に持つメルカプト基は金属から電子の逆供与を受けるこ



- 1: $R^1=CO_2CH_3$, $R^2=H$ (*SS)
 2: $R^1=CO_2CH_3$, $R^2=Trt$ (*SS)
 3: $R^1=CO_2H$, $R^2=Trt$ (*SS or RS)
 4: $R^1=H$, $R^2=H$

- 5: $n=1$
 6: $n=2$

- 7: $R=N(CH_3)_2$, $n=2$
 8: $R=SCH_3$, $n=1$
 9: $R=SCH_3$, $n=2$
 10: $R=OH$, $n=2$

とができるため、亜鉛と強く結合することが知られている。そこでイミダゾール基に代わってメルカプト基を導入した化合物 5, 6 およびその類縁体 8-10 を合成した。ゲルシフト実験を行ったところ、予想通り 5 と 6 は 1 よりも強く HIV-EP1 と DNA の結合を阻害することがわかった。特に 5 の IC_{50} は約 $4\mu M$ で、1 の 10 倍と最も強い阻害効果を示した。これに対して 8-10 の阻害活性は弱く、メルカプト基が阻害に重要であることが確かめられた。5 によって阻害された HIV-EP1 と DNA の結合は亜鉛を加えても回復しなかった。これは阻害が亜鉛の除去に起因するのではなく、亜鉛酵素の阻害剤に見られるようにメルカプト基の亜鉛との結合に起因するためと推測される。

第三章 転写因子阻害における選択性

HIV-EP1 は DNA の κB 配列 (5'-GGGACTTTCC-3') に特異的に結合するが、免疫系の遺伝子の発現に関与する転写因子 NF- κB も κB 配列に結合することが知られている。NF- κB は Rel ホモロジー蛋白質であり、亜鉛フィンガーを持たない。ホルボールエステルなどで細胞を刺激すると HIV-EP1 と NF- κB の両方が同時に誘導されるため、各々の転写因子の役割解明の見地から、これまでに合成した HIV-EP1 阻害剤の NF- κB に対する影響を検討した。ゲルシフト実験の結果、1 は NF- κB と DNA の結合を阻害しなかったが、意外なことに、3 とその亜鉛錯体が NF- κB と DNA の結合を阻害することがわかった。3 の亜鉛錯体は HIV-EP1 と DNA の結合を阻害しないことから、NF- κB の機能を選択的に阻害することが示された。

一方、 C_4 型亜鉛フィンガーを持つアデノウイルス E1A は TATA 結合蛋白質 (TBP) と結合し、転写因子複合体を形成する。E1A と TBP との結合に対する 1 の阻害効果を TBP ビーズを用いて調べた。その結果、 IC_{90} は約 $100mM$ もの高い値であり、HIV-EP1 と DNA の結合がほとんど消失する $300\mu M$ の 1 によっては阻害が全く見られなかった。

このように、同時に誘導され κB 配列に競合的に結合する 2 つの転写因子 HIV-EP1 と NF- κB を、化合物を使い分けることによって区別して阻害することができた。また、亜鉛フィンガー蛋白質間においても HIV-EP1 のみを阻害することができた。

本研究成果は、従来、未開拓であった亜鉛フィンガー蛋白質の機能を阻害する新規化合物の開発に価値ある情報を提供するばかりでなく、遺伝子発現の制御を目指す次世代の創薬の礎にもなり得ると考えられる。

論文審査の結果の要旨

特定の転写因子の機能阻害は、その転写因子が調節する特定の遺伝子発現の選択的制御に通じ、新規医薬品の開発や遺伝子発現機構の解明に寄与すると考えられる。本研究では主として亜鉛フィンガー型転写因子の機能制御を目的とした人工配位子の分子設計、合成、活性評価を行い、幾つかの有用な知見を得た。

エイズのプロウイルスの DNA に結合する転写因子 HIV-EP1 は C_2H_2 型亜鉛フィンガーを有するので、この亜鉛を除去できる有効な配位子を創製できれば HIV-EP1 の機能を阻害することが可能である。そこで、天然亜鉛酵素の活性部位に見られるイミダゾール基やカルボキシル基を持った新規複素環配位子およびそのジメチルアミノ誘導体を設計・合成した。ゲルシフト実験の結果から、本合成化合物、特にイミダゾール基を有する配位子は EDTA よりも強く HIV-EP1 と DNA との結合を阻害することが示された。また、この阻害は亜鉛を添加することによって回復することから、新規イミダゾール化合物による HIV-EP1 の阻害は亜鉛フィンガーからの亜鉛除去に起因することが強く示唆された。

次にイミダゾール基の代わりにメルカプト基を導入した化合物およびその類縁体を設計・合成した。メルカプト基は亜鉛から電子の逆供与が期待でき亜鉛と強く結合することが出来る。予想通り、メルカプト化合物は対応するイミダゾール化合物よりも約10倍強い阻害効果を示した。しかし、メルカプト化合物によって阻害された HIV-EP1 と DNA との結合は亜鉛を添加しても回復せず、本化合物による阻害が亜鉛除去ではなく、亜鉛酵素の活性阻害でよく見られるメルカプト基の亜鉛との結合に起因するためと考えられた。

免疫系の遺伝子発現に関与する転写因子 NF- κ B は亜鉛フィンガーを持たないが、HIV-EP1 と同様に DNA の κ B 配列 (5'-GGGACTTTC-3') に結合する。HIV-EP1 阻害剤の NF- κ B に対する効果を検討したところ、これまで合成したイミダゾール化合物の中に、HIV-EP1 と DNA との結合は阻害しないが、NF- κ B と DNA との結合を選択的に阻害するものを見出した。さらに C_4 型亜鉛フィンガーを有するアデノウイルスの転写因子 E1A と C_2H_2 型亜鉛フィンガーを持つ HIV-EP1 との間の新規イミダゾール配位子の阻害効果を比較した結果、本化合物は HIV-EP1 のみを阻害することが明らかになった。

本研究成果は、亜鉛フィンガー型転写因子の機能を阻害する新規化合物の分子設計、合成および活性評価に関して価値ある情報を提供するばかりでなく、遺伝子発現の制御を目指す次世代の創薬の礎にもなり得ると考えられ、審査に当たった川寄教授、横山教授そして私は、本論文が博士(薬学)の論文として価値あるものと認めた。さらに、平成8年2月28日論文内容とそれに関連した事項につき口頭試問を行った結果、合格と認めた。