

たんぱく質間相互作用を制御する合成分子の創製

Rational Design of Synthetic Agents that Control Protein-protein Interactions

京都大学化学研究所 生体機能化学研究系 ケミカルバイオロジー研究領域 大神田 淳子

背景と目的

急速な高齢化が進む我が国において、死亡原因の 1 位を占めるがんは常に深刻な疾病である。がんの約 30%に Ras たんぱく質の変異が見出される。そのため Ras の不活性化を戦略とする抗がん剤研究が広くなされてきたが、臨床薬の開発には至っていない。2013 年、米国がん研究所が Ras プロジェクトを立ち上げて話題になり[1]、Ras 標的型創薬に再び注目が集まっている。特に、進行性すい臓がんや再発性大腸がんなどの K-Ras 変異由来難治性がんは薬剤耐性が高く、薬剤開発を含めた医療技術の改善に革新的なアプローチが望まれている[2]。

一方、たんぱく質間相互作用(protein-protein interactions; PPIs)は生体内信号伝達系で主要な役割を果たし、増殖・分化・老化等の多様な生体反応を司っている。PPIs の異常と様々な疾病の関連が明らかになり、ポストゲノム時代の創薬標的として広く注目されている[3]。しかし PPIs の作用面は浅く広く、低分子による創薬が極めて難しい。我々はこれまでに、平坦なたんぱく質表面を認識する中分子サイズの多価有機分子を、表面の局所的な構造的特徴に相補的なモジュール低分子を設計してこれらを組み上げて得る、モジュールアセンブリ法を検討してきた[4]。本研究では、K-Ras と、脂質翻訳後修飾酵素のファルネシル転移酵素(FTase)と FTase およびゲラニルゲラニル化酵素(GGTase-I)との間に起こる過渡的 PPIs に焦点を当て、モジュールアセンブリ法に基づくアンカー型中分子を合理設計し、細胞内 PPIs の制御を検討することを目的とした。

検討内容

本来、GTP 結合たんぱく質である Ras は、MAPK 信号伝達系の on/off を司る分子スイッチとして細胞増殖の制御を担っているが、GTP 結合サイトの 1 アミノ酸残基に変異が生じると加水分解機能が消失し、増殖シグナルの異常な活性化が起こる。Ras のスイッチ機能には C 末端側の Cys のファルネシル化翻訳後修飾が必須であるので、FTase 阻害剤を作用させると、がん細胞の増殖は抑制される。しかし、K-Ras 変異由来のがん細胞の場合、FTase を阻害すると K-Ras がゲラニルゲラニル化される「抜け道」機構が存在し増殖を抑制できない。この原因は、K-Ras 特有の C-末端ポリリシン領域と、FTase および GGTase-I の共通サブユニットが持つ酸性表面間で起こる、一過性の PPIs にあることがわかっている。我々はこの PPIs を標的とした FTase/GGTase-I dual 阻害剤をアンカー法で設計した。すなわち、酵素の活性ポケットに結合する K-Ras の C 末端テトラペプチド CVIM をアンカーとし、酸性表面と同程度の大きさを持つように最小限に設計したアミノ基含有没食子酸誘導体を、スペーサーで連結した化合物を設計・合成した。

結果と考察

蛍光標識 K-Ras C 末端オリゴペプチドを用いた in vitro 試験の結果、この化合物の FTase と GGTase-

I に対する阻害活性は、テトラペプチドを大きく上回り、nM の活性を示す dual 阻害剤として機能することが分かった。阻害モードは競合阻害機構であり、非特異的な結合によるものではなかった。また、阻害活性にはモジュールの加算性が認められたが、没食子酸誘導体モジュールのみでは高濃度でも全く活性がなかった。この結果は、「小さく弱い」表面モジュールが、アンカーの助けによって狙った酸性表面に配置されて機能を果たす、という当初の予想が妥当であったことを支持している。なお、アンカーを CVIL テトラペプチドに変更すると、

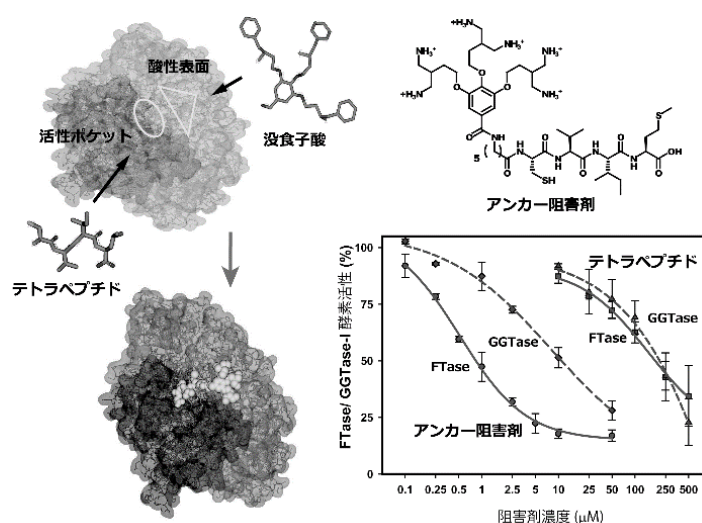


図1. (左) モジュールアセンブリによるアンカー型阻害剤の設計。(左下) FTase 結晶構造との重ね合わせモデル (阻害剤; CPK 表示) (右) アンカー型阻害剤とテトラペプチドの FTase と GGTase に対する阻害活性

GGTase-I 選択的阻害剤を得ることもできた。すなわち、標的への結合選択性と親和性は、アンカーモジュールによって支配的に制御されている、と解釈できる。以上の結果から、アンカー型化合物が PPI 阻害剤として有効であるとともに、共通のたんぱく表面構造が dual 型阻害剤の分子標的となることを明らかにできた[5]。

ペプチド性のアンカーを使用したため当初から予想されたことではあったが、この化合物には細胞透過性が欠如していた。そこでアンカーをペプチドミメティクス化した種々の誘導体を設計・合成し、Ras 変異性膀胱がん細胞 T-24 に対する細胞増殖抑制効果を比較検討した。その結果、グアニジル基含有化合物は、アミノ基含有誘導体と比較して高い増殖阻害活性を示すことが分かった。さらに、HDJ-2 タンパク質のファルネシル化に対する阻害活性を Western blot 法を用いて評価したところ、化合物は 10 μM で有意な阻害活性を示すことが明らかとなった。本化合物は K-Ras タンパク質間相互作用阻害剤のリード化合物として期待される。更なる細胞活性の改善を目指し、強力な結合能を持つペプチドミメティクスを導入した構造改変を進め、現在、nM の細胞活性を示す誘導体を得るに至っている。この化合物は細胞内の K-Ras プレニル化を選択的に阻害することを確認しており、今後、動物担がんモデルを用いた生物学的な検討を行い K-Ras 標的型抗がん剤としての評価を進めていく予定である。

参考文献

- 1) H. Thompson H., *Nat. Med.* **19**, 949 (2013).
- 2) Mullard A., *Nature Rev. Drug Discov.* **11**, 173 (2012).
- 3) C. Meier, et al., *Drug Discovery Today* **18**, 607 (2013).
- [4] J. Ohkanda, *Chem. Rec.* **13**, 561 (2013).
- [5] S. Machida, N. Kato, K. Harada, J. Ohkanda, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 958 (2011).