

(論文内容の要旨)

プロテインキナーゼ C (PKC) は、細胞の分化、増殖、アポトーシスなどの多くの細胞機能に関わる細胞内情報伝達の鍵酵素であり、発がんプロモーターの主要なターゲットとしても注目されている。PKC は 10 種類以上のアイソザイムからなるが、発がんプロモーターは、conventional PKC (cPKC: α , β I, β II, γ) と novel PKC (nPKC: δ , ϵ , η , θ) の 8 種に存在する C1 ドメイン (C1A, C1B) に結合してこれらの PKC を活性化する。近年、発がんプロモーションにおいて 3 種の nPKC (δ , ϵ , η) が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。しかしながら、nPKC がどのようなシグナル伝達を行なっているかについては不明な点が多い。nPKC を選択的に活性化する化合物は、この問題を解決するためにきわめて有用であり、その開発が強く求められている。本論文では、天然の発がんプロモーターである indolactam-V (IL-V) をリード化合物として nPKC 選択的な活性化剤を開発した結果がとりまとめられている。その主な内容は以下の通りである。

第 1 章では、PKC の細胞内情報伝達における役割ならびに、これまでに開発された PKC アイソザイム選択的な活性化剤および阻害剤の構造と各種生理活性について概説し、本研究の目的および意義について述べた。

第 2 章では、放線菌由来の PKC 活性化剤である IL-V と PKC δ C1B ドメイン (δ -C1B) との結合様式を、CH/ π 相互作用 (CH 基と π 電子との引力的相互作用) に注目して解析した。その結果、IL-V のインドール環が δ -C1B の 11 番目の Pro 残基 (Pro-11) の 4 位および 5 位水素原子と CH/ π 相互作用している可能性を見だし、CH/ π 相互作用を形成できないフッ素原子で Pro-11 の 4 位を置換した δ -C1B (P11dfP- δ C1B) を用いて、CH/ π 相互作用の関与を実験的に証明した。Pro-11 は、全 PKC アイソザイムに保存されており、その空間位置は PKC アイソザイム間で異なっている可能性が考えられた。

第 3 章では、IL-V の 1 位あるいは 12 位への置換基の導入が、PKC アイソザイム選択的な結合に与える影響を調べた。12 位側鎖では、 α 位に枝分かれを持たない誘導体が若干の nPKC 選択性を示した。1 位側鎖では、嵩高いイソプロピル基を持つ誘導

体が顕著な nPKC 選択性を示した. 側鎖の導入によって CH/ π 相互作用にアイソザイム間の差異が生じたかどうかを評価するため, PKC γ の C1A の Pro-11 の 4 位水素原子をフッ素原子に置換したペプチド (P11dfP- γ -C1B) を合成し, 先に合成した P11dfP- δ -C1B とともにリガンド結合能を評価した. その結果, IL-V の 1 位へのイソプロピル基の導入により, C1ドメインの Pro-11 との CH/ π 相互作用がアイソザイム間で異なることによって, nPKC 選択性がもたらされた可能性が示唆された.

第 4 章では, IL-V の 1 位にヘキシル基を導入するとともにラクタム環を 9 員環から 10 員環に拡大することによって, PKC アイソザイム C1ドメインの Pro-11 に対するインドール環の空間位置を変化させた 1-hexyl-indolactam-V10 (IL-V10) を設計した. 本化合物は, 4-nitroindole を出発原料として 14 段階, 総収率 3.4%で合成した. IL-V10 は, nPKC に 10 ~ 30 nM の解離定数で結合したのに対して, cPKC に対する解離定数はいずれも 5,000 nM 以上であった. さらに, IL-V10 は HeLa 細胞において, 3 種の nPKC (δ , ϵ , η) を選択的に細胞質から細胞膜に移行させ, PKC の特異的な基質である MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) をリン酸化した. 以上の結果は, IL-V10 が nPKC 選択的な活性化剤であることを示している. 3 種の nPKC (δ , ϵ , η) は, マウス皮膚発がんのプロモーション段階において重要な役割を果たしていることから, IL-V10 は発がんプロモーションを解析するためのツールになりうる.

最後に, 第 5 章で本論文の研究内容の要約ならびに結論を述べた.

(論文審査の結果の要旨)

プロテインキナーゼ C (PKC) は、細胞内情報伝達における鍵酵素であり、がんやアルツハイマー病などの様々な疾患の治療薬のターゲットとして注目されている。PKC には 10 種類以上のアイソザイムが存在し、それぞれに機能的な差異があることが知られている。従って、個々のアイソザイムに選択的に結合して活性化するリガンドの開発は、PKC アイソザイムの機能を正確に把握する上で必要不可欠である。本研究では、CH/ π 相互作用 (CH 基と π 電子との引力的相互作用) に着目し、発がんプロモーションにおいて重要な役割を果たしている 3 種の novel PKC アイソザイム (nPKC: δ , ϵ , η) を選択的に活性化する化合物の設計と合成を行なった。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 放線菌の産生する発がんプロモーターである indolactam-V (IL-V) は、分子量が小さく化学的に安定であることからリード化合物として最適である。本研究ではまず、IL-V と PKC δ C1B ドメイン (δ -C1B) とのドッキングシミュレーションを行ない、IL-V のインドール環と δ -C1B の 11 番目のプロリン残基 (Pro-11) の 4 位および 5 位の水素原子が CH/ π 相互作用している可能性を示唆した。そこで、 δ -C1B の Pro-11 の 4 位水素原子をフッ素原子に置換した変異ペプチドを合成し、本ペプチドの IL-V に対する結合能を測定することによって、CH/ π 相互作用を検証することに成功した。リガンドと酵素との結合において、水素結合および疎水性相互作用という古典的な分子間相互作用のみならず、水素原子と π 電子との弱い引力的相互作用を考慮すべきであることを明快に示したことは高く評価できる。
2. IL-V の 1 位に嵩高い置換基を導入することによって、nPKC に対する結合選択性が増大することを明らかにした。さらにその高い選択性の一部は、上記 CH/ π 相互作用の PKC アイソザイム間における差異に起因することを示した。
3. 上記 CH/ π 相互作用を PKC アイソザイム間で変化させる目的で、IL-V の 1 位にヘキシル基を導入するとともにラクタム環を 9 員環から 10 員環に拡大した 1-hexyl-indolactam-V10 (IL-V10) を合成した。本化合物は、顕著な nPKC 結合選択性を示し、HeLa 細胞において、3 種の nPKC (δ , ϵ , η) を選択的に細胞質から細

胞膜に移行させて活性化した. IL-V10 は, 発がんプロモーション機構を解析するためのツール分子としての応用が期待される.

以上のように本論文は, IL-V と PKC との結合において, 水素結合や疎水性相互作用以外の分子間相互作用である CH/ π 相互作用の重要性を実験的に証明し, 本相互作用を nPKC を選択的に活性化する薬剤の開発に応用したものであり, 生物有機化学, 医薬品化学, および酵素化学に貢献するところが大きい.

よって, 本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める.

なお, 平成 21 年 2 月 13 日, 論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた.