

論文の内容の要旨

論文題目 低分子リガンドによる細胞接着蛋白質の機能制御に関する研究

氏名 妹尾 暁暢

第1章 序論

蛋白質はその機能を発揮する際に多量体を形成することが多く、生命現象の根底には蛋白質同士の機能複合体形成があると言える¹。そのため蛋白質機能複合体の形成を制御する分子は、難病治療のための薬剤や機能解明のためのプローブとしての可能性をもつ。蛋白質機能複合体の形成駆動力となっているのが蛋白質-蛋白質間相互作用(Protein-protein interaction; PPI)である。PPIにはいくつかの特徴がある。ひとつは、相互作用界面が広い(1000-3000 Å²)点、もうひとつは PPI が天然の基質リガンドを持たない点である²。こうした背景から PPI 制御分子として、広い相互作用界面と高度な分子認識能を発揮する抗体など高分子量の分子種が選択されることも多い。しかしながらそれらのモダリティには投与方法の制限や高コスト、細胞膜透過性の低さといった問題がある³。以上の背景から PPI を低分子で制御する有効な戦略が求められている。

本研究では、細胞接着蛋白質 P-カドヘリンによる蛋白質機能複合体形成を標的にこれを低分子で制御することを目的とした。P-カドヘリンは上皮細胞で広く発現している E-カドヘリンと同じクラシカルカドヘリン・I 型に属する蛋白質である。通常細胞では一部組織でしか発現していないものの、大腸癌・膵臓癌・肺癌など様々な癌細胞において高発現している⁴。さらに、抗 P-カドヘリン抗体を用いた研究では、P-カドヘリンによる細胞接着は癌の浸潤や増殖を促進する作用があることが確認されている⁵。こうした背景より、P-カドヘリンの細胞接着を制御することは抗浸潤という観点から重要な抗

癌戦略であると位置付けられている。細胞接着の分子基盤は細胞上でのカドヘリン分子のホモ二量体化である。細胞外ドメインの2ドメイン(Extracellular domain 1-2; EC12)が中間体(Xダイマー)を経て、Strand-Swapダイマー(S-Sダイマー)というホモ二量体を形成する⁶。このホモ二量体が細胞上でクラスター化することで細胞接着能が発揮される。S-Sダイマーにおいては蛋白質表面の疎水ポケットが相互作用に重要であることが知られている。そのため、カドヘリン制御分子の開発もその疎水ポケットに対するリガンド開発を主軸として進められてきた^{7,8}ものの、同ポケットへの結合が証明されたリガンドは存在しない。従って、P-カドヘリンを含むクラシカルカドヘリンの低分子による接着形成制御に向けた効果的な戦略は未知である。

第2章 SPRを用いたP-カドヘリンホモ二量体に対する低分子スクリーニング

本研究ではまずP-カドヘリンのモノマー変異体へ結合する低分子のスクリーニングを行った。センサーチップ上に固定化したP-カドヘリンのモノマー変異体に対し、ライブラリー中の化合物を流し、得られた結合レスポンスが上位約7%につき、結合活性を有する化合物として選抜した。続いて得られた化合物に対して、S-Sダイマーを形成するコンストラクト(EC12)をセンサーチップ上に固定化し、ABAアッセイと呼ばれるSPRの手法を用いてセンサーチップ上のダイマー形成を阻害する活性を示す化合物を選抜した。ABAアッセイにおいては2種類の溶液A、Bを連続的にセンサーチップ上に流す。溶液Aには固定化したものと同じEC12を、溶液Bには一次スクリーニングのヒット化合物を用いた。これにより溶液Aでセンサーチップ上に形成されたホモ二量体が溶液Bにより解離されるかを検証した。この様な活性を示す化合物は2化合物存在したが、その内1化合物について、結合活性に関する濃度依存性が確認できたため、続く評価系にはその1化合物(Hit 1)を用いることとした。

第3章 ヒット化合物による細胞接着阻害機構の精密解析

Hit 1のP-カドヘリン上での結合位置を特定するためにX線結晶構造解析を実施した。P-カドヘリンのモノマー変異体を結晶化し、この結晶をHit 1を含む結晶母液へと液浸した。その結果分解能2.30 ÅのHit 1とモノマーP-カドヘリンの複合体結晶構造を得た。Hit 1はEC1ドメインとEC2ドメインの中間に結合していた。この結合位置は細胞接着過程において中間体のホモ二量体であるXダイマーの結合界面付近に位置していたため、Hit 1はXダイマーを制御している可能性が示唆された。この仮説を検証するために水素重水素交換質量分析法を用いて、Xダイマーの相互作用界面の溶媒への露出度をもとにHit 1のXダイマー阻害試験を実施した。Xダイマーの結合界面に含まれる領域でHit 1の添加に伴い重水交換率が上昇し、この部分がHit 1添加時に溶媒へ露出することが分かった。以上から、Hit 1はXダイマーの平衡をモノマー側へと偏らせる作用があることが示唆された。加えて、Hit 1によるXダイマーへの作用

を精査するため、再び X 線結晶構造解析を実施した。X ダイマーのみを形成し、S-S ダイマーは形成しないコンストラクト(MEC12)を結晶化し、Hit 1 を含む結晶母液へ液浸することで解像度 2.45 Å の Hit 1 と X ダイマーの複合体結晶構造を得た。本構造は、Hit 1 が X ダイマー阻害剤であることを考えると Hit 1 が X ダイマーに作用する過程での準安定構造を捉えたものであると考えられる。Hit 1 の結合により X ダイマーに対するドラスティックな構造変化と、それに伴う X ダイマー形成に必須な水素結合の切断が確認された。Hit 1 は、蛋白質に対する構造変化を誘起することで間接的に水素結合を切断し、X ダイマーの相互作用界面を不安定化したことを示唆する。

続いて X ダイマーへの作用が確認できた Hit 1 に関し、実際の細胞接着を阻害するかどうかを細胞凝集アッセイにより確認した。Hit 1 の添加時には、濃度依存的に細胞凝集の形成が阻害された。一方で、一度形成させた細胞凝集に Hit 1 を添加しても再び細胞を分散させる効果はないことが明らかになった。以上の結果は、一連の細胞接着形成過程において、分子同士の最初の相互作用である X ダイマー化が極めて重要なチェックポイントであり、X ダイマー化の結合定数(on-rate)が細胞接着形成を支配しているパラメータであることを示唆している。この仮説を検証するために、X ダイマーの形成速度を測定する手法としてリポソーム凝集アッセイを実施した。リポソーム上に MEC12 を固定化し、カルシウムの添加をスイッチとして X ダイマーを形成させ、これに基づくリポソームの凝集を O.D.₆₅₀ をもとに測定した。その結果、Hit 1 存在時には、そうでない場合に比べ優位に X ダイマー形成速度が低下していることが明らかになった。

さらに、モノマーと Hit 1 の複合体結晶構造を基により高阻害活性を有する化合物を設計・合成した。その結果、合成したいずれの化合物も Hit 1 と同程度の結合親和性しか示さなかったものの、ある化合物においては顕著な X ダイマー化の on-rate 減少効果の向上とそれと相関する細胞凝集形成阻害活性の向上が確認できた。以上より、細胞凝集形成過程における X ダイマーの on-rate の重要性を支持する結果が得られた。

3. 結論・展望

本研究により P-カドヘリンのホモ二量体化を制御可能な新たなリガンド結合部位および低分子骨格が見出された。同結合部位への化合物の結合はホモ二量体化に重要な EC12 ドメインの構造変化を誘起し、相互作用界面を間接的に不安定化させる効果があることが示唆された。こうした“ドメイン間の窪み”はさまざまな接着分子においても確認でき、本研究で得られた知見があらゆる接着蛋白質の低分子による制御に重要な知見を与えることが期待できる。また、X ダイマーの on-rate が P-カドヘリンの細胞接着形成過程を支配しているパラメータである可能性が示唆された。クラシカルカドヘリンにおける細胞接着形成過程のように、中間体を経る蛋白質複合体形成過程では一連の過程の最初の相互作用を速度論的に制御することが全体の行程の制御にも重要であることが考えられる。またこの速度論的制御には必ずしも高親和性が要求されるわけでもない

ことが合成展開の結果より示唆された。仮に本標的が本質的に高親和性リガンドを生み出しにくいものだとすれば、こうした親和性に頼らない阻害戦略が同様の性質を保有する PPI の制御に対し新たな切り口を与えることが期待できる。

4. 参考文献

- (1). Marsh, J. A., *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 551–575 (2015).
- (2). Scott, D. E. *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 533–550 (2016).
- (3). Imai K., *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **6**, 714–727 (2006).
- (4). Van Roy, F., *Nat. Rev. Cancer* **14**, 121–134 (2014).
- (5). Zhang, C. C. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **16**, 5177–5188 (2010).
- (6). Kudo, S., *et al.*, *Structure* **24**, 1523–1536 (2016).
- (7). Burden-Gulley, S. M. *et al.*, *Peptides* **30**, 2380–2387 (2009).
- (8). Nardone, V. *et al.* *J. Med. Chem.* **59**, 5089–5094 (2016).
- (9). Nose, A., *et al.*, *J. Cell Biol.* **103**, 2649–2658 (1986).