

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 タンパク質間相互作用に着目した VDR 阻害薬 ならびに Plk1 阻害薬の創製研究

氏名 三田 裕介

#### 【序論】

タンパク質間相互作用は、シグナル伝達に関与する等、生体にとって重要な役割を果たしており、これらの相互作用を低分子を用いて自在に制御できれば、標的タンパク質のさらなる機能解明や、創薬研究を通じた医薬品の創製等が期待される。しかしながら、比較的広い面積かつ浅いポケットを介して起こるタンパク質間相互作用を、低分子を用いて制御するのは困難な場合も多く、成功例は限られている。私は、ペプチド鎖上に存在するタンパク質間相互作用に重要なアミノ酸残基の空間的な配置に着目し、そのファーマコフォアを模倣する低分子化合物を創製することで、低分子を介したタンパク質間相互作用の制御が可能になると考えた。そこで本作業仮説に基づき、タンパク質間相互作用を介して転写に関与する核内受容体、および、タンパク質間相互作用を介して細胞分裂に関与するリン酸化酵素の低分子を介した制御について研究に取り組んだ。

#### 【背景・目的】

核内受容体は転写因子の一つであり、リガンドの結合によって各核内受容体の応答配列下流の転写が活性化される。しかしながら核内受容体の転写活性化には、核内受容体へのリガンド結合に加え、核内受容体とコアクチベータータンパク質の相互作用が必須である。本相互作用では、核内受容体がコアクチベーター上の LXXLL 配列(L:ロイシン、X:任意のアミ

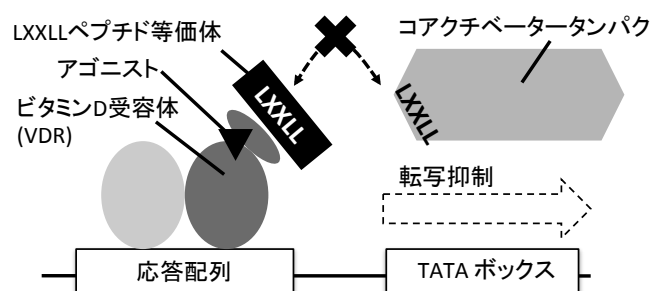


Fig. 1. LXXLL ペプチド等価体による VDR-コアクチベーター相互作用の阻害

ノ酸)を認識する。核内受容体の一つであるビタミン D 受容体(VDR)は骨・カルシウム代謝調節機構等に関与しており、VDR 阻害薬は骨パジェット病治療薬として期待される。そこで私は、VDR とコアクチベーターの相互作用を阻害する LXXLL ペプチド等価体型 VDR 阻害薬の創製に着手した (Fig. 1)。

## 【方法・結果】

VDR と LXXLL ペプチドフラグメントの複合体 X 線結晶構造解析はすでに報告がなされており、これに基づき LXXLL ペプチド等価体の設計を行った。設計に当たって、相互作用に重要な Leu630, Leu633, Leu634 の 3 つのロイシン側鎖と 2 つの静電相互作用をファーマコフォアとして抽出した。次いで、その空間配置をよく模倣する剛直な骨格としてベンゾジアゼピン骨格を母核に採用し、各ロイシン側鎖に対応する分岐アルキル鎖を導入した。またベンゾジアゼピン骨格 3 位のカルボニル基が Leu633 のカルボニル基を、8 位のアミノ基が Met629 および Leu630 におけるアミド窒素原子を模倣することを期待して化合物の設計を行った (Fig. 2)。

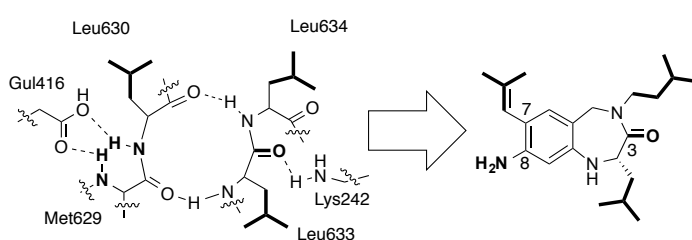
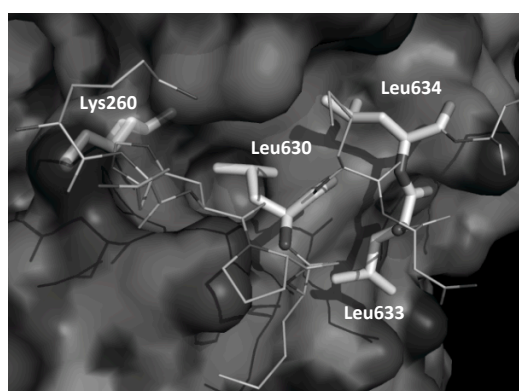


Fig. 2. LXXLL ペプチド等価体の設計

上：LXXLL ペプチドのファーマコフォアと LXXLL ペプチド等価体の設計  
左：VDR と LXXLL ペプチドフラグメントの複合体 X 線結晶構造解析 (PDB ID: 1RK3)

非細胞系の FRET アッセイを用いて、VDR とコアクチベーター由来 LXXLL ペプチドフラグメントの相互作用抑制活性を評価した結果、それほど活性は強くないものの、VDR-コアクチベーター相互作用阻害活性を合成化合物に見いだした

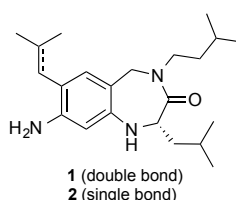


Table 1. FRET アッセイ結果

compound	IC <sub>50</sub> (μM)
1	20
2	>30 (48%) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>FRET assay was performed with a VDR agonist (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (10 nM) and test compounds.

<sup>b</sup>the ratio of VDR inhibition at 30 μM

(Table 1)。また細胞系の評価系としてレポータージーンアッセイを用いて VDR 転写抑制活性を評価した結果、FRET アッセイと同様に化合物に VDR 阻害活性が見られた (Table 2)。さらにアゴニスト濃度を 100 倍に増加した結果、既存アンタゴニストである DLAM-2P では阻害活性の減弱が見られたのに対し、ベンゾジアゼピン化合物では阻害活性の減弱が起らなかった (Table 2)。これはベンゾジアゼピン化合物が既存アンタゴニストとは異なる作用機序を持つことを示唆する結果である。即ち、アンタゴニストはアゴニストと競合することで VDR 阻害活性を示すのに対して、ベンゾジアゼピン化合物は VDR とアゴニストが結合した後の VDR-コアクチベーター相互作用を阻害しているため、アゴニスト濃度に依存せず VDR 阻害活性を示したものと考察している (Fig. 3)。また化合物 1 と VDR とのドッキングスタディを行った結果、化合物 1 が VDR の LXXLL ペプチド認識部位と結合することが示唆された (data not shown)。

Table 2. レポータージーンアッセイ結果

compound	IC <sub>50</sub> (μM)	
agonist <sup>a</sup>	3 nM	300 nM
<b>1</b>	17 (68%) <sup>b</sup>	23 (59%) <sup>b</sup>
<b>2</b>	>30 (47%) <sup>b</sup>	30 (53%) <sup>b</sup>
DLAM-2P <sup>c</sup>	0.22 (98%) <sup>d</sup>	3.3 (66%) <sup>d</sup>

<sup>a</sup>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was used as a VDR agonist.

<sup>b</sup>the ratio of inhibition at 30 μM, <sup>c</sup>VDR antagonist,

<sup>d</sup>the ratio of inhibition at 10 μM

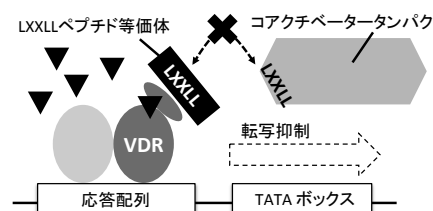


Fig. 3. アゴニスト濃度に依存しない VDR 阻害

引き続き、構造展開を行った結果、8位アミノ基を有さない化合物 **3** の阻害活性が消失すること、および、7位フェニル基を有する化合物 **4** が VDR 阻害活性を維持することを見だし、7位分岐炭素鎖のフェニル基への置換が許容されることを明らかにした (Table 3)。この結果を受けて、結合部位近傍に存在する Lys260 との相互作用を期待し、安息香酸エステルを導入したところ、活性が向上した化合物 **5** を見いだした (Table 3)。

Table 3. 7位および8位の構造活性相関

compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)
1	NH <sub>2</sub>		26
3	H		N.A. <sup>b</sup>
4	NH <sub>2</sub>		24
5	NH <sub>2</sub>		14

<sup>a</sup>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was used as a VDR agonist.

<sup>b</sup>N.A. means no activity at 30 μM.

## ②非ペプチド・ATP非競合型 polo-like kinase 1 阻害薬の創製

### 【背景・目的】

polo-like kinase 1 (Plk1) はセリン／スレオニンプロテインキナーゼの一種であり、細胞分裂や細胞増殖を制御する。Plk1は種々のがんに過剰発現することが知られており、Plk1を阻害すると細胞分裂の停止やアポトーシス誘導が起こるため、Plk1阻害薬は抗がん剤として期待されている。Plk1は細胞分裂の過程において種々の基質タンパク質をリン酸化するが、リン酸化に際しては、基質タンパク質上の別のリン酸化ペプチド配列を認識することが必須である。近年、そのペプチド配列の一つである PLHSpT配列 (pT:リン酸化スレオニン) を有するペプチド化合物により、基質タンパク質のリン酸化が阻害されることが示された。そこで私は、PLHSpTペプチド等価体を設計・合成することで、タンパク質間相互作用阻害に基づくATP非競合型Plk1阻害薬が創製できると考え、研究に着手した (Fig. 4)。

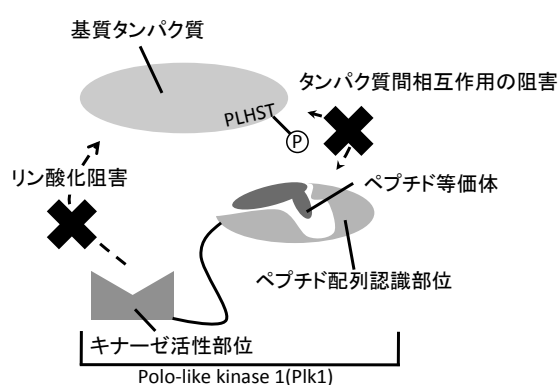


Fig. 4. ペプチド等価体での Plk1 阻害

### 【方法・結果】

Plk1 と PLHSpT ペプチドの複合体 X 線結晶構造解析に基づき、ファーマコフォアとして重要である Leu 残基上のカルボニル基と Thr 残基上のリン酸基の二つの極性基、および結晶化条件において結合部位近傍に存在したグリセリンに着目し、これらを模倣する PLHSpT ペプチド等価体としてターフェニル化合物 **6** を設計した (Fig. 5)。

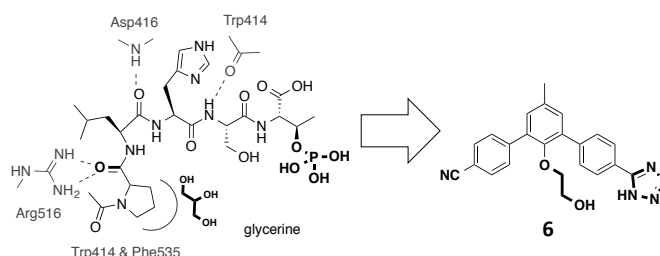
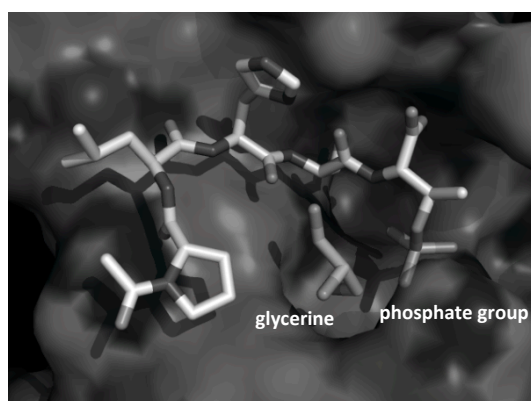


Fig. 5. PLHSpT ペプチド等価体の設計

上: PLHSpT ペプチドのファーマコフォアと PLHSpT ペプチド等価体の設計

左: Plk1 と PLHSpT ペプチドフラグメントの複合体 X 線結晶構造解析 (PBD ID: 3HIK)

化合物 **6** が Plk1 と PLHSpT ペプチドの相互作用を阻害することを期待して Plk1-PLHSpT 結合の評価を行ったが、当初の期待に反して、Plk1 と PLHSpT ペプチドの結合が濃度依存的に増強された (Fig. 6)。また Plk1 のキナーゼ活性に対する阻害効果について精査した結果、ATP 競合型キナーゼ阻害薬である staurosporine は ATP 濃度を増やすことで Plk1 阻害活性が減弱するのに対し、化合物 **6** は ATP 濃度非依存的に Plk1 を阻害した (Fig. 7)。これは化合物 **6** が ATP 非競合的に Plk1 を阻害することを示唆している。

上記結果より、ターフェニル化合物 **5** は Plk1 と相互作用し、何らかのコンフォメーション変化をもたらすことで、PLHSpT ペプチド認識能の向上とキナーゼ活性を阻害する可能性があると考えられている。現在までに報告されている主な Plk1 阻害薬は、ATP 競合型キナーゼ活性阻害薬、および、PLHSpT 等価ペプチド誘導体型 Plk1-基質タンパク質相互作用阻害薬に分類される。一方で、今回見いだした化合物 **5** は、その Plk1 阻害様式より、Plk1 に対して新たな部位で結合している可能性があり、新しいタイプの Plk1 阻害薬として期待できると考えている。

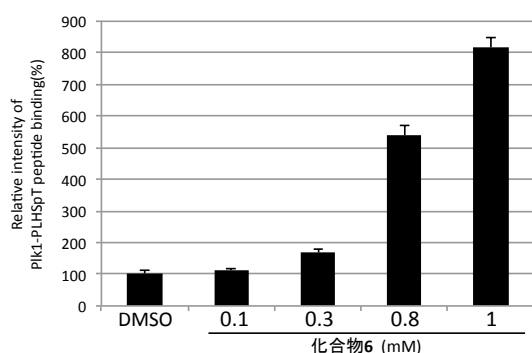


Fig. 6. 化合物 **6** による Plk1-PLHSpT 結合増強

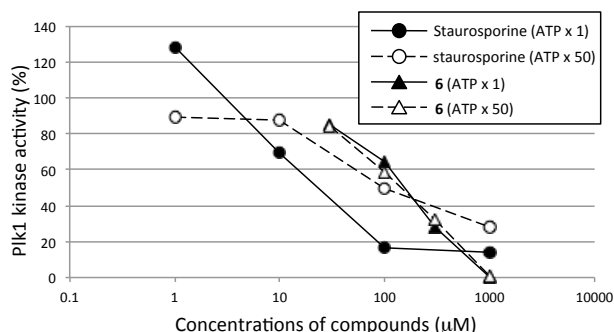


Fig. 7. Plk1 阻害作用の ATP 濃度依存性に関する評価

## 【まとめ】

私は、タンパク質間相互作用を制御する低分子の創製に当たって、ペプチド鎖上に存在するタンパク質間相互作用に重要なファーマコフォアに着目し、これを模倣する低分子化合物の創製に取り組み、2種類の活性化合物を創製した。

具体的には、VDR と LXXLL ペプチドの相互作用より着想を得て、これを模倣したベンゾジアゼピン骨格を有する LXXLL ペプチド等価体型 VDR 阻害薬を見いだした。また Plk1 と PLHSpT ペプチドの相互作用より着想を得て、その相互作用を模倣したターフェニル骨格を有する PLHSpT ペプチド等価体の創製を試みたが、当初期待したタンパク質間相互作用阻害活性を見いだすことができなかった。しかしながらターフェニル化合物にタンパク質間相互作用増強活性、および ATP 非依存的な Plk1 阻害活性を見いだした。

本研究で見いだした 2 種類の化合物は、活性は弱いものの、タンパク質間相互作用を阻害、あるいは増強する新規低分子化合物であり、これら化合物を創出した事実は、これからのタンパク質間相互作用を制御する低分子化合物の創製研究に対して、一つの指針を与えるものになると考えている。また本研究で見いだした化合物が特徴あるケミカルツールとして VDR、および Plk1 の機能解明に応用できるものと期待している。