

審査の結果の要旨

氏名 三田 裕介

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、タンパク表面に存在する、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。三田は、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、その研究に着手した。本博士論文において、三田は、前述の作業仮説に基づき、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、の二種類の標的に対して、生理活性を有する二系統の低分子を創出したことを論述している。

本博士論文は全5章から構成され、具体的な研究は第2章および第3章に記述されている。第2章では、LXXLL 配列を模倣したビタミン D 受容体-コアクチベーター相互作用阻害物質の創製について記述している。

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:任意のアミノ酸) を認識する。また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。そこで三田は、「LXXLL 配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ち LXXLL ペプチド等価体を用いることで、VDR とコアクチベーターの相互作用を阻害し、その結果 VDR を介した転写を抑制できる」とする作業仮説を構築し、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 (Figure 1)。

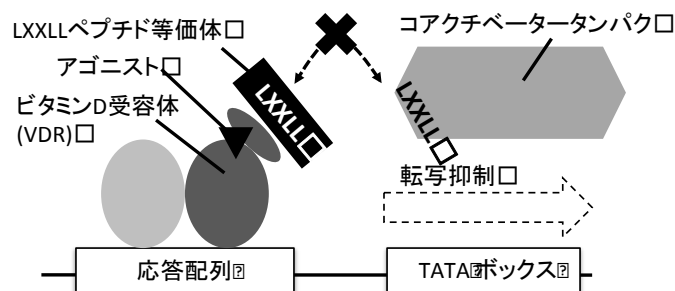


Figure 1. LXXLL ペプチド等価体による VDR 転写活性化の抑制

三田は VDR と LXXLL ペプチドフラグメントの複合体 X 線結晶構造解析より、三つのロイシン側鎖、および、二つの charge clamp と呼ばれる静電相互作用をファーマコフォアとして抽出し、これを模倣する化合物として、ベンゾジアゼピン骨格を有する LXXLL ペプチド等価体の設計・合成を行った (Figure 2)。

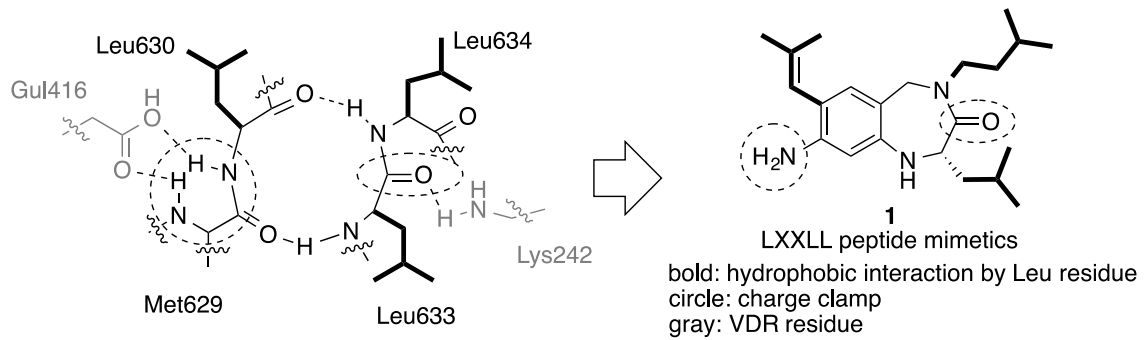


Figure 2. LXXLL ペプチド等価体の設計

得られた化合物 **1** による VDR-コアクチベーター由来ペプチド相互作用阻害作用を非細胞系の FRET アッセイで評価した結果、期待通り VDR とコアクチベーター由来ペプチドにおける相互作用阻害活性を見いだした。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活性を評価した結果、同様に VDR 阻害活性を見いだした。加えて本阻害活性が既存のアンタゴニストとは異なり、共存するアゴニスト濃度に依存しないことを見だし、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有することを示している。一方で、化合物 **1** は核内受容体の一つであるエストロゲン受容体 α (ER α) に対して阻害活性を有さず、VDR と ER α 間において選択性を示した。さらに構造展開を行った結果、8 位アミノ基を有さない化合物 **2** 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 **3** 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 1)。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 **4** を見いだした (Table 1)。

Table 1. LXXLL ペプチド等価体の構造展開 (レポータージーンアッセイ)

compound	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μ M)
1	NH ₂		26
2	H		N.A. ^b
3	NH ₂		24
4	NH ₂		14

^a1,25(OH)₂D₃ was used as a VDR agonist.
^bN.A. means no activity at 30 μ M.

本研究は「タンパク質間相互作用におけるファーマコフォアを模倣して、論理的にペプチド等価体を設計する」という研究コンセプトの実証例の一つであり、また活性は弱いながらも新規作用機序・新規骨格を有する VDR 阻害薬を提案したものであると言える。

第3章では、非ペプチド・ATP非競合型 polo-like kinase 1 阻害薬の創製について記述している。

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、Plk1と基質タンパク質の相互作用が阻害され、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。そこで三田は、「PLHSpT配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ちPLHSpTペプチド等価体の創製により、Plk1と基質タンパク質の相互作用を阻害することで、Plk1を介したリン酸化を阻害できる」とする作業仮説を構築し、タンパク質間相互作用阻害に基づくATP非競合型Plk1阻害薬の創製に着手した (Figure 3)。

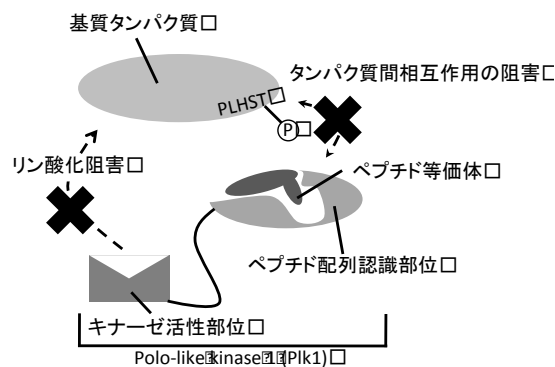


Figure 3. PLHSpT ペプチド等価体によるタンパク質間相互作用の阻害と Plk1 阻害

三田は 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 **5** を設計・合成した (Figure 4)。

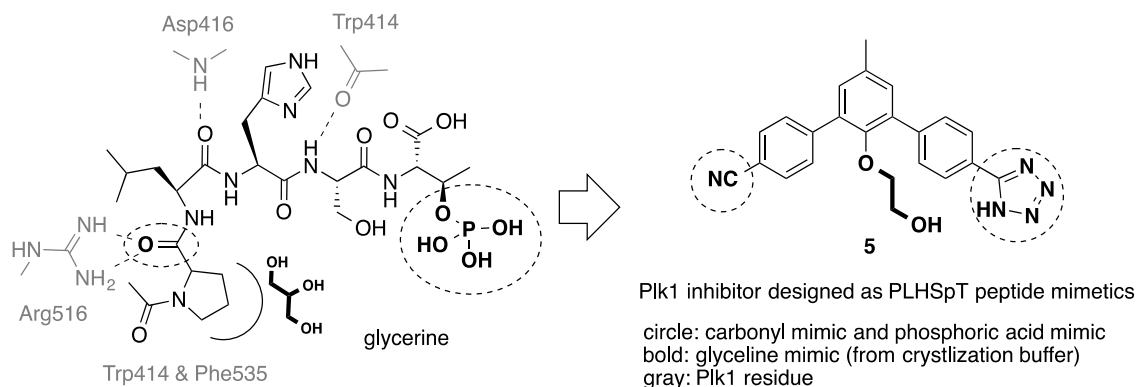


Figure 4. ターフェニル化合物の設計

化合物 **5** 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 **ELISA** を用いた **Plk1-PLHSpT** 結合の評価を行ったが、当初の期待に反して、化合物 **5** は **Plk1** と **PLHSpT** ペプチドの結合を濃度依存的に増強することが明らかとなった (Figure 5)。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** キナーゼ阻害活性が減弱するのに対し、化合物 **5** は **ATP** 濃度非依存的に **Plk1** を阻害することを見いだした (Figure 6)。これは化合物 **5** が **ATP** 非競合的に **Plk1** を阻害することを示唆している。

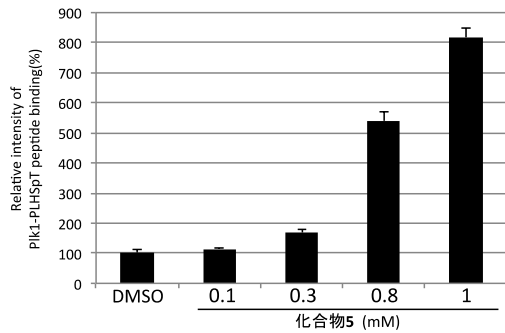


Figure 5. **Plk1-PLHSpT** 結合の増強

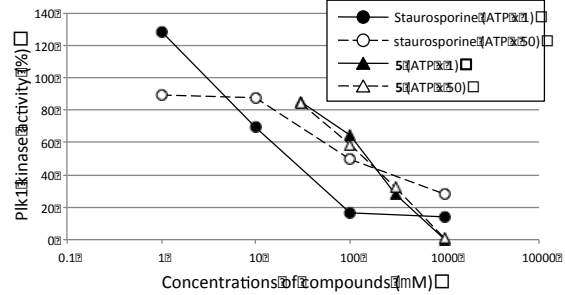


Figure 6. **ATP** 非競合的な **Plk1** 阻害

三田は、上記結果より、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している。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ものである。

以上のように、三田は、本論文に記述した研究において、タンパク質間相互作用に着目し、それから着想を得て、2種類の生理活性物質を創製するに至った。一般的に難しいとされる「低分子化合物によるタンパク質間相互作用の制御」という研究テーマに対して、本論文中の研究を通じて、高活性は言えないまでも、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を創出できた事実は、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創製研究に対して一つの指針をあたえるものになり得ると言える。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。

上述のように、三田の本博士論文の研究成果は医薬化学研究に大きく貢献するものであり、博士(薬学)の授与に値するものと認められる。