

マルチアプローチによる転写制御分子の創製

栗原正明

Multi-approach to development of transcriptional regulators

Masaaki Kurihara

We demonstrated design, synthesis and evaluation of ligands of nuclear receptors, stapled short helical peptides as vitamin D receptor (VDR)-coactivator interaction inhibitors, estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy and selective estrogen receptor down-regulators.

Keywords: transcriptional regulator, nuclear receptor, stapled short helical peptide, protein knockdown strategy, selective estrogen receptor down-regulator

はじめに

核内受容体は転写因子として様々な生理作用を転写レベルで制御している。それゆえ、創薬の重要なターゲットタンパクと考えられている。ここでは、幾つかの方法論による核内受容体の転写制御分子の創製について報告する。核内受容体のオン・オフを制御するには一般的にはリガンドであるアゴニストとアンタゴニストがある。ここでは、リガンドの創製とそれ以外の方法による核内受容体の転写制御法についても述べる。

(1) 核内受容体の新規リガンドの創製

レチノイド受容体 (RAR) のアゴニストの開発を行った¹⁾。RARのリガンドであるAM80のN置換基によるアミドボンドのコンフォメーション変化を回避するために分子内に環構造を導入したサイクリックウレア構造を基本骨格とし、RAR α とのドッキングスタディによりリガンドをデザインした。HL-60細胞を用いた分化誘導活性を評価したところ、もっとも活性の強かったものがYR105 (ED₅₀: 8.3nM)であった(図1)。転写活性化能はAM80に及ばなかったが、内在性リガンドである活性型ビタミンA (all-trans retinoic acid; ATRA) と同等の

細胞分化誘導活性を有していた。図2にYR105とRAR α の結合モデルを示した。

次に、ビタミンD受容体 (VDR) 新規リガンドの創製を行った^{2,3)}。VDRは骨代謝、細胞分化、免疫調節等に関与しており、骨粗しょう症、皮膚病、ガン等の治療薬として期待されている。ビタミンD受容体の内在性リガンドは活性型ビタミンD₃ (1 α ,25(OH)₂D₃)である。2000年にVDRと1 α ,25(OH)₂D₃が結合したX線構造解析が報告された。これにより、VDRとリガンドの結合様式が明らかとなり、ドッキングスタディによりVDRの新規リガンドの設計が可能となった。我々のグループでも、新規リガンドの設計、合成、活性評価を行いYR301, YR305を創製した(図3)。

YR301及びYR335を設計・合成した。HOS細胞を用いた転写活性の評価を行った結果、内在性リガンドである活性型ビタミンD₃に匹敵する転写活性 (YR301: 0.04nM, YR335: 0.06nM)を示した^{2,3)}。YR301, YR335ともVDRのligand binding domain (LBD)と結合したX線構造解析を行った。(YR301: 2ZFX, YR335: 3AUN) YR335とVDRのLBDのX線構造解析の結果を図4に示した。6つの残基と水素結合を形成していることが明らかとなった。これは、設計の段階で行ったモデリングの構造と完全に一致した。

(2) 核内受容体とコアクチベータとの結合を阻害する分子

核内受容体にアゴニストが結合すると、ヘリックス12 (H12) が折りたたみ (コンフォメーション変化) を起こし、コアクチベータタンパクと結合し転写活性が

To whom correspondence should be addressed:

Masaaki Kurihara; Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext.222; Fax: +81-3-5787-3831 ; E-mail: masaaki@nihs.go.jp

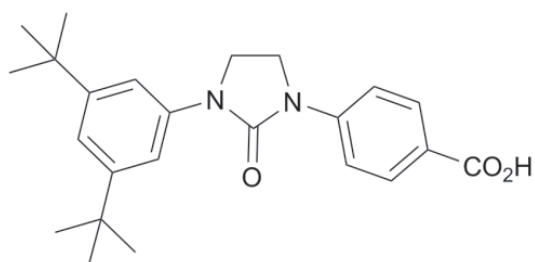


図1 YR105の構造

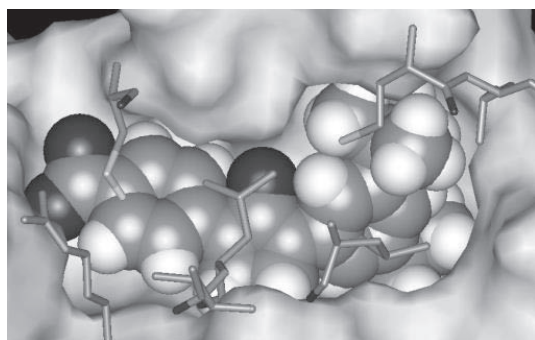
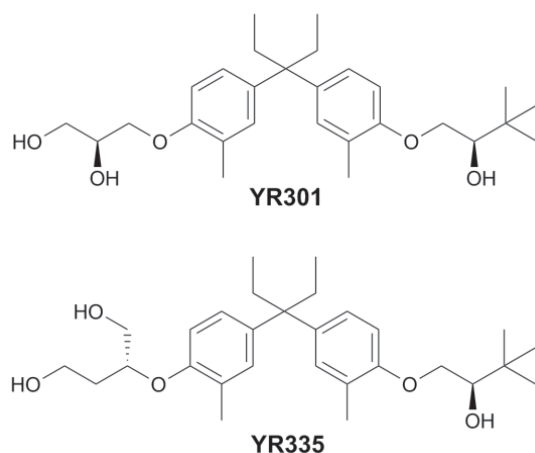
図2 YR105とRAR α の結合モデル

図3 YR301 (上), YR335 (下) の構造

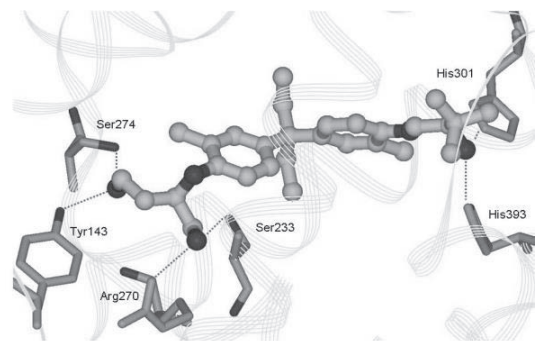


図4 YR335, 活性型ビタミンD3とVDRの結合X線構造

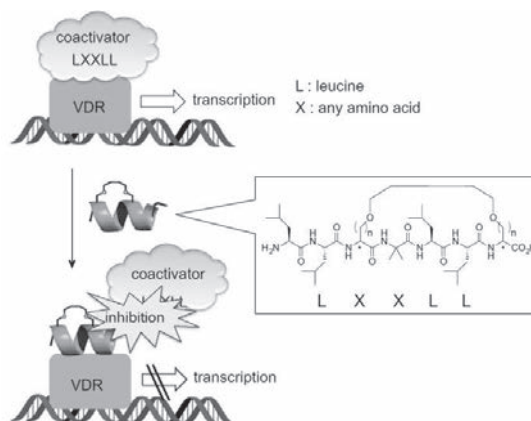


図5 安定化ヘリカルペプチドによる核内受容体とコアクチベータとの結合阻害

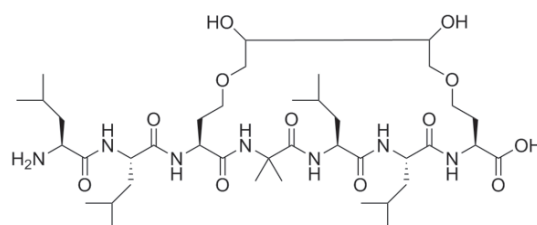


図6 DPI-07の構造

促進される。アンタゴニスト分子はこのヘリックス12の折りたたみを阻害すると考えられている。核内受容体のアゴニストが結合し、H12が正しく折りたたまれても、コアクチベータの結合を阻害することができれば転写を阻害することができる。そこで、コアクチベータがVDRと結合する部分であるLXXLLモチーフを含むヘリックス構造を模倣した短鎖ペプチドがコアクチベータとVDRの結合を阻害すると考えた(図5)。この短鎖ペプチドは、 α -ヘリックス構造をとる必要があるため、ペプチドにヘリックス性を増加する α 、 α -ジ置換アミノ酸、架橋構造を導入した。VDRとコアクチベータの結合阻害を評価した結果、DPI-07が最も強い活性を示した(図6)。モデリングの結果、DPI-07とVDRの結合は図7のようであると考えられる。架橋構造上の2つの水酸基はタンパク質接触面とは反対側に向いており、水との水和エネルギーを低下させていると考えられる。水酸基のないペプチドの阻害活性は2ケタ低かった。水酸基の位置を別の場所にデザインしたDPI-10も高い阻害活性を示した(図8, 図9)^{6,7)}。この安定化ヘリカルペプチド阻害分子に関しては、さらに細胞膜透過ペプチドを付与することにより細胞レベルで活性を持たせることにも成功している⁸⁾。

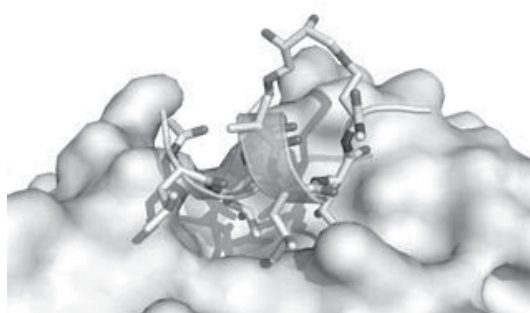


図7 DPI-07とVDRのドッキングモデル

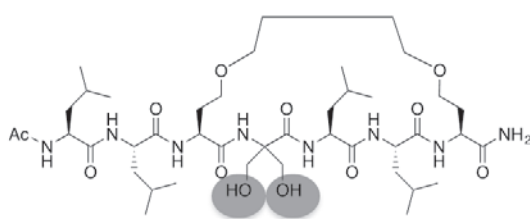


図8 DPI-10の構造

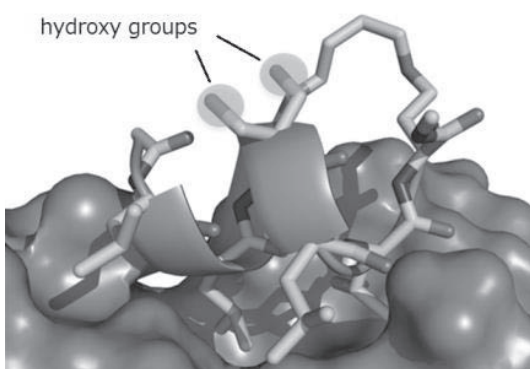


図9 DPI-10とVDRのドッキングモデル

(3) 核内受容体をターゲットにしたプロテインノックダウン分子

プロテインノックダウン分子とは、標的タンパク質に結合するリガンド分子とユビキチンリガーゼ (cIAP1) と結合する分子とをリンカーで結合させることで、標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソーム系での分解を誘導する分子である (図10)。エストロゲン受容体 (ER) は乳がん細胞で過剰発現しており、がん細胞の増殖に関わっている。ERを分解誘導する分子は乳がんの治療薬となり得る。そこで、ERのリガンドである4-ヒドロキシタモキシフェンとcIAP1のリガンドであるベスタチンをリンカーで結合した分子をデザインした (図11)。MCF-7細胞を用いてER α の分解誘導を評価した (図12)。化合物7が最も強い分解誘導活性を示した。こ

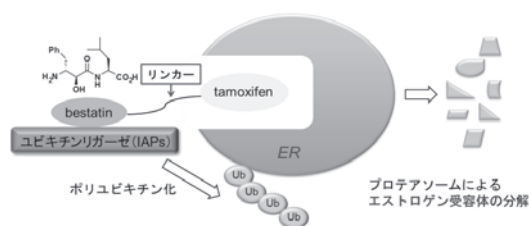
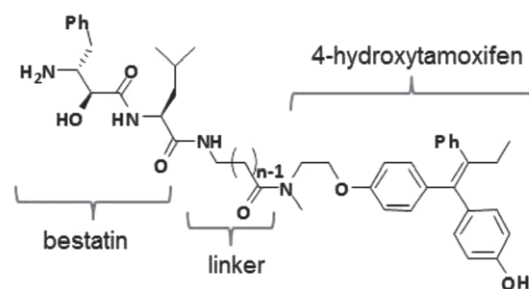


図10 ERを分解誘導するメカニズム



5: n=1, 6: n=3, 7: n=5

図11 プロテインノックダウン分子の構造

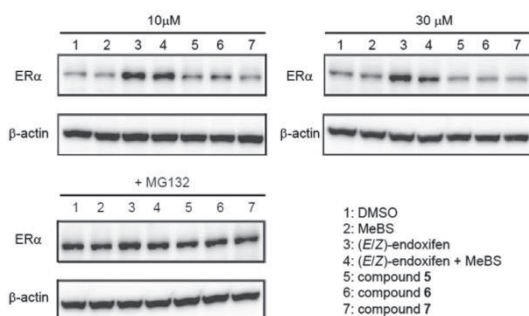


図12 ER α の分解誘導評価

の作用はプロテアソーム阻害剤であるMG132で抑制されることからこの分解誘導作用にはプロテアソーム系が関与していることが明らかとなった⁹⁻¹¹⁾。

(4) 核内レセプターのダウンレギュレーター

標的タンパク質に結合することで、タンパク質を不安定化し、細胞内のユビキチン-プロテアソーム系での分解を誘導する分子がダウンレギュレーターである。エストロゲン受容体 (ER α) において核内受容体に結合することで核内受容体タンパクを不安定化し、ダウンレギュレーションを起こす分子を設計・合成した¹²⁻¹⁴⁾。代表的なものを図13に示した。MCF-7細胞を用いてER α のタンパク量を評価したところ、C10, C10F, C10OHでダウンレギュレーションが見られた。疎水性の高いC10Fが最も活性が高く、親水性基が付いたC10OHでは活性が低いことが明らかとなった。この作用はプロテア

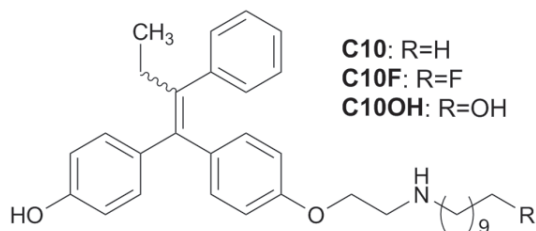


図 13 設計したダウンレギュレーターの構造

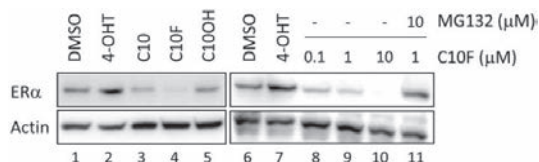


図 14 ERαの分解誘導評価

ソーム阻害剤であるMG132で抑制されることからこの分解誘導作用にはプロテアソーム系が関与していることが明らかとなった (図14). ダウンレギュレーターの作用メカニズムは、ダウンレギュレーターの長いアルキル鎖がタンパク質の外側に出て疎水環境にある特定のタンパク質表面に結合することで、ヘリックス12がタンパク質表面に密着できず、ヘリックス構造を取れず不安定な構造になることによって起きると考えている (図15).

引用文献

- 1) Kurihara M, Rouf ASS, Kansui H, Kagechika H, Okuda H, Miyata N: *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14:4131-4.
- 2) Hakamata W, Sato Y, Okuda H, Honzawa S, Saito N, Kishimoto S, Yamamoto A, Sugiura T, Kittaka A, Kurihara M: *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18:120-3.
- 3) Kakuda S, Okada K, Eguchi H, Takenouchi K, Hakamata W, Kurihara M, Takimoto-Kamimura M: *Acta Crystallogr F.* 2008;64:970-3.
- 4) Demizu Y, Nakatsu A, Sato Y, Honzawa S, Yamashita A, Sugiura T, Kittaka A, Kato S, Okuda H, Kurihara M: *Lett Org Chem.* 2011;8:43-7.
- 5) Demizu Y, Takahashi T, Kaneko F, Sato Y, Okuda H,

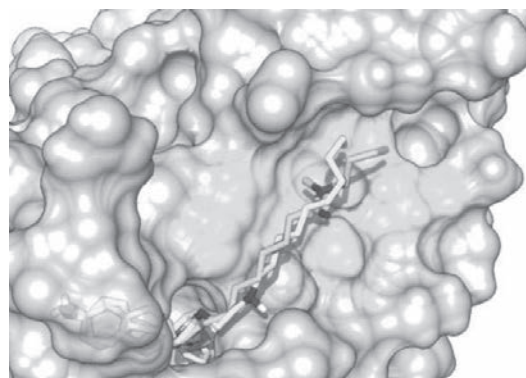


図 15 C10とERαとのドッキングモデル

Ochiai E, Horie K, Takagi K, Kakuda S, Takimoto-Kamimura M, Kurihara M: *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;21:6104-7.

- 6) Demizu Y, Nagoya S, Shirakawa M, Kawamura M, Yamagata N, Sato Y, Doi M, Kurihara M: *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23:4292-6.
- 7) Misawa T, Demizu Y, Kawamura M, Yamagata N, Kurihara M: *Bioorg Med Chem.* 2015;23:1055-61.
- 8) Nagakubo T, Demizu Y, Kanda Y, Misawa T, Shoda T, Okuhira K, Sekino Y, Naito M, Kurihara M: *Bioconjugate Chem.* 2014;25:1921-4.
- 9) Demizu Y, Okuhira K, Motoi H, Ohno A, Shoda T, Fukuhara K, Okuda H, Naito M, Kurihara M: *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22:1793-6.
- 10) Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami T, Okuda H, Kurihara M, Naito M: *Cancer Science.* 2013;104:1492-8.
- 11) Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Kurihara M, Naito M: *Methods Mol Biol.* 2016;1366:549-60.
- 12) Shoda T, Okuhira K, Kato M, Demizu Y, Inoue H, Naito M, Kurihara M: *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24:87-9.
- 13) Shoda T, Kato M, Harada R, Fujisato T, Okuhira K, Demizu Y, Inoue H, Naito M, Kurihara M: *Bioorg Med Chem.* 2015;23:3091-6.
- 14) Shoda T, Kato M, Fujisato T, Misawa T, Demizu Y, Inoue H, Naito M, Kurihara M: *Bioorg Med Chem.* 2016;24:2914-9.