The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	タンパク質内部および外部表面を同時認識するプレニルトランスフェラーゼ阻害剤の創製
Author(s)	町田, 慎之介
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58031
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【42】

氏　　名	町　田　慎之介（まち　だ　しん の すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２３５７２　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科化学専攻
学　位　論　文　名	タンパク質内部および外部表面を同時認識するプレニルトランスフェラーゼ阻害剤の創製
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　加藤　修雄 （副査） 教　授　村田　道雄　　教　授　中谷　和彦　　准教授　大神田淳子

論　文　内　容　の　要　旨

タンパク - タンパク質間相互作用は大きな作用面積を必要とするために、低分子化合物による制御は、一般的に困難とされている。しかし、がん・アルツハイマーなどの疾患に関わることから、この相互作用を効果的に制御できる分子の開発が必要となってきた。本研究では、タンパク質 - タンパク質間相互作用を制御する酵素阻害剤設計手法の一つとして、モジュールアセンブリの概念に基づき、タンパク質の内部および外部表面に対して、それぞれに相補的な相互作用を示す分子を設計し、組み合わせたハイブリッド型のタンパク質認識分子を創製し、prenyltransferases-K-Ras4B の阻害効果を通じて検討することを目的とした。

Prenyltransferase ファミリーの一つである GGTase-I に対するハイブリッド阻害剤として、内部表面認識モジュールに GGTase-I の基質テトラペプチド CVIL、外部表面認識モジュールに GGTase-I の活性部位近傍の α-subunit 上に存在する酸性領域と相補的に相互作用を示す amino 基含有の没食子酸誘導体を組み合わせたハイブリッド阻害剤を設計した。テトラペプチドの蛍光基質を用いた阻害活性評価から、各モジュールを単独で作用させた時よりも、ハイブリッド阻害剤は外部表面認識モジュールが酸性領域を認識していることにより、内部および外部表面の二つのモジュールによる同時認識が働き、明らかな阻害活性の向上を示した。また、同じ prenyltransferase ファミリーで、構造が類似している farnesyltransferase (FTase)に対して 150 倍以上の選択性を実現した。

K-Ras4B を含む Ras family は FTase の翻訳後修飾を経由して機能化する。しかし、K-Ras4B が他の isoform よりも FTase に親和性が高い理由として、活性部位との認識以外に、K-Ras4B の持つ塩基性領域と α-subunit の酸性領域との静電相互作用が働くことが指摘されている。そこで、モジュールアセンブリに基づく分子設計による内部および外部表面認識型ハイブリッド阻害剤が K-Ras4B と FTase 間のタンパク質 - タンパク質間相互作用を効果的に阻害するかを検討した。K-Ras4B の C 末端の 14 mer のオリゴペプチドを K-Ras4B のモデルと見立て評価した結果、ハイブリッド阻害剤は CVIM ($K_i = 1.1 \times 10^{-6}$ M)と比較して K-Ras4B のファルネシル化を 220 倍も強力に阻害することができた ($K_i = 5.0 \times 10^{-9}$ M)。さらに、本ハイブリッド阻害剤による GGTase-I - K-Ras4B のタンパク質 - タンパク質間相互作用の阻害を評価したところ、CVIM ($K_i = 6.7 \times 10^{-6}$ M)と比較して K-Ras4B のゲラニルゲラニル化を約 20 倍の強く阻害する結果を与えた ($K_i = 3.5 \times 10^{-7}$ M)。

本研究の結果を通じて、タンパク質の外部表面を認識標的に取り入れたモジュールアセンブリの分子設計は、多点認識による標的タンパク質への認識能向上のみならず、組み合わせ方によって高い選択性・dual 認識能を実現することを見出し、その有用性を証明することができた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、タンパク質 - タンパク質間相互作用を制御する酵素阻害剤設計手法の一つとしてモジュールアセンブリの概念を提案し、実際にその概念に基づいた新規な構造要素を有する酵素阻害剤の設計・合成・評価に関する研究成果を纏めたものである。

具体的な標的酵素として、タンパク質の細胞膜移行に係わる prenyltransferase ファミリーを選択し、まず、ゲラニルゲラニル基転移酵素・GGTase-I に対する阻害剤の創製研究を展開した。内部表面認識モジュールとして基質テトラペプチド CVIL、外部表面認識モジュールとして GGTase-I の外部表面に存在する酸性領域と相補的な相互作用を示す amino 基含有の没食子酸誘導体を組み合わせたハイブリッド型阻害剤を設計・合成した。そして、テトラペプチドの蛍光基質を用いた阻害活性評価から、各モジュール単独の場合より、ハイブリッド型阻害剤に明らかな阻害活性の向上が認められることを明らかにした。同時に、同様に prenyltransferase ファミリーに属しファルネシル基転移酵素である FTase に対する阻害能も評価し、GGTase-I に対する選択的阻害剤であることも示した。

分化・増殖シグナルの上流に位置し、その変異が癌化と深く関連している Ras ファミリーは、FTase による翻訳後修飾を経て機能化する。Ras ファミリーの中でも、特に、K-Ras4B は他の isoform よりも FTase に親和性が高く、また、場合によっては GGTase-I の基質になることも知られており、K-Ras4B の持つ塩基性領域と prenyltransferase ファミリーの外部表面酸性領域との静電相互作用がその要因であることが指摘されている。そこで、上述の GGTase-I 阻害剤と同様の手法により、内部および外部表面認識部位を有するハイブリッド型阻害剤を合成した。そして、FTase の内部認識ペプチド・CVIM に比較して K-Ras4B モデルペプチドのファルネシル化を 220 倍も強く阻害することを明らかにした。さらに、本ハイブリッド型阻害剤は、GGTase-I による K-Ras4B モデルペプチドのゲラニルゲラニル化を CVIM の約 20 倍の強さで阻害することも明らかにした。すなわち、２つの酵素を同時に阻害しうる dual 阻害剤の性質を有することを明らかにしている。

以上のように、本論文では、タンパク質の外部表面を認識標的に取り入れたハイブリッド型阻害剤を設計・合成し、多点認識による標的タンパク質への選択的認識能の向上のみならず、モジュールの組合わせ方によっては、dual 認識能を発現させうることをも明らかにした。酵素阻害剤に対する新たな分子設計の指針を与える成果である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。