

ラメラリンの軸不斉を利用した プロテインキナーゼ阻害選択性の制御



長崎大学大学院工学研究科
博士前期課程二年

吉田 賢佑

よしだ けんゆう

2011年 長崎大学工学部応用化学科卒業
2011年 長崎大学大学院工学研究科博士前期課程入学



長崎大学大学院工学研究科物質科学部門
助教

福田 勉

ふくだ つとむ

1997年 九州大学大学院理学研究科博士後期課程
中途退学
同年より現職
1998年 九州大学にて学位取得（理学博士）



長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
教授

石橋 郁人

いしばし ふみと

1987年 九州大学大学院農学研究科博士課程修了
1987～1989年 日本学術振興会特別研究員
1989～1992年 愛媛大学農学部助手
長崎大学水産学部助教授を経て、2007年より現職



長崎大学大学院工学研究科物質科学部門
教授

岩尾 正倫

いわお まさとむ

1974年 九州大学理学部化学科卒業
1990年 長崎大学教養部教授
1997年 長崎大学工学部応用化学科教授
2011年より現職



フランス国立科学研究センター
リサーチ ディレクター
(C.N.R.S., Research Director)

Laurent Meijer

1983年 PhD バリ大学理学部
1989年より現職
2007年 ManRos Therapeutics設立

1. はじめに

ラメラリンとは 14-phenyl-6*H*-[1]benzopyrano [4',3':4,5]-pyrrolo[2,1-*a*]isoquinolin-6-one 骨格を持つ海洋天然物の総称であり、現在までに基本骨格周りの置換基 (OH, OMe) の数や位置が異なる約 40 種類の天然物が単離されている^{1),2)}。ラメラリンは、置換様式に依存して、さまざまな有用生理活性を示す。例えば、ラメラリン D (1) やラメラリン N (2) は、種々のがん細胞の増殖を nM レベルで抑制する (図 1)³⁾。また、これらは、構造的に関連性のない複数の抗がん剤に対して耐性を獲得した多剤耐性がん細胞に対しても有効である³⁾。筆者らは、ラメラリンの特異な構造と有用生理活性に興味を持ち、ラメラリンの合成研究を開始した。その結果、

1997年にラメラリン系海洋天然物 (ラメラリン D および H) の最初の全合成を達成した⁴⁾。さらに、この手法を応用して複数のラメラリン D アナログを合成し、HeLa 細胞を用いた構造活性相関研究を行った。その結果、1 の抗がん活性発現には E 環部 8 位と A 環部 20 位の水酸基が必須であることを明らかにした⁵⁾。また、フラ

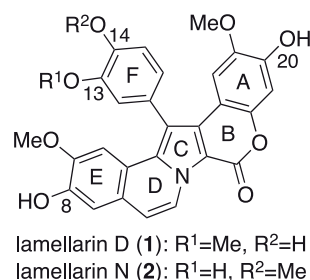


図 1 海洋天然物ラメラリン D およびラメラリン N

ンス医学研究機構 (INSERM) の Bailly らは、**1** の抗がん活性発現の主要な作用機序が、DNA の纏れを解く酵素トポイソメラーゼ I の阻害であることを報告している^{6,7)}。

一方、筆者らは、ラメラリン N (**2**) が、がんやアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症に関与する複数のプロテインキナーゼ (CDK1/cyclinB, CDK5/p25, GSK-3 α/β , Pim1, DYRK1A) を非選択的に強く阻害することを見出した⁸⁾。また、構造活性相関研究から、これらのキナーゼを阻害するためには、E 環部 8 位と F 環部 13 位の水酸基は必須であるが、A 環部 20 位水酸基は必ずしも必要でないことを明らかにした。今回、**2** の持つ軸不斉構造がキナーゼ阻害におよぼす影響を検証した結果、軸不斉の違いが阻害選択性に大きな影響を及ぼすという興味深い知見を得ることができた。また、軸不斉にかかわる 1 位芳香環の修飾によりトポイソメラーゼ I 阻害とプロテインキナーゼ阻害の切り分けも可能であることも明らかになった。本稿では、これらの研究の経緯について紹介する (図 2)。

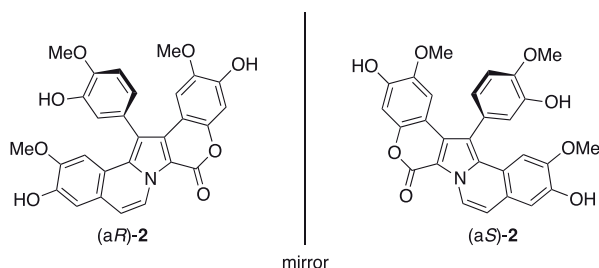


図 2 軸不斉に起因するラメラリン N のエナンチオマー

2. ラメラリン N 誘導体分割の試み

一般に、非対称に置換された芳香環 (F 環) を持つラメラリン類は、C1-C11 間単結合周りの回転障害に基づく軸不斉を持つと考えられる⁹⁾。しかしながら、現在までに海洋生物から単離されたラメラリンは、1 例 (ラメラリン S) を除いて¹⁰⁾、いずれも光学不活性体である。また、分割の報告もない。そこで、フェノール性水酸基を種々の保護基で修飾したラメラリン N 誘導体 **3-8** を合成し、光学活性カラムを用いた HPLC により分割を試みた。しかしながら、期待に反し、いずれの誘導体も一旦分離されたエナンチオマーがカラム中でラセミ化を起し、室温で分割することはできなかった (図 3)。

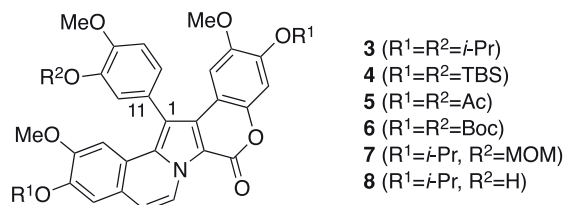


図 3 分割を試みたラメラリン N 誘導体

3. C1-C11 軸周りの回転障壁エネルギー

従来、ラメラリン骨格 C1-C11 単結合間の回転障壁エネルギーは、力場計算により分割可能な高い値が見積もられていた⁹⁾。しかしながら、上記の結果から、回転障壁エネルギーは予想外に低いのではないかと推測された。そこで、¹H NMR で識別可能なジアステレオトピックなプロトンにメチレンジオキシ環部を持つラメラリン **9** を合成し、温度可変 NMR により回転障壁エネルギーを求めることにした。合成した **9** の H_a と H_b の吸収は室温で AB quartet (400 MHz ¹H NMR in toluene-*d*₈, $\Delta\nu = 4.7$ Hz, $\delta = 1.0$ Hz) として現れ、これらのピークは 95°C で融合した。この結果より、回転障壁エネルギーは 83 kJ/mol と見積もられた。この値は 25°C におけるラセミ化の半減期 21 秒に相当し、単純なラメラリン N 誘導体が室温で分割が困難であるという事実を裏づける結果となった (図 4)。

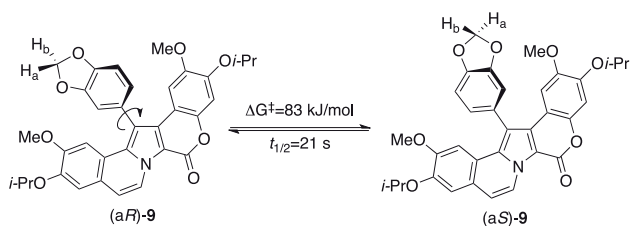


図 4 ラメラリン **9** の C1-C11 軸周りの回転

4. 16-メチルラメラリン N の合成

通常のラメラリン N 誘導体の分割が困難であることが明らかになったので、回転軸周りの立体障害を増した 16-メチルラメラリン N 誘導体を合成し、分割を試みることにした。ラメラリン骨格構築のためにさまざまな合成法が開発されているが²⁾、今回筆者らは、*N*-ベンゼ

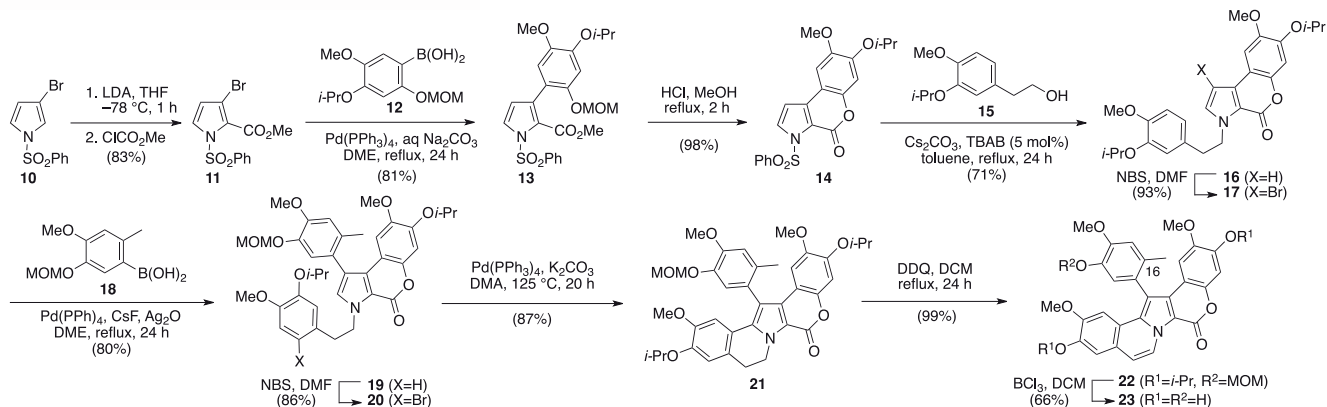


図5 16-メチルラメラリンNの合成

ンスルホニル-3-プロモピロール(10)を出発物質とする独自のルート¹¹⁾を一部修正し、16-メチルラメラリンN(23)の合成を達成した(図5)。用いた鍵反応は、配向的リチオ化(10→11)¹²⁾、Pd触媒鈴木-宮浦カップリング(11→13; 17→19)、Pd触媒直接アリール化(20→21)等である。

5. 分割と絶対配置の決定

引き続き、16-メチルラメラリンN(23)の前駆体22の分割を試みた。Daicel CHIRALPAK ICセミ分取カラムを用いHPLC(Hexane/CH₂Cl₂/EtOH=40:60:1)を行った所、24分付近に溶離される22aと27分付近に溶離される22bに分離された(図6)。これらがお互いにエナンチオマーであることは、CDスペクトルにより確認した(図7)。また、絶対配置については、22bから誘導された臭化物24bのX-線結晶構造解析により、22aをaS、22bをaRと決定した(図8)。分割した22aと22bは熱的に安定であり、トルエン中120℃で24時間加熱しても光学純度の低下は認められなかった。また、それぞれをBCl₃で処理することにより、(aS)-16-メチルラメラリンN(23a)と(aR)-16-メチルラメラリンN(23b)を得ることができた。

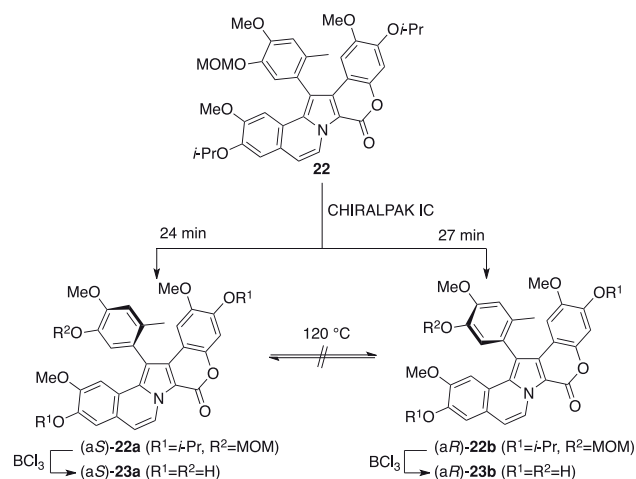


図6 16-メチルラメラリンNの分割

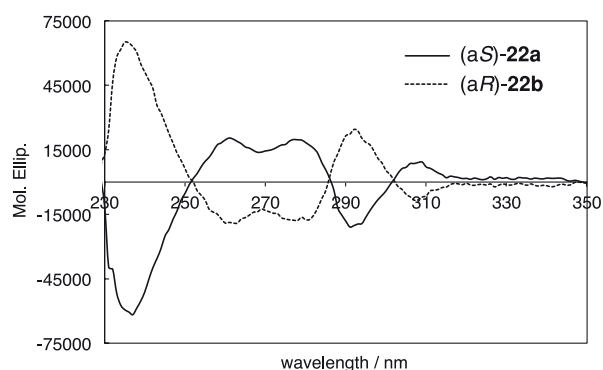


図7 (aS)-22aと(aR)-22bのCDスペクトル

6. プロテインキナーゼ阻害活性評価

以上のようにして合成した16-メチルラメラリンNの光学活性体23a, 23bについて8種のプロテインキナーゼ(CDK1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK5/p25, GSK-3 α /3 β , Pim1, DYRK1A, CLK3, CK1)に対する

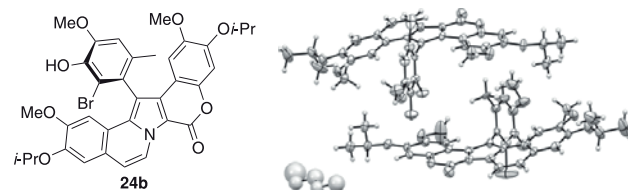


図8 臭化物24bのX-線結晶構造解析

阻害活性評価を行った(表1)。その結果、(aR)-**23b**はラメラリンN(**2**)と同様に、CK1以外のキナーゼを非選択的に強く阻害することが明らかになった。一方、(aS)-**23a**はGSK-3 α/β , Pim1, DYRK1Aのみを選択的に阻害し、CDK1, 2, 5やCLK3に対しては阻害活性を示さなかった。今回活性評価を行った8種のキナーゼの内、CDK1, 2, 5, GSK-3 α/β , DYRK1A, CLK3は、分子系統樹(kinome)中で同一のCMGCファミリーに属している。軸不斉構造のみが異なる(aR)-**23b**と(aS)-**23a**において、構造的に類似したこれらのキナーゼに対する阻害選択性に大きな違いが認められたことは興味深い。

表1 プロテインキナーゼ阻害活性評価

protein kinase	IC ₅₀ (μ M)		
	2	(aR)- 23b	(aS)- 23a
CDK1/cyclin B	0.070	0.052	> 10
CDK2/cyclin A	—	0.067	> 10
CDK5/p25	0.025	0.024	\geq 10
GSK-3 α/β	0.005	0.21	0.37
Pim1	0.055	0.13	0.22
DYRK1A	0.035	0.042	0.44
CLK3	—	0.15	> 10
CK1	> 10	> 10	> 10

7. 阻害選択性発現の解釈

多くのキナーゼ阻害剤は、キナーゼのATP結合ポケットに入り込み、その触媒機能を阻害する¹³⁾。(aR)-**23b**と(aS)-**23a**の間でのキナーゼ阻害選択性の違いは、各キナーゼのATP結合ポケットの構造の違いを反映したものと考えられる。そこで、上記の結果を合理的に解釈するとともに、より有効なキナーゼ阻害剤の設計指針を得るために、シミュレーションによりラメラリンのキナーゼ阻害モードを探ることにした。まず、(aR)-**23b**と(aS)-**23a**で阻害に大きな違いが認められたサイクリン依存性キナーゼ(CDK)について検討を加えた。ラメラリンと類似の平面骨格を持つ非選択的キナーゼ阻害剤スタウロスポリンとCDK2との共結晶X-線結晶構造解析データに基づき、MOEにより最適化を行った。図9にラメラリンN(**2**)、(aR)-**23b**、(aS)-**23a**とCDK2との複合体の最適化構造**25A**、**25B**、**25C**、ならびにそのスコア値を示した。

まず基本となるラメラリンN(**2**)/CDK2複合体**25A**を見ると、**2**は、その平面5環性骨格をN-末端ローブとC-末端ローブに沿ってATP結合部位に入り込み、B環部のカルボニル基がヒンジ領域のLeu83のNHと、E環部8位の水酸基がLys33/Asp145塩橋部位と、それぞれ

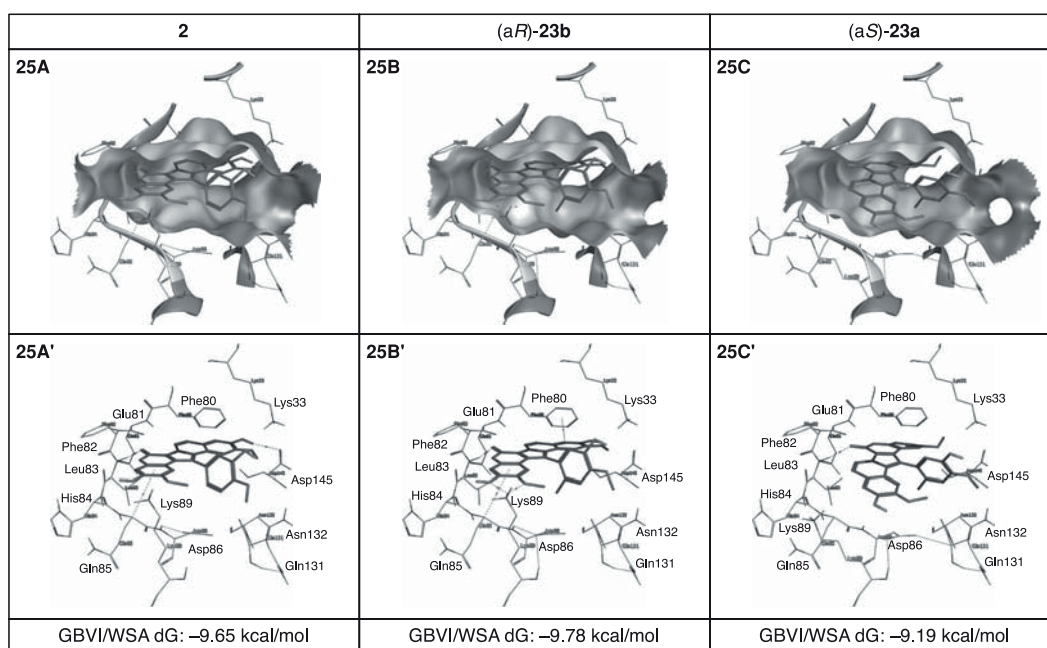


図9 CDK2とラメラリンN(**2**)、(aR)-**23b**、(aS)-**23a**との複合体の最適化構造

れ水素結合をして安定化している。さらにA環部20位の水酸基と21位メトキシ基がLys89の側鎖アミノ基の水素をキレートするような形で安定化している。一方、5環性骨格に直交した1位芳香環(F環)は、13位水酸基をN-末端ローブ側に向けた配座をとっている。この配座においては、13位水酸基とP-ループにあるGlu12のペプチド結合部が相互作用可能な位置関係にあるため、軸周りで可動なF環は、このような配座をとって安定化しているものと考えられる。

次に、高活性を示した(aR)-**23b**との複合体**25B**を見ると、(aR)-**23b**はラメラリンN(**2**)とほぼ同様の配向でCDK2と結合していることがわかる。さらに、F環部16位のメチル基がC-末端ローブ側にある疎水性ポケットに嵌り込むような形で安定化しており、スコア値からも**25B**は**25A**に比べて付加的な安定化相互作用があることが示唆された。一方、CDK類に活性を示さなかった(aS)-**23a**との複合体**25C**においては、上記の2例とは大きく異なり、(aS)-**23a**の5環性骨格が反転した形でATP結合部位に入り込んでいる。これは、5環性骨格が**25A**や**25B**のような安定と考えられる配向で入ると、F環部の16位メチル基とN-末端ローブ側の剛直な β -シートとの間で強い反発を生じるため、それを避ける形でこのような異常な構造が計算上最安定構造として得られたものと考えられる。

引き続き、(aR)-**23b**と(aS)-**23a**の間で阻害に大きな違いが認められなかったGSK-3 β について、スタウロスポリンとの共結晶X-線結晶構造解析データに基づき、最適化を行った。図10にラメラリンN(**2**)、(aR)-**23b**、(aS)-**23a**とGSK-3 β との複合体の最適化構造**26A**、**26B**、**26C**、ならびにそのスコア値を示した。これらの複合体はラメラリンの5環性骨格に関してすべてが同じ配向で結合しており、スコア値にも大きな違いが認められなかった。GSK-3 β はCDK2に比較して、N-末端ローブとC-末端ローブの間隙が広く、F環の配向の違いは活性に影響をおよぼさないものと考えられる。

8. トポイソメラーゼI阻害および細胞増殖抑制活性評価

すでに述べたとおり、ラメラリンD(**1**)はトポイソメラーゼIを強く阻害することが知られている⁶⁾。ラメラリン骨格をモチーフとして新たなキナーゼ阻害剤を創製する場合、キナーゼ阻害活性とトポイソメラーゼI阻害活性の切り分けは必須と考えられる。そこで、トポイソメラーゼI阻害活性評価(DNAリラクセーションアッセイ)を行った(図11)。その結果、標準的な阻害剤であるカンプトテシン(CPT)やラメラリンD(**1**)はトポ

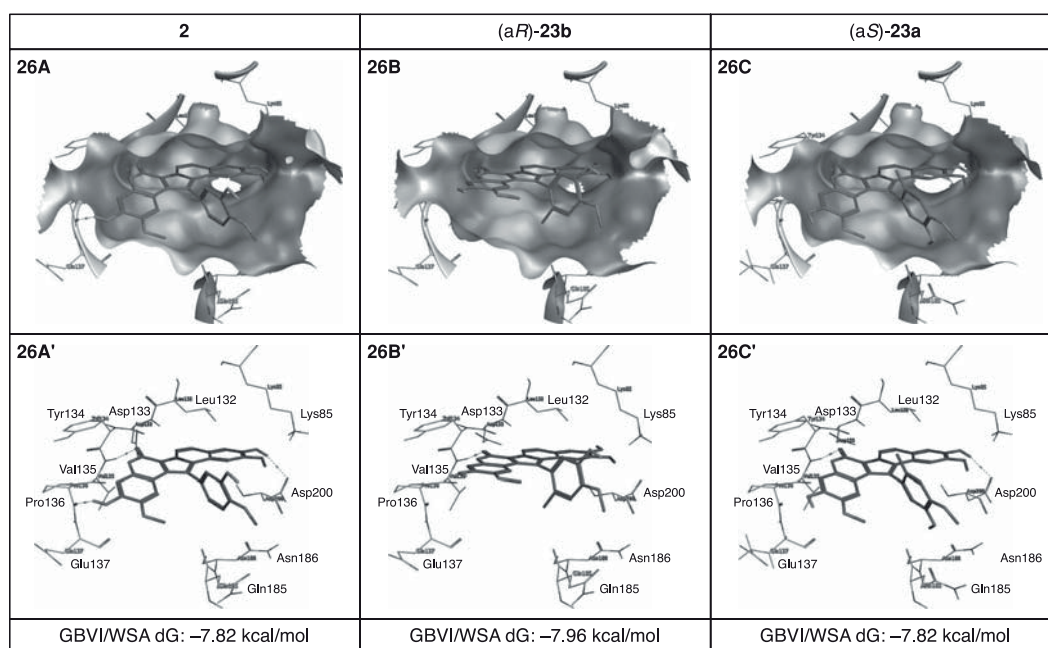


図10 GSK-3 β とラメラリンN(**2**)、(aR)-**23b**、(aS)-**23a**との複合体の最適化構造

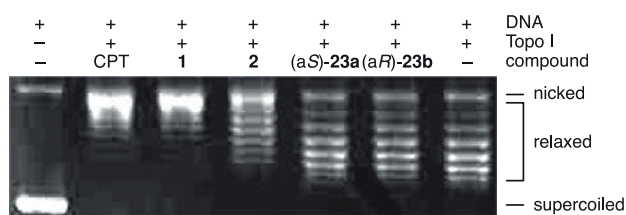


図11 トポイソメラーゼI阻害活性評価

イソメラーゼIを強く阻害するが、ラメラリンN(2)の活性はそれらに比べると弱く、特に16-メチル体は両エナンチオマーともに活性を示さないことがわかった。詳細は省略するが、ラメラリンD-DNA-トポイソメラーゼI三元複合体モデル⁷⁾から、(aR)-23bや(aS)-23aにおいては16位メチル基がラメラリン平面5環性骨格のDNAへのインターカレーションを妨害し、安定な三元複合体が形成されないものと考えられる。

最後に、ラメラリンN(2)、(aR)-23b、(aS)-23aの酵素阻害活性の違いが細胞増殖抑制活性の違いに反映されるか否かを検討した。子宮頸がん細胞(HeLa)ならびに2種の神経芽腫細胞(SH-SY5Y, IMR32)を用いてアッセイを行った(表2)。その結果、いずれの細胞においても、増殖阻害活性は2、(aR)-23b、(aS)-23aの順で低下しており、トポイソメラーゼIおよびCDK阻害活性の低下を反映する結果となった。

表2 細胞増殖抑制活性評価

cell line	IC ₅₀ (μM)		
	2	(aR)-23b	(aS)-23a
HeLa ^a	0.032	0.160	2.95
SH-SY5Y ^b	0.040	0.79	4.1
IMR32 ^b	0.019	0.41	2.0

a) colony formation assay
b) MTS assay

9. おわりに

今回、海洋天然物ラメラリンN(2)の軸不斉構造がキナーゼ阻害におよぼす影響を明らかにするために、光学活性(aR)-23bおよび(aS)-23aを合成し、活性評価を行った。その結果、軸周りで可動な2の評価からではわからなかった興味深い知見を得ることができた。シミュ

レーションによれば、ラメラリンは、その平面5環性骨格とそれに直交した芳香環(F環)により、ATP結合ポケットの3次元的な構造を認識している。このうち、ヒンジや塩橋と結合する5環性骨格が活性発現部位として働き、ポケットの上下を認識するF環が活性制御(選択性発現)部位として作用しているものと理解される。現在、このような解釈のもとに、高選択的かつドラッグライクな特性を備えたラメラリン系キナーゼ阻害剤の創製を試みている。

英文タイトル: Selectivity control in protein kinase inhibition using axial chirality of lamellarins

参考文献

- 1) Fan, H.; Peng, J.; Hamann, M. T.; Hu, J.-F. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 264-287.
- 2) Fukuda, T.; Ishibashi, F.; Iwao, M. *Heterocycles* **2011**, *83*, 491-529.
- 3) Quesada, A. R.; Grávalos, M. D. G.; Puentes, J. L. F. *Br. J. Cancer* **1996**, *74*, 677-682.
- 4) Ishibashi, F.; Miyazaki, Y.; Iwao, M. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5951-5962.
- 5) Ishibashi, F.; Tanabe, S.; Oda, T.; Iwao, M. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 500-504.
- 6) Facompré, M.; Tardy, C.; Bal-Mahieu, C.; Colson, P.; Perez, C.; Manzanares, I.; Cuevas, C.; Bailly, C. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7392-7399.
- 7) Marco, E.; Laine, W.; Tardy, C.; Lansiaux, A.; Iwao, M.; Ishibashi, F.; Bailly, C.; Gago, F. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3796-3807.
- 8) Baunbæk, D.; Trinkler, N.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Ploypradith, P.; Ruchirawat, S.; Ishibashi, F.; Iwao, M.; Meijer, L. *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 514-527.
- 9) Andersen, R. J.; Faulkner, D. J.; Cun-heng, H.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5492-5495.
- 10) Urban, S.; Capon, R. J. *Aust. J. Chem.* **1996**, *49*, 711-713.
- 11) Ohta, T.; Fukuda, T.; Ishibashi, F.; Iwao, M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8143-8153.
- 12) Fukuda, T.; Ohta, T.; Sudo, E.; Iwao, M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2734-2737.
- 13) Ghose, A. K.; Herberz, T.; Pippin, D.A.; Salvino, J. M.; Mal-lamo, J. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5149-5171.

