

トポロジー解析

○西 弘二¹、香月正明¹、チュアン・トゥアン・ギャム¹、中山 仁¹、山乙教之²、広野修一²、小田切優樹¹(1 熊本大院・薬、2 北里大・薬)

緒論

ヒト α_1 -酸性糖蛋白質(AGP)は、183 個のアミノ酸残基と 5 本の糖鎖からなる分子量約 40kDa の血清糖蛋白質である。この蛋白質の生物学的機能の詳細は解明されていないが、血中で多くの塩基性薬物やステロイドホルモン類の主要結合担体として働き、結合薬物の体内挙動に影響を及ぼすことが知られている¹⁾。

UCN-01(7-hydroxy-staurosporine、Figure 1)は、 Ca^{2+} およびリン脂質依存性プロテインキナーゼ C (PKC)の選択的阻害剤として、*Streptomyces sp.* 培養液から単離精製された新規インドロカルバゾール系抗癌剤である²⁾。UCN-01 の抗腫瘍効果を示す作用機序としては PKC 阻害だけでなく、ヒト癌細胞において、サイクリン依存性キナーゼ(Cdk)を G1 期に集積させる細胞周期特異的な作用があることが明らかにされている³⁻⁵⁾。さらに、UCN-01 は臨床試験において非常に小さな分布容積および全身クリアランスを示すとともに生体内半減期は約 1000 時間と極めて長いことが確認されている。このような動態特性の一因として AGP への極めて高い結合性(10^8 M^{-1})が挙げられている⁶⁾。AGP 結合性のステロイドホルモンや塩基性薬物の中で親和性の高いものでも 10^6 M^{-1} 程度であることから、UCN-01 の AGP

への結合親和力は極めて高いものであると言える。興

味深いことに、このような強力な結合性は UCN-01 の構造類似体(UCN-02 および staurosporine)では認められず、また AGP への特異的な結合は他の動物種では観察されないことから、ヒト特異的なものであることが知られているがその詳細は解明されていない⁶⁾。

このような背景の下、本研究では AGP 分子上における UCN-01 の結合部位および結合様式の解明を目的として種々の検討を行い、AGP 分子上における薬物結合部位のトポロジー解析を行った。

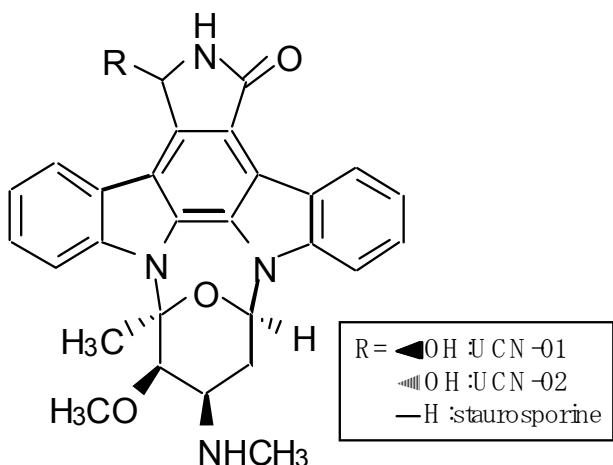


Figure 1. Chemical structure of UCN-01, UCN-02 and staurosporine

光アフィニティラベリング法を用いた AGP と UCN-01 の結合実験

AGP(50 μM)と [^3H]UCN-01(0.08 μM)(20 mM Tris-HCl, pH 7.4)を遮光下で 1 時間室温で放置後、

水浴下で310nmのUVを30分間照射することにより、ラベリングを行い³H]UCN-01でラベリングされたAGPをアセトン沈殿により回収した。得られたラベル化AGPを電気泳動後、PVDF膜に転写し放射活性を測定した結果、AGPが³H]UCN-01により有意にラベリングされたことが示唆された(Figure 2)。

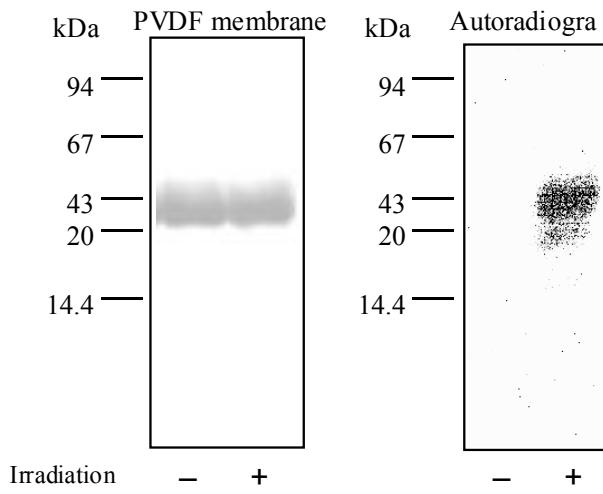


Figure 2. Photolabeling of hAGP with (+) or without (-) ³H]UCN 01.

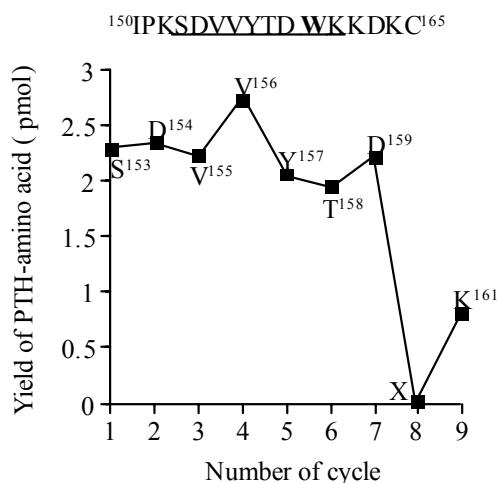


Figure 3. N-terminal amino acid sequence analysis by the Edman degradation method.

次に、このラベル化AGPをトリプシン消化後、放射活性を有するペプチド断片を逆相およびキャビラリーHPLCにより単離し、アミノ酸配列解析した結果、AGP分子内の160番目のトリプトファン残基(Trp160)が³H]UCN-01によりラベル化されていることが示唆され

た(Figure 3)。

組換え型AGP(変異体)を用いた光アフィニティラベリング実験

組換え型AGPの作製においては、当研究室で構築したAGPの発現系を用いて行った⁷⁾。すなわち発現ベクター(AGP/pPIC9)をElectroporation法を用い、メタノール資化能を有する *Pichia pastoris*(GS115)の染色体DNA上に挿入し、培地上清から精製した組換え型AGPを得た。各変異体は、Quickchange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kitを用いて作製した。

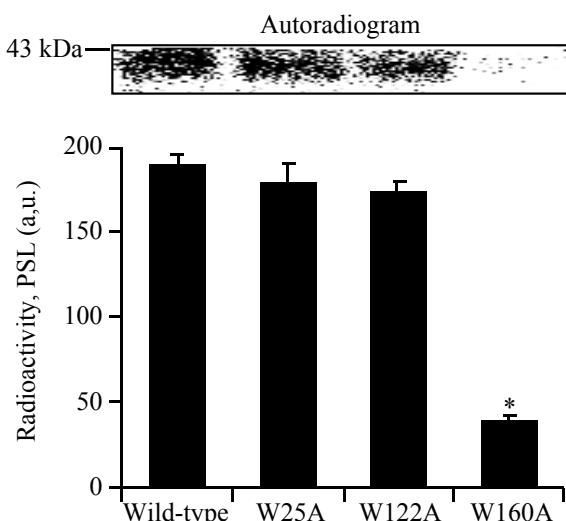


Figure 4. Photolabeling of recombinant AGP (Wild-type, W25A, W122A and W160A) with ³H]UCN-01. *Statistically significant compared with wild type; $p<0.01$.

Figure 3の結果から、UCN-01はAGP分子内のTrp160に結合することが示唆されたため、Trpをアラニン(A)に変異させたW160Aおよび他のW25、122のアラニンへの変異体(W25A、W122A)を作製し、それぞれ³H]UCN-01で光ラベリングを行い、ラベル化されたAGPの放射活性を測定した(Figure 4)。その結果、W25A、W122Aにおいては野生型(Wild Type)

とほぼ同等の活性を示した。一方、W160Aにおいては有意な活性低下が観察された。これらの結果は、UCN-01の結合部位がTrp160周辺であることを示唆しているものと思われる。Trp160はAGP分子内においてC末端部位に非常に近い位置にあり、これまで提唱されてきたAGP分子上の薬物結合部位とは異なる。UCN-01がこれまで報告してきたAGP結合性薬物の結合性を大きく上回り、ヒトAGPにのみ特異的に結合することを考慮すると、ここで得られた結果は、AGP分子上の新たな薬物結合部位の探索という点からも非常に興味深い。

ホモジーモデリングを用いたAGPとUCN-01のドッキングモデルの構築

これまでの結果から、UCN-01がAGP分子上のTrp160周辺に結合する可能性が極めて高いものと思われた。そこで、最近Kopeckyらによって作製されたAGPの立体構造モデル(ホモジーモデル)を用いて、そのTrp160近辺にUCN-01を配置させることによりドッキングモデルを構築した。その結果、Trp160周辺に2つの有力な結合サイト(Type IとType II)の存在の可能性が示唆された(Figure 5)。そこで、それぞれの結合サイトにおけるAGPとUCN-01との結合様式や、周辺のアミノ酸残基について検討した。Type Iにおいては、UCN-01周辺にVal41、Glu43、Ile44、Phe48、Tyr50、Val156、Thr158およびTrp160の存在が確認された。

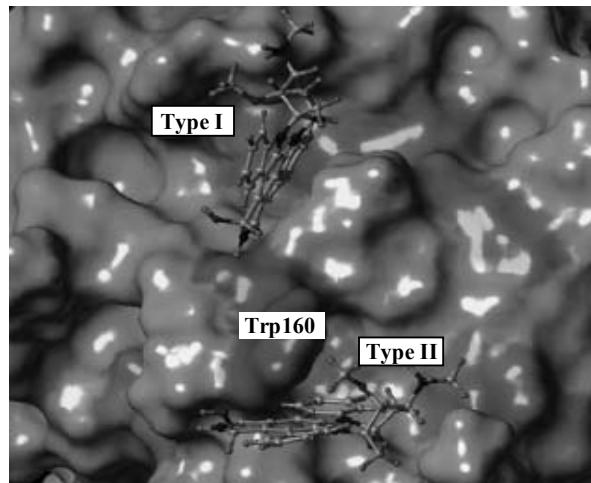


Figure 5. Type I and II docking models of UCN-01 and hAGP

その一方で、Type IIにおいてはIle28、Pro131、Glu132、Lys135、Leu138、Tyr157、Trp160およびLys161がUCN-01周辺に存在し、その中でもLys135、Leu138、Tyr157、Trp160およびLys161はUCN-01に対し非常に近い距離(5Å以内)にあることが観察された(Figure 6)。さらにLys135はUCN-01の糖環の酸素原子(O)と接触し、カルボニル基(C=O)はTrp160と水素結合を形成している可能性が考えられた。 $^{[3]H]$ UCN-01がAGP分子上のTrp160をラベリングしたことから、この結果は極めて妥当なものであると考えられた。

さらに、UCN-01の構造類似体であるUCN-02およびstaurosporine(Figure 1)を用いて同様にAGP分子上のType IIでのドッキングモデルを構築した。その結果、UCN-01の7位の水酸基(α-OH)はLys161と静電的相互作用している一方で、UCN-02の水酸基(β-OH)はLys161とほぼ対照的な位置にあるGlu132のカルボン酸と静電的相互作用していることが示唆された。また、UCN-02もUCN-01と同様、Trp160との相互作用が観察されたが、その距離はUCN-01よりやや離れていることが観察された。これは、UCN-02がTrp160やLys161と対照的位置にある

Glu132 に引き寄せられた結果起こった現象かも知れない。さらに、UCN-01 の AGP への強固な結合が Trp160 との結合にあると考えると、この現象が UCN-02 の結合親和性が UCN-01 のそれよりも低くなる原因の 1 つであると考えられる。しかし、これだけでは UCN-01 と UCN-02 の 100 倍近い結合定数の差を完全に説明することは難しく今後更なる検討が必要であると思われる。

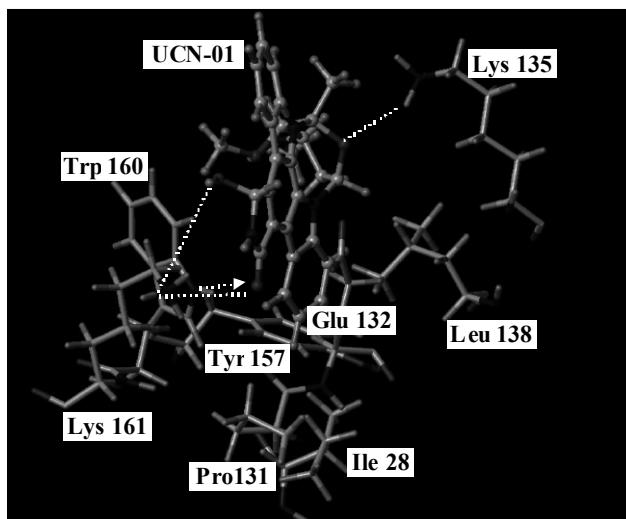


Figure 6. Amino acid residues in a surface cleft around Trp160 that interacts with UCN-01 exhibited in type II docking model.

一方、staurosporine の場合はカルボニル基と Trp160 の相互作用は観察されたものの、7 位の水素原子と相互作用しているアミノ酸側鎖の存在は確認されなかった。これらの結果から、いずれの化合物のカルボニル基も Trp160 と相互作用しているにも関わらず、結合定数に差が生じる原因の 1 つとして 7 位の水酸基の有無あるいは配向性の違いが挙げられる。

まとめ

本研究では、光アフィニティラベリング法、部位特異的変異法および分子シミュレーション技術を用いて AGP 分子上における UCN-01 の結合部位の同定に成功した。そ

の結果、UCN-01 は AGP 分子の Trp160 およびその周辺のアミノ酸残基からなる結合ポケットに結合し、水素結合や静電的相互作用を形成しているもの考えられた。

参考文献

- [1] JMH. Kremer, *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, **40**, 1-47 (1988).
- [2] I. Takahashi, *et al.*, *J. Antibiot.*, **40**, 1782-1784 (1987).
- [3] CM. Seynaeve, *et al.*, *Cancer Res.*, **53**, 2081-2086 (1993).
- [4] T. Tomaoki, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397-402 (1986).
- [5] K. Kawakami, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 778-783 (1996).
- [6] E. Fuse., *et al.*, *Cancer Res.*, **58**, 3248-3258 (1998).
- [7] K. Nishi., *et al.*, *Drug. Metab. Dispos.*, **32**, 1069-1074 (2004).