

博士論文の要旨

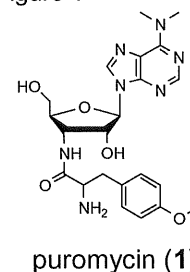
論文題目 : ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ特異的阻害剤の創製

氏名 : 加来田 博貴

1. 序

ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (PSA) は、脳や神経で高発現しているメタロプロテアーゼの一つであり、がん転移において重要な役割を担うと考えられているアミノペプチダーゼN (APN) と同様な基質特異性を有する中性アミノペプチダーゼである。PSA は puromycin (1) に対する感受性の高さからその名があるが、1 の認識する基質結合部位のアミノ酸配列が類縁のアミノペプチダーゼ間で相同しているため、その特異性は必ずしも高くない。従って puromycin (1) でさえ PSA の特異的阻害剤とは言えない。これまで PSA に特異的な阻害剤が知られていなかったこともあり、PSA の生理機能については長らく不明のままであった。近年、Osada らにより PSA 欠損マウスが創製され、PSA の個体レベルにおける機能については情報が得られつつある¹⁾。しかしながら細胞レベルにおける機能解明はなお発展途上にある。

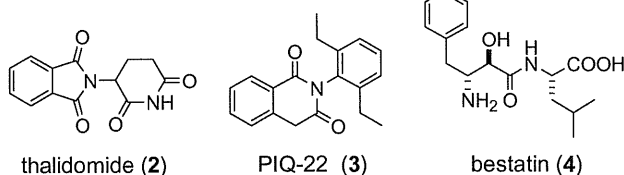
Figure 1



puromycin (1)

そのような中、著者らは多様な生理活性を有する thalidomide (2) をリードとした構造展開研究において、PSA に特異的な阻害剤 PIQ-22 (3) を見出した (Figure 2)^{2),3)}。さらに 3 はマウスメラノーマ細胞 B16F10 を用いた細胞浸潤阻害評価において、臨床

Figure 2



thalidomide (2)

PIQ-22 (3)

bestatin (4)

応用されている bestatin (4) (Figure 2) 以上の細胞浸潤阻害能を有することを明らかにした⁴⁾。このように 3 は PSA の機能解明ツールとなる可能性が示されたのだが、3 の環内ベンジルメチレンが容易に自動酸化されてその活性を失う³⁾。

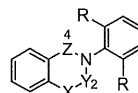
そこで本研究において、(i) 化学的に安定で、かつ 3 より高い PSA 阻害活性を有する阻害剤を創製し、(ii) それを PSA の機能解明プローブへ展開して分子生物学的な PSA の機能解明への道を拓くこと、および (iii) 細胞浸潤阻害能について評価を行うことで PSA 阻害剤の医薬応用への道を拓くことを目指した。

2. 2,4(1*H*,3*H*)-Quinazolidinedione 骨格を有する PSA 阻害剤の創製と構造活性相関

PIQ-22(3)の環内ベンジルプロトンカルボニル酸素やフッ素原子に置換した化合物 5、6 などには PSA 阻害活性が見られないことなどから、『PSA 阻害活性には、環内ベンジル位プロトン付近の正の静電場が必要』という仮説を立て、3 のベンジルメチレンを NH に置換した 2,4(1*H*,3*H*)-quinazoline-dione 骨格を有する 7 (PAQ-22) をデザインした⁵⁾。その結果、7 およびその NH を

N-アルキル化した **8**~**13** に高い PSA 阻害活性が認められた。一方、同位置をエーテル酸素に置換した **14** は、N-アルキル体に比べその活性が大きく低下した。これらは上記仮説を支持するものと考えている。尚、これらの化合物は、PIQ-22 (**3**)に見られたような自動酸化反応は見られない。2位のカルボニル基を、チオカルボニル基に置換した **15**、およびメチレンに置換した **16** においては、**7** に比べるとそれほど大きな活性の低下は見られなかった。従って2位のカルボニル基は酵素との結合に重要ではないと思われる。一方 **7** の4位カルボニル基を、チオカルボニル基

Table 1



Compound	X	Y	Z	R	PSA IC ₅₀ [μM]	APN IC ₅₀ [μM]
3 : PIQ-22	CH ₂	CO	CO	Et	7.8	>100
5	CO	CO	CO	Et	>100	>100
6	CF ₂	CO	CO	Et	>100	>100
7 : PAQ-22	NH	CO	CO	Et	3.8	>100
8	NMe	CO	CO	Et	3.4	>100
9	NEt	CO	CO	Et	0.7	>100
10	NPr	CO	CO	Et	0.6	>100
11	NBu	CO	CO	Et	0.9	>100
12	NBn	CO	CO	Et	1.1	>100
13	NBz	CO	CO	Et	0.9	>100
14	O	CO	CO	Et	53.4	>100
15	NH	CS	CO	Et	3.8	>100
16	NH	CH ₂	CO	Et	26.7	>100
17	NH	CO	CS	Et	25.3	>100
18	NH	CO	CH ₂	Et	>100	>100
19	NH	CO	SO ₂	Et	7.7	>100
20 : PAQ-00	NH	CO	CO	H	>100	>100
21 : PAQ-11	NH	CO	CO	Me	78.3	>100
22 : PAQ-33	NH	CO	CO	ⁱ Pr	7.0	>100
23	NH	CO	CO	MeO	4.5	>100
1 : puromycin					0.6	4.8
4 : bestatin					0.5	1.3

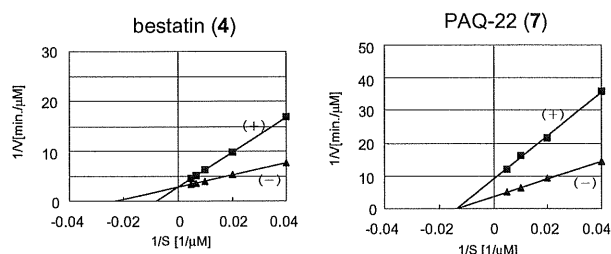
に置換した **17**、およびメチレンに置換した **18** において活性が大きく低下したことから、4位のカルボニル基は酵素認識に関与することが示唆された。

PIQ-22(**3**)/ PAQ-22(**7**)のジエチルフェニル基を分枝脂肪鎖や環状脂肪鎖に置換したところ活性は認められなかったことからフェニル基の必要性が示された。

Puromycin (**1**)および bestatin (**4**) と異なり今回創製した化合物が PSA に特異的な阻害を示すことから、阻害様式に興味を持たれた。Lineweaver-Burk Plot による速度論解析の結果、

puromycin (**1**)および bestatin (**4**) は基質に対して競合的に PSA を阻害する一方、今回創製した PSA 阻害剤は基質結合部位とは異なる位置に結合する非競合的な阻害剤であることが示された (Figure 3)。創製した一連の化合物が PSA に高い特異性を示すのは、類縁のアミノペプチダーゼ間において相性の低いアミノ酸配列から構成される、特異的な結合部位を認識するためと考えられる。

Figure 3

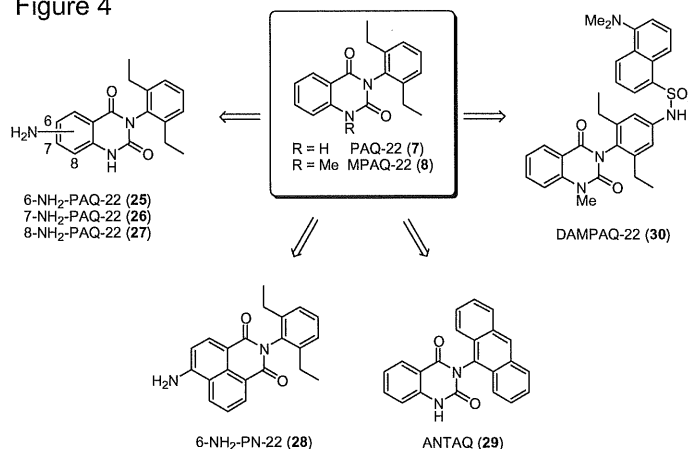


3. PSA 蛍光プローブの創製

PSA 発現を可視化する手法としてその抗体プローブの利用が知られるが、その手法は繁雑でありかつ感度的に問題がある。そこでこれらを克服したプローブ創製を目指し、今回創製した PSA 阻害剤を蛍光プローブへ展開することにした。

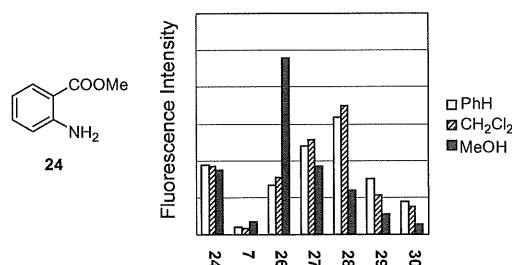
PAQ-22 (**7**)は弱いながら蛍光を発する。そこでこの分子自体を強力な蛍光

Figure 4



体に展開出来ないかと考えた。蛍光色素として有名な methyl anthranilate (**24**)に比べ**7**の蛍光強度が弱いのは、**7**の2位カルボニル基により1位アミノ基のキナゾリンジオン芳香環に対する電子供与性が低減されるためだと考えた。そこで当該芳香環にアミノ基等の電子供与性基を導入して**25~27**としたところ、いずれにも顕著な蛍光増強が見られた。また**26, 27**はPSA阻害活性も示した。しかしながらこれらの化合物は、その蛍光強度が酵素内部のような低極性環境で極性環境に比べて大きく増強しないため (Figure 5)、蛍光プローブとしては不適であると考えられた。キナゾリンジオン骨格をアミノナフタルイミド骨格に変換した**28**においては、高い蛍光強度は得られたもののPSAに対する特異性が失われた。

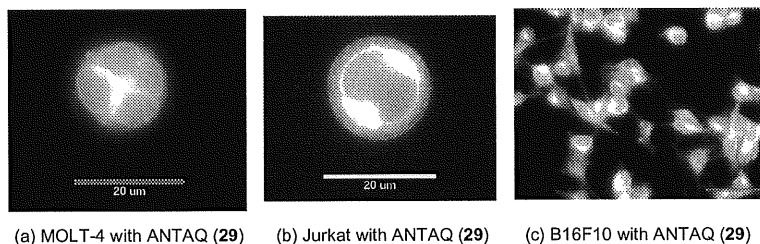
Figure 5



Compound	PSA IC ₅₀ [μM]	APN IC ₅₀ [μM]	DPPiV IC ₅₀ [μM]
25	>100	>100	>100
26	9.8	>100	>100
27	0.5	>100	>100
28	0.5	23.5	>100
29	2.9	>100	>100
30	4.6	>100	>100

PAQ-22 (**7**)のジエチルフェニル基をアントラセンに置換した ANTAQ (**29**)、および**8**のジエチルフェニル基へダンシルアミノ基を導入した DAMPAQ-22 (**30**)を創製したところ、高い蛍光強度およびPSA特異的な阻害活性が見られた。ANTAQ (**29**)ないし DAMPAQ-22 (**30**)で処理した各種細胞の蛍光顕微鏡撮影を行ったところ、PSA発現の少ないHL60等の細胞ではその発光が弱く、一方PSA発

Figure 6



現の多いMOLT-4、Jurkat等においては細胞質、とりわけ核を取り巻く一部に強い発光域が見られた (Figure 6)。この発光は一連のPSA阻害剤との共存により消失もしくは低下し、ANTAQ (**29**)/DAMPAQ-22 (**30**)はPSAと特異的に結合して発光していると判断できた。PSAの細胞内分布が細胞可溶性画分とされていることから、この結果は妥当と思われる⁶⁾。現在、これら化合物のPSA結合部位の同定を目指し光親和性プローブへの展開を試みている。

4. 生物活性評価

創製した化合物の細胞浸潤阻害活性をマウスメラノーマ細胞B16F10を用いて評価した。その結果、強力なPSA阻害剤はいずれもB16F10に対して濃度依存的な細胞浸潤能を示した。PSAの配列中に細胞分裂装置である微小管に対する結合配列と相同性の高い配列が2箇所見出されていることから、PSAは細胞の運動性に関与する可能性が示唆される⁷⁾。従ってこの結果は、PSA阻害による細胞の運動性低下に起因するのかもしれない。

5. 総括および今後の展望

本研究により、化学的に安定でかつ強力な特異的 PSA 阻害剤創製に成功した。また創製した化合物群の構造活性相関解析を行うことで、PSA を生細胞で可視化する蛍光プローブの開発にも成功した。今後これらの化合物を用いることにより PSA の分子生物学的な機能解明が図られるものと期待される。さらに PSA 阻害剤が細胞浸潤阻害能を有することを示すことが出来た。この結果と PSA 欠損マウスにおいて無痛症が見られることを含めて考えると¹⁾、PSA 特異的阻害剤は、細胞浸潤のみならず鎮痛作用をもったこれまでにない抗がん剤候補になりうると考えられ医薬への応用も期待される。

<参考文献>

- 1) Osada T., *et al.*, *J. Neurosci.*, **19**, 6068-6078, **1993**.
- 2) Komoda M., *et al.*, *Bio. Med. Chem.*, **9**, 121-131, **2001**.
- 3) Takahashi H., *et al.*, *Yakugaku Zasshi*, **120**, 909-921, **2000**.
- 4) Kagechika H., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1010-1012, **1999**.
- 5) Kakuta H., *et al.*, *Heterocycles*, **55**, 1433-1438, **2001**.
- 6) Kakuta H., *et al.*, *Bio. Med. Chem Lett.*, in press, **2002**.
- 7) Constam DB, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 26931-26939, **1995**.