

論文の内容の要旨

論文題目 CDK4 特異的インヒビター開発への結晶構造解析からのアプローチに関する研究
氏名 幾田 まり

p16^{INK4A}-CDK4,6-cyclin D-RB の経路の変異は、ヒトの半数以上のガンで見つまっている。よって、CDK4 は新規の抗ガン剤の開発に、魅力的なターゲットとなっている。しかしながら、CDK4 以外の kinase に阻害活性をもたない CDK4 特異的な阻害剤を開発することは困難である。特に、CDK ファミリーは高い構造の相同性を持つため、CDK2 などの CDK ファミリー内で選択性を出すのは、困難である。

ところで、最近になってタンパク質の3次元構造を基に、ドラッグデザインが行われた例が報告されてきている。CDK 阻害剤の開発についても、CDK2 や CDK2 と阻害剤の複合体の3次元構造が有用な情報を与えてきた。そこで本研究では、3次元構造の情報を利用し、CDK4 選択的阻害剤の開発を行うことを目的とした。

本研究の目的は CDK4 選択的阻害剤を開発することだが、そのためには、明らかに CDK4 の3次元構造情報が必要であった。しかし、CDK4 の結晶化は困難であり、CDK4 特異的阻害剤の開発に対して上記と同様な手法をとることができなかった。そこで、この問題を解決するために、CDK2 の ATP 結合ポケットを CDK4 のアミノ酸残基に変換した CDK4 mimic CDK2 を作製した。この CDK4 mimic CDK2 について結晶化を行い、X 線構造解析を行った。この様にして得られた CDK4 mimic CDK2 の構造は、CDK4 特異的な化合物の開発に対して、有用な情報を与えるものであった。

得られたデータから、CDK4 は、CDK2 に比較して、大きな置換基を許容できる余分なスペースを持つことがわかった。その余分なスペースに入り込むような置換基をもつ化合物は、CDK4 選択的になることが予想された。なぜならば、このような化合物は、CDK2 の ATP 結合ポケットでは、立体障害により、その結合が許容されないからである。この CDK4 選択的阻害剤のデザインの方針に従って、新しい CDK4 特異的阻害剤が開発された。新しく開発された CDK4 特異的阻害剤と CDK4 mimic CDK2 複合体の結晶構造を決定することにより、導入した置換基が実際に CDK4 の余分なスペースに存在していることが確認された。

compound I / wild-type CDK2 複合体の構造

我々は CDK2 の ATP 結合ポケットの構造情報をもとに、CDK4 阻害剤のリード化合物である compound I を見出した。しかしながら、compound I は CDK4 のみならず、CDK2 にも阻害活性を示した。まずこの compound I について、CDK2 との複合体の構造解析を行った。compound I / CDK2 の構造の全体図を図1に示す。CDK2 の構造は、N 端の主に β -sheet からなっている小さなドメインと、C 端の主に α -helices からなる大きなドメインから構成されている。N 端ドメインと C 端ドメインの間では深いクレフトが形成されており、ATP の結合するポケットとなっている。compound I は、ATP や他の CDK インヒビターと同様、2つのドメインの間の深い溝に結合していた(図1)。

また compound I の水素結合と疎水的相互作用の様式について、図2に示す。compound I と CDK2 の Leu83 の主鎖との間に水素結合が形成されていた。compound I の tricyclic amine の部分は、Val18,Ala31,Val64,Phe80,Leu134 など CDK2 の残基と疎水相互作用を形成していた。また、ピリジン環についても、Ile10 や Leu134 と疎水相互作用をしていた。

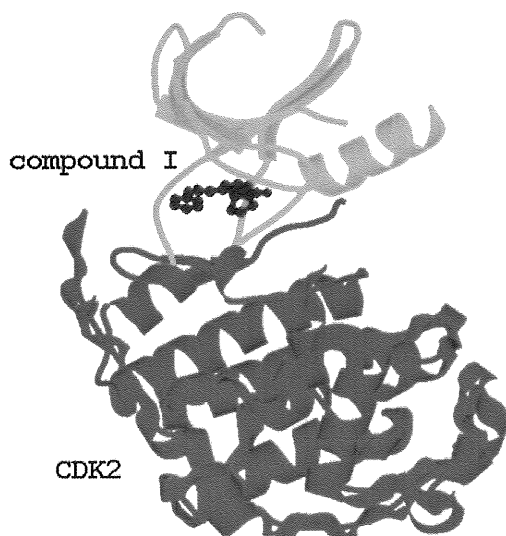


図1 compound I / wild-type CDK2 の全体構造

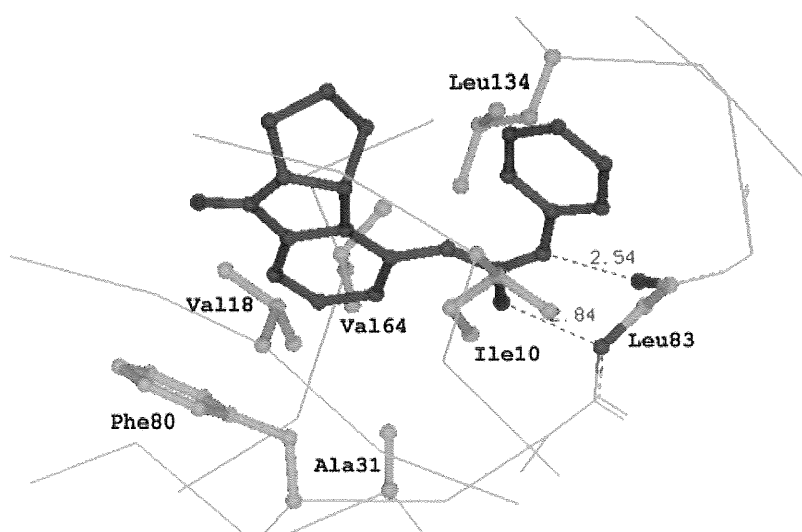


図2 compound I の wild-type CDK2 における結合様式

CDK4 mimic CDK2 の系の確立

CDK4 の結晶化は困難であったが、CDK4 選択的な化合物の開発において、その構造情報が必要とされていた。そこで、CDK2 の ATP 結合ポケット内のみを CDK4 型に改変した CDK4 mimic CDK2 を作製し、阻害剤が結合する箇所における CDK4 の構造情報を得ることを計画した。作製した CDK4 mimic CDK2 は Sf9 内でよく発現し、soluble なタンパク質を得ることができた。精製についても、wild-type と同様な方法で行うことができた。

CDK4 mimic CDK2 が wild-type と同様な酵素活性を保持していることを確認するために、CDK4 mimic CDK2 について、その酵素活性の測定を行った。活性型 CDK4 mimic CDK2 / cyclin A を用いて酵素活性の測定を行い、wild-type CDK2 / cyclin A との比較を行ったところ、CDK4 mimic CDK2 は wild-type CDK2 と同様な酵素活性を示した。これらの CDK4 mimic CDK2 について、結晶化を行ったところ、良好な結晶を得ることができた。

compound I / CDK4 mimic CDK2 の結晶構造及び compound I / wild-type CDK2 との構造の比較

CDK2 と CDK4 の ATP 結合ポケットは類似しているが、構造情報をドラッグデザインに生かしていくためには、この2つの構造の間の差異を見つけることが重要である。CDK4 と CDK2 の ATP 結合ポケットの構造の違いを同定するために、compound I / CDK4 mimic CDK2 の結晶構造を決定した。compound I / CDK4 mimic CDK2 複合体の結晶構造でも、compound I の結合様式は wild-type CDK2 での結合様式と類似していた。

次に compound I / CDK4 mimic CDK2 と compound I / wild-type CDK2 の ATP 結合ポケットの構造の比較を行った(図3)。CDK4 mimic CDK2 と wild-type CDK2 の ATP 結合ポケットの最も特徴的な違いは、残基 89 (CDK2:Lys, CDK4:Thr) の側鎖の大きさの違いにより、CDK4 mimic CDK2 では余分なスペースが存在していたことであった。つまり、CDK4 の構造では Thr の側鎖が小さいため余分なスペースが存在するのに対し、CDK2 においては、残基 89 が Lys でかさ高い側鎖をもっているため、この領域のスペースに余裕がないことが示唆された。以上より、この余分なスペースに結合するような大きな置換基をもった阻害剤は、CDK4 には結合できるが、CDK2 の ATP ポケット内で許容されないと予想される。このような化合物は、CDK2 への阻害活性がなくなることで、CDK4 に選択的に阻害活性を示すことができると考えられる。以上の CDK4 選択的阻害剤のデザインの方向性に従って、compound I に大きな置換基を導入したような化合物がデザインされ、実際に合成された。その結果、compound II (Table I) を代表とするような、CDK4 選択的阻害剤の合成に成功することができた。

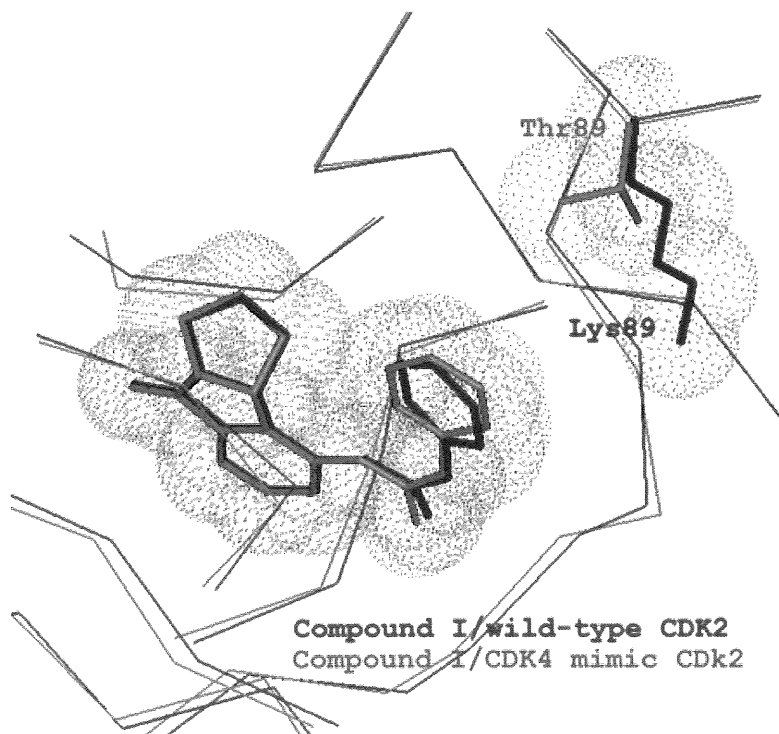


Table I Properties of CDK4 Inhibitors

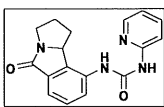
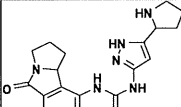
	compound I	compound II
		
Inhibitor data		
IC50(μM)		
CDK4-cyclinD	0.051	0.21
CDK6-cyclinD	0.071	0.33
CDK2-cyclinA	0.096	25
cdc2-cyclinB	0.28	45
Ratio(CDK2/CDK4)	1.9	120
CDK4 mimic CDK2-cyclinA	0.25	1.6

図3 compound I/wild-type CDK2 と compound I/CDK4 mimic CDK2 の構造の比較

compound II の CDK4 特異性

compound II の CDK4 に対する選択性を, *in vitro* 酵素アッセイにより調べた (Table I). その結果, compound I は, CDK4, CDK6, CDK2, cdc2 を 0.05-0.28 μ M の範囲で, それぞれ同等に抑制しているのに対して, compound II は CDK4, CDK6 を特異的に抑制しており, CDK2 や cdc2 とは選択性が 100 倍以上あることが明らかになった. さらに, これらの化合物が CDK 以外の他の serine/threonine もしくは tyrosine kinase を阻害するかどうかを測定した結果, これらの阻害剤は他の kinase に対しては, 阻害効果を示さないことが確認された.

またこれらの化合物が CDK4 mimic CDK2 に対して阻害効果を示すかどうかについても, 実験を行った. その結果, compound II は CDK4 mimic CDK2 に対して, CDK2 よりも CDK4 に近い阻害効果を示した (Table I). この結果から, CDK4 mimic CDK2 の ATP 結合ポケットの構造は, CDK4 を代表していることが示唆される.

compound II / CDK4 mimic CDK2 複合体の結晶構造及び compound II が CDK4 選択的であることの構造上の知見

compound II に導入した置換基が実際に CDK4 の ATP 結合ポケットの余分なスペースに結合しているかどうかを確認するために, compound II / CDK4 mimic CDK2 複合体の結晶構造を決定した. compound II の結合様式を図4に示す. compound II においても, 化合物とタンパク質の Val83 の主鎖との間に水素結合が形成されていた. さらに, 化合物の N-22 は water644 と水素結合しており, さらにその水分子は, Gln131 の主鎖のカルボニルと水素結合を形成していた. また図に示したアミノ酸残基側鎖との疎水相互作用もみられた.

CDK4 阻害剤デザインの方向性が正当であったかを確認するために, compound II / CDK4 mimic CDK2 の構造と compound I / wild-type CDK2 の構造の重ね合わせを行い, compound II の置換基が CDK2 の中でどのような位置を占めているかの考察を行った (図5). 結果, compound II は CDK4 mimic CDK2 の余分なスペースによくあてはまっていた. しかしながら, wild-type CDK2 においては, Lys89 の側鎖が立体障害となっていることがわかった. これより, compound II の wild-type CDK2 への結合が維持できなくなっていることが示唆された. このことは, compound II が CDK2 に対する阻害活性を低下させることで, CDK4 に対する選択性を獲得していることを, よく説明している.

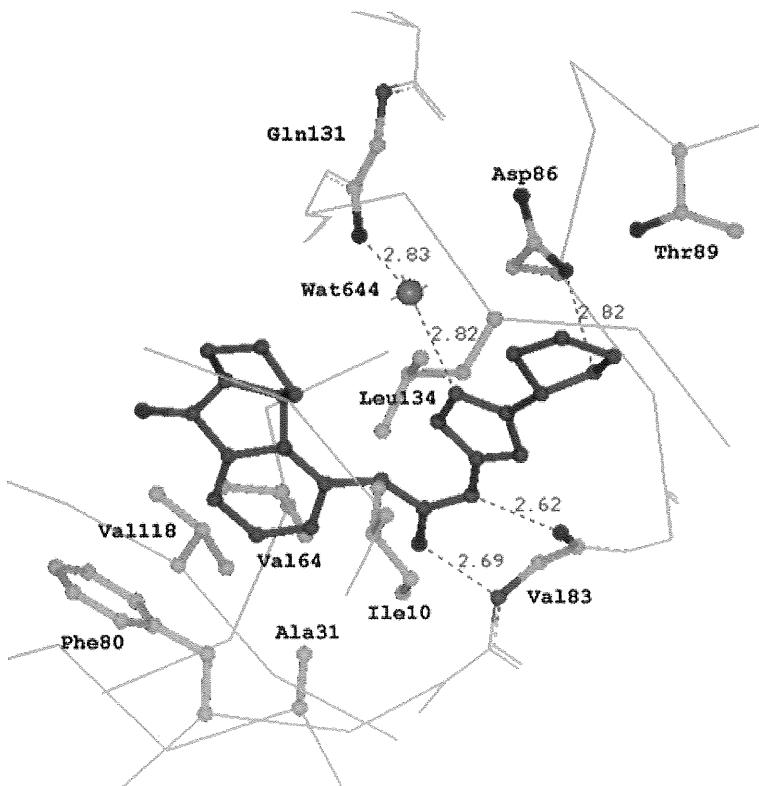


図4 compound II / CDK4 mimic CDK2 複合体の結晶構造

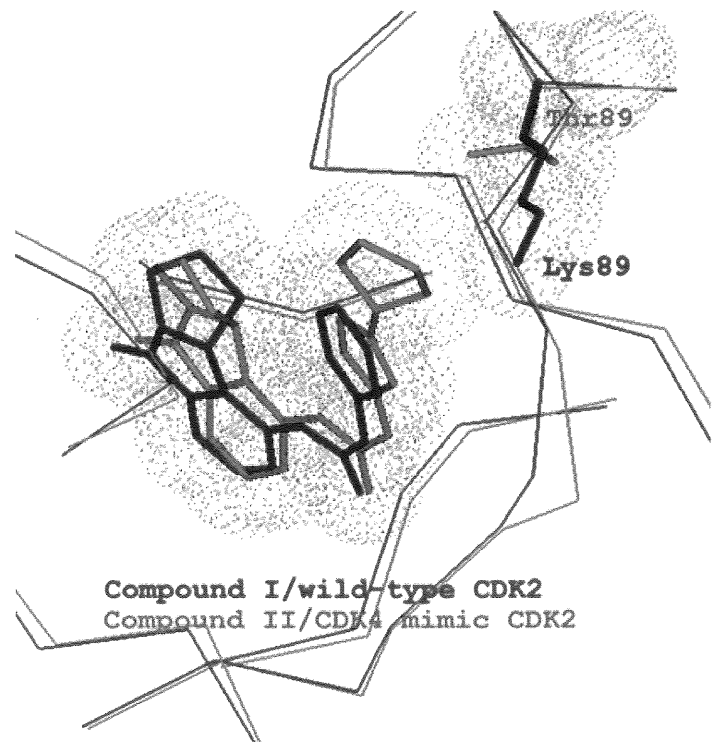


図5 compound I / wild-type CDK2 と compound II / CDK4 mimic CDK2 の構造の比較

<結論>

CDK4 mimic CDK2 は、CDK2 の ATP 結合ポケットのアミノ酸残基を CDK4 のものに変異させた変異体である。この CDK4 mimic CDK2 は CDK4 特異的な化合物の開発に対して、有用な情報を与えるものであった。この、CDK4 mimic CDK2 は、Sf9 で wild-type と同様によく発現し、高純度にまで精製を行うことができ、X線構造解析を行うのに、充分良質な結晶を与えることができた。

特異性のない CDK 阻害剤と wild-type CDK2 の複合体、および CDK4 mimic CDK2 との複合体、それぞれの複合体の結晶構造を比較することで、CDK4 には余分なスペースが存在し、化合物の大きな置換基を許容することがわかった。これらの発見に基づいて、compound II を代表とする、CDK4 選択的な化合物を合成することができた。実際、compound II / CDK4 mimic CDK2 複合体の結晶構造解析により、compound II は CDK4 の ATP 結合ポケットによくあてはまっていることがわかった。しかしながら、CDK4 での余分なスペースの部分は、CDK2 ではかさ高い側鎖がきており、compound II が CDK2 の中で結合できないようになっていた。これは、compound II の CDK4 選択性をよく説明している。結論として、CDK2 と CDK4 mimic CDK2 の結晶構造の比較は、CDK4 選択的な阻害剤の開発に効果的であったことがわかった。このアプローチは、さらに改良された性質をもつ次世代の CDK4 選択的な阻害剤の開発にも、有用となるであろう。

現在までに知られている kinase の阻害剤は全て ATP 結合ポケットをターゲットとしている。現在までは、特異的な CDK4 阻害剤の開発は、ATP 結合ポケットが様々な kinase の間で類似しているため、困難だと考えられてきた。しかしながら、様々な kinase 阻害剤と kinase の複合体の構造が明らかになり、その結合様式の情報の特異的な kinase 阻害剤の開発するのに助けとなることがわかってきた。今後、ハイスループットスクリーニングやコンビナトリアルケミストリー、モデリングなどの技術と組み合わせることで、最適な化合物をデザインしていくのが可能になっていく、と期待される。

今後、本当の意味で‘抗ガン剤’の開発を行うには、阻害剤は *in vitro* ばかりではなく、*in vivo* でも、阻害活性をもつ必要がある。compound II について、ガン由来の細胞種をもちいて、細胞での阻害活性を測定した。その結果、compound II は 25 μ M の濃度においても、細胞増殖を抑えないことがわかった。compound II は細胞に浸透できないのが、その原因の1つとして考えられる。いずれにせよ、compound II のさらなる改良を行い、培養細胞や動物モデルでも阻害活性をもつ化合物を開発しなければならないが、その誘導化の方向性を決めるのにも構造情報は有用であり、これについての研究は現在進行中である。

最後に、CDK 以外の他のケースに対しても、同様なアプローチ、つまり、結晶化が困難なために構造決定ができないタンパク質に対して、ホモロジーが高く結晶化が可能なタンパク質の変異体を作製するという手法は、リガンドの結合様式についての情報を得る目的のために利用できるだろうと考えられる。

<Reference>

- Ikuta, M., Nishimura, S. et al. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**, 27548-27554.
Honma, T., Ikuta, M., Nishimura, S., Morishima, H. et al. (2001) *J. Med. Chem.* **44**, 4615-4627
Honma, T., Ikuta, M., Nishimura, S., Morishima, H. et al. (2001) *J. Med. Chem.* **44**, 4628-4640