

講座 生体機能化学研究部門（化学研究所）

2. 3. 12 研究分野：分子生体触媒化学

構成員： 教授 平竹 潤
助教 渡辺 文太
大学院修士課程 5名

A. 研究活動（2010. 4～2011. 3）

A-1. 研究概要

a) γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ阻害剤の分子設計と合成

グルタチオン（ γ -Glu-Cys-Gly）は活性酸素種や生体異物の解毒代謝に中心的な役割を果たしているトリペプチドであり、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GGT）はグルタチオン代謝の鍵酵素である。本研究では、GGTの基質認識機構を明確にするため、グルタチオンの構造に基づいて精密に設計された遷移状態アナログ阻害剤を合成した。構造活性相関の結果、ヒトGGTはCys部分およびリン原子上の立体配置、さらにはGly部分末端の負電荷を強く認識していることが明らかとなった。一方、大腸菌GGTに対する阻害剤の構造活性相関はヒトGGTと大きく異なり、特に末端Gly部分の負電荷を十分に認識していないことから、大腸菌GGTの本来の基質はグルタチオンでないことが示唆された。また、質量分析の結果から、阻害剤はグルタチオンに相当する構造を保ったまま、GGTの小サブユニットと共有結合していることが分かった。さらに、遺伝子改変を行った大腸菌GGTのX線結晶構造解析より、ヒトGGTのLys562がグルタチオンおよび阻害剤のC末端の負電荷と強く相互作用していることを明らかとした。また、ほ乳類のGGTに対する特異的阻害剤がヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生やエラスチン産生を著しく亢進することが判明し、アンチエイジング化粧品原料としての応用研究を精力的に進めている。また、これまで報告のなかった、ヒトGGTについてのX線結晶構造解析についても着手した。

b) アスパラギン合成酵素を標的とした阻害剤の開発

急性リンパ性白血病の化学療法における第一選択として、アスパラギナーゼ療法がある。これは、血中のAsnを枯渇させ、白血病細胞の増殖を阻止するユニークな化学療法であるが、白血病細胞の一部や固形ガン細胞はアスパラギン合成酵素（AS）を高度に発現しており、これが化学療法剤のひとつであるアスパラギナーゼの効果を低減させ、耐性獲得の原因ともなっている。そこで、ヒトASに対する特異的阻害剤の開発は、アスパラギナーゼ療法の効果を高め、適用範囲を広げる、ガン化学療法の新しい領域を開拓する重要なテーマである。我々はこれまで、ヒトASに対し、 $K_i = 2.5 \text{ nM}$ という、きわめて強力なAS阻害剤を世界で初めて設計・合成したが、細胞レベルでの増殖抑制には100-1000 μM の濃度を要した。そこで、本研究では、細胞膜透過性を向上させ、阻害剤の腫瘍細胞に対する生物活性を高めることを目的とし、pharmacophoreとなるスルホキシイミンを含むAMPミミックとして、一連のアシルスルファミド系化合物を合成展開している。阻害剤の合成過程では、ロジウム触媒を用いた新しいスルホキシイミン合成反応を開発し、クリックケミストリーを利用したコンビナトリアル合成に対応した合成法を確立し、ハイスループットスクリーニングにより、有用な化合物の探索を行っている。

c) アシル活性化酵素に対する特異的阻害剤の分子設計

アシル活性化酵素は、脂肪酸の β 酸化や植物二次代謝産物の生合成等に広く関わり、CoAチオエステルやアミドを合成する非常に多様な酵素群である。これらリガーゼは全て、アシルアデニル酸活性化中間体を経由するという共通の反応機構を持つ。本研究では、フェニルプロパノイド経路の鍵酵素である4-ヒドロキシケイヒ酸CoAリガーゼ（4CL）に着目し、その生理的意義を明らかにするために、4CL選択的阻害剤として新規N-アシルアデノシルスルファミド系化合物を設計・合成した。合成した阻害剤は酵素レベルで4CLを阻害し、阻害剤のベンゼン環上の置換基の位置や構造と阻害活性の間に明瞭な相関があることを見出した。また、阻害剤を添加した培地で植物体を生育させたところ、スコポリンおよびスコポレチンといったフェニルプロパノイド化合物の含量が無添加時と比較して有意に減少したことから、本阻害剤は根から吸収され、in vivoでも4CLを阻害していることが示唆された。

d) 細胞透過性を指向した γ -グルタミルシステイン合成酵素阻害剤の分子設計

グルタチオンの生合成における律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素（GCS）の活性は、システインの供給とともに、細胞内のグルタチオン濃度に直接的に影響を与え、細胞のレドックスバランスを制御する鍵酵素である。これまで、従来の GCS 阻害剤（BSO）の1000倍以上の阻害活性をもつ反応機構依存型阻害剤 cbBSO を開発した。cbBSOの細胞透過性を上げ、細胞レベルおよび in vivoで効力を発揮する実用的阻害剤の開発をめざし、細胞のペプチドトランスポーターによる能動輸送を介した取り込みに期待し、疎水性アミノ酸を結合させた Ala-cbBSO, Leu-cbBSO, Ile-cbBSO, Phe-cbBSO等の一連のジペプチド型阻害剤を合成した。その結果、大腸菌への取り込みが有意に増大し、菌体内のグルタチオン濃度が顕著に低下することを見いだした。これらジペプチド型cbBSOは、細胞のペプチドトランスポーターによって能動輸送され、細胞内のペプチダーゼによって切断され、cbBSOを遊離させることによってグルタチオン生合成を阻害しているものと思われた。ヒト線維芽細胞等の動物細胞において、ジペプチド型cbBSOを用いる細胞内レドックスバランスの制御を行っている。

A-2. 研究業績（国内・国外含む）

a) 成果刊行

著 書

・平竹潤、池内秀幸、遷移状態アナログを利用した酵素解析について 「酵素利用技術体系一基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで」 小宮山眞 監修、東京、（株）エヌ・ティ・エス、pp. 93-98 （2010）

原著論文（書評論文を含む）

・Ogata M, Kameshima Y, Hattori T, Michishita K, Suzuki T, Kawagishi H, Totani K, Hiratake J, Usui T. : Lactosylamide-based affinity purification for cellulolytic enzymes EG I and CBH I from *Hypocrea jecorina* and their properties. (査読有)
Carbohydr Res. 345; 2623-2629, 2010

A-3. 国内における学会活動など①

所属学会等（役割）

・平竹 潤：日本農芸化学会関西支部（評議員）、「化学と生物」和文誌編集委員会委員

A-3. 国内における学会活動など②

競争的資金等獲得状況

①科学研究費補助金

- ・若手研究（スタートアップ）：渡辺 文太：グルタチオン生合成を制御する新規薬剤の開発

②その他の競争的資金

- ・科学技術振興機構 研究成果最適展開支援事業（A-STEP） 起業挑戦タイプ：平竹 潤：新規 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GGT）阻害剤によって引き起こされる細胞内コラーゲン産生の応用

B. 教育活動（2010. 4～2011. 3）

B-1. 学内活動

a) 開講授業科目（担当教員）

- ・全学共通科目： 少人数向けセミナー（ポケットゼミ）「きて、みて、さわって、有機化学が死ぬほど好き！」（平竹 潤）
- ・大学院： 分子生体触媒化学専攻演習（平竹、渡辺）、分子生体触媒化学専攻実験（平竹、渡辺）