

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550189

研究課題名(和文)カスパーゼ活性化有機小分子の作用機序の解明とガン細胞選択的アポトーシス誘導

研究課題名(英文)Clarification of action mechanism of caspase-activating molecules and cancer cell-selective induction of apoptosis

研究代表者

松尾 貴史 (Matsuo, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：50432521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：カスパーゼ3は、前駆体プロカスパーゼ3として発現し、活性化することで、アポトーシスの最終段階で機能するプロテアーゼである。ガン細胞では、この前駆体の活性化が、細胞中の金属イオンにより抑制されている。本研究では、この過程の回復を促す有機小分子PAC-1の酵素活性への影響についての詳細を検討した。その結果、PAC-1は金属イオンの有無に関わらず、前駆体の活性化のみならず、活性化したのちの酵素分子の機能をも向上させることを見いだした。また、弱いながらも酵素活性をもつ変異体プロカスパーゼ3に対しての機能向上は乏しく、金属イオンの関与以外に、酵素への直接的結合による活性向上効果が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Caspase-3, a protease at the downstream of a apoptosis cascade, is produced from a zymogen protein (procaspase-3) with the help of other activator on cell stimuli. The activation process is inhibited in several kinds of cancerous cell because of much amounts of metal ions. This work focuses on the action mechanism of PAC-1, a compound that recovers the activation process of procaspase-3 in cancerous cells, on the activities of (pro)caspase-3 from the viewpoint of enzymology. The kinetic studies of caspase-3 indicated that PAC-1 enhances the activity of mature caspase-3 as well as the recovery of activation process from the zymogen to mature form in the absence of metal ions. The effect of the compound on a mutant procaspase-3, a variant that has a weak caspase-3 activity, was found to be poor. In conclusion, PAC-1 has a structural perturbation mechanism for affecting the (pro)caspase-3 activities as well as the metal ion-chelation removal pathway.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：カスパーゼ 有機小分子 アポトーシス 作用機構

1. 研究開始当初の背景

(1) アポトーシス(プログラム化された細胞死)に基づくガン治療法に、アポトーシス経路の初期段階で機能する p53 遺伝子を活性化する方法がある。しかし、ガン細胞では、経路の途中に異常があることが多い。そこで、近年、補完的な方法として、アポトーシス経路の後段階で機能するカスパーゼ3を直截的に活性化する方法も注目されている。

(2) カスパーゼ3は、システイン残基を活性中心にもつタンパク質加水分解酵素であり、前駆体である「プロカスパーゼ3」がカスパーゼ9等により部分切断を受けて活性化し成熟型酵素として生成する。ガン細胞では、この活性化過程が阻害されているためにアポトーシスが起こりにくい状態となっているが、「プロカスパーゼ3の存在量は、ガン細胞でも、正常細胞とほぼ同程度もしくはそれ以上」(Roy et al, 2001)という報告がなされて以来、阻害されている活性化過程を有機小分子により回復させ、ガン細胞のアポトーシスを誘導する方法が注目されている。しかし、この活性化過程を促進する有機小分子の作用機構については解明すべき点が多く、臨床応用のためには、これらの分子によるカスパーゼ3活性化機構に関するデータの蓄積が必要であった。

2. 研究の目的

従来、カスパーゼ3活性化阻害には、タンパク質に結合している金属イオンの関与が指摘されている。このことから、アポトーシス誘導有機小分子においても、「金属イオンキレート除去機構」が提唱されており、Horgenrotherらが報告した有機小分子 PAC-1 (1st procaspase-activating compound) は、ガン細胞中に大量に存在する亜鉛イオンをキレート除去することでカスパーゼ3活性化を回復するとされている。一方、研究代表者の予備実験において、PAC-1は成熟型カスパーゼ3の活性も向上することが分かっていた。

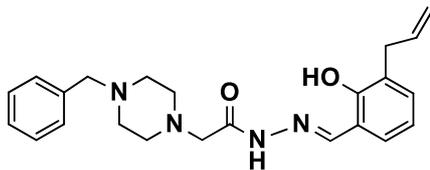


図1 PAC-1の構造

プロカスパーゼ3も、非常に弱いながら酵素活性を示し、自己活性化によりゆっくりと活性の高い成熟型へ変化するため、酵素化学的に、有機小分子への作用を検討する際に、前駆体への影響か、成熟型への影響の見極めは困難である。そこで、本研究では、PAC-1の成熟型カスパーゼ3に対する活性化機構(基質結合段階への影響か、あるいは化学触

媒段階への影響かなど)を詳細に検討し、金属キレート効果によるタンパク質機能制御以外の反応機構が存在するかどうか、前駆体カスパーゼ3のみならず、活性化した後にも明らかにし、ガン細胞選択的アポトーシス誘導のための指針を得るために、以下の実験を実施した。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来カスパーゼ3は、ATCCから購入した pET-23b プラスミドをもつ BL21(DE3) 大腸菌によって発現させ、プロカスパーゼ3を得たのち、精製過程での自己活性化により成熟型酵素として得た。また、自己活性化を抑制した変異体プロカスパーゼ3 (D9A/D28A/D175A) は、上記の pET-23b 中の該当アミノ酸残基をコードする塩基配列に PCR 法を用いて部位特異的変異を施して、大腸菌より発現させた。PAC-1 は Hergenrotherらの論文を参考に、塩化ベンジルを出発原料とする有機合成によって得た。

(2) 酵素活性は、Sigma-Aldrichより購入した AcDEVD *p*-nitroanilide を用いて測定した。また、PAC-1 と成熟型カスパーゼ3の相互作用を検討するための分子動力学(MD)計算は、YASARA modeling software package (Ver.14.4.15)によって行った。

4. 研究成果

(1) Hergenrotherらは、PAC-1が Zn^{2+} キレート除去することで、プロカスパーゼ3の活性化を促進し、ガン細胞のアポトーシスを誘発していると提案している。そこで、PAC-1が、同様の条件で成熟型酵素にも効果があるのかどうかを検討するために、PAC-1存在下、 Zn^{2+} が及ぼす成熟型カスパーゼ3の活性効果を測定した。なお、ガン細胞中は正常細胞に比べて、弱酸性条件になっていることを考慮して、pH = 6.0にて活性評価を行った。その結果、 Zn^{2+} によって酵素活性は減少するものの、その減少度合いは、PAC-1存在下の方が小さかった。しかし、この条件での PAC-1 の Zn^{2+} 結合は、中性条件に比べて 1/1000 であることが分かった。また、 Zn^{2+} 非存在下でも酵素活性の上昇が観測され、予備実験の再現性が得られた。

すなわち、報告されている Zn^{2+} キレート除去はこの条件でも機能しうるが、支配的な機構ではなく、別の活性化機構が存在することが示唆された。

(2) 上記の結果を受けて、 Zn^{2+} 非存在下、システイン残基の酸化を抑制するために窒素下で、成熟型カスパーゼ3の酵素活性の Michaelis-Menten パラメータに対する PAC-1 の効果を算出した。その結果、PAC-1 の添加により、 K_m 値の低下、 k_{cat} 値の上昇が観測され、総括活性(k_{cat}/K_m)は、約 8.6 倍に上昇した。

また、酵素分子と PAC-1 に混合溶液の紫外

吸収スペクトルおよび誘起 CD スペクトルの観測結果より、酵素分子と PAC-1 の直接的相互作用が示唆された。この提案は、酵素活性向上効果について PAC-1 の濃度依存性を検討した際に、Michaelis-Menten 型の飽和依存性を示したことから支持される。

(3)(2) で述べた実験を、カスパーゼ活性測定でポピュラーに用いられる条件 (2-メルカプトエタノールおよび CHAPS の添加条件) で行ったところ、PAC-1 の酵素活性に対する効果は消失した。通常、このような添加剤は、酵素に比べて、大過剰に用いられ、PAC-1 の濃度 (約 28 μM) よりも過剰である。したがって、大過剰に存在する添加剤が PAC-1 と酵素分子との相互作用を阻害しているためと考えられる。

これらの実験事実は、通常のカスパーゼ酵素アッセイで用いられる条件下で、有機小分子の酵素活性への影響を検討する際、大過剰に存在する添加剤の影響により、本来観測されるはずの効果が消失してしまう可能性があり、実験条件の最適化を行う必要性を示している。

(4) PAC-1 のカスパーゼ 3 活性効果における分子構造の重要性を検討するために、PAC-1 のフェノール水酸基あるいはベンジル部位を欠損させた化合物 (アナログ化合物) を用いて、同様に酵素活性への効果を検討した。しかし、PAC-1 に見られたような成熟型カスパーゼ 3 の酵素活性向上効果はなかった。これらの化合物は、プロカスパーゼ 3 の活性化およびアポトーシス誘導に対しても不活性であるとされている。したがって、前駆体、成熟型両方に対して、PAC-1 がもつ官能基の重要性が示された。

(5) 上記の実験で、PAC-1 と成熟型カスパーゼ 3 の直接的相互作用が示唆されることを受け、その相互作用様式を検討するために、分子動力学計算によるドッキングシミュレーションを行った。

まず、結合位置に制限をかけない VINA ドッキングプログラムを用いて、PAC-1 が結合しうる位置の探索を行った。成熟型カスパーゼ 3 は、2 つのドメインの相互作用により 1 つのプロトマーを形成し、さらに、もう 1 つのプロトマーユニットとダイマーを形成する「homo-heterodimeric dimer」の構造をもつ。2 つのプロトマーユニット界面には、疎水的なアミノ酸残基が集まっているキャビティが存在する。計算によって得られた 100 通りの結合様式すべてにおいて、プロトマー間境界面への結合構造が示された。

上記で得られた結合構造のうち、結合エネルギーの大きい 3 つの構造について、YASARA2 力場を用いて溶媒分子を考慮した MD 計算を実施した。ペプチド鎖 $\text{C}\alpha$ の RMSD の収束が見られるまで、シミュレーションを継続し、結合構造の最適化を行った。

計算の結果、得られた 3 つの最安定構造に共通して、PAC-1 のピペラジン環窒素と、プ

ロトマー界面に存在する Glu124/Arg164 との水素結合の形成が見られた。これら 2 つのアミノ酸残基は、塩橋の形成により、プロトマーユニット界面のキャビティ構造を保つための重要なアミノ酸残基である。さらに、Arg164 は、カスパーゼ 3 の活性部位を担う Cys163 に隣接したアミノ酸残基であり、柔軟なループ上に存在するアミノ酸残基である。また、Clark らの研究により、Glu124 を別のアミノ酸残基に置換した場合、Glu124 の位置は活性部位から遠いにも関わらず、酵素活性が著しく低下することが報告されており、Arg164 との塩橋が欠損したために、プロトマー間境界の構造が変化したためと理解されている。今回の研究で、シミュレーションにより得られた最安定構造から、Arg164 と有機小分子の相互作用により、間接的に Cys163 の位置・配向にも影響が及んでいることが推測される。すなわち、PAC-1 はアロステリックドラッグとしての性質をも持ち合わせていることが示された。

一方、PAC-1 のベンジル基、フェノール部分についても、プロトマー境界面に位置するアミノ酸残基との疎水性相互作用、水素結合の形成が示唆され、これらの官能基のない場合に酵素活性への効果がないという実験事実を説明できる結果が得られた。

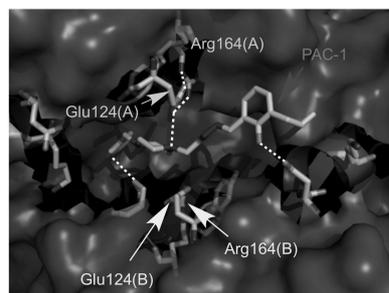


図2 MD 計算に基づく、想定される PAC-1 の成熟型カスパーゼ 3 への結合構造の 1 つ

(6) PAC-1 の直接的構造摂動による活性化が、プロカスパーゼ 3 でも起こりうるのかどうかを検討するために、自己消化の起こらない擬似的前駆体酵素である変異体プロカスパーゼ 3 (D9A/D28A/D175A) に対する PAC-1 を調べた。その結果、成熟型に比べて、大量の PAC-1 を添加しないと、活性の増加が検出できない程度の効果しかなかった。変異体プロカスパーゼ 3 (D9A/D28A/D175A) 変異体プロカスパーゼの X 線結晶構造は、現在のところ得られていないが、Wells らが報告した自己消化の起こらない C163A 変異体プロカスパーゼ 3 では、自己消化のための部分切断が起こらないために、活性型酵素では折り畳まれている 2 つのループが、プロトマー境界面上に露出した形になっている。そのために、PAC-1 のプロトマー界面への結合が阻害されているものと考えられる。

(7) 以上の結果より、PAC-1 によるカスパーゼ 3 の酵素活性向上が明らかとなり、直接

的相互作用を示唆する実験データが得られた。このことは、従来、金属イオンキレート除去機構のみに着目されていたPAC-1の新たな性質が存在することを示している。さらに、MD 計算による結合構造の結果から、カスパーゼ3 活性化にどの官能基が重要であるかが明らかとなり、ガン細胞選択的作用に向けての分子設計に重要な手がかりが得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Takashi Matsuo, Keita Yamada, Masaya Ishida, Yoshiyuki Miura, Masaru Yamanaka, Shun Hirota

“Effect of a procaspase-activating compound on the catalytic activity of mature caspase-3”

Bull. Chem. Soc. Jpn. in press. 査読有

DOI: dx.doi.org/doi:10.1246/bcsj.20150139

Ryu Nishimura, Tomokazu Shibata, Hulin Tai, Izumi Ishigami, Takashi Ogura, Satoshi Nagao, Takashi Matsuo, Shun Hirota, Kiyohiro Imai, Saburo Neya, Akihiro Suzuki, Yasuhiko Yamamoto

“Relationship between the Electron Density of the Heme Fe Atom and the Vibrational Frequencies of the Fe-Bound Carbon Monoxide in Myoglobin”

Inorg. Chem. **2013**, 52, 3349–3355. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

石田昌也、松尾貴史、廣田俊

「成熟型および前駆体 Caspase-3 に対する PAC-1 の効果」

日本化学会第 95 春季年会

2015 年 3 月 26 日、日本大学理工学部・薬学部キャンパス(千葉県船橋市)

松尾貴史、山田啓太、三浦仁志、廣田俊

「プロトマーインタフェイスへの合成分子の結合に基づくカスパーゼ3 活性の制御」

第 8 回バイオ関連化学シンポジウム

2014 年 9 月 11 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

松尾貴史、山田啓太、河野尊匡、廣田俊

「有機小分子 PAC-1 によるカスパーゼ3 活性の促進機構の検証」

日本化学会第 95 春季年会

2014 年 3 月 28 日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

〔その他〕

ウェブサイト

http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/tmatsuo/matsuo_jpn.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松尾 貴史 (MATSUO, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：50432521

(2)連携研究者

廣田 俊 (HIROTA, Shun)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：90283457