プロテインキナーゼC阻害剤の作用メカニズム†

玉 沖 達 也, 中 野 洋 文

(協和発酵東京研究所)

はじめに

プロテインキナーゼによる蛋白質のリン酸化は細胞の増殖, 分化をはじめとする細胞の多様な生理機能の調節に深くかかわっている. プロテインキナーゼはリン酸化を受けるアミノ酸残基の種類によってセリン/スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼとに大別される⁽¹⁾. サイクリックヌクレオチドをセカンドメッセンジャーとするサイクリックヌクレオチド依存性プロテインキナーゼ, Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ, *cdc 2* のような細胞周期を調節する核内のプロテインキナーゼおよび *raf*, *mos* などの癌遺伝子産物はセリン/スレオニンキナーゼである. 一方 *p 60^{src}* などの癌遺伝子産物や EGF, PDGF 等の受容体のプロテインキナーゼはチロシンの水酸基をリン酸化する. 1980 年以降, DNA クローニング技術の応用によって新しいプロテインキナーゼの発見, 構造解明が相次ぎ, 現在までに 100 を越える酵素が報告されている⁽¹⁾.

セリン/スレオニンキナーゼの一つ Ca^{2+} /リン脂質依存性プロテインキナーゼ (以下 PKC) は西塚らによって見出され⁽²⁾, イノシトールリン脂質代謝回転によって産生されるジアシルグリセロール (DG) をセカンドメッセンジャーとすることが明らかにされた. 発癌のプロモーションなどの作用を示す TPA を代表とするホルボルエステル類が DG と同様 PKC に結合し PKC を活性化することが報告され注目を浴びた⁽³⁾. 1986 年以降, PKC のクローニングにより PKC は複数の分子種からなる分子ファミリーを構成していることが明らかになった⁽⁴⁾. これら PKC の分子種は組織や細胞分布が異なり, 活性化機構, 触媒作用にも差があることから PKC

は組織や細胞によって異なった機能を司っていることが示唆されている⁽⁴⁾.

PKC は cDNA の解析から図 1 に示すように C 末側の触媒領域と N 末側の制御領域に分けられる. 触媒領域は他のプロテインキナーゼと高い相同性を示し, ATP 基質の結合部位を有する. 一方, 制御領域は PKC に特異的で, システインに富む反復配列を持ち, DG/ホルボルエステル, Ca^{2+} , リン脂質の結合部位を有する.

以上のように PKC が種々の細胞の生理的機能に深くかかわっていることが明らかにされつつあるが, これらの機能の解明には PKC の特異的かつ強力な阻害剤が有効な手段になりうる. また PKC 選択的阻害剤は広い分野での医薬品になる可能性が考えられる. そこで筆者らは PKC の特異的かつ強力な阻害剤を求めて微生物産物を対象にスクリーニングを行った. 現在まで表 1 に示すように多くの化合物が PKC 阻害剤として報告されているが, これらは大きく, PKC の触媒領域に作用するものと制御領域に作用するものに分類される. 本稿では筆者らが発見した化合物を中心に, 代表的な PKC 阻害剤について解説する.

1. PKC の触媒領域に作用する阻害剤

触媒領域は各プロテインキナーゼ間で相同性が高く⁽⁵⁾, とくに ATP 結合部位は相同性が高いことが知られている. したがって触媒領域に作用する阻害剤は特異性が低いと考えられる. 事実, 合成化合物の H-7 は ATP と拮抗することから ATP 結合部位に作用すると考えられるが PKC をはじめ各種プロテインキナーゼを同程度に阻害する⁽⁶⁾.

微生物産物のスクリーニングの結果, 筆者らは *indolo-[2,3- α]carbazole* 骨格を有するスタウロスポリンが PKC をはじめ cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA), *p 60^{v-src}* プロテインチロシンキナーゼ (*p 60^{v-src}* PTK) などを強力に阻害することを見出した^(7,8). スタウロスポリンは大村らによって抗真菌活性

† Mechanism of Action of Protein Kinase C Inhibitor.

Tatsuya TAMAOKI and Hirofumi NAKANO
(Kyowa Hakko Tokyo Research Laboratory,
Machida, Tokyo 194)

from Ohno S. et. al. Nature 325, 161 1987

図 1 プロテインキナーゼ C

図 2 プロテインキナーゼ C 阻害剤の構造

を有する微生物アルカロイドとして既に報告されていた化合物である⁽⁹⁾。表 1 に示すようにスタウロスポリンは nM レベルの IC_{50} を示す最も強いプロテインキナーゼ阻害剤である。スタウロスポリンもプロテインキナーゼの触媒領域の共通に保存された部位に作用する⁽¹⁰⁾。スタウロスポリンの結合部位はまだ明らかにされていないが筆者らは、過剰量の ATP によっても阻害が回復しないことなどから ATP 結合部位とは少し異なる触媒部位に作用すると推定している。スタウロスポリンの各種培養細胞に対する強い抗細胞活性⁽⁷⁾、マクロファージの活性

化⁽¹¹⁾、血小板凝集阻害⁽¹²⁾などは、おそらく細胞のプロテインキナーゼの阻害によるものであろう。

筆者らは数 nM のスタウロスポリンを検出できる PKC アッセイと HPLC を組み合わせて、約 5000 株の放線菌のうち 5 株がスタウロスポリンを生産することを見出した。さらに高生産株の 1 株がスタウロスポリンの 7 位の炭素に水酸基が結合した UCN-01 および立体異性体の UCN-02 を生産していることを見出した⁽¹³⁾。UCN-01 は表 1 に示すように PKC を選択的に阻害する (IC_{50} : PKC に対し 4.1 nM, PKA に対し 42 nM,

表 1 プロテインキナーゼC阻害剤

作用部位	阻害剤	由来	IC ₅₀ (μM)	
			PKC	PKA
触媒領域	スタウロスポリン	放線菌	0.0027	0.0082
	UCN-01	放線菌	0.0041	0.042
	UCN-02	放線菌	0.062	0.25
	K252 a	放線菌	0.02	0.02
	H-7	合 成	15	13
	アミノアクリジン	合 成	(40*)	
	サンギバマイシン	放線菌	(10*)	
調節領域	疑似基質ペプチド	合 成		
	カルホスチンC	糸状菌	0.05	>50
	セルコスボリン	糸状菌	0.37	22.4
	クロルプロマジン	合 成	40	
	トリフルオペラジン	合 成	(35*)	
	タモキシフェン	合 成	>50(5*)	
	エーテル脂質	合 成	(10*)	
	スフィンゴシン		(80*)	
	ポリミキシンB	細 菌	10	
	アドリアマイシン	放線菌	(50*)	

これらのデータはラット脳より部分精製した PKC と牛心臓より部分精製した PKA を用いて測定した。

* 文献値。

p60^{v-src} PTK に対し 45 nM). UCN-01, 02 もスタウロスポリンと同様 PKC の触媒領域に作用する⁽¹⁴⁾. UCN-01 の PKC に対する選択性は、7 位の水酸基の存在が PKC と他のプロテインキナーゼの触媒領域の構造の微妙な違いによって親和性に対する差を生じることによると考えられる。

水酸基の代わりにメトキシ基を導入した誘導体の PKC に対する選択性は約 100 倍とさらに高くなり⁽¹⁴⁾, 7 位の置換基が選択性に寄与していることを支持する。最近, 7 位以外を修飾したスタウロスポリン誘導体も PKC を選択的に阻害することが報告されている^(15,16). スタウロスポリン, UCN-01 以外にも多くの indolocarbazole 骨格を有する化合物が見出されてきた。加瀬らが見出した K-252 a も強力に各種プロテインキナーゼを阻害する⁽¹⁷⁾. K-252 a は ATP と拮抗し ATP 結合部位に作用すると推定されている⁽¹⁷⁾.

触媒領域には基質の結合部位も存在する。プロテインキナーゼの制御領域に存在する pseudosubstrate 配列に相当するペプチドは基質と拮抗することにより阻害活性を示すが、この配列は各プロテインキナーゼに特異的なため PKC 特異的阻害剤の合成も可能である。実際に pseudosubstrate 配列に相当する 18 残基オリゴペプチ

ドが基質と拮抗し (K_i : 0.15 μM) PKC を特異的に阻害することが報告されている⁽¹⁸⁾. しかしながらこれらペプチドは細胞膜透過性が問題であろう。

2. 制御領域に作用する阻害剤

PKC に特異的な領域であるため制御領域に作用する阻害剤は特異性の面で優れている。

筆者らは糸状菌 *Cladosporium cladosporioides* が生産する新規物質が PKC の強力な特異的阻害剤であることを見出しカルホスチンと命名した⁽²⁰⁾. カルホスチンは 3,10-perylenequinone 骨格を有し、いくつかの類縁体から成っている⁽²¹⁾. 最も活性の強いカルホスチン C は PKC を IC₅₀ 値 0.05 μM で阻害するのに対し, PKA や p60^{v-src} PTK, MLCK など他のプロテインキナーゼをほとんど阻害しない。カルホスチン C は Ca²⁺ 依存性プロテアーゼ処理によって得られる PKC の触媒領域の活性を全く阻害しないことから PKC の制御領域に作用することが確認された。さらに過剰量の Ca²⁺ やリン脂質によって阻害活性が変化しないことから Ca²⁺, リン脂質の結合部位には作用しないこと、ホルボールジブチレート (PDBu) の PKC への結合を部分的に阻害することからカルホスチン C の標的部位は制御領域の DG/ホルボールエステルの結合部位またはその近傍と推定さ

れる⁽¹⁹⁾. カルホスチン類縁体の PKC 阻害活性と培養細胞に対する抗細胞活性はよく相関しており, カルホスチンの抗細胞活性は PKC の特異的阻害によるものと考えられる⁽²⁰⁾.

カルホスチンに類縁の化合物として古くからセルコスボリンやヒペリシンが知られている. これらの化合物も PKC を特異的に阻害するのでカルホスチンと同じ作用部位に作用すると考えられる⁽²¹⁾.

カルホスチン以外で制御領域に作用する阻害剤として報告されている化合物のほとんどはリン脂質と拮抗するものである. 代表的なものとして向精神薬のトリフルオペラジン, クロルプロマジン, 抗生物質ポリミキシン, 抗乳癌剤タモキシフェンなどが知られているが, いずれも阻害活性が弱いため細胞を用いた実験に用いることは困難である.

3. おわりに

スタウロスボリンは特異性はないがプロテインキナーゼの阻害剤として極めて有用であり, 最近スタウロスボリンを使用した研究が数多く報告されている. カルホスチン C は PKC の特異的阻害剤でかつ強さの面でも優れている. 今後, UCN-01 やカルホスチン C が *in vivo* で PKC を阻害しているかどうか研究する必要がある.

はじめに紹介したように PKC は複数の分子種が存在している. 組織, 細胞における PKC の各分子種の役割を明らかにするためには, 各分子種に対する特異的な阻害剤が望まれている. スタウロスボリンやカルホスチンの誘導体の中にも PKC 各分子種の構造の違いを認識するものがある可能性も残されている.

また, 興味深いことに, PKC 選択的阻害剤 UCN-01 およびカルホスチン C は *in vivo* で抗腫瘍効果を示す^(13,20). したがってこれらの化合物は PKC の生理的役割の解明に有用なばかりでなく新しいタイプの制癌剤としても期待されている.

(1) T. Hunter : *Cell*, **50**, 823 (1987).

(2) Y. Nishizuka : *Science*, **233**, 305 (1986).

(3) M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka : *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847 (1982).

(4) U. Kikkawa, A. Kishimoto and Y. Nishizuka : *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 31 (1989).

(5) S. K. Hanks, A. M. Quinn and T. Hunter : *Science*, **241**, 42 (1988).

(6) H. Hidaka, M. Inagaki, S. Kawamoto and Y. Sasaki : *Biochemistry*, **23**, 5036 (1984).

(7) T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomita : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397 (1986).

(8) H. Nakano, E. Kobayashi, I. Takahashi, T. Tamaoki, Y. Kuzuu and H. Iba : *J. Antibiot.*, **40**, 706 (1987).

(9) S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi and R. Masuma : *J. Antibiot.*, **30**, 275 (1977).

(10) T. Nakadate, A. Y. Jeng and P. M. Blumberg : *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 1541 (1988).

(11) S. Tanida, M. Takizawa, T. Takahashi, S. Tsubotani and S. Harada : *J. Antibiot.*, **42**, 1619 (1989).

(12) S. Oka, H. Suzuki and A. Sata : *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, Jp-60-188325 (1985).

(13) I. Takahashi, Y. Saito, M. Yoshida, H. Sano, H. Nakano, M. Morimoto and T. Tamaoki : *J. Antibiot.*, **42**, 571 (1989).

(14) I. Takahashi, E. Kobayashi, C. Murakata, H. Saito and T. Tamaoki : *Mol. Pharmacol.*, in press.

(15) T. Meyer, U. Regenass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rosel, M. Muller, G. Caravatti and A. Matter : *Int. J. Cancer*, **43**, 851 (1989).

(16) P. D. Davis, C. H. Hill, E. Keech, G. Lawton, J. S. Nixon, A. D. Sedgwick, J. Wadsworth, D. Westmacott and S. E. Wilkinson : *FEBS Lett.*, **259**, 61 (1989).

(17) H. Kase, K. Iwahashi, S. Nakanishi, Y. Matsuda, K. Yamada, M. Takahashi, C. Murakata, A. Sato and M. Kaneko : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 436 (1987).

(18) C. House and B. E. Kemp : *Science*, **238**, 1726 (1987).

(19) E. Kobayashi, H. Nakano, M. Morimoto and T. Tamaoki : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 548 (1989).

(20) E. Kobayashi, K. Ando, H. Nakano, T. Iida, H. Ohno, M. Morimoto and T. Tamaoki : *J. Antibiot.*, **42**, 1470 (1990).

(21) T. Tamaoki, I. Takahashi, E. Kobayashi, H. Nakano, S. Akinaga and K. Suzuki : "The Biology and Medicine of Signal Transduction," Raven Press, New York, 1990, p. 497.