

京都大学	博士 (工 学)	氏名	増田 真理恵
論文題目	Covalent modification of endogenous proteins for functional analyses and drug discovery based on <i>N</i> -sulfonyl pyridone chemistry (タンパク質の機能解析と薬剤開発を目的とした <i>N</i> -スルホニルピリドン化学による内在性タンパク質の共有結合修飾)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>タンパク質の機能解析は生命現象の解明に繋がる重要な技術であり、得られた知見は創薬開発においても大いに貢献する。特に近年の低分子化合物を主軸とする創薬研究はシード化合物の枯渇により失速する傾向にあり、アンメットメディカルニーズに応じるための新規標的タンパク質の探索や既存薬の改変により新たな薬効を生み出す試みが繰り返されている。しかし、生細胞に内在的に発現するタンパク質の機能解析を可能にする「タンパク質の標識」は極めて困難である。細胞には多様な生体分子が存在し、その中から発現量の低い標的タンパク質のみを選択的に標識する技術の欠如が大きな要因である。生細胞において迅速かつ選択的なタンパク質標識を可能にする新規技術の開発が急務とされる。本論文は <i>N</i>-スルホニルピリドン (SP) 化学による迅速かつ選択的なタンパク質標識法を開発し、当該手法を生細胞条件下でのタンパク質イメージング及び不可逆阻害剤へ展開した結果をまとめたものであり、3章からなっている。</p> <p>第1章では内在性タンパク質標識の新技术として開発されたリガンド指向性 SP 化学において反応性の異なる 8 種類の誘導体を合成し、量子化学計算により算出された反応性を示すパラメーター (LUMO のエネルギー準位) とタンパク質標識速度の実験値との相関を評価した。具体的には炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase; CA family) を標的としたタンパク質標識において、SP 誘導体の LUMO のエネルギー準位と精製タンパク質 (CA2) および細胞表層タンパク質 (CA12) の標識速度は直線的な相関を示すことを明らかにした。また、最も反応性の高い化合物では数秒以内の標識に成功した。一方、LUMO のエネルギー準位と細胞内タンパク質 (CA2) の標識速度に直線的な相関は認められず、高反応性の化合物は細胞内の求核種による分解のため CA2 の標識効率が低下することを実証した。以上の体系的な評価により、精製タンパク質、細胞表層タンパク質の迅速な標識に適した反応性を LUMO のエネルギー準位を指標に予測できることを示した。これらの知見は新規標識化合物の論理的な設計指針の確立に貢献するものである。</p> <p>第2章では、第1章において見出した SP 誘導体による細胞表層タンパク質の迅速な反応を、前立腺癌マーカーである膜タンパク質 PSMA (prostate-specific membrane antigen) の生細胞系での標識およびエンドサイトーシス挙動観察へと展開した。これまでに PSMA のエンドサイトーシス速度や経路を生細胞で定量的に評価した報告は乏しい。また、従来法では PSMA 認識モチーフと検出用分子を連結させた化合物を PSMA に可逆的に作用させた状態の挙動が観察されていた。これに対し、本研究では検出用の蛍光色素を共有結合で標識することにより、PSMA 認識モチーフが作用しない状態での可視化に成功した。一般的に膜タンパク質のエンドサイトーシス速度は細胞の代謝活性機能の状態に大きく左右される。本手法による迅速な標識の特徴は、標識反応に長時間を要しないため、細胞に対して非侵襲的に標的タンパク質のみを標識できる点である。そこで、本手法により蛍光標識された PSMA のエンドサイトーシス挙動は生細胞の生理的条件に近い状態での PSMA のエンドサイトーシス挙動を反映するもの</p>			

京都大学	博士 (工 学)	氏名	増田 真理恵
<p>として、次のアプリケーション実験を行った。まず、本手法により蛍光標識された PSMA のエンドサイトーシス速度を 37 度 (5%二酸化炭素雰囲気下) または 25 度 (5%二酸化炭素雰囲気下) で観察し、細胞表層 PSMA のエンドサイトーシスの半減期の算出に成功した。また、エンドサイトーシス経路に関して、構造生物学的な知見を基に、PSMA はクラスリン依存的な経路を辿るトランスフェリン受容体と同じ経路を辿ると考えられている。これに対して、同経路でのエンドサイトーシスを阻害するスクロース高浸透圧処置細胞では、本手法により蛍光標識された PSMA のエンドサイトーシス速度の低下が認められた。この結果から、生細胞系での PSMA のエンドサイトーシス経路の同定に成功した。また、PSMA は薬物送達システムの標的タンパク質であることから、蛍光標識された PSMA を用いて細胞内への効率的な薬剤輸送を達成する PSMA 認識リガンドを選定するシステムの構築にも成功し、リガンドのエンドサイトーシス促進効果を評価できることを示した。</p> <p>第 3 章では、癌細胞に発現する葉酸受容体に、SP 化学を用いて内在性アゴニスト葉酸を共有結合修飾することで、細胞増殖を阻害する不可逆阻害剤 (ligand-protein conjugation reagent; LPCR) の開発に成功した。葉酸受容体は癌細胞選択的に過剰発現する細胞膜タンパク質として腫瘍イメージングおよび腫瘍選択的な薬物療法の標的として注目されている。癌細胞の異常な分裂および増殖は葉酸受容体を介した葉酸の取り込みにより起こるため、これまでに細胞内で作用する葉酸代謝拮抗剤が多数開発されている。本研究では、既存薬とは異なり、当初葉酸受容体による葉酸取り込みを直接阻害する不可逆阻害剤の開発を目指した。また、従来の不可逆阻害剤がシステインを反応点とするのに対し、葉酸受容体中のシステインは全てジスルフィド結合を形成し不活性な状態で存在する。そこで本研究ではリジンおよびチロシンを反応点とする SP 化学を不可逆阻害剤の反応基として応用した。LPCR は葉酸受容体を過剰発現する 2 種類の癌細胞において十分な増殖抑制効果を示すことを明らかにした。一方、葉酸が共有結合で連結された葉酸受容体のエンドサイトーシス経路は通常とは異なり、細胞内消化器官リソソームに輸送されて速やかに分解されることを発見した。LPCR は葉酸受容体を介した葉酸取り込み阻害能を有さなかったものの、上記の動態変化を含む複数の作用機序により細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。また、LPCR は葉酸受容体を発現しない細胞では増殖抑制効果を示さず、腫瘍選択性の高い新規化学療法の開発への貢献を期待し得ることを明らかにした。</p>			

氏名	増田 真理恵
----	--------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、*N*-スルホニルピリドン (SP) 化学を用いた生細胞系での迅速かつ選択的なタンパク質修飾法を開発し、それによる新たなアプリケーションを考案した研究成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 内在性タンパク質標識の新技术として開発されたりガンド指向性 SP 化学において反応性の異なる誘導体を合成し、量子化学計算により算出された反応性を示すパラメーター (LUMO のエネルギー準位) とタンパク質標識速度の実験値との相関を評価した。炭酸脱水酵素を標的としたタンパク質標識において、精製タンパク質、細胞表層タンパク質、細胞内タンパク質の 3 条件でのタンパク質標識速度と LUMO のエネルギー準位の相関を体系的に評価することにより、各条件でのタンパク質標識に適した反応性を LUMO のエネルギー準位を指標に予測できることを示した。これにより、新規標識化合物の論理的な設計指針の確立に貢献する知見を得た。
2. 上記の検討において見出した SP 誘導体による細胞表層タンパク質の迅速な反応を、前立腺癌マーカー膜タンパク質 PSMA の生細胞系での標識およびエンドサイトーシス挙動観察に応用した。これまでに PSMA のエンドサイトーシス速度や経路を生細胞で定量的に評価した報告は乏しかった。これに対し、本研究では蛍光色素を PSMA に共有結合で標識することにより、PSMA の生細胞系でのエンドサイトーシス挙動の定量的評価に成功した。
3. 癌細胞に発現する葉酸受容体に、SP 化学を用いて内在性アゴニスト葉酸を共有結合修飾することで、細胞増殖を阻害する不可逆阻害剤 (ligand-protein conjugation reagent; LPCR) の開発に成功した。LPCR は葉酸受容体を過剰発現する癌細胞において十分な増殖抑制効果を示すことを明らかにした。一方、葉酸が共有結合で連結された葉酸受容体のエンドサイトーシス経路は通常とは異なり、細胞内消化器官リソソームに輸送されて速やかに分解されることを新たに発見した。LPCR は当初想定した葉酸受容体を介した葉酸取り込み阻害能を有さなかったものの、上記の動態変化を含む複数の作用機序により細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

本論文は、SP 化学による迅速かつ選択的なタンパク質修飾法の開発を行い、その手法による細胞表層タンパク質の生理的条件下でのエンドサイトーシス挙動の観察および不可逆阻害剤の創成を達成しており、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 30 年 10 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。