

京都大学	博士 (工学)	氏名	上田 毅
論文題目	Development of Covalent Inhibitors and Drug Screening using Ligand-Directed NASA Chemistry		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>合成小分子によるタンパク質の化学修飾 (ラベル化) は、創薬研究に有用な分子ツールを創出できる手法として期待されている。例えば、蛍光色素や阻害剤といった機能性分子を細胞内の標的タンパク質に選択的に導入することができれば、バイオイメージング、バイオセンサーの構築、タンパク質の活性制御など様々な応用が期待される。本論文は、細胞内タンパク質の選択的なラベル化を用いた薬剤スクリーニング系の構築と不可逆阻害剤の開発を行なった結果についてまとめたものであり、4章から構成される。</p> <p>第1章では、リガンド指向性 <i>N</i>-acyl-<i>N</i>-alkyl sulfonamide (NASA) 化学による細胞内タンパク質の選択的なラベル化とその評価を行った。近年、NASA 構造を反応基とするリガンド指向性 NASA 化学が開発され、迅速なタンパク質のラベル化が達成された。しかし細胞環境におけるラベル化の際は、反応速度に加えて標的タンパク質に対する選択性も重要であるが、生細胞における詳細な標的タンパク質選択性の評価は行われていなかった。そこで、分子シャペロンである Heat shock protein 90 (Hsp90) のリガンドの PU-H71 を有する NASA 型ラベル化剤を合成した。そして、このラベル化剤が細胞内在性 Hsp90 を選択的にラベル化可能であることを確認した。また、LC-MS/MS 解析の結果、細胞内 Hsp90 のラベル化部位はリガンド結合サイト近傍に存在する Lys58 であることがわかった。最後に、定量 MS プロテオミクスによるオフターゲットタンパク質の解析を行った。その結果、Hsp90 と Grp94 が NASA 型ラベル化剤のリガンド特異的なターゲット、そして Trifunctional enzyme subunit α、Tubulin-α、ADP/ATP translocase 3 の3つがオフターゲットタンパク質として同定された。以上の結果より、NASA 型ラベル化剤は細胞内のような夾雑な環境下でも高い選択性でラベル化できることが示された。</p> <p>第2章では、Hsp90 の化学修飾法を用いて、生細胞での新しい Hsp90 阻害剤評価系を構築した。Hsp90 はがん治療の創薬標的として注目されているが、細胞内で小分子と Hsp90 の結合を直接評価する方法が乏しいため、新規阻害剤の開発が困難であった。そこで、リガンド指向性 NASA 化学による Hsp90 ラベル化の競合阻害実験を用いて、細胞内で既知の Hsp90 阻害剤の結合活性を評価できるか検討した。その結果、阻害剤濃度依存的にラベル化の阻害が確認でき、EC50 値を指標に Hsp90 阻害剤の結合活性を評価することが可能であった。一方 Hsp90 のアロステリック阻害剤である Gedunin ではラベル化の阻害が見られなかったことから、本手法は Hsp90 の N 末 ATP 結合サイトに結合する化合物を特異的に検出できることが明らかとなった。さらに本手法を薬剤スクリーニングに適用すると、1280 個の化合物を含むライブラリーから Hsp90 に結合する化合物を新たに見出すことに成功した。この結果から、リガンド指向性 NASA 化学によるタンパク質修飾が新しい阻害剤を探索する戦略として有用であることが示された。</p>			

第3章ではリガンド指向性 NASA 化学による Hsp90 のリジン標的型不可逆阻害剤の開発を行った。不可逆阻害剤は標的タンパク質と共有結合を形成することで、強力かつ持続的な阻害効果を発揮する利点がある。近年標的タンパク質と特異的に反応できるように緻密に分子デザインされた新しいタイプの不可逆阻害剤が盛んに開発されている。現在、不可逆阻害剤のほとんどがマイケルアクセプター型の反応基を用いて求核性の高いシステイン残基を標的として設計されている。しかし、リガンド結合サイト近傍に利用可能なシステインがない場合、不可逆阻害剤の開発は非常に困難である。この問題を克服するには、システイン以外のアミノ酸残基を標的にすることが求められる。そこで、第1章で得られた知見を基にリンカー構造を合理的に設計し、Hsp90 のリガンドに NASA 反応基を連結した不可逆阻害剤を合成した。精製 Hsp90 を用いた評価から、不可逆阻害剤は NASA 型ラベル化剤と同じ Hsp90 のリガンド結合サイト近傍の Lys58 と反応することがわかった。次に不可逆阻害剤を乳がん細胞 SKBR3 に作用させたところ、不可逆阻害剤は可逆阻害剤 PU-H71 と比べ強い増殖抑制効果を示した。この原因を確かめるために、Hsp90 によって安定化されるタンパク質 (HER2, cRaf, Akt, pAkt など) の発現量をウェスタンブロッティングにより評価すると、不可逆阻害剤を処置した細胞ではこれらタンパク質が顕著に不安定化されていることがわかった。一方、可逆阻害剤 PU-H71 は Hsp90 を長時間阻害することができないため、これらタンパク質はほとんど減少しなかった。以上の結果から、不可逆阻害剤は細胞内 Hsp90 に対して不可逆的な阻害活性を示すことがわかった。そして NASA 反応基が不可逆阻害剤の反応基として利用可能であることが実証された。また、NASA 反応基はリジン残基と反応する特徴を有するため、従来のマイケルアクセプター型反応基では標的にすることが難しかったタンパク質に対しても不可逆阻害剤開発が可能になると期待される。

第4章ではタンパク質間相互作用 (PPI) の不可逆阻害剤開発を行った。PPI は生命現象において重要な役割を担っており、疾患の発症とも深く関わっている。そのため PPI は不可逆阻害剤の標的としても近年注目されている。しかし、マイケルアクセプターのような従来の反応基を有する不可逆阻害剤の標的となるシステイン残基が PPI 表面に少ないため、その開発例は極端に少ない。そこで NASA 反応基を用いて MDM2 と p53 の相互作用を阻害する不可逆阻害剤の開発を試みた。試験管中で不可逆阻害剤と精製 MDM2 を混合すると、反応開始 4 時間で不可逆阻害剤が 1 分子付加したプロダクトが収率 88% で得られた。また、修飾部位解析の結果、N 末端アミノ基と Tyr68 に反応が進行していることがわかった。続いて、細胞レベルでの不可逆阻害活性を評価した。細胞内で MDM2 は p53 を分解して発現量を低く保っているが、相互作用を阻害すると p53 の蓄積が起きる。実際に骨肉腫細胞の SJSA1 細胞に不可逆阻害剤を作用させると、可逆阻害剤 Nutlin3 に比べて長時間 p53 を蓄積させることがわかった。最後に、p53 の蓄積により細胞死が誘導されるか評価した。その結果、Nutlin3 は SJSA1 細胞の生存率に影響を与えなかったが、不可逆阻害剤は強い増殖抑制効果を示した。以上の結果より、不可逆阻害が PPI の阻害に効果的であることが実証された。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞内タンパク質の選択的な化学修飾を用いた薬剤スクリーニング系の構築と不可逆阻害剤の開発を行なった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. リガンド指向性 NASA 化学による細胞内 Hsp90 の選択的なラベル化とその評価を行った。分子シャペロンである Hsp90 に対する NASA 型ラベル化剤を合成し、定量プロテオミクスによりオフターゲット蛋白質の解析を行った。その結果 NASA 型ラベル化剤は内在性 Hsp90 を高選択的にラベル化できることが明らかとなった。
2. Hsp90 の化学修飾法を用いて、生細胞での新しい Hsp90 阻害剤評価系を構築した。本手法ではリガンド指向性 NASA 化学による Hsp90 ラベル化反応の競合阻害実験を用いて、細胞内で既知の Hsp90 阻害剤の結合活性の評価が可能であった。さらに、本手法を薬剤スクリーニングに適用し、Hsp90 に結合する化合物を新たに見出すことに成功した。
3. リガンド指向性 NASA 化学による Hsp90 のリジン標的型不可逆阻害剤の開発を行った。第 1 章の知見を基に新たに合成した不可逆阻害剤は、NASA 型ラベル化剤と同じ Hsp90 のリガンド結合サイト近傍の Lys58 と反応することがわかった。また、不可逆阻害剤は乳がん細胞 SKBR3 細胞に対して可逆阻害剤に比べ、低濃度で持続的な阻害効果を示した。
4. MDM2 と p53 のタンパク質間相互作用を阻害する不可逆阻害剤の開発を行った。NASA 反応基を用いて新たに合成した不可逆阻害剤は可逆阻害剤と比べて、MDM2 と p53 の相互作用を持続的に阻害し、骨肉腫細胞 SJSA1 細胞の増殖を強く抑制することに成功した。

本論文は上記の通り、細胞内在性タンパク質の選択的な化学修飾およびそれを利用した薬剤スクリーニング系の構築と不可逆阻害剤開発を行っており、学術上、實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、令和 2 年 1 月 18 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。