

京都大学	博士 (総合学術)	氏名	周 敬棠
論文題目	Application of Mirror-image Screening Technology by Expansion of Bioassay Systems and Chiral Resources		
(論文内容の要旨)			
<p>天然物の鏡像体は、天然物と同等の物理化学的特性を有するため、創薬リソースとしての有用性が期待される。しかし、天然物鏡像体は天然および化学合成による供給が困難であるため、その有用性については十分な評価が実施されなかった。そこで著者らの所属グループでは D-タンパク質を化学合成し、これに対して手持ちの天然物ライブラリーを評価することで、仮想的に天然物鏡像体のスクリーニングができることを実証した。本戦略の適応拡大と応用を図るだけでなく、未開拓領域を網羅的に探索し数多くの創薬シーズを取得することを目的に、著者は以下の 2 章からなる検討を実施した。</p>			
<p>第1章 ミラーイメージスクリーニングの応用</p>			
<p>ミラーイメージスクリーニングの適応範囲拡大と天然物鏡像体からの新規医薬品候補同定を目的に、腫瘍制御に係る二つのタンパク質を標的として選択し化学合成を実施した。</p>			
<p>第1節 Src SH2 ドメインの化学合成およびミラーイメージスクリーニングへの応用</p>			
<p>チロシンキナーゼ c-Src が有する SH2 ドメイン (Src¹⁴⁵⁻²⁵¹) の化学合成を実施した。2つのペプチドフラグメント (Src¹⁴⁵⁻¹⁸⁷ 及び Src¹⁸⁸⁻²⁵¹) を Fmoc 固相合成法により構築した。続いて、native chemical ligation 法を用いて Cys¹⁸⁸ 位で両フラグメントを連結することで、Src¹⁴⁵⁻²⁵¹ を純度よく得た。次に、得られたタンパク質はグアニジン塩酸水溶液で溶解・変性させた後、還元条件下での透析によりフォールディングさせた。L-Src¹⁴⁵⁻²⁵¹ 及び D-Src¹⁴⁵⁻²⁵¹ は、その認識配列であるリン酸化チロシン含有ペプチドの L-及び D-エナンチオマーとの高い結合親和性を有していた。得られた Src¹⁴⁵⁻²⁵¹ を用いて、阻害剤の探索に利用する生物活性評価系を構築した。蛍光偏光法、ELISA 法、SPR 法を用いたいずれの系においても、リン酸化チロシン含有ペプチドをプローブとして Src¹⁴⁵⁻²⁵¹ の結合を検出し、阻害剤による結合阻害活性を良好な感度で測定可能であった。そして、理化学研究所が保有する 22,097 化合物を対象として、化合物アレイ解析と ELISA 法を用いた評価を行った結果、Src SH2 ドメイン阻害活性を示す複数の化合物を同定した。</p>			
<p>第2節 ミラーイメージスクリーニングに向けた XIAP BIR3 ドメインの化学合成</p>			
<p>アポトーシス抑制能を持つ XIAP が有する BIR3 ドメイン (XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶) を標的として選択した。本標的はドメイン内で複数の Cys を保存していることから、保存されているアミノ酸 (Ala263, Cys300, Cys327) を連結点として選択した。native chemical ligation 法を用いて 4 フラグメントを連結することで XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ を純度よく得た。次に、得られたタンパク質を尿素水溶液で溶解・変性させた後、還元条件下での透析によりフォールディングさせた。フォールディングしたタンパク質は L 体 D 体ともに、その認識配列であるペプチドの立体異性体を厳密に識別した。第 1 節と同様に、得られた化学合成タンパク質を用いて、阻害剤の探索に利用する生物活性評価系を構築した。蛍光偏光法、ELISA 法、SPR 法を用いたいずれの系においても、リガンドペプチドと XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ の結合を検出し、阻害剤による結合阻害活性を測定可能であった。また、理化学研究所が保有する 22,097 化合物について化合物アレイ解析を行い、L-もしくは D-タンパク質への結合活性を示す 579 化合物を同定した。このうち 53 化合物は分子内にキラリティーを有し、D-タンパク質選択的な結合活性を示した。</p>			

第 2 章 有機触媒を鍵とする DNA に穏和なアルドール反応を活用した、固相上でのβ-ヒドロキシケトンの合成

ミラーイメージスクリーニングに適応するキラルリソースの拡充を目的に、固相上での反応ツールの開発を実施した。近年 OBOC ライブラリー上の化合物情報を DNA にコードすることで、大幅なスループットの向上が達成された (MacConnell, A. B., MaEnaney, P. J., Cavett, V. J., and Paegel, B. M. ACS. Combi. Sci. 17, 518, 2015)。しかし本手法では DNA タグ存在下でライブラリー化合物を構築する必要がある。DNA タグが化学的処理の度にダメージを蓄積し、後々の化合物情報の読み取りエラーにつながるものが本戦略の大きなボトルネックであった。プロリン触媒を用いた穏和なアルドール反応であれば DNA にダメージを与えずかつ固相上で不斉点を有する C-C 結合を形成できると考えた。プロリン触媒を利用したアルドール反応を固相上で検討したところ、DMSO 溶媒条件下室温 16 時間で反応が完結した。また、本反応はアクセプター側のアルデヒドやドナー側のケトンについても幅広く許容した。さらなるビルディングブロック連結を見据え、アルドール化合物に対して光延反応を行うことでアジド化合物を固相上で得ることに成功した。プロリン触媒を用いたアルドール反応や光延反応はいずれも DNA に対するダメージはわずかであったことから、本反応は DNA-encoded OBOC ライブラリー構築において有効な反応手法になることを実証した。

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、創薬リソースとしての有用性が期待されながら、化学合成が困難で十分な研究がなされていなかった天然物の鏡像体に着目し、D-タンパク質を化学合成して、これに対して天然物ライブラリーを評価することで、仮想的に天然物鏡像体のスクリーニングができることを実証するとともに、アルドール反応を活用した固相上での β -ヒドロキシケトンの合成に成功した。

以下、本論文で述べた本研究の成果を3つ掲げる。

第1に、腫瘍制御に係る Src タンパク質の SH2 ドメインを化学合成し、阻害剤の探索に利用する生物活性評価系を構築した。蛍光偏光法、ELISA 法、SPR 法を用いて、Src SH2 ドメインのリン酸化チロシン含有ペプチドへの結合を検出し、阻害剤による結合阻害活性を測定することができた。また、理化学研究所が保有する 22,097 化合物を対象としたスクリーニングを行い、L 体もしくは D 体の Src SH2 ドメインに対して結合阻害活性を有する化合物を同定した。

第2に、native chemical ligation 法を用いて4フラグメントを連結して XIAP BIR3 ドメインを化学合成する方法を確立した。得られたタンパク質をフォールディングさせた後、リガンドペプチドとの結合活性を評価し、リガンドペプチドの立体異性体を厳密に識別することを確認した。さらに、理化学研究所が保有する 22,097 化合物について化合物アレイを用いたスクリーニングを行い、L-もしくはD-タンパク質への結合親和活性を示す 579 化合物を同定した。

第3に、有機触媒を鍵とする DNA に穏和なアルドール反応を活用した固相上での β -ヒドロキシケトンの合成を実施した。DMSO 溶媒条件下において室温 16 時間で反応が完結するとともに、本反応はアクセプター側のアルデヒドやドナー側のケトンについても成立することを見出した。さらに、アルドール化合物に対して光延反応を行うことでアジド化合物を固相上で得ることができた。プロリン触媒を用いたアルドール反応や光延反応はいずれも DNA に対するダメージはわずかであったことから、DNA-encoded OBOC ライブラリー構築において有効な反応手法になることを実証した。

以上述べたように、3つの大きな成果により、本論文は博士(総合学術)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月8日、論文内容とそれに関連した事項について試問した結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 平成 年 月 日以降