

京都大学	博士（工学）	氏名	河野 正晴
論文題目	Development of <i>N</i> -acyl- <i>N</i> -aryl sulfonamide warheads for covalent protein modification and inhibition (蛋白質の化学修飾および不可逆阻害を目的とした ArNASA 反応基の開発)		
（論文内容の要旨） 蛋白質は生命活動を担う主要な生体高分子であり、蛋白質を特異的に化学修飾できる手法は生命現象の理解、創薬研究に有用である。例えば、蛍光色素や阻害剤といった機能性分子を標的蛋白質に特異的に導入できれば、蛋白質機能の解析や人工制御が可能となる。申請者は博士課程研究において、細胞内およびマウス個体内の蛋白質を選択的に化学修飾する手法を開発し、標的蛋白質の不可逆阻害、機能化に成功した。本論文はこれらの研究結果についてまとめたものであり、序論及び本論（三章）から構成される。以下にその概要を示す。 （第一章） 不可逆阻害剤は標的蛋白質に対するリガンドと求電子性反応基から構成される化合物であり、共有結合を介して標的蛋白質の機能を半永久的に阻害する。従来開発されている不可逆阻害剤のほとんどは求核性の高いシステイン側鎖のチオールと反応するように設計されているが、蛋白質におけるシステインの割合は少なく、システイン以外の求核性アミノ酸残基を標的とできる反応基開発が求められている。側鎖にアミノ基を有するリジン残基は蛋白質表面に豊富に存在するため、不可逆阻害剤が標的とする反応点として有望と考えられている。一方、これまでに開発されているリジン標的型反応基は生体内安定性や反応速度に課題が存在した。そこで申請者は、<i>N</i>-acyl-<i>N</i>-aryl sulfonamide (ArNASA)骨格をもとに、新たなリジン標的型反応基の開発を行った。HSP90 をモデル蛋白質とし、ArNASA 骨格を有する種々の不可逆阻害剤を合成、評価した。その結果、一部の ArNASA 化合物は既存のリジン標的型反応基と同等もしくはそれ以上の不可逆阻害反応速度を示す一方で、優れた加水分解耐性を有することが明らかとなった。最適化された ArNASA 型不可逆阻害剤は、血清存在下で細胞内在性 HSP90 のシャペロン活性を不可逆的に阻害できることが実証された。 （第二章） Bruton's tyrosine kinase (BTK)は B 細胞受容体からのシグナルを伝達する細胞質チロシンキナーゼであり、B 細胞性のがんや免疫疾患などに関連している。BTK 不可逆阻害剤である Ibrutinib は、BTK の 481 番目のシステイン(C481)と反応することで強力な阻害活性を示し、慢性リンパ性白血病(CLL)の治療薬として用いられている。ところが近年、C481 がセリンに変異した BTK 変異体(BTK-C481S)が Ibrutinib 耐性を獲得することが明らかとなり、CLL 治療における大きな課題となっている。本章において申請者は、第 1 章で開発した ArNASA 化学を用いて BTK-C481S 変異体を標的とした不可逆			

阻害剤の開発を行った。具体的には、BTK のリガンド結合部位近傍のリジンを標的とした ArNASA 型不可逆阻害剤を複数設計・合成し、これらを BTK-C481S 発現細胞に処置した。その結果、これら阻害剤は細胞内 BTK-C481S と選択的に共有結合を形成し、そのキナーゼ活性を不可逆的に阻害することを明らかにした。

(第三章)

我々の研究室では、リガンド指向性化学と呼ばれるトレースレス蛋白質ラベル化法を開発している。リガンド指向性化学で用いられるラベル化剤は、蛋白質に対するリガンド、脱離型の反応基およびプローブ(蛍光色素等)から構成される。ラベル化剤と標的蛋白質が反応し、プローブが蛋白質に修飾されると同時にリガンド部が脱離するため、蛋白質本来の活性を保ったままラベル化することが可能である。これまで、リガンド指向性化学を用いてマウス脳内や赤血球内の蛋白質ラベル化に成功しているが、それ以外の組織におけるラベル化は困難とされていた。本章では、ArNASA 基をリガンド指向性化学へと適用し、Integrin $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ を標的蛋白質としたラベル化剤の開発を行った。特筆すべきことに、構造最適化した ArNASA 型ラベル化剤は培養細胞だけではなく、担がんマウスの腫瘍組織および肺に発現する内在性 Integrin $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ を選択的に蛍光標識可能であった。同様に Integrin $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ を標的とした ArNASA 不可逆阻害剤の開発を行った。この ArNASA 化合物は担がんマウスの腫瘍組織における Integrin $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ の RGD peptide リガンドへの結合を不可逆的に阻害できることが実証された。これらの結果から申請者は、ArNASA 基が動物個体内における内在性蛋白質の選択的化学修飾に利用可能な高い生体適合性を有することを実証した。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、培養細胞および生きたマウス個体内において、蛋白質を選択的に化学修飾するための新たな有機化学反応の開発と、これを応用した蛋白質の不可逆阻害剤およびラベル化剤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. 蛋白質上のリジン残基におけるアミノ基と反応可能な *N*-acyl-*N*-aryl sulfonamide (ArNASA) 反応基を開発した。Aryl 基として多様なベンゼン環およびピリジン環を導入した ArNASA 化合物のライブラリーを合成し、求電子反応性と標的蛋白質反応性を評価した。その結果、ArNASA 化合物は既存のリジン標的型反応基と比較して優れた安定性を示す一方で、標的蛋白質に対する高い修飾活性を示すことが実証された。
2. リジンと反応可能な ArNASA 基の特性を利用して、既存のシステイン標的型不可逆阻害剤への薬剤耐性を獲得した Bruton's tyrosine kinase (BTK) C481S 変異体に対する不可逆阻害剤を開発した。ArNASA 型不可逆阻害剤を BTK-C481S 発現細胞に処置した結果、ArNASA 化合物は細胞内 BTK-C481S と選択的に共有結合を形成し、そのキナーゼ活性を不可逆的に阻害することが実証された。
3. Integrin α v β 3/ α v β 5 に対して、選択的に蛍光色素を化学修飾する ArNASA 型ラベル化剤の開発を行った。このラベル化剤を用いることで培養細胞系だけでなく、生きたマウス個体の腫瘍内における Integrin α v β 3/ α v β 5 の蛍光ラベル化に成功した。Integrin α v β 3/ α v β 5 に対する ArNASA 型不可逆阻害剤を開発し、マウス個体内の Integrin におけるリガンド結合の不可逆的な阻害に成功した。

本論文は、細胞内および生体内といった複雑系で蛋白質を化学修飾するための求電子性反応基の開発に取り組んだものであり、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 7 年 2 月 21 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。