

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	池内秀幸
論文題目	Studies on Human Asparagine Synthetase Inhibitors (ヒトアスパラギン合成酵素阻害剤に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
現在、急性リンパ性白血病（ALL）の化学療法剤の第一選択薬として L-アスパラギナーゼ（ASNase）がある。これは、細胞増殖に必要な血中のAsn 濃度を下げることで腫瘍細胞の増殖を抑制するユニークな化学療法剤である。しかし、ASNase 耐性を獲得した腫瘍細胞には効果が低く、再発率が高い。事実、成人ALLの長期生存率は30~40%であり、その原因として、腫瘍細胞によるヒトアスパラギン合成酵素（hASNS）の高発現および誘導が指摘されている。したがって、hASNS の特異的阻害剤は、腫瘍細胞の Asn生合成を阻止することで、ALLのアスパラギナーゼ療法に対する耐性を打破できると同時に、hASNS 活性とASNase 耐性あるいは制ガン作用との因果関係を<i>in vivo</i>レベルで明らかにする化学プローブとしても活用できることが期待される。また、ガンの悪性度とhASNS 活性には正の相関が指摘されていることから、hASNSの阻害が悪性度の高いガン種の効果的な化学療法ともなりうる。そこで、本研究では、hASNS の反応機構にもとづいた遷移状態アナログ阻害剤の合成研究を行った。その主な内容は以下のように要約される。 1. 本酵素反応の遷移状態に基づいて開発されたアデニル化スルホキシミン型阻害剤 1 は、<i>in vitro</i> でhASNSを強く阻害するが（$K_i^* = 24 \text{ nM}$）、白血病細胞の増殖阻害活性は十分でない（$\text{IC}_{50} = 1 \text{ mM}$）。これは、リン酸基等の親水性基が細胞内への透過性にとって不利に作用したためと考え、1 のアデノシン 5'-リン酸基をスルファミド基、スルファメート基に置換した化合物 3、4 をそれぞれ設計・合成した。しかしそれらの hASNS 阻害活性は著しく低下し、hASNS と阻害剤との相互作用においては 5'-リン酸基の負電荷が重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、唯一、X線結晶構造の判明している大腸菌 ASNS-Bとのドッキングモデルを作成したところ、5'-リン酸基は、さまざまな生物種における同酵素で高度に保存されているLys残基（hASNS ではLys466）と静電的に強く相互作用していることを明らかにした。また、スルホキシミンの合成において、スルホキシドとスルファミドを用いたロジウム触媒による酸化的イミノ化を収率良く進行させることに成功し、スルホキシミン型阻害剤の網羅的合成に道を開いた。 2. 阻害剤 1 の細胞膜透過性を向上させるとともに、α-カルボキシ基、アミノ基の認識を調べるため、アミノ-およびカルボキシスルホキシミン 5 および 6 をそれぞれ合成し、hASNSに対する阻害活性を測定した。両化合物のうち、アミノ			

スルホキシミン **5** がとりわけ高い阻害活性を示した ($K_i^* = 7.6 \text{ nM}$) のに対し、アミノ基を欠くカルボキシスルホキシミン **6** の阻害活性は **1** に比べ 1/6 程度に低下した ($K_i^* = 141 \text{ nM}$) ことから、阻害剤の α -アミノ基はhASNSとの相互作用に重要な役割を果たしているが、 α -カルボキシ基は必ずしも重要でないことが明らかになった。強力な阻害活性を示した化合物 **5** について、アスパラギナーゼ耐性を獲得した腫瘍細胞に対する細胞増殖阻害試験を行ったところ、細胞増殖阻害活性は $IC_{50} = 0.1 \text{ mM}$ であり、阻害剤 **1** を大きく上回った。これは、分子内のアミノ基と 5'-リン酸基が双性イオンを形成し、分子全体の電荷が相殺されるため、阻害剤 **1** よりも細胞膜透過性が向上した結果であると考察している。また、化合物 **5** には、アスパラギナーゼ投与の有無に関わらず腫瘍細胞の細胞死を引き起こす活性があることを見だし、hASNS がガン化学療法の新規標的となりうることを示した。

3. hASNSの阻害剤にはアデノシン 5'-リン酸基の負電荷が必須であるが、同時に、その実用化には細胞内への透過性を上げる工夫が必要である。そこで、5'-リン酸基のミミックとして、 $pK_a = 5$ 付近に酸解離平衡を持つNHプロトンの解離によって負電荷を生じる *N*-アシルスルファミド **7**、**8** を設計・合成し、hASNSに対する阻害活性を測定した。化合物 **7**、**8** 自体には活性はなかったが、**7**、**8** の分解産物に強い阻害活性を見だし ($K_i^* = 42 \text{ nM}$)、その分解産物の構造決定を行った。その結果、候補化合物として、6員環の新規スルホキシミンを見だし、hASNS阻害剤の分子設計に新たな知見をもたらした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、急性リンパ性白血病 (ALL) の化学治療において再発の原因となるヒトのアスパラギン合成酵素 (hASNS) の阻害剤を設計・合成し、hASNS およびアスパラギナーゼ耐性白血病細胞に対して酵素活性阻害および増殖阻害活性の評価を行ったものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. 阻害剤のアデノシン 5'-リン酸基の負電荷と ASNS で高度に保存されている Lys 残基の側鎖との静電的相互作用が、酵素—阻害剤複合体形成にとって重要であり、hASNS 阻害剤を設計する上で、分子内に 5'-リン酸基に相当する負電荷を組み込むことが必須であることを明らかにした。
2. スルホキシミンの合成において、スルホキシドとスルファミドを用いたロジウム触媒による酸化的イミノ化を収率良く進行させることに成功し、スルホキシミンの効率的合成法を確立した。
3. hASNS 阻害剤の活性向上に重要な構造的要因を明らかにし、 K_i^* 値が 8 nM に達するきわめて強い酵素阻害活性と、高い細胞増殖阻害活性をもつ化合物を合成することに成功した。
4. hASNS 阻害がアスパラギナーゼ投与の有無に関わらず、白血病細胞の細胞死を引き起こすことを初めて見だし、hASNS が白血病およびそれに関連したガン種の化学療法の新しい標的になりうることを示した。
5. リン酸基のミミックとなりうる *N*-アシルスルファミド型の新規阻害剤を設計・合成し、目標化合物の分解産物に強い阻害活性を見いだした。さらに、その活性本体を、6 員環構造を有する新規スルホキシイミンと推定し、hASNS 阻害剤の分子設計に新たな知見をもたらした。

以上のように、本論文は、細胞膜透過性を加味した hASNS 阻害剤の分子設計に新たな知見をもたらすとともに、hASNS 阻害が白血病細胞の細胞死を引き起こすことを初めて明らかにし、hASNS が白血病ならびにガン化学療法の新しい標的になりうることを示したものである。この成果は、有機化学、生物化学、生理活性化学、創薬化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 24 年 3 月 8 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降