

## 論文の内容の要旨

論文題目 迅速かつ高精度なキナーゼ活性測定法の構築と  
High-Throughput Screeningにおける有用性の実証

氏名 丸木 理世 (戸籍名: 今村 理世)

### 【序論】

High-throughput screening (HTS)とは、「高度にシステム化された方法により短期間に大量の化合物を評価して、目的にあった生理活性化合物を迅速に見出すこと」であり、新薬創出を目指す製薬企業にとって、なくてはならない基盤技術となっている。一般的な HTS の 1 次スクリーニングでは、ヒット取得の確率を上げるためできるだけ多くの化合物を N=1 で効率的に、かつ取りこぼしなく評価する必要があり、そのためにはマイクロプレート内で再現性良く高精度に評価可能なアッセイ系を構築することが重要である。本研究では、まずは実施例をもとに HTS に適したアッセイ系のポイントとその課題について考察し、解決策の一つとして、迅速かつ高精度な新規キナーゼ活性測定法を構築した。また実際に 21 万化合物の HTS を実施し、その有用性を検証した。

### 【本論】

#### 1. HTSに適したアッセイ系のポイントとその課題

実際に行った例として、転写因子 FoxO1 の阻害剤の探索のためのアッセイ系と、Keap1-p62 蛋白質間相互作用の阻害剤探索のためのアッセイ系を例に挙げて、適したアッセイ系のポイントとその課題について考察した。一般的なアッセイ法は、操作が複雑で行程数が多く、マイクロプレート内処理が困難、もしくはスピードを上げると精度が犠牲になってしまうが、HTS では効率よく、かつ高い精度でアッセイをする必要があり、そのためには、ステップ数の少ない、かつ操作が簡単なアッセイ系を構築する必要がある。これに対し、独自に工夫された HTS 用のアッセイキットが多数販売されているが、特許や企業秘密により自作ができず、コストがかかることが一番の問題であり、評価するサンプル数が限られる(ヒット化合物を得る可能性が低下してしまう)ことが危惧される。またアッセイ系には各々系特有の偽陽性が存在するため、特に多い場合は早い段階で効率的に排除しておかないと、最終的にヒットを取りこぼしてしまう可能性がある。

#### 2. 新規キナーゼ活性測定法の構築

前述の現状を踏まえ私は、以前創薬機構において開発された、簡便かつ低価格でアッセイ可能な糖転移酵素活性測定法を、もう少し広い範囲で応用できないかと考え、2 段階目の ADP 変換カップリング反応を利用して、より創薬ターゲットとして注目されているプロテインキナーゼの新規活性測定法を構築した。アッセイ法の模式図

を図表1に示す。実際のプロトコールは、マイクロプレート内でキナーゼ反応を行ったあと、そこへ検出試薬の混合液を等量添加するだけで 30 分後には測定可能であり、簡便かつ迅速にキナーゼ活性を測定できる。検出液は市販の試薬で自作できるため、1well にかかる金額が 1-2 円程度と、従来のキットを利用した場合に比べて 1/10 以下で HTS が可能である。

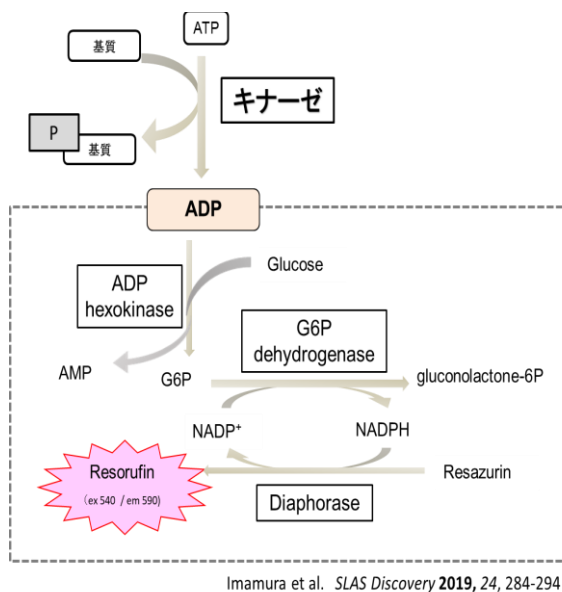
この酵素カップリング反応で ADP 検量線を定量したところ、ADP 1  $\mu$  M から数十  $\mu$  M までリニアな関係で検出でき、検出感度としても問題ないことや室温でも長時間シグナルが安定であることが示された。一方懸念点としては、検出系にキナーゼを含む 3 種類の酵素を使用しているため、そこを阻害する化合物が偽陽性として多数ヒットしてくる可能性があり、実際スタウロスポリンは検出反応自体を強く阻害することが判明した。つまり、本方法を用いてキナーゼ阻害剤探索を行った際、得られるヒット化合物は、(①実際に目的のキナーゼを阻害する化合物+②検出系を阻害する化合物)であり、最終的に狙った作用をもつヒット化合物を得るためには、ヒット化合物から効率的に②を除く必要がある。そのためには、キナーゼ非存在下で ADP を検出するリファレンスアッセイを行い、そのヒット化合物を②として除外すればよいと考えた。

この新しく構築したキナーゼ活性測定法(ADP 蛍光法)について、現在広くキナーゼ HTS に使用されている ADP-Glo 法(ADP 発光法)との比較を行った。ADP 発光法では検出に 2 工程必要で時間もかかるのに対し、本方法は 1 行程で、簡便かつ迅速にアッセイ可能である。また 6 つのキナーゼ阻害剤について、両者で検出して結果を比較したところ、ほぼ同一の IC<sub>50</sub> 値が得られたことから、ADP 発光法と ADP 蛍光法でほぼ同じ阻害活性の結果が得られることが示された。また、両者で 384 穴プレートでアッセイした際のバラツキも比較したところ、Z prime 値(アッセイ系のばらつきを考慮した指標。1.0 に近いほど良い。)が ADP 発光法では 0.80 なのに対し、ADP 蛍光法では 0.85 と従来法より高い精度でアッセイ可能であることが示された。

実際に 1280 化合物を N=1 で ADP 蛍光法と発光法で評価したところ、両者で活性を示す共通ヒットと各測定法でのみ活性を示す固有のヒットが得られた。N=4 で再現性を確認したところ、ADP 発光法固有のヒットでは再現性が見られなかったのに対し、ADP 蛍光法のヒットは再現性が確認され、またキナーゼ非存在下(ADP 存在下)でも、ほぼ同様に阻害活性を示したため、ADP の検出系を阻害している化合物がヒットしていることが示唆された。

以上を踏まえ、この新規キナーゼ活性測定法により実際に大規模な HTS が迅速かつ高精度に実施可能かどうか、また検出系を阻害する偽陽性がどの程度ヒットし、それらをきちんと除けるかどうか、つまりは HTS プラットフォームとして有用かどうかを検証するため、本方法を用いて創薬機構の約 21 万化合物について、実際にキナー

図表 1 新規キナーゼ活性測定法の模式図



Imamura et al. SLAS Discovery 2019, 24, 284-294

ゼ阻害剤探索の HTS を実施することとした。

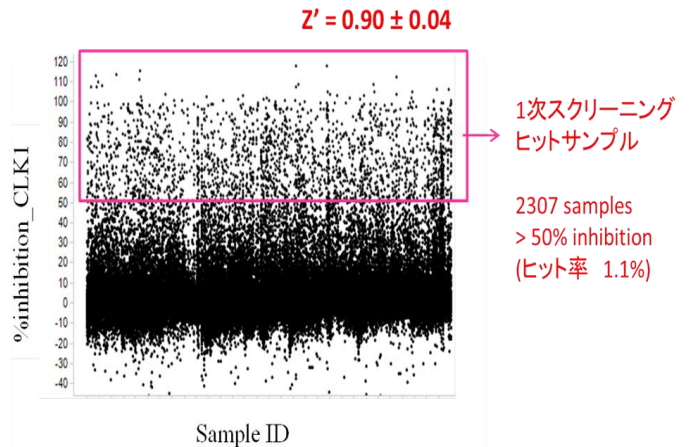
### 3. 新規キナーゼ活性測定法を用いたキナーゼ HTS 実施結果

キナーゼ HTS を実施するに当たり、MAPK と同じ CMGC グループに属し、典型的なキナーゼドメインを持つ CDC2-like kinase1(CLK1)の阻害剤を探索することとした。アッセイ系構築のため、条件検討を行い、最適な CLK1 濃度を 250 ng/ml とし、その濃度において反応がリニアで十分にシグナル強度がとれる反応時間として 2 時間が最適であると判断した。HTS の 1 次スクリーニングでは、約 21 万化合物を 1 プレートに 320 化合物ずつ分注し、試薬の添加には微量分注装置を使用し、30-60 プレート(1-2 万化合物)を 1 回として合計 13 回のアッセイを約 2 週間で終了した。各プレート内で high control(0% inhibition) 値と low control(100% inhibition) 値を元に全化合物の阻害率を計算し、1 つにまとめたプロットを図表 2 に示す。合計 675 プレートの Z prime の平均値は 0.90 と非常に高く、精度よく HTS が実施できた。クライテリア 50%以上の阻害活性を示した 2307 サンプルについて再現性試験を行い、一部を除いて再現性良く CLK1 阻害活性を示すことを確認した。同時に、本方法の懸念点である偽陽性の発生頻度を調べるため、リファレンスアッセイとして、CLK1 の代わりに ADP 10uM 存在下で同様に HTS を行った。その結果、こちらも Z prime=0.88 と精度よく HTS が実施され、50%以上の阻害活性を示したサンプルは 124 個、全体の 0.06%となった(CLK1 ヒット化合物 2307 の約 5%に相当。)

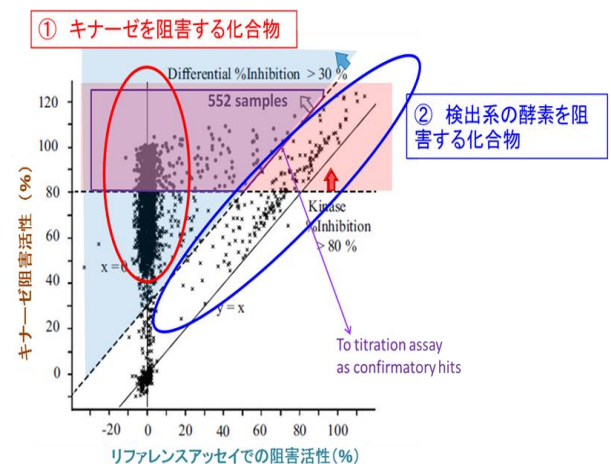
HTS ヒットからこの偽陽性ヒットを除くため、図表 3 に示す通り、再現性試験におけるキナーゼ阻害活性を縦軸、リファレンスアッセイの阻害活性を横軸でプロットし、x=0 付近が①キナーゼのみを阻害する真のヒット、y=x 付近が②検出系を阻害する偽陽性ヒットであるとし、①から②を除くため x と y の差が 30%以上あるもので、かつキナーゼ阻害活性の高い 552 化合物を、再現性試験のヒットとした。そこから構造等も考慮して 414 化合物に絞り込んだのち、濃度依存性を確認し、最終的に IC<sub>50</sub> が 100 nM 以下となった活性の強いヒット化合物 12 個を得ることができた

図表 2 CLK1 キナーゼ HTS 結果

評価サンプル: DDIライブラリー 計 214106 サンプル  
サンプル評価濃度: 10 μM



図表 3 偽陽性の排除について



キナーゼ阻害活性(%) - リファレンスアッセイでの阻害活性(%) > 30%

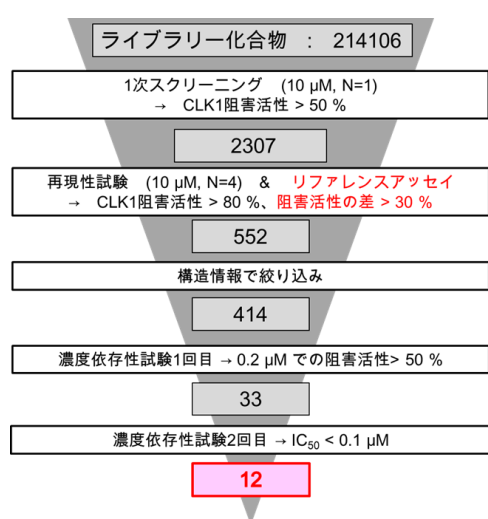
かつ

キナーゼ阻害活性(%) > 80%

の552化合物(図中の紫色)をヒット化合物として選択した

(図表 4)。それらヒット化合物の容量作用曲線を確認すると、リファレンスアッセイはほぼ阻害せず CLK1 阻害活性のみ強く示していることから、効率よく偽陽性を除き、強い CLK1 阻害活性をもつヒット化合物を選択できたことがわかる。この 12 個のヒット化合物の構造式をよく見ると、DDI001 と DDI004 は共通骨格を持っており、新規の CLK1 阻害活性を有する母核である事が示唆された。そこで、濃度依存性試験を行った 414 化合物の構造式を改めて調べると、その中にも同じ共通骨格をもつ化合物が存在することが判明したため、本 HTS により強い CLK1 阻害活性をもつ新規母格を見つけることに成功したと考えた。さらにヒット化合物のキナーゼ特異性を検証するため、類似の別の3キナーゼについても同様に本キナーゼ活性測定法を用いて評価することができた。

図表 4 HTS フローチャートと最終的なヒット 12 化合物 (IC<sub>50</sub> < 0.1 μM) の構造式



Comp Name	Structure	IC <sub>50</sub> (nM)	Comp Name	Structure	IC <sub>50</sub> (nM)
DDI001		17 ± 4	DDI007		54 ± 12
DDI002 (PHA 767491)		35 ± 9	DDI008 (RO-3306)		63 ± 27
DDI003		40 ± 9	DDI009		73 ± 11
DDI004		48 ± 13	DDI010		73 ± 10
DDI005		51 ± 19	DDI011		84 ± 25
DDI006 (BAY 61-3606)		51 ± 20	DDI012		86 ± 20

### 【総括】

HTSのためのアッセイ系を構築するにあたり大事なことは、コンセプトにあった、高精度な系を構築すると同時に、費用もできるだけ抑えて、より多くの化合物を評価できるアッセイ系を構築することである。今回私は、まさにその目的にあう、迅速かつ高精度にしかも低価格でアッセイできる、新規キナーゼ活性測定法を開発した。また実際に21万化合物のHTSにおいても高い精度を維持し、効率的に偽陽性を除くことが可能な、優れたアッセイプラットフォームであることを実証した。核となるADP蛍光法は、キナーゼに限らず、ADPを産生するあらゆる酵素に適応可能であり、それら様々な酵素について、低価格で迅速かつ高精度に、より多くの化合物に対するHTSを可能とする画期的な方法である。本方法が、より多くの研究者にHTSの機会を提供することができ、結果として創薬だけでなく、広く生命現象の解明につながるツール化合物の創出にも貢献できる有用なアッセイプラットフォームであると確信する。