

審査の結果の要旨

氏名 丸木 理世 (戸籍名: 今村 理世)

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と題する本論文は、迅速かつ精度の高いキナーゼ活性測定法を構築し、従来法と比較して同等以上の結果が得られることを示し、実際にその方法を用いて 21 万化合物の HTS を実施して有用な HTS プラットフォームとなり得ることを示したものである。本論文は序論と本論 (全 5 章)、最後にまとめと実験項が記されている。本論では、第 1 章で現在の HTS アッセイ系における課題を考察し、第 2 章で新規キナーゼ活性測定法の構築について述べられている。第 3 章では実際に 21 万化合物について HTS を行った結果が記されており、第 4 章で総括、第 5 章では今後の展望について述べられている。

第一章では、HTS に適したアッセイ系のポイントとその課題について、実際に行ったアッセイ系を例にあげて考察を行い、効率よく高い精度で HTS をするためにはステップ数の少ない、操作が簡単なアッセイ系を構築する必要がある、と述べている。その対応策として現状では、独自に工夫された市販の HTS 用アッセイキットが使用されているが、特許や企業秘密により自作ができないため、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ことでヒット化合物を得る確率が低下してしまう可能性を指摘している。またアッセイ系では各々系特有の偽陽性が存在するため、最終的にヒットを取りこぼさないように、特に多い場合は早い段階で効率的に排除しておく重要性も述べている。

第二章では、前述の課題を踏まえ、新規キナーゼ活性測定法を構築し、検証を行っている。この新規キナーゼ活性測定法は、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の一部を利用し、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活性を測定できるよう開発されたものである。アッセイプロトコールはキナーゼの反応液に検出試薬の混合液を等量添加し 30 分静置後に測定するだけであり、かつ検出試薬液は市販の試薬で自作できるため、従来のキットを利用した場合に比べて 1/10 以下で HTS が可能であることから、迅速・簡便かつ低価格にキナーゼ活性が測定可能な、大変有用な測定法となり得ると考察している。実際に ADP 検出感度に問題がないこと、検出系を阻害する偽陽性は発生するが、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することで効率的に除けると考えたこと、また、キットを使用する従来法 (ADP 発光法) と比較しても同等以上の精度が得られることなどが示されている。

第三章では、この新規キナーゼ活性測定法が、実際に HTS プラットフォームとして有用である

かどうか検証するため、創薬機構の21万化合物についてキナーゼ HTS を実施した結果について示されている。具体的には、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、条件検討を行ったのち、384 穴プレートを用いて約 2 週間かけて HTS の 1 次スクリーニングを行い、50%以上の阻害活性を示した 2307 化合物を 1 次ヒットとして得ている。合計 675 プレーートの Z prime (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。) の平均値は 0.90 と非常に高く、精度よく HTS が実施できたことを示している。一方、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 10 μ M 存在下で同様に HTS を行い、同じく 50%以上の阻害活性を示す化合物が 124 個、全体の 0.06% となり、CLK1 ヒット化合物の約 5%に相当したことを明らかにしている。

CLK1 ヒットからこの偽陽性ヒットを除くため、再現性試験におけるキナーゼ阻害活性とリファレンスアッセイの阻害活性を比較し、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、さらに活性の強さで数を絞り込んだ結果、得られた 12 個の HTS ヒット化合物は、IC₅₀ が 100 nM 以下と強い CLK1 阻害活性を有しながら、リファレンスアッセイはほぼ阻害しないことが確認できたため、HTS フローの過程で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取得できたと結論している。さらにこの HTS ヒット化合物のうち 2 化合物に共通骨格が見られ、また再現性試験でヒットとした化合物の中にも同じ共通骨格をもつ化合物が 6 個存在したことから、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察している。

以上より、本キナーゼ活性測定法は、キットに頼らず、迅速かつ高精度な HTS を大規模に実施可能とする有用な HTS プラットフォームであることを実証できたと結論している。

さらに今後の展望においては、384 穴プレートから更なる小スケール化 (1536 穴プレートでのアッセイ) が可能であることが示され、核となる ADP 蛍光法はキナーゼ以外の ADP 産生酵素へも適応可能であると述べられている。

本論文は、キットに頼る従来法の問題を解決するため、検出試薬を自作することで低価格を実現しつつ、迅速かつ高精度なアッセイを可能とする、新規キナーゼ活性測定法を開発したものである。さらに、実際に21万化合物のHTSを行い、大規模なアッセイにおいても高い精度を維持し、偽陽性も効率的に除外可能な、優れたHTSプラットフォームであることを実証したものである。核となるADP蛍光法は、ADPを産生するあらゆる酵素に適応可能であり、キナーゼに限らず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と考えられる。

よって、本学位申請者は博士 (薬科学) の称号を得るにふさわしいと判断した。