

博士論文（要約）

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

丸 木 理 世

（ 戸 籍 名 ： 今 村 理 世 ）

目次

目次

略語表

序論	1
第一章 HTS に適したアッセイ系のポイントとその課題	10
1-1 例 1 : 転写因子 FoxO1 の阻害剤探索のためのアッセイ系	10
1-2 例 2 : 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	13
1-3 小括	15
第二章 新規プロテインキナーゼ活性測定法の構築	17
2-1 プロテインキナーゼの重要性	17
2-2 従来 of キナーゼ活性測定法について	19
2-3 新規キナーゼ活性測定法の開発	21
2-3-1 簡便かつ低価格な糖転移活性測定法	21
2-3-2 新規キナーゼ活性測定法の構築	23
2-3-3 偽陽性の発生について	27
2-4 従来法と新規活性測定法の比較	30
2-4-1 アッセイ手法の違い	30
2-4-2 比較検討結果① アッセイ系のバラツキについて	33
2-4-3 比較検討結果② 阻害活性値の比較	34
2-4-4 比較検討結果③ 化合物の N=1 評価結果の比較	35
2-5 小括	38
第三章 新規キナーゼ活性測定法を用いたキナーゼ HTS 実施結果	40
3-1 HTS 実施のためのアッセイ系構築	40
3-1-1 CDC2-like kinase1(CLK1)について	40
3-1-2 条件検討	41
3-2 フライブラリー (約 21 万化合物) の HTS 実施結果	51

3-2-1 HTS 実施概要	51
3-2-2 一次スクリーニング結果	52
3-2-3 再現性試験結果と偽陽性排除	56
3-2-4 HTS フローチャートとヒット化合物について	61
3-2-5 ヒット化合物のプロファイリング	65
3-3 小括	70
第四章 総括	71
第五章 今後の展望	72
5-1 プレートの小スケール化について	72
5-2 リアルタイム測定への応用	73
5-3 キナーゼ以外の酵素活性測定法への利用	74
まとめ	75
実験項	77
Materials	77
Methods	79
Kinase Assay of CLK1	79
ADP Detection Assay	79
ADP Detection Assay by ADP-Glo Bioluminescence Assay	80
Kinase Selectivity Assay	80
Electrophoretic Mobility Shift Assay	81
Data Processing and Analysis	81
ADP 蛍光法の試薬調製	82
引用文献	84
謝辞	90

略語表

ADP	Adenosine diphosphate
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
ARE	Antioxidant response element
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CK1	Casein kinase1
CLK1	Cdc2-like kinase1
CMGC	Group named after member families CDK, MAPK, GSK3 and CLK
CMP	Cytidine monophosphate
DDI	Drug Discovery Initiative
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
DYRK	Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase
Dyrktide	DYRK1A substrate peptide
DW	Deionized water
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FI	Fluorescence intensity
FoxO1	Forkhead box protein O1
FP	Fluorescence polarization
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GDP	Guanosine diphosphate

GSK	Glycogen synthase kinase
HC	High control
HPLC	High-performance liquid chromatography
HTS	High-throughput screening
HTRF	Homogeneous time resolved fluorescence
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50
iPS	induced pluripotent stem cell
IRE	Insulin response element
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LC	Low control
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBP	Myelin basic protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NEM	N-Ethylmaleimide
Nrf2	NF-E2-related factor 2
p62	p62/Sqstm1
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PPi	Phosphatase inhibitor
RT	Room temperature
RI	Radioisotope
SB	Signal to background ratio
SD	Standard deviation
SPA	Scintillation proximity assay

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDP	Uridine diphosphate
Z'	Z prime factor

序論

「薬」と聞いて今皆が思い浮かべるのは、「最先端科学の技術と知識を集めて製造された一粒」だが、その歴史を振り返ると、実は人類の歴史と同時に始まったと言えるほど古いものであり、一万数千年前の縄文人居住跡から薬として使ったとみられる薬草（キハダ、生薬名は黄柏）が発見されている¹。文明が発達してきた紀元前 3000 年頃には天然由来の薬である生薬が体系化され、メソポタミア文明の遺跡で発見された粘土板には 500 種以上、古代エジプト医学について記された最古のパピルス「エーベルス文書（Ebers Papyrus）」には 800 種以上もの薬の調製法や使用法が記載されている^{2, 3}。使用されていた生薬は、アヘン（opium）や大麻（cannabis）、ラム酒（myrrh）、桂皮（cassia）、センナ（senna）、タイム（thyme）、アロエ（Aloe）、ヒマシ油（Castor oil）、ニンニク（garlic）など現在でも耳にするものが多数含まれている一方で、治療のためにはしばしば呪術や祈祷などが行われていた。中世の錬金術師の活躍により化学が進歩し、それまで使っていた生薬の有効成分が“有機化合物”であり、それらを化学的に合成することが可能であるということが示されたのは、19 世紀に入ってからである。その後、数々の生薬から有効成分（サリチル酸、カフェイン、アトロピン、など）が単離され、その合成研究も進められ、19 世紀の終わりには、アセトアミノフェンやアセチルサリチル酸などが、初めて人工合成医薬品として発売された^{2, 3}。

一方、1928 年、フレミングがペニシリンを発見し、抗生物質の有用性が認められると、その探索のためのスクリーニング法が確立されていく⁴。ただ、1 日数百検体

程度の規模であり、薬理学の発展と共に疾患メカニズムに則した創薬研究が盛んにはなりつつも、薬の開発は粘り強いスクリーニングや偶然による発見 (serendipity) に依るところが大きかった^{5, 6}。

その後、製薬企業においては、承認される新薬の数が減る一方、新薬1つに対する開発費の高騰が続き、より効率的に新薬候補化合物を取得する必要に迫られてくる。そんな状況において1990年代、欧米の大手製薬企業から、それまでのスクリーニング規模を遥かに超える高速大量スクリーニング (High-throughput screening)、略してHTS が生まれた⁴。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」である⁵。HTS の導入により、スクリーニングでの評価化合物数は、従来の数百~数千化合物から、今では100万検体以上の評価も可能なレベルに達しており、分注・反応容量も多くは $\mu\text{L} \sim \text{nL}$ スケールで行われている。効率的に新規作用機作による新薬創出を目指す製薬企業にとって、HTS はなくてはならない基盤技術となっている²⁻⁷。

このようなHTSの進化が可能であったのは、測定技術の開発、微量分注器の開発、操作の自動化、そして大量のデータを処理する解析ツールなど、異分野の技術革新が達成・統合されたためである。加えて分子生物学などの進歩により、狙った蛋白質に作用して狙った効果を発揮する“分子標的薬”が登場するに至った。特異性の甘さや標的分子の体内分布の問題などにより、必ずしも理屈通りに副作用がなくなったわけではないが、今後の技術の進歩や生命現象の理解が進むことで、より適した標的分子の同定や特異性を高めた薬剤の開発が期待される。ヒトゲノム計画完了後に様々

に展開されている各種オミックス解析（プロテオミクスやメタボロミクス、エピゲノムなど）や、iPS 細胞を利用した疾患特異的なメカニズムの解明などで、新しいコンセプトの薬剤がデザイン可能となった暁には、それを実際に探索できるよう、HTS の方もさらに進化が必要になると思われる²。

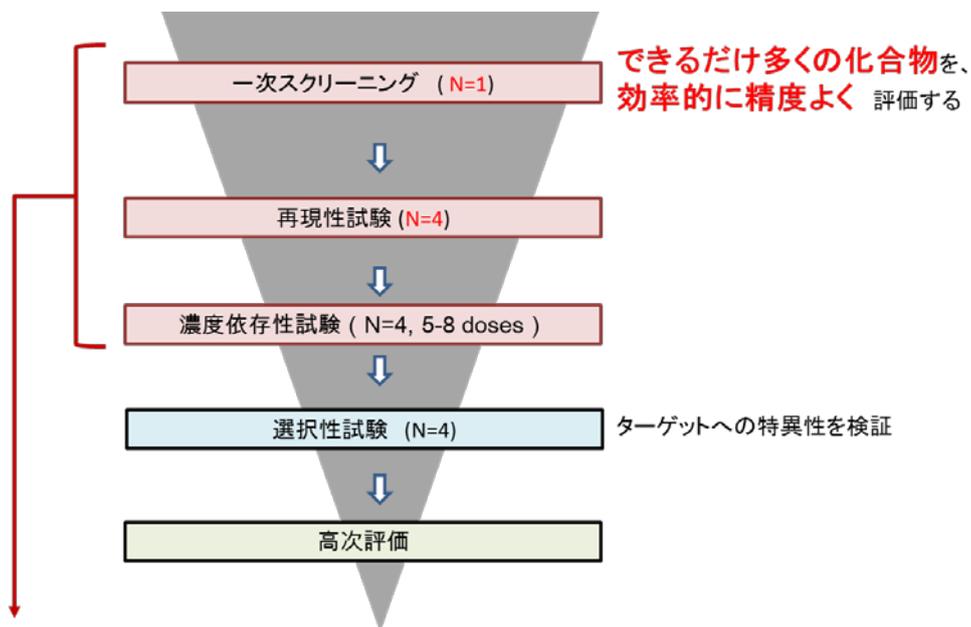
最近ではその HTS 技術が、従来の「新薬候補化合物の探索」だけでなく、リード化合物選定に重要な ADME や毒性試験などでも利用されるようになってきているが、ここでは新規生理活性物質を発見するための創薬の最上流における HTS に焦点をあてて、以下話を進める。

HTS では一般的には次に示すように、数段階を経てヒット化合物を絞り込んでいく（図表 1）。

① 1 次スクリーニング

低分子化合物ライブラリーや天然物ライブラリー等の化合物群に対し、狙った作用を検出可能なアッセイ系で網羅的に評価を行う。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効率的に（一般的には N=1 で）、かつ取りこぼしを防ぐためにできるだけ高い精度で評価することが大事である。

図表 1 High-Throughput Screening (HTS) の一般的な流れ



HTSのための “マイクロプレート内で再現性良く評価可能なアッセイ系” を構築する

⇒ 一番時間がかかる大事なステップ

②再現性試験

1次スクリーニングでヒットした化合物を、再度同じアッセイ系で評価し、再現性を確認する（創薬機構においては N=4 で評価している）。再現性が見られなかった化合物を排除して、1次ヒット化合物とする。

③濃度依存性試験

1次ヒット化合物の活性の濃度依存性を調べ、目標とする強さの活性を有する化合物に絞り込む。

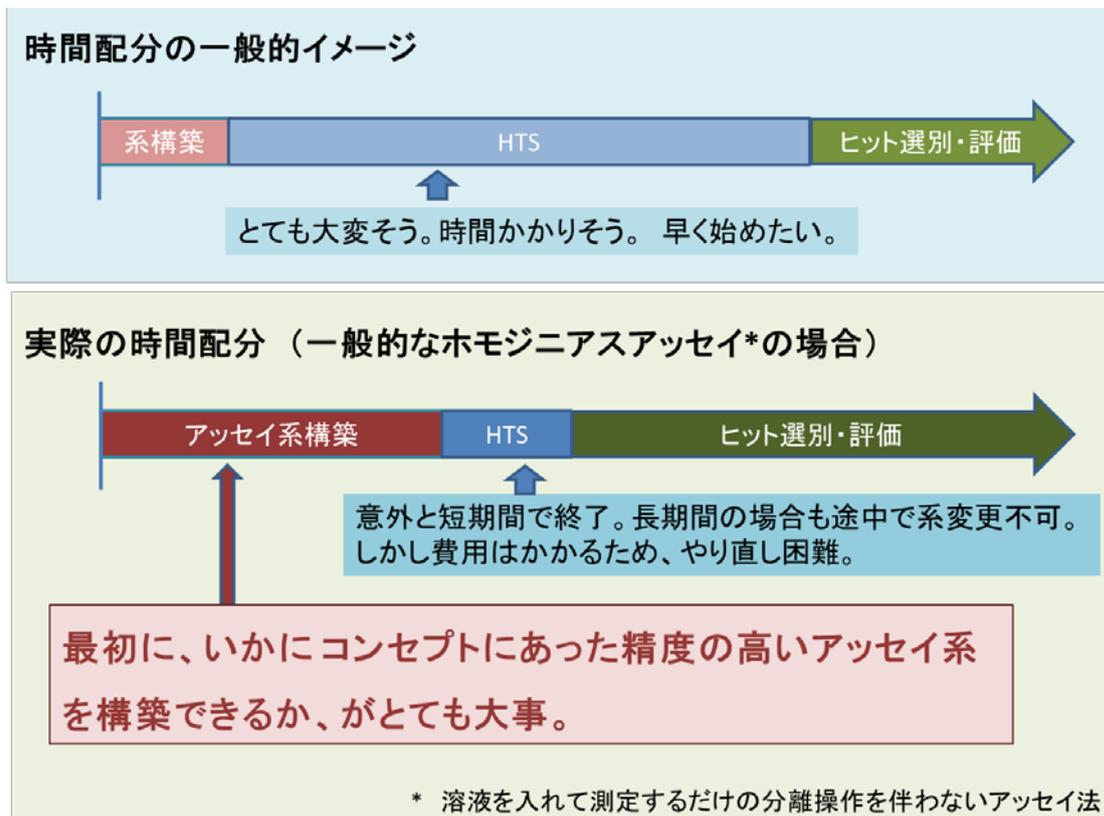
④高次評価

選択性試験などを通して作用の特異性を検証する。1次スクリーニングが酵素アッセイであれば、ターゲットへの特異性があるかどうか、phenotypic（細胞系など）アッセイであれば、狙った作用点のものがとれているかどうか、などを検証しつつ、ヒット化合物を高次評価へと進めていく。化合物の作用点の特異的ではないと、後々動物モデル等 *in vivo* での薬効が確認できた場合でも化合物の狙った作用によるものかどうか判断がつかないため、ヒット化合物の特異性を確認することは重要である。

ここで 1次スクリーニングから濃度依存性試験までは基本的には同一のアッセイ系を使用するため、HTS 実施のためにはマイクロプレート内で再現性良く評価可能

なアッセイ系を構築することが必要であり、ここでのアッセイ系の完成度がその後の HTS 全体の成否を決めると言っても過言ではない。たとえ HTS の途中でアッセイ系に問題があることが発覚しても、途中で条件を変えると同一基準でヒット選抜を行うことが難しくなってしまうため、一度 HTS を始めたらアッセイ系の変更は行えない。一方で、HTS を行うにはプレート・試薬等が大量に必要となり費用がかかるため、簡単にやり直すことは難しい。そのため、下手に HTS を急いで始めてしまい、バラツキが大きく解釈が難しい結果が出てしまうと、前にも後にも進めなくなってしまう、最悪の場合はそのまま pending、という事態になりかねない。そうならないためにも、HTS を実施する際は、コンセプトにあった精度の高いアッセイ系を構築するための条件検討が一番時間をかけるべき大事なステップである。一般的には HTS というと同じアッセイを長期間行うイメージがあるが、簡便で良質なアッセイ系が構築できれば HTS 実施期間の方が検討期間より短いことも多い（図表 2）。

図表 2 HTS の時間配分：一般的なイメージと実際の乖離



HTS で良いヒットを得られるかどうかは、突き詰めると、どのようなアッセイ系を用いて、どのような化合物ライブラリーを評価するか、ということにかかっていると言える。アッセイ系については、上述した通り、コンセプトにあった簡便で高精度なアッセイ系であることが望ましい。評価する化合物ライブラリーについても、HTS ヒットは当然そこからしか得られないため、その質がとても大事である。初期の頃のライブラリーは、数を稼ぐためにコンビケム (combinatorial chemistry) で合成された多様性の乏しい化合物ライブラリーが多く含まれていたが、最近では、ケミカルスペースを意識した広汎な多様性が大事だと考えられており、かつ高い反応性や毒性を持つことが示唆される化合物を除き、リピンスキーの法則 (Lipinski's rule of five) などを考慮してできるだけ drug-like な化合物をそろえるなど、質を高める努力がされている。さらには、構造式の観点からだけではなく、集めた実際のサンプルについても、その純度を調べて低いものは除外したり注意書きを付れたりしている。また、ターゲットや目的に合わせてヒットしやすい構造を集めた化合物ライブラリー (Focused library) なども作られている^{2,4,7}。

最後に、HTS を行えば必ずヒット化合物が得られるという保証はないが、できるだけその確率を高くするためには、HTS に適したアッセイ系を構築し、かつ質の高いライブラリーを用いて、できるだけ多くの化合物を評価する、ということが大切である。多くの化合物を評価する際、一番問題になるのはそのコストであり、予算に合わせて

評価する化合物数が決まる場合も多い。その意味において、アッセイ系の精度だけではなく費用も大事な問題であり、同じ予算で HTS を行う場合、単純にコストが半分になれば評価できる化合物数は 2 倍になり、ヒットが得られる確率も 2 倍となる。ヒット率が低い系では特に、確率を上げることはヒット化合物が有るか無いかに関わる大きな問題である。

以上より、アッセイ系構築においては、コンセプトにあった精度の高いアッセイ系を構築すると同時に、費用もできるだけ抑える工夫が大事であり、一番時間をかけるべき大事なステップである。

本研究では、まず第一章で実際に私が行った HTS のアッセイ系を例に挙げて、HTS に適したアッセイ系のポイントと現状の課題について考察する。第二章では、それに対する解決策の一つとして新規アッセイ法を紹介し、従来法と比較して遜色なくアッセイ可能であることを実証した。第三章では、実際にその新規アッセイ法を用いて 21 万化合物の HTS を実施し、HTS プラットフォームとしての有用性を実証した。

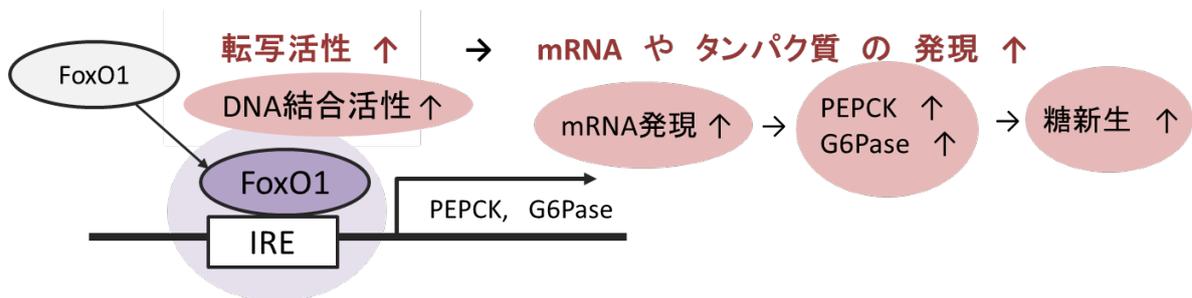
第一章 HTS に適したアッセイ系のポイントとその課題

1-1 例 1 : 転写因子 FoxO1 の阻害剤探索のためのアッセイ系

HTS アッセイ系 1 例目として、私が旧藤沢薬品工業（現アステラス製薬）の探索研究所にて実際にスクリーニングを担当したテーマ、FoxO1 阻害剤探索のためのアッセイ系を取り上げる。

FoxO1 は肝臓において糖新生酵素の産生を介して血糖値の調節に関与することが知られている転写因子であり、その活性を阻害すれば糖新生が抑制されることで糖尿病の治療薬となりうると考え、FoxO1 阻害剤の探索を行った。（図表 3）

図表 3 転写因子 FoxO1 の阻害剤の探索



転写因子の活性を測定するには、その DNA 結合活性や、活性に伴って上昇する mRNA や蛋白質の発現量を定量する方法等があるが、操作が複雑で HTS には不向きである。一般的には図表 4 に示すような ELISA 法でスクリーニングを行うこともあるが、操作のステップ数が多く洗浄操作もあるため、時間がかかる上に、各ウェル間のバラつきが大きくなりやすい。

一方、FoxO1 の転写活性に伴って Luciferase の発現が上昇するように遺伝子を導入した細胞を作製し、Luciferase の活性を基質と ATP を添加して発光で測定する、レポーター遺伝子アッセイを利用すれば、細胞をプレートで培養後、検出試薬を入れて測定するだけの簡単な操作かつ少ないステップで HTS を行うことができる（図表 5）。問題点としては、検出試薬が高価であることと、化合物の作用点が多いため、狙った転写因子を阻害しないヒット、いわゆる偽陽性が多く取れてしまうことが挙げられる。このような系ではヒット化合物を絞り込む前に、偽陽性を効率的に除外することが大事となる。本テーマではレポーター遺伝子アッセイでは最終的には狙った作用点の化合物が得られず、当時社内で独自に開発されたアフィニティーセレクション法のスクリーニングを私が担当し、FoxO1 を直接阻害する AS1842856 を見出した（図表 6）⁸。

図表 4 ELISA 法概要

ELISA法

Protocol



- ↓ 認識配列DNA固定化
- ↓ wash
- ↓ blocking
- ↓ wash
- ↓ 核抽出液 & 化合物添加
- ↓ incubation
- ↓ wash
- ↓ 一次抗体添加
- ↓ incubation
- ↓ wash
- ↓ 二次抗体添加
- ↓ incubation
- ↓ wash
- ↓ 検出液添加
- ↓ incubation
- ↓ 反応停止
- ↓ 検出

- × 操作ステップが多い
- × wash操作がある
 - 時間がかかる
 - バラツキが大きくなる

図表 5 レポーター遺伝ンアッセイ法概要

レポーター遺伝ンアッセイ法

Protocol

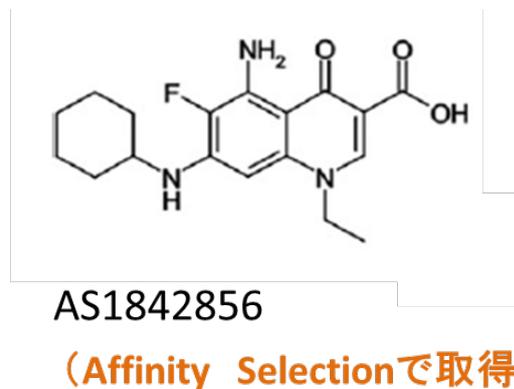


- ↓ 細胞播種
- ↓ 培養 2-3日
- ↓ 試薬 (Luciferin + ATP) 添加
- ↓ 発光検出



- 操作ステップが少ない → 迅速
- wash不要 → 簡便
- × 検出試薬が高価
- × 化合物の作用点が多く、狙った作用を持たない偽陽性が多い
- 偽陽性を効率的に除外することが大事

図表 6 FoxO1 阻害剤

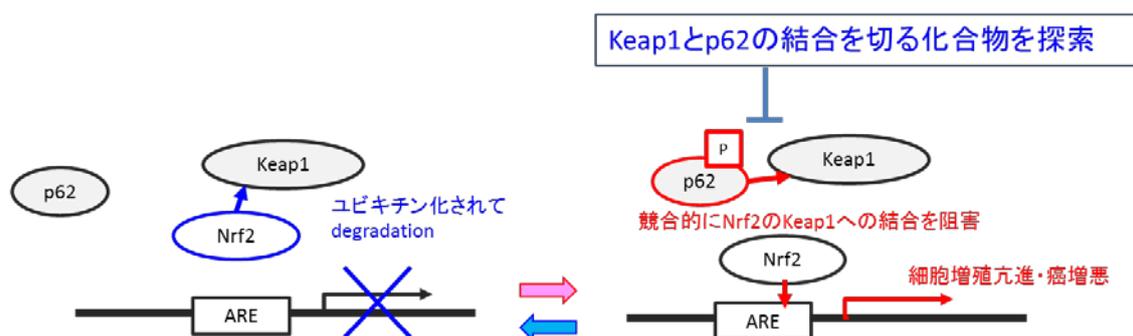


1-2 例 2 : Keap1-p62 蛋白質間相互作用の阻害剤探索のためのアッセイ系

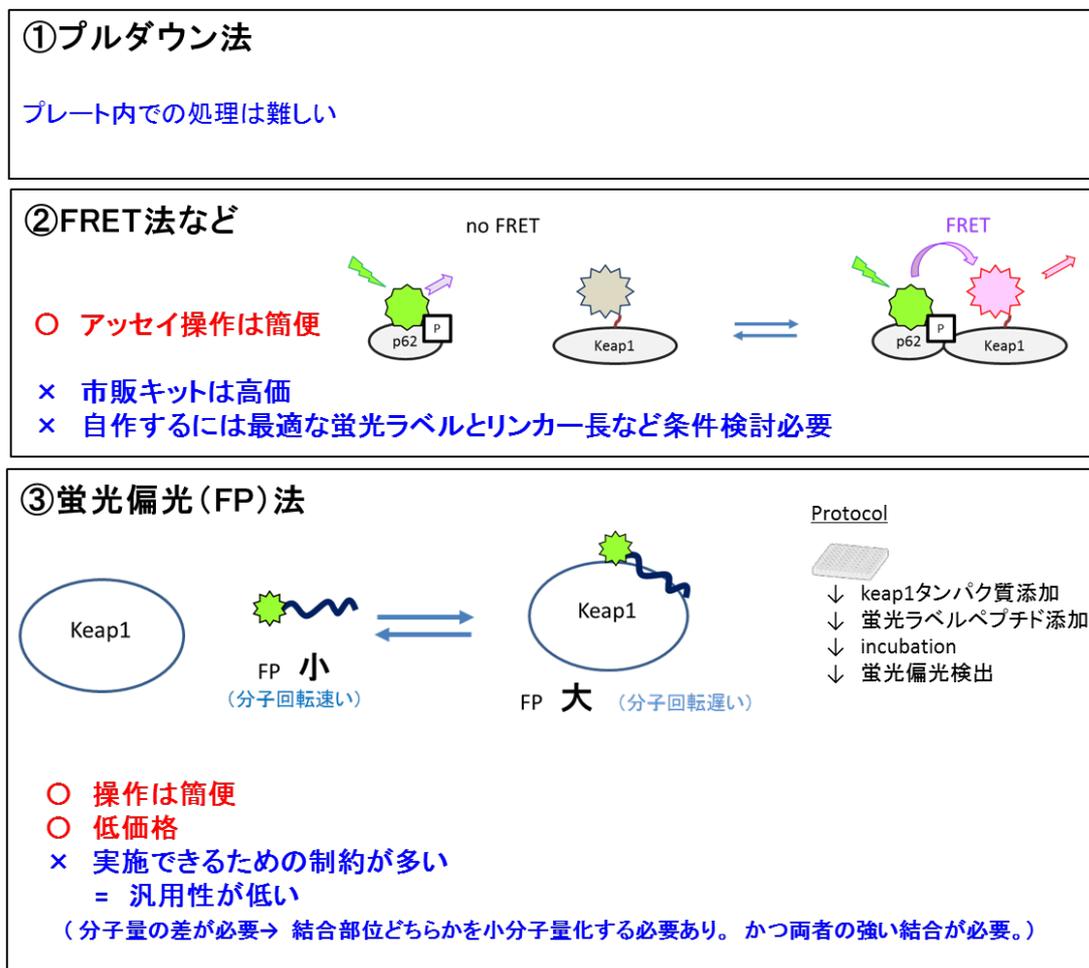
転写因子 Nrf2 は Keap1 に結合することで活性を制御されているが、リン酸化 p62 が競合的に結合阻害することで Nrf2 の活性が亢進し、肝臓癌の増悪要因となる事がわかってきた (図表 7)。そこで肝臓癌治療薬としてリン酸化 p62 と Keap1 の相互作用を阻害する化合物の探索を行った。

蛋白質間相互作用の解析には、一般的にはプルダウン法等が用いられるが、操作が複雑でプレート内処理は難しい。HTS では FRET を用いたアッセイ系が使われることが多いが、自作するには大規模な条件検討が必要であり、一方の市販のキットは高価で大規模 HTS の障壁となり得る (図表 8)。そこで今回は蛍光偏光 (FP) 法を用いることとした。FP 法とは、フリー (分子が高速回転) とバウンド状態 (分子回転が減速) で蛍光の偏光値が異なることを利用した方法である。アッセイプロトコールは簡便 (結合する二者を順に添加するだけ)、かつ蛍光ラベルしたペプチド以外は特別な試薬も必要ないため、低価格で HTS が実施可能である。ただ FP 法で評価できる蛋白質間相互作用の条件に限られるため汎用性が低い、という問題点がある。今回は両者の親和性を保ちつつ p62 の結合部位をペプチド化できたため、FP 法を利用して創薬機構の約 15 万化合物について HTS を行い、Keap1-p62 相互作用を特異的に阻害する化合物、K67 を見出した (図表 9) ^{9, 10}。

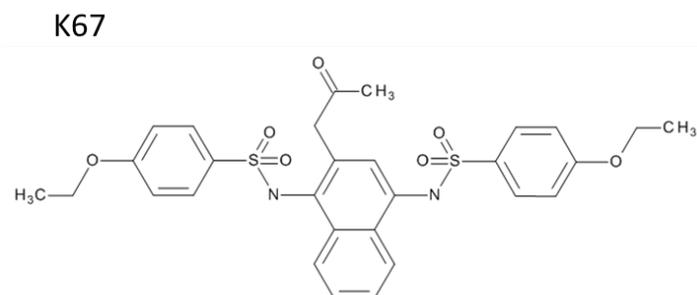
図表 7 Keap1-p62 蛋白質相互作用の阻害剤探索



図表 8 蛋白質間相互作用の解析法



図表 9 Keap1-p62 結合阻害剤



1-3 小括

以上を図表 10 にまとめる。一般的なアッセイ法は、操作が複雑で工程数が多く、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。さらには、汎用性があれば毎回のアッセイ系構築の労力を減らすことが可能となり、HTS のプラットフォームとしてより使いやすいものとなる。

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点であり、評価サンプル数が限られることによる最終的なヒット化合物取得の可能性の低下が危惧される。またキットかどうかによらずアッセイ系では各々系特有の偽陽性が存在するが、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。

図表 10 HTS に求められるアッセイ系のポイントと現状問題点

	一般的なアッセイ系	HTSで求められるアッセイ系	市販のHTS用アッセイキット	
操作性	× 複雑なことが多い (washあり・transferあり)	簡単であるほど良い (washなし・transferなし)	簡単に	HTS実施できるよう 独自に工夫 されている
Step数	× 多工程	少ない方が良い	少ない工程数で	
スピード (効率)	△ 精度を上げるために 丁寧にを行うと時間がかかる	○ 両立が必要	効率よく	
精度		○	精度よく	
コスト	系による?	低価格 (価格が安いほど 多くの化合物を評価可能)	× 高価	
汎用性	?	○	○	
偽陽性	?	少ないか、 効率的に除外可能	△ 系による	

第二章 新規プロテインキナーゼ活性測定法の構築

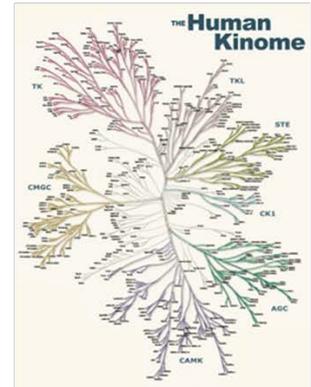
2-1 プロテインキナーゼの重要性

プロテインキナーゼは、蛋白質をリン酸化する酵素で、ほ乳類の中でも最も大きなファミリーの一つである。ヒトでは 518 キナーゼが知られており kinome tree として分類されている (図表 11) ¹¹。リン酸化によるシグナル伝達を介して、細胞の増殖や分化、セルサイクルなど様々な生体内の反応に関与する、重要な蛋白質であり、その活性亢進や機能低下は様々な病気と関連することが知られている。そのため、分子生物学的にも創薬の面からも魅力的なターゲットとして、長年研究されてきた。1995 年、Rho-kinase 阻害剤 (fasudil) が初めてキナーゼ阻害剤 (脳血管攣縮の治療薬) として承認されて以降、imatinib (Bcr-Abl kinase inhibitor) や gefitinib (EGFR tyrosine kinase inhibitor) など約 30 個のキナーゼ阻害剤が承認されているが、それらのほとんどが抗がん剤である ^{12, 13}。近年、tofacitinib (JAK inhibitor) が抗リウマチ薬として承認され、さらに 130 個以上のキナーゼ阻害剤が臨床試験中だが、開発されている薬の標的となるキナーゼは 80 種程で kinome 全体の 2 割弱しかカバーしておらず、新規な創薬ターゲットとしてのキナーゼやその阻害剤の開発が重要となっている ¹⁴⁻¹⁷。またキナーゼ阻害剤のほとんどは ATP 拮抗型であり、結合部位が似ていることから選択性を出すのが難しく、よりキナーゼ特異性をあげた阻害剤の探索も待たれている。

図表 11 HTS ターゲットとしてのプロテインキナーゼの重要性

プロテインキナーゼ とは

- 蛋白質をリン酸化し様々な生体内の反応に関与する重要なタンパク質
- ヒトでは 518 kinase が知られており、Kinome Treeで分類されている
(G Manning et al. *Science* 2002)
- 上市薬に加え臨床試験中のキナーゼ阻害剤も多いが、そのほとんどがATP拮抗型
→ 選択的な阻害剤の探索の必要性
- 開発中の阻害剤のターゲットとしては80個くらいで、全体の20%程度しかカバーしていない。
また、そのほとんどが癌治療薬。
→ 新規ターゲットとしてのキナーゼとその阻害剤の開発も重要



<http://kinase.com/human/kinome/>

(Ten things you should know about protein kinases Fabbro D et al. *Br J Pharmacol.* 2015)

Unexplored therapeutic opportunities in the human genome

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY

VOLUME 17 | MAY 2018 | 317

ANALYSIS

Table 1 | Current distribution of TDL categories by protein family for the druggable genome

Target class	All	T _{dis}	T _{obs}	T _{un}	T _{unk}
GPCRs (non-olfactory)	406	96	113	145	52
Olfactory GPCRs	421	0	0	8	413
Kinases	634	50	390	163	31
Ion channels	353	120	94	130	23
Nuclear receptors	48	18	19	11	0
Transporters	473	26	46	287	114
Transcription factors	1,400	0	27	866	507
Epigenetic proteins*	280	12	53	178	37
Enzymes†	4,146	186	493	2,607	860
Others	11,957	87	217	6,671	4,982
Total	20,120	601	1,402	11,086	7,031

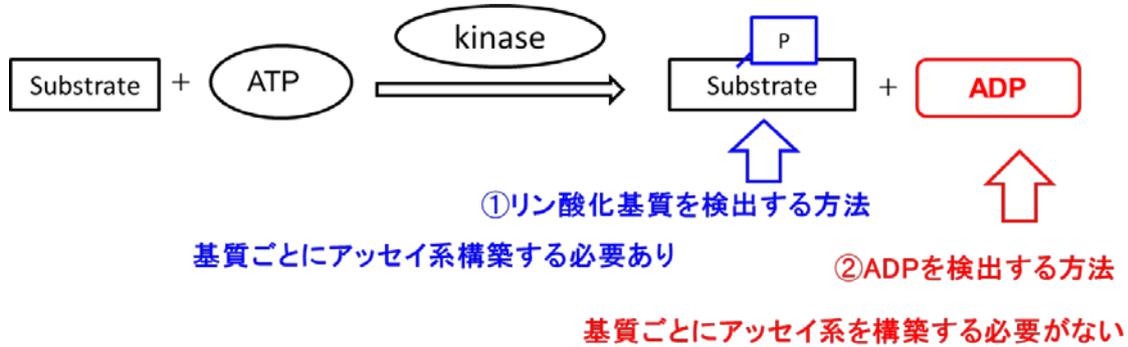
GPCR, G protein-coupled receptor; TDL, target development level. *Includes 40 transcription factors not already counted with those in the transcription factor category; †Excludes kinases.

2-2 従来のキナーゼ活性測定法について

キナーゼの活性測定法としては、古くは RI 標識された ^{32}P -ATP を使用して基質のリン酸化を検出する方法がよく行われていたが、HTS では大量の放射性廃棄物が出るため最近では敬遠されている。リン酸化された基質を認識する抗体を用いた ELISA や Western-blotting 法なども HTS に用いられてきたが、これらは工程数が多く wash 操作などもありばらつきが大きくなりやすい。また、基質が変わるたびに抗体を検討しアッセイ系を構築する必要がある (図表 12)。

これに対し、より簡便に精度よくアッセイができるように、様々なメーカーが独自に開発した手法によるキナーゼ活性測定のためのキットが売り出されている (図表 13)。なかでも近年は ADP を定量する方法を使ったキットがいくつか販売され、広く使用されている¹⁸⁻²¹。理由は、キナーゼ反応の共通産物である ADP を定量する方が、キナーゼによって様々で場合によっては検出自体が困難だったりする基質側を定量するより、アッセイ系の構築がしやすいからである。これらのキットは操作が簡便で、汎用性があるため便利ではあるがとても高価で、特許や企業秘密もあり自作はできないため、20 万化合物を評価するには数百万円以上かかるものばかりであり、特にアカデミアでのスクリーニングにおいてはその費用が問題となることが多い。

図表 12 キナーゼ反応とその活性測定法について



図表 13 様々なキナーゼ活性測定法

従来法

- RI法 (^{32}P -ATP使用)
- ELISA 法
- Western Blotting 法

市販されているキットの例

- SPA (PerkinElmer) : scintillation proximity assay using ^{33}P -ATP incorporation
- KinEASE (Cisbio) : homogeneous time-resolved fluorescence immuno-assay using biotin-tagged substrates
- IMAP (Molecular Devices): FP assay using fluorescent substrates
- ADP hunter (DiscoverX) : fluorescence assay which generate H_2O_2 from ADP by enzyme coupling reaction followed by production of resorufin
- Transcreener (BellBrook) : FP assay using anti-ADP antibody and far-red fluorescence-labeled ADP
- ADP-Glo (Promega) : ADP is converted to ATP and the ATP is measured by means of luciferase/luciferin reaction

2-3 新規キナーゼ活性測定法の開発

2-3-1 簡便かつ低価格な糖転移活性測定法

糖転移酵素は「糖」を供与体である糖ヌクレオチドから様々な受容体（蛋白質・脂質・糖・核酸など）に転移する酵素であり、その欠損は様々な病気の原因となっているほか、生体分子の糖修飾を通じてその分布の制御に関与していることが知られている（図表 14）。そのため、その阻害剤や活性化剤を取得できれば、研究ツールや創薬の種として重要であると考えられるが、その活性測定法としては、HPLC や RI を使用する HTS に向かない手法、もしくは高価なキットを使用する方法のみであった。そこで創薬機構において、糖転移酵素の活性を簡便かつ低価格で測定可能な新規アッセイ法が開発された（図表 15）²²。この新規活性測定法を用いれば、操作が簡便、かつ検出液は市販の酵素や試薬だけで自作が可能のため低価格で糖転移酵素の HTS が実施可能である。私はこの優れたアッセイ系を、もう少し広い範囲で利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（3 段階の酵素反応で定量的に ADP の量をレゾルフィンの量に変換）に注目し、この部分を ADP 産生酵素（キナーゼや ATPase など）の活性測定に応用可能であると考えた。まずは、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測定法に応用するため、キナーゼアッセイ系の構築を行い、有用性を検証することにした。

図表 14 糖転移酵素活性 概要



図表 15 新規糖転移酵素活性 測定法

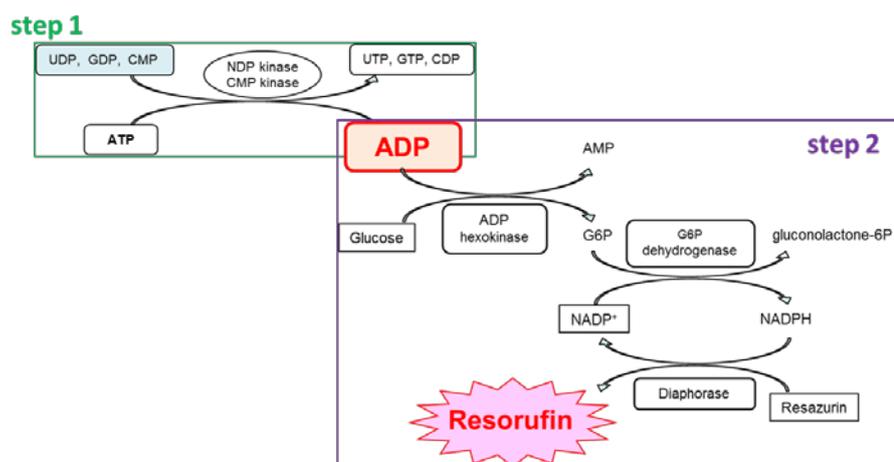
Protocol



- ↓ 糖転移酵素反応
- ↓ 検出液①(ATP & Kinase) 添加 : step 1
- ↓ incubation 60min
- ↓ 検出液②(3酵素 & 基質) 添加 : step 2
- ↓ incubation 60min
- ↓ 蛍光検出

概略図

Kumagai et al. Analytical Biochemistry 2014



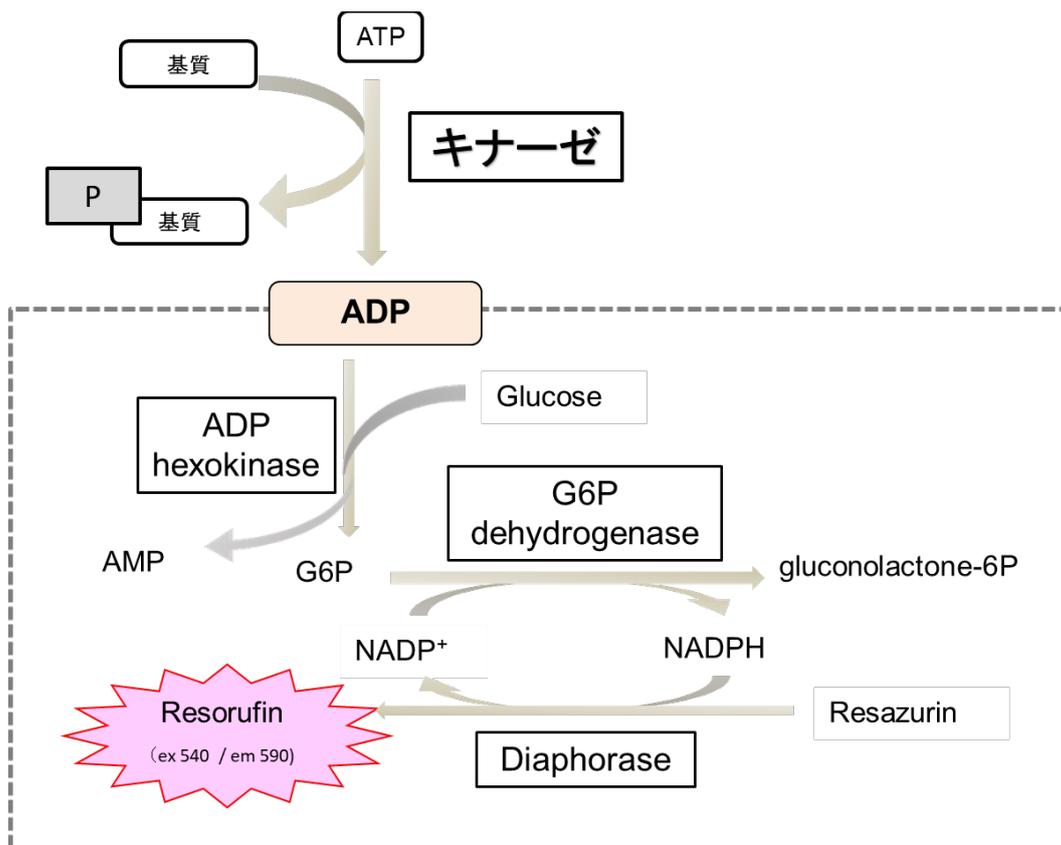
3つの酵素カップリング反応でADPを検出

→ ADP産生酵素の活性測定にも応用できるかも。

2-3-2 新規キナーゼ活性測定法の構築

糖転移酵素活性測定法の2段階目のADP変換カップリング反応（図表15略図中のstep2）を、キナーゼの活性測定へ応用した際の反応模式図を図表16に示す。キナーゼ反応で発生されたADPを、3つの酵素のカップリング反応でレゾルフィンに変換してその蛍光値を測定する方法（以下ADP蛍光法と呼ぶ）で、その検出液は10種類の市販の試薬を混ぜるだけである（作製法については実験項を参照のこと）²³。

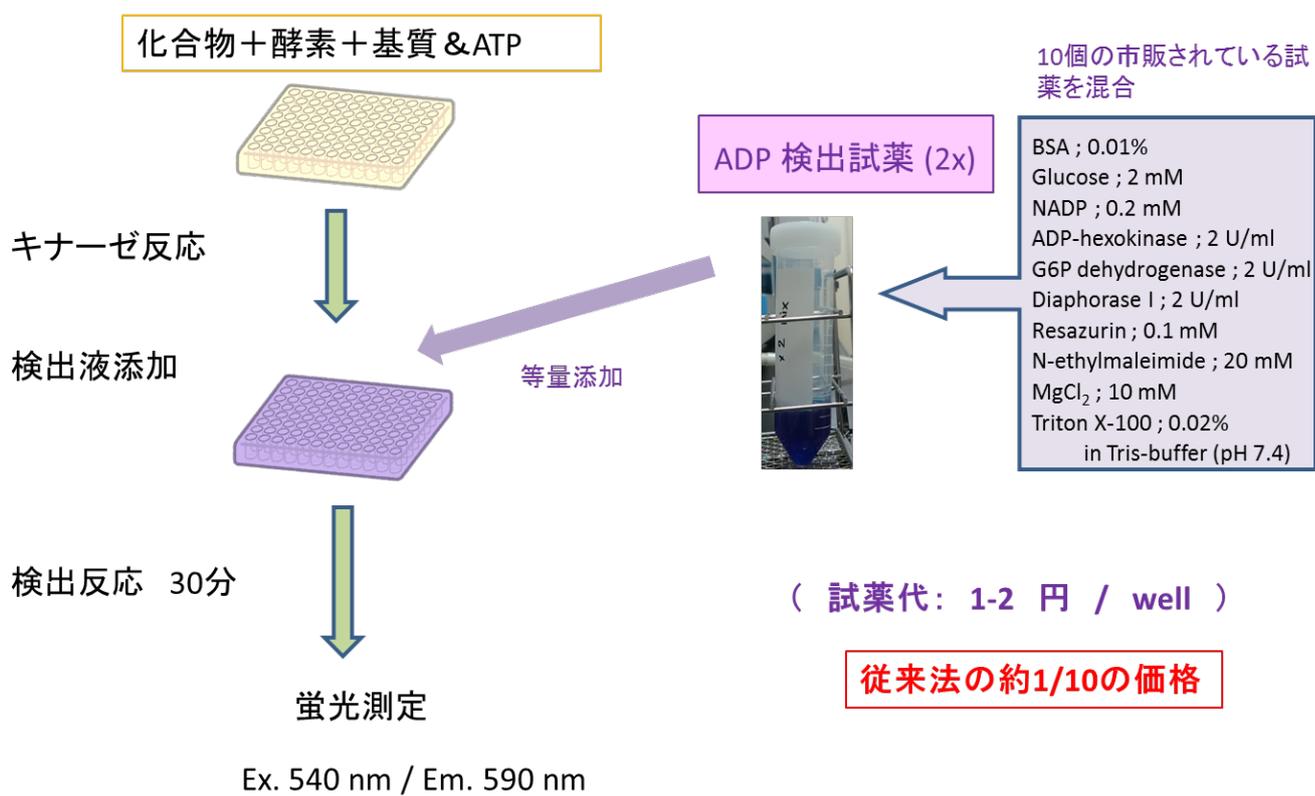
図表 16 新規キナーゼ活性測定法（ADP 蛍光法）の模式図



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

図表 17 に、今回構築したキナーゼ活性測定法のプロトコールを示す。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 ADP 検出試薬を等量添加するだけで、30 分後には測定可能と簡便かつ迅速にキナーゼ活性を測定できる。検出試薬は市販されている試薬から自作するため、1well にかかる金額が 1-2 円程度と、キットを使用する従来法の 1/10 以下で HTS が可能である。

図表 17 新規キナーゼ活性測定法プロトコール



まずは ADP の検出感度とそのシグナルの安定性を調べるため、ADP 検量線を作製し、この酵素カップリング反応で変換されたレゾルフィンの蛍光値を測定した（図表 18）。その結果、ADP 1 μM から数十 μM までリニアな関係で検出できることがわかり、検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) も以下の通り十分に低いことが確認できた。

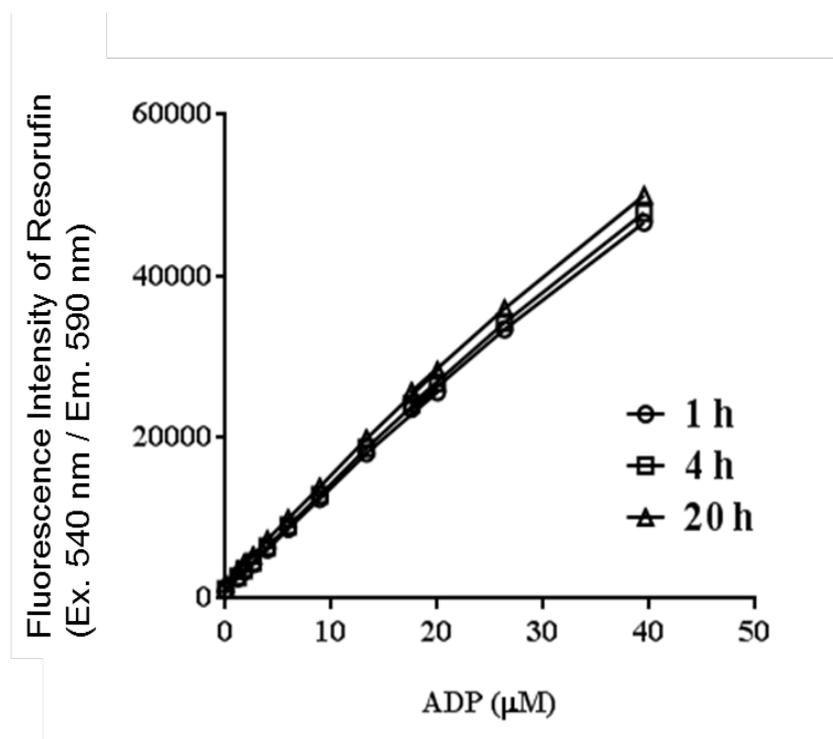
LOD : 0.03 μM : ((average of signal) – (average of blank))/(SD of blank) = 3 の時の濃度

LOQ : 0.08 μM : ((average of signal) – (average of blank))/(SD of blank) = 10 の時の濃度

一方、HTS を行う際の指標として、S/B (シグナルとバックグラウンドの比) が使われることが多く、一般的に、可能であれば S/B が 3 以上、最低でも 2 以上であることが望ましいとされている。今回の検量線では ADP 1.2 μM のシグナルが 2554、バックグラウンド (ADP 0 μM) は 1014 (S/B > 2) となり、ADP 産生が 1 μM 付近でもなんとか HTS 可能であることが示唆された。実際には、余裕を見て数 μM ~ 10 μM の ADP が産生されるアッセイ系であることが望ましいと考えている。

また、一晚 (20 時間) 室温にて静置後 (図表 18 の 20 h (Δ)) 測定してもシグナルはほぼ変わらず、室温でも長時間シグナルが安定であることが示された。

図表 18 レゾルフィン蛍光の ADP 濃度依存性と安定性



Standard curve of ADP in enzyme-coupled fluorescence assay. ADP solutions of various concentrations were mixed with detection reagents, and the fluorescence intensity at 590 nm was measured with excitation at 540 nm after 1 h, 4 h and 20 h incubation at room temperature (N=5).

2-3-3 偽陽性の発生について

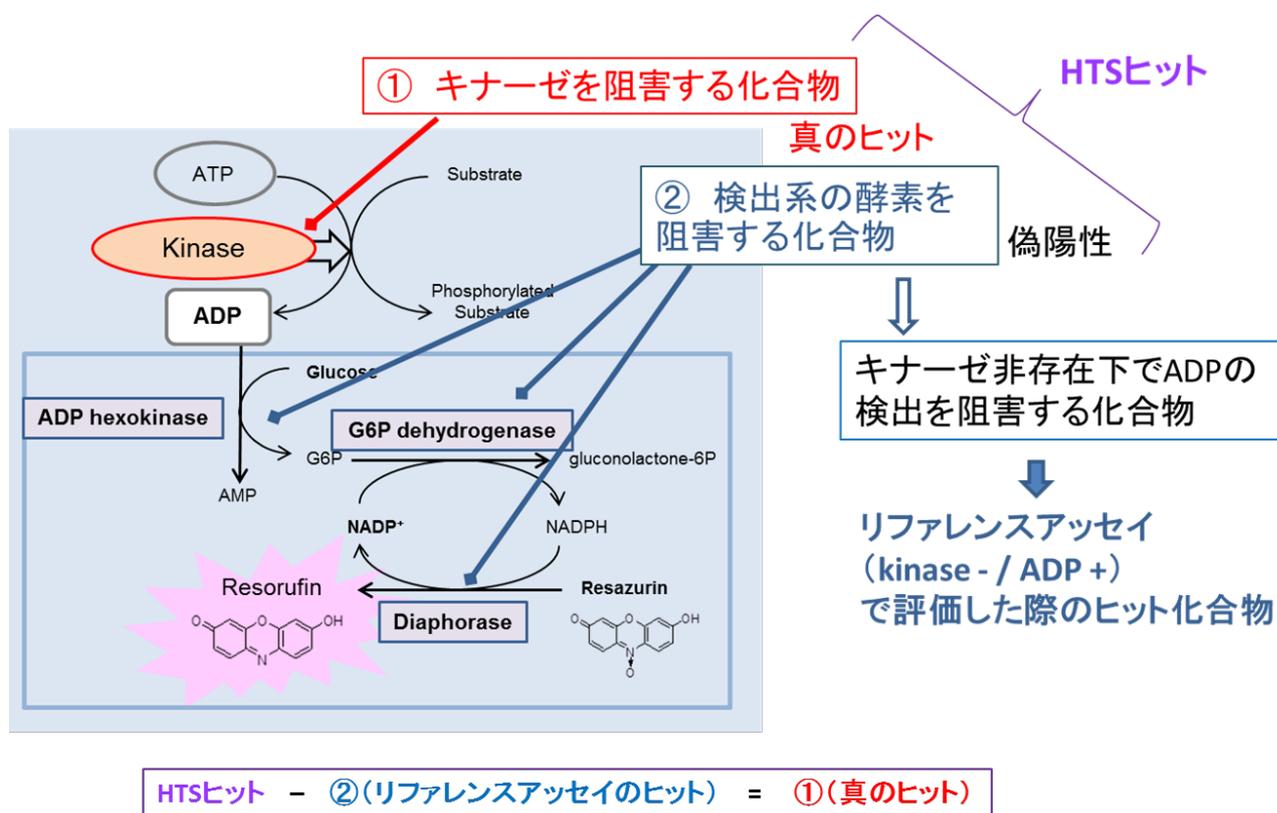
前項で述べた通り、この新規キナーゼ活性測定法は、検出系にキナーゼを含む3種類の酵素を使用していることから、一番の懸念点としては、それらを阻害する化合物が偽陽性として多数ヒットしてくる可能性が挙げられる。アッセイ系では各々系特有の偽陽性が存在するが、第一章で述べたとおり、特に多い場合は途中のヒット選別に影響するため、早い段階で効率的に排除する必要がある。

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、図表 19 の、(①実際にキナーゼを阻害する化合物+②検出系を阻害する化合物) であると考えられる。実際、様々なキナーゼを広く阻害することが知られている *staurosporine* の存在下で ADP の検出を行うと、濃度依存的な阻害活性が認められた (図表 20)。これより、このような化合物がライブラリーに入っていると、目的とするキナーゼの阻害活性を持たなくても ADP の変換反応が阻害され、ヒットとして選別されてしまうことになる。つまり、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、図表 19 に示すように HTS ヒット化合物から効率的に②の偽陽性を除く必要がある。そこで私は、②を効率的に選別するため、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。

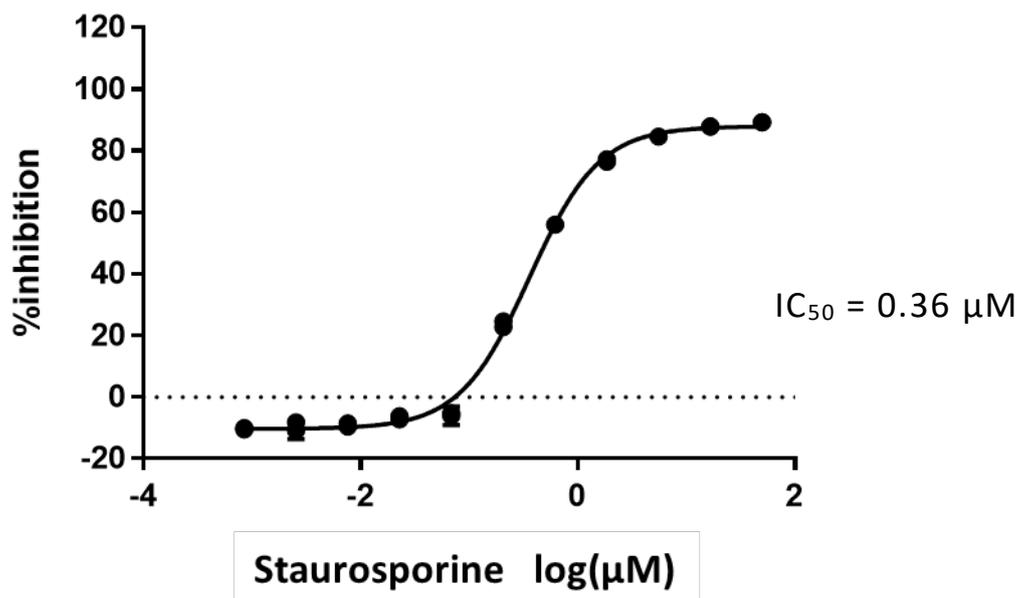
以上に加えて蛍光法の共通の懸念点として、化合物に励起光・蛍光の吸収がある場合や同じ蛍光を発する場合に、偽陽性や偽陰性が生じる可能性が挙げられる。偽陽性については、前述のリファレンスアッセイにより除くことが可能と考えられる。偽陰性を除くためには、少々手間がかかるが、反応前の蛍光値を測定し、反応後の測定値

と比較することで反応による変化量を見積もり、ヒットとして選ぶことが可能である。

図表 19 ADP 蛍光法で得られるヒット化合物の作用点と偽陽性の可能性



図表 20 Dose-response curve of staurosporine



ADP 10 μM 存在下で staurosporine の濃度をふり、等量の ADP 検出試薬を添加、30 分後に蛍光値 (Ex. 540 nm / Em. 590 nm) を測定した。

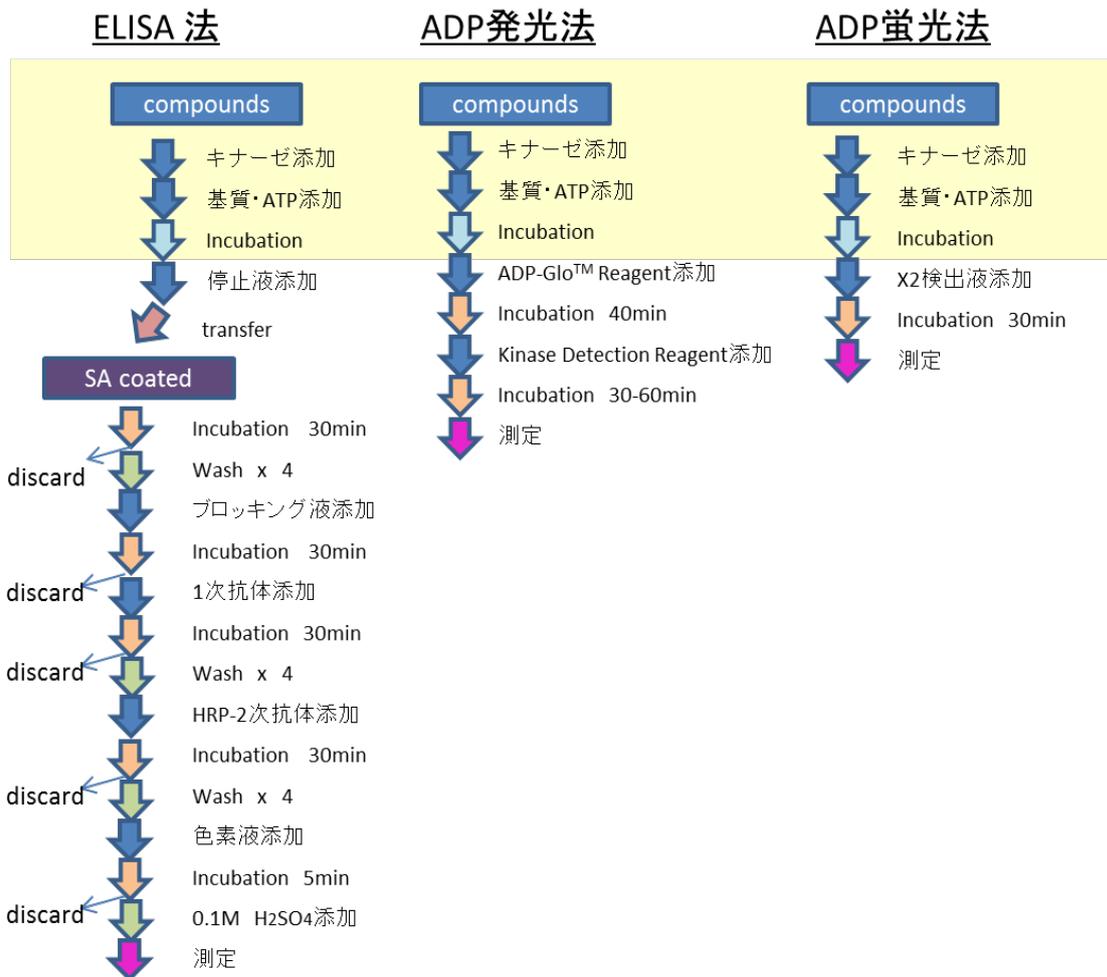
DMSO コントロールを 0% 阻害、ADP 非存在下での蛍光値を 100% 阻害として %inhibition を計算し、Prism で解析を行った。

2-4 従来法と新規活性測定法の比較

2-4-1 アッセイ手法の違い

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、有用性を検証するため、従来の ELISA 法、および現在広くキナーゼ HTS に使用されているキット ADP-Glo™法（ADP 発光法）との比較を行った。3 者のプロトコールの比較を図表 21 に示す。ELISA 法に比べると、ADP 発光法・蛍光法はともにステップ数が少なく簡便である。そして次にこの後者の二つを比較すると、ADP 発光法ではまず残存する ATP を消去（ADP-Glo™ Reagent 添加）してから、生成した ADP を ATP に変換して定量する（Kinase Detection Reagent 添加）ことから、検出に 2 工程必要で時間もかかるのに対し、本 ADP 蛍光法は ADP をそのまま定量するため 1 工程で検出でき、簡便かつ迅速にアッセイ可能である。

図表 21 ELISA 法、ADP 発光法、ADP 蛍光法のプロトコール比較



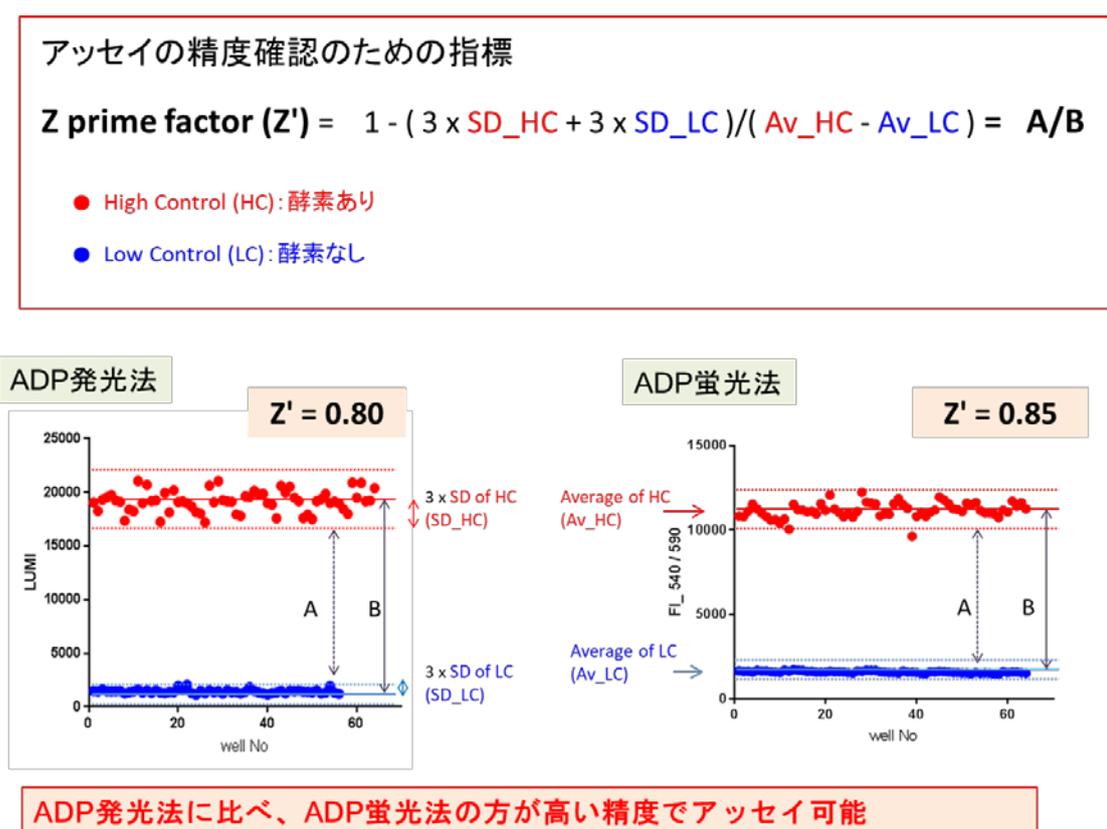
また、一般論として、発光法は化合物の自家蛍光や吸収の影響を受けにくいメリットがある一方で、発光シグナルの寿命が短いというデメリットがある。ADP-Glo™法では発光法としては比較的長時間、十分な発光値を示す（半減期が2時間程度）が、ADP 蛍光法で検出に用いているレゾルフィンにはさらに安定であり、20時間たってもほぼ同じ値であることが示されている（図表 18）。これは、実際の HTS 時に、大量のプレートを積んだ測定器のスタッカーに万が一問題が起きても、翌日までは何度でも再測定を行うことができる可能性があるということであり、実際の HTS において心強い。

また、発光法ではプレートの1ウェルあたりの容量を小さくする（小スケール化のメリットについては第五章を参照のこと）と、容量に応じてシグナル強度が下がるが、蛍光法ではあまり変わらない。このため、1536 化などの小スケール化は蛍光法の方がしやすいと言える。発光法で同じアッセイ条件で小スケール化した際の感度を保つためには1ウェルあたりの測定時間を増やすことで発光シグナルをあげることができるが、1プレートあたりの測定時間が増えることでその間のシグナル低下の影響を受けやすくなることと、あまり長い測定時間で HTS を実施することは現実的には難しい。対応策としては、CCD カメラタイプの測定器で測定することが考えられるが機器の導入が必要である。

2-4-2 比較検討結果① アッセイ系のバラツキについて

まず、ADP 発光法および ADP 蛍光法を用いて 384 プレートでアッセイした際のバラツキを比較した。HTS を行う上でアッセイ系の精度を確保することは重要であり、一般的には Z prime factor (Z')といわれる、アッセイ系のばらつきを考慮した指標を算出して、アッセイの精度確認を行う (図表 22)。この Z' を、ADP 発光法と ADP 蛍光法でのアッセイ結果から比較したところ、ADP 発光法では 0.80 なのに対し、ADP 蛍光法では 0.85 と発光法より高い精度でアッセイ可能であることが示された。

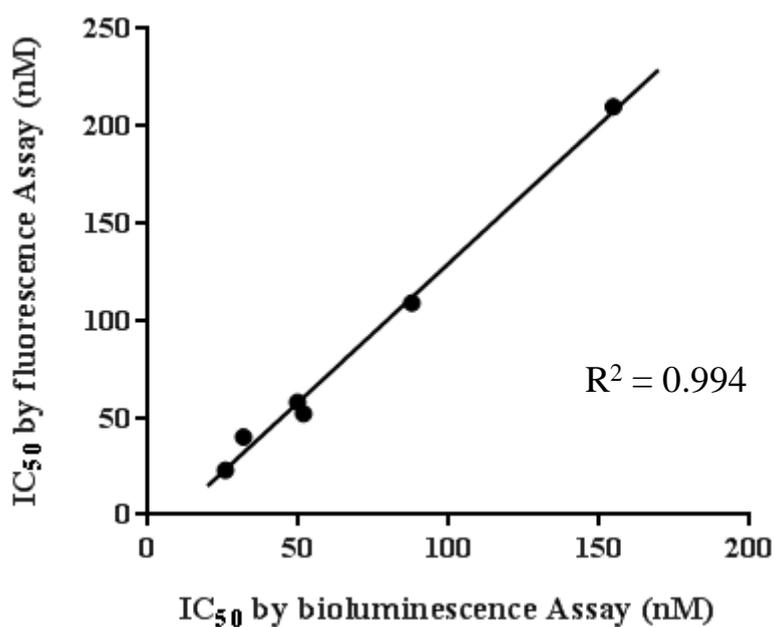
図表 22 ADP 発光法と ADP 蛍光法のバラツキの比較検討結果



2-4-3 比較検討結果② 阻害活性値の比較

また 6 つのキナーゼ（CLK1）阻害剤について、同様に 384 プレート内でアッセイを行い、ADP 発光法および ADP 蛍光法でそれぞれ検出して CLK1 キナーゼ阻害活性を比較したところ、ほぼ同一の IC₅₀ 値が得られたことから、ADP 発光法と ADP 蛍光法ではほぼ同じ阻害活性の結果が得られることが示された（図表 23）。

図表 23 キナーゼ阻害剤の IC₅₀ 値測定結果



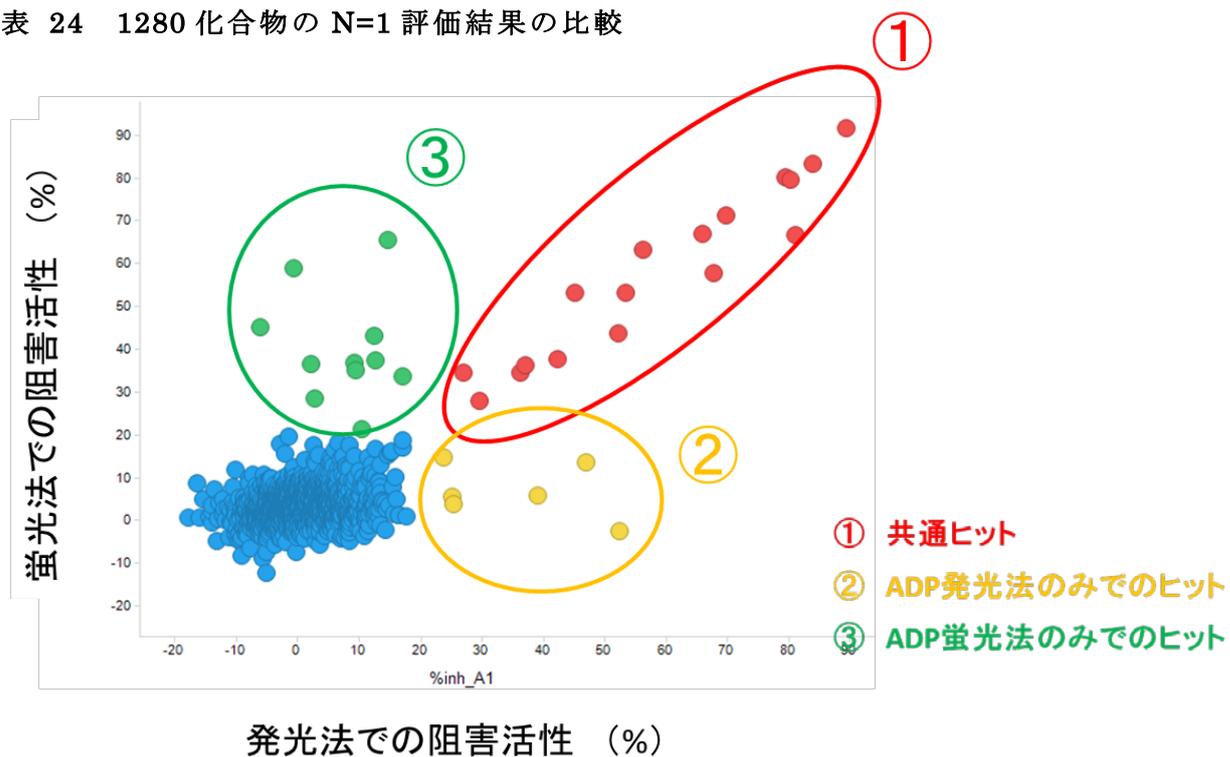
Two parallel kinase assays were conducted in the 384-well format in the same condition as primary screening and detected by different two methods, one using ADP fluorescence assay, and the other using ADP bioluminescence assay. The IC₅₀ values were calculated from the results of each assay, and the correlation was examined between the fluorescence assay and bioluminescence assay results. The line corresponds to the fitting of a simple linear equation to the data.

2-4-4 比較検討結果③ 化合物の N=1 評価結果の比較

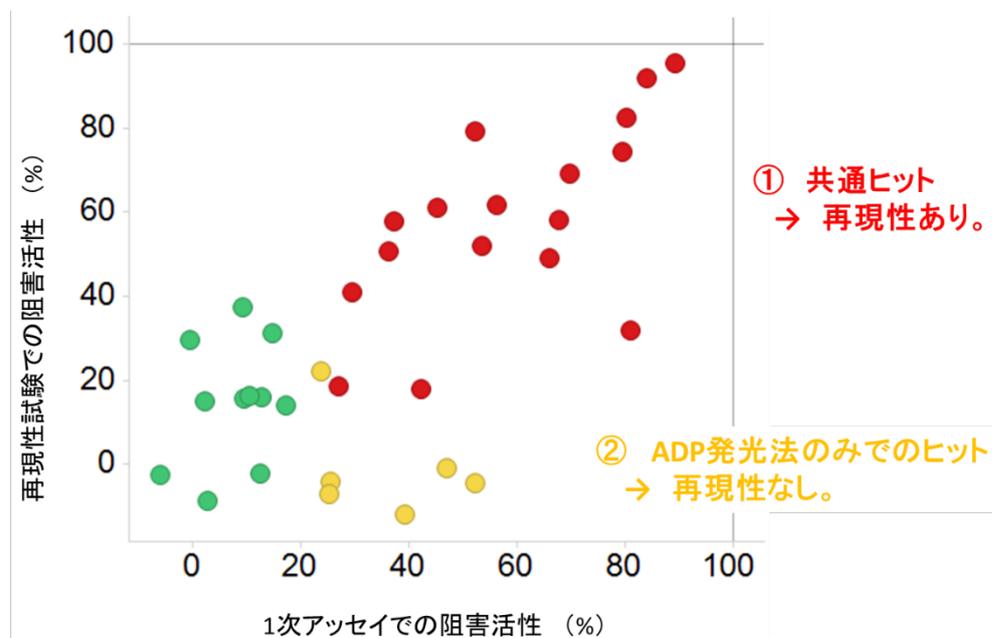
さらに、両者の検出法を用いて HTS を行った際、得られるヒット化合物に違いがあるのかどうかを検証するため、創薬機構で保有する 1280 個の化合物ライブラリーを用いて、CLK1 キナーゼに対する阻害活性評価を N=1 で行い結果を比較した。その結果、図表 24 に示すように、①両方法ともにヒットとなる共通ヒットと②ADP 発光法でのみヒットした化合物、および③ADP 蛍光法でのみヒットした化合物、の 3 種類のヒットが得られた。この 3 種類のヒットについて、各検出系で再現性を確認したところ、①共通ヒットはともに再現性があり、真のヒットである可能性が示唆されたが、②発光法でのみのヒットは再現性が取れなかった（図表 25）。このことから、ADP 発光法により再現性良く得られるヒットは ADP 蛍光法でも同様にヒットとして得られることが示された。一方、③蛍光法でのみのヒットは再現性があつた（図表 26）。これら③の化合物は ADP 発光法では阻害活性を示さないことから真のヒットではないと考えられる。③の化合物が ADP 蛍光法でのみヒットとなる理由としては、前述の通り、検出に関わる 3 つの酵素を 1 つ以上阻害する可能性や、レゾルフィンの蛍光を阻害するような化合物である可能性が挙げられ、実際にキナーゼ非存在下でリファレンスアッセイを行うと、ADP の検出も阻害することが確認された（図表 27）。

以上より、ADP 蛍光法では、系特有の偽陽性が発生する可能性があるが、真のヒットと考えられる化合物については、どちらのアッセイ系を使用しても取得できると、およびリファレンスアッセイを実施することで偽陽性を効率的に排除できる可能性が示された。

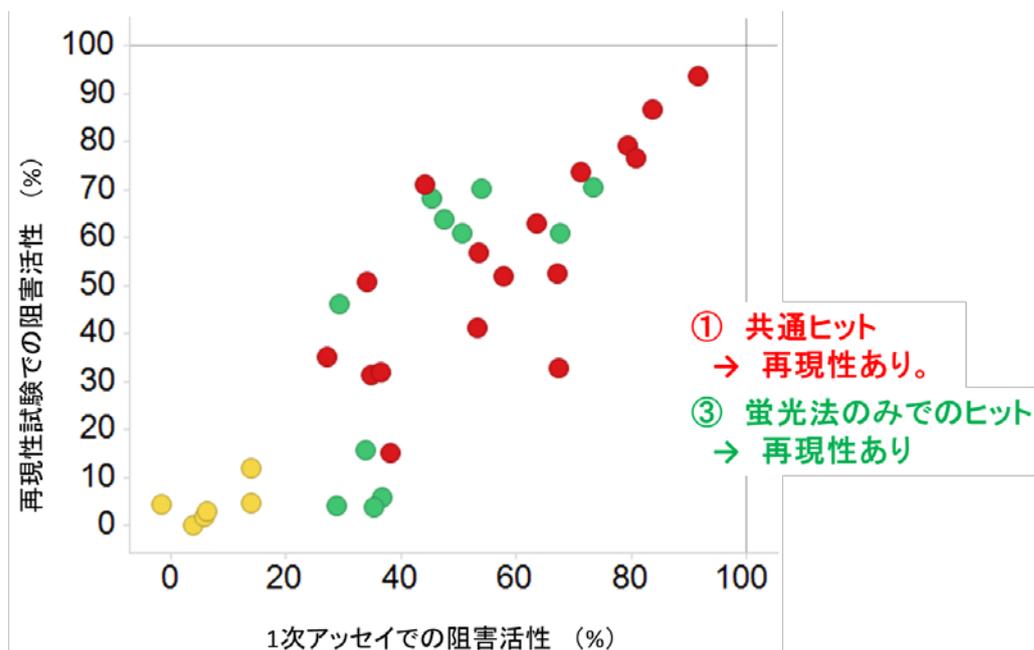
図表 24 1280 化合物の N=1 評価結果の比較



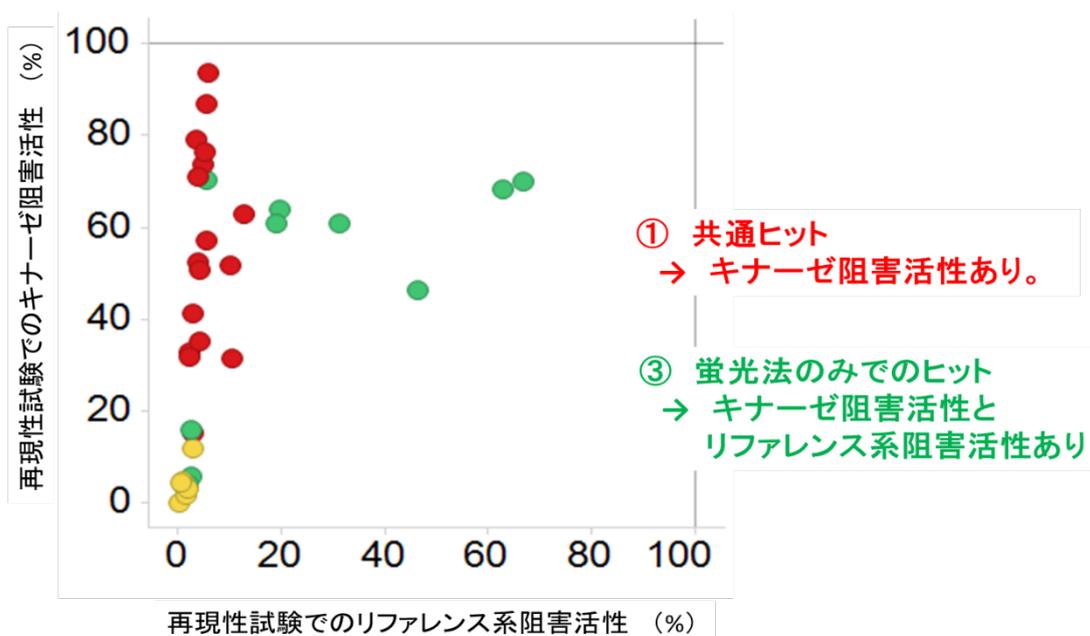
図表 25 発光法における 1 次ヒットの再現性試験結果



図表 26 蛍光法における1次ヒットの再現性試験結果



図表 27 蛍光法におけるヒット化合物のキナーゼアッセイとリファレンスアッセイでの活性比較



2-5 小括

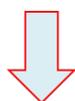
以上より私は、まず糖転移酵素活性法の一部の反応を利用し、より創薬ターゲットとしても注目され、広範囲に研究が進められているキナーゼの活性測定法を構築した。この新規キナーゼ測定法（ADP 蛍光法）を、汎用されている ADP 発光法と比較検討した結果、アッセイ系の精度は同等以上であり阻害剤の阻害活性も同等に評価が可能、また N=1 で評価した際も従来法と同じヒット化合物を選抜可能であることが示された。

工程数が少なく短時間で、かつ高精度に HTS ができる可能性がメリットである一方、デメリットとして検出系を阻害する偽陽性が多くヒットすることが懸念された。また少ない枚数では精度よく評価可能でも、多枚数の評価になると精度が悪くなってしまうことも多い。そこで次に、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れくらいヒットし、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、実際にキナーゼ阻害剤探索の HTS を実施することとした。

図表 28 新規キナーゼ活性測定法（ADP 蛍光法）の検証

本ADP蛍光法は、

- ADP発光法と比較して、工程数が少なく短時間で、かつ高精度にHTSが実施可能
- 検出系を阻害する偽陽性が多くヒットする可能性あり



- ✓ 実際に大規模HTSが迅速かつ高精度に実施可能かどうか？
- ✓ 検出系を阻害する偽陽性がどれくらい発生するか？
- ✓ その偽陽性をきちんと除けるかどうか？

=> HTSプラットフォームとして有用かどうか？



21万化合物について、実際のキナーゼHTSを行い検証する

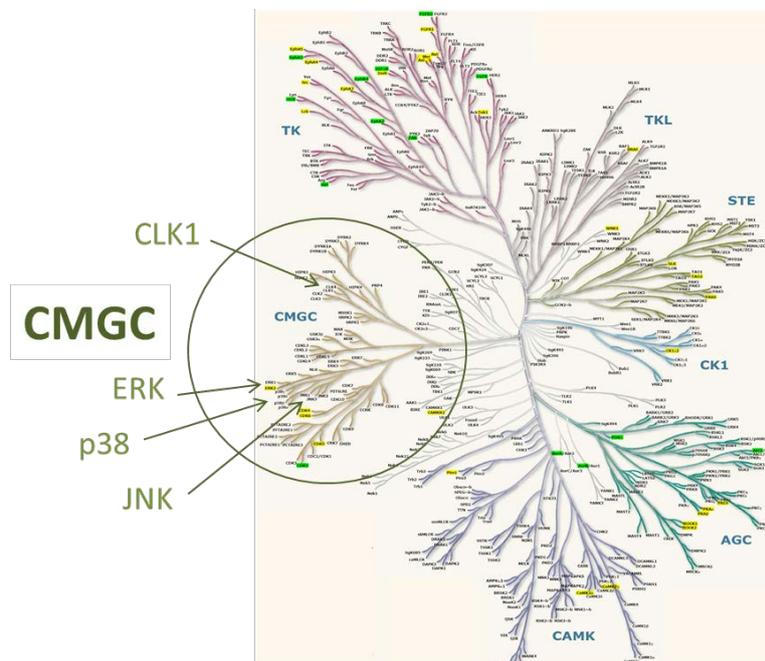
第三章 新規キナーゼ活性測定法を用いたキナーゼ HTS 実施結果

3-1 HTS 実施のためのアッセイ系構築

3-1-1 CDC2-like kinase1(CLK1)について

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 (図表 29)。CLK1 は serine/threonine と tyrosine の両方をリン酸化できる dual specificity kinase であり、mRNA のスプライシングに重要な serine-and arginine-rich (SR) protein をリン酸化することで、RNA の alternative - splicing を制御している重要な蛋白質である²⁴⁻²⁷。アルツハイマーなど脳神経変性疾患との関連が報告されており、TG003、KH-CB19、Leucettine L41 など様々な CLK1 阻害剤が報告されているが、まだ薬として臨床では使われていないため、活性の強い新規骨格の発見が待たれている²⁸⁻³⁵。

図表 29 CLK1 は MAPK と同じ CMGC グループに属する



3-1-2 条件検討

キナーゼ活性の濃度依存性と反応時間

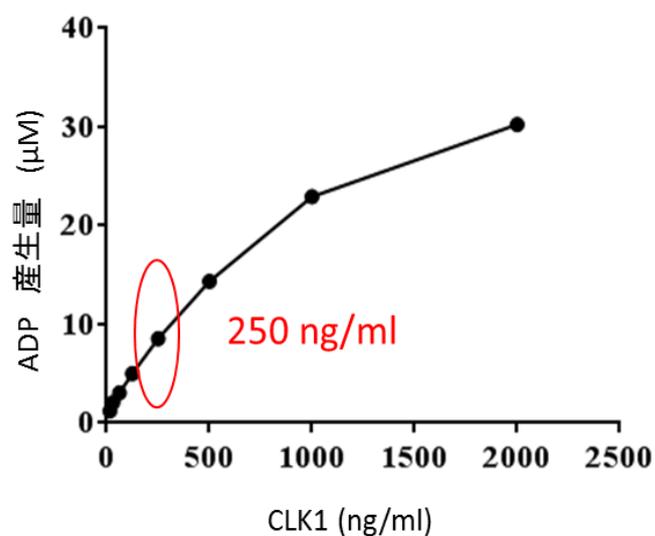
アッセイ系構築のため、まずは CLK1 濃度と反応時間を決定すべく、以下の通り検討を行った。

CLK1 濃度依存的な ADP 産生量を測定し、反応の線形性があり、かつ S/B (signal/background) が 2 以上、という最適な CLK1 濃度を 250 ng/ml とした (図表 30)。その条件におけるリン酸化反応時間依存的な活性 (ADP 産生量) の変化を確認し、線形性が十分にあり、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 (図表 31)。

ここで、キナーゼの反応温度は常に室温 (25℃) とした。37℃の方がキナーゼ活性は高くなると考えられるが、インキュベーション時にプレートの温度を上げることで、プレートの中央と端で測定値が異なってしまう“エッジ効果”が出やすくなるからである。その理由は、インキュベータ内と実験室内の温度差があるとインキュベーション前後で反応液の温度変化が起こり、その際プレート内のウェル位置によって変化速度が異なるため、それが活性の違いとなって表れてしまう場合があるためである。(インキュベーション時間が短いほど起こりやすいと考えられる。) また温度が高い方が反応液の蒸発が起こりやすいため、インキュベーション中の乾燥も懸念されるが、密閉容器 (タッパー) の中に水に浸したキムタオルなどを引き、その上にプレートを入れて湿度 100%の密閉状態でインキュベーションすることで、乾燥の影響

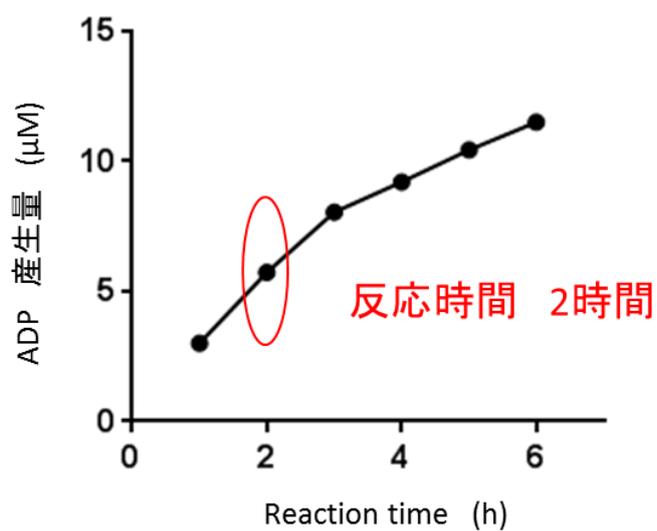
は抑えられる。室温でのインキュベーションでも反応時間が長い場合は同じく乾燥の影響が気になるため、上述のようにタッパーに入れてインキュベーションするようにしている。また、一口に室温といっても夏と冬で異なるため、実際は 25℃のインキュベータ内で反応させるようにしている。

図表 30 ADP 産生量のキナーゼ濃度依存性



Progression curves with various concentrations of CLK1 to determine the optimal kinase concentration. Incubation time was 2 h and other conditions were the same as described in Materials and Methods. N=4.

図表 31 ADP 産生量のキナーゼ反応時間依存性

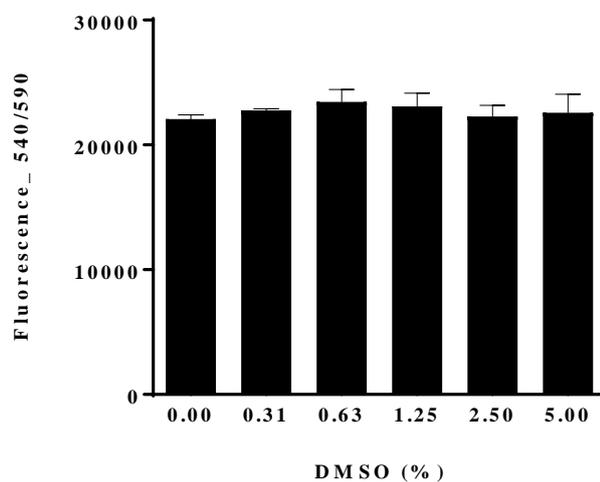


Optimization of incubation time for kinase reaction. The incubation time for kinase reaction was varied; other conditions were as described in Materials and Methods.

DMSO 耐性の確認

HTS で評価を行う化合物は全て DMSO に溶けているため、評価する濃度に応じた DMSO の混入が避けられない。そのため、あらかじめ DMSO によるキナーゼ反応への影響があるかどうかを調べた。その結果、図表 32 に示す通り、5%までは影響がないことが確認された。

図表 32 DMSO 耐性検討結果



DMSO tolerance was assessed by CLK1 assay in the presence of 0.0%, 0.31%, 0.63%, 1.25%, 2.50% and 5.0% DMSO. Error bars represent the SD for four wells. CLK1 concentration was 7.2 nM, incubation time was 2 h, and other conditions were as described in Materials and Methods.

ATP 濃度については、CLK1 と ATP の K_m は $11 \mu\text{M}$ であるとされているが、十分なシグナルを得つつ、ATP の消費が 10%以内で収まることを優先し、 $\text{ATP} = 100 \mu\text{M}$ でアッセイを行うこととした。その際、最終的にキナーゼ反応で産生される ADP は $10 \mu\text{M}$ 程度となるようにし、基質濃度については、リン酸化部位が 1 か所であることから、反応に必要な十分量として $25 \mu\text{M}$ とした。

以上より、HTS のアッセイ条件を以下の通りとした。

CLK1 濃度 : 250 ng/ml

基質濃度 : $25 \mu\text{M}$

ATP 濃度 : $100 \mu\text{M}$

化合物評価濃度 : $10 \mu\text{M}$ (1% DMSO)

Incubation time : 2 h at Room Temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)

使用する buffer には、化合物の凝集を防いだり、酵素や基質などが分注器流路のチューブ壁へ吸着するのを防ぐため、低濃度の界面活性剤（今回は 0.01% Tween 20）を入れている。濃い濃度を入れてしまうと機械での分注時に泡が立ちやすく、バラツキの原因になりやすいため、注意が必要である。

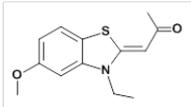
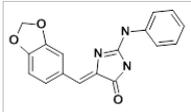
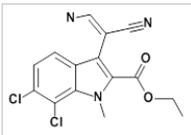
既知活性物質の活性確認と阻害活性の安定性について

前述のアッセイ条件において、既知の CLK1 阻害剤（TG003, Leucettine L41, KH-CB19）の阻害活性を調べたところ、ほぼ報告されている IC₅₀ 値と近い値が算出された。（図表 33）

また、そのうち LeucettineL41 の IC₅₀ 値を、キナーゼ反応時間を変えて測定したところ、図表 34 に示すように 3 時間まではほぼ同じ IC₅₀ 値を示すが、一晩経つと活性が落ちることがわかった。先にキナーゼの反応時間を 2 時間と決めたが、3 時間まではアッセイ系の感度として問題ない（同じ阻害活性を持つ化合物を同じ阻害活性値で検出できる）と判断した。

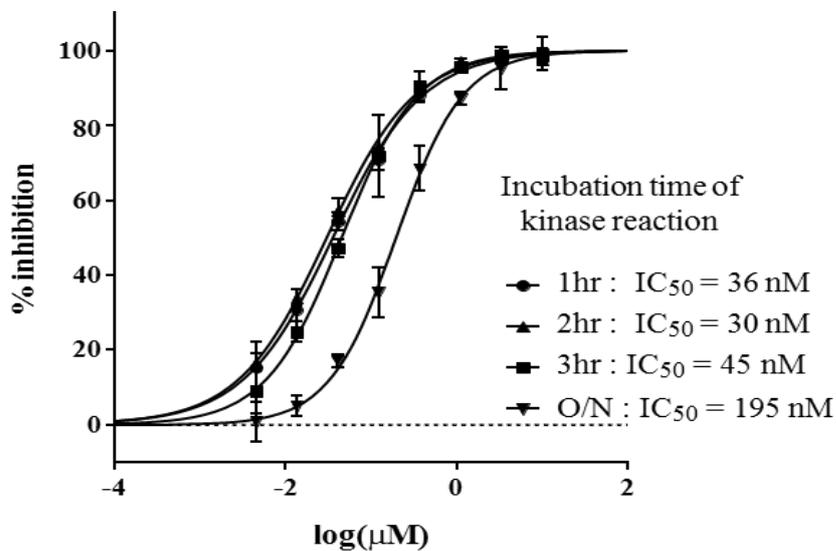
さらに、ADP 検出液を添加してからの阻害活性の安定性を確認するため、ADP 検出液を添加してから 1 時間後と 4 時間後の IC₅₀ 値を比較したところ、ほぼ同じ値であることが判明した（図表 35）。これにより、ADP 検出液を添加してから 4 時間後まで（1 時間後に測定を開始した場合、その 3 時間後まで）は阻害活性が安定して検出可能であると判断した。

図表 33 CLK1 の既知阻害剤の活性値測定結果の比較

Compound Name	Structure	IC ₅₀ (nM)	Reported IC ₅₀ (nM)
TG003		102	49 ^a
Leucettine L41		34	15 ^b
KH-CB19		12	20 ^a

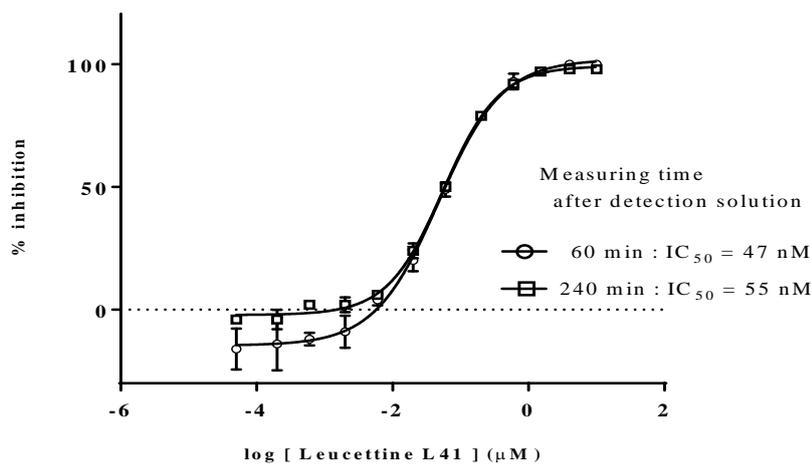
- a. Debdab, M.; Carreaux, F.; Renault, S.; et al. Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4172-4186.
- b. Coombs, T. C.; Tanega, C.; Shen, M.; et al. Small-molecule pyrimidine inhibitors of the cdc2-like (Clk) and dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated (Dyrk) kinases: Development of chemical probe ML315. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3654-3661.

図表 34 キナーゼ反応時間による阻害活性変化



Time dependency of dose-response curve and IC_{50} values of positive control (Leucettine L41), which were almost unchanged up to 3 h incubation for kinase reaction.

図表 35 ADP 検出液添加後の阻害活性の安定性



Dose-response curves of Leucettine L41. IC_{50} values were stable up to 4 h after addition of detection reagent at room temperature.

Note that where error bars are not shown, they are smaller than the symbols.

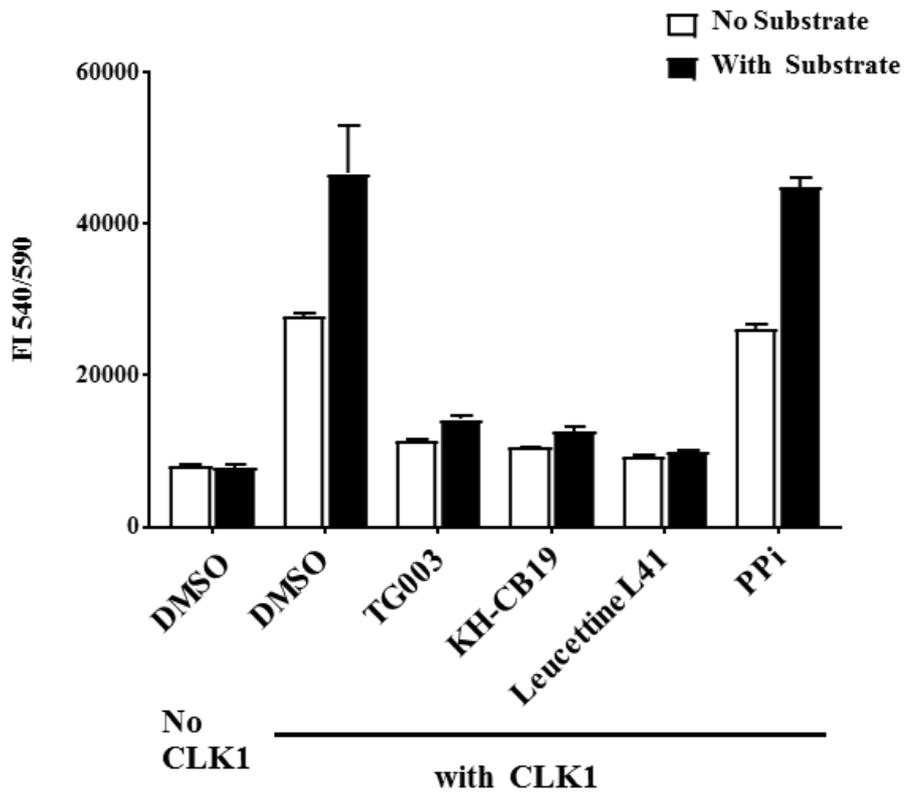
ADP 産生が CLK1 特異的なものであることの確認

本アッセイ法は ADP を検出することから、目的のキナーゼによる ADP 産生と、反応液に混入した他の酵素活性による ADP 産生を区別できない。万が一別の酵素の ADP 産生を見ていた場合、得られたヒットは本来のキナーゼではなく別の酵素の阻害剤であることになる。そのため、見ている ADP 産生が CLK1 によるものであることを確認するため、基質の有無、CLK1 の特異的阻害剤、および phosphatase 阻害剤添加による CLK1 の ADP 産生の変化を調べた。

その結果、図表 36 に示す通り、基質なしでも半分程度の ADP 産生が見られるものの、CLK1 の特異的阻害剤存在下では background 近くまで下がり、逆に phosphatase 阻害剤を添加しても ADP 産生量にほぼ影響がないことから、本条件で見ている ADP 産生は、ほとんどが CLK1 のキナーゼ活性によるものと判断した。基質がない場合でも ADP 産生が起こっている理由としては、CLK1 の自己リン酸化や内在的な ATPase 活性によるものが考えられる²⁸。

以上より、本アッセイで検出している ADP 産生は CLK1 特異的な活性によるものであり、これを指標として CLK1 阻害剤の探索を行うことで問題ないと判断した。

図表 36 基質と特異的阻害剤の有無による CLK1 活性の比較



CLK1 activity with and without 25 μ M substrate in the presence of known CLK1 inhibitors (1 μ M) or phosphatase inhibitor cocktail (PPI; 1/100 dilution). The average values of N=4 and standard deviation are shown.

3-2 フライブラリー（約 21 万化合物）の HTS 実施結果

3-2-1 HTS 実施概要

前項の検討結果を踏まえ、図表 37 に示すような手順で、創薬機構のフルライブラリー（214,106 化合物）に対し CLK1 の HTS を行った。本 HTS では最後の測定が一番時間のかかる段階であるため、検出液添加後、阻害活性の変わらないことが確認された 3 時間以内に測定できる枚数として 1 回の評価枚数を 60 枚以内とした。

1 次スクリーニングでは、214,106 化合物を最終濃度 10 μM になるよう、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。CLK1 の HTS 全体で使用した検出試薬代は約 26 万円であり、プレート代よりも安かった。

図表 37 HTS 実施概要

Assay Protocol

384-well microplate (30 or 60枚)

 ← 50 nl/well Compound (final 10 μM)

↓ ← 2.5 μl /well **CLK1 kinase** (final 250 ng/ml)

↓ ← 2.5 μl /well **ATP** (final 100 μM) & **Substrate** (final 25 μM)

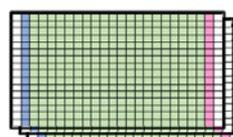
↓ incubation at RT for **2 h**

↓ ← 5 μl /well **ADP detection sol. (x2)**

↓ incubation at RT for 1h in the dark

↓ measurement of FI (ex540/em590)

* 320 化合物/plate をあらかじめ分注しておく



x 675 plates



30 or 60枚 (1-2万化合物)
を1回にまとめて評価

微量分注装置を使用



Multidrop Combi
(Thermo Fisher)

約2週間で 21万化合物の1次スクリーニングを終了した
(1-2万化合物/回 x 13回 アッセイを実施)

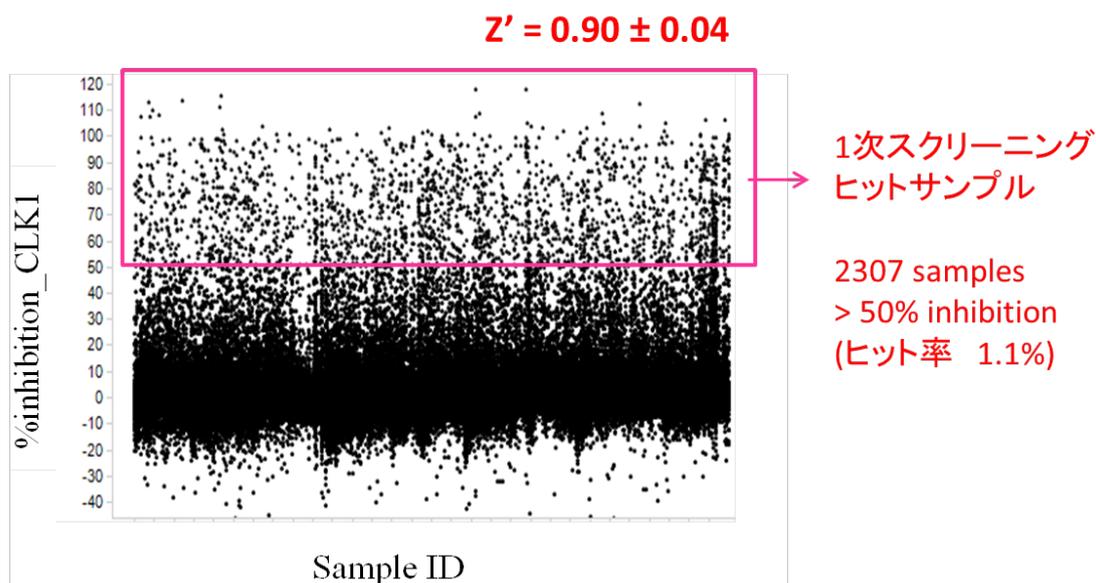
3-2-2 一次スクリーニング結果

図表 38 に CLK1 の HTS 結果を示す。散布図は各プレート内で HC 値と LC 値を元に各ウェルの阻害率を計算し、1 つにまとめたプロットで、合計 675 プレートの Z' の平均値は 0.90 と非常に高く、精度よく HTS が実施できた。DMSO コントロールのばらつきから 3SD(約 30%)以上の阻害活性を示したサンプルは優位に阻害活性が高くヒットと考えられるが、それではヒット数が 4760 (ヒット率 2.3%) と数が多すぎたため、活性が弱いと思われるヒットは不要と考えて、阻害活性が 50%以上の 2307 サンプル(ヒット率 1.1%) を今回は 1 次スクリーニングヒットとした。

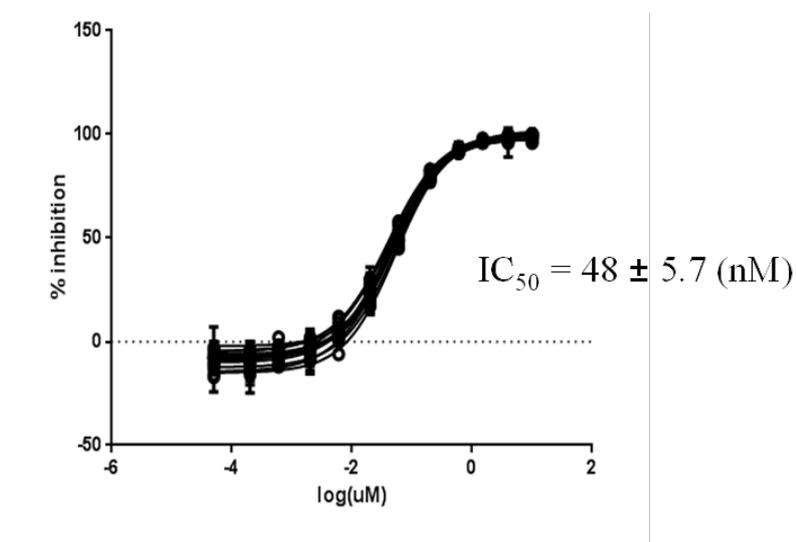
また、1 次スクリーニングの 675 枚のアッセイに関して、同じ感度でアッセイができていることを確認するため、positive control として既知の CLK1 阻害剤、Leucettinne L41 の容量作用曲線を毎回同時に評価し、HTS を通じてその IC₅₀ 値が変わらないことを確認した(図表 39)。

図表 38 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 μ M



図表 39 Leucettine L41 の容量作用曲線と IC_{50} 値

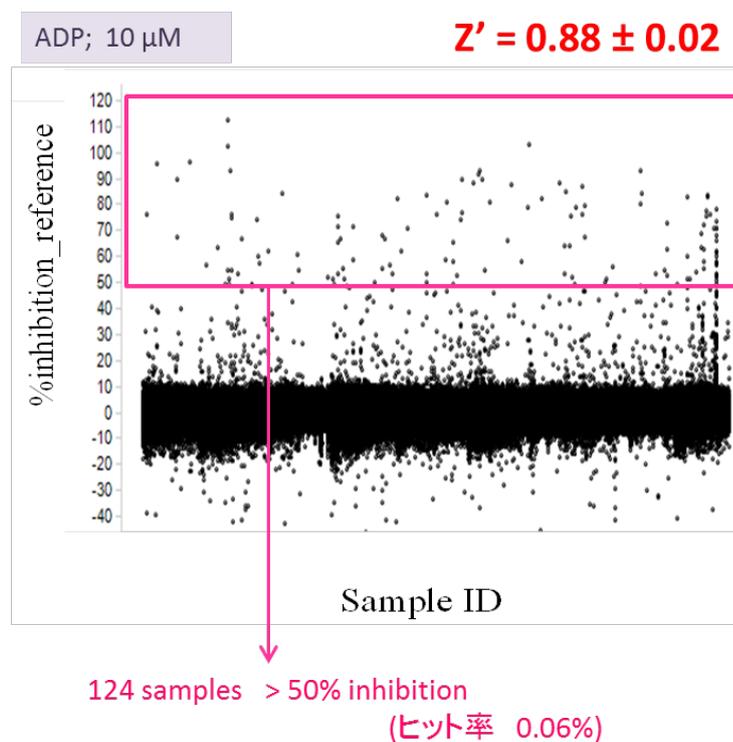


Overlay of all dose-response curves obtained for Leucettine L41, used as positive control, throughout the whole screening process. The mean value and standard deviation of IC_{50} were calculated from the results of 13 batches in primary HTS.

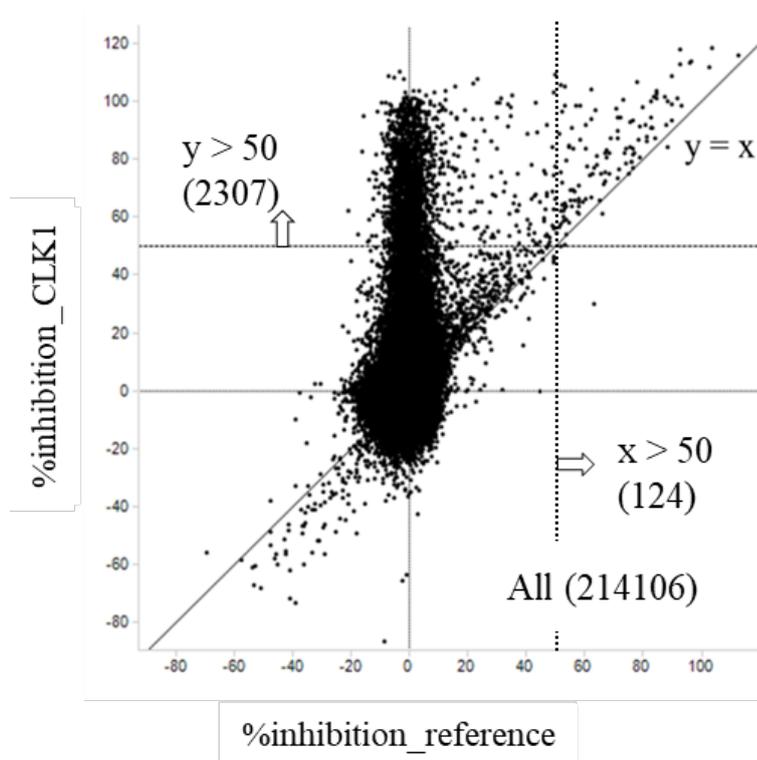
今回、検出系を阻害する偽陽性が全体でどれくらい発生するのかを調べるため、CLK1 の代わりに ADP 10 μ M 存在下で同様に評価を行うリファレンスアッセイを、同じく 214,106 サンプルについて行い、 Z' =0.88 と精度よく HTS が実施できた (図表 40)。両者の相関を見るため、横軸にリファレンスアッセイの結果、縦軸に CLK1 アッセイの結果をプロットしたものを図表 41 に示す。リファレンスアッセイで 50%以上の阻害活性を示したサンプルは 124 個、全体の 0.06%であり、CLK1 アッセイのヒット化合物 2307 の約 5%に相当する。このヒット化合物に対する偽陽性の割合は、クライテリアを 30%、40% inhibition と変えてもほぼ 5%と同じであった (図表 42)。

図表 40 リファレンスアッセイ 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 μ M



図表 41 CLK1 アッセイとリファレンスアッセイの結果相関図



図表 42 CLK1/Reference HTS 結果比較

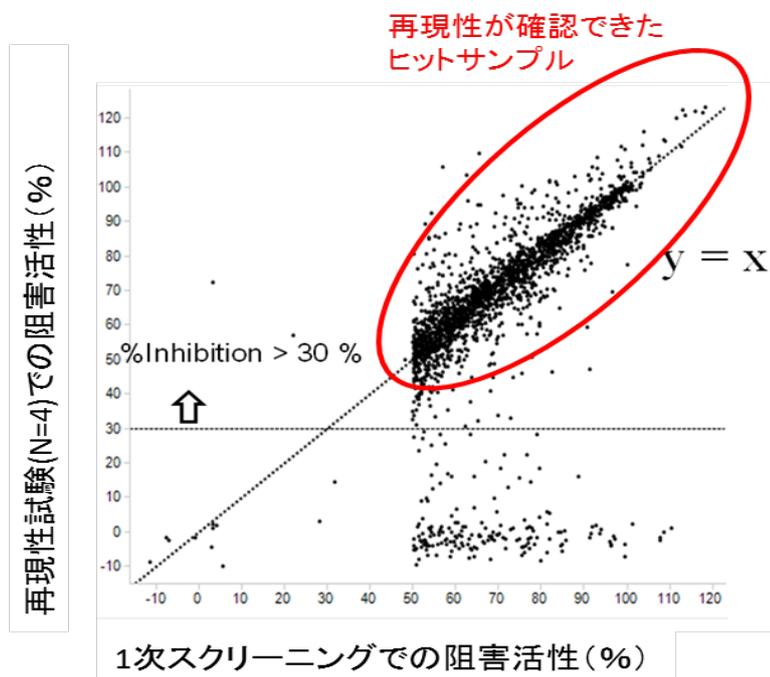
Criteria (%inhibition)	CLK1 assay		Reference assay		False positive hit rate (Ref / CLK) (%)
	Number of active compounds	Hit rate (%)	Number of active compounds	Hit rate (%)	
30	4718	2.2	268	0.13	5.7
40	3209	1.5	187	0.09	5.8
50	2307	1.1	124	0.06	5.4

Hit rates of primary HTS (CLK1 assay and Reference assay) and false-positive hit rate with different criterion values of % inhibition.

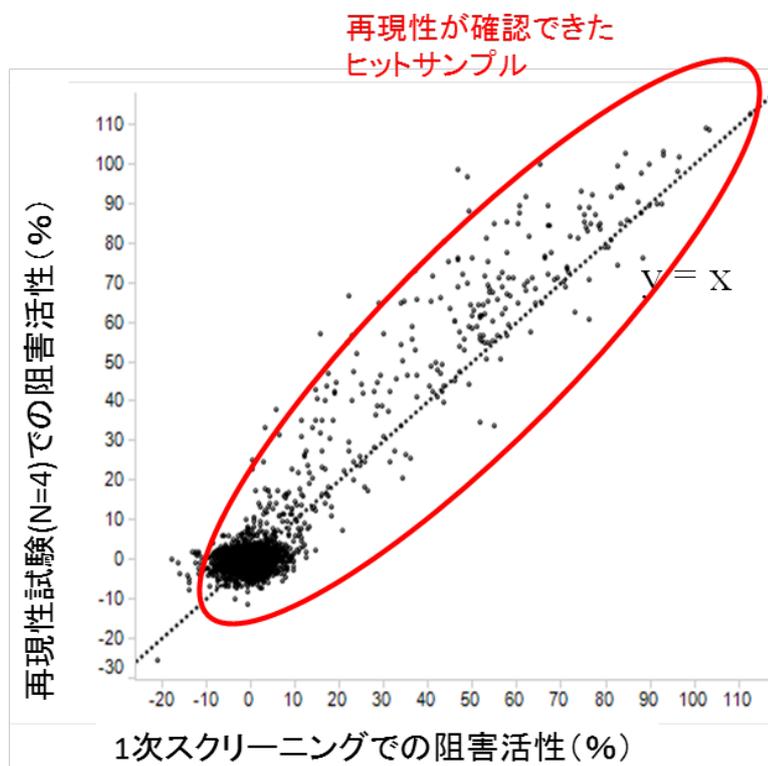
3-2-3 再現性試験結果と偽陽性排除

1次スクリーニングでヒットとした2307サンプルについて再現性を確認するため、N=4で再度同条件でアッセイを行い、その結果を、それぞれ横軸に1次スクリーニングの結果、縦軸に再現性試験での平均値をとってプロットした(図表43)。1次スクリーニングでCLK1阻害活性をしめした2307サンプルのうち、2030サンプル(88%)が再現性試験でも30%以上の阻害活性を示したが、277サンプル(12%)については1次スクリーニングでの活性の再現が見られなかった。一方、リファレンスアッセイの方も同様にプロットすると、ほぼすべてのサンプルで再現性が確認された(図表44)。このことから、CLK1アッセイで一部活性の再現が見られなかった原因は、詳細は不明だが、ADPの検出反応系の問題ではなく、キナーゼ反応時に何らかの問題が起きたことによるものと考えられる。

図表 43 CLK1 アッセイ再現性確認試験結果

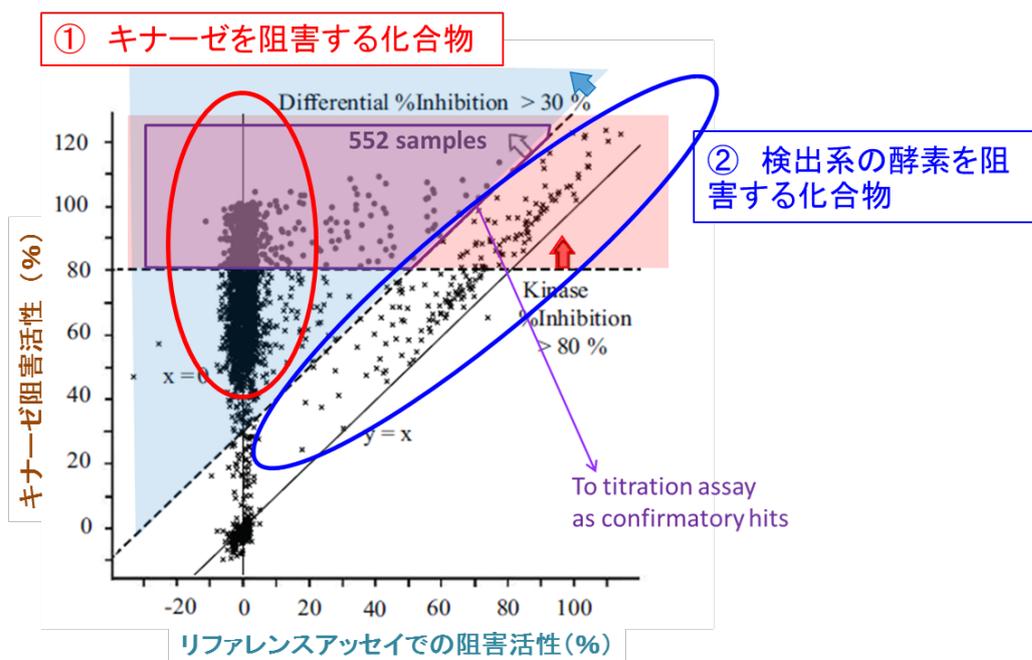


図表 44 リファレンスアッセイ再現性確認試験結果



HTS ヒットからこのリファレンスアッセイでヒットした偽陽性を除くため、再現性試験における CLK1 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 (図表 45)、 $x=0$ 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 CLK1 阻害活性が 80%以上ある 552 化合物を、再現性試験のヒットとした。

図表 45 偽陽性の除外について



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%

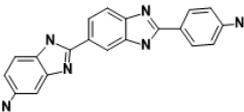
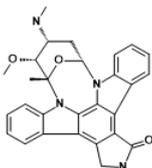
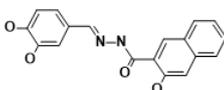
かつ

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 45 における②検出系の酵素を阻害する化合物の中で既知活性物質は Ro 90-7501、先に触れた Staurosporine、Dynasore であった (図表 46)。これらは偽陽性として HTS ヒットからは除外されたが、実際には CLK1 の阻害活性も有する可能性がある。特に Ro 90-7501 や Staurosporine は、CLK1 阻害活性が 100%以上で、リファレンスアッセイの活性よりも高いため、CLK1 阻害活性も有する可能性が高い。(100%以上の阻害活性が出るのは、ATP の分解等による ADP の混入がバックグラウンドとして存在し、検出系の阻害ではキナーゼ反応のみの阻害に比べてそのバックグラウンドの検出も阻害されるためと考えられる。)リファレンスアッセイで活性があっても、両者の活性の差が 30%以上あれば今回はヒットとして選抜されるが、30%以下のものはヒットにはならないので注意が必要である。ただ、こうした化合物は一般的に特異性が低いものと考えられるため、HTS の目的からすると大きな問題にはならないと考えている。

図表 46 ADP 蛍光法で偽陽性となった既知活性物質

Compound Name	Structure	% inhibition in Reference Assay	% inhibition in Kinase Assay
Ro 90-7501		89	110
Staurosporine		103	118
Dynasore		71	73

Known Active Compounds, which showed more than 50% inhibition in reference assay at 10 μ M were listed.

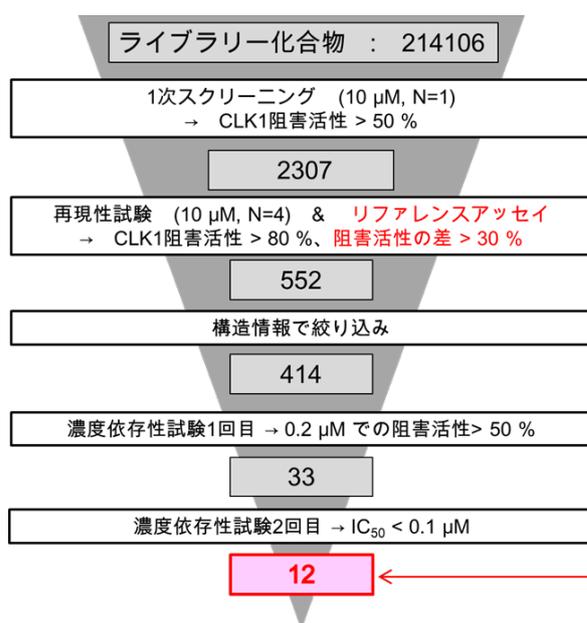
3-2-4 HTS フローチャートとヒット化合物について

図表 47A に CLK1 の HTS 全体のフローチャートを示す。構造等も考慮して再現性試験のヒット 552 化合物を 414 に絞り込んだのち、濃度依存性を確認し、最終的に IC₅₀ 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 47B に示すように、それらヒット化合物の容量作用曲線を見ると、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。またこれら 12 個のヒット化合物の構造式と IC₅₀ 値を図表 48 に示す。構造式を見比べると 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、その中にも同じ母核を共通骨格にもつ化合物が新たに 6 個 (合計 8 個) 存在することが判明したため (図表 49)、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る。

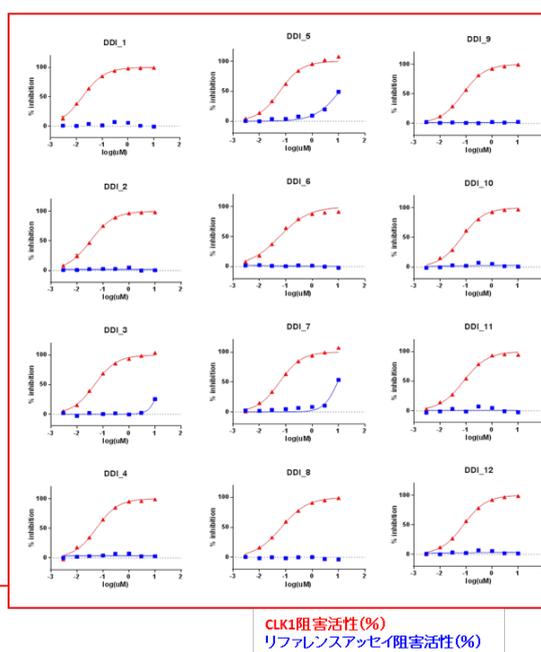
以上より、新規キナーゼ活性測定法により、CLK1 阻害剤の HTS を行った結果、活性の強い阻害剤に加え、新規母格も見つけることができた。

図表 47 CLK1 阻害剤探索の HTS 結果

A. HTSのフローチャート



B. 最終的なヒット化合物の容量作用曲線



- HTS全体にかかった検出試薬代は約26万円。(従来法のキットを使用した場合に比べ1/10以下。)
- 全体を通して、精度も再現性も問題なくHTSを実施できた。
- 再現性試験と同時にリファレンスアッセイを行うことで、検出系阻害剤と思われる偽陽性を効率よく除外できた。

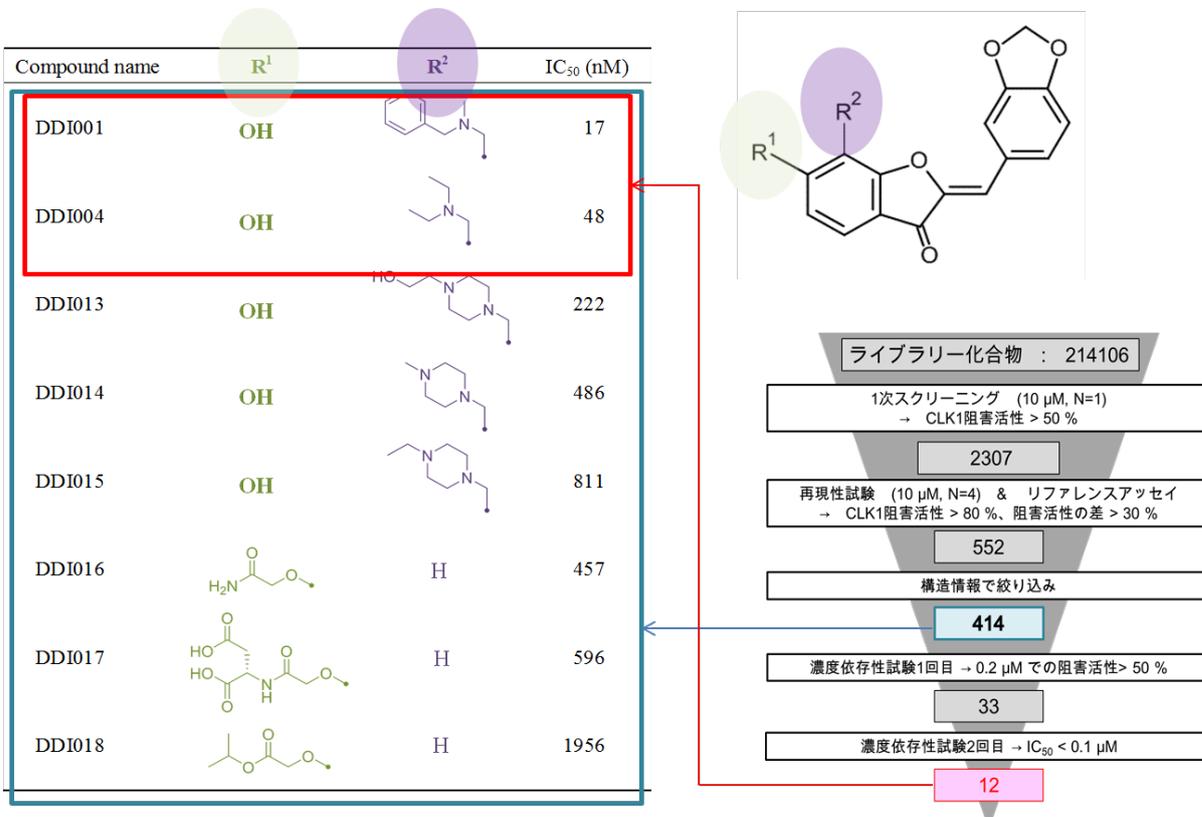
図表 48 HTS ヒット 12 化合物の構造式

Comp Name	Structure	IC ₅₀ (nM)	Comp Name	Structure	IC ₅₀ (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



共通骨格あり

図表 49 Derivatives of Potent CLK1 Inhibitor, DDI001



HTSヒット DDI001・004の共通骨格を有する化合物が、濃度依存性試験を行った414化合物の中に8個あることがわかった = CLK1阻害活性をもつ新規母核

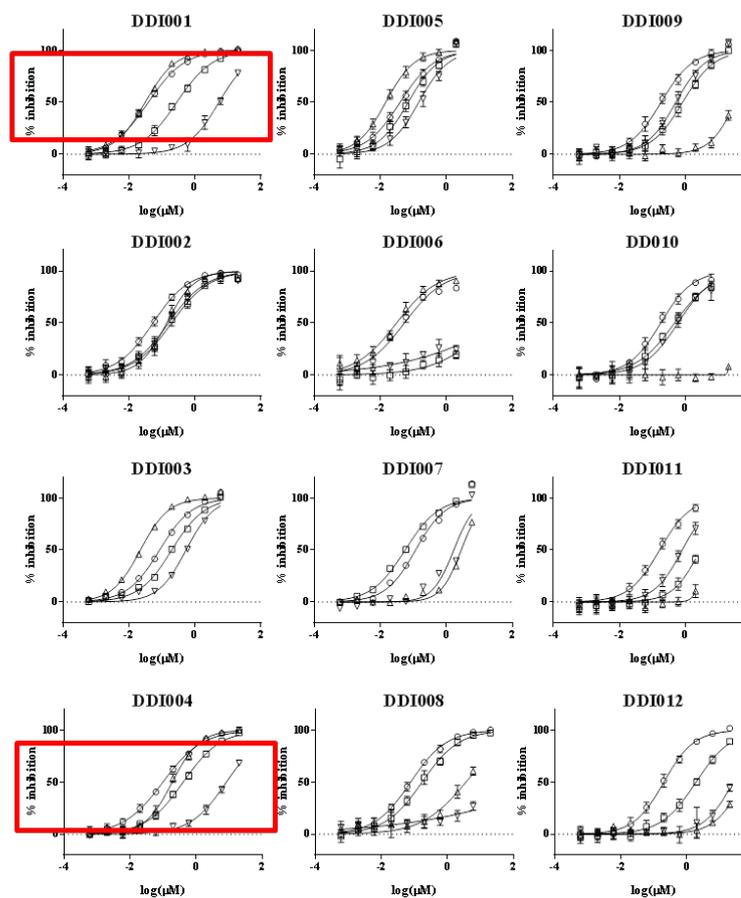
3-2-5 ヒット化合物のプロファイリング

キナーゼの選択性

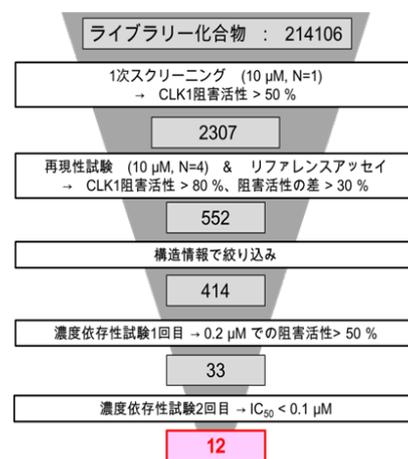
既知の CLK1 阻害剤の弱点として、キナーゼの選択性が低いことが挙げられる。そこで、今回のヒット化合物についてもキナーゼの選択性を調べるため、CLK1 との相溶性が高く同じくアルツハイマー病との関連が示唆されているキナーゼ群、CK1、DYRK1A、GSK3 について、その阻害活性を評価することとした²⁸。活性測定には、CLK1 と同じく ADP 蛍光法を用いることとし、アッセイ系構築簡略化のため、MBP (myelin basic protein) を共通基質として用いた。キナーゼ濃度は、購入元の Carna Biosciences の資料³⁶に基づき、CLK1 との相対的な活性からあたりをつけて、反応の線形性等を確認して決定した。結果は図表 50 に示すように、DDI011 と DDI012 が最も CLK1 特異的な阻害活性を示した。新規母核を有する DDI001 と DDI004 は似たようなキナーゼの選択性を示すことも確認できた。

以上より、新規キナーゼ活性測定法を用いて CLK1 以外のキナーゼ選択性も簡単に調べることができた。

図表 50 HTS ヒット化合物のキナーゼ選択性試験結果



- CLK1
- ▽ CK1d
- DYRK1A
- △ GSK3a



CLK1と相同性がある3つのキナーゼについても、同じADP蛍光法を用いて活性測定を行い、HTSヒット12化合物について、迅速かつ簡便に選択性試験を行うことができた。同じ母核をもつDDI001と004は似たようなキナーゼ選択性をもつことが確認できた。

キナーゼアッセイで用いる基質の選択について

ADP 検出法のメリットとして、基質によらないアッセイ系の構築が可能であることが挙げられるが、その HTS によって得られるヒットについては、そこで用いる基質によって、ある程度違いが出てくる可能性があり、基質特異的な阻害剤を得たい場合は、できるだけその基質を用いた方が良いと考えている。実際に、CLK1 の基質として DYRKtyde を用いた場合 (HTS 時) と MBP を用いた場合 (キナーゼの選択性試験の時) で比較したところ、化合物によっては阻害活性が異なるものがあった (図表 51)。基質が異なる以外、CLK1 濃度や反応時間等の条件は両者で同じであるため、IC₅₀ の違いは、主には基質の違いによるものと考えられる。

一方、基質特異性をそれほど求めない場合は、本来の基質が不明でも、今回のように MBP のような様々なキナーゼによってリン酸化されうる基質を利用することができる。キナーゼの基質特異性が高く、MBP などをリン酸化できない場合はアッセイできないため注意が必要である。CLK1 は本来 MBP に対する反応性は低いですが、N 末の基質認識部位を除いた、キナーゼドメインのみを HTS に用いているため、そのまま MBP でもアッセイが可能であった³⁷。究極的には、ATPase 活性が比較的高いキナーゼについては、基質なしでその ATPase 活性を測定することで阻害剤の探索が可能であると考えている。

図表 51 基質の違いによる IC₅₀ 値の違い

Compoundname	IC ₅₀ (nM) _DYRKtyde	IC ₅₀ (nM) _MBP
DDI001	17	39
DDI002	35	54
DDI003	40	85
DDI004	48	99
DDI005	51	40
DDI006	51	54
DDI007	54	118
DDI008	63	77
DDI009	73	180
DDI010	73	177
DDI011	84	163
DDI012	86	201
TG003	102	92
Leucettine L41	34	36
KH-CB19	12	14

基質のリン酸化とその阻害活性の確認

本方法は ADP の産生を検出しているだけであるから、念のため、ヒット化合物が実際に基質のリン酸化を阻害していることを確認しておく必要があると考えた。そのため、基質のリン酸化を定量的に検出可能な mobility shift assay でヒット化合物のいくつかを評価し、実際に CLK1 による基質のリン酸化をヒット化合物が阻害することを確認した (図表 52)。

最終的には標的キナーゼとヒット化合物の複合体の結晶構造や NMR 構造を解析し、確かに複合体をとっていることを確認できるのが理想的である^{38, 39}。さらにはそこで結合様式の解析をすることで、その情報をもとに、より活性の強いリード化合物の取得へつながる可能性がある。

図表 52 CLK1 阻害剤とヒット化合物の Mobility Shift Assay による IC₅₀ 値

Compound Name	IC ₅₀ (nM)		
DDI001	25	±	1.8
DDI002	76	±	24
DDI003	65	±	10
DDI004	93	±	21
DDI009	72	±	28
KH-CB19	13	±	1
Leucettine L41	49	±	12
TG003	153	±	33

3-3 小括

新規 ADP 蛍光法を用いて、CLK1 の阻害活性を迅速かつ高精度に測定できるアッセイ系を構築し、実際に約 21 万化合物の HTS を実施した。その結果、1 次スクリーニングの $Z' = 0.90$ と高い精度で HTS を実施できた。価格も従来のキットを使用した場合にくらべ 1/10 以下と低いため、同じ予算で約 10 倍多くの化合物を評価できることになり、より良いヒット化合物を得る確率を上げられるという意味で重要である。

当初の予想通り検出系特有の偽陽性が出たが、リファレンスアッセイ結果と比較を行うことで効率よく除くことができ、最終的には IC_{50} 値が $0.1 \mu\text{M}$ 以下の強いヒット化合物を 12 個と新規母核を得ることができた。

また、キナーゼの種類と濃度を変えるだけで、簡単に数種類のキナーゼの特異性を検証することができ、本方法に汎用性があることも示すことができた。

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が実証できた。

第四章 総括

安価で簡便な ADP 変換カップリング反応を応用し、迅速かつ精度の高いキナーゼ活性測定法を構築した。従来法（ADP 発光法）と比較したところ、同等以上の高い精度をもつ robust なアッセイ系であることが示唆され、既知のキナーゼ阻害剤の評価結果から従来法と同等の阻害活性を検出できることが示された。また 1280 化合物を N=1 で評価したところ、従来法と同じヒット化合物を得られることが示された。

この新規キナーゼ活性測定法の HTS における有用性を検証するため、約 21 万化合物の HTS を実施し、 $Z' = 0.88 - 0.90$ と高い精度で 50% 以上の阻害活性を示す 2307 化合物を 1 次スクリーニングヒットとして得ることができた。再現性試験と同時にリファレンスアッセイを行うことで偽陽性を効率よく除き、従来法の 1/10 以下の価格で、迅速に精度よく CLK1 阻害剤とその新規母核を見つけ出すことに成功した。他のキナーゼについても同様に本方法を用いて評価を行い、アッセイ系としての汎用性が高いことも確認できた。

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した。

第五章 今後の展望

5-1 プレートの小スケール化について

今回は 384 プレートで HTS を実施したが、通常の HTS の現場では 1536 プレートもよく使われており、1536 化することで、より効率的に短時間で、かつ少ない試薬の量で HTS を実施することが可能になる。これは、時間的にも金銭的にも HTS にかかる負担を軽くすることであり、1536 化への可能性は HTS プラットフォームとしては大事な要素である（図表 53）

図表 53 アッセイ少量化のメリット

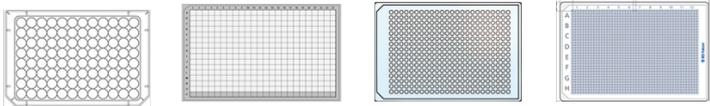


plate タイプ	96	384	384 sv*	1536
標準的なアッセイ容量 (μL/well)	100	30	5	2
21万化合物評価した場合のプレート枚数 (枚)	2,626	657	657	165

*Small Volume plate

スケールダウンすることで、大幅に時間や労力を削減可能

5-2 リアルタイム測定への応用

リン酸化反応の停止メカニズムとしては、ADP 発光法では ATP を分解除去することで停止させていると考えられるが、新規キナーゼ活性測定法では、NEM (N-Ethylmaleimide)による還元剤ブロックとキナーゼ反応に重要な反応部位のシステイン残基をブロックすることでキナーゼ反応を停止させるメカニズムとなっている。そのためキナーゼによっては完全に反応が停止しない場合があるので注意が必要である。その一方で、逆にそのような還元剤が不要なキナーゼについては、キナーゼ反応開始と同時に ADP 検出液 (NEM 非添加) も添加し測定を行うことで、キナーゼ活性の変化をリアルタイムに測定し、その時間依存的な変化を追うことも可能である。

5-3 キナーゼ以外の酵素活性測定法への利用

本キナーゼ活性測定法で利用した ADP 検出法は、キナーゼ以外でもその酵素反応により ADP を生成する他の酵素、例えば ATPase や分子シャペロンなどの活性測定にも利用できると思われる。

また、lysate などの夾雑物が不明なサンプルでは ADP 産生が目的の酵素以外でも起こる可能性があるため、ある特定の酵素活性を測定することは難しいが、精製された純度の高いサンプルであれば、膜蛋白質であっても均一に可溶化が可能であればアッセイ可能であると考えられる。さらには、目的の酵素 (A) が ADP を産生しなくても、その酵素が制御する酵素 (B) が ADP 産生を行うものであれば、両者の共存下でアッセイを行い、酵素 B の活性を測定することで、間接的に酵素 A の活性も測定可能であると考えている。

以上より、本キナーゼ活性測定法としての ADP 検出法は、創薬ターゲットとして有用なキナーゼの活性測定のみでなく、ADP を産生するあらゆる酵素や、キナーゼを直接制御する他の酵素についても活性評価が可能であると考えられる。

まとめ

HTS の登場により、人類は狙った標的に狙った作用を示す化合物を網羅的に、serendipity に（ほとんど）頼らず探し出すことが可能となったと言える。その成果が「分子標的薬」などで現れてきてはいるが、個人的にはまだその技術を活かしきれていないように感じている。その理由としては、第一には化合物ライブラリーへのアクセスが限られていたこと、第二の理由としては HTS 実施にはかなりの費用がかかること、により HTS を行う研究者が絶対的に少ないためだと考える。

第一の理由については、以前は大規模ライブラリーを保有する一部の製薬企業しか HTS が実施できなかったが、近年は日本でも公的な大規模ライブラリーが整備され、アカデミアの研究者等広く利用可能となっており、状況は改善されたように思われる⁴⁰。

第二の費用については、HTS が大規模スクリーニングである以上仕方がない面もあるが、同じアッセイでも条件検討の際に費用面も気をつけてアッセイ構築を行うことでかなり減らすことも可能である。例えば反応量（1 ウェル=1 化合物評価に要する容量）を減らすことができれば、検出試薬代を節約することが可能である。酵素アッセイでは酵素の濃度を 1/2 にするだけで（必要に応じて反応時間を 2 倍にすることで S/B が小さくならないように工夫して）全体で必要となる酵素量を半分にすることができる。コストを下げたために感度が悪くなり肝心の欲しいヒットが得られな

いようでは困るが、うまくバランスを取ってコストを下げ、その分評価する化合物数を増やすことができればその方がヒットを得る確率を上げることができる。

つまり 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。今回開発した ADP 蛍光法を用いたキナーゼ活性測定法は、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キナーゼ活性を測定できる、優れたアッセイ系プラットフォームである。高精度に HTS を実施するためには、操作が簡便である必要があるが、本キナーゼ活性測定法は、キナーゼ反応液に ADP 検出液を等量添加するだけで 30 分後には測定可能であり、シグナルは一晩安定と、これ以上ない簡便さである。

現在広くキナーゼ活性測定に汎用されている ADP 発光法と比較したところ、同等以上の精度、かつ 1/10 以下の価格で、従来法と同等の結果を得られることが示された。また、実際に 21 万化合物の HTS を実施した結果から、本方法が様々な面で有用な HTS プラットフォームとなり得ることが示された。

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。

実験項

Materials

Recombinant human CLK1, CK1 δ , DYRK1A and GSK3 α were purchased from Carna Biosciences (Kobe, Japan). Substrate peptide Dyrktide was purchased from AnaSpec (San Jose, CA). Nucleoside diphosphate kinase (NDPK, 1.9 kU/mg protein) from baker's yeast, phosphatase inhibitor cocktail 3, the LOPAC1280 compound library and ATP (purity \geq 99.0%) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). ADP-hexokinase (52.6 U/mg solid) from *Thermococcus litoralis* was purchased from Asahi Kasei Pharma (Tokyo, Japan). Diaphorase-I (1.8 kU/mg protein) from *Bacillus stearothermophilus* was from Nipro (Osaka, Japan). Recombinant glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, 754 U/mg protein) from *Leuconostoc* sp. and NADP⁺ were from Oriental Yeast Co. (Tokyo, Japan). Triton X-100 and Tween 20 were purchased from Alfa Aesar (Lancashire, UK) and Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan), respectively. ADP, dithiothreitol (DTT), N-ethylmaleimide (NEM), bovine serum albumin (BSA), resazurin, and other chemicals were from Fujifilm Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). Small-volume non-binding 384-well black microplates and 384-well polypropylene microplates were purchased from Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany) for kinase assay and for electrophoretic mobility shift assay, respectively. ADP-Glo kinase assay kit was purchased from Promega (Madison, WI). FL-Peptide 34 (5-FAM-RRRFRPASPLRGPPK-OH) for electrophoretic mobility shift assay was purchased from

PerkinElmer (Waltham, MA) and myelin basic protein (MBP) was from Fermeus (Turku, Finland).

Methods

Kinase Assay of CLK1

CLK1 assay was performed in small-volume non-binding 384-well black plates at a final volume of 5 μ L per well. Test compounds (1 mM solution in DMSO; 50 nL/well) were dispensed into wells of columns 3 through 22 of the plates using an Echo 555 acoustic dispenser (Labcyte, Sunnyvale, CA), and 50 nL DMSO was dispensed into the remaining wells. Then, a Multidrop Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used to add a solution of CLK1 (7.2 nM, 2.5 μ L/well) in buffer A (20 mM Hepes (pH 7.4), 0.01% Tween 20, 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂). The reaction was initiated by the addition of 2.5 μ L substrate solution (50 μ M Dyrktide, 200 μ M ATP in buffer A) into the wells. The plates were incubated at room temperature for 2 h in a closed container with well-wetted tissues. Phosphorylation reactions were stopped and quantified using enzyme-coupled fluorescence ADP detection assay as described below.

ADP Detection Assay

Five μ L/well of kinase reaction solution or ADP solution (10 μ M for reference assay) was mixed with 5 μ L aliquots of ADP detection reagent (2 mM glucose, 200 μ M NADP⁺, 100 μ M resazurin, 20 mM NEM, 2 U/ml ADP-hexokinase, 2 U/ml G6PDH and 2 U/ml diaphorase

I in buffer B (10 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) Triton X-100, 0.01% (w/v) BSA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5)* 詳細は後述) in 384-well plates, and the plates were incubated at room temperature for 60 min in the dark. Fluorescence intensity due to the formation of resorufin was measured with a PHERAstar microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) with excitation at 540 nm and emission at 590 nm. NEM, a thiol reagent, was included in the ADP detection reagent to terminate the target kinase reaction as well as to block the reactive thiol in DTT, which is often used in kinase assay as a kinase activator.

ADP Detection Assay by ADP-Glo Bioluminescence Assay

ADP bioluminescence assay was conducted according to the manufacturer's protocol of ADP-Glo bioluminescence assay kit.

Kinase Selectivity Assay

Kinase selectivity assays for CLK1, CK1 δ , DYRK1A and GSK3 α were performed in basically the same way as described for CLK1 assay, except that MBP was used as the substrate at a concentration of 1 μ M. Kinase concentrations were varied depending on the activity; 3.6 nM for CLK1, 16 nM for CK1 δ , 2.2 nM for DYRK1A and 6.4 nM for GSK3 α , and incubation time was 2 h. Phosphorylation reactions of all kinases were evaluated using enzyme-coupled fluorescence ADP detection assay.

Electrophoretic Mobility Shift Assay

Twenty μL of 5.2 nM CLK1 solution, 20 μL of 4.5 μM FL-peptide 34 and 300 μM ATP and 20 μL of test compound solution (5% DMSO) were added per well and the plates were incubated for 2.5 hours at room temperature in buffer A, then the reaction was stopped by addition of 3 μL of 500 mM EDTA. Phosphorylated and unphosphorylated peptides were separated and detected with a Lab-Chip EZ Reader II (PerkinElmer, Waltham, MA).

Data Processing and Analysis

The percentage inhibition was calculated based on the DMSO control as 0% inhibition, and the background (no-kinase) control as 100% inhibition. The calculated % inhibition values were analyzed by TIBCO Spotfire (Tibco Spotfire, MA) and used for the calculation of IC_{50} values by fitting the dose-response curves to a four-parameter logistic model in GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

ADP 蛍光法の試薬調製

本方法は 10 種類の市販の試薬を使って自作することで従来法の 1/10 の価格で HTS 可能であることが特長であるが、裏を返すと 10 種類の試薬を自分で調製し配合する必要がある。毎回粉から調製するのは現実的ではないため、-20 度でストックを保存し、アッセイ時にはそれらを溶かして配合するだけで試薬が簡便に作製できるようにした。

具体的には、図表 57 に示すように、10 種類を 6 グループ (A-F) にわけ、それらを (A) 以外は等量混合すればよいように工夫した。

ストックの作成方法を以下にしめす。作製時は少々大変だが、一度作れば数年間-20 度で保管が可能であり、凍結融解も 10 回程度は行っても問題なく検出に使えることが確認されている。

図表 54 ADP 蛍光法の試薬の作成方法

Stock溶液	添加比	ADP検出液 (x2)
A 0.5 M Tris-HCl 50 mM MgCl ₂ 0.1 % Triton X-100	20	
B 1 % BSA	1	
C 200 mM Glucose 20 mM NADP	1	
D 200 U/ml ADP-hexokinase 200 U/ml G6P dehydrogenase 200 U/ml Diaphorase I	1	
E 10 mM Resazurin in DMSO	1	
F 2M N-ethylmaleimide in DMSO	1	
DW (milliQ)	75	
	100	

0.1 M Tris-HCl
10 mM MgCl ₂
0.02 % Triton X-100
0.01 % BSA
2 mM Glucose
0.2 mM NADP
2 U/ml ADP-hexokinase
2 U/ml G6P dehydrogenase
2 U/ml Diaphorase I
0.1 mM Resazurin
20 mM N-ethylmaleimide

① ストック溶液の調製

10種類の試薬を以下の6グループのストック溶液として調製し、-20°C保管とした。

A. Tris buffer solution (x5)

500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM MgCl₂, 0.1% Triton-X 100 aqueous solution

B. BSA solution (x100)

1% BSA aqueous solution

C. Substrates solution (x100)

200 mM Glucose, 20 mM NADP aqueous solution

D. Enzymes solution (x100)

200 U/ml ADP-hexokinase, 200 U/ml G6P dehydrogenase, 200 U/ml Diaphorase I aqueous solution

E. Resazurin solution (x100)

10 mM Resazurin DMSO solution

F. N-ethylmaleimide (x100)

2 M N-ethylmaleimide in DMSO

②ADP 検出液 (x2) の作製

上述したストック液を解凍し、溶液 A:B:C:D:E:F:DW=20 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 75 の比率で添加して用時調製した。調製後は、室温にて数時間は変わらず使用可能であることを確認済みである。

引用文献

1. 製薬協 HP くすりについて

http://www.jpma.or.jp/medicine/med_qa/info_qa55/q02.html.

2. 長野 哲雄編創薬化学 ―メディシナルケミストへの道―,東京化学同人, 2018.

3. Wermuth Carmille G.編最新 創薬化学 上巻,TECHNOMICS, 2004.

4. 植木 智一. HTS の現状と今後の展望. *日本薬理学雑誌*日本薬理学会, 2007129, p 276.

5. 新井 好史. ハイスループットスクリーニング技術とは?. *化学と生物*日本農芸化学会, 200038, p 264.

6. 神沼 二眞. 創薬方法論の概要:A Tutorial. *創薬方法論―総論* CBI学会, 2007, p 3.

7. 吉田 稔. アカデミアの創薬スクリーニング, 分子標的からリード化合物発見への戦略; 基礎の基礎. *細胞工学*秀潤社, 201332, p 634.

8. Nagashima, T.; Shigematsu, N.; Maruki, R., et al Discovery of novel forkhead box O1 inhibitors for treating type 2 diabetes: improvement of fasting glycemia in diabetic db/db mice. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 961-970.
9. Yasuda, D.; Nakajima, M.; Yuasa, A., et al Synthesis of Keap1-phosphorylated p62 and Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and their inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 5956-5959.
10. Saito, T.; Ichimura, Y.; Taguchi, K., et al p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12030.
11. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R., et al The protein kinase complement of the human genome. *Science.* **2002**, *298*, 1912-1934.
12. Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 2675-2700.
13. Roskoski, R., Jr A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 1-23.
14. Fabbro, D. 25 Years of Small Molecular Weight Kinase Inhibitors: Potentials and Limitations. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *87*, 766-775.

15. Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A., et al A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 19-34.
16. Oprea, T. I.; Bologa, C. G.; Brunak, S., et al Unexplored therapeutic opportunities in the human genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 317-332.
17. Vyas, D.; O'Dell, K. M.; Bandy, J. L., et al Tofacitinib: The First Janus Kinase (JAK) inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann. Pharmacother.* **2013**, *47*, 1524-1531.
18. Wang, Y.; Ma, H. Protein kinase profiling assays: a technology review. *Drug Discov. Today Technol.* **2015**, *18*, 1-8.
19. Li, H.; Totoritis, R. D.; Lor, L. A., et al Evaluation of an antibody-free ADP detection assay: ADP-Glo. *Assay Drug Dev. Technol.* **2009**, *7*, 598-605.
20. Larson, B.; Banks, P.; Zegzouti, H., et al A Simple and robust automated kinase profiling platform using luminescent ADP accumulation technology. *Assay Drug Dev. Technol.* **2009**, *7*, 573-584.
21. Kumar, M.; Lowery, R. G. A High-Throughput Method for Measuring Drug Residence Time Using the Transcreeper ADP Assay. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 915-922.

22. Kumagai, K.; Kojima, H.; Okabe, T., et al Development of a highly sensitive, high-throughput assay for glycosyltransferases using enzyme-coupled fluorescence detection. *Anal. Biochem.* **2014**, *447*, 146-155.
23. Imamura, R. M.; Kumagai, K.; Nakano, H., et al Inexpensive High-Throughput Screening of Kinase Inhibitors Using One-Step Enzyme-Coupled Fluorescence Assay for ADP Detection. *SLAS Discov.* **2019**, *24*, 284-294.
24. Ben-David, Y.; Letwin, K.; Tannock, L., et al A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators. *EMBO J.* **1991**, *10*, 317-325.
25. Colwill, K.; Pawson, T.; Andrews, B., et al The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.* **1996**, *15*, 265-275.
26. Douville, E.; Duncan, P.; Abraham, N., et al Dual specificity kinases--a new family of signal transducers. *Cancer Metastasis Rev.* **1994**, *13*, 1-7.
27. Bullock, A. N.; Das, S.; Debreczeni, J. E., et al Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR protein phosphorylation. *Structure.* **2009**, *17*, 352-362.
28. Jain, P.; Karthikeyan, C.; Moorthy, N. S., et al Human CDC2-like kinase 1 (CLK1): a novel target for Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets.* **2014**, *15*, 539-550.

29. Muraki, M.; Ohkawara, B.; Hosoya, T., et al Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24246-24254.

30. Fedorov, O.; Huber, K.; Eisenreich, A., et al Specific CLK Inhibitors from a Novel Chemotype for Regulation of Alternative Splicing. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 67-76.

31. Debdab, M.; Carreaux, F.; Renault, S., et al Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4172-4186.

32. Coombs, T. C.; Tanega, C.; Shen, M., et al Small-molecule pyrimidine inhibitors of the cdc2-like (Clk) and dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated (Dyrk) kinases: Development of chemical probe ML315. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3654-3661.

33. Rosenthal, A. S.; Tanega, C.; Shen, M., et al Potent and selective small molecule inhibitors of specific isoforms of Cdc2-like kinases (Clk) and dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases (Dyrk). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3152-3158.

34. Deau, E.; Loidreau, Y.; Marchand, P., et al Synthesis of novel 7-substituted pyrido[2',3':4,5]furo[3,2-d]pyrimidin-4-amines and their N-aryl analogues and evaluation of their inhibitory activity against Ser/Thr kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6784-6788.

35. Mott, B. T.; Tanega, C.; Shen, M., et al Evaluation of substituted 6-arylquinazolin-4-amines as potent and selective inhibitors of cdc2-like kinases (Clk). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6700-6705.
36. Carna Biosciences Kinase Profiling Book. **2018**, 91.
37. Keshwani, M. M.; Hailey, K. L.; Aubol, B. E., et al Nuclear protein kinase CLK1 uses a non-traditional docking mechanism to select physiological substrates. *Biochem. J.* **2015**, *472*, 329-338.
38. Kinoshita, T.; Tsutsumi, T.; Maruki, R., et al Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of the C-terminal catalytic domain of human poly(ADP-ribose) polymerase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 109-111.
39. Kinoshita, T.; Maruki, R.; Warizaya, M., et al Structure of a high-resolution crystal form of human triosephosphate isomerase: improvement of crystals using the gel-tube method. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2005**, *61*, 346-349.
40. 長野 哲雄編アカデミア創薬の戦略と実例,実験医学 増刊,羊土社, **2014**; Vol. 32.

謝辞

学生時代から至らぬ私を寛大な心で親身にご指導ご鞭撻いただき、社会人になった後も変わらず温かく受け入れていただいた東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室教授 嶋田一夫先生に、心より感謝申し上げます。本論文執筆にあたりまして、的確なご指導ご鞭撻を賜りましたこと、重ねてお礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えていただき、常に温かくご支援いただきました、東京大学名誉教授であり創薬機構の客員教授であります長野哲雄先生に、深く感謝申し上げます。

本研究を行う機会を与えていただき、折に触れる的確なご指導・ご鞭撻をいただきました、東京大学創薬機構副機構長であり特任教授であります小島宏建先生に、深く感謝申し上げます。

本研究の遂行および論文執筆にあたり、豊富な知識と経験に基づき丁寧に温かくご指導いただきました、東京大学創薬機構特任教授 岡部隆義先生に深く感謝申し上げます。

本研究の基礎となる糖転移酵素活性測定法の開発者であり、本研究の遂行や論文執筆にあたり丁寧なご指導と温かいご支援を頂きました、神戸大学大学院工学系研究科特任准教授 熊谷和夫先生に深く感謝申し上げます。

本研究の共同研究者であり、本論文執筆にあたりご支援いただきました、慶応義塾大学薬学部准教授 大江知之先生、特任助教 安田大輔先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なご支援をいただきました東京大学創薬機構の研究員の皆さまに、厚くお礼申し上げます。

研究生生活全般を温かく支援してくれた義父憲三、義母明美に深く感謝致します。

ここに至るまでの長い道のりを常に見守り支えてくれた父一成、母秀子、妹裕子および祖父母一同に深く感謝致します。

最後に、研究生生活と論文執筆を応援し、叱咤激励して支えてくれた、夫太郎、および息子の亮太、俊太に、心から感謝の意を表します。