

審査の結果の要旨

氏名 柳 光一

柳 光一は「Pathway-Oriented Screening 法による生細胞の代謝活性の評価とその阻害剤の探索」と題し、以下の研究を行った。

大規模化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング (HTS) は、細胞の表現型を制御し、疾患を治療する化合物を探索する上で非常に強力な手法である。生体内の代謝活性を担う酵素を標的としたHTSは広くおこなわれているが、生体内の酵素の活性はタンパク質間相互作用や翻訳後修飾、基質や補因子の濃度変化等によって複雑に制御されているため、これを反映した形で生体内の酵素活性を正しく評価するには、生細胞系でこれを評価することが望ましい。本研究では、生体内の代謝活性をスループット高く評価する汎用性の高いアッセイ系を構築し、これを用いた生細胞スクリーニング系の構築と、がんに関わる代謝活性異常の制御化合物の探索をおこなった。具体的には、ある基質をinputとして生細胞に添加し、その後代謝されて細胞外に放出された代謝物をoutputとして検出することで、これらinputとoutputの間に介在する代謝経路の活性を評価するというアイデアを考案し、特に、がんに関わる代謝異常に着目して、このようなpathway-oriented screening法の構築をおこなった。はじめに、細胞外代謝物をcoupled assayによってハイスループットに検出するためのNAD(P)H、H₂O₂ 検出蛍光プローブの開発をおこない(項目1)、これを用いてがん細胞における異常がその悪性化と関係することが知られているmethylglyoxal代謝系の阻害剤探索(項目2)、アミノ酸代謝系の阻害剤スクリーニング(項目3)を実施した。

1. 細胞外代謝物蛍光検出プローブの開発

細胞共存下で特定の細胞外代謝物を蛍光検出するには、蛍光色素が細胞内へ透過して検出対象の代謝物以外のシグナルが生成されることを防ぐ必要がある。そこで、水溶性を高めることで細胞外に留まり、細胞外代謝物を選択的に蛍光検出することが可能な新規蛍光プローブの開発をおこなった。特に、coupled assay を用いた代謝物の検出に汎用されるNAD(P)H、H₂O₂に着目し、NAD(P)H 検出プローブとして、酵素ジアホラーゼがNAD(P)Hを用いてキノン構造を還元する性質を利用し、蛍光色素クマリンとキノン構造を組み合わせたプローブを開発した。また、H₂O₂ 検出プローブとして、酵素 HRP を用いてH₂O₂と反応し蛍光を発する蛍光プローブ APF の構造に基づき、これにスルホ基を導入し水溶性を高

めた蛍光プローブを開発した。開発したプローブは微量の NAD(P)H、H₂O₂ と選択的に反応し、細胞共存下での細胞外代謝物の検出を可能とすることが確かめられた。

2. Methylglyoxal (MG) 代謝系阻害剤の探索

MG は反応性の高いジカルボニル構造を有し、タンパクや核酸と反応するため MG の細胞内蓄積は増殖抑制や細胞死を引き起こすことが知られている。MG 代謝系は、MG を無害な D-lactate へと変換する代謝経路で、肺がんなどの多くのがんで活性の増大が見られ、特に、難治性の肺小細胞がんの創薬標的となりうるということが報告されている。MG を input、D-lactate を output とすることで MG 代謝系を評価することが可能であることを見出し、がん細胞 (DMS273) に MG を添加してインキュベーション後、蛍光プローブ溶液を加えて細胞外 D-lactate の検出を行うスクリーニング系の構築をおこなった。東京大学創薬機構が保有する 9600 化合物を用いたスクリーニングを実施し、これらのうちから、がん細胞で強い増殖抑制効果を示す化合物を取得することに成功し、その作用メカニズムの解明をおこなった。

3. アミノ酸代謝系阻害剤の探索

更に、pathway-oriented screening の概念の一般化を目指し、様々な input を加えたときの output を検出することにより、がんの特徴的な input と output の組み合わせを探索する実験系の構築をおこなった。特に、多くのがんにおいて異常が観察されるアミノ酸代謝に着目し、各アミノ酸を細胞に添加後、細胞外に放出されたアミノ酸量を測定し、正常細胞とがん細胞での比較をおこない、がん細胞で亢進が見られる input-output のペアを複数見出すことに成功した。これらのうち、input として glutamine、output として asparagine を用いて評価される代謝系に着目し、output の asparagine を検出する蛍光プローブを用いたスクリーニング系を構築し、生理活性既知の 1600 化合物から、上記のアミノ酸代謝活性を制御し、がん細胞の増殖抑制を示す化合物を複数取得することに成功した。

以上のように柳光一は、代謝活性を評価する新たな生細胞ベースの HTS 系である pathway-oriented screening の概念実証をおこない、実際に、がんで亢進している代謝経路に対して阻害剤を探索することにより、がん細胞に選択的に増殖抑制を示す化合物を取得することに成功した。以上の業績は、新たな創薬研究の可能性を提唱する意味で薬学、医学分野に大きな貢献をするものであると考えられ、博士(薬科学)の授与にふさわしいものと判断した。