

# 博士論文（要約）

化学的手法を用いた核酸タンパク質複合体に  
対する阻害物質取得法に関する研究

春元 俊正

## 第一章：研究背景および目的

核酸は生体において遺伝子翻訳から翻訳後遺伝子調節までの多様な機能を果たしており、生命機能の根幹を担っている。核酸はそれ単体のみで作用することは殆どなく、タンパク質と結合して機能を果たしており、その核酸タンパク質複合体に対する阻害物質は創薬としての可能性を秘めている。核酸タンパク質複合体を阻害する物質には、大きく分けて核酸塩基配列を認識し阻害する分子と、核酸とタンパク質間の結合を阻害する分子がある。前者に関しては、標的配列に高い親和性で結合する人工核酸が開発されており、分子設計は比較的容易である一方で課題は細胞内への効率的な送達となっている。後者の核酸タンパク質間相互作用の阻害分子に関しては、新たな取得手法の開発が求められている。

一般的な阻害分子の取得法としては、標的タンパク質と候補分子の構造や結合能にフォーカスをあて目的分子を取得していく **target-based screening** があるが、核酸タンパク質間結合の場合には、キナーゼ阻害剤のような奥深い結合ポケットが存在せず、さらにタンパク質が強い正電荷を帯びているため静電相互作用による非特異的な結合が起こりやすいため取得の難易度は高いとされている。本研究は、以上のようなニーズや課題に応えるため、化学的手法に基づき、核酸タンパク質間阻害物質の取得法に関する研究を行った。タンパク質としてはRNA干渉の中心タンパク質である **Argonaute2 (AGO2)** を標的とした。AGO2と核酸の相互作用はRNA 5'末端結合領域が最も重要と考えられる。そのため、取得戦略としては本結合領域に着目し、**label-free**の化学的手法を組み合わせることにより、阻害分子取得を目指した。

## 第二章：評価系の構築および小規模ライブラリスクリーニング

本章ではまずRNA 5'末端結合領域に対する阻害物質をスクリーニングするために最適なSPR評価系の構築を行った。非特異的結合を極力回避しAGO2とRNA 5'末端結合領域のみに着目するため、AGO2 MIDドメインを用いた阻害評価を選択し、センサーチップ基盤にはUMPのみを提示する評価系を検討した。本評価系において、天然ヌクレオチドおよびAdenosineを評価したところ、AMP, UMP>GMP, CMP>>Adenosineという阻害活性の序列を確認した。AGO2とRNA 5'末端の結合においては、特にリン酸基が重要であり、各塩基の親和性はAMP, UMP>GMP, CMPとの報告と合致する結果となり、目的とする評価系構築を達成した。次に、小規模ライブラリ1266化合物からのスクリーニングを行った。SPR評価ではスループットを

向上するため、濃度一点で初期選抜したのちに濃度依存性評価を行い、14種をヒットとして選抜した。次に、NMRを用いた結合実験を二次評価として実施した。二次評価では、化合物の結合部位が標的領域にあるかどうかを同定し、結合の有無、およびRNA 5'末端結合領域への結合か否かの評価を行った。その結果、意図する化合物を1種取得した。しかしながらその親和性は微弱であった。一連のスクリーニング結果から、RNA 5'末端結合領域に着目したSPR評価とNMR評価の組み合わせ手法は非常に有用であることが示された一方、ヒット化合物の割合が低く、また、溶解度が低いもしくは非特異結合に由来すると考えられるシグナル異常を示した化合物が多いという課題が見られた。より有望な化合物を選抜するには化合物の母数を増やすことが有効であるが、SPR評価のスループットには限界がある。そのため、より効率的に目的化合物を取得するにはさらに評価系を組み合わせる必要があることが示唆された。

### 第三章：In silico SCR, SPR, NMRによる大規模ライブラリスクリーニング

In silico screening (SCR)を初期スクリーニングとしてさらに組み込み、大規模ライブラリ(6,817,770種)からの目的分子取得を検討した。まず、カルボン酸、硫酸、リン酸構造による部分構造検索を行った。複数の観点での化合物選択によりヒット取得の確率が向上すると考えられることから、リン酸構造に着目した選抜およびファーマコフォアスクリーニングの2手法を実施し、ドッキングシミュレーションを通じて171種を選抜した。その後、第二章と同様にSPR評価とNMR評価とを組み合わせることでAGO2とRNA 5'末端結合領域に対する結合を阻害する分子を3種(UZI/1999527, Z317095268, Z56862757)取得した。前章で実施した小規模ライブラリスクリーニングにおいては、1266種のSPR評価からNMR評価でのヒットは1種のみであった一方、本章では171種のSPR評価から最終ヒット化合物を3種取得できており、in silico SCRを初期スクリーニングとして加えた効果が反映されたと考えられる。また、in silico SCRにおいて酸性官能基を初期選抜したことで溶解性が高い物質が選ばれたことも寄与したと考えられる。また、NMR評価にて同定された結合残基とドッキングポーズの比較から各化合物と天然塩基AMPとの重ね合わせ図を作製した。取得した3化合物に関しては、既報化合物とその親和性をSPR阻害評価系にて比較したところ、いずれも既報化合物を顕著にしのぐ阻害活性を示した。

#### 第四章：取得化合物の活性評価

本章では、第三章にて取得した低分子3種のRNA induced silencing complex (RISC)形成阻害能を評価するため、HeLa lysateを用いたAGO2-siRNA結合系に各低分子を阻害剤として添加した。反応後の溶液から免疫沈降法によりAGO2を精製し、その中に含まれるsiRNAのアンチセンス鎖をstem-loop RT-PCR法により定量した。その結果、いずれの化合物も既報阻害分子を超えるRISC形成阻害活性を示した。本結果は親和性の結果と相関すると考えられるが、親和性の序列とRISC阻害活性の序列までは一致しなかった。これは、スクリーニングで用いたSPR評価、NMR評価とHeLa lysateにおける評価環境の違い(他分子の影響の有無の違い)に起因すると考えられる。次に、内在性のmiR-16に対する阻害活性を評価したが、いずれの化合物も顕著な阻害活性を示さなかった。成熟RISCからmiRNAをはがすにはpre-RISCの阻害よりも強力なエネルギーが必要と考えられており、成熟RISCから効率的に内在性miRNAをはがすためには化合物の親和性を向上させる必要があることが示唆される。また、UZI/1999527においてはHeLa細胞のviabilityへの影響が確認され、毒性を低減した化合物への改良必要性も示唆された。本現象に関しては正常細胞を用いたviability assay等により詳細な機構が明らかになることが期待される。

#### 第五章：総括と応用展開

本論文では、label-freeの化学的手法に基づいたtarget-based screeningによりAGO2とsmall RNAの結合を阻害する分子の取得を目指し研究を行った。取得方針としては、AGO2とRNA 5'末端の結合が最も重要な相互作用と捉え、その結合領域にフォーカスしたスクリーニング系の構築を行い、化学的手法を組み合わせることで大規模ライブラリから効率的に目的分子の取得に至った。本アプローチのように、結晶構造や分子機構に基づいた着目ポイントの設定を行い化学的手法を組み合わせる手法は、核酸-タンパク質間結合に対する阻害分子の取得手法として有用と考えられる。さらに、今回取得した低分子に関して、Fragment-Based Drug Discoveryの起点としての応用展開および、siRNA活性向上技術への応用展開の可能性を提案した。