

論文の内容の要旨

論文題目 医薬品リード化合物の標的タンパク質に対する作用機序に関する研究
氏名 宮久 郁夫

【背景】

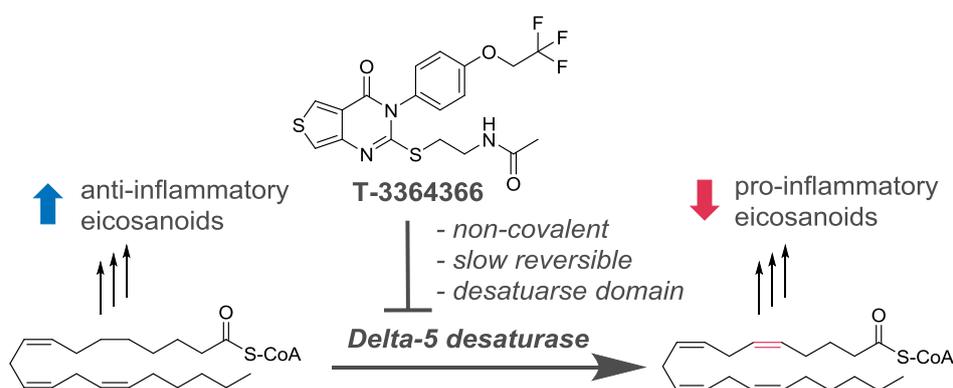
医薬品リード化合物の最適化研究において、薬物の標的タンパク質に対する結合作用機序の解析は重要な役割を果たしている。阻害剤の最適化研究では、合成されるリード周辺化合物の阻害活性を生化学試験の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を用いて評価するのが最も一般的である。その理由は IC_{50} 算出の容易さに加え、チェン=プルソフの関係式により IC_{50} は評価化合物の解離定数 (K_i) と比例することが示されているため定量的な阻害の評価指標として使えるからである。この関係式が成立するには、評価化合物とその標的タンパク質との結合が、(1) 可逆的であり、(2) 平衡状態に達しており、(3) 基質または結合プローブと拮抗的である、という前提が必要である。しかしながら創薬研究においては上記の前提を満たさないリード化合物が散見され、その一例がスローバインディング阻害剤や不可逆性阻害剤等の時間依存性阻害剤である。スローバインディング阻害剤は平衡に達するまでの時間がアッセイの測定時間と同程度か遅い阻害剤を指し、その IC_{50} は平衡に達するまで測定時間依存的に減少する。一方で不可逆性阻害剤の IC_{50} は全ての標的分子が阻害剤により占有されるまで時間依存的に減少し続け、平衡状態ではそのアッセイ系の標的タンパク質の半分の濃度と一致し、もはや阻害の強度とは無関係になる。このようにチェン=プルソフ式的前提を満たさないリード化合物の阻害活性は IC_{50} では正しく評価出来ない場合もあるため、結合作用機序の解析を通じて化合物が前提を満たすかどうかを判定し、満たさない場合にはどのような評価指標を使うのが適切かを判断する必要がある。そこで本論

文では、ハイスループットスクリーニング (HTS) によって取得した二つのリード化合物に関して、セルフリーの結合試験を用いて速度論解析を実施し、標的タンパク質に対する作用機序を明らかにすることを目的とした。また、 IC_{50} では定量的な評価ができない不可逆性阻害剤の阻害活性 k_{inact}/K_I を定量的かつ迅速に評価する系を新たに開発することを目的とした。

【結果と考察】

1. デルタ 5 デサチュラーゼ阻害剤 T-3364366 の結合作用機序解析

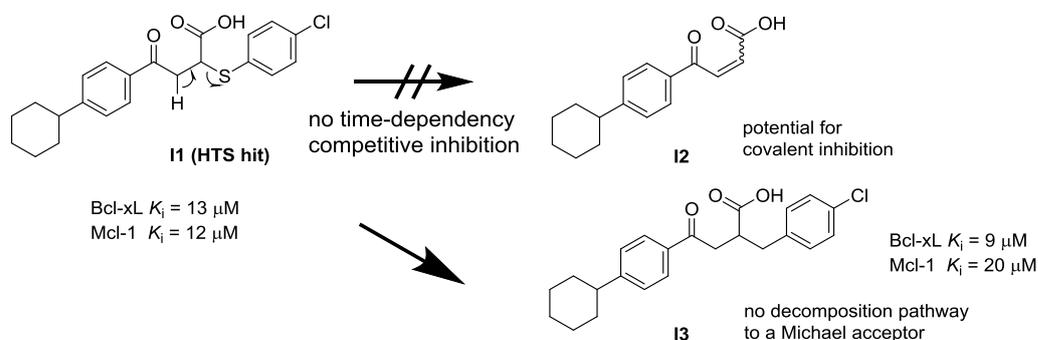
デルタ 5 デサチュラーゼ (D5D) は、ジホモ γ リノレン酸 (DGLA) からアラキドン酸 (AA) への変換を触媒する酵素である。DGLA と AA はそれぞれ抗炎症性・炎症促進性エイコサノイドの共通の前駆体であるため、D5D 阻害は炎症性疾患の重要な治療戦略になる可能性がある。これまで D5D 阻害薬に関する複数の報告があるにも関わらず、それら阻害薬の生化学的な作用機序は殆ど理解されていない。それは主として D5D の酵素アッセイを用いた定量的な解析が困難であることに起因すると考えられる。そこで強力かつ選択的な D5D 阻害薬 T-3364366 の結合作用機序の解析を目的として、放射性標識した T-3364366 をプローブとする結合試験を構築した。結合試験の結果から、T-3364366 は可逆的で 2 時間以上の解離時間を有するスローバインディング阻害剤であることが明らかになった。その遅い解離の効果は細胞の洗浄試験で確認された。D5D と D6D 間のドメイン交換実験により、T-3364366 は D5D のデサチュラーゼドメインに結合することが示された。本研究はデサチュラーゼファミリー阻害剤の結合様式を明らかにした初めての例であり、デサチュラーゼ酵素の創薬研究に重要な洞察を与えると考えられる。



2. Bcl-xL/Mcl-1 タンパク質間相互作用阻害剤の作用機序解析

一般的にタンパク質間相互作用 (PPI) 阻害薬の HTS からの同定では、真のヒット化合物の選抜に大きな困難を伴うことが多いが、それは一次ヒット化合物中に偽陽性化合物が数多く存在することが原因である。本研究では Bcl-xL/Mcl-1 二重 PPI 阻害薬の HTS ヒット化合物が共有結合阻害剤を含めた偽陽性化合物ではないことを、プローブに対する競合

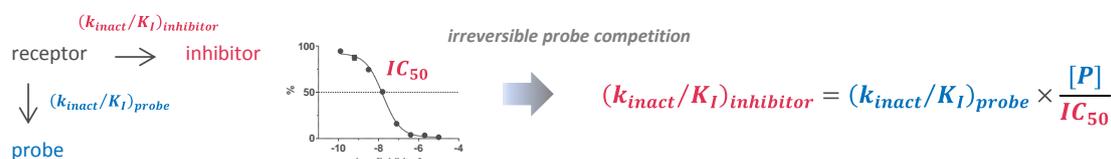
的結合試験を用いた作用機序解析から検証した。HTS から発見したヒット化合物 **I1** は、Bcl-xL/Mcl-1 を共有結合阻害が可能なマイケルアクセプター構造の **I2** を生み出す潜在性を有していた。そこで Bcl-xL/Mcl-1 両タンパク質に結合する蛍光ペプチドを用いた定量的な競合的結合試験を構築し、**I1** の結合作用機序を解析した。**I1** は結合が迅速に平衡に達しかつプローブペプチドと拮抗的な可逆的結合を示すことが確認され、**I1** の非共有結合的な阻害が示唆された。**I1** の共有結合阻害の可能性を除外できていることを確認するために、**I1** の構造類縁体でマイケルアクセプターへの分解経路を持たない **I3** を合成したところ、**I1** と同程度の阻害活性が確認できた。本結果より **I1** と **I3** は両化合物に共通した置換基による可逆的相互作用を介して、Bcl-xL/Mcl-1 に結合することが示唆された。**I1** および **I3** は、化学構造の新規性、PPI 阻害剤としては小さな分子量、さらに Bcl-xL/Mcl-1 の両タンパク質に対する二重阻害活性から、Bcl-xL/Mcl-1 阻害剤のリード最適化研究における興味深い出発点であると考えられる。



3. エンドポイントの競合的結合試験を用いた不可逆性阻害剤の活性評価指標 k_{inact}/K_I の迅速な決定法の開発

創薬研究において、不可逆阻害はその強力な活性と標的タンパク質の持続的な占有により、強力な薬理作用を発揮する有効な戦略の一つである。不可逆性阻害剤の活性評価指標は IC_{50} ではなく二次の速度定数である k_{inact}/K_I (単位、 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) で評価すべきであるが、 k_{inact}/K_I の算出には速度論的測定やカーブフィッティングを含む煩雑な過程が必要である。そこで、評価化合物に拮抗的な不可逆性プローブを用いて、競合試験の一時間点 (エンドポイント) の IC_{50} から容易に k_{inact}/K_I を算出する理論を構築した。評価化合物と事前の速度論解析で k_{inact}/K_I を決定したプローブを標的タンパク質に対し競合的に結合させ、系が平衡に達した後にプローブ置換の IC_{50} を決定する。この条件下では、試験化合物の k_{inact}/K_I は次の単純な数式; $(k_{\text{inact}}/K_I)_{\text{inhibitor}} = (k_{\text{inact}}/K_I)_{\text{probe}} \times [\text{probe}]/IC_{50}$ から算出される。本数式は可逆性阻害剤のチェン=ブルソフ式のように、プローブと評価化合物間の不可逆阻害の強度を関連付けている。EGFR キナーゼを題材とした実験とシミュレーションの両方において、本手法で得られた k_{inact}/K_I は従来速度論的解析法で求めた k_{inact}/K_I と優れた相関を示したことから、本数式の妥当性が支持された。本評価法は従来法に対して、簡便さ、高い処

理能力、広い測定域、あらゆるターゲットクラスに対する普遍的な適用などを含めた複数の利点があり、不可逆性阻害薬の創薬研究における価値ある評価方法となると考えられる。



【総括・展望】

第一章では、新規な D5D 阻害剤 T-3364366 の結合作用機序を解析し、可逆的なスローバインディング阻害剤であることを示した。酵素アッセイを用いた前平衡状態での IC_{50} 評価では、スローバインディング阻害を示すことが予想される T-3364366 の周辺化合物も真の阻害活性を過小評価する可能性が高いと考えられる。放射性リガンドに対する競合的結合試験を用いて平衡状態で阻害剤を評価すれば、 IC_{50} は阻害剤の真の活性値と比例する。そのため T-3364366 周辺化合物の構造-活性相関研究では、なるべく長いインキュベーション時間での $[^3H]$ T-3364366 に対する競合的結合試験の IC_{50} 値を用いることで、阻害剤の真の阻害活性の過小評価を最小限にできると考えられる。

第二章では、新規 Bcl-xL/Mcl-1 二重 PPI 阻害剤 **II** の結合作用機序を解析し、**II** は結合が迅速に平衡に達しかつプローブペプチドと拮抗的な可逆的結合を示すことを確認した。本研究で提示した定量的な結合試験を用いて真のヒット化合物を選抜する手法は、共有結合阻害剤を含む偽陽性の可能性を除外する簡単な手法として、他の PPI 標的分子にも広く適応可能であると考えられる。

第三章では、不可逆性阻害剤の活性評価指標 k_{inact}/K_I をエンドポイントの競合試験の IC_{50} から迅速に算出する新規手法の開発を示した。本手法は不可逆性阻害薬の最適化研究におけるチェン=プルソフ式に相当する関係式として、不可逆性阻害薬の創薬研究を推進する価値ある手法として広く使われることが期待される。加えて、本手法はシステイン等の反応性アミノ酸残基に対する化合物の反応速度 (k_{chem}) の算出にも応用可能である。これにより、不可逆性阻害剤の主活性 (k_{inact}/K_I) と化学反応性 (k_{chem}) の二次元の構造-活性相関を提供することが可能になり、強力な主活性と他のタンパク質に対する低い反応性を両立した高度に選択的で安全な不可逆性阻害薬の合理的なデザインに貢献できると考えられる。

以上の通り、本研究で解析した阻害剤は可逆的なスローバインディング阻害剤、迅速に平衡に達する可逆的阻害剤、不可逆性阻害剤であり、それぞれの作用機序に応じた評価系の設定と活性評価指標の算出が必要である。このように、結合速度論解析によるリード化合物の結合作用機序の理解と作用機序に応じた適切な評価指標の設定は、強力で安全な薬物を設計しようとする医薬品リード化合物の最適化研究を正しく導くために今後も重要な役割を果たすと考えられる。