

審査の結果の要旨

氏名 宮久 郁夫

医薬品リード化合物の最適化研究では、合成されるリード周辺化合物の阻害活性を、酵素基質または可逆性結合リガンドを用いた生化学試験の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を指標にして評価するのが最も一般的である。その理由は IC_{50} が評価化合物の解離定数 (K_i) と比例することがチェン=プルソフの関係式により示されているからであるが、この関係式が成立するためには、評価化合物と標的タンパク質との結合が、可逆的で、迅速に平衡に達し、且つ基質または結合プローブと拮抗的である、という前提条件が必要である。しかしながら、創薬研究ではこれらの前提条件を満たさない化合物が散見され、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がその代表例である。このようなチェン=プルソフ式的前提条件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ため、結合作用機序解析を通じて化合物がこの前提条件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。このような背景のもと、本論文では、二つのリード化合物に関して標的タンパク質に対する作用機序解析を行うとともに、 IC_{50} では定量的に評価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した研究をまとめている。本論文は、研究背景等について記述した序論および全四章からなる本論より構成される。

本論第一章では、新規なデルタ 5 デサチュラーゼ阻害剤 T-3364366 の結合作用機序を、 $[^3H]T-3364366$ をプローブとした放射性リガンド結合試験を用いて解析している。結合試験の結果から、T-3364366 が可逆的で 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。また、その遅い解離の効果を細胞の洗浄試験で確認した。さらに、変異体に対する結合試験から、T-3364366 がデサチュラーゼドメインに結合することを明らかにした。

第二章では、Bcl-xL/Mcl-1 二重タンパク質間相互作用阻害剤 **I1** の結合作用機序を解析している。ハイスループットスクリーニングから発見したヒット化合物 **I1** は、共有結合することによって Bcl-xL/Mcl-1 を阻害し得るマイケルアクセプターを生じる可能性をもつ構造であった。そこで蛍光ペプチドをプローブに用いた競合的結合試験系を構築し **I1** を評価したところ、**I1** は結合が迅速に平衡に達し且つプローブと拮抗的な可逆的結合を示すことを明らかにした。さらにマイケルアクセプターへと分解されない **I1** の構造類縁体を合成し、本化合物が **I1** と同程度

の阻害活性を有することを示した。以上から、**I1** が非共有結合的に Bcl-xL/Mcl-1 に結合することを明らかにした。

第三章では、不可逆性阻害剤の活性評価指標 $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ (単位、 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) を、不可逆性プローブを用いた競合試験の IC_{50} から容易に算出する手法の開発について述べている。具体的には、不可逆性阻害剤および事前の速度論解析で $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を決定したプローブによる標的タンパク質の競合的な占有を測定し、系が平衡に達した後にプローブ置換の IC_{50} を決定し、試験化合物の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を次の単純な数式； $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{inhibitor}} = (k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}} \times [\text{probe}]/IC_{50}$ より算出する。EGFR キナーゼを対象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 $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ は従来の速度論的解析法で求めた $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ と優れた相関を示し、本数式の妥当性が示された。

第四章では、本論文で解析した二つの阻害剤の作用機序解析と、新たに開発した $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の簡便な算出法について考察し、創薬研究における化合物と標的タンパク質との結合の速度論解析研究に関する今後の展望を述べて本研究を総括している。

以上、本研究は、二つのリード化合物に関して標的タンパク質に対する作用機序解析を行うとともに、 IC_{50} では定量的に評価できない不可逆性阻害剤の阻害活性 $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を定量的かつ迅速に評価する系を新たに開発したもので、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。