

CFAフラグメントライブラリーを用いた細胞代謝フェ ノタイプスクリーニングによるコバレントリガンド 探索

井上, 和哉

<https://hdl.handle.net/2324/7157316>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (臨床薬学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 井上 和哉

論文題名 : CFA フラグメントライブラリーを用いた細胞代謝フェノタイプスクリーニング
によるコバレントリガンド探索

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

FBDDはフラグメントと呼ばれる分子量300以下からなる化合物を用いてスクリーニングを行い、構造の最適化により標的タンパク質に対して相互作用をするリード化合物を開発するための創薬方法である。FBDDは低分子フラグメントを用いることによりスクリーニング時にヒット率の向上が期待され、効率的に標的タンパク質と相互作用する化合物を見出すことができる利点を有する。その一方で、標的タンパク質との結合親和性が低いため、NMRやX線結晶構造解析などの生物物理学的技術を駆使し、結合を測定することでヒット化合物を選定していく必要がある。そこで、フラグメント化合物の低親和性を補うために標的タンパク質と共有結合を形成するコバレントドラッグを用いたフラグメント創薬が行われるようになった。コバレントドラッグはタンパク質と相互作用をするリガンド部位に加え、標的の求核性アミノ酸残基と反応するための求電子的反応基 (Warhead) を併せ持ち、リガンド部位と標的タンパク質が相互作用した後、標的タンパク質表面の求核性アミノ酸から warhead に対する求核攻撃が誘起されることで共有結合を形成する。コバレント型のフラグメントは非共有結合的な相互作用をする化合物とは異なり、タンパク質と解離しないことから強い結合性と長い作用時間を有するといった特徴を持つ。

当研究室ではこれまでに穏やかな反応性を有する反応基として α -クロロフルオロアセトアミド基 (CFA 基) を見出した。CFA 基は標的システインと反応し共有結合を形成する一方で、タンパク質表面のシステイン残基と反応した場合には加水分解するという可逆性も有していることから、細胞内での標的タンパク質を高選択的に阻害することができる。とりわけ生細胞を用いたフェノタイプスクリーニングにおいては、高い標的選択性は擬陽性や細胞毒性の低下につながることからスループット性の観点からも非常に重要である。そのため、まず CFA を反応基として有するフラグメント化合物の拡張を行った。

また、我々はケミカルバイオリジー的な手法を用いて様々な代謝経路の活性を検出可能な新しいケミカルプローブの開発も行っており、これまで代謝経路の一つである脂肪酸 β 酸化を検出するために **probe1** を開発した。しかしながら、**probe1** は蛍光強度が弱いため、フェノタイプスクリーニングに用いるための十分な感度を有さなかった。そこで、クマリンの6位にフルオロ基を導入した **probe2** を設計することにより、約9倍の蛍

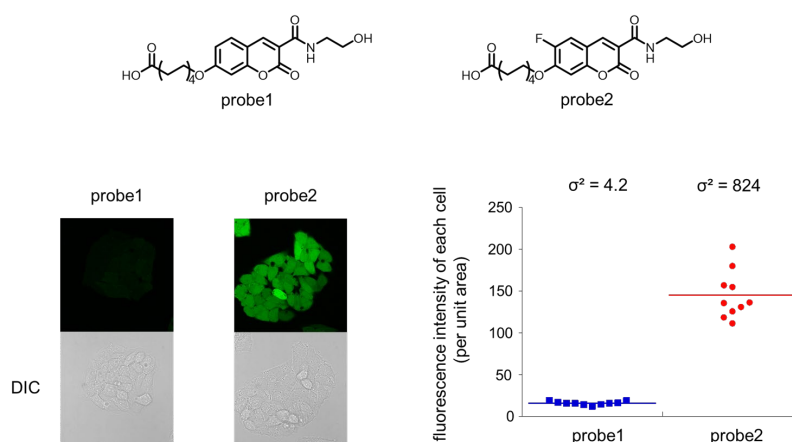


Figure 1. Fluorescence imaging of probe1 and probe2 in living cells.

光強度の増大に成功し、フェノタイプスクリーニングに用いるための十分な感度を得た (Figure 1)。

そのため、先に示した CFA フラグメントライブラリーを HepG2 細胞に添加した後、**probe2** を加えプレートリーダー及び蛍光イメージングにより蛍光強度を算出した。その結果、**probe2** の蛍光を減少させるピペラジン・ピペリジン骨格を有する CFA-154/157 を見出した ($IC_{50} \doteq 2 \mu M$)。反応基部位を CFA 基からアセチル基に変更したところ阻害活性を示さなかったことから、CFA-154/157 は何らかのタンパク質と共有結合を形成することで β 酸化活性を阻害していると考えられた (Figure 2)。

続いてこれらの化合物の作用機序の解明を行うために CFA-154、

157 にアルキンタグを導入した CFA-170、166 を合成し、gel-based ABPP を行ったところ、これらの化合物は 50 kDa 付近のバンドを特異的にラベル化した (Figure 3)。さらにケミカルプロテオミクス解析を行ったところ、50 kDa 付近の proteinX を同定することに成功した。そのため、CFA-154、157 とそれらのアルキン体である CFA-166、170 を用いて proteinX の精製酵素に対するラベル化挙動を調べた。その結果ケミカルプロテオミクス解析時と同様、ピペリジン骨格を有する CFA-154、170、及びピペラジン骨格を有する CFA-157、166 は proteinX をラベル化する結果を得た。さらに、CFA-154、157 の精製酵素に対する阻害活性を調べたところ、proteinX に対して高い阻害活性を示すことが分かった (CFA-154; $IC_{50} \doteq 26 \text{ nM}$, CFA-157; $IC_{50} \doteq 11 \text{ nM}$)。

また、proteinX と β 酸化との関係性を調べるために既存の proteinX の阻害剤と **probe2** を用いた生細胞スクリーニングを行ったところ、阻

害剤は **probe2** の蛍光を抑える結果を得た。さらに 4-HNE 抗体を用いたドットブロット法による検出から、CFA-154 及び 157 は proteinX を阻害することで細胞内に蓄積した 4-HNE が β 酸化関連酵素と付加体を形成し、その機能を阻害する知見を得た。

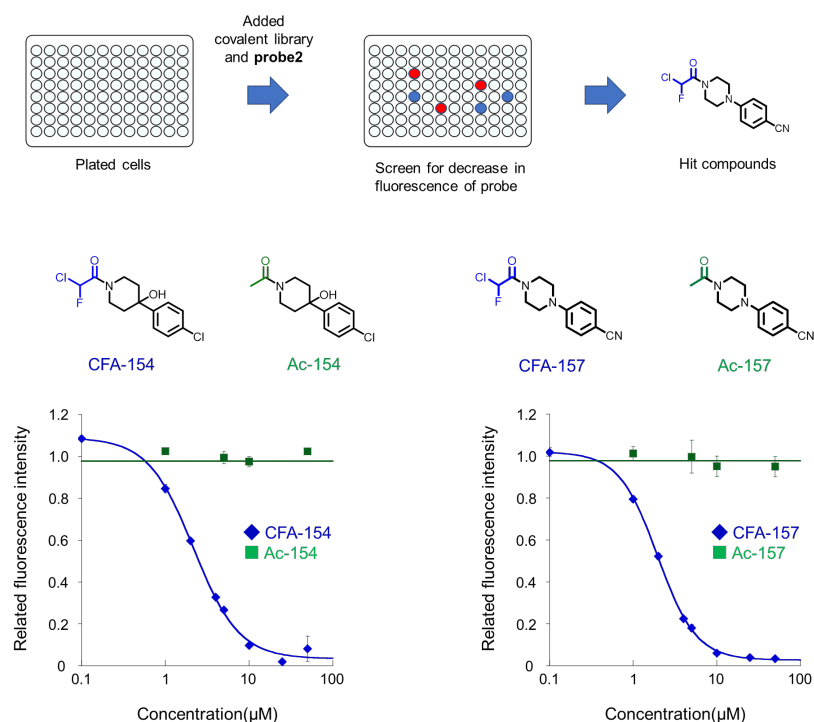


Figure 2. Inhibitor screening of FAO.

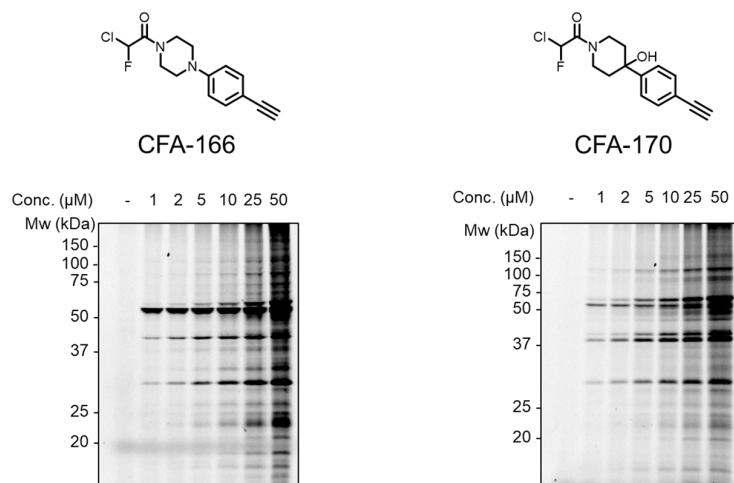


Figure 3. In gel fluorescence analysis of CFA-166/170.