

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 :

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

創薬ケミカルバイオロジー分野 3PS19102W 井上 和哉

【序論及び本研究の目的】

FBDD (Fragment based drug discovery) はフラグメントと呼ばれる分子量 300 以下からなるから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^(1,2)。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現在活発に行われている。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に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ため、従来の FBDD での問題点である結合親和性の改善が見込まれる⁽³⁾。

これまでに当研究室では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⁽⁴⁾。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。また、当研究室では代謝を検出する蛍光プローブの開発を行っているため、当研究室で独自に開発した穏やかな反応性を有する CFA 基を導入したフラグメント化合物と、代謝を検出する蛍光プローブを組み合わせることで、オリジナリティの高い新規コバレント型の代謝阻害剤を開発できると考えた。そこで、本研究では CFA 基を反応基として持つフラグメントライブラリーから、代謝を抑制する化合物の開発とその作用機序の解明を目的とした (Figure 1)。

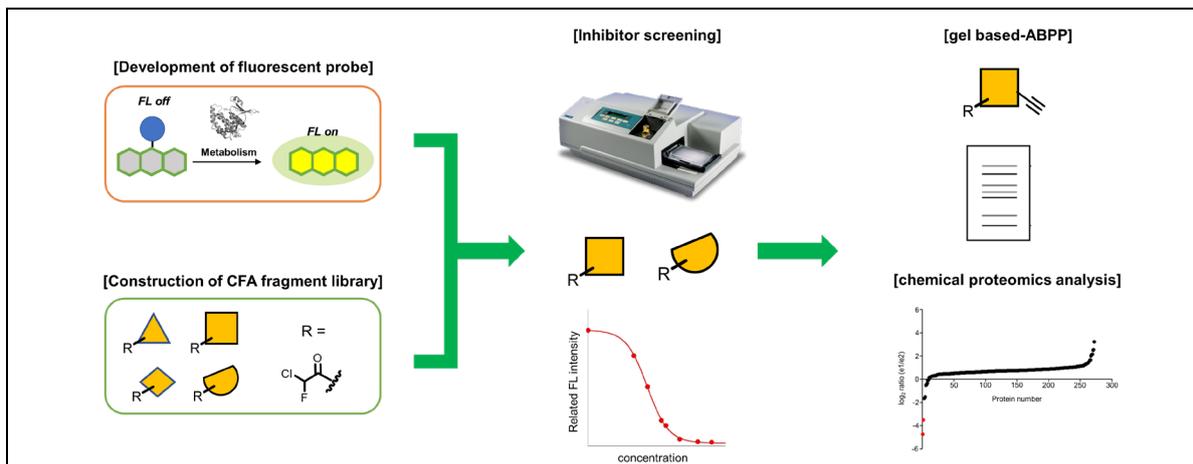


Figure 1. Schematic illustration of this research.

【実験】 又は 【方法】

まず、CFA フラグメントライブラリーの拡張を行った。様々な構造のアニリン及びアミン誘導体に反応基を導入することで種約 160 種類のライブラリー化合物を得た。反応基の導入は sodium 2-chloro-2-fluoroacetate の propanephosphonic acid anhydride (T3P) を用いた縮合 (Figure 2 (a)) 又は 2-chloro-2-fluoroacetyl chloride による縮合反応 (Figure 2 (b)) で合成した⁽⁵⁾。

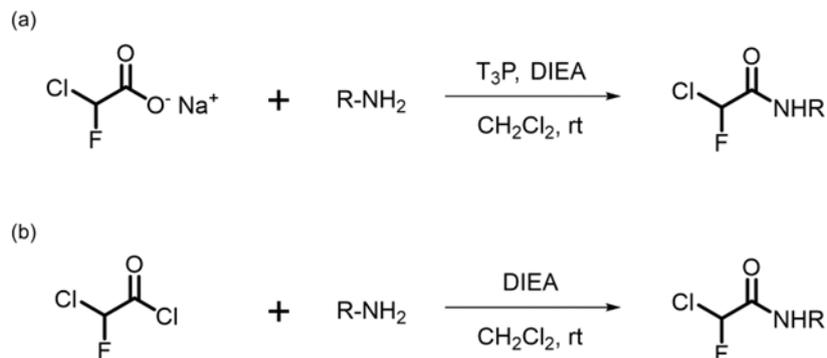


Figure 2. Synthesis of CFA fragments . (a). condensation reaction by sodium 2-chloro-2-fluoroacetate. (b). condensation reaction by 2-chloro-2-fluoroacetyl chloride.

続いて β 酸化検出用蛍光プローブの改良を行った。当研究室でこれまでに開発した **probe1** は蛍光強度が弱く蛍光変化が追いかかった。そこで蛍光色素であるクマリンにフルオロ基を導入した **probe2** を設計し、生細胞中での **probe1** との蛍光強度の比較を行った (Figure 3)。

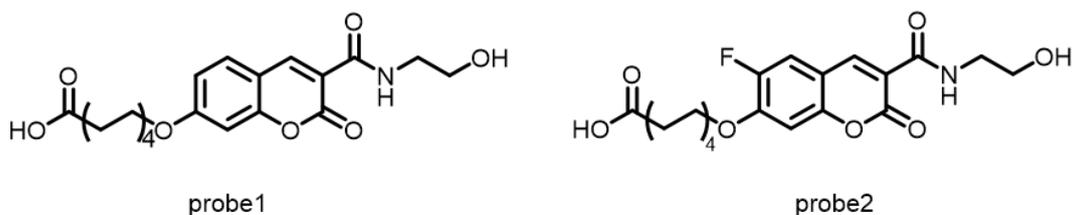


Figure 3. Chemical structure of **probe1** and **probe2**

最後に CFA フラグメントライブラリーと改良した **probe2** を用いた阻害剤スクリーニングを行った。ヒト肝細胞癌である HepG2 細胞に対し、CFA フラグメントライブラリーを添加した後に **probe2** を添加することで、**probe2** の蛍光強度を抑える化合物を探索した。その後ヒットしてきたフラグメント化合物に対してアルキンを導入し、CuAAC を利用した gel-based ABPP (Figure 4(a)) 及びケミカルプロテオミクス解析 (Figure 4(b)) を行い、作用機序の解明を行った。

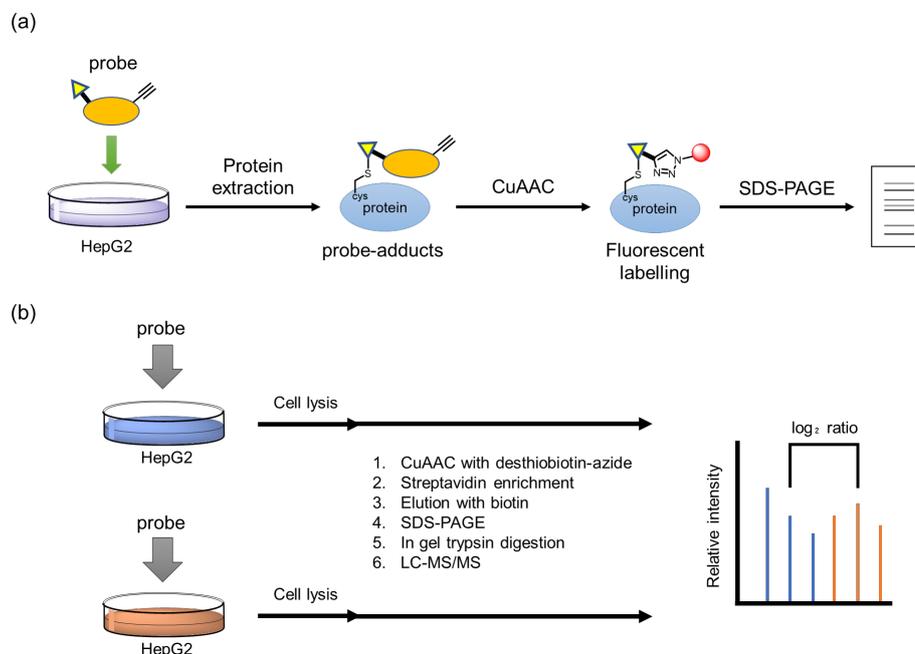


Figure 4. Schematic illustration of gel-based ABPP (a) and chemical proteomics analysis (b).

【結果と考察】

これまでに開発した **probe1** と、クマリンの 6 位にフルオロ基を導入した **probe2** の蛍光強度の比較を行ったところ、**probe2** の方が約 9 倍の蛍光強度が強いことが分かった (Figure5)。また、既存の β 酸化阻害剤として知られる etomoxir を添加すると蛍光強度が減少し、活性化剤として知られる ND630 を添加すると蛍光強度は増大したことから、開発した **probe2** は感度良く β 酸化を検出できることが分かった。

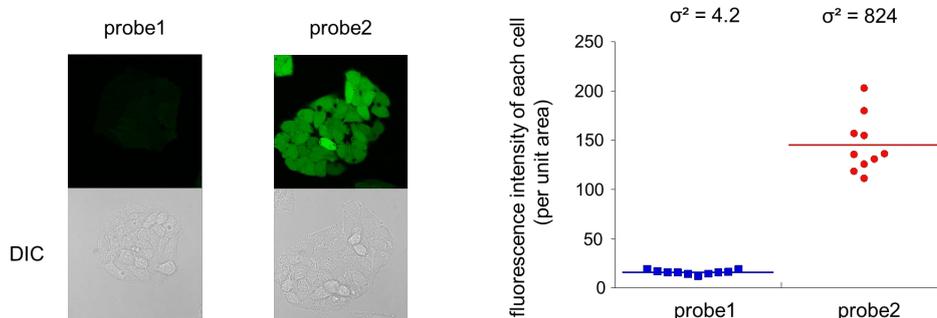


Figure 5. Fluorescence imaging of **probe1** and **probe2** in living cells.

さらに阻害剤スクリーニングにより **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 ($IC_{50} \cong 2 \mu M$)。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 6)。

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 Figure 6. Inhibitor screening of FAO.

50 kDa 付近のバンドを特異的にラベル化した (Figure 7)。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 付近のタンパク質 X 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 を用いてタンパク質 X 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、ピペラ

ジン骨格 Figure 7. In gel fluorescence analysis of CFA-166/170.

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 はタンパク質 X1 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、タンパク質 X1 に対して高い阻害活性を示すことが分かった (CFA-154; $IC_{50} \cong 26 \text{ nM}$ 、CFA-157; $IC_{50} \cong 11 \text{ nM}$)。

また、タンパク質 X と β 酸化との関係性を調べるために既存のタンパク質 X 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 はタンパク質 X 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。

【引用文献】

1. F. N.B. Edfeldt, et. al. *Drug Discov. Today*, **2011**, 16(7/8), 284
2. Z. Konteatis, *Expert Opin Drug Discov.*, **2021**, 16(7), 723
3. A. Keeley, et. al. *Drug Discov. Today*, **2020**, 25(6), 983
4. N. Shindo, et. al, *Nat. Chem. Biol.*, **2019**, 15, 250
5. C. Miura, et. al. *Chem. Pharm. Bull.*, **2020**, 68, 1074

