

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620137

研究課題名(和文)コバレントドラッグ開発のための新しい基盤技術の創出

研究課題名(英文)Construction of Research Platform for Discovery of Covalent Drugs

研究代表者

王子田 彰夫(Ojida, Akio)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10343328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質と共有結合を形成して、その機能を不可逆的に阻害するコバレントドラッグを開発するための新しい技術基盤を構築することを目的として、コバレントドラッグに適した新しい反応基の探索、新しい反応基である α -クロロフルオロアセチル基を有するフラグメント小分子ライブラリーを構築した。また、ライブラリーを利用した結核治療のためのコバレントドラッグの探索を目指し、蛍光アッセイ系の構築を行った。

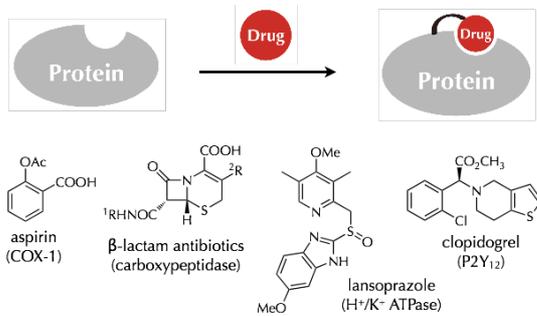
研究成果の概要(英文)：Covalent drug is an agent that inhibits protein functions through the formation of a specific covalent bond with a target protein. In this research, we constructed the research platform for development of new covalent drug. We found that α -chlorofluoroacetyl group is a mild reactive group suitable for covalent drug. Based on this finding, we prepared a compound library composed of the small molecules, which are appended with a α -chlorofluoroacetyl group. To apply this compound library, we constructed the fluorescence assay system for screening a covalent drug for tuberculosis.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質 コバレントドラッグ 化合物ライブラリー スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

タンパク質機能を共有結合形成により不可逆的に阻害するコバレントドラッグは、長い創薬研究の中でこれまでに数多く開発されてきた。コバレントドラッグの最も代表的なものとしては、下図に示すアスピリンやβ-ラクタム系抗生物質などが知られているが、その他にも多様な受容体や酵素を標的とした薬剤がコバレントドラッグとして開発されており、幅広い疾患領域で用いられている。



コバレントドラッグは、通常分子間相互作用に基づいた可逆的阻害剤とは異なり、共有結合の形成により持続的かつ強力な阻害能の発現が可能となる、2) 多点相互作用に依存した強い結合力を必要としないので分子デザインの単純化が可能となるなどの優れた利点を有する。近年、これらの利点に着目したコバレントドラッグ開発が、主にがん領域の創薬研究において積極的に進められている。一方でケミカルバイオロジー研究においても、共有結合阻害剤を用いた細胞内タンパク質の網羅的機能解析がさかんに行われている。しかしながら、これらのコバレントドラッグ開発は、既存の可逆的阻害剤に共有結合形成する反応性部位 (**warhead**) を付加する戦略が進められることが多く、新規なコバレントドラッグを **de novo** で開発する手法は未だに開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質に対する共有結合阻害分子 (コバレントドラッグ) 開発のための新しい基盤技術の確立である。本研究では、コバレントドラッグ開発のための新たなプラットフォーム技術として、コバレントドラッグに適した穏やかな反応性を持つ新しい反応基の探索、新たに見出した反応基を持つ反応性フラグメント化合物から構成されるライブラリー構築と、これを用いた不可逆的阻害分子のスクリーニングを目指す。さらにスクリーニングより得られた標的タンパク質の機能を不可逆的に阻害するヒット化合物の構造活性相関を行い、より活性の強いリード化合物の開発を進める。

3. 研究の方法

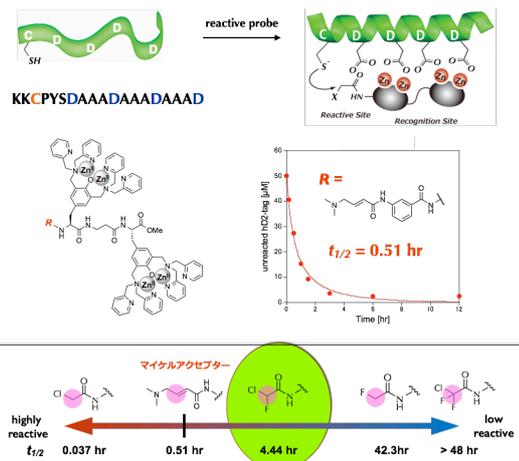
コバレントドラッグに適した穏やかな反応性を持つ反応基に探索は、我々がこれまでに開発したペプチドを用いた蛍光アッセイ

系を用いて行った。次にアッセイにより得られた望ましい反応性を有する反応基を持つ小分子フラグメントを多数合成し、ライブラリーを構築した。さらに、標的となるタンパク質の機能阻害を評価できるアッセイ系を構築し、反応性フラグメントライブラリーのスクリーニングを試みる。

4. 研究成果

(1) コバレントドラッグに適した新しい反応基の探索

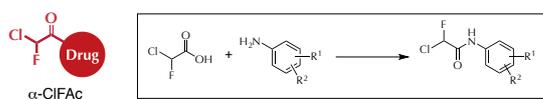
コバレントドラッグに用いる反応性基として最も重要な特性は、非特異的なラベル化を起こさない制御された穏やかな反応性である。しかし、コバレントドラッグに適した反応基を開発しようとする試みは、これまでにほとんど行われてこなかった。実際に、現在開発が盛んに行われているコバレントドラッグ型の抗がん剤は、ほぼ一様に、マイケルアクセプターをシステイン残基との反応部位として有している。しかし、マイケルアクセプターは、反応性が比較的高いため標的タンパク質以外の他のタンパク質に対する非特異的修飾 (オフターゲットラベル化) が起こることが報告されている。そこで申請者は、マイケルアクセプターに代わる新しい反応基の探索を目的として、化合物の反応性を簡便にスクリーニングできるペプチドを用いた蛍光アッセイ系を用いて検討を行った。その結果、**Cys** 残基と反応する新しい反応性基として **α-クロロフルオロアセチル基 (α-CIFAc)** を新たに見出した。この **α-CIFAc** 基は、マイケルアクセプターよりも穏やかな反応性を示し、他のタンパク質との非特異的反応を起こしにくい、コバレントドラッグに適した反応基であると予測された。



(2) α -CIFAc 基を持つ化合物ライブラリーの構築

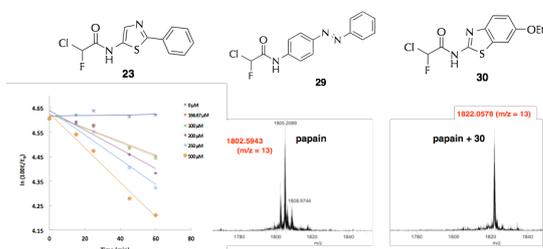
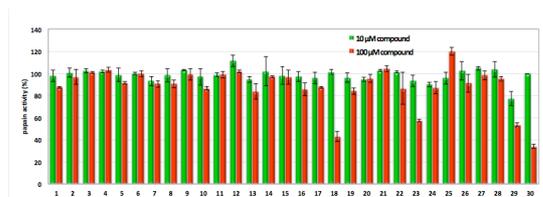
次に新たに見出した α -CIFAc 基を持つ小分子型のライブラリーの構築を行った。ライブラリー化合物は、市販のアニリン誘導体と α -クロロフルオロ酢酸との縮合反応により容易に合成できるため、短時間でライブラ

リーの構築が可能であった。市販のアニン誘導体は、試薬メーカーのリストよりセレクトして、少量ずつカスタム購入した。研究期間内では、約 **150** 種類の反応性フラグメントライブラリーの合成を行った。



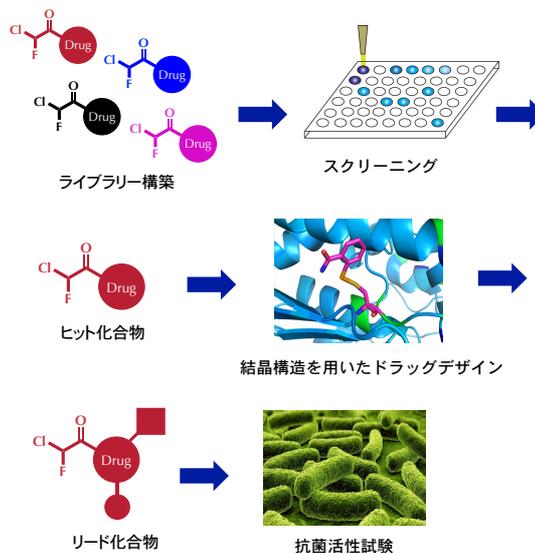
(3) コバレントドラッグアッセイ系の構築

構築した化合物ライブラリーの有用性を評価するために、初期検討として、**30** 種類のフラグメント化合物を用いてシステインプロテアーゼであるパパインに対するスクリーニングを行った。その結果、化合物 **23**, **29**, **30** が IC_{50} にして数十 μ M 程度の阻害活性を持つことを見出した。さらに **Kitz-Wilson** プロットや質量分析を行うことで化合物 **30** がパパインと共有結合を形成し、不可逆的に活性を阻害していることを明らかとした。この結果は、申請者の進める新しいラベル化反応の開拓に基づいたコバレントドラッグ探索の潜在的な有用性の高さ示す成果であると言える。



次に結核治療薬の開発を目指したスクリーニング系の確立を行った。スクリーニングの対象となる標的タンパク質である **antigen 85** は、結核菌の特殊な細胞壁を構成するトレハロースジミコール酸エステルを合成する酵素であり、その活性ポケット近傍に **Cys209** を持つ。近年、この **Cys209** と共有結合を形成するエブセレンが、**antigen 85** に対する強い阻害活性を持つことが明らかとなっており、新しい結核治療薬のターゲットとして注目を集めていることから、本研究においては、**antigen85** に対するコバレントドラッグの開発を目指した。阻害活性の評価は、エステラーゼ活性を持つ **antigen85** の基質となる蛍光性化合物を用いたアッセイ系を構築した。また、**antigen85** の大腸菌発現系も構築し、アッセイに用いる **antigen85** の供給体制が整った段階にある。本研究終了後は引き続き、構築した化合物ライブラリーから

antigen85 の阻害剤をスクリーニングする予定である。さらにヒット化合物の構造修飾を行い、より活性の高いリード化合物を見出していく。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 涸田大和、進藤直哉、田畑栄一、三浦千鶴、岡本恵、渡公佑、小野真弓、王子田彰夫、タンパク質ラベル化の化学 (3): タンパク質不可逆阻害のための反応基の探索、日本化学会第 9 5 春季年会、2015 年 3 月 26 日～3 月 29 日、日本大学 (船橋)
- ② 初山勇次、涸田大和、進藤直哉、三浦千鶴、岡本恵、渡公佑、小野真弓、王子田彰夫、不可逆阻害剤開発のための有機化学反応の探索と **EGFR** 阻害剤への応用、第 5 2 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6 月 27 日、北九州
- ③ 王子田彰夫、ペプチドデザインから始まるケミカルバイオロジーと創薬、第 4 7 回若手ペプチド夏の勉強会、2015 年 8 月 10 日、長野
- ④ 三浦千鶴、岡本恵、大澤智代、進藤直哉、桑田啓子、王子田彰夫、コバレントドラッグライブラリーの構築とその阻害剤探索への応用、第 3 2 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 28 日、九州保健福祉大学 (延岡)
- ⑤ 王子田彰夫、コバレントドラッグ創薬の試み、第 1 8 回生命化学研究会、2016 年 1 月 8 日、島原 (長崎)
- ⑥ 涸田大和、進藤直哉、初山勇次、田畑栄一、三浦千鶴、岡本恵、渡公佑、小野真弓、王子田彰夫、タンパク質不可逆阻害の化学: 新しい反応性基の探索と阻害剤開発への応用、2016 年 3 月 24 日、同志社大学 (京都)
- ⑦ 進藤直哉、涸田大和、渡公佑、小野真弓、

王子田彰夫、穏やかな反応性基を有する新規 EGFR 阻害剤の開発、第3回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム、2015年9月9日、熊本大学（熊本）

⑧ 三浦千鶴、岡本恵、大澤智代、進藤直哉、桑田啓子、王子田彰夫、タンパク質不可逆阻害の化学：反応性フラグメントライブラリーの構築と阻害剤開発への応用、2016年3月24日、同志社大学（京都）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://bunseki.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA Akio)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10343328