

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659046

研究課題名(和文)ライブラリー化合物の有効活用を目指した新規生物活性評価手法の構築と応用

研究課題名(英文)Development and application of a novel screening technology toward effective uses of chemical library

研究代表者

藤井 信孝 (Fujii, Nobutaka)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60109014

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)：キラルなライブラリー化合物の有効活用に向けて、化学合成タンパク質を用いた生物活性評価系を確立した。まず、腫瘍増殖に関与するタンパク質(MDM2, MDMX)の簡便な化学合成法を確立し、適切なフォールディングにより生物活性を有する活性タンパク質を取得した。これを研究室保有のライブラリー化合物と天然物ライブラリーからの医薬品候補化合物探索に利用して、化合物アレイ法と蛍光偏光法による2段階のスクリーニングにより複数のヒット化合物を取得した。

研究成果の概要(英文)：Development of a novel screening approach was achieved toward effective uses of chiral compound libraries for drug discovery. Two cancer-related proteins (MDM2, MDMX) with the native structures and functions were prepared via a standard solid-phase peptide synthesis and appropriate folding conditions. Using these synthetic proteins for screening of in-house chemical library and natural product library, a number of hit compounds were identified via a primary chemical array-mediated screening and the subsequent fluorescence polarization assay.

研究分野：創薬化学

キーワード：天然物 化合物ライブラリー スクリーニング アッセイ 生物活性化合物 鏡像体

1. 研究開始当初の背景

近年の医薬品のシーズ探索において、化合物ライブラリーは極めて重要な役割を果たし、多数の化合物供給のためのコンビナトリアルケミストリーや効率的な活性評価を可能にするハイスループットスクリーニング技術が著しく進歩した。一方で、無数の化合物を取り扱う HTS が、創薬プロセスの効率化に結びついているのか疑わしいとも考えられつつある。こうした背景のもと、化合物の「構造多様性」や「薬らしさ」の観点から、古来より創薬シーズとして用いられてきた天然有機化合物の有用性が再認識されつつある。すなわち、天然物は、安価な市販試薬から簡便には化学合成できない複雑かつ多様な分子構造を提供するとともに、動植物が生産する合目的性の観点から生体分子への相互作用が認められる可能性が高いと考えられている。一方で、化合物ライブラリーに含まれる天然有機化合物は一般的に対掌体の一方のみ(天然型)であり、同等の「構造多様性」や「薬らしさ」を持つ非天然型のエナンチオマー(鏡像体)は活性評価に付されていない。

2. 研究の目的

本研究では、化合物ライブラリーに含まれる各種天然有機化合物やキラルな合成化合物を有効活用するための新しい化合物探索手法の開発と実証を行う。化学合成により得られる非天然型生体分子(D-タンパク質等の鏡像異性体)を用いたスクリーニング系を確立し、非天然型の立体配置を有する生物活性化合物の効率的な探索を実現する。具体的には癌の制御に關与する MDM2・MDMX と p53 タンパク質の相互作用阻害剤の探索において本法の有用性を検証する。

3. 研究の方法

MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ 及び MDMX²⁴⁻¹⁰⁸ の化学合成 : H-Rink Amide-Chem-Matrix 樹脂上、HBTU/HOBt/DIPEA を縮合剤とする Fmoc 固相合成法により保護ペプチド樹脂を合成した。保護ペプチド樹脂を TFA/*m*-cresol/thioanisole/1,2-ethanedithiol/H₂O (80:5:5:5:5) の反応溶液中、室温で 2 時間処理し、側鎖保護基の除去を伴う樹脂からの切り出しを行った。得られた粗ペプチドを HPLC により精製し、目的のペプチドを得た。

MDM2^{TMR} 及び MDMX^{TMR} の合成 : 上述の保護ペプチド樹脂に対して、前述の縮合条件で Gly-Gly リンカーと 5-ヘキシン酸を縮合した後、非標識タンパク質と同様の手法で側鎖保護基の除去を伴う樹脂からの切り出しを行い、アルキン修飾ペプチドを得た。H₂O/DMSO/*t*-BuOH の混合溶液に CuSO₄ 水溶液と TBTA の DMSO 溶液を加え 3 分間攪拌し、続いてアスコルビン酸ナトリウム水溶液を数回に分けて加えた。この溶液に、tetramethylrhodamine (TMR)-azide とアルキン

修飾ペプチドの DMSO 溶液を加えて 15 分間攪拌し、Huisgen 環化による各ペプチドの TMR 標識を行った。この際、HPLC 精製によりジスルフィド結合を介した二量体ペプチドを得た。得られた二量体ペプチドについて TCEP を含む 6 M 塩酸グアニジン水溶液中 37°C で 5 時間インキュベートした後、再度 HPLC 精製することで目的のペプチドを得た。

化学合成ペプチドのフォールディング : ペプチドを 6 M 塩酸グアニジン水溶液で変性させた後、PBS (0.5 mM TCEP, 0.005% Tween-20, pH 7.4) で 100 倍希釈し、4°C で終夜静置してペプチドをフォールディングさせた。その後、分画分子量 3kDa のメンブレンフィルターを用いて遠心濃縮した。

CD スペクトル解析 : MDM2²²⁵⁻¹⁰⁹ 及び MDMX²⁴⁻¹⁰⁸ をそれぞれ PBS (0.5 mM TCEP, 0.005% Tween-20, pH 7.4) に希釈し、室温下で測定した。

表面プラズモン共鳴解析による MDM2-p53 及び MDMX-p53 相互作用の検出 : ビオチン修飾した p53 ペプチドを固定化した NLC センサーチップ上で、PBS (0.005 % Tween-20, pH 7.4) を用いて 20°C で ProteOn XRP360 により解析した。

化合物アレイを用いたスクリーニング : TBS-T (1% スキムミルク) を用いて調製した化合物を固定したアレイ上に MDM2^{TMR} もしくは MDMX^{TMR} を 1 時間作用させ、TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) で洗浄し、乾燥させた。GenePix スキャナで 532 nm の蛍光波長を読み取り蛍光強度を測定した。(Osada H, *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 5584)

蛍光偏光法による生物活性評価 : 0.005% Tween-20 含有 PBS を用いて調製した MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ もしくは MDMX²⁴⁻¹⁰⁸ 溶液に、化合物溶液を加えて 30 分間インキュベートした後、蛍光標識 p53 ペプチド溶液を加えて再度 30 分間インキュベートした。その後、溶液の蛍光偏光をプレートリーダーにより測定した(励起波長:480 nm, 蛍光波長:535 nm)。

4. 研究成果

[化学合成 MDM2 及び MDMX の機能評価]
MDM2 及び MDMX について表面プラズモン共鳴解析により p53 ペプチドとの結合親和性を評価した。MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ 及び MDMX²⁴⁻¹⁰⁸ の結合解離定数は文献値と同等の値を示したことから、化学合成した両タンパク質は、組換え技術等により調製された先例におけるタンパク質と同等の性質を有することが確認された(図 1)。

蛍光標識 MDM2 及び蛍光標識 MDMX の p53 ペプチドとの結合解離定数を評価したところ、非標識タンパク質と同等の値を示し、タンパク質の N 末端への蛍光団の導入が p53 ペプチドとの結合親和性に影響を与えない

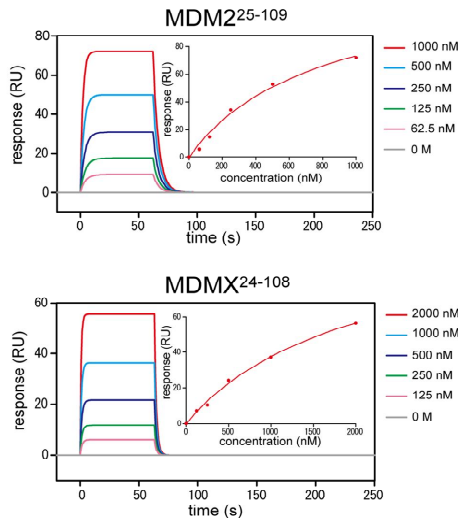


図1：化学合成 MDM2 及び MDMX の p53 ペプチドへの結合親和性評価

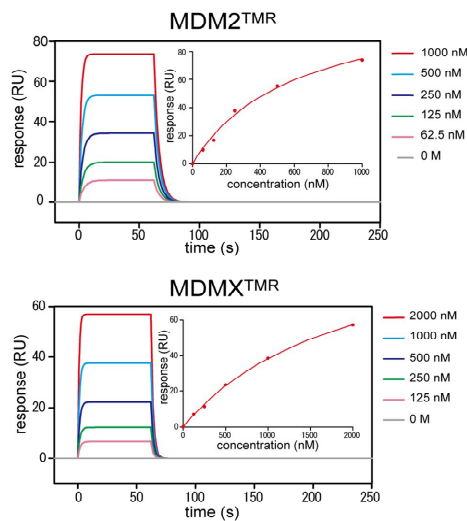


図2：蛍光標識 MDM2 及び MDMX の p53 ペプチドへの結合親和性評価

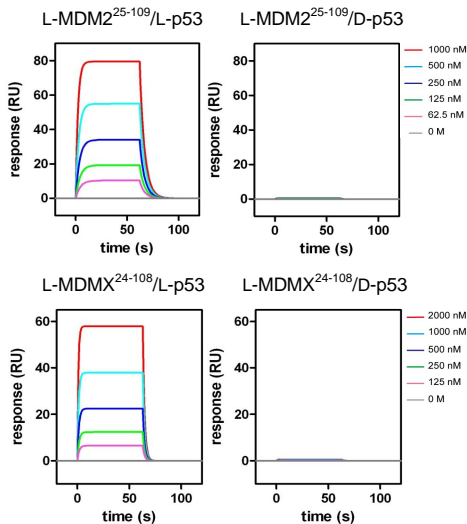


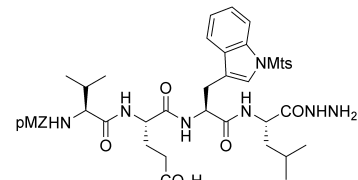
図3：MDM2 及び MDMX の L-p53 ペプチドと D-p53 ペプチドへの結合親和性評価

ことが示唆された(図2)。

また、L-MDM2 と L-MDMX はいずれも D-p53 ペプチドに結合せず、MDM2 及び MDMX の p53 結合ポケットがそのリガンドを立体特異的に認識することが確認された(図3)。

[探索プロセスの妥当性の検証：In-house 化合物ライブラリーからの阻害剤探索]
研究室が保有する化合物ライブラリーから MDM2-p53 及び MDMX-p53 阻害剤の探索を行った。7,600 化合物をガラス基板上に固定化した化合物アレイについて、MDM2^{TMR}、または、MDMX^{TMR} で処理したところ、54 化合物が MDM2 もしくは MDMX に結合活性を示した。このうち 6 化合物が MDM2 選択的に、10 化合物が MDMX 選択的に、38 化合物が MDM2 と MDMX の両方に結合した。

続いて、54 種類の候補化合物の中から、p53 結合ドメインに作用する化合物を同定するため、蛍光偏光法による p53 ペプチドとの競合阻害実験を行った。蛍光団としてカルボキシフルオレセインを有する p53 由来ペプチド (pDI) に対して競合阻害活性を有する化合物をスクリーニングしたところ、3 種類の保護ペプチド KPYA52218、KPYB00497 及び KPYP00556 を見出した。このうち、KPYB00497 は、A549 細胞に対する細胞増殖抑制活性を示した(図4)。これらにより、化学合成したタンパク質を用いた MDM2-p53 及び MDMX-p53 阻害剤の探索系が機能することを確認した。



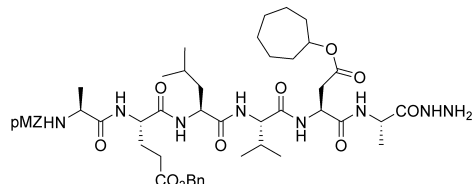
KPYA52218

IC₅₀ (L-MDM2): 8.51 μM
IC₅₀ (L-MDMX): 32.4 μM
EC₅₀ (A549 cell): >30 μM



KPYB00497

IC₅₀ (L-MDM2): 22.2 μM
IC₅₀ (L-MDMX): 42.1 μM
EC₅₀ (A549 cell): 13.7 μM



KPYB00556

IC₅₀ (L-MDM2): 21.3 μM
IC₅₀ (L-MDMX): 52.5 μM
EC₅₀ (A549 cell): >30 μM

図4：L-MDM2-L-p53 相互作用阻害剤の化学構造

[天然物及びその誘導体からの阻害剤探索]
天然物及びその誘導体のスクリーニングを行った。MDM2 及び MDMX の両エナンチオマーを用いて、D-タンパク質特異的な新規阻害剤を探索した。まず、化合物アレイ法による一次スクリーニング(理化学研究所保有ライブラリー: 22,293 化合物)により、L/D-タンパク質のいずれかに相互作用する 149 種類のヒット化合物を同定した。続いて、蛍光偏光法を用いたアッセイにより D-MDM2 の p53 結合ドメインに結合すると考えられる 8 種類の化合物を同定した(表 1)。このうち、トコフェロール誘導体は、D-MDM2-D-p53 相互作用を選択的に阻害した。このトコフェロール誘導体の鏡像体を化学合成し生物活性評価に付したところ、L-MDM2-L-p53 相互作用に対する阻害活性を示すことを確認した。さらに、この鏡像体のエピマーや異なる修飾基を有する誘導体を合成・評価し、トコフェロール誘導体の生物活性に関わる構造要素を明らかにした。

表 1: 天然物及びその誘導体からの探索プロセスにおけるヒット化合物数

タンパク質	ヒット化合物数	
	一次評価 (化合物アレイ)	二次評価 (蛍光偏光法)
L-MDM2	107	7
D-MDM2	101	8
L-MDMX	121	4
D-MDMX	47	4

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Yoshimitsu Y, Miyagaki J, Oishi S, Fujii N, Ohno H. Synthesis of pachastrissamine (jaspine B) and its derivatives by the late-stage introduction of the C-2 alkyl side-chains using olefin cross metathesis. *Tetrahedron*, 69(21) 4211-4220 (2013)
doi: 10.1016/j.tet.2013.03.091

Noguchi T, Oishi S, Honda K, Kondoh Y, Saito T, Kubo T, Kaneda M, Ohno H, Osada H, Fujii N. Affinity-based screening of MDM2/MDMX-p53 interaction inhibitors by chemical array: identification of novel peptidic inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23(13) 3802-3805 (2013)
doi: 10.1016/j.bmcl.2013.04.094

[学会発表](計 1 2 件)

Yoshimitsu T, Miyagaki J, Oishi S, Ohno H, Fujii N. 「Stereoselective divergent synthesis of four diastereomers of pachastrissamine (jaspine B) and their sphingosine kinase inhibitory activities」 ISMC2012 [2012 年 9 月 ベルリン(ドイツ)]

宮垣潤、吉光佑二、大石真也、藤井信孝、大野浩章 「Jaspine B およびその誘導体の多

様性指向型合成研究」第 42 回複素環化学討論会 [2012 年 10 月 京都テルサ(京都市)]

宮垣潤、吉光佑二、大石真也、藤井信孝、大野浩章 「Jaspine B およびその誘導体の多様性指向型合成研究」第 62 回日本薬学会近畿支部大会 [2012 年 10 月 武庫川女子大学(兵庫県西宮市)]

藤井信孝 「ケミカルバイオロジーを基盤とする創薬研究」生命分子機能研究会セミナー-2013 [2013 年 3 月 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)]

野口太朗、大石真也、久保達彦、大野浩章、近藤恭光、齋藤臣雄、長田裕之、藤井信孝 「化合物アレイを用いた新規 MDM2/MDMX-p53 阻害剤探索法の開発」日本薬学会第 133 年会 [2013 年 3 月 パシフィコ横浜(横浜市)]

Noguchi T, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Kondou Y, Saito T, Osada H, Fujii N. 「Identification of novel MDM2/MDMX-p53 interaction inhibitors by chemical array technology」2nd Annual Conference ICBS2013 [2013 年 10 月 京都大学芝蘭会館(京都市)]

野口太朗、大石真也、久保達彦、大野浩章、近藤恭光、齋藤臣雄、長田裕之、藤井信孝 「化合物アレイを用いた新規 MDM2/MDMX-p53 阻害剤探索法の開発とその応用」第 63 回日本薬学会近畿支部大会 [2013 年 10 月 同志社女子大学(京都府京田辺市)]

野口太朗、大石真也、久保達彦、大野浩章、近藤恭光、齋藤臣雄、長田裕之、藤井信孝 「化合物アレイを用いた新規 MDM2/MDMX-p53 阻害剤探索法の開発とその応用」第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム [2013 年 11 月 アステールプラザ(広島市)]

本田真歩、宮垣潤、吉光佑二、岩田顕、大槻和裕、丸山透、大石真也、大野浩章、藤井信孝 「スフィンゴシンキナーゼ阻害活性を有する Jaspine B 誘導体の構造活性相関研究」日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会 [2014 年 6 月 大阪大学(大阪府豊中市)]

本田真歩、宮垣潤、吉光佑二、岩田顕、大槻和裕、丸山透、中村真也、仲西功、大石真也、大野浩章、藤井信孝 「スフィンゴシンキナーゼ阻害活性を有する Jaspine B 誘導体の構造活性相関研究」第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム [2014 年 11 月 神戸国際会議場(神戸市)]

野口太朗、大石真也、本田香織、近藤恭光、齋藤臣雄、大野浩章、長田裕之、藤井信孝 「天然物の鏡像体化合物群の活用を目指した新規スクリーニング法の開発」日本薬学

会第 135 年会 [2015 年 3 月 デザイン・クリエティブセンター神戸 (神戸市)]

本田真歩、宮垣潤、吉光佑二、大槻和裕、丸山透、中村真也、仲西功、大石真也、大野浩章、藤井信孝「クロスメタセシス反応を利用したスフィンゴシンキナーゼ阻害剤の創製研究」日本薬学会第 135 年会 [2015 年 3 月 兵庫医療大学 (神戸市)]

[その他]

所属研究室ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizo/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 信孝 (FUJII, Nobutaka)

京都大学・大学院薬学研究科・特定教授

研究者番号 : 6 0 1 0 9 1 0 4

(2) 連携研究者

大野 浩章 (OHNO, Hiroaki)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号 : 3 0 3 2 2 1 9 2

大石 真也 (OISHI, Shinya)

京都大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号 : 8 0 3 8 1 7 3 9