

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02856

研究課題名(和文) 全てのリン酸化酵素を標的としたフォールディング中間体阻害の評価系構築

研究課題名(英文) Drug discovery targeting folding intermediates of kinases

研究代表者

喜井 勲 (Kii, Isao)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：80401561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン酸化酵素のフォールディング中間体を標的とした低分子創薬を汎用化するための概念と技術の確立を行った。具体的には、中間体阻害の概念を強固にするため、リン酸化酵素 DYRK1A とそのフォールディング中間体選択的阻害剤 FINDY の結合様式を解明した。汎用技術を確認するため、タンパク質の熱力学的平衡状態に着目した新技術「温度ジャンプ」を構築した。本技術はリン酸化酵素 DYRK1A をモデルとして実験系の構築を行い、他のリン酸化酵素にも適用可能であることを確認した。本概念と技術の確立により、リン酸化酵素のみならず他のタンパク質に適用可能なフォールディング中間体選択的阻害の創薬技術基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、リン酸化酵素のフォールディング中間体が低分子創薬の標的となり得ることを実証した。これは従来の精製タンパク質が有する阻害剤結合ポケット以外にも、構造多様性が確保できることを意味し、低分子創薬における標的ケミカルスペースの拡張につながると期待される。また、「温度ジャンプ」は様々なタンパク質に適用できる技術であり、既存のスクリーニング評価系に容易に組み込むことができるため、製薬企業や創薬ベンチャーが実施する大規模化合物ライブラリを対象としたスクリーニングに搭載することで、これまで見過ごされてきた新しいタイプの阻害剤の発見につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established the concept and technology to develop drug discovery to target folding intermediates of kinases. To confirm the concept of folding intermediate-selective inhibition, we elucidated the binding mode of the kinase DYRK1A and its folding intermediate-selective inhibitor FINDY. To establish a general-purpose technology, we constructed a new technology termed "temperature vaulting," which focuses on the thermodynamic equilibrium of protein structure. An experimental system was constructed using DYRK1A as a model, and it was confirmed that this technology is applicable to other kinases. With this concept and technology, we have established the basis for drug discovery technology for selective inhibition of folding intermediates that can be applied not only to kinases but also to other proteins.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：リン酸化酵素、フォールディング中間体、DYRK1A、非天然状態、無細胞タンパク質合成、熱力学的平衡状態、温度ジャンプ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) リン酸化酵素を標的とした創薬研究開発

低分子医薬品の約 20%はリン酸化酵素を標的としている。これらリン酸化酵素に対する阻害剤は、酵素活性中心である ATP 結合ポケットに結合することで、その活性を阻害する。

ヒトゲノムには約 520 種類のリン酸化酵素がコードされている。阻害剤の研究開発では、これらリン酸化酵素群における選択性が重要である。しかし、ATP 結合ポケットが保存されているため、阻害剤の選択性を上げることは難しく、副作用の発生が懸念されている。

この課題を解決する 1 つの考え方は、活性ドメインにある構造多様性が担保されている阻害剤結合部位を標的とした低分子創薬を実施することである。例えば、ATP 結合ポケットよりも構造多様性が担保されている部位として、アロステリック部位が挙げられる。アロステリック部位を標的とした低分子創薬は比較的困難であるため、依然として ATP 結合ポケットを標的とした低分子創薬が進められている。

(2) リン酸化酵素 ABL の不活性化状態（非天然状態）を標的とした低分子医薬品イマチニブ

リン酸化酵素の活性ドメインは安定な変化しない構造を取るわけではなく、揺らいだ構造をとり、さらにその構造が低分子医薬品の標的となることが知られている。例えば、リン酸化酵素 ABL の活性ドメインは、安定な活性化状態（天然状態）と不安定な不活性化状態（非天然状態）の平衡状態をとる。慢性骨髄性白血病に対する医薬品である ABL 阻害剤イマチニブは、後者の不活性化状態の ATP 結合ポケットに結合することで、その構造を安定化し、活性化状態への遷移を抑制する（引用文献①）。

グリベックは、活性化状態（天然状態）の ATP 結合ポケットを標的とする低分子医薬品よりも選択性が高いことが知られている。これは、不活性化状態（非天然状態）にある ATP 結合ポケットが、活性化状態（天然状態）にあるポケットよりも不安定で変化しやすく、結果として構造多様性が担保されているからである。不活性化状態（非天然状態）にある ATP 結合ポケットの多様な構造の中でも、グリベックが標的とした構造は、他のリン酸化酵素での出現頻度が少なく、副作用の少ない低分子医薬品となったと考えられる。

(3) リン酸化酵素のフォールディング途中に一過的に存在する過渡的構造体

上記 ABL 以外にも、リン酸化酵素の活性ドメインの構造多様性が報告されている。例えば、DYRK ファミリーに属するリン酸化酵素 (DYRK1A など) や GSK3β では、そのフォールディング途中において、フォールディングの完了した活性ドメインとは異なる構造をとることが報告されている。このフォールディング途中に過渡的に出現する特異な構造は、ATP を基質として自分自身をリン酸化する分子内自己リン酸化反応を触媒する。この分子内自己リン酸化は、これらの酵素の活性化に必要であり、正常なフォールディングの是非を判定する品質管理機構となっている。つまり、活性化状態（天然状態）にある活性ドメインとは異なる構造が、フォールディングの途中に形成され、その過渡的構造は同じく酵素活性を有している。

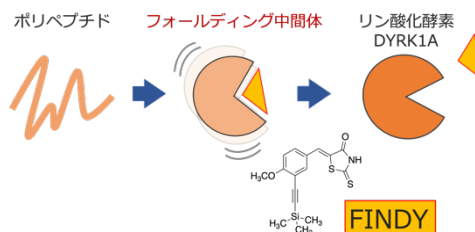
さらに、このフォールディング途中の過渡的構造の ATP 結合ポケットは、フォールディングの完了した活性ドメインのものとは、低分子阻害剤の結合の点において異なると報告されている。Lochhead らは、複数の低分子阻害剤を用いることで、これらの ATP 結合ポケットの阻害剤への結合親和性が異なることを証明した（引用文献②）。これは、フォールディング途中にある過渡的構造も低分子創薬の標的となり得ることを示している。さらに、フォールディングが未完了な構造（中間体）は、不安定な非天然状態にあるため、その構造多様性が期待される。

(4) リン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング中間体を選択的に阻害する化合物の同定

Lochhead らの報告を受けて、我々はリン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング中間体を触媒する分子内自己リン酸化を選択的に阻害する化合物の探索を行なった。この探索では、DYRK1A 第 97 番目セリン残基 (Ser97) の分子内自己リン酸化を検出する特異的抗体を作製した。この Ser97 分子内自己リン酸化は、フォールディング途中に一過的に起こることがわかっており、培養細胞株においてリン酸化 Ser97 を検出することで、化合物がフォールディング中間体を阻害したかを判定することができる。

我々は、培養細胞株 HEK293 を用いてフォールディング中間体の選択的阻害を評価する実験系を構築し、約 200 種類の化合物をスクリーニングした。これらの化合物は、フォールディングの完了した天然状態にあるリン酸化酵素 DYRK1A を標的とする阻害剤 RD0392 の構造類縁体である。その結果、リン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング中間体を選択的に阻害する新規化合物として RD0392 構造類縁体を発見し、FINDY と命名した（右図：引用文献③）。

さらに FINDY の DYRK1A フォールディング中



間体に対する作用を検証するため、無細胞タンパク質合成系を構築した。無細胞タンパク質合成系とは、試験管内にて mRNA を鋳型として翻訳を行い、タンパク質を合成する実験系である。翻訳されたポリペプチドは、フォールディングされ、天然状態へと収束する。その途中にはフォールディング中間体が存在し、DYRK1A の場合は Ser97 分子内自己リン酸化が触媒される。無細胞タンパク質合成系には、タンパク質合成に必要な最低限の因子のみしか含まれていないため、FINDY の DYRK1A フォールディング中間体への作用をより直接的に検証できると考えた。この無細胞タンパク質合成系において、FINDY は Ser97 分子内自己リン酸化を選択的に阻害することが判明した。

以上の結果から、リン酸化酵素の非天然状態は低分子阻害剤の標的となり得ることが実証された。また、その同定・評価には、タンパク質のフォールディング中間体を試験管内にて生成することができる無細胞タンパク質合成系が有効であることが示された。

(5) これまでの研究における課題

研究を進展させる場合に、2つの課題が挙げられる。1つ目は、リン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング中間体に対して FINDY が直接結合しているかが未解明な点である。無細胞タンパク質合成系を用いたため、他の因子が介在する可能性は低いが、直接的な証明とはならない。また、FINDY しかフォールディング中間体選択的阻害剤が得られていないため、偶発的な現象であることが否定できていない。2つ目は、リン酸化酵素 DYRK1A 以外のリン酸化酵素や、リン酸化酵素以外のタンパク質においても、そのフォールディング中間体などの非天然状態を選択的な標的とする阻害剤をスクリーニングするための汎用的な技術がないことである。無細胞タンパク質合成系は、汎用的な技術となり得るが、大規模化合物スクリーニングに使用するには、コストがかかり過ぎることが問題である。

2. 研究の目的

本研究では、上記2つの課題を解決するため、以下の2つの研究項目に取り組み、フォールディング中間体選択的阻害の概念を、ヒトゲノムにコードされる全てのリン酸化酵素に対して拡張することを目的とした。

研究項目(1) : DYRK1A フォールディング中間体に対する FINDY の阻害作用の直接的証明

リン酸化酵素 DYRK1A フォールディング中間体に対して FINDY が直接結合するかを検証することを項目(1)-1として実施した。具体的には、大腸菌でリン酸化酵素 DYRK1A 活性ドメインを発現させる際に FINDY を添加し、その後複合体を単離・精製することで、複合体に FINDY が含まれるかを調べた。複合体に FINDY が含まれていれば、直接結合していると結論できる。加えて、FINDY 以外にもリン酸化酵素 DYRK1A フォールディング中間体を標的とする阻害剤が取得できることを示すため、FINDY について構造活性相関解析を行なった。具体的には、FINDY の構造類縁体を新たに合成し、それらの中間体に対する阻害活性を、無細胞タンパク質合成系を用いて定量的に評価した。

研究項目(2) : 他のリン酸化酵素へ適用可能な中間体選択的阻害剤の評価技術の確立

FINDY の同定では、フォールディング中間体を選択的に触媒する Ser97 分子内自己リン酸化を検出できる抗体が有効に働いた。しかし、他のリン酸化酵素では、このような分子内自己リン酸化部位は明らかとされていない。当初、無細胞タンパク質合成系を用いてリン酸化酵素を発現させ、分子内自己リン酸化部位を同定する計画を立てていたが、無細胞タンパク質合成系で細胞内のフォールディング過程における分子内自己リン酸化が再現できるか不明であることと、リン酸化酵素 DYRK1A においても無細胞タンパク質合成系での分子内自己リン酸化の効率が悪く、合成されたタンパク質の1%程度しか自己リン酸化されないことが判明し、この無細胞タンパク質合成系を評価技術として用いることを断念した。

さらに、無細胞タンパク質合成系にかかるコストは高く、数十万種類の化合物ライブラリを対象としたスクリーニングには適用できそうにないことも判明した。そこで、より簡便かつ安価に大規模化合物スクリーニングに適用できる技術の開発を進めた。

3. 研究の方法

(1)-1 リン酸化酵素 DYRK1A 活性ドメインへの FINDY の直接結合の証明

DYRK1A 活性ドメインへの FINDY の直接結合を証明するため、我々は大腸菌にて活性ドメインを発現させる実験系を構築した。この大腸菌の培養液に対して、FINDY を添加し、その後 IPTG による DYRK1A 活性ドメインの発現誘導を行った。大腸菌から精製した活性ドメインを変性させることで FINDY を遊離させ、結合量を UV 吸収分析により定量した。

(1)-2 リン酸化酵素 DYRK1A 中間体選択的阻害剤 FINDY の構造活性相関解析

FINDY の trimethylsilyl 基部分の構造展開を行い、合計11種類の構造類縁体を合成した。化合物設計に資するために、阻害剤 RD0392 と天然状態にある DYRK1A 活性ドメインの複合体の結晶構造解析を実施し、その構造を解明した。

これら構造類縁体のリン酸化酵素 DYRK1A フォールディング中間体が触媒する Ser97 分子内自己リン酸化活性に対する阻害作用を無細胞タンパク質合成系を用いて定量的に評価し、

IC₅₀ 値を算出した。

また、FINDY 構造類縁体の天然状態にある DYRK1A 活性ドメインの ATP 結合ポケットへの結合様式を解明するため、*in silico* ドッキング計算を行なった。これら FINDY 構造類縁体は天然状態にある ATP 結合ポケットに対しては結合しないことが実験的に判明しているため、本ドッキング計算では、これら FINDY 構造類縁体の trimethylsilyl 基相当部分の ATP 結合ポケット入口との立体障害を計算により求めた。

(2) タンパク質の非天然状態を標的とする化合物の評価技術の構築

当初計画では、リン酸化酵素のフォールディング中間体の示す分子内自己リン酸化活性を評価する目的で、無細胞タンパク質合成系をリン酸化酵素において構築する予定だった。しかし、DYRK1A 以外のリン酸化酵素では、フォールディング中間体が触媒する分子内自己リン酸化部位は明らかにされておらず、無細胞タンパク質系で細胞内のフォールディング過程における分子内自己リン酸化を再現できるか不明であること、また無細胞タンパク質合成系での分子内自己リン酸化の効率が DYRK1A を含め、検討した 5 種類の他のリン酸化酵素で 1% 以下しかないことが判明し、この無細胞タンパク質合成系を評価技術として用いることを断念した。

本研究では、無細胞タンパク質合成系に代わる新たな方法として、タンパク質の熱力学的平衡状態に着目した。タンパク質の立体構造の安定性は、ギブス自由エネルギーによって規定されており、熱エネルギーである温度に依存している。理論的には、天然状態にあるタンパク質を加熱することで、そのフォールディングは解けて非天然状態となり、その後冷却することでフォールディングが進行し、天然状態へと戻る。この理論を応用し、天然状態にある精製タンパク質を瞬間的に加熱することで、フォールディングの解けた非天然状態を試験管内に作り出し、その後冷却することで、フォールディング過程を再現する技術を構築した。さらに、この技術を用いて、リン酸化酵素 DYRK1A と FINDY、および、他のリン酸化酵素をモデルとしてフォールディング中間体選択的阻害の評価系を構築した。

4. 研究成果

(1)-1 リン酸化酵素 DYRK1A 活性ドメインへの FINDY の直接結合の証明 (引用文献④: Kimura et al., Protein Expr Purif. 2022 Aug;195-196:106089. doi: 10.1016/j.pep.2022.106089.)

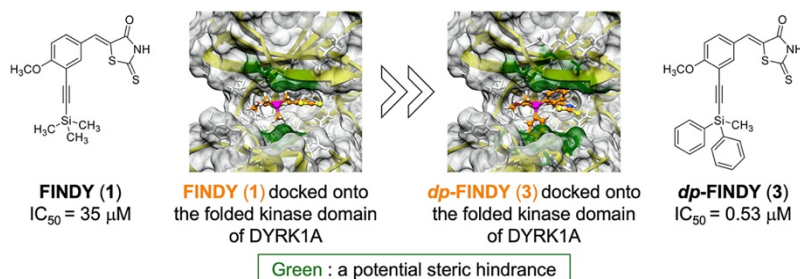
大腸菌培養液に FINDY (終濃度 60 μM) を添加した状態でリン酸化酵素 DYRK1A 活性ドメインのリコンビナントタンパク質を発現させ、その後クロマトグラフィーにより活性ドメインを精製した。この際、精製過程のバッファー類には FINDY を添加していない。活性ドメインに結合した FINDY を定量した結果、活性ドメイン 1 分子あたり約 0.2 分子の FINDY が結合していることが明らかとなった。また、活性ドメインの溶出ピークと FINDY の溶出ピークは完全に一致していることから、両者は結合した状態で精製されたと考えられる。回収されたリコンビナント活性ドメインのタンパク質量から、大腸菌細胞内での活性ドメインタンパク質濃度が約 20 μM と算出された。細胞内のタンパク質濃度が高いことと、FINDY はフォールディングの完了した天然状態にある活性ドメインには結合できないことを考慮すると、活性ドメイン 1 分子あたり約 0.2 分子の FINDY の結合検出は、妥当な結果であると判断した。

以上の結果から、FINDY はリン酸化酵素 DYRK1A 活性ドメインに直接結合すると結論づけた。また、精製過程のバッファー類に FINDY を添加していないため、解離速度の速い場合は、FINDY が検出できないはずである。つまり、FINDY の活性ドメイン複合体からの解離は比較的遅いと考えられた。

(1)-2 リン酸化酵素 DYRK1A フォールディング中間体選択的阻害剤 FINDY の構造活性相関解析 (引用文献⑤: Miyazaki et al., Eur J Med Chem. 2022 Jan 5;227:113948. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113948.)

FINDY 構造類縁体の設計のため、阻害剤 RD0392 と天然状態にあるリン酸化酵素 DYRK1A 活性ドメインの複合体の結晶構造解析を行なった。その結果、RD0392 は ATP 結合ポケットを標的としていることが判明した。この結合構造を利用して、ドッキング計算により FINDY の結合構造を予測した。その結果、FINDY の trimethylsilyl 基は、N-lobe の ATP 結合ポケット入口にある Ile165 と立体障害を起こすことが判明し、これが FINDY が天然状態に対して阻害活性を示さない理由であるとわかった。次にこの構造情報をもとにして、FINDY の trimethylsilyl 基を構造展開し、新たに 11 種類の構造類縁体を合成した。

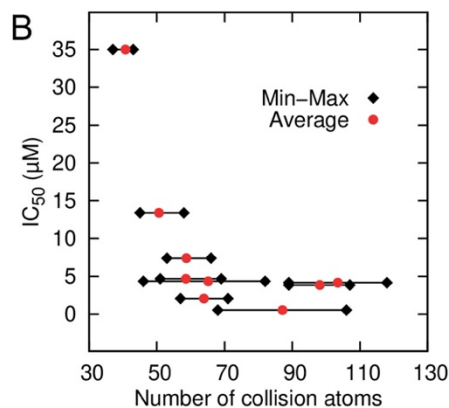
FINDY 構造類縁体のリン酸化酵素 DYRK1A フォールディング中間体が触媒する Ser97 分子内自己リン酸化に対する阻害活性を評価した結果、FINDY よりも約 60 倍高い阻害活性を示す新規化合物を同定し、*dp* FINDY と命名した (右図)。



dp-FINDY は、FINDY の trimethylsilyl 基部分が diphenylmethylsilyl 基に置換された化合物であり、ドッキング計算の結果では、活性ドメイン ATP 結合ポケット入口と立体障害を生じることが判明した。

培養細胞株 HEK293 に対して *dp*-FINDY を作用させたところ、2 μ M にて内在性 DYRK1A タンパク質の消失が確認された。これは、*dp*-FINDY がフォールディングの進行を阻害した結果、立体構造形成が破綻し、細胞内の品質管理機構によって除去されたと考えられる。

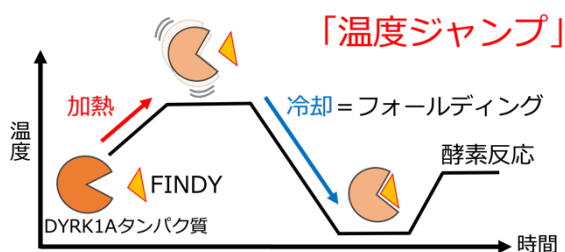
FINDY 構造類縁体の Ser97 自己リン酸化阻害活性の IC₅₀ 値と ATP 結合ポケット入口との立体障害の大きさを比較したところ、相関関係があることが判明した (右図)。この結果は、立体障害が Ser97 自己リン酸化阻害活性に関係すること、最適な立体障害の大きさがあることを示唆していた。



(2) タンパク質の非天然状態を標的とする化合物の評価技術の構築 (Suzuki et al. 論文投稿準備中、特許出願済)

試験管内にて天然状態にある精製タンパク質から、非天然状態にあるフォールディング中間体を作り出すため、我々はタンパク質溶液を瞬間的に加熱し、その後冷却する実験系を考案し、「温度ジャンプ」と命名した (右図)。

96-well PCR プレートにリン酸化酵素 DYRK1A 活性ドメインのリコンビナントタンパク質と FINDY を添加し、サーマルサイクラーを用いて 62 °C まで急速に加熱し、20 秒間温度を保持したのち、室温まで急速に冷却した。その結果、FINDY の活性ドメインへの阻害が確認された。この阻害は、加熱・冷却依存性であった。さらに、FINDY 構造類縁体を用いて阻害 IC₅₀ 値を算出し、その数値を無細胞タンパク質合成系で確認した分子内自己リン酸化阻害活性の IC₅₀ 値と比較したところ、相関が確認された。これは、精製リコンビナントタンパク質を用いた温度ジャンプが、無細胞タンパク質合成系でのフォールディング過程を再現していることを示している。



さらにリン酸化酵素 DYRK1A 以外のリン酸化酵素への適用を検討するため、DYRK1B と ABL の活性ドメインのリコンビナントタンパク質を作製し、化合物スクリーニングを実施した。その結果、DYRK1A に対する選択的阻害剤である FINDY 構造類縁体は、DYRK1B に対しては、阻害活性を示さないことが判明した。DYRK1A と 1B の活性ドメインは高い構造類似性を有しているが、温度ジャンプによって出現する非天然状態では、阻害剤結合ポケットの構造が異なることが示唆された。これは、フォールディング中間体のような非天然状態が選択性の高い阻害剤を創出する上で有利であることを示している。加えて、ABL に対しては、温度ジャンプ依存性の阻害剤が同定され、本技術の応用可能性が示唆された。その他のリン酸化酵素として SRC, ROCK1, PKCmu, SYK, FYN でも温度ジャンプ評価系を構築しており、最終的には全てのリン酸化酵素で評価系を構築する予定である。

温度ジャンプによる天然状態からの非天然状態の出現は、タンパク質一般に適用できる概念であり、ギブス自由エネルギーにより決定される温度依存的な可逆的過程である。この技術を応用することで、タンパク質のフォールディング中間体のような非天然状態を標的とした創薬スクリーニングが可能となると期待される。タンパク質のフォールディング状態は細胞内では特にゆらぎやすく、天然状態と非天然状態の平衡状態にあると報告されている。そのため、温度ジャンプを搭載したスクリーニングによって得られたヒット化合物は、細胞内で有効性を示すことができると考えられる。今後は、非天然状態を標的とした低分子阻害剤の創出にかかる基盤を理論と実験の両面から確立していく。

<引用文献>

- ① Xie et al., Science. 2020 Oct 9; 370(6513): eabc2754. doi: 10.1126/science.abc2754
- ② Lochhead et al., Cell. 2005 Jun 17;121(6):925-36. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.034.
- ③ Kii et al., Nat Commun. 2016 Apr 22;7:11391. doi: 10.1038/ncomms11391.
- ④ Kimura et al., Protein Expr Purif. 2022 Aug;195-196:106089. doi: 10.1016/j.pep.2022.106089.
- ⑤ Miyazaki et al., Eur J Med Chem. 2022 Jan 5;227:113948. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113948.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Ninako, Saito Kanako, Niwa Takashi, Yamakawa Masato, Igaue Shota, Ohkanda Junko, Hosoya Takamitsu, Kii Isao	4. 巻 195-196
2. 論文標題 Expression and purification of DYRK1A kinase domain in complex with its folding intermediate-selective inhibitor FINDY	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106089 ~ 106089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2022.106089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki Yuka, Kikuchi Masaki, Umezawa Koji, Descamps Aurelie, Nakamura Daichi, Furuie Gaku, Sumida Tomoe, Saito Kanako, Kimura Ninako, Niwa Takashi, Sumida Yuto, Umehara Takashi, Hosoya Takamitsu, Kii Isao	4. 巻 227
2. 論文標題 Structure-activity relationship for the folding intermediate-selective inhibition of DYRK1A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 113948 ~ 113948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2021.113948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toyomoto Masayasu, Inoue Asuka, Iida Kei, Denawa Masatsugu, Kii Isao, Ngako Kadji Francois Marie, Kishi Takayuki, Im Dohyun, Shimamura Tatsuro, Onogi Hiroshi, Yoshida Suguru, Iwata So, Aoki Junken, Hosoya Takamitsu, Hagiwara Masatoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 S1PR3-G12-biased agonist ALESIA targets cancer metabolism and promotes glucose starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 S2451-9456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umezawa Koji, Kii Isao	4. 巻 26
2. 論文標題 Druggable Transient Pockets in Protein Kinases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 651 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26030651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Suguru, Sakata Yuki, Misawa Yoshihiro, Morita Takamoto, Kuribara Tomoko, Ito Harumi, Koike Yuka, Kii Isao, Hosoya Takamitsu	4. 巻 57
2. 論文標題 Assembly of four modules onto a tetraazide platform by consecutive 1,2,3-triazole formations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 899 ~ 902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc07789e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoya Yusuke, Nojo Wataru, Kii Isao, Suzuki Takanori, Imanishi Miki, Ohkanda Junko	4. 巻 56
2. 論文標題 Identification of synthetic inhibitors for the DNA binding of intrinsically disordered circadian clock transcription factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11203 ~ 11206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc04861e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Kenji, Terao Nodoka, Kii Isao, Nakagawa Reiko, Niwa Takashi, Hosoya Takamitsu	4. 巻 22
2. 論文標題 Indolizines Enabling Rapid Uncaging of Alcohols and Carboxylic Acids by Red Light-Induced Photooxidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 5434 ~ 5438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c01799	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yazaki Junshi, Kawashima Yusuke, Ogawa Taisaku, Kobayashi Atsuo, Okoshi Mayu, Watanabe Takashi, Yoshida Suguru, Kii Isao, Egami Shohei, Amagai Masayuki, Hosoya Takamitsu, Shiroguchi Katsuyuki, Ohara Osamu	4. 巻 48
2. 論文標題 HaloTag-based conjugation of proteins to barcoding-oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e8 ~ e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama Takashi, Kobayashi Tominari, Jirintai Suljid, Kii Isao, Nagashima Shigeo, Prathiwi Primadharsini Putu, Nishizawa Tsutomu, Okamoto Hiroaki	4. 巻 270
2. 論文標題 Screening of novel drugs for inhibiting hepatitis E virus replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jviromet.2019.04.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 喜井 勲
2. 発表標題 リン酸化酵素フォールディング中間体を標的とした創薬研究
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会学術集会 シンポジウム1 ケミカルバイオロジーの新展開と創薬 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜井 勲
2. 発表標題 リン酸化酵素のフォールディング中間体を標的とした創薬研究
3. 学会等名 2nd WPI-NanoLSI Special Seminar -Frontiers in Chem-Bio- (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜井 勲
2. 発表標題 リン酸化酵素のフォールディング中間体を標的とした創薬研究
3. 学会等名 新学術領域「分子夾雑の生命化学」第2回 関東地区シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜井 勲
2. 発表標題 リン酸化酵素のフォールディング中間体を標的とした創薬研究
3. 学会等名 第8回生命科学阿波おどりシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜井 勲
2. 発表標題 リン酸化酵素のフォールディング中間体を標的とした創薬研究
3. 学会等名 水無月セミナー@大阪大学蛋白質研究所（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古家 岳、梅澤 公二、菊地 正樹、鈴木 空、木村 仁奈子、山川 真慧、丹羽 節、細谷 孝充、梅原 崇史、喜井 勲
2. 発表標題 リン酸化酵素フォールディング中間体選択的阻害のハイスループット定量評価系
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 侑香、菊地 正樹、梅澤 公二、Aurelie Descamps、中村 大地、古家 岳、隅田 ともえ、齊藤 佳南子、木村 仁奈子、丹羽 節、隅田 有人、梅原 崇史、細谷 孝充、喜井 勲
2. 発表標題 リン酸化酵素DYRK1Aのフォールディング中間体選択的阻害の構造活性相関
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 空、喜井 勲
2. 発表標題 標的タンパク質の準安定状態に結合する阻害剤は解離が遅い
3. 学会等名 第13回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 選択的機能性物質の探索方法、選択的機能性物質探索装置、選択的機能性物質探索方法、および、プログラム	発明者 喜井勲、古家岳、梅澤公二	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/044375	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 選択的阻害剤の探索方法、選択的阻害剤探索装置、選択的阻害剤探索方法、および、プログラム	発明者 喜井勲、古家岳、梅澤公二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2020 - 201892	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>信州大学 特許紹介映像シリーズvol.6 https://www.shinshu-u.ac.jp/guidance/media/movie/2022/01/vol6undruggabledrugable.html 温度ジャンプ技術紹介資料 https://drive.google.com/file/d/1Rcqn9QICFR0gWnra_S1BBN0gICjX5Cug/view 神経疾患に関わるリン酸化酵素DYRK1Aのフォールディング中間体に対する新規阻害剤の同定に成功 https://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/news/2021/11/dyrk1a.php 研究室ホームページ https://iki180.wixsite.com/drugtarget</p>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------