



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	スルホニルフルオリドの反応性を利用した共有結合性リガンドの創製研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	宍戸, 裕子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13339号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71889
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuko_Shishido_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学）氏 名 宍戸 裕子

審査担当者	主 査	教 授	周東 智
	副 査	教 授	市川 聡
	副 査	講 師	渡邊瑞貴
	副 査	教 授	阿部 洋（名古屋大学大学院理学研究科）

学位論文題名

スルホニルフルオリドの反応性を利用した共有結合性リガンドの創製研究

博士学位論文審査等の結果について（報告）

共有結合性リガンドとは、標的タンパク質と不可逆的に結合しその機能を阻害する分子であり、強い薬理作用、薬効時間の長期持続など優れた機能を有することが期待される。現在医薬品として市販されている共有結合性リガンドの多くは偶然の発見によるものであるが、最近になって合理的な設計が行われるようになった。主なデザインの方法は標的タンパク質のリガンド結合部位近傍に存在する求核性アミノ酸残基を狙い、その標的タンパク質の基質の適切な位置に求電子反応性官能基を導入することで行われる。標的とするタンパク質に応じて様々な求核性アミノ酸残基と反応するスルホニルフルオリド (SF) が近年、ケミカルバイオロジーの分野で広く用いられている。SF は酸化還元、高温などの条件下や水中でも安定である一方、特異的な環境下で活性化を受けると反応する特徴を有する。宍戸裕子は SF を反応性官能基として用いることで、グルタチオン *S*-転移酵素 (glutathione *S*-transferase, GST) 及び上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とした共有結合性リガンドの創製研究を実施し以下の成果を得た。

1. GST を標的とした共有結合性リガンドの開発

GST は生体内解毒機構を担う重要な酵素であり、疎水性かつ求電子性の化合物がその基質となる。GST にはグルタチオン (glutathione, GSH) が結合しており、基質に対する GSH チオール基の求核置換反応を触媒し GSH 抱合体を生成する。GST には複数のサブタイプ (A₁₋₁, P₁₋₁, M₂₋₂ など 9 種) が存在し、中でも癌組織において高発現している GSTP₁₋₁ は抗癌剤の創薬標的として有望である。既報の GST 阻害剤は主に GSH 骨格を基盤とした阻害剤であり、細胞内に高濃度に存在する GSH と競合するため細胞内では効果が弱い。強力な抗癌活性を発揮することを期待し、共有結合性 GST 阻害剤の開発に取り組んだ。

GSH において γ Glu のアミノ基及びカルボキシル基は GSH の結合に必須である。また、GST 上の Tyr 残基は Cys (GSH) のチオールプロトン塩基として引き抜く事が明らかとなっている。以上の点を踏まえ、GST の Cys 残基先端に反応性官能基を導入する事で、合理的に共有結合性 GST 阻害剤を設計・合成した。その結果、既存の GST 阻害剤を凌ぐ活性を有する GS-ESF を筆頭として、有望な GST 阻害活性を有する化合物群を見出した。各生化学実験の結果、GS-ESF が GST と共有結合を形成し、その機能を不可逆的に阻害することが示唆された。

次に GS-ESF と共有結合した GST のアミノ酸残基を特定するため阻害剤と共有結合した GST を精製した。LC-MS/MS 及び X 線結晶構造解析の結果、阻害剤は GST の Tyr108 と共有結合していることが明らかとなった。

さらに、細胞内で機能するベンゼンスルホニルフルオリド (BSF) 型リガンドの創製を目指した結果、GST と共有結合する阻害剤を見出した。LC-MS/MS により阻害剤の GSH 抱合体は GST の Tyr7 および Tyr108 と共有結合していることが明らかとなった。

2. EGFR を標的とした共有結合性アプタマーの開発

SF をアプタマーに導入することにより標的タンパク質に共有結合し、EGFR を特異的かつ強力に阻害するリガンドの開発を目指した。EGFR は細胞の増殖や成長、分化において重要な役割を果たすチロシンキナーゼ型受容体であり、固形癌において過剰発現している。

アプタマーは *in vitro* selection 法である SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 法を用いて取得した。ライブラリーの 5'末端に SF 基を導入し初期ライブラリーを構築し、全 10 サイクルのスクリーニングにより得られたライブラリー中のシーケンス解析を行った後、得られたアプタマー候補 DNA を合成し、EGFR との結合能を調べた。その結果、二種類の配列において EGFR に対する DNA アプタマーを得ることに成功した。

以上のように、宍戸裕子は、反応性官能基として SF を用いた共有結合性リガンドの創製研究を展開し、GST を標的としたリガンドの創出に成功するとともに、その反応機序を明らかとした。さらに、EGFR を標的としたリガンドの創製に取り組み、SELEX 法により得られた DNA ライブラリーの塩基配列解析により、EGFR に強固に結合する DNA アプタマーの取得に成功した。ケミカルバイオロジーにおいて重要な共有結合阻害剤の発展に大いに寄与する学術的成果であり、北海道大学博士（臨床薬学）の学位を授与するに十分値するものと判断した。