



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 [全文の要約]
Author(s)	宍戸, 裕子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/71890
Type	doctoral thesis
File Information	Yuko_Shishido_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏 名 宍戸 裕子

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

共有結合性リガンドとは、標的タンパク質と共有結合し、不可逆的に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り、その後の研究によりそのメカニズムが明らかとなったものが多く、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。標的となるアミノ酸残基としてはシステインが良く知られ、それに対する反応性官能基としてはマイケルアクセプターなどが有効である。しかし、機能タンパク質には基質結合部位近傍にシステイン以外のアミノ酸残基を有するものも多く、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 K. Barry Sharpless らにより開発された求電子性官能基であり、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といったユニークな特徴を有する。そこで SF の反応性に着目し、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を目的として研究を行った。

1. GST を標的とした共有結合性リガンドの開発

【背景】 GST は生体内で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、細胞内に高濃度 (1~10 mM) に存在するグルタチオン (glutathione, GSH) が結合しており、GST は基質に対する GSH チオール基の求核置換反応を触媒する。この反応により GSH 抱合体となった基質は、細胞内の異物排出ポンプによって細胞外に排出される。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、その中でも GSTP₁₋₁ は癌組織において高発現しており、抗癌剤の創薬標的として有望視されている。また、GSTP₁₋₁ はアポトーシスのシグナル伝達経路への関与も指摘されており、その阻害により既存の抗癌剤の補助剤ではなく、直接的な抗癌活性を示す抗癌剤としての利用も期待できる。これまでに報告された GST 阻害剤の役割は抗癌剤の併用使用における薬剤耐性の獲得阻害であり、直接的な抗癌活性を期待できない。また、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

高濃度の阻害剤を投与する必要がある。そこで本研究ではより低濃度で抗癌活性を発揮する GST 阻害剤の開発を目指し共有結合阻害剤の開発に取り組んだ。

【結果・考察】 GSH において γ Glu のアミノ基及びカルボキシル基は、GST の G 部位の Gln 及び Ser 残基によって認識されている。この部位は 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に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。共有結合型の阻害では共有結合を形成する段階が律速であると考えられるため、阻害剤と GST の反応時間に対する酵素活性の変化を追跡したところ時間依存的に GST 阻害を示し、共有結合をすることが示唆された。また、各阻害剤の GST 阻害活性の可逆性を調べるため、GST を阻害剤で処理した後、限外ろ過膜を用いて阻害剤を除去し、操作前後での GST 活性を評価した。その結果、GS-ESF のみ GST の再賦活化が起こらず、不可逆的に GST を阻害することが明らかとなった。

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、阻害剤にビオチンを導入しアビジンとの相互作用を利用して阻害剤と共有結合した GST を精製し、ゲル電気泳動による解析後ゲルを切り出し、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、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。また、X 線結晶構造解析からも同様の結果を得た。加えて、MD シミュレーションにより反応メカニズムを解析した結果、①SF 基が周辺のアミノ酸残基との相互作用によりコンホメーション固定されること、②近傍の求核性アミノ酸残基 (二つのチロシン) が反応点であるスルホニルの硫黄原子から同距離 (4.2 Å) に存在すること、③Tyr7 に比べて Tyr108 の側鎖酸素原子の pK_a が低く、より求核性が高いことが示唆され、実験結果との整合性が示された。GSH 骨格を母核とした GST の共有結合性阻害剤は本報告が初めてであり、GST が関わる疾患の治療や原因解明のツールとしての応用が期待できる。

本研究で見出した共有結合性 GST 阻害剤 GS-ESF は既存の GST 阻害剤より高い GST 阻害活性を示したものの、細胞膜透過性に乏しかった。そこで、細胞内で構築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。GST の活性測定に汎用されるリガンドとして 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) が知られている。CDNB は GST 存在下、GSH と反応し GSH 抱合体となると 340nm の吸収をもつことから、その吸光度の変化を利用して GST の活性測定に利用される。このメカニズムを GST 阻害剤の分子設計に応用した。即ち、CDNB の二つのニトロ基のうち一方を SF に置換することにより、細胞膜透過後、速やかに細胞内の GSH と反応し、GST の基質として認識され、GST と共有結合を形成し、その機能を阻害するものと考えた。実際に合成した誘導体のうち、GST と共有結合する阻害剤を見出した。*In vitro* での阻害活性評価を行ったところ阻害剤が 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。さらに別途合成・単離した阻害剤の GSH 抱合体を用いて共有結合した GST のアミノ酸残基を LC-MS/MS により解析したところ、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。加えて、細胞内での GST 阻害効果をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、既存の細胞膜透過性 GST 阻害剤であるエタクリン酸 (EA) を上回る GST 阻害活性を示す化合物の取得に成功した。

2. EGFR を標的とした共有結合性アプタマーの開発

【背景】 アプタマーとは、複雑な三次元立体構造をとることで標的分子に結合する一本鎖の RNA または DNA 分子である。本研究では 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、その機能を特異的かつ強力に阻害するリガンドの開発を目的とした。標的とした 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る。多くの固形癌において EGFR は過剰発現しており、重要な治療標的となっている。現在、EGFR を標的とした治療戦略は抗 EGFR 抗体やチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) に依存している。特に TKI 療法においては EGFR の変異により治療抵抗性を示すことが問題となっており、より特異的かつ選択的な新しい EGFR 標的薬の開発が望まれている。

【結果・考察】 アプタマーは *in vitro* selection 法である SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 法を用いて取得することとした。この方法では初期ライブラリーから標的分子に結合する核酸分子を分離し、これらの核酸分子を PCR により増幅後、一本鎖の DNA または RNA を調製する操作を繰り返すことでアプタマーとなる核酸を濃縮していく。本研究ではライブラリーの 5'末端にスルホニルフルオリド導入し初期のライブラリーを構築し、全 10 サイクルのスクリーニングを行った。6 ラウンド以降では DNA ライブラリーと EGFR を反応させた後、界面活性剤を含むバッファーで洗浄することにより EGFR により強固に結合するライブラリーの取得を目指した。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。80 個のコロニーからプラミスト DNA を抽出し、56 本の ssDNA のシーケンス解析に成功した。そのうち 35 本の ssDNA において複数の重複する配列を得られ、塩基配列の収束を確認することができた。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ところ、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、本研究で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を行った。第一章では GST を標的としたリガンドの創製に取り組み、種々の活性測定、質量分析および X 線結晶構造解析によりリガンドが GST と共有結合を形成し、不可逆的にその機能を阻害することを明らかにした。第二章では 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。