

称号及び氏名 博士(理学) 十亀 弘子

学位授与の日付 平成20年3月31日

論文名 「リン酸および硫酸転移酵素の阻害剤探索に適した
ハイスループットスクリーニング法の開発」

論文審査委員 主査 藤井 郁雄
副査 多田 俊治
副査 徳富 哲

論文要旨

近年の創薬研究では、対象疾患の分子レベルでの機序の解明から医薬品の標的となり得る分子を探索、同定し、それに作用する化合物や抗体などを探索する分子標的アプローチを取ることが多い。健常者と疾患患者の違い、あるいは、病巣と正常組織の違いを分子レベルで解明し、例えば、癌の増殖や転移に関わる分子を同定する。そして、その分子の機能を特異的に抑える化合物や抗体を創製しようとする手法である。

標的分子に対する阻害剤あるいは活性化剤の探索研究において、数万から百万の化合物に対するランダムスクリーニングを行うことも、近年の創薬研究の大きな特徴の一つである。従来のスクリーニング規模をはるかに超えるハイスループットスクリーニング(High-Throughput Screening; HTS)と呼ばれるこの手法は、オートメーション等の技術を最大限に利用して短期間に多数の化合物を評価することを可能にする。新規骨格を有する医薬品の種となる化合物を短期間に見出すことは、オリジナルな新薬開発の極めて重要な鍵となるため、多様な化合物骨格の発見が期待できるHTSは、現在、創薬研究の初期段階で広く利用される重要な基盤技術の一つとして位置付けられている。

従って、疾患に関連する標的分子を選択し、HTSを行うためのアッセイ系を構築することは、創薬研究を開始するための重要なステップであると言える。本研究では、炎症性疾患の一つであるぜんそくを対象疾患とし、疾患に関連する分子標的に対するHTSに適したアッセイ系構築を検討した。

ぜんそくは、遺伝的因子およびアレルゲン、寒気、運動、ストレスなどの環境因子が発端となった慢性の気道炎症であると考えられている。気道過敏性が亢進する結果、気管支平滑筋、気道粘膜の浮腫、気道分泌亢進などにより気道の狭窄・閉塞が起り、喘鳴、息切れ、咳などの症状をきたす呼吸器疾患である。2004年の試算では、世界に3億人のぜんそく患者がいるとされる有症率の高い疾患である。現在の薬物治療は、長期管理薬であるグルココル

チコステロイドと、発作治療薬である β_2 アゴニストがゴールドスタンダードである。しかし、いずれも根治療法ではないことや、その副作用から、異なる作用機序に基づく治療薬の研究開発が継続的に試みられている。

炎症には炎症性細胞や種々のメディエーターが関わっていることが明らかにされてきているが、気道の炎症であるぜんそくも同様のメカニズムで引き起こされると考えられている。即ち、肥満細胞、好酸球、好中球、T細胞、樹状細胞、マクロファージなどの炎症性細胞が産生する、種々のケモカイン、サイトカイン、ヒスタミン、NO、プロスタグランジンなど100を越えるメディエーターが、気道における複雑な炎症反応に関わっていると考えられている。従って、種々のメディエーターが惹起する細胞内のシグナル伝達において重要な役割を果たしている分子を標的とし、その阻害剤を探索することは、炎症のメカニズム解明の一助となるとともに、新規作用機序に基づく治療薬の開発につながる有意義なことと考えられる。

本研究では、4つの酵素を分子標的として取り上げた。第1章では、シグナル伝達において重要なプロテインキナーゼの1つであるMKK4のアッセイ系構築について述べる。続いて、プロテインキナーゼ同様、シグナル伝達に深く関与することが明らかとなってきた脂質キナーゼである、PI3キナーゼ γ およびスフィンゴシンキナーゼ1のアッセイ系構築を、それぞれ第2章および第3章で述べる。最後に、第4章で、炎症と密接に関連するリンパ球のホーミングに重要な役割を果たす糖の硫酸転移酵素であるGlcNAc6ST-2のアッセイ系構築について述べる。脂質および糖を基質とする酵素は、創薬ターゲットとしては新しい分野の酵素であるため、確立されたHTSに適したアッセイ方法が存在しない。従って、これらの酵素に対してHTS実施可能なアッセイ系を構築できたことは、大変意義のあることと考えている。

第1章 チロシンプロテインキナーゼの阻害剤探索系の開発： MKK4に対する阻害剤探索系

MKK4は、細胞へのストレスや炎症性サイトカインに反応してJNKを直接リン酸化し活性化するMAPキナーゼキナーゼである。MKK4欠損T細胞ではT細胞レセプターの活性化につながるIL-2産生が抑制されることから、MKK4/JNK経路の炎症における重要性が示唆されている。従って、MKK4活性を阻害することにより、炎症反応を抑制できる可能性が考えられた。本来の基質であるSAPK α のキナーゼ活性を欠失させた変異体を基質とし、 $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ を用いる定法により、酵素の生化学的特性評価を行い、基本的なアッセイ条件の設定を行った。その後、ユーロピウム (Eu) ラベル化抗リン酸化チロシン抗体を用いる時間分解蛍光検出系に変換して、ラジオアイソトープを用いない高感度なHTSに適したアッセイ系を確立し、HTSを実施した。

第2章 脂質キナーゼの阻害剤探索系の開発(1)： PI3キナーゼに対する阻害剤探索系

PI3キナーゼファミリーは脂質性セカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール3リン酸 (PIP3) を産生し、細胞の増殖、運動、接着、アポトーシスなど基本的な細胞応答を制御する酵素群である。細胞遊走を制御するケモカインのレセプターの直下で作動するPI3キナーゼ γ は、血球系細胞に特異的に発現し、細胞遊走に重要な役割を果たすと考えられている。創薬の標的として魅力的ではあるが、従来のアッセイは有機溶媒を用いた抽出やTLCによる分離が必要であり、HTSに応用することは困難であった。そこで、新規アッセイ系

の開発を試みることにし、ホスファチジルイノシトール (PI) 固定化プレートを作製し、 $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ をリン酸ソースとして、PIへの ^{33}P の転移を検出する系を検討した。この方法は、PI固定化プレートで酵素反応後、プレートを洗浄するだけで放射活性を測定することができ、抽出やTLCは必要としない。PI固定化プレートを用いたPI3 キナーゼ γ の生化学的特性評価およびアッセイ条件の最適化の結果、384wellプレートでのアッセイ系を確立し、HTSを実現した。

第3章 脂質キナーゼの阻害剤探索系の開発(2): スフィンゴシンキナーゼに対する阻害剤探索系

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、細胞内および細胞外で多様な作用を示す脂質シグナル分子である。細胞内では細胞の増殖や生存にセカンドメッセンジャーとして働く一方、GPCRのリガンドとして、血管新生、心形成、免疫、細胞運動などの制御に関わるユニークな分子である。スフィンゴシンキナーゼは、スフィンゴシンをリン酸化してS1Pを産生する酵素であり、種々の細胞刺激に応答して誘導されS1Pレベルを上昇させる。魅力的な創薬の標的であるが、前出のPI3 キナーゼ同様、脂質を基質とするため、従来法をHTSに応用することは困難であった。ここでは、S1Pが1級アミノ基を有していることに着目し、従来の有機溶媒を用いる抽出とTLCによる分離の代わりに、アクアバインド™プレート(活性化デキストランコートプレート)を用いて捕捉する方法を検討した。 $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた酵素反応後、反応液をアクアバインドプレートに移して ^{33}P S1Pを固定化し、放射活性を測定する。本アッセイによるスフィンゴシンキナーゼ 1 の生化学的特性評価およびアッセイ条件の最適化の結果、384wellプレートでのアッセイ系を確立し、HTSを実現した。

第4章 糖の硫酸転移酵素の阻害剤探索系の開発: N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase に対する阻害剤探索系

白血球の接着分子であるL-セレクトインは、リンパ球の二次リンパ組織や炎症部位へのホーミングにおいて重要な役割を果たしている。L-セレクトインの結合には、血管内皮側にあるリガンドのシアリルLewis X中のN-アセチルグルコサミン (GlcNAc)が硫酸化されていることが必須であることから、硫酸転移酵素がリンパ球の遊走に関係していると考えられている。近年、シアリルLewis Xモチーフの硫酸化を行うGlcNAc6STがL-セレクトインリガンドの機能発現において重要な役割を担っていることが明らかとなり、これまで創薬研究が殆ど手がけられていないクラスの標的分子として注目を集めている。しかし、従来のアッセイはTLCによるものであり、HTSに応用することは困難であった。そこで、新規ビオチン化糖基質を合成し、シンチレーション近接アッセイ (SPA) による簡便な硫酸転移酵素アッセイ系の構築を試みた。即ち、 ^{35}S 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS)とビオチン化糖を反応後、ストレプトアビジンSPAビーズでビオチン化糖を捕捉し、PAPSからの ^{35}S の転移を検出する。HTSの報告例の無いクラスの標的分子に対し、ホモジニアスアッセイによるHTSを実現することができた。

構築したアッセイ系は全て、高いシグナル-バックグラウンド比およびシグナル-ノイズ比

を達成した。また、バラツキも小さく、精度の高いアッセイ系を構築することができた。ここに示したアッセイは、同様の活性を持つ他の酵素にも応用可能である。本研究が応用の機会を得、疾患のメカニズム解明や創薬研究の一助になればと願っている。

審査結果の要旨

近年の創薬研究では、対象疾患の分子レベルでの機序の解明から医薬品の標的となり得る分子を探索、同定し、それに作用する化合物や抗体などを探索する分子標的アプローチを取ることが多い。標的分子に対する阻害剤あるいは活性化剤の探索研究において、数万から百万の化合物に対するランダムスクリーニングを行うことも、近年の創薬研究の大きな特徴の1つである。従来のスクリーニング規模をはるかに超えるハイスループットスクリーニング (High-Throughput Screening; HTS) と呼ばれるこの手法は、オートメーション等の技術を最大限に利用して短期間に多数の化合物を評価することを可能にする。従って、疾患に関連する標的分子を選択し、その HTS に適したアッセイ系を考案することが、創薬研究を開始するための重要な鍵となる。本論文では、炎症性疾患の1つであるぜんそくを対象疾患とし、疾患に関連する分子標的に対する HTS に適したアッセイ系を構築した。本論文の主要な成果は以下の通りである。

1. チロシンプロテインキナーゼである MKK4 の阻害剤探索系として、時間分解蛍光法に基づく DELFIA の構築を検討した。本来の基質である SAPK を基質とするラジオアイソトープフリーの 384 well アッセイ系を構築した。
2. 脂質キナーゼであるスフィンゴシンキナーゼの阻害剤探索を目的とする、より安定な HTS アッセイ系構築を検討した。トレシル活性化デキストラン表面を有するアクアバインドプレートにより生成物を共有結合で固定化する、簡便で安定な 384 well プレートアッセイ系を構築した。
3. 糖の硫酸転移酵素である GlcNAc6ST-2 の阻害剤探索のためのアッセイ系構築を検討した。新規に合成したビオチン化 GlcNAc を基質とする、SPA による簡便な 384 well ホモジニアスアッセイ系を構築した。

構築したアッセイ系は全て、高い S/B 比および S/N 比を達成した。バラツキも小さく、良好な Z 値を与える、精度の高いアッセイ系である。このようなアッセイ系は、分子標的医薬品の開発のみならず、酵素阻害剤や受容体アンタゴニストの迅速な創出を可能にし、ケミカルバイオロジーの研究に大きく貢献するものである。