学位論文題名

Characterization and regulation of dynamic mechanism in protein phosphorylation by kinases

(プロテインキナーゼによるタンパク質リン酸化の機能解明と制御に関する研究)

学位論文内容の要旨

プロテインキナーゼは ATP を供与体としてタンパク質のセリン/スレオニン、チロシン側鎖の水酸基へリン酸を転移する酵素である。生体中の約 30% のタンパク質はプロテインキナーゼによりリン酸化を受けることでシグナル伝達や代謝の調節因子として機能している。ほとんどすべての疾病はシグナル伝達に何らかの異常を伴っていることから、プロテインキナーゼは重要な創薬ターゲットとして古くから研究が行われ、近年、ガン領域における分子標的薬としてキナーゼ阻害剤の開発が活発に行われている。その一方で、ヒトゲノムがコードする 500 種類以上のプロテインキナーゼの多くはその機能の詳細が未だ明らかとなっていない。そのため、医薬品としてだけでなく、生物学的ツールとしても強力なプロテインキナーゼ阻害剤の開発が望まれる。プロテインキナーゼは高度に保存された活性部位をもつことから、標的とするキナーゼのみを選択的に阻害することはきわめて難しい。プロテインキナーゼには 2 つのコンホメーションをとることが知られており、そのうち不活性型コンホメーションは各々のキナーゼに特有の構造をとることから、このコンホメーションを標的とすることで選択的な阻害剤が得られることが示唆されている。著者は小分子によるタンパク質リン酸化の機能解明を目的として、1) 不活性型コンホメーションを標的とするキナーゼ阻害剤ライブラリーの構築、および、2) MALDI-TOFMS を用いたマルチキナーゼアッセイ法の開発についての研究を行った。

第一章ではこれまでのプロテインキナーゼの機能と疾病との関わりを簡単にまとめ概説した。

第二章では、ABL キナーゼ (Abl tyrosine kinase) の不活性型コンホメーションを標的とする阻害剤候補化合物ライブラリーの構築、およびその生物活性について述べた。ジアリルアミドおよびジアリルウレア構造を持つ 1,2,3-トリアゾール誘導体は ABL キナーゼの不活性型コンホメーションを特異的に阻害することを見出した。この化合物を元に、銅を触媒とするアジド-アルキン[3+2]双極子付加環化反応(クリックケミストリー)を利用して 4 位に置換基を持つトリアゾールライブラリーを作成し生物活性評価を行った。その結果、 IC_{50} 値において約 10 μ M の阻害活性を持つ化合物を見出した。また、活性向上のため側鎖部分について構造活性相関を行った。

第三章では、安定同位体でラベル化された基質ペプチドを用いた MALDI-TOFMS によるマルチキナーゼアッセイ法について述べた。用いる基質ペプチドの C 末端に WR 配列を付与することで、全ての基質ペプチドにおいてイオン化率が向上することを明らかにした。また、その実用性を明らかにすべく ABL キナーゼについて速度論解析を行った結果、得られた K_m 値は文献値とよい一致を示し、またイマチニブおよびスタウロスポリンを用いた阻害実験においても IC_{50} 値を正確に算出できることから、ハイスループットスクリーニングへの応用が可能であることを示した。またマウス B16 メラノーマ細胞の抽出液を用いて、スタウロスポリン、イマチニブ、ゲフィチニブの 3 種類のキナーゼ阻害剤について、Abltide のリン酸化に対する阻害能の算出に成功し、本法は細胞の抽出液を用いた系においても、脱塩等の後処理を行うことなく利用可能であることを示した。また K562 細胞抽出液を用いたマルチキナーゼアッセイを行い、本法は一度の実験で各ペプチド基質に対する阻害スペクトルを効率的に算出できる有用な方法であることを示した。

第四章においては第一章から第三章までの総括、またこれからの展望についても短く述べた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 教 授 出 村 誠
副 査 准教授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Characterization and regulation of dynamic mechanism in protein phosphorylation by kinases

(プロテインキナーゼによるタンパク質リン酸化の機能解明と
制御に関する研究)

生体中の約 30%のタンパク質はプロテインキナーゼによりリン酸化を受けることでシグナル伝達や代謝の調節因子として機能している。ほとんど全ての疾病はシグナル伝達に何らかの異常を伴っていることから、プロテインキナーゼは重要な創薬ターゲットとして古くから研究が行われ、近年特にガン領域における分子標的薬としての研究開発が著しい。その一方で、ヒトゲノムがコードする 500 種類以上のプロテインキナーゼの多くはその機能の詳細が未だ明らかとなっていない。そのため医薬品としてだけでなく、生物学的ツールとしても強力なプロテインキナーゼ阻害剤の開発が望まれる。プロテインキナーゼは高度に保存された活性部位を持つことから、標的とするキナーゼのみを選択的に阻害することは極めて難しく、このことが阻害剤開発の大きなボトルネックとなっている。

本論文は、このような現況にあるキナーゼの阻害剤開発について、キナーゼ阻害剤ライブラリーの効率的構築、及び MALDI-TOFMS を用いたマルチプルキナーゼアッセイ法という二つの手法を確立することで、迅速に選択的キナーゼ阻害剤を見出すことで、タンパク質リン酸化の機能を解明することを目的として研究を行っている。

第一章では、プロテインキナーゼの機能と疾病との関わりについて述べている。これまで続けられてきた研究の背景を踏まえて、現在のキナーゼ阻害剤の開発状況とその意義について大変わかりやすくまとめられており、この分野に対する知識を幅広く身に付けたと評価できる。

第二章では、チロシンキナーゼを標的とした阻害剤候補化合物ライブラリーの構築法及びその生物活性について述べている。クリックケミストリーを利用して簡便にライブ

ラリーを構築し、*in situ*スクリーニング法と組み合わせることで Abl キナーゼの不活性型コンホメーションを選択的に阻害する化合物を見出している。論理的な分子設計とリンカー部分における綿密な予備実験により、限られた化合物ライブラリーの中から活性物質を非常に効率的に見出したことは評価に値する。また活性増強のメカニズムについて、類縁体合成およびドッキングスタディーを用いて考察しており、今後の阻害剤開発に有用な知見を示している。本手法の他のキナーゼへの展開性についても言及しており、様々なキナーゼに対する Type II inhibitor の探索への応用が期待される。

第三章では、MALDI-TOFMS を利用したプロテインキナーゼの活性測定法について述べている。N 末端を安定同位体でラベル化し、C 末端に高感度化のために WR 配列を付与した基質ペプチドを用いることで、高い精度での酵素反応物の定量を達成している。また、細胞破碎液のような共雑物が存在する条件下においても、脱塩等の精製処理なしに直接定量が可能であり、既存のアッセイ法と比較しても遜色のない実用的な手法であるといえる。K562 細胞抽出液を用いたマルチプルキナーゼアッセイでは、複数の基質ペプチドのリン酸化の進行率、それらに対する阻害剤の阻害スペクトルを迅速に算出することに成功している。本法は標的細胞のキナーゼの発現レベルや、新規阻害剤の標的キナーゼの同定等にも応用可能であることを示している。

第四章では、第一章から第三章までの総括を、またこれからの展望について述べている。

これらを要するに、本論文はキナーゼを標的とした化合物ライブラリーを効率的に構築し、それらを MALDI-TOFMS を用いたアッセイ法によって阻害スペクトルを迅速に調査することで目的のキナーゼに対する選択的阻害剤の創出が可能であることを示したものであり、タンパク質リン酸化の機能解明や医薬品の開発に大きく貢献できる将来性の高い研究であると評価できる。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。