

学 位 論 文 題 名

In-crystal chemical ligation and affinity ranking for drug discovery

(蛋白結晶中におけるケミカルライゲーションと
結合活性の序列に関する研究)

学位論文内容の要旨

疾病の原因蛋白質の機能を選択的に阻害/促進できる化合物（リード化合物）を見出す際、ロボット技術を駆使した High-Throughput Screening (HTS) と呼ばれる創薬技術が日常的に用いられている。HTS は、高度に自動化された化合物スクリーニング方法であるが、1) 保有する化合物ライブラリーの数や化学構造の多様性に大きく依存する問題、2) 生物活性と化学構造との間に相関関係を見出すことが困難な場合、薬物候補化合物の創製が難航するなどの問題を抱えている。このような弱点を克服できる新しいアプローチとして、医薬品にて頻出する部分骨格（フラグメント）化合物を創薬研究の起点とする Fragment-based Drug Design (FBDD) と呼ばれる創薬技術が開発され、実際の疾病治療薬開発において目覚ましい研究成果を挙げつつある。

創薬研究の起点となる標的蛋白質へ結合したフラグメント化合物を同定するスクリーニング工程において、High-throughput Protein Crystallography 技術は、どのような場所に、どのような結合様式にて結合しているのか”に関する複合体結晶構造を高精度かつ迅速に決定できる。しかしながら、フラグメント化合物を同定した以降の工程（化合物展開工程）における技術開発は十分に進展しておらず、従来通りの Medicinal Chemistry や Computer-Aided Drug Design を利用した半経験的な試行錯誤が適用されている状況にあり革新的な創薬技術の開発が待ち望まれている。

本研究では、High-throughput Protein Crystallography 技術の拡張により、FBDD 研究における化合物展開工程の飛躍的な効率化を実現できる新規創薬技術を開発することを目的とし、

蛋白結晶を反応場とした化合物展開方法の開発を行った。蛋白結晶は高い溶媒含有率をもつ結晶状態である。従って、ソーキング処理により多種多様な有機化合物との複合体結晶を作成することができる。そこで、蛋白結晶中において規則正しく配置された蛋白分子を化学反応の鋳型（反応場）として利用することにより、選択性ならびに結合活性が高い化合物の創製と複合体結晶構造決定を同時に実現できると期待できる。我々が考案した“蛋白結晶を反応場とした新しい化合物展開方法（In-crystal Chemical Ligation）”の概要は、1）創薬標的蛋白質のアポ体結晶を作成する、2）化合物展開の起点となる反応性置換基 A を持つ分子（アンカー分子、反応性置換基 B と反応する）をアポ体結晶に導入する、3）アンカー分子との複合体結晶を用いて、Focused ライブラリー化した反応性置換基 B を持つ分子（チューニング分子、反応性置換基 A と反応する）を用いて X 線スクリーニングを実施する、4）複合体結晶構造解析により、明瞭な反応生成物（提示化合物）の電子密度マップが確認できるアンカー分子とチューニング分子の組み合わせを同定する、5）試験管合成した提示化合物を用いてアッセイ実験を行うことにより、化学構造、標的蛋白質との複合体構造、生物活性の相関関係を迅速に解析できると期待される。

In-crystal Chemical Ligation のコンセプトの確からしさ、適用限界、将来性は、Proof-of-Concept 実験により確認した。Proof-of-Concept 実験では、標的蛋白質として X 線結晶構造解析ならびに生物学的機能解析の結果が多数報告されている Bovine pancreatic trypsin を用いた。また、アンカー分子として 3 位もしくは 4 位にアルデヒド基を有するベンザミジン誘導体を用いた。Proof-of-concept 実験の結果、In-crystal Chemical Ligation により、期待通り生物活性が向上した化合物を創製できること、ならびに、化学構造、標的蛋白質との複合体構造、生物学的機能の相関関係を迅速に解明できることが分かった。また、蛋白結晶中における反応機構の解明することを目的とし、時間分割 X 線結晶構造解析および試験管合成した提示化合物を用いた複合体解析を実施した。その結果、蛋白結晶が反応場として機能していること、蛋白結晶中にて化学反応が進行していることを明らかにした。最後に、2 種類のチューニング分子からなるカクテル溶液を用いた Selection 実験から、蛋白結晶を反応場として利用すると結合能が高い方の化学反応が選択的に進行することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田中	勲
副査	教授	門出	健次
副査	教授	出村	誠
副査	准教授	姚	閔

学位論文題名

In-crystal chemical ligation and affinity ranking for drug discovery

(蛋白結晶中におけるケミカルライゲーショント
結合活性の序列に関する研究)

疾病の原因蛋白質の機能を選択的に阻害/促進できる化合物（リード化合物）を見出す際、ロボット技術を駆使した High-Throughput Screening (HTS) と呼ばれる創薬技術が日常的に用いられている。HTS は、高度に自動化された化合物スクリーニング方法であるが、1) 保有する化合物ライブラリーの数や化学構造の多様性に大きく依存する問題、2) 生物活性と化学構造との間に相関関係を見出すことが困難な場合、薬物候補化合物の創製が難航するなどの問題を抱えている。このような弱点を克服できる新しいアプローチとして、医薬品にて頻出する部分骨格（フラグメント）化合物を創薬研究の起点とする Fragment-based Drug Design (FBDD) と呼ばれる創薬技術が開発され、実際の疾病治療薬開発において目覚ましい研究成果を挙げつつある。

創薬研究の起点となる標的蛋白質へ結合したフラグメント化合物を同定するスクリーニング工程において、High-throughput Protein Crystallography 技術は、どのような場所に、どのような結合様式にて結合しているのか”に関する複合体結晶構造を高精度かつ迅速に決定できる。しかしながら、フラグメント化合物を同定した以降の工程（化合物展開工程）における技術開発は十分に進展しておらず、従来通りの Medicinal Chemistry や Computer-Aided Drug Design を利用した半経験的な試行錯誤が適用されている状況にあり革新的な創薬技術の開発が待ち望まれている。

本研究では、High-throughput Protein Crystallography 技術の拡張により、FBDD 研究における化合物展開工程の飛躍的な効率化を実現できる新規創薬技術を開発することを目的とし、蛋白結晶を反応場とした化合物展開方法の開発を行った。蛋白結晶は高い溶媒含有率をもつ結晶状態である。従って、ソーキング処理により多種多様な有機化合物との複合体結晶を作成することができる。そこで、蛋白結晶中において規則正しく配

置された蛋白分子を化学反応の鋳型（反応場）として利用することにより，選択性ならびに結合活性が高い化合物の創製と複合体結晶構造決定を同時に実現できると期待できる。本研究で考案した“蛋白結晶を反応場とした新しい化合物展開方法（In-crystal Chemical Ligation）”の概要は，次の段階からなる．1）創薬標的蛋白質のアポ体結晶を作成する，2）化合物展開の起点となる反応性置換基 A を持つ分子（アンカー分子，反応性置換基 B と反応する）をアポ体結晶に導入する，3）アンカー分子との複合体結晶を用いて，Focused ライブラリー化した反応性置換基 B を持つ分子（チューニング分子，反応性置換基 A と反応する）を用いて X 線スクリーニングを実施する，4）複合体結晶構造解析により，明瞭な反応生成物（提示化合物）の電子密度マップが確認できるアンカー分子とチューニング分子の組み合わせを同定する，5）試験管合成した提示化合物を用いてアッセイ実験を行う。

In-crystal Chemical Ligation のコンセプトの確からしさ，適用限界，将来性は，Proof-of-Concept 実験により確認した。Proof-of-Concept 実験では，標的蛋白質として X 線結晶構造解析ならびに生物学的機能解析の結果が多数報告されている Bovine pancreatic trypsin を用いた。また，アンカー分子として 3 位もしくは 4 位にアルデヒド基を有するベンザミジン誘導体を用いた。Proof-of-concept 実験の結果，In-crystal Chemical Ligation により，期待通り生物活性が向上した化合物を創製できること，ならびに，化学構造，標的蛋白質との複合体構造，生物学的機能の相関関係を迅速に解明できることが分かった。また，蛋白結晶中における反応機構の解明を目的とし，時間分割 X 線結晶構造解析および試験管合成した提示化合物を用いた複合体解析を実施した。その結果，蛋白結晶が反応場として機能していること，蛋白結晶中にて化学反応が進行していることを明らかにした。最後に，2 種類のチューニング分子からなるカクテル溶液を用いた Selection 実験から，蛋白結晶を反応場として利用すると結合能が高い方の化学反応が選択的に進行することを明らかにした。

以上，本研究では，X 線結晶構造を利用した創薬のための新しい方法を考案し，その可能性を明らかにしたものである。本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり，よって審査員一同は，申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた。