

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 千々和 修平

現在、ポストゲノム研究の集大成として、明らかにされたヒトゲノム情報を用いていかに生命システムや疾病メカニズムの理解に貢献できるかという観点から、創薬研究が盛んに行われている。臨床薬の開発のボトルネックの一つは薬剤標的の同定であり、近年の臨床薬の認可には明確な作用機作の提示が義務づけられている。しかし表現型スクリーニングで得られた化合物の標的因子の同定は困難であるため、低分子化合物に関する優れた標的の同定法の確立は医薬品開発の場において切望されている。さらに開発薬について標的分子の探索を行うことにより、副作用の予測も可能になることが期待される。したがって高感度かつ迅速な標的の同定法の確立は、医薬品開発全体に大きな進歩をもたらすと考えられる。本論文は、効率的かつ実用性の高い新しい標的タンパク質同定法の開発と応用を目的とした研究に関するものであり、三章および実験の部より構成されている。

第一章では、タンパク質相互作用解析システムを低分子化合物に適用することにより、新規標的タンパク質同定法の開発を行っている。近年産業総合技術研究所の夏目らが開発した質量分析と免疫沈降法を組み合わせたタンパク質相互作用解析システムは、多くのタンパク質間相互作用を解明している。この手法の低分子化合物への応用の可能性を検証するため、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤である spiruchostatin A をモデル化合物として選択し、ペプチドタグでラベル化した標識化合物 (キメラ化合物) を用いて HDAC 複合体の同定を試みた。ペプチドタグとしては、非特異的なタンパク質の吸着が極めて少なく効率的に結合タンパク質の回収が可能な Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 配列を、また低分子化合物とペプチドタグをつなぐスペーサーは、C12 アルキル鎖およびポリエチレングリコール鎖を採用した。キメラ化合物の合成に関しては、ペプチドタグおよびスペーサー部分を固相合成により行い、最後に液相合成により spiruchostatin A と結合させ、効率的に行っている。本キメラ化合物を HEK293T 細胞溶解液に対して作用させ、回収されたタンパク質を断片化し、ナノフロー LC-MS/MS 分析を行ってアミノ酸配列を決定することにより結合タンパク質の同定を行った。その結果、標的タンパク質である HDAC の他、HDAC と相互作用すると報告されている多数の関連タンパク質を同定することに成功した。これにより、微量の細胞より HDAC および多くの HDAC 複合体を一度に同定でき、本方法の有効性を証明することに成功した。

第二章では、糖尿病薬である PPAR γ アゴニストを用いて標的タンパク質の同定を行っている。PPAR γ アゴニストは、脂肪細胞の分化やインスリン抵抗性の改善に関与していることが知られているが、抗糖尿病における詳細なメカニズムは不明である。また、PPAR γ アゴニストの一部の化合物については、抗腫瘍活性が報告されており、PPAR γ 以外のオフターゲットの存在が示唆されている。そこで、報告されている化合物中で PPAR γ アゴ

ニスト活性が強い KST1 を用いて、第一章と同様の手法で標的タンパク質の同定を行った。その結果、予想に反して、PPAR γ は得ることが出来なかったが、PPAR γ を高発現させた細胞を用いて PPAR γ を同定することに成功した。PPAR γ 非高発現細胞では、癌の増殖に関係する因子 HCCR 1 が同定され、本因子が KST1 の標的の一つであることが示唆された。次に、糖尿病薬として臨床応用されている thiazolidinedione 系化合物 pioglitazone を用いて、標的タンパク質の同定を行った。その結果、PPAR γ 高発現細胞を用いても PPAR γ は得られなかったが、脂肪酸代謝に関わる ADH5、PECI および ECH1 の同定に成功した。また、ADH5 に関しては、そのアルコールデヒドロゲナーゼ活性を阻害することが明らかとなり、さらに、それが thiazolidinedione 骨格に由来する可能性を示した。

第三章では新規 GRP78 発現抑制物質 versipelostatin の標的タンパク質の同定を行っている。Versipelostatin は、抗腫瘍活性を持つ天然化合物で、癌細胞を用いた *in vitro* 実験でグルコース飢餓状態において誘導されてくる分子シャペロン GRP78 の発現を抑制し、また、マウスを用いた *in vivo* 実験においても抗腫瘍活性を示す。このような活性を有する化合物はこれまで報告されていなかったため、その作用機作を解明する手懸かりが無いのが現状であった。そこで、作用機作の解明を目的に標的タンパク質の同定を行い、標的タンパク質 HSD17B12 および STEAP3 を同定した。Versipelostatin は、抗腫瘍活性を持つ天然化合物で、癌細胞を用いた *in vitro* 実験でグルコース飢餓状態において誘導されてくる分子シャペロン GRP78 の発現を抑制し、また、マウスを用いた *in vivo* 実験においても抗腫瘍活性を示す。このような活性を有する化合物はこれまで報告されていなかったため、その作用機作を解明する手懸かりが無いのが現状であった。そこで、versipelostatin のキメラ化合物を合成したが、versipelostatin は不安定な化合物であるため、ペプチドタグおよびスパーサー部分との結合にはアジドと末端アルキンによる水溶液中でのトリアゾール形成反応を用いている。キメラ化合物を用いて標的タンパク質の同定を行った結果、HSD17B12 および STEAP3 を同定に成功した。また本研究により不安定な化合物に対するラベル化法も確立できた。

以上本論文は、低分子化合物の標的タンパク質の新規同定法の開発と応用に関する研究をまとめたものであり、従来の方法を凌駕する可能性を示した。今後、多くの化合物の標的タンパク質を網羅的に同定することが可能になり、作用機作の解明や副作用の予測が迅速に行われ、創薬研究を加速することが期待されることから、学術上ならびに応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。