

## 論文の内容の要旨

論文題目 分子間相互作用解析に基づく

蛋白質間相互作用阻害剤の創製

氏 名 吉村 千穂子

### 第1章 序論

疾病の制御の目的で低分子化合物を用いることは、細胞内の蛋白質や蛋白質間相互作用など、多様な標的へのアプローチを可能とする。しかし低分子化合物の誘導体展開による活性の向上の過程では、しばしば分子量・疎水性の増大を伴い、時として非特異的な相互作用や生体利用率の低下を招く事が課題となっている。このため、活性は弱くとも相互作用の特性（質・効率）のよい化合物をもとに展開をはかることが有用と考えられるが、様々な蛋白との相互作用を持つ、動的な特性を見せる蛋白では、特に論理的分子設計が困難である。本研究においてはモデルとして、多数の蛋白質と相互作用し、それらの立体構造を制御する事が知られている HSP90 と、Ca<sup>2+</sup>結合時の疎水性表面の露出により p53 の天然変性部位と結合する S100B という、動的特性を持つ 2 つの系を対象として、相互作用解析に基づく阻害剤創製を試みた。

本論文は全 5 章により構成されている。第 1 章の序論に続いて、第 2 章では HSP90 と複数の阻害剤の熱力学的な相互作用解析を通じ、結合様式不明であった化合物 THS-510 の結合様式を推定し、その仮説に基づき得られた新規誘導体について、活性の向上に加え、アイソフォーム選択性の獲得という知見を得ている。第 3 章では、明確なポケットを持たず、疎水性のクレフトにより p53 と結合する S100B を対象に、S100B と相互作用を持つと報告のある低分子化合物に関して、結合の熱力学的プロファイルと、p53 との蛋白質間相互作用阻害の有無を明らかにした。これを通じ、S100B 結合化合物が S100B に対しゆらぎの制御を行っているという示唆を得ている。第 4 章では、蛍光偏光法による p53-S100B 蛋白質間相互作用阻害剤のアッセイ系を構築し、Fragment Library の評価をもとに Focused Library を構築・評価することで、Ligand Efficiency の高いヒット化合物を得ると同時にその構造活性相関を明らかにした。さらに、メラノーマ細胞内での蛋白質間相互作用阻害について評価系を構築、得られた阻害剤の細胞内での作用についても知見を得ている。最後の第 5 章は、全体の総括である。

## 第2章 新規 HSP90 阻害剤の創製

HSP90 は多数の癌関連蛋白質の立体構造保持に必須であり，癌治療において有望な標的である．フラグメント化合物 THS-510 が human HSP90 $\alpha$ のN末端ドメイン (hHSP90 $\alpha$ NTD) に対し  $\Delta H$  driven な結合を示したことから，より詳細に解析することとし，結合様式既知の複数化合物を用いた競合的等温滴定カロリメトリー解析により，THS-510 の結合様式推定を行った(図 1)．

その結果，THS-510 は ATP ポケットを占有するタイプの化合物と競合せず，ATP ポケットに加え hHSP90 $\alpha$ NTD が特定のコンフォメーションをとる場合にあらわれる 2<sup>nd</sup> ポケットを利用するタイプの化合物に対しては競合した．このことから，THS-510 を 2<sup>nd</sup> ポケットならびにその周辺領域を利用して結合している化合物であると仮定して，さらなる展開と解析を行った．

THS-510 をもとに，ATP ポケットを占有する目的で展開された化合物群のひとつである THS-1593 において，HSP90 への結合活性の向上と，それに伴う癌細胞株における HSP90 クライアント分解・細胞増殖抑制効果が見られた．

THS-1593 はこれまでの多くの HSP90 阻害剤と結合様式上異なる性質 (3<sup>rd</sup> ポケットの利用) を有する事が予想されたため，4 種の Isoform に対する選択性を調べたところ，HSP90 $\alpha \cdot \beta$  に対し選択的な阻害を示した．これまでに Pan HSP90 阻害剤，および Isoform のひとつである GRP94 の阻害剤は知られているものの，HSP90  $\alpha \cdot \beta$  を選択的に阻害する化合物は我々の報告以外では見られていない．より高次での作用を調べるため，Her2 発現胃癌株である NCI-N-87 の皮下移植モデルにおいて，抗腫瘍効果を調べたところ，THS-1593 は腫瘍を縮退させる効果を示した．

以上より，熱力学的な相互作用解析を通じ，新規 HSP90 阻害剤を得るとともに，得られた化合物がアイソフォーム選択性というユニークな特徴と，高い抗腫瘍効果を持つことを示した．

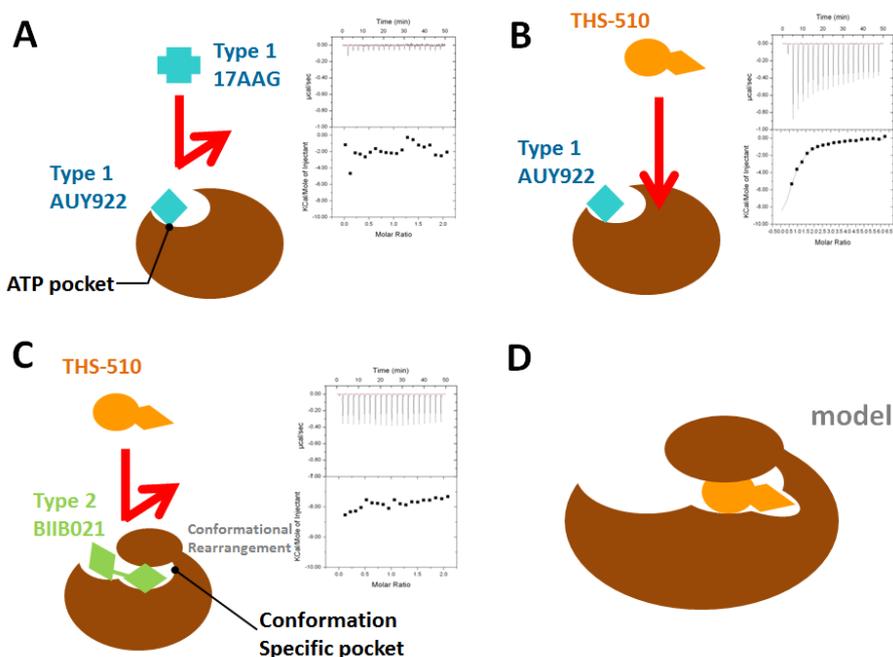


図 1. 競合的等温滴定カロリメトリー解析による THS-510 の結合様式推定

### 第3章 S100B 結合化合物の物理化学的解析

S100B はメラノーマ等において発現が亢進しており、発現と予後との相関について報告がある。S100B は癌抑制蛋白質である p53 と相互作用能を持つが、S100B を阻害することで p53 による آپトシス誘導能が亢進されることが報告されている。従って、S100B-p53 蛋白質間相互作用阻害がメラノーマを中心とした癌の治療標的となる可能性がある。

まず先行研究において NMR および X 線共結晶構造解析により S100B への結合が報告されている化合物およびそれらと類似性を持つ化合物群を収集し、熱力学的な寄与を調べた。結果、DNA や RNA など他多数の標的を持つ事が明らかとされている pentamidine を除いては結合時の発熱は観察されず、また pentamidine の結合においても本研究における測定条件下では  $\Delta S$  駆動型であった。深いポケットと結合水を有する酵素における標的部位の場合と異なり、浅く広く疎水性のクレフトを対象とする系では、物理的に相互作用が確認されている化合物であっても  $\Delta H$  駆動型の結合が見出されづらい傾向を示していると考えられる。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) により、p53<sub>367-388</sub> を固定したセンサーチップに対し S100B の結合の有無を観察する系において、S100B に化合物を混合した際に、S100B の p53 への結合が阻害されるか否かを評価したところ、化合物の存在下でも p53 への結合が失われない場合があった。ここから、蛋白質間相互作用阻害剤の探索においては、対象の一方の蛋白質に化合物が結合するだけでは不十分である場合があることが示された。また、S100B 結合化合物と S100B の共存下で pentamidine を結合させた際、pentamidine の結合時の発熱が増強される例が見られた。これは、低分子化合物が S100B のゆらぎを制御している可能性を示唆しており、蛋白立体構造を Rigid に扱っての Structure Based Drug Design が困難であることが予想された。

### 第4章 Human S100B-p53 蛋白質間相互作用阻害剤の探索

S100B と p53 の相互作用に対して強い阻害能を持つ化合物を効率よく見出すために、蛍光標識タグを持った p53<sub>367-388</sub> ペプチドを用いて、競合的偏向蛍光法によるハイスループット評価が可能であるアッセイ系 (FP アッセイ) を構築した。化合物溶液については東京大学創薬オープンイノベーションセンターから提供を受けた。プレスクリーニングとして分子量が小さく溶解度が高い 2000 化合物 (フラグメントライブラリー) について 250  $\mu\text{M}$  における阻害率を評価した。30%以上の阻害率を示した化合物群 (Initial Hit) をもとに、センター保有の約 20 万化合物を対象に Similarity 検索を実施することにより化合物選択を行い Focused Library を構築・評価した。その結果、IC<sub>50</sub> 値が 50  $\mu\text{M}$  を下回る化合物が 22 化合物見いだされ、同時に Initial Hit および周辺化合物の Hit・Non-hit 化合物群の構造を比較することで、それぞれの群での構造活性相関が明らかとなった (図 2)。以上より、蛋白質間相互作用阻害剤探索における化合物ライブラリー構築・アッセイ系構築・スクリーニング・ヒット化合物の解析を通じ、S100B-p53 蛋白質間相互作用阻害剤を新たに獲得するとともに、標的蛋白質の立体構造や Positive Control となる化合物を事前に必要としない、阻害剤獲得初期における効率的なワークフローを構築した。また、疎水性の浅いクレフトが対象であるにもかかわらず、明らかな構造活性相関が存在することを示し、蛋白質間相互作用における制御の厳密性の一端を示した。

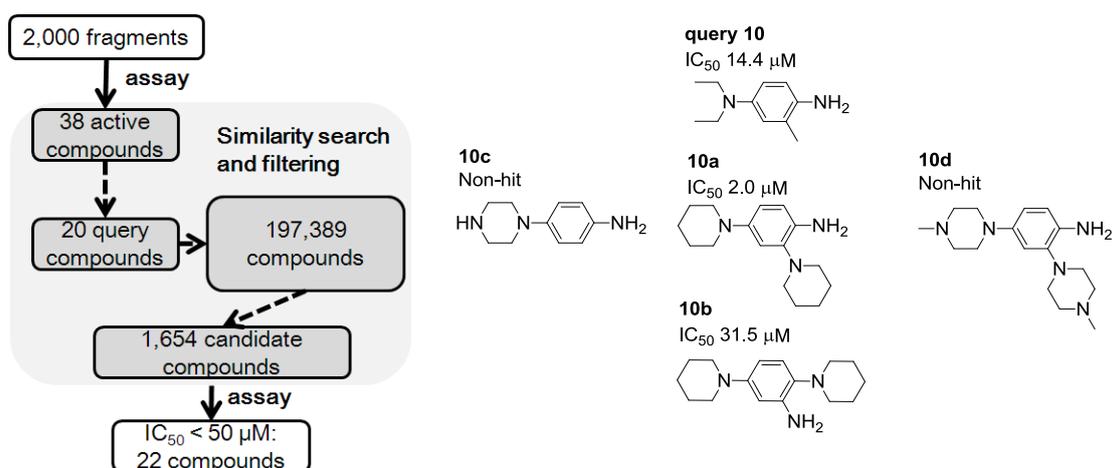


図 2. 左：スクリーニング概要 右：SAR の例

化合物 **10a** について SPR による解析を行ったところ、**10a** は S100B に結合することで、S100B-p53 相互作用を阻害している事が示された。さらに、S100B および野生型 p53 発現ヒトメラノーマ細胞株 WM-115 において **10a** は細胞増殖を抑制し、細胞膜透過性を持つことが示された。そこでさらに、細胞内における p53 と S100B 複合体を検出する系を Proximity Ligation Assay 法により構築し、細胞内での S100B-p53 蛋白質間相互作用阻害を *In situ* で観察する事に成功した。同系において化合物 **10a** を添加の上観察したところ、S100B-p53 相互作用の阻害が確認された(図 3)。

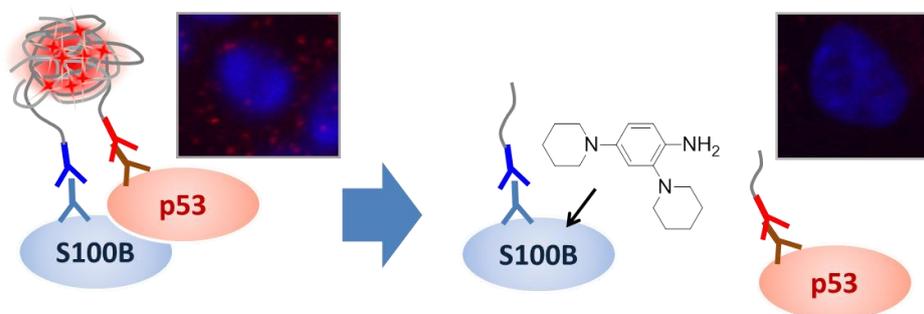


図 3. Proximity Ligation Assay 法による WM-115 細胞における S100B-p53 複合体 (赤) の検出 (青は DAPI による細胞核の染色)

## 第 5 章 結論

物理化学的解析、相互作用解析は、結合様式や標的蛋白あるいは低分子化合物の構造情報と統合して用いることで、より深い洞察を与えることができる。これにより、本研究においては HSP90 阻害剤および S100B-p53 相互作用阻害剤の探索において、比較的分子量が小さく moderate な活性を示す化合物から、さらに活性の向上、高次評価へと導くことができた。今回の結果は、鍵と鍵穴式では語りえない、動的な特性をもつ標的への阻害剤創製に対する基礎情報を与え、また今後様々な新たな標的への治療薬開発に向けた有用な知見となりうる。