

博士論文

医薬品リード化合物の標的タンパク質に対する作用機序に関する研究

宮久 郁夫

目次

序論	5
第一節 研究の背景	5
第二節 数式の導出	16
第一章 デルタ 5 デサチュラーゼ阻害剤 T-3364366 の結合作用機序解析 ...	22
第一節 背景、目的	22
第二節 新規な D5D 阻害剤 T-3364366 の発見	25
第三節 [³ H]T-3364366 を用いた放射性リガンド結合試験の構築	26
第四節 [³ H]T-3364366 の時間依存性阻害の評価	29
第五節 T-3364366 の薬物動態学的性質	33
第六節 T-3364366 の結合ドメインの同定	34
第七節 考察	36
第八節 材料と方法	38
第二章 Bcl-xL/Mcl-1 タンパク質間相互作用阻害剤の作用機序解析	46
第一節 背景、目的	46
第二節 HTS からの Bcl-xL/Mcl-1 二重阻害剤 I1 の発見	49
第三節 競合的結合試験を用いた I1 の結合作用機序解析	52
第四節 分解経路を有さない構造類縁体 I3 による阻害確認	56
第五節 考察	56
第六節 材料と方法	60
第三章 エンドポイントの競合的結合試験を用いた不可逆性阻害剤の活性指標 $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の迅速な決定法の開発	65
第一節 背景、目的	65
第二節 不可逆性プローブを用いた競合的結合試験による $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 算出	68
第三節 不可逆性 EGFR 阻害剤を用いた理論の検証	71
第四節 シミュレーションを用いた他の結合モデルでの適用性の確認	78
第五節 考察	80
第六節 材料と方法	85
第七節 数式の導出	90
総括	101
参考文献	112
発表論文	121
謝 辞	122

略語

ATP, adenosine 5'-triphosphate

Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra large

CoA, coenzyme A

Cys, cysteine

D5D, delta-5 desaturase

D6D, delta-6 desaturase

DGLA, dihomo-gamma linoleic acid

DMEM, Dulbecco's modified eagle medium

DMSO, dimethyl sulfoxide

DTT, DL-dithiothreitol

EDTA, ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

EGFR, epidermal growth factor receptor

HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPLC, high-performance liquid chromatography

HTS, high-throughput screening

IC_{50} , inhibitor concentration producing 50% inhibition

K_I , inactivator concentration when the rate of inactivation reaches half of k_{inact}

k_{inact} , maximum inactivation rate constant

k_{obs} , pseudo-first-order inactivation rate constant

KCl, potassium chloride

LA, linoleic acid

Mcl-1, myeloid cell leukemia 1

MgCl₂, magnesium chloride

MOA, mechanism of action

NADH, nicotinamide adenine dinucleotide

NaF, sodium fluoride

NaHPO₄, sodium phosphate

NaOH, sodium hydroxide

PBS, phosphate buffered saline

PPI, protein-protein interaction

SCD, stearoyl-CoA desaturase

TLC, thin-layer chromatography

TR-FRET, time-resolved fluorescence resonance energy transfer

Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane

Tween-20, polyoxyethylene(20)sorbitan monolaurate

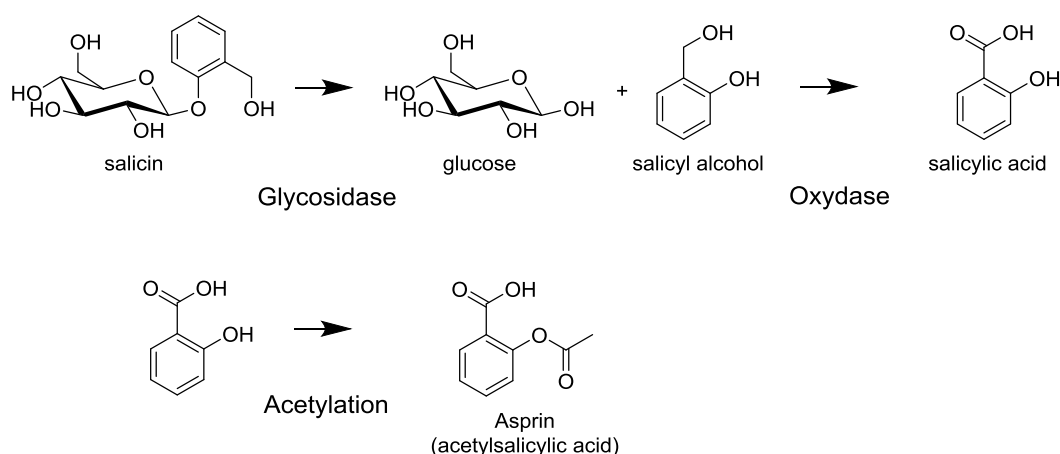
序論

第一節 研究の背景

創薬研究の歴史

古くから人類は天然に存在する成分を薬として疾患の治療に用いてきた。例えば、生薬や漢方薬として、身の周りの様々な植物や動物、菌類、鉱物を、有効成分を精製することなくそのまま服用してきた。古代ギリシャ時代からヤナギの樹皮が鎮痛・解熱薬として使われた記録がある。

一方、18世紀終わり頃から近代的な薬学が発達し、有効成分が単離精製されて医薬品として用いられるようになる。例えば、ヤナギ樹皮の成分分析の結果サリシンが単離され、この化合物が体内で変換された物質として後にサリチル酸が発見された。これは後にホフマンによるアセチルサリチル酸の合成につながり、19世紀終わり頃に世界初の人工合成の医薬品であるアスピリンとして発売され、消炎鎮痛剤として今日でもなお用いられている¹(図序-1)。



図序-1、アスピリン発見の過程

さらに20世紀に入ると、フレミングにより青カビ (*Penicillium notatum*) から発見されたペニシリンは、フローリー、チェーンらによる単離、構造決定、製

造研究を経て商業化され、人類の生存を脅かす細菌感染症の治療薬として著しい効果を示した² (図 序 - 2)。またワクスマンらによりストレプトマイセス属放線菌 (*Streptomyces griseus*) から発見されたストレプトマイシンは、当時、不治の病と言われた結核に対する特効薬として初めて用いられ、その死亡者数を激減させた³。

これらの天然物由来の医薬品は、その表現型 (フェノタイプ) によるスクリーニングから見出された薬物であり、その標的分子は後の薬理作用研究から解明されている。アスピリン、ペニシリン、ストレプトマイシンの標的分子はそれぞれ、シクロオキシゲナーゼ、バクテリア D-Ala-D-Ala カルボキシペプチダーゼ/トランスペプチダーゼ、バクテリアリボソーム上 23S rRNA であることが後の研究から明らかになっている。

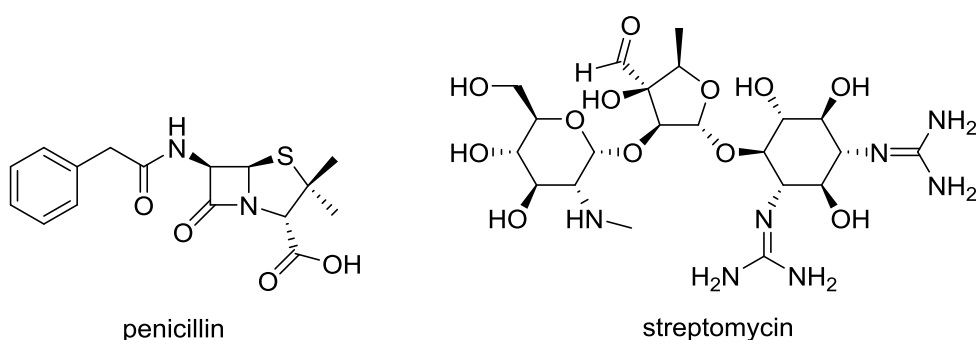


図 序 - 2、微生物より発見された抗生物質の例

逆薬理的創薬手法とハイスループットスクリーニングの台頭

一方で、遺伝子工学やタンパク質工学の進展により 1980 年代の終わり頃から、創薬標的となるタンパク質を同定後その遺伝子をクローニングし、そのタンパク質を異種生産することが可能になった。その結果、組換えタンパク質を用いた *in vitro* アッセイが汎用的に用いられるようになった。さらに 2000 年代に入りヒトの全ゲノム情報が解読されると⁴ バイオインフォマティクスの進歩と相まって、既存の薬物受容体との配列相同性を示しながらも、結合するリガ

ンドが不明な受容体 (オーファン受容体) が多数存在することが明らかとなった。そこで、まずはそのタンパク質に結合する薬物を同定し、その薬物を用いた薬理的解析により機能未知タンパク質の生理的役割を同定することも可能となった (逆薬理学、reverse pharmacology)。さらに siRNA 等を用いた遺伝子ノックダウンや遺伝子破壊マウス (ノックアウトマウス) 等の遺伝子組換え生物の評価を通じて遺伝子の機能解析が精力的に行われ、疾患の標的となりうる分子の絞り込みが容易になってきた。その結果、分子薬理学や逆薬理学を用いた創薬手法が主流となった^{5,6}。

このような流れの中で製薬企業各社は 1990 年代から、ハイスループットスクリーニング (HTS) を用いて創薬標的タンパク質に結合する薬物の同定に乗り出し始めた。HTS とは蛍光や発光検出法など各種の生化学アッセイ技術をロボット技術と組み合わせることで自動化されたアッセイを用いた化合物探索法である。本技術により、100 万を超える化合物から標的タンパク質に作用する薬物を短期間に効率的に選択してることが可能になった。その結果、前述の天然物を用いたフェノタイプスクリーニングに代わり、HTS は創薬研究におけるリード化合物創出プロセスにおいて必須の役割を担うようになっていく⁷。実際にこのような HTS を起点とした探索研究から、各種の医薬品分子が創出されている⁸ (図 序 - 3)。Protein kinase 阻害剤では抗がん薬のラパチニブ (一般名; Tykerb)、ゲフィチニブ (Iressa)、エルロチニブ (Tarceva) 等、peptidase 阻害剤では二型糖尿病薬であるシタグリプチン (Januvia) 等、さらに GPCR 阻害剤では抗 HIV 薬であるマラビロク (Selzentry) など、実際に多くの画期的な医薬品が HTS から見出されたヒット化合物を出発点としている。このように、特に創薬研究初期のヒット化合物の探索研究において、*in vitro* アッセイは重要な役割を果たしている。

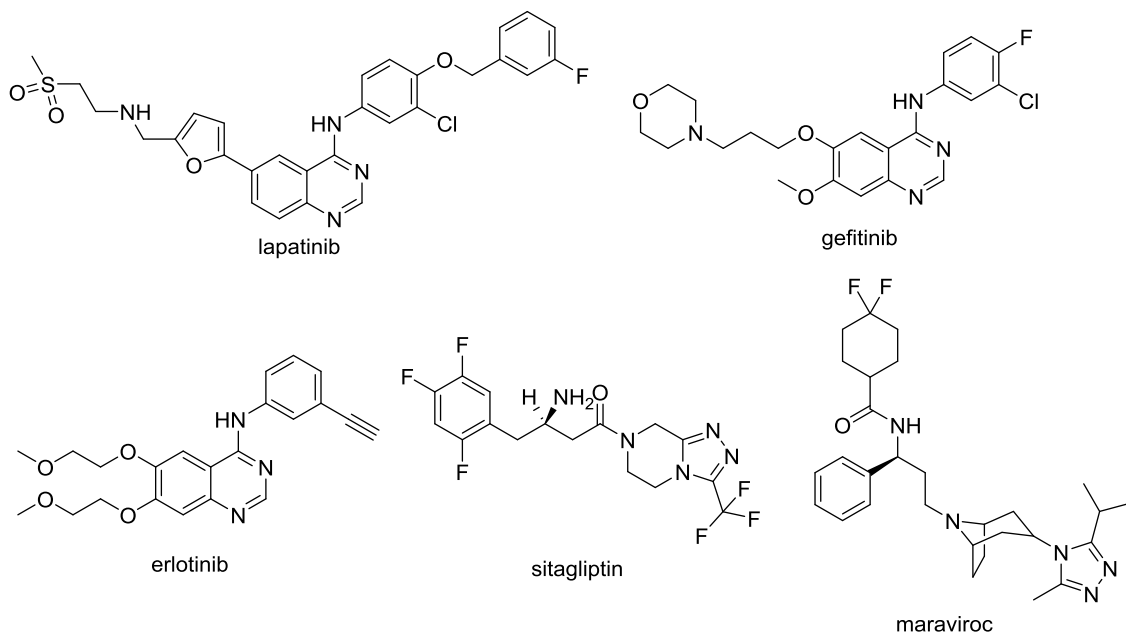


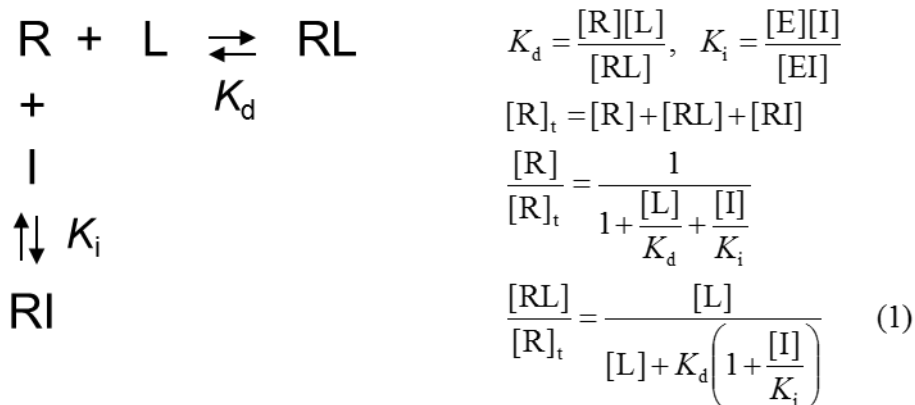
図 序 - 3、HTS より発見されたリードから創出された医薬品の例

逆薬理的創薬研究における薬物の標的タンパク質に対する作用機序解析

標的タンパク質に対して新しい薬物を発見する逆薬理的創薬手法において、解析対象となる薬物とその標的タンパク質の作用機序 (mechanism of action) の解析は、基礎科学としてのみならず、医薬品最適化研究においても重要である^{9,10}。医薬品の最適化研究の目的は、高活性でかつ目的の標的に高選択的な分子を創出することである。そのためにはリードとなる化合物の定量的な構造-活性相関を取得することが必要であるため、有機合成化学手法を用いてリード化合物の周辺化合物が多種類合成される。これら周辺化合物の活性評価は、標的タンパク質に対する解離定数 (K_i 、単位 M) を用いて評価するのが最も直接的かつ定量的な解析法である。しかし実際には、その代替として *in vitro* アッセイの 50% 阻害濃度 (IC_{50} 、単位 M) を用いて化合物の活性強度を比較することが、その容易さから一般的に行われている。

IC_{50} とは評価化合物の生化学的阻害作用の有効度を示す値であり、酵素アッセイであれば酵素反応生成物の生成速度を、受容体結合試験であれば標識リガンド (プローブ) の結合を 50% 阻害する薬物濃度である。受容体結合試験の場

合、以下の 4 つの前提、すなわち (1) 阻害剤が薬物受容体に可逆的に結合する、(2) リガンドが阻害剤と拮抗的である、(3) 阻害剤およびリガンドが薬物受容体よりも十分に高い濃度である、(4) 系が平衡状態に達している、という前提の元で評価すれば、チェン=プルソフの関係式より生化学アッセイの IC_{50} は阻害剤と薬物受容体の解離定数である K_i に変換が可能である¹¹ (図 序 - 4)。酵素阻害剤の場合も、同様の 4 つの前提が満たされる場合、酵素と阻害剤の解離定数 K_i を IC_{50} から定量的に求めることができる。



Assumption

- L and I bind reversibly
- L and I are competitive
- $[R] \ll [L]$ and $[R] \ll [I]$
- The system reaches equilibrium

when $[I] = 0$,

$$\frac{[RL]_0}{[R]_t} = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (2)$$

from (1) and (2)

$$\frac{[RL]}{[RL]_0} = \frac{[L] + K_d}{[L] + K_d \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

when $[I] = IC_{50}$,

$$\frac{[RL]}{[RL]_0} = \frac{[L] + K_d}{[L] + K_d \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right)} = \frac{1}{2}$$

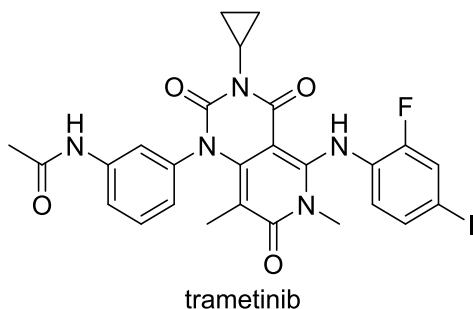
$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[L]}{K_d}\right)$$

図 序 - 4、リガンド結合試験におけるチェン=プルソフの関係式の導出

R = 薬物受容体、L = リガンド、I = 阻害剤を示す。R と L 間の解離定数を K_d 、R と I 間の解離定数を K_i とする。

最適化研究で合成される化合物は、元のリード化合物と同じ作用機序を持つと考えるのが妥当である。そのため、一度リード化合物の機能解析を実施し、上述した IC_{50} 評価の 4 つの前提を満たすことが確認できれば、その周辺化合物群の真の阻害活性 (薬物と薬物受容体の解離定数 K_i) も同じアッセイで得られる IC_{50} より簡単に求めることができる。すなわち、新規に合成される周辺化合物の阻害活性を IC_{50} の比較によって定量的に評価・比較できる。このようにチェン=プルソフの関係式の 4 つの前提が満たされる評価系においては、評価化合物の定量的な活性指標 K_i を迅速かつ容易に算出可能であるため、 IC_{50} を用いた阻害剤の構造-活性相関研究が創薬研究において広く用いられている。

しかし、評価する阻害剤がチェン=プルソフ式の前提を必ずしも満たすとは限らないので注意が必要である。例えば上述したアスピリンやペニシリン等のように、共有結合により標的タンパク質を不可逆的に阻害する医薬品も存在し、評価する薬物は必ずしも可逆的とは限らない。また EGFR 阻害薬のゲフィチニブ (図序 -3) と MEK 阻害薬のトラメチニブ (図序 -5) は共に抗がん薬として用いられる protein kinase 阻害剤であるが、前者が ATP 拮抗型であるのに対し¹²、後者は ATP 拮抗型ではないアロステリック型の阻害様式を示す¹³。さらに同じく抗がん剤の HER2/EGFR 阻害薬のラパチニブ (図序 -3) はアッセイ時間の範囲内では平衡状態に達しないスローバインディング阻害剤であることから¹⁴、平衡状態に達する前の IC_{50} 評価ではその真の結合活性を過小評価してしまう。

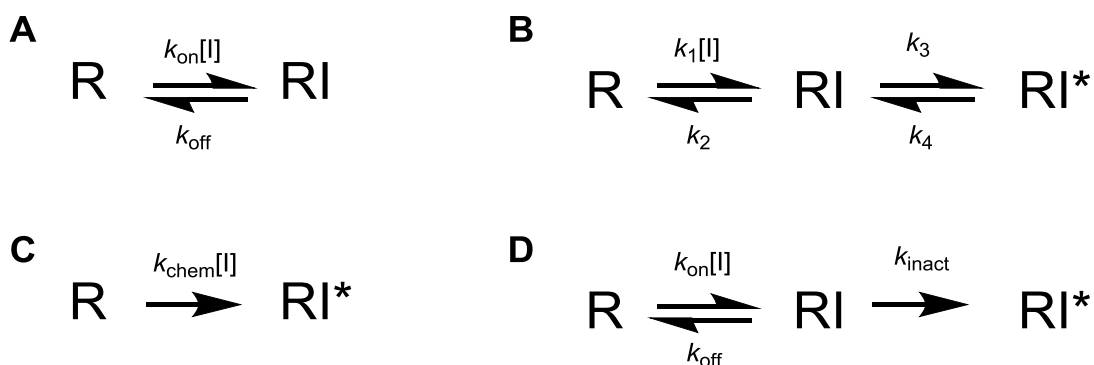


図序 -5、アロステリック型 kinase 阻害薬のトラメチニブ

このように評価する化合物が必ずしもチェン=プルソフ式的前提を満たすとは限らない。もし前提を満たさない場合に定量的な活性評価を実施するためには、前提が満たされるように *in vitro* アッセイの試験条件を変更するか、もしくは IC_{50} 以外での評価を行うことが必要になる。そのため、リード最適化研究における構造-活性相関研究を正しく行うためには、評価するリード化合物の標的タンパク質に対する結合作用機序を解析し、上記の前提を満たすかどうかをあらかじめ解析しておくことが必要になる。

IC_{50} 評価の前提を満たさない阻害剤の例

以下では、定量的な IC_{50} 評価の前提を満たさない阻害剤の例として、スローバインディング阻害剤と不可逆性阻害剤について詳述する⁹(図序-6)。



図序-6、時間依存性阻害を示す阻害剤の結合スキーム

(A) 一段階および (B) 二段階反応のスローバインディング阻害剤の結合スキーム。アスタリスク (*) は阻害剤によるコンフォメーション変化等によって、より安定的な構造に至った受容体を示す。(C) 一段階および (D) 二段階反応の不可逆性阻害剤の結合スキーム。アスタリスク (*) は共有結合を形成した受容体を表す。R = 薬物受容体、I = 阻害剤。

スローバインディング阻害剤とは、結合が平衡に達するまでの時間が測定している *in vitro* アッセイの時間軸と同程度かそれより遅い阻害剤を指す (図序-6A および B)。特に創薬研究においては、薬物の体内での消失速度との比較で議論されることが多いため、標的タンパク質からの解離半減期 ($t_{1/2}$) が数時間以

上の阻害剤を指すことが一般的である。このような阻害剤は標的タンパク質からの解離速度の遅さが原因で、系が平衡状態に達するまでに時間がかかり、そのため生化学アッセイの IC_{50} 値は測定時間依存的な減少を示す。一段階および二段階のスローバインディング阻害剤 (図序 - 6A および B) の平衡状態における真の活性値はそれぞれ以下のとおり記述される ; $K_i = k_{off}/k_{on}$ (導出序 - 1) および $K_i^* = k_2/(k_1 \times (1 + k_3/k_4))$ ⁹ (導出序 - 2)。

一方、不可逆性阻害剤はその結合反応が不可逆的であるため、全ての標的タンパク質が阻害剤により占有されるまで平衡が移動し続ける (図序 - 6C および D)。そのため全標的タンパク質が占有されるまでは生化学アッセイの IC_{50} 値が時間依存的に減少し続け、平衡状態では IC_{50} は阻害剤の強さに関係なく、そのアッセイ系の薬物受容体濃度の半分の値と理論上一致する。そのため、不可逆性阻害剤に対して IC_{50} は阻害活性の定量的な評価指標とは言えず、前平衡状態の速度論解析から求まる酵素不活性化の速度定数を用いることが必要となる。一段階の不活性化反応の場合は k_{chem} (単位、 $M^{-1}s^{-1}$) が、二段階の不活性化反応の場合は k_{inact}/K_I (単位、 $M^{-1}s^{-1}$) がそれぞれ用いられる。 k_{inact}/K_I は酵素反応の特異性定数 k_{cat}/K_m に相当する二次の速度定数であり、ミクロな速度定数を用いて記述すると、 $k_{inact}/K_I = k_{on} \times k_{inact}/(k_{off} + k_{inact})$ と記述される¹⁵ (導出序 - 4)。ただし、 k_{on} は結合速度定数 (単位、 $M^{-1}s^{-1}$)、 k_{off} は解離速度定数 (単位、 s^{-1})、 k_{inact} は二段階反応の最大不活性化速度定数 (単位、 s^{-1})、 K_I は k_{inact} の半分の値を与える阻害剤濃度 (単位、 M) であり $K_I = (k_{on} + k_{inact})/k_{off}$ である。

上記の通り、可逆的なスローバインディング阻害剤も共有結合性の不可逆性阻害剤も共に時間依存的な阻害を示す。両阻害剤は標的タンパク質からの解離が遅い又は解離が無い場合、ともに生体内において薬物が血中から消失した後も標的タンパク質を持続的に占有し続ける。そのため、一般的に時間依存性阻害剤は強力で持続的な薬効が期待される。特にスローバインディング作用はメカニズムによっては選択性の発揮などにも寄与していることが知られている

ことから、創薬研究のリード化合物として好ましい阻害剤であると考えられる。一方で、共有結合による不可逆性阻害剤は強力な阻害活性は期待できるものの、その共有結合形成メカニズムによっては非特異的な共有結合が原因の選択性の欠如が懸念される。そのため、不可逆性阻害剤のリード最適化研究では、選択性の確保や化学反応性の低減などに注意する必要がある。この際の定量的な選択性評価指標としても、 k_{inact}/K_I を用いた比較が必要になる。

以上の通り、可逆的なスローバインディング阻害剤と不可逆性阻害剤では創薬の最適化研究において注目すべき点や懸念すべき点、さらにその活性評価指標が異なる。しかし両者はどちらも時間依存的な阻害を示し、一時間点で算出した IC_{50} だけでは両者を明確に区別することは不可能である。そのため、標的タンパク質への速度論解析を通じて事前にその作用機序を明らかにし、両者を明確に区別しておくことが特に重要になる。

本研究の目的と本論文の構成

すでに述べたように、酵素阻害剤や受容体のアゴニストやアンタゴニストなどを開発する低分子創薬研究においては、低分子化合物の標的タンパク質への作用機序 (結合様式等) を明らかにすることが極めて重要である。特に、標的タンパク質に不可逆に結合する阻害剤、あるいは標的タンパク質との結合に時間がかかるスローバインディング阻害剤では、一般的によく使われる IC_{50} 値を用いて定量的に阻害活性を比較することができないため注意が必要となる。そこで本研究では、HTS によって取得した 2 つのリード化合物に関して、セルフリーの結合試験を用いて速度論解析を実施し、標的タンパク質に対する作用機序を明らかにすることを目的とした。また、 IC_{50} では定量的な評価ができないリード化合物およびその周辺化合物の阻害活性を定量的かつ迅速に評価する系を新たに開発することを目的とした。

第一章では、新規なデルタ 5 デサチュラーゼ阻害剤 T-3364366 の結合速度論解析を実施し、同化合物の時間依存的阻害の作用機序を解析した。創薬の標的

分子として注目されるデルタ 5 デサチュラーゼには、複数の阻害剤が知られているが、それら阻害剤の結合作用機序はこれまで報告されていない。これは酵素アッセイを用いた定量的な作用機序解析が困難であることに起因していると考えられる。この問題を解決するために、放射性リガンド [^3H]T-3364366 を用いたリガンド結合実験系を構築し、T-3364366 の時間依存的阻害の証明とその作用機序を解析した。さらにその作用機序に基づいて、T-3364366 および周辺化合物の定量的な評価方法について考察した。

第二章では、Bcl-xL/Mcl-1 二重タンパク質間相互作用 (PPI) 阻害剤の結合作用機序を解析した。一般的に HTS からの PPI 阻害剤の同定では、一次ヒット化合物中に非特異的な共有結合阻害剤等の偽陽性化合物が数多く存在することが原因で、真のヒット化合物の選抜に大きな困難を伴うことが多い。HTS より発見されたヒット化合物 **II** は、共有結合性を有する分解物を生じることが考えられ、共有結合を介した不可逆阻害により Bcl-xL/Mcl-1 を阻害していることが懸念された。そこで、この可能性を検証するために、Bcl-xL/Mcl-1 に対して結合する蛍光ペプチドをプローブとした結合試験系を構築し、これを用いて **II** の結合作用機序を解析し、共有結合阻害の有無を検証した。さらに、プローブペプチドに対する競合的結合試験による定量的な結合作用機序の解析が、HTS の一次ヒット化合物中に存在する偽陽性化合物を排除する一般的な方法論として有用である点についても考察した。

第三章では、基質または可逆性結合プローブを用いた通常 IC_{50} 評価が定量的な阻害活性指標となりえない阻害剤の代表例である不可逆性阻害剤について述べる。不可逆性阻害剤の最適化には、その定量的な活性評価指標 (k_{inact}/K_I) を用いた評価が必要である。しかし、 k_{inact}/K_I の算出には速度論的な測定と複雑なカーブフィッティングが必要なため、相当な手間を要する。この問題を解決する手法として、 k_{inact}/K_I の迅速な決定法を開発し、実験及びシミュレーションでその手法の妥当性を検証した。本手法では、不可逆性プローブに対する競合的な結合試験から得られる IC_{50} 値を k_{inact}/K_I と関連付けることを可能にした結

果、従来の可逆性阻害剤の評価とほぼ同様の手法を用いて、定量的かつ迅速な $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の評価が可能となった。

最後に、総括として第一章から第三章までの成果をまとめるとともに、創薬研究における結合速度論解析の今後の展望について述べる。

第二節 数式の導出

導出 序 - 1、一段階反応のスローバインディング阻害剤による受容体占有 (図序 - 6A)

$$[R]_t = [R] + [RI]$$

$$\text{Assume } [R] \ll [I],$$

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_{on}[I][R] + k_{off}[RI]$$

$$\frac{d[RI]}{dt} = k_{on}[I][R] - k_{off}[RI]$$

$$\frac{d[RI]}{dt} = k_{on}[I]([R]_t - [RI]) - k_{off}[RI]$$

$$\frac{d[RI]}{dt} = -(k_{on}[I] + k_{off})[RI] + k_{on}[I][R]_t$$

$$\int_{[RI]_0}^{[RI]} \frac{d[RI]}{-(k_{on}[I] + k_{off})[RI] + k_{on}[I][R]_t} = \int_0^t dt$$

$$\text{at } t = 0, \quad [RI]_0 = 0$$

$$[RI] = \frac{k_{on}[I][R]_t}{k_{on}[I] + k_{off}} (1 - e^{-(k_{on}[I] + k_{off}) \cdot t})$$

$$[RI] = \frac{[R]_t [I]}{[I] + K_i} (1 - e^{-(k_{on}[I] + k_{off}) \cdot t})$$

$$K_i = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

$$[R] = [R]_t - \frac{[R]_t [I]}{[I] + K_i} (1 - e^{-(k_{on}[I] + k_{off}) \cdot t})$$

$$\text{at } t = \infty,$$

$$[R] = [R]_t - \frac{[R]_t [I]}{[I] + K_i} = \frac{K_i}{[I] + K_i} [R]_t$$

$$[RI] = \frac{[I]}{[I] + K_i} [R]_t$$

導出 序 - 2、二段階反応のスローバインディング阻害剤による受容体占有 (図
序 - 6B)

$$[R]_t = [R] + [RI] + [RI^*]$$

Assume $[R] \ll [I]$,

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_1[R][I] + k_2[RI]$$

$$\frac{d[RI]}{dt} = k_1[R][I] - k_2[RI] - k_3[RI] + k_4[RI^*]$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_3[RI] - k_4[RI^*]$$

Assume that the initial binding step is in rapid equilibrium compared to the equilibrium of the second step, that is, $k_1[I], k_2 \gg k_3, k_4$

$$K_i = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[R][I]}{[RI]}$$

$$[R]_t = \left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right) [RI] + [RI^*]$$

$$[RI] = \frac{[R]_t - [RI^*]}{1 + \frac{K_i}{[I]}}$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_3 \left(\frac{[R]_t - [RI^*]}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \right) - k_4[RI^*]$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = - \left(k_4 + \frac{k_3}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \right) [RI^*] + \frac{k_3}{1 + \frac{K_i}{[I]}} [R]_t$$

$$k_{\text{obs}} = k_4 + \frac{k_3}{1 + \frac{K_i}{[I]}}, \quad \alpha = \frac{k_3}{1 + \frac{K_i}{[I]}}$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = -k_{\text{obs}}[RI^*] + \alpha[R]_t$$

$$\int_{[RI^*]_0}^{[RI^*]} \frac{d[RI^*]}{-k_{\text{obs}}[RI^*] + \alpha[R]_t} = \int_0^t dt$$

$$\text{at } t = 0, \quad [RI]_0 = 0$$

$$[RI^*] = \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} [R]_t (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$$

$$[RI] = \frac{[R]_t - [RI^*]}{1 + \frac{K_i}{[I]}} = \frac{[R]_t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \left(1 - \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) \right)$$

$$[R] = \frac{K_i}{[I]} [RI] = \frac{[R]_t}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \left(1 - \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) \right)$$

at $t = \infty$,

$$\frac{[RI^*]}{[R]_t} = \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}}$$

$$\frac{[RI]}{[R]_t} = \frac{1}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \left(1 - \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} \right)$$

$$\frac{[R]}{[R]_t} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \left(1 - \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} \right)$$

$$\frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} = \frac{k_3}{k_3 + k_4 \left(1 + \frac{K_i}{[I]} \right)}$$

$$1 - \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} = \frac{k_4 \left(1 + \frac{K_i}{[I]} \right)}{k_3 + k_4 \left(1 + \frac{K_i}{[I]} \right)}$$

$$\frac{[R]}{[R]_t} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \left(1 - \frac{\alpha}{k_{\text{obs}}} \right) = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{\left(\frac{K_i}{1 + \frac{k_3}{k_4}} \right)}} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i^*}}$$

$$K_i^* = \frac{K_i}{1 + \frac{k_3}{k_4}}$$

導出 序 - 3、一段階反応の不可逆性阻害剤による受容体占有 (図 序 - 6C)

$$[R]_t = [R] + [RI^*]$$

Assume $[R] \ll [I]$,

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_{\text{chem}}[I][R]$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = -k_{\text{chem}}[I]([RI^*] - [R]_t)$$

$$\int_{[RI^*]_0}^{[RI^*]} \frac{d[RI^*]}{[RI^*] - [R]_t} = -k_{\text{chem}}[I] \int_0^t dt$$

$$\text{at } t = 0, \quad [RI^*]_0 = 0$$

$$[RI^*] = [R]_t(1 - e^{-k_{\text{chem}}[I] \cdot t})$$

$$[R] = [R]_t e^{-k_{\text{chem}}[I] \cdot t}$$

at $t = \infty$,

$$\frac{[RI^*]}{[R]_t} = 1$$

$$\frac{[R]}{[R]_t} = 0$$

導出 序 - 4、二段階反応の不可逆性阻害剤による受容体占有 (図 序 - 6D)

$$[R]_t = [R] + [RI] + [RI^*]$$

Assume $[R] \ll [I]$,

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_{on}[I][R] + k_{off}[RI]$$

$$\frac{d[RI]}{dt} = k_{on}[I][R] - (k_{off} + k_{inact})[RI]$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_{inact}[RI]$$

Assume steady state of $[RI]$

$$\frac{d[RI]}{dt} = 0$$

$$[R] = \frac{k_{off} + k_{inact}}{k_{on}} \frac{[RI]}{[I]} = \frac{K_1}{[I]} [RI], \quad \left(K_1 = \frac{k_{off} + k_{inact}}{k_{on}} \right)$$

$$[R]_t = \left(1 + \frac{K_1}{[I]} \right) [RI] + [RI^*]$$

$$[RI] = \frac{[R]_t - [RI^*]}{1 + \frac{K_1}{[I]}}$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_{inact}[RI] = -\frac{k_{inact}}{1 + \frac{K_1}{[I]}} ([RI^*] - [R]_t)$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = -k_{obs}([RI^*] - [R]_t), \quad k_{obs} = \frac{k_{inact}}{1 + \frac{K_1}{[I]}}$$

$$\int_{[RI^*]_0}^{[RI^*]} \frac{d[RI^*]}{[RI^*] - [R]_t} = -k_{obs} \int_0^t dt$$

$$\text{at } t = 0, \quad [RI^*]_0 = 0$$

$$[RI^*] = [R]_t (1 - e^{-k_{obs}t})$$

$$[RI] = \frac{[R]_t - [RI^*]}{1 + \frac{K_1}{[I]}} = \frac{[R]_t}{1 + \frac{K_1}{[I]}} e^{-k_{obs}t}$$

$$[R] = \frac{K_1}{[I]} [RI] = \frac{[R]_t}{1 + \frac{[I]}{K_1}} e^{-k_{obs}t}$$

at $t = \infty$,

$$\frac{[\text{R}]}{[\text{R}]_t} = 0$$

$$\frac{[\text{RI}]}{[\text{R}]_t} = 0$$

$$\frac{[\text{RI}^*]}{[\text{R}]_t} = 1$$

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}}{1 + \frac{K_1}{[\text{I}]}} = \frac{k_{\text{inact}}[\text{I}]}{[\text{I}] + K_1}$$

$$\frac{k_{\text{inact}}}{K_1} = \frac{k_{\text{on}}k_{\text{inact}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{inact}}}$$

第一章 デルタ 5 デサチュラーゼ阻害剤 T-3364366 の結合作用機序解析

第一節 背景、目的

エイコサノイドは 20 炭素の脂肪酸の酸化により合成される脂質性シグナル分子で炎症の制御因子として数々の重要な働きを担っている¹⁶。アラキドン酸 (C20:4, n-6) に由来するエイコサノイドは一般的に炎症促進性分子であり、これら分子の過剰な生合成は動脈硬化¹⁷からがん¹⁸に至るまで様々な炎症関連疾患に関与している。そのため、エイコサノイドの生合成とシグナル伝達に関与するタンパク質は、製薬業界から創薬標的として大きな注目を集め、精力的に研究されている¹⁹。

脊椎動物において、アラキドン酸は必須脂肪酸であるリノレン酸 (C18:2, n-6) から合成される (図 1-1)。デルタ 6 デサチュラーゼ (delta-6 desaturase; D6D) によるリノレン酸の不飽和化とそれに続く脂肪酸エロンゲース (fatty acid elongase; Elovl5) による二炭素鎖の伸長により、ジホモ γ リノレン酸 (dihomo-gamma linoleic acid; DGLA, 20:3, n-6) が生成する。その後、デルタ 5 デサチュラーゼ (delta-5 desaturase; D5D) により DGLA の C₅-C₆ 炭素間にもう一つの二重結合が導入され、アラキドン酸が生成する²⁰。実際の D5D の酵素反応は基質として dihomogamma linoleoyl-CoA (DGL-CoA) を用いる (図 1-2)。D5D は分子状酸素依存的な脱水素反応により基質 DGL-CoA を不飽和化し、生成物 arachidonyl-CoA が産生される²¹。この D5D により触媒される最後の酸化反応がアラキドン酸生合成の律速段階の一つである。

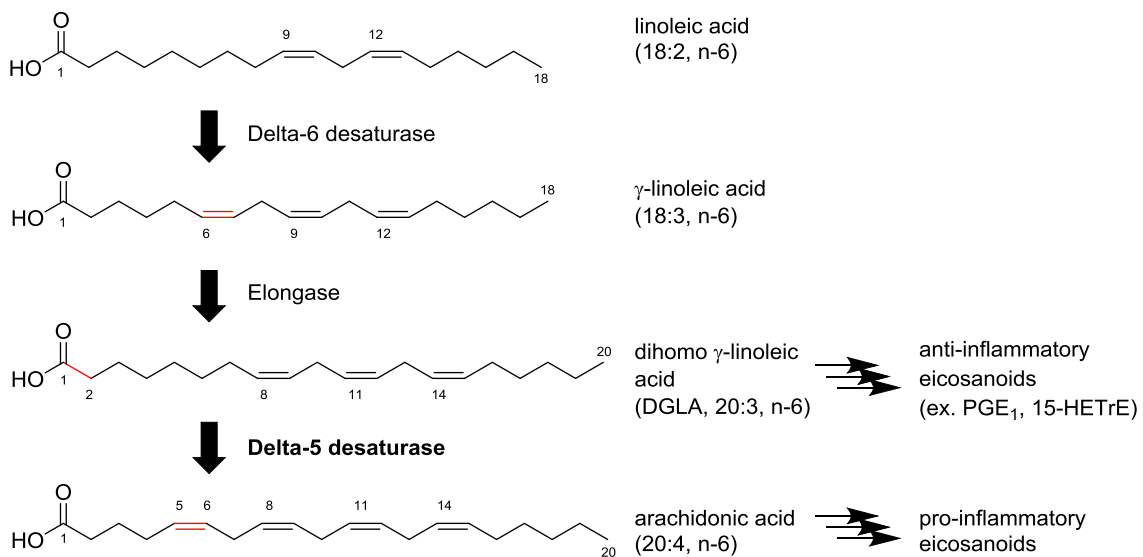


図 1-1、動物における長鎖不飽和脂肪酸の主要な代謝経路

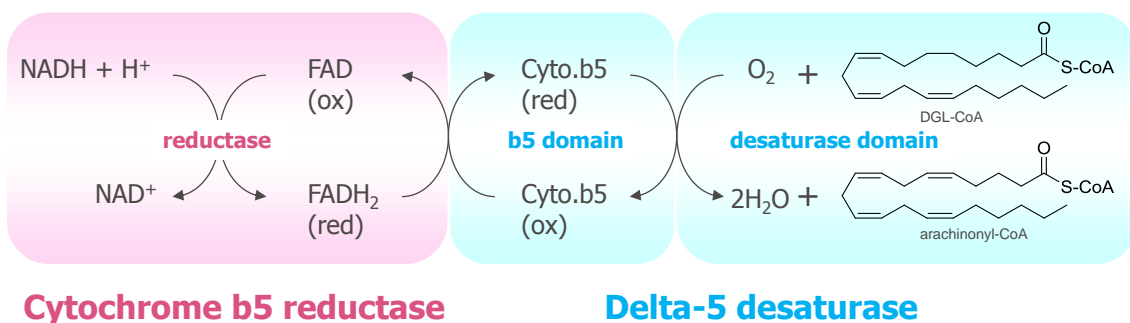


図 1-2、D5D 酵素反応の反応機構

D5D は D6D、デルタ 9 デサチュラーゼ (stearoyl-CoA desaturase; SCD)、ジヒドロセラミドデサチュラーゼ 1 および 2 (dihydroceramide desaturase 1 and 2) を含む脂肪酸デサチュラーゼファミリーの一員である。D5D はデサチュラーゼドメインとシトクロム b5 ドメインの二つのドメインからなるタンパク質である。デサチュラーゼドメインは二つの鉄原子を有する活性中心での脱水素反応を触媒し、シトクロム b5 は NADH シトクロム b5 レダクターゼからデサチュラーゼドメインの活性中心に電子を伝達する (図 1-2)。D5D は小胞体に存在する膜貫通型タンパク質であり、主として肝臓に、それよりも低い程度で心臓、脳、肺に、また他の組織に低いながらも検出出来る程度に発現している²²。

DGLA はプロスタグランジン E₁ (prostaglandin E₁; PGE₁) や 15 ヒドロキシトリエノイン酸 (15-hydroxytrieneoic acid, 15-HETrE) などの抗炎症性エイコサノイドの前駆体である²³。それゆえ、D5D 阻害はアラキドン酸由来の炎症促進性エイコサノイドの減少と同時に DGLA 由来の抗炎症性エイコサノイドの増加による二重の抗炎症作用を発揮すると期待される。実際に、D5D 欠損マウスは野生型マウスと比較して顕著な PGE₁ の増加と PGE₂ の減少が認められ、抗炎症性や抗増殖性のフェノタイプに至っている²⁴。これらをまとめると、D5D 阻害は炎症性反応を減弱する可能性があり、炎症関連疾患治療の次世代の治療戦略の一つになりうると期待される。実際に複数のグループから低分子 D5D 阻害剤が報告されている。Obukowicz らは D5D 酵素アッセイを用いて化合物スクリーニングを実施し、CP-74006 および他の化学構造の D5D 阻害剤を発見している²⁵ (図 1-3)。CP-74006 は別のグループによって動物への経口投与で D5D 阻害活性を示すインダゾール骨格の阻害剤にさらに最適化されている²⁶。

創薬に向けたリード最適化研究において、リード化合物の標的タンパク質に対する結合作用機序の解明は、リード化合物群の定量的評価の基盤となるため極めて重要である²⁷。これまでに複数の D5D 阻害剤が報告されているが^{25, 26}、詳細な生化学的また速度論的な阻害剤の解析は実施されておらず、阻害剤の結合作用機序はほとんど理解されていない。その情報がない理由は、主として酵素アッセイを用いた速度論解析の実施が困難であることに由来しているが、それには少なくとも次の三つの理由がある。まず、D5D 反応の基質と生成物を分離し検出する手法が HPLC²⁸ や TLC²⁹ などの低感度で処理能力の低いクロマトグラフ法のみに限られていることである。二つ目に D5D は膜貫通型タンパク質であり均一に精製されないため、可溶性のデサチュラーゼでは広く使われている精製タンパク質を用いた生化学的または構造生物学的な解析が報告されていないことである³⁰。最後に、基質が分子状酸素および K_m 付近の濃度でミセル形成をする長鎖の脂肪酸アシル CoA であるため、基質の有効濃度の厳密な制御が困難であることである³¹。

これらの酵素アッセイの問題を克服する代替戦略の一つが、試験化合物をプローブとして用いたリガンド結合試験である。本手法により酵素アッセイの基質を用いずに、リガンド結合を直接観察することが可能になる。今回、武田薬品工業において筆者らが実施した HTS とそのヒット化合物の最適化によって見出された D5D 阻害剤 T-3364366 を対象に、リガンド結合試験を用いてその阻害様式を明らかにすることを目的に実験を行った。解析結果に基づき、T-3364366 およびその周辺化合物の定量的な評価に必要な評価系設定についても考察する。

第二節 新規な D5D 阻害剤 T-3364366 の発見

D5D 酵素アッセイを用いたスクリーニングのヒット化合物を最適化する過程から、チエノピリミジノン骨格を有する新規な D5D 阻害剤 T-3364366 が見出された (図 1-3)³²。T-3364366 は酵素アッセイにおいて、強力な D5D 阻害と D6D および SCD に対する極めて良好な選択性を示し、またヒトおよびラット由来の肝細胞株 (HepG2 および RLN-10) において強力にアラキドン酸生成を阻害した (表 1-1)。興味深いことに、細胞アッセイの IC_{50} 値は、酵素アッセイよりも約 10 倍程度小さい値を示した。

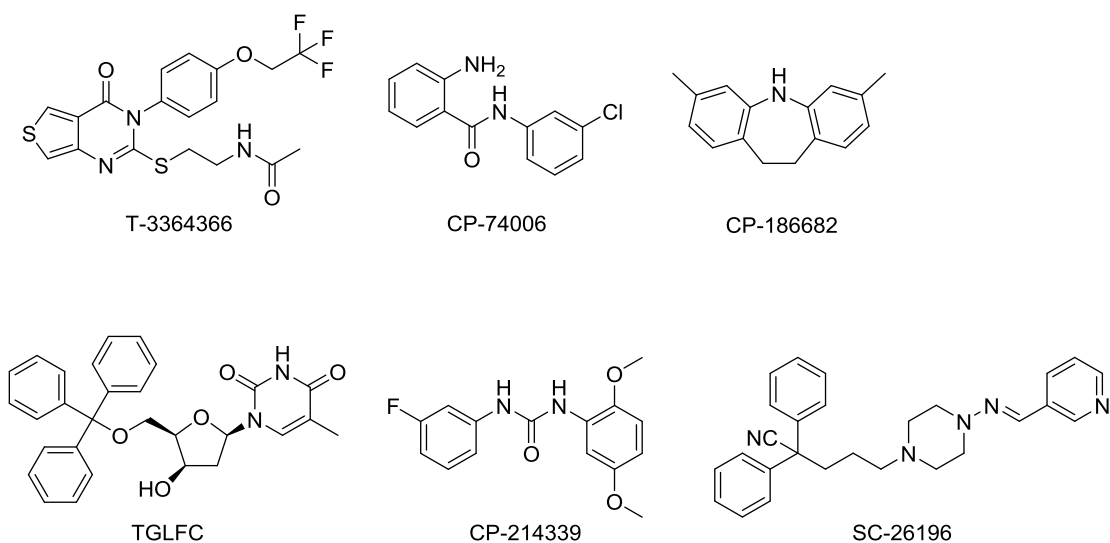


図 1-3、本研究で用いたデサチュラーゼ阻害剤の化学構造

表 1-1、CP-74006 と T-3364366 の D5D 阻害活性と選択性^a

	酵素アッセイ IC_{50} (nM) ^b			D5D 細胞アッセイ IC_{50} (nM)	
	D5D	D6D	SCD	HepG2	RLN-10
CP-74006	160 (140 – 190)	> 10000	> 10000	29 (25 – 34)	26 (22 – 30)
T-3364366	19 (16 – 22)	6200 (4100 – 9300)	> 10000	1.9 (1.7 – 2.0)	2.1 (1.8 – 2.4)

^a 括弧内は 95% 信頼性区間を表す

^b ラット肝ミクロソームを使った評価

第三節 [³H]T-3364366 を用いた放射性リガンド結合試験の構築

T-3364366 による D5D 阻害に関して、細胞アッセイの IC_{50} 値が酵素アッセイよりも約 10 倍程小さかった原因を解明するために、D5D 酵素アッセイを用いて T-3364366 の速度論解析を実施した。しかしながら前述の通り、酵素アッセイは検出感度が低いこと、基質濃度の可変範囲が狭いことが主な理由で、定量的な結果を取得することができなかった。そこで、トリチウム化 T-3364366 (³H]T-3364366) をプローブとする放射性リガンド結合試験を用いて、T-3364366 の結合を直接的に測定することにした。本実験では、ヒト D5D のタンパク質安定性が低いことから、ラット肝ミクロソーム画分に存在する D5D を代替として用いた。なお、T-3364366 はヒトとラットの細胞アッセイで同程度の阻害活性を示したことから、ラット肝ミクロソームで得られた結果はヒト D5D の結果を適切に反映すると考えられる。アッセイは、³H]T-3364366 をラット肝ミクロソーム画分とインキュベーション後、タンパク質と複合体を形成した ³H]T-3364366 のみをフィルターに吸着させ、非結合の ³H]T-3364366 と分離する「フィルター結合試験法」に基づいて構築した。

まず、複数濃度のトリチウムリガンド ³H]T-3364366 存在下で飽和結合実験を行った。³H]T-3364366 はラット肝ミクロソーム画分に対し、評価した濃度域において一相の特異的な飽和的結合を示した (図 1-4)。

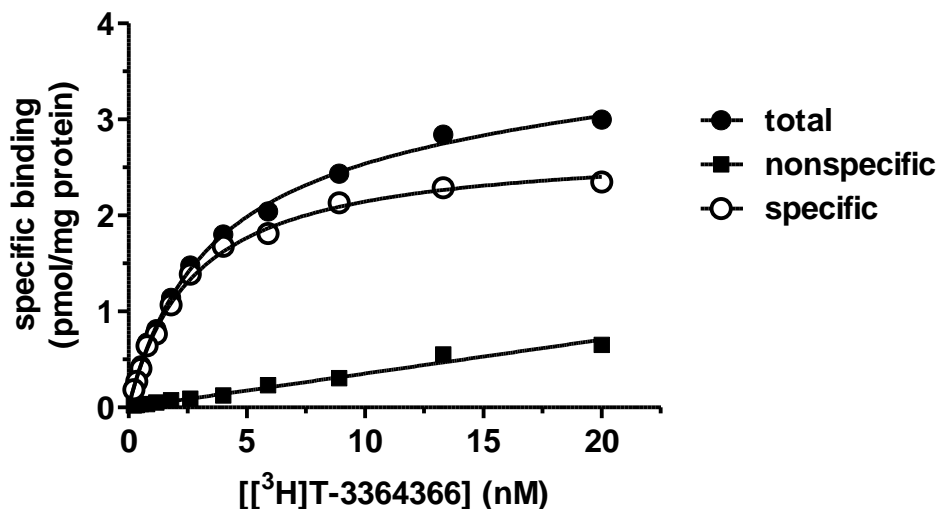


図 1-4、³H]T-3364366 のラット肝ミクロソームに対する飽和結合実験

10 μM の非標識 T-3364366 存在下 (非特異的結合、■) および非存在下 (全結合、●) での ³H]T-3364366 の結合を 150 分のインキュベーション後に測定した。特異的結合 (○) は全結合から非特異的結合を差し引くことで算出した。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 3) で表示している。

次に、検出された ³H]T-3364366 の放射能が D5D 特異的な結合によるものであることを確認するために、異なる化学構造の複数の特異的 D5D 阻害剤による ³H]T-3364366 の競合阻害を確認した。3.0 nM の ³H]T-3364366 の特異的結合は CP-74006 や他の化学構造の特異的 D5D 阻害剤 (図 1-3) により完全に置換されたが (図 1-5)、D6D の特異的阻害剤 SC-26196 (図 1-3) によっては高濃度において部分的に阻害されるのみであった²⁵ (図 1-6)。本データは ³H]T-3364366 の結合シグナルが D5D への結合に起因し、ミクロソーム画分に存在する他のタンパク質 (D6D など) への結合に由来しないことを示唆している。

150 分インキュベーション時の ³H]T-3364366 の見かけの K_d 値は 2.7 nM (2.2–2.9、95% 信頼性区間) と算出された (図 1-4)。この K_d 値は細胞アッセイで得られた IC_{50} 値と同程度の活性であり、リガンド結合試験が正しく構築されていることを示唆している。本アッセイの高い感受性により、結合試験に必

要なマイクロソーム画分の濃度を酵素アッセイと比較して少なくとも 6 分の 1 以下に低下させることが可能であった。

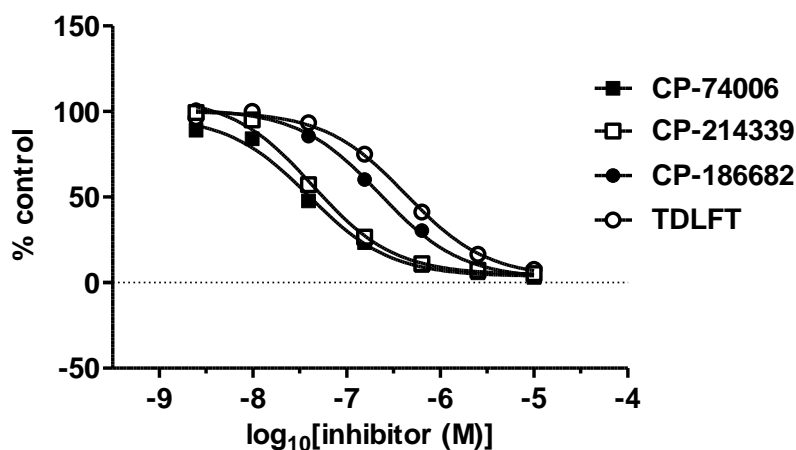


図 1-5、様々な D5D 阻害剤による 3.0 nM の $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ に対する競合的結合試験 CP-74006 (■)、CP-214339 (□)、CP-186682 (●)、TDLFT (○) を示す (化学構造は図 1-3 に表示している)。DMSO および 10 μM 非標識 T-3364366 存在下のシグナルをそれぞれ 100%、0% コントロールとして用いた。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) で表示している。

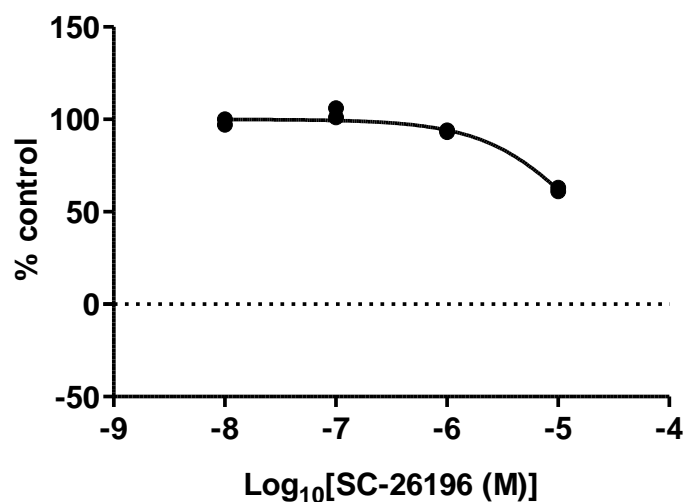


図 1-6、D6D 阻害剤 SC-26196 による $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ に対する競合的結合試験 DMSO および 10 μM 非標識 T-3364366 存在下のシグナルをそれぞれ 100%、0% コントロールとして用いた。試験は $n=2$ で実施し、各データをグラフに表示している。

第四節 [³H]T-3364366 の時間依存性阻害の評価

本リガンド結合試験を用いて、T-3364366 の結合作用機序を解析した。酵素アッセイと細胞アッセイの阻害強度の乖離の主な原因の一つとして、時間依存性阻害を仮定した⁹。そこでまず結合試験を用いて T-3364366 の阻害の時間依存性を評価した。様々な濃度 (1.2 ~ 20 nM) の [³H]T-3364366 を D5D とインキュベーションし、複数の時間点 (1 ~ 150 分) での特異的結合を算出した。その結果、[³H]T-3364366 の特異的結合の緩やかな上昇が 150 分まで見られ、T-3364366 が測定時間の範囲における時間依存的な D5D 阻害剤であることが示された (図 1-7)。特異的結合の変化を 24 時間にわたり経時的に測定したが 150 分以降の時間では特異的結合のより緩やかな減少が観察されたが (data not shown)、これは D5D タンパク質の失活によると考えられる。この特異的結合の減少のため、減少を考慮していない通常モデルより導出した数式では K_d 値などの平衡定数や k_{off} 値などの速度論定数を定量的に決定することは不可能である (使用した数式は「第八節、材料と方法」を参照)。特異的な結合の減少がなければさらなる時間依存性が確認できる可能性があることから、減少を無視して上記で算出した K_d 値や k_{off} 値は、真の値の上限値を規定しているに過ぎないといえる。

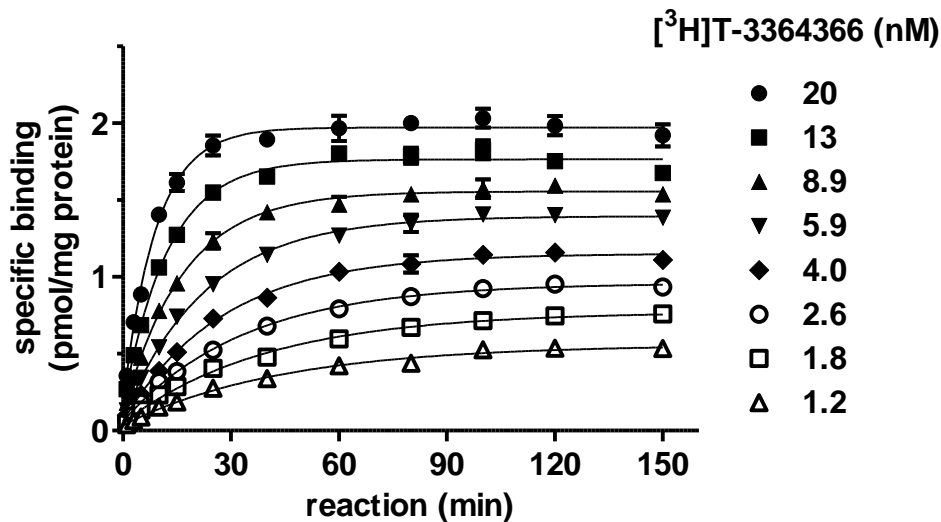


図 1-7、 $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ 結合の時間依存性評価

様々な濃度の $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の特異的結合を、表示した時間のインキュベーション後に評価した。データは一相のエクスポネンシャル結合曲線でフィットした。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 6$) で表示している。

続いて T-3364366 の時間依存性阻害のメカニズムを解明するために、T-3364366 による阻害の可逆性を希釈実験により試験した。時間依存性阻害は可逆的なスローバインディング阻害か共有結合性の不可逆性阻害により引き起こされる可能性がある。 $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ (6.0 nM) とラット肝ミクロソームを 150 分プレインキュベーションして複合体を形成させた後、解離した $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の再結合を防ぐ目的で $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ に対して過剰量 (10 μM) の非標識 T-3364366 の添加により溶液を 2 倍希釈した。D5D に結合した $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ のシグナルは希釈後 21 時間後にはほぼ完全に消失したことから、T-3364366 の可逆的なスローバインディング阻害が示唆された (図 1-8)。希釈実験から $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の解離半減期を算出するために D5D に結合した $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ を経時的にフィルターに捕捉したところ、 $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の結合シグナルは希釈後、緩やかに減少した。タンパク質失活の影響を考えないモデルから導出した数式によるフィッティングでは、解離の半減期は 2.0 時間 (1.9–2.1、95% 信頼性区間) と算出された (図 1-9)。

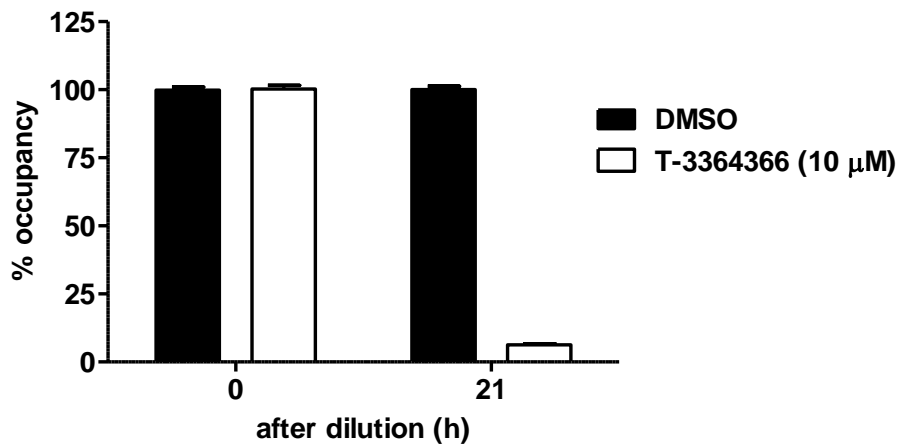


図 1-8、オーバーナイトの希釈実験による $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の可逆性の検証

DMSO および 10 μM 非標識 T-3364366 存在下のシグナルをそれぞれ 100%、0% コントロールとして用いて特異的結合を算出した。希釈後 0 時間および 21 時間の DMSO による希釈後の特異的結合のシグナル (閉じたバー) に対して、T-3364366 による希釈後のシグナル (開いたバー) を標準化して表示した。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 8$) で表示している。

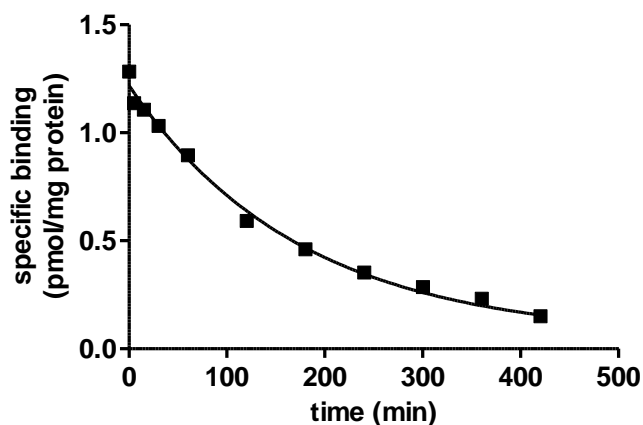


図 1-9、希釈実験による $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の D5D からの時間依存的な解離

10 μM の非標識 T-3364366 による希釈時を 0 分とし、 $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の D5D からの経時的な解離を観察した。DMSO および 10 μM 非標識 T-3364366 存在下のシグナルをそれぞれ全結合、非特異的結合として用いて特異的結合を算出して表示し、一相のエクスポネンシャル減衰曲線でフィットした。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 8$) で表示している。

T-3364366 の D5D への共有結合形成の可能性をさらに排除するために、タンパク質を失活させた後にミクロソーム画分に残存する [³H]T-3364366 量を測定した。もしも [³H]T-3364366 が共有結合を介した不可逆性阻害剤であれば、タンパク質失活剤の添加で D5D の三次元構造が崩れ結合ポケットが失われた後でも、[³H]T-3364366 は共有結合を介して D5D に付加しているはずである。[³H]T-3364366 とプレインキュベーションした D5D に終濃度 2% のトリクロロ酢酸 (TCA) を添加すると、[³H]T-3364366 の特異的結合が迅速に消失した。以上から、T-3364366 の非共有結合的な可逆的スローバインディング阻害が強く示唆された (図 1-10)。

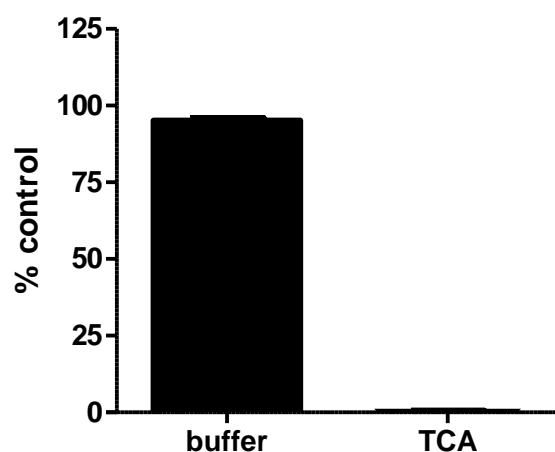


図 1-10、トリクロロ酢酸 (TCA) 添加による [³H]T-3364366 の結合の消失

[³H]T-3364366 をラット肝ミクロソームと 150 分インキュベーション後、バッファーまたはトリクロロ酢酸を添加した。DMSO および 10 μ M 非標識 T-3364366 存在下のシグナルをそれぞれ全結合、非特異的結合として用いて特異的結合を算出し、バッファーおよびトリクロロ酢酸を添加後の結合シグナルを、添加前のシグナルに対して標準化して表示した。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=8$) で表示している。

T-3364366 の解離半減期は 2 時間以上と算出されたが、この解離半減期は細胞アッセイでの薬物洗浄後も持続的な薬理作用が期待されるほど、遅い解離速度であると考えられる。そこで、HepG2 細胞を用いた D5D アッセイにおいて

培地中に存在する T-3364366 の洗浄後も阻害が持続するかどうかについて精査した (図 1 - 11)。CP-74006 のアラキドン酸生成阻害は洗浄により大きく減弱してしまったのに対し (A)、T-3364366 による阻害活性には僅かな影響しか与えなかった (B)。この結果から、より生体を反映した細胞内環境においても T-3364366 がスローバインディング阻害を示すことが確認できた。

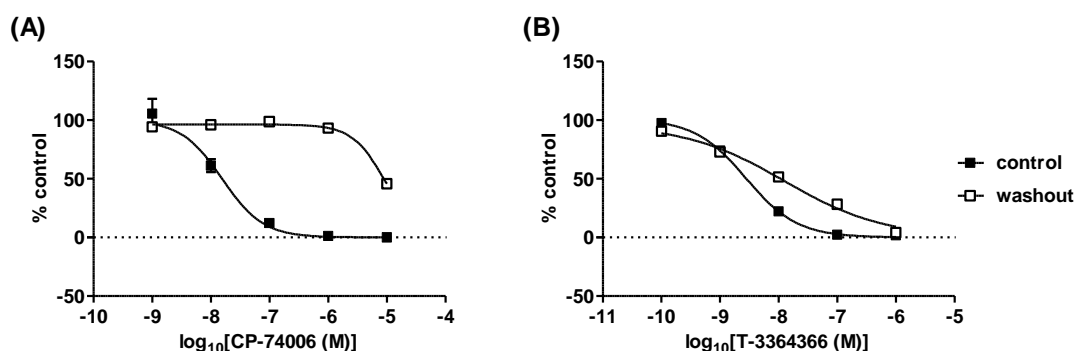


図 1 - 11、T-3364366 の細胞アッセイでの洗浄耐性

HepG2 細胞に CP-74006 (A) および T-3364366 (B) を 3 時間処理した。細胞を DMEM 培地で 3 回洗浄した後、[¹⁴C]DGLA を添加し、細胞をさらに 4 時間インキュベーションした。薬物を洗浄しない条件での DMSO および 10 μM T-3364366 をそれぞれ 100% および 0% コントロールとして、[¹⁴C]DGLA からの [¹⁴C]アラキドン酸の生成を標準化して表示した。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 4) で表示している。

第五節 T-3364366 の薬物動態学的性質

解離速度の遅いスローバインディング阻害剤は、生体内において血中の薬物消失後も標的タンパク質に対する占有が持続することから、薬物消失後でも持続的な薬理作用が期待できる³³。T-3364366 の遅い解離速度の生体における薬効への寄与を考察するために、マウスに T-3364366 を静脈内投与後、血中の T-3364366 濃度の経時変化を測定することで薬物動態指標を算出した (表 1 - 2)。T-3364366 投与後の血中における薬物の平均滞留時間 (mean residence time, MRT) は 0.65 時間と算出された。この値は T-3364366 の解離半減期 (> 2.0 時間) よりも短い結果となった (表 1 - 2)。平均滞留時間よりも遅い解離の影響で、

T-3364366 は血中薬物濃度の低下後も薬理作用が持続すると考えられるため、生体での薬効発現に必要な全身の薬物濃度の減少が期待できる。結果として、T-3364366 は潜在的なオフターゲット阻害による副作用リスクの少ない有望なリード化合物になると考えられる。

表 1-2、T-3364366 の薬物動態指標^a

route	dose (mg/kg)	AUC _{0-8h} (ng·h/mL)	CL _{total} (L/h/kg)	V _{dss} (L/kg)	MRT (h)	F (%)
iv	0.10	65	1.5	1.1	0.65	
oral	1.0	260			1.8	41

^a マウスカセットドージング法で算出した ($n = 3$)。iv, oral はそれぞれ経静脈投与、経口投与を示す。dose、AUC_{0-8h}、CL_{total}、V_{dss}、F はそれぞれ投与量、0–8 時間の薬物血中濃度 – 時間曲線下面積、全身クリアランス、定常状態分布容積、生物学的利用能を示す。

第六節 T-3364366 の結合ドメインの同定

前述したように、D5D はデサチュラーゼドメインおよびシトクロム *b5* ドメインの 2 つのドメインからなるタンパク質である。そのため T-3364366 による D5D の阻害機序に関しては、デサチュラーゼドメインの脱水素活性の阻害やシトクロム *b5* ドメインを介した電子伝達の阻害など複数の可能性が考えられる。T-3364366 の作用機序の更なる解析のために、D5D と D6D 間のドメイン交換実験により結合ドメインの同定を行った。D6D は D5D と同様にデサチュラーゼドメインとシトクロム *b5* ドメインからなり、全長にわたって D5D と高い相同性 (61% identity、76% similarity) を有する³⁴。UniProt でシトクロム *b5* ドメインと指定されている領域 (D5D の 18–95 aa、D6D の 17–94 aa) の相同性は 56% identity、77% similarity、一方でデサチュラーゼドメインを含む残りの領域 (D5D の 96–444 aa、D6D の 95–444 aa) の相同性は 65% identity、77% similarity であることから、類似の度合いはドメインに依存しないことが分かる。

T-3364366 は D6D を非常に高い濃度でしか阻害しないことが示されていることから、D5D と D6D 間のドメイン交換変異体に対するリガンド結合試験か

ら T-3364366 の結合ドメインを同定できると考えられる。そこで D5D と D6D 間のアミノ酸配列比較から二種のドメイン交換変異体を作製した。すなわち D6D の シトクロム *b5* ドメイン (1-100) および D5D の デサチュラーゼドメイン (100-444) を融合した D6D-*b5*₍₁₋₁₀₀₎/D5D-*des*₍₁₀₀₋₄₄₄₎ 変異体と D5D の シトクロム *b5* ドメイン (1-99) と D6D の デサチュラーゼドメイン (101-444) を融合した D5D-*b5*₍₁₋₉₉₎/D6D-*des*₍₁₀₁₋₄₄₄₎ 変異体を作製し、これらの組換えタンパク質に対して [³H]T-3364366 の結合実験を実施した (図 1-12A)。その結果、 [³H]T-3364366 は D5D の デサチュラーゼドメインを有するタンパク質にのみ結合したことから、T-3364366 は D5D の シトクロム *b5* ドメインではなく デサチュラーゼドメインへの結合を介して D5D を阻害していることが明らかになった (図 1-12B)。

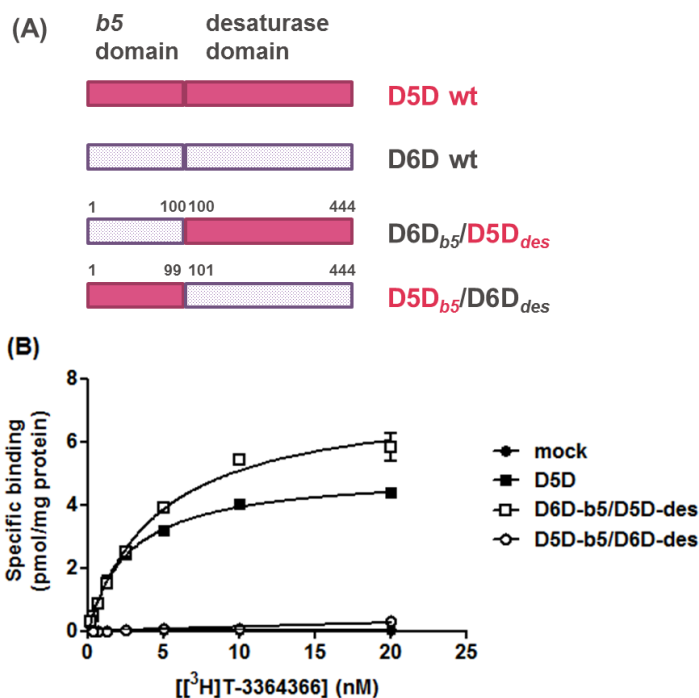


図 1-12、キメラ D5D/D6D への [³H]T-3364366 の結合試験による結合サイト同定 (A) キメラ D5D/D6D タンパク質作製の模式図。(B) [³H]T-3364366 の飽和結合試験を、ベクターのみ発現 (●)、野生型 D5D (■)、ドメイン交換変異体 D6D-*b5*/D5D-*des* (□) および D5D-*b5*/D6D-*des* (○) に対して実施し、特異的結合を表示した。データは平均値 ± 標準誤差 ($n = 3$) で表示している。

第七節 考察

本研究では T-3364366 の D5D に対する結合の作用機序を解明するために、評価化合物を結合プローブとして用いた放射性リガンド結合試験を採用した。リガンド結合試験は従来の D5D 酵素アッセイに対して、高感度、高精度、高い処理能力、そして結合の直接的測定が可能、などの複数の利点がある。表 1 に示したとおり、酵素アッセイで算出した T-3364366 の IC_{50} 値は真の阻害強度を過小評価していることが明らかになったが、それは一部にはスローバインディング阻害が原因であると考えられる。同様にスローバインディング阻害が原因で、当初実施した酵素アッセイでの T-3364366 の作用機序解析においても、適切な評価が妨げられていたと考えられる⁹。デサチュラーゼの定量的な酵素アッセイの実施が困難であることは D6D や SCD1 を含む脂肪酸デサチュラーゼ阻害剤の結合作用機序に関する情報が殆ど存在しないことに関連していると考えられる。最近、アゼチジン化合物 ($[^3H]AZE$) を用いた SCD1 に対する競合的結合試験が報告されたが³⁵、そのリガンド化合物の詳細な結合作用機序はまだ報告されていない。アゼチジン化合物の結合試験を用いた生化学解析はデサチュラーゼファミリー酵素阻害剤の結合作用機序の更なる理解に有益であると考えられる。

T-3364366 の生化学的な作用機序解析において、今後さらに明らかにしなければならぬのは、基質 DGL-CoA に対する阻害様式である。 $[^3H]T-3364366$ は少なくともフリー体の酵素 (DGL-CoA 非存在下の酵素) には強力に結合するので、続いて DGL-CoA との複合体を形成した酵素に結合できるかどうかを検証しようとした。すなわち、DGL-CoA 存在下での D5D に対しての $[^3H]T-3364366$ の結合試験を実施したが、おそらく DGL-CoA のミセル形成によって一貫した結果を得ることが出来なかったため、検討を中止した。このような場合には、標的タンパク質の構造解析とそれに続く変異解析が、基質と阻害剤の結合サイトを決定する強力な手段の一つになりうる。残念ながら、D5D の結晶構造解析はこれまでのところ報告されておらず、例えば SCD など他のデサチュラーゼタ

ンパク質の構造情報やトポロジー情報に基づいた更なるキメラ構築や変異解析が、リガンド (基質または阻害剤) の結合サイトや阻害様式の推測に役立つと考えられる³⁶⁻³⁸。

結論として、T-3364366 は D5D のデサチュラーゼドメインに対し、可逆的かつスローバインディングな結合様式を示す、強力かつ選択的で経口投与可能な D5D 阻害剤であることが、リガンド結合試験等を用いて明らかにされた。

T-3364366 は強力な結合親和性と持続的な薬効を有する炎症性疾患治療薬の有望なリード化合物として期待される。本研究は脂肪酸デサチュラーゼ阻害剤の結合作用機序を解析した初めての例であり、デサチュラーゼ阻害剤の創薬研究に重要な情報を提供するものである。

T-3364366 の周辺化合物も同様の結合様式すなわちスローバインディング阻害を示すことが期待される。そのため、酵素アッセイを用いた前平衡状態での IC_{50} 評価では、これら周辺化合物も T-3364366 と同様に真の結合活性を過小評価することになる可能性が高いと考えられる。評価化合物と拮抗するリガンドを結合プローブとする競合的結合試験を用いれば、平衡状態における IC_{50} が評価する阻害剤の真の活性値と比例する。そのため、T-3364366 周辺化合物の構造-活性相関研究では、D5D 酵素の失活が許容出来るなるべく長いインキュベーション時間での [³H]T-3364366 の競合試験の IC_{50} 値を用いるのが適切である。これにより、阻害剤の真の活性値の過小評価を最小限にすることが可能であると考えられる³²。このように、リード化合物の最適化研究を正しく導くためには、リード化合物の標的タンパク質に対する作用機序に基づいて、その周辺化合物の適切な評価法と評価指標を提示することが重要である。

第八節 材料と方法

試薬

記載のないかぎり、試薬は和光純薬工業から購入した。細胞培養の培地や添加物は Gibco から購入した。CP-74006、SC-26196 は以前に報告された方法に従って武田薬品工業で合成した。CP-214339、TGLFC、CP-186682 は the University of Florida, Sigma, Vitas-M Laboratory からそれぞれ購入した。Tween-20 は Bio-Rad より購入した。

ラット肝マイクロソームの調製

Sprague Dawley ラットの肝臓を取得し、以下の作業は氷上で実施した。肝臓をハサミで細切れにし、ポリトロンを用いて 250 mM スクロース、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、Complete プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含む 4°C のバッファー中で均一化した。破砕物を 10,000 g で 30 分間、4°C で遠心した後、上清をさらに 40,000 g で 60 分間再度遠心した。上清を廃棄し、マイクロソームペレットを 250 mM スクロース、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、Complete EDTA-free プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含むマイクロソームバッファーに再懸濁し、小分け分注し、使用まで -80°C で保存した。本研究で用いた全ての動物の取扱及び試験は武田薬品工業株式会社の動物実験委員会のガイドラインに則り実施された。

組換え D5D、D6D タンパク質の調製

組換え D5D、D6D とその変異体は Tawa らの方法に微修正を加えて実施した³⁵。目的 cDNA 断片を PCR で増幅して pFASTBac1 に挿入し、Bac-to-bac バキュロウイルス発現系 (Life technologies) を用いて High five 細胞 (BTI-TN-5B1-4) で発現した。培養 72 時間後、細胞は遠心で回収し、ペレットをマイクロソームバッファーに再懸濁し、ポリトロンを用いて均一化した。細胞

片を除くために破砕物を 1,500 g で 10 分間遠心し、ミクロソーム画分を取得するため上清を 180,000 g で 30 分間遠心した。ペレットをミクロソームバッファーに再懸濁し、使用まで -80°C で保存した。

D5D 酵素アッセイ

アッセイは 30 μL の最終液量で 96 ウェルプレートで 100 mM NaHPO_4 , 150 mM KCl , 10 mM NaF , 1.5 mM glutathione, 3 mM MgCl_2 , 1 mM NADH , 3 mM ATP , 0.3 mM CoA-SH , 0.1% (w/v) 脂肪酸除去 Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) および 0.1 μCi /ウェル $[^{14}\text{C}]\text{DGLA}$ (ARC) を含むバッファー中で実施した。評価化合物をラット肝ミクロソーム (終濃度 1.0 mg/ml) と 5 分間プレインキュベーションした後、 NADH 、 ATP 、 $[^{14}\text{C}]\text{DGLA}$ を添加して D5D 酵素反応を開始し、反応液を 120 分間、室温でインキュベーションした。その後、酵素反応を NaOH (終濃度、0.67 N) の添加で反応を停止した。脂肪酸のけん化のため 55°C で一晩インキュベーションした後、脂肪酸の溶媒抽出をブライ=ダイアーの方法に従って実施した³⁹。クロロホルム層を逆相 TLC RP-18 F_{254s} (Merck Millipore) 上にスポットしアセトニトリル：水：ぎ酸 (95:4.5:0.5) で展開した。 $[^{14}\text{C}]\text{DGLA}$ および $[^{14}\text{C}]\text{アラキドン酸}$ の放射能は BAS-5000 (Fujifilm) で測定し、Multi Gauge Ver2.3 (Fujifilm) で定量化した。評価化合物の IC_{50} 値は、データに対して下記のロジスティクス関数をフィットすることで算出した。

$$\% \text{ control} = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{(\log[I] - \log IC_{50})})$$

D5D 細胞アッセイ

HepG2 と RLN-10 細胞は 96 ウェル細胞培養プレート (Corning) に 1 ウェルあたり 100,000 細胞を播種し、10% (v/v) ウシ胎児血清、100 U/ml penicillin、100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin を添加した DMEM 培地で 5% CO_2 存在下 37°C でインキュベーションした。細胞は 200 μL の PBS で 2 回洗浄後、0.1% (w/v) 脂

脂肪酸除去 BSA を添加した DMEM 中に希釈した評価化合物と共にインキュベーションした。その後、各ウェルに 0.1 μCi の [^{14}C]DGLA を添加した。3 時間、37°C でインキュベーションした後、細胞を 200 μL の PBS で 3 回洗浄して培地中の [^{14}C]DGLA を除去し、脂肪酸をけん化するため NaOH (終濃度 0.63 N) を添加した。 [^{14}C]DGLA と [^{14}C]アラキドン酸は上記の方法で抽出、分離、分析を行った。評価化合物の IC_{50} 値は、データに対してボトム値を 0 に固定したヒル関数をフィットすることで算出した。

放射性リガンド結合試験

放射性リガンド結合試験は最終液量 200 μL スケールで、10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 0.005% (w/v) Tween-20, 1 mM glutathione を含有するバッファー中で、96 ウェルプレートで実施した。ラット肝ミクロソーム (30 μg) を複数濃度の [^3H]T-3364366 と 10 μM T-3364366 存在下 (非特異的結合) または非存在下 (全結合) で 150 分間インキュベーションした。ミクロソームに結合したリガンドは GF/B フィルタープレート (PerkinElmer) に捕捉し、Filtermate Harvester (PerkinElmer) を用いた迅速ろ過と 300 μL の 10 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) による 5 回の洗浄により非結合のリガンドと分離した。フィルタープレートは乾燥し、各ウェルに 25 μL のマイクロシンチ-O (PerkinElmer) を添加後 TopCount liquid scintillation counter (PerkinElmer) を用いて放射能を測定した。 [^3H]T-3364366 の特異的結合は全結合から非特異的結合を差し引くことで算出し、特異的結合モデルでフィットした。飽和結合実験では、データに対して以下の関数をフィットした。

$$\text{specific binding} = B_{\text{max}} \times [L]/([L] + K_d)$$

$$\text{nonspecific binding} = \text{slope} \times [I] + \text{background}$$

$$\text{total binding} = \text{specific} + \text{non specific binding}$$

リガンドの競合試験では、3 パラメーターロジスティクス関数をデータにフィットして IC_{50} 値を算出した。結合及び解離のプログレスカーブ実験には、それぞれ以下の一相のエクスポネンシャル関数を用いた。

$$\text{specific binding} = B_{\max(\text{app})} \times (1 - \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t))$$

$$\text{specific binding} = B_0 \times \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t)$$

マウスカセットドージング法による薬物動態解析⁴⁰

評価化合物をカセットドージング法により非絶食マウスに経静脈 (0.10 mg/kg) または経口 (1.0 mg/kg) で投与した。投与後、血液試料を回収し、遠心により血漿画分を得た。さらに血漿試料を除タンパク後遠心し、上清に含まれる薬物の濃度を LC/MS/MS で測定した。

データ解析

データ解析は GraphPad Prism 5 ソフトウェア (GraphPad) を用いて実施した。

T-3364366 および [³H]T-3364366 の合成

A) ethyl 4 -isothiocyanatothiophene -3 -carboxylate

Ethyl 4 -aminothiophene -3 -carboxylate hydrochloride (69 g) を 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (400 ml) に加え、混合物を酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して褐色油状物 (56 g) を得た。この褐色油状物をクロロホルム (150 ml) に溶かし、チオホスゲン (12.5 ml) のクロロホルム (300 ml) 溶液に加えた。この混合溶液を炭酸水素ナトリウム (18.5 g) の水溶液 (115 ml) に室温で滴下し、4 時間攪拌した。有機層と水層を分液し、水層をクロロホルムで抽出した。得られた有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して得られた粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) に

て精製し当該化合物 (15.6 g) を薄黄色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.39 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 4.36 (2H, q, $J=7.2$ Hz), 7.14 (1H, d, $J=3.6$ Hz), 8.06 (1H, d, $J=3.6$ Hz).

B)

2-thioxo-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]-2,3-dihydrothieno[3,4-d]pyrimidin-4(1H)-one

Ethyl 4-isothiocyanatothiophene-3-carboxylate (1.1 g) および 4-(2,2,2-trifluoroethoxy)aniline (0.99 g) をアセトニトリル (40 ml) に溶かし、1 時間加熱還流した。放冷後、カリウム tert-ブトキシド (1.27 g) をエタノール (15 ml) に溶かし、室温下反応混合物に注いだ。反応混合物を 10 分間加熱還流した後放冷し、減圧濃縮した。得られた褐色残渣をエタノール (10 ml) に溶かし、氷冷下 0.3 M 塩酸 (35 ml) に注いだ。生じた沈殿物をろ取り、水で洗浄後、テトラヒドロフラン (40 ml) に溶かし、酢酸エチル (80 ml) で希釈した。この有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し固体を得た。この固体をテトラヒドロフラン/イソプロピルエーテル (1/10) 混合溶媒で洗浄し、当該化合物 (1.59 g) を固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.82 (2 H, q, $J=8.9$ Hz), 7.10 (2 H, d, $J=9.0$ Hz), 7.12 (1 H, d, $J=3.3$ Hz), 7.20 (2 H, d, $J=9.0$ Hz), 8.51 (1 H, d, $J=3.3$ Hz), 12.92 (1 H, s).

C) tert-butyl

[2-(14-oxo-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]-3,4-dihydrothieno[3,4-d]pyrimidin-2-yl)sulfanyl)ethyl]carbamate

2-Thioxo-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]-2,3-dihydrothieno[3,4-d]pyrimidin-4(1

H)-one (1.59 g) を N,N-ジメチルホルムアミド (20 ml) に溶かし、氷冷下、水素化ナトリウム (60% 油性、0.25 g) および tert-butyl(2-bromoethyl)carbamate (1.49 g) を順に加えた後、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 ml) を注ぎ、混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、酢酸エチル/ヘキサン) にて精製し、当該化合物 (2.12 g) を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.35 (9 H, s), 3.10 (2 H, t, $J=6.3$ Hz), 3.23 (2 H, td, $J=6.3, 5.3$ Hz), 4.86 (2 H, q, $J=8.9$ Hz), 6.97 (1 H, t, $J=5.3$ Hz), 7.18 (2 H, d, $J=9.0$ Hz), 7.37 (2 H, d, $J=9.0$ Hz), 7.66 (1 H, d, $J=3.3$ Hz), 8.50 (1 H, d, $J=3.3$ Hz).

D)

2-[(2-aminoethyl)sulfanyl]-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]thieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-one hydrochloride

4 M 塩化水素酢酸エチル溶液 (20 ml) とメタノール (10 ml) の混合溶液に tert-butyl [2-(14-oxo-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]-3,4-dihydrothieno[3,4-d]pyrimidin-2-yl)gulfanyl)ethyl]carbamate (1.7 g) を加え、室温で 14 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残留物を酢酸エチル/エーテル (1/1) の混合液で洗浄し、当該化合物 (1.48 g) を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 3.03 - 3.21 (2 H, m), 3.29 (2 H, t, $J=6.8$ Hz), 4.87 (2 H, q, $J=8.8$ Hz), 7.20 (2 H, d, $J=9.1$ Hz), 7.43 (2 H, d, $J=9.1$ Hz), 7.70 (1 H, d, $J=3.3$ Hz), 8.17 (3 H, br. s.), 8.53 (1 H, d, $J=3.3$ Hz).

E)

N-[2-({4-oxo-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]-3,4-dihydrothieno[3,4-d]pyrimidin-2-ylsulfanyl)ethyl]acetamide (T-3364366)

2-[(2-Aminoethyl)sulfanyl]-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]thieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-one hydrochloride (0.33 g) をテトラヒドロフラン (30 ml) に懸濁し、トリエチルアミン (0.31 ml)、無水酢酸 (0.28 ml) および 4-ジメチルアミノピリジン (37 mg) を順に加え、室温で 18 時間攪拌した。反応混合液を減圧濃縮した後酢酸エチルで希釈し、飽和クエン酸水溶液、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた薄黄色固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、無色固体を得た。この固体を酢酸エチル/ヘキサンで再結晶し、当該化合物 (0.22 g) を無色固体として得た。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.77 (3H, s), 3.01-3.20 (2H, m), 3.21-3.38 (2H, m), 4.86 (2H, q, *J* = 8.7 Hz), 7.10-7.27 (2H, m), 7.31-7.45 (2H, m), 7.66 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 8.01 (1H, t, *J* = 5.3 Hz), 8.50 (1H, d, *J* = 3.4 Hz).

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ 444.0.

元素分析: Anal. Calcd for C₁₈H₁₆N₃O₃S₂F₃: C, 48.75; H, 3.64; N, 9.48. Found: C, 48.84; H, 3.76; N, 9.41.

F)

N-[2-(14-oxo-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)[2,6-³H₂]phenyl]-3,4-dihydrothieno[3,4-d]pyrimidin-2-ylsulfanyl)ethyl]acetamide ([³H]T-3364366)

N-[2-({4-oxo-3-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]-3,4-dihydrothieno[3,4-d]pyrimidin-2-ylsulfanyl)ethyl]acetamide (3 mg) とクラブトリー触媒 : (1,5-cyclooctadiene) (pyridine) (tricyclohexylphosphine)iridium(I) hexafluorophosphate (6 mg) をジクロロメタン (1.5 ml) に溶解し、トリチウムガス (2 Ci) 雰囲気下 4 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣にエタノールを加え再度減圧濃縮した。残留物

を逆層高速液体クロマトグラフィー (C18 column、溶出液：水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸) で精製し、標題化合物 (44 Ci/mmol) を得た。高速液体クロマトグラフィーで測定した標題化合物の放射化学的純度は 99.9% であった (カラム：Spherisorb ODS2 5 μ 150 \times 4.6 mm、溶媒：A 液；0.1% トリフルオロ酢酸含有水、B 液；0.1% トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル、グラジエントサイクル：0 分 (A 液/B 液 = 80/20)、15 分 (A 液/B 液 = 0/100)、注入量：5 μ L、流速：1 ml/min)。

MS (ESI+): [M+H]⁺ 448.1.

第二章 Bcl-xL/Mcl-1 タンパク質間相互作用阻害剤の作用機序解析

第一節 背景、目的

細胞内シグナル伝達や細胞間コミュニケーションは、タンパク質が他のタンパク質との相互作用 (protein-protein interaction; PPI) を通じて働くことで大部分が制御されている。不適切に亢進した PPI はがん⁴¹⁻⁴³、自己免疫疾患⁴⁴⁻⁴⁶を含む多くの疾患で観察されているため、PPI 阻害は創薬研究において大きな興味もたれている⁴⁷⁻⁵⁰。現在、ほぼすべての PPI 阻害薬は抗体医薬品であり、細胞表面の標的タンパク質にその適用範囲が限られている。細胞内 PPI の阻害には、良好な細胞膜透過性や体内動態など、低分子医薬品として適した“ドラッグライク”な性質を有する低分子阻害剤の同定が必要である。

創薬標的分子としての細胞内 PPI の例として挙げられるのが、B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) および myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) である (図 2-1)。

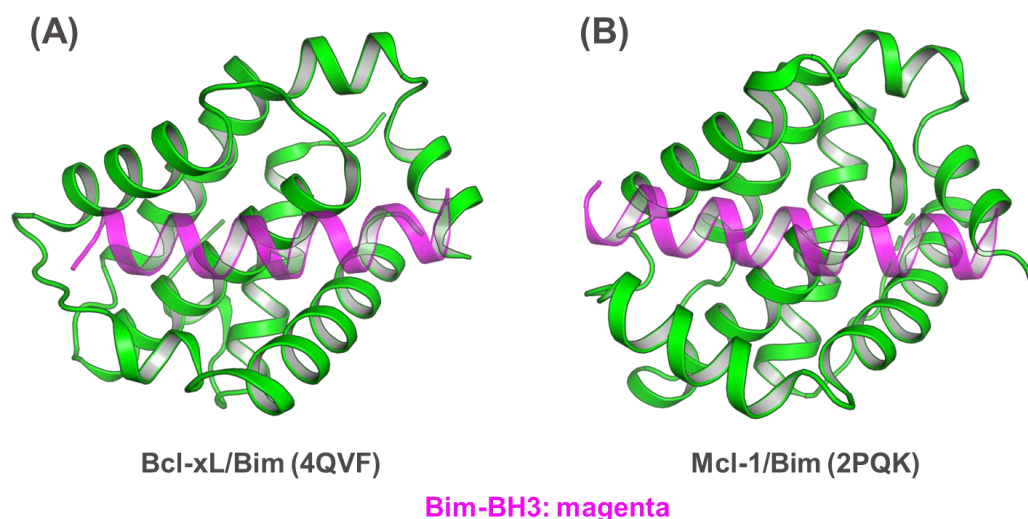


図 2-1、Bcl-xL および Mcl-1 の三次元タンパク質構造

Bcl-xL (A) および Mcl-1 (B) をグリーンで、Bim の BH3 ドメイン由来のペプチドをマゼンダで表示した。座標ファイルは、蛋白質構造データベースの PDB code; 4QVF、2PQK をそれぞれ使用し、Pymol 1.4.1 を用いて描画した。

両タンパク質は共に B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) タンパク質ファミリーの抗アポトーシスメンバーに属し、ミトコンドリアを介したアポトーシスの重要な制御因子である。両タンパク質は Bcl-2-associated X protein (Bax) や Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak) などアポトーシス促進性の Bcl-2 ファミリータンパク質と相互作用することでアポトーシスを抑制する (図 2-2)^{41, 42, 51, 52}。

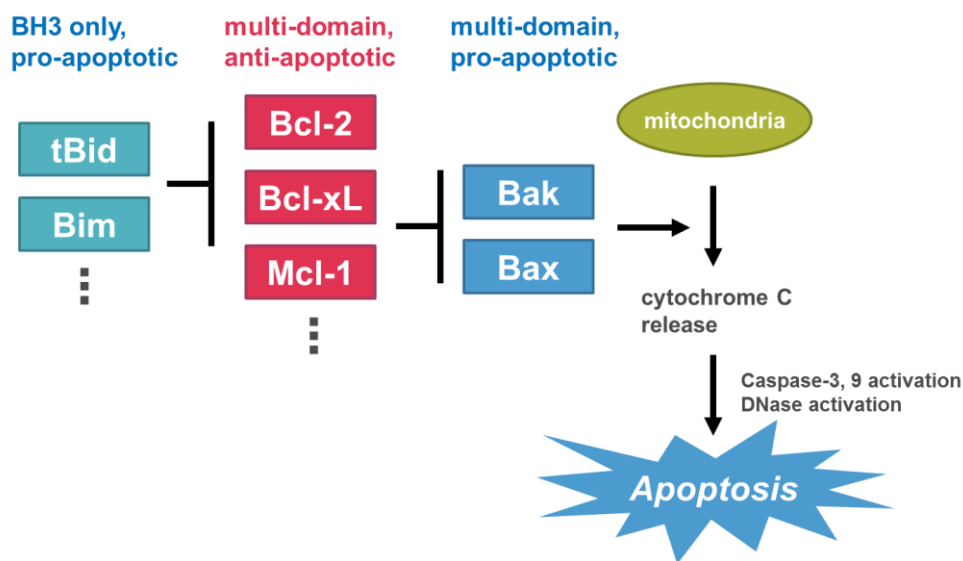


図 2-2、Bcl-2 ファミリータンパク質を介したアポトーシス制御

tBid、Bim はそれぞれ truncated BH3 interacting domain death agonist protein、Bcl-2-interacting mediator of cell death を示す。参考文献 41、42、51、52 より改変。

一方で Bcl-xL および Mcl-1 の抗アポトーシス機能は、BH3 ドメインのみを有するアポトーシス促進性 Bcl-2 ファミリータンパク質 (tBid、Bim 等) との相互作用により抑制されている (図 2-2)。このような機構を介して Bcl-xL および Mcl-1 の PPI は、シトクロム c のミトコンドリアからの漏出、カスパーゼカスケードの活性化、そしてアポトーシスの実行へとつながる経路を制御している。Bcl-xL と Mcl-1 タンパク質の過剰発現やこれら遺伝子の増幅ががん細胞のアポトーシスからの回避と相関する⁵³⁻⁵⁷。興味深いことに、Mcl-1 に加えて Bcl-xL のアポトーシス促進性タンパク質との PPI を同時に阻害することで、Mcl-1 単独の阻害と比較して強力な抗がん作用が期待できる⁵³。これらの情報に基づき、

Bcl-xL と Mcl-1 の二重 PPI 阻害はがん細胞におけるアポトーシス経路を回復する可能性があり、有望ながん治療法と考えられる。

PPI は創薬研究において魅力的な標的であるが、経口剤として好ましい物理化学的特徴を有する低分子 PPI 阻害剤をハイスループットスクリーニング (HTS) から同定することは、アカデミアや製薬産業の多大な努力にもかかわらず、未だに困難なままである。HTS からの PPI 阻害剤の同定が困難な主な理由は、低分子が PPI 境界面に結合するための深くぼみがないことである^{47, 50, 58}。PPI 境界面に浅いポケットしか存在しないことは、HTS の一次ヒットが標的タンパク質に対し弱い親和性でしか結合せず、化合物スクリーニングを高濃度 (10 μM 以上) で実施する必要があることを意味している。高い阻害剤濃度でのスクリーニングは、化合物による非特異的な共有結合を介した標的タンパク質の失活や、自家蛍光等によるアッセイ原理への干渉などが原因で、偽陽性が高頻度で生じることにつながる⁴⁷。従って、PPI を標的とした HTS の一次ヒット化合物は細心の注意を払ってその結合の妥当性、すなわち、その一次ヒットが偽陽性化合物ではないかどうかを精査する必要がある。

一般的に PPI 阻害剤の結合の妥当性の検証には生物物理学的分析法が広く用いられている^{59, 60}。例えば、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance; SPR)、等温滴定熱量測定 (isothermal titration calorimetry; ITC)、核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) などが 1 対 1 より大きい化学量比の結合性や異常な結合速度論を示す偽陽性化合物を除外するのに使われている^{47, 59-62}。これらの生物物理学的分析法は、化合物を蛍光や放射性同位元素でラベルすることなく直接的に結合を測定出来るため、化合物が標的タンパク質に対して実際に結合しているという強い根拠を提供できる。しかしながら、生物物理学的分析法は高額な装置を必要とし、大量のタンパク質供給が必要で、さらに特殊な実験技術が必要であるため、必ずしもいつも使えるとは限らない。加えて、これらの手法は一般的に膜タンパク質には適用できず、その利用は可溶性の精製

タンパク質に限られている。そのため、HTS ヒット化合物の偽陽性結果を減らすためには、簡単で幅広く利用可能なヒット化合物の結合の妥当性検証法が必要であると考えられる。

第二節で述べるように、武田薬品工業において筆者らが中心になって実施した Bcl-xL/Mcl-1 二重 PPI 阻害剤の探索研究において、HTS ヒット化合物 **II** が得られた。しかしながら上記の通り PPI 阻害剤の HTS ヒットには多くの偽陽性化合物が混在することから、**II** が共有結合性を介した非特異的な阻害剤や偽陽性化合物等ではなく、Bcl-xL/Mcl-1 に対して 1 対 1 の化学量比で結合する特異的な阻害剤であることを証明する必要がある。そこで PPI 阻害を定量的に評価するプローブに対する競合的結合試験を構築し、**II** の結合の作用機序を明らかにすることを目的に実験を行った。本章では、これらの解析を通じて共有結合阻害剤および偽陽性化合物の可能性を除外する戦略について述べる。さらに、このような定量的な競合的結合試験による HTS ヒット化合物の機能解析は、HTS の偽陽性化合物を排除する一般的な方法論として利用可能である点についても考察する。

第二節 HTS からの Bcl-xL/Mcl-1 二重阻害剤 **II** の発見

Bcl-xL/Mcl-1 二重阻害剤のヒット化合物の取得を目的とした HTS を実施した。スクリーニングされた約 80 万化合物の中から、**II** がその独特な化学構造と PPI 阻害剤としては小さな分子量、さらに興味深いことに Bcl-xL および Mcl-1 に対する二重阻害活性を有することから、Bcl-xL および Mcl-1 阻害剤の一次ヒット化合物として注目された (図 2-3)。**II** の阻害強度を蛍光偏光法 (FP) に基づき、プローブに対する競合的結合試験を用いて評価した。蛍光偏光法とは以下の原理である。蛍光団を有する分子に偏光した励起光を照射すると、偏光した蛍光が発せられるが、蛍光の偏光は分子の運動に依存して解消度合いに差が生じる。非結合の蛍光リガンドは分子量が小さいため、溶液中のブラウン運動により激しく回転し蛍光の偏光が解消され偏光度が低くなる。一方、リ

ガンドが受容体に結合すると見かけ上の分子量が増加し分子の運動は緩やかになるため、高い偏光度を示す。試験の結果 Bcl-xL および Mcl-1 に対する解離定数 K_i は、それぞれ 4.7 μM 、14 μM と算出された (表 2-1)。

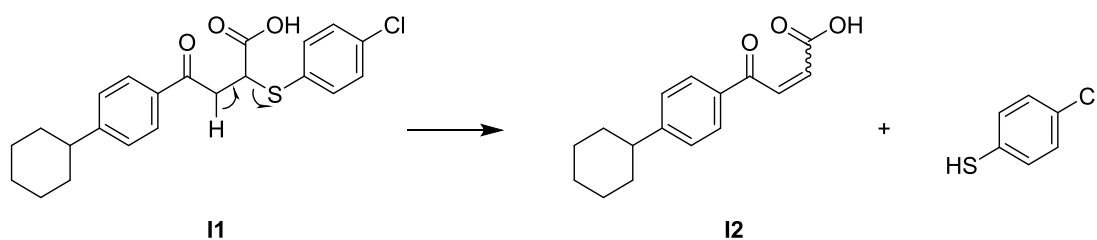


図 2-3、HTS ヒット化合物 **I1** の化学構造と分解物 **I2** 生成の可能性

I1 の矢印は逆マイケル反応による潜在的な分解経路を示す。

表 2-1、Bcl-xL/Mcl-1 二重阻害剤の解離定数 (K_i) の測定^a

	Bcl-xL (μM)		Mcl-1 (μM)	
	FP	TR-FRET	FP	TR-FRET
I1	4.7 (3.8 – 5.8)	13 (12 – 13)	14 (12 – 15)	12 (12 – 13)
I3^b		9.0 (8.6 – 9.5)		20 (19 – 21)

^a 括弧内の数値は 95% 信頼性区間を示す。

^b **I3** については第四節で述べる。

I1 は興味深いリード化合物ではあったが、 α -aryl-thio- γ -keto-4-arylbutanoic acid 基を保持しており、レトロマイケル反応を介してマイケルアクセプターである **I2** に至る可能性を有している (図 2-3)。同様の反応による阻害剤の分解とその分解物によるタンパク質の共有結合的修飾が、アルデヒドデヒドロゲナーゼ阻害剤で報告されている (図 2-4A)⁶³。この例では、元の化合物が酵素に媒介されるレトロマイケル反応を受ける (図 2-4B)。

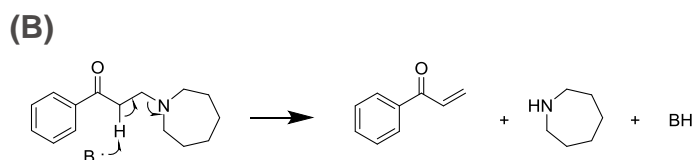
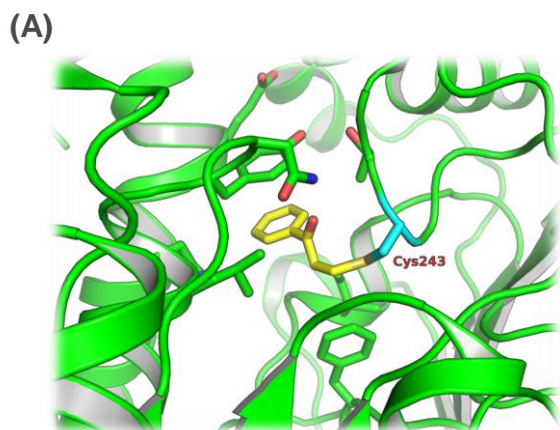


図 2-4、アルデヒドデヒドロゲナーゼ阻害剤のレトロマイケル反応分解物による共有結合阻害

(A) アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH3A1) とレトロマイケル反応分解物の結晶構造。分解物はマイケル付加反応で活性中心に存在する Cys-243 に共有結合している。座標ファイルは、蛋白質構造データバンクの PDB code; 3SZB を使用し、Pymol 1.4.1 を用いて描画した。(B) 予想される化合物のレトロマイケル反応によるマイケルアクセプター分解物の生成の模式図。参考文献、63 より改変。

同様に **II** も、分解物である **I2** を介した共有結合修飾により Bcl-xL および Mcl-1 を阻害している可能性が考えられる。実際、共有結合性の可能性のある骨格を有する Mcl-1 阻害剤が報告されていることから⁶⁴、**II** が共有結合を介した阻害剤ではないことを確認することは、化合物の構造最適化を開始する以前の重要事項である。共有結合性阻害は生体での強い薬理活性や長い薬効持続等を含めて多くの望ましい性質を有するものの^{65,66}、同時に反応性残基への修飾を通じて非選択的な阻害の可能性もある。その結果として共有結合を介したタンパク質付加物による免疫原性から、アレルギーや薬物過敏症を惹起する懸念を有している^{65,67}。それゆえ、共有結合修飾の潜在性を有する化合物は構造最適化のリード化合物としては避けるべきだとの考え方が一般的である。一方で、も

し **I1** が **I2** を介した不可逆性阻害剤であった場合、これら化合物の最適化研究における定量的な活性指標は可逆性結合プローブに対する競合的結合試験の IC_{50} ではなく k_{inact}/K_I であり、 IC_{50} の場合とは異なる算出方法の設定が必要になる。そのため、いずれの場合でもヒット化合物の作用機序を事前に解析しておく必要がある。

第三節 競合的結合試験を用いた **I1** の結合作用機序解析

I1 の **I2** を介した共有結合性の可能性を検証するために、**I1** の Bcl-xL/Mcl-1 に対する結合作用機序を解析した。まず結合作用機序解析のためのプローブに対する定量的な競合的結合試験として、Bcl-xL/Mcl-1 の両タンパク質に結合する Bid (BH3 interacting domain death agonist protein、図 2 - 2) タンパク質由来のペプチドを用いて、Bcl-xL - Bid 間および Mcl-1 - Bid 間の PPI 評価系を構築した。アッセイは蛍光ラベルした Bid ペプチド (F-Bid) を用いた TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動) 原理を元に構築した。本手法は時間分解蛍光と蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) とを組み合わせた測定法である。ドナー蛍光とアクセプター蛍光の距離が近接すれば、ドナーが発した光エネルギーをアクセプターが吸収することでアクセプターが蛍光を発する。しかし通常の FRET 法とは異なり、ドナー蛍光として蛍光寿命が非常に長いテルビウムを用いることで、化合物等の蛍光が消光した後の測定が可能になる⁶⁸。その結果、バックグラウンドを抑えた高感度の FRET 測定が可能である。さらに、本手法は経時的な測定が可能であり、また蛍光偏光法とは異なり幅広いリガンド濃度域において安定的な評価が可能である。

K_d 濃度の F-Bid プローブ (Bcl-xL; 10 nM、Mcl-1; 35 nM) に対して実施した TR-FRET 法の競合的結合試験において、**I1** は Bcl-xL および Mcl-1 に対してそれぞれ $K_i = 13 \mu\text{M}$ および $12 \mu\text{M}$ とほぼ同等の結合活性を有することが明らかになった (表 2 - 1)。本結果は蛍光偏光 (FP) アッセイの結果と同程度の活性値

を示していることから、TR-FRET 原理に基づくプローブに対する競合的結合試験が正確に構築できていることを示唆している。以下の試験では、本アッセイを用いて **I1** の評価を実施した。

不可逆性阻害剤の特徴として、その標的タンパク質に対してインキュベーション時間を長くする毎に阻害活性が増強するということが挙げられる。**I1** の共有結合を介した不可逆阻害の可能性を検証するために、Bcl-xL 阻害の時間依存性を TR-FRET 法の競合的結合試験を用いて検証した。Bcl-xL に対する 30 分と 120 分反応の IC_{50} 値は $18 \mu\text{M}$ および $19 \mu\text{M}$ と実験誤差の範囲内で同一であった (図 2-5)。**I1** は時間依存的阻害を示さないことから、この結果は **I1** が可逆的に Bcl-xL および Mcl-1 を阻害していることを示唆している。

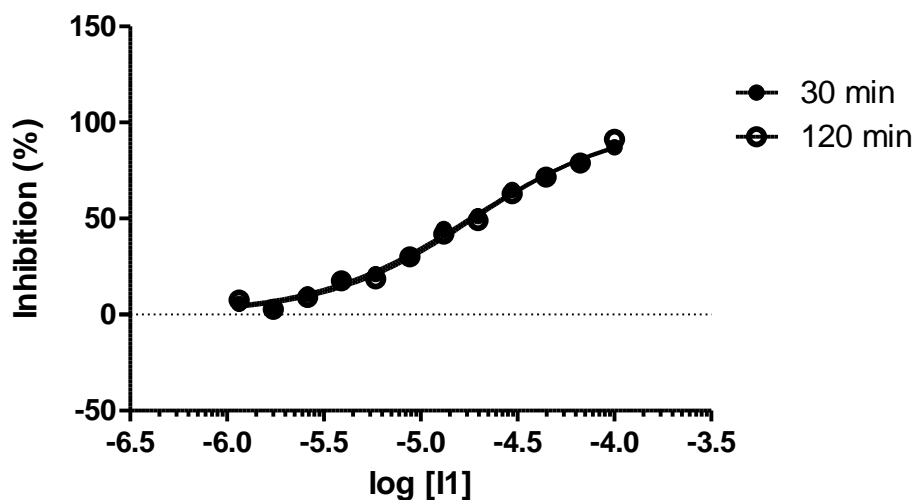


図 2-5、**I1** の Bcl-xL 阻害におけるインキュベーション時間依存性

I1 による Bcl-xL 阻害活性を GST-Bcl-xL 添加後 30 分 (●) および 120 分 (○) に測定した。10 nM の F-Bid、1.0 nM の Tb 抗 GST 抗体、2.0 nM の GST-Bcl-xL 条件下において、様々な濃度の **I1** 存在下における FRET 比率を測定した。得られたデータにシグモイド曲線をフィッティングすることで IC_{50} を算出した。各データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 4$) で表示している。

さらに **II** が共有結合的阻害ではないことを確認する目的で、**II** の Bcl-xL に対する結合が F-Bid に対して拮抗的であるかどうかを検証した^{9, 69, 70}。阻害剤の結合が可逆的であつプローブと拮抗すれば、平衡状態において拮抗的阻害様式、すなわちプローブは阻害剤濃度に応じた見かけの K_d の減弱と、阻害剤濃度によらない同一の見かけの B_{max} を示す。一方で、共有結合を介した不可逆性阻害剤は、前平衡状態では拮抗するプローブ濃度に応じて不可逆性阻害速度が遅くなるが、平衡状態に達するとプローブ濃度に依らずにすべての標的タンパク質を占有するため、阻害はプローブに対して非拮抗阻害様の挙動を示す。以上の通り、F-Bid に対する拮抗性から **II** の可逆性を判定可能である。

TR-FRET 結合試験を用いて、F-Bid の Bcl-xL への飽和的結合を様々な濃度の **II** 存在下で測定した (図 2 - 6)。F-Bid の見かけの K_d 値は **II** 濃度と共に直線的に増大したが ($R^2 = 0.99$)、 B_{max} はほぼ不変であった。これらの結果は、**II** の F-Bid に対する拮抗的阻害メカニズム、すなわち **II** の F-Bid に対し拮抗的であつ可逆的な結合を示しており、それはすなわち **II** の非共有結合的な阻害を示唆している。上記の結合曲線のグローバルフィッティングから、**II** の K_i 値は $12 \pm 1.0 \mu\text{M}$ と算出され、これまで示した結果と良好な一致を見せた。

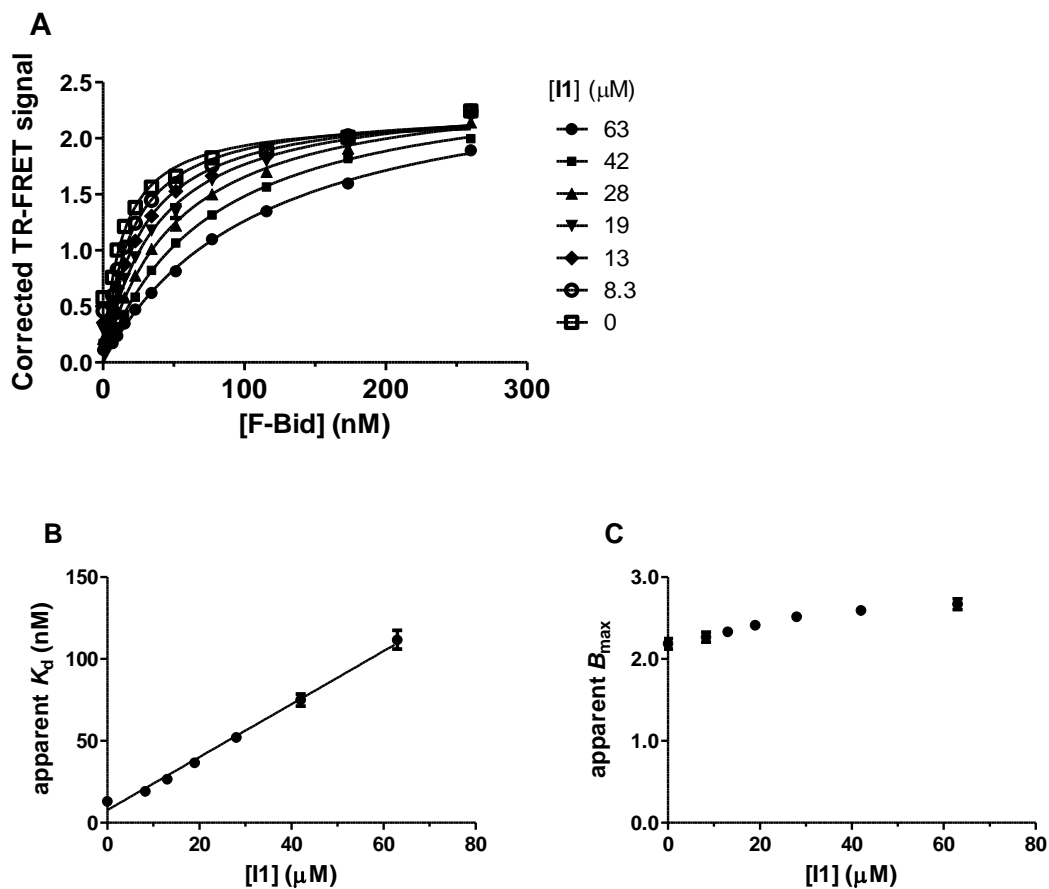


図 2-6、様々な濃度の **I1** 存在下における F-Bid の Bcl-xL に対する飽和結合実験

(A) 様々な濃度の **I1** 存在下における F-Bid と Bcl-xL の相互作用の飽和プロット。TR-FRET アッセイは、1.0 nM の Tb 抗 GST 抗体、2.0 nM の GST-Bcl-xL と以下の濃度の **I1** において実施した: (●) 63 μM 、(■) 42 μM 、(▲) 28 μM 、(▼) 19 μM 、(◆) 13 μM 、(○) 8.3 μM および (□) 0 μM 。非特異的結合を除外するために、FRET シグナルを方法に記載した通りに補正し、F-Bid 濃度に対してプロットした。各 **I1** 濃度における見かけの K_d 値および最大の FRET 比 (B_{max}) は特異的結合モデルを用いて算出した。各データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 4$) で表示している。(B および C) 様々な濃度の **I1** 存在下で求めた、見かけの K_d (B) および B_{max} (C) 値のリプロット。グラフ中のエラーバーはフィッティング解析から算出された標準誤差を表す。

第四節 分解経路を有さない構造類縁体 **I3** による阻害確認

I1 の結合作用機序の解析から、**I1** の共有結合阻害の可能性が除外できていることを確認するために、**I1** の構造類縁体でマイケルアクセプターへの分解経路を持たない **I3** を合成した (図 2-7)。TR-FRET 法による F-Bid に対する競合的結合試験を用いて、**I3** の PPI 阻害を評価した。 K_d 濃度の F-Bid に対する競合的結合試験において、**I3** は Bcl-xL 及び Mcl-1 に対しそれぞれ $9.0 \mu\text{M}$ および $20 \mu\text{M}$ の K_i 値で結合していることが示され (表 2-1)、**I3** は元の化合物 **I1** と同程度の阻害活性を保持していることが明らかになった。以上の結果から、**I1** の非共有結合阻害が支持された。あわせて、**I3** は **I1** と同様の結合モード、すなわち **I1** と **I3** に共通した官能値による可逆的相互作用により Bcl-xL および Mcl-1 に結合していることが示唆された。

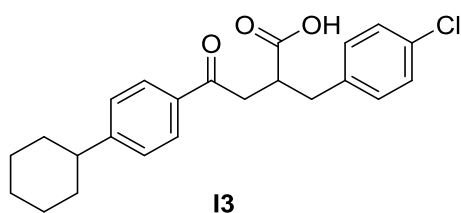


図 2-7、**I2** への分解経路を持たない **I3** のデザイン

第五節 考察

本研究で見出された **I1** はその構造からレトロマイケル反応によるマイケルアクセプター **I2** への分解が当初懸念された。しかし本研究から **I1** は F-Bid と拮抗的で結合が迅速に平衡に達する可逆的阻害剤であることが示唆された。以上から、**I1** および **I3** の最適化研究においては活性評価指標として通常の可逆性プローブに対する競合的結合試験の IC_{50} を用いた評価が適している。**I1** は、その化学構造の新規性、PPI 阻害剤としては小さな分子量、さらに Bcl-xL/Mcl-1 の両タンパク質に対する二重阻害活性から、Bcl-xL/Mcl-1 阻害剤のリード最適化における興味深い出発点であると言える。

I1 は F-Bid に対して拮抗的に挙動したが、その結合サイトの未同定のままである。**I1**、**I3** およびその周辺化合物と Bcl-xL/Mcl-1 との X 線共結晶構造解析を実施したが現時点まで構造決定には至っておらず、結合サイトおよび結合モードの同定は今後の課題である。

PPI は創薬研究の重要な標的であるが、PPI を阻害する低分子を HTS から発見することは困難である。その主な理由は、HTS の一次ヒット中に高頻度で偽陽性化合物が存在するため、真の阻害剤の選抜に大きな労力が伴うことである。本研究では、Bcl-xL/Mcl-1 阻害剤のヒット化合物取得に際し、共有結合性阻害剤を他のタンパク質失活剤などの偽陽性化合物と共に除外する戦略を採用した。そのため、評価化合物の阻害が時間依存的でないこと、標識プローブに対して拮抗的であることから、その非共有結合性を確認した。

時間依存的な阻害は、不可逆性阻害剤だけではなく、遅い解離速度を示す非共有結合性のスローバインディング阻害剤によっても示されることは考慮しておく必要がある。それゆえ、評価化合物が時間依存的な阻害を示した場合には、非常に望ましいスローバインディング阻害剤を除外してしまわないよう、例えば第一章で示した希釈実験などにより阻害剤の可逆性を精査しておくべきである。

標識プローブとの拮抗性に基づいたヒット化合物からの偽陽性を排除する戦略では、拮抗的阻害を示さないアロステリック型 PPI 阻害剤のヒット化合物を逃してしまう懸念がある。しかしながら、アロステリック阻害剤は目的としない PPI を阻害してしまう可能性があるため、アロステリック阻害剤よりも PPI 境界面に結合する拮抗的阻害剤の方が創薬研究にはより適していると考えられる。多くのタンパク質は一つ以上のパートナータンパク質と作用していることが知られている⁶⁷。アロステリック阻害は、コンフォメーション変化により阻害を引き起こすので^{71,72}、アロステリック PPI 阻害は目的外の PPI 阻害を引き起こしうる。これは PPI 阻害の選択性の欠如に繋がり、結果的に予期せぬ生物現象 (副作用) を引き起こす懸念がある。

F-Bid プローブに対する競合的結合試験の構築には、TR-FRET 技術を採用した。他の生化学的試験法と比較して本アッセイの利点は、第三節で述べたものに加えて、少なくとも以下の二つが挙げられる。まず一つ目に、本技術を用いたアッセイは構築が容易で、抗体または化学修飾で目的のタンパク質を蛍光標識可能でありさえすれば不溶性の膜タンパク質を含めた多くのタンパク質の PPI の検出に幅広く適応可能である点である。二つ目に、高感度かつ安定的なアッセイであることから (Bcl-xL; S/B = 28, Z' factor = 0.90、Mcl-1; S/B = 23, Z' factor = 0.86)、低ナノモル濃度のタンパク質でアッセイが成立するため、少ないタンパク質消費と非常に強力な阻害剤の定量的な評価を可能にし⁷³、さらにアッセイは高密度ウェルプレートフォーマット (1536 ウェルプレート) への微量化も理論上可能である点が挙げられる。

多数の偽陽性化合物が存在する HTS の一次ヒットから真の阻害剤を選抜するには、良好な処理能力を有する安定的な二次アッセイが必要になるが、必要とされる処理能力は生物物理学的分析法の処理能力を超えることが多い。本研究で示したとおり、迅速に平衡に達しかつプローブと拮抗的で可逆的な結合性を確認することは、不可逆性阻害の可能性を高い処理能力で除外する簡単な手法である。生物物理学的分析法に対する本手法の利点には、優れた処理能力以外に、アッセイの容易さ、材料消費量の少なさ、さらに上述の通り不溶性のタンパク質への適用が挙げられる。このように、プローブに対する定量的な競合的結合試験を用いて HTS からの多数のヒット化合物の結合作用機序を明らかにすることは、生物物理学的分析法と相補的な手法に、また少なくとも生物物理学的分析法に供する化合物の絞込み手法として機能するはずである。

まとめると、プローブに対する定量的な競合的結合試験を用いて、時間依存性の阻害を示さずかつプローブ拮抗的な可逆的な結合を確認することは、共有結合阻害剤を含む偽陽性化合物の可能性を除外する簡便な手法である。このような HTS ヒット化合物の標的タンパク質への作用機序解析は、生物物理学的分析

法の短所を相補し、また他の標的分子にも広く適応可能であることから、創薬研究において重要な解析法であると考えられる。

第六節 材料と方法

材料

ヒト Bcl-xL および Mcl-1 をコードする cDNA 断片は PCR で増幅し、N 末グルタチオン S トランスフェラーゼ (glutathione S transferase; GST) タグ付加タンパク質として発現するため pGEX-6P-1 (GE Healthcare) に挿入した。組換え GST 付加 Bcl-xL (1-209) および Mcl-1 (1-319) タンパク質は大腸菌 BL21 (DE3) で発現し、以前に報告された方法に従いアフィニティークロマトグラフィー法を用いて精製した⁷⁴。その後、ゲルろ過クロマトグラフィー法によりさらに精製を行った。取得されたタンパク質は使用まで -80°C で保存した。

Fluorescein isothiocyanate (FITC) ラベル Bid ペプチド (F-Bid: FITC-Ahx-EDIIRNIARHLAQVGDSMDR-OH) はスクラム社で合成された。本ペプチドは DMSO に溶解し使用まで -30°C で保存した。F-Bid 濃度は FITC の 495 nm の吸光度で、モル吸光係数 $70,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて決定した。テルビウムラベル抗 GST 抗体 (Tb 抗 GST 抗体) および D-PBS は Life Technologies より購入した。I1 は G&J Research Chemicals より購入した。Tween-20 は Bio-Rad より購入した。他の試薬は和光純薬工業より購入した。全てのアッセイは 0.01% (w/v) Tween-20 および 1.0 mM DTT を含む D-PBS バッファーを用いて実施した。

蛍光偏光アッセイ

蛍光偏光アッセイは 384 ウェル黒色平底プレート (Greiner Bio-One) を用いて、15 μL の液量で実施した。蛍光偏光は、ミリ偏光単位 (mP) でエンビジョンマイクロプレートリーダー (Perkin Elmer) を用いて測定した。F-Bid の Bcl-xL または Mcl-1 に対する解離定数 K_d の測定には、10 nM の F-Bid と複数濃度の Bcl-xL または Mcl-1 をアッセイバッファーに混合し、室温で 2 時間インキュベーションした後、蛍光偏光を測定した。I1 の Bcl-xL および Mcl-1 に対する

阻害活性の測定は、それぞれ 40 nM、190 nM、10 nM の Bcl-xL、Mcl-1、F-Bid を用いて測定した。室温で 2 時間インキュベーションした後、それぞれの化合物濃度における蛍光偏光を測定した。

TR-FRET アッセイ

TR-FRET 測定は、384 ウェル白色平底プレート (Greiner Bio-One) を用いて、14 μ L の液量で実施した。FRET シグナルはエンビジョンマイクロプレートリーダーを用いて測定した。F-Bid を蛍光プローブとして用いた TR-FRET アッセイは以下のとおり実施した。F-Bid の GST-Bcl-xL または GST-Mcl-1 に対する解離定数を算出するために、1.0 nM Tb 抗 GST 抗体と 2.0 nM GST-Bcl-xL または 2.0 nM GST-Mcl-1 を含む溶液に複数濃度の F-Bid を添加した。GST-Bcl-xL または GST-Mcl-1 存在下および非存在下のシグナルを、全 TR-FRET シグナルおよび非特異的 TR-FRET シグナルとして算出した。プレートは室温で 2 時間インキュベーションして TR-FRET シグナルを測定し、全シグナルから非特異的シグナルを引くことで特異的な TR-FRET シグナルを算出した。

Bcl-xL からの F-Bid の置換を測定するために、Tb 抗 GST 抗体と GST-Bcl-xL を少なくとも 1 時間以上インキュベーションした。混合液を F-Bid および様々な濃度の阻害剤を含む溶液に添加した。Tb 抗 GST 抗体、GST-Bcl-xL および F-Bid の終濃度は、それぞれ 1.0 nM、2.0 nM、10 nM である。プレートを 2 時間室温でインキュベーションした後、それぞれのウェルの TR-FRET シグナルを測定した。Mcl-1 に対する阻害活性も同様の方法で測定し、Tb 抗 GST 抗体、GST-Mcl-1、F-Bid 濃度はそれぞれ 1.0 nM、1.2 nM、35 nM で測定した。

データ解析

蛍光偏光および TR-FRET アッセイの両方において、Bcl-xL および Mcl-1 の非結合画分は下記の数式に従って算出した。 T はテスト化合物を含むウェル、 μ_{c1} および μ_{c2} はそれぞれ 0% and 100% 阻害コントロールウェルの値。

$$\text{非結合画分 (\%)} = 100 \times (\mu_{c1} - T) / (\mu_{c1} - \mu_{c2})$$

0% および 100% コントロールの値はそれぞれタンパク質の存在下および非存在下のシグナルである。データ解析は GraphPad Prism 5 ソフトウェアを用いて実施した。解離定数 K_d は下記の数式を用いて算出した。

$$\text{FP (mP)} = \frac{([\text{Protein}] + [\text{F-Bid}] + K_d) - \sqrt{([\text{Protein}] + [\text{F-Bid}] + K_d)^2 - 4[\text{Protein}][\text{F-Bid}]}}{2} + \text{background}$$

ここで [Protein] は Bcl-xL または Mcl-1 を、[F-Bid] は F-Bid 濃度を示す。 IC_{50} 値はシグモイド用量反応曲線にフィットすることで算出した。その後、 IC_{50} 値はチェン=プルソフ式を用いて K_i に変換された。全てのデータは $n = 4$ の平均値 \pm 標準誤差で表示している。

化合物 13 の合成

A) Diethyl 2-(4-chlorobenzyl)-2-(2-(4-cyclohexylphenyl)-2-oxoethyl)malonate

diethyl 2-(4-chlorobenzyl)malonate (1.12 g, 3.93 mmol) の無水 N,N-ジメチルホルムアミド (20 mL) 溶液に、水素化ナトリウム (189 mg, 4.73 mmol, 60% 油状物) を 0°C において加えた。得られた混合物を窒素雰囲気下、70°C において 1 時間攪拌した。室温まで冷却した後、2-bromo-1-(4-cyclohexylphenyl)ethanone (1.10 g, 3.93 mmol) とヨウ化ナトリウム (589 mg, 3.93 mmol) を加えた。そのまま 25°C で、窒素雰囲気下 12 時間攪拌した後、水 (20 mL) を加えた。酢酸エチル (50 mL) で 3 回抽出した後、得られた有機層を水 (40 mL) で 2 回、飽和食塩水 (40 mL) で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下で溶媒を留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (石油エーテ

ル：酢酸エチル = 30 : 1) で精製し、当該化合物 (1.49g、79%) を黄色の油状物として得た。

¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄): δ 1.24 (6H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.29–1.58 (5H, m), 1.74–1.93 (5H, m), 2.52–2.69 (1H, m), 3.45 (2H, s), 3.53 (2H, s), 4.15–4.26 (4H, m), 6.97 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.21 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.36 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.85 (2H, d, *J* = 8.4 Hz).

B) 2-(4-Chlorobenzyl)-2-(2-(4-cyclohexylphenyl)-2-oxoethyl)malonic acid

diethyl 2-(4-chlorobenzyl)-2-(2-(4-cyclohexylphenyl)-2-oxoethyl)malonate (1.49 g, 3.07 mmol)、テトラヒドロフラン (8 mL)、水 (8 mL)、エタノール (8 mL) 混合物に、4 M 水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL) を加えた。得られた混合物を 30°C で 12 時間攪拌したのち、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣に水 (30 mL) を加えた後、pH 4 になるまで 5% 塩酸を加えた。析出した固体を濾取した後、酢酸エチル (20 mL) で洗浄し当該化合物 (960 mg、73%) を白色の固体として得た。

¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄): δ 1.29–1.52 (5H, m), 1.74–1.91 (5H, m), 2.56–2.65 (1H, m), 3.41 (2H, s), 3.56 (2H, s), 7.03 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.21 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.34 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.85 (2H, d, *J* = 8.4 Hz). 二つのプロトン (COOH × 2) は NMR で検出されなかった。

C) 2-(4-Chlorobenzyl)-4-(4-cyclohexylphenyl)-4-oxobutanoic acid (I3)

2-(4-Chlorobenzyl)-2-(2-(4-cyclohexylphenyl)-2-oxoethyl)malonic acid (960 mg, 2.24 mmol) を窒素雰囲気下、145 度で 20 分攪拌した。室温に戻した後、ジクロロエタン (50 mL) を加えた。得られた溶液を飽和食塩水 (40 mL) で 2 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残

渣を分取 HPLC (0.1% トリフルオロ酢酸/アセトニトリル) で精製し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を凍結乾燥し当該化合物 (411 mg、48%) を白色の固体として得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.19-1.49 (5H, m), 1.67-1.84 (5H, m), 2.52-2.62 (1H, m), 2.79-2.88 (1H, m), 2.90-3.03 (2H, m), 3.07-3.18 (1H, m), 3.29-3.32 (1H, m), 7.27 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.30-7.41 (4H, m), 7.85 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 12.29 (1H, brs).
純度: 100 % (HPLC)。

第三章 エンドポイントの競合的結合試験を用いた不可逆性阻害剤の活性指標 k_{inact}/K_I の迅速な決定法の開発

第一節 背景、目的

薬物の生体内での薬効の発揮には、薬物が標的タンパク質と強力かつ持続的に相互作用することが極めて重要である⁹。共有結合を介した不可逆性阻害は、阻害からの回復には標的タンパク質の再合成を必要とすることから、強力かつ持続的な阻害を達成するための最も強力な戦略であることはほぼ間違いない⁶⁶。ペニシリンやアスピリンは不可逆性阻害薬の古くからの例であり、さらに最近になって、オメプラゾール、クロピドグレル、アフアチニブ等が FDA 承認薬に加わっている (図 3-1)。これらの不可逆性阻害薬の成功は製薬業界の大きな注目を集めている。

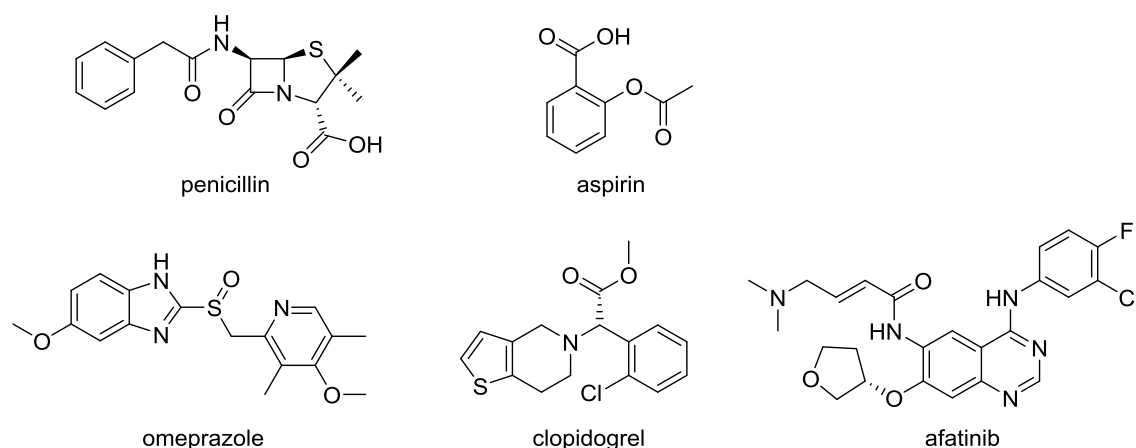


図 3-1、臨床で使われる不可逆性阻害薬の例

これらの不可逆性阻害薬の阻害機構は次のとおりである。ペニシリンは D-Ala-D-Ala カルボキシペプチダーゼ／トランスペプチダーゼに基質アナログとして取り込まれ β ラクタムのカルボニル炭素と活性中心のセリン残基とが共有結合するが、以後の反応を受けにくい非常に安定な中間体を形成するため同酵素を不可逆的に阻害する。アスピリンはシクロオキシゲナーゼの活性部位に結合した後、アセチル基をセリンのヒドロキシル基に転移し、酵素を不可逆

的に阻害する。オメプラゾールは、胃酸による酸性条件下での分子内転位により活性本体を生じ、 $H^+/K^+-ATPase$ のシステイン残基とジスルフィド結合を形成して、同酵素を不可逆的に阻害する。クロピドグレルは肝臓に存在する CYP2C19 等の酸化酵素により活性化を受けチオール基を有する活性本体を生じ、P2 プリン受容体 P2Y12 のシステイン残基とジスルフィド結合を形成することで受容体を不可逆的に阻害する。アファチニブは上皮成長因子受容体 EGFR の kinase ドメインの ATP 結合サイトに結合し、その近傍に存在するシステインと共有結合を形成することで不可逆性を発揮する⁶⁶。

可逆性阻害剤のリード創出では、阻害強度の評価に可逆性結合リガンド (基質またはプローブ) に対する競合試験など生化学アッセイの IC_{50} が共通して用いられている。チェン=プルソフ式の利用により、 IC_{50} は阻害強度の定量的な評価指標である阻害剤の解離定数 K_I に変換可能である¹¹。しかし残念ながら、 IC_{50} は時間依存性阻害を示す評価化合物、特に不可逆性阻害剤の阻害活性の定量評価には不十分な評価指標である⁶⁶。十分な時間において、不可逆性阻害剤の IC_{50} はもはや阻害強度を示さず、代わりにアッセイに用いられる酵素濃度を測定していることになる。不可逆性阻害剤の定量的評価指標は $k_{inact}/K_I (M^{-1}s^{-1})$ であり、酵素反応の特異性定数 k_{cat}/K_m に相当する標的タンパク質不活性化の二次の速度定数である⁶⁶。しかし不可逆性阻害剤の k_{inact}/K_I の算出は、酵素反応のプログレスカーブ等の速度論的測定と複雑なカーブフィッティングやリプロットによるパラメーター算出が必要であり、可逆性阻害剤の IC_{50} 測定の簡単さと比較して相当な手間を要する (図 3-2)。

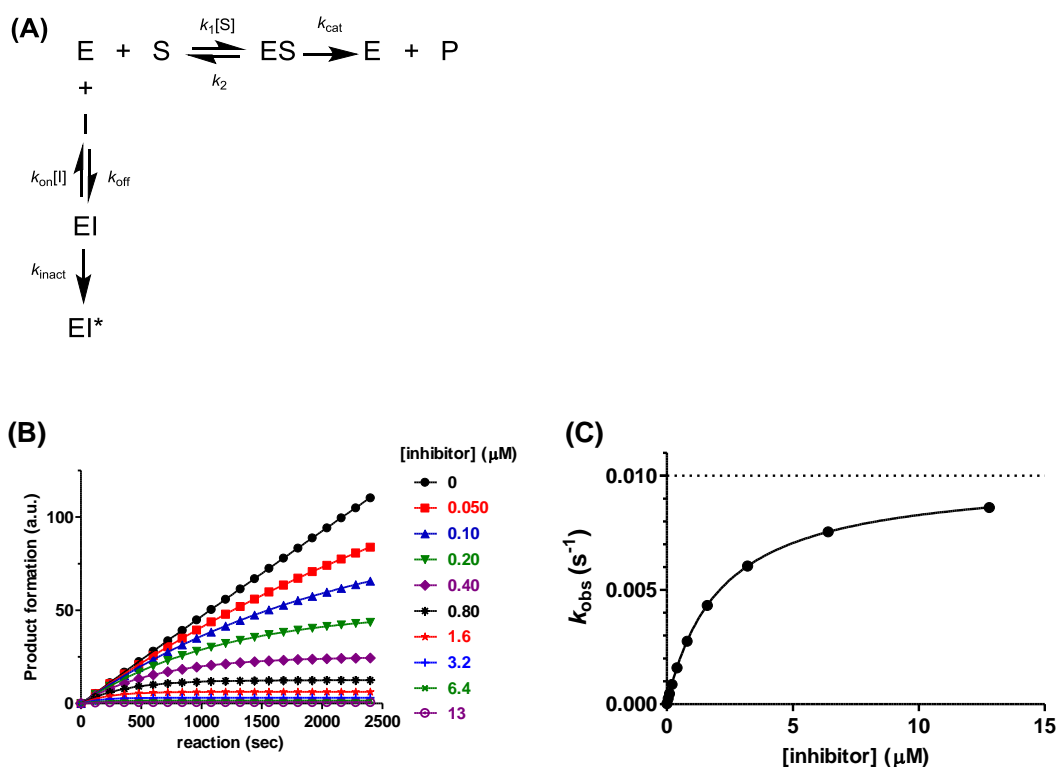


図 3-2、酵素反応を用いた従来法による不可逆性酵素阻害剤の k_{inact}/K_I の算出例

(A) 二段階の不可逆性阻害剤を酵素反応を用いて評価する際のスキーム。(B) 酵素反応のプログレスカーブ解析による不可逆性阻害剤の評価。 $k_1 = 1.0 \times 10^5$ 、 $k_2 = 1.0 \times 10^{-1}$ 、 $k_3 = 1.0 \times 10^{-2}$ 、 $k_{on} = 1.0 \times 10^5$ 、 $k_{off} = 1.0 \times 10^{-1}$ 、 $k_{inact} = 1.0 \times 10^{-2}$ に設定し、 $[E] = 10 \text{ nM}$ 、 $[S] = 1.0 \text{ } \mu\text{M}$ およびグラフに示した各阻害剤濃度の条件下で KinTek Global Kinetic Explorer を用いてデータを発生させた。データは $[P] = v_{initial}/k_{obs}(1 - \exp(-k_{obs} \cdot t))$ を用いてフィットした。ただし、 k_{obs} は不活性化の見かけの速度定数を示す。(C) (B) のフィッティングから得られた k_{obs} の阻害剤濃度に対するリプロット。データは $k_{obs} = k_{inact}[I]/(K_I + [I])$ を用いてフィットした。阻害剤濃度を無限大にした際の k_{obs} の最大値が k_{inact} 、 k_{inact} の半分の値を与える阻害剤濃度が K_I として算出される⁹。

最近、Krippendorff らが酵素反応を用いて不可逆性阻害薬を評価し、複数の時間で測定した IC_{50} から k_{inact} および K_I を独立に算出する解析手法を報告した⁷⁵。本手法は二段階反応の不可逆性阻害剤を拮抗的な基質を用いた酵素反応で評価し、その IC_{50} を複数時間点で測定する。得られた IC_{50} を測定時間に対して再プロットし、エクスポネンシャルを含む関数を用いてフィットすることで k_{inact} および K_I を算出する手法である。この手法は IC_{50} 測定のスクリーニング

方法論がそのまま適応可能なため、従来のプログレスカーブによる速度論的解析と比較すると確かにより簡便で迅速な方法である。しかし、本手法の適応範囲は酵素活性を有するターゲットに限定され、また依然として複数時間点での測定が必要なうえ、エクスポネンシャルを含む複雑なカーブフィッティングを必要とする。実際に本論文では、 k_{inact} および K_{I} 値の概算値を得るために 1 化合物あたり少なくとも 4 つの異なる時間での IC_{50} から k_{inact} および K_{I} 値を算出している。不可逆性阻害剤の創薬研究のリード化合物創出では多数の阻害剤の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の定量的評価が決定的に重要であるため、より効率的な評価法が必要である。

この問題を解決するために、本研究では不可逆性プローブを用いた競合的結合試験から $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を迅速に算出するための新規な手法を開発することを目指した。開発した手法ではチェン=プルソフ式に類似したシンプルな関係式を用いて、 $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ が典型的なエンドポイントの競合的結合試験の IC_{50} 測定から決定できる。本手法は可逆性阻害剤の最適化で汎用的に用いられる従来の生化学アッセイの IC_{50} 評価のハードウェアとソフトウェアをそのまま応用可能である。本章では、本手法の開発だけでなくその理論の背景を提示し、実験とシミュレーションを用いて理論の妥当性について検証する。

第二節 不可逆性プローブを用いた競合的結合試験による $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 算出

本研究では、一般によく見られる二つの不可逆性阻害の反応機構を取り上げる (図 3-3)。本論文の表記では、R と I はそれぞれ薬物の受容体 (または酵素) と不可逆性阻害剤を表す。メカニズム A は一段階の不可逆性阻害を表す。このメカニズムにおいては、阻害剤濃度が増加しても不活性化速度は飽和せずに直線的に増加する。メカニズム B は二段階の反応であり、阻害剤は受容体と最終的な共有結合付加体 (RI*) を形成する前に、初めのステップにおいて可逆的な複合体 (RI) を形成する。そのためメカニズム B では阻害剤濃度が増加するにつれ、不活性化速度は徐々に飽和する (図 3-2C)。これらの不可逆性阻害の二

つの機構の不活性化の速度定数 (単位、 $M^{-1}s^{-1}$) はそれぞれ k_{chem} と $k_{inact}/K_I = k_{on} \times k_{inact}/(k_{off} + k_{inact})$ である¹⁵。ただし、 k_{on} は結合速度定数 (単位、 $M^{-1}s^{-1}$)、 k_{off} は解離速度定数 (単位、 s^{-1})、 k_{inact} は二段階反応の最大不活性化速度定数 (単位、 s^{-1})、 K_I は k_{inact} の半分の値を与える阻害剤濃度 (単位、 M) であり $K_I = (k_{on} + k_{inact})/k_{off}$ である。

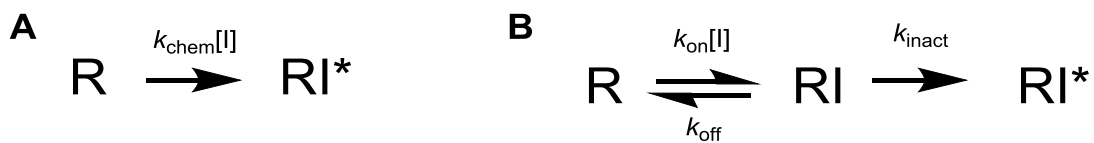


図 3-3、一段階 (A) および二段階 (B) の不可逆性阻害の反応スキーム

アスタリスク (*) は共有結合形成した受容体を示す。R = 薬物受容体、I = 不可逆性阻害剤を示す。

本論文では次のようなモデルを考える；不可逆性のプローブ (P) が薬物受容体 (R) に結合し、かつ評価する不可逆性阻害剤と拮抗的であり、標的とする受容体と共有結合複合体 (RI*) を形成した時のみにその結合シグナルを観察できる⁷⁶。説明を簡単にするため、二段階反応の不可逆性プローブと二段階反応の不可逆性阻害剤が競合するモデルをまず考える (図 3-4)。

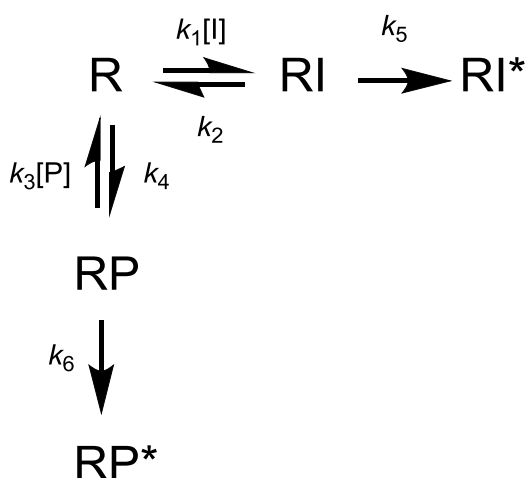


図 3-4、二段階反応のプローブと阻害剤間の競合的結合試験のスキーム

アスタリスク (*) は共有結合形成した受容体を示す。R = 薬物受容体、P = 不可逆性プローブ、I = 不可逆性阻害剤を示す。

時間 0 において、一定濃度のプローブ P と複数の異なる濃度の評価阻害剤 I を含む溶液に受容体 R を添加して、一連のアッセイを開始する。観察出来るシグナルは RP* から生じ、時間とともに増加する。このモデルの前提は以下の通りである。(1) プローブ P と阻害剤 I が不可逆的に受容体 R に結合する、(2) 両者は受容体 R に相互排他的に結合する、(3) 両者は受容体 R に 1 対 1 で結合する、(4) 受容体 R を介したリガンド (P および I) の欠乏が起こらない。この前提の元では、R、RP、RI は無限の反応時間で消失し RP* と RI* のみが残るため、無限時間後の RP* と RI* の和が時間 0 の状態に存在した全ての受容体分子 ($[R]_{total}$) に相当する。

競合的結合試験において観察されるシグナルは、 $[RP^*]_i/[RP^*]_0$ と比例する。ここで $[RP^*]_0$ と $[RP^*]_i$ はそれぞれ特定の濃度の阻害剤の非存在下または存在下の $[RP^*]$ を指す。反応終了時における $[RP^*]_0$ はすべての R がプローブにより占有されていることから $[R]_{total}$ に等しいため、反応終了時の $[RP^*]_i/[RP^*]_0$ は $[RP^*]_i/[R]_{total}$ と等しい (導出 3 - 1)。 $[RP^*]_i/[R]_{total}$ を $[I]$ の関数として表示すると binding isotherm 式すなわち IC_{50} 式が得られ、観察される競合的結合試験の IC_{50} と不可逆性阻害剤の評価指標 (k_{inact}/K_I) との関係は、次のように表される：

$$(k_{inact}/K_I)_{inhibitor} = (k_{inact}/K_I)_{probe} \times [probe] / IC_{50} \quad \text{数式 1}$$

本関係式を実際に使用する場合には、不可逆性プローブの $(k_{inact}/K_I)_{probe}$ をあらかじめ従来法の数値論的解析により決定する必要がある。この $(k_{inact}/K_I)_{probe}$ は評価化合物が存在しない条件での RP* 生成のプログレスカーブのフィッティングから決定される。同時に、この実験は RP* 生成の見かけの速度定数 k_{obs}

値を与え、その値は特定のプローブ濃度における受容体占有の半減期を決定する。プローブの受容体占有の半減期は最低限必要なアッセイの実行時間を規定するのに使われる。重要なことに、受容体占有の半減期はプローブ単独の場合と比較し、評価化合物の共存下でさらに短くなる。それゆえ、評価化合物を含まないアッセイはエンドポイントに達するのに最も時間がかかる。アッセイの感度は反応終了時に最大になる。以上から、反応終了時間をプローブ単独で 97% 以上の受容体を占有するインキュベーション時間、すなわち半減期の 5 倍に設定するのが望ましい。

第三節 不可逆性 EGFR 阻害剤を用いた理論の検証

本数式の妥当性を検証するために上皮成長受容体増殖因子 (EGFR) チロシンキナーゼの不可逆性阻害剤を用いて以下で検証した⁷⁷⁻⁸⁰ (図 3-5)。

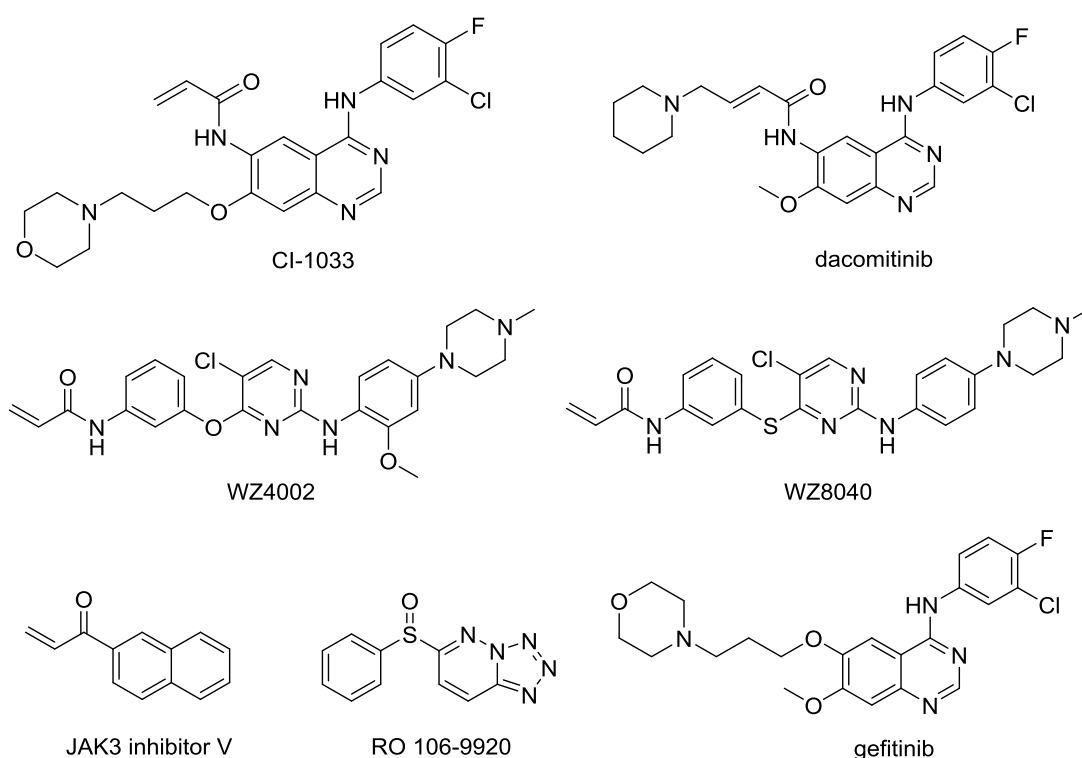


図 3-5、本研究で用いた EGFR 阻害剤

EGFR は細胞増殖、分化、生存の制御に関わっており、キナーゼの異常な活性化は様々ながんにおいて腫瘍の増殖に関与していることが示されている⁸¹。そのため抗がん薬を目指して、EGFR に対して複数の不可逆性阻害剤が合成されている。そのうちの 1 つである CI-1033 のトリチウム標識体 [³H]CI-1033 を EGFR に対する不可逆性プローブとして採用した (図 3-5)。CI-1033 は EGFR の ATP ポケットに結合し、反応性官能基のアクリルアミドと Cys-797 間でマイケル付加を介した共有結合を形成する⁸² (図 3-6)。

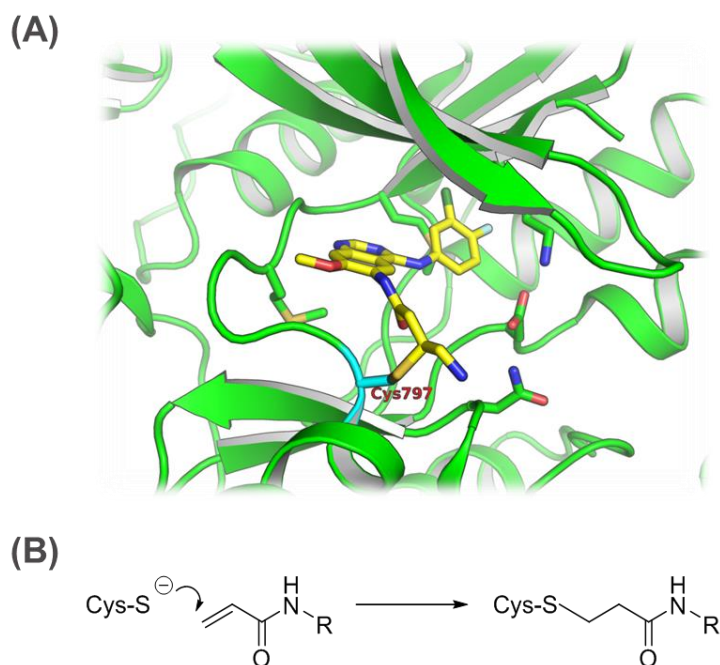


図 3-6、EGFR 阻害剤によるマイケル付加反応による共有結合形成

(A) EGFR 阻害剤 dacominitib の EGFR (T790M 変異体) の Cys-797 への共有結合形成。座標ファイルは、蛋白質構造データバンクの PDB code; 4I24 をそれぞれ使用し、Pymol 1.4.1 を用いて描画した。(B) 阻害剤の Cys 残基への共有結合の反応模式図。

まず、[³H]CI-1033 が本数式の導出の前提を満たすかどうかを検証するため、[³H]CI-1033 をリガンドにしたフィルター結合試験系を構築した。[³H]CI-1033 と EGFR 酵素をインキュベーション後、アセトン添加により酵素が失活しかつ凝集することでフィルターへの吸着を可能にした。アセトンの添加により酵素

の三次元構造は失われるため $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ と共有結合を形成しない PR の酵素種はシグナルとして観察されず、共有結合的に結合した RP^* の酵素種のみを観察することが可能になる。この条件で RP^* 生成を経時的に観察したところ時間依存的なシグナルの増加が観察され、一相のエクスポネンシャル曲線による良好なフィットを見せた。これは測定した条件における $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の EGFR への 1 対 1 結合を示唆している (図 3-7)。PR* 生成のプログレスカーブのフィッティング解析から $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ は $3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定された。続いて、 $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ と EGFR の希釈実験を大過剰 ($10 \mu\text{M}$) の非標識 CI-1033 添加により実施したところ、 $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の不可逆的結合が確認された (図 3-8)。以上から $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ は上記で提示した数式の導出の前提を満たすことが確認され、数式 1 の妥当性の検証に適した競合プローブであることが証明された。

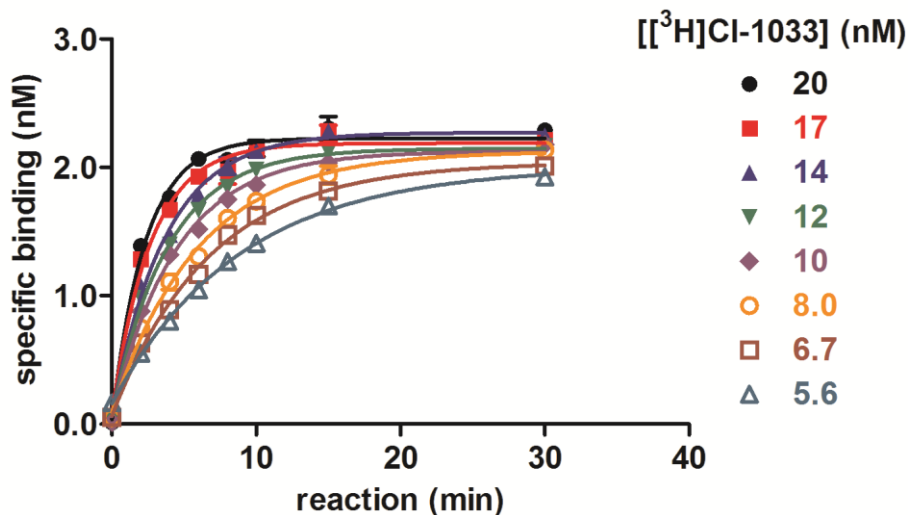


図 3-7、 $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の EGFR への結合の経時変化

様々な濃度の $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ による PR^* 形成のプログレスカーブ。試験は 2.0 nM の EGFR 酵素を用いて実施した。特異的結合は実験項に記載した方法で補正しインキュベーション時間に対してプロットした。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) で表示している。

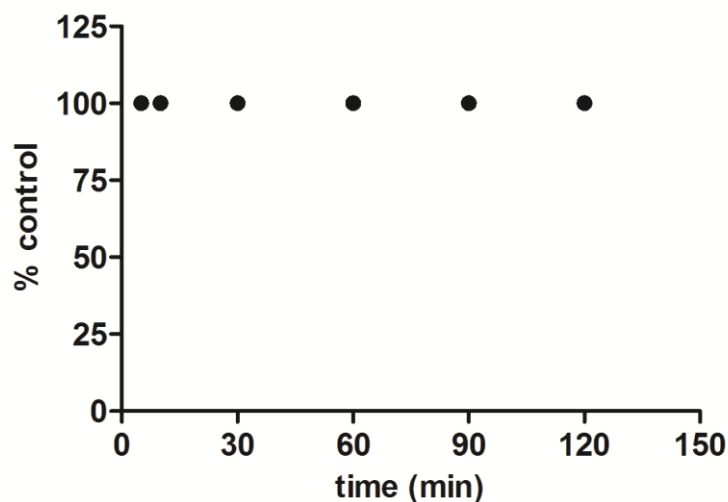


図 3-8、 $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の EGFR からの解離

希釈実験による $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の EGFR に対する不可逆性の確認。50 nM の EGFR と 50 nM の $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ を混合し 30 分インキュベーション後、大過剰 (10 μM) の CI-1033 を用いて 10 倍に希釈した。希釈した時間を 0 分として、希釈後 120 分まで EGFR に結合した $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の放射能を測定した。特異的結合は実験項に記載した方法で補正し、さらに希釈なしのデータに対して標準化し表示した。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 4$) で表示している。

数式 1 によると、競合的結合試験の IC_{50} 値はプローブ濃度に正比例し、その傾きは $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ 対 $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{inhibitor}}$ の比に等しいことが予測される。そこで複数のプローブ濃度で競合的結合試験を実施した際の dacomitinib (阻害剤) の IC_{50} のシフトを精査することで、数式 1 の妥当性を検証した。Dacomitinib は EGFR の Cys-797 と共有結合を形成する共有結合性 EGFR 阻害剤である⁸³。競合的結合試験の結果、プローブ濃度を増加させることにより dacomitinib の IC_{50} は増加した (図 3-9A)。予測した通り、 IC_{50} のプローブ濃度依存性は直線的で、その直線の傾きは 3.2 であり (図 3-9B)、これはプローブと阻害剤の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 比 2.8 と良く一致した (表 3-1)。以上から、数式 1 の妥当性が支持された。

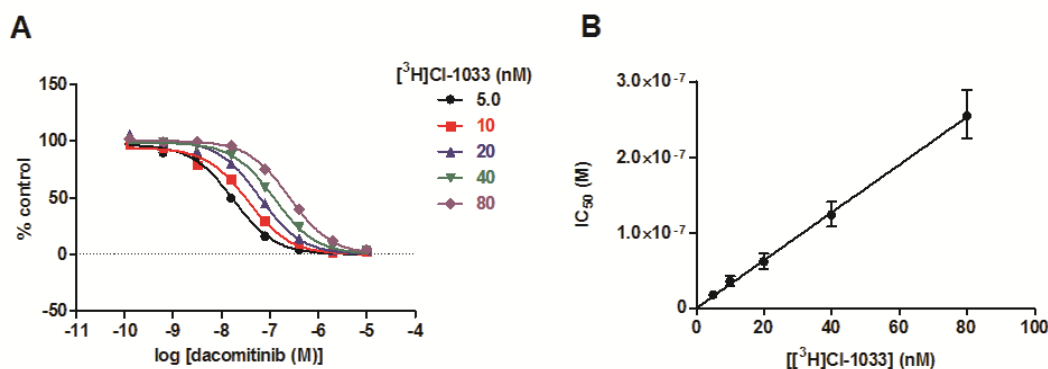


図 3-9、複数濃度の [³H]CI-1033 に対する dacomitinib の競合的結合試験

(A) 競合的結合試験における dacomitinib の IC₅₀ に対するプローブ (³H]CI-1033) 濃度の影響。1.0 nM (5.0 nM [³H]CI-1033) または 2.0 nM (10 から 80 nM [³H]CI-1033) の EGFR を用いて試験を実施し、反応開始後 60 分後の IC₅₀ を測定した。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 3) で表示している。(B) (A) で算出した IC₅₀ のプローブ濃度に対するリプロット。(A) で得られたデータにシグモイド曲線をフィッティングすることで IC₅₀ を算出した。値はフィッティング解析から算出された 95% 信頼性区間と共に表示している。

続いて、 k_{inact}/K_I 値がほぼ 4 桁にわたる様々な阻害強度の不可逆性 EGFR 阻害剤を評価することで、この方法論の k_{inact}/K_I の検出域の広さを検証した。5.0 nM のプローブと複数濃度の阻害剤の存在下で、プローブによる EGFR 酵素の占有を測定した。5.0 nM のプローブ [³H]CI-1033 濃度では、良好なアッセイの安定性 ($Z' > 0.75$) と 97% 以上の酵素占有に必要なインキュベーション時間の短さ (5 倍の半減期 = 33 分) が共に達成出来るため、この条件で試験を実施した。この競合的結合試験で得られた IC₅₀ 値からそれぞれの阻害剤の k_{inact}/K_I を数式 1 により決定した (probe competition、図 3-10、表 3-1)。並行した実験で、それぞれの阻害剤の k_{inact}/K_I を従来法の方法論解析 (kinetic measurement) により決定した。その代表例として WZ-4002 の結果を示す (図 3-11)。

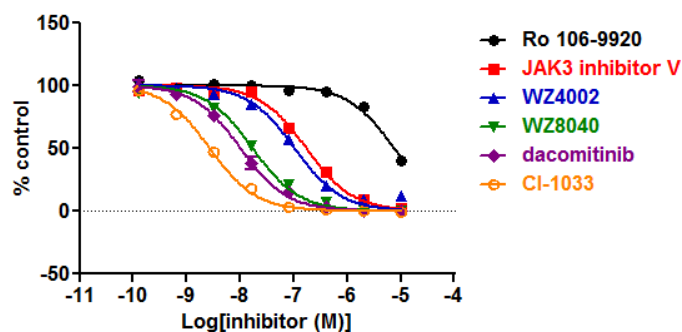


図 3-10、5.0 nM の ^3H CI-1033 に対する不可逆性 EGFR 阻害剤の競合的結合試験
1.0 nM の EGFR を用いて、図 3-5 に示した複数の EGFR 阻害剤の反応開始後 60 分後の IC_{50} を測定した。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) で表示している。

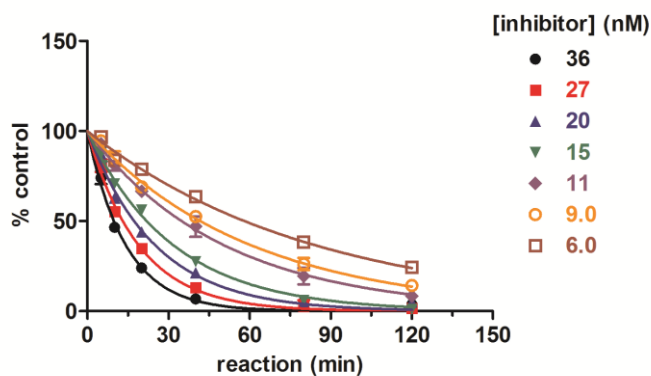


図 3-11、従来の速度論解析法による k_{inact}/K_I の算出
2.0 nM の EGFR と様々な濃度の WZ-4002 を横軸で指定した時間反応後、大過剰の ^3H CI-1033 (100 nM) を添加し反応を停止した。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=4$) で表示している。

表 3-1、様々な不可逆性 EGFR 阻害剤の k_{inact}/K_I 値 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)^a

	kinetic measurement	probe competition
1, CI-1033	$(1.1 \pm 0.02) \times 10^6$	$(5.2 \pm 0.3) \times 10^5$
2, dacomitinib	$(3.9 \pm 1.0) \times 10^5$	$(1.4 \pm 0.09) \times 10^5$
3, WZ-8040	$(1.7 \pm 0.02) \times 10^5$	$(9.6 \pm 0.6) \times 10^4$
4, WZ-4002	$(3.3 \pm 0.03) \times 10^4$	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^4$
5, JAK3 inhibitor V	$(9.8 \pm 0.4) \times 10^3$	$(8.2 \pm 0.8) \times 10^3$
6, Ro 106-9920	$(3.6 \pm 0.13) \times 10^2$	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^2$

^a データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) で表示している。

この結果を両対数軸グラフにプロットしたところ、競合的結合試験と従来の速度論解析で得られた $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 値の間には良好な相関 ($R^2 = 0.99$) が確認された (図 3 - 12)。両パラメーターには直線的な関係式が存在し、そのスロープは 0.94 であった。一方で、表 3 - 1 に見られる通り、競合的結合試験 (probe competition) は、従来の速度論解析 (kinetic measurement) で得られた $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 値の約 1/2 の値を一貫して生み出す結果となった。この乖離はプローブ [^3H]CI-1033 の $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ (図 3 - 7) の過小評価が原因で、数式 1 において $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ と比例関係ある競合的結合試験の $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{inhibitor}}$ も結果として過小評価していると説明できる。CI-1033 の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 値は次の異なる 3 つの方法で算出している。すなわち [^3H]CI-1033 の直接結合の速度論解析からの算出 (図 3 - 7、 $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$)、非標識 CI-1033 の速度論解析からの算出 (表 3 - 1、kinetic measurement)、非標識 CI-1033 の競合的結合試験からの算出 (表 3 - 1、probe competition、 $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{inhibitor}}$) である。もしも [^3H]CI-1033 の直接結合の速度論アッセイで求めた $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ 値である $3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を 2 倍程度過小評価していると仮定すると、 $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ の真の値は 2 倍大きくなり、結果として数式 1 から算出される競合的結合試験の $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{inhibitor}}$ も 2 倍大きく算出される。その結果として 3 つの異なる評価法で求めた $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 値はほぼ一致することから、上記の仮説の妥当性が裏付けられる。この結果は同時に、従来の速度論解析法を用いて $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を 2 倍以下の誤差範囲内で求めることの困難さも示している。

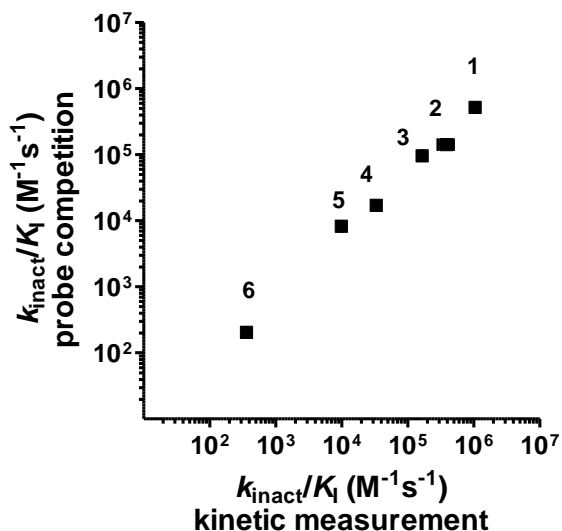


図 3 - 12、従来の速度論解析法 (kinetic measurement) と競合的結合試験法 (probe competition) による k_{inact}/K_I 値の比較

データは両対数軸グラフ上に、平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$) で表示している。1 = CI-1033, 2 = dacomitinib, 3 = WZ8040, 4 = WZ4002, 5 = JAK3 inhibitor V, 6 = Ro 106-9920。

第四節 シミュレーションを用いた他の結合モデルでの適用性の確認

本手法の一般性をさらに広げるために、二段階反応の不可逆性阻害剤と二段階反応のプロープが競合する反応機構以外のスキームに対しての数式を導出した (図 3 - 13、導出 3 - 2 から 3 - 4)。

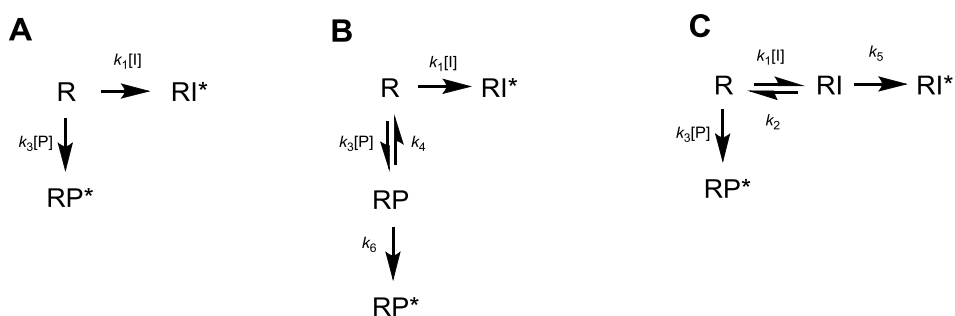


図 3 - 13、一段階および二段階反応のプロープおよび阻害剤の競合的結合試験のスキーム
本スキームに基づき、数式の算出及びシミュレーションを実施した。アスタリスク (*) は共有結合形成した受容体を示す。R = 薬物受容体、P = 不可逆性プロープ、I = 不可逆性阻害剤を示す。

その結果、得られた数式 2~4 は、構成するミクロの速度定数はメカニズム毎に異なるものの、全てのモデルにおいて数式 1 と同じ形の数式となった (導出 3-2 から 3-4)。導出した数式の妥当性を検証するために、KinTek Global Kinetic Explorer ソフトウェアを用いたシミュレーションを実施した。図 3-13 および図 3-4 に示した不可逆性プローブと不可逆性阻害剤が競合する各反応メカニズムに基づいて、表 3-2 の速度論パラメーターを用いて異なる阻害剤濃度での RP* 濃度を誤差と共に経時的に発生させた。前述の EGFR の実験と同様の算出法を用いて、反応終了時の RP* 濃度から競合的結合試験の IC_{50} を算出後、数式 1~4 を用いて阻害剤の k_{inact}/K_I 値 (calculated) に変換し、表 3-2 の元の値 (input) と比較した (図 3-14)。その結果、シミュレーションで数式 1~4 から算出した k_{inact}/K_I 値 (calculated) と元の入力値から算出した k_{inact}/K_I 値 (input) は、評価した全てのモデルにおいて $R^2 \geq 0.99$ の良好な相関を示した。以上から、本研究で提示した数式は不可逆性阻害剤の一段階および二段階の反応機構に依らずに成立することが示唆され、本数式の一般性が支持された。

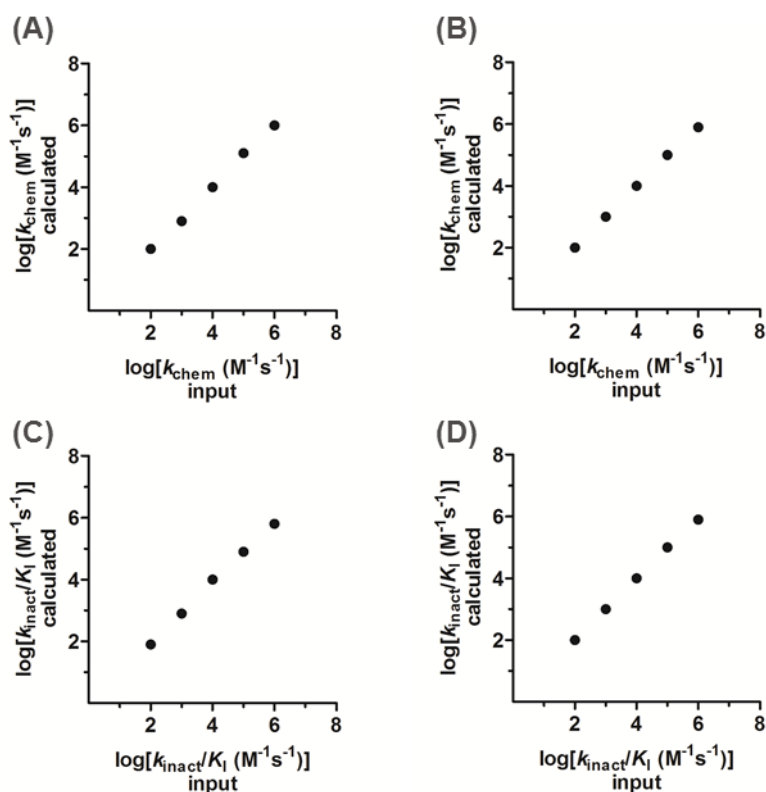


図 3-14、数式 1 を用いた $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 算出のシミュレーションによる妥当性検証

図 3-13 A から C および図 3-4 のスキームに基づき、表 3-2 のパラメーターから RP* を発生させた。シグモイド関数によるフィッティングから IC_{50} を算出し、数式 1 を用いて $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 値を算出し、元の入力値との相関図を作成した。相関図 A、B、C は、図 3-13 のスキーム A、B、C に、相関図 D は図 3-4 のスキームに相当する。データはフィッティングから算出された標準誤差と共に表示している。

第五節 考察

本研究で開発した不可逆性プローブを用いた $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の新規な算出手法は、従来の速度論的測定を用いた手法と比較して少なくとも 3 つの利点があると考えられる。それは、迅速で容易な評価、広い活性評価域、そしてあらゆるターゲットクラスに対する適応性である。本研究以前は、プローブと不可逆性阻害剤の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を結びつける、チェン＝プルソフ式に相当するシンプルな関係式が存在しなかったため、手間を要する速度論的解析によりそれぞれの評価化合物ごとの $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を決定する必要があった。本手法では不可逆性プローブの $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ を速度論的解析により一度だけ決定する必要があるだけであり、以

降は容易なエンドポイントの競合試験により評価化合物の $(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{inhibitor}}$ を算出できる。

加えて、本競合的結合試験法は評価結果が数式 1 からどれだけ逸脱するかを観察することで、評価する阻害剤の不可逆性を定性的に評価することも可能である。本競合的結合試験においては、可逆的な阻害剤は不可逆性プローブの結合を遅らせはするけれども、無限時間の後には不可逆性プローブの結合を置き換えることはない。そのため不可逆性プローブに対しては、不可逆性阻害剤は反応時間に非依存的な IC_{50} を生じるが、可逆的な阻害剤はアッセイ時間を長くする毎に減弱した IC_{50} を生じる¹² (図 3-15A および B)。これは可逆的なリガンド (基質やプローブ) を用いた通常の生化学アッセイでは不可逆性阻害剤は時間依存的な阻害を示し、アッセイ時間が長くなる毎に増強する IC_{50} を示すのとは対照的である。以上から、不可逆性プローブを用いる本競合的結合試験法では、目的化合物の不可逆性評価をわずか 2 つの異なる時間点 (半減期の 5 倍の時間と更に長い時間) での IC_{50} 値のシフトの有無から定性的に評価することが可能である。

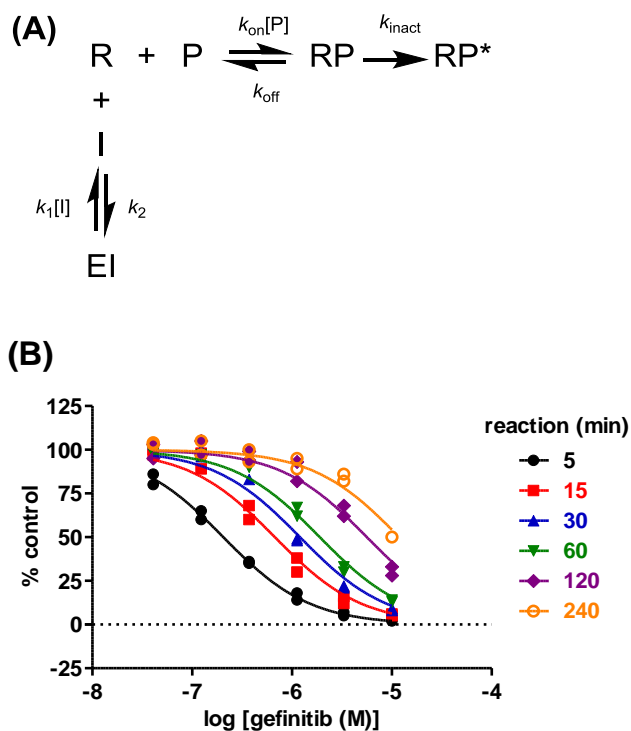


図 3 - 15、不可逆性プローブを用いた競合的結合試験法による可逆的阻害剤の時間依存的な IC_{50} の減弱

(A) 不可逆性プローブに対する可逆性阻害剤の競合的結合試験のスキーム。アスタリスク (*) は共有結合形成した受容体を示す。R = 薬物受容体、I = 可逆性阻害剤、P = 不可逆性プローブ。(B) 可逆性 EGFR 阻害剤 gefitinib (図 3 - 5) による $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ 結合の置換を測定した。2.0 nM の EGFR と 5.0 nM の $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ と様々な濃度の gefitinib を表示された時間インキュベーションした。試験は $n = 2$ で実施し、各データをグラフに表示している。

第二に、不可逆性プローブを用いた競合的結合試験法は阻害強度の評価域において利点がある。本研究では不可逆性 EGFR 阻害剤を例として用い、本評価方法が 4 桁の評価域を持つことを示した。重要なことに、この評価域はプローブ濃度を変えることで更に広くすることができる。一般的に使用される放射性リガンドや蛍光リガンドの結合試験において、薬物受容体濃度の下限とプローブ濃度範囲はそれぞれ 1 nM、5 ~ 500 nM である。この際、競合的結合試験の見かけの IC_{50} 値は 0.5 nM から 10 μM の範囲を取りうるが、その限界はそれぞ

れリガンド欠乏 (タイトバインディング阻害⁸⁴) および阻害剤の溶解度により規定される。この状況において、評価化合物の検出可能な $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の下限と上限は、数式 1 からそれぞれ $5 \times 10^{-4} \times (k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ ($[\text{P}] = 5 \text{ nM}$ において $IC_{50} = 10 \text{ }\mu\text{M}$ の場合) および $10^3 \times (k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{probe}}$ ($[\text{P}] = 500 \text{ nM}$ において $IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$ の場合) と算出可能である。このように理論上は、本競合的結合試験法は 6 桁の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の評価域を有し、これは創薬の最適化研究に十分広い評価域であると考えられる。もし更に幅広い評価域が必要であれば、異なる強度を有するプローブを使うことで、評価化合物の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の更なる評価域を得ることが出来る。さらに最も重要な事として、本競合的結合試験法はミカエリス=メンテン速度論の前提となる迅速平衡の前提にも定常状態の前提にも依存しない。それゆえ、これらの前提がもはや成り立たなくなるほど高度に最適化された不可逆性阻害剤にも本手法は適用可能である⁸⁵。

最後に評価系が前述した 4 つの前提を満たす限り、本研究で示した不可逆性プローブを用いた競合的試験法はあらゆるターゲットクラスの阻害剤評価に適応可能である。そのようなターゲットには、核エクスポーチンのような感度の良い連続的な機能アッセイ系の構築が困難なタンパク質⁸⁶や速度論的測定を容易にする蛍光基質が無いために測定に手間がかかる酵素などが含まれる。本競合的試験法の構築の鍵となる要素は適切なプローブの準備であるが、この観点からも本手法には利点がある。可逆的な結合プローブの場合、信頼性の高いアッセイ系の構築にはプローブの強力な結合活性が必要である。一方で、不可逆性プローブの場合は、十分に長いインキュベーション時間があれば共有結合を介して必ず標的分子を捉えるので、そのターゲットに対して高度に最適化されている必要はない。その上、プローブが共有結合するために、可逆性プローブには適さない厳しい洗浄条件も許容される。これは、シグナル/バックグラウンド比の向上を通じて、精度の高い試験系の構築に大きく寄与する。

本アプローチの感度は、プローブ濃度、フィルターに補足されるタンパク質の割合、プローブの比放射能、アッセイの進行度合いなど多数の要因により左

右されている⁸⁷。本アッセイ手法は結合試験であるため、(もし標的タンパク質が触媒作用を持っていれば利用可能な) 標的分子の触媒活性に起因するシグナル増強機構を有していない。その代わりとして、放射能化学の利用により感度を獲得している。もし低濃度のタンパク質条件での評価が必要であるならば、プローブの比放射能を増大させることで、触媒活性による増幅に相当するシグナルを獲得することが考えられる。

結論として、本研究で示した不可逆性プローブを用いたエンドポイントの競合的な結合試験により、迅速かつ定量的に不可逆性阻害剤の阻害強度を測定することが可能になった。本方法は簡便かつ、ハイスループットで測定域が広く、ターゲットに依らず広く適応可能であり、不可逆性阻害剤の創薬研究の効率的なリード最適化を大きく促進することが可能になるであろう。

第六節 材料と方法

材料

CI-1033、dacomitnib、JAK3 inhibitor V はそれぞれ LKT Laboratories、和光純薬工業、EMD Millipore より購入した。Ro 106-9920 および gefitinib は Tocris Bioscience より、WZ8040 および WZ4002 は Selleck Chemicals より購入した。 $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ は Quotient bioresearch から取得した。EGFR kinase ドメイン (696-1022) は以前に報告されたものを用いた⁸⁸。Tween-20 は Bio-Rad より購入した。その他の試薬は、記載のない限り和光純薬工業より購入した。

放射性リガンドフィルター結合試験

放射性リガンドフィルター結合試験は 96 ウェルプレートフォーマットで最終 150 μL の液量で実施した。複数濃度の $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ とテスト化合物を EGFR キナーゼと、10 mM HEPES (pH 7.5)、10 mM MgCl_2 、1.0 mM EGTA、0.01% (w/v) Tween-20 を含むバッファー中で室温においてインキュベーションした。結合反応を終了させるために 50 μL のアセトンを追加し、タンパク質の沈殿を促進するために反応液を 4°C で 30 分静置した。タンパク質に付加したリガンドはポリエチレンイミンを前処理した GF/C フィルタープレート (PerkinElmer) 上に捕捉し、Filtermate Harvester を使用した迅速なフィルターろ過により非結合のリガンドと分離した。フィルターは 100 μL のアセトンで 1 回、300 μL のアッセイバッファーで 5 回洗浄した。プレートを乾燥しマイクロシンチ-O を添加後、放射能を TopCount liquid scintillation counter (PerkinElmer) を用いて測定した。 $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の特異的結合は、全結合 (DMSO) から非特異的結合 (10 μM 非標識 CI-1033) を差し引くことで算出した。 $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ 算出のプログレスカーブのデータは、次の数式を用いてフィッティングした。

$$B = B_{\text{max}}[1 - \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t)] \quad \text{ただし} \quad k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}} [\text{I}]/(K_{\text{I}} + [\text{I}]), \quad K_{\text{I}} = (k_{\text{off}} + k_{\text{inact}})/k_{\text{on}}^9$$

競合的結合試験法と従来の速度論法での $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の算出

上述した放射性リガンドフィルター結合試験を用いて、 $[^3\text{H}]\text{T-3364366}$ の競合的結合試験を実施した。5.0 nM の $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ と複数濃度の阻害剤存在下で、プローブによる EGFR 酵素の占有率を測定した。室温で 60 分インキュベーション後、アセトンの添加により結合反応を停止した。アセトン沈殿、結合・遊離リガンドの分離、放射能の検出は上記の通り実施した。 $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ の特異的結合は、全結合 (DMSO) から 非特異的結合 (10 μM 非標識 CI-1033) を差し引くことで算出し、シグモイド用量反応曲線でフィットして IC_{50} を算出した。得られた IC_{50} から数式 1 を用いて $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を算出した。放射性リガンド結合試験は、従来法の速度論的算出法を用いた $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の算出にも用いた。酵素と様々な濃度の阻害剤を表示した期間、インキュベーションした。結合反応は 100 nM の $[^3\text{H}]\text{CI-1033}$ を添加することで停止し、全ての非占有の酵素を捕捉するために反応液をさらに 30 分間インキュベーションした。アセトン沈殿、結合・遊離リガンドの分離、検出は上記の通り実施した。 $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ の算出のために、プログレスカーブのデータを以下のどちらかの式でフィットした。

$$[\text{E}]_{\text{free}}/[\text{E}]_{\text{t}} = \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t) \quad \text{ただし} \quad k_{\text{obs}} = k_{\text{chem}} [\text{I}]$$

$$[\text{E}]_{\text{free}}/[\text{E}]_{\text{t}} = [\text{E}]_{\text{i}}/[\text{E}]_{\text{t}} \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t) \quad \text{ただし} \quad k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}} \times [\text{I}]/(K_{\text{I}} + [\text{I}]) \quad \text{および} \quad K_{\text{I}} = (k_{\text{off}} + k_{\text{inact}})/k_{\text{on}}$$

データ解析

データ解析は GraphPad Prism 5 ソフトウェアを用いて実施した。

シミュレーション解析

シミュレーション解析は、KinTek Global Kinetic Explorer (KinTek, Austin, TX) を用いて実施した。本ソフトウェアは反応速度式の数値積分を用いて、モデル

の単純化のための前提を使わずにデータを生成することが可能である。表 3 - 2 に示す様々な値の k_{chem} または k_{inact}/K_I 値を有する一段階または二段階メカニズムに従う不可逆的プローブと不可逆的阻害剤を仮定した (図 3 - 13 A から C および 図 3 - 4)。薬物受容体 (1.0 nM)、プローブ (100 nM)、様々な濃度の評価化合物 (10,000, 3,000, 1,000, 300, 100, 30, 10, 3.0, 1.0 nM) を混合した時間を 0 秒とし、受容体-プローブ共有結合付加体 RP^* を 3% の絶対ガウス誤差と共に発生させた。 RP^* 生成の半減期の 5 倍より長い時間である 6,000 秒において、各濃度の阻害剤存在下でのプローブに対する競合的結合試験法での RP^* 生成の IC_{50} 値を算出した。得られた IC_{50} を数式 1 を用いて k_{chem} または k_{inact}/K_I に変換し、元の入力値から算出される k_{chem} または k_{inact}/K_I と比較した。

表 3-2、シミュレーションで用いたプローブと阻害剤の速度論パラメーター

図 3-9、スキーム A

	k_{chem} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{inact} (s^{-1})	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
probe, P	1.0×10^4			
I1	1.0×10^2			
I2	1.0×10^3			
I3	1.0×10^4			
I4	1.0×10^5			
I5	1.0×10^6			

図 3-9、スキーム B

	k_{on} or k_{chem} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{inact} (s^{-1})	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
probe, P	1.0×10^5	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-3}	9.1×10^3
I1	1.0×10^2			
I2	1.0×10^3			
I3	1.0×10^4			
I4	1.0×10^5			
I5	1.0×10^6			

図 3-9、スキーム C

	k_{on} or k_{chem} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{inact} (s^{-1})	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
probe, P	1.0×10^4			
I1	1.0×10^3	1.0	0.010	91
I2	1.0×10^4	1.0	0.10	9.1×10^2
I3	1.0×10^5	1.0	0.10	9.1×10^3
I4	1.0×10^6	1.0	0.10	9.1×10^4
I5	1.0×10^6	1.0	10	9.1×10^5

図 3 - 4、スキーム

	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{inact} (s^{-1})	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
probe, P	1.0×10^5	1.0	0.10	9.1×10^3
I1	1.0×10^2	1.0	0.10	91
I2	1.0×10^3	1.0	0.10	9.1×10^2
I3	1.0×10^4	1.0	0.10	9.1×10^3
I4	1.0×10^5	1.0	0.10	9.1×10^4
I5	1.0×10^6	1.0	10	9.1×10^5

第七節 数式の導出

導出 3-1, 二段階反応のプロープと阻害剤の競合 (図 3-4)

Assume $[R] \ll [I]$ and $[R] \ll [P]$,

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_1[I][R] - k_3[P][R] + k_2[RI] + k_4[RP]$$

$$\frac{d[RI]}{dt} = k_1[I][R] - (k_2 + k_5)[RI]$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_5[RI]$$

$$\frac{d[RP]}{dt} = k_3[P][R] - (k_4 + k_6)[RP]$$

$$\frac{d[RP^*]}{dt} = k_6[RP]$$

$$[R]_t = [R] + [RI] + [RP] + [RI^*] + [RP^*]$$

$$\text{at } t = 0, [R] = [R]_t, [RI] = [RP] = [RI^*] = [RP^*] = 0$$

The Laplace transform of the equations yields

$$sF_R - [R]_t = -(k_1[I] + k_3[P])F_R + k_2F_{RI} + k_4F_{RP}$$

$$sF_{RI} = k_1[I]F_R - (k_2 + k_5)F_{RI}$$

$$sF_{RI^*} = k_5F_{RI}$$

$$sF_{RP} = k_3[P]F_R - (k_4 + k_6)F_{RP}$$

$$sF_{RP^*} = k_6F_{RP}$$

$$\frac{[R]_t}{s} = F_R + F_{RI} + F_{RP} + F_{RI^*} + F_{RP^*}$$

From the equations above,

$$\frac{F_R}{[R]_t}$$

$$= \frac{(s + k_2 + k_5)(s + k_4 + k_6)}{s(s + k_2 + k_5)(s + k_4 + k_6) + k_1[I](s + k_5)(s + k_4 + k_6) + k_3[P](s + k_6)(s + k_2 + k_5)}$$

$$\frac{F_R}{[R]_t} = \frac{a_1}{s + \alpha} + \frac{b_1}{s + \beta} + \frac{c_1}{s + \gamma} = \frac{N}{\Delta}, \quad \text{Eq. S1, where } \alpha, \beta, \gamma > 0 (\because k_{1-6} > 0)$$

$$\Delta = s^3 + (\alpha + \beta + \gamma)s^2 + (\alpha\beta + \beta\gamma + \gamma\alpha)s + \alpha\beta\gamma$$

By comparing the constant terms of the cubic equation in s ,

$$\alpha\beta\gamma = k_1[I]k_5(k_4 + k_6) + k_3[P]k_6(k_2 + k_5), \quad \text{Eq. S2,}$$

$$N = (a_1 + b_1 + c_1)s^2 + (a_1(\beta + \gamma) + b_1(\gamma + \alpha) + c_1(\alpha + \beta))s + (a_1\beta\gamma + b_1\gamma\alpha + c_1\alpha\beta)$$

By comparing the constant terms of the quadratic equation in s ,
 $a_1\beta\gamma + b_1\gamma\alpha + c_1\alpha\beta = (k_2 + k_5)(k_4 + k_6), \quad \text{Eq. S3,}$

The Laplace back-transform of Eq. S1 yields

$$\frac{[R]}{[R]_t} = a_1 e^{(-\alpha t)} + b_1 e^{(-\beta t)} + c_1 e^{(-\gamma t)},$$

$$\text{Suppose } t \rightarrow \infty, \quad \frac{[R]_{t=\infty}}{[R]_t} = 0$$

$$\frac{F_{RP}}{[R]_t} = \frac{k_3[P]}{s + k_4 + k_6} \frac{F_R}{[R]_t} = \frac{k_3[P]}{s + A} \left(\frac{a_1}{s + \alpha} + \frac{b_1}{s + \beta} + \frac{c_1}{s + \gamma} \right), \quad \text{where } A = k_4 + k_6 > 0$$

$$\frac{F_{RP}}{[R]_t} = \frac{k_3[P]a_1}{(s + A)(s + \alpha)} + \frac{k_3[P]b_1}{(s + A)(s + \beta)} + \frac{k_3[P]c_1}{(s + A)(s + \gamma)}$$

$$\frac{k_3[P]a_1}{(s + A)(s + \alpha)} = \frac{a_2}{s + A} - \frac{a_2}{s + \alpha}, \quad a_2 = \frac{k_3[P]a_1}{\alpha - A}$$

$$\frac{k_3[P]b_1}{(s + A)(s + \beta)} = \frac{b_2}{s + A} - \frac{b_2}{s + \beta}, \quad b_2 = \frac{k_3[P]b_1}{\beta - A}$$

$$\frac{k_3[P]c_1}{(s + A)(s + \gamma)} = \frac{c_2}{s + A} - \frac{c_2}{s + \gamma}, \quad c_2 = \frac{k_3[P]c_1}{\gamma - A}$$

$$\frac{F_{RP}}{[R]_t} = \frac{a_2}{s + A} - \frac{a_2}{s + \alpha} + \frac{b_2}{s + A} - \frac{b_2}{s + \beta} + \frac{c_2}{s + A} - \frac{c_2}{s + \gamma}$$

The Laplace back-transform yields

$$\frac{[RP]}{[R]_t} = (a_2 + b_2 + c_2)e^{(-At)} - a_2 e^{(-\alpha t)} - b_2 e^{(-\beta t)} - c_2 e^{(-\gamma t)}$$

$$\text{Suppose } t \rightarrow \infty, \quad \frac{[RP]_{t=\infty}}{[R]_t} = 0$$

$$\frac{F_{RP}^*}{[R]_t} = \frac{k_6}{s} \frac{k_3[P]}{s + k_4 + k_6} \frac{F_R}{[R]_t} = \frac{k_3[P]k_6}{s(s + A)} \left(\frac{a_1}{s + \alpha} + \frac{b_1}{s + \beta} + \frac{c_1}{s + \gamma} \right), \quad \text{from Eq. S1}$$

$$\frac{k_3[P]k_6 a_1}{s(s + A)(s + \alpha)} = \frac{a_3}{s} + \frac{a_4}{s + A} + \frac{a_5}{s + \alpha}$$

By comparing the constant terms of the cubic equation in s ,

$$k_3[P]k_6a_1 = a_3A\alpha$$

$$a_3 = \frac{k_3[P]k_6a_1}{A\alpha}$$

Likewise,

$$\frac{k_3[P]k_6b_1}{s(s+A)(s+\beta)} = \frac{b_3}{s} + \frac{b_4}{s+A} + \frac{b_5}{s+\beta}, \quad b_3 = \frac{k_3[P]k_6b_1}{A\beta}$$

$$\frac{k_3[P]k_6c_1}{s(s+A)(s+\gamma)} = \frac{c_3}{s} + \frac{c_4}{s+A} + \frac{c_5}{s+\gamma}, \quad c_3 = \frac{k_3[P]k_6c_1}{A\gamma}$$

$$\frac{F_{RP^*}}{[R]_t} = \left(\frac{a_3}{s} + \frac{a_4}{s+A} + \frac{a_5}{s+\alpha} \right) + \left(\frac{b_3}{s} + \frac{b_4}{s+A} + \frac{b_5}{s+\beta} \right) + \left(\frac{c_3}{s} + \frac{c_4}{s+A} + \frac{c_5}{s+\gamma} \right)$$

$$\frac{F_{RP^*}}{[R]_t} = \frac{a_3 + b_3 + c_3}{s} + \frac{a_4 + b_4 + c_4}{s+A} + \frac{a_5}{s+\alpha} + \frac{b_5}{s+\beta} + \frac{c_5}{s+\gamma}$$

The Laplace back-transform yields

$$\frac{[RP^*]}{[R]_t} = a_3 + b_3 + c_3 + (a_4 + b_4 + c_4)e^{-At} + a_5e^{-\alpha t} + b_5e^{-\beta t} + c_5e^{-\gamma t}$$

$$\text{Suppose } t \rightarrow \infty, \quad \frac{[RP^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = a_3 + b_3 + c_3$$

$$\frac{[RP^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = a_3 + b_3 + c_3 = \frac{k_3[P]k_6}{A} \left(\frac{a_1}{\alpha} + \frac{b_1}{\beta} + \frac{c_1}{\gamma} \right) = \frac{k_3[P]k_6}{A} \left(\frac{a_1\beta\gamma + b_1\gamma\alpha + c_1\alpha\beta}{\alpha\beta\gamma} \right)$$

$$\frac{[RP^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = \frac{k_3[P]k_6}{k_4 + k_6} \left(\frac{(k_2 + k_5)(k_4 + k_6)}{k_1[I]k_5(k_4 + k_6) + k_3[P]k_6(k_2 + k_5)} \right),$$

from Eq. S2 and S3

$$\frac{[RP^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = \frac{k_3[P]k_6(k_2 + k_5)}{k_1[I]k_5(k_4 + k_6) + k_3[P]k_6(k_2 + k_5)}$$

Likewise, suppose $t \rightarrow \infty$,

$$\frac{[RI]_{t=\infty}}{[R]_t} = 0, \quad \frac{[RI^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = \frac{k_1[I]k_5(k_4 + k_6)}{k_1[I]k_5(k_4 + k_6) + k_3[P]k_6(k_2 + k_5)}$$

$$\emptyset = \text{Fractional signal of the binding assay}_{(at t=\infty)} = \frac{([RP]_i + [RP^*]_i)_{t=\infty}}{([RP]_0 + [RP^*]_0)_{t=\infty}}$$

$$= \frac{[RP^*]_{i, t=\infty}}{[RP^*]_{0, t=\infty}},$$

where $[RP^*]_0$ and $[RP^*]_i$ indicate $[RP^*]$ in the absence or presence of a specific concentration of an inhibitor, respectively.

$$\text{At } [I] = 0, [RP^*]_{0, t=\infty} = [R]_t$$

$$\emptyset = \frac{[\text{RP}^*]_{i, t=\infty}}{[\text{R}]_t} = \frac{[\text{RP}^*]_{t=\infty}}{[\text{R}]_t} = \frac{k_3[\text{P}]k_6(k_2 + k_5)}{k_1[\text{I}]k_5(k_4 + k_6) + k_3[\text{P}]k_6(k_2 + k_5)}$$

$$\emptyset = \frac{1}{1 + \frac{\frac{[\text{I}]}{k_3k_6(k_2 + k_5)}}{\frac{[\text{P}]}{k_1k_5(k_4 + k_6)}}}, \quad \text{Eq. S4}$$

$$\text{IC}_{50} = \frac{k_3k_6(k_2 + k_5)}{k_1k_5(k_4 + k_6)} [\text{P}] = \frac{k_2 + k_5}{k_1k_5} \frac{k_3k_6}{k_4 + k_6} [\text{P}]$$

$$\frac{k_1k_5}{k_2 + k_5} = \frac{k_5}{\frac{k_2 + k_5}{k_1}} = (k_{\text{inact}}/K_1)_{\text{inhibitor}}$$

$$\frac{k_3k_6}{k_4 + k_6} = \frac{k_6}{\frac{k_4 + k_6}{k_3}} = (k_{\text{inact}}/K_1)_{\text{probe}}$$

$$(k_{\text{inact}}/K_1)_{\text{inhibitor}} = (k_{\text{inact}}/K_1)_{\text{probe}} \times \frac{[\text{P}]}{\text{IC}_{50}} \quad \text{Eq. 1}$$

導出 3-2, 一段階反応のプロープと阻害剤の競合 (図 3-13A)

Assume $[R] \ll [I]$ and $[R] \ll [P]$,

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_1[I][R]$$

$$\frac{d[RP^*]}{dt} = k_3[P][R]$$

$$\frac{d[R]}{dt} = -(k_1[I] + k_3[P])[R]$$

$$[R]_t = [R] + [RI^*] + [RP^*]$$

$$\text{at } t = 0, [RI^*] = [RP^*] = 0, [R] = [R]_t$$

$$\int_{[R]_t}^{[R]} \frac{d[R]}{[R]} = - \int_0^t (k_1[I] + k_3[P]) dt$$

$$\ln \frac{[R]}{[R]_t} = -(k_1[I] + k_3[P])t$$

$$[R] = [R]_t e^{-(k_1[I] + k_3[P])t}$$

$$\frac{d[RP^*]}{dt} = k_3[P][R]_t e^{-(k_1[I] + k_3[P])t}$$

$$\int_0^{[RP^*]} d[RP^*] = k_3[P][R]_t \int_0^t e^{-(k_1[I] + k_3[P])t} dt$$

$$[RP^*] = \frac{k_3[P][R]_t}{k_1[I] + k_3[P]} (1 - e^{-(k_1[I] + k_3[P])t})$$

$$[RI^*] = \frac{k_1[I][R]_t}{k_1[I] + k_3[P]} (1 - e^{-(k_1[I] + k_3[P])t})$$

Suppose $t \rightarrow \infty$,

$$[R]_{t=\infty} = 0$$

$$[RI^*]_{t=\infty} = \frac{k_1[I][R]_t}{k_1[I] + k_3[P]}$$

$$[RP^*]_{t=\infty} = \frac{k_3[P][R]_t}{k_1[I] + k_3[P]}$$

$$\emptyset = \text{Fractional signal of the binding assay}_{(\text{at } t=\infty)} = \frac{[RP^*]_{i, t=\infty}}{[RP^*]_{0, t=\infty}}$$

$$\text{at } [I] = 0, \quad [RP^*]_{0, t=\infty} = [R]_t$$

$$\emptyset = \frac{[RP^*]_{i, t=\infty}}{[R]_t} = \frac{[RP^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = \frac{k_3[P]}{k_1[I] + k_3[P]} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{\frac{k_3[P]}{k_1}}}$$

$$IC_{50} = \frac{k_3[P]}{k_1} = \frac{(k_{\text{chem}})_{\text{probe}} \times [P]}{(k_{\text{chem}})_{\text{inhibitor}}}$$

$$(k_{\text{chem}})_{\text{inhibitor}} = (k_{\text{chem}})_{\text{probe}} \times \frac{[P]}{IC_{50}} \quad Eq. 2$$

導出 3-3, 二段階反応のプロープと一段階反応の阻害剤の競合 (図 3-13B)

Assume $[R] \ll [I]$ and $[R] \ll [P]$,

$$\frac{d[R]}{dt} = -(k_1[I] + k_3[P])[R] + k_4[RP]$$

$$\frac{d[RI^*]}{dt} = k_1[I][R]$$

$$\frac{d[RP]}{dt} = k_3[P][R] - (k_4 + k_6)[RP]$$

$$\frac{d[RP^*]}{dt} = k_6[RP]$$

$$[R]_t = [R] + [RI^*] + [RP] + [RP^*]$$

$$\text{at } t = 0, [RP] = [RI^*] = [RP^*] = 0, [R] = [R]_t$$

The Laplace transform of the equations yields

$$sF_R - [R]_t = -(k_1[I] + k_3[P])F_R + k_4F_{RP}$$

$$sF_{RI^*} = k_1[I]F_R$$

$$sF_{RP} = k_3[P]F_R - (k_4 + k_6)F_{RP}$$

$$sF_{RP^*} = k_6F_{RP}$$

$$\frac{[R]_t}{s} = F_R + F_{RP} + F_{RI^*} + F_{RP^*}$$

From the equations above,

$$\frac{F_R}{[R]_t} = \frac{(s + k_4 + k_6)}{(s + k_1[I])(s + k_4 + k_6) + k_3[P](s + k_6)}$$

$$\frac{F_R}{[R]_t} = \frac{a_1}{s + \alpha} + \frac{b_1}{s + \beta} = \frac{N}{\Delta}, \quad \text{Eq. S5,} \quad \text{where } \alpha, \beta, \gamma > 0 (\because k_{1-6} > 0)$$

$$\Delta = s^2 + (\alpha + \beta)s + \alpha\beta$$

By comparing the constant terms of the quadratic equation in s ,

$$\alpha\beta = k_3[P]k_6 + k_1[I](k_4 + k_6)$$

$$N = s + k_4 + k_6$$

By comparing the constant terms of the equation in s ,

$$a_1\beta + b_1\alpha = k_4 + k_6$$

The Laplace back-transform of Eq. S5 yields

$$\frac{[R]}{[R]_t} = a_1e^{-\alpha t} + b_1e^{-\beta t}$$

Suppose $t \rightarrow \infty$, $\frac{[R]_{t=\infty}}{[R]_t} = 0$

$$\frac{F_{RP}}{[R]_t} = \frac{k_3[P]}{s + k_4 + k_6} \frac{F_R}{[R]_t} = \frac{k_3[P]}{s + A} \frac{F_R}{[R]_t} = \frac{k_3[P]}{s + A} \left(\frac{a_1}{s + \alpha} + \frac{b_1}{s + \beta} \right),$$

where $A = k_4 + k_6 > 0$

$$\frac{F_{RP}}{[R]_t} = \frac{k_3[P]a_1}{(s + A)(s + \alpha)} + \frac{k_3[P]b_1}{(s + A)(s + \beta)}$$

$$\frac{k_3[P]a_1}{(s + A)(s + \alpha)} = \frac{a_2}{s + A} - \frac{a_2}{s + \alpha}, \quad a_2 = \frac{k_3[P]a_1}{\alpha - A}$$

$$\frac{k_3[P]b_1}{(s + A)(s + \beta)} = \frac{b_2}{s + A} - \frac{b_2}{s + \beta}, \quad b_2 = \frac{k_3[P]b_1}{\beta - A}$$

$$\frac{F_{RP}}{[R]_t} = \frac{a_2}{s + A} - \frac{a_2}{s + \alpha} + \frac{b_2}{s + A} - \frac{b_2}{s + \beta}$$

The Laplace back-transform yields

$$\frac{[RP]}{[R]_t} = (a_2 + b_2)e^{-At} - a_2e^{-\alpha t} - b_2e^{-\beta t}$$

Suppose $t \rightarrow \infty$, $\frac{[RP]_{t=\infty}}{[R]_t} = 0$

$$\frac{F_{RP^*}}{[R]_t} = \frac{k_6 F_{RP}}{s [R]_t} = \frac{k_6 k_3[P]}{s(s + A)} \frac{F_R}{[R]_t} = \frac{k_3[P]k_6}{s(s + A)} \left(\frac{a_1}{s + \alpha} + \frac{b_1}{s + \beta} \right)$$

$$\frac{k_3[P]k_6 a_1}{s(s + A)(s + \alpha)} = \frac{a_3}{s} + \frac{a_4}{s + A} + \frac{a_5}{s + \alpha}$$

By comparing the constant terms of the cubic equation in s ,

$$a_3 = \frac{k_3[P]k_6 a_1}{A \alpha}$$

$$\frac{k_3[P]k_6 b_1}{s(s + A)(s + \beta)} = \frac{b_3}{s} + \frac{b_4}{s + A} + \frac{b_5}{s + \beta}, \quad b_3 = \frac{k_3[P]k_6 b_1}{A \beta}$$

$$\frac{F_{RP^*}}{[R]_t} = \left(\frac{a_3}{s} + \frac{a_4}{s + A} + \frac{a_5}{s + \alpha} \right) + \left(\frac{b_3}{s} + \frac{b_4}{s + A} + \frac{b_5}{s + \beta} \right)$$

$$\frac{F_{RP^*}}{[R]_t} = \frac{a_3 + b_3}{s} + \frac{a_4 + b_4}{s + A} + \frac{a_5}{s + \alpha} + \frac{b_5}{s + \beta}$$

The Laplace back-transform yields

$$\frac{[RP^*]}{[R]_t} = a_3 + b_3 + (a_4 + b_4)e^{-At} + a_5e^{-\alpha t} + b_5e^{-\beta t}$$

Suppose $t \rightarrow \infty$, $\frac{[\text{RP}^*]_{t=\infty}}{[\text{R}]_t} = a_3 + b_3$

$$\frac{[\text{RP}^*]_{t=\infty}}{[\text{R}]_t} = a_3 + b_3 = \frac{k_3[\text{P}]k_6}{A} \left(\frac{a_1}{\alpha} + \frac{b_1}{\beta} \right) = \frac{k_3[\text{P}]k_6}{A} \left(\frac{a_1\beta + b_1\alpha}{\alpha\beta} \right)$$

$$\frac{[\text{RP}^*]_{t=\infty}}{[\text{R}]_t} = \frac{k_3[\text{P}]k_6}{k_4 + k_6} \left(\frac{k_4 + k_6}{k_3[\text{P}]k_6 + k_1[\text{I}](k_4 + k_6)} \right)$$

$$\frac{[\text{RP}^*]_{t=\infty}}{[\text{R}]_t} = \frac{k_3[\text{P}]k_6}{k_3[\text{P}]k_6 + k_1[\text{I}](k_4 + k_6)}$$

Likewise, suppose $t \rightarrow \infty$,

$$\frac{[\text{RI}^*]_{t=\infty}}{[\text{R}]_t} = \frac{k_1[\text{I}](k_4 + k_6)}{k_3[\text{P}]k_6 + k_1[\text{I}](k_4 + k_6)}$$

$$\emptyset = \text{Fractional signal of the binding assay}_{(at t=\infty)} = \frac{([\text{RP}]_i + [\text{RP}^*]_i)_{t=\infty}}{([\text{RP}]_0 + [\text{RP}^*]_0)_{t=\infty}}$$

$$= \frac{[\text{RP}^*]_{i, t=\infty}}{[\text{RP}^*]_{0, t=\infty}}$$

At $[\text{I}] = 0$, $[\text{RP}^*]_{0, t=\infty} = [\text{R}]_t$

$$\emptyset = \frac{[\text{RP}^*]_{i, t=\infty}}{[\text{R}]_t} = \frac{[\text{RP}^*]_{t=\infty}}{[\text{R}]_t} = \frac{k_3[\text{P}]k_6}{k_3[\text{P}]k_6 + k_1[\text{I}](k_4 + k_6)} = \frac{1}{1 + \frac{[\text{I}]}{\frac{k_3k_6}{k_1(k_4 + k_6)}} [\text{P}]}$$

$$\text{IC}_{50} = \frac{k_3k_6}{k_1(k_4 + k_6)} [\text{P}] = \frac{1}{k_1} \frac{k_3k_6}{k_4 + k_6} [\text{P}]$$

$$k_1 = (k_{\text{chem}})_{\text{inhibitor}}$$

$$\frac{k_3k_6}{k_4 + k_6} = \frac{k_6}{\frac{k_4 + k_6}{k_3}} = (k_{\text{inact}}/K_I)_{\text{probe}}$$

$$(k_{\text{chem}})_{\text{inhibitor}} = (k_{\text{inact}}/K_I)_{\text{probe}} \times \frac{[\text{P}]}{\text{IC}_{50}} \quad \text{Eq. 3}$$

導出 3-4, 一段階反応のプローブと二段階反応の阻害剤の競合 (図 3-13C)

By exchanging P and I and corresponding microscopic rate constants in derivation 3,

$$\frac{[R]}{[R]_t} = a_1 e^{(-\alpha t)} + b_1 e^{(-\beta t)}$$

$$\frac{[RI]}{[R]_t} = (a_2 + b_2) e^{(-Bt)} - a_2 e^{(-\alpha t)} - b_2 e^{(-\beta t)}$$

$$\frac{[RI^*]}{[R]_t} = a_3 + b_3 + (a_4 + b_4) e^{(-Bt)} + a_5 e^{(-\alpha t)} + b_5 e^{(-\beta t)}$$

Where $B = k_2 + k_5 > 0$

$$\alpha\beta = k_1[I]k_5 + k_3[P](k_2 + k_5), \quad a_1\beta + b_1\alpha = k_2 + k_5$$

$$a_3 = \frac{k_1[I]k_5 a_1}{B \alpha}, \quad b_3 = \frac{k_1[I]k_5 b_1}{B \beta}$$

Suppose $t \rightarrow \infty$

$$\frac{[R]_{t=\infty}}{[R]_t} = 0$$

$$\frac{[RI]_{t=\infty}}{[R]_t} = 0$$

$$\frac{[RI^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = a_3 + b_3 = \frac{k_1[I]k_5}{B} \left(\frac{a_1\beta + b_1\alpha}{\alpha\beta} \right) = \frac{k_1[I]k_5}{k_1[I]k_5 + k_3[P](k_2 + k_5)}$$

$$\frac{[RP^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = 1 - \frac{[R]_{t=\infty}}{[R]_t} - \frac{[RI]_{t=\infty}}{[R]_t} - \frac{[RI^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = \frac{k_3[P](k_2 + k_5)}{k_1[I]k_5 + k_3[P](k_2 + k_5)}$$

$$\emptyset = \text{Fractional signal of the binding assay}_{(at t=\infty)} = \frac{[RP^*]_{i, t=\infty}}{[RP^*]_{0, t=\infty}}$$

$$\text{At } [I] = 0, \quad [RP^*]_{0, t=\infty} = [R]_t$$

$$\emptyset = \frac{[RP^*]_{i, t=\infty}}{[R]_t} = \frac{[RP^*]_{t=\infty}}{[R]_t} = \frac{k_3[P](k_2 + k_5)}{k_1[I]k_5 + k_3[P](k_2 + k_5)} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{\frac{k_3[P](k_2 + k_5)[P]}{k_1k_5}}}$$

$$IC_{50} = \frac{k_3[P](k_2 + k_5)[P]}{k_1k_5} = k_3 \frac{k_2 + k_5}{k_1k_5} [P]$$

$$\frac{k_2 + k_5}{k_1k_5} = \frac{\frac{k_2 + k_5}{k_1}}{k_5} = \frac{1}{(k_{inact}/K_I)_{inhibitor}}$$

$$k_3 = (k_{chem})_{probe}$$

$$(k_{\text{inact}}/K_{\text{I}})_{\text{inhibitor}} = (k_{\text{chem}})_{\text{probe}} \times \frac{[\text{P}]}{\text{IC}_{50}} \quad \text{Eq. 4}$$

総括

医薬品リード化合物の標的タンパク質に対する作用機序解析は、定量的な構造-活性相関解析の基盤としてリード化合物の最適化研究に重要であり、これまで様々な薬物の解析がなされてきた⁸⁹。特に創薬ターゲットとして注目の集まる **protein kinase** 阻害剤や **protease** 阻害剤は、豊富なアッセイ方法や結晶構造解析などの三次元構造情報等を利用して、精力的な解析が行われている。一方で近年では創薬ターゲットの枯渇に伴い、結合作用機序がよく知られていないターゲットクラスのタンパク質に対する創薬研究も実施されている。また同じタンパク質を標的とする他社競合化合物との差別化のため、化学構造や結合様式の異なる阻害剤を見出そうとする探索研究も行われている。

このように、これまでに結合作用機序が分かっていない、もしくは既存のものとは異なる結合作用機序の可能性のある薬物が見出された場合には、目的とする標的タンパク質への作用機序を定量的に解析しておくことが望ましい。そこで本研究では、新規なデルタ 5 デサチュラーゼ阻害剤 **T-3364366** の結合速度論解析を実施した。続いて、新規な **Bcl-xL/Mcl-1** 二重タンパク質間相互作用阻害剤 **II** の結合作用機序を解析した。

また近年注目される作用機序の一つである不可逆性阻害剤の最適化研究において、阻害剤の活性指標である $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ は算出には非常に手間を要することから、定量評価が行われず不可逆性阻害剤の最適化研究の律速段階の一つになっていた。その問題点を解消するために、不可逆性プローブを用いた競合的結合試験のエンドポイントの IC_{50} から迅速に $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ を求める新規な手法を開発した。

以下、これらの研究について各章ごとに簡単に纏める。

第一章では新規なデルタ 5 デサチュラーゼ (**D5D**) 阻害剤 **T-3364366** の結合作用機序を解析した。これまで **D5D** 阻害剤に関しての複数の報告があるに

も拘らず、阻害剤の生化学的な作用機序は殆ど理解されていない。これは酵素アッセイを用いて D5D に対する定量的解析を行うことが困難であることに主として起因していると考えられた。そこで評価化合物をリガンドに用いる放射性リガンド結合試験を採用して、強力かつ選択的な D5D 阻害剤 T-3364366 の結合作用機序を解析した。結合試験の結果から、T-3364366 は可逆的で 2 時間以上の解離半減期を有するスローバインディング阻害剤であることが明らかになった。その遅い解離の効果は細胞の洗浄試験で確認された。D5D と D6D 間のドメイン交換実験により、T-3364366 は D5D のデサチュラーゼドメインに結合することが示された (図 4-1)。本研究はデサチュラーゼファミリー阻害剤の結合様式を明らかにした初めての例であり、デサチュラーゼ酵素の創薬研究に重要な洞察を与えると考えられる。

酵素アッセイを用いた前平衡状態での IC_{50} 評価では、スローバインディング阻害を示すことが期待される T-3364366 の周辺化合物も真の結合活性を過小評価することになる可能性が高いと考えられる。可逆的リガンドとの競合的結合試験を用いれば、平衡状態における IC_{50} が評価する阻害剤の真の活性値と比例する。そのため、T-3364366 周辺化合物の構造-活性相関研究では、D5D 酵素の失活が許容されるなるべく長いインキュベーション時間での [3 H]T-3364366 の競合的結合試験の IC_{50} 値を用いることが、阻害剤の真の活性値のミスリードを防ぐ重要な手段であると考えられる。

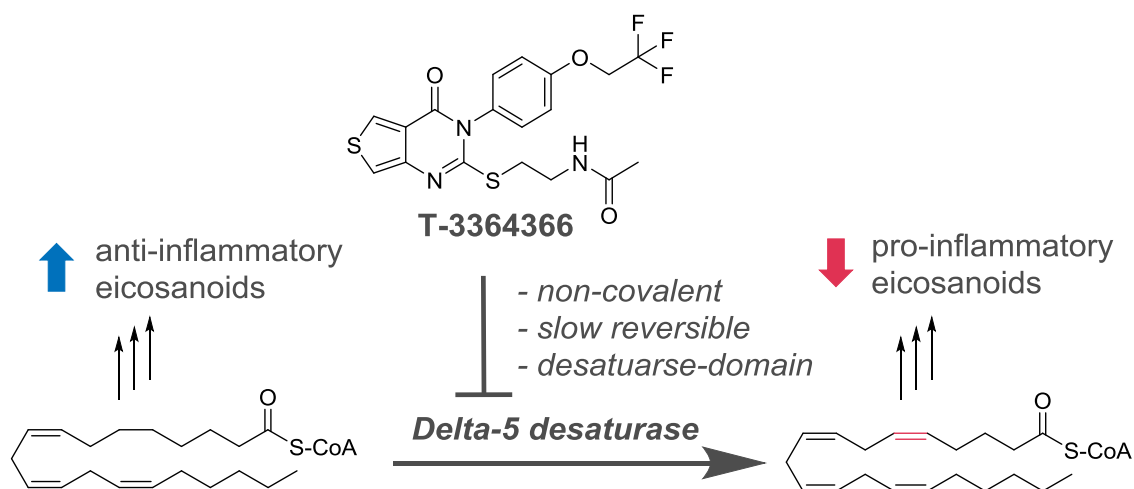


図 4-1、新規なデルタ 5 デサチュラーゼ阻害剤 T-3364366 の結合速度論解析

第二章では Bcl-xL/Mcl-1 タンパク質間相互作用 (PPI) 阻害剤 **I1** の結合作用機序を解析した。Bcl-xL/Mcl-1 二重 PPI 阻害剤の HTS からヒット化合物 **I1** を同定したが、本化合物は共有結合を介して Bcl-xL/Mcl-1 を阻害可能なマイケルアクセプター構造を有する **I2** を生み出す潜在性を有していた。そこで Bcl-xL/Mcl-1 両タンパク質に結合する蛍光ペプチドに対する定量的な競合的結合試験を構築し、**I1** の結合作用機序を解析した。**I1** は結合が迅速に平衡に達しかつプローブペプチドと拮抗的な可逆的結合を示すことが確認され、非共有結合的な結合が示唆された。構築したアッセイが共有結合阻害の可能性を除外できていることを確認するために、**I1** の構造類縁体でマイケルアクセプターへの分解経路を持たない **I3** を合成したところ、**I1** と同程度の阻害活性が確認できた。本結果より、**I1** と **I3** は両化合物に共通した官能基を用いた可逆的相互作用を介して、Bcl-xL/Mcl-1 に結合することが示唆された。**I1** および **I3** は、化学構造の新規性、PPI 阻害剤としては小さな分子量、さらに Bcl-xL/Mcl-1 の両タンパク質に対する二重阻害活性から、Bcl-xL/Mcl-1 阻害剤のリード最適化研究における興味深い出発点であると考えられる (図 4-2)。

一般的に HTS からのタンパク質間相互作用 (PPI) 阻害剤の同定は、ヒット化合物の結合親和性が弱いため、困難を伴うことが多い。本研究で提示したプ

ローブに対する定量的な競合的結合試験を用いた拮抗的かつ迅速に平衡に達する可逆的結合の確認は、共有結合阻害剤を含む偽陽性の可能性を除外する簡便な手法である。HTS ヒット化合物の標的タンパク質への作用機序解析は、生物物理学的分析法の短所を相補し、また他の標的分子にも広く適応可能であることから、創薬研究において重要な解析法であると考えられる。

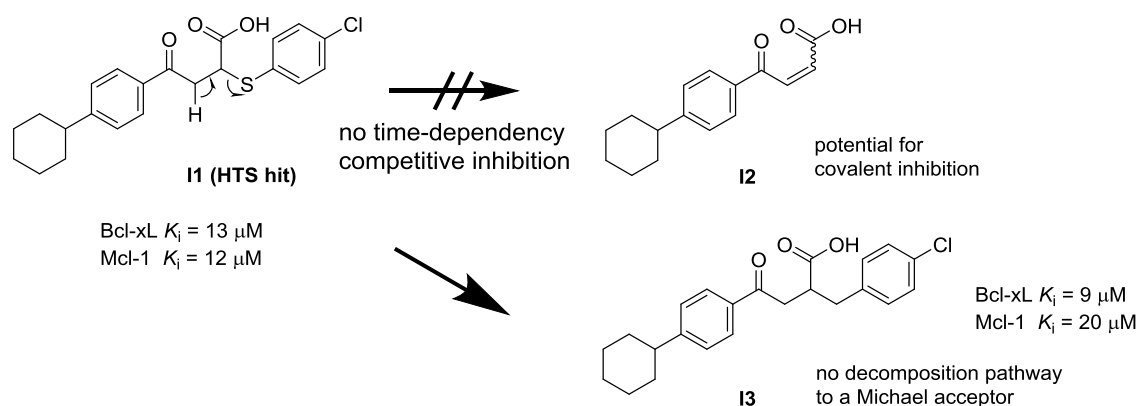


図 4-2、Bcl-xL/Mcl-1 タンパク質間相互作用阻害剤 I1 の作用機序解析

第三章ではエンドポイント競合的結合試験法を用いた不可逆性阻害剤の活性評価指標 k_{inact}/K_I の迅速な決定法の開発について述べた。不可逆性阻害剤の活性評価指標は可逆性リガンドを用いた生化学アッセイから算出される IC_{50} ではなく二次の速度定数である k_{inact}/K_I (単位、 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) で評価すべきである。しかし k_{inact}/K_I の算出には速度論的測定やカーブフィッティングを含む煩雑な過程が必要である。そこで、評価化合物に拮抗的な不可逆性プローブを用いた競合的結合試験の一時間点 (エンドポイント) の IC_{50} から容易に k_{inact}/K_I を算出する理論を構築した。評価化合物と事前の速度論解析で k_{inact}/K_I を決定したプローブとによる標的タンパク質の競合的な占有を測定し、系が平衡に達した後にはプローブ置換の IC_{50} を決定する。この条件下では、試験化合物の k_{inact}/K_I は次の単純な数式； $(k_{\text{inact}}/K_I)_{\text{inhibitor}} = (k_{\text{inact}}/K_I)_{\text{probe}} \times [\text{probe}]/IC_{50}$ から算出される。本数式は可逆性阻害剤のチェン=プルソフ式のように、プローブと評価化合物間の不可

逆阻害の強度を関連付けている。EGFR キナーゼを題材とした実験とシミュレーションの両方において、本手法で得られた k_{inact}/K_I は従来の速度論的解析法で求めた k_{inact}/K_I とよく相関し、これは本数式の妥当性を支持している。本評価法は従来法に対して、簡便さ、高い処理能力、広い測定域、あらゆるターゲットクラスに対する普遍的な適用などを含めた複数の利点があり、不可逆性阻害剤の創薬研究における価値ある評価方法になると考えられる (図 4-3)。

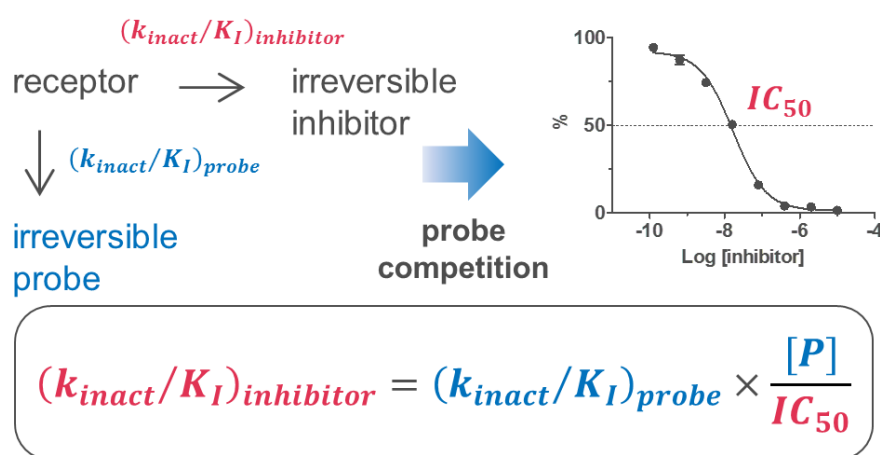


図 4-3、エンドポイントの競合的結合試験を用いた不可逆性阻害剤の活性指標 k_{inact}/K_I の迅速な決定法の開発

以上の通り、本研究では医薬品リード化合物の標的タンパク質に対する作用機序を結合速度論試験を用いて解析した。有効でかつ安全な医薬品の設計のためには、生体において標的以外の分子を阻害することなく目的のタンパク質にのみ強く作用する薬物を設計する必要がある。そのためには、目的とする標的タンパク質を強力に阻害し、生体において低い暴露量で強い薬効を示すことが理想である。可逆的な結合様式を示す分子の場合、解離定数 K_i は解離速度定数 k_{off} を結合速度定数 k_{on} で割った値 ($K_i = k_{off}/k_{on}$) で算出されるため、結合親和性を強くするすなわち K_i を小さくするためには、 k_{on} を大きくするか k_{off} を小さくする必要がある。これは薬物の標的分子への結合を早くするか、標的分子

からの解離を遅くすることをそれぞれ意味している。 k_{on} 値の上昇には溶液の拡散律速の上限があり、また創薬化学手法でコントロールしにくいと言われていたのに対し、 k_{off} 値の減少には下限もなく標的タンパク質と薬物の相互作用を増やす等の通常の創薬化学手法で達成される⁹⁾。すなわち強力で安全な医薬品分子をデザインするという創薬化学研究は、標的タンパク質からの解離が遅く、結果として平衡状態に達するまでに時間を要するスローバインディング阻害剤をデザインすることと、多くの場合同義である。そのため、可逆的な阻害剤の最適化過程とは平衡状態を仮定したミカエリス=メンテン速度論の前提から逸脱する方向を目指して薬物を設計する活動であるとも考えることが出来る。実際に、医薬品または臨床開発化合物の中には、標的タンパク質からの解離が通常の生化学アッセイや薬物の体内動態の時間軸と比較して同程度かさらに遅い薬物も数多く報告されている^{90,91)}。一方で創薬研究では、標的タンパク質に不可逆的に共有結合する薬物も数多く報告されている。特に近年では標的タンパク質の特定のアミノ酸残基のみを狙って合理的に設計された高度に選択的な不可逆性阻害剤も多数報告されており、そのうち複数の薬物が臨床現場で使用され、注目を集めている⁶⁶⁾。

可逆的なスローバインディング阻害剤も不可逆性阻害剤もどちらも時間依存的な阻害を示し、一時間点で算出した通常の生化学アッセイの IC_{50} 評価だけでは両者を明確に区別することは不可能である。前述の通り、スローバインディング阻害剤を平衡状態に達する前に測定してしまうと、その真の結合活性の過小評価につながってしまう。一方で、不可逆性阻害剤はどれほど弱い活性であっても、反応時間さえ長く取れば、すべての酵素を不可逆的に阻害するため、平衡状態での定量的な阻害活性の比較は不可能である。そのため同じ時間依存性阻害剤であっても、その作用機序に応じて最適な評価方法は異なるため、事前に速度論解析等を用いて結合作用機序を明らかにし、両者に適した評価方法を設定する必要がある。このように、強力で安全な薬物を設計しようとするリード最適化研究を正しく導くために、結合作用機序解析は重要な役割を果たす。

特に不可逆性阻害剤の最適化研究は、可逆性阻害剤とは最適化指標も最適化方針も異なることに注意する必要がある。不可逆性阻害剤には複数の阻害メカニズムが知られているが、最も汎用的に報告されているのが、例えばシステインに対するマイケルアクセプターのような反応性官能基を介した結合である。これらの薬物は特定のアミノ酸残基を通じて標的タンパク質を不可逆に阻害することが可能である反面、他のタンパク質の同じアミノ酸残基と反応する可能性を理論上否定はできない。有効で安全な不可逆性阻害剤を創出するためには、目的とする標的タンパク質への阻害活性を強めるだけでなく、他の分子の阻害を通じた予期せぬ毒性を回避する必要がある。そのためには、標的タンパク質に対する阻害活性を向上させる一方で、反応性官能基の化学反応性は維持または低下させていく方向に化合物を最適化することが望ましい。それはすなわち、標的分子のポケットの特定のアミノ酸残基に対する反応性 ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$) は向上させる一方、タンパク質表面に露出したアミノ酸残基に対する反応性 (k_{chem}) は維持または低下させるような化学修飾が必要になると言い換えることができる (図 4-4)。

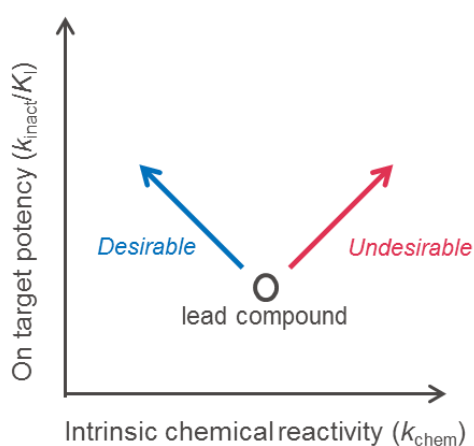


図 4-4、主活性 ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$) と化学反応性 (k_{chem}) の二次元の反応性を指標とした不可逆性阻害剤の最適化

本研究で提示した不可逆性阻害剤の活性指標の迅速な算出法は、主活性や選択性の定量的な評価に加えて、このようなアミノ酸残基に対する反応速度 (k_{chem}) の算出にも利用可能である (図 4-5)。本評価系ではチオールと不可逆的に共有結合すると蛍光を発するチオール基検出プローブと生体内のシステインの代替としてグルタチオンを用いる。このチオール基検出プローブと評価する不可逆性阻害剤とが競合的にグルタチオンに結合する競合的結合試験を考える。不可逆性阻害剤のグルタチオンに対する反応速度 (k_{chem}) は、この競合的結合試験における反応終了時の蛍光強度の IC_{50} から、第三章で導出した数式を用いて迅速に算出可能である (図 4-5)⁹²。この評価系により、新規に合成されるリード周辺化合物の主活性 (k_{inact}/K_I) と反応性 (k_{chem}) の二次元の構造-活性相関情報を提供することが可能になり、強力な主活性と他のタンパク質に対する低い反応性を両立した高度に選択的で安全な不可逆性阻害剤の合理的なデザインに貢献できると考えられる⁶⁶。

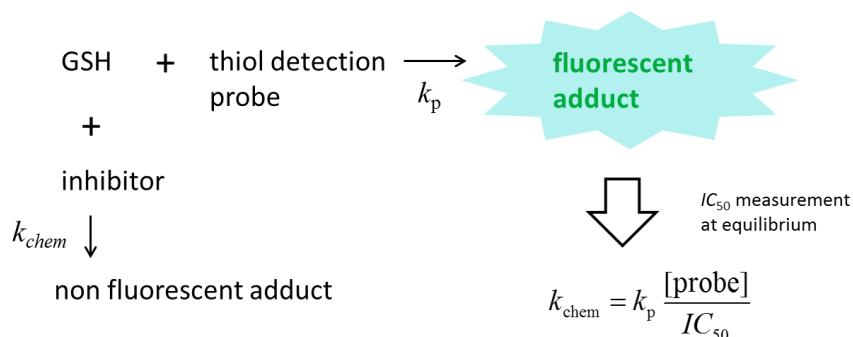


図 4-5、不可逆性阻害剤のチオール (グルタチオン; GSH) に対する反応性評価系

医薬品リード化合物の結合作用機序解析は定量的な活性指標を算出するモデルや手法の妥当な選択が可能になることに加えて、高度に最適化された阻害剤の生体での薬効予測においても重要な役割を果たす。*in vitro* アッセイ系は評価期間中に薬物濃度が変わらない閉鎖系であるのに対し、生体内は薬物濃度が経時的に変化する開放系である。上記のように高度に最適化された時間依存性阻害剤は、標的タンパク質への結合速度や標的からの解離時間が薬物動態の変化

や標的分子のターンオーバー等の時間軸と同程度もしくはそれより長い場合がある。そのため、生体内のような開放系において時間依存性阻害剤による標的タンパク質の占有率の時間変化を経時的に解析していくには、阻害剤の時間依存性結合の影響を加味する必要がある。これらの時間依存性阻害剤は、生体において血中での薬物の消失後もその遅い解離または不可逆的な結合により標的タンパク質の占有が継続する場合があります、その場合、血中から薬物が消失した後も薬理作用時間の延長が期待できる。これら時間依存性阻害剤の結合作用機序を *in vitro* アッセイを用いて事前に解析し、さらに生体での挙動を予測しうる速度論パラメーターを算出することは、生体での薬物動態・薬力学モデル (pharmacokinetic/pharmacodynamic model) の外挿性を高めることが期待される。これは生体での薬効の高精度予測に繋がり、低暴露で強い薬効を示す安全な薬物の創出に貢献することが期待される⁹¹。

スローバインディング阻害のメカニズムとしては、これまで複数の報告がある⁹。例えば、活性中心に存在する金属原子に強固に配位している水分子の置換が必要な場合、活性中心の金属原子に対し阻害剤の配位に時間がかかる場合、阻害剤の結合により構造変化が誘起されその構造変化に時間がかかる場合、などが報告されている。一般にスローバインディング阻害剤の合理的なデザインにはそのメカニズムの解明が必要であるが、これは阻害剤の結合速度論解析の結果と阻害剤とタンパク質の共結晶構造解析等の構造情報とを組み合わせることで、大きく前進すると考えられる。

これまで成功を収めていた逆薬理学的アプローチからの低分子創薬研究であるが、薬効不足や安全性懸念などからの成功確率の低下、さらに低分子で制御できる創薬標的分子の枯渇、研究開発費の高騰など、21世紀に入りその生産性の低下が大きな課題となっている^{93,94}。そのため、製薬企業はワクチンなどの予防医療や ES 細胞や iPS 細胞などを用いた再生医療、また核酸やペプチド、抗体などのバイオ医薬品など低分子化合物以外の医薬品に注力し始めている。さ

らに低分子創薬研究においても、逆薬理学的手法からの創薬だけではなく、患者由来の iPS 細胞などを使った新しいフェノタイプ評価系からの創薬研究にも再び注目が集まっている^{89,95}。このような状況ではハイスループットスクリーニング (HTS) からの逆薬理学的な探索研究の重要性は相対的に低下するかもしれない。

しかし、そのような状況下でも *in vitro* アッセイを用いた薬物の標的タンパク質に対する作用機序解析は依然として創薬研究でその役割を求められ続けると考えられる。薬物が低分子化合物でもバイオ医薬品などの高分子化合物でも、また表現型スクリーニングから発見されたものであっても、薬物は標的分子への結合を介して生体機能を調節していることに変わりはない。そのためその結合作用機序の理解は、より良い薬物へと改良していくリード最適化研究の大きな助けとなる。確かに表現形スクリーニングのヒット化合物の場合は、その標的分子の探索が必要である。しかし一旦その標的分子が同定されれば明確な構造-活性相関の取得や薬効メカニズムの解明が容易になるため、薬物の標的タンパク質が探索されることが一般的である。特に、細胞で顕著な活性を示す薬物は予期せぬ作用メカニズムを有することもあるため、表現形スクリーニングから得られた薬物こそ標的タンパク質の同定とその結合作用機序を解析しておくことが望ましい。

またバイオ医薬や再生医療などの発展があっても、低分子医薬品は依然として社会から必要とされ続けるはずである。先進国では高齢化社会を迎え、認知症などを始めとする中枢性疾患の治療薬が必要とされているが、これらの薬物は血液脳関門を通過して脳へと移行する必要がある。しかし現在の技術では高分子医薬品を脳へと届けることは実現されていないため、低分子性中枢薬は依然として必要とされ続けている。また注射が必要な高分子医薬品とは異なり、経口投与が可能な低分子化合物は服薬者の利便性改善や服薬コンプライアンス向上に寄与できる。さらに、高額な価格のため、医療費の圧迫が問題視されているバイオ医薬品に対して、低分子医薬品はその工業化や製造の容易さからコ

スト面で大いに競争力を有し、また特に開発途上国での医薬品アクセス改善への貢献も期待できるはずである。

今後も、医薬品は人々が健康に暮らしていくために必要なものであり続けるはずである。特に 21 世紀の日本では、高齢化が進み、医療・医薬品の重要性がますます大きくなっていくはずである。今後も生化学アッセイを用いた薬物の作用機序解析を進めることで、人々の健康に貢献する革新的な医薬品の創出に寄与することが期待される。

参考文献

1. Mann, C. C., and Plummer, M. L. (1994) アスピリン企業戦争—薬の王様 100 年の軌跡.
2. Bornstein, S. (1940) Action of Penicillin on Enterococci and Other Streptococci, *Journal of bacteriology* 39, 383-387.
3. Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S. A. (2005) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944, *Clinical orthopaedics and related research*, 3-6.
4. International Human Genome Sequencing, C. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature* 431, 931-945.
5. 田中千賀子, and 加藤隆一 (2011) *NEW 薬理学 改訂6 版*
6. Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective, *Science* 287, 1960-1964.
7. Bleicher, K. H., Bohm, H. J., Muller, K., and Alanine, A. I. (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening, *Nat Rev Drug Discov* 2, 369-378.
8. Macarron, R., Banks, M. N., Bojanic, D., Burns, D. J., Cirovic, D. A., Garyantes, T., Green, D. V., Hertzberg, R. P., Janzen, W. P., Paslay, J. W., Schopfer, U., and Sittampalam, G. S. (2011) Impact of high-throughput screening in biomedical research, *Nat Rev Drug Discov* 10, 188-195.
9. Copeland, R. A. (2005) Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists, *Methods Biochem Anal* 46, 1-265.
10. Swinney, D. C. (2004) Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success?, *Nat Rev Drug Discov* 3, 801-808.
11. Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol* 22, 3099-3108.
12. Barker, A. J., Gibson, K. H., Grundy, W., Godfrey, A. A., Barlow, J. J., Healy, M. P., Woodburn, J. R., Ashton, S. E., Curry, B. J., Scarlett, L., Henthorn, L., and Richards, L. (2001) Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11, 1911-1914.
13. Abe, H., Kikuchi, S., Hayakawa, K., Iida, T., Nagahashi, N., Maeda, K.,

- Sakamoto, J., Matsumoto, N., Miura, T., Matsumura, K., Seki, N., Inaba, T., Kawasaki, H., Yamaguchi, T., Kakefuda, R., Nanayama, T., Kurachi, H., Hori, Y., Yoshida, T., Kakegawa, J., Watanabe, Y., Gilmartin, A. G., Richter, M. C., Moss, K. G., and Laquerre, S. G. (2011) Discovery of a Highly Potent and Selective MEK Inhibitor: GSK1120212 (JTP-74057 DMSO Solvate), *ACS medicinal chemistry letters* 2, 320-324.
14. Wood, E. R., Truesdale, A. T., McDonald, O. B., Yuan, D., Hassell, A., Dickerson, S. H., Ellis, B., Pennisi, C., Horne, E., Lackey, K., Alligood, K. J., Rusnak, D. W., Gilmer, T. M., and Shewchuk, L. (2004) A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells, *Cancer research* 64, 6652-6659.
 15. Tian, W. X., and Tsou, C. L. (1982) Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier, *Biochemistry* 21, 1028-1032.
 16. Harizi, H., Corcuff, J. B., and Gualde, N. (2008) Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology, *Trends Mol Med* 14, 461-469.
 17. Hansson, G. K., and Hermansson, A. (2011) The immune system in atherosclerosis, *Nat Immunol* 12, 204-212.
 18. Wang, D., and Dubois, R. N. (2010) Eicosanoids and cancer, *Nat Rev Cancer* 10, 181-193.
 19. Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294, 1871-1875.
 20. Nakamura, M. T., and Nara, T. Y. (2004) Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases, *Annu Rev Nutr* 24, 345-376.
 21. Shanklin, J., and Cahoon, E. B. (1998) Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 611-641.
 22. Cho, H. P., Nakamura, M., and Clarke, S. D. (1999) Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase, *J Biol Chem* 274, 37335-37339.
 23. Wang, X., Lin, H., and Gu, Y. (2012) Multiple roles of dihomo-gamma-linolenic acid against proliferation diseases, *Lipids Health Dis* 11, 25.
 24. Fan, Y. Y., Monk, J. M., Hou, T. Y., Callway, E., Vincent, L., Weeks, B., Yang, P., and Chapkin, R. S. (2012) Characterization of an arachidonic acid-deficient (Fads1 knockout) mouse model, *J Lipid Res* 53, 1287-1295.

25. Obukowicz, M. G., Welsch, D. J., Salsgiver, W. J., Martin-Berger, C. L., Chinn, K. S., Duffin, K. L., Raz, A., and Needleman, P. (1998) Novel, selective delta6 or delta5 fatty acid desaturase inhibitors as antiinflammatory agents in mice, *J Pharmacol Exp Ther* 287, 157-166.
26. Baugh, S. D., Pabba, P. K., Barbosa, J., Coulter, E., Desai, U., Gay, J. P., Gopinathan, S., Han, Q., Hari, R., Kimball, S. D., Nguyen, H. V., Ni, C. Y., Powell, D. R., Smith, A., Terranova, K. M., Wilson, A., Yu, X. C., and Lombardo, V. K. (2015) Design, synthesis, and in vivo activity of novel inhibitors of delta-5 desaturase for the treatment of metabolic syndrome, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25, 3836-3839.
27. Swinney, D. C. (2011) Molecular Mechanism of Action (MMoA) in Drug Discovery, *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 46, 301-317.
28. Zhang, L., Ramtohul, Y., Gagne, S., Styhler, A., Wang, H., Guay, J., and Huang, Z. (2010) A multiplexed cell assay in HepG2 cells for the identification of delta-5, delta-6, and delta-9 desaturase and elongase inhibitors, *J Biomol Screen* 15, 169-176.
29. Obukowicz, M. G., Raz, A., Pyla, P. D., Rico, J. G., Wendling, J. M., and Needleman, P. (1998) Identification and characterization of a novel delta6/delta5 fatty acid desaturase inhibitor as a potential anti-inflammatory agent, *Biochem Pharmacol* 55, 1045-1058.
30. Moche, M., Shanklin, J., Ghoshal, A., and Lindqvist, Y. (2003) Azide and acetate complexes plus two iron-depleted crystal structures of the di-iron enzyme delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase. Implications for oxygen activation and catalytic intermediates, *J Biol Chem* 278, 25072-25080.
31. Constantinides, P. P., and Steim, J. M. (1985) Physical properties of fatty acyl-CoA. Critical micelle concentrations and micellar size and shape, *J Biol Chem* 260, 7573-7580.
32. Matsunaga, N., Suzuki, H., Asano, K., Tokuhara, H., Yamamoto, T., and Okamoto, R. (2012) Fused heterocyclic compound and application thereof, *WO2012011591*.
33. Copeland, R. A., Pompliano, D. L., and Meek, T. D. (2006) Drug-target residence time and its implications for lead optimization, *Nat Rev Drug Discov* 5, 730-739.
34. Cho, H. P., Nakamura, M. T., and Clarke, S. D. (1999) Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase, *J Biol Chem* 274, 471-477.

35. Tawa, P., Falgoutyret, J. P., Guiral, S., Isabel, E., Powell, D. A., Zuck, P., and Skorey, K. (2011) High-throughput scintillation proximity assay for stearoyl-CoA desaturase-1, *J Biomol Screen* 16, 506-517.
36. Man, W. C., Miyazaki, M., Chu, K., and Ntambi, J. M. (2006) Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1, *J Biol Chem* 281, 1251-1260.
37. Wang, H., Klein, M. G., Zou, H., Lane, W., Snell, G., Levin, I., Li, K., and Sang, B. C. (2015) Crystal structure of human stearoyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate, *Nature structural & molecular biology* 22, 581-585.
38. Bai, Y., McCoy, J. G., Levin, E. J., Sobrado, P., Rajashankar, K. R., Fox, B. G., and Zhou, M. (2015) X-ray structure of a mammalian stearoyl-CoA desaturase, *Nature* 524, 252-256.
39. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
40. Berman, J., Halm, K., Adkison, K., and Shaffer, J. (1997) Simultaneous pharmacokinetic screening of a mixture of compounds in the dog using API LC/MS/MS analysis for increased throughput, *J Med Chem* 40, 827-829.
41. Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
42. Lessene, G., Czabotar, P. E., and Colman, P. M. (2008) BCL-2 family antagonists for cancer therapy, *Nat Rev Drug Discov* 7, 989-1000.
43. Chène, P. (2003) Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy, *Nature reviews cancer* 3, 102-109.
44. Liu, J., Marino, M. W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A. J., Old, L., and Bernard, C. C. (1998) TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination, *Nature medicine* 4, 78-83.
45. Ishihara, K., and Hirano, T. (2002) IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease, *Cytokine & growth factor reviews* 13, 357-368.
46. Croft, M., Benedict, C. A., and Ware, C. F. (2013) Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies, *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 147-168.
47. Arkin, M. R., Glicksman, M. A., Fu, H., Havel, J. J., and Du, Y. (2004) Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats.
48. Wells, J. A., and McClendon, C. L. (2007) Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein–protein interfaces, *Nature* 450, 1001-1009.
49. Wilson, A. J. (2009) Inhibition of protein–protein interactions using designed molecules, *Chemical Society Reviews* 38, 3289-3300.

50. Mullard, A. (2012) Protein–protein interaction inhibitors get into the groove, *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 173-175.
51. van Delft, M. F., and Huang, D. C. (2006) How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis, *Cell Res* 16, 203-213.
52. Adams, J. M., and Cory, S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene* 26, 1324-1337.
53. Wei, G., Margolin, A. A., Haery, L., Brown, E., Cucolo, L., Julian, B., Shehata, S., Kung, A. L., Beroukhi, R., and Golub, T. R. (2012) Chemical genomics identifies small-molecule MCL1 repressors and BCL-xL as a predictor of MCL1 dependency, *Cancer Cell* 21, 547-562.
54. Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., Mc Henry, K. T., Pinchback, R. M., Ligon, A. H., Cho, Y. J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M. S., Weir, B. A., Tanaka, K. E., Chiang, D. Y., Bass, A. J., Loo, A., Hoffman, C., Prensner, J., Liefeld, T., Gao, Q., Yecies, D., Signoretti, S., Maher, E., Kaye, F. J., Sasaki, H., Tepper, J. E., Fletcher, J. A., Taberner, J., Baselga, J., Tsao, M. S., Demichelis, F., Rubin, M. A., Janne, P. A., Daly, M. J., Nucera, C., Levine, R. L., Ebert, B. L., Gabriel, S., Rustgi, A. K., Antonescu, C. R., Ladanyi, M., Letai, A., Garraway, L. A., Loda, M., Beer, D. G., True, L. D., Okamoto, A., Pomeroy, S. L., Singer, S., Golub, T. R., Lander, E. S., Getz, G., Sellers, W. R., and Meyerson, M. (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature* 463, 899-905.
55. Krajewska, M., Fenoglio-Preiser, C. M., Krajewski, S., Song, K., Macdonald, J. S., Stemmerman, G., and Reed, J. C. (1996) Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach, *Am J Pathol* 149, 1449-1457.
56. Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J. I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., and Reed, J. C. (1996) Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers, *Am J Pathol* 148, 1567-1576.
57. Akgul, C. (2009) Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer, *Cell Mol Life Sci* 66, 1326-1336.
58. Uetrecht, J. (2009) Immune-mediated adverse drug reactions, *Chem Res Toxicol* 22, 24-34.
59. Song, T., Li, X., Chang, X., Liang, X., Zhao, Y., Wu, G., Xie, S., Su, P., Wu, Z., and Feng, Y. (2012) 3-thiomorpholin-8-oxo-8H-acenaphtho [1, 2-b] pyrrole-9-carbonitrile (S1) derivatives as pan-Bcl-2-inhibitors of Bcl-2, Bcl-x<

- sub> L</sub> and Mcl-1, *Bioorganic & medicinal chemistry*.
60. Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., and Hajduk, P. J. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature* 435, 677-681.
 61. Giannetti, A. M., Koch, B. D., and Browner, M. F. (2008) Surface plasmon resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors, *J Med Chem* 51, 574-580.
 62. Friberg, A., Vigil, D., Zhao, B., Daniels, R. N., Burke, J. P., Garcia-Barrantes, P. M., Camper, D., Chauder, B. A., Lee, T., Olejniczak, E. T., and Fesik, S. W. (2013) Discovery of potent myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) inhibitors using fragment-based methods and structure-based design, *J Med Chem* 56, 15-30.
 63. Khanna, M., Chen, C. H., Kimble-Hill, A., Parajuli, B., Perez-Miller, S., Baskaran, S., Kim, J., Dria, K., Vasiliou, V., Mochly-Rosen, D., and Hurley, T. D. (2011) Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases, *J Biol Chem* 286, 43486-43494.
 64. Walensky, L. D., Stewart, M. L., and Cohen, N. (2011) Small molecules for the modulation of mcl-1 and methods of modulating cell death, cell division, cell differentiation and methods of treating disorders
 65. Johnson, D. S., Weerapana, E., and Cravatt, B. F. (2010) Strategies for discovering and derisking covalent, irreversible enzyme inhibitors, *Future Med Chem* 2, 949-964.
 66. Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A., and Whitty, A. (2011) The resurgence of covalent drugs, *Nat Rev Drug Discov* 10, 307-317.
 67. Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzflaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksoz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., Birchmeier, W., Lehrach, H., and Wanker, E. E. (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome, *Cell* 122, 957-968.
 68. Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G. P., and Xie, B. (2009) HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications, *Current chemical genomics* 3, 22-32.
 69. Blat, Y. (2010) Non-competitive inhibition by active site binders, *Chem Biol Drug Des* 75, 535-540.
 70. Rishton, G. M. (1997) Reactive compounds and in vitro false positives in HTS,

- Drug Discovery Today* 2, 382-384.
71. Scheuermann, T. H., Li, Q., Ma, H. W., Key, J., Zhang, L., Chen, R., Garcia, J. A., Naidoo, J., Longgood, J., Frantz, D. E., Tambar, U. K., Gardner, K. H., and Bruick, R. K. (2013) Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules, *Nature chemical biology* 9, 271-276.
 72. Gorczynski, M. J., Grembecka, J., Zhou, Y., Kong, Y., Roudaia, L., Douvas, M. G., Newman, M., Bielnicka, I., Baber, G., Corpora, T., Shi, J., Sridharan, M., Lilien, R., Donald, B. R., Speck, N. A., Brown, M. L., and Bushweller, J. H. (2007) Allosteric inhibition of the protein-protein interaction between the leukemia-associated proteins Runx1 and CBFbeta, *Chemistry & biology* 14, 1186-1197.
 73. Tanaka, Y., Aikawa, K., Nishida, G., Homma, M., Sogabe, S., Igaki, S., Hayano, Y., Sameshima, T., Miyahisa, I., Kawamoto, T., Tawada, M., Imai, Y., Inazuka, M., Cho, N., Imaeda, Y., and Ishikawa, T. (2013) Discovery of Potent Mcl-1/Bcl-xL Dual Inhibitors by Using a Hybridization Strategy Based on Structural Analysis of Target Proteins, *J Med Chem* 56, 9635-9645.
 74. Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A. C., and Reed, J. C. (2006) Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins, *Cell death and differentiation* 13, 1419-1421.
 75. Krippendorff, B. F., Neuhaus, R., Lienau, P., Reichel, A., and Huisinga, W. (2009) Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values, *J Biomol Screen* 14, 913-923.
 76. Leung, D., Hardouin, C., Boger, D. L., and Cravatt, B. F. (2003) Discovering potent and selective reversible inhibitors of enzymes in complex proteomes, *Nat Biotechnol* 21, 687-691.
 77. Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Gale, C. M., Lifshits, E., Gonzales, A. J., Shimamura, T., Zhao, F., Vincent, P. W., Naumov, G. N., Bradner, J. E., Althaus, I. W., Gandhi, L., Shapiro, G. I., Nelson, J. M., Heymach, J. V., Meyerson, M., Wong, K. K., and Janne, P. A. (2007) PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib, *Cancer Res* 67, 11924-11932.
 78. Zhou, W., Ercan, D., Chen, L., Yun, C. H., Li, D., Capelletti, M., Cortot, A. B., Chirieac, L., Iacob, R. E., Padera, R., Engen, J. R., Wong, K. K., Eck, M. J., Gray, N. S., and Janne, P. A. (2009) Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M, *Nature* 462, 1070-1074.
 79. Brown, G. R., Bamford, A. M., Bowyer, J., James, D. S., Rankine, N., Tang, E.,

- Torr, V., and Culbert, E. J. (2000) Naphthyl ketones: a new class of Janus kinase 3 inhibitors, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 10, 575-579.
80. Swinney, D. C., Xu, Y. Z., Scarafia, L. E., Lee, I., Mak, A. Y., Gan, Q. F., Ramesha, C. S., Mulkins, M. A., Dunn, J., So, O. Y., Biegel, T., Dinh, M., Volkel, P., Barnett, J., Dalrymple, S. A., Lee, S., and Huber, M. (2002) A small molecule ubiquitination inhibitor blocks NF-kappa B-dependent cytokine expression in cells and rats, *J Biol Chem* 277, 23573-23581.
81. Hynes, N. E., and Lane, H. A. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors, *Nat Rev Cancer* 5, 341-354.
82. Smail, J. B., Rewcastle, G. W., Loo, J. A., Greis, K. D., Chan, O. H., Reyner, E. L., Lipka, E., Showalter, H. D., Vincent, P. W., Elliott, W. L., and Denny, W. A. (2000) Tyrosine kinase inhibitors. 17. Irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor: 4-(phenylamino)quinazoline- and 4-(phenylamino)pyrido[3,2-d]pyrimidine-6-acrylamides bearing additional solubilizing functions, *J Med Chem* 43, 1380-1397.
83. Gajiwala, K. S., Feng, J., Ferre, R., Ryan, K., Brodsky, O., Weinrich, S., Kath, J. C., and Stewart, A. (2013) Insights into the aberrant activity of mutant EGFR kinase domain and drug recognition, *Structure* 21, 209-219.
84. Morrison, J. F. (1969) Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors, *Biochimica et biophysica acta* 185, 269-286.
85. Schwartz, P. A., Quinn, J. G., and Hixon, M. S. (2014) In *36th Steenbock Symposium*.
86. Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9112-9117.
87. Kahl, S. D., Sittampalam, J., and Weidner, J. (2012) Calculations and Instrumentation used for Radioligand Binding Assays, In *Assay Guidance Manual* (Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P. W., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Peltier, J. M., Riss, T., Trask, J., O. J. , and Weidner, J., Eds.).
88. Aertgeerts, K., Skene, R., Yano, J., Sang, B. C., Zou, H., Snell, G., Jennings, A., Iwamoto, K., Habuka, N., Hirokawa, A., Ishikawa, T., Tanaka, T., Miki, H., Ohta, Y., and Sogabe, S. (2011) Structural analysis of the mechanism of inhibition and

- allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein, *J Biol Chem* 286, 18756-18765.
89. Swinney, D. C., and Anthony, J. (2011) How were new medicines discovered?, *Nat Rev Drug Discov* 10, 507-519.
 90. Copeland, R. A. (2010) The dynamics of drug-target interactions: drug-target residence time and its impact on efficacy and safety, *Expert opinion on drug discovery* 5, 305-310.
 91. Copeland, R. A. (2016) The drug-target residence time model: a 10-year retrospective, *Nat Rev Drug Discov* 15, 87-95.
 92. Sameshima, T., Miyahisa, I., Yamasaki, S., Gotou, M., Kobayashi, T., and Sakamoto, J. (2016) *manuscript in preparation*.
 93. Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H., and Warrington, B. (2012) Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency, *Nat Rev Drug Discov* 11, 191-200.
 94. Munos, B. (2009) Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation, *Nat Rev Drug Discov* 8, 959-968.
 95. Eder, J., Sedrani, R., and Wiesmann, C. (2014) The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution, *Nat Rev Drug Discov* 13, 577-587.

発表論文

- 1) Sameshima, T.*, Miyahisa, I.*, Homma, M., Aikawa, K., Hixon, M. S., Matsui, J.
A simple and widely applicable hit validation strategy for protein-protein interaction inhibitors based on a quantitative ligand displacement assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**(24):5836–9 (2014). *These authors contributed equally to this work.
- 2) Miyahisa, I., Sameshima, T., Hixon, M. S.
Rapid Determination of the Specificity Constant of Irreversible Inhibitors (k_{inact}/K_i) by Means of an Endpoint Competition Assay. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**(47):14099–102 (2015).
- 3) Miyahisa, I., Suzuki, H., Mizukami, A., Tanaka, Y., Ono, M., Hixon, M. S., Matsui, J.
T-3364366 Targets the Desaturase Domain of Delta-5 Desaturase with Nanomolar Potency and a Multihour Residence Time. *ACS Med. Chem. Lett.*, **7**(9):868–72 (2016).

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、本論文を提出する機会を与えていただき、有益なご助言ならびに温かいご指導ご鞭撻を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科教授、大西康夫博士に心より感謝申し上げます。大西先生には、筆者の東京大学農学部及び農学生命科学研究科醗酵学研究室在籍中より、生化学解析のなど研究面はもちろんのこと、様々な場面でのご指導、ご助言、励ましのお言葉をいただきました。深く感謝いたします。

本論文の執筆にあたり、貴重なご指導とご助言を頂いた東京大学院農学生命科学研究科教授、清水謙多郎博士、同教授、吉田稔博士、同教授、伏信進矢博士、同講師、勝山陽平博士に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、直接の上司としてご指導ご鞭撻を賜りました武田薬品工業株式会社医薬研究本部、松井純二氏に厚く御礼申し上げます。また著者を速度論解析の道に導き、本研究の実施に対して直接のご指導ならびに叱咤激励を頂きました武田カリフォルニア株式会社、マーク S. ヒクソン博士に心より感謝致します。

本研究の共同研究者であり、実験データの取得および解析にご協力頂きました武田薬品工業株式会社医薬研究本部、鮫島知哉博士、本間実咲博士、合川勝二氏、鈴木英夫博士、水上温司氏、田中友喜哉氏、小野みどり氏に深く感謝致します。また本研究を遂行するにあたりご協力いただきました武田薬品工業株式会社の同僚の皆様、特にデルタ 5 デサチュラーゼプロジェクト、Bcl-xL/Mcl-1 プロジェクト、および不可逆性阻害剤プロジェクトの各メンバーの皆様、また生物分子研究所の皆様にお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたりご指導とご理解を頂きました武田薬品工業株式会社医薬研究本部、樽井直樹博士、坂本潤一氏にお礼申し上げます。また有益な

ご助言ならびに温かいご指導を頂きました武田薬品工業株式会社医薬研究本部、岩田英久博士に心より感謝致します。

末筆ながら、著者の研究活動を支えてくれたメンター、友人、家族に心から感謝致します。