

【目的】 本研究の目的は、共有結合阻害剤（コバレントドラッグ）に有用な新しい有機反応化学を開拓し、これを活用して標的選択性に優れたコバレントドラッグの創出に貢献する事である。特に本研究では、これまでにない反応阻害様式を実現できるコバレントドラッグの創薬有機化学を提案し実証する。さらに、これらの反応化学を取り入れた薬剤分子設計に基づいて、副作用のない安全性の高いコバレントドラッグの創出を目指す。

【方法】 我々は、コバレントドラッグの創薬有機化学の確立を目指し、従来のコバレントドラッグとは異なる新しい反応化学（阻害モード）を提案、これを実現できる一連の反応化学の開発を進めている。本研究では、① 可逆反応性を持つ新しい反応基の開発と創薬応用、② 標的タンパク質を切断するコバレントドラッグの開発を目指して研究を進め、コバレントドラッグのための新しい反応化学の拡大を目指した。①については、リジン残基に対して可逆反応性を持つ反応基としてフルオロビニルスルホン（FVS）基を用いた反応化学の検討、②についてはシステイン残基のホルミル化によるタンパク質主鎖の切断反応について検討を進めた。

【結果】 ① リジン残基に対して可逆反応性を持つ新しい反応基の開発と創薬応用：リジン残基を標的とした可逆的反応基としてβ-フルオロビニルスルホン（FVS）の検討を行った。FVS 誘導体の *N*-アセチルリジンに対する反応性評価を行ったところ、スルホニル基のβ位の置換基が反応性に影響を与えることが確認された。また、これらのアミン付加体は、中性水溶液中では2時間ほどで付加体が加水分解される可逆性を示す事を明らかとした。次に上皮成長因子受容体（EGFR）のATP結合ポケット内に存在するLys745を狙ったEGFR阻害剤の開発を試みた。既存のEGFR阻害剤であるerlotinibの骨格を鋳型にFVS基を導入したプローブを設計し、C797S変異型EGFRと反応させたところラベル化反応が進行したことが確認された。さらにFVSの適用範囲の拡大を目的として、親水環境にあるリジン残基（K58）を有するヒートショックプロテイン90（Hsp90）を標的したFVS基を有するコバレントリガンドをデザインした。その結果、細胞内でFVSプローブがHsp90と共有結合を形成することをgel-based ABPPを用いて明らかとした。② システイン残基のホルミル化によるタンパク質主鎖切断法の開発：本研究では、ペプチド鎖の切断反応を簡便に評価する蛍光アッセイ法を構築して、システイン残基を修飾するアシル化剤を用いて切断効率を評価した。その結果、システイン残基のホルミル化が効率よくタンパク質のアミド結合を切断することを見出した。ペプチド配列については、アスパラギン酸（Asp）やアスパラギン（Asn）を有するDCやNC配列でS-ホルミル化後の切断反応の効率が大きく向上することを明らかにした。また、S-ホルミル化分子の構造について検討を行った結果、ホルミル基周辺に嵩高い置換基を導入することで、高い水中安定性とシステイン選択性を示すS-ホルミル化分子を見出す事に成功した。次にシステインを有するペプチドタグを融合したMBPタンパク質に対して、S-ホルミル化分子を有する亜鉛錯体プローブを用いた切断を検討した。その結果、ペプチドタグと亜鉛錯体プローブとの相互作用に依存して、低濃度（25 μM）のプローブ添加を用いて効率よくペプチドタグが切断されることを明らかとした。本研究により見出したシステインホルミル化による切断反応は、触媒量の試薬、穏やかな中性、室温条件で進行する生体適合性の高い新たな反応である。

(a) FVS 基によるタンパク質リジンの可逆的ラベル化、(b) システイン残基ホルミル化によるタンパク質切断反応

