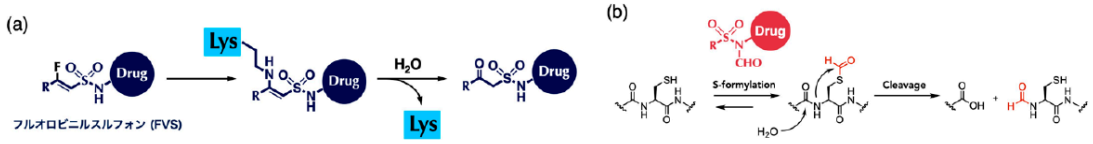
6　コバレントドラッグのための創薬有機化学の開拓	王子田　彰夫

【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



6. コバレントドラッグのための創薬有機化学の開拓

王子田　彰夫

九州大学 大学院薬学研究院 創薬ケミカルバイオロジー分野

Key words：コバレントドラッグ，タンパク質，不可逆阻害

緒　言

タンパク質と反応して、その機能を不可逆的に阻害するコバレントドラッグは、強く持続する薬効を発揮できる優れた特性を有する。その一方でコバレントドラッグは、標的以外のオフターゲットタンパク質や他の生体成分と非特異的に反応することで副作用を引き起こす可能性を持つ。このような背景から、製薬企業でのコバレントドラッグ開発は長年にわたり避けられる傾向にあった。ところが、この十年程度の間に、標的タンパク質と特異的に反応できる緻密に分子デザインされた新しいタイプのコバレントドラッグの開発が進められている（Figure 1）。それらは targeted covalent inhibitor（TCI）と呼ばれ、特にがん治療の領域において研究開発が盛んである。この背景の下で我々は、標的特異性に優れ、副作用を起こさない安全な TCI を開発するためには、コバレントドラッグに適した新しい有機反応化学の開拓が重要であると考えた。

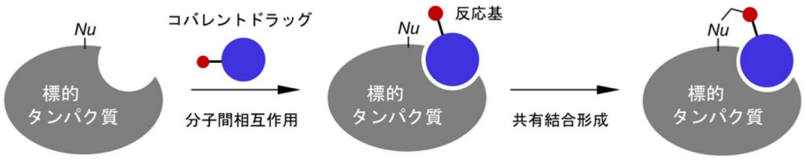


Figure 1. Schematic illustration of f targeted protein modification by covalent drug.

上記の考えに基づいて我々は、TCI に導入する新しい反応基の探索と細胞内での機能評価を行うコバレントドラッグのケミカルバイオロジー研究をこれまでに進めてきた。その成果として我々は、最近、コバレントドラッグの新しい反応基としてα−クロロフルオロアセタミド（CFA）を見出すことに成功した［1］。この研究において我々は、CFA 基を有するコバレントドラッグ NS-062 が標的のプロテインキナーゼである EGFR に対して極めて高い特異性で反応し、強い阻害活性を有することを ABPP 解析や質量分析を用いたケミカルプロテオミクス等の手法を用いて明らかとした。その標的 EGFR 選択性は既存のマイケルアプターを持つアファチニブよりもはるかに高いものであった。

本研究では、CFA 基を応用したコバレントドラッグ開発の経験に基づいて、様々な標的タンパク質の不可逆阻害を実現できる新しい反応化学の開拓を目指す。例えば CFA 基はシステイン残基と選択的に反応するが、リジンやチロシン残基と反応する反応基はコバレントドラッグの応用範囲を格段に広げることを可能とする。また、標的タンパク質との可逆反応、アミノ酸主鎖の切断など、これまでにない阻害様式を実現できる反応基の開発を目指す。これらの反応特性は、標的タンパク質に対する特異性の向上、これまで困難とされてきたタンパク質−タンパク質間相互作用の阻害、標的になりにくい undruggable なタンパク質に対するコバレントドラッグの創出に高い有用性を持つと期待できる。

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として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 標的タンパク質を切断するコバレントドラッグの開ではシステイン残基のホルミル化によるアミド主鎖の切断反応について検討を進めた。

結果および考察

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。まず FVS 誘導体のグルタチオンと *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や選択性に影響を与えることを明らかとした（Table 1）。また、これらのアミン付加体の水中あるいは疎水環境における安定性を評価した結果、疎水環境において非常に安定である一方で、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ことが判明した（Table 2）。この結果より、タンパク質ポケット内部の疎水環境のリジン残基を標的とする事で非特異反応の抑制が期待できた。

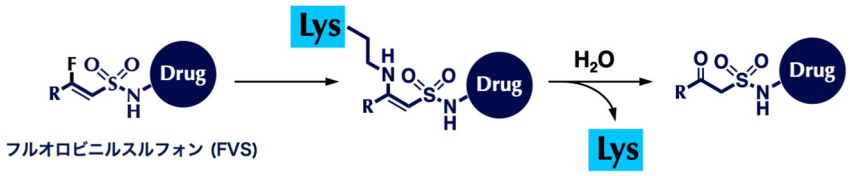


Table 1. Summary of reactivity of FVS derivatives toward GSH and N-Ac-Lys.

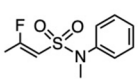
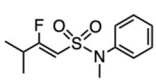
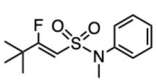
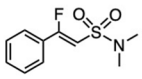
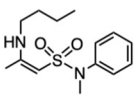
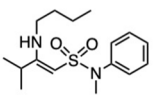
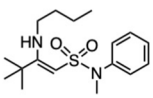
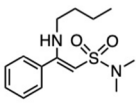
				
Lys $t_{1/2}$ (hr)	2.31	10.6	>100	8.1
GSH $t_{1/2}$ (hr)	4.86	11.4	66.9	4.3
GSH / Lys	2.10	1.08	< 1.0	0.53

Table 2. Summary of stability of FVS-amine adducts under aqueous and lipophobic condition.

				
aqueous stability $t_{1/2}$ (hr)	< 0.5	0.86	< 0.5	1.45

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。非小細胞肺がんの治療標的である EGFR に対して Cys797 を狙ったコバレントドラッグが上市されているが、近年それらに耐性を持つ C797S 変異 EGFR の発現が問題になっている。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 **FVS-6** を設計し、C797S 変異型 EGFR と反応させた（Figure 2）。Gel-based ABPP の結果、Cys797 を標的とした既存の阻害剤が **FVS-6** をラベル化しなかった一方で、FVS プローブが EGFR をラベル化したことが確認された。

次に FVS の適用範囲の拡大を目的として、親水環境のリジン残基を標的とした阻害剤への応用を試みた。ヒートショックプロテイン 90（Hsp90）は様々な癌関連タンパク質の発現を制御するタンパク質であり、創薬標的として注目されている。その可逆阻害剤である PU-H71 の構造を鋳型に Hsp90 のリジン 58 を狙った FVS プローブ **FVS-14** を設計した。SKBR3 細胞内を **FVS-14** で処理し gel-based ABPP 解析を行った結果、Hsp90 がラベル化されている事を確

認できた（Figure 3）。また、ラベルの形成後に **FVS-14** を除去して経時変化を追跡したところ、**FVS-14** による Hsp90 のラベル化が徐々に解消されていることが確認され、細胞内においても FVS プローブによる反応が可逆的であることが示された。この結果は、FVS がタンパク質表面のリジン残基を標的にできる事を示しており、今後にタンパク質間相互作用を阻害するコバレント阻害剤開発への応用が期待できる。

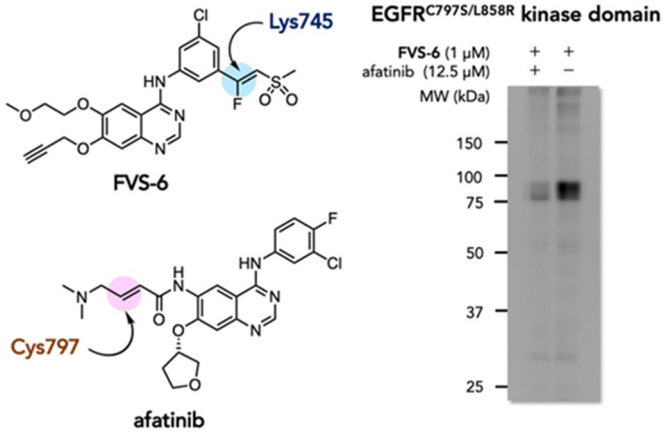


Figure 2. Chemical labeling of EGFRC797S/L858R kinase domain.

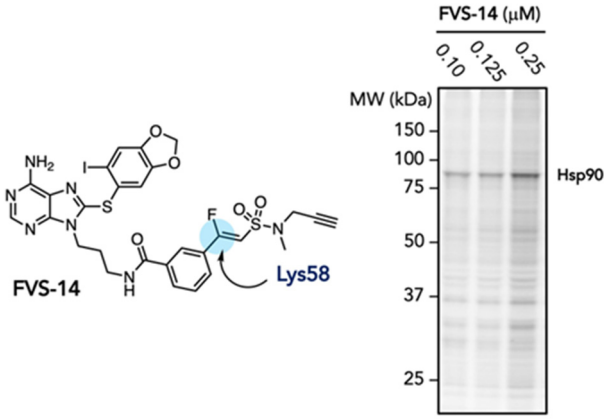


Figure 3. Chemical labeling of Hsp90 in SKBR3 cells.

2. 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の開発

本研究では、まず初めにシステインを有するペプチドを設計し、ペプチド主鎖のアミド結合の切断反応を簡便に評価する蛍光アッセイ系を構築した（Figure 4）。このアッセイ系を用いて複数のアシル化剤について切断反応を評価したところ、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。本切断反応については、HPLC や ESI-MS を用いた解析によって、Figure 4 に示す反応機構で切断が進行することを明らかにした。また、システインの隣に様々なアミノ酸残基（-X_{aa}C-）を有するモデルペプチドを用いて配列選択性を評価したところ、アスパラギン酸（Asp）やアスパラギン（Asn）を有する DC 配列、NC 配列で S-ホルミル化後の切断効率が大きく向上することを明らかにした。

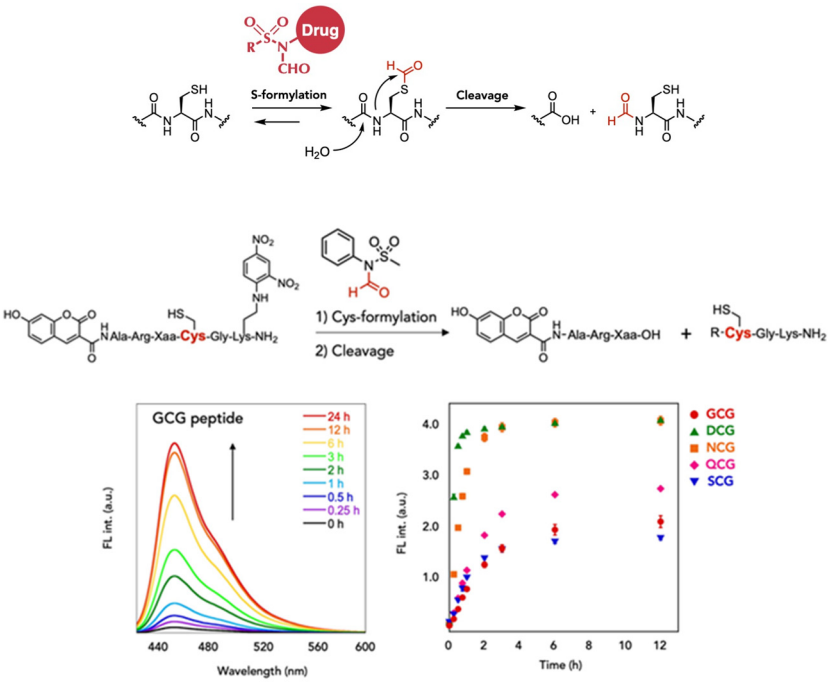
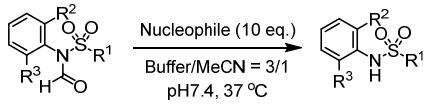


Figure 4. Peptide cleavage by S-formylation.

次に S-ホルミル化分子の構造について検討を行った。その結果、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（Table 3）。Cys 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-ホルミル化分子を導入した亜鉛錯体プローブを用いて切断反応を検討した（Figure 5）。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）のプローブ添加によっ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。また、蛍光ペプチドを用いた場合と同様に、GC 配列よりも NC や DC 配列について高効率で切断反応が進行する結果を得ることができた。一方で S-ホルミル化後の切断反応時にチオール種を添加することで、切断効率が大きく向上することを明らかとした（Figure 6）。HPLC や ESI-MS を用いた解析によって、この切断反応の加速は、チオール種のアミドカルボニル基への求核攻撃により引き起こされていることを明らかとした。この切断加速反応を利用することで、切断により生じたタンパク質の N 末端を蛍光色素などの人工分子によりラベル化できる事を明らかにした。

Table 3. Aqueous stability and Reactivity of N-Formyl sulfonanilide derivative toward GSH.



	Structure			Nucleophile: $t_{1/2}$ (h)	
	R^1	R^2	R^3	GSH	Nu (-)
16	Me	H	H	< 0.10	1.02
19	Me	Me	H	0.31	1.68
20	Me	Me	Me	2.98	16.1
21	^{i}Pr	H	H	0.16	4.01
22	^{t}Bu	H	H	0.15	6.63
23	^{t}Bu	Me	H	1.47	37.2
24	^{t}Bu	Me	Me	20.9	> 48

Conditions: [S-formyl reagent] = 0.1 mM, [Nucleophile] = 1 mM, 100 mM sodium phosphate, 25% MeCN, pH 7.4, 37 °C.

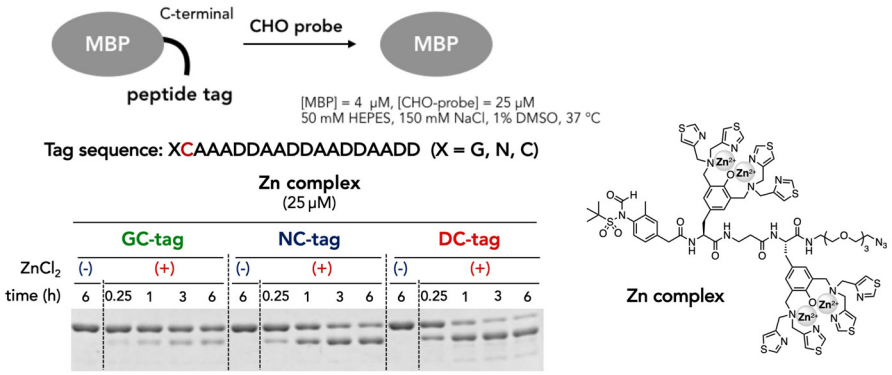


Figure 5. Chemical cleavage of tag-fused MBP proteins by the Zn(II)-complex CHO probe.

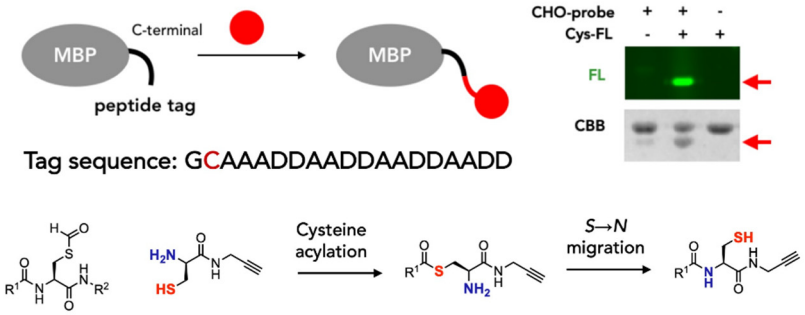


Figure 6. Protein modification upon S-formylation-induced protein cleavage.

従来、タンパク質主鎖の切断反応は、過剰量のシアノ化剤やニッケル錯体を用いた報告があるのみであり、それらの生体適合性は極めて低いものであった。今回、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。後は、細胞膜に存在するタンパク質切断による機能制御に応用し、本反応の有用性を明らかにして行きたいと考えている。

文　献

1) Shindo N., Fuchida H., Sato H., Watari K., Shibata T., Kuwata K., Miura C., Okamoto K., Hatsuyama Y., Tokunag K., Sakamoto S., Morimoto S., Abe Y., Shiroishi M., Caaveiro JMM., Ueda T., Tamura T., Matsunaga N., Nakao T., Koyanagi S., Ohdo S., Yamaguchi Y., Hamachi I., Ono M., Ojida A.. Selective and Reversible Modification of Kinase Cysteines with Chlorofluoroacetamides, Nature Chem. Biol. 2019, 15, 250-258, PMID: 30643284, DOI: 10.1038/s41589-018-0204-3.