氏名（本籍）	判谷　理恵
学位の種類	博　士（　生命農学　）
学位記番号	博　甲　第　　10040　　号
学位授与年月日	令和　3　年　3　月　25　日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査学術院	理工情報生命学術院
学位論文題目	High-throughput screeningにおける高質な医薬品候補化合物選抜のための生物物理評価に関する研究
主査	筑波大学教授　理学博士　繁森　英幸
副査	筑波大学准教授　博士（理学）　山田　小須弥
副査	筑波大学准教授　博士（農学）　春原　由香里
副査	筑波大学准教授　博士（農学）　宮前　友策

論　文　の　要　旨

本論文で著者は、創薬において用いられている多種類の化合物ライブラリーをスクリーニングするhigh throughput screening（HTS）のスピード向上のため、HTSの高質な医薬品候補化合物を短期間に見出す手法を確立した。これまでHTSのほとんどは生物物理手法によるターゲットエンゲージメントを実施しないのが一般的であったが、水溶液中で凝集体を形成してターゲット分子を阻害するpromiscuous binderが生化学アッセイでは排除が難しいことからこれらを除くために、著者はSurface plasmon resonance（SPR）法を用いることを検討した。

第1章で著者は、脂質異常症やアテローム性動脈硬化治療のターゲットと考えられているphospholipid transfer protein（PLTP）に対するHTSを構築した。これまでこのようなHTSの報告はなく、高質な医薬品候補化合物を見出すために通常HTSでは用いない血漿を酵素源として26万化合物のHTSを実施した。しかしながら、血漿中には複数のタンパク質が存在するため、ターゲットに対する候補化合物の特異的な結合の確認は重要と考えられたため、著者は新たにSPR評価系を確立することで候補化合物compound **1**および**2**を見出し、これらの化合物が精製PLTPに1:1結合することを明らかにした。これまでPLTPに対する低分子化合物のSPR評価の報告はなく、著者の開発した本手法はPLTPの阻害剤探索に有用な手法と考えられる。また、compound **1**および**2**はHepG2細胞においてapoB分泌を阻害し、またファミリータンパク質のcholesteryl ester transfer protein（CETP）を阻害しなかったことから、脂質異常症の治療薬開発に有用であることを見出した。

第2章で著者は、Th2細胞のシグナル伝達やTh17細胞の分化ならびにIL-17Aの産生に重要な役割を果たすキナーゼinterleukin-2-inducible T-cell kinase（ITK）の触媒部位は構造類似性が高いことから、より高選択的で高質な医薬品候補化合物を選抜するために不活性構造の安定化を評価するスクリーニング系を新たに構築した。一次スクリーニングでは、脱リン酸した全長ITK（不活性構造）を用いて39万化合物のHTSを実施し、ITKに対してIC_{50}値が10 μM以下で，FLT3(D835Y)（活性構造）に対して5倍の選択性を示す化合物を選抜した。次に、

脱リン酸したITKキナーゼドメインに対する化合物のSPR結合評価を行い、非特異的に作用する化合物を排除した。さらに、ITKの不活性構造を安定化する化合物を効率的に絞り込むため、著者はタンパク質の構造変化を高速で検出する蛍光バイオセンサーおよびSecond-harmonic generation（SHG）評価系を新たに構築した。しかしながら、蛍光バイオセンサー法の不利点は化合物の自家蛍光が検出に干渉することである。そこで著者は、既存のITK結晶構造から活性構造と不活性構造で動きが大きいαC-helixの1か所をcysteineに置換した変異体をアクリロダンで蛍光標識した。ツール化合物と蛍光標識タンパク質をインキュベーションした後、蛍光スペクトルを測定した結果、ITKを不活性構造に安定化するBMS-509744とcompound 9を選抜したことから、本評価法により活性型と不活性型阻害剤が判別可能であることを見出した。一方、SHG法は蛍光標識したタンパク質を固定化して蛍光分子の角度変化を測定することによりタンパク質の構造変化を検出できることから、著者はITKのαC-helixを蛍光分子のSHG2-maleimideでラベルし、ツール化合物とインキュベーションしてNi/NTA二重膜表面に固定化してSHGシグナルを測定した。その結果、活性構造阻害剤のSHGシグナルは高値で不活性構造阻害剤は低値を示したことから両者を見分けることに成功した。そこで、構築した蛍光バイオセンサー法あるいはSHG法により医薬品候補化合物としてJ-13, J-31およびJ-95を選抜した。これらの化合物はキナーゼパネル評価において高い選択性を示したことから、蛍光バイオセンサー法とSHG法は共に、ITKを不活性構造に安定化する化合物の取得に有効であることを見出した。

審　査　の　要　旨

本論文で著者は、PLTPについてはpromiscuous binderの排除に効果的と考えられる血漿を酵素源としたHTSを構築し、さらにSPR結合評価を実施して短期間に高質な医薬品候補化合物を見出すことに成功した。また、ITKについては精製酵素を用いたHTSにSPR結合評価とタンパク質の構造変化検出系を組み入れることで高選択的で高質な医薬品候補化合物を見出すことに成功した。したがって、本研究によって得られたPLTPとITKの医薬品候補化合物選抜法の知見が、様々な創薬ターゲットに対するHTS医薬品候補化合物探索ストラテジーの構築と治療薬の開発につながるものと期待される。したがって、本研究成果は創薬探索研究に関する生命科学の発展に大いに寄与するものと思われる。

令和　3年 1月 19日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生命農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。