

2021 年口頭発表

P01. High Throughput MALDI-TOF MS を利用した Whole cell MS 測定および解析手法の検討

三浦 早苗 (第一三共 RD ノバーレ株式会社 生物評価研究部 HTS グループ)

MALDI-TOF MS は適用分子量範囲が比較的広く、また、組織や細胞のようなクルードなサンプルの測定に強いという特徴を持つ。近年、MALDI-TOF MS 装置の高速化により、ラベルフリーの創薬スクリーニング手法としての活用が進みつつある。本発表では、分画や抽出などの操作を行わず、簡便な前処理でハイスループットに細胞を測定する手法について紹介する。具体的には、MS スペクトルから得られたピークリストを多変量解析し (MS fingerprint 解析)、細胞株の種類の識別や iPS 細胞の分化過程のモニタリングが可能であることを示した。また、個別ピークの解析例としてヒストンに着目し、修飾状態の変化を検出することで化合物評価が可能であることを示した。

P02. ラッサウイルスの細胞侵入阻害薬の探索

武長 徹 (京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 微細構造ウイルス学分野)

アレナウイルス科に属するラッサウイルスは、西アフリカで流行するヒトに致死的なラッサ熱の原因ウイルスである。しかし、ラッサ熱に対する治療法や予防法は存在しない。本研究では、バイオセーフティレベル 3 (BSL-3) 実験室で取り扱い可能なラッサウイルスの表面糖タンパク質 GP を持つシュードタイプウイルスや低病原性のアレナウイルスであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスを用いてスクリーニングを行い、P 糖タンパク質阻害剤である CP100356 塩酸塩がこれらの細胞侵入を効果的に阻害することを見出した。さらにフィリップ大学マールブルク (ドイツ) の BSL-4 実験室でその効果を評価し、ラッサウイルスの増殖を効果的に阻害することを確認した。これらの結果は、CP100356 塩酸塩がラッサ熱に対する抗ウイルス薬となりうることを示している。

P03. Sirtuin 活性検出蛍光プローブ群の開発と脱ミリスチル化活性阻害剤探索への応用

川口 充康 (名古屋市立大学大学院薬学研究科)

Sirtuin は NAD⁺ 依存的ヒストン脱アセチル化酵素であり、様々なタンパク質のリシン残基側鎖を脱アセチル化する。近年では SIRT1-3, 6 は脱ミリスチル化をも制御することが明らかとなった。特に SIRT2 の脱ミリスチル化活性は、K-Ras4a の局在変化を介しがん細胞の形質転換に関与する。本研究では、1 段階 SIRT プローブ SFP3 を基に構造展開することで、高感度な蛍光プローブ群の開発を目指した。SFP3 の合成スキームを簡略化させ、効率的に蛍光プローブ群を合成した。また、新規プローブの各 SIRT アイソザイムに対する反応性を評価した結果、特定の構造を持つプローブとアイソザイムとの組み合わせに

において高い反応性を示すことが明らかになった。さらに、化合物ライブラリーを用いた SIRT2 阻害剤スクリーニングへ応用した結果、新規低分子 SIRT2 脱ミリスチル化阻害剤を同定することに成功した。

P04. 腫瘍血管新生因子 Biglycan を標的とした阻害剤探索系の構築

石井 豪 (愛媛大学プロテオサイエンスセンター)

VEGF を標的とする既存の血管新生阻害剤は、正常血管への副作用が課題である。我々は腫瘍血管内皮細胞に特異的に高発現し、腫瘍血管新生と転移を促進する Biglycan に着目した。本研究では、Biglycan シグナルを遮断する新たな血管新生阻害剤の開発を目指し、Biglycan と受容体との相互作用を阻害する薬剤探索を実施した。Biglycan 受容体候補の TLR2、TLR4、CD14 と Biglycan との相互作用を AlphaScreen を用いて評価した結果、Biglycan と CD14 において特異的な結合シグナルが検出された。この系をもとに S/B 比と安定性の向上、少量化を検討し、1,536 穴プレートを用いた HTS 系を構築した。東京大学創薬機構から提供された中分子化合物ライブラリ 15,000 化合物を対象にスクリーニングを実施し、濃度依存的に Biglycan と CD14 の結合阻害を示す薬剤を複数見出した。

P05. 計算科学と構造生物学を組み合わせたスクリーニングによる DNA メチル化制御薬の開発

郡 聡実 (横浜市立大学)

DNA メチル化異常はがん化の原因の一つである。UHRF1 は DNA 維持メチル化を制御するが、その高発現はがん細胞の異常増殖と関連する。我々は、UHRF1 が DNA ligase1 (LIG1) によって複製部位へ呼び込まれる分子機構を構造生物学的な観点から報告した。本研究では、UHRF1 TTD ドメインと LIG1 の相互作用部位に着目し、この結合を阻害する UHRF1 阻害剤の開発を行った。化合物ライブラリーから動的指標を考慮した *in silico* スクリーニングで TTD に結合する候補化合物を 130 個選抜し、熱安定性実験で 2 個の化合物を同定した。最も安定に結合した化合物と TTD の複合体の X 線結晶構造解析で、化合物が TTD の標的部位に結合することを解明した。さらに、これが全長 UHRF1 と LIG1 の結合を阻害する初めての化合物であることを生化学実験で示した。本手法で、効率的なリード化合物の同定に成功した。

P06. 非染色画像を用いた Fucci 蛍光画像の生成と細胞周期解析

門井 宏平 (株式会社ニコン)

細胞周期フェーズを可視化する蛍光センサーとして Fucci (Fluorescent, Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) 技術が知られている。また創薬開発において細胞周期解析の重要性は認知されている。我々は透過型顕微鏡画像から Fucci 蛍光画像の生成と最適条件の検討を試みた。画像の生成には、顕微鏡画像統合ソフトウェア

(NIS-Elements) に搭載された NIS.ai モジュールを利用した。NIS.ai は Deep Learning を用いた画像処理機能で、convert.ai 機能による画像生成、segment.ai 機能による領域分割が可能であり、本検証ではこれらの機能を用い Fucci の蛍光推論を実施した。生成された Fucci 蛍光画像を用い、細胞周期フェーズごとに細胞を分類、解析する方法も併せて検討した。本報告では、これらの検証結果を報告する。

P07. 物理化学測定を活用した DNA Gyrase 阻害物質の創出

中納 広一郎 (大正製薬株式会社)

物理化学測定は高感度に標的蛋白質と化合物の結合を評価可能な手法であり、HTS hit validation において確立された手法となっている。近年では測定手法も多様化し多面的な物理化学的解析が可能になっており、Fragment-Based Drug Discovery においては Fragment screening・初期 SAR 取得・Fragment to lead と幅広い領域で利用されている。その中でも物理化学測定の一つである Isothermal titration calorimetry (ITC) は、溶液中での標的タンパク質と化合物の結合に伴って生じた熱量変化をダイレクトに検出することで、結合親和性と熱力学的パラメータを直接的に評価できる唯一の測定技術である。本発表では、HTS hit の結合活性向上に際し複合体結晶構造を基にした Fragmentation および ITC 評価を行うことで、結合活性を約 10000 倍向上させることに成功した事例(ACS Omega, 2020 May 5; 5(17):10145-10159.)について報告する。