

〈総説〉

—住木・梅澤記念賞受賞後の研究—

住木梅澤記念賞受賞後25年報告

ケミカルバイオロジー研究基盤としての化合物アレイ技術

長田裕之

理化学研究所環境資源科学研究センター

(2021年1月23日受付)

我々は、これまでに理化学研究所抗生物質研究室で収集してきた天然化合物およびその類縁体を基にして、理研天然化合物バンク (NPDepo) を設立した。NPDepo ライブラリーの効率的活用法として、化合物アレイ法を確立し、目的タンパク質に結合する小分子 (リガンド) のスクリーニングを行っている。本総説では、化合物アレイ法の技術開発とスクリーニング結果についてまとめた。

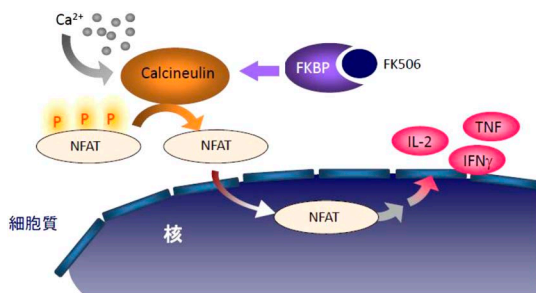
1. はじめに

筆者が1996年に住木梅澤記念賞を受賞して25年が経過しようとしている。受賞総説「Bioprobes for Investigating Mammalian Cell Cycle Control」を、1998年のJ. Antibioticsに執筆しているが¹⁾、本稿では、受賞後の研究の中から、化合物アレイ技術の開発とそれを用いた研究成果を中心に報告する。

ケミカルバイオロジーという名称は、以前から使われていたが、その研究が注目を引くようになったのは、米国ハーバード大学のSchreiberグループが発表したFK-506 (現在の一般名タクロリムス) の標的同定に関する一連の研究²⁻⁵⁾以降である。FK-506は、もともと藤沢薬品工業 (現・アステラス製薬) が、マウス混合リンパ球アッセイでインターロイキン2 (IL-2) の生産抑制剤を探

すという表現型スクリーニングで見出したものである^{6,7)}。Schreiberらは、免疫抑制剤FK-506の作用機作を明らかにするために、FK-506を担持したアフィニティービーズを用いて、FK-506の結合タンパク質FKBPを同定した⁸⁾。同定されたFKBPはプロリンシストランスイソメラーゼ活性を有していたが、FK-506による酵素阻害活性と免疫抑制活性の関係性が十分に説明できないことから、さらにFK-506とFKBPに結合するタンパク質を探し、タンパク質脱リン酸化酵素の一種であるカルシニューリンを同定した²⁾。すなわち、FK-506とFKBP複合体がカルシニューリンに結合して、そのタンパク質脱リン酸化酵素活性を阻害することを証明した。これらの研究により、FK-506-FKBP複合体がカルシニューリンを阻害すると、転写因子nuclear factor of activated T cells (NFAT) の核内移行が阻害され、T細胞抗原受容体の刺激などによって惹起される免疫反応が

図1. FK-506の作用機作



抑制される⁵⁾, という複雑な制御機構が明らかになった (図1)。

当時, 我々は, 生物機能の探索針として有用な化合物をバイオプローブ (Bioprobe) と命名して^{1,9)}, Schreiberグループとは異なるアプローチでケミカルバイオロジー研究を行っていたが, 上記の研究成果に感服した。我々は, 微生物培養液から細胞増殖因子の阻害剤を単離し, その作用標的が, 受容体から転写因子までのどのステップを阻害するのか, 生化学的に解明しようとしていたが, アフィニティービーズを使って結合タンパク質を同定する手法は大きな威力を発揮することに気付かされた。

また, ケミカルバイオロジー研究で, 複雑な生物現象を解明するためには, 低濃度で選択的な活性を示す優れた化合物が必要である。Schreiberグループの研究が成功を収めたのも, FK-506という化合物の存在が大きい。その後, Schreiber教授とお会いした時に, 彼は「微生物から興味ある化合物が発見されるだろうが, その研究はあなたたち日本人に任せる。私たちは, 一つの酵素に対して阻害剤をスクリーニングして見つけるのではなく, あらゆる酵素に対して阻害剤が見つけられるよう, 有機合成化学的に多様性を指向した Diversity oriented synthesis (DOS)¹⁰⁾ ライブラリーを構築して, ハイスループットスクリーニングを行うことにした」と言っていた。当時の我々

は, 微生物から細胞内シグナル伝達阻害剤を見出すために, 様々な工夫を重ねてユニークな表現型スクリーニング系を構築し, 新規阻害剤をポツリポツリと報告していた。ハイスループットスクリーニングは, 企業の研究者がやることで, 我々には大規模な化合物ライブラリーもないし, できないこととっていた。しかも, 異分野の研究者からは, いまだに古臭い抗生物質研究 (見つかるかどうか分からない化合物を, 昔ながらの力づくのスクリーニングで探すようなこと) をしているのかと揶揄されることがあった。

このような状況下で, 我々は, Schreiberらとは異なる天然化合物ライブラリーを構築すること, その化合物をDNAマイクロアレイの様にチップ上に固定化した化合物アレイを作ることを思いついた。チップに固定化した化合物とタンパク質の物理的な相互作用 (結合力) を網羅的に解析する手法を確立できれば, それまでのスクリーニングとは大きく異なる展開が期待できる。そんな矢先, 1999年に MacBeathと Schreiberによって, 様々な化合物をガラス基板に結合させた化合物アレイの論文を発表されてしまった¹¹⁾。

2. 化合物アレイとは

化合物アレイは, まずスライドガラス等の基板上に化合物をスポットして, 化合物を何らかの方法で基板上に固定化する。1枚のスライドガラスには, 数千種類の化合物を固定化することができるため, 固定化された数千の小分子化合物に対するタンパク質の結合の有無を一度にアッセイすることができる点が優れている。非常に処理能力が高いので超ハイスループットスクリーニングと言える。また, 他のアッセイ法の多くは, タンパク質の機能が分かった上で, 小分子化合物を添加し, そのタンパク質の機能を阻害するかどうかを検出するという研究手法であったが, 化合物アレイ

イでは、タンパク質と小分子化合物との物理的相互作用を検出するため、機能未知のタンパク質にも適応できるという特長を持つ。つまり、原理的にはいかなるタンパク質についても小分子化合物のスクリーニングが可能であるということになる。

3. 化合物アレイの作製法

化合物アレイの作製においては、多種多様な構造を有する化合物をいかに基板（ここではスライドガラス）上に固定化するのが重要な問題である。

MacBeathらが発表した論文では、基板にマレイミド基を導入し、その上にチオール基を有する化合物をスポットし、化合物のチオール基とマレイミド基との共有結合を形成させることにより、化合物を基板上に固定化した（図2）。Schreiberグループは、この他にもさまざまな化合物固定化法を開発している¹²⁾。例えば、基板を塩化チオニルで活性化し、水酸基を有する化合物を反応させる

ことにより化合物を基板上に固定化する方法¹³⁾や、酸性官能基を有する化合物を、ジアゾベンジリデン基を利用して固定化する方法¹⁴⁾を発表した。これらの方法は、いずれも化合物が有する特定の官能基を利用して、基板上に形成した反応点と共有結合させるものであった。

化合物の特定の官能基を利用して基板上に固定化する手法は、化合物アレイ作製法として主流であったが、この手法では、化合物が特定の官能基を有しているか、有していない場合は化合物に特定の官能基を導入しなければならない。さらに、その官能基の近傍が標的タンパク質との相互作用に必要な場合、本来結合すべきタンパク質と結合できない可能性があった。そこで、我々は化合物の官能基に依存しない基板への固定化法を模索した。文献調査の結果、アリールジアジリン基に360nm付近の紫外線を照射して発生するカルベン種を、化合物との固定化に用いることにした^{15,16)}。カルベン種は非常に反応性に富んでいるため、C-H結合を含め様々な結合に挿入できることが知られている。すなわち、特定の官能基に依

図2. ハーバード大学・Schreiberグループが開発した化合物アレイ作製法。ガラス基板にマレイミド基、塩化チオニル基、ジアゾベンジリデン基を持たせて、それぞれに結合する官能基を有する化合物を結合させる方法。

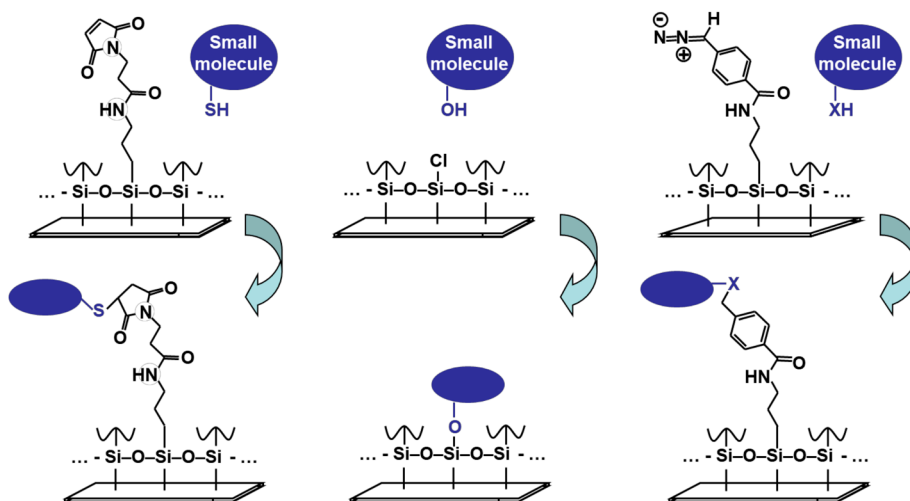
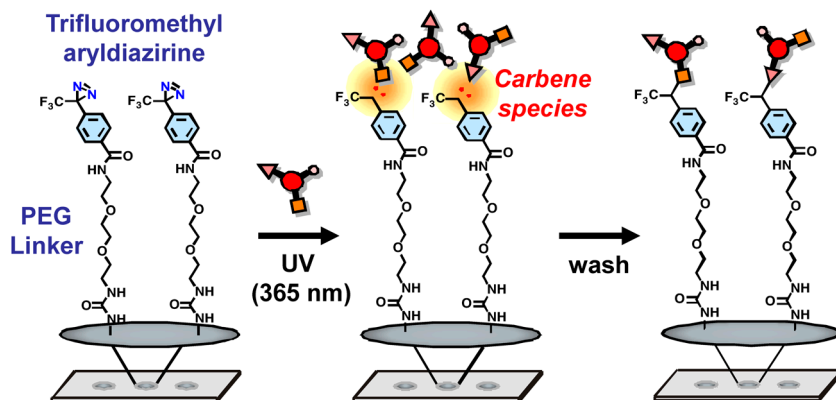


図3. 理研・長田グループが開発した化合物アレイ作製法。trifluoromethylaryldiazirine を光照射することにより発生する carbene 種が、原理的にはいかなる有機化合物も補足する。また、一つの化合物にランダムな部位で結合するため、化合物と標的タンパク質との結合に必要な部位が残ることが期待できる。



存せず、原理的にはあらゆる有機化合物を同一の手法で基板に固定化することが可能である¹⁷⁾ (図3)。一般的に、有機化学者は、きれいな反応(均一の合成産物が得られる反応)を目指しているが、我々の研究はその逆で、一つの化合物が様々な反応部位で基板に固定化できることがメリットであった¹⁸⁾。

4. 化合物アレイを用いた海外での研究例

化合物アレイを用いたスクリーニングでは、米国の Schreiber らが先行していた。彼らは多様性志向型 (DOS) ライブラリーとして 3,780 個の 1,3-ジオキサン化合物を合成し、それを固定化した化合物アレイを作製し、酵母由来のタンパク質 Ure2p の小分子リガンドとして Uretupamine A を見出した¹⁹⁾。さらに、構造を最適化して A よりも強力な Uretupamine B を合成した (図 4A)。Uretupamine B を細胞に添加すると、細胞内で Ure2p の下流に複数存在する伝達経路の中で Nil1p 下流のグルコース感受性パスウェイが選択的に活性化されることを報告した。Ure2p は転写因子である Nil1p や Gln3p の機能を抑制するの

で、Ure2p 遺伝子をノックダウンすると複数の伝達経路が影響を受けた。しかし、Uretupamine B は、Ure2p シグナルの中で Nil1 経路のみを抑制解除したので、Ure2p の新たな細胞内制御機能機構の解明に繋がった (図 4B)。小分子化合物が、タンパク質のある特定の機能のみを阻害できることを示した好例である。

この他にも、Schreiber グループは化合物アレイによって、酵母の転写因子 Hap3p の小分子リガンド Haptamide A²⁰⁾、Calmodulin の小分子リガンド Calmoduphilin¹⁴⁾、ヘッジホッグのホモログであるソニックヘッジホッグ (Shh) に結合する Robotnikinin²¹⁾ などを見出している (図 5)。

5. 化合物アレイを用いた我々の研究成果

従来のハイスループットスクリーニング系で、10 万化合物をスクリーニングするには、かなりの予算と労力を必要とする。化合物アレイ法では、一旦化合物をチップに固定化すれば、様々な種類のタンパク質をチップに添加して、安価で迅速に化合物とタンパク質との相互作用を検出することができる。我々は、化合物アレイ技術にとって課

図4. A: 化合物アレイ法によるスクリーニングの例, B: スクリーニングで見出された化合物を用いた作用解析の例

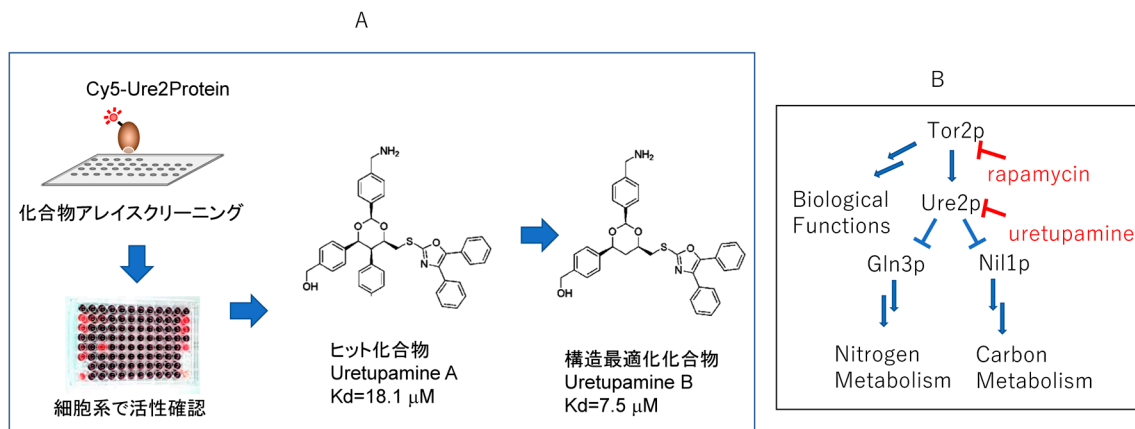
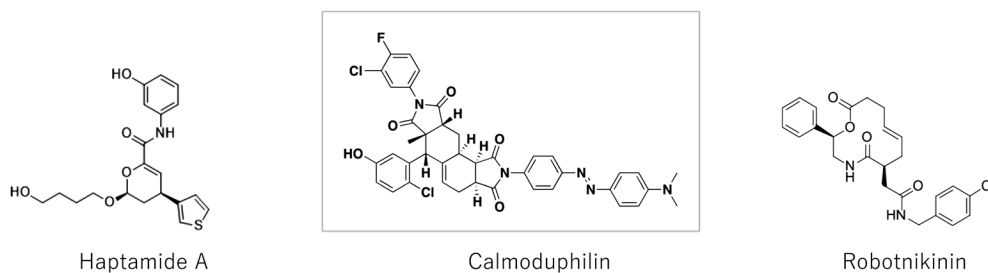


図5. ハーバード大学シュライバーグループが化合物アレイで見出した化合物



題であった「いかにして多様な構造の化合物を簡単にチップに固定化するか」を考え、官能基非依存的な固定化法という新たな発想でその問題を解決した。さらに、目的タンパク質と赤色蛍光タンパク質 (RFP) の融合タンパク質を発現するためのカセットタイプの遺伝子ベクターを構築し、多種多様な蛍光タンパク質ライブラリー (GLORIA) を作製した^{22,23)} (図6)。これらの技術基盤構築により、様々なタンパク質に結合する小分子リガンドを見出すことができたので、以下に、我々が行った研究成果の一部を紹介する。

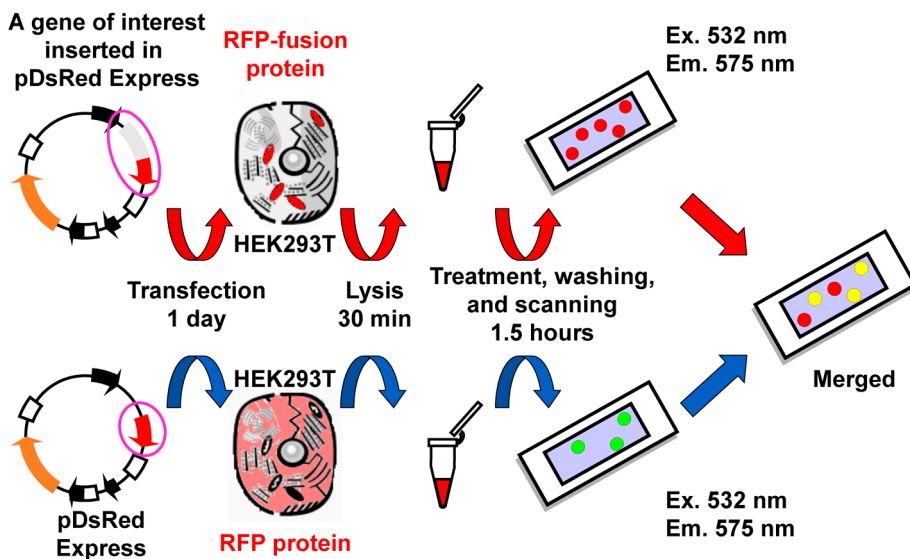
5-1. 実施例1. フラグメントベースアプローチ

1996年にアボット社のShukerらが、NMRによる構造活性相関研究 (フラグメントベースア

プローチ)の方法を報告した²⁴⁾。この方法は、目的タンパク質に弱く結合する比較的小さな化合物 (フラグメント)を見出して、そのフラグメント同士を繋ぎ合わせるによりさらに強く結合する化合物を取得する方法である。NMRの他にも、X-線結晶構造や、質量分析によるフラグメントベースアプローチも報告されている²⁵⁻²⁷⁾。フラグメントベースアプローチは、優れた方法ではあるが、比較的多量の精製タンパク質を必要とする点が難点であった。

そこで、我々は、フラグメントベースアプローチを化合物アレイ上で行う手法 (fragment combination array; FCA法)を開発した。一つのフラグメントを一つのスポットとしてアレイを作製した場合、フラグメントの分子量が小さいため、

図6. 化合物アレイに用いる蛍光タンパク質ライブラリーの作製と実験法。目的タンパク質と赤色蛍光タンパク質 (RFP) の融合タンパク質を作製するためのベクター (図左上) を構築し、それをヒト腎細胞 (HEK293T) にトランスフェクションしてライセートを調整した。目的タンパク質を精製することなく、化合物アレイに添加してアレイ上で結合リガンドを簡便、迅速に検出することが可能。

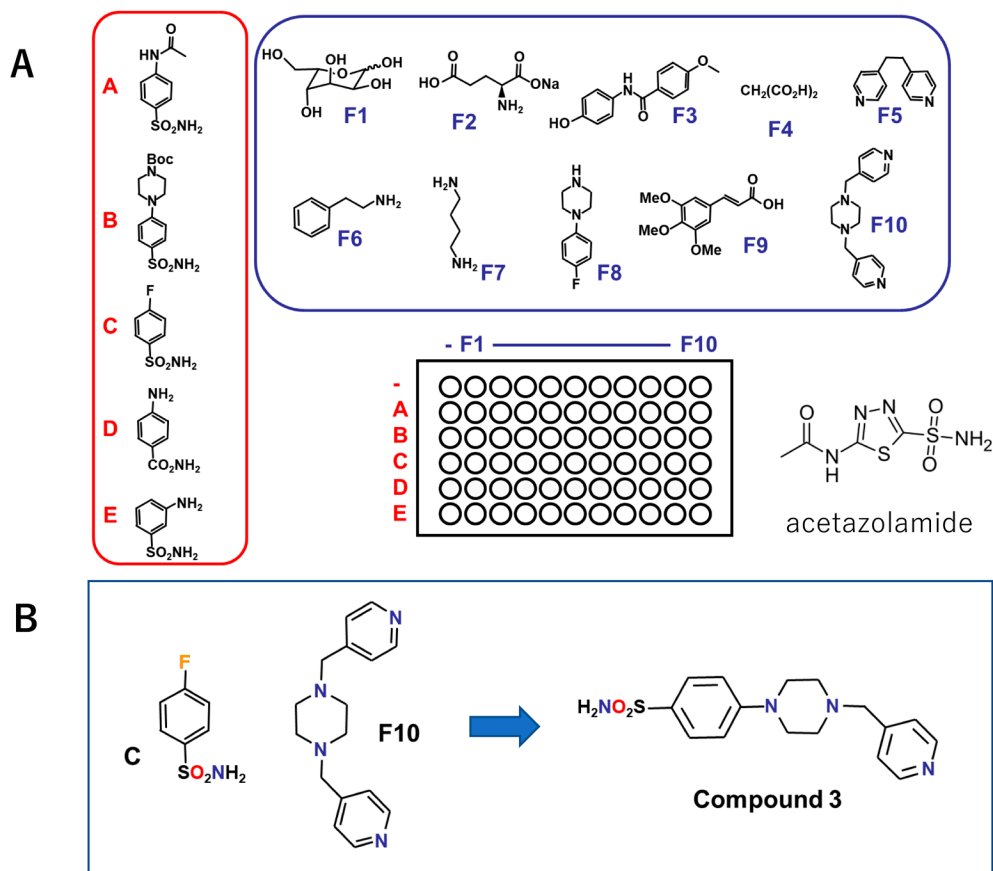


標的タンパク質との親和性が弱いので、アレイを洗浄する過程でタンパク質と化合物の結合が乖離してしまうことが危惧された。そこで、FCA法では、2種類のフラグメントを混合してアレイ上の同一スポットに固定化することにより、タンパク質に対する親和性を増強させ、それらフラグメントのペアを検出するという工夫をした。すでに我々は、上述の通り、化合物の固定化に光親和型リンカーを使用し、細胞抽出液を用いたアッセイ系を確立していたので、FCA法で容易にスクリーニングを実施できた^{28,29)}。

炭酸脱水素酵素は、植物からヒトまで広く存在する酵素であり、二酸化炭素を炭酸と重炭酸イオンに変換、あるいはその逆反応を触媒する酵素である。ヒトでは臓器によって異なる機能を有しているが、重要な機能の一つとして、pHバランスの制御が知られている。II型炭酸脱水素酵素 (CAII) の阻害剤であるアセタゾラミドは緑内障治療薬と

して用いられている³⁰⁾。我々は、Proof-of-concept 研究として、CAII阻害剤のスクリーニングを実施した。CAIIは、阻害剤の構造活性相関研究やX線結晶構造に関する情報が豊富にあるため、少数のフラグメントの組み合わせでも新規誘導体への展開が可能であると考えたからである。まず、代表的なCAII阻害剤の基本骨格であるスルホンアミドを有する化合物を母核フラグメントとした。組み合わせる連結フラグメントは、1) 分子量350以下、2) 良溶解性 (ClogP<3)、3) 構造多様性、の条件で選定した。本条件で選ばれた母核フラグメントA-E (Dはコントロール) と連結フラグメントF1-F10を混合したDMSO溶液を調整し、化合物アレイにスポットした (図7A)。その化合物アレイをRFP-CAII過剰発現細胞抽出液とインキュベートさせた後、最も強い蛍光シグナルが得られた組み合わせのフラグメントから、2つのフラグメントの化学構造に基づいて、化合物3を合

図7. A: フラグメント組み合わせアレイ法 (fragment combination array; FCA法)。縦方向 (A, B, C...) のスルホンアミドを有する母核フラグメントと横方向 (F1, F2, F3...) の連結フラグメントを混合して, 化合物アレイにスポットし, RFP-CAII との結合を測定した。ポジティブコントロールは, アセタゾラミド。B: 2種類のフラグメントの組み合わせで最も強い結合が見出された組み合わせ (母核フラグメントCと連結フラグメントF10) をもとにして, 化合物3を合成した。



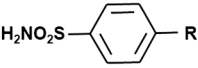
成した (図7B)。等温滴定型カロリメトリー (ITC) 実験による化合物3の結合定数 K_d は29 nMで, CAII酵素活性阻害アッセイによる IC_{50} 値は48 nMであり, 実用化されているアセタゾラミド ($K_d=31$ nM, $IC_{50}=34$ nM) と同等の阻害効果を示した²⁹⁾ (図8)。

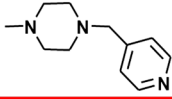

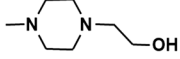
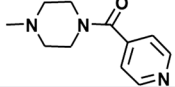
5-2. 実施例2. MTH1阻害剤のスクリーニング

MTH1は, 細胞内で生じる異常酸化ヌクレオチドを加水分解して, 異常ヌクレオチドがDNAに取り込まれることを防ぐ酵素である³¹⁾。2015年

のNature誌に, カロリンスカ研究所のGadらと, オーストリア科学アカデミーのHuberらが2報連続で, がん細胞におけるMTH1の機能とその阻害剤開発に関する論文を発表した^{32,33)}。Gadらは, がん細胞では細胞内に多くの活性酸素種 (ROS) が発生するので, 核酸合成に必要なヌクレオチド三リン酸 (dNTP) が恒常的に酸化を受けていると考え, 多くのがん細胞では8-oxo-dGTPや2-OH-dATPなどの酸化ヌクレオチドを加水分解するためにMTH1を高発現して, 細胞死を回避していると報告した (図9)。そこで, 彼らは強力なMTH1

図8. 化合物3とその類縁体のCAII酵素阻害活性 (IC_{50}) とCAIIとの結合力 (K_d)

基本骨格 

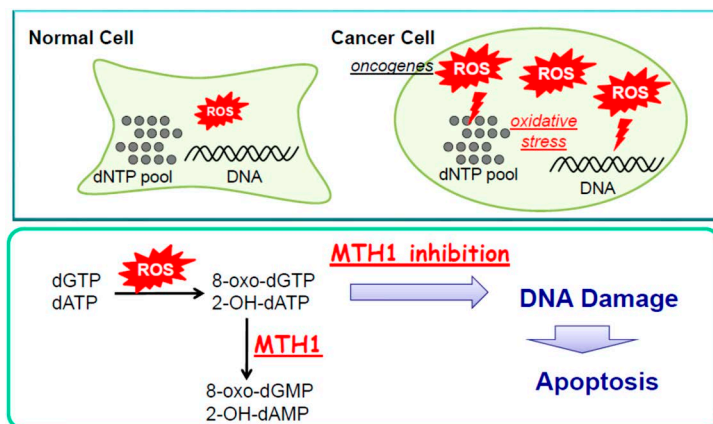
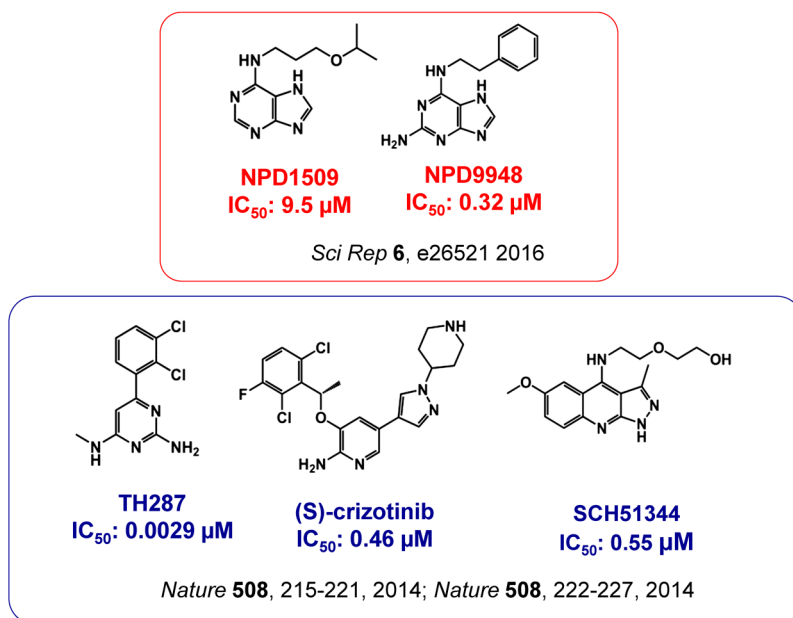
Name	R	IC_{50} (nM)	K_d (nM)
C	—F	203	435
3		48	29
4		299	426
5		137	208
6		72	100

阻害剤TH287の開発に成功し、TH287は、正常細胞には細胞毒性を示さずがん細胞選択的にアポトーシスを起こすことを報告した³²⁾。一方、Huberらは、RAS依存性のがん細胞モデルを使って、SCH51344と(S)-クリゾチニブを得て、その分子標的がMTH1であることを報告した。ちなみに、(R)-クリゾチニブはキナーゼ阻害剤であり抗がん剤として使用されているが、(R)体にはMTH1の阻害活性はなかった³³⁾。

実は、我々もMTH1に興味を持っていたので、上記の論文が発表される前から化合物アレイを用いてMTH1阻害剤をスクリーニングしていた。理研天然化合物バンク(NPDepo)の化合物ライブラリー約3万化合物の中からMTH1と結合する化合物として21種類のヒット化合物を得たが、構造的にも、活性的にも注目すべき化合物がなかったので、放置していた。しかし、上記の論文に刺激を受けて、21種類のヒット化合物の中からNPD15095に着目して、MTH1阻害剤の研究を再開した。まず、NPD15095類縁体を揃えてMTH1に対する阻害活性を評価した。その結果、強力な

MTH1阻害剤NPD9948を見出した(図10)。ところが、NPD9948はサブ μ MでMTH1の酵素活性を示すにもかかわらず、HeLa細胞に対する増殖阻害活性は極めて弱く、既知のMTH1阻害剤TH287とは傾向が異なった。そこで、NPD9948とTH287の細胞増殖に及ぼす阻害作用(分子標的)を、我々が開発したChemProteoBase³⁴⁾を用いて解析した。NPD9948はDNAダメージを誘導することが知られているcamptothecinやSCH51344と同じクラスターに分類された。それに対して、低濃度で細胞毒性を示したTH287は、チューブリン阻害剤を含むクラスターに分類された(図11)。そこで、TH287のチューブリン重合に及ぼす阻害活性を検討したところ、TH287は*in vitro*でも細胞レベルでも濃度依存的にチューブリン重合を阻害することが明らかになった。さらにNature論文では、使用したMTH1のsiRNAは、がん細胞に対して増殖阻害活性を示したと報告しているが、我々が用いたsiRNAでは、MTH1mRNAをノックダウンできたにもかかわらずHeLa細胞の増殖に影響は認められなかった^{35,36)}。

図9. がん細胞でMTH1が薬剤標的になる可能性を示した図

図10. 我々が見出したMTH1阻害剤とNature論文で報告されたMTH1阻害剤の比較。IC₅₀は酵素阻害濃度。

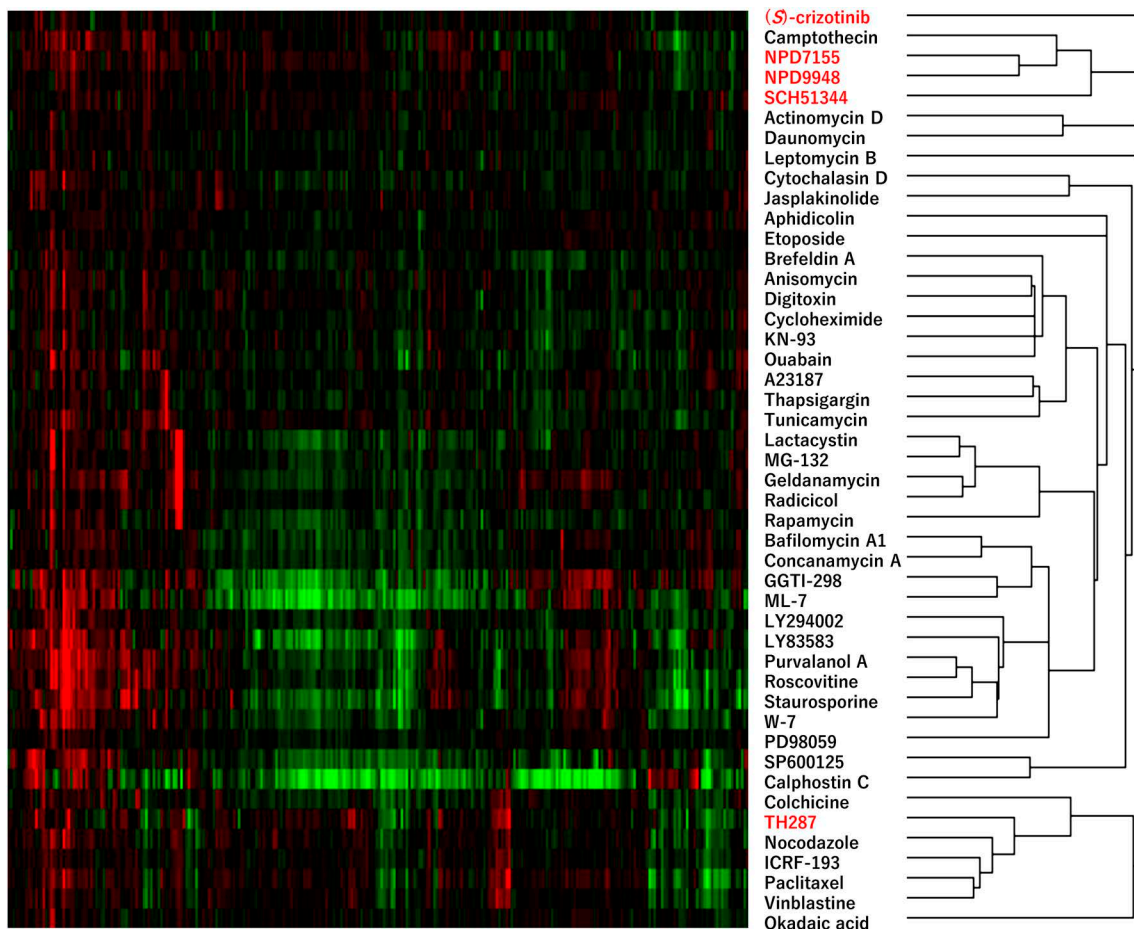
我々だけでなく、アストラゼネカ³⁷⁾、MDアンダーソンがんセンター³⁸⁾のグループも、選択的かつ強力なMTH1阻害剤を見出したが、それらの阻害剤はがん細胞の増殖に影響を与えなかったと報告している。さらに、遺伝学的にMTH1をノックアウトしても、細胞死が起きなかったことから、MTH1を標的とするがん分子標的治療薬の可能性

については疑問を呈している (<https://cen.acs.org/articles/94/i10/Doubt-cast-cancer-drug-target-MTH1.html>)。

6. まとめ

筆者は、1992年4月に理化学研究室抗生物質研

図 11. ChemoProteoBase で分類された MTH1 阻害剤の標的。細胞毒性が弱い MTH1 阻害剤は、DNA ダメージを誘導する化合物群として分類され、細胞毒性が強い MTH1 阻害剤は微小管阻害群に分類された。



研究室の主任研究員となったが、その研究室は、2015年3月に60有余年の歴史を閉じた。抗生物質の研究には、微生物学、天然物化学、生化学など幅広い知識と経験が必要である。その観点から、「物質ハンティング」ではなく「抗生物質学研究」として、大学などで人材育成していたら、抗生物質「学」研究室が、どこかの大学に残ったのかもしれないが、筆者の知る限り、その名を標榜した研究室は、世界中どこにもなくなってしまったようだ。野山を歩き回って土拾いをして、新しい抗生物質を探すことは、筆者にとっては最も楽しい趣味であった（物質ハンティングに関して、

どこからも研究費を受けたことがないので、研究というより趣味と言え）。住木・梅澤記念賞受賞後25年間で、ケミカルバイオロジー研究の推進を目的として、理研天然化合物バンクを設立し、その化合物ライブラリーを活用した化合物アレイスクリーニングを実施した。趣味から研究に移ってきたので、チーム体制を整えて実施した。本総説で、化合物アレイスクリーニングの応用例を網羅することができなかったので、我々が本手法で見出した様々なタンパク質に結合する小分子（小分子リガンド）を表1にまとめた。

表1. 化合物アレイを用いて取得したタンパク質の阻害剤

	タンパク質 (遺伝子)	見出された化合物	要約	文献
1	Carbonic anhydrase 2 (CA2)	sulfonamide 化合物	緑内障に関与する CA2 の阻害剤を同定。	28
2	Influenza A virus Nucleoprotein (NP)	mycalamide A 類縁体	インフルエンザウイルスの NP の結合する化合物を同定。	39
3	HIV Vpr	SIP-1, SIP-2, SIP-3, SIP-4	ヒト免疫不全ウイルスの Vpr に結合する化合物を同定。	40
4	Pirin (PIR)	TPhA	がん細胞の Pirin タンパク質の結合物質を同定。	41
5	Chaperone protein HtpG (htpG)	colistins A, B ほか	シアノバクテリアの HtpG に結合する化合物として colistinA, B を同定。	42
6	Lysophospholipase-like protein 1 (LYPLAL1)	furocoumarin 化合物	アシルタンパク質チオエステラーゼ LYPLAL1 の阻害剤を同定。	43
7	Trichothecene 3-O-acetyltransferase (TRI101)	NPD6218 ほか	カビ毒・トリコテセンの産生に関わる TRI101 を阻害する化合物を同定。	44
8	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (MDM2), Mdmx (MDMX)	KPYA52218, KPYB00497, KPYB00556	MDM2 と p53 との相互作用を阻害する化合物を同定。	45
9	Acyl-protein thioesterases 1 and 2 (ATP1, ATP2)	boron 含有化合物	アシルタンパク質チオエステラーゼである ATP1, ATP2 の阻害剤を同定。	46
10	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3)	spindlactones A, B	がん関連分子である TACC3 に結合する化合物を同定。	47
11	Tau protein (human MAPT)	dihydroxybenzene 化合物 (Epinephrine, Isoproterenol 他)	アルツハイマーのタウタンパク質の凝集を抑制する化合物を同定。	48
12	Abscicic acid receptor (PYR1)	RK460	植物の ABA 受容体のアンタゴニストを同定。	49

表1. 続き

13	Matrix metalloproteinase-9 (MMP9)	isoxazole 化合物	がん転移に関わる MMP9 の阻害剤を同定。	50
14	Synaptosomal-associated protein 23 (SNAP23)	MF286 (ReveromycinA 合成中間体)	インスリン分泌を促進する物質を同定。	51
15	p38 α MAPK mutant (p38 γ /delta MAPK)	SU-002, SU-005 ほか	p38 γ / δ MAP キナーゼの特異的阻害剤を同定。	52
16	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (MDM2)	α -tocopherol 誘導体 ent-NP843	MDM2 と p53 の相互作用を阻害する物質を同定。	53
17	MTH1	NPD9948 ほか	損傷ヌクレオチド除去酵素 MTH1 の阻害剤を同定。	35
18	M-Sec	NPD3064 (TNT-i)	細胞膜ナノチューブ(TNT)の形成因子 M-Sec タンパク質の機能阻害剤を同定。	54
19	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (MDM2)	apomorphine	ユビキチンリガーゼ MDM2 の阻害剤を同定。	55
20	Trichodiene (TDN) synthase (TRI5)	NPD10133 ほか	カビ毒・トリコテセンの産生に関わる TRI5 を阻害する化合物を同定。	56
21	β -arrestin1	RKN5755	がんの転移に関与する β アレスチン 1 タンパク質の阻害剤を同定。	56
22	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)	coumarin 誘導体 (NPD8716 ほか)	B 型肝炎ウイルス(HBV)の受容体 NTCP に結合する化合物を同定。	57
23	Abscicic acid receptor (PYR1, PYL1, PYL5, PYL10)	3'-Alkyl ABAs	植物の ABA 受容体のサブファミリー選択的アゴニストを同定。	58
24	Major latex-like proteins (MLPs)	amisulbrom, pyrifluquinazon	ウリ科作物において有機汚染物質を輸送する MLP タンパク質に結合する化合物を同定。	59

謝辞

本総説で述べた研究は、理化学研究所抗生物質研究室およびケミカルバイオロジー研究グループに所属した共同研究者によって行われたもので、専任研究員の近藤恭光博士と川谷誠博士、テクニカルスタッフの本田香織さん、叶直樹博士（現・星薬科大学）、清水史郎博士（現・慶應大学）、宮崎功博士（現・大鵬薬品工業）、河村達郎博士（現・ペプチドリーム）など、多くの方々にお世話になりました。

引用文献

- 1) Osada H: Bioprobes for investigating mammalian cell cycle control. *J Antibiot.* 1998; 51: 973–81.
- 2) Liu J, Farmer J, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991; 66: 807–15.
- 3) Schreiber SL: Chemistry and biology of immunophilins and their immuno-suppressive ligands. *Science.* 1991; 251: 283–7.
- 4) Liu J, Albers MW, Wandless TJ, *et al.*: Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry.* 1992; 31: 3896–901.
- 5) Schreiber SL, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today.* 1992; 13: 136–42.
- 6) Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, *et al.*: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes. I. fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot.* 1987; 40: 1249–55.
- 7) Kino T, Hatanaka H, Miyata S, *et al.*: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes. II. immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. *J Antibiot.* 1987; 40: 1256–65.
- 8) Standaert RF, Galat A, Verdine GL, Schreiber SL: Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature.* 1990; 346: 671–4.
- 9) Osada H: Trends in bioprobe research. *Bioprobes* (ed. Osada H), Springer 2000: 1–14.
- 10) Schreiber SL: Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science.* 2000; 287: 1964–9.
- 11) MacBeath G, Koehler AN, Schreiber SL: Printing small molecules as microarrays and detecting protein—Ligand interactions en masse. *J Am Chem Soc.* 1999; 121: 7967–8.
- 12) MacBeath G, Schreiber SL: Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science.* 2000; 289: 1760–3.
- 13) Hergenrother P, Depew K, Schreiber S: Small-molecule microarrays: Covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides. *J Am Chem Soc.* 2000; 122: 7849–50.
- 14) Barnes-Seeman D, Park SB, Koehler AN, Schreiber SL: Expanding the functional group compatibility of small-molecule microarrays: discovery of novel calmodulin ligands. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003; 42: 2376–9.
- 15) Hatanaka Y, Hashimoto M, Kanaoka Y: A novel biotinylated heterobifunctional cross-linking reagent bearing an aromatic diazirine. *Bioorg Med Chem.* 1994; 2: 1367–73.
- 16) Kanoh N, Kumashiro S, Simizu S, *et al.*: Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions. *Angew Chem Int Ed.* 2003; 42: 5584–7.
- 17) Kanoh N, Nakamura T, Honda K, Yamakoshi H, Iwabuchi Y, Osada H: Distribution of photo-cross-linked products from 3-aryl-3-trifluoromethyldiazirines and alcohols. *Tetrahedron.* 2008; 64: 5692–8.
- 18) Kanoh N, Honda K, Simizu S, Muroi M, Osada H: Photo-crosslinked small molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics. *Angew Chem Int Ed.* 2005; 44: 3559–62.
- 19) Kuruvilla FG, Shamji AF, Sternson SM, Hergenrother PJ, Schreiber SL: Dissecting glucose signalling with diversity-oriented

- synthesis and small-molecule microarrays. *Nature*. 2002; 416: 653–7.
- 20) Koehler AN, Shamji AF, Schreiber SL: Discovery of an inhibitor of a transcription factor using small molecule microarrays and diversity-oriented synthesis. *J Am Chem Soc*. 2003; 125: 8420–1.
- 21) Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, *et al.*: A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol*. 2009; 5: 154–6.
- 22) Miyazaki I, Simizu S, Osada H: The application of the chemical array for biological study. *Methods Mol Biol*. 2010; 669: 95–107.
- 23) Osada H: Introduction of new tools for chemical biology research on microbial metabolites. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010; 74: 1135–40.
- 24) Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW: Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*. 1996; 274: 1531–4.
- 25) Murray CW, Rees DC: The rise of fragment-based drug discovery. *Nat Chem*. 2009; 1: 187–92.
- 26) Pedro L, Quinn RJ: Native mass spectrometry in fragment-based drug discovery. *Molecules*. 2016; 21.
- 27) Ferreira LG, Andricopulo AD: From protein structure to small-molecules: recent advances and applications to fragment-based drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2017; 17: 2260–70.
- 28) Miyazaki I, Simizu S, Ichimiya H, Kawatani M, Osada H: Robust and systematic drug screening method using chemical arrays and the protein library: identification of novel inhibitors of carbonic anhydrase II. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72: 2739–49.
- 29) Miyazaki I, Simizu S, Ishida K, Osada H: On-chip fragment-based approach for discovery of high-affinity bivalent inhibitors. *ChemBioChem*. 2009; 10: 838–43.
- 30) Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M: Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm*. 2002; 248: 1–14.
- 31) Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T, *et al.*: Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem*. 1993; 268: 23524–30.
- 32) Gad H, Koolmeister T, Jemth AS, *et al.*: MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature*. 2014; 508: 215–21.
- 33) Huber KV, Salah E, Radic B, *et al.*: Stereospecific targeting of MTH1 by (*S*)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature*. 2014; 508: 222–7.
- 34) Muroi M, Kazami S, Noda K, *et al.*: Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. *Chem Biol*. 2010; 17: 460–70.
- 35) Kawamura T, Kawatani M, Muroi M, *et al.*: Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival. *Sci Rep*. 2016; 6: 26521.
- 36) Kumar A, Kawamura T, Kawatani M, Osada H, Zhang KYJ: Identification and structure–activity relationship of purine derivatives as novel MTH1 inhibitors. *Chem Biol Drug Des*. 2017; 89: 862–9.
- 37) Kettle JG, Alwan H, Bista M, *et al.*: Potent and selective inhibitors of MTH1 probe its role in cancer cell survival. *J Med Chem*. 2016; 59: 2346–61.
- 38) Petrocchi A, Leo E, Reyna NJ, *et al.*: Identification of potent and selective MTH1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26: 1503–7.
- 39) Hagiwara K, Kondoh Y, Ueda A, *et al.*: Discovery of novel antiviral agents directed against the influenza A virus nucleoprotein using photo-cross-linked chemical arrays. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 394: 721–7.
- 40) Hagiwara K, Murakami T, Xue G, *et al.*: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 403: 40–5.
- 41) Miyazaki I, Simizu S, Okumura H, Takagi S, Osada H: A small-molecule inhibitor shows that

- pirin regulates migration of melanoma cells. *Nature Chem Biol.* 2010; 6: 667–73.
- 42) Minagawa S, Kondoh Y, Sueoka K, Osada H, Nakamoto H: Cyclic lipopeptide antibiotics bind to the N-terminal domain of the prokaryotic Hsp90 to inhibit the chaperone activity. *Biochem J.* 2011; 435: 237–46.
- 43) Burger M, Zimmermann TJ, Kondoh Y, *et al.*: Crystal structure of the predicted phospholipase LYPLAL1 reveals unexpected functional plasticity despite close relationship to acyl protein thioesterases. *J Lipid Res.* 2012; 53: 43–50.
- 44) Nakajima Y, Kawamura T, Maeda K, *et al.*: Identification and characterization of an inhibitor of trichothecene 3-*O*-acetyltransferase, TRI101, by the chemical array approach. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013; 77: 1958–60.
- 45) Noguchi T, Oishi S, Honda K, *et al.*: Affinity-based screening of MDM2/MDMX-p53 interaction inhibitors by chemical array: identification of novel peptidic inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23: 3802–5.
- 46) Zimmermann TJ, Burger M, Tashiro E, *et al.*: Boron-based inhibitors of acyl protein thioesterases 1 and 2. *Chembiochem.* 2013; 14: 115–22.
- 47) Yao R, Kondoh Y, Natsume Y, *et al.*: A small compound targeting TACC3 revealed its different spatiotemporal contributions for spindle assembly in cancer cells. *Oncogene.* 2014; 33: 4242–52.
- 48) Soeda Y, Yoshikawa M, Almeida OF, *et al.*: Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. *Nature Commun.* 2015; 6: 10216.
- 49) Ito T, Kondoh Y, Yoshida K, *et al.*: Novel abscisic acid antagonists identified with chemical array screening. *Chembiochem.* 2015; 16: 2471–78.
- 50) Kawatani M, Fukushima Y, Kondoh Y, *et al.*: Identification of matrix metalloproteinase inhibitors by chemical arrays. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015; 79: 1597–602.
- 51) Kunii M, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, *et al.*: Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells. *J Cell Biol.* 2016; 215: 121–38.
- 52) Kondoh Y, Honda K, Hiranuma S, *et al.*: Comparative chemical array screening for p38gamma/delta MAPK inhibitors using a single gatekeeper residue difference between p38alpha/beta and p38gamma/delta. *Sci Rep.* 2016; 6: 29881.
- 53) Noguchi T, Oishi S, Honda K, *et al.*: Screening of a virtual mirror-image library of natural products. *Chem Commun.* 2016; 52: 7653–6.
- 54) Hashimoto M, Bhuyan F, Hiyoshi M, *et al.*: Potential role of the formation of tunneling nanotubes in HIV-1 spread in macrophages. *J Immunol.* 2016; 196: 1832–41.
- 55) Ishiba H, Noguchi T, Shu K, *et al.*: Investigation of the inhibitory mechanism of apomorphine against MDM2-p53 interaction. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017; 27: 2571–74.
- 56) Suvarna K, Honda K, Kondoh Y, Osada H, Watanabe N: Identification of a small-molecule ligand of β -arrestin1 as an inhibitor of stromal fibroblast cell migration accelerated by cancer cells. *Cancer Med.* 2018; 7: 883–93.
- 57) Kaneko M, Futamura Y, Tsukuda S, *et al.*: Chemical array system, a platform to identify novel hepatitis B virus entry inhibitors targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci Rep.* 2018; 8: 2769.
- 58) Yoshida K, Kondoh Y, Iwahashi F, *et al.*: Abscisic Acid Derivatives with Different Alkyl Chain Lengths Activate Distinct Abscisic Acid Receptor Subfamilies. *ACS Chem Biol.* 2019; 14: 1964–71.
- 59) Fujita K, Kondoh Y, Honda K, *et al.*: Pesticide treatment reduces hydrophobic pollutant contamination in Cucurbita pepo through competitive binding to major latex-like proteins. *Environ Pollut.* 2020; 266: 115179.

Chemical array method as a platform of chemical biology research

Hiroyuki Osada

Chemical Biology Research Group,
RIKEN Center for Sustainable Resource Science

Twenty-five years ago, I received the Sumiki-Umezawa Memorial Award. As an award winner's paper, I wrote a review article entitled "Bioprobes for Investigating Mammalian Cell Cycle Control" which was published in *The Journal of Antibiotics* in 1998. This time, I write a Japanese review article reporting the recent achievements of the Osada group and our collaborators.

We established the Natural Products Depository (NPDepo) in RIKEN and collected many natural compounds. In order to utilize these valuable compounds effectively, we developed a new screening method, the chemical array method. The idea of the chemical array is based on the concept of the DNA microarray, namely the chemical array keeps small molecular compounds instead of DNA on a glass slide. We found that the chemical array is useful in detecting the interaction of proteins with small molecules.

In this review article, the development of the chemical array method and screening results are described.