

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 令和元年 7 月 2 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 発表者 谷口 結 |
| 【Journal】 <i>ACS Med. Chem. Lett.</i> <b>2019</b> , 10, 923-928.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |          |
| 【Title】 DMSO-Perturbing assay for identifying promiscuous enzyme inhibitors                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |          |
| 【Affiliation & Authors】<br>Keisuke Tomohara, Isao Adachi, Yoshikazu Horino, Hitoshi Kesamaru, Hitoshi Abe, Keitaro Suyama and Takeru Nose<br>Faculty of Arts and Science, Kyushu University                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |          |
| 【Abstract】<br>無差別酵素阻害剤の存在は、酵素阻害剤の探索における課題の 1 つである。しかし、既存のアッセイ法では無差別酵素阻害剤の同定が困難なため、早期段階で阻害剤の非特異性を特定できる新規アッセイ法が求められている。先行研究で見出された DMSO-perturbing アッセイは、DMSO 濃度依存的に阻害活性が減少する化合物を無差別酵素阻害剤として特定できる可能性が示唆された。そのため本論文では、その適用範囲、実用性の確立を検討した。初めに筆者らは、先行研究で見出された無差別酵素阻害剤を含む構造的に多様な 18 種の阻害剤の $\beta$ -lactamase (BL)、 $\alpha$ -chymotrypsin (CT) に対する阻害活性を評価した。その結果、いくつかの阻害剤に特有の働きによる無差別酵素阻害の可能性が示唆された。そこで、筆者らは非特異的阻害のメカニズムを同定するために界面活性剤または還元剤ジチオスレイトール (DTT) 添加条件でのスクリーニングを検討した。その結果、凝集の解消や、阻害剤の還元により、quercetin や rottlerin などの阻害活性が減弱したため、これらの無差別酵素阻害剤の働きは凝集、酸化還元反応、非特異的な共有結合に起因していることが示唆された。これらの無差別酵素阻害剤を DMSO-perturbing アッセイで評価したところ、DMSO 濃度依存的な阻害活性の減弱が確認された。さらに、酵素を緩衝液で希釈すると酵素活性が回復したことから、酵素の活性中心に存在する Trp 残基由来の蛍光スペクトルが、DMSO 濃度依存的に変化しなかったことで酵素の不可逆的な変性が起きていないことが確認された。これらより、DMSO による酵素の可逆的な変性が推測された。これらの結果より、DMSO 添加による無差別酵素阻害剤の活性減弱は、可逆的に変性した酵素に無差別酵素阻害剤が結合することによるものと推測された。DMSO-perturbing アッセイでは、DMSO 添加で可逆的に変性した酵素に対する無差別酵素阻害剤の阻害活性評価によって、阻害剤の凝集、酸化還元反応、非特異的な共有結合などを介した無差別酵素阻害剤の特定が可能なことを確認した。本研究では創薬の初期段階で、標的特異性を評価する効果的な DMSO-perturbing アッセイの適用範囲、実用性を確立した。 |          |