OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	α1,6フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)阻害剤の探索と機能解析
Author(s)	武部, 智之
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82011
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

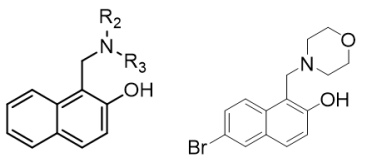
氏　名　（　Takebe Tomoyuki　）	
論文題名	Search and functional analysis of α1,6 fucosyltransferase (FUT8) inhibitor

α1,6-fucosyltransferase (FUT8) transfers fucose from GDP-fucose to N-acetylglucosamine at the base of N-linked sugar chains by α1,6 binding to form a core fucose structure. The core fucose suppresses immunoglobulin-dependent cytotoxic activity and is involved in immune regulation, as well as in various diseases such as fibrosis and cancer. In this study, we are developing an inhibitor of FUT8 that can be used *in vivo* for the purpose of functional analysis and activity control of core fucose.

We have already discovered the pharmacophore of FUT8 inhibitor by high throughput screening (HTS) using about 30,000 compounds. We aimed to improve the inhibitor by evaluating the function of FUT8 inhibitors at cell level and performing a structure-activity relationship based on the pharmacophore of the FUT8 inhibitor. First, we aimed to create a compound with high FUT8 inhibitory activity by synthesizing this analog based on FUT8 inhibitor **1** that based on pharmacophore. The structure of compound **1** was divided into two units, and each unit was optimized. As a result of synthesizing about 50 kinds of compounds and measuring their activities, we have synthesized the FUT8 inhibitor **2**, with an IC_{50} of about 10 μM *in vitro*. Next, the FUT8 inhibitory activity of the obtained compound **2** was measured, and the expression level of core fucose 72 hours after treated was confirmed by PANC-1, but the expression level of core fucose on the cell surface did not decrease. Therefore the physical property of compound **2** were investigated and as a result, compound **2** showed instability in water condition and completely decomposed after 12 hours in PBS at 37 ˚C. When the decomposition product was analyzed by MS, a peak of the compound in which the phenylpiperazine ring portion was considered to be eliminated was detected due to the formation of an enone by deprotonation of the hydroxy group of compound **2**. The structure of the decomposition product of compound **2** was confirmed using MS and NMR. From the results of ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR and LC-MS (nega), the structure of the decomposition product was identified, and the hydroxy group of compound **2** was determined to be the cause of destabilization in aqueous solution.

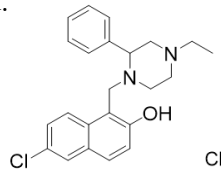
Therefore, we synthesized compound **3** which was designed so that the hydroxy group of compound **2** was protected and lipophilicity was increased to allow it to rapidly permeate the cell membrane and the hydroxy group was exposed by intracellular enzymes. Compound **3** showed improvement of stability in aqueous solution compared to compound **2**. Compound **3** was treated to PANC-1 every 12 hours for 3 days, and the FUT8 inhibitory activity was evaluated by flow cytometry. As a result, compound **3** reduced the expression level of core fucose on the cell surface at a level comparable to 2-Fluro-peracetylfucose, which is generally used as an inhibitor of fucosyltransferase.

Next, the mechanism of action of compound **2** was investigated. The reaction product of FUT8 and compound **2** was measured using HPLC-MS and MS-MS, and the multivalent peak and binding site where FUT8 and compound **2** were bound were confirmed.

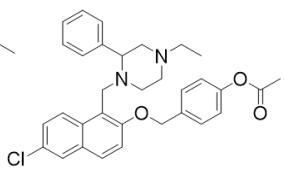


Pharmacophore of FUT8 inhibitor

1



2



3

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　武部　智之　　）	
論文題名	α1,6フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)阻害剤の探索と機能解析

α1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) はN結合型糖鎖の根元のN-アセチルグルコサミンにGDP-フコースからα1,6結合でフコースを転移し，コアフコース構造を形成する．形成されたコアフコースは，免疫グロブリン依存性細胞傷害活性を抑制し免疫制御に関わるほか，繊維化やがんをはじめとするさまざまな疾病にも関与する．本研究では，コアフコースの機能解析および活性制御を目指して*in vivo* で利用可能なFUT8の阻害剤の開発を行っている．

既に，約30,000個の化合物を用いたHigh throughput screening (HTS) によりFUT8阻害剤のファーマコフォアの発見に至っている．そこで発見したFUT8阻害剤の細胞における機能評価を行うとともに，FUT8阻害剤のファーマコフォアをもとにした構造活性相関を行うことで，より強力な阻害剤の開発を目指した．まず，ファーマコフォアをもとに開発したFUT8阻害剤**1**を基盤として，この類縁体を合成することにより，FUT8阻害活性の高い化合物の創製を目指した．化合物**1**の構造を2つのユニットに分割し，それぞれのユニットの最適化を行った．約50種類程度の化合物を合成し，活性を測定した結果，*in vitro* でのIC_{50}が10 μM程度とこれまでで最も強力なFUT8阻害剤**2**の創製に至った．次に，得られた化合物**2**についてFUT8阻害活性を測定し，PANC-1にて投与から72時間後のコアフコース発現量を確認したが，細胞表面のコアフコース発現量は減少しなかった．そこで化合物**2**の物性について調査を行ったところ，37 ˚CのPBS中で12時間後に化合物**2**が完全に分解されており，化合物**2**が水中で不安定であることが判明した．分解物をMSにて解析したところ，化合物**2**のヒドロキシ基の脱プロトン化によるエノン形成に伴い，フェニルピペラジン環部分が脱離したと考えられる化合物のピークが検出された．化合物2の分解物の構造を，MSとNMRを用い確認を行った．^{13}C-NMR，^{1}H-NMRとLC-MS (nega) の結果から，分解物の構造を特定し，化合物**2**のヒドロキシ基が水溶液中での不安定化の原因であると判断した．

そこで化合物**2**のヒドロキシ基を保護し，脂溶性を高めることで速やかに細胞膜を透過させ、細胞内の酵素でヒドロキシ基が露出するようなデザインにした化合物**3**を合成した．化合物**3**は化合物**2**と比較して水溶液中での安定性の向上がみられたため，化合物**3**を12時間おきに3日間，PANC-1に投与し，フローサイトメトリーによりFUT8阻害活性を評価した．その結果，化合物**3**を投与した際に，一般的にフコシルトランスフェラーゼの阻害剤として用いられている2-Fluro-peracetylfucoseと遜色ないレベルで細胞表面のコアフコース発現量が減少していることを確認できた．

次に，化合物2の作用機構について調べた．FUT8と化合物2の反応物をHPLC-MSおよびMS-MSを用いて測定し，FUT8と化合物2の結合した多価のピークと結合サイトを確認した．

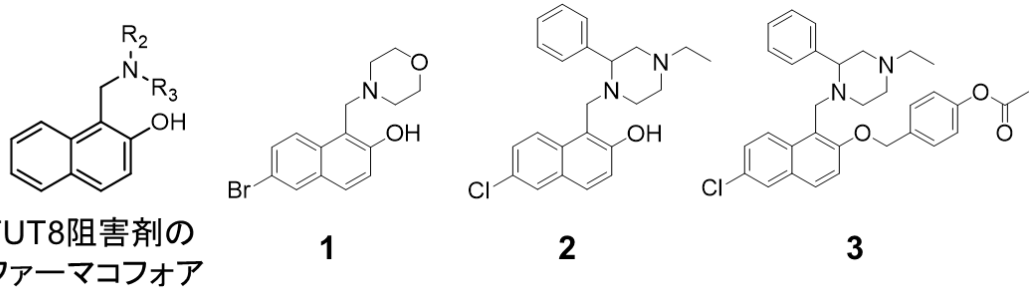


Fig.1 各化合物の構造

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　武部　智之　）

	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	深瀬　浩一
	副 査　教授	梶原　康宏
	副 査　教授	鈴木　孝禎
	副 査　特任教授	島本　啓子

論文審査の結果の要旨

武部智之君は、α1,6 フコース転移酵素 (Fut8)の阻害剤開発について研究を行った。

Fut8 は、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖(N-グリカン)の還元末端(根元)に存在する N-アセチルグルコサミンに対して、 α1-6 結合でフコースを転移する酵素である。この位置のフコースはコアフコースと呼ばれる。コアフコースは、肝臓がんなどにおいて、肝臓からの分泌糖タンパク質に観測されるため、肝臓がんや膵臓がんの診断や治療への利用が検討されている。また免疫系において、コアフコースは様々な調節機能を有することから注目を集めている。

武部君は、Fut8 ならびにコアフコースの機能解明や、新規な免疫療法への展開を目指し、Fut8 阻害剤の開発を行った。そこで、High Throughput Screening によって見出されていたファーマコフォアを基に、構造活性相関研究を行い、より高活性の化合物を得た。また見出された化合物が緩衝液中で容易に分解することを見出し、細胞内のエステラーゼによって活性化合物が切り出されるプロドラッグ化を行った。得られた化合物は、細胞レベルで Fut8 阻害作用を示すことをフローサイトメトリーにより確認した。またこの化合物は他のフコース転移酵素には作用せず、Fut8 を選択的に阻害することをフローサイトメトリーにより確認した。さらに、阻害剤が Fut8 と共有結合を形成することを質量分析により明らかにした。

細胞レベルで阻害作用を示す Fut8 選択的阻害剤は、当該研究室における競合的阻害剤（未発表）を除いては初めての例である。また細胞や生体レベルで阻害作用を示す糖転移酵素の開発例がほとんどないことを考慮すると本研究が糖鎖科学研究に与えるインパクトは大きい。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。