



Title	グリオブラストーマ治療創薬を目指したヒトAlkB homolog 5酵素活性阻害化合物探索とその阻害作用の解析
Author(s)	高橋, 光
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/89568">https://doi.org/10.18910/89568</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# 博士学位論文

グリオブラストーマ治療創薬を目指した

ヒト AlkB homolog 5 酵素活性阻害化合物探索とその阻害作用の解析

大阪大学大学院 薬学研究科 細胞生理学分野

創成薬学専攻 博士後期課程 3 年

高橋光

## 目次

緒論 .....	- 3 -
本論 .....	- 6 -
第一章 化合物選抜に用いる酵素活性評価系の構築.....	- 6 -
第1節 実験材料.....	- 6 -
第2節 実験方法.....	- 7 -
第3節 化合物評価を目的とした ELISA 酵素活性評価系の改良.....	- 9 -
第4節 AlphaScreen 評価系について.....	- 11 -
第5節 小括 .....	- 12 -
第二章 LiSC 保有化合物ライブラリからの化合物選抜.....	- 14 -
第1節 実験材料.....	- 14 -
第2節 実験方法.....	- 14 -
第3節 ALKBH5 阻害化合物の選抜.....	- 15 -
第4節 Ena15, Ena21 の阻害様式, 2OG に対する速度論的評価.....	- 16 -
第5節 類縁体評価.....	- 18 -
第6節 企業ライブラリ, J-Public ライブラリからの化合物探索 .....	- 20 -
第7節 小括 .....	- 20 -
第三章 ドッキングモデルと検証.....	- 22 -
第1節 実験材料とドッキングモデル構築のための情報.....	- 22 -
第2節 実験方法.....	- 22 -
第3節 ドッキングモデルの構築 .....	- 22 -
第4節 核酸生成物存在下での阻害活性.....	- 24 -
第5節 小括 .....	- 25 -
第四章 各種がん組織由来細胞株評価 .....	- 26 -
第1節 実験材料.....	- 26 -
第2節 実験方法.....	- 28 -
第3節 脳腫瘍(GBM)由来細胞における評価.....	- 30 -
第4節 siRNA 処置 ALKBH5 ノックダウンによる細胞増殖抑制活性 .....	- 31 -
第5節 細胞周期に与える影響.....	- 32 -
第6節 各種がん組織由来細胞株を用いた検討.....	- 32 -
第7節 ALKBH5 の m6A 脱メチル化阻害感受性遺伝子の探索 .....	- 33 -
第8節 小括 .....	- 38 -
総括 .....	- 39 -

結論 .....	- 43 -
謝辞 .....	- 44 -
略語 .....	- 45 -
本研究遂行における寄与 .....	- 47 -
参考文献 .....	- 48 -

## 緒論

厚生労働省から令和 3 年に報告[1]された本邦における死因第1位は、悪性新生物(全死亡者に占める割合は 26.5%)である。また、Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)による 2017 年の世界疾病負担調査[2]においても、悪性新生物は死因第 2 位で 24%を占めており、医療におけるがん治療薬開発の意義は非常に高いと言える。

本研究室では、前立腺がん、膵がんや小細胞性肺がんで高発現し、予後不良性が正相関する、Prostate cancer antigen-1 (PCA-1) 遺伝子を同定[3,4]した。PCA-1 は DNA/RNA の脱メチル化酵素活性を有し、細胞のがん化に関わると考えられることから、本研究室では PCA-1 を分子標的とする first in class のがん治療薬の開発を進めている。PCA-1 はホモロジー解析の結果、大腸菌蛋白質 AlkB と同様なドメイン構造を持ち、現在ヒトでは 9 種の分子からなる AlkB homolog (ALKBH) ファミリーの形成が確認された(Fig. 1) [5]。

ALKBH ファミリーは、2-oxoglutaric acid (2OG)を基質とし、二価鉄を補欠分子族として含む 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (2OGD)である。PCA-1 は ALKBH3 に該当し、核酸における N<sup>1</sup>-methyadenosine (m1A), N<sup>3</sup>-methylcytidine (m3C)の脱メチル化に関与する。一方、同じファミリーに属する ALKBH5, Fat mass and obesity-associated protein (FTO)は、N<sup>6</sup>-methyadenosine (m6A)の脱メチル化酵素である(Fig. 1)。

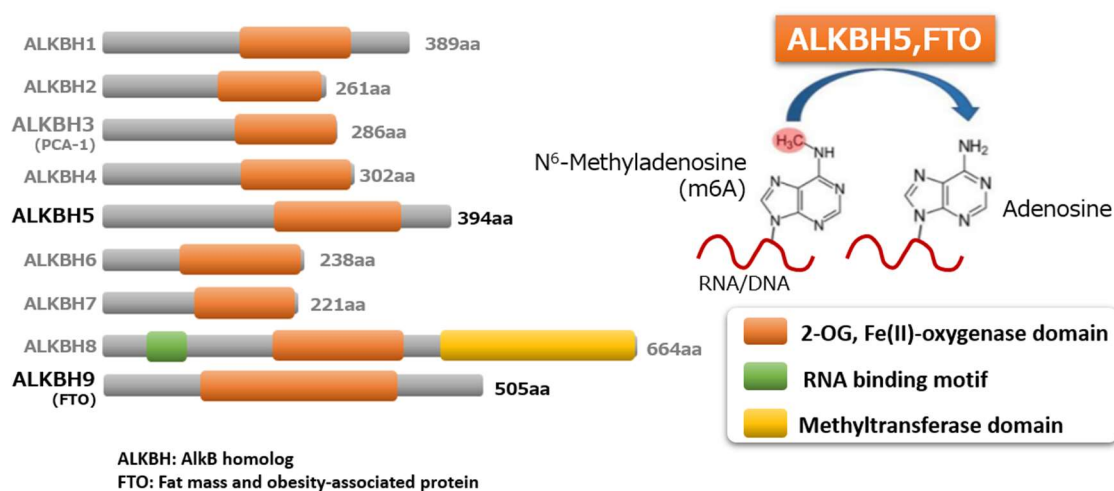


Fig. 1 ALKBH ファミリー分子と m6A 脱メチル化反応

このような核酸への後天的修飾については、メチル化、水酸化、アセチル化等 100 種以上の報告があり[6–8], その中でも m6A の RNA 修飾は最も一般的であり、エピトランスクリプティックな転写調節に重要な役割を果たしていると考えられている。例えば、m6A 修飾は、mRNA の安定性[9]や蛋白質の翻訳を制御する役割を果たす[10–12]と想定されている。この m6A を脱メチル化する

ALKBH5 や FTO は、上記の機能を制御する活性を有することから、新たな抗がん作用の標的として注目されている。

m6A の脱メチル化阻害は、神経膠芽腫[13]や骨肉腫[14]等、いくつかのがんに対して抑制効果が報告されている。最初に発見された RNA デメチラーゼである FTO は、低分子阻害剤 Meclofenamic acid 誘導体 MA2 等を用いて、FTO の抗がん作用に関する報告がなされた[15,16]。ALKBH5 阻害剤についても、最近複数の報告がなされている[17-19]。FTO 低分子阻害剤 Meclofenamic acid 誘導体 MA2 等では、m6A の脱メチル化活性を持つ ALKBH5 には阻害活性が低いという選択性の結果が示されている。一方、既報の ALKBH5 阻害剤は、その情報が十分示されていない。ALKBH5 阻害剤の報告は、結晶情報を活用したバーチャルスクリーニングの場合、主にこれらの酵素の基質である 2OG に対する拮抗型阻害化合物を想定した報告[17,19]がなされてきた。しかし、これらは FTO を含む他の 2OGD への選択性は示されていなかった。また、バーチャルスクリーニング以外の報告となる MV1085[18]は、開発化合物のリポジショニング調査の結果、プロテオミクスの手法から主活性を ALKBH5 阻害と判定した報告であるが、選択性は示されていない。以上の既報の ALKBH5 阻害化合物は、他の 2OGD に対する選択性が不明であり、これらを用いた結果が必ずしも ALKBH5 阻害によると明確には言えないのが現状である。

以上を鑑みて、ALKBH5 に対して選択的な阻害活性を示す化合物を、多様な構造を有する化合物ライブラリからのハイスループットスクリーニング(HTS)により見出すことを選択した。その理由として、選抜された化合物の創薬シードとしての価値に加え、FTO における Meclofenamic acid 誘導体 MA2 のように、ALKBH5 のがん細胞の増殖に関わる作用機序の解明に役立つと考えたためである。そこで、本学ライブラリスクリーニングセンター(LiSC)保有の化合物ライブラリを対象に化合物を探索することにした。

化合物選抜の目的で用いられた ALKBH5 の酵素活性評価系には、本研究室で構築済のサンドイッチ ELISA 法以外には、PAGE 法[15]、LC-MS 法[20,21]、蛍光偏光法[15]、RI 法[22]、蛍光標識 RNA 複合体法[23]があるものの、スループットやコスト面での課題は多く、小規模の化合物評価用途に限られている。本研究では、サンドイッチ ELISA 評価系を基に、AlphaScreen 試薬を用いた酵素活性評価系を構築した。この試薬を使う利点は、ELISA 法とは違い、洗浄過程が不要で検出が簡便なため、高い再現性が期待できることである。また、ELISA 法は 96 well microplate の使用が一般的であるが、AlphaScreen 試薬は 1536 well microplate での評価に対応している。このため、小スケールで多サンプル処理が可能であり、HTS での利用に多くの利点がある。但し、AlphaScreen 試薬を用いた手法は、洗浄過程がないために化合物の自家蛍光やクエンチング等の影響を受けやすく、偽陽性化合物が含まれる可能性がある。そのため、選抜した化合物の酵素活性阻害の確定判断には、酵素反応後に化合物の洗浄除去過程があるサンドイッチ ELISA 評価系を用いることとした。

HTS に用いる化合物ライブラリの多様な構造の化合物の中には、疎水性等の物性に基づく蛋白質への非特異的結合が生じて、あたかも陽性化合物として誤って選抜されてしまう場合がある。そのため、HTS では酵素反応に影響しない範囲で、還元剤、界面活性剤、BSA を添加することが通

例である。本研究室で構築済のサンドイッチ ELISA 評価系の反応溶液組成には、すでに還元剤、界面活性剤が加えられていたが、更なる偽陽性化合物排除を行い、適切な化合物のみを選抜するために BSA を加えた評価系の追加検討を行った上で、HTS 評価系に供した。

本研究では、LiSC 保有化合物ライブラリ探索により ALKBH5 選択的阻害化合物を新規に取得し、それらの化合物を用いて、ALKBH5 脱メチル化反応とグリオブラストーマ(GBM)由来細胞株に対する作用解析を行い、ALKBH5 に関連する既知情報と照らし合わせて、創薬シードとしての各化合物の作用発現の妥当性、ALKBH5 に関連するがん細胞増殖作用を評価した。

## 本論

### 第一章 化合物選抜に用いる酵素活性評価系の構築

LiSC 保有化合物ライブラリからの化合物探索を行うため, ALKBH5 酵素活性評価系の構築を行った。また, ALKBH5 の選択性対象として, 同じ m6A を基質とし, 同じ ALKBH ファミリーに属する FTO の酵素活性評価系の構築を行った。HTS 評価系構築に際しては, 本研究室で保有する ALKBH3 阻害化合物ライブラリ(1280 化合物)を使用した。これらの多くは ALKBH5 への交差性について不明であったが, 2OG 拮抗型阻害剤を含むことから, 仮想 HTS (パイロット)評価に供して ALKBH5 阻害活性値の再現性を確認した。

#### 第 1 節 実験材料

##### 精製酵素

- ALKBH5 (Active Motif 社 cat. no. 31589)
- FTO (Active Motif 社 cat. no. 31972)

##### 核酸基質

- Biotin 標識 1 本鎖 RNA 基質 [Biotin-UUUGGACUUGGUUGG(m6A)CUUU]
- Biotin 標識 1 本鎖 DNA 基質 [Biotin-GTTGCCTGTTTCGTGTTGG(m6A)CTTGCCTGT]

##### 検出試薬, 使用プレート

(ELISA 評価系)

- ABTS microwell peroxidase substrate system (SeraCare Life Sciences, Inc. cat. no. 5120-0032)
- Rabbit pAb to N<sup>6</sup>-methyladenosine (m6A) (Abcam cat. no. ab151230)
- Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam cat. no. ab6721)
- Immobilizer Streptavidin (ThermoFisher cat. no. 436014)

(AlphaScreen 評価系)

- AlphaScreen mouse IgG detection kit (PerkinElmer cat. no. 6760606R)
- Anti-N<sup>6</sup>-meA modifications of RNA&DNA mAb (345E11, Synaptic Systems cat. no. 202 011)
- Anti- N<sup>6</sup>-methyladenosine mAb (17-3-4-1, Enzo cat. no. ENZ-ABS301-0100)
- Alphaplate 1536 well plate (PerkinElmer cat. no. 6004350)

##### 化合物ライブラリ

- 本研究室保有 ALKBH3 阻害化合物ライブラリ (1280 化合物)



## 第2節 実験方法

### 1. ELISA 酵素評価系 (ALKBH5, FTO)

Immobilizer Streptavidin (以下, ELISA 用プレート)を 5 × SSCT buffer (750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH 7.0)により 300 µL/well で 3 回洗浄後, 5 × SSCT buffer に溶解した Biotin 標識 RNA 基質, または Biotin 標識 DNA 基質を終濃度 0 ~ 4 nM として 100 µL/well 添加し, 室温で 2 時間静置した。固定化されなかった残存核酸基質除去のため, 2 × SSCT buffer (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH 7.0)により 300 µL/well で 3 回洗浄後, 反応液組成を 50 mM HEPES-KOH (pH7.3 ± 0.1), 1 mM L(+)-ascorbic acid, 40 µM FeSO<sub>4</sub>, 0 ~ 0.1% BSA, 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), 0.04% NP-40, 100 ~ 400 µM 2OG として, ALKBH5 終濃度を 0.15 ng/µL, あるいは FTO を 1.5 ng/µL とした。また, 反応時間を ALKBH5 は1時間, FTO は 2 時間, 反応温度は 37°Cとした。酵素反応後, PBST (0.05% Tween20 in PBS, pH 7.2)で各ウェルを 300 µL で 3 回洗浄後, 1 次抗体(抗 m6A ポリクローナル抗体)および 2 次抗体(HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体)を PBST でそれぞれ 10,000 倍希釈し, 100 µL/well で添加し, 各 1 時間室温で静置し, 反応後には PBST で同様に洗浄した。ELISA 反応の検出試薬とした ABTS Microwell Peroxidase Substrate System はキットプロトコルに準拠して使用した。吸光光度計で OD<sub>415</sub>を測定した。各化合物の阻害活性値は, 以下の通り算出した。

$$\text{阻害率}_{\text{compound}} = 1 - (\text{Signal}_{\text{blank}} - \text{Signal}_{\text{compound}}) / (\text{Signal}_{\text{blank}} - \text{Signal}_{\text{control}})$$

Blank: 酵素なし, 基質あり

Control: 酵素あり, 基質あり

Compound: 酵素あり, 基質あり, 化合物あり

### 分注フローおよび検出

実施時条件	添加量
ELISA 用プレート(Immobilizer Streptavidin)	
↓ 5 × SSCT (0.05% Tween 20)	300 µL/well × 3 回
Biotin 標識核酸基質溶液	100 µL/well
↓ 室温 (25°C) 2 時間	
↓ 2 × SSCT (0.05% Tween 20)	300 µL/well × 3 回
化合物溶液	50 µL/well
↓ 室温 (25°C)	
酵素溶液	50 µL /well
↓ 37°C, 1 時間(ALKBH5), 2 時間(FTO)	
↓ PBST (0.05% Tween 20)	300 µL/well × 3 回
1 次抗体(Rb pAb to N <sup>6</sup> -methyladenosine (m6A))	100 µL/well
↓ 室温 (25°C), 1 時間	
↓ PBST (0.05% Tween 20)	300 µL/well × 3 回

2 次抗体 (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP))	100 $\mu$ L/well
↓ 室温 (25°C), 1 時間	
↓ PBST (0.05% Tween 20)	300 $\mu$ L/well x 3 回
発色試薬 (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP))	100 $\mu$ L/well
↓ 37°C, 1 時間	
OD <sub>415</sub> 測定 (吸光光度計 BIO-RAD 社 iMARK)	

## 2. AlphaScreen 酵素評価系 (ALKBH5, FTO)

Alphaplate 1536 well plate (以下, 1536 well plate)を用い, 反応液組成を 50 mM HEPES-KOH (pH 7.3  $\pm$  0.1), 1 mM L(+)-ascorbic acid, 40  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 0.1% BSA, 1 mM TCEP, 0.04% NP-40, 100  $\mu$ M 2OG, 核酸基質を Bio-m6A oligo DNA として酵素活性評価を実施した。酵素終濃度は, 条件検討時には ALKBH5 を 0~0.1 ng/ $\mu$ L, HTS では 0.22 ng/ $\mu$ L とした。酵素に FTO を用いた評価の際には 3 ng/ $\mu$ L とした。核酸基質終濃度は, 酵素に ALKBH5 を用いた際は 0.5 nM, FTO を用いた際は 0.4 nM として実施した。バックグラウンド値の算出の際には, 酵素終濃度, 核酸基質終濃度は 0 とした。また, 反応時間は, ALKBH5 を用いた条件検討時には 0~20 分間, HTS では 10 分間, FTO を用いた際は 60 分間で実施した。反応温度は両酵素共に室温 (約 25°C) とした。

検出試薬とした AlphaScreen Mouse IgG (mIgG) Detection Kit はキットプロトコルに準拠して使用した。抗体終濃度は 250 ng/mL とし, 0.1% BSA in PBS(-)にて調製した。一晩暗所静置後, マイクロプレートリーダーTECAN 社 SPARK で AlphaScreen シグナルを測定した。

Biotin 標識 DNA 基質の脱メチル化率は, 以下の通り算出した。

$$\text{脱メチル化率} = 1 - (\text{Signal}_{\text{control}} - \text{Signal}_{\text{background}}) / (\text{Signal}_{\text{blank}} - \text{Signal}_{\text{background}})$$

Blank: 酵素なし, 基質あり

Control: 酵素あり, 基質あり

background: 酵素なし, 基質なし

各化合物の阻害活性値は, 以下の通り ELISA 評価系と同様に算出した。

$$\text{阻害率}_{\text{compound}} = 1 - (\text{Signal}_{\text{blank}} - \text{Signal}_{\text{compound}}) / (\text{Signal}_{\text{blank}} - \text{Signal}_{\text{control}})$$

Blank: 酵素なし, 基質あり

Control: 酵素あり, 基質あり

Compound: 酵素あり, 基質あり, 化合物あり

## 分注フローおよび検出

実施時条件	添加量
<hr/>	
1536 well plate (Alphaplate 1536 well plate)	
↓	
化合物溶液	25 nL/well

(分注機:Hewlett-Packard 社 D300 または Becton, Dickinson and Company 社 Echo 550)

↓ 室温 (25°C)

Bio-6-meA oligo DNA 溶液 0.5 µL/well

(分注機:Fritz Gyger AG 社 CERTUS FLEX)

↓ 室温 (25°C)

反応液 (Blank) 2 µL/well

(分注機:Thermo Fisher Scientific 社 MultiDrop Combi)

↓ 室温 (25°C)

酵素溶液 (Control または Compound) 2 µL/well

(分注機:Thermo Fisher Scientific 社 MultiDrop Combi)

↓ 室温 (25°C) 10 分間

AlphaScreen beads mix 2 µL/well

(分注機:Thermo Fisher Scientific 社 MultiDrop Combi)

↓ 室温 (25°C), 遮光下, 一晚静置

測定 (マイクロプレートリーダー:TECAN 社 SPARK)

### 3. HTS quality control

HTS 実施における, 化合物活性評価の再現性指標[24]を用いて, 各評価について測定値の品質管理を行った。Z'-factor が 0.5 以上であれば, 各化合物が 1 ウェルでの評価であっても再現性のある阻害活性値であると判断した。

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{\text{blank}} + 3\sigma_{\text{control}})}{|\mu_{\text{blank}} - \mu_{\text{control}}|}$$

μ : 平均

σ : 標準偏差

blank : 基質あり, 酵素なし

control: 基質・酵素あり

### 4. 化合物活性値, 統計的手法

化合物評価のデータ解析基盤には KNIME Analytics Platform (KNIME AG) を用いた。化合物の IC<sub>50</sub> 値算出には, R 言語の drc パッケージを使用した。測定値より算出した活性値は, 平均値 ± SD で示した。GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.) を用い, DMSO 対照群に対する各処置群の 2 群間の有意差検定を Dunnett's test により行った。p 値が 0.05 以下の場合、統計的に有意であると判断した。

### 第 3 節 化合物評価を目的とした ELISA 酵素活性評価系の改良

多数の化合物から適切な化合物を選抜するため, 本研究室で構築された, 脱メチル化反応基質である m6A に対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法 (Fig. 2) による ALKBH5 酵素活性評価

系を基礎とした。この ELISA 評価系では、偽陽性化合物排除のために酵素反応液に界面活性剤、還元剤は含まれていたが、可能な限り適切な化合物選抜を行うために、偽陽性化合物排除の効果が期待できる BSA を加えた反応液組成の検討を行った。

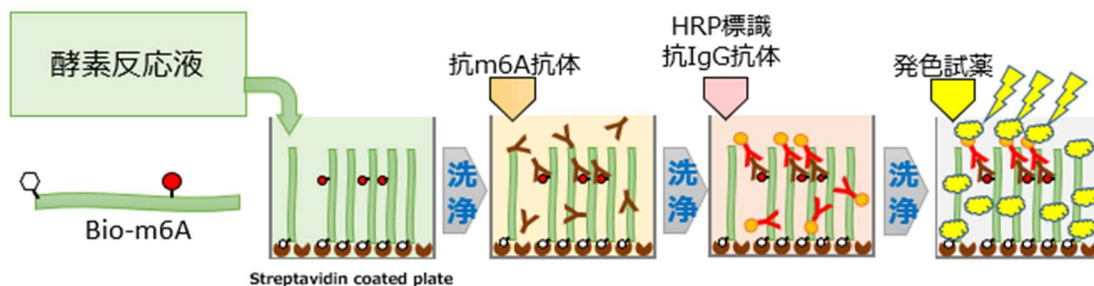


Fig. 2 サンドイッチ ELISA 法による N<sup>6</sup>-methyadenosine 脱メチル化反応検出の模式図

始めに、5×SSCT に溶解した 2 種類の核酸基質を用いた検量線を作成した。その結果、吸光度 OD<sub>415</sub> は、核酸基質 RNA, DNA 共に濃度依存的な増加を示した(Fig. 3A)。一方、酵素反応液組成として、0.1% BSA, 0.04% NP-40, 1 mM TCEP を添加した場合は、RNA 基質の吸光度 OD<sub>415</sub> は消失した(Fig. 3B)。一方、DNA 基質の吸光度 OD<sub>415</sub> は認められ、かつ ALKBH5 による脱メチル化反応に基づくシグナルの低下が認められた。以上の結果から、既報[25,26]の通り ALKBH5 の DNA 基質に対する脱メチル化活性を確認できたため、ALKBH5 酵素活性評価系に使用する核酸基質には DNA 基質を選択した。

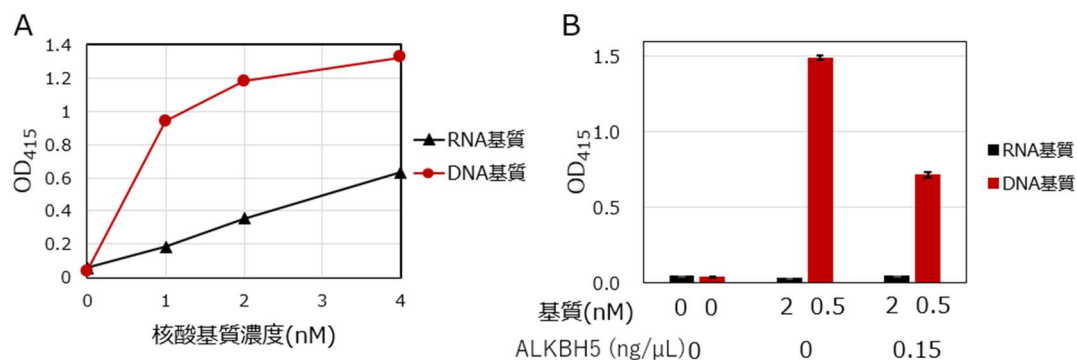


Fig. 3 化合物評価に用いる核酸基質の検討

化合物選抜の際の偽陽性化合物の排除に必要な追加の添加物として、BSA の添加条件下での m6A 修飾された RNA 基質(黒)と DNA 基質(赤)の抗 m6A 抗体を用いたサンドイッチ ELISA の検出結果の比較を実施した。A. BSA 不含の溶液に溶解した各核酸基質 0, 1, 2, 4 nM の m6A に対する検出試薬の吸光度 OD<sub>415</sub>(検出反応 20 分間, n = 2) B. 0.1% BSA を含む酵素反応液と、m6A 修飾された RNA 基質、または DNA 基質を用いた ALKBH5 酵素反応時の各核酸基質の吸光度 OD<sub>415</sub> (検出反応 40 分, n = 3)

#### 第4節 AlphaScreen 評価系について

上記のサンドイッチ ELISA 法を基に、HTS 実施に適した活性評価法として、前述の AlphaScreen 試薬を用いた酵素活性評価系(Fig. 4)を構築した。

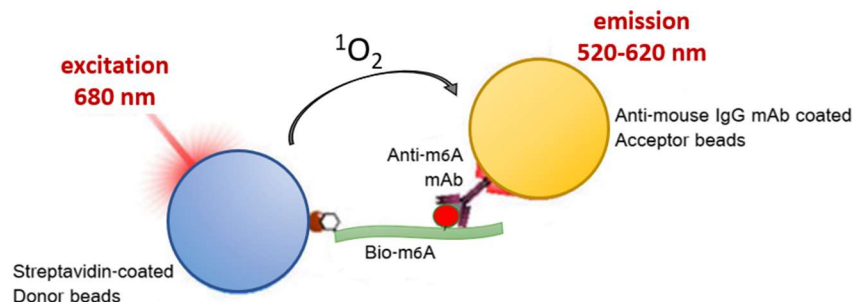


Fig. 4 AlphaScreen 試薬を用いた N<sup>6</sup>-methyladenosine 脱メチル化反応の検出の模式図

反応液組成を ELISA 法と同様として、AlphaScreen 試薬を用いた脱メチル化の検出に適した抗 m6A 抗体を選択するため、購入可能な 2 種類の抗体について各々の AlphaScreen シグナルを比較した。その結果、2 種類の抗 m6A 抗体は濃度依存的な AlphaScreen シグナルの増加傾向を示した(Fig. 5A, B)。Enzo 社抗体(Fig. 5B)に比べ、Synaptic Systems (SYSY) 社抗体(Fig. 5A)は同程度の濃度でのシグナルバックグラウンド比が高い結果を示した。以上の結果から、本評価系に用いる抗 m6A 抗体として、SYSY 社抗体 (345E11) を選択した。

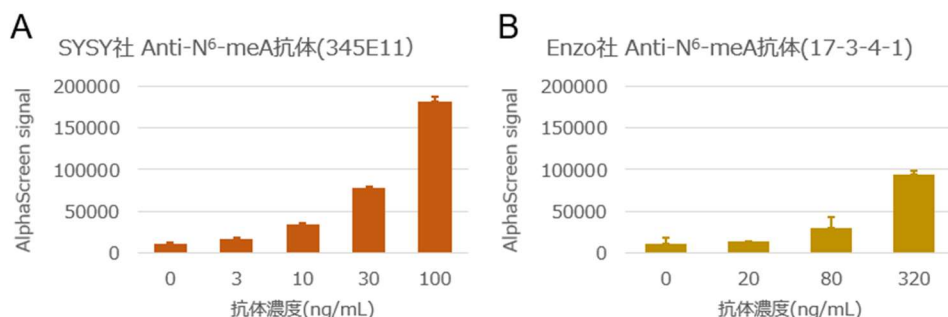


Fig. 5 AlphaScreen 試薬を用いた酵素活性評価系に用いる抗 m6A 抗体の比較結果

購入可能な 2 種類の抗体について各々の AlphaScreen シグナルを比較した (n = 4)。A, 抗 m6A マウスモノクローナル抗体 (橙, 345E11), B, 抗 m6A マウスモノクローナル抗体 (金, 17-3-4-1)

数万化合物の酵素活性阻害評価の HTS 実施を想定し、AlphaScreen 試薬を用いた酵素活性評価系を AlphaScreen 1536 well plate (以下, 1536 well plate) で実施することにした。但し、このような高密度プレートを使用する際、加温して酵素反応を行う場合には、ウェル毎に温度条件が異なる事象が生じやすくなる。その結果、1 化合物毎の活性値の quality control が維持できず、適切な阻害活性を得ることが難しくなる。そのため、室温での化合物評価を前提として、酵素濃度と反応時間の検討を行った。その結果、各酵素濃度で反応時間依存性を比較した場合、反応開始 3 分後で酵素反応が停止していた(Fig. 6A)。同じ結果を各反応時間で酵素濃度依存性を比較すると(Fig.

6B), 酵素濃度 0.05 ng/μL 以上の濃度では飽和傾向が見られるものの, 0.05 ng/μL 以下であれば, 酵素濃度依存的な m6A 脱メチル化反応を示した。以上の結果から, 最終的に HTS は 0.022 ng/μL にて実施することとした。

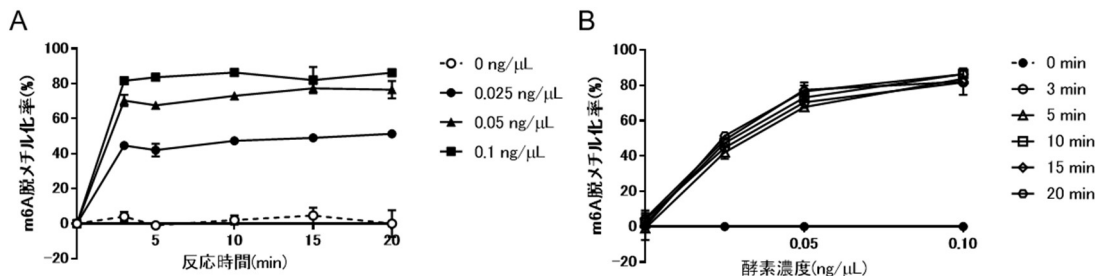


Fig. 6 ALKBH5 酵素濃度と反応時間

HTS 実施を想定した, ALKBH5 酵素濃度と反応時間の検討。ALKBH5 酵素濃度を 0, 0.025, 0.05, 0.1 ng/μL, 反応時間を 0, 3, 5, 10, 15, 20 分間として, 室温で反応を行った (n = 4)。

以上の検討により, 数万化合物の酵素活性評価を想定した 1536 well plate を用いた ALKBH5 酵素活性評価系を構築した。本研究室保有 ALKBH3 阻害化合物ライブラリの 1280 化合物を 2 枚の 1536 well plate に分注して n = 2 でパイロット評価を実施した(Fig. 7A)。HTS quality control 指標の Z'-factor[24]はそれぞれ 0.75, 0.76 で再現性に問題はないと判断した。また, 各化合物の n = 2 の阻害活性値の差は, 約 9 割が 3%以内であり(Fig. 7B), この結果からも再現性に問題ないと判断した。

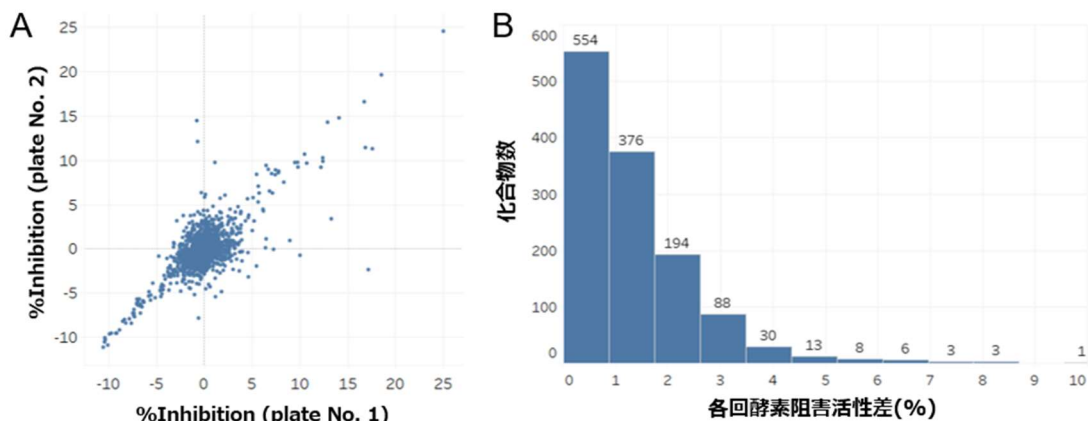


Fig. 7 AlphaScreen 試薬を用いた ALKBH5 酵素評価系における各化合物の阻害値の再現性

本研究室保有 ALKBH3 阻害化合物ライブラリの 1280 化合物を 2 枚の 1536 well plate に分注して仮想 HTS 評価を実施した結果。A. 各化合物の ALKBH5 酵素活性阻害値, B. 各化合物のプレート間の阻害活性値の活性差の頻度分布。

## 第 5 節 小括

- 本研究室で構築済の ELISA 法に基づく ALKBH5 酵素活性評価系の反应用液組成を, ALKBH5 選択的化合物を化合物ライブラリから取得する際の偽陽性化合物を排除する目的

で BSA を含む組成に改変した。この変更により RNA 核酸基質の検出シグナルが消失するため、ALKBH5 が *in vitro* で同様の脱メチル化反応を示す DNA 基質を用い、ALKBH5 酵素活性評価系を構築した。

- 偽陽性排除を目的として改変した酵素反応液組成を用い、AlphaScreen 試薬を用いた酵素活性評価系を構築した。本研究室保有 ALKBH3 阻害化合物ライブラリの 1280 化合物を用いたパイロット評価で、HTS 実施の際の化合物阻害活性値の再現性に問題がないことを確認した。

## 第二章 LiSC 保有化合物ライブラリからの化合物選抜

第一章で構築した AlphaScreen 試薬を用いた ALKBH5 酵素活性評価系を用いて, ALKBH5 選択的阻害活性を有する化合物の探索を LiSC 保有化合物ライブラリより行った。

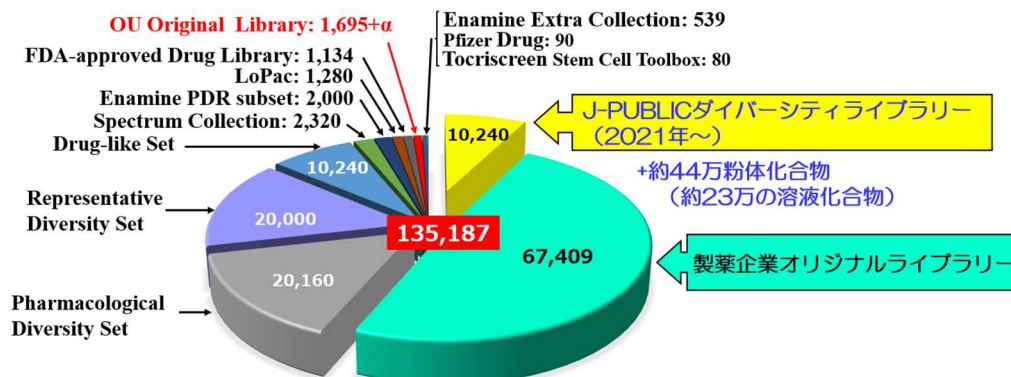


Fig. 8 本学 LiSC 保有化合物ライブラリ

本学 LiSC 保有の複数化合物ライブラリ毎の化合物数と総数を示す。2021 年に J-Public ライブラリ 10240 化合物等が追加された。

### 第 1 節 実験材料

LiSC 保有化合物ライブラリ(Fig. 8)

- Enamine 社 Pharmacological Diversity Set: 10240 化合物
- 企業ライブラリ: 約 6.7 万化合物
- J-Public ライブラリ: 10240 化合物

上記に加え, 酵素活性評価には, 第一章 第 1 節に記載した実験材料のうち, 精製酵素 (ALKBH5, FTO), Biotin 標識 1 本鎖 DNA 基質, ELISA 評価系または AlphaScreen 評価系の検出試薬, 使用プレートを用いた。

### 第 2 節 実験方法

#### 1. 化合物ライブラリからの HTS による ALKBH5 阻害化合物選抜

第一章 第 2 節に記載した実験方法 1~4 に従い, 酵素活性評価を実施した。本章での酵素反応液組成は, 全て BSA を含む条件で実施した。また, 核酸基質は DNA を用いた。

#### 2. 化合物活性値, 統計的手法, 物性値, 阻害様式, 類縁体検索

各活性値の算出とその有意差検定は第一章第 2 節に記載のとおり行った。酵素反応速度論に基づく見かけの  $K_m$  および見かけの  $V_{max}$  の値は GraphPad Prism 7 ソフトウェアによる Michaelis-Menten 式に基づき算出した。また, 各阻害様式の判断の参考に非線形回帰曲線フィットモデルに基づく適合度を算出した。各化合物の物性値算出には Chemistry Development Kit toolkit を用いた。類縁体検索には, 選抜化合物と検索対象となる LiSC 保有ライブラリの化合物構造情報として SMILES フォーマットを用い, RDkit により各化合物の ECFP4 のフィンガープリントを作成した。選



抜化合物と検索対象となる各化合物のフィンガープリントより Tanimoto 係数を算出し, 0.5 以上のものを類縁体として選抜した。

第 3 節 ALKBH5 阻害化合物の選抜

LiSC 保有化合物ライブラリより Enamine 社 Pharmacological Diversity Set ライブラリ 10240 化合物を提供頂いた。第一章で構築した AlphaScreen 系で 1536 well plate 1 枚当たり 1280 化合物, 計 8 枚分について, 化合物終濃度 10  $\mu$ M (n = 1)で ALKBH5 酵素活性阻害を評価した。各評価プレートの再現性指標となる Z'-factor[24]は 0.62 以上であり, 再現性に問題はないと判断した。

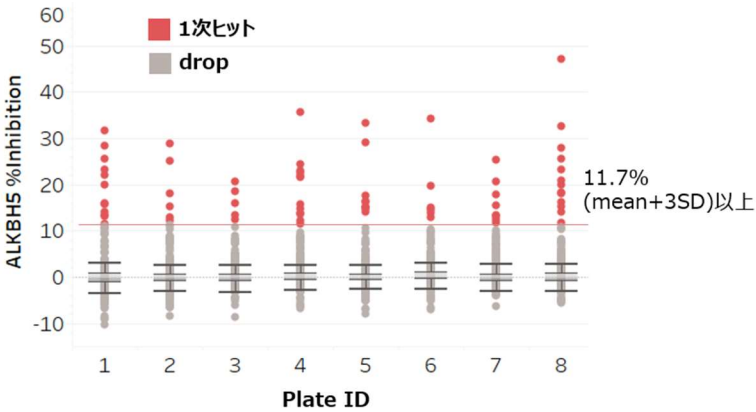


Fig. 9 Pharmacological Diversity Set ライブラリ 10240 化合物の ALKBH5 酵素活性阻害

Enamine 社 Pharmacological Diversity Set ライブラリ 10240 化合物の HTS 評価での各化合物の ALKBH5 酵素活性阻害値。全 10240 化合物の ALKBH5 阻害活性値の Mean+3SD となる 11.7%以上を 1 次スクリーニングの化合物選抜基準とした。

1 次スクリーニングの化合物選抜基準を, 評価化合物の阻害活性値より Mean+3SD となる 11.7% 以上とした(Fig. 9)。この基準で化合物選抜を行った結果, 70 化合物が 1 次ヒット化合物となった。1 次ヒット率は 0.68%であった。

Table 1 再現性評価で選抜した 10 化合物の ALKBH5 酵素活性阻害値

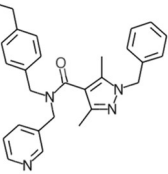
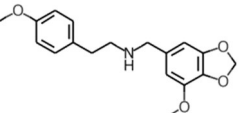
Ena#	Product ID	Alphascreen評価系		ELISA評価系
		酵素阻害活性(%) 終濃度 10 $\mu$ M	酵素阻害活性(%) 終濃度 20 $\mu$ M	酵素阻害活性(%) 終濃度 50 $\mu$ M
1	Z56772174	27	117	-2
3	Z92266491	19	127	2
5	Z46095442	35	48	-1
10	Z26063623	18	121	7
13	Z46559185	24	69	4
14	Z89514325	18	157	-2
15	Z52453295	44	25	74
20	Z56595001	33	68	6
21	Z2239055624	28	23	53
次点				
9	Z194740588	5	46	0

HTS ヒット化合物の 2 化合物を赤でハイライトした。

引き続き、同じ AlphaScreen 系による ALKBH5 酵素活性評価系を用いて、再現性評価を化合物終濃度 10, 20  $\mu\text{M}$  ( $n = 2$ ) で実施した。1 次評価と同じ選抜基準で阻害活性を示した 9 化合物と、1 次評価よりも弱い結果となったが、20  $\mu\text{M}$  添加時に 46% 阻害を示した化合物 Ena9 を次点化合物として追加し、合計 10 化合物を選抜した (Table 1)。

確定判断のため、化合物自家蛍光等の影響がない ELISA 法による ALKBH5 酵素活性評価系により 400  $\mu\text{M}$  2OG 存在下で化合物終濃度 50  $\mu\text{M}$  ( $n = 2$ ) での各化合物の酵素活性阻害評価を行った。HTS ヒット化合物の選抜基準を 50% 阻害とした際に、Ena15 と Ena21 の阻害活性値は、それぞれ 74%, 53% の阻害活性値を示した。一方、他の 7 化合物の阻害活性は認められなかったため、偽陽性化合物と判断した (Table 1)。以上の結果により HTS ヒット化合物として選抜した Ena15 と Ena21 の化学構造式と Chemistry Development Kit toolkit により物性値を算出した (Table 2)。

**Table 2 Enamine 社 Pharmacological Diversity Set ライブラリより選抜した各ヒット化合物の物性値と新規購入原末の純度**

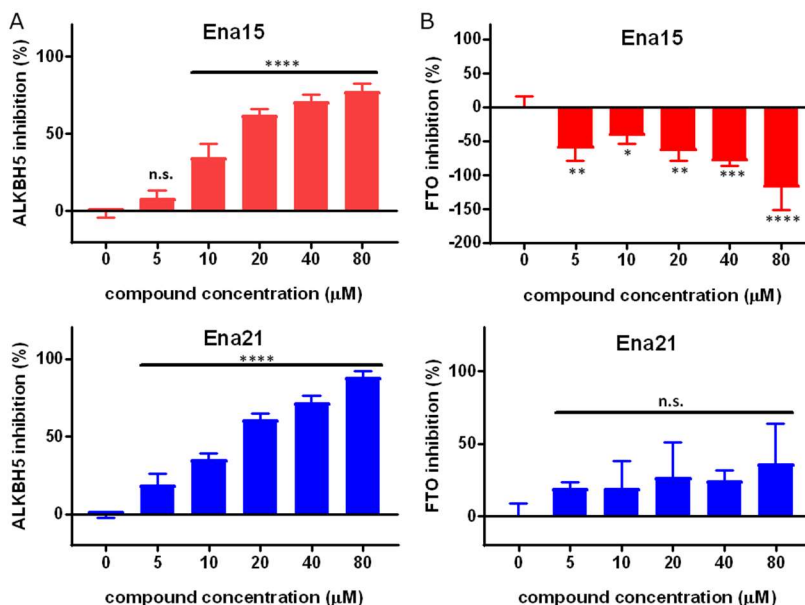
Compound	Ena15	Ena21
		
Enamine Product ID	T5488185	T5364936
Chemical Formula	$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4$
Molecular weight	438.2	315.1
XLogP	5.258	2.721
H donors	0	1
HB acceptors	4	1
純度	90%	90%

#### 第 4 節 Ena15, Ena21 の阻害様式, 2OG に対する速度論的評価

HTS ヒット化合物 Ena15 および Ena21 について、ELISA 法による ALKBH5 阻害活性値の濃度依存性について、100  $\mu\text{M}$  2OG 存在下における、化合物終濃度 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) で ALKBH5 の阻害活性値を求めた (Fig. 10A)。各化合物の  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ、Ena15 は  $18.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$ , Ena21 は  $15.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$  であった。一方、同じ m6A を基質とする ALKBH5 と同じファミリーの酵素である FTO への阻害活性を 2OG 及び化合物終濃度を同じ条件で評価した (Fig. 10B)。その結果、Ena15 は ALKBH5 とは逆に FTO の脱メチル化活性を向上させる傾向を示した。一方、Ena21 は化合物終濃度が 80  $\mu\text{M}$  まで FTO に対して有意な阻害活性値を示さなかった。

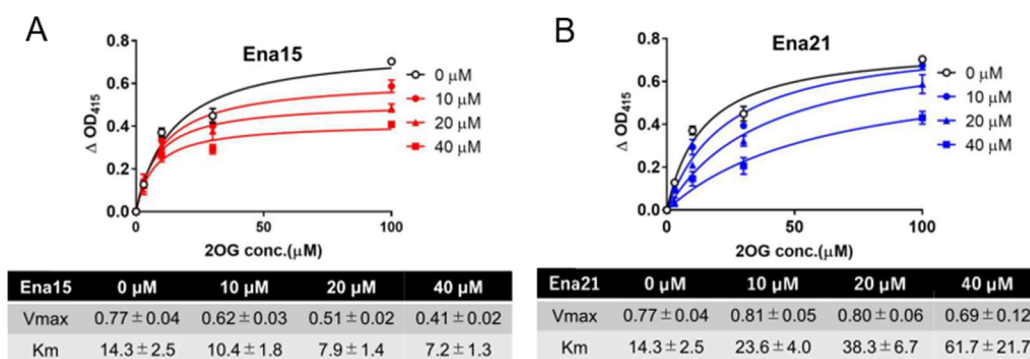
引き続き、ALKBH5 の酵素反応への 2OG に対する阻害様式について Michalis-Menten 式に基づく評価を行った (Fig. 11)。その結果、Ena15 は 2OG 濃度増加に関わらず  $K_m$  値,  $V_{\text{max}}$  が共に

低下する不拮抗型阻害を示した。一方, Ena21 は 2OG 濃度増加に伴い  $K_m$  値は増大傾向を示し,  $V_{max}$  は一定となる拮抗型阻害を示した。GraphPad Prism software で用意されている阻害様式に基づく Curvefit model で適合度を確認したところ, Ena15 は不拮抗型阻害の Curvefit 適合度が最も高く, 相関係数  $R^2 = 0.9658$ ,  $\text{Alpha}K_i = 47.8 \pm 5.5 \mu\text{M}$  であった。一方, Ena21 は拮抗型阻害の Curvefit 適合度が最も高く, 相関係数  $R^2 = 0.9623$ ,  $K_i = 11.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$  であった。



**Fig. 10 HTS ヒット Ena15, Ena21 の ALKBH5 および FTO に対する濃度依存性評価結果**

ELISA 法による ALKBH5 および FTO に対する酵素活性評価での 2OG 濃度を  $100 \mu\text{M}$  存在下, 各化合物 Ena15(赤), Ena21(青)の化合物終濃度  $10, 20, 40, 80 \mu\text{M}$  での活性値( $n = 3 \sim 4$ )。A. ALKBH5 酵素活性阻害値, B. FTO 酵素活性阻害値。DMSO 対照群(化合物濃度  $0 \mu\text{M}$ )に対する各処置群の 2 群間の有意差検定を Dunnett's test により行った。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; n.s., not significant.



**Fig. 11 Michaelis-Menten 式に基づく Ena15, Ena21 の 2OG に対する阻害様式**

2OG 濃度を  $0, 3, 10, 30, 100 \mu\text{M}$  存在下, 化合物濃度  $0, 10, 20, 40 \mu\text{M}$  添加時の ALKBH5 阻害による脱メチル化反応より  $V_{max}$ ,  $K_m$  値を Prism software で算出し, 各化合物の阻害様式を決定した( $n = 3$ )。図中, DMSO control(黒, A,B), Ena15(赤, A), B. Ena21(青, B)。

## 第 5 節 類縁体評価

Table 3 Ena21 類縁体 20 化合物の構造式と各 Tanimoto 係数

No.	Produc ID	Molecule	tanimoto coefficients	No.	Produc ID	Molecule	tanimoto coefficients
1	Z57106196		0.59	11	Z90639897		0.51
2	Z86153296		0.57	12	Z751911146		0.51
3	Z90649176		0.52	13	Z401927652		0.55
4	Z86145594		0.65	14	Z823524242		0.57
5	Z86143211		0.55	15	Z823442884		0.52
6	Z823521314		0.6	16	Z823525700		0.56
7	Z635523088		0.56	17	Z751954962		0.51
8	Z764447666		0.55	18	Z86149474		0.54
9	Z86143199		0.54	19	Z751958450		0.54
10	Z751960170		0.53	20	Z102841998		0.69

HTS ヒット化合物として選抜した Ena15 と Ena21 について、LiSC ライブラリ化合物の中から類縁体検索を行う目的で、フィンガープリント ECFP4 で類似性指標とした Tanimoto 係数が 0.5 以上の化合物を LiSC ライブラリ化合物の中から選抜した。その結果、Ena15 でこの条件を満たす類縁体は得られなかった。一方、Ena21 は 20 化合物が類縁体として選抜された (Table 3)。

引き続き、Ena21 類縁体の 20 化合物について、AlphaScreen 系 ALKBH5 酵素活性評価系で化合物終濃度 10, 20  $\mu\text{M}$  ( $n=2$ ) で阻害活性を評価した (Table 4)。その結果、HTS における化合物選抜基準より弱い阻害活性ではあるが、Ena21 類縁体#3 の 1 化合物で、終濃度 20  $\mu\text{M}$  において HTS の選抜基準の 11.7% を超える酵素活性阻害を確認した。

Table 4 Ena21 類縁体 20 化合物の AlphaScreen 評価系における ALKBH5 酵素活性阻害

No.	Enamine	平均 酵素活性阻害率(%) 化合物終濃度 10 $\mu$ M	平均 酵素活性阻害率(%) 化合物終濃度 20 $\mu$ M
1	Z57106196	-1.5	1.0
2	Z86153296	-1.3	-0.2
3	Z90649176	6.4	18.8
4	Z86145594	-2.2	1.2
5	Z86143211	-1.6	0.1
6	Z823521314	-1.6	-0.2
7	Z635523088	0.4	-0.3
8	Z764447666	-0.4	0.1
9	Z86143199	-0.8	0.1
10	Z751960170	-1.1	-0.6
11	Z90639897	0.9	1.6
12	Z751911146	0.3	0.4
13	Z401927652	-0.9	2.0
14	Z823524242	-1.0	-0.1
15	Z823442884	-1.2	2.9
16	Z823525700	-0.5	1.2
17	Z751954962	-0.4	0.5
18	Z86149474	-0.6	1.5
19	Z751958450	-0.9	-0.8
20	Z102841998	-0.8	-0.1

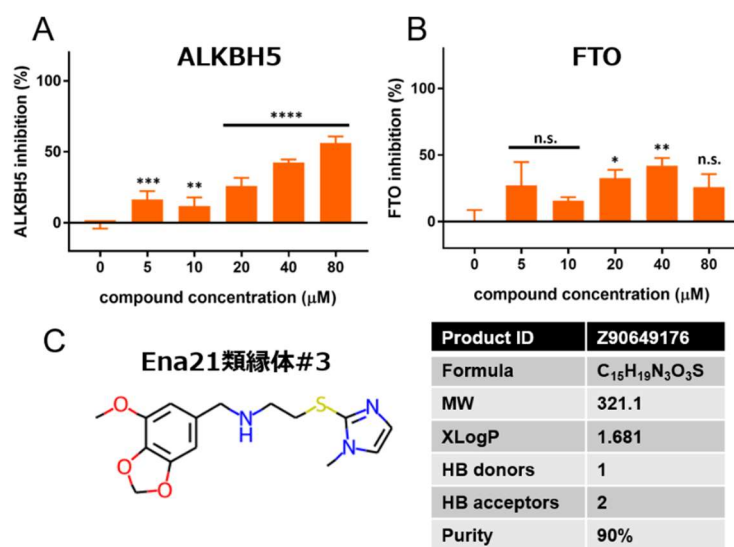


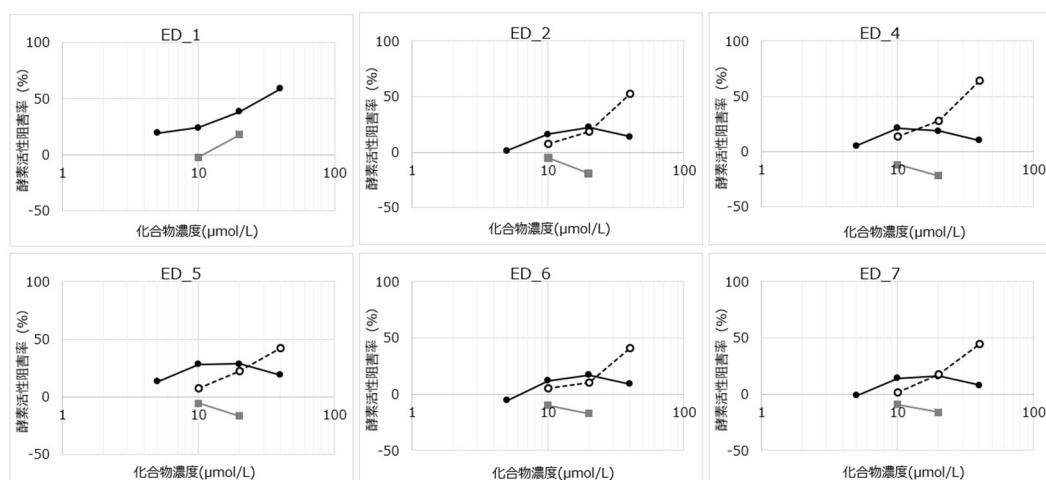
Fig. 12 ELISA 法による ALKBH5 および FTO に対する Ena21 類縁体#3 の濃度依存性評価, 化学構造式と物性値

2OG 濃度を 100  $\mu$ M 存在下, 化合物濃度 0, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu$ M 添加時(n = 3 ~ 4)の ALKBH5(A)および FTO(B)に対する阻害値。DMSO 対照群(化合物濃度 0  $\mu$ M)に対する各処置群の 2 群間の有意差検定を Dunnett's test により行った。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001; n.s., not significant. C. Ena21 類縁体#3 の化学構造式と Chemistry Development Kit toolkit により算出された物性値と新規購入原末の純度。

この Ena21 類縁体#3 について、AlphaScreen 試薬を用いた評価で懸念となる、化合物自家蛍光等による影響での偽陽性化合物ではないことを確認するため、ELISA 法による阻害活性の確定判断を行った。ALKBH5 酵素活性評価系における活性評価を 100  $\mu$ M 2OG, 化合物終濃度 10, 20, 40, 80  $\mu$ M ( $n = 3 \sim 4$ )で濃度依存性評価を行った。その結果、AlphaScreen 系 ALKBH5 酵素活性評価系での阻害活性値と同等であった(Fig. 12A)。選択性評価のため、FTO を対象として、化合物終濃度を 80  $\mu$ M までで阻害活性値を評価した結果、FTO に対して ALKBH5 と同様に、やや弱い阻害活性値であった(Fig. 12B)。Ena21 とその類縁体#3 は類似の化学構造を有し、共通の酵素活性阻害を持つことから、ALKBH5 への相互作用が化学構造の類似性に基づく可能性が示唆された。Ena21 類縁体#3 の化学構造式と Chemistry Development Kit toolkit により算出された物性値を示した(Fig. 12C)。

## 第 6 節 企業ライブラリ, J-Public ライブラリからの化合物探索

Enamine 社 Pharmacological Diversity Set で実施した HTS と同様の評価により、企業ライブラリの約 6.7 万化合物, J-Public ライブラリ 10240 化合物からの ALKBH5 選択的化合物探索を実施した。その結果、企業ライブラリからは 6 化合物を HTS ヒットとして選抜した(Fig. 13)。一方、J-Public ライブラリからは選抜基準を満たすヒット化合物は得られなかった。



**Fig. 13 企業ライブラリより選抜した ALKBH5 選択的化合物の各酵素に対する活性値**

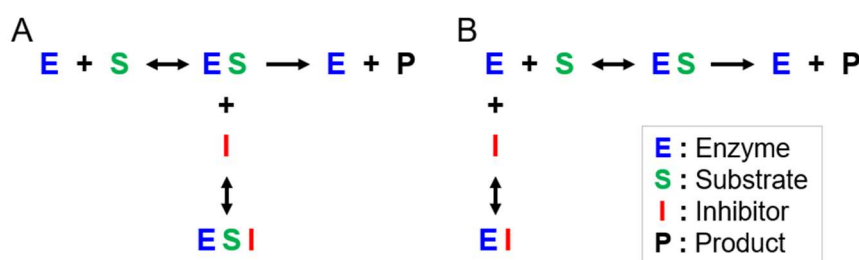
HTS でヒット化合物として選抜した 6 化合物の ALKBH5, FTO に対する 2OG 濃度を 100  $\mu$ M 存在下の化合物濃度 0, 5, 10, 20, 40  $\mu$ M 添加時( $n = 3 \sim 4$ )の酵素活性阻害値を示した。なお、AlphaScreen 法での阻害値は、濃度依存的な化合物自家蛍光と想定される影響が懸念されたため、酵素なしで化合物を添加した条件との差分で補正した値を示した。ALKBH5 濃度依存性評価(AlphaScreen: ●, ELISA: ○), FTO 濃度依存性評価(AlphaScreen, ■)

## 第 7 節 小括

- HTS により LiSC 化合物ライブラリのうち、Enamine 社 Pharmacological Diversity Set(10240 化合物)より、新規の ALKBH5 選択的阻害作用を示す 2 化合物を見出し、Ena15, Ena21 と命

名した。

- 企業化合物ライブラリ(6.7 万化合物)より, 新規の ALKBH5 選択的阻害作用を示す 6 化合物を見出した。なお, この 6 化合物については, 新たに合成する必要があるため, HTS によるヒット化合物選抜までの検討とした。
- Enamine 社 Pharmacological Diversity Setより取得した ALKBH5 選択的阻害 2 化合物のうち, Ena15 は 2OG との不拮抗型阻害を示した。Ena15 は ES+I という反応で ESI の状態に遷移する(Fig. 14A)。つまり, 2OG が ALKBH5 に結合した状態で, 2OG 相互作用部位と共存可能な部位に Ena15 が結合し脱メチル化反応を阻害すると解釈される。一方, Ena21 は 2OG との拮抗型阻害を示す化合物で, 既報[17,19]の化合物と同様, ALKBH5 の 2OG の相互作用部位に結合する可能性が示唆された(Fig. 14B)。
- LiSC 化合物ライブラリより Ena15, Ena21 の類縁体を検索した結果, Ena21 のみ 20 化合物を見出すことができた。これらの化合物を評価した結果, ALKBH5 に対して阻害活性を示す Ena21 類縁体#3 を得た。Ena21 とその類縁体#3 は類似の化学構造を有し, 共通の酵素活性阻害を持つため, ALKBH5 への相互作用が化学構造の類似性に基づく可能性が示唆された。



**Fig. 14** 酵素反応速度論に基づく酵素活性阻害様式の模式図

A, 不拮抗型阻害 (Ena15) B, 拮抗型阻害 (Ena21)

### 第三章 ドッキングモデルと検証

ALKBH5 に対して阻害活性を有し、それぞれ異なる阻害様式を持つ 2 つの化合物 Ena15, Ena21 について、ドッキングモデルによる結合予測を実施した。更に、この結合予測結果の検証検討を行った。

#### 第 1 節 実験材料とドッキングモデル構築のための情報

##### 結晶情報

- ALKBH5 (PDB ID: 4NRO)
- AlkB protein bound to dsDNA containing m6A (PDB ID: 4NID)

##### 核酸反応生成物(mimicked product)

- 合成 1 本鎖 DNA 生成物[GTTGCCTGTTCGTGTTGGACTTGCCTGT]

上記に加え、酵素活性評価には、第一章 第 1 節に記載した実験材料のうち、精製酵素 (ALKBH5, FTO), Biotin 標識 1 本鎖 DNA 基質, ELISA 評価系の検出試薬, 使用プレートを用いた。

#### 第 2 節 実験方法

低分子化合物と ALKBH5 の結合予測モデル構築のため、ALKBH5 の結晶情報として、Protein Data Bank より PDB ID: 4NRO[19]を取得した。ドッキングモデル構築には、AutoDock Vina[28] (The Scripps Research Institute)を用いた。以上の情報を基に、Ena15 または Ena21 との ALKBH5 複合体モデルを構築した。各化合物と相互作用する ALKBH5 のアミノ酸残基の把握に Biovia Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes)を使用し、Ligand Interaction Diagramを作成した。

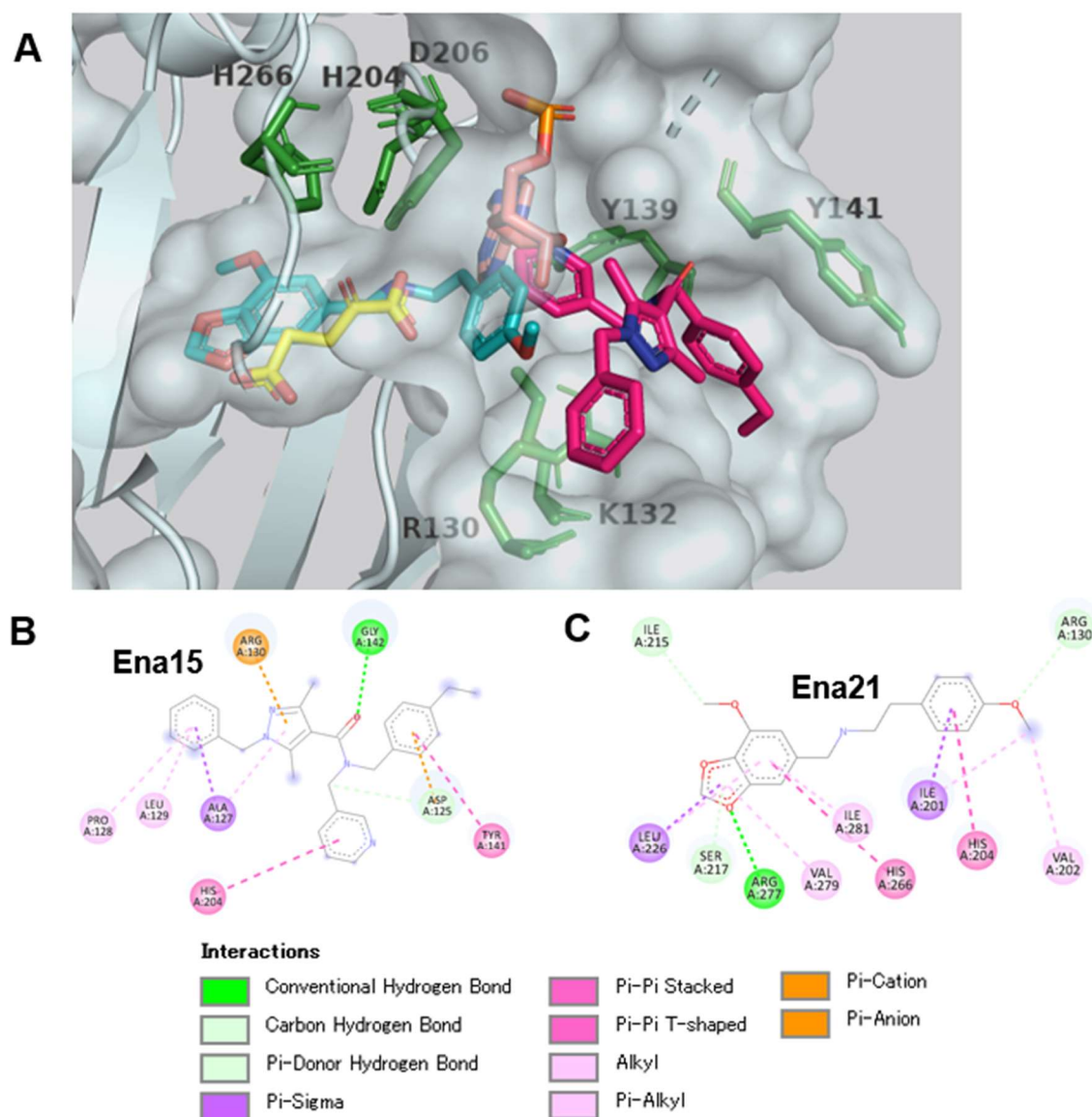
上記に加え、酵素活性評価には、第一章 第 2 節に記載した実験方法を用いた。本章での酵素反応液組成は、全て BSA を含む条件で実施した。また、核酸基質は DNA を用いた。

#### 第 3 節 ドッキングモデルの構築

AutoDock Vina[28]を用いて、ALKBH5 とリガンド結合の探索対象とする化合物相互作用部位を規定する grid box として、ALKBH5 全体を内包する x: 50 Å, y: 40 Å, z:50 Å, センターを x: 12.406 Å, y: 24.292 Å, z: 12.533 Å に設定した。結晶の水素原子は、AutoDock Vina[28]を用いて再構成した。なお、His204 と His266 には NE2 における金属への配位のために HD1 を、His209 には Glu153 の主鎖との水素結合の可能性から HE を選択した。ALKBH5 に対して Ena15 および Ena21 のドッキング予測モデルを構築した結果、最も高い結合エネルギー-7.3 kcal/mol を示す予測モデルを得た。一方、PDB ID: 4NRO には 2OG と鉄イオンの代替で用いられたマンガンイオンの共結晶情報を含むものの、核酸基質は共結晶情報として含まれていなかった。ALKBH5 と m6A の相互作用部位の想定のため、大腸菌 AlkB 蛋白質の共結晶情報 PDB ID: 4NID[29]より、PyMOL を用いて、cutoff = 1.5 Å として、aligning residues = 208 vs. 215, RMSD = 1.441 Å の精度で ALKBH5 へ m6A の重ね合わせを行った。また、相互作用するアミノ酸残基の同定に用いる



Biovia Discovery Studio Visualizer の Ligand Interaction Diagram の作成条件として, Ligand quality = Medium, Hydrogen atom display filter = Keep interacting hydrogens, Neighbor distance criterion = 2 Å, Calculate solvent accessible surface = ON と設定した。



**Fig. 15 Ena15 および Ena21 の ALKBH5 に対するドッキングモデル**

AutoDock Vina で最も高い結合エネルギー-7.3 kcal/mol を示す予測モデルを示す。HTS ヒット化合物 Ena15(赤紫色), Ena21(水色), ALKBH5 の基質である 2OG(黄), m6A(橙),また脱メチル化反応において, 基質との相互作用に関わるアミノ酸残基[19](緑)を示す。A, ALKBH5 の蛋白質表面を表示(酸素原子: 赤, 窒素原子: 青, 硫黄原子: オリーブ色), B, ドッキングモデルに基づいた Ena15 結合部位の 2 次元図, C, 同, Ena21 結合部位の 2 次元図を示す。なお, B,C 図中の破線とアミノ酸残基の色は凡例 Interactions で示す相互作用を表す。

その結果, Ena15 は 2OG(黄)のドッキングポケットではなく, その隣接するクレフトで ALKBH5 と

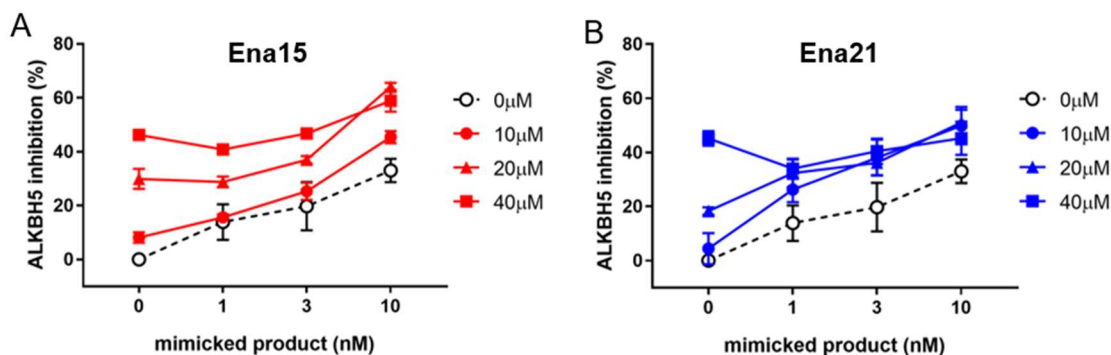
相互作用すると予測された(Fig. 15A, 赤紫色)。Ena15 は 2OG と拮抗型阻害を示すため、予測されたドッキングモデルは齟齬のない結果であった。Ligand Interaction Diagram の結果から、Ena15 は、2OG が相互作用するとされる H204[19]と、Pi-Pi stacked での相互作用を示すと予想された(Fig. 15B)。また、核酸基質が相互作用するとされる Y141[19]と Pi-Pi T-shaped での相互作用を示すと予想された。

一方、Ena21 は 2OG (黄) のドッキングポケットと相互作用すると予測された(Fig. 15A, 水色)。Ena21 は 2OG 拮抗型阻害を示すため、予測されたドッキングモデルは齟齬のない結果であった。また、Ena21 は Ligand Interaction Diagram から、2OG が相互作用するとされる H204[19]と Pi-Pi stacked での相互作用、H266[19]と Pi-Pi T-shaped での相互作用を示すと予想された(Fig. 15C)。

それぞれの化合物のドッキングモデルでは、大腸菌 AlkB 蛋白質 (PDB ID: 4NID) の m6A (橙) を重ね合わせを行った結果、Ena15 (赤紫色)、Ena21 (水色)とも重なりが示されており(Fig. 15A)、これらの化合物は核酸基質と相互作用する可能性が示唆された。

#### 第 4 節 核酸生成物存在下での阻害活性

第 3 節 ドッキングモデルの構築の結果(Fig. 15A), Ena15 と Ena21 が核酸基質の m6A の相互作用部位の一部を占有する可能性が示唆された。その検証のため、酵素活性評価系に用いる核酸基質の脱メチル化体 (mimicked product) を、酵素反応評価系に共存させた条件下で各化合物の阻害活性を評価した。



**Fig. 16** 核酸基質脱メチル化体 (mimicked product) 共存下での各化合物の ALKBH5 酵素活性阻害

2OG 濃度を 100  $\mu$ M 存在下、ELISA 法による ALKBH5 酵素活性評価での mimicked product 終濃度 0, 1, 3, 10 nM, 各化合物の化合物終濃度 0, 10, 20, 40  $\mu$ M ( $n = 3$ )での活性値。図中、DMSO control (黒, A,B), Ena15 (赤, A), B. Ena21 (青, B)。

その結果、mimicked product は濃度依存的な ALKBH5 酵素阻害活性を示した(Fig. 16A, B, 黒破線)。酵素反応に添加した核酸基質は 1 nM であり、同濃度 1 nM の mimicked product は 16%, 10 nM で 33%の阻害を示した。mimicked product は核酸基質アナログであり、脱メチル化反応を核酸基質ポケットにおいて核酸基質と拮抗型に阻害すると解釈できるため、核酸基質ポケットにて

相互作用する mimicked product に対する各化合物の作用を評価した。この mimicked product 濃度依存的な ALKBH5 酵素活性阻害に, Ena15 は化合物単独に比べて相加的な阻害活性の増強を示した。一方, Ena21 は Ena21 単独の酵素活性阻害の濃度依存性が 1 nM 以上の mimicked product の添加により, Ena21 終濃度 10 ~ 40  $\mu$ M において共に同程度の阻害に変化した(Fig. 16B)。Ena15 とは対照的に, Ena21 では m6A 脱メチル化生成物, もしくは m6A 核酸基質, および ALKBH5 に対する相互作用が生じ, 阻害活性が増強する可能性が示唆された。

## 第 5 節 小括

- AutoDock Vina を用いた ALKBH5 の結晶情報 (PDB ID: 4NRO) に基づくドッキングモデル構築の結果, Ena15, Ena21 の最も高い結合活性を示すモデルにおいて, 第二章で確認したそれぞれの 2OG に対する阻害様式を支持する位置での結合予測結果を示した。
- 大腸菌 AlkB 蛋白質の共結晶情報 (PDB ID: 4NID) を基に, m6A を ALKBH5 の結晶情報 (PDB ID: 4NRO) に重ね合わせを行った結果, Ena15, Ena21 の予測結合部位に重なりが認められた。
- 核酸基質との相互作用の可能性を検証するため, 核酸基質脱メチル化体 (mimicked product) の存在下での Ena15, Ena21 の ALKBH5 に対する酵素活性阻害を確認した。Ena15 は mimicked product との相互作用は認めなかったが, Ena21 は mimicked product や ALKBH5 との相互作用による可能性を示唆する阻害活性の増強が認められた。

## 第四章 各種がん組織由来細胞株評価

ALKBH5 に阻害活性を有し, それぞれ異なる阻害様式を持つ 2 つの化合物について, 脳腫瘍 (glioblastoma multiforme, GBM) を含む各種がん組織由来細胞株に対する細胞増殖抑制活性の把握, また, その生理的作用機序の探索を実施した。

### 第 1 節 実験材料

培地, 試薬等

- EMEM (富士フイルム和光, cat. No. 055-08975)
- DMEM High glucose (富士フイルム和光, cat. No. 049-32645)
- DMEM Low glucose (富士フイルム和光, cat. No. 041-29775)
- RPMI-1640 (富士フイルム和光, cat. No. 189-02025)
- D-MEM / Ham's F-12 (富士フイルム和光, cat. No. 048-29785)
- Fetal bovine serum (ThermoFisher scientific, cat. No. 10270-106)
- kanamycin sulfate (富士フイルム和光, cat. No. 115-00342)
- PBS(-) (富士フイルム和光, cat. No. 166-23555)
- 0.05% Trypsin, 0.53mM EDTA 溶液 (富士フイルム和光, cat. No. 202-16931)
- 96 well Tissue Culture plate (VIOLAMO, cat. No. 2-8588-05)
- 6 well Tissue Culture plate (VIOLAMO, cat. No. 2-8588-01)
- Cell Counting Kit-8 (dojindo, cat. No. CK04)
- Lipofectamine RNAiMAX Reagent (ThermoFisher scientific, cat. No. 13778-030)
- Opti-MEM Medium (ThermoFisher scientific, cat. No. 31985-070)
- QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, cat. No. 79306)
- QuantiFluor RNA system (Promega, cat. No. E3310)
- PrimeScript™ RT reagent Kit (TAKARA-BIO, cat. No. RR037A)
- THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, cat. No. QPS-201)
- Hard-Shell® 96-Well Semi-Skirted PCR Plates (Bio-Rad, cat. No. HSS9601)
- Ribonuclease A from bovine pancreas (Merck KGaA, cat. No. R5503)
- Propidium iodide (Merck KGaA, cat. No. P4170)

PCR primer

ALKBH5 (TAKARA BIO PRTSS, cat. No. HA048534)

- HA048534-F: TGCAAGTTCCAGTTCAAGCCTATTC
- HA048534-R: CAGTGAGTGATTTCATCAGCAGCA

ACTB (TAKARA BIO PRTSS, cat. No. HA067803)

- HA067803-F: TGGCACCCAGCACAATGAA
- HA067803-R: CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

# ノックダウン試薬 siRNA

- control siRNA (Thermofisher scientific, cat. No. 4390844)
- siALKBH5 #1 (Thermofisher scientific, cat. No.4392421, ID. s29686)
- siALKBH5 #2 (Thermofisher scientific, cat. No.4392421, ID. s29687)

the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)[30] RNAseq データファイル

- CCLE\_RNAseq\_genes\_rpkm\_20180929.gct.gz

# 細胞株

- 7 組織 23 細胞株 (Table 5)

**Table 5 実験に使用した細胞株 (23 種) と培養に用いた培地組成**

細胞株名	がん由来組織	培地
KNS81	Brain (GBM)	DMEM High glucose (5% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
LN229	Brain (GBM)	DMEM High glucose (5% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
U87MG	Brain (GBM)	EMEM (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
U251MG	Brain (GBM)	EMEM (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
HT29	Large intestine	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
HCT116	Large intestine	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
DLD-1	Large intestine	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
SW620	Large intestine	DMEM low glucose (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
786-O	Kidney	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
ACHN	Kidney	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
Caki-1	Kidney	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
Caki-2	Kidney	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
Aspc1	Pancreas	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
KP-2	Pancreas	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
Panc-1	Pancreas	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
KLM-1	Pancreas	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
PK-1	Pancreas	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
HeLa	Uterine cervix	DMEM low glucose (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
A2780	Ovary	RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
CaOV3	Ovary	DMEM low glucose (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
RMG-1	Ovary	D-MEM / Ham's F-12 (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
EJ-1	Bladder	DMEM low glucose (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)
UMUC2	Bladder	DMEM low glucose (10% FBS, 100 µg/mL kanamycin sulfate)

## 第2節 実験方法

### 1. 細胞増殖活性評価

維持培養を行った各細胞株について、96 well tissue culture plate に細胞毎にウェル当たり 1000 cells/well となるよう細胞懸濁液を 90  $\mu\text{L}$ /well で播種した後、37°C, 5%  $\text{CO}_2$  存在下で一晩培養を行った。翌日、各濃度で化合物溶液を 10  $\mu\text{L}$ /well 添加後、2 日間同様に培養し、Cell Counting Kit-8 を 10  $\mu\text{L}$ /well 添加し、37°C, 5%  $\text{CO}_2$  存在下で 4 時間程度発色反応後、マイクロプレートリーダー Bio-Rad 社 iMark により、 $\text{OD}_{450}/\text{OD}_{630}$ (measurement/reference)を求め、以下の式に基づいて化合物添加による細胞増殖抑制活性を算出した。

$$\text{阻害率}_{\text{compound}} = 1 - (\text{Signal}_{\text{compound}} - \text{Signal}_{\text{blank}}) / (\text{Signal}_{\text{control}} - \text{Signal}_{\text{blank}})$$

Blank: 細胞なし, 化合物なし

Control: 細胞あり, 化合物あり

Compound: 細胞あり, 化合物あり

### 2. siRNA による ALKBH5 ノックダウン

維持培養を行った各細胞株を 6 well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well で播種し、37°C, 5%  $\text{CO}_2$  存在下で一晩培養した。Lipofectamine RNAiMAX Reagent を Opti-MEM Medium で 50 倍希釈後、20  $\mu\text{M}$  siRNA ストック溶液(control: 1 種, ALKBH5: 2 種)を Opti-MEM Medium で 125 倍希釈し、この 2 種の希釈液を 1:1 で混合後、室温で 5 分間インキュベートした(80 nM siRNA)。6 well plate の培地を除去した後、各 siRNA 終濃度が 10 nM になるように、培地 1750  $\mu\text{L}$ /well と上記の siRNA 80 nM 混合液を 250  $\mu\text{L}$ /well 混和後添加した。37°C, 5%  $\text{CO}_2$  存在下で 24 時間培養後、500~1000 cells/well で 96 well plate に播種し、細胞増殖活性を Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。また、残りの細胞はノックダウン効率の確認のため、QIAzol Lysis Reagent で溶解し、-80°C で保存した。

### 3. 細胞溶解液からの total RNA, cDNA 調製

QIAzol Lysis Reagent で調製した細胞溶解液サンプルより、miRNeasy Mini Kit を用いて、キットプロトコルに則り total RNA を抽出した。各サンプルの total RNA 収量の把握のため、分光光度計 BioSpec-nano (光路長 0.7 mm) で  $\text{OD}_{260}$  より、total RNA 濃度を算出した。引き続き、各サンプルの total RNA 500 ng より、PrimeScript™ RT reagent Kit を用いて、キットプロトコルに則り single strand cDNA を調製した。

### 4. qPCR

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて、鋳型 cDNA と以下の通り反応液を調製して Hard-Shell® 96-Well Semi-Skirted PCR Plates に 10  $\mu\text{L}$ /well を添加した。サーマルサイクラー CFX96 Touch Real-time System (BIO-RAD) により、98°C 30 秒間の熱変性後に、96°C 5 秒間、96°C 30 秒間を 40 サイクル実施して PCR 反応を行った。その後、特異的な増幅であることを確認するため、

55°C から 95°Cまで, 0.5°C 5 秒ずつ温度を上げて Dissociation Curve を検出した。

Reagent/sample	反応液組成 (μL)
DNase/RNase free water	3.6
10 μM Forward primer	0.2
10 μM Reverse primer	0.2
2 x SYBR qPCR Mix	5
Template cDNA	1
total	10

## 5. 細胞周期への化合物の影響

維持培養を行った各細胞株を 6 well plate に  $1.0 \times 10^5$  cells/well で播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で一晩培養した。翌日, 各化合物の終濃度 0, 10, 33 μM となるよう添加後, 1~2 日間培養した。各ウェルの細胞をすべて回収し, 700 μL の 70% EtOH/PBS に浸漬し, 一晩-20°Cで保存した。

PBS で 2 回洗浄後, PBS で 6 倍希釈した 10 mg/mL Ribonuclease A 溶液を 60 μL 添加し, 室温で 30 分静置した。50 μg/mL Propidium iodide (PI)/3% FBS 含有 PBS 溶液を 500 μL 添加し 4°Cで 30 分、遮光して静置した。MACS Quant®X フローサイトメーターで 15,000 cells/sample で蛍光を測定し, 得られたデータを FlowJo™ 解析用ソフトウェア (Becton, Dickinson and Company)で解析して, 細胞毎の PI 蛍光強度より細胞周期毎の細胞数の各割合を算出した。

## 6. 一般化線形モデルによる細胞内脱メチル化 RNA の探索

細胞株毎に異なる ALKBH5 酵素活性阻害の細胞増殖活性への感受性と各遺伝子の発現量から, 両者の正相関性に基づく ALKBH5 の細胞内脱メチル化 RNA の探索を, 一般化線形モデル (GLM)[31]を用いて試みた。

なお, GLM は以下のように表される。

$$g(y) = \beta_0 x_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n$$

上記式において,  $g(\cdot)$  はリンク関数を,  $y$  は目的変数を,  $\beta$  は偏回帰係数を,  $x$  は説明変数を,  $n$  は説明変数の数を表す。

GLM のデータ解析基盤には KNIME Analytics Platform を用いた。H2O ライブラリから, H2O Generalized Linear Model Learner (Regression)を用い, CCLE [26]データベースの細胞株の RNAseq データより各遺伝子  $n$  の発現量  $x$  と各化合物の各濃度に対する各細胞株の増殖抑制活性値  $n$  を基に, その 9 割の情報を GLM により学習し, 残り 1 割で目的変数の予測値  $\hat{y}$  の精度から, 化合物に対する各細胞増殖活性への高感受性に関連する遺伝子  $n$  を, GLM における係数  $\beta$  を指標に抽出した。

## 7. その他の化合物活性値, 統計的手法

各活性値の算出とその有意差検定は第一章第 2 節に記載のとおり行った。GLM による,

ALKBH5 に基質となる遺伝子の探索検討は, RNAseq の遺伝子発現量(RPKM)の他, 遺伝子毎の z-score を CCLE [26]データベースの全細胞株の発現量(RPKM)より, KNIME Analytics Platform により算出して使用した。実際の発現量(RPKM)と細胞増殖抑制活性の実測値がそれぞれ正相関, あるいは逆相関を示したかを, Tableau Desktop (Tableau 社)を用いて, 相関性傾向線の p 値より判断した。

### 第 3 節 脳腫瘍(GBM)由来細胞における評価

GBM 由来 4 細胞株に対する, Ena15 および Ena21 の細胞増殖抑制活性を評価した。各化合物終濃度 0, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  での 48 時間培養後にいずれの化合物も化合物濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示した(Fig. 17)。また, 各化合物の  $\text{IC}_{50}$  値は, KNS81, LN229, U251MG, U87MG の順に, Ena15 が  $34 \pm 4 \mu\text{M}$ ,  $32 \pm 6 \mu\text{M}$ ,  $79 \pm 21 \mu\text{M}$ ,  $63 \pm 5 \mu\text{M}$ , Ena21 が  $54 \pm 1 \mu\text{M}$ ,  $40 \pm 1 \mu\text{M}$ ,  $47 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $37 \pm 4 \mu\text{M}$  であった。Ena15 では 20  $\mu\text{M}$  処置でも KNS81 と LN229 で増殖抑制活性を示す一方, U251MG と U87MG では  $\text{IC}_{50}$  値が 2 倍程度に作用が減弱した。Ena21 はいずれの細胞株においても 20  $\mu\text{M}$  処置では増殖抑制活性をほとんど示さなかったが, 80  $\mu\text{M}$  処置でほぼ 100%の抑制を示した。

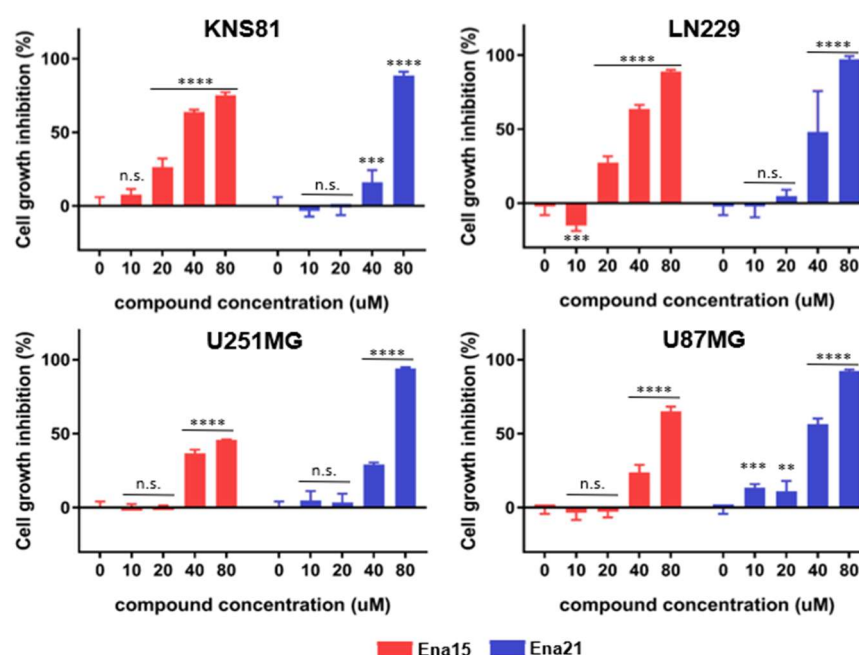


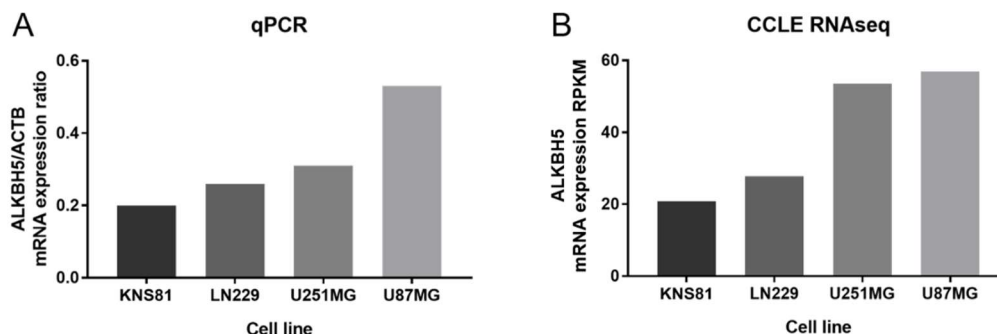
Fig. 17 GBM 由来 4 細胞株に対する各化合物の細胞増殖抑制活性

GBM 由来 4 細胞株 (A, KNS81, B, LN229, C, U251MG, D, U87MG) に対する, 各化合物終濃度 0, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  ( $n = 3-4$ ) での 48 時間培養後の細胞増殖抑制活性値。Ena15 処置群 (赤) および Ena21 処置群 (青)。測定値より算出した活性値は, 平均値  $\pm$  SD で示した。DMSO 対照群 (化合物濃度 0  $\mu\text{M}$ ) に対する各処置群の 2 群間の有意差検定を Dunnett's test により行った。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; n.s., not significant。



#### 第4節 siRNA 処置 ALKBH5 ノックダウンによる細胞増殖抑制活性

GBM 由来 4 細胞株に対して、siRNA 処置による ALKBH5 ノックダウンに基づく細胞増殖抑制作用を評価した。始めに GBM 由来 4 細胞株の ALKBH5 の発現量を qPCR で確認した。

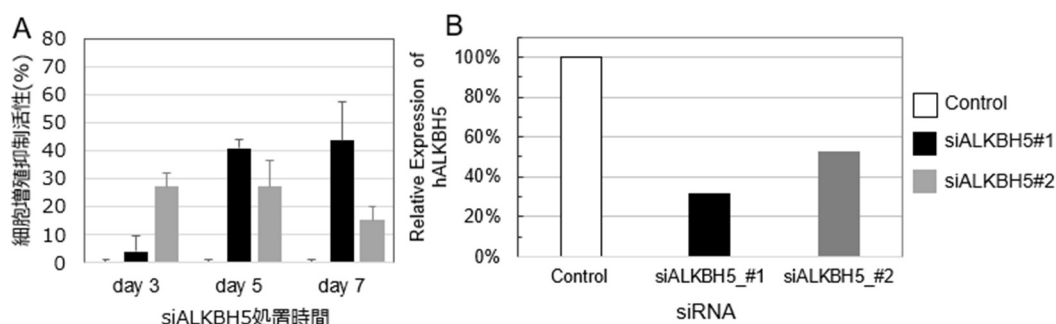


**Fig. 18 GBM 由来 4 細胞株の ALKBH5 の発現量**

GBM 由来 4 細胞株(KNS81, LN229, U251MG, U87MG)の ALKBH5 の A. 内部標準 ACTB に対する発現比 (n = 2), B. CCLE データベースより各細胞株の RNAseq の RPKM 補正值。

その結果、ALKBH5 の発現量は KNS81, LN229, U251MG, U87MG の順に増加した(Fig. 18A)。この発現量は CCLE データベースより取得した各細胞株の RNAseq の RPKM 補正值(Fig. 18B)と比較したところ、概ね ALKBH5 発現量の順は同じ傾向であった。

引き続き、LN229 について ALKBH5 ノックダウン評価を実施した。この細胞について、siRNA 添加 3, 5, 7 日後の各 siRNA の増殖抑制活性はコントロールに比べ、どちらも 30%以上を示した(Fig. 19A)。ALKBH5 に対する siRNA 添加 24 時間後の ALKBH5 ノックダウン効率を評価した結果、コントロールに比べて、siALKBH5#1 で 31.7%, siALKBH5#2 で 52.1%であった(Fig. 19B)。

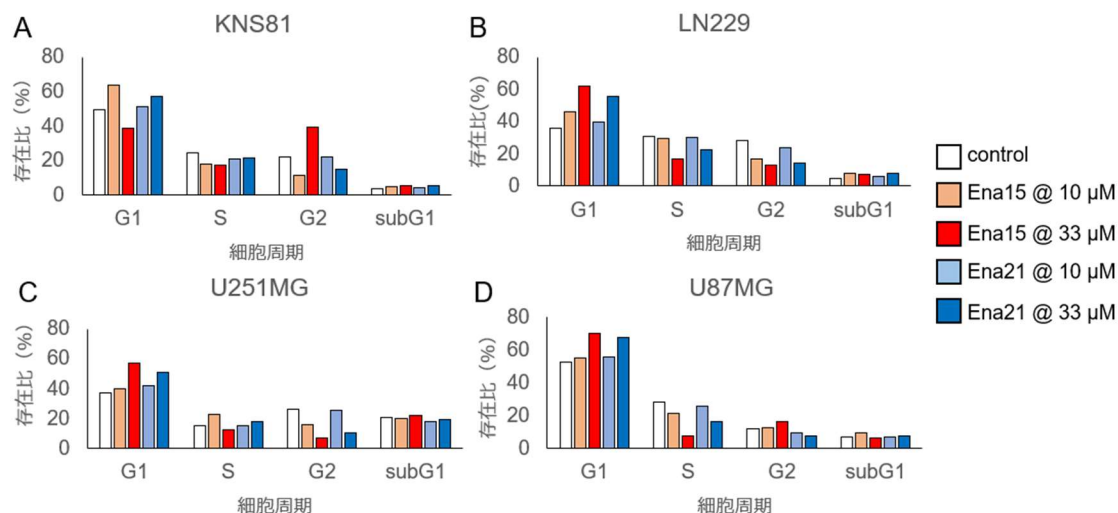


**Fig. 19 siRNA による ALKBH5 ノックダウンでの LN229 細胞増殖抑制作用**

細胞株 LN229 に siRNA (control: 1 種, ALKBH5: 2 種)を終濃度が 10 nM になるように添加した。A. siRNA 添加後 3, 5, 7 日間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖抑制活性を評価した (n = 3)。 B. ノックダウン効率の確認のため、ノックダウン細胞より total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を調製した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて、鋳型 cDNA と第四章第 2 節に記載の反応液を調製して qPCR を行った(n = 2)。

## 第 5 節 細胞周期に与える影響

Ena15, Ena21 添加による細胞増殖抑制作用が細胞周期のどの時期に影響したかを評価した。GBM 由来 4 細胞株について、各化合物の終濃度 0, 10, 33  $\mu\text{M}$  となるよう添加後、24 時間培養に、細胞毎の PI 蛍光強度の分布を比較した。その結果、Ena15, Ena21 の添加により、KNS81, LN229, U251MG, U87MG に共通して、G0/G1 期の割合に増加傾向を示した (Fig. 20)。



**Fig. 20 Ena15, Ena21 化合物添加 24 時間後の細胞周期への影響**


各細胞株を一晩培養し、終濃度 0, 10, 33  $\mu\text{M}$  の各化合物を添加後、更に 24 時間培養した。細胞を回収し、70% EtOH/PBS に浸漬して一晩-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。PBS 洗浄後、Ribonuclease A 溶液を添加し、室温で 30 分静置した。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propidium iodide (PI)/3% FBS 含有 PBS 溶液を添加し 4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分、遮光静置した。MACS Quant $^{\circ}\text{X}$  フローサイトメーターで 15,000 cells/sample で蛍光を測定し、得られたデータを FlowJo $^{\text{TM}}$  解析用ソフトウェア(Becton, Dickinson and Company)で解析して各細胞周期の細胞数の割合を算出した。

## 第 6 節 各種がん組織由来細胞株を用いた検討

ALKBH5 阻害による GBM 由来細胞株以外のがん組織由来細胞株の増殖抑制活性を評価した。6 種類のがん組織由来、19 細胞株 (Table 5) について、Ena15 および Ena21 を各化合物終濃度 0, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) として、処置 48 時間培養後の細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、各化合物共に濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示した (Table 6)。Ena15 は 80  $\mu\text{M}$  においても、細胞株により、感受性に違いが確認された。一方、Ena21 は 40  $\mu\text{M}$  において細胞増殖抑制活性に影響が小さい細胞株であっても、80  $\mu\text{M}$  添加時にはほぼ完全にいずれの細胞も増殖が抑制された。由来組織毎の比較では、Ena15, Ena21 共に腎臓がん由来の細胞株が感受性の高い傾向を示した。一方、膀胱がん由来の細胞株は感受性が低い傾向を示した。また、同じ組織由来のがん細胞株でも GBM と同様に、感受性に違いが認められた。

**Table 6** GBM 以外の 6 組織由来, 19 細胞株に対する Ena15 および Ena21 添加 48 時間後の細胞増殖抑制活性値

Tissue Type	Cell Line	Condition / conc.(uM)							
		Ena15				Ena21			
		10	20	40	80	10	20	40	80
Bladder	EJ-1	-10%	-2%	53%	85%	15%	9%	90%	102%
	UMUC2	-12%	-18%	55%	88%	2%	-1%	5%	100%
Cervix	HeLa	-1%	4%	37%	76%	-1%	5%	94%	101%
Colon	DLD-1	-15%	-15%	35%	77%	-3%	-3%	52%	100%
	HCT116	-2%	-7%	24%	83%	12%	21%	68%	102%
	HT29	-1%	8%	63%	83%	27%	79%	93%	101%
	SW620	-5%	11%	66%	86%	8%	74%	93%	100%
Kidney	786-O	5%	12%	54%	82%	14%	35%	82%	100%
	ACHN	-3%	18%	66%	91%	11%	20%	61%	93%
	Caki-1	11%	50%	87%	95%	12%	23%	90%	101%
	Caki-2	-3%	9%	44%	74%	7%	20%	82%	100%
Ovary	A2780	15%	32%	60%	94%	10%	17%	55%	98%
	CaOV3	10%	21%	46%	70%	10%	17%	61%	100%
	RMG-1	7%	4%	20%	76%	25%	39%	62%	88%
Pancreas	Aspc1	1%	1%	19%	57%	15%	22%	73%	96%
	KLM-1	-7%	1%	45%	81%	12%	11%	65%	100%
	KP-2	-14%	-15%	18%	56%	-1%	12%	79%	100%
	Panc-1	4%	24%	61%	88%	6%	12%	60%	90%
	PK-1	-5%	-10%	9%	75%	5%	12%	35%	98%

細胞増殖抑制率  0 50 100 (%)

## 第 7 節 ALKBH5 の m6A 脱メチル化阻害感受性遺伝子の探索

阻害様式や想定される結合部位で異なる作用を示す Ena15, Ena21 の 2 化合物は, FTO への作用では, Ena15 は活性増強, Ena21 はほぼ阻害なしとの結果(Fig. 10B)が得られている。しかし, ALKBH5 阻害では共通の作用(Fig. 10A)を示しており, Ena15 と Ena21 で共通して細胞増殖抑制の影響を受ける遺伝子は, ALKBH5 による m6A 脱メチル化反応に基づく発現制御の対象, つまり RNA 基質の候補となると考えた。m6A 脱メチル化阻害感受性を測るため, 各化合物による細胞増殖抑制活性と各遺伝子の各がん細胞株での発現量を基に, 統計的手法として GLM で RNA 基質候補となりうる遺伝子の探索を行った。

GLM は統計手法の一つであり, 複数の観測結果に基づいて, 原因または結果を推定する予測モデルを構築することができる[31]。GLM に基づく予測モデルは線形式で得られるため, 今回推定を行う対象は細胞増殖抑制値とし, その推定に関連すると考える各遺伝子の発現量を GLM に用いた。この場合, 細胞増殖抑制値の最尤推定値を得るための係数(coeff.)を各遺伝子に対して得ることができる。係数が正であれば遺伝子発現量と化合物添加による細胞増殖抑制は正相関, 負であれば逆相関と推定された結果を得たことになる。また, 係数が 0 であれば, 細胞増殖抑制値との化合物添加の関連性はないという結果を得たことになる。

各がん細胞株の遺伝子の発現情報は, CCLE\_RNAseq\_genes\_rpk\_m\_20180929.gct.gz を CCLE [26]データベースより取得して使用した。この情報には, 56202 件の遺伝子, 1019 種の細胞株の発現情報が含まれていた。GLM でモデル構築する際, 遺伝子抽出条件を係数が 0 以外を選抜基準にした。予測モデル構築には, RNAseq の遺伝子発現量(RPKM)に加え, 遺伝子毎の z-score

を細胞株 1019 サンプルの発現量(RPKM)に基づいて KNIME Analytics Platform により算出した。以上、発現量(RPKM)と z-score を遺伝子発現量とした 2 つの予測モデル構築を行い、それぞれで候補遺伝子の選抜を行った。

この CCLE より取得したファイルでは、各遺伝子の Gene symbol と Ensembl Gene Accession ID の情報を用いて、Ensembl データベース(<https://asia.ensembl.org/index.html>)で収載遺伝子を確認した結果、Organism が”Homo sapiens”に該当した遺伝子 21448 件のうち、CCLE RNAseq データ収載のヒト遺伝子は 18524 件であった。このヒト遺伝子 18524 件の発現量データを用いて GLM により各化合物の細胞増殖阻害活性の予測値を算出し、実測値との相関性を確認した。Ena15, Ena21 の細胞増殖抑制活性を評価し、CCLE RNAseq データ収載の細胞株に含まれたのは、GBM 由来 LN229, KNS81, U87MG, U251MG, 腎がん由来 Caki-1, Caki-2, ACHN, 大腸がん由来 HCT116, HT29, SW620, 卵巣がん由来 A2780, CaOV3, RMG-1, 膵臓がん由来 Aspc1, KP-2, Panc-1, PK-1 の 5 組織 17 細胞株であった。

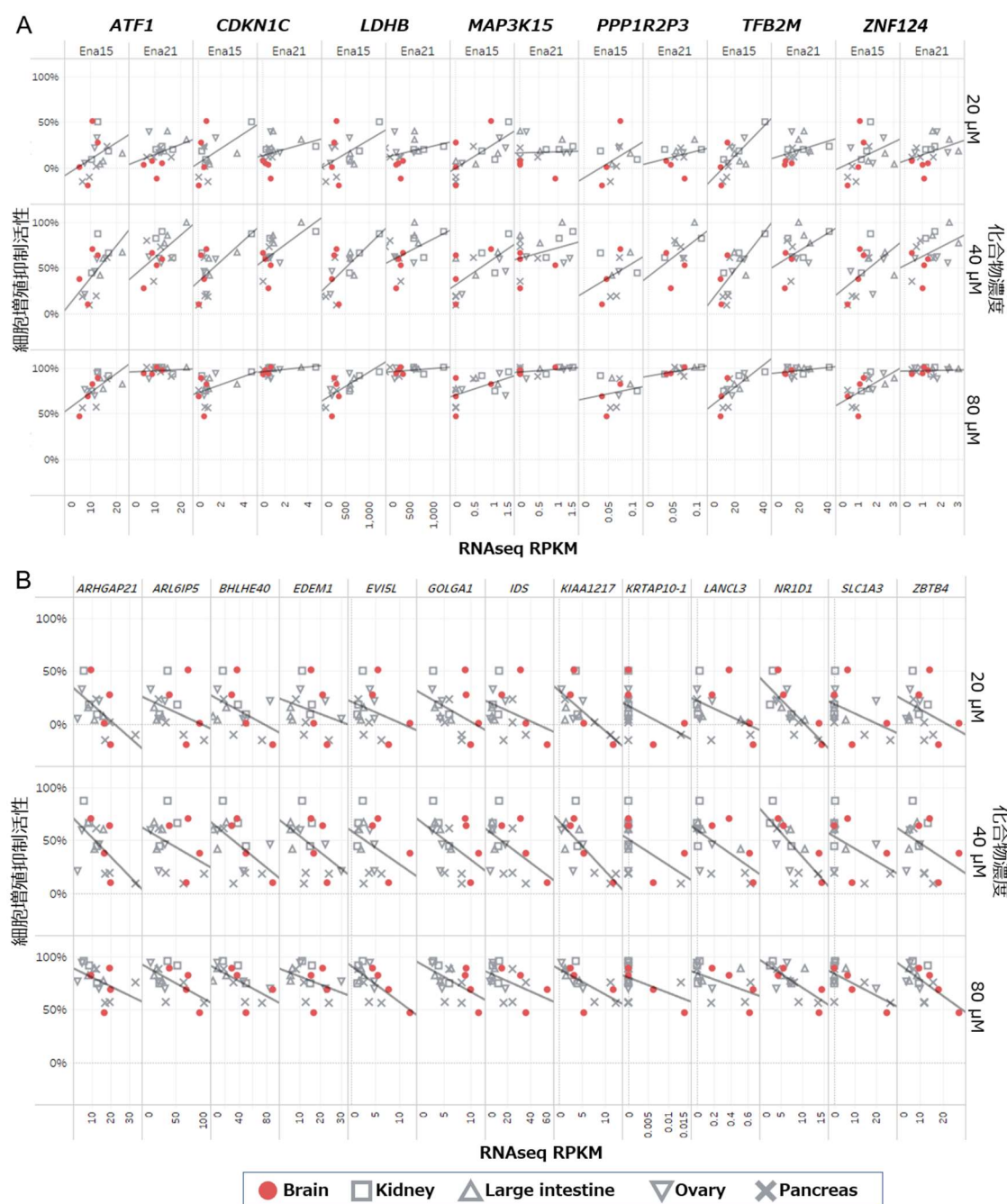
以上の情報に基づき、KNIME Analytics Platform の H2O Generalized Linear Model Learner (Regression), H2O Predictor (Regression)を用い、GLM に基づくモデル構築を行った。その結果、発現量(RPKM)でモデル構築をした場合の細胞増殖活性の予測値と実測値との相関性を示す相関係数  $R^2$  は 0.765, z-score の相関係数  $R^2$  は 0.858 となった。そのモデル式において用いられた各遺伝子とその係数(coeff.)を示した (Table 7)。係数が正の遺伝子は、各化合物の細胞増殖阻害活性が高い場合に発現量が高い正相関を示すため、化合物感受性の RNA と想定される。発現量(RPKM)でモデル構築をした場合の感受性遺伝子は、係数の大きい順に *PPP1R2P3*, *MAP3K15*, *ATF1*, *TFB2M*, *LDHB* であった。一方、z-score でモデル構築をした場合の感受性遺伝子は、係数の大きい順に *CDKN1C*, *TFB2M*, *LDHB*, *PPP1R2P3*, *ZNF124* であった。両モデルで共通して正相関を示した遺伝子は、*PPP1R2P3*, *TFB2M*, *LDHB* であった。

**Table 7** 発現量(RPKM)とその z-score で GLM による各化合物の細胞増殖阻害活性予測モデル構築での予測値と実測値との相関性、その予測モデルに用いられた遺伝子とその係数 (coeff.)

GLM(RPKM)		GLM(z-score)	
対象遺伝子数 = 18524		対象遺伝子数 = 18524	
相関係数 $R^2$ = 0.765		相関係数 $R^2$ = 0.858	
Genesymbol	Coeff.( $\times 10^{-3}$ )	Genesymbol	Coeff.( $\times 10^{-3}$ )
<b>PPP1R2P3</b>	36.98	<b>CDKN1C</b>	21.10
<b>MAP3K15</b>	5.83	<b>TFB2M</b>	10.71
<b>ATF1</b>	2.17	<b>LDHB</b>	6.77
<b>TFB2M</b>	1.12	<b>PPP1R2P3</b>	5.07
<b>LDHB</b>	0.05	<b>ZNF124</b>	2.03
<i>ARL6IP5</i>	-0.05	<i>ZBTB4</i>	-0.42
<i>BHLHE40</i>	-0.05	<i>IDS</i>	-0.88
<i>EDEM1</i>	-0.32	<i>GOLGA1</i>	-0.95
<i>SLC1A3</i>	-0.57	<i>ARHGAP21</i>	-1.24
<i>KIAA1217</i>	-0.91	<i>SLC1A3</i>	-2.57
<i>NR1D1</i>	-1.65	<i>LANCL3</i>	-6.26
<i>EVI5L</i>	-1.92	<i>KIAA1217</i>	-8.78
		<i>KRTAP10-1</i>	-28.05

表中の係数(coeff.)が正を黒、負を赤で記載した。2 種類のモデルで共通した遺伝子を太字で示した。





**Fig. 21 GLM 細胞増殖阻害活性予測モデル構築で用いられた遺伝子の発現量 (RPKM) と Ena15 または Ena21 による細胞増殖阻害活性との相関性**

Ena15 または Ena21 の細胞増殖阻害活性と CCLE データベースの RNAseq 発現量 (RPKM) が予測モデルにおいて正相関または逆相関を示す各遺伝子の実測値での相関を確認するため、横軸に各遺伝子の発現量 (RPKM)、縦軸に細胞増殖抑制活性値を上段から各化合物濃度 20, 40, 80  $\mu$ M で記載した。A. 正相関を示す 7 遺伝子の Ena15 または Ena21 での相関性。B. 逆相関を示す 13 遺伝子の Ena15 での相関性。GBM 由来の 4 細胞株は赤、その他の由来の 13 細胞株は灰色で示した。

以上の遺伝子とは逆に、係数が負の遺伝子は、発現量が高い場合に各化合物の細胞増殖阻害活性が低くなる逆相関を示すことから、化合物抵抗性の遺伝子の可能性を想定した。

発現量(RPKM)でモデル構築をした場合の感受性遺伝子は、係数の小さい順に *EVISL*, *NR1D1*, *KIAA1217*, *SLC1A3*, *EDEM1*, *BHLHE40*, *ARL6IP5* であった。

一方、z-score でモデル構築をした場合の感受性遺伝子は、係数の小さい順に *KRTAP10-1*, *KIAA1217*, *LANCL3*, *SLC1A3*, *ARHGAP21*, *GOLGA1*, *IDS*, *ZBTB4* であった。両モデルで共通して逆相関を示した遺伝子は、*KIAA1217*, *SLC1A3* であった。両モデルのいずれかで細胞増殖阻害活性と正相関、あるいは逆相関を示した各遺伝子について、実際の発現量(RPKM)と細胞増殖抑制活性の実測値においても正相関、あるいは逆相関を示したかについて、5組織の17細胞株との相関性傾向線のp値を求めた(Fig. 21, Table 8)。表中のp値が0.05未満となる条件は赤でハイライトした。それぞれが5組織の17細胞株、あるいはGBM由来4細胞において、p値が0.05未満となるEna15またはEna21の化合物添加濃度の条件毎に比較した。その結果、5組織の17細胞株に対するEna15添加の条件が各遺伝子と相関性が最も高く、GBM由来に絞った場合には、相関性が残る遺伝子はあるものの、正相関する群ではEna15とEna21で共通したのは*PPP1R2P3*のみであった。

**Table 8** 5組織の17細胞株に対する各化合物の細胞増殖抑制活性値と各遺伝子の発現量(RPKM)の傾向線の相関性p値

	Genesymbol	5組織由来細胞株						GBMのみ					
		p 値_Ena15			p 値_Ena21			p 値_Ena15			p 値_Ena21		
		20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	80 $\mu$ M	20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	80 $\mu$ M	20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	80 $\mu$ M	20 $\mu$ M	40 $\mu$ M	80 $\mu$ M
正相関	<i>ATF1</i>	0.153	0.010	0.010	0.174	0.028	0.593	0.441	0.822	0.448	0.251	0.009	0.398
	<i>CDKN1C</i>	0.048	0.015	0.127	0.195	0.011	0.107	0.310	0.147	0.360	0.377	0.872	0.349
	<i>LDHB</i>	0.063	0.004	0.002	0.266	0.080	0.230	0.849	0.932	0.640	0.186	0.614	0.957
	<i>MAP3K15</i>	0.002	0.005	0.031	0.855	0.195	0.085	0.218	0.021	0.398	0.954	0.628	0.182
	<i>PPP1R2P3</i>	0.245	0.293	0.616	0.423	0.110	0.073	0.033	0.008	0.159	0.971	0.559	0.036
	<i>TFB2M</i>	0.002	0.003	0.003	0.164	0.108	0.190	0.297	0.925	0.362	0.736	0.317	0.202
	<i>ZNF124</i>	0.177	0.041	0.010	0.122	0.112	0.780	0.228	0.607	0.092	0.678	0.637	0.295
逆相関	<i>ARHGAP21</i>	0.017	0.018	0.070	0.218	0.141	0.694	0.252	0.402	0.861	0.013	0.763	0.240
	<i>ARL6IP5</i>	0.169	0.141	0.011	0.011	0.073	0.985	0.674	0.610	0.114	0.851	0.277	0.648
	<i>BHLHE40</i>	0.066	0.014	0.005	0.276	0.476	0.569	0.152	0.045	0.568	0.504	0.735	0.209
	<i>EDEM1</i>	0.311	0.060	0.127	0.532	0.273	0.154	0.384	0.413	0.768	0.215	0.286	0.432
	<i>EVISL</i>	0.280	0.138	0.003	0.053	0.030	0.443	0.403	0.454	0.002	0.707	0.220	0.348
	<i>GOLGA1</i>	0.136	0.087	0.029	0.001	0.017	0.721	0.359	0.464	0.037	0.546	0.232	0.291
	<i>IDS</i>	0.186	0.054	0.055	0.005	0.033	0.446	0.297	0.143	0.477	0.777	0.899	0.353
	<i>KIAA1217</i>	0.003	0.001	0.006	0.469	0.500	0.969	0.143	0.043	0.598	0.469	0.700	0.200
	<i>KRTAP10-1</i>	0.064	0.053	0.051	0.199	0.002	0.489	0.317	0.389	0.013	0.573	0.274	0.261
	<i>LANCL3</i>	0.049	0.009	0.025	0.054	0.047	0.834	0.244	0.160	0.172	0.720	0.700	0.257
	<i>NR1D1</i>	0.000	0.001	0.001	0.520	0.515	0.733	0.049	0.070	0.175	0.324	0.731	0.040
	<i>SLC1A3</i>	0.088	0.063	0.002	0.103	0.085	0.530	0.568	0.614	0.025	0.875	0.126	0.506
	<i>ZBTB4</i>	0.180	0.174	0.006	0.010	0.009	0.620	0.446	0.469	0.005	0.800	0.223	0.397

表中の傾向値の相関性p値が0.05未満を赤でハイライトした。

各遺伝子が *ALKBH5* の脱メチル化反応の基質となるか否かについて、エピトランスクリプトームシーケンスデータベース RMBASE v2.0 (<https://rna.sysu.edu.cn/rmbase/>) [8]で mRNA の m6A 修飾部位の有無を調査した。mRNA の安定性[9]や蛋白質の翻訳を制御する役割を果たしている[10–12]とされる非翻訳領域と翻訳領域について、各遺伝子の領域ごとの m6A の修飾の有無を調査した(Table 9)。

Table 9 各遺伝子の領域ごとの m6A の修飾

	Genesymbol	5'-utr	cds	3'-utr
正相関	ATF1	あり	あり	あり
	CDKN1C	あり	あり	あり
	LDHB	あり	あり	あり
	MAP3K15	なし	なし	なし
	PPP1R2P3	なし	なし	なし
	TFB2M	あり	あり	あり
	ZNF124	なし	あり	あり
逆相関	ARHGAP21	あり	あり	あり
	ARL6IP5	あり	あり	あり
	BHLHE40	あり	あり	あり
	EDEM1	あり	あり	あり
	EVI5L	あり	あり	あり
	GOLGA1	あり	あり	あり
	IDS	あり	あり	あり
	KIAA1217	あり	あり	あり
	KRTAP10-1	なし	なし	なし
	LANCL3	なし	なし	なし
	NR1D1	あり	あり	あり
	SLC1A3	あり	あり	あり
	ZBTB4	あり	あり	あり

表中の m6A 修飾部位の情報が無い部位をグレーアウトした。

いずれかのモデルで正相関した遺伝子のオントロジーを AmiGo2 オントロジーデータベース (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) で調査した(Table 10, Table 11)。なお, ATF1 と LDHB はヒト種のオントロジー情報がなかったため, マウス種のオントロジー情報を参考とした。各分子の局在を示すオントロジーを除くと, 転写関連の機能を持つ分子が多く含まれることが分かった(Table 10)。また, 各分子の主な機能には転写関連以外に, LDHB は ALKBH5 の基質となる 2OG の生成に関連する TCA サイクルに供給されるピルビン酸の調節酵素, CDKN1C は細胞周期に関わる分子であった(Table 11)。

Table 10 2つのモデルのいずれかで正相関した7遺伝子がコードする蛋白質の機能のうち, 複数遺伝子で重複するオントロジー

AmiGo2_Accession	GO class	Genesymbol	重複遺伝子数
GO:0005515	protein binding	CDKN1C, PPP1R2B, ZNF124	3
GO:0005634	nucleus	Atf1, CDKN1C, ZNF124	3
GO:0000977	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	Atf1, ZNF124	2
GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	Atf1, ZNF124	2
GO:0003677	DNA binding	Atf1, ZNF124	2
GO:0005737	cytoplasm	CDKN1C, Ldhd	2
GO:0005739	mitochondrion	TFB2M, Ldhd	2
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	Atf1, TFB2M	2
GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	Atf1, ZNF124	2
GO:0042802	identical protein binding	Atf1, Ldhd	2
GO:0044877	protein-containing complex binding	Atf1, CDKN1C	2
GO:0046872	metal ion binding	MAP3K15, ZNF124	2

**Table 11** 2つのモデルのいずれかで正相関した 7 遺伝子がコードする蛋白質の主な機能に関するオントロジー

Genesymbol	AmiGo2 Accession	GO class
Atf1	GO:0001228	DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific
CDKN1C	GO:0045930	negative regulation of mitotic cell cycle
Ldhb	GO:0004457	lactate dehydrogenase activity
MAP3K15	GO:0033554	cellular response to stress
PPP1R2B	GO:0009966	regulation of signal transduction
TFB2M	GO:0000179	rRNA (adenine-N6,N6-)-dimethyltransferase activity
ZNF124	GO:0001227	DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II-specific

## 第 8 節 小括

- GBM 由来 4 細胞に対し, Ena15, Ena21 共に濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示した。また, ALKBH5 ノックダウンによっても LN229 細胞で増殖抑制活性を認めた。
- 化合物添加 24 時間後に, GBM 由来 4 細胞は G0/G1 期の増加を示した。
- GBM 以外の 6 組織由来 19 細胞に対し, Ena15, Ena21 共に濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示した。その化合物感受性は, 細胞株毎に異なる傾向を示した。
- CCLE データベースの発現情報を活用し, 5 組織由来 17 細胞株の化合物感受性の遺伝子の探索を GLM により行った。その結果, *PPP1R2P3*, *MAP3K15*, *ATF1*, *TFB2M*, *LDHB*, *CDKN1C*, *ZNF124* の 7 遺伝子で化合物感受性との相関性を認めた。



## 総括

本研究室が取り組んでいる GBM 等のがん疾患における QOL の改善を目指し、注目する創薬ターゲットの機能解明や新たな創薬ターゲットの探索等、医療、医薬に関わる研究活動が日々行われている。創薬シーズとなる化合物探索は、過去にはコストやインフラ整備の面から製薬企業、製薬ベンチャーに限られていた。しかし、昨今の新規創薬ターゲットの枯渇傾向から、商業的に未開拓な分野の創薬ターゲットに対する化合物探索が、専門性の高いアカデミア等の研究機関に求められるようになった。以上の研究環境の変化により、国内のみならず、欧米や中国等の諸外国で、アカデミアによる創薬シーズ探索が拡大している現状がある。

今回、本研究室で創薬ターゲットとして化合物探索を行った ALKBH5 の GBM 等のがんに対する作用は、未だ十分に明らかではなく、既存の ALKBH5 阻害剤 [17-19] では選択性等に懸念があった。本研究の取り組みにおいては、ALKBH5 の創薬シーズ探索という目的のみならず、基礎的な機能解明の目的でも新規阻害化合物を探索する価値は高いと判断し、LiSC 保有ライブラリからの HTS を実施した。

本研究室では PCA-1 の発見[3]から、ALKBH ファミリーの各分子の研究が継続的に行われており、サンドイッチ ELISA 法による酵素活性評価系を用いてきた。本検討では、始めに HTS 実施の目的で、化合物ライブラリからの探索に適する改変を実施した。HTS 酵素評価系には AlphaScreen 試薬を用いたホモジニアスアッセイ系を用い、LiSC ライブラリ化合物から累計 8.7 万化合物について、ALKBH5 選択的化合物探索を行い、結果として、Enamine 社 Pharmacological Diversity Set から 2 化合物、企業ライブラリから 6 化合物の新規阻害化合物を得ることができた。

企業ライブラリから取得した 6 化合物については、HTS 選抜以降の基礎研究目的での検討は行っていない。一方、Enamine 社 Pharmacological Diversity Set から取得した 2 化合物、Ena15 と Ena21 については、原末を入手し、化合物の阻害様式と細胞への作用を確認した。

Ena21 は 2OGD ファミリーの酵素に対する阻害剤として、これまで多く報告されている阻害様式となる 2OG 拮抗型阻害剤であった。ドッキング予測モデル(Fig. 15A)の結果、核酸基質との重なりが示唆されたため検証実験を行った。その結果、mimicked product との相互作用の可能性が示唆された(Fig. 16B)。一方、Ena15 は 2OG に対し不拮抗型阻害を示す化合物であった。これは ALKBH5 だけでなく、ALKBH ファミリー全体に於いても初めての阻害様式となる化合物である。近年化合物探索で汎用傾向であるバーチャルスクリーニングに基づく化合物探索では、共結晶情報が必須であり、基質である 2OG の共結晶情報に基づいた、2OG 拮抗型しか得ることは出来なかった。細胞内 2OG 濃度は 0.6 ~ 2 mM 程度という報告[27]がある一方、ALKBH5 の 2OG に対する  $K_m$  値は、14.3  $\mu$ M (Fig. 11) と 2OG 拮抗型阻害剤が細胞内で ALKBH5 を阻害するには高い結合活性が必要な環境と言える。今回 HTS による構造多様性の高い Pharmacological Diversity Set を用いた化合物探索を実施したことで、Ena15 という希少な不拮抗型阻害を示す化合物を得ることができた。酵素速度論に則れば、このような高濃度の 2OG 存在下で細胞内 ALKBH5 を阻害するに

は有利な化合物である。このような新たな結合様式を持つ ALKBH5 阻害剤を得られたことにより、構造多様性の高い化合物ライブラリからの化合物探索を実施した価値が示されたとと言える。

Ena15 は ES+I という反応で ESI の状態に遷移するので、具体的には 2OG が ALKBH5 に結合した状態で、2OG 相互作用部位と共存可能な部位に Ena15 が結合すると理論的に解釈される。ドッキングモデル(Fig. 15A)構築に用いた PDB ID:4NRO の結晶情報は 2OG との共結晶であり、この相互作用部位が生じているはずであるが、核酸基質への脱メチル化反応の阻害については、大腸菌 AlkB の結晶情報である PDB ID:4NID の m6A との重なりはドッキング予測モデルで想定されたものの、mimicked product 共存下の検討では、相互作用は認めなかった(Fig. 16A)。m6A の位置は RMSD = 1.441 Å の精度であるため、予測モデルの誤差による可能性はあるが、Ena15 の ALKBH5 結合による induced fit により PDB ID:4NRO の結晶情報を基に構築したドッキングモデルと異なる結合を示した可能性も想定される。

Ena15, Ena21 は、HTS の目的で構造多様性の高い化合物ライブラリに収載された市販化合物であり、今後 ALKBH5 へのより強い作用を目的とした合成展開が計画されている。現在の Ena15 は FTO の活性を阻害しないが、逆に活性を増強する結果(Fig. 10A)を示しており、ALKBH5 との共結晶による Structure based drug discovery (SBDD)により ALKBH5 への選択性と向上させる中で、改善がなされるものと考ええる。一方、Ena21 は Ena21 類縁体#3 が得られており、Ena21 とその類縁体#3 は ALKBH5 への相互作用が化学構造の類似性に基づく可能性が示唆されたと考えられた。Ena21 は FTO に対する選択性を確認しており、SBDD により、他の既知化合物との更なる差別化がなされ则认为る。

GBM 由来の 4 細胞株の評価において、Ena15, Ena21 はいずれも濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示した(Fig. 17)。また、ALKBH5 のノックダウンでも同様に細胞増殖活性の低下を確認した(Fig. 19)。更にこの細胞増殖抑制活性は、細胞周期への影響に基づくことを確認した(Fig. 20)。KNS81 細胞に Ena15 を終濃度 33 μM で添加した条件を除き、Ena15 と Ena21 はこの評価において、GBM 由来の 4 細胞株で G0/G1 期の割合を増加させる結果となった。ALKBH5 をノックダウンした食道扁平上皮癌での報告においても G0/G1 期を増加させるとの報告[32]があり、がん組織の由来は異なるものの、Ena15 および Ena21 は m6A 脱メチル化反応阻害による細胞周期へ同様の作用を示した。この評価では、例外的に KNS81 細胞に Ena15 を終濃度 33 μM で添加した条件下で、G2 期の割合の増加が認められた(Fig. 20A)。この要因を探るため、これら GBM 由来 4 細胞株で、主に細胞周期や増殖に関わる遺伝子群について、CCLE データベースより変異情報を取得して比較を行った。KNS81 のみで他の 3 細胞株と異なるホモ欠損変異は、細胞周期や増殖に関わる主要な遺伝子群の多くで確認された(Table 12)。特に CHEK2 は CDC25C ホスファターゼを阻害し、がん抑制蛋白質 p53 の安定化による G0/G1 期の割合の増加を起こす分子[33–35]として知られている。KNS81 が数々の細胞周期や増殖に関わる遺伝子が欠損する中で、どのように細胞増殖しているかは不明であるが、Ena15 を終濃度 33 μM 添加した条件下で、CHEK2 ホモ欠損変異を始めとする遺伝的バックグラウンドの影響により、G0/G1 期の増加が生じにくい結果になったと考察する。

**Table 12** GBM 由来の 4 細胞株のうち, KNS81 のみホモ欠損変異の遺伝子

機能	KNS81のみ, ホモ欠損変異の遺伝子
DNA damage response	CHEK2
cell cycle control	CDK1, E2F2
survival/cell death regulation signaling	NFKB2, CHUK, FAS, CASP9, CASP7
PI3K-AKT-mTOR signaling	AKT1, MTOR
Ras-Raf-MEK-Erk/JNK signaling	MAPK1, MAPK8, MAPK12

ALKBH5 が脱メチル化反応の基質とする遺伝子の探索検討のため, GBM 由来の 4 細胞株のみでは, 統計的手法による化合物感受性遺伝子の探索は難しいと考えた。ALKBH5 の腫瘍化については, 膵臓では抗がん作用を示すという報告[36]があり, がん化の機序において, 組織別の要因も想定される。このことから, GBM に限らず, 6 種の組織由来の 19 細胞株を追加して, ALKBH5 の化合物感受性遺伝子の探索を試みた。始めに 6 種の組織由来の 19 細胞株への Ena15, Ena21 の細胞増殖抑制活性を評価した。すべての細胞株で濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示した(Table 6)が, GBM 由来の 4 細胞株と同様, 細胞株毎にその化合物感受性は異なっていた。多様な細胞株と多くの遺伝子発現情報は CCLE データベース[30]より入手し, 5 種の組織由来の 17 細胞株の Ena15, Ena21 の細胞増殖抑制活性との相関性を GLM によるモデル構築により検定した。その結果, ヒト遺伝子 18524 件より関連性が予測される遺伝子を選抜した(Table 7)。この検討の主目的は, GBM における ALKBH5 の化合物感受性遺伝子の探索であったが, 5 種の組織由来の 17 細胞株において, 逆相関を示す遺伝子についても, m6A 脱メチル化阻害による細胞増殖作用の可能性を考慮し, 並行して調査を行った。5 種の組織由来の 17 細胞株での細胞増殖抑制活性と選抜した遺伝子の発現量の相関性は, GLM で想定した正相関, もしくは逆相関を示した(Fig. 21)。但し, GBM の 4 細胞株のみを対象とした場合, *CDKN1C*, *MAP3K15*, *KRTAP10-1* 等全く発現が見られない遺伝子が散見された。今回の調査では 17 細胞株での化合物感受性の傾向の強い遺伝子が選抜されているが, GBM における化合物感受性の遺伝子の選抜には, 今回実施した検討を組織由来毎に実施することが望ましいとも考えられる。但し, KNS81 のように, 同じ GBM 由来の細胞株であっても, その遺伝子バックグラウンドは同じではなく, 必ずしも組織毎で検討することで ALKBH5 のがん細胞増殖との関連分子を整理することは十分とは言えないと思われた(Table 12)。例えば, がん患者からの外科的切除サンプルやその初代培養細胞を対象に含めて, ALKBH5 阻害による増殖抑制のバイオマーカー探索の観点で検討する等, その検索対象については, 今後の課題と考える。

今回のヒト遺伝子 18524 件を特定のオントロジーに限らず, 広く全件を対象にした化合物感受性遺伝子の探索により, ALKBH5 酵素阻害化合物への感受性を示した 7 遺伝子には転写関連の蛋白質をコードしたものが多く傾向であった。今回の報告には示していないが, オントロジー情報に基づき, ALKBH5 の RNA に関する機能や細胞増殖に関する遺伝子群のみを対象とした検討も行った。その結果はモデル構築を行った限られた遺伝子群の中での感受性の高い候補を把握できるものの, 対象を恣意的に絞ることにもなると考え, 評価対象としたヒト遺伝子 18524 件全体を対

象に得られた 7 遺伝子の結果から考察を行い、今後の基礎的な検討方針を整理するべきと考えた。

Ena15, Ena21 への細胞増殖抑制へ感受性を示した 7 遺伝子のうち、ZNF124 は転写関連蛋白質、ATF1 は cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) や MAPK カスケードの下流にあり、CDK3 によって活性化され、細胞増殖等に関連する蛋白質である[37]。また TFB2M は、ミトコンドリアの RNA ポリメラーゼ (mtRNAP), TFAM と複合体を形成して mtRNAP の転写活性を調節する蛋白質である[38]。PPP1R2P3 はプロテインホスファターゼ 1 調節サブユニット 2 (PPP1R2) と 95% の相同性を持つ偽遺伝子とされているが、精巣中で転写が確認されていることから[39]、PPP1R2 と同様の cAMP カスケードの調節機能の発現が想定されている。MAP3K15 ストレス応答キナーゼ [40] はストレス応答によるアポトーシス誘導に関連する。また、CDKN1C は CDK 活性を抑制して細胞増殖を抑制する[41]。LDHB は RTK-PI3K-AKT-mTOR 経路による腫瘍形成において作用[42] し、また、小児の脳腫瘍である髄芽腫において、予後不良マーカーとされている[43]。直接の因果関係は報告されていないが、様々な LDHB のアイソフォームが、3'-UTR のリードスルーによってペルオキシソームへの移行が生じているとの報告[44]がある。ALKBH5 は m6A の脱メチル化を介して、転写制御に関与する機能を有しており、LDHB が ALKBH5 の RNA 基質であった場合、腫瘍形成やアイソフォームの多様性の要因となっている可能性は考えられる。以上の通り、これら 7 遺伝子は 18524 遺伝子から、GLM の統計的手法のみで選抜されたにも拘わらず、細胞増殖や転写、アポトーシス、腫瘍との関連が報告されている分子が選抜された。PPP1R2P3 と MAP3K15 は m6A 修飾部位の情報がないため (Table 9), ALKBH5 の RNA 基質ではない可能性はあるが、他の 5 遺伝子と共に選抜されたことから、間接的な影響を受けている可能性はあると考える。

現在、がん治療では外科的処置、放射線治療に加えて、化学療法、免疫チェックポイント阻害薬や新たな治療方法が活用されている。また、例え同じ臓器のがんであっても患者毎にバイオマーカーを検査して層別化し、適切な医薬品でのがん治療が行われている。このような医療の進歩により、年々がんの延命率が改善されたとする報告がなされてきている。しかしながら、未だに難治性のがんはあることから、今後も新たな作用機序によるがん治療薬が求められる状況は変わらないと考える。本検討で創薬対象とした ALKBH5 の阻害化合物として新規に取得した Ena15 と Ena21 が、今後、創薬シーズとしてだけでなく、ALKBH5 の基礎研究でも活用され、新たな作用機序の解明に少しでも役立てられることを期待する。

## 結論

1. ALKBH5 酵素活性評価系を構築し, HTS により LiSC 化合物ライブラリから, 新規の ALKBH5 選択的阻害作用を示す 2 化合物を見出し, Ena15, Ena21 と命名した。

2. HTS で選抜した 2 化合物のうち, Ena21 は既報の多い 2OG 拮抗型阻害を示す化合物であったが, Ena15 は不拮抗型阻害を示した。不拮抗型阻害を示す化合物は ALKBH5 を含むファミリー内で初めて確認された。細胞内 2OG 濃度は ALKBH5 の  $K_m$  値より数十倍程度高いため, 拮抗型は高い結合活性を必要とするが, Ena15 は不拮抗型阻害剤のため, 酵素阻害活性と同等以上の活性を示す可能性が期待できる。また, 酵素論的に 2OG とは異なる新しい ALKBH5 の部位で相互作用を示す化合物である。

3. ALKBH5 への Ena15, Ena21 の予測ドッキングモデル構築により, それぞれの阻害様式を示すのと齟齬がない部位への相互作用を示した。更に核酸基質の相互作用部位を占有しうる可能性が示唆されたため, 核酸生成物 mimicked product との競合を評価した。結果, Ena15 は相加的で相互作用を認めなかったが, Ena21 は mimicked product との相互作用により, 低濃度での阻害活性が向上する作用が認められた。

4. Ena15, Ena21 は GBM 由来 4 細胞株において, 濃度依存的に増殖抑制活性を示した。この結果は siRNA での *ALKBH5* ノックダウンと同様の結果であった。また, 細胞増殖を複数の細胞株で G0/G1 期の割合が増加する作用が, 食道扁平上皮癌での *ALKBH5* ノックダウンでの報告[32]と同様に確認された。

5. Ena15, Ena21 は GBM 由来以外の 6 組織由来の 19 細胞株においても同様に, 濃度依存的に増殖抑制活性を示した。この活性値情報と CCLE データベースの遺伝子発現情報を参考に, 5 組織由来の 17 細胞株について GLM により化合物感受性遺伝子の探索を行った。その結果, *PPP1R2P3*, *MAP3K15*, *ATF1*, *TFB2M*, *LDHB*, *CDKN1C*, *ZNF124* の 7 遺伝子が化合物濃度依存的な細胞増殖抑制と正相関する遺伝子として同定された。

## 謝辞

本研究を学位論文として纏めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野教授、辻川 和丈先生に心より謝意を表します。

本研究において種々のご指導、ご協力を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科招聘准教授、上田 裕子先生、特任講師、神宮司 健太郎先生、助教、長谷 拓明先生に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多岐に亘る様々のご協力を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科北 惠 郁緒里特任研究員、田代 純輝特任研究員、平出 祥啓特任研究員に心より感謝申し上げます。

ライブラリ化合物の御供与ならびに種々のご指導、ご協力を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科准教授、谷 昭義先生、布村 一人先生、林 邦忠先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、日々の研究活動の中で、ご協力並びに様々なディスカッションで支えて頂きました、内藤 拓也修士、金重 紀洋学士、本田 弘平修士、仲井 愛修士、技術補佐員 川 脇 公子さん、秘書の西村 恭子さん、岩渕 彩さん、三宅 葉子さん、をはじめとする大阪大学薬学研究科細胞生理学分野の皆様に、心より感謝致します。

## 略語

ALKBH5	AlkB homolog 5
FTO	Fat mass and obesity-associated protein
GBM	glioblastoma multiforme
DNA	deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
2OG	2-oxoglutaric acid
2OGD	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
PCA-1	Prostate cancer antigen-1
m6A	N <sup>6</sup> -methyladenosine
m1A	N <sup>1</sup> -methyladenosine
m3C	N <sup>3</sup> -methylcytidine
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
LC-MS	Liquid chromatograph - Mass spectrometry
RI	radio isotope
SSCT	saline sodium citrate buffer with Tween 20
pAb	polyclonal antibody
mAb	monoclonal antibody
IgG	Immunoglobulin G
HTS	high throughput screening
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
PBS	phosphate-buffered saline
BSA	bovine serum albumin
Tween 20	Tween polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate
NP-40	nonyl phenoxypolyethoxylethanol
3'UTR	three prime untranslated region
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FBS	fetal bovine serum
mRNA	messenger RNA
cDNA	complementary DNA
qPCR	quantitative polymerase chain reaction

ACTB	Actin beta
siRNA	small interfering RNA
GLM	generalized linear model
RNAseq	RNA sequencing
RPKM	reads per kilobase of exon per million mapped reads
PPP1R2	Protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 2
PPP1R2P3	PPP1R2 Family Member B
MAP3K15	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15
ATF1	Activating transcription factor 1
TFB2M	Transcription factor B2, mitochondrial
LDHB	Lactate dehydrogenase B
CDKN1C	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C
TCA	tricarboxylic acid
PKA	protein kinase A
ZNF124	Zinc finger protein 124
EVI5L	Ecotropic viral integration site 5 like
NR1D1	Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1
SLC1A3	Solute carrier family 1 member 3
EDEM1	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1
BHLHE40	basic Helix-Loop-Helix family member E40
ARL6IP5	ADP ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 5
KRTAP10-1	Keratin associated protein 10-1
LANCL3	LanC like 3
ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21
GOLGA1	Golgin A1
IDS	Iduronate 2-sulfatase
ZBTB4	Zinc finger and BTB domain containing 4
mtRNAP	mitochondrial RNA polymerase
CDK3	Cyclin dependent kinase 3
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial
RTK	Receptor tyrosine kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
AKT	AKT serine/threonine kinase
mTOR	mechanistic target of rapamycin kinase



## 本研究遂行における寄与

本研究の遂行にあたり、申請者は次に示す検討において実験を実施し、解析結果を得た。即ち、第一章、HTS 評価系構築に必要な各種検討 (Fig. 3, 5, 6, 7), 第二章、HTS による ALKBH5 選択的化合物選抜 (Fig. 9, 10, 11, 13, 14, Table 1, 2, 3, 4), 第三章、ALKBH5 結晶情報を用いたヒット化合物のドッキング予測モデル構築および関連する検討 (Fig. 15, 16), 第四章、各種がん組織細胞株を用いたヒット化合物の増殖抑制活性作用の機序を探索する検討 (Fig. 17, 18B, 21, Table 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12)を実施した。なお、一部の実験について、北恵 郁緒里特任研究員 (Fig. 18A), 田代 純輝特任研究員 (Fig. 19, 20)の協力、並びに検討の実施を得た。

## 参考文献

- [1] 令和3 年(2021) 人口動態統計月報年計(概数) の概況, 2021.  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai21/index.html>
- [2] Findings from the Global Burden of Disease Study 2017, Seattle, WA, 2018.  
[www.healthdata.org](http://www.healthdata.org).
- [3] N. Konishi, M. Nakamura, E. Ishida, K. Shimada, E. Mitsui, R. Yoshikawa, H. Yamamoto, K. Tsujikawa, High Expression of a New Marker PCA-1 in Human Prostate Carcinoma, 2005.  
[www.aacrjournals.org](http://www.aacrjournals.org).
- [4] K. Koike, Y. Ueda, H. Hase, K. Kitae, Y. Fusamae, S. Masai, T. Inagaki, Y. Saigo, S. Hirasawa, K. Nakajima, I. Ohshio, Y. Makino, N. Konishi, H. Yamamoto, K. Tsujikawa, anti-tumor effect of AlkB homolog 3 knockdown in hormone- independent prostate cancer cells., *Current Cancer Drug Targets.* 12 (2012) 847–856.  
<https://doi.org/10.2174/156800912802429283>.
- [5] K. Tsujikawa, K. Koike, K. Kitae, A. Shinkawa, H. Arima, T. Suzuki, M. Tsuchiya, Y. Makino, T. Furukawa, N. Konishi, H. Yamamoto, Expression and sub-cellular localization of human ABH family molecules, *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 11 (2007) 1105–1116. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00094.x>.
- [6] A. Czerwonec, S. Dunin-Horkawicz, E. Purta, K.H. Kaminska, J.M. Kasprzak, J.M. Bujnicki, H. Grosjean, K. Rother, MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2008 update, *Nucleic Acids Research.* 37 (2009). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn710>.
- [7] W.A. Cantara, P.F. Crain, J. Rozenski, J.A. McCloskey, K.A. Harris, X. Zhang, F.A.P. Vendeix, D. Fabris, P.F. Agris, The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update, *Nucleic Acids Research.* 39 (2011). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1028>.
- [8] J.J. Xuan, W.J. Sun, P.H. Lin, K.R. Zhou, S. Liu, L.L. Zheng, L.H. Qu, J.H. Yang, RMBase v2.0: Deciphering the map of RNA modifications from epitranscriptome sequencing data, *Nucleic Acids Research.* 46 (2018) D327–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx934>.
- [9] H.-H. Woo, S.K. Chambers, Human ALKBH3-induced m(1)A demethylation increases the CSF-1 mRNA stability in breast and ovarian cancer cells., *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms.* 1862 (2019) 35–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.10.008>.
- [10] X. Wang, B.S. Zhao, I.A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He, N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency, *Cell.* 161 (2015) 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>.
- [11] X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G.C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, C. He, N 6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability,

- Nature. 505 (2014) 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>.
- [12] K.D. Meyer, D.P. Patil, J. Zhou, A. Zinoviev, M.A. Skabkin, O. Elemento, T. v. Pestova, S.B. Qian, S.R. Jaffrey, 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation, *Cell*. 163 (2015) 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>.
- [13] S. Zhang, B.S. Zhao, A. Zhou, K. Lin, S. Zheng, Z. Lu, Y. Chen, E.P. Sulman, K. Xie, O. Böglér, S. Majumder, C. He, S. Huang, m6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program, *Cancer Cell*. 31 (2017) 591–606.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.013>.
- [14] S. Chen, L. Zhou, Y. Wang, ALKBH5-mediated m6A demethylation of lncRNA PVT1 plays an oncogenic role in osteosarcoma, *Cancer Cell International*. 20 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1105-6>.
- [15] Y. Huang, J. Yan, Q. Li, J. Li, S. Gong, H. Zhou, J. Gan, H. Jiang, G.F. Jia, C. Luo, C.G. Yang, Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m6A over ALKBH5, *Nucleic Acids Research*. 43 (2015) 373–384. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1276>.
- [16] Q. Cui, H. Shi, P. Ye, L. Li, Q. Qu, G. Sun, G. Sun, Z. Lu, Y. Huang, C.G. Yang, A.D. Riggs, C. He, Y. Shi, m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells, *Cell Reports*. 18 (2017) 2622–2634. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.059>.
- [17] S. Selberg, N. Seli, E. Kankuri, M. Karelson, Rational Design of Novel Anticancer Small-Molecule RNA m6A Demethylase ALKBH5 Inhibitors, *ACS Omega*. 6 (2021) 13310–13320. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01289>.
- [18] A. Malacrida, M. Rivara, A. di Domizio, G. Cislighi, M. Miloso, V. Zuliani, G. Nicolini, 3D proteome-wide scale screening and activity evaluation of a new ALKBH5 inhibitor in U87 glioblastoma cell line, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 28 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115300>.
- [19] C. Feng, Y. Liu, G. Wang, Z. Deng, Q. Zhang, W. Wu, Y. Tong, C. Cheng, Z. Chen, Crystal structures of the human RNA demethylase alkbh5 reveal basis for substrate recognition, *Journal of Biological Chemistry*. 289 (2014) 11571–11583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546168>.
- [20] W. Aik, M. Demetriades, M.K.K. Hamdan, E.A.L. Bagg, K.K. Yeoh, C. Lejeune, Z. Zhang, M.A. McDonough, C.J. Schofield, Structural basis for inhibition of the fat mass and obesity associated protein (FTO), *Journal of Medicinal Chemistry*. 56 (2013) 3680–3688. <https://doi.org/10.1021/jm400193d>.
- [21] Y. Qiao, B. Zhou, M. Zhang, W. Liu, Z. Han, C. Song, W. Yu, Q. Yang, R. Wang, S. Wang, S. Shi, R. Zhao, J. Chai, J. Chang, A Novel Inhibitor of the Obesity-Related Protein FTO, *Biochemistry*. 55 (2016) 1516–1522. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00023>.

- [22] F. Li, S. Kennedy, T. Hajian, E. Gibson, A. Seitova, C. Xu, C.H. Arrowsmith, M. Vedadi, A Radioactivity-Based Assay for Screening Human m6A-RNA Methyltransferase, METTL3-METTL14 Complex, and Demethylase ALKBH5, *Journal of Biomolecular Screening*. 21 (2016) 290–297. <https://doi.org/10.1177/1087057115623264>.
- [23] N. Svensen, S.R. Jaffrey, Fluorescent RNA Aptamers as a Tool to Study RNA-Modifying Enzymes, *Cell Chemical Biology*. 23 (2016) 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.018>.
- [24] Y. Sui, Z. Wu, Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment, *Journal of Biomolecular Screening*. 12 (2007) 229–234. <https://doi.org/10.1177/1087057106296498>.
- [25] S. Zou, J.D.W. Toh, K.H.Q. Wong, Y.G. Gao, W. Hong, E.C.Y. Woon, N<sup>6</sup>-Methyladenosine: A conformational marker that regulates the substrate specificity of human demethylases FTO and ALKBH5, *Scientific Reports*. 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep25677>.
- [26] J.D.W. Toh, L. Sun, L.Z.M. Lau, J. Tan, J.J.A. Low, C.W.Q. Tang, E.J.Y. Cheong, M.J.H. Tan, Y. Chen, W. Hong, Y.G. Gao, E.C.Y. Woon, A strategy based on nucleotide specificity leads to a subfamily-selective and cell-active inhibitor of N<sup>6</sup>-methyladenosine demethylase FTO, *Chemical Science*. 6 (2015) 112–122. <https://doi.org/10.1039/c4sc02554g>.
- [27] K. Thirstrup, S. Christensen, H.A. Møller, A. Ritzén, A.L. Bergström, T.N. Sager, H.S. Jensen, Endogenous 2-oxoglutarate levels impact potencies of competitive HIF prolyl hydroxylase inhibitors, *Pharmacological Research*. 64 (2011) 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.03.017>.
- [28] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*. (2009) NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [29] C. Zhu, C. Yi, Switching demethylation activities between AlkB family RNA/DNA demethylases through exchange of active-site residues., *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 53 (2014) 3659–3662. <https://doi.org/10.1002/anie.201310050>.
- [30] M. Ghandi, F.W. Huang, J. Jané-Valbuena, G. v. Kryukov, C.C. Lo, E.R. McDonald, J. Barretina, E.T. Gelfand, C.M. Bielski, H. Li, K. Hu, A.Y. Andreev-Drakhlin, J. Kim, J.M. Hess, B.J. Haas, F. Aguet, B.A. Weir, M. v. Rothberg, B.R. Paoletta, M.S. Lawrence, R. Akbani, Y. Lu, H.L. Tiv, P.C. Gokhale, A. de Weck, A.A. Mansour, C. Oh, J. Shih, K. Hadi, Y. Rosen, J. Bistline, K. Venkatesan, A. Reddy, D. Sonkin, M. Liu, J. Lehar, J.M. Korn, D.A. Porter, M.D. Jones, J. Golji, G. Caponigro, J.E. Taylor, C.M. Dunning, A.L. Creech, A.C. Warren, J.M. McFarland, M. Zamanighomi, A. Kauffmann, N. Stransky, M. Imielinski, Y.E. Maruvka, A.D. Cherniack, A. Tsherniak, F. Vazquez, J.D. Jaffe, A.A. Lane, D.M. Weinstock, C.M. Johannesen, M.P. Morrissey, F. Stegmeier, R. Schlegel, W.C. Hahn, G. Getz, G.B. Mills, J.S. Boehm,

- T.R. Golub, L.A. Garraway, W.R. Sellers, Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia, *Nature*. 569 (2019) 503–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1186-3>.
- [31] R.W.M. Nelder, J. A., & Wedderburn, Generalized Linear Models Why Generalized Linear Models ?, *Journal of the Royal Statistical Society*. 135 (1972) 370–384. <https://doi.org/10.2307/2344614>.
- [32] Y. Nagaki, S. Motoyama, T. Yamaguchi, M. Hoshizaki, Y. Sato, T. Sato, Y. Koizumi, A. Wakita, Y. Kawakita, K. Imai, H. Nanjo, H. Watanabe, Y. Imai, Y. Minamiya, K. Kuba, m6A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis, *Genes to Cells*. 25 (2020) 547–561. <https://doi.org/10.1111/gtc.12792>.
- [33] S. Matsuoka, M. Huang, S.J. Elledge, Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase, *Science*. 282 (1998) 1893–1897. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1893>.
- [34] A. Blasina, I. van de Weyer, M.C. Laus, W.H.M.L. Luyten, A.E. Parker, C.H. McGowan, A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase, *Current Biology*. 9 (1999) 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80041-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80041-4).
- [35] T.W. Mak, DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2, *Science*. 287 (2000) 1824–1827. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1824>.
- [36] B. Tang, Y. Yang, M. Kang, Y. Wang, Y. Wang, Y. Bi, S. He, F. Shimamoto, M6A demethylase ALKBH5 inhibits pancreatic cancer tumorigenesis by decreasing WIF-1 RNA methylation and mediating Wnt signaling, *Molecular Cancer*. 19 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1128-6>.
- [37] D. Zheng, Y.Y. Cho, A.T.Y. Lau, J. Zhang, W.Y. Ma, A.M. Bode, Z. Dong, Cyclin-dependent kinase 3-mediated activating transcription factor 1 phosphorylation enhances cell transformation, *Cancer Research*. 68 (2008) 7650–7660. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1137>.
- [38] H.S. Hillen, Y.I. Morozov, A. Sarfallah, D. Temiakov, P. Cramer, Structural Basis of Mitochondrial Transcription Initiation, *Cell*. 171 (2017) 1072.e10-1081.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.036>.
- [39] L.K. Gregório, Publisher main menu Not so pseudo : the evolutionary history of protein phosphatase 1 regulatory subunit 2 and related pseudogenes, (2016) 1–14.
- [40] T. Kaji, S. Yoshida, K. Kawai, Y. Fuchigami, W. Watanabe, H. Kubodera, T. Kishimoto, ASK3, a novel member of the apoptosis signal-regulating kinase family, is essential for stress-induced cell death in HeLa cells., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 395 (2010) 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.164>.

- [41] J.N. Adkins, K.J. Lumb, Intrinsic structural disorder and sequence features of the cell cycle inhibitor p57Kip2., *Proteins*. 46 (2002) 1–7. <https://doi.org/10.1002/prot.10018>.
- [42] X. Zha, F. Wang, Y. Wang, S. He, Y. Jing, X. Wu, H. Zhang, Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis, *Cancer Research*. 71 (2011) 13–18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1668>.
- [43] T. de Haas, N. Hasselt, D. Troost, H. Caron, M. Popovic, L. Zdravec-Zaletel, W. Grajkowska, M. Perek, M.C. Osterheld, D. Ellison, F. Baas, R. Versteeg, M. Kool, Molecular risk stratification of medulloblastoma patients based on immunohistochemical analysis of MYC, LDHB, and CCNB1 expression, *Clinical Cancer Research*. 14 (2008) 4154–4160. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4159>.
- [44] F. Schueren, T. Lingner, R. George, J. Hofhuis, C. Dickel, J. Gärtner, S. Thoms, Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals, *eLife*. 3 (2014) e03640. <https://doi.org/10.7554/eLife.03640>.