

論文の内容の要旨

論文題目 質量分析を用いた創薬標的蛋白質の研究

氏名 久保田 一石

1. 緒言

質量分析は物質の質量を測定する方法である。従来、蛋白質・ペプチドのような不揮発性高分子はイオン化効率が悪く、質量分析には不向きな試料とされてきた。しかしながら、1980年代、1990年代の質量分析装置の革新、蛋白質配列データベースの拡充、及びソフトウェアの開発により、現在では質量分析により、フェムトモルレベルの蛋白質の同定、翻訳後修飾の解析が可能となっている。創薬プロセスでは、初めに創薬の標的となる標的蛋白質の探索が行われる。この創薬標的蛋白質の探索も、創薬標的蛋白質候補を探索するステップと、見出された候補蛋白質が医薬品の標的として適切であるか評価するステップに分かれる。本研究はこの最新の質量分析による蛋白質解析技術を、創薬標的蛋白質の探索に応用することを目的とした。

2. 破骨細胞分化過程における分泌蛋白質の研究

骨組織は間質系細胞株由来の骨芽細胞による骨形成と、血球系由来の破骨細胞による骨吸収を順次繰り返す、骨リモデリング機構により一定の骨量を維持する動的な組織である。そこで、近年報告された均一な株化細胞(RAW264.7細胞)を用いた破骨細胞実験系を用いて、破骨細胞分化過程における分泌蛋白質について検討した。

2-1. 2次元電気泳動法及びショットガン解析によるプロテオーム解析

破骨細胞分化過程における分泌蛋白質の増減を解析するために、網羅的蛋白質解析であるプロテオームの2つの手法、2次元電気泳動法及びショットガン解析法の一つ isotope-coded affinity tags (ICAT)法を用いた。その結果、変動していた蛋白質として、cathepsin 類、osteopontin, legumain, MIP-1 α ,等これまで報告のあった蛋白質が同定される一方、新たに HE1, GILT, PCDGF 等これまでに報告のない蛋白質も同定された。これらの蛋白質は破骨細胞による骨リモデリング過程の調節蛋白質候補であり、かつ新規創薬標的候補であると考えられる。

2-2. 破骨細胞が分泌する骨芽細胞分化抑制因子の精製及び同定

破骨細胞へ分化誘導した RAW264.7 細胞培養上清を骨芽細胞分化アッセイに供したところ、骨芽細胞の分化を抑制した。そこで、この培養上清中から骨芽細胞分化抑制因子の微量精製、同定を試みた。その結果、質量分析により活性物質が PDGF BB であることが示唆された。この骨芽細胞分化抑制活性が、中和抗体で中和されたことから、この骨芽細胞分化抑制因子は PDGF BB であることが確認された。PDGF が骨代謝に影響を及ぼすことはこれまで知られていたが、破骨細胞または破骨細胞前駆細胞が骨芽細胞の分化を PDGF BB を分泌することにより直接制御することは初めての知見であった。PDGF BB は骨リモデリング過程において重要な因子であると同時に、骨疾患治療薬の有望な創薬標的候補であると考えられる。

3. 2'-PDE の同定及び機能解析

2-5A システムはインターフェロン(IFN)を介した抗ウイルス・抗腫瘍機構であり、調節分子として 2-5A を用いる。この 2-5A は、一般的な RNase により分解されず 2'-phosphodiesterase (2'-PDE)と呼ばれる酵素により分解されることが示唆されていたが、これまでその実体は明らかにされていなかった。2'-PDE は 2-5A システムの負のレギュレーターと考えられるので、その阻害剤は 2-5A システムを活性化し、抗ウイルス、抗腫瘍作用を持ち、創薬標的候補として有望であると考えられる。そこで、この 2'-PDE の精製及び同定を試みた。牛肝臓より質量分析を前提とした微量蛋白質精製により、機能未知遺伝子が同定され、この遺伝子の全長をクローニングし、組換え体を構築したところ 2'-PDE であることを確認した。

この 2'-PDE が創薬標的として妥当であるか調べるために、その機能解析を行った。2'-PDE 過剰発現株を複製し、IFN 及び二本鎖 RNA による影響を調べたところ、2'-PDE 過剰発現株では有意にその効果が減弱された。さらに HeLa 細胞におけるワクシニアウイルスアッセイ系において、2'-PDE の siRNA による抑制、及び化合物による酵素阻害は、共に有意にウイルス増殖を阻害した。これらの結果により 2'-PDE は仮説どおり 2-5A システムの負のレギュレーターとして作用し、本酵素が創薬標的として有望であることが示された。

4. PADI によるシトルリン化部位の研究

翻訳後修飾の一つに蛋白質中の Arg 残基が脱イミノ反応しシトルリン(Cit)残基になるシトルリン化反応が知られている。この反応は Ca^{2+} 依存性酵素である peptidylarginine deiminase (PADI)によって触媒されており、このうち hPADI4 は関節リウマチ治療薬の標的蛋白質候補と目されている。

4-1. hPADI2 及び hPADI4 のシトルリン化部位の比較

hPADI4 の創薬標的としての妥当性評価のために、関節リウマチ患者の滑膜組織で発現している二つのヒト PADI アイソフォーム、hPADI2 及び hPADI4 によるシトルリン化部位の同定及び比較を、質量分析を用いて行った。脱アミド化部位を誤ってシトルリン化部位と判定しないために、シトルリン化部位の同定基準は非常に厳格なものとした。結果としてモデル基質として用いたフィブリノーゲンにおいて、hPADI2 及び hPADI4 の間で多くのシトルリン化部位が共通であったが、一部に差異も観察された。また、そのシトルリン化部位には明確なモチーフは観察されなかった。PADI アイソフォーム間での基質特異性の比較は、PADI の関節リウマチ発症における役割の解明、さらに創薬標的としての妥当性評価の重要な基礎的知見と考えられる。

4-2. 安定同位体標識を用いた新規シトルリン化部位決定法

前節で行った方法はシトルリン化部位と脱アミド化部位を区別するために、MS/MS スペクトルの精査が必要であり、その解析は非常に労力を要するものであった。そこで、PADI によるシトルリン化反応においては酸素原子が H_2O より取り込まれる事を利用し、50% H_2^{18}O による安定同位体標識を利用した新規シトルリン化部位同定法について検討した。この 50% H_2^{18}O 中で行う新しい方法と、これまでの天然の H_2O 中で行う方法で行い、比較検討した結果、新しい安定同位体標識を用いた方法は、これまでの方法と比較し、同定したシトルリン化部位は完全に一致し、同等のペプチドカバー率を示しながら、そのスルーブットは MS/MS の精査を必要としないために大幅に向上した。シトルリン化部位の迅速な同定は PADI の妥当性評価・機能解析を行う上で有用であり、関節リウマチ治療薬の研究開発に貢献すると考えられる。