論文の内容の要旨

応用生命化学　専攻

平成16年度博士課程　入学

氏名　千々和　修平

指導教員名　渡邉　秀典

論文題目　低分子化合物の新規標的タンパク質同定法の開発とその応用研究

ヒトゲノムの全塩基配列解析が終わり、現在、ポストゲノム研究の真只中にある。ポストゲノム研究の集大成として、明らかにされたヒトゲノム情報をいかにして生命システムや疾病メカニズムの理解、さらには人類の健康と福祉に貢献できるかという観点から、ポストゲノム創薬研究が盛んに行われ始めている。

近年、ケミカルゲノミクスという言葉が提唱され始めている。これまでのケミカルゲノミクスは、ある特定の活性を持った化合物について、活性発現メカニズムを研究するものであった。しかし、優れた活性を有する化合物を見出すためには、新規骨格を有する化合物の発見あるいは合成が困難になってきている現状において、このような手法にだけに頼っていては薬剤の開発は進まない。そこで、既に存在する薬剤のターゲットを網羅的に決定する、いわゆるフォワードケミカルゲノミクス研究が重要になると考えられている。これは、既存薬が知られている薬効以外に様々な活性を示すことに起因するが、構造活性相関に基づく新しい化合物の創造に役立つものでもあるとともに、副作用などの予測にも結びつく可能性も秘めており、創薬研究の加速には有用かつ必須な研究である。

本論文は、効率的かつ実用性の高い新しい標的タンパク質同定法を、数種の低分子化合物を用いて、その標的タンパク質の同定を行うことによって開発することを目的に研究を行ったものである。

1.低分子化合物の新規標的分子同定法の開発

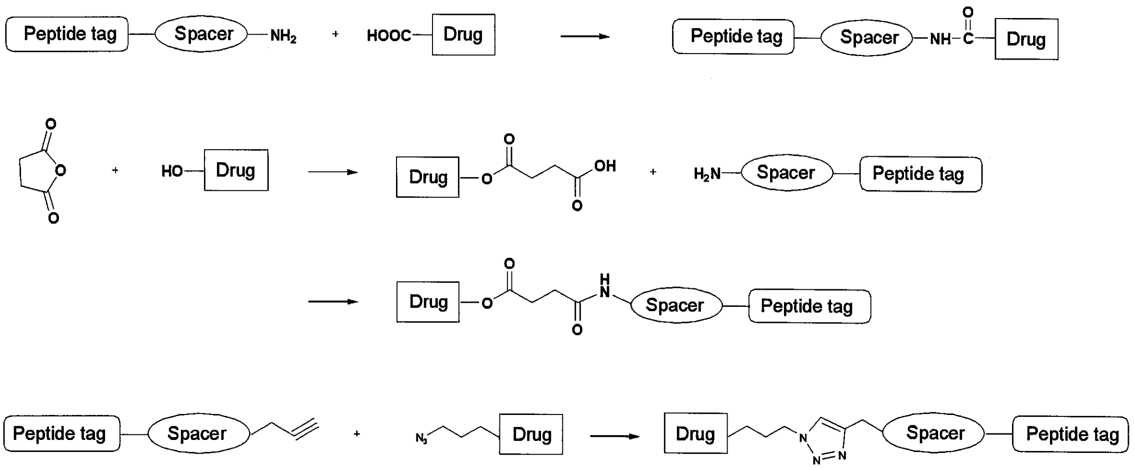
現在、タンパク質相互作用解析の主流となっている方法は、質量分析と免疫沈降法を組み合わせたものである。この方法を、さらに高感度かつハイスループットに遂行できるシステムを、産業総合技術研究所タンパク質ネットワーク解析チームの夏目徹博士等が開発し、これまで分子生物学的アプローチを含めあらゆる手法を用いても見出すことが出来なかった多くのタンパク質間相互作用を解明している。

そこで、このタンパク質相互作用解析システムに着目し、低分子化合物の新規標的分子の同定法の開発を行った。従来の化合物ータンパク質間相互作用の検出は、通常、直接もしくはビオチンーアビジン相互作用を利用して樹脂に固定し、アフィニティークロマトグラフィーと同様の方法により、結合タンパク質を同定するものであった。しかしながら、ビオチンーアビジンは非特異的なタンパク質の吸着が多いこと、また、その結合が強いことから効率的な結合タンパク質の回収が困難であるといった弱点があった。

このような問題を克服するため、従来のビオチンによる化合物のラベル化では無く、非特異的吸着が極めて少なく、かつ効率的に結合タンパク質の回収が可能なタグを選択することとした。タグは抗原ー抗体反応を利用して樹脂に固定する方法を用いるため、タグを認識する抗体の調製が容易なペプチドタグを選択した。また、低分子化合物とペプチドタグをつなぐスペーサーは、脂溶性および水溶性化合物ともに適応可能とするものを用いることとした。また、低分子化合物を縮合させた最終産物である、ペプチドタグースペーサーー低分子化合物からなる標識化合物を、キメラ化合物と命名した。

1) キメラ化合物の調製法

ペプチドタグースペーサーは、効率的にペプチド伸長が可能な固相合成法を採用した。低分子化合物のペプチドタグースペーサーへの結合は、以下のような反応を用いて行った。これらの反応を用いることで、目的とする低分子化合物の性質および量に適応させ、固相上あるいは溶液中でのキメラ化合物化を行った。



2) キメラ化合物

i) ヒストンデアセチラーゼ阻害剤

本法の有効性の検証実験として、まず初めにヒストンデアセチラーゼ(histone deacetylase、HDAC) の阻害剤である spiruchosatatin A をモデル化合物として用いた。HDAC は、抗腫瘍、生活習慣病など多くの疾患治療ターゲットとして注目されている分子であり、HDAC 複合体は転写複合体として比較的多くの結合因子について研究が進んだ因子の一つである。また、HDAC 阻害剤については、同じ HDAC ファミリーにアフィニティーが強いのにもかかわらず、活性表現系が異なると言った興味ある現象が知られている。これには HDAC 複合体の違いが関与していると考えられており、本手法により、一度に多くの HDAC 複合体を同定することが出来れば、本分野の研究に大きく貢献することが期待される。そこで、キメラ spiruchosatatin A を用いて実験を行った結果、HDAC 複合体の同定に成功した。

ii) PPARγアゴニスト

次の目的化合物として、糖尿病薬である PPARγアゴニストに注目した。PPARγアゴニストは、脂肪細胞の分化やインスリン抵抗性の改善に関与していることが知られているが、その詳細なメカニズムは不明である。また、PPARγアゴニストの一部の化合物については、抗腫瘍活性が報告されており、PPARγ以外のオフターゲットの存在が示唆されている。したがって、これらをキメラ化合物とすることで抗糖尿病あるいは抗腫瘍の新たな標的タンパク質を明らかにすることが期待できる。

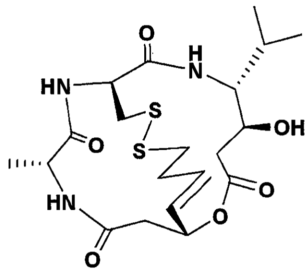
そこで、報告されている化合物中で PPARγアゴニスト活性が強い KST1 を用いて、標的タンパク質の同定を行った。その結果、予想に反して、PPARγは得ることが出来なかったが、PPARγを高発現させた細胞を用いて同様の実験を行った場合、PPARγを同定することができた。PPARγ非高発現細胞では、癌の増殖に関係する因子として報告されているタンパク質が同定され、本因子が KST1 のターゲットの一つであることが示唆された。

次に、糖尿病薬として臨床応用されている thiazolidinedione 系化合物 pioglitazone を用いて、標的タンパク質の同定を行った。その結果、PPARγ高発現細胞を用いても PPARγは得られなかったが、脂肪酸代謝に関わる数種のタンパク質の同定に成功した。これらの新たに見出した因子が、今後の糖尿病治療薬開発の新規ターゲットとなることが期待される。

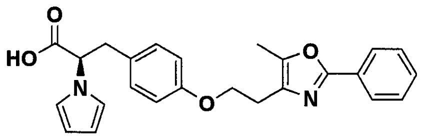
iii) 新規 GRP78 発現抑制物質 versipelostatin

本方法の開発の本来の目的は、東京大学分子細胞生物学研究所活性分子創生研究分野にて見出された、新規 GRP78 発現抑制物質 versipelostatin の標的タンパク質を同定することに起因する。Versipelostatin は、放線菌より単離された天然由来の低分子化合物

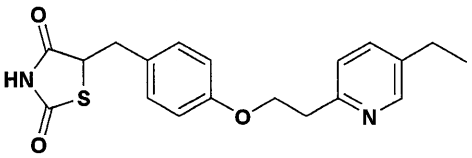
で、癌細胞を用いた *in vitro* 実験でグルコース飢餓状態において誘導されてくる分子シャペロン GRP78 の発現を抑制し、細胞死を誘導する。また、動物モデルであるマウスを用いた *in vivo* 実験においても抗腫瘍活性を示し、全く新たな活性発現メカニズムを有する固形癌選択的治療薬として期待されている。このような活性を有する化合物はこれまで報告されていなかったため、その作用機作を解明する手懸かりが無いのが現状である。この標的タンパク質が同定されれば、新たな癌治療におけるターゲットタンパク質を示すことができる。さらに、versipelostatin の骨格や構造をファーマコフォアとし、ターゲット分子により特異的で強力な結合を有する類縁体合成へと進めることが可能となる。



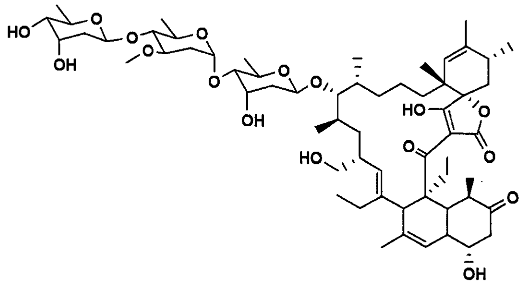
Spiruchostatin A



KST1



Pioglitazone



Versipelostatin

標的低分子化合物

以上、この低分子化合物の新規標的タンパク質同定法は、従来の方法を凌駕するものであり、今後本法を用いて、様々な化合物について網羅的に低分子化合物－タンパク質相互作用を解明することにより、ポストゲノム創薬を加速することが期待される。