

# 小分子固定化を基軸とした小分子 蛋白質間相互作用検出システムの開発

著者	高山 浩
号	44
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博第449号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/57020">http://hdl.handle.net/10097/57020</a>

氏 名 (本籍)                   <sup>たか</sup>高                   <sup>やま</sup>山                   <sup>ひろし</sup>浩

学 位 の 種 類                   博                   士 (薬                   学)

学 位 記 番 号                   薬   博   第   4   4   9   号

学 位 授 与 年 月 日               平 成 23 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件               学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 、 専 攻                   東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科  
(博 士 課 程) 創 薬 化 学 専 攻

学 位 論 文 題 目

小分子固定化を基軸とした小分子-蛋白質間相互作用検出システム:新規開裂型フォトアフィニティービーズと Cytochrome P450 基質検出アレイの開発

論 文 審 査 委 員                   (主 査) 教 授   岩 淵 好 治  
  教 授   大 島 吉 輝  
  教 授   土 井 隆 行

# 論文内容要旨

新規小分子-蛋白質間相互作用を探索・解析する技術は、ケミカルバイオロジー研究を推進する強力な基盤技術となり得る。著者は、小分子固定化を基軸とした小分子-蛋白質間相互作用検出システムの開発を目的として、生物活性小分子と共有結合する標的蛋白質の検出が可能な新規開裂型フォトアフィニティービーズの開発と、Cytochrome P450 の基質を探索する化合物アレイの構築を行った。

## 新規開裂型フォトアフィニティービーズの開発

生物活性小分子をアガロースビーズなど固相担体上に固定化し、小分子-蛋白質間相互作用に基づき細胞内結合蛋白質を釣り上げる手法は、小分子の細胞内標的分子を同定する上で有用な手法である。固相上に小分子を固定化する方法として 2003 年に開発された光親和型固定化法が注目されている。光親和型固定化法とは、ジアジリン基の光分解により発生するカルベンを用いた小分子の固定化法である。しかし、光親和型固定化法により小分子を固定したアフィニティービーズには 2 つの大きな問題点があることが指摘されていた。一つ目は、小分子と共有結合を形成する標的蛋白質の検出感度が低いという問題点である。二つ目は、小分子がどのような固定化様式で、どのくらいの量がビーズ上に固定化されているかの検証が困難であるという問題点である。

そこで、ビーズと小分子を繋ぐリンカー鎖中に選択的切断サイトとしてジスルフィド結合を導入した新規開裂型フォトアフィニティービーズをデザインし、これを用いることで上記問題点の解決を図ることとした (Fig. 1)。すなわち、導入した切断サイトからの切り出しにより固定化された小分子をアフィニティービーズから解離させ、これを解析する事で、小分子の固定化様式ならびに固定化量の解析が可能であると考えた。また、小分子と共有結合を形成する標的蛋白質の検出も、切断サイトからの切り出しにより可能になると期待した。これらの着想を基に、切断サイトとしてジスルフィド結合を導入した新規開裂型フォトアフィニティービーズの評価を行った。

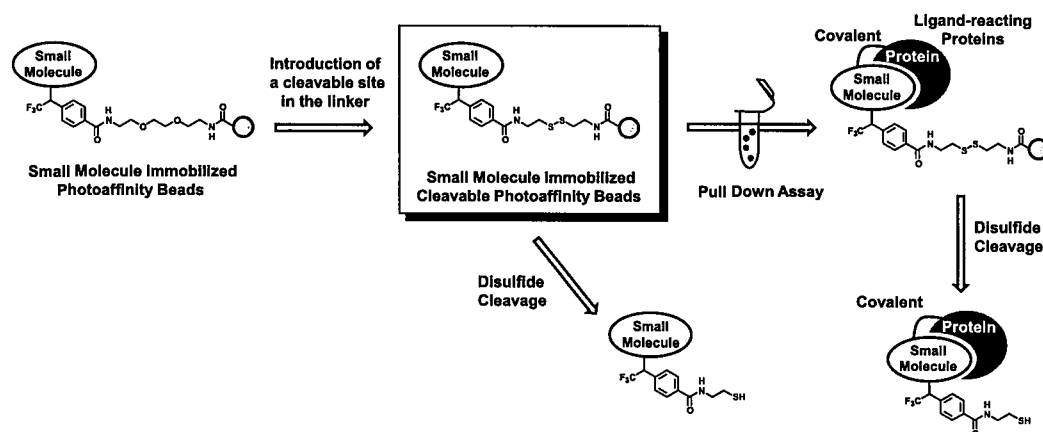


Fig. 1 Detection of Immobilized Small Molecule and Ligand-reacting Protein by Cleavage of Disulfide Bond

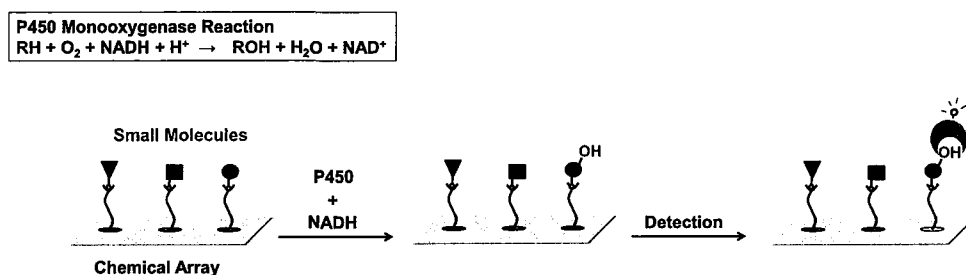
まず、新規開裂型フォトアフィニティービーズ上に固定化した小分子のビーズからの切り出しと検出を天然由来小分子 Cyclosporin A と FK506 を用いて評価した。両小分子をそれぞれ固定化させた開裂型フォトアフィニティービーズを還元剤 DTT で処理することで、リンカー鎖中のジスルフィド結合を切断し、遊離した小分子を質量分析装置にて解析した。その結果、光親和型固定化法によりアフィニティービーズ上に固定化された Cyclosporin A と FK506 由来の分子イオンの検出に成功した。

次に、開裂型フォトアフィニティービーズを用いて小分子と共有結合を形成する標的蛋白質の検出を試みた。モデル化合物として放線菌由来のポリケチド化合物 Phoslactomycin D を用い、細胞内で Phoslactomycin D と共有結合を形成する標的蛋白質 PP2Ac (Protein Phosphatase 2A/c subunit) の検出を試みた。その結果、切断サイトを持たないアフィニティービーズでは十分に検出されなかったが、開裂型フォトアフィニティービーズを用いることで Phoslactomycin D と共有結合を形成する標的蛋白質 PP2Ac の高感度検出を可能とした。

以上の結果より、切断サイトとしてジスルフィド結合を導入することで、その切り出しにより光親和型固定化法により固定化された小分子の検出が可能であることを明らかとした。また、開裂型フォトアフィニティービーズを用いることで、これまで問題があった小分子と共有結合を形成する標的蛋白質の検出の問題を解決し、生物活性小分子の標的蛋白質探索において有効な検出システムであることを示した。

#### Cytochrome P450 基質検出アレイの開発

酸化酵素 Cytochrome P450 (以下 P450) は、基質分子に対し酸素原子を添加させる一原子酸素添加活性を有するヘム蛋白質である。放線菌を含めた微生物では、二次代謝産物の生合成に深く関与することから、基質分子の特定を出発点とした P450 機能解析が活発に行われている。また、P450 の多様な触媒活性を多様な化合物の創成に利用しようとする試みも行われている。そこで、様々な活性を示す P450 分子種の機能理解や活性制御・利用を行うには、まず、これら P450 がどのような小分子を基質とするかを明らかにすることが必要不可欠である。そこで、著者は、P450 の基質化合物を網羅的に探索できるハイスループットスクリーニング系の構築を目指した。

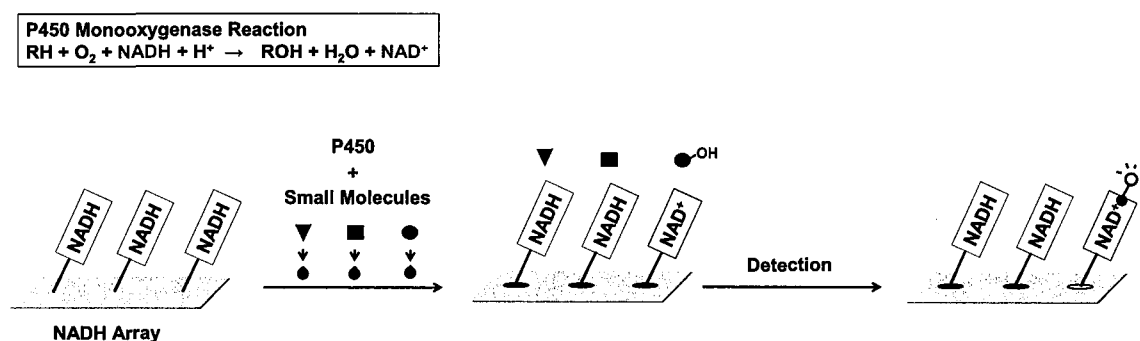


**Fig. 2 Schematic Diagram of Screening for P450 Substrates by Detecting Structural Change of Tethered Substrates on Chemical Array**

著者は、まず化合物アレイを利用した P450 の基質スクリーニングシステムの開発を計画した。化合物アレイとは、数千から数万種類の小分子が固定化されたガラス基板で、蛋白質の小分子リガンドスクリーニングに用いられてきた。そこで、P450 がアレイ上の小分子と相互作用し、その結果生じた官能基の変換を何らかの方法で検出できれば、化合物アレイを用いた P450 の基質化合物のハイスループットスクリーニングが可能であると考えた。

本スクリーニング系の構築には、基質候補化合物の固相上への固定化が必要であり、そのためには小分子側に固相固定化用リンカーの導入が必要である。しかし、基質分子に固相固定化用の長鎖リンカーを導入すると、P450 システムの電子供給源である NADH の消費率に顕著な減少が見られ、固相上に固定化された基質分子を酸化することは困難であることが明らかとなった。そのため、基質スクリーニングには基質候補となる小分子への化学修飾を伴わず、別の何らかの方法で P450 の酸化反応の進行を検出する手法が求められた。

そこで次に、P450 の酸化システムにおいて、小分子が P450 の基質となり酸化される場合、酸化反応の進行と共に電子供給源である NADH が NAD<sup>+</sup> に効率良く変換されることに着目し、この変換を固相上で検出することを計画した。著者が計画した概略図を Fig. 3 に示す。



**Fig. 3 Schematic Diagram of Screening for P450 Substrates by Detecting Conversion from NADH to NAD<sup>+</sup> on NADH Array**

まず、NADH を固定化した NADH 固定化基板上 (NADH Array) に、P450 と基質候補化合物を含む溶液を微小液滴としてスポットする。小分子が基質となる場合、微小液滴中で酸化反応が進行し、固定化されている NADH は NAD<sup>+</sup> に変換される。その後、何らかの方法で NAD<sup>+</sup> を選択的に標識化し、検出することができれば P450 の基質ハイスループットスクリーニングが可能であると考えた。本スクリーニング系の構築には、(1) P450 システムで利用可能な NADH 固定化基板の開発と、(2) 固相上に固定化された NAD<sup>+</sup> 選択的な検出法の開発が核となる技術的要素と考えられる。

技術的要素の構築を図った結果、まず固相上にアデニン部位の 8 位を介して固定化された NADH が P450 システム中で補酵素として機能することを明らかとし、P450 システムで利用可能な NADH 固定化基板の作製法を確立した。また、ビオチンまたは蛍光色素ロダミンを導入したアセトフェノン誘導体が、選択的に NAD<sup>+</sup> とコンジュゲートを形成することを明らかとし、NAD<sup>+</sup> 選択的検出試薬の開発に成功し

た。

最後に、NADH 固定化基板と上記検出試薬を用いて P450 の基質スクリーニングが可能であるかどうかの検討を行った。土壌細菌 *Pseudomonas putida* 由来の P450cam とその基質である *d*-camphor を評価系として用いて検討したところ、*d*-camphor が含まれる微小液滴をスポットした場所で、NADH から NAD<sup>+</sup> への変換が検出された。

以上の結果より、著者は、P450 システムで利用可能な NADH 固定化基板の開発と、固相上に固定化された NAD<sup>+</sup> 選択的な検出法の開発に成功した。また、NADH 固定化基板と上記検出試薬を用いることで P450 の基質スクリーニングが可能な検出システムを構築した。

## 審査結果の要旨

微生物の二次代謝産物を始めとする生物活性小分子の多くは、蛋白質を分子標的として相互作用を及ぼし、特異な表現形を発現する。ゆえに、網羅的に小分子-蛋白質間相互作用を解析する技術は、ケミカルバイオロジー研究を推進する強力な基盤技術として期待される。本論文の著者は、小分子固定化を基軸として小分子-蛋白質間相互作用検出システムの開発を目的とした研究を行った。

まず、光照射により小分子と標的タンパク質とを共有結合で連結して、多くの蛋白質が混在する系中から標的タンパク質を特定することを可能とする光親和型固定化法の高機能化に取り組んだ。従来、光親和型固定化法を用いたプラットフォームには2つの大きな問題点があることが指摘されていた。1つ目は、小分子と共有結合するリガンド反応性蛋白質の検出感度が低いという問題で、2つ目は、小分子の固定化様式と定量性の検証法に関する問題点である。著者は、ビーズと小分子を繋ぐリンカー鎖中に選択的切断サイトとしてジスルフィド結合を導入した新規開裂型フォトアフィニティービーズを設計・作製して上記問題点の解決を図った。検討の結果、切断サイトを持たないアフィニティービーズでは十分に検出されなかった phoslactomycin D とその標的蛋白質 PP2Ac の相互作用が、開裂型フォトアフィニティービーズを用いることで高感度検出が可能となることを実証した。新規開裂型フォトアフィニティービーズは、これまで困難であった小分子と共有結合を形成する標的蛋白質の検出の問題を解決し、生物活性小分子の標的蛋白質探索において有効な検出システムとして活用されると期待される。

次いで著者は、酸化酵素 cytochrome P450 の基質を探索する化合物アレイの構築を行った。Cytochrome P450 は基質分子に対し一原子酸素添加する活性を有するヘム蛋白質であり、その基質特異性の理解は、多様な生物種の特性的理解、さらにはバイオテクノロジー領域への応用展開が期待されている。著者は、小分子が P450 の基質となり酸化される場合、酸化反応の進行と共に電子供給源である NADH が  $\text{NAD}^+$  に効率良く変換されることに着目し、この変換を固相上で検出することを試みた。まず固相上にアデニン部位の 8 位を介して固定化された NADH が P450 システム中で補酵素として機能することを明らかとし、P450 システムで利用可能な NADH 固定化基板の作製法を確立した。また、ビオチンまたは蛍光色素ロダミンを導入したアセトフェノン誘導体が、選択的に  $\text{NAD}^+$  とコンジュゲートを形成することを明らかとし、 $\text{NAD}^+$  選択的検出試薬の開発に成功した。土壌細菌 *Pseudomonas putida* 由来の P450cam とその基質である *d*-camphor を評価系として用いて検討したところ、*d*-camphor が含まれる微小液滴をスポットした場所で、NADH から  $\text{NAD}^+$  への変換を検出することに成功した。本手法は、P450 のみならず、NADH/ $\text{NAD}^+$  を補酵素とする酵素類、 $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$  を基質とする酵素類の基質または阻害剤探索にも利用可能であると考えられる。

以上、著者は小分子固定化を基本戦略として、小分子-蛋白質間の相互作用を網羅的に解析するための2つの新しい手法を開発することに成功した。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。