

## 着に関する構造活性相関研究およびその抑制方法の開拓

(株)リバーズ・プロテオミクス研究所、化学部門) ○山崎 晃、田中 明人

## はじめに

現在 NIH を中心にポストゲノム時代の中心課題の一つとしてケミカルジェノミクスが謳われ、積極的な投資が行われ製薬企業の注目を集めている<sup>1)</sup>。一方、これらの流れを背景とし、製薬企業においてはその固有財産としての“生理活性自社化合物（毒性・副作用を含む）”の最大活用の重要性が認識されつつあり、いわゆる Forward Chemical Genetics<sup>2),3)</sup>の戦略の遂行（興味ある生理活性物質のターゲットタンパク質を探索し、その延長として評価系の再構築・S BDDを行う）が計画されている。この研究においてアフィニティ樹脂は“直接”化合物が結合するターゲット候補蛋白質を同定できるメリットがあるため、間接的な関連蛋白質情報を含むプロテーム等の研究に比べ、最も有効な手法の一つと考えられている。しかし、アフィニティ樹脂を用いたターゲット探索研究自身は古い歴史を持つ反面、基盤技術が未開拓領域であるため、その有効活用が米国においてもなされていないこともまた事実である。我々はこれらのことを背景とし、創薬関連11社共同出資会社の標記会社を設立し<sup>4)</sup>、NEDOの支援のもと研究を行い、アフィニティ樹脂に関する基盤技術をほぼ完成させることが出来た。

今回の講演ではその中で、アフィニティ樹脂に非特異的に結合する蛋白質に関する定量的構造活性相関に関する結果、およびその結果を活用したその抑制策について発表する。

## 非特異的な蛋白吸着

アフィニティ樹脂を用いたターゲット探索研究では固相担体に生理活性物質を出来る限り活性な状態で固定し、ターゲット蛋白質を含む蛋白溶液（以下単に lysate）と混合し、その結合蛋白質からターゲット蛋白質を同定するが、多くの場合非特異的にアフィニティ樹脂に吸着する蛋白質の存在が探索研究にとって大きな障害となる。代表的な例としては細胞から調整した lysate における tubulin ( $\alpha$ -tubulin; 50 KDa) や actin ( $\alpha$  actin 3; 42 KDa)、血漿におけるアルブミン (Serum albumin (Precursor); 69KDa) などが挙げられる。これらの蛋白質は他に比べ圧倒的に多量に存在すること、およびその分子量が多く興味深い蛋白質分子量と類似する等の理由から、ターゲット蛋白質探索研究を阻害する場合多くなっている。

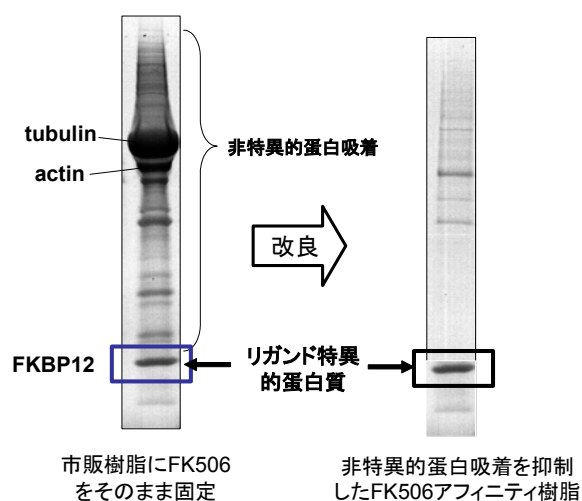


図1. アフィニティ樹脂における非特異的蛋白吸着

これらの非特異的蛋白吸着はこれまでアフィニティ樹脂の疎水的性質に相関すると言われてきたが、その定量的な研究はなされないまま、一部の限定された単純脂肪酸と市販酵素との相互作用に関する Hofstee 等<sup>5)</sup>による研究をベースに過大解釈されてきた背景があったため、我々は定量的な研究を行うこととした。

## 各種リガンドー固定アフィニティ樹脂の合成およびラット脳ライゼートとの混合

図 2 A に示す 12 種のリガンドを検討対象リガンドとして選択し、市販アフィニティ用樹脂 (Tosho 社、AF-Amino-650M) にこれらを固定化し、実験材料とした。ここで使用したリガンドはすべて分子内にカルボン酸を有し固相担体のアミノ基との縮合反応により固定化でき、その導入率が残存アミノ基に対するニンヒドリン試験によって未反応アミノ基量をチェックできるものを選択した。また、使用したリガンドは、1) 構造的長が少なく疎水的効果を判断するに相当と考えられる単純飽和脂肪酸 (化合物 1-5)、2) 生理

活性物質にしばしば見られる部分構造であるベンゼン環を含む化合物 (化合物 6)、アミド結合を含む化合物 (化合物 7)、ピリジン環を含む化合物 (化合物 8)、3) 医薬品そのもの及びその誘導体 (化合物 9, 10, 12)、4) アミノ酸誘導体 (化合物 13) を選択し、可能な限り構造的 diversity も持たせたよう努めた。

これらのリガンドを固相担体に固定し、ラットの脳から調整した lysate と混合し、lysate 除去後、樹脂を 5 回 buffer (0.25 M sucrose, 25 mM Tris pH=7.4) で洗浄後、SDS サンプル buffer を加え結合タンパク質を完全に溶出した。溶出した蛋白質の解析は SDS ゲルにて行った (図 2 B)。

図 2 B の結果を定量的に解析するため GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (BIO-RAD, software; Quantity One-4.1.0) を用い、代表的な非特異的蛋白質である tubulin および actin のバンド量を数値化した (図 2 C)。

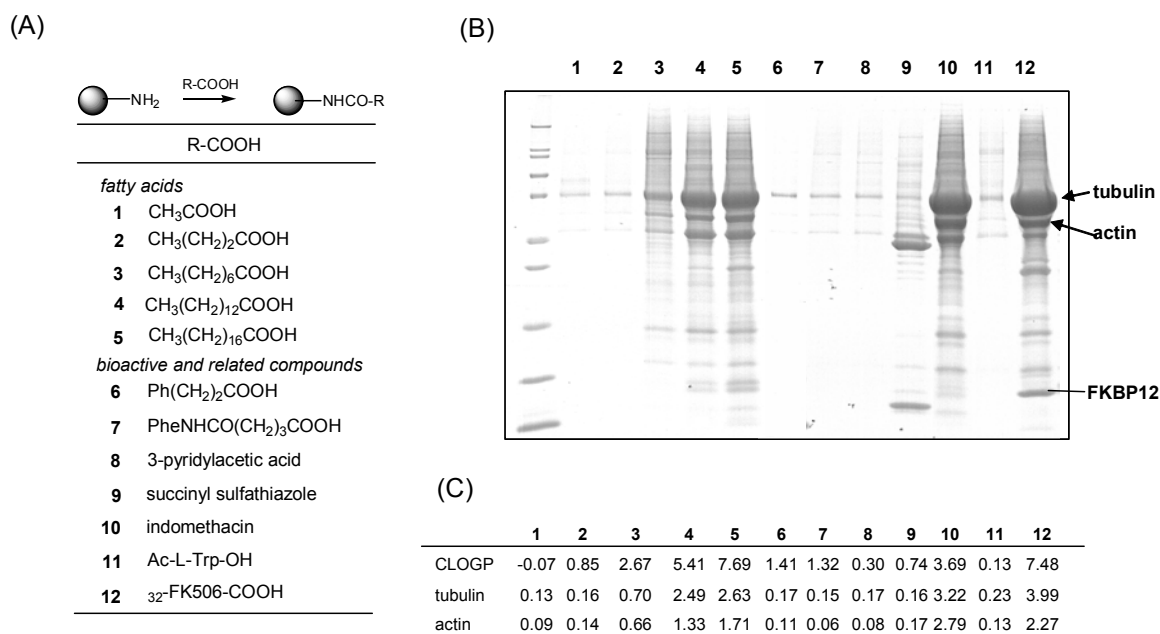


図2 (A) 今回の検討で使用したリガンドの構造とアフィニティ樹脂の合成、(B) リガンド固定化アフィニティ樹脂をラット脳から調整した lysate (0.25 M sucrose, 25 mM Tris pH=7.4) と混合し得られた結合蛋白質、(C) 各リガンド分子 (R-COOH) の CLOGP 値 (Daylight Chemical Information Systems Inc. Version 4.72, ) と図 2B の tubulin, actin のバンドを数値化した蛋白量。

## 非特異的結合蛋白量の解析

図 2 C のデータを plot した結果を図 3 に示す。図 3 に示すように tubulin、actin 共にアフィニティ樹脂上のリガンドの CLOGP が約 1.5 までの親水性リガンドが固定化された樹脂にはほとんど結合しないことが明らかとなった (CLOGP は Daylight Chemical Information Systems Inc で計算 (Version 4.72))。一方、CLOGP=1.5 を越えた点から CLOGP の増加に相関し結合量を増加させることが明らかとなった。ただし、indomethacin はこの相関から外れているがその理由が不明である。Indomethacin を除く 6 化合物に関し、固定化に用いたフリー・リガンド(R-COOH)の CLOGP を用い解析した結果、

$$(\text{tubulin}) = 0.51 \cdot \text{CLOGP} - 0.54 \quad (n=6, r=0.95) \quad (1)$$

$$(\text{actin 量}) = 0.30 \cdot \text{CLOGP} - 0.27 \quad (n=6, r=0.97) \quad (2)$$

(ただし、CLOGP>1.5)

という高い相関関係を有する正の直線関係があることが示された。この結果は、先の Hofstee の結果と一致し、過去の結果を再確認することとなった。しかし、前述の通り、過去に本相関に関する定量的な報告例は無く、今回の結果はアフィニティ樹脂における非特異的タンパク吸着量と化合物の疎水的性質の関係を定量的に検討した最初の報告となった<sup>6)</sup>。なお、我々の検討では CLOGP と相関関係が無い他の構造パラメーターとの相関関係は認められなかった。

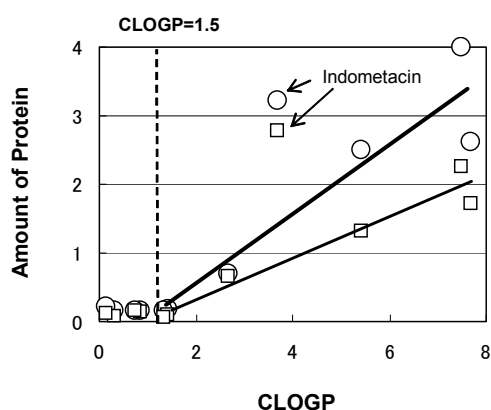


図 3 tubulin、actin 量とリガンド CLOGP の関係

## 親水性スパーサーによる非特異的結合蛋白抑制

図 3 の検討からリガンドを含むアフィニティ樹脂の表面の親水性を向上させることによりターゲット探索検討の妨害となる非特異的蛋白吸着を抑制することが示唆された。そこで、FK506 固定化アフィニティ樹脂による lysate からの FKBP12 抽出への応用を行った。FK506 は特異的結合蛋白質 FKBP12 と  $K_d = 0.4 \text{ nM}$  と強力に結合することが知られている免疫抑制剤である<sup>7)</sup>。FK506 と FKBP12 の複合体形成に影響を与えない FK506 の 32 位に導入したリンカー部位と固相担体の間に新たに開発した親水性スパーサー<sup>6)</sup>を 1 から 6 mer 導入したアフィニティ樹脂を合成し (図 4 A)、各 FK506 アフィニティ樹脂への非特異的蛋白吸着量を観測することとした (図 4 B)。その結果、期待通りに特異的結合蛋白質の結合量 (FKBP12) を一定に保ちながら、非特異的吸着蛋白質 (tubulin、actin) の結合量を抑制することが出来、我々の図 3 での結果を補完する事ができた。

図 4 B の tubulin、actin の蛋白量を数値化した (図 4 C)。図 2 C のデータと図 4 C のデータをまとめ、再度 CLOGP を用い検討を行った (図 4 D)。その結果、下記の (3)、(4) 式の結果を得ることが出来た。

$$(\text{tubulin}) = 0.57 \cdot \text{CLOGP} - 0.84 \quad (n=12, r=0.87) \quad (3)$$

$$(\text{actin 量}) = 0.30 \cdot \text{CLOGP} - 0.43 \quad (n=12, r=0.90) \quad (4)$$

(ただし、CLOGP>1.5)

(3)、(4) 式の結果を (1) (2) 式と比べてみても相関係数の面で若干の低下が見られたが相関式そのものも実験誤差を考えれば妥当な範囲であり、我々が想定した非特異的蛋白吸着量は樹脂に固定化したリガンドの疎水的性質に比例とするという仮説が支持されたと考えられる。

なお、親水性スパーサーの導入による非特異的吸着蛋白のうち、tubulin については trimer あるいは tetramer 程度のその効果がほぼ飽和状態にある

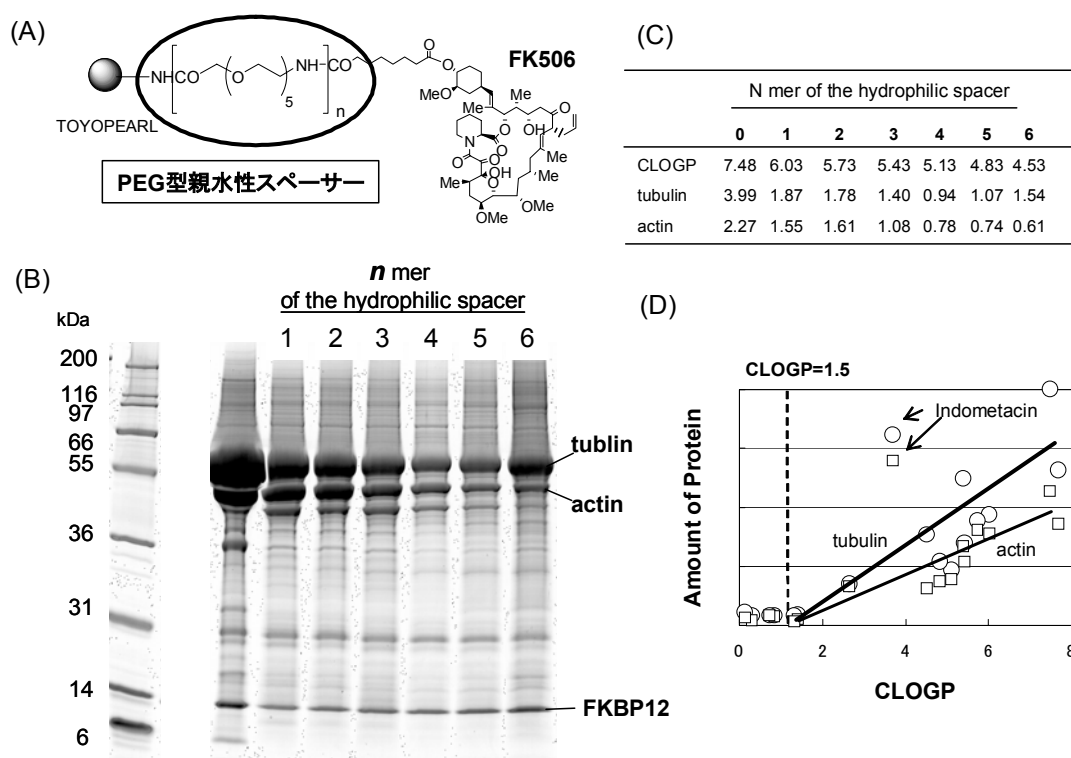


図4 (A)親水性スペーサーを導入したFK506-Affinity resins構造、(B)親水性スペーサーを導入したFK506アフィニティ樹脂への結合蛋白質、(C)図4Bのtubulin、actinのバンドを数値化した値およびCLOGP値、(D) 図3に親水性スペーサーに関するデータを加味したtubulin、actin量とリガンドCLOGPの関係

点が認められるが、現時点ではその要因は未解明である。また、本検討において indomethacin を固定化した樹脂が CLOGP から予測されるより tubulin あるいは actin を多く吸着する点についても今後の検討課題である。

## References and Notes

- [1] NIH が推進する”The Road Map”に関する記事は <http://nihroadmap.nih.gov/> で公開中。
- [2] Chemical genetics の説明は本概念の発案者の <http://www-schreiber.chem.harvard.edu/> に詳しい。
- [3] Forward chemical genetics は生理活性物質ありきの戦略で、機能未知遺伝子有りきの戦略 reverse chemical genetics と対をなす (<http://iccb.med.harvard.edu/biology/index.htm>)。

[4] [http://www.reprore.jp/index\\_ja.htm](http://www.reprore.jp/index_ja.htm)

- [5] 1) Hofstee, B. H. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**, 1137-1144 (1973). 2) Hofstee, B. H. J. *Adv Exp Med Biol.* **42**, 43-59 (1974).

[6] T. Tamura, *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, **14** (6), 1222 - 1230 (2003).

[7] J.J. Siekierka, *et al.* *Nature* **1989**, 341. 755.T.

[8] 未発表データ。