

生命・化学情報に基づく融合創薬研究者養成

京都大学大学院薬学研究科



■ 平成17年度 魅力ある大学院教育イニシアティブ報告書 ■

▶ Contents

1	あいさつ
2	プログラム概要
	■融合研究プロジェクト成果概要
4	小林 祐輔／プロテアソーム阻害物質の合成と評価
6	藤本 真二／脳内出血治療薬開発を目指したトロンビン誘発遅延性神経細胞死原因タンパクの探索
8	木村 郁夫／新規分泌性因子Neudesinの神経栄養・分化因子としての役割の解明
10	相田 一樹／光による機能分子イメージングのためのプローブの開発研究
12	竹本 誠二／機能性ペプチドの利用による新規癌免疫療法の開発
14	井村 雄一／抗菌性ペプチドの作用標的の制御と細胞内分子導入ベクターへの応用
16	中尾 賢治／アストロサイト形態を指標としたセリンプロテアーゼ受容体リガンド探索法の最適化
18	山内 陽介／ $\alpha 7$ ニコチン受容体に対する植物アルカロイドの薬理作用の探索的研究
20	佐藤 康彦／ペルオキシソーム膜タンパク質輸送に関するPex3p, Pex19p, PMPの結合様式の解析
22	矢野 武明／脂肪酸受容体GPR120のゲノム薬理的解析
24	鳴海 哲夫／タンパク質の機能発現を制御するペプチド性リガンドの高活性非ペプチド化によるゲノム創薬研究
26	兵頭 健治／骨転移巣へのタンパク質ターゲティングシステムの開発による骨転移抑制
28	勝見 英正／一酸化窒素デリバリーによる活性酸素障害の抑制
30	畑 誠司／タンデム型Mannich-oxidation反応を利用したTaxol誘導体合成
32	坂井 健男／(-)-Kopsijasmineの効率的な不斉全合成
34	野中 元裕／細胞内MBPによる糖タンパク質の翻訳後修飾・輸送に関する研究
36	高野 裕嗣／ヒアルロン酸-CD44シグナルによるマスト細胞の成熟抑制機構の解明

コース名

- ケミカルバイオロジー
- ゲノム創薬
- ファーマコゲノミクス

魅力ある大学院教育イニシアティブ
「生命・化学情報に基づく融合創薬研究者養成」
融合研究プロジェクト 平成17年度 成果報告にあたって



平成17年度に、魅力ある大学院教育イニシアティブプログラムとして採択された本事業は、京都大学大学院薬学研究科において、これまで21世紀COEプログラム「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」によって実施してきたバイオインフォマティクス教育を、ゲノム創薬研究の人材育成へと結びつけることを目的に計画された。

プログラムの具体的内容として、教育システムの充実の面からは、大学院ゲノム創薬カリキュラムの再編成と大学院バイオインフォマティクス講義の設置を行い、これらの講義科目に対するインターネット学習システム（WebCT）の導入と整備を通じて、バイオインフォマティクスに対する横断的連携教育システムの構築を推進している。講義アーカイブの制作に関わる技術的な準備も平成17年度にほぼ終了し、現在は実質的なコンテンツの整備の体制作りを進めている。また、大学院生のコース管理を目的に電子メールサーバ等を導入し、さらに研究成果の発表等に必要な機器の整備も進めた。

本プログラムでは、もうひとつの重要な柱として、大学院生の自立的研究提案に対して専攻の異なる複数教員が共同で横断的研究教育体制を確立し研究の推進を支援する融合研究プロジェクトを立案した。本プロジェクトでは、『ゲノム創薬コース』、『ケミカルバイオロジーコース』、『ファーマコゲノミクスコース』の3つの融合コースを創設したが、募集に対し大学院博士後期課程学生より25件の応募があり、選考委員会による選考の結果、融合研究によって大きな研究の発展が期待できる17件（ケミカルバイオロジーコース7件、ゲノム創薬コース6件、ファーマコゲノミクス4件）の研究提案が採択された。各研究の成果は、平成17年度末に開催された研究報告会において報告され、研究科横断的な討論を通じて、評価を行うと共に、研究の更なる発展に向けた足がかりを得ることになった。

本成果報告書は、研究報告会に発表された内容を編集したもので、ホームページによる公開と併せて、研究成果を広く公表し社会に還元することを目的とする。本書に報告された研究内容は、自立的な研究の推進を基盤とし、各大学院生が、研究テーマの立案、実験計画の策定、実験結果の解析等に、融合コースとしての総合的な立場に基づく指導のもとで、意欲的に取り組んだ研究活動の貴重な記録となっている。大学院生の成長に向けて、関係各位の更なるご指導ご鞭撻を、本機会に改めてお願いしたい。

京都大学大学院薬学研究科
橋田 充

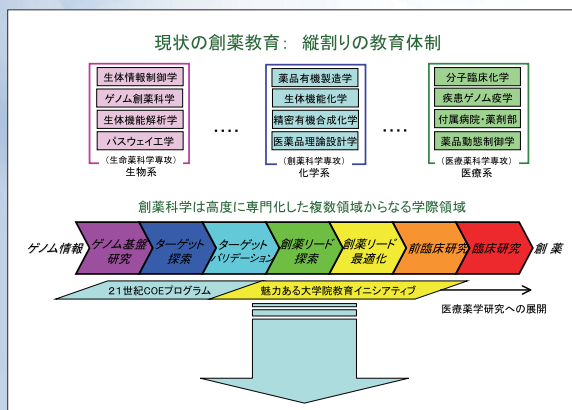
教育プログラムの概要

■ 本事業の大学全体としての位置付け

薬学に対する社会的期待・要請は、創薬から医療領域まで多岐にわたり、わが国の薬学教育・研究を代表する本学薬学研究科に対しては、先端的薬学教育を推進して創薬・薬物治療の発展を先導する人材、研究者を輩出することが強く求められている。本教育・研究者養成プログラムは、21世紀COEプログラム「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」で推進してきた薬学領域における情報科学基盤教育をさらに充実させ、バイオインフォマティクスやケモインフォマティクスを統合するファーマコインフォマティクスを基盤とした創薬研究・教育を推進するものである。複数の研究分野が連携・融合した本研究プロジェクトを大学院生に立案・実行させるプログラムを推進することにより将来、研究者として自立するためのインセンティブを与え、社会的ニーズにマッチした新世代の創薬研究者を養成する教育改革として位置付けられる。これは京都大学の理念、中期目標に沿う教育改革でもあり、京都大学としても支援を行う予定である。

■ これまでの教育研究活動の状況

本学薬学研究科では、多様かつ調和のとれた教育体系のもと卓越した知の継承と創造的精神の涵養に努め、社会の調和ある発展に貢献できる優れた研究能力や医療人としての高度の専門知識を持つ人材を育成するという基本目標を達成するため、創薬・医療連携薬学コア部門を新設し、“創薬”、“医療”という従来の二分化した縦型の薬学教育・研究の枠組みを克服し、創薬科学と医療科学の連携による基礎と医療・臨床をインテグレートした新しい薬学教育システムの構築を図ってきた。また、最近の科学技術の急速な発展に呼応し、バイオインフォマティクス、ファーマコゲノミクス、ゲノム・プロテオーム・メタボローム創薬などの新しい創薬研究手法や、分子標的医薬、遺伝子治療、移植医療、テーラーメイド医療などの革新的医療の研究・教育の場への導入に計画的に取り組んできた。しかし、こうした非常に幅広くまた高度に専門化した科学教育を実施するには、現状のオーソドックスな専門教育システムは領域の有機結合に基づく研究の深化や施策の機動性に欠けきわめて不十分であるため、次世代の発展へのステップとして新しい発想に基づくプロジェクト展開が不可欠である。



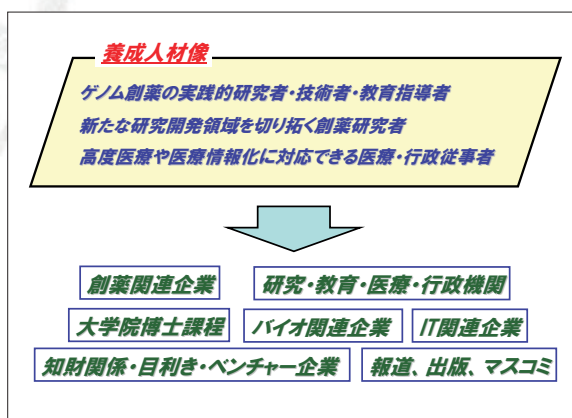
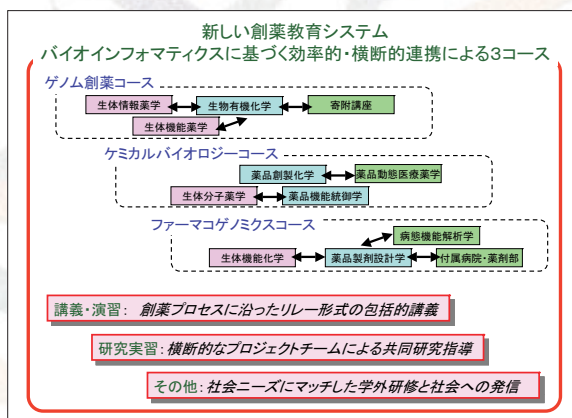
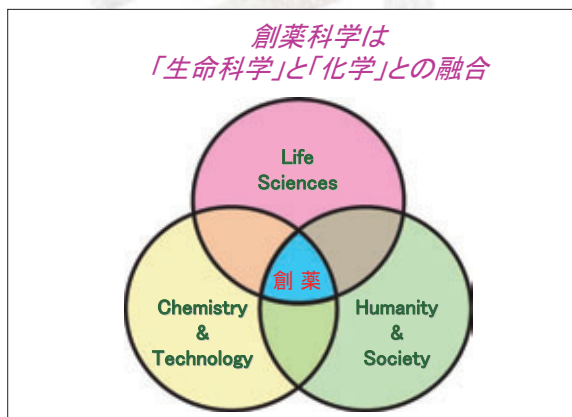
● 魅力ある大学院教育への取組・計画

近年、生命科学と化学の急速な進展に伴い、それらの融合領域である創薬科学にパラダイムシフトが生まれつつある。すなわち、バイオインフォマティクス、ケモインフォマティクス等の情報科学を基盤として、創薬標的の探索やシード化合物の最適化に活用するゲノム創薬に大きな期待が寄せられている。しかしながら、生命科学、化学、情報科学に精通した創薬研究者の養成に従来の大学院カリキュラムでは十分対応できていない現状である。また、実際の創薬は広範で高度に専門化した領域からなる融合学際領域であるため、従来のオーソドックスな創薬のための単一研究室のみで完結する専門教育体制では、社会ニーズにマッチする創薬研究者の養成が困難で、横断的教育システムの必要性が痛感されている。

当教育プログラムでは、これまで21世紀COEプログラムで推進してきた基礎バイオインフォマティクス教育を発展させてゲノム創薬を軸に高度化した大学院カリキュラムを創成するとともに、創薬研究プロセスに即して組織化した複数の研究室からなるプロジェクトチームを編成し、異なる専攻の教員が共同で大学院生の研究テーマを指導する横断的研究教育体制を確立、実践するための『ゲノム創薬コース』、『ケミカルバイオロジーコース』、『ファーマコゲノミクスコース』の3つの融合コースを創設する。これにより、社会の即戦力となるゲノム創薬の実践的研究者・技術者・教育指導者、情報科学との融合により新たな研究開発領域を切り拓く創薬研究者、さらにはテーラーメイド薬物治療などの高度医療や医療情報化に対応できる医療・行政従事者を育成し、大学、各種研究機関、創薬関連産業、行政機関、医療機関に輩出する。

● 資料：専攻の入学定員等

研究科・専攻名	課程区分	修業 年限 (年)	入学 定員 (人)	収容 定員 (人)
薬学研究科・創薬科学専攻	博士前期課程	2	24	48
	博士後期課程	3	11	33
薬学研究科・生命薬科学専攻	博士前期課程	2	25	50
	博士後期課程	3	11	33
薬学研究科・医療薬科学専攻	博士前期課程	2	16	32
	博士後期課程	3	7	21



薬学研究科 e-Learningシステム

- 薬学研究科一化学研究所間で遠隔講義システムが稼動中
 - 講義ビデオWeb配信
 - オンデマンド受講、WebCTとリンク
 - 現在、47講義を配信中
- ファーマコインフォマティクスの独自コンテンツ制作 (18年度計画)
 - WebCTの活用 (Webを通じた教育管理システム)
 - ユーザ管理 (教員と学生の登録・成績管理)
 - 科目管理 (設定・諸通知・教員・学生間議論・利用状況分析)
 - 課題管理 (作成・提出・採点・結果分析)
 - テスト実行 (作成・受験・採点・結果分析)
 - 概論、特論、実験技術演習をネット配信

プロテアソーム阻害物質の合成と評価

(薬品分子化学分野) 小林 祐輔

研究指導主任 薬品分子化学分野 教授 竹本 佳司

研究指導協力者 生体機能解析学分野 教授 金子 周司



研究内容

【研究の背景と目的】

ユビキチン-プロテアソームシステムは、選択的なタンパク質分解に重要な役割を果たしており、細胞周期、シグナル伝達、ストレス応答など多様な生命現象を制御するタンパク質を特異的に分解し、それらの生命現象を調節している。あらたなプロテアソーム阻害物質は、さらなる生体内現象やタンパク質の機能解明のツールとして期待でき、さらには選択的、特異的な阻害様式によっては癌、炎症、免疫疾患などの治療薬としての応用も期待できるため、多くの注目を集めている。実際に、昨年、アメリカFDAによりプロテアソーム阻害物質PS-341 (Velcade) が多発性骨髄腫の治療薬として認可されている。そこで、私は、近年単離された新規プロテアソーム阻害物質であるTMC-95AやSalinosporamide Aに注目し、これらの類縁体合成を可能にする合成経路の開拓と研究過程で見出される新規化合物の活性評価試験を2研究室の融合研究として行い、活性構造相関を調べると共に、高活性な新規小分子のデザイン合成を行うことを計画した。

【方法と期待される成果】

TMC-95Aは、これまでの共有結合形成によるプロテアソーム阻害物質と異なり、プロテアソームを阻害するのではなく、多点の水素結合により非共有結合的に複合体を形成することで阻害活性を示すことが明らかとなり、多くの注目を集めている。本化合物を合成する際には、官能基化された環状構造を立体選択的に合成するかが鍵となる。そこで、我々は、容易に合成可能なホルムアミドのホルミルC-H結合を中性条件下、遷移金属触媒により活性化し、シス選択的にアルキンに挿入させて、*E* 選択的に環状オレフィンを合成することを計画している。また、本反応（ヒドロアミド化反応）は官能基がまったく失われることがなく、有毒

な一酸化炭素を用いなくてもカルボニル基を導入できる非常に効率的な反応であるが、これまで分子間のアルケンとの反応に限られており、分子内反応に成功すれば初めての報告例となる。

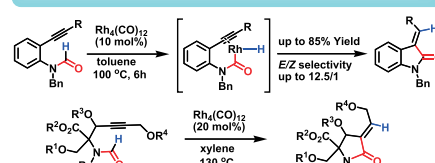
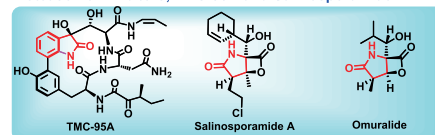
次に、本反応をSalinosporamide Aの中心骨格である多置換ラクタム環の合成に展開することを計画している。Salinosporamide Aは、深海の微生物Salinospora属の培養液から単離された [3, 2, 0] ビシクロβ-ラクトンγ-ラクタム構造をもつプロテアソーム阻害物質である。それ以前に発見された同じ骨格を持つOmuralideと置換基が異なるだけであるが、その35倍の阻害活性を示すため、そのプロテアソームに対する結合様式に興味をもたれており、プロテアソーム阻害機構の解明ため、様々な置換基を導入した類縁体を構築することを計画している。そこで、我々は、種々の天然アミノ酸から誘導した光学活性なアルキニルホルムアミドの分子内ヒドロアミド化反応を検討し、Salinosporamide Aの中心骨格の簡便合成法を確立する。

天然物の中には、特異な薬理作用を有し、難病治療薬開発への応用が期待できるものが多く存在する。しかし、多様な生理活性を併せもつ天然物においては、個々の活性の発現機構を明らかにしなければ実用化には程遠い。そのためには、まず目的の天然物を全合成し、類縁体合成を可能にする実用的な合成方法を確立する必要がある。本年度は、主に中心骨格の簡便合成法を確立することを計画しているが、今後は、合成研究を進展させて活性評価を行うための化合物ライブラリー構築を行う。本研究は、2研究室が融合し、プロテアソーム阻害物質の合成と活性評価を行う研究であり、活性効果を高めた新しい物質の創製だけでなく、生命現象の発現機構の解明への手助けとなると考えている。

プロテアソーム阻害物質の合成と評価

薬品分子化学分野
博士後期課程2年 小林祐輔

【目的】置換基によって活性の異なる化合物群の簡便合成法の開発を目指す
Protease Inhibitors; TMC-95A and Salinosporamide A



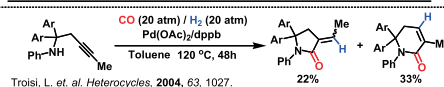
Survey of Reaction Conditions

Entry	Catalyst	Solvent	Temp.(°C)	Time (h)	Yield(%)
1	Ru ₃ (CO) ₁₂	MeCN	reflux	5	<4
2	Ru ₃ (CO) ₁₂ /PCy ₃	Toluene	reflux	5	trace
3	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	Toluene	reflux	5	0
4	Pd(PPh ₃) ₄	Toluene	reflux	5	0
5	Mo(CO) ₆	Xylene	130	10	0
6	Rh ₄ (CO) ₁₂	Xylene	130	24	44
7*	Rh ₄ (CO) ₁₂	Xylene	130	10	70

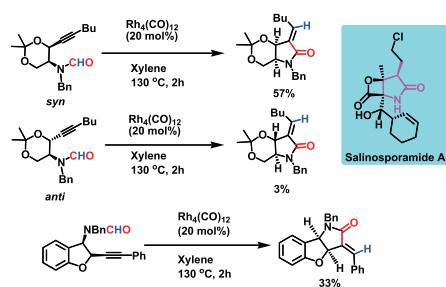
* 20 mol% of catalyst was used.

Application of various substrates

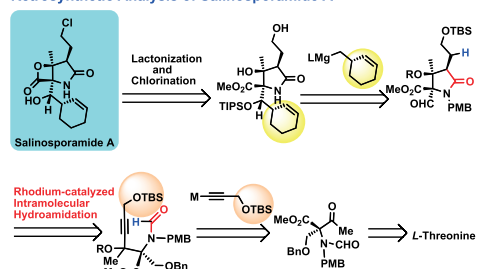
Entry	R ¹	R ²	Yield (%)
1	MeO	Ph	70
2	MeO	<i>n</i> -Bu	74
3	MeO	CH ₂ OBn	58
4	MeO	CH ₂ OTBS	50
5	H	<i>n</i> -Bu	56
6	H	Ph	72



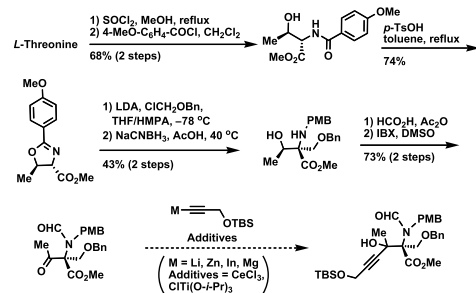
Application to Bi- and Tricyclic Compounds



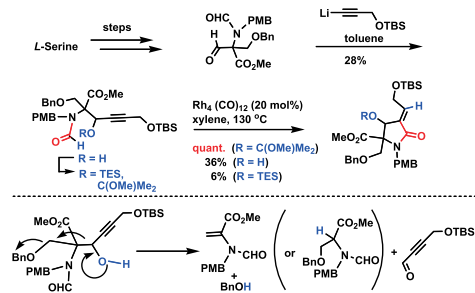
Retrosynthetic Analysis of Salinosporamide A



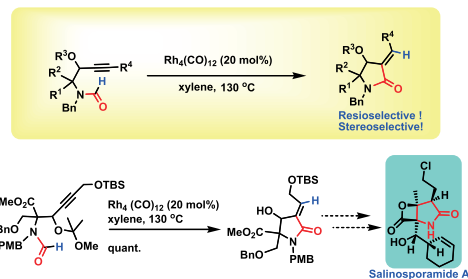
Synthetic Root for Salinosporamide A (From L-Threonine)



Synthetic Root for Salinosporamide A (From L-Serine)



Summary



【計画】今後、開発した本手法により、まずSalinosporamide Aの全合成を目指す

脳内出血治療薬開発を目指した トロンビン誘発遅延性神経細胞死原因タンパクの探索

(薬品作用解析学分野) 藤本 真二

研究指導主任 薬品作用解析学分野 教授 赤池 昭紀

研究指導協力者 病態機能分析学分野 教授 佐治 英郎



研究内容

脳内出血には未だ有効な治療法が確立されておらず、予後は悪く致死率も高い。脳内出血発作時には、脳実質中に漏出した血液由来成分が障害の惹起に寄与していることが報告されている。このうち、血液凝固因子としても知られているトロンビンは、中枢神経系に広く分布しているトロンビン受容体を介して神経細胞およびグリアに作用する。申請者は、生体脳に近い実験系で細胞構築が保持されている培養大脳皮質線条体切片を用いた検討により、トロンビンにより誘発される細胞障害はextracellular signal-regulated kinase (ERK) リン酸化阻害薬およびタンパク合成阻害薬により抑制されることを見いだした。このことから、トロンビン毒性にはERKを介した新規タンパク合成が必須であることが示唆された。

一方、ERKにより誘導される細胞内情報伝達経路は、トロンビンにより誘発される障害だけでなく、細胞の恒常性の維持にも重要な役割を果たしている。そ

れゆえ、トロンビン刺激によるERKリン酸化シグナルの下流において特異的に新規合成されるタンパクの特性を解明することは脳内出血に対する有効かつ安全な治療薬を開発する上で重要な情報となりうる。

この目的において、³H標識したアミノ酸を培養大脳皮質線条体切片に適用した後にトロンビン処置を負荷し、回収した切片を破碎することによって得られる抽出物から、新規合成され³H標識されたアミノ酸を組み込んだタンパクを探索し、その分子量および等電点を電気泳動により導出することには重要な意義がある。トロンビン無処置群との比較によりトロンビンにより合成が亢進するタンパクの物理化学的特性の一部が明らかになると考えられる。また、抽出物の分画操作により放射活性の高い画分を回収し、既知の化学物質との結合実験を行うことによりこのタンパクに対して阻害活性を有する化合物の創製に向けた有用な知見が得られると考えられる。

研究計画

脳内出血には未だ有効な治療法が確立されておらず、予後は悪く致死率も高い。脳内出血発作時には、脳実質中に漏出した血液由来成分が障害の惹起に寄与していることが報告されている。このうち、血液凝固因子としても知られているトロンビンは、中枢神経系に広く分布しているトロンビン受容体を介して神経細胞およびグリアに作用する。申請者は、生体脳に近い実験系で細胞構築が保持されている培養大脳皮質線条体切片を用いた検討により、トロンビンにより誘発される細胞障害はextracellular signal-regulated kinase (ERK) リン酸化阻害薬およびタンパク合成阻害薬により抑制されることを見いだした。このことから、トロンビン毒性にはERKを介した新規タンパク合成が必須であることが示唆された。

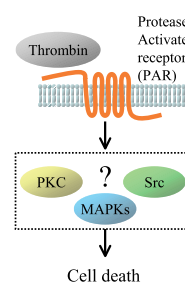
一方、ERKにより誘導される細胞内情報伝達経路は、トロンビンにより誘発される障害だけでなく、細胞の恒常性の維持にも重要な役割を果たしている。その目的において、³H標識したアミノ酸を培養大脳皮質線条体切片に適用した後にトロンビン処置を負荷し、回収した切片を破碎することによって得られる抽出物から、新規合成され³H標識されたアミノ酸を組み込んだタンパクを探索し、その分子量および等電点を電気泳動により導出することには重要な意義がある。トロンビン無処置群との比較によりトロンビンにより合成が亢進するタンパクの物理化学的特性の一部が明らかになると考えられる。また、抽出物の分画操作により放射活性の高い画分を回収し、既知の化学物質との結合実験を行うことによりこのタンパクに対して阻害活性を有する化合物の創製に向けた有用な知見が得られると考えられる。

研究指導者

薬品作用解析学分野 赤池 昭紀 教授
病態機能分析学分野 佐治 英郎 教授

序論

脳内出血発作時には、脳実質中に漏出した血液由来成分が障害の惹起に寄与していることが報告されている。このうち、血液凝固因子としても知られているトロンビン (thrombin) は、血液中に存在するプロトロンビンの切断により合成され、中枢神経系に広く分布しているprotease activated receptor (PAR) を介して神経細胞およびグリアに作用する。培養アストロサイトを用いたこれまでの報告から、トロンビンにより誘発される細胞死においてprotein kinase C (PKC)、チロシナーゼ、mitogen-activated protein kinases (MAPKs) が関与していることが示唆されている。また、ミカログリアにおいてトロンビンがMAPKsを介してNO合成酵素 (NOS) の発現を誘導し神経細胞を傷害する活性酸素種の生成に寄与していることが報告されているが、これらの詳細な機序は明らかになっていない。そこで本研究において、トロンビン誘発細胞障害の機序を解明することが脳内出血に対する治療法を確立する上で重要であると考え、細胞構築が保持されている培養大脳皮質線条体切片を用いた検討を行った。



実験方法

培養大脳皮質線条体切片の作製

3~4日齢のWistar系ラット新生仔の全脳を摘出し、厚さ300 μmの大脳皮質線条体切片を製作し、34°C、5%CO₂環境下、多孔培養皿上で静置平衡させた。培地の組成は、50% Minimum Essential Medium, 25% Hanks' Balanced Salt Solution, 25% 血清とされた。

薬物処置

培養9~11日目に培地を無血清培地に交換し、その24~48時間後にthrombin、薬物およびpropidium iodide (PI; 5 μg/ml) を含有した無血清培地で72時間培養した。一部の試験においてはthrombin曝露の24時間前から薬物を投与した。

細胞障害の評価

薬物処置開始後24、48、72時間後の大脳皮質内単位面積あたり(180 μm × 180 μm)のPIの蛍光強度を測定し、NMDA (100 μM) を72時間投与したときの蛍光強度を100%として、相対的な蛍光強度を算出し、評価した。一部の試験においては切片全体の画像を取得し、線条体の面積を測定した。

免疫組織化学

薬物処置3時間後あるいは72時間後に切片を4% paraformaldehyde で固定し、一次抗体としての細胞マーカーおよびphosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) に対する抗体を用い、蛍光標識した二次抗体を反応させた後、共焦点顕微鏡により観察した。一部の試験では二次抗体と同時に Hoechst33342 (0.1 mg/ml) を添加した。

Western Blotting

薬物処置した切片をlysis bufferにより回収した後、タンパク量を一定にしてSDS化した。SDS-PAGEによりタンパクを分離し、PVDF膜に転写した。各抗体と反応させた後、ECLによりタンパクを検出した。

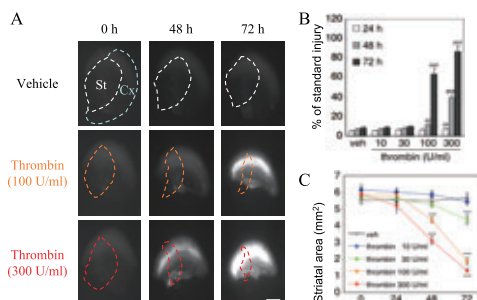


Fig. 1. Thrombin-induced cortical cell injury and striatal shrinkage. Scale bar, 1 mm. $^{*}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. vehicle (veh) at respective time points. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ vs. 0 h of respective treatment.

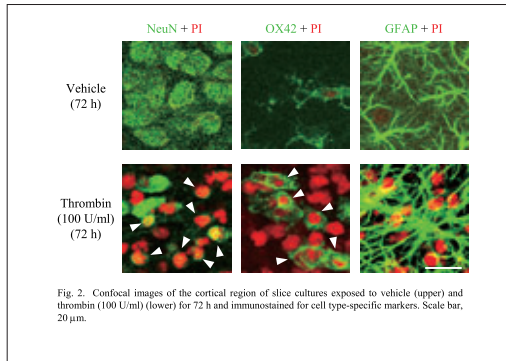


Fig. 2. Confocal images of the cortical region of slice cultures exposed to vehicle (upper) and thrombin (100 U/ml) (lower) for 72 h and immunostained for cell type-specific markers. Scale bar, 20 μm.

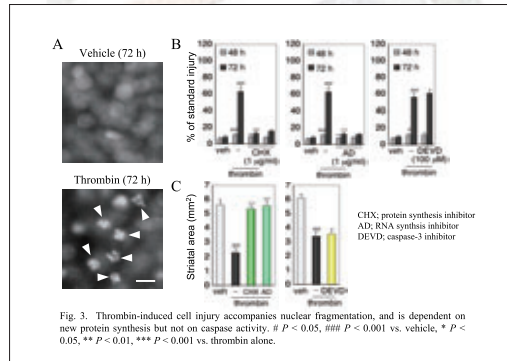


Fig. 3. Thrombin-induced cell injury accompanies nuclear fragmentation, and is dependent on new protein synthesis but not on caspase activity. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. thrombin alone.

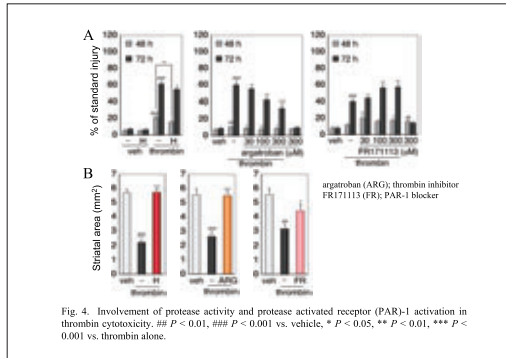


Fig. 4. Involvement of protease activity and protease activated receptor (PAR)-1 activation in thrombin cytotoxicity. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. thrombin alone.

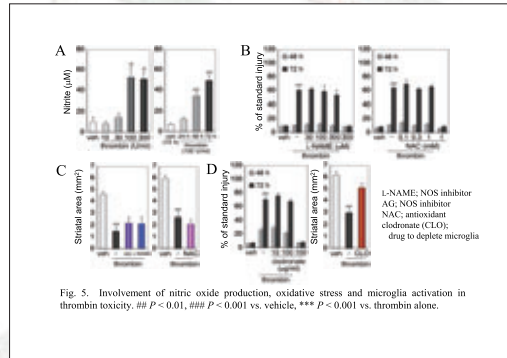


Fig. 5. Involvement of nitric oxide production, oxidative stress and microglia activation in thrombin toxicity. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle, *** $P < 0.001$ vs. thrombin alone.

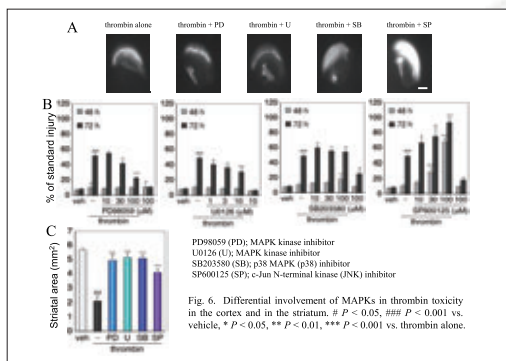


Fig. 6. Differential involvement of MAPKs in thrombin toxicity in the cortex and in the striatum. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. thrombin alone.

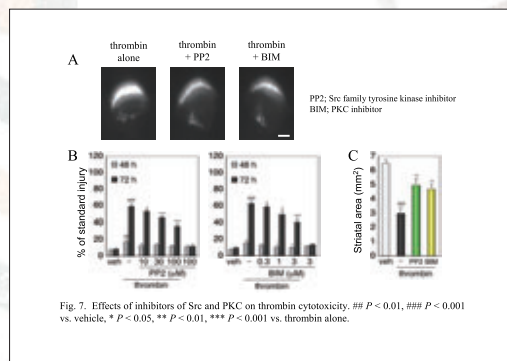


Fig. 7. Effects of inhibitors of Src and PKC on thrombin cytotoxicity. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. thrombin alone.

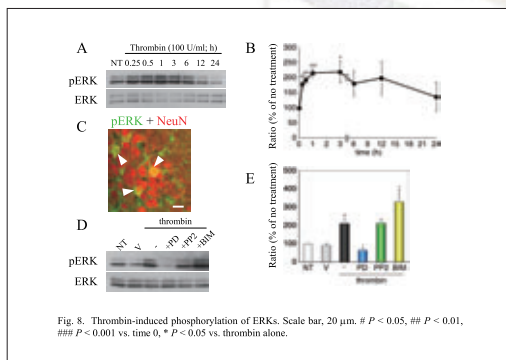


Fig. 8. Thrombin-induced phosphorylation of ERKs. Scale bar, 20 μm. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. time 0, * $P < 0.05$ vs. thrombin alone.

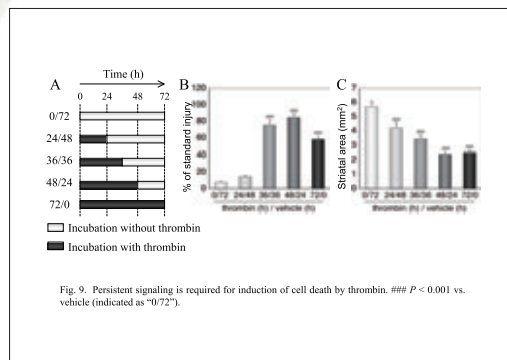


Fig. 9. Persistent signaling is required for induction of cell death by thrombin. ### $P < 0.001$ vs. vehicle (indicated as "0/72").

総括および今後の展望

大脳皮質における細胞障害	線条体の線条
<i>De novo</i> protein synthesis	+
Caspase-3	+
Protease activity	+
Protease activated receptor-1	+
Microglial activation	+
Nitric oxide (NO)	+
ERK	+
MAPKs	+
g38	+
JNK	+
Src family tyrosine kinase	+
Protein kinase C (PKC)	+

- ・ SrcおよびPKCの阻害はERKのリン酸化を抑制しなかった。
- ・ トロンピンにより誘発される障害にはERKのリン酸化のタイムコースよりも長い刺激が必要であった。

以上の結果から、トロンピンにより誘発される障害には、ERK、Src型チロシンキナーゼおよびPKCを介した新規タンパク合成が重要な役割を担っていることが示唆された。ERKのリン酸化はSrcファミリーチロシンキナーゼおよびPKCの活性化を介しておらず、プロテアーゼ活性に依存しない線条体を含む複数の経路により障害が誘発されることが考えられる。また、トロンピンは線条体質および線条体において異なる形態の障害を惹起し、この障害は一部の薬物に対して異なる応答をしたことからトロンピンにより誘発される障害は脳の部位によって異なる機序を介していることが示唆された。今後、トロンピンにより誘発される障害の機序をさらに詳細に検討し、リン酸化ERKの下流のシグナルとして新規に合成されるタンパクを特定することともに、*in vivo*において脳内出血好発部位においてトロンピンを始めとするヤリシロプロテアーゼが脳組織に及ぼす影響を検討することは脳内出血治療薬を開発する上で重要であると考えられる。

新規分泌性因子Neudesinの神経栄養・分化因子としての役割の解明

(遺伝子薬学分野) 木村 郁夫

研究指導主任 遺伝子薬学分野 教授 伊藤 信行

研究指導協力者 薬品作用解析学分野 教授 赤池 昭紀



■ 研究内容

ヒトゲノム配列の解読の完了とともに、その後の展開として、各遺伝子の機能解析と、これらの遺伝子間、細胞間の相互作用ネットワークの解析へと展開することが期待される。その研究展開の過程で、新規分泌性因子遺伝子の発見と機能解析はバイオ医薬などの医薬品開発を通じて、医療の進歩に大きく貢献するものと期待される。申請者はヒト/マウスDNAデータベースより、分泌性シグナルを指標として新規分泌性因子遺伝子を探索した。申請者が同定した新規分泌性因子遺伝子の発見をマウスで調べたところ、この遺伝子は脳神経系において神経細胞に特異的に高発現していることが明らかになった。さらに、この遺伝子産物の組換えタンパク質を作成し、培養神経細胞を用いて、その生物活性を調べた。その結果、このタンパク質は培養神経細胞に対して強い神経栄養活性をもつことが明らかになった。従って、申請者はこの遺伝子をNeudesin (neuron-derived secreted neurotrophic factor) と命名した。さらに、申請者はNeudesinの神経栄養作用の分子メカニズムを解明するため、Neudesinの細胞内伝達系における役割を調べた。その結果、NeudesinはGi/o型GPCR阻害剤であるPTXにより、その神経栄養活性が顕著に抑制されること、さらに、NeudesinはMAPK, PI-3K経路を強く活性化するとともに、これらの経路を遮断するとNeudesinの活性が著しく阻害されることが明らかになった。従って、NeudesinはGi/o型GPCRを介して、MAPK, PI-3K経路を活性化し、その神経栄養作用を示すことが明らかになった。これまでのNeudesinの神経栄養活性の測定は血清非

存在下における培養神経細胞の細胞死の抑制を指標にした。今後は、様々な神経毒存在下におけるNeudesinの神経細胞保護作用を検討するとともに、その作用メカニズムの解明を目指す。このような神経毒存在下におけるNeudesinの神経細胞保護作用に関する研究は、この分野で優れた研究実績をもつ赤池昭紀教授(研究指導協力者)の指導と助言のもとで進める予定である。

一方、このNeudesinはマウスの神経分化開始時期である胎生13日の脳にも強く発現している。従って、Neudesinは神経栄養因子のみならず、神経分化促進因子として胎生初期の脳で作用していると期待される。従って、申請者はNeudesinの神経分化促進活性も調べる。胎生13日のマウス脳から単離した培養神経系前駆細胞は未分化な神経系細胞で、その後の分化刺激により神経細胞、グリア細胞へと分化していく。従って、申請者はこの培養神経系前駆細胞系を用いて、Neudesinの神経分化能を調べる。さらに、前述のNeudesinの神経栄養因子作用の分子メカニズムを調べた時と同様の手法を用いてNeudesinの神経分化作用の分子メカニズムも明らかにする。

申請者の研究によりNeudesinが神経細胞に対する生存維持活性のみならず、神経分化活性をもつことが明らかになれば、神経細胞死に由来する各種神経疾患の治療や、神経細胞再生など再生医療へのNeudesinの応用が期待される。さらに、Neudesinの神経栄養・分化活性の分子メカニズムが解明されれば、それらを標的とした新たな薬剤の創成にも手掛かりが得られるものと期待される。

新規分泌性因子Neudesinの 神経栄養・分化因子としての役割の解明

ゲノム創薬コース

遺伝子薬学分野

○木村 郁夫、三宅 歩、伊藤信行

研究計画

近年、ヒトゲノムの解読が完了したが、その後の展開として各遺伝子の機能を探索することへと移行し、さらには遺伝子間、細胞間の相互作用ネットワークの解析へと展開することが期待される。その過程で新規有用遺伝子の発見はバイオ医薬や遺伝子治療、医薬品の面で非常に大きな影響を与えるものであると考えられる。そこでDNAデータベースより、分泌性シグナルを指標として、新規分泌性因子をコードすると予想され、機能不明なヒトおよびマウス遺伝子を見出し、後に神経系遺伝子として作用することがわかったためにNeudesinと命名した。そしてこの遺伝子の産物における役割について検討した。

この新規分泌性因子Neudesinは胎児期から成体にかけて脳、脊髄等の中枢神経系において強く発現していた。また脳において神経細胞特異的に発現しており、神経細胞に対して生存維持活性を持つことを明らかにした。さらにこのNeudesinによる生存維持活性はMAPK, PI3K経路を介することによって発揮されることを明らかにした。

今回、このNeudesinが神経分化時期のmouse脳に強く発現していることおよび培養神経系前駆細胞においても発現していることから神経系前駆細胞における神経分化に対するNeudesinの役割について検討を行う。培養神経系前駆細胞を用いたNeudesin添加実験を行い、分化後の細胞運命を免疫染色により染め分けることで神経分化へのNeudesinの影響について検討を行う。また同時に神経分化に関与する種々の転写因子、細胞外成長因子等のNeudesin添加による発現変化をRT-PCRによって検討する。さらにその時の細胞内シグナル伝達をそれぞれの経路の阻害剤やリン酸化抗体を用いて検討する。これらの結果からNeudesinの作用する受容体についての予測をたてる。

以上を明らかにすることにより神経細胞に対する生存維持活性だけでなく神経分化、神経再生医療の観点からも創薬応用できる非常に有用な因子であることが期待できる。また受容体を予測することで創薬ターゲットとして現実的応用の可能性が期待できる。これらよりNeudesinの研究は神経分化、再生、脳・神経系疾患に対する予防・治療薬の開発応用に対し、有用な知見を提供するものと期待される。

Summary

Neudesin expressed in adult mouse brain encodes a secreted signal with neurotrophic activity in neurons (J Neurosci Res. 79:287, 2005). Most neurotrophic factors are involved in neural cell proliferation and/or differentiation. However, the role of Neudesin in neural development remains to be elucidated. Therefore, we examined the expression of Neudesin in mouse embryonic cerebral cortex and cultured mouse neural precursor cells and its roles in neural development. Neudesin was expressed in the embryonic cerebral cortex early in development. Its expression was mainly observed in the preplate where mostly post-mitotic neural cells existed. Neudesin mRNA was expressed in the neural precursor cells before the appearance of neurons. Therefore, roles of Neudesin in neural development were examined using the precursor cells. Neudesin significantly promoted neuronal differentiation and overrode the undifferentiated state of the neural precursor cells sustained by FGF2. In contrast, it inhibited the differentiation of astrocytes. In addition, Neudesin transiently promoted neural cell proliferation early in the developmental process. The effect on cell proliferation was distinct from that of FGF2, a self-renewal-promoting factor for neural precursor cells. The differentiation was mediated through activation of the protein kinase A (PKA) and phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) pathways. In contrast, the proliferation was mediated through the mitogen-activated protein kinase and PKA pathways. The expression profile and activity indicate that Neudesin plays unique roles in neural development. The present findings have revealed new potential roles of Neudesin in neural cell proliferation and neuronal differentiation.

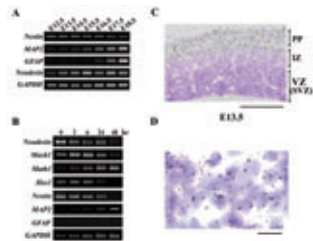
要旨

以前、我々が報告した新規神経栄養因子Neudesin (J Neurosci Res. 79:287, 2005)が神経系前駆細胞において一過性の増殖後、神経細胞への分化を促進する因子であることを明らかにした。

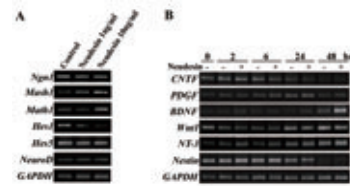
mouse Neudesinが神経分化期において大脳皮質に強く発現していることから培養神経系前駆細胞を用い、神経分化への影響についての検討を行った。その結果、Neudesinは神経系前駆細胞の増殖を一時的に促進させ、その増殖活性はPKA経路に依存するMAPK経路を介するものであることがわかった。さらにこの一過性の増殖後、神経細胞分化に関与する転写因子の上昇が確認され、PI3K, PKA経路を介してNeudesinが神経細胞分化を促進することがわかった。またこの際、PKA経路によりBDNFが誘導され、これは神経分化を促進する可能性も示唆された。さらにNeudesinのアストロサイトへの分化に対する影響を検討したところ、Neudesinはその分化を抑制することもわかった。

これらの結果より、Neudesinは選択的に神経細胞分化を促進する重要な因子であることが示唆された。

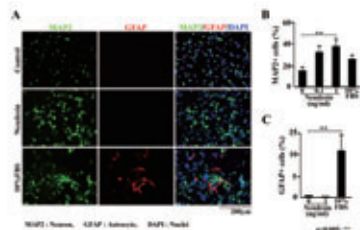
Expression of *Neudesin* in mouse embryonic cerebral cortex and Neural precursor cells.



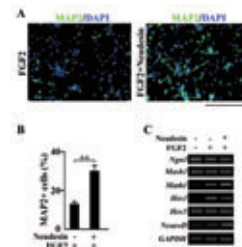
Neudesin induces neuronal differentiation related transcription factors and growth factors.



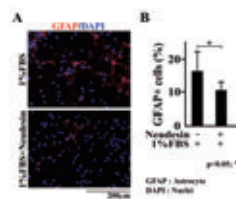
Effects of Neudesin on neuronal and astrocyte differentiation in mouse neural precursor cells.



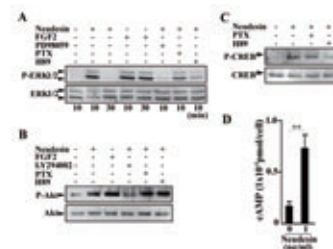
Effects of Neudesin on neuronal differentiation inhibited by FGF2 in mouse neural precursor cells.



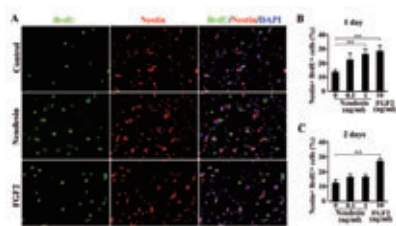
Effects of Neudesin on astrocyte differentiation induced by FBS in mouse neural precursor cells.



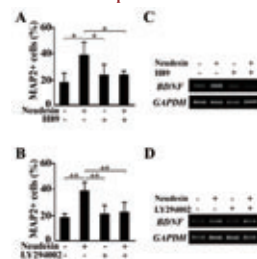
Effects of Neudesin on phosphorylation of ERK1/2, Akt and CREB in mouse neural precursor cells.



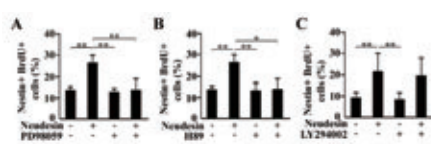
Effects of Neudesin on neural cell proliferation in mouse Neural precursor cells.



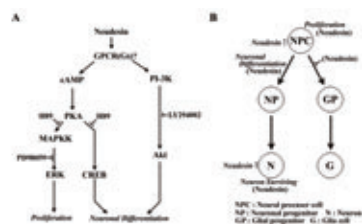
Effects of inhibitors for PI-3K and PKA pathways on neuronal Differentiation activity promoted by Neudesin in mouse neural precursor cells.



Effects of inhibitors for MAPK, PKA and PI-3K pathways on neural cell proliferation promoted by Neudesin in mouse neural precursor cells.



Putative Neudesin signal pathways and neural differentiation model.



光による機能分子イメージングのための プローブの開発研究

(病態機能分析学分野) 相田 一樹

研究指導主任 病態機能分析学分野 教授 佐治 英郎

研究指導協力者 薬品機能解析学分野 教授 松崎 勝巳



■ 研究内容

【研究背景・目的】

In vivoにおける代表的な機能分子イメージング法としては核医学断層撮像法 (positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT)) が挙げられる。PET, SPECTは、放射性標識化合物と生体機能分子との相互作用を非侵襲的にリアルタイムで測定できる点で大変優れているが、被曝の危険性や空間解像度が低い等の問題点を有している。一方、蛍光分析法は空間・時間解像度が著しく高く、安全で操作的にも簡便なものが多いため非常に有用であるが、汎用されている可視光領域の蛍光は生体透過性が悪いので、in vivoでの機能分子イメージングは不可能であった。そこで、生体透過性の高い近赤外領域に蛍光を有するランタニド錯体に着目し、近赤外光を用いたin vivoでの機能分子イメージングを可能とするプローブの開発を計画した。さらに、発光波長制御やスイッチングなどの技術と融合することで、生体内においてターゲット特異的に蛍光特性を変化させ、機能分子イメージングの際に問題となるバックグラウンドを極限まで低減することを目的とした。

【設 計】

本研究では、機能認識型近赤外蛍光プローブに必要な各種機能を有する分子部品をそれぞれ合成し、各部品を組み合わせることとした。すなわち、ランタニド錯体を基本構造とした発光部、発光部へエネルギーを供給するエネルギー供給部、ターゲットへ高選択的に作用しプローブの蛍光特性を変化させるターゲット認識部、を機能部品とする。具体的には、ランタニド錯体の配位子には生体内での安定性を考慮してDOTAを用いることとした。ランタニド錯体は配位子による蛍光波長の変動がほとんど無く、特有の長い蛍光寿命を利用した時間分解蛍光測定法を用いることにより、周囲の有機分子由来の蛍光によるバックグラウンドを無視できる等の利点を持ち合わせていることから発光部として最適である。さらに、エネルギー供給部としては、詳細に研究がなされているfluoresceinを採用して、fluoresceinよりランタニドへのエネルギー移動過程を経て近赤外領域の蛍光を発するプローブを開発することとした。ターゲット認識部は、fluoresceinからランタニドへのエネルギー移動を阻害するクエンチャー部と、ターゲット分子(酵素・タンパク等)により

切断・伸展などの構造変化を起こすリンカー部から構成し、ターゲット分子との相互作用によりクエンチャー部を発光中心から物理的に遠ざけることによりプローブの蛍光特性を変化させることとした。

【方 法】

本研究は、以下に述べる段階に分けて展開する。すなわち、1) fluoresceinとDOTAをアミド結合またはエステル結合を介して接続し、ランタニドイオンと作用させて発光中心部を合成する。得られた化合物は、NMR、元素分析等の手法により生成を確認する。さらに蛍光分光光度計を用いて、fluoresceinを励起することにより、ランタニド由来の近赤外領域の蛍光が検出されることを確かめる。また、種々のpHの水溶液、溶媒を用いて発光中心部の化学的安定性について検討する。2) 培養細胞を用いて、in vitroにおける発光中心部の生物学的安定性と蛍光特性について、蛍光分光光度計および蛍光顕微鏡により解析するとともに、細胞毒性や細胞内局在についても検討する。さらに、ラット・マウスを用いて、in vivoにおける安定性と体内動態についての検討を行う。これらの情報を統合してプローブの有効性について考察する。3) ターゲット認識部と発光中心部を接続して機能認識型近赤外蛍光プローブを合成する。得られたプローブはNMR等を用いて生成を確認した後、蛍光分光光度計を用いて通常状態での蛍光消光と、ターゲット分子との相互作用による蛍光再生を確認する。さらに、ターゲット分子発現細胞、モデル動物を用いて親和性、安定性、体内動態、蛍光特性の変化について検討を行い、本プローブの有効性を示す。

【期待される成果】

本プローブは、機能認識部を付け替えることで、種々の対象分子に応用可能であり汎用性が高い。また、核医学断層撮像法と比較して、①より安全である、②機能認識部とランタニド錯体の併用によりバックグラウンドを非常に効率的に低減させることができるので、高感度化が図れる、③蛍光分析法の最大の利点である高い時間・空間解像度が得られる、などのことから新規機能分子イメージング法としての利用が期待される。

コース名: ケミカルバイオロジー

**光による機能分子イメージングのための
プローブの開発研究**

研究指導者: 病態機能分析学分野 教授 佐治 英郎
薬品機能解析学分野 教授 松崎 勝巳

研究者: 病態機能分析学分野 D2 相田 一樹

Introduction

蛍光分析法

高い空間・時間分解能	簡便な操作
高い安全性	大掛かりな装置が不要

汎用性に優れ、最も有力な分析法の1つ
in vitroにおける対象成分の局在検出に利用

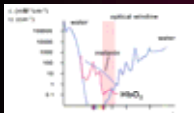
近年、スイッチング技術を用いて環境変化・生体機能を描出するような
蛍光プローブも盛んに報告されている

in vivoでも利用可能な蛍光プローブの開発

Introduction

解決手段 蛍光プローブをin vivo で用いるための要件と解決法

- 生体組織透過能の高い近赤外領域の蛍光
- 生体組織の吸収が少ない①近赤外領域の蛍光 (700 – 1000 nm)を用いる
- 自家蛍光によるbackgroundの低減
- ②長い蛍光寿命を利用した時間分解蛍光測定法を用いる
- 迷光によるbackgroundの低減
- ③大きなストークスシフトを持つ蛍光体を用いる
- 励起光による生体組織へのダメージの低減
- ④長波長領域の吸収を持つchromophoreを用いる



J. Kraljic, J. Moxon, 2001, 2000, 83 – 104.

上記の4つの解決法を全て満たすようなプローブの開発

Strategy

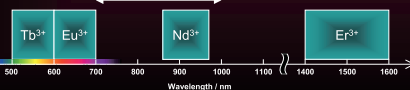
- ①近赤外領域の蛍光
- ②長い蛍光寿命
- ③大きなストークスシフト

ランタノイドイオン: La 及び4f 元素群に属する15 元素のイオン

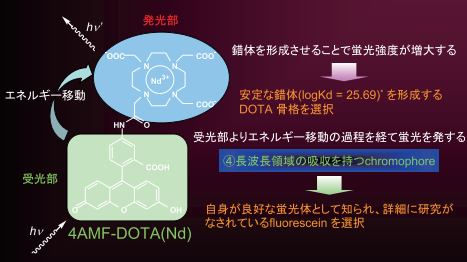
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

- 一般的にマイクロ秒～ミリ秒の蛍光寿命を持つ
- 数 nm のストークスシフトを持つ
- 周囲の環境による蛍光波長の变化がほとんどない
- シャープな蛍光スペクトルを示す

生体組織透過能の高い近赤外領域



Design of New Neodymium Complex



* Shu Ling Wu et al., J. Am. Soc. Dalton, Trans., 1997, 1497 – 1502.

Experiment

4AMF-DOTA(Nd)の合成

4AMF-DOTA(Nd)の蛍光特性に関する検討

4AMF-DOTA(Nd)の蛍光スペクトル

周囲環境が4AMF-DOTA(Nd)の蛍光に与える影響

- pH
- 溶媒

装置: Fluorolog-3 (Jobin Yvon Inc.)

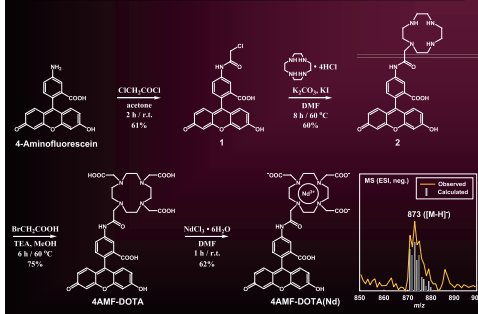
測定濃度: 10 μM

測定範囲: 800 – 1200 nm (emission) 励起波長: 488 nm

400 – 600 nm (excitation) 蛍光波長: 870 nm

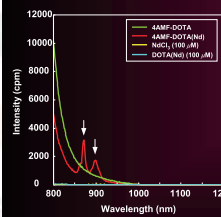
フィルター: 720 nm cut-off filter もしくは 500 nm cut-off filter

Synthesis of 4AMF-DOTA(Nd)

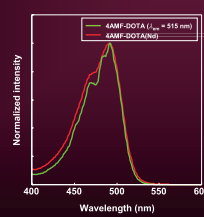


Spectral Features

Emission spectra

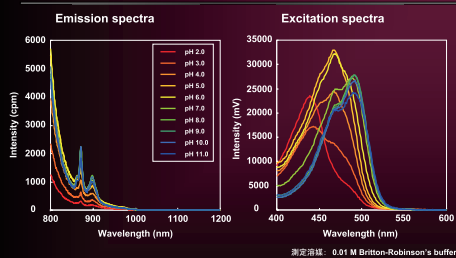


Excitation spectra



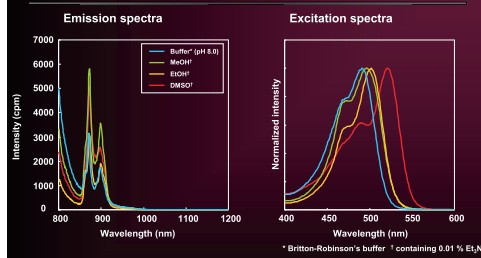
- 488 nm の光での励起により、870, 900 nm 付近に蛍光が観測された
- 4AMF-DOTA(Nd) はfluorescein 部の励起によりNd より蛍光を発する

pH Effect to 4AMF-DOTA(Nd)



- 4AMF-DOTA(Nd)の蛍光特性はpHによって変動した
- 4AMF-DOTA(Nd)の蛍光はfluorescein部の蛍光特性と運動している

Solvent Effect to 4AMF-DOTA(Nd)



- 励起スペクトルのピークは溶媒により変動するが、蛍光スペクトルのピークは変動しない
- 蛍光波長が環境に依存しないというランタノイドイオンの特徴を有する

Summary

近赤外領域に蛍光を有する新規ネオジム錯体 4AMF-DOTA(Nd)を設計し、4-amino-fluorescein から4段階で合成した

4AMF-DOTA(Nd)は可視光領域である488 nmの光で励起することにより、Ndへのエネルギー移動の過程を経て、近赤外領域である870, 900 nm付近にピークを持つ蛍光を有した

4AMF-DOTA(Nd)の蛍光は受光部であるfluoresceinの蛍光と類似のpH応答を示した

4AMF-DOTA(Nd)は数種類の有機溶媒中でも蛍光特性を失わず、蛍光波長は変化しないことが示された

これらにより、4AMF-DOTA(Nd)が、fluorescein部の励起によりNdへエネルギーを移動して、Nd自身の蛍光を発することが示された。また、4AMF-DOTA(Nd)がin vivoで応用しうる蛍光プローブとして、①近赤外領域の蛍光、③大きなストークスシフト、④長波長領域に吸収を持つchromophoreの要件を満たすことを確認した。今後、蛍光寿命測定を行い、②長い蛍光寿命について要件を満たすことを確認する。

Conclusion

4AMF-DOTA(Nd)がin vivo イメージングに応用しうる近赤外蛍光プローブとしての性質を有することが示された

機能性ペプチドの利用による 新規癌免疫療法の開発

(病態情報薬学分野) 竹本 誠二

研究指導主任 病態情報薬学分野 教授 高倉 喜信

研究指導協力者 薬品機能解析学分野 教授 松崎 勝巳



研究内容

ヒトゲノムの解読が終了し、ターゲットとなる生体機能分子の構造に基づく医薬品開発が進められ、標的分子と特異的に相互作用する新規化合物の探索が行われている。これに加えて、疾患と関連するタンパク質や遺伝子などの生体高分子を直接患者に投与することによる疾患治療の可能性が飛躍的に高まってきた。しかしながら、これらの高分子化合物は細胞膜透過性が低いため、細胞内への移行が大幅に制限される。一方、ウイルス由来のペプチドが細胞膜に結合後細胞質内へ移行することが発見され、膜透過ペプチド (cell-penetrating peptide; CPP) と総称されるようになった。CPPをタンパク質やリポソームに結合することで、これら『積荷』を細胞内へデリバリー可能であることが報告されたことから、CPPを利用した高分子医薬の経細胞膜輸送による疾患治療の可能性が考えられる。また単純ヘルペスの構造タンパク質VP22に代表される一部のCPPでは、細胞内から外への移行活性を持つことが示されており、これを利用した細胞内タンパク質・ペプチドの細胞外輸送が期待される。

熱などの刺激により発現が亢進するタンパク質群の一つであるheat shock protein 70 (Hsp70) は、細胞内タンパク質の高次構造の形成や輸送、分解等を介助する分子シャペロンとして機能する。その一方で、Hsp70は抗原ペプチドと結合すること、hsp receptorを介してマクロファージや樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞 (APC) に取り込まれること、さらにはAPCを活性化

としての利用が期待される。そこで私は、Hsp70を骨格とする新規腫瘍ワクチンの開発を目的にマウスにおけるHsp70の体内動態について検討し、静脈内投与後主として肝臓に取り込まれること、その取り込みにはおもに肝細胞に発現するCD91の関与が大きいことを明らかにした。一方、皮下投与時には所属リンパ節への高い移行が明らかとなり、Hsp70を利用するワクチン療法において効率的な免疫応答を期待する場合には皮下投与が有効な投与経路になりうる可能性を示した。

Hsp70を利用した腫瘍ワクチンの開発には、同定された抗原ペプチドのデリバリーシステムとしての利用が考えられ、抗原ペプチド融合Hsp70あるいはその発現プラスミドDNAを用いて現在その有効性の評価を進めている。一方、癌細胞内に存在する抗原ペプチドを細胞外に『引き出す』ことができれば、抗原の同定が不要になり、多くの癌種への適用が可能になるものと考えられる。こうした背景のもと本研究では、Hsp70にVP22あるいはそのCPP部分を結合した融合タンパク質を設計し、これを発現するプラスミドDNAを腫瘍に直接投与することで、腫瘍内でのHsp融合タンパク質の発現と、それに引き続く抗原-Hsp融合タンパク質複合体の癌細胞外輸送による癌免疫治療の可能性について検討する。VP22ペプチドを用いた検討において本アプローチの有効性を証明したのちに、Hsp70融合タンパク質の効率的な細胞膜透過を実現するペプチドデザインを行い、癌免疫治療効果の増大を試みる。

ファーマコゲノミクス

機能性ペプチドの利用による 新規癌免疫療法の開発

○竹本 誠二, 大槻 貴幸, 西川 元也, 高倉 喜信

病態情報薬学分野

【序論】

Heat Shock Protein 70 (Hsp70) は、腫瘍抗原ペプチドと結合性を有することに加え、Hspレセプターを介して抗原提示細胞 (APC) に効率よく取り込まれること、さらには細胞性免疫を賦活化することから、強力な抗原キャリア分子として注目されている (Fig. 1)。^{1), 2)}

一般的な癌免疫療法では、体外から癌抗原ペプチドが投与されるが、癌細胞内にはさまざまな癌抗原が存在することから、これらを利用することで抗腫瘍免疫が誘導可能であると考えられる。そのためには、癌細胞内の抗原を積極的に癌細胞外へ輸送し、APCにデリバリーすることが必要である。

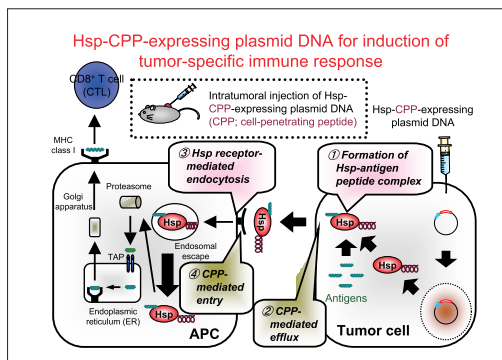
通常、高分子の膜透過は大きく制限されるが、単純ヘルペスウイルス由来のVP22タンパク質など細胞膜透過性を示すペプチド・タンパク質の存在が報告されており、その利用によるHsp70-抗原ペプチド複合体の癌細胞外デリバリーの可能性が考えられる。^{3), 4)}

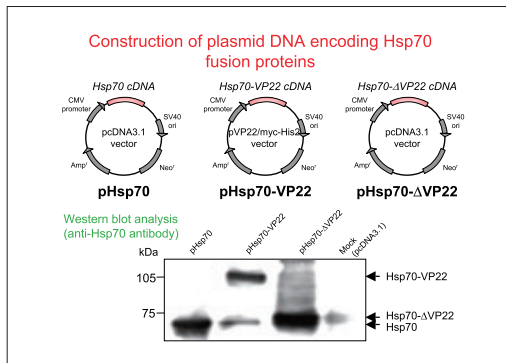
そこで本研究では、細胞膜透過能を有するペプチド・タンパク質の機能を利用し、癌細胞内に導入・発現させたHsp70の癌細胞外輸送及びAPCデリバリーの可能性について検討した。

【研究提案書】

ヒトゲノムの解読が終了し、ターゲットとなる生体機能分子の構造に基づく医薬品開発が進められ、標的分子と特異的に相互作用する新規化合物の探索が行われている。これに加えて、疾患と関連するタンパク質や遺伝子などの生体高分子を直接患者に投与することによる疾患治療の可能性が飛躍的に高まってきた。しかしながら、これらの高分子化合物は細胞膜透過性が低いため、細胞内への移行が大幅に制限される。一方、ウイルス由来のペプチドが細胞膜に結合後細胞質内へ移行することが発見され、膜透過ペプチド (cell-penetrating peptide; CPP) と総称されるようになった。CPPをタンパク質やリポソームに結合することで、これら『積荷』を細胞内へデリバリー可能であることが報告されたことから、CPPを利用した高分子医薬の経細胞膜輸送による疾患治療の可能性が考えられる。また単純ヘルペスの構造タンパク質VP22に代表される一部のCPPでは、細胞内から外への移行活性を持つことが示されており、これを利用した細胞内タンパク質・ペプチドの細胞外輸送が期待される。

Hsp70を利用した腫瘍ワクチンの開発には、同定された抗原ペプチドのデリバリーシステムとしての利用が考えられ、抗原ペプチド融合Hsp70あるいはその発現プラスミドDNAを用いて現在その有効性の評価を進めている。一方、癌細胞内に存在する抗原ペプチドを細胞外に『引き出す』ことができれば、抗原の同定が不要になり、多くの癌種への適用が可能になるものと考えられる。こうした背景のもと本研究では、Hsp70にVP22あるいはそのCPP部分を結合した融合タンパク質を設計し、これを発現するプラスミドDNAを腫瘍に直接投与することで、腫瘍内でのHsp融合タンパク質の発現と、それに引き続く抗原-Hsp融合タンパク質複合体の癌細胞外輸送による癌免疫治療の可能性について検討する。VP22ペプチドを用いた検討において本アプローチの有効性を証明したのちに、Hsp70融合タンパク質の効率的な細胞膜透過を実現するペプチドデザインを行い、癌免疫治療効果の増大を試みる。





Confocal microscopic images of transiently expressed Hsp70 fusion proteins in B16-F10 melanoma cells

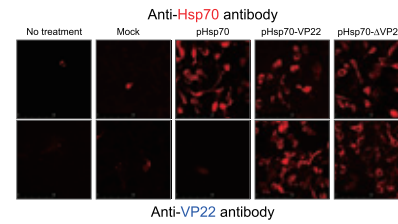
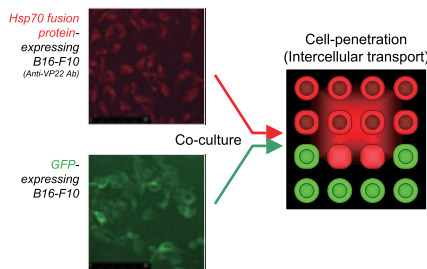


Fig. 1 Intracellular localization of Hsp70 fusion proteins in B16-F10. B16-F10 cells cultured on coverslips were transfected with each pDNA, fixed, then permeabilized and stained with anti-Hsp70 antibody (top) or anti-VP22 antibody (bottom), followed by detection with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG. All images are of the same magnification.

Validation of cell-penetration of Hsp70 fusion proteins using stable clones of B16-F10 cells



Confocal microscopic images of Hsp70 fusion protein- and GFP-expressing B16-F10 cells

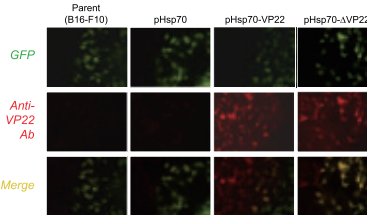


Fig. 2 Extracellular spreading of Hsp70 fusion proteins in B16-F10. B16-F10 cells were transfected with pHsp70, pHsp70-VP22 or pHsp70-ΔVP22, washed, co-cultured with GFP-B16-F10 cells and imaged by immunofluorescence microscopy for VP22 and GFP signals. Merged image of a GFP-B16-F10 cell that has acquired Hsp70-ΔVP22 is shown in yellow.

CTL generation by immunization with Hsp70 fusion protein-expressing plasmid DNA into E.G7 tumor

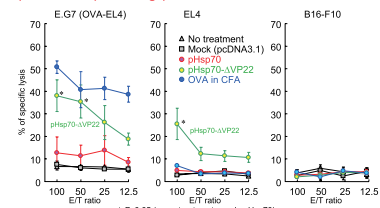


Fig. 3 Tumor growth inhibitory effects by administration of plasmids. E.G7 was intradermally inoculated in C57BL/6 mice. When tumor volumes reached >40 mm³, pHsp70, pHsp70-ΔVP22, mock (100 μg/mouse) or OVA in CFA by intratumoral injection by electroporation once a day for 4 days. Spleen cells were isolated and standard ⁵¹Cr release assay was performed. E.G7, EL4 and B16-F10 were used as target cells.

Production of anti-OVA IgG in serum of mice receiving Hsp70 fusion protein-expressing plasmid DNA

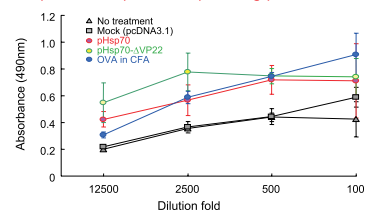


Fig. 4 E.G7 tumor cells were intradermally inoculated in C57BL/6 mice. When tumor volumes reached >40 mm³, pHsp70, pHsp70-ΔVP22, (100 μg/mouse) or mock by intratumoral injection by electroporation once a day for 4 days. 4 days after the last administration, the serum from the mice was collected. Anti-OVA IgG was measured by ELISA. The results are expressed as the mean ± S.D.

Growth of E.G7 tumor after intratumoral injection of plasmid DNA in mice

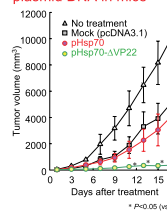
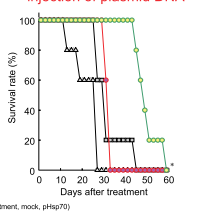


Fig. 5 Tumor growth inhibitory effects by administration of plasmids. E.G7 was intradermally inoculated in C57BL/6 mice. When tumor volumes reached >40 mm³, pHsp70, pHsp70-ΔVP22 (100 μg/mouse) or mock by intratumoral injection by electroporation once a day for 5 days. Tumor sizes and prolongation of survival time were measured every 2 days.

Survival rate of E.G7 tumor-bearing mice after intratumoral injection of plasmid DNA



Results and Discussion

Hsp70-ΔVP22の細胞外輸送: B16-F10細胞で発現したHsp70は、細胞質にほぼ均一に分布したが、Hsp70-ΔVP22は細胞膜近傍への局在が観察された (Fig.1)。また、Hsp70-ΔVP22発現B16-F10細胞をGFP発現B16-F10細胞と共培養したところ、GFP陽性細胞においてもHsp70-ΔVP22が検出されたことから、VP22由来ペプチドを融合することにより癌細胞で発現させたHsp70を細胞外に輸送可能であることが示された (Fig.2)。

Hsp70-ΔVP22発現プラスミドDNAの腫瘍内投与による免疫応答の評価: pHsp70-ΔVP22投与群では、E.G7に対する高いCTL誘導活性ならびに抗体産生が認められた (Fig.3, 4)。また、免疫応答の誘導に対応して、pHsp70-ΔVP22投与群では腫瘍増殖の抑制ならびに生存日数の延長も認められた (Fig.5)。以上の結果から、細胞膜透過ペプチドを融合させたHsp70発現プラスミドDNAの腫瘍内投与により、癌細胞内の癌抗原ペプチドが細胞外へ輸送され、抗腫瘍免疫が誘導されることが推察された。

また、EL4に対してもCTL活性が認められたことから、抗原性の強いOVAペプチドだけでなく、EL4とE.G7に共通する別の癌抗原も癌細胞外に輸送されることが示唆された。

Conclusions

- VP22由来膜透過ペプチドを融合したHsp70を発現するプラスミドDNAを癌細胞に導入することで、癌細胞内で発現したHsp70融合タンパク質の癌細胞外デリバリーに成功した。
- 膜透過型Hsp70の腫瘍内遺伝子導入により、抗腫瘍免疫を誘導できることが示された。このことから、*in vivo*においても膜透過ペプチドによって癌細胞内の抗原ペプチドを細胞外に輸送し、免疫応答を誘導できることが示唆された。

抗菌性ペプチドの作用標的の制御と細胞内分子導入ベクターへの応用

(薬品機能解析学分野) 井村 雄一

研究指導主任 薬品機能解析学分野 教授 松崎 勝巳

研究指導協力者 病態情報薬学分野 教授 高倉 喜信



■ 研究内容

【背景】

抗菌性ペプチドは10-50残基からなるペプチドで、ヒトを含む様々な生物から単離されている。そのアミノ酸配列や二次構造は多様性に富むが、抗菌性ペプチドの多くは塩基性と疎水性のクラスターを併せ持つ両親媒性で、酸性脂質に富んだ細菌細胞膜に直接的に作用する。細菌細胞膜はATP産生場で、その性質を変化させることは容易でなく、細胞膜を標的とするこの作用機構は耐性菌の出現を抑えられると考えられる。近年、多剤耐性菌の出現や再興感染症が問題となり、新規の抗菌剤の開発が急務となっている中、抗菌性ペプチドは理想的な候補として期待されている。多くのペプチドは標的膜のバリアー能を破壊して細菌の細胞膜電位を消失させることで抗菌作用を発揮するが、一部のペプチドは膜と相互作用するものの、膜を乱さずに細胞内に入り、DNAなどの細胞内標的と結合することでDNAやタンパク質の合成を阻害するものもある。このようなペプチドは細胞内へ薬剤などの分子を導入するベクターとしての応用も期待できる。このような異なる作用機構とアミノ酸配列・二次構造の違いの相関は、熱心な構造-活性相関の研究にも関わらず、明らかになっていない。

これまでに当研究室はアフリカツメガエルより単離された抗菌性ペプチドmagainin 2 (GIGKWLHSAKKF-GKAFVGEIMNS) やアジアヒキガエル由来のbuforin 2 (TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK) の作用機構を、リポソームを用いて明らかにしてきた。Magainin 2は脂質膜に脂質を抱き込んだ一時的な超分子複合体ポアを形成し、ポア崩壊時に一部ペプチドが内在化 (translocation) する。ポアを通した内容物の流出が抗菌作用の要因であると考えられている。対照的に、buforin 2は膜を乱さずに効率よく細胞内に入り、DNAと結合することで抗菌活性を発揮していると考えられている。

【目的】

本研究では抗菌性ペプチドを元に化学修飾体やアミノ酸置換体を作成し、作用標的を制御して、新規抗菌剤や細胞内分子導入ベクターとして応用することを目的とする。本研究室は主に物理化学的な手法を用いて作用機構を解明してきたが、特に細胞内分子導入ベクターとして応用する際には、ドラッグデリバリーに基づく視点や手法が必要になるため、融合研究として行うことでより興味深い結果が得られると考えられる。

【方法】

本研究では以下のように、①アミノ酸置換による抗菌性ペプチドの作用標的の制御、②抗菌性ペプチドを用いた細胞内導入ベクターの開発を行う。

- ① これまでに、両親媒性 α ヘリックスのモデルペプチドの疎水面に α ヘリックスを不安定化するペプチドを導入すると、標的が膜からDNAに変化すると報告されている。ペプチドは細胞毒性に関して不明であるという点と、大量合成が難しいので、我々はmagainin 2の疎水面に α ヘリックスを不安定化するプロリン残基を導入し、作用標的が膜からDNAへ変化するかどうかをモデル膜及び細胞を用いて検証する。我々は逆にbuforin 2のプロリン残基をアラニン残基に置換することで、標的がDNAから膜に変化することを示した [Kobayashi, Set al. (2000) *Biochemistry*, 39, 8648]。本研究により、 α ヘリックスの不安定化が、抗菌性ペプチドの作用標的の選択性に与える影響が一般的なものであるかどうか明らかとなる。さらに、プロリン置換体が効率よく膜透過するのであれば、膜を乱さないで細胞毒性を軽減できより良い細胞導入ベクターの開発が可能となる。また、膜作用型とDNA型を混合して用いることで相乗効果が得られるかどうかを検討する。
- ② 上で検討して得られた知見を元にベクターの配列をデザインし、ペプチド核酸などのカーゴ分子と結合して細胞内へ導入されるかどうか共焦点レーザー顕微鏡を用いて実験を行う。また、ベクターにオルガネラ局在シグナルを付加することによって、細胞内局在を自在に制御できるかどうかを検討する。

【成果】

抗菌性ペプチドの作用標的の制御を研究することは、耐性が生じにくい理想的な抗菌剤の開発へつながる可能性を秘めている。また、細胞内導入ベクターに関しては、TATなどのアルギニンリッチペプチドが用いられているが、これらのペプチドは主としてエンドサイトーシス経路で細胞内に入るため、細胞質内への導入効率はあまり良くない。一方抗菌性ペプチドは細胞膜を直接経路して膜透過するのでより直接的で効率よく導入を行うことが出来ると考えられる。また、オルガネラ局在性をコントロールできれば、遺伝子治療などにおいて画期的な成果を上げることが出来ると考えられる。

コース名 ケミカルバイオロジー

抗菌性ペプチドの作用標的の制御と細胞内分子導入ベクターへの応用

京都市大学大学院薬学研究科 薬品機能解析学分野 井村 雄一

研究指導者 京都市大学大学院薬学研究科 薬品機能解析学分野
教授 松崎 睦巳
京都市大学大学院薬学研究科 病態情報薬学分野
教授 高倉 喜信

【背景①】

抗菌性ペプチド(antimicrobial peptide)とは[1,2]

- ヒトを含む様々な生物に存在 (880種類以上)
- 10-50残基程度
- 塩基性と疎水性のクラスターを併せ持つ両親媒性構造
- 多くは酸性脂質に富んだ細菌細胞膜に直接的に作用し、細菌の細胞膜電位を消失させることで抗菌作用を発揮

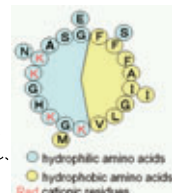
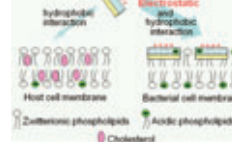
Fig.1 amphiphilic α helical structure of magainin 2

Fig.2 membrane selectivity of antimicrobial peptides

[1] Zasloff, M. (2002) *Nature*, 415, 389-395.[2] Brogden, KA. (2005) *Nat Rev Microbiol*, 3, 238-250.

【背景②】

抗菌性ペプチドの応用

- 膜に直接作用する作用機構。耐性菌の出現を低減、耐性菌に作用する可能性。
- 一部のペプチドは膜を乱さずに効率よく細胞内に内在化。

新規抗菌剤の候補

細胞内分子導入ベクター

このような異なる作用機構とアミノ酸配列・二次構造の違いの相関は明らかとなっていない。

magainin 2 (GIGKWLHSAKFGKAFVGEIMNS) アフリカツメガエル

Magainin 2は脂質膜に脂質を抱き込んだ一時的な超分子複合体ポアを形成し、ポア崩壊時に一部ペプチドが内在化(translocation)する。ポアを通じた内容物の流出が抗菌作用の要因であると考えられている。

Fig.3 toroidal pore model [3]

buforin 2 (TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK) アジアヒキガエル

Buforin 2は膜を乱さずに効率よく細胞内に入り、DNAと結合することで抗菌活性を発揮していると考えられている。

[3] Matsuzaki, K. (1998) *Biochim Biophys Acta*, 1376, 391-400.

【目的・方法】

抗菌性ペプチドの化学修飾体やアミノ酸置換体を作成し、作用標的を制御して、新規抗菌剤や細胞内分子導入ベクターとして応用する。

- ①アミノ酸置換による抗菌性ペプチドの作用標的の制御

両親媒性 α ヘリックスのモデルペプチドの疎水面に α ヘリックスを不安定化するペプチド残基を導入すると、標的が膜からDNAに変化した。[4] α ヘリックスの不安定化が、抗菌性ペプチドの作用標的の選択性に与える影響が一般的なものであるかどうかをモデル膜を用いた実験、DNA結合実験により調べ、標的の制御を行う。

- ②抗菌性ペプチドを用いた細胞内導入ベクターの開発

上で得られた知見を元にベクターの配列をデザインし、ペプチド核酸などのカーゴ分子と結合して細胞内へ導入されるかどうか共焦点レーザー顕微鏡を用いて実験を行う。また、ベクターにオルガネラ局在シグナルを付加することによって、細胞内局在を自在に制御できるかどうかを検討する。

[4] Song, YM et al. (2005) *Biochemistry*, 44, 12094-12106.

【アミノ酸置換による抗菌性ペプチドの作用標的の制御①】

buforin 2のブロン残基をアラニン残基に置換することで、標的がDNAから膜に変化。[5]
 α ヘリックスの不安定化が、抗菌性ペプチドの作用標的の選択性に与える影響が一般的なものであるかどうかをmagainin 2の疎水面にブロン残基を導入することで検証する。

A9P, F5W magainin 2 (A9P MG)を固相合成法により作成

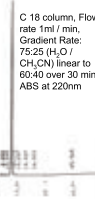
Fig.4 amphiphilic α -helical structure of A9P MG

Fig.5 HPLC chart

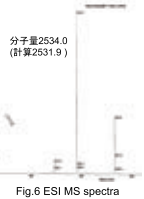


Fig.6 ESI MS spectra

[5] Kobayashi, S et al. (2005) *Biochemistry*, 39, 8648-8654.

【アミノ酸置換による抗菌性ペプチドの作用標的の制御②】

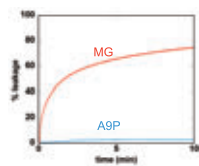


Fig. 7: Membrane permeabilization activity as estimated by the leakage of the fluorescent dye calcein entrapped within LUVs

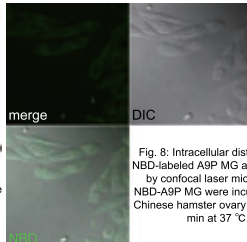


Fig. 8: Intracellular distribution of NBD-labeled A9P MG as examined by confocal laser microscopy. NBD-A9P MG were incubated with Chinese hamster ovary cells for 15 min at 37 °C.

今後

作用標的が膜からDNAへ変化するかどうか-DNA結合実験

モデル膜を用いたtranslocation実験

膜作用型とDNA型を混合して用いることでの相乗効果の検討。

【抗菌性ペプチドを用いた細胞内導入ベクターの開発】

Magainin 2をモデルに作成したPEG修飾ペプチドがモデル膜において、translocation能力を持つ

大きなカーゴ分子を細胞内に運ぶベクターとしての可能性

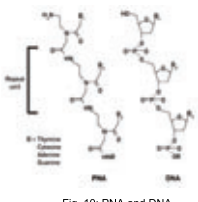
今後

ベクターの配列をデザインし、ペプチド核酸(PNA)などのカーゴ分子と結合して細胞内へ導入されるかどうか共焦点レーザー顕微鏡を用いて実験を行う。

ブロン置換体が膜を乱さずに効率よく細胞内に内在化するのであれば、毒性の少なく、効率の良い細胞導入ベクターが出来ると考えられる。



Fig. 9: Amino acid sequence of PEG-E19Q-MG (M.W. of PEG moiety is 5 kDa on average)

Fig. 10: PNA and DNA taken from <http://complex.upf.es/>

【成果】

- 抗菌性ペプチドの作用標的の制御を研究することは、耐性が生じにくい理想的な抗菌剤の開発へつながる可能性を秘めている。

- 細胞内導入ベクターに関しては、TATなどのアルギニンリッチペプチドが用いられているが、これらのペプチドは主としてエンドサイトーシス経路で細胞内に入るため、細胞質内への導入効率はあまり良くない。一方、抗菌性ペプチドは細胞膜を直接経路で膜透過するのでより直接的で効率よく導入を行うことが出来ると考えられる。

- オルガネラ局在性をコントロールできれば、遺伝子治療などにおいて画期的な成果を上げることが出来ると考えられる。

アストロサイト形態を指標とした セリンプロテアーゼ受容体リガンド探索法の最適化

(生体機能解析学分野) 中尾 賢治

研究指導主任 生体機能解析学分野 教授 金子 周司

研究指導協力者 薬品有機製造学分野 教授 藤井 信孝



■ 研究内容

【研究の背景】

ヒト脳において神経細胞の数倍もの数が存在するアストロサイトは、様々な刺激に応じて形態を変化させることで、神経ネットワークの構築、神経細胞のシグナル伝達制御、細胞外液の恒常性維持など、中枢神経系において幅広い機能を担っていると考えられている。事実、アストロサイトの活性化を制御する低分子リガンドは中枢変性疾患治療薬として製薬メーカーの手で臨床開発が進められている。一方、トロンビンに代表されるセリンプロテアーゼは、特異的受容体PAR (Proteinase-activated receptors) において細胞外アミノ末端側のオリゴペプチドを切断し、そのペプチドが自己受容体リガンドとして結合することでPARを活性化させるユニークな情報伝達様式を有している。当研究室においては、トロンビンが惹起するアストロサイトの形態変化における細胞内 Ca^{2+} 動態の関与について研究を進めており、培養アストロサイトを用いた新しい機能評価系をこれまでに確立した (2006年神経科学学会等で発表予定)。

【目 的】

本研究の目的は、第一にケミカルバイオロジー的手法、すなわち細胞形態を指標とするアッセイによって新規PARリガンドを探索するための方法論を確立することにある。ついで最適化された手法に基づき、ペプチド合成と生理活性評価に長年の経験を有する藤井教授からアドバイスを受けつつ、実際にペプチドライブラリからアストロサイトの形態変化に影響を与えるリガンドを探索する。

【方 法】

トロンビンに対して高感受性に形態を変化させる培養アストロサイト1321N1細胞株を用い、諸種ペプチドを適用した場合の形態変化を経時的に追跡する。なお、データ解析には、ペプチド選択に有効なフィードバック情報を与えるコンピュータ学習アルゴリズムを応用したい。

【期待される成果】

アストロサイトの形態変化に関与するPARサブタイプは複数存在し、さらにその下流の細胞内機構において、各種G蛋白質やカルシウム流入を担うTRPチャネルなど多様な分子が形態変化に関与していることが想定される。このように生体分子の複雑な相互作用によって細胞形態は調節されており、従来の限定的な酵素活性を指標としたin vitroスクリーニング手法は生理的に意義のあるリガンドの探索法として必要十分とは言えない。本研究のように、生細胞の形態変化を指標にする新たな手法を開発することで、生理活性を有する新規化合物を見いだすことが可能になると考えられ、特異的リガンドが見いだされていないPARサブタイプに対するリガンドの発見にも繋がる。さらに、発見されたりガンドはPARを介した増殖や形態変化、および環境適応の分子メカニズムを解明するためのツールとして利用できるとともに、臨床応用への可能性を示唆することができると思われる。

なお、本研究では培養細胞を用いる薬理評価のためのプロトコルを標準化し、研究の背景や最新の成果とともにWebCTシステムにアーカイブ化する。これらのコンテンツは、創薬研究者養成に有用な融合研究コースの教材を提供する。

ケミカルバイオロジーコース

アストロサイト形態を指標としたセリンプロテアーゼ受容体リガンド探索法の最適化

京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野 中尾 賢治

研究指導者

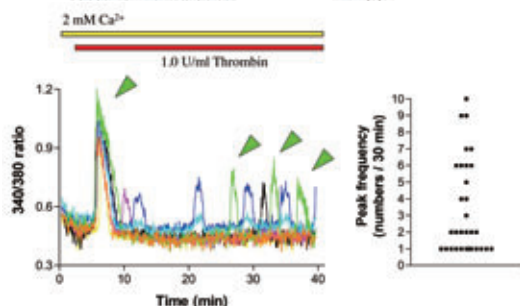
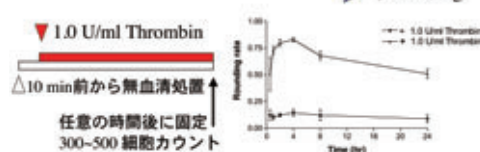
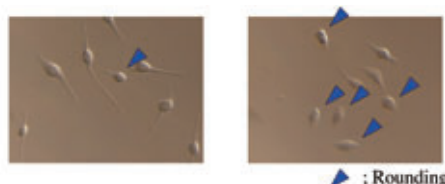
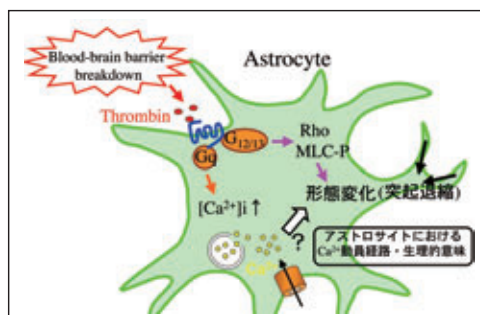
京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野教授 金子 周司

京都大学大学院薬学研究科薬品有機製造学分野教授 藤井 信孝

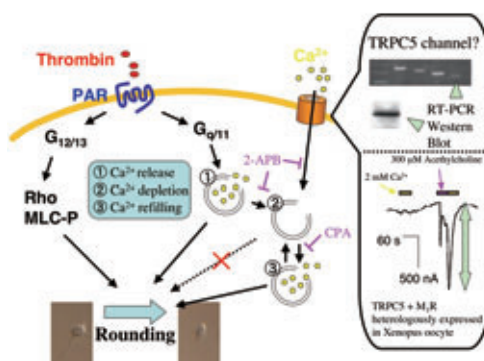
ヒト脳において神経系細胞の大多数を占めるアストロサイト細胞は、様々な刺激に応じて形態を変化させることで、神経ネットワークの構築、神経細胞のシグナル伝達制御、細胞外環境の恒常性維持など、中枢において幅広い機能を担っていると考えられている。脳・血液関門崩壊時に活性化されるセリンプロテアーゼの一種であるトロンビンも、アストロサイトの突起運動に関与していることが示されており、当研究室においては、トロンビンによって惹起されるアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 動員と形態変化の同調関係について検討している。

トロンビンなどのセリンプロテアーゼによる作用は、中枢を含め広く発現している G 蛋白質連関型受容体 PAR (Protease-activated receptors) を介して発揮される。セリンプロテアーゼが PAR 受容体に作用すると、

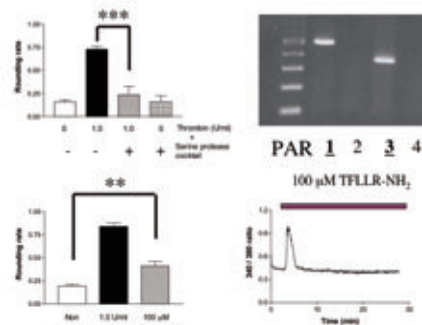
受容体 N 末の特定アミノ酸が切断され、突出したペプチドが PAR 受容体の別の部位にリガンドとして結合することで受容体は活性化される。そのため、外来性に特定のペプチドを適応することでも PAR 受容体が活性化されることから、これらのペプチドは、薬理ツールとして研究に利用されており、また、臨床応用への可能性も模索されている。しかし、現在用いられているペプチドでは、特異性や活性化能の観点から十分であるとはいえない。そこで私は、ケミカルバイオロジーの観点から、ペプチド合成戦略についてご教授を頂きつつペプチドライブラリを用意し、アストロサイトの形態変化をセリンプロテアーゼ生理活性の指標としてスクリーニングを行うことで、PAR アゴニスト/アンタゴニストペプチドを新規開発・最適化することを考えた。本研究はアゴニスト結合を介した受容体活性化機構に物理化学的な知見を与えると共に、開発された生理活性を保證された特異的な高比活性アゴニストや完全アンタゴニストは、薬理ツールとして PAR 受容体の研究速度を大きく増進させ、また、直接の臨床応用への可能性をも秘めていると考えられる。



1321N1 astrocytoma の thrombin による
形態変化と細胞内 Ca^{2+} 上昇



PAR receptors	Thrombin-sensitive ?	Receptor-activating sequences (human)
PAR-1	Yes	SFLLRN
PAR-2	No	SLIGKV
PAR-3	Yes	TFRGAP
PAR-4	Yes	GYPGQV



本研究により、アストロサイトマにおける thrombin 誘発細胞運動ダイナミズムに対し、細胞外からの Ca^{2+} 流入や細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出を介した Ca^{2+} 動員が同調関係にあることが示唆された。今後 1321N1 細胞における PAR の関与を解明し、形態変化を指標とするペプチド由来アゴニスト・アンタゴニストの評価系を構築する計画である。

α 7 ニコチン受容体に対する 植物アルカロイドの薬理作用の探索的研究

(生体機能解析学分野) 山内 陽介

研究指導主任 生体機能解析学分野 教授 金子 周司

研究指導協力者 薬品資源学分野 教授 本多 義昭



■ 研究内容

ニコチン受容体はアセチルコリン受容体のうちイオンチャネルを内蔵する一群であり、骨格筋、神経節、中枢神経系でアセチルコリンによる興奮性神経伝達を担っている。ニコチン受容体には様々なサブタイプが存在しており、 α サブユニットだけでも10種類のアイソフォームが存在し、さらに β サブユニットとの組み合わせによって多様な表現型を有している。ニコチン受容体は中枢神経系において、認知や痛覚などの重要な生理機能に深く関わっていることが知られているが、中でも中枢ニューロンに特異的に発現している α 7 ホモ五量体を標的としたリガンド探索が盛んに進められている。本研究は、 α 7 受容体を標的とするリガンドをアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学的測定によって、効率的に探索する評価系を樹立することを目標にする。さらに本多教授との共同研究によって、植物由来成分から α 7 受容体リガンドを探索する。

これまでアフリカツメガエル卵母細胞発現系で α 7 受容体を機能的に発現させ、アセチルコリン電流応答

に対する植物由来成分であるガラントミンの増強作用を検出してきた。正に帯電した1-メチルガラントミンでも同様の増強作用を検出し、一方、これら増強作用は酸性条件下では見られずに、逆に減弱作用を持つ結果を得ている。細胞外環境に応じてガラントミンの作用が変化することは、この増強作用の作用機序研究において相反する報告が多いことにも関係があると考えられる。作用機序の解明にはアフリカツメガエル卵母細胞発現系のような単純な実験系を利用することが必要である。 α 7 受容体におけるpH変化に感受性のある残基、アセチルコリン、ガラントミンの結合に関連する残基を標的として、点変異実験を繰り返し行い、細胞外環境を操作しながらガラントミンの増強作用の詳細な検討を行う。この研究による α 7 受容体に対するアセチルコリン電流応答の増強作用の作用機序の解明は、 α 7 受容体を標的分子とした創薬に根拠を与えるとともに、増強作用の検出に最適なスクリーニング系の確立につながり、ゲノム創薬における創薬リード化合物の探索の一助になると考えられる。



ゲノム創薬 コース

 $\alpha 7$ ニコチン受容体に対する植物アルカロイドの薬理作用の探索的研究

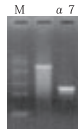
研究計画

ニコチン受容体はアセチルコリン受容体のうちイオンチャネルを内蔵する一群であり、骨格筋、神経節、中枢神経系でアセチルコリンによる興奮性神経伝達を担っている。ニコチン受容体には様々なサブタイプが存在しており、 α サブユニットだけでも 10 種類のアイソフォームが存在し、さらに β サブユニットとの組み合わせによって多様な表現型を有している。ニコチン受容体は中枢神経系において、認知や痛覚などの重要な生理機能に深く関わっていることが知られているが、中でも中枢ニューロンに特異的に発現している $\alpha 7$ ホモ五量体を標的としたリガンド探索が盛んに進められている。本研究は、 $\alpha 7$ 受容体を標的とするリガンドをアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学的測定によって、効率的に探索する評価系を樹立することを目標にする。さらに本多教授との共同研究によって、植物由来成分から $\alpha 7$ 受容体リガンドを探索する。

実験方法

cRNA 注入卵母細胞の調製

ラット由来のニコチン型アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ サブユニット ($\alpha 7$ nAChR) をコードするプラスミド DNA から各々 SP6 RNA ポリメラーゼを用いて cRNA を合成した (mMESSAGEmACHINE, Ambion, TX, USA)。低温麻酔を施したアフリカツメガエル *Xenopus laevis* (浜松生物教材) の腹腔内に卵巣を摘出し、0.66 mg/ml コラゲナーゼ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を含む培養液中で 21℃、60 分、緩やかに振とうし、卵母細胞を覆う濾胞を除去した。合成した cRNA を Dummont 分類の V ~ VI 相 (直径が 1 mm 以上) にあたる卵母細胞に 1 細胞あたり 10 ng 注入した。ペニシリン (10 U/ml)、ストレプトマイシン (10 μ g/ml)、ヒルビン酸 (0.3 mg/ml) を含む Barth 変法培養液 (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.6) 中で 2 ~ 4 日培養し、ACh 300 μ M の投与に対し検出可能な内向き電流応答の見られる発現時期に測定を行った。



cRNA の品質確認
M: RNA ladder
(9.49 kb, 7.46 kb,
4.40 kb, 2.37 kb,
1.35 kb, 0.24 kb),
 $\alpha 7$: $\alpha 7$ nAChR

電気生理学的測定

記録溶液には内因性の Ca²⁺ 依存性 Cl⁻ チャネルの影響を除く目的で BaCl₂ Frog Ringer 溶液 (BaFR: 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 2.5 mM BaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4) を用いた。また一部 Calcium Frog Ringer 溶液 (CaFR: 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) を利用した。卵母細胞をチャンバの溝に静置し、重力を利用して注射筒に入れた記録溶液に灌流液を流速 1.5 ml/min で灌流した。前投与などの薬液投与は別の注射筒に用意した薬物入りの記録溶液に灌流液を切り替えることで行った。ACh の投与は一定速度の液交換が必要であるため、50 μ l の薬液を灌流系に注入し、常に同じ注射筒からの灌流液を利用して投与を行った。Whole-cell 膜電流の測定は、膜電位固定用増幅器 (OC-725C; Warner Instrument, Hamden, CT, USA) に接続された 3 M KCl を充填した 2 本のガラス電極 (抵抗: 1 ~ 2 M Ω) を細胞内に挿入し、膜電位を -80 mV に固定して行った。

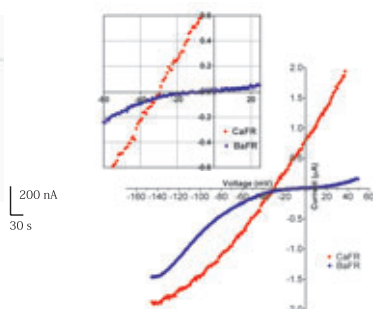
結果 (2) 内因性 Cl⁻ チャネルの影響の排除

$\alpha 7$ 受容体の ACh に対する電流応答において、灌流液を BaFR にすることで内因性の Ca²⁺ 依存性 Cl⁻ チャネルの影響が除かれているか確かめる目的で ramp 液 (250 ms, -150 mV ~ -50 mV) をかけて IV-Curve をとった。灌流液が CaFR の時の逆転電位は -21.1 $\pm$ 4.8 mV (n=5) であったが、灌流液を BaFR に切り替えると逆転電位は -2.8 $\pm$ 3.5 mV (n=5) に変化し、外向き電流が減少している。したがって CaFR で見られた Cl⁻ イオン電流が BaFR では消失していると考えられる。

in CaFR



in BaFR



	細胞外液 (CaFR)	Xenopus oocyte 細胞内イオン組成 *1	比率 [外/内]	20℃における 逆転電位
Na	115 mM	10.4 mM	11.06	+ 60.7 mV
K	2 mM	108.6 mM	1 / 54.3	- 100.9 mV
Cl	125 mM	43.5 mM	2.87	- 26.6 mV
Ca	2 mM	125.75 mM	15905	+ 122.2 mV
Mg	2 mM	>0.5 mM	4	+ 17.5 mV

*1: cited from W. M. Weber, Biochimica et Biophysica Acta 1421 (1999), 213-233

京都大学大学院薬学研究科 生体機能解析学分野
山内 陽介

研究指導者

京都大学大学院薬学研究科 生体機能解析学分野

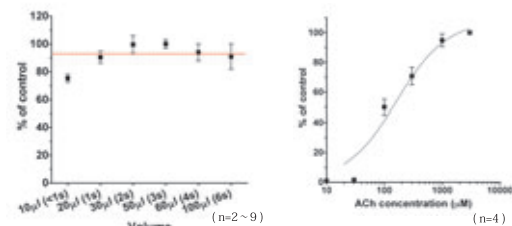
教授 金子 周司

京都大学大学院薬学研究科 薬品資源学

教授 本多 義昭

結果 (1) アセチルコリン電流応答

まずはじめに安定した反応が得られるアセチルコリン (ACh, 300 μ M) の投与量を検討した。灌流系に注入する薬液量を 10 μ l から 100 μ l まで変化させたところ 30 μ l までは容量に応じて反応性が増加したが、30 μ l から 100 μ l では電流反応は一定の値に落ち着くようであった (n=2~9)。以下の実験では ACh の投与量として 50 μ l を採用した。次に ACh の電流応答の濃度依存性を検討した。濃度作用曲線の EC₅₀ 値は 163 $\pm$ 30 μ M であった。以下の実験では ACh の濃度はすべて 300 μ M を用いている。



ペルオキシソーム膜タンパク質輸送に関与する Pex3p, Pex19p, PMPの結合様式の解析

(構造生物薬学分野) 佐藤 康彦

研究指導主任 構造生物薬学分野 教授 加藤 博章

研究指導協力者 生体情報制御学分野 教授 中山 和久



■ 研究内容

【背景】

細胞内で合成される様々なタンパク質群が、その機能すべきオルガネラへと輸送されるメカニズムは生命科学における未解明の問題である。ペルオキシソームは、極長鎖脂肪酸の代謝などに関与するオルガネラであり、その形成異常はZellweger症候群など重篤な疾患を引き起こすことが知られている。ペルオキシソームへのタンパク質輸送のうち、可溶性タンパク質については輸送シグナルが解明されているが、膜タンパク質の輸送についてはほとんど不明である。

ペルオキシソーム膜タンパク質 (PMP) のペルオキシソームへの輸送には、ペルオキシシン (通称Pex) タンパク質群のうち、Pex19pとPex3pとが関与している。Pex19pはPMP専用のシャペロンあるいは輸送キャリアであり、Pex3pはPMP-Pex19p複合体の受容体であると考えられている。すなわち、PMPがペルオキシソーム選択的に輸送されるメカニズムにはPMP-Pex19p、Pex19p-Pex3pの分子認識機構が重要な役割をしているものと考えられる。したがって、これらの詳細を明らかにするために、まずPMP、Pex19p、Pex3pの精製タンパク質を用いて、相互の結合のメカニズムを理解することが必要である。

【目的】

申請者は、これまでの研究で、ヒトPex3pの細胞質露出領域の大量発現、及び精製法を確立した。さらに、これを用いてPex3pがPex19pのN末端側半分の領域に結合することを明らかにした。Pex19pはPMPとPex3pとで結合部分を使い分けられていることが示唆されている。しかし、その詳細な結合領域の区分、及びPMPとPex3pそれぞれに対する結合の強さは不明である。本研究では、Pex19pとその部位欠失変異体を用いて、

PMP、Pex3pそれぞれに対する結合の結合解離の特徴を調べることにより三者の相互作用様式の解明を目指す。

【方法】

[Pex19p上のPex3p結合領域の検討]

これまでにPex3pはPex19pのN末端側半分の領域に結合することが明らかとなっている。そこでさらに詳細な結合領域の検討を行う。Pex19pの部位欠失変異体とPex3pとの結合解離の特徴を蛍光測定法やSPR法 (表面プラズモン共鳴解析法) によって解明する。

[Pex19p上のPMP結合領域の検討]

遺伝子レベルの研究から、Pex19pとPMPとの結合に必要なそれぞれの領域は推測されているものの、その直接の結合の詳細は明らかになっていない。本研究ではPMPモデルペプチドや無細胞合成法によって調製した数種類のPMPを用いてPex19pの部位欠失変異体との結合機能の検討を行う。また、*Pichia pastoris*を用いて発現精製したPMP22を用いて、Pex19pとの結合性を調べる。

【期待される成果】

Pex19pが様々なPMPやPex3pと結合するメカニズムの解明はPMP輸送系を明らかにする上で、重要であると考えられている。Pex19pの結合相手に応じた領域の使い分けや、親和力のデータはそれを理解するための基礎的情報になるものと期待される。次年度以降は、これらの結果を基に構造生物学的なアプローチによって分子認識機構の構造基盤の解明が行なえるものと期待される。

コース名: ケミカルバイオロジー
ペルオキシソーム膜タンパク質輸送に関与する
Pex3p, Pex19p, PMPの結合様式の解析

構造生物薬学分野 佐藤 康彦

研究指導者: 生体情報制御学分野 中山和久
構造生物薬学分野 加藤博章

序 論

ペルオキシソームは、過酸化水素や脂肪酸の代謝などに関与するオルガネラであり、その形成異常はZellweger 症候群など重篤な疾患を引き起こすことが知られている。ペルオキシソームへのタンパク質輸送のうち、可溶性タンパク質については輸送シグナルが解明されているが、膜タンパク質の輸送についてはほとんど不明である。

ペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)の輸送には、Peroxin 通称(Pex)タンパク質群のうち、Pex19pとPex3pとが関与すると言われている。Pex19pはPMP専用のシャペロン及び輸送キャリアであり、Pex3pはPMP-Pex19p複合体の受容体であると考えられている。すなわち、PMPがペルオキシソーム選択的に輸送されるメカニズムにはPMP-Pex19p、Pex19p-Pex3pの分子認識機構が重要な役割をしているものと考えられる。これらの詳細を明らかにするために、PMP、Pex19p、Pex3pの精製タンパク質を用いて、相互の結合のメカニズムを理解することが必要である。

脂肪酸受容体GPR120のゲノム薬理学的解析

(ゲノム創薬科学分野) 矢野 武明

研究指導主任 ゲノム創薬科学分野 教授 辻本 豪三
研究指導協力者 生体情報制御学分野 教授 中山 和久



■ 研究内容

【背景】

G蛋白質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) は細胞情報伝達系において主要な仲介因子であり、疾病との関係も深く、創薬研究上重要な標的分子である。GPCR中にはリガンドが未知の、いわゆるオーファン受容体も多数含まれ、オーファン受容体のリガンド探索および機能解析は極めて重要である。当研究室では、このオーファン受容体の一つであったGPR120のリガンドが不飽和長鎖脂肪酸であることを明らかにした。GPR120は腸管特異的に発現しており、マウス由来の腸内分泌細胞STC-1にも発現している。STC-1細胞は遊離脂肪酸に反応しペプチドホルモンを遊離することが報告されており、遊離脂肪酸刺激によるglucagons like peptide-1 (GLP-1) の分泌が、GPR120を介していることが明らかとなった。申請者らによる先の報告においてSTC-1での遊離脂肪酸刺激によるアポトーシス抑制がGq-PLC-ERK経路を介していることを証明した。しかしながら、リガンドとGPR120との直接的な相互作用は立証されていないこと、また、受容体が活性化してからGLP-1の分泌に至るまでの経路も解明されていない。GPR120を標的とした創薬研究には、このリガンドと受容体の相互作用およびGLP-1分泌までの情報伝達系の解明が重要である。

【目的】

脂肪酸受容体GPR120刺激によるGLP-1分泌機構の全容を解明するため、リガンドと受容体の直接的な相互作用を証明すると同時に、受容体活性化からGLP-1の分泌までの経路を明らかにする。これにより、創薬標的分子としてのGPR120の生理学的な機能を明確なものとするとともに、創薬に結びつく包括的な情報を得ることを目指す。

【方法】

リガンドと受容体の直接的な相互作用を証明するた

め、リガンドと受容体の結合様式の解析を行う。脂肪酸受容体群のアミノ酸配列アラインメントおよび立体構造のモデルからリガンドと相互作用する可能性の高いアミノ酸を選択し、変異導入を行うことでリガンド結合に必須のアミノ酸を同定する。次に、GLP-1の分泌機構を解明するため、GPR120の活性化によりGLP-1の分泌を起こすSTC-1細胞をモデルとし、シグナル伝達系に対する薬理学的ツールを用いた解析および、生化学的、分子生物学的な解析手法を用いてGLP-1分泌に関与する分子の同定を行い、情報伝達経路を明らかにする。さらにリガンド結合の低下した点変異導入型と野生型GPR120受容体とのシグナル伝達系の比較を、同定した分子種について詳細に検討することで、GPR120の活性化からGLP-1の分泌までの機構を明確にする。

【期待される成果】

変位導入GPR120の解析により、受容体-リガンド間の直接的な相互作用を検証出来るはずである。さらにこの結果から、GPR120に対するリガンド結合の立体構造モデルの作成が可能となり、新規リガンドの探索へと役立つことが期待される。さらに、GLP-1分泌、制御機構の解析により、鍵となる情報伝達系と関連する分子種が明らかになるであろう。これにより、GPR120の腸管における生理的機能がさらに明確となり、薬物開発上、重要な情報が得られることが期待される。腸管から分泌されるGLP-1は、インスリン分泌の誘導及びグルカゴン分泌を抑制することから、GLP-1分泌、制御機構の分子レベルでの理解から、糖尿病、肥満、摂食調節に対する新たな治療標的分子発見の可能性もある。以上、本研究プロジェクトでは、広い研究分野の連携から、脂肪酸受容体GPR120のリガンド結合解析と、GLP-1分泌における機能解析とを包括的にを行い、ゲノム創薬による新規の創薬標的分子の同定から、創薬応用へと発展する研究の達成が期待される。

遊離脂肪酸受容体のリガンド結合部位の同定

○矢野 武明, 定金 恵子, 畑 美絵, 平澤 明, 辻本 豪三

京都大学大学院薬学研究科創薬科学専攻ゲノム創薬科学分野

研究指導主任 辻本 豪三

研究指導協力者 中山 和久

要旨

GPR120のリガンドである脂肪酸のカルボキシル基が受容体の細胞外ループに存在する塩基性アミノ酸残基と相互作用すると仮定し、これら4ヶ所のアミノ酸残基を点変異導入によりアラニンに置換した。作製した変異体をそれぞれHEK293細胞に一過性に発現させた後、リガンドである α -リノレン酸刺激に伴うERKの活性化を測定した。その結果、第一細胞外ループに存在するR99A変異体のみにおいて顕著なERKのリン酸化の抑制が確認された。その後、Tet-Onシステムによりドキシサイクリンで発現が誘導される安定発現細胞株を作製し、脂肪酸および天然物より抽出されたリガンドに対してERKのリン酸化と細胞内 Ca^{2+} の変動を測定した結果、脂肪酸のリガンドはR99A変異体において顕著なシグナルの抑制が認められた。一方、脂肪酸とは構造の異なる天然物より抽出されたリガンドにおいては、R99Aにおけるシグナルの抑制は認められなかった。以上の結果から、脂肪酸のリガンドはR99Aを介してGPR120と相互作用している事を明らかにした。

背景と目的

G蛋白質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) は細胞情報伝達系において主要な仲介因子であり、疾病との関係も深く、創薬においても重要な標的である。GPCRの中にはリガンドが未知な、いわゆるオーファン受容体であるものも多く、そのリガンド探索および機能解析は極めて重要である。当研究室では、このオーファン受容体の一つであったGPR120のリガンドが長鎖不飽和脂肪酸であることを明らかにした。GPR120は腸管特異的に発現しており、マウス由来の腸内分泌細胞STC-1にもGPR120が発現していることが報告されており、遊離脂肪酸刺激によるGLP-1の分泌が、GPR120を介していることが明らかとなった。また、先の報告においてSTC-1での遊離脂肪酸刺激によるアポトーシス抑制がGq-PLC-ERK経路を介していることを証明した。GPR120を標的とした創薬を行うにあたって、リガンドと受容体の相互作用を解明する必要がある。そこで、GPR120のリガンド結合部位の同定を行った。

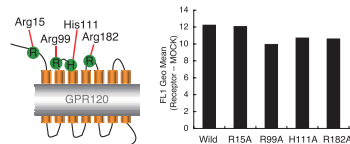


図1 塩基性アミノ酸残基の点変異導入および発現確認
脂肪酸との相互作用に重要であると予測した、細胞外ループに存在する塩基性アミノ酸残基をアラニンに置換した。(左図)
FLAG融合GPR120を作製した。それぞれHEK293細胞に一過性に発現させ、フローサイトメトリー (FACS Calibur; BD社) にてFLAG抗体および蛍光標識プロテインを用いて細胞膜表面に発現する受容体を測定した。縦軸は各受容体とMOCKにおけるGeo Meanの差を示した。

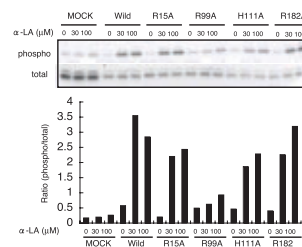


図2 HEK293細胞に発現させたGPR120および変異体のERK活性化
野生型および、R15A, R99A, H111A, R182Aの各変異体をHEK293細胞に一過性に発現させた。それぞれ、 α -LAを0, 30, 100 μ Mにて5分刺激した。pERKおよびERK抗体にて抽出した。下図の棒グラフは上図の抽出されたバンドを数値化したものを示した。

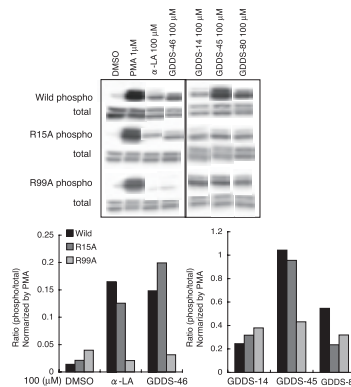


図3 安定発現細胞株におけるGPR120および変異体のERK活性化
野生型および、R15A, R99Aの各変異体のドキシサイクリンにて発現を誘導できる安定発現細胞株 (HEK) を作製した。それぞれ、ドキシサイクリンにて発現を誘導させた後、脂肪酸リガンドである α -LAおよびGDDS-46, 文、脂肪酸とは構造の異なる天然物由来のGDDS-14, GDDS-45, GDDS-80を100 μ Mにて5分刺激した。その後pERKおよびERK抗体にて抽出した。下図の棒グラフは上図に示した抽出されたバンドを数値化したものを示した。又、それぞれの値はPMA 1 μ M刺激時における数値を基準とした。

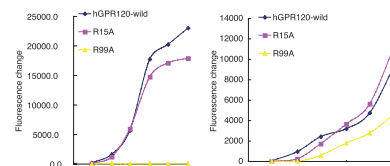


図4 安定発現細胞株におけるGPR120および変異体の細胞内 Ca^{2+} の変動
野生型および、R15A, R99Aの各変異体のドキシサイクリンにて発現を誘導できる安定発現細胞株 (HEK) を作製した。それぞれ、ドキシサイクリンにて発現を誘導させた後、各濃度における α -LA (左図) およびGDDS-45 (右図) にて刺激した。

結果

1. R15A, R99A, H111A, R182A変異体において、HEK293細胞に野生型および変異体を一過性に発現させた結果、それぞれの発現レベルに大きな差は認められなかった (図1)。
2. それぞれHEK293細胞に一過性に発現させた後、 α -LA刺激時のERKのリン酸化を検討した結果、R99Aにおいて顕著なシグナルの低下が認められた (図2)。
3. ドキシサイクリンにて発現が誘導される安定発現細胞株を用い、野生型、R15A, R99AでのERKのリン酸化および細胞内 Ca^{2+} の変動を測定した。その結果脂肪酸リガンド (α -LA, GDDS-46) においてはシグナルの抑制が認められた。一方、脂肪酸とは構造の異なる天然物由来のリガンドにおいては顕著なシグナルの低下は認められなかった (図3, 図4)。

以上の結果から、脂肪酸リガンドとGPR120の相互作用にはArg99が重要であることを示唆する。一方、脂肪酸と構造の異なるリガンドに関しては、Arg99を介さず相互作用すると考えられる。

タンパク質の機能発現を制御する ペプチド性リガンドの高活性非ペプチド化によるゲノム創薬研究

(薬品有機製造学分野) 鳴海 哲夫

研究指導主任 薬品有機製造学分野 教授 藤井 信孝

研究指導協力者 ゲノム創薬科学分野 教授 辻本 豪三



■ 研究内容

【背景】

7回膜貫通型G蛋白共役型受容体(7TM-GPCR)をはじめとする数多くの新規創薬標的となりうるタンパク質をもとに有効性の高い医薬品を開発するためには、タンパク質の結晶構造をはじめとして、受容体とリガンドの結合様式、及び、シグナル伝達の分子機構を解明することが必須である。そのためにはNMR解析、X線結晶構造解析をはじめとする構造生物学的手法だけでなく、Chemical Biologyから得られるペプチド・タンパク質に関する有用な生物活性発現に関する情報と併せて有機化学に軸足を置いて創薬研究を展開していくことが必要である。

Chemical Biologyでは小分子化合物をバイオプローブとして受容体であるタンパク質を攪乱し、生体反応における調節機構を理解することから、対象となるタンパク質の機能を選択的に制御する小分子化合物を開発することが必要不可欠である。しかしながら、バイオプローブとなる小分子化合物の分子設計には一般的な方法論が確立されておらず、対象となるタンパク質ごとにバイオプローブを開発しなければならないのが現状である。

【目的】

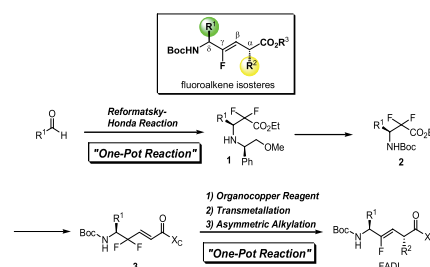
創薬標的となるタンパク質の機能を調節しうる小分子化合物は、創薬研究のみならず、タンパク質分子の生体内機能を解明する上でも非常に有用なケミカルプローブとなる。このケミカルプローブは対象となるタンパク質に対し部位特異的に作用する必要があるため、目的に応じて化学修飾が可能である非ペプチドはより詳細な生物活性発現機構の解析を可能にするものである。従って、天然型ペプチド性リガンドを多様性があり構造的相同性の高い非ペプチドへと効率よく変換する方法論の創製が望まれている。

そこで本研究ではPeptide to Non-Peptideの普遍的方法論の確立を目的として、有用なバイオイソスターと期待されるフルオロアルケン型ジペプチドイソスター(FADI)の高立体選択的合成法を確立することを目指す。続いて、CXCR4アンタゴニストである生理活性ペプチドFC131を題材の一つとして取り上げ、合成したFADIを導入したFC131誘導体の機能解析、FC131とその誘導体の構造活性相関をもとにFADIの有用性を検証する。

【方法】

FADIの高立体選択的合成は右記のスキームに基づいて進めていく。FADIの合成において必要なのは、アミ

ノ酸の側鎖に相当するα位及びδ位にある二つの不斉点とZ型フルオロオレフィン骨格の構築である。



る。そこで本研究では二つの不斉点、及びZ型フルオロオレフィンを二つのOne-Pot反応により効率よく構築する。まず一つめのδ位の不斉点はReformatsky-Honda反応によりα位に二つのフッ素原子を有するβアミノ酸を合成し、続いて分子内に不斉環境を有する3へと誘導する。得られた3に対し、有機銅試薬による一電子還元、続いてトランスメタル化、不斉アルキル化の三ステップをOne-Pot反応で行うことにより目的とするFADIを得る。

続いて、FADIのPeptide to Non-Peptideの一般的方法論における有効性を証明すべく、FADIをCXCR4アンタゴニストである生理活性ペプチドFC131に導入し機能解析を行う。

【期待される成果】

ペプチドの化学修飾における有効な方法論として、(E)-アルケン型ジペプチドイソスター(EADI)が用いられてきたが、EADIではペプチド結合固有の水素結合における静電的極性の低下など機能発現に結びつく力が弱く、有効な手法とならない場合が多い。本研究のターゲットであるFADIならばもとのペプチド結合と構造的、及び静電的相同性も高いことから従来の力不足と言う問題を克服するものである。また、FADIの高立体選択的合成法は未だ確立されておらず、本研究は有機合成化学的特色を有している。加えて、創薬標的として重要なCXCR4のアンタゴニストであるFC131にFADIを導入することで有機合成化学だけでなく、その医薬品化学的な有用性を結論できる。すなわち本研究はFADIの高立体選択的合成法の開発という有機化学を基盤としてPeptide to Non-Peptideにおける有効な方法論の提示、さらに新規CXCR4受容体アンタゴニスト、及びペプチド性リガンドを認識するタンパク質の機能解析におけるプローブの開発といった幅広い分野での応用を見据えており、ポストゲノム時代の創薬研究として重要度の高いものと考えられる。

蛋白質の機能発現を制御するペプチド性リガンド の高活性非ペプチド化によるゲノム創薬研究

薬品有機製造学分野
鳴海 哲夫、藤井 信孝
ゲノム創薬科学分野
辻本 豪三

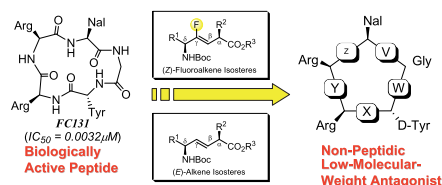
Native Peptides vs. (*E*)-Alkene Isosteres vs. (*Z*)-Fluoroalkene Isosteres: Synthesis and Biological Evaluation of Pseudopeptide Analogues of the CXCR4 Antagonist FC131

研究背景

7回膜貫通型 G 蛋白共役型受容体をはじめとする数多くの新規創薬標的となりうるタンパク質に対して有効性の高い医薬品を開発するためには、タンパク質の結晶構造をはじめとして、受容体とリガンドの結合様式、及びシグナル伝達の分子機構を解明することが重要である。そのためには NMR 解析、X 線結晶構造解析をはじめとする構造生物学的手法だけでなく、ペプチド・タンパク質に関する有用な生物活性発現に関する情報と併せて有機化学に軸足を置いて創薬研究を展開していくことが必要である。

Chemical Biology 研究では小分子化合物をバイオプローブとして受容体であるタンパク質機能を攪乱し、生体反応における調節機構を理解することから、対象となるタンパク質の機能を選択的に制御する小分子化合物を開発することが必要不可欠である。しかしながら、バイオプローブとなる小分子化合物の分子設計には普遍的方法論が確立されておらず、対象となるタンパク質ごとにバイオプローブを開発しなければならないのが現状である。

Peptide to Non-Peptide Strategy

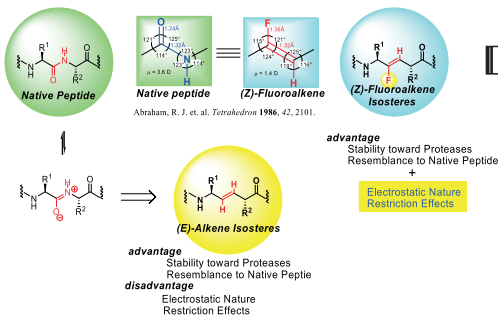


目的

創薬標的となるタンパク質の機能を調節しうる小分子化合物は、創薬研究のみならず、タンパク質分子の生体内機能を解明する上でも非常に有用なケミカルプローブとなる。このケミカルプローブは対象となるタンパク質に対し部位特異的に作用する必要があり、目的に応じて化学修飾が可能であるペプチドバイオイソスターはより詳細な生物活性発現機構の解析を可能にするものである。従って、天然型ペプチド性リガンドを多様性があり構造的相同性の高い非ペプチドへと効率よく変換する方法論の創製が望まれている。

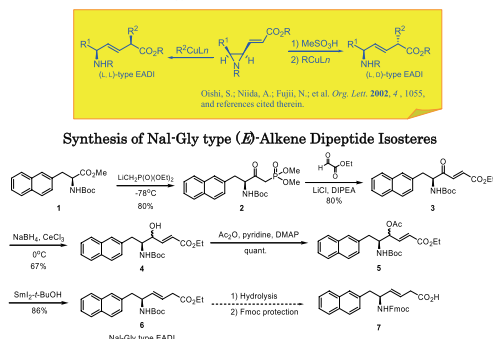
そこで本研究では Peptide to Non-Peptide の普遍的方法論の確立を目指し、有用なバイオイソスターと期待されるフルオロアルケン型ジペプチドイソスター (FADI) の高立体選択的合成法を開発することを目的とする。さら CXCR4 アンタゴニストである生理活性ペプチド FC131 を題材の一つとして取り上げ、合成した FADI、及び従来法により合成した (*D*)-アルケン型ジペプチドイソスター (EADI) を導入した FC131 誘導体の機能解析、FC131 とその誘導体の構造活性相関をもとに FADI のバイオイソスターとしての可能性も検証する。

Native Peptides and Its Corresponding Isosteres



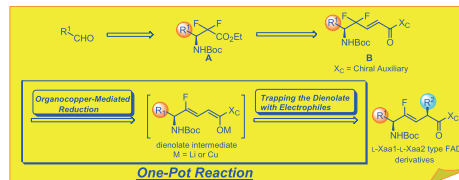
(*E*)-Alkene Dipeptide Isosteres

Synthetic Strategy toward (*E*)-Alkene Dipeptide Isosteres



(*Z*)-Fluoroalkene Dipeptide Isosteres

Diastereoselective Synthesis of (*Z*)-Fluoroalkene Dipeptide Isosteres



骨転移巣へのタンパク質ターゲティングシステムの開発による骨転移抑制

(薬品動態制御学分野) 兵頭 健治

研究指導主任 薬品動態制御学分野 教授 橋田 充

研究指導協力者 病態機能解析学分野 教授 佐治 英郎



研究内容

抗癌療法の進歩により原発腫瘍は制御がほぼ可能となった。一方、遠隔臓器への転移の制御はいまだに困難であり、癌患者が死亡する最大の要因である。したがって、癌研究・治療の今後の目標は遠隔臓器への転移の制御となることは明白である。癌の転移標的臓器として骨は肺・肝臓に匹敵する転移好発臓器である。しかし、骨に転移した癌に対して通常の抗癌療法はその組織構造と血流量の低さから功を奏しにくい。薬理効果を発揮するためには薬物を骨末端の標的部位に効率よく送達させる必要があるが、その実現は困難であり、薬理効果を確実にするためには薬物の血中濃度を高くしなければならず、結果として投与量の増大や頻回投与を余儀なくされるなどの問題を抱えている。これらの要因により他の正常組織や全身に副作用を引き起こすことが投薬上の大きな障害となっている。こうした背景の中、骨を標的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) は骨疾患に対する薬物療法における問題を解決する方法として期待されており、近年盛んに研究が進められている。申請者はこれまでに肺、肝臓、腹膜への転移を血中滞留型PEG-catalase、肝実質細胞指向型Gal-catalase、腹腔内滞留型ED-catalaseにより効率的に抑制できることを明らかにした。これらの結果は癌転移過程における活性酸素の重要性を示すものであるとともに、catalase誘導体が転移に対して有効であることを示すものであると考えられる。そこで、本研究ではcatalaseをはじめとする種々タンパク質医薬品や薬物の骨特異的デリバリー技術の確立およびそれを用いた骨転移抑制法の開発を目指す。

本研究では癌患者の生命を脅かす最大の要因である癌転移、その中でも特に治療が困難で、耐え難い骨痛・病的骨折・運動制限・高カルシウム血症などを合併し患者のQOLを著しく低下させる癌の骨転移抑制法の開発を目的とする。そのアプローチとして、生理活性タンパク質 (活性酸素消去酵素) を骨特異的にデリバリーする技術の確立を目指す。癌の転移抑制を目的として癌細胞特異的な抗体を標的指向因子とし癌細胞へ直接ターゲティングするアプローチも行われているが、癌細胞の多様性および遺伝子の不安定さから普遍的なターゲティング技術とは成り得ない。そこで本研究では、癌細胞の転移標的部位である骨表面に選択的に分布するビスフォスフォネート (BiP) を骨指向因子として選択し、これをcatalaseなどの活性酸素消去酵素をはじめとする生理活性タンパク質と結合させることにより骨表面特異的ターゲティング技術の確立を目指す。BiPは、硬組織に多く存在し、骨のミネラル成分であるリン酸カルシウム (ヒドロキシアパタイト) に親和性が非常に高いこと、ならびにヒドロキシアパタイトの溶解抑制作用があることが知られている。BiPは生体内に存在し骨代謝を制御するピロリン酸と類似した構造を有し、ピロリン酸が2つのリン酸基が同一酸素に結合 (P-O-P結合) しているのに対し、BiPは炭素に結合 (P-C-P結合) したものの総称である。このP-C-P部分がヒドロキシアパタイトに非常に強力な親和力を有し、BiPを体内に投与した場合、投与量の大部分が速やかに全身骨に選択的に分布し、残りは尿中に速や

かに排泄される特徴を有する。また近年、BiPによる癌細胞の接着や浸潤、血管新生の抑制による骨転移抑制効果が明らかにされた。したがって、BiPは生理活性タンパク質の指向因子としての機能だけでなく、骨転移抑制能も併せ持つと考えられ、骨転移抑制効果に関して活性酸素消去酵素との相乗効果が期待される。しかし、これまでに数多くのBiP化合物が研究されてきたにも拘らず、BiPに関する化学構造と薬理活性の相関、定量的構造活性相関 (quantitative structure-activity relationship (QSAR)) や化学構造と体内動態の相関、定量的構造物性相関 (quantitative structure-pharmacokinetic relationship (QSPR)) に関する情報はわずかな数にとどまっている。化学修飾によるDDSの設計において一般的に最も困難とされる点は、標的部位への理想的な薬物送達を可能にするための最適構造を適応する化合物ごとに精密にデザインしなければならないことである。BiP修飾による骨指向型DDSの場合、薬物とBiPとの結合はスパーサーを介して行われ、骨指向性や滞留性などの特性は、適応する薬物、BiPおよびスパーサーのそれぞれの組み合わせによって変化する。これまでタンパク質をBiP修飾した例は非常に少なく、系統的研究はなされていないのが現状である。BiP修飾タンパク質の化学構造と骨指向性などの体内動態との関係 (QSPR) を把握することは、本アプローチを最適化する場合やその他種々の生理活性タンパク質にも適応する際においても非常に有用な情報となり得る。

検討は、BiPのR₁基に側鎖として水素・メチル基・水酸基など、R₂基にスパーサーを導入しタンパク質と結合させる。血液と骨髓コンパートメントとの物質交換にはlining cellにより構成される血液-骨髓液関門 (blood-bone marrow barrier) が存在し物質輸送が制限されていることから、スパーサーの種類や長さを変化させたものをいくつか作成し、in vitroにおいてヒドロキシアパタイトとの結合性および酵素活性を確認後、骨転移モデルマウスに投与することでそれらの体内動態を解析する。骨転移モデルマウスは既報に従いマウスメラノーマB16-BL6細胞をC57/BL6マウスの心臓内に投与することで作成する。タンパク質のサイズ・構造およびスパーサーを変化させた場合の体内動態の変化をQSPRの手法を用いて解析することにより、骨へのタンパク質DDS技術の確立を目指す。申請者はすでにレポーター遺伝子を安定に発現する癌細胞の開発に成功しており、これにより癌転移を高感度かつ定量的に評価可能であるばかりでなく、癌細胞増殖の速度論的解析も可能であることから、作成したBiP修飾活性酸素消去酵素の抑制効果を厳密に評価可能と考えられる。また、癌転移は癌細胞自身による血管外基質・基底膜の破壊に始まり、血管内への流入、血流中の移行、血管内皮細胞への接着、血管基底膜の破壊、間質への浸潤、増殖により成立するが、申請者が開発したレポーター遺伝子癌細胞を用いることでこれらの素過程を分離評価可能であることから、BiP修飾活性酸素消去酵素の抑制効果を作用点ごとに解析可能であり、骨転移抑制に最適な投薬スケジュールも設計することが可能となる。

一酸化窒素デリバリーによる活性酸素障害の抑制

(薬品動態制御学分野) 勝見 英正

研究指導主任 薬品動態制御学分野 教授 橋田 充

研究指導協力者 製剤機能解析学分野 教授 半田 哲郎



■ 研究内容

一酸化窒素 (NO) は、血管弛緩因子としてのみならず、活性酸素産生や血小板の凝集、免疫系の活性化などを制御する細胞間の情報伝達物質として機能し、生体におけるホメオスタシス維持に多彩な役割を果たしていることが明らかになってきた。近年、循環器疾患や虚血・再灌流時における内因性NOレベルの低下が、病態の悪化や合併症の発症と密接に関連することも示されてきた。したがって、NOを医薬品として体外から投与することは、このような疾患や障害に対する有効な治療法として期待される。しかしながら、NOは非常に不安定な化合物であり、投与に際しては生体内でNOを放出するNO供与体が必須である。また、NOは反応性が非常に高く、高濃度NOは組織障害を惹起するため、NOを利用した有効かつ安全な循環器疾患に対する治療戦略を立てるためには、NO供与体の体内動態を精密に制御し、NOを必要とする疾患部位へ選択的にデリバリーすることが不可欠である。そこで、本研究では、NOによる効果的な活性酸素障害の抑制を目的として、種々の化学修飾により機能性分子を付与したNOキャリアを創製し、その有効性を物性、体内動態、治療効果の観点から総合的に評価する。申請者が所属する研究室では、これまでにタンパク質の化学修飾およびそれに基づく体内動態制御について豊富な経験を有しており、実験動物を使ったin vivo分布実験から培養細胞系におけるin vitro実験を使ってドラッグデリバリーシステム (DDS) の機能評価を行ってきた。DDSにおいてはDDSキャリアと生体膜に存在する標的分子との相互作用がその効率を決定する重要な要因であり、論理的にキャリア分子を設計するためには相互作用の分子機構を解明することが重要である。しかしながら、当研究室には分子論的な相互作用に関する知識や技術がほとんどなく、物理化学を専門とするエキスパートとの共同研究が不可欠である。

本研究を遂行するにあたって、まず高分子化NO供与体の合成を行う。種々の化学修飾を施すのに適したキャリアとして牛血清アルブミン (BSA) を選択する。BSAにNOを結合させるために、BSAにN-succinimidyl S-acetylthioacetateを結合させて遊離SH基を導入し、NaNO₂あるいはisoamyl nitriteと反応させる。NOの放出速度をコントロールするために、BSAにpolyethylene glycol修飾を施した誘導体も併せて合成し、同様のNO導入を行う。その他、標的細胞に選択的にNO供与体をデリバリーするために、糖修飾を施した誘導体を合成する。得られたNO供与体からのNO放出に関しては、in vitro実験では緩衝液中の、in vivo実験では血漿中のNO酸化物濃度をGriess法により評価する。In vivo分布実験では¹¹¹In標識した各BSA誘導体を静脈内投与後経時的に血液および組織中の放射活性を測定する。治療実験においては、マウスを麻酔下門脈および肝動脈を一定時間閉塞してから再灌流する肝虚血再灌流障害モデルを用いて、障害のサロゲートマーカーとして肝臓から放出されるGOT, GPT活性を測定する。一方、糖修飾を施したBSA誘導体と生体膜上の糖認識レセプターとの相互作用解析では、肝臓よりアフィニティカラムにより精製したレセプターをリボソームに分散した系を構築し、BSA誘導体との相互作用を表面プラズモン共鳴法および蛍光共鳴エネルギー移動法によって解析する。

本解析により、リガンドと糖認識レセプターとの相互作用の様式、ならびにそれに対するPEG修飾の影響について分子レベルで明らかになるものと期待される。これは、NO供与体を最適に分子設計するための基礎的知見を与えるとともに、本解析手法を確立し、応用展開することによってDDS評価の新しい道を拓くものと期待される。

コース名:ファーマコゲノミクス

コース名:ファーマコゲノミクス

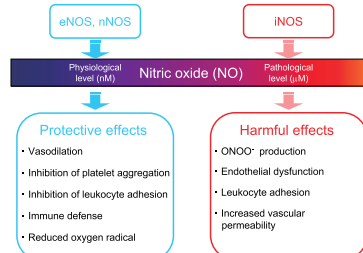
コース名:ファーマコゲノミクス

○勝見英正、西川元也、山下富義、橋田 充

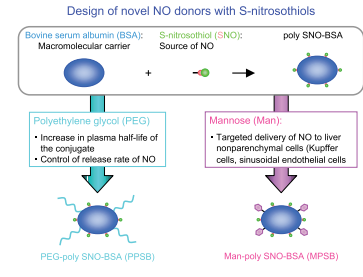
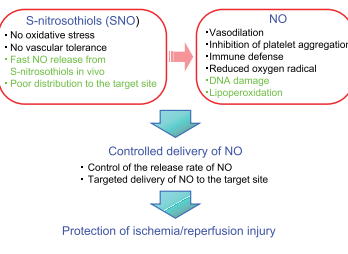
橋田 充 薬品動態制御学分野

半田 哲郎 製剤機能解析学分野

研究狀況報告

[illegible]

Biological activity and therapeutic use of nitric oxide



Methods

Tissue Distribution Experiment. Male labeled BSA and PEG-coy SNA-BSA were injected into the tail vein of mice at a dose of 1 mg/kg. At appropriate times after injection, blood was collected from the vena cava under ether anesthesia, and the mice were then killed. Plasma was separated by centrifugation at 10,000g for 10 min, and the supernatant was removed, rinsed with saline, and weighed. Urine was also collected. The radioactivity in each sample was counted using a well-type NaI-scintillation counter (ARC-50; Aloka, Tokyo, Japan) [Fig. 4].

Hepatic Ischemia-Reperfusion Experiment. An incision was made in the abdomen, and the hepatic portal vein was exposed. A small clip was applied to the portal vein to produce hepatic ischemia. Then, blood was allowed to reflow through the liver (reperfusion). The hepatic lesions following hepatic pyruvic tumescence (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) activities were measured. The plasma concentrations of C₁₆-labeled hepatocyte injury. Saline, SNAP, NO-BSA, PEG-coy SNA-BSA, and Man-PEG-SNA-BSA were administered intravenously at a dose of 1 mg/kg immediately after reperfusion.

Evaluation of Neutrophil Infiltration. Liver tissues were excised after 8 hr of reperfusion to make the sections, and neutrophils in the liver section were stained using the A-S-D chromogenic substrate. The number of infiltrated neutrophils per field of vision (neutrophils/morphology) were counted in 25 high-power fields (HPF) [used up] using a microscope. Only those neutrophils were counted that were present within sinusoids or extravasated into the tissue. Those in large hepatic vessels such as venules were omitted.

Fig.1 Physicochemical characteristics of NO donors

	SNO/BSA (mol/mol)	Total NO/BSA (mol/mol)	PEG or Man/BSA (mol/mol)	Molecular Weight
NO-BSA	0.2	0.8	-	67,000
PEG-poly SNO -BSA (PPSB)	10.3	10.3	36.6	250,000
Man-poly SNO -BSA (MPSB)	5.8	5.8	23.3	71,000

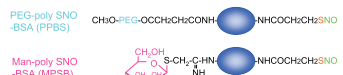


Fig.4 Tissue distribution of ^{111}In labeled PEG-poly SATA-BSA
Man-poly SATA-BSA after intravenous injection in mice

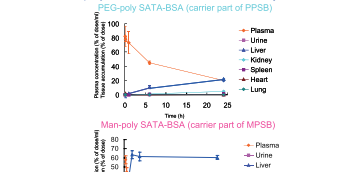
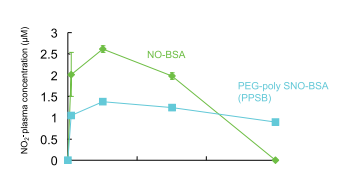
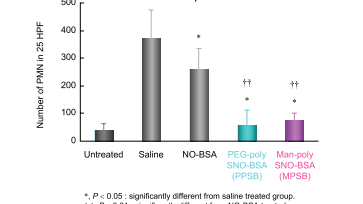
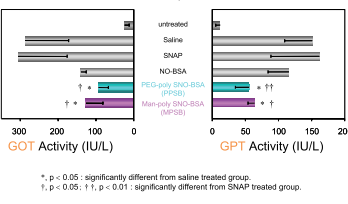


Fig.6 Number of neutrophils in liver sections of mice after hepatic ischemia/reperfusion



タンデム型Mannich-oxidation反応 を利用したTaxol誘導体合成

(薬品合成化学分野) 畑 誠司

研究指導主任 薬品合成化学分野 教授 富岡 清

研究指導協力者 分子微生物学分野 教授 河合 明彦



■ 研究内容

【背景】

エステルをLDA等の強塩基で処理して容易に調製できるリチウムエノラートは最も基本的な求核反応剤の一つであり、炭素-炭素結合形成を信頼性高く可能とするための第一選択肢になっている。しかし最も単純なエステルである酢酸エステルから調製したリチウムエノラートはパラ-メトキシアニリンとベンズアルデヒドから調製する最も基本的なイミンとの不斉付加反応では、何故かは不明であったが、期待する生成物を与えないという問題点を抱えていた。酢酸メンチルエステルとLDAから反応性の高いLDA-エノラート錯体を調製し、イミンと反応させると、付加体ジアニオンを経由し期待する不斉付加反応に成功した。

次いで付加体ジアニオン4の酸化による α -ヒドロキシ化に取り組んだ。LDAと錯形成させたエステルエノラート1とイミン2の反応によって発生するジアニオン3は活性化されたエノラート反応種である。ワンポットでアニオンを求電子剤で捕捉できれば二反応を一挙に行える効率の良い反応を構築できる。

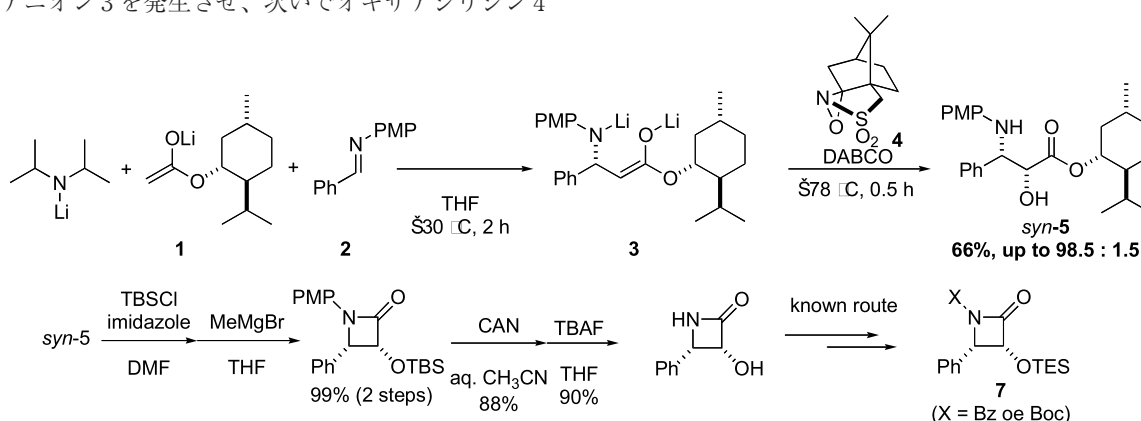
タキソール系制がん剤6のC-13位側鎖の前駆体は本反応のジアニオン中間体3を酸化すれば一挙に構築可能であり、二段階の立体選択的反応の応用としても面白い。先ずジアニオン3を発生させ、次いでオキサアジリジン4

で酸化した。2.5当量のLDAと錯形成させた2.0当量のエステルエノラート1のTHF溶液中にイミン2のTHF溶液を滴下した後-30℃で2時間攪拌し、ジアニオン3を発生させた。次いで、4のTHF溶液を-78℃で滴下し、同温度で30分攪拌した。酸化剤として4を用いると66%、*syn*:*anti*=96:4と高選択的に所望の*syn*-5を得ることができた。さらに、DABCO共存下で酸化を行うと*syn*:*anti*=98.5:1.5まで向上させることができた (Scheme 1)。更に*syn*-5は、NicolaouらによるTaxolの全合成の際に用いられるラクタム7へと変換することも分かっている。詳細な検討を加えて実質的な合成反応を構築したい。

【目的】

イミンとして2以外のものを用いても上記タンデム反応は同様の結果で進行すると期待できるため、様々なTaxol誘導体C-13位の側鎖を合成することが可能と考えられる。これを用いた高活性なTaxol誘導体探索を行うことを目的とする。

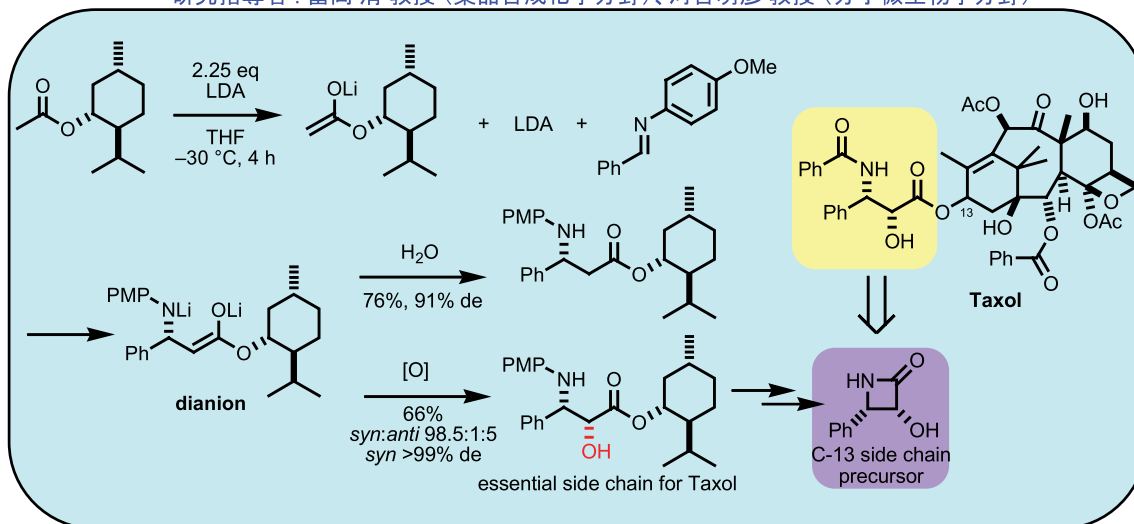
方法・期待される成果：Ph基に種々の置換基を導入したイミン、並びに他の芳香族イミンを用いてタンデム反応を行うことによりTaxol類縁体を合成する。これによってより高活性かつ低毒性の新規化合物の開発が期待できる。



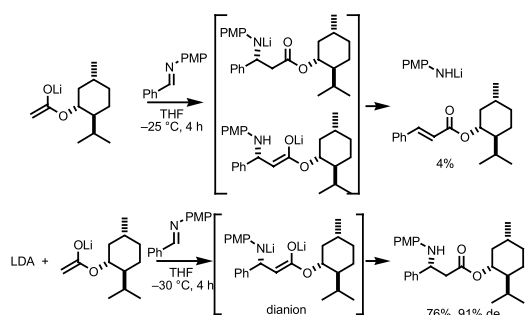
Synthesis of Taxol Side Chain Analogue Using Consecutive Mannich-Oxidation Reaction

ケミカルバイオロジーコース：畑 誠司 (薬品合成化学分野)

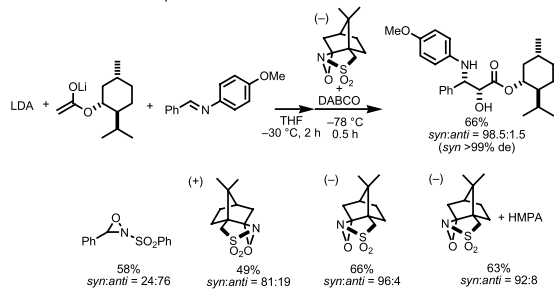
研究指導者：富岡 清 教授 (薬品合成化学分野)、河合明彦 教授 (分子微生物学分野)



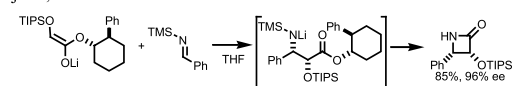
LDA-Assisted Asymmetric Mannich-type Reaction



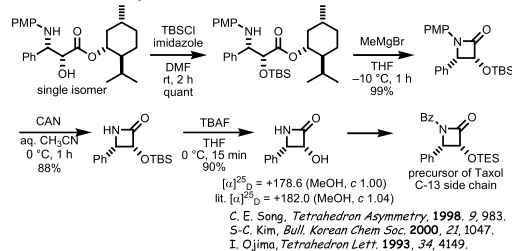
Optimization of Oxidizer



Ojima, 1991

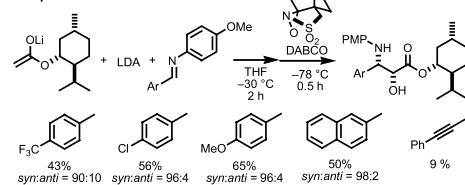


Synthesis of Side Chain Precursor

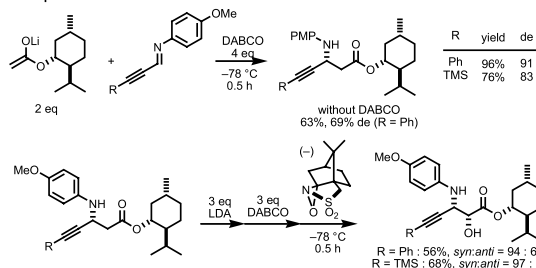


Oxidation of Various Substrates

One-pot Oxidation



Stepwise Oxidation



(-)-Kopsijasmineの効率的な不斉全合成

(薬品合成化学分野) 坂井 健男

研究指導主任 薬品合成化学分野 教授 富岡 清

研究指導協力者 生体機能解析学分野 教授 金子 周司

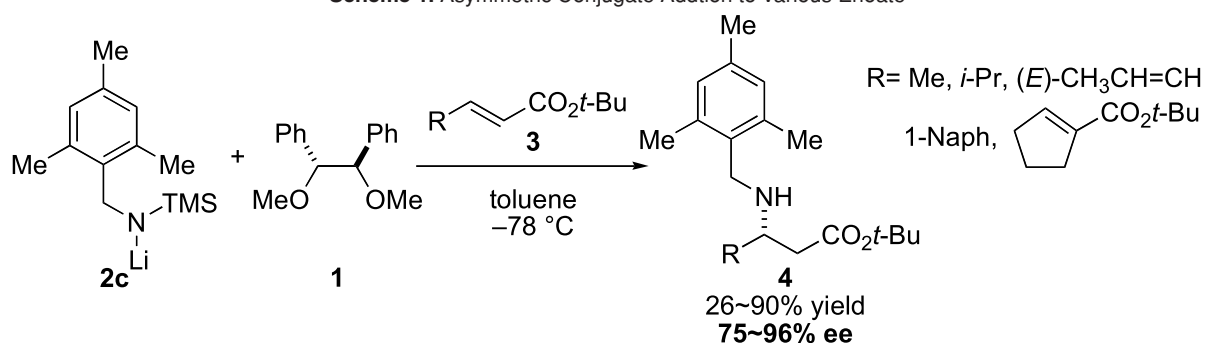


研究内容

当研究室では生物情報活性アミン類を指向する立体選択的不斉合成方法論の開拓を行っている。これら方法論の開発は、将来バイオインフォマティクスから候補としてあがってくるであろう創薬ターゲットを迅速に合成する上で非常に意義深い。申請者はこれまで、

リチウムアミドの不斉共役付加によるβアミノ酸類の不斉合成法の開発に携わってきた (Scheme 1)。本研究では、これらの不斉合成法の手法をKopsane alkaloidsの合成研究へと適用拡大してゆく予定である。

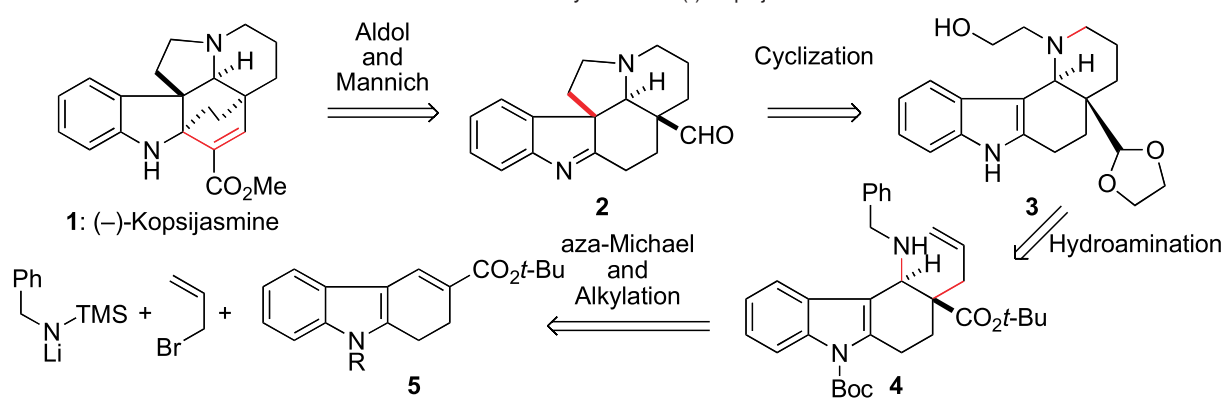
Scheme 1. Asymmetric Conjugate Addition to Various Enolate



Kopsane alkaloidsは主に*Kopsia*属 (キョウチクトウ科) の植物が産出するインドールアルカロイドで、その一部は関節リウマチ、浮腫、扁桃腺炎などの薬と

して用いられている。本研究では(-)-Kopsijasmineの効率的な不斉全合成を目指す。

Scheme 2. Retrosynthesis of (-)-Kopsijasmine



逆合成解析を示した (Scheme 2)。1 はアルドールとマンニッヒ反応により 2 より誘導できると期待した。2 は、3 を環化させることにより作ることができると期待した。また、3 は 4 を環化させることにより作ることができると期待している。4 の合成は当研究で開発しているリチウムアミドの連続不斉共役付加-アルキ

ル化反応により、2 不斉点を一挙に構築できるものと期待している。

これらの合成を達成した後、種々のインドールアルカロイドのライブラリ構築なども可能になると期待している。

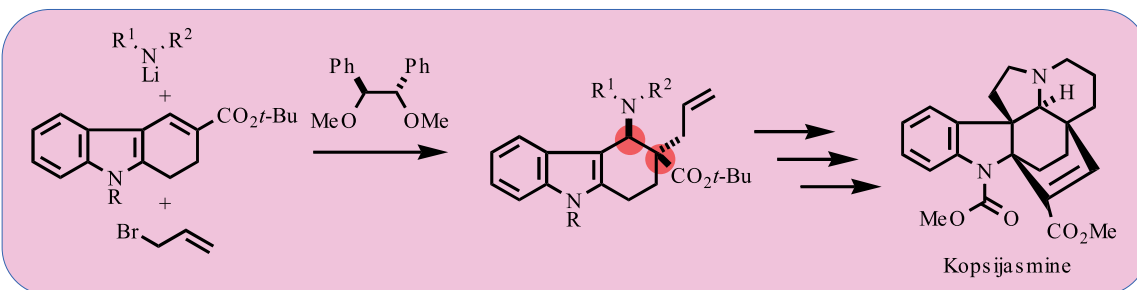
ケミカルバイオロジー

(-)-Kopsijasmineの効率的な不全合成

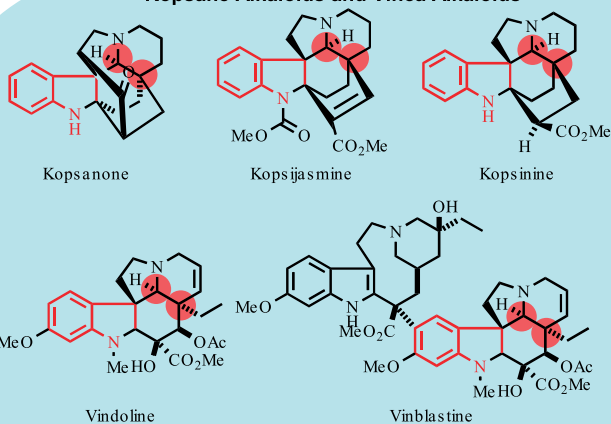
薬品合成化学分野 博士後期課程1年 坂井健男

薬品合成化学分野 教授 富岡 清

生体機能解析分野 教授 金子 周司



Kopsane Alkaloids and Vinca Alkaloids

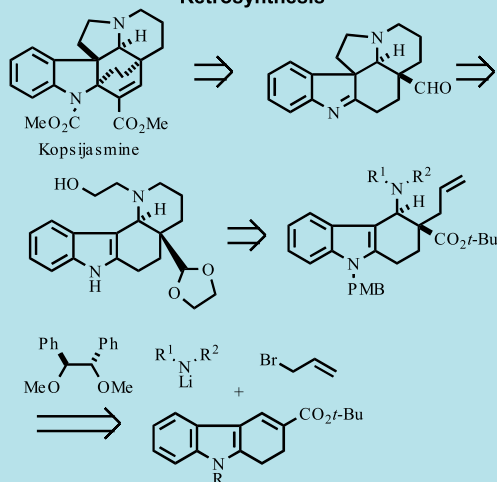
QuickTime™
TIFF and EPS files are supported.
C:\Program Files\Apple Computer\QuickTime™\QT32\QT32.exe -open C:\Program Files\Apple Computer\QuickTime™\QT32\QT32.exe

Kopsia Fruticosa

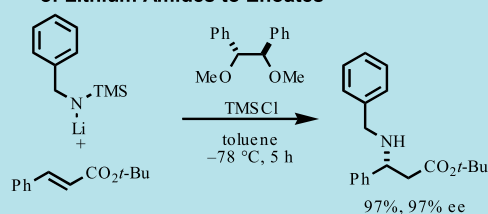
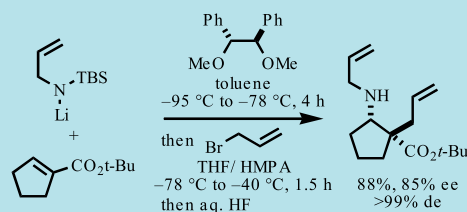


Catharanthus roseus

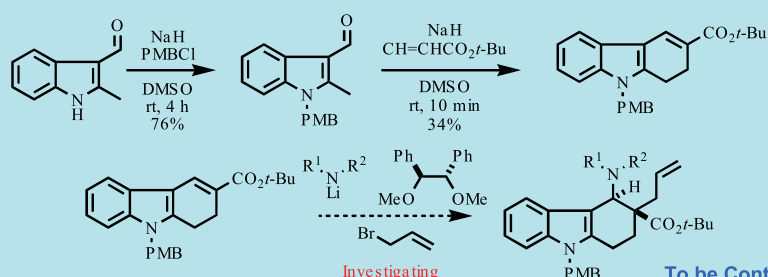
Retrosynthesis



Chiral Ligand-Controlled Conjugate Addition of Lithium Amides to Enolates

Doi, H.; Sakai, T.; Iguchi, M.; Yamada, K.; Tomioka, K.
J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125, 2886-2887.

Report of the Experiment at This Time



細胞内MBPによる糖タンパク質の翻訳後修飾・輸送に関する研究

(生体分子認識学分野) 野中 元裕

研究指導主任 生体分子認識学分野 助教授 岡 昌吾

研究指導協力者 生体情報制御学分野 教授 中山 和久



研究内容

天然に存在する多くのタンパク質は、複雑な配列をもつ糖鎖によって濃密に修飾されており、近年、これらの糖鎖は核酸、アミノ酸に次ぐ第3の生命情報鎖としてその機能解析に注目があびつつある。本研究では、糖鎖に内在される生体情報の解読を目的とし、MBP (mannan binding protein) が生体内で果たす役割の解明をめざしている。MBPはマンノース、フコース、N-アセチルグルコサミンを特異的に認識するC型レクチンの一種である。MBPは一種の遺伝子にコードされ、主に肝臓で合成されるが、細胞外に分泌される血清型MBP (S-MBP) と細胞内に留まる細胞内MBP (I-MBP) が存在する。S-MBPは先天性免疫において重要な分子であるが、I-MBPの機能については未だ不明な点が多い。これまでの研究により、共焦点顕微鏡や電子顕微鏡を用いた観察から、I-MBPが小胞体 (ER) の一部に特徴的な存在様式を示すことを明らかとした。さらにERとGolgiの間を行き来する輸送小胞のタンパク質マーカーと比較、観察した結果から、I-MBPはそれら輸送小胞中に存在することが明らかとな

り、糖タンパク質の細胞内輸送に関与する可能性を示した。今後、共焦点顕微鏡、電子顕微鏡を用いてさらなる詳細な観察を行い、細胞内でMBPがどの輸送小胞に局在しているかを調べ、またS-MBPとI-MBPの翻訳後修飾、分泌にどのような違いがあるかを明らかにする。次に、I-MBPと細胞内において相互作用するタンパク質の同定を行う。さらにI-MBPとの結合、解離のメカニズムなどについて表面プラズモン共鳴法を用いた詳細な解析を行うことにより、I-MBPが細胞内の環境において、新生糖タンパク質と結合、解離をすることを示す。これらの研究により、I-MBPが担う糖タンパク質の品質管理における役割が明確になると考えられる。本研究遂行には申請者が所属する研究室の持つ糖鎖生物学的研究手法だけではなく、細胞内タンパク質の選択的輸送機構に関する専門的な細胞生物学的知識と経験が必要である。従って本研究は個々の研究分野の確立している知見や技術の融合によって達成可能な研究であり、I-MBPに関する新しい機能解明が期待される。

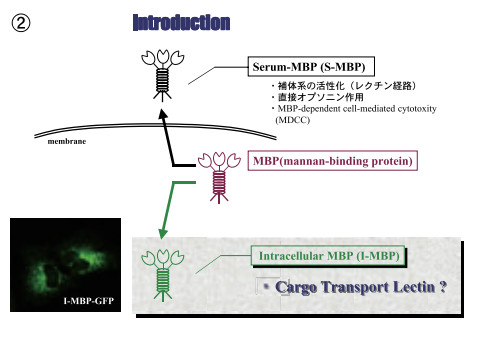
①

天然に存在する多くのタンパク質は、複雑な配列をもつ糖鎖によって濃密に修飾されており、近年、これらの糖鎖は核酸、アミノ酸に次ぐ第3の生命情報鎖としてその機能解析に注目があびつつある。

MBPはマンノース、フコース、N-アセチルグルコサミンを特異的に認識するC型レクチンの一種である。MBPは一種の遺伝子にコードされ、主に肝臓で合成されるが、細胞外に分泌される血清型MBP (S-MBP) と細胞内に留まる細胞内MBP (I-MBP) が存在する。S-MBPは先天性免疫において重要な分子であるが、I-MBPの機能については未だ不明な点が多い。

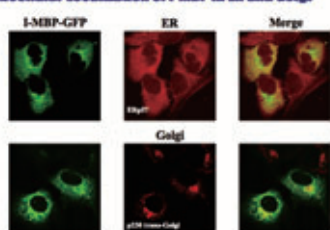
本研究では、糖鎖に内在される生体情報の解読を目的とし、MBP (mannan binding protein) が生体内で果たす役割として、糖タンパク質の細胞内における翻訳後修飾・輸送へのI-MBPの関与について検討を行った。

②



③

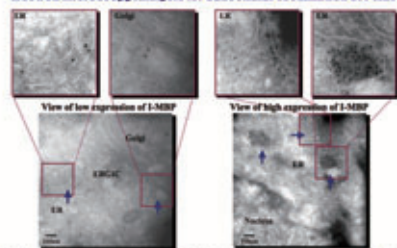
Subcellular Localization of I-MBP in ER and Golgi



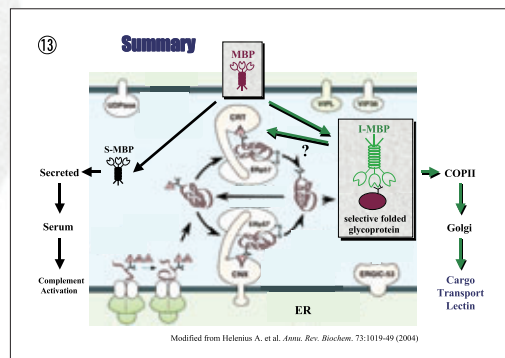
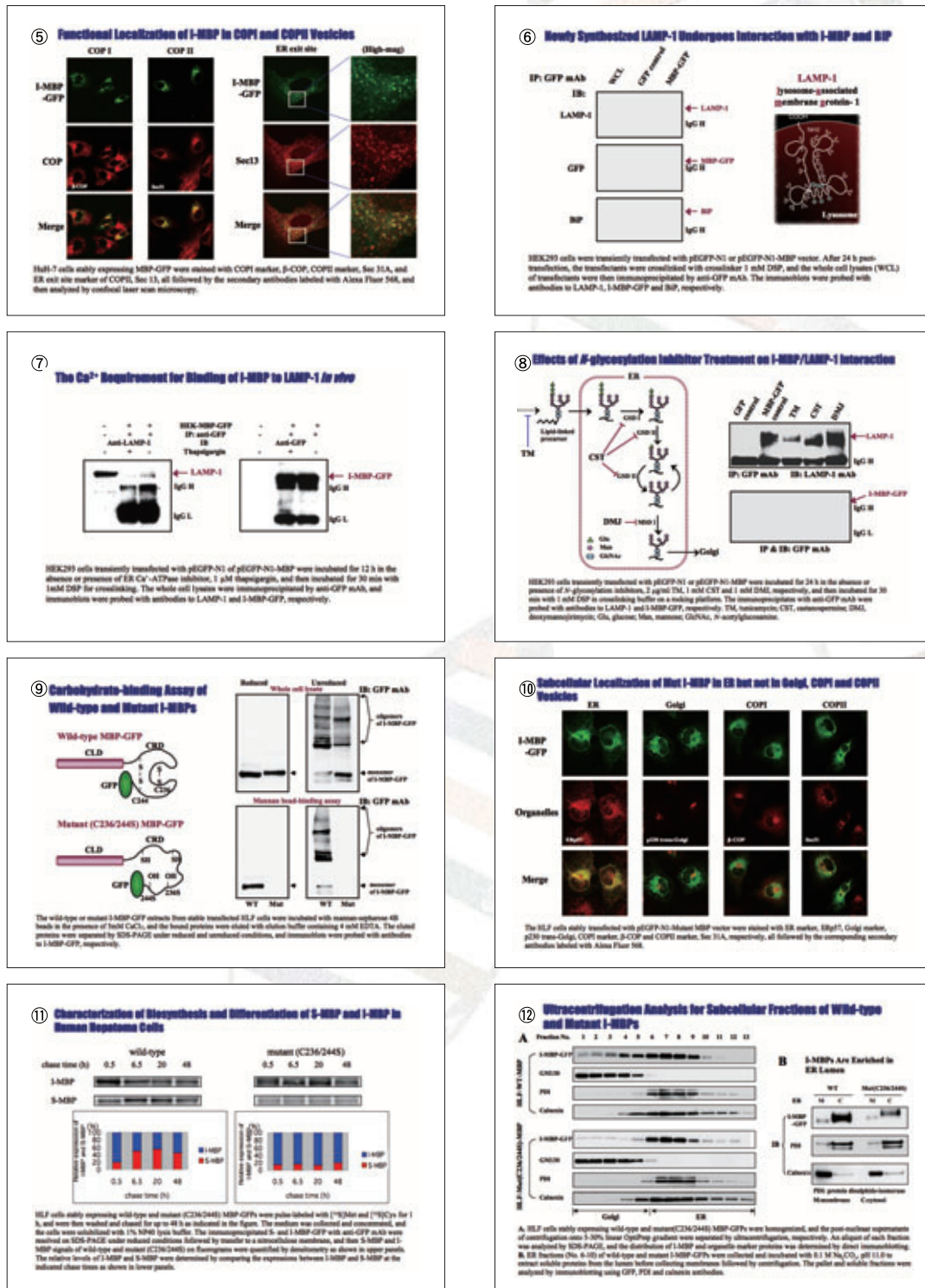
The subcellular distribution and co-localization of I-MBP with the ER and Golgi apparatus was visualized by confocal laser scan microscopy. The I-MBP-GFP cells transiently transfected with ER marker, ERp17 and Golgi marker, p230 trans-Golgi, respectively, both followed by the corresponding secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 568.

④

Electron Microscopy Analysis for Subcellular Localization of I-MBP



The pEGFP-N1-MBP-transfected HeLa cells were fixed and embedded. Ultrathin cryosections of the HeLa cells were stained with anti-GFP pAb, followed with 10 nm colloidal immunogold labeled secondary antibody. The arrows indicate the accumulative localization of I-MBP in the ER, Golgi and ER/Golgi.



ヒアルロン酸-CD44シグナルによるマスト細胞の成熟抑制機構の解明

(生体情報制御学分野) 高野 裕嗣

研究指導主任 生体情報制御学分野 教授 中山 和久

研究指導協力者 ゲノム創薬科学分野 教授 辻本 豪三



■ 研究内容

【背景】

アレルギー疾患や自己免疫疾患などの免疫疾患は、それぞれ獲得免疫と自然免疫の過剰応答が原因である。マスト細胞は、IgE受容体とヒスタミンやプロテアーゼを含む顆粒を特徴として全身の組織に分布し、寄生虫感染時には自然免疫に携わる一方で、獲得免疫のエフェクター細胞として機能する。実際マスト細胞は、アレルギー疾患では中心的な役割を果たし、また線維症やリウマチなどの自己免疫疾患においても重要な役割を担っている(図1)。ところでマスト細胞は、

する抗CD44抗体、(ii) ヒアルロン(HA) 酸合成阻害剤、(iii) CD44遺伝子欠損の影響を調べたところ、いずれもマスト細胞の成熟を亢進した。従って、マスト細胞の成熟にはヒアルロン酸によるCD44シグナルが抑制的に働く可能性が示唆された。③実際、CD44欠損マウスの皮膚受動アナフィラキシー(PCA) 反応を調べたところ、野生型より亢進していたことから、CD44欠損によりマスト細胞の過成熟が引き起こされ、これがアレルギー応答の亢進を導くものと考えられた。

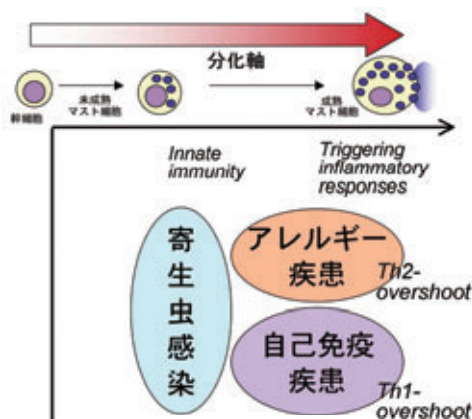


図1 マスト細胞の分化と機能

マスト細胞は幹細胞から分化して局所に応じた成熟を遂げるが、自然免疫にも獲得免疫にも働き、アレルギー、自己免疫疾患に関与する。

未成熟なまま末梢組織に移行しその局所環境に応じた機能を獲得するが、これらの機能に関わる遺伝子の多型がアレルギーや自己免疫疾患の発症率に相関することが判ってきた。そのため、マスト細胞の組織特異的な機能発現の機構を理解し、これを制御することができれば、アレルギーや自己免疫疾患の予防や治療につながるものと考えられる。しかしながら、マスト細胞が種々の組織にサテライトとして点在するために単離・培養が困難で、その分化・成熟機構は十分に理解されるに至っていない。このような背景のもと、申請者はこれまでに骨髓マスト細胞から結合組織型マスト細胞への成熟過程をインビトロで忠実に再現する培養系を確立し、これを用いて以下のような知見を得ている。①成熟段階の異なるマスト細胞のマイクロアレイ解析を行い、マスト細胞の成熟に依存して発現変化する遺伝子群を同定した。②これらの中からヒアルロン酸受容体であるCD44に注目し、(i) ヒアルロン酸結合阻害

【目的】

ヒアルロン酸-CD44シグナルによるマスト細胞の成熟を抑制の分子機構を明らかにすることである。

【方法】

上述のように、(i) 抗CD44抗体、(ii) HA合成阻害剤、(iii) CD44遺伝子欠損、これらはいずれもマスト細胞成熟を亢進した。そこでこの3条件により共通して発現変化する遺伝子をマイクロアレイならびにクラスター解析により検索する(図2)。融合研究の意義はマイクロアレイ解析、クラスター解析に精通したゲノム創薬科学の辻本教授の指導の下、行うことができることにある。得られた遺伝子群の解析方法としては、順次マスト細胞に導入あるいはRNAi導入し、マスト細胞成熟の指標を調べ、各遺伝子の成熟における役割を評価する。

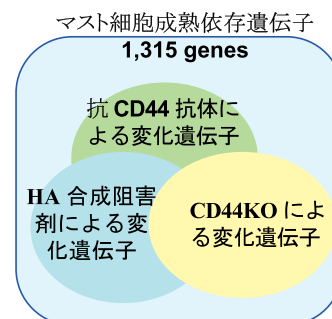
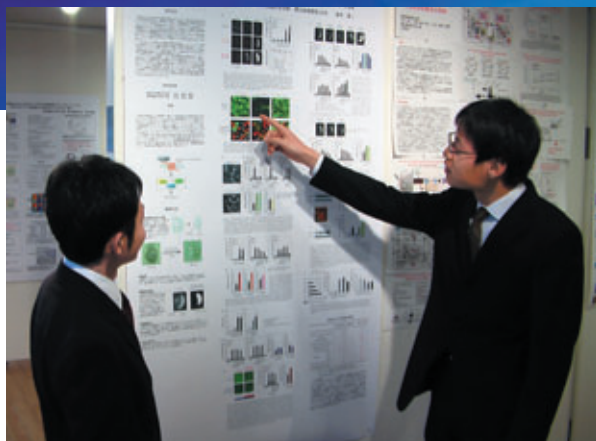


図2 本研究の概念図

【期待される成果】

本研究は、従来不明であったマスト細胞の分化成熟機構の理解に貢献するのみならず、細胞外基質の構成成分であるヒアルロン酸がマスト細胞の成熟ならびにアレルギー応答を負に制御することを示唆するものであり、アトピー性皮膚炎のようなアレルギー疾患の予防・治療薬としての応用も考えられ、社会的意義が大きい。またCD44の下流で成熟抑制に働く遺伝子は、新たな抗アレルギー薬の標的となりうるものであり、波及効果が大きい。

発表会風景 ▶



▶ 京都大学大学院薬学研究科

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/> ◀

