

# 薬物標的となる未知タンパク質の高感度検出法の開発

金沢大学 医薬保健研究域薬学系 生物有機化学研究室  
国嶋 崇隆

## 1. 目的

医薬品が作用する未知の標的タンパクを特定することは、その薬理作用機序や代謝経路解明への最も直接的かつ重要なアプローチであり、さらにdrug reprofilingにおける既存医薬品の新しい作用タンパクの探索においても重要な方法論となる。これによって得られた情報は、薬物-タンパク質間の結合性相互作用に立脚した薬物設計を可能にするだけでなく、薬物代謝に関わる酵素やトランスポーターなど、個体差に基づく医薬品の毒性発現を回避するための指針としても重要である。従って、この目的に適う真に汎用性に優れたケミカルバイオロジー的手法の開発が医薬品業界においても強く望まれるが、未だ開発には至っていない。

本研究では、細胞溶解物中に含まれる無数のタンパク質の中から薬物の標的となるものを特異的かつ高感度で検出できる汎用性・応用性に優れた簡便な技術を開発することを目的とする。

本研究目的を達成するための方法論はアフィニティーラベル化法(AL法)に基づいている。従来法の中でもっともよく研究されてきたものは、光アフィニティーラベル化法であり、優れた光感応性基が開発され、多数の論文が報告されている。しかし、これに用いるアフィニティープローブ(APb)の合成には相当な合成的力量と時間が要求され、創薬研究者や分子生物学者が簡単に実施できるものではない。また、光照射によって反応のタイミングを制御できる点は優れているが、ラジカルやカルベン等の高活性な反応種を生じるため、標識位置が無秩序になることや副反応による標識率の低下が問題となる。加えて標識剤の多様性も低い。AL法がより実用的な汎用技術となるためには、APbの合成が簡単で、多様な標識剤を自在且つ高収率に導入できることが必要である。

申請者らは最近この目的に適う新しいAL法として、モジュール式アフィニティーラベル化法(MoAL法)を開発した。MoAL法は、申請者らが独自に見出した「3級アミンを触媒として水中で進行する触媒的脱水縮合反応」に基づいている。その特徴はAPbが有する3つの機能部位(リガンド部位、反応部位、標識部位)を異なる分子に切り離し(モジュール化)、これらを適宜組み合わせるだけでタンパク質を簡便かつ特異的に標識化する点である。構造の単純化に基づく合成の簡便化と、標識剤の多様化が実現でき、応用性と実用性が格段に向上している。

そこで、未知の薬物標的タンパク質の探索法としてMoAL法を実用化レベルに向上させることを目指して、以下の①～④の課題を提案・実施した。

- ① 微量標識化タンパク質の高感度検出： 標識化されたタンパク質を高感度に検出できる条件を解明する。酵素抗体法による検出限界を考慮して100 pgのタンパク質の検出を数値目標とする。

- ② 標識化反応における限界濃度の解明：細胞内に微量存在している薬物標的タンパク質を、MoAL法によって特異的に標識化するために、必要なタンパク質濃度を解明する。In vitroでの反応を想定して100 pMのタンパク質の標識化を数値目標とする。
- ③ 細胞溶解物中の標的タンパク質の検出：①、②の方法を用いて実際にモデル薬物の標的タンパク質の検出を行う。

これらに加え、その応用として、

- ④ 未知の標的タンパク質の探索：③の系において標的以外の未知の作用タンパク質が存在する場合、その検出・同定を行う。

モデル薬物として非ステロイド性抗炎症剤であるインドメタシンを用い、標的タンパク質をシクロオキシゲナーゼ1 (COX1)とする。

## 2. 方法

以下に述べる通り、①、②において市販のCOX1を用いて至適条件を解明後、③、④において培養細胞溶解物中に存在する作用タンパク質の特異的標識化を行った。

①標識化タンパク質の高感度検出として以下の方法を検討した。

標識化サンプルの調製：MoAL法により予め標識化し、標識率が明らかな純品COX1を調製し、これをCOX1を含まない細胞の水溶性画分により段階希釈することにより、夾雑するタンパク質の組成と量が一定で、標識化COX1の量だけが異なる試料を作成した。

検出：上記サンプルを電気泳動後、膜に転写し、次に上げるいずれかの方法で検出した。標識剤に対する抗体を用いた酵素抗体法による化学発光検出、ビオチン化剤／酵素化アビジンによる化学発光検出、ビオチン化剤／量子ドット化アビジンによる蛍光検出

②低濃度タンパク質の標識化における反応限界濃度の解明では、未標識の純品COX1を①と同様の方法で段階希釈し、それぞれの濃度におけるCOX1の標識化を行い、得られたサンプルを①の方法に準じて検出した。

③及び④の細胞溶解物中のタンパク質の検出では、培養細胞から調製した細胞溶解物に対してMoAL法による標識化を行い、標識化されたCOX1ならびにそれ以外の特異的標識化タンパク質を検出した。検出法は①の方法の他、2次元電気泳動による分離や、放射性元素として<sup>125</sup>Iを導入したベンジルアミンによるRI検出についても検討した。

## 3. 結果

①の課題については、検出方法として酵素抗体法、アビジン／ビオチン法のいずれを用いても同程度の検出が可能であることがわかった。染色条件について検討した結果、化学発光試薬としてパーキンエルマー社のWestern Lightning Ultraが最も高い感度を与えることを見出し、酵素抗体法については1次および2次抗体濃度の至適条件、アビジン／ビオチン系においては酵素化アビジン濃度の至適条件などを明らかにした。見出した至適条件においては、当初数値目標を超える50 pgの標識化COX1の検出が達成された。

②の課題については、当初目標には及ばなかったものの、その30倍に相当する2.8 nMのCOX1を標識化し、これを検出することが出来た。

③の課題については、ラット副腎褐色腫由来の神経細胞変異株の細胞溶解物に対して反応を行った結果、COX1の有意な標識化／検出は出来なかった。

④の課題については、インドメタシンにより標識化が有意に阻害される非COX1タンパク質が数種類検出され、2次元電気泳動とMS解析によりその内の一つのタンパク質の同定に成功した。放射性ヨウ素を用いた検出では期待した感度が得られなかった。

#### 4. まとめおよび今後の展望

②の反応限界濃度である2.8 nMの溶液中に含まれるCOX1量は、8 ngであり、①の検出限界量の160倍に相当する。従って①の結果に基づけば、2.8 nMの場合では標識化率が僅か数%を超えればこれを検出することが可能である。このことから③の結果において、COX1が検出されなかったのは、検出感度の問題ではなく、試料として用いた細胞溶解物中に存在しているCOX1濃度が、反応限界濃度(2.8 nM)よりかなり低いことが原因であると予想された。抗COX1抗体を用いた酵素抗体法によってCOX1が存在することは確認されていることから、本研究目的の達成にあたり、今後は以下の課題を検討する予定である。

- ・細胞溶解物を分画、濃縮し、定量の上、標識化／検出
- ・ビオチン標識後アビジンカラムを用いた標識化タンパクの単離精製

また、④の研究において検出された未知タンパク質については、drug reprofilingの観点からも大変興味深い成果であり、今後以下のことを検討する。

- ・残りの未知タンパク質の同定
- ・被標識化ペプチド断片の検出による、標識化の特異性の証明と標識部位の特定
- ・同定されたタンパク質の発現により、その機能並びにインドメタシンとの相互作用機序並びに生理学的意義の解明

以上の研究成果より、申請者らが開発したMoAL法は、従来法と比較して優れた実用性と簡便性を有するケミカルバイオロジーの技術となることが示された。本課題によって明らかにされた高感度検出条件は、インドメタシン／COX1系以外の多様な薬物／作用タンパク系に対して適用可能であることから、今後は共同研究等を積極的に進め、医薬品の未知標的タンパク質、代謝酵素やトランスポーターなどの特定へと展開してゆく予定である。

終わりに臨み本研究助成に対し心より感謝を申し上げます。

#### 5. 発表論文

(1) Kunishima, M.; Nakanishi, S.; Nishida, J.; Tanaka, H.; Morisaki, D.; Hioki, K.; Nomoto, H. *Chem. Commun.* **2009**, 5597. (1) Nakanishi, S.; Tanaka, H.; Hioki, K.; Yamada, K.; Kunishima, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 7050.