

氏 名（本籍） き 木 さら 皿 しげ 重 き 樹

学 位 の 種 類 博 士（医療薬学）

学 位 記 番 号 薬 博（医療薬学）第 6 号

学位授与年月日 平成 18 年 3 月 24 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）医療薬科学専攻

学 位 論 文 題 目

ネオカルチノスタチンアポ蛋白質を素材とする超天然物創製の
基礎研究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 後 藤 順 一
教 授 安 齋 順 一
助教授 眞 野 成 康

論文内容要旨

ネオカルチノスタチン (NCS) は、放線菌 (*Streptomyces carzinostaticus* var. F-41) の培養濾液より単離されたクロモタンパク質系抗腫瘍性抗生物質であり、肝がん、胃がん、膀胱がんや急性白血病などに有効な治療薬である。NCS は、分子量約 1 万の酸性一本鎖ポリペプチド (apo-NCS) と光や熱に不安定な 9 員環エンジイン構造を含むクロモホア (NCS-chr) から 1:1 のモル比で構成され、高分子抗生物質に分類される。apo-NCS は、活性本体である NCS-chr を保護し、標的部位まで運ぶパッキングキャリアタンパク質としての機能を担っていると考えられている。また、免疫グロブリンの可変領域に類似した基本構造から抗体に代わる機能性蛋白質としての有用性も期待されている。そこで今回、apo-NCS の NCS-chr 結合領域のアミノ酸を置換することにより新たな機能を持つ超天然物創製を目的とした基礎研究を行った。

はじめに、apo-NCS の NCS-chr 結合領域に及ぼすアミノ酸置換効果を検討するため大腸菌 apo-NCS 発現ベクター pR49/pRSET A を鋳型 DNA とし、two-stage megaprimer PCR/site directed mutagenesis 法を用い apo-NCS 変異体 (W39F, F52Y, S98G, S98A, S98C) を作製した。本 apo-NCS 変異体の全体構造は、円二色性分散計 (Circular Dichroism:CD) の CD スペクトルの比較から、天然 apo-NCS と同様のスペクトルが得られた。このことから、apo-NCS における NCS-chr 結合領域の 1 アミノ酸置換体は同様の基本構造を取ることが示唆された。次に、各 apo-NCS 変異体の機能評価として、蛍光偏光度法による評価系により検討した。すなわち、不安定な NCS-chr の代わりに NCS-chr と同様に apo-NCS と結合するエチジウムブロマイド (EtdBr) を擬似クロモホアかつ蛍光トレーサーとし、apo-NCS の濃度関数として、蛍光偏光度及び総蛍光強度を、Beacon2000 蛍光偏光度測定システムを用いて測定した ($\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=617$ nm, 25°C)。

Fluorescence polarization analysis of Wild and apo-NCS mutants

Parameter	ΔFP_{max} (mPU)	ΔIT_{max}	Observed equilibrium dissociation constant (μM)	95% Confidence interval (μM)	Hill slope
Wild (PR49)	155	114	4.39	4.15–4.65	0.92
W39F	146	113	2.07	1.87–2.29	0.97
F52Y	112	141	2.83	2.22–3.61	0.85
S98A	175	116	2.62	2.34–2.94	0.79
S98G	135	145	1.40	1.29–1.53	0.96
S98C	169	102	11.4	9.76–13.4	0.92

その結果、S98Gにおいて、天然型 apo-NCS と比較し解離定数 (Kd) が 1.4 μ M、蛍光強度最大変化量 (Δ IT) 145 と結合力の増大が認められ EtdBr との結合能において機能の向上が示唆された。apo-NCS における 98 番目のアミノ酸は NCS-chr 結合ポケットの入口部にあたり、この部分のアミノ酸を Gly のようにファンデルワールス体積が小さいアミノ酸側鎖に置換することで立体障害が減少したため、EtdBr が apo-NCS 変異体の NCS-chr 結合ポケットに導入され易くなり、apo-NCS の疎水性部分に強力に結合することで溶媒水との相互作用が減少していることを示唆している。しかし、S98C については Kd 値が 11.4 μ M であり、天然の apo-NCS に比較し EtdBr の結合力の減少が認められた。その理由として Cys 残基のファンデルワールス体積が Ser よりも大きく、立体障害が大きくなっており、EtdBr が NCS-chr 結合ポケットに導入されにくくなっていることが示唆される。以上の結果から、天然 apo-NCS における NCS-chr 結合領域の単一アミノ酸を改変しても全体構造は大きく変化させることなく、また反応特異性の異なる蛋白質の創製が可能であることが明らかとなった。

そこで、次に apo-NCS と NCS-chr の結合に関与する 3 領域 14 アミノ酸 (Pro49-Ala50-Asp51-Phe52, Phe76-Leu77-Phe78-Asp79-Gly80, Gln94-Val195-Gly96-Leu97-Ser98) をランダムに改変し apo-NCS 変異体遺伝子ライブラリーを作製した。はじめに、megaprimer PCR 法と overlap extension PCR 法により 3 領域の各アミノ酸をランダム化したランダム化 apo-NCS 変異体遺伝子ライブラリーを作製した。その結果、鋳型 DNA 由来と考えられる非ランダム化クローンの混入が 20% に及んでいたため、次にランダム化効率の上昇を目的とし、megaprimer PCR 法と overlap extension PCR 法に dam メチル化と制限酵素 *DpnI* による DNA 消化を組み合わせる方法を検討した。*DpnI* は GATC 配列のアデニンがメチル化された DNA を選択的に消化するため、DNA アデニンメチル化酵素である dam methylase によりメチル化された DNA は、*DpnI* 消化により除去可能となる。よって、PCR 反応の鋳型 DNA として dam メチル化された DNA を用いた場合、新規に増幅した断片はメチル化されていないために *DpnI* により消化されないが、鋳型 DNA は消化されるため、これを除去することができる。この方法を用いることにより鋳型 DNA のライブラリーへの混入率を低下させることが可能となる。今回、dam メチル化と制限酵素 *DpnI* 消化を用いた方法を用いランダム化 apo-NCS 変異体遺伝子ライブラリーを作製した結果、鋳型 DNA と同様の塩基配列を持つクローンが確認されなかったことから、本法はランダム化ライブラリーの有用な作製ツールとなることが期待される。

続いて作製したランダム化遺伝子ライブラリーを用いファージディスプレイ・バイオパニング法により、非天然クロモホア結合性 apo-NCS 変異体を単離・選別した。今回のモデルリガンドとしては、多くの誘導体が存在するためにタンパク質-低分子間相互作用や結合様式に関する情報が得られ易いという理由から、低分子生理活性物質でありオレアナン骨格を有するグリチルレチン酸 (GA) を用いた。その結果、GA 結合性が付加されたクローン C5-32, C5-37, C5-41, C5-54 が得られた。これらクローンについて塩基配列を決定した。

その結果、GA-BSA コンジュゲートとの結合には、apo-NCS 変異体の 49 ~ 52 番目、76 ~ 80 番目のアミノ酸に対する置換が関与していると推察された。また、これにより apo-NCS をアミノ酸置換するこ

Nucleotide sequences of anti-GA apo-NCS mutants

clones	nucleotide sequence of each amino acid residues														
	Q38	P49	A50	D51	F52	F76	L77	F78	D79	G80	Q94	V95	G96	L97	S98
pR49	CAA	CCG	GCG	GAT	TTT	TTT	CTG	TTT	GAT	GGC	CAG	GTG	GGC	CTG	AGC
C5-32	CAG	CGG	CGC	TAT	GAA										
C5-37	CAG	GTT	TTC	CGG	AGC	TTG	ACC	ATC	CCG	GGC					
C5-41	CAG	TGT	CCG	GGG	GTA	GGT	TCT	ATG	GTG	GCC					
C5-54	CAG	TGT	CCG	GGG	GGT	GGT	TCT	ATG	GTG	GCC					

とにより、天然型 apo-NCS にはない機能を付与しうることが示唆された。次いで、各クローンについて SWISS-PROT により分子モデリングを行い、Swiss-Pdb Viewer プログラム、及び PyMOL プログラムを用い立体構造を確認した。その結果、機能が変化しているにも関わらず、NCS-chr 結合領域のアミノ酸を置換することは、apo-NCS の立体構造に大きな影響を与えないことが明らかとなった。

本研究により、apo-NCS を改変することで、様々な特異性の変化した機能性タンパク質の創製が可能であることが示された。本研究結果は今後、毒性の強い薬物や不安定な薬物のパッキングキャリアーとしての応用など新たな医薬素材としての有用性が期待できると考える。

審査結果の要旨

分子認識に優れる機能性器材の開発は、生命化学、医療等幅広い領域で強く望まれている。なかでも生体由来の抗体は、遺伝子工学を駆使することにより、目的に応じた化合物に対して、目的に応じた親和性を持つ人工の抗体に改変することができることから、多くの注目を浴びている。しかし、分子量が大きく、生体に投与する場合には新たな抗体の産生を惹起することから、さらにヒト型抗体への誘導が必要である。このため、より分子量の小さな機能性器材の開発が望まれている。一方、クロモ蛋白質系抗腫瘍性抗生物質であるネオカルチノスタチン (NCS) は、分子量約 10,000 の一本鎖ポリペプチド (apo-NCS) と、9 員環エンジインを含むクロモフォア (NCS-chr) より構成されており、前者は活性本体である後者のパッキングキャリアー蛋白質としての機能を持つと理解されている。また、その構造は免疫グロブリンの可変領域ときわめてよく似ており、抗体に変わる機能性蛋白質としての有用性も期待されている。本研究では、こうした観点から apo-NCS に着目し、このアミノ酸を置換し、新たな機能を持つ蛋白質への変換に検討を加えた。

まず、apo-NCS 上の結合領域のアミノ酸を置換し、NCS-chr の結合に及ぼす効果に検討を加えた。尚、NCS-chr は、光や熱にきわめて不安定であることから、擬似クロモフォアとして蛍光を持つエチジウムブロミド (EtdBr) を用いた。大腸菌 apo-NCS 発現ベクターを鋳型 DNA として apo-NCS 変異体 (W39F, F52Y, S98G, S98A, S98C) を作製し、CD スペクトルを相互に比較した。その結果、何れも天然の apo-NCS とほぼ同様のスペクトルを与え、結合領域の 1 アミノ酸置換は基本的に同じ三次元構造をとることが判明した。次いで蛍光偏光度法により機能評価を試みた。その結果、S98G において天然型 apo-NCS よりも結合力の増大が認められ、S98C では結合力の大幅な低下が認められた。これは、結合ポケットの入り口にあたる 98 番目のアミノ酸の置換が結合力に大きく影響し、Gly への置換はファンデルワールス体積の減少により立体障害が減少してクロモフォアが入りやすくなったものと考えられる。一方、Cys の導入は、反対に立体障害が増大したため結合力が低下したものと推測される。これらの結果は、1 アミノ酸の変換により結合特異性の異なる蛋白質を創製できることを示したものである。

引き続き、結合に関与する 3 領域の 14 個のアミノ酸をランダムに改変し、非天然型クロモフォア結合性 apo-NCS 変異体を調製し、グリチルレチン酸 (GA) をモデルリガンドとしてその結合能に吟味を加えた。その結果、天然型 apo-NCS の 49 ~ 52 番目と、76 ~ 80 番目のアミノ酸の置換が GA との結合に大きく関与することが明かとなった。

以上、本論文は、apo-NCS を例に取り上げ、その分子認識部位を人工的に改変することにより新たな機能を付与できることを示したものであり、博士 (医療薬学) の学位論文として合格と認める。