

氏 名（本籍） さ とう こう いち
佐 藤 光 市

学 位 の 種 類 博 士（薬 学）

学 位 記 番 号 薬 博 第 4 0 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 0 年 3 月 2 5 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 学 科 専 攻

学 位 論 文 題 目

Cleavable affinity gel による小分子結合タンパク質の特異的抽出
法の構築

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 眞 野 成 康
教 授 永 沼 章
准教授 三 浦 隆 史

論文内容要旨

生体内には、タンパク質や核酸などの生体高分子の他、各種ホルモンなどの様々な生体分子が存在し、それらが互いに関連しながら生体の営みを構成している。このため、分子個々の挙動を把握するのみならず、分子間相互作用を解析することが重要となる。これまでにタンパク質-タンパク質間の相互作用解析法として、two-hybrid 法や免疫沈降法を利用する方法や、アフィニティータグを用いるタンパク質相互作用複合体のプルダウン法が確立されている。しかしながら、生体内には多くの小分子が存在し、それらがタンパク質などの生体高分子と結合してはじめて生理機能を発現することもあるため、小分子-タンパク質の相互作用解析は極めて重要となる。古くから、小分子結合タンパク質の解析には、放射性同位元素を標識した小分子を用いて小分子-タンパク質複合体をゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し、放射活性を有するタンパク質画分を分画する方法が用いられてきた。しかしながら、タンパク質相互の分離能に劣る上、得られる結果が試料中のタンパク質自身の存在量に影響されやすく、例えば存在量がわずかで結合親和力の弱いタンパク質はほとんど検出されない。これに対し、小分子を固定化したゲルを用いるアフィニティー抽出法も広く用いられており、汎用性が高く、比較的結合親和力の弱いタンパク質をも抽出可能なる。しかしながら、特に脂溶性薬物の結合タンパク質を解析する場合、ゲル表面やリンカー部分への非特異的吸着の回避が難しく、小分子結合タンパク質の特定は容易ではない。そこで、こうした課題を解決するため、緩和な条件で切断可能なジスルフィド結合を活用し、これをリンカー部分に含む小分子固定化 cleavable affinity gel を用いる小分子結合タンパク質の特異的プルダウン手法の構築に着手した。

今回、モデル小分子として胆汁酸を用いることとした。胆汁酸は、肝においてコレステロールより合成される脂溶性分子であり、各種キャリアータンパク質や膜トランスポーターの働きにより、効率よく腸肝循環している。胆汁酸はステロイド核上に複数の水酸基を有し、その数や位置、配置により構造が多岐に渡る。また、側鎖末端にはカルボキシル基を有し、そのアミノ酸抱合により酸性度の異なる代謝物に変換される。胆汁酸には種々の結合タンパク質が知られており、例えばラット肝細胞質画分中の 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase や glutathione S-transferase は、古くから胆汁酸と結合することが知られている。また、核内受容体 FXR は、胆汁酸の側鎖抱合形式の違いによる親和力に差は認められないものの、12 α 水酸化体であるコール酸やデオキシコール酸 (DCA) との親和力は低く、このことからステロイドの A, B 環を含む領域を認識している可能性が高い。ヒト肝細胞質画分中の胆汁酸結合タンパク質として知られる dihydrodiol dehydrogenase は、3 α 位水酸基の脱水素活性を示さず、逆に 3 α 位水酸基部分を含む A, B 環の認識能は低いものと考えられる。このように、胆汁酸の結合タンパク質は、それぞれ異なる部分を認識していることから、今回、胆汁酸の 24 位カルボキシル基 (gel A) あるいは 3 位水酸基 (gel B) からジスルフィドリンカーを伸長したゲルを調製し、胆汁酸結合タンパク質の抽出を試みることにした。

はじめに、分子内にジスルフィド結合を有するシスタミンをリンカー分子として用いることとし、胆汁酸固定化 cleavable affinity gel の調製を行った。まず、小分子の物性によらずリンカーを伸長可能な方

法を確立するため、大過剰のシスタミンに対して9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボネートを作用させ、シスタミンのFmoc一分子結合体を調製した。これに対し、胆汁酸の*p*-ニトロフェニルエステル、もしくは胆汁酸の3-オキシメチルエステルと混合し、24位カルボキシル基、あるいは3位水酸基を起点としてリンカーを伸長した。次いで、Fmocを脱保護して生じた一級アミノ基を*N*-ヒドロキスクシンイミジルエステル化アガロースゲルと縮合させることにより、2種のcleavable affinity gelを調製した。

次に、タンパク質分子内部のジスルフィド結合には影響せず、リンカーのジスルフィド結合のみを切断する条件の設定を試みた。はじめに、DCAの側鎖カルボキシル基を起点にリンカーを伸長したgel Aを用い、ジスルフィドリンカーの切断反応条件を検討した。まず、種々の量のジチオスレイトール(DTT)添加時の、上清中に遊離するDCAの2-メルカプトエチルアミン結合体量につき、HPLCを用いて経時的に追跡した。その結果、ジスルフィドリンカーに対して1倍モル量のDTTを用いる場合、反応開始後3時間を経過しても約90%までしか切断されないのに対し、2.5倍モル量の添加では60分間の反応で、また、5倍モル量のDTT添加では40分間でほぼ完全にリンカーが切断されることが判明した。引き続き、本還元反応がタンパク質立体構造に与える影響を精査した。モデルタンパク質として、ジスルフィド結合を多数有し、かつ胆汁酸と 10^4M^{-1} 程度の親和力で結合するマウス血清アルブミン(MSA)を用いた。まず、タンパク質の二次構造に対する影響を検討するため、種々の量のDTTを添加したMSAを円二色性分散分析に付した。その結果、MSAに対して1800倍モル量のDTTを添加しても、 α -ヘリックス構造に特徴的なCDスペクトルパターンにほとんど変化は認められなかった。次に、先と同様の試料につきトリプトファン残基側鎖のインドール環周辺の環境変化に基づく蛍光特性を解析することにより、タンパク質の三次構造変化の追跡を試みた。その結果、10倍モル量のDTTを添加しても蛍光極大座標は変化せず、MSAの立体構造は維持されていることが判った。引き続き、還元剤によるタンパク質分子内部のジスルフィド結合の切断状況を把握するため、質量分析法を用いて解析することとした。すなわち、タンパク質分子表面の遊離のメルカプト基をあらかじめヨードアセトアミドにより保護した後、種々の量のDTTを添加して、ジスルフィド結合の開裂により新たに生じたメルカプト基を4-ビニルピリジンにて修飾した。過剰の試薬を除去後、トリプシンによる酵素消化に付し、得られたペプチド断片混合物をMALDI-TOF MS分析した。その結果、10倍モル量までのDTTの添加によって得られたマススペクトルパターンは、無添加の場合のパターンと完全に一致したのに対し、20倍モル量以上を添加した場合は、DTT添加量依存的に4-ビニルピリジン修飾ペプチドが検出された。このことから、タンパク質分子内部のジスルフィド結合は、10倍モル量のDTTを添加しても維持されていることが判明した。

次に、今回調製したゲルの性能を評価するため、マウス腹水中の抗DCAモノクローナル抗体の抽出を行った。本抗体は、DCAの24位カルボキシル基を介してウシ血清アルブミンと結合した、ハプテン-キャリアータンパク質複合体を免疫源として用いて調製したことから、DCAのステロイド骨格部分を認識する。そこで、DCAの側鎖末端カルボキシル基からリンカーを伸長したgel Aを用いて抽出を試みた。まず、抗DCAモノクローナル抗体を含むマウス腹水とDCA固定化ゲルを混合し、結合タンパク質

を捕捉した。リン酸緩衝液を用いてゲルを洗浄後、DTT 添加により上清中に回収した結合タンパク質を SDS-PAGE に付したところ、3 本のタンパク質バンドが選択的に濃縮された。各バンドをトリプシンを用いるゲル内消化に付した後、生じたペプチド断片混合物を MALDI-TOF MS 分析した。その結果、抗 DCA モノクローナル抗体の H 鎖と L 鎖に加え、MSA が同定された。血清アルブミンは、胆汁酸の血中のキャリアタンパク質として機能しており、胆汁酸に $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ 程度の親和性を示す。一方、抗体分子の H 鎖と L 鎖が別個に検出されたが、それぞれのドメインを連結するジスルフィド結合が抽出操作中で切断された可能性も考えられることから、次に同じ試料を非変性条件下で native-PAGE に付した。その結果、抗 DCA モノクローナル抗体の H 鎖と L 鎖が一本のバンドとして検出され、本法は比較的切断されやすい抗体分子のジスルフィド結合にも影響しないことが明らかとなった。

次いで、ケノデオキシコール酸 (CDCA) を固定化した gel A, および gel B を用いて、HepG2 細胞およびラット肝臓の細胞質画分中の CDCA 結合タンパク質の抽出を試みた。抽出タンパク質試料を SDS-PAGE にて分離後、トリプシンによるゲル内消化に付し、ペプチド断片混合物を MALDI-TOF MS 分析および nanoLC/ESI-MS/MS 分析した。その結果、HepG2 細胞質画分から、dihydrodiol dehydrogenase を含む多数のタンパク質が同定され、またラット肝細胞質画分からも glutathione S-transferase を含む多数のタンパク質が同定された。しかしながら、SDS-PAGE 上の異なるバンドから同一のタンパク質が同定される場合が多く、各タンパク質の量的比較が困難であった。そこで、抽出タンパク質試料をそのままトリプシンにて酵素消化後、生じるペプチド断片混合物を nanoLC/ESI-MS/MS 分析に付し、emPAI 法により各タンパク質量を評価した。その結果、HepG2 細胞由来の細胞質画分からは aldo-keto reductase 1C2 (dihydrodiol dehydrogenase) が明確に検出され、しかも本タンパク質は gel B でのみ特異的にプルダウンされることが判った。一方、ラット肝細胞質画分においては、古くから胆汁酸の結合タンパク質であることが知られている glutathione S-transferase が gel A 選択的に抽出されることが判明した。以上のように、本法はゲル表面やリンカー部分に非特異的に吸着したタンパク質を排除できる上、タンパク質の分子認識能を巧みに利用した、極めて選択性の高い小分子結合タンパク質の抽出法であることが明らかとなった。

今回開発した手法は、標的分子の結合タンパク質のみならず、これに関連する生体分子複合体を一挙にプルダウンできる可能性があり、標的小分子結合タンパク質と相互作用するネットワークパスウェイを解明する上で極めて有用と考えられる。そればかりか、薬物あるいは薬物候補分子をゲルに固定化することにより、薬理作用の発現メカニズムのみならず、副作用発現に関連するタンパク質の特定にも応用可能と考えられる。本法は、生体内の生理活性小分子や新規医薬品候補化合物の探索を行う上で、大いに役立つものと期待される。

審査結果の要旨

薬物や生体内の生理活性小分子の多くは、タンパク質と結合してはじめて機能を発揮するため、それらの分子間相互作用の解析は、薬物や生体内小分子の作用発現メカニズムの理解にきわめて重要となる。タンパク質-小分子相互作用の解析には、小分子固定化ゲルを用いるアフィニティー抽出法が汎用されている。しかしながら、脂溶性薬物の結合タンパク質の解析においては、ゲル表面やリンカー部分への非特異的吸着の影響が大きく、結合タンパク質の特定は容易ではない。本論文は、こうした課題解決のため、緩和な条件下で切断可能なジスルフィド結合をリンカー部分に含む小分子固定化 cleavable affinity gel を新たに開発し、小分子結合タンパク質の特異的プルダウン法の構築を行ったものである。

本研究では、モデル小分子として、生体内で各種タンパク質と結合することが知られている胆汁酸を用いることとした。まず、ステロイド核の A, B 環部分、あるいは側鎖を含む C, D 環部分を主に認識するタンパク質をそれぞれ抽出するため、24 位カルボキシル基、あるいは 3 位水酸基からリンカーを伸張した 2 種のゲルを調製した。次に、本アフィニティーゲルによる結合タンパク質の抽出条件の検討を行った。その結果、タンパク質分子内部のジスルフィド結合を切断せずに、リンカーのみを切断可能な還元反応条件を見出した。しかも、CD スペクトル分析、蛍光分析並びに質量分析法を用いて種々検討したところ、本条件下ではタンパク質の立体構造は維持されていることを明らかにした。次いで、デオキシコール酸 (DCA) の 24 位からリンカーを伸張したゲルを用いて、マウス腹水中の抗 DCA モノクローナル抗体の抽出を試みたところ、複雑なタンパク質混合試料中から抗 DCA 抗体およびマウス血清アルブミンを選択的に抽出できることが判明した。

次に、ケノデオキシコール酸 (CDCA) を固定化した 2 種のゲルを用い、HepG2 細胞およびラット肝臓の細胞質画分中の CDCA 結合タンパク質の抽出を試みた。その結果、HepG2 細胞から、胆汁酸のキャリアータンパク質である dihydrodiol dehydrogenase を含む多数のタンパク質が抽出され、ラット肝細胞質画分の抽出試料においても glutathione S-transferase を含む多くのタンパク質が同定された。しかも、nanoLC/ESI-MS/MS の分析結果から算出した emPAI の比較解析から、多くの CDCA 結合タンパク質は、2 種類のゲルのどちらか一方で選択的に抽出されることが明らかとなった。

このように、本研究は、非特異的吸着の影響を回避し、タンパク質の分子認識能を巧みに利用した、きわめて選択性の高い小分子結合タンパク質のプルダウン手法を提供した。よって、本論文は、生理活性小分子や薬物の結合タンパク質を解析するうえで、大いに役立つものと期待されることから、博士 (薬学) の学位論文として合格として認める。