

3月26日(水) E会場 パシフィコ横浜会議センター 3F 311+312
大学院生シンポジウムGS1 10:00~12:00

プロテオーム情報を活用した創薬戦略

New Drug Discovery Pathway Based on Proteomics and Structural Information

阿部 康弘^{1,2}, 諏訪 喜昭³(¹阪大院薬, ²医薬基盤研, ³熊大院薬)

ポストゲノム時代を迎え、ライフサイエンス研究は遺伝型(遺伝子・ゲノム)から表現型(蛋白質・プロテオーム)の解析へと関心を移している。なかでも、多様な蛋白質の発現様式と生命現象や病態との関連を網羅的に解析しようとするプロテオミクスや、蛋白質の機能と立体構造を体系的に理解しようとする構造ゲノミクスは、今最もホットな研究テーマである。この研究は生命の本質的理解を目指す基礎研究に大きく貢献するだけでなく、予防・診断、分子標的医薬の開発、個別化医療などに於いても重要な可能性を有しており、国民福祉に寄与するところは極めて大きい。その一方で克服すべき多くの課題が存在することも確かであり、よりいっそうの成果と発展が期待されている。そこで本シンポジウムでは、第一線で活躍する独創性の高い各シンポジニストにプロテオミクスの成果とこれからの可能性(創薬への展開)について講演して頂き、討論する予定である。

GS1-1

Ets 転写因子ファミリーによる転写制御機構の構造学的解明

Structural biology of transcriptional regulation mechanisms by the Ets transcription factor family

○諏訪 喜昭¹, 中村 照也¹, 藤間 祥子¹, 池水 信二¹, 甲斐 広文¹, 森岡 弘志¹,
山縣 ゆり子¹(¹熊本大院薬)

Ets 転写因子は、様々な転写を制御することで細胞の分化・増殖・老化・アポトーシスさらにはガン化など様々な生命現象に関わる転写因子群である。Ets 転写因子の1つである Ets2 は、ガンの悪性化や21番染色体トリソミーを原因とするダウン症への関与が示されている。本研究においては、X線結晶構造解析により分子レベルで Ets2 の転写制御機構を解明することを目的とした。Ets2 の DNA 結合ドメイン(Ets domain : ETSD) について、大腸菌発現系を用いた発現、精製、結晶化を行った。得られた高純度タンパク質溶液を用い、Ets2 の標的配列を含む DNA との複合体における結晶化を行い、X線回折実験を行いうる結晶を得る事に成功した。現在、分子置換法を用い立体構造を解析中である。また、ETSD の N 末端・C 末端の両側には、DNA への結合に対して抑制的に働く inhibitory domain (ID) の存在が示唆されている。この ID を含む Ets2ΔN307 も大腸菌発現系による発現、精製を行い、ETSD と併せて Biacore による相互作用解析を行い、決定した解離定数から ID の存在は DNA への結合に対する親和性を減少させていることがわかった。さらに、このΔN307 についても単独ならび標的配列を含む DNA との複合体による結晶化を行った。

今後、立体構造から得られる知見を基に、Ets2 の DNA 認識機構を分子レベルで解明し、その DNA 認識機構および転写制御機構を解明することは、デコイ医薬品の開発や分子設計プログラム MOE 等を用いた低分子化合物の探索に貢献するものと考えられる。入手可能な低分子化合物については、複合体での構造解析ならびに標的 DNA への結合に対する阻害活性等を測定することで、その後の新規医薬品開発に貢献するものと思われる。

GS1-2

ミオグロビンを基盤骨格とした人工酵素の開発

Development of artificial enzymes based on the myoglobin scaffold

○清田 浩平¹, 富杉 佳計¹, 石川 吉伸², 池水 信二², 青山 浩¹, 河原 一樹¹,
大久保 忠恭¹, 宇野 公之¹(¹阪大院薬,²熊本大院薬)

生体には活性中心にヘムを含む一群のタンパク質が存在し、これらはヘムタンパク質と総称される。ヘムタンパク質はガス分子の結合やヘム鉄の酸化還元に関与した多彩な機能を発現するが、その多様性はヘムを取り巻くアミノ酸の違いによると考えられる。そこで、既存タンパク質のヘム周辺アミノ酸を変異させれば、ヘムという共通の要素を利用して新規機能を持つ人工タンパク質を構築できると考えた。

本研究ではミオグロビンを機能改変の基盤骨格として、ペルオキシダーゼ様活性を持つヘム酵素の構築を試みた。ミオグロビンは主に酸素貯蔵機能を担うが、潜在的に弱いペルオキシダーゼ様活性を持つ。そこで、酸素結合に有利なミオグロビンの活性中心の構造を基質がアクセスしやすいように改変した四重変異体 H64V/V68H/H93A/H97F (VHAF) と H64V/V68H/H93A/H97A (VHAA) を作成した。これらのX線結晶構造解析を行った結果、変異体は野生型と同様の三次元立体構造を保持したままヘムが溶媒側に露出した構造を持つことがわかった。さらに、ペルオキシダーゼ様活性を測定したところ、野生型に比べてVHAAではVmaxが6倍に、Kmが1/45になったことから、反応効率が270倍に上昇したことがわかった。

以上の結果から、ミオグロビンを利用することで既存タンパク質の構造的枠組みを超えた人工ヘム酵素が構築できることがわかった。タンパク質はその機能を自由にデザインすることで新しい分子素材として利用できる可能性を秘めている。このような機能改変タンパク質は、医薬品の不斉合成触媒として、あるいはタンパク質性製剤として創薬分野に大きく貢献できるものと期待される。

GS1-3

NMRによるディスコイディンドメイン受容体2のコラーゲン結合様式の解明

Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2

○市川 治^{1,2}, 大澤 匡範¹, 西田 紀貴^{1,2}, 五島 直樹³, 野村 信夫³, 嶋田 一夫^{1,3}
(¹東大院薬,²JBIC・生物情報解析研究セ,³産総研・生物情報解析研究セ)

コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な構成成分であり、不溶性かつ不均一な繊維を形成する。コラーゲン繊維は細胞間隙を充填するだけでなく、コラーゲン受容体との相互作用を介して細胞を制御する。ディスコイディンドメイン受容体2 (DDR2) は、コラーゲンをリガンドとする受容体型チロシンキナーゼである。DDR2 は、細胞の増殖、遊走などの生体機能および腫瘍細胞の転移などの疾患に関与している。DDR2 の活性化は、細胞外のディスコイディン (DS) ドメインがコラーゲン繊維と結合することで誘起される。DDR2 のコラーゲン認識様式を解明するためには原子レベルでの解析が不可欠である。しかしながら、コラーゲン繊維の不溶性・不均一な特徴が解析の大きな妨げとなり、これまで構造生物学的な知見はほとんど得られていない。本研究において、我々は核磁気共鳴法を用いて DS ドメインの立体構造を決定し、さらに転移交差飽和法により繊維状コラーゲンの結合部位を明らかにした。DS ドメインの構造は 8 本の β -ストランドを含む β バレル構造であり、その β バレル骨格の上面に 6 本のループが並列して存在する。コラーゲン結合部位は疎水性残基に囲まれた荷電性残基で形成されるループ間の溝であった。コラーゲン結合部位の特徴から、DDR2 が維状コラーゲンの特異的な部位を認識することが示唆された (Ichikawa, et al., *EMBO J.* (2007) 26, 4168–4176)。今後、立体構造と相互作用部位の特徴を基に DDR2 阻害剤を合理的に分子設計することで、抗ガン剤の開発への応用が期待される。

GS1-4

疾患関連蛋白質の同定およびこれらに対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる抗体プロテオミクスの確立 Establishment of antibody proteomics for identification of disease-related proteins and high-throughput isolation of monoclonal antibodies

○今井 直^{1,2}, 角田 慎一^{2,3}, 中川 晋作¹, 堤 康央^{1,2,3} (1 阪大院薬,² 基盤研,³ 阪大 MEI セ)

近年、健全状態と比較して、疾患状態で発現変動している疾患関連蛋白質を二次元ディフュージョン電気泳動(2D-DIGE)法等により解析・同定しようとする疾患プロテオミクスが注目されている。しかし一般に、一疾患当たり、数百から数千種類もの疾患関連蛋白質が同定されてくるため、この情報を有効活用し、画期的創薬を実現していくためには、これら疾患関連蛋白質の中から、創薬ターゲットとして価値のある蛋白質を絞り込んでいくことが最重要ステップとなる。しかし現状では、国内外を問わず、創薬ターゲットを効率よく絞り込む基盤技術の開発に成功したという例は皆無に等しい。この点我々は、数多くの疾患関連蛋白質を同定すると同時に、これら疾患関連蛋白質に対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる基盤技術(抗体プロテオミクス)を先駆けて確立した。この抗体プロテオミクスは、2D-DIGE 解析等から単離された僅か数 ng 程度ずつしかない数多くの疾患関連蛋白質に対して、2 週間程度で特異性に優れる抗体(ファージ抗体)が得られるため、抗体を用いた組織アレイ解析等により、疾患関連蛋白質の発現プロファイルや局在解析等の“疾患関連蛋白質と疾患の発症・悪化との関連解明”が迅速に行える唯一の基盤技術と言える。そのため、抗体プロテオミクスを適用すれば“蛋白質の機能解析”に基づいた“絞り込み”が、ハイスループットに行える点で他を圧倒しており、さらに得られた抗体はそのまま抗体医薬として診断・治療にも展開し得ることを認めている。本シンポジウムでは、“乳がんの抗体プロテオミクス”に焦点を絞り、その現状と将来展望を詳細に紹介させて頂く。

GS1-5

プロテオーム情報に基づく筋萎縮性側索硬化症の創薬戦略：細胞内の銅不均衡をターゲットとした創薬 An approach to drug discovery for amyotrophic lateral sclerosis based on proteomic information: intracellular copper dysregulation is a potential drug target

○徳田 栄一¹, 小野 真一^{1,2}, 石毛 久美子¹, 伊藤 芳久¹, 鈴木 孝^{1,3}
(¹ 日本大学薬学部,² 公立阿伎留医療センター,³ 日本大学医学部)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は進行性の骨格筋麻痺をきたす予後不良な運動ニューロン疾患である。ALS の一部では Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の変異が見出されている。変異 SOD1 は酵素活性の低下ではなく、未知の毒性の獲得 (gain of toxic-function) により運動ニューロン死を導くとされる。

変異 SOD1 の未知の毒性を同定することは、ALS の病態解明および治療薬開発の突破口となり得る。プロテオーム解析はたん白質の網羅的解析が可能のため、未知の毒性を同定するうえで、非常に有効な手法である。

レドックスプロテオミクス解析はたん白質のレドックス状態を網羅的に解析できる手法である。この解析により、ALS モデルマウス (G93A) の脊髄では変異 SOD1 自身が酸化修飾を受けていることが示されている。さらにこの酸化修飾には Cu が密接に関与していることが明らかとなった。

これら知見に基づき、我々は選択的 Cu キレート剤の tetrathiomolybdate (TTM) を G93A に投与する randomized blind study を行い、ALS 様症状 (麻痺発症、進行および生存期間) の全てに奏効することを見出した。中でも、生存期間は ALS 唯一の治療薬 riluzole の 2 倍以上の成績であった。

本シンポジウムではポストゲノム研究の1つとして、プロテオーム情報に基づき、細胞内の Cu の不均衡をターゲットとした創薬や疾患メカニズム解明を目指したライフサイエンス研究について述べる。

プロテオミクス創薬の実現に叶う機能性人工蛋白質の迅速創出技術の開発**Development of a high-throughput system for creation of functional mutant proteins useful for pharmaceutical proteomics**○阿部 康弘^{1,2}, 向 洋平^{1,2}, 角田 慎一^{1,3}, 中川 晋作², 堤 康央^{1,3}(1 基盤研,² 阪大院薬,³ 阪大 MEI セ)

創薬プロテオミクスを効果的かつ効率よく推進するためには、数多くの疾患関連蛋白質候補の中から、疾患の発症や悪化に関わる“創薬ターゲット”、あるいは疾患の治療に関わる“医薬品シーズ”を迅速に絞り込む画期的テクノロジーの新規開発が不可欠となっている。この点我々は、本シンポジウムで別途講演する“抗体プロテオミクス”に加え、ファージ表面提示法を駆使した独自の機能性人工蛋白質創出技術による、蛋白質機能のハイスループット解析法の確立を先駆けて進めている。本方法は、プロテオーム解析で絞り込まれてきた“個々の創薬ターゲットあるいは医薬品シーズ候補の蛋白質”について、数千万種類以上もの構造変異体(アミノ酸置換体)ライブラリを 1 週間以内に作製し、それら変異体のリガンド・レセプター結合の親和性・指向性といった機能情報を迅速かつ網羅的に集積可能とするものである。これによって得られる体系的な“蛋白質の構造-活性相関情報”は、構造ゲノミクスのさらなる進展や、バイオインフォマティクスなどを利用した低分子医薬の分子設計など、創薬を指向したプロテオミクス研究を強力に推進するものである。また本方法を用いることで、膨大な変異蛋白質ライブラリの中から、レセプター指向性・親和性に優れた人工蛋白質(アゴニスト)、さらには蛋白性アンタゴニストをも初めて創出することに成功し、これら人工蛋白質が機能解析ツールとしてのみならず、そのまま医薬品としても有用であることを認めている。本発表では、腫瘍壊死因子(TNF)のレセプター指向性アゴニスト・アンタゴニストの創製と TNF の機能解明を目指した研究を一例として、上記基盤技術を紹介する。