

氏名（本籍）	關口 光広 （ 東京都 ）		
学位の種類	博 士（ 生物工学 ）		
学位記番号	博 乙 第 2685 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	創薬加速化のためのタンパク質リガンド相互作用解析における熱分析技術の開発		
主査	筑波大学教授	理学博士	繁森 英幸
副査	筑波大学教授	工学博士	王 碧昭
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	山田 小須弥

論 文 の 要 旨

創薬を進める上で、ターゲットとなるタンパク質との医薬品候補化合物の相互作用を明らかにすることは、mode of actionの解明、構造活性相関研究、副作用の推測など様々な重要な情報を得るために必要不可欠である。低分子とタンパク質の相互作用解析を行う物理化学的な手法としては、表面プラズモン共鳴(SPR)、核磁気共鳴(NMR)、X線結晶構造解析、熱分析的な手法など様々存在する。熱分析を利用する解析としては、熱力学的手法の示差走査型カロリメーター(DSC)および等温滴定型カロリメーター(ITC)、蛍光を利用する手法のdifferential scanning fluorometry(DSF)などがあり、これらは他の手法と比べて、①ラベルフリーで実験可能②非特異吸着の判別が可能③タンパク質使用量がNMRや結晶構造解析より少ない、などの利点がある。そこで、本研究においては、創薬加速化へつながる効果的な熱分析の手法の確立を目指し、2つのターゲットタンパク質、FKBP12およびPXRに対する相互作用解析を実施した。

1. FKBP12とmTOR融合タンパク質とリガンドの熱分析および構造生物学的な解析を利用した効果的な評価法の確立

FK506やrapamamycinはイソメラーゼであるFKBP12に結合する。しかしそれだけでは活性は得られない。このタンパク質リガンド複合体が、さらに他のタンパク質calcineurinやmTORと結合することによってそのシグナル伝達を阻害し、免疫抑制作用や抗がん作用を発現するユニークな作用機序を有している。そこで、抗がん剤の創薬をめざし、ligandがFKBP12に結合した後に、mTORに結合するか否かを判別する物理化学的なスクリーニング方法の確立を目指した。FKBP12とmTORの融合タンパク質を作成し、NMRとDSCによる解析を実施した。その結果、容易に1度の実験でFKBP12のみと結合する化合物とFKBP12およびmTORと3者複合体を形成している化合物を判別する方法を確立した。

2. 酵素誘導を担うタンパク質PXRとリガンドの創薬加速化を目指した熱分析評価法の確立

PXRはヒトの薬物代謝の主要な酵素であるCYP3Aを誘導するタンパク質として知られている。PXRへの結合を評価することは、その薬物の代謝に大きく影響を与えるため、早期に把握しておくことが必要である。既存のreporter gene assayは細胞系で実験していることから様々な制限があり、物理化学的な相互作用解析測定法が必要であった。そこで

PXRタンパク質を作成し、熱力学相互作用解析を用いて評価した。その結果、DSCを用いることでreporter gene assayと同等の結果を得ることが出来た。しかし一方でDSCはスループットが高くはなく、初期のスクリーニング向きではないため、高いスクリーニング能力を有するDSFを検討した。本来DSFではPXRのような疎水性の大きなポケットを有するタンパク質においてはDyeと競合してしまうため利用が困難である。そこで、新しいパラメーター $(dF/dT)_{50}$ (蛍光強度の温度変化あたりの変化が初期状態と比較して半分になるリガンド濃度)を定義し、本数値の適応を検討した。その結果、 $(dF/dT)_{50}$ の値はDSCの T_m やreporter gene assayの EC_{50} と高い相関性を得ることが出来た。これによりDSFを用いて高いスループットでPXRとの相互作用解析が可能になり、初期のCYP3A誘導評価を物理化学的な方法で可能にした。

以上の結果より、FKBP12およびPXRにおける熱分析を利用したタンパク質リガンド相互作用解析から、創薬加速化へつなげる効率的なスクリーニング法を作成した。

審 査 の 要 旨

本研究は、創薬を進める上で、ターゲットとなるタンパク質との医薬品候補化合物の相互作用を迅速に解析するための手法として熱分析技術(DSCやDSF)を開発した研究に関する報告である。本研究では、DSCやDSFを用いてFKBP12およびPXRとの相互作用を解析した結果、従来の分析法では解析できなかったものが解析でき、また、従来法よりも迅速で効率良く解析することに成功していることから、評価に値する。これらの分析法を用いることにより、効果的なスクリーニング法を創作すれば、目的の相互作用を有する医薬品候補化合物の探索を効率的に実施できることを示しており、今まで困難であった安定性の低いタンパク質や疎水性の高いタンパク質に対しても解析が可能になると期待される。したがって、本研究成果は医薬品開発に関わる生命産業の発展に大いに寄与するものと思われる。

平成26年 1月 28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(生物工学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。