

1pS2-PM1 コンビナトリアル・バイオエンジニアリングによる新しい医薬品設計

○藤井 郁雄
(阪府大・先端研)

21世紀に入るとともに、ヒトの遺伝子構造のほぼ全容が明らかにされた。ヒトゲノムがもつ3-4万個のうち約半数は機能不明のタンパク質をコードするといわれており、現在、ゲノムから翻訳されるタンパク質の網羅的な解析を目指す大規模プロジェクトがはじまっている。これにより、医薬品のターゲットとなるタンパク質の種類も数も劇的に増える。そこで、この急速なプロテオーム解析研究に対応して、いち早く医薬品開発に結びつけるための新技術の開発が求められている。われわれは、天然にはない新しい機能を持つ生体分子の創出に向けて研究を進めており、免疫システムにみられるように、分子多様性(ライブラリー)を構築し、その中から、目的とした機能分子を効率的に選別する手法を開発している(コンビナトリアル・バイオエンジニアリングと呼ぶ)。これまで、ファージ抗体のライブラリーを用いて、抗体タンパク質の高機能化に成功し、現在、このコンビナトリアル・バイオエンジニアリングを機能性ペプチドの創出に展開している。今回は、ファージ・ディスプレイ・ライブラリーとペプチド立体構造設計を組み合わせた新しいドラッグ・デザインの手法について報告する。立体構造(a-helix, helix bundle, b-sheet, zinc fingerなど)をもつペプチドのライブラリーからスクリーニングされてくる活性ペプチドは、標的タンパク質との相互作用に必要なファーマコフォアの3次元情報を与えるので、それをもとに低分子医薬品を設計することが可能になる。

1. 2次構造モチーフ・ペプチド・ライブラリー

近年、コンビナトリアル・ライブラリーを用いるリード化合物探索法が、医薬品開発の有用な方法になってきている。種々のペプチド・ライブラリーが作製され、受容体アンタゴニストなどが見だされてきている。しかし、従来のライブラリーでは、個々のペプチドがフレキシブルな構造を持つため、エントロピーの損失が大きく高い結合活性や生物活性を期待するのが難しい。また、フレキシブルなペプチドからはファーマコフォアの3次元情報が得られず、低分子化合物の分子設計に繋がらない。そこで、このような問題を解決するために、立体構造をもつペプチド・ライブラリーを作製するための方法論を開発した。これにより、高い生理活性ペプチドを見いだすと同時に、低分子化するための3次元構造情報を得ることが可能になる。

立体構造をもつペプチド・ライブラリーとしてα-ヘリックス構造ペプチドのライブラリーを構築した。ライブラリーの土台にはヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチドを用いた。このペプチドは3つの領域で構成される(a.14アミノ酸残基からなる構造支持領域、b.グリシン7残基からなるループ、c.14アミノ酸残基からなるライブラリー領域)。このペプチドは疎水および静電相互作用により寄り添い安定なヘリックス・ループ・ヘリックス構造を形成しているため、外側のアミノ酸残基をライブラリー化することができる。

2. G-CSF受容体結合性ペプチド

上記ヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチドの外側のアミノ酸5残基をランダム化したライブラリーを、多価のファージ・表面タンパク質(gVIIIp)上に提示させた。このファージ・ライブラリーをマウス G-CSF 受容体に対してスクリーニングしたところ、特異的結合性のペプチドを得ることに成功した。また、これら安定なヘリックス構造を持つペプチドは、濃度依存的に細胞増殖を阻害した。

Drug design based on combinatorial bioengineering

○Ikuo FUJII
(RIASI, Osaka Pref. Univ.)

Key words peptide, phage display, combinatorial chemistry, cytokine

1pS2-PM2 細菌におけるタンパク質のサブセルラーレベルでの局在解析

○関口 順一
(信州大・繊維・応生科)

細菌、特にグラム陽性細菌のモデル生物である枯草菌に於いて、タンパク質のサブセルラーレベルの局在化解析について著者らの研究を中心に展望する。

(1) GFPとの融合

蛍光物質GFPとの融合タンパク質を作り、蛍光顕微鏡で観察する方法である。胞子形成細胞におけるタンパク質の局在化解析に用いた例を紹介する。VegとGFPとの翻訳融合タンパク質をつくり、蛍光部位を観察したところ、今まで栄養細胞で存在すると考えられていたVegタンパク質が、胞子形成期にも認められた。さらに詳細に検討したところ、胞子のコアーに強い蛍光が認められた。この遺伝子の発現をGFPとの転写融合タンパク質を構築して検討したところ、胞子のフォースポア側でのみ転写されていた。ノーザン解析とプライマーイックステンション解析より、vegはハウスケーピングのシグマAで転写される遺伝子であったが、胞子形成期においては母細胞側では発現しないこの結果は興味深い。本技法を多糖脱アセチル化酵素(PdaA)に適応した結果、PdaAは胞子中に存在するとともに、この酵素欠損が胞子発芽を完全に停止させることを明らかにした。

タンパク質相互作用の研究に酵母 2- ハイブリッドシステムやビアコアを使った方法が良く知られているが、Dingらは最近、相互作用する一方のタンパク質を細胞の両極に局在化させるドメインと融合し、もう一方の相互作用するタンパク質は GFP と融合し、相互作用した場合のみ細胞の両極にGFPの蛍光が見られることを示した。

(2) 3xFLAGペプチドとの融合

抗FLAGペプチド抗体と、FITC-コンジュゲートさせた2次抗体を用いて蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察する方法である。本方法は細胞壁結合タンパク質の解析に特に有効であり、細胞分離にかかわるLytF(CwlE)、LytE(CwlF)は予想通り細胞分離部位と両極に局在が認められた。一方自己溶解酵素であるLytC(CwlB)は細胞全体に局在が見られた。またLytFの局在をミニセル形成変異株で調べたところ、ミニセルとの分離部位に強い蛍光が見られた。さらに局在ドメインがLytF、LytEと同じLysMドメインを持つ新規細胞壁溶解酵素 YojL も細胞分離部位及び両極に蛍光が認められた。yojL 遺伝子を細胞分離遺伝子と多重に欠損させた場合、極度の綿状の形態を示した。本技法を他の細胞表面タンパク質に利用したところ、機能未知のYoeBが細胞分離部位と両極に局在することが解った。

3xFLAG ペプチドは小さいため、分泌後の局在を見る場合も、分泌過程が律速になりにくいと思われるが、FLAG断片中にはアスパラギン酸の割合が多いため融合タンパク質の等電点が著しく下がることもあり、注意が肝要である。またプロテアーゼの影響はGFPの場合より少ないが、それでもかなりの影響が認められた。

(3) その他

J. Errington らによる細胞骨格タンパク質 MreB ファミリーの局在解析に使われた抗生物質バンコマイシンの蛍光誘導物質の例などを紹介するとともに、今後を展望する。

Subcellular localization of proteins in bacteria

○Junichi SEKIGUCHI
(Dept. Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, GFP, fluorescent microscopy, cell wall