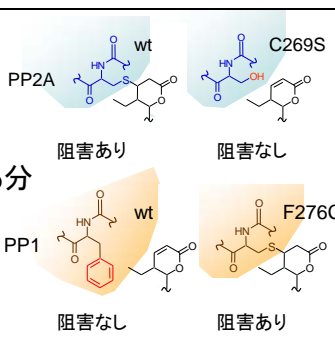


ディビジョン番号	7
ディビジョン名	天然物化学・生命科学

大項目	2. 生物系天然物化学
中項目	2-4. 活性天然物および医薬品による作用発現の分子機構
小項目	2-4-1. 化学生物学の基礎および応用研究

<p>概要</p> <p>慢性骨髄性白血病治療薬であるグリベック、そして免疫抑制剤の FK506 は、薬剤がどのような分子と結合することで作用発現しているか、その分子機構の解析が重要なステップとなった。本稿では、今、盛んに研究されている化合物の作用発現に関する分子機構解析の現状と最前線のデータをホスファターゼ阻害剤であるホスラクトマイシンを例に紹介し、さらに、タンパク質に結合する化合物を網羅的に取得する手法について紹介する。</p>	
<p>現状と最前線</p> <p>ヒトゲノムの解読が完了し、今後はその情報を人類の健康と生活レベルの向上にいかにつけていくのが課題である。そのような状況で今、注目されているのが化学と生物学の融合領域“ケミカルバイオロジー”である。実際に、これまでも化学が生物学・医学に果たした役割の大きさは甚大である。例えば、慢性骨髄性白血病治療薬である STI571 (商品名：グリベック)、そして免疫抑制剤の FK506 が特筆すべき例である。この成功のためには、阻害剤がどのような分子と結合することで作用発現しているか、その分子機構の解析が重要なステップとなる。また、医薬品ではなくても阻害剤が作用発現する分子機構を明らかにした結果、研究試薬として利用されている化合物は枚挙にいとまない。</p> <p>ホスラクトマイシン類は、今から 20 年以上前に理化学研究所・抗生物質研究室を含む複数の研究室で単離された抗真菌物質である (Uramoto, M. <i>et al. J. Antibiot.</i>, 38, 665, 1985; Fushimi, S. <i>et al. J. Antibiot.</i>, 42, 1019, 1989; Ozasa, T. <i>et al. J. Antibiot.</i>, 42, 1331, 1989; Kohama, T. <i>et al. J. Antibiot.</i>, 46, 1503, 1993)。その後、ホスラクトマイシンがプロテインホスファターゼ 2A の特異的阻害剤であることが明らかになった (Usui, T. <i>et al. J. Biochem.</i>, 125, 960, 1999)。一方、ホスラクトマイシン類はα, β-不飽和ラクトンを持つことから標的分子のシステイン残基と共有結合することが予測された。そこでホスラクトマイシン A のビオチン化体を作成し、細胞内結合蛋白質の検索を行ったところ、プロテインホスファターゼ 2A の触媒サブユニットがホスラクトマイシン結合タンパク質として同定された。さらに変異体を作製した結果、活性中心近傍の 269 番目のシステインのセリン変異タンパク質 (C269S) との結合が見られなくなった。(Teruya, T., <i>et al. FEBS Lett.</i>, 579, 2463, 2005)。</p>	

また変異プロテインホスファターゼ 2A (C269S) のホスファターゼ活性をホスラクトマイシンは阻害できなかつた。興味深いことにセリン・スレオニンホスファターゼの活性中心近傍は保存性が高く、他のプロテインホスファターゼ 2A ファミリー (PP4, PP6 など) ではないずれも結合部位であるシステインが保存されているのに対し、プロテインホスファターゼ 1 ではこの残基がフェニルアラニンになっており、ホスファターゼに対する選択性が 1 アミノ酸残基の違いによることが推測された。そこで次に、

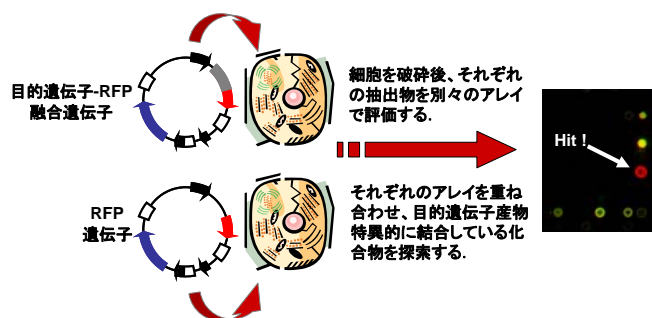
プロテインホスファターゼ 1 内のこのフェニルアラニンをシステイン残基に置換するとホスラクトマイシンで阻害されるようになるか否かを検討した。その結果、野生型プロテインホスファターゼ 1 をホスラクトマイシンは阻害できないのに対し、変異型プロテインホスファターゼ 1

		ホスラクトマイシン結合部位			
		β12		β13	
PP1α	263	LVTLL	FSAPNYCGEFDNA	GAMMSV	DETL..
PP2Aα	256	VVTI	FSAPNYCYRCGNQ	AAIMEL	DDTL..
PP4	253	VLTV	WSAPNYCYRCGNV	AAILEL	DEHL..
PP6	252	LVTV	WSAPNYCYRCGNI	ASIMVF	KDVN..
PP2Bα	332	LITI	FSAPNYLDVYNNK	AAVLKY	ENNV..
PP5	435	CVTV	FSAPNYCDQMGNK	ASYIHL	QGSD..
PP7	418	VVTI	FSASNYEEGSNR	GAYIKL	CSGT..

(F276C) はホスラクトマイシンに阻害されるように変化した。以上のことから、ホスラクトマイシンはプロテインホスファターゼ 2A の β12 と β13 ループ間のシステイン 269 に共有結合することがその阻害に重要であるが、プロテインホスファターゼ 1 ではそのアミノ酸がフェニルアラニンになっているためにホスラクトマイシンがアクセスできずに酵素活性を抑制できないものと考えられる。

次に、天然化合物とタンパク質の結合をスクリーニングする最新の手法を紹介する。我々はガラス基盤の上に低分子化合物を“官能基非依存的”に固定化する技術を開発してきた。昨年、米国から目的タンパク質を精製せずに、低分子マイクロアレイ上で評価する報告がなされ (Bradner, JE, *et al. Chem. Biol.*, 13, 493, 2006)、我々も従来の技術と組み合わせること

で、より効率的な探索系の確立に着手した。すなわち、目的とするタンパク質と RFP タンパク質を融合させた形でヒト細胞に発現させ、細胞抽出物のまま化合物アレイ上で目的タンパク質と天然物化合物の結合を検出する。この技術により、タンパク質と化合物の組み合わせが数万から数十万、迅速に解析できるようになった。



将来予測と方向性

- ・ 5 年後までに解決・実現が望まれる課題

日本国内における化合物バンクの確立と、活性天然物とタンパク質との相互作用を解析する人材の確保。

- ・ 10 年後までに解決・実現が望まれる課題

日本国内における化合物バンクのさらなる発展と、化合物—タンパク質相互作用のデータベースの共有化。

キーワード

活性天然物、ケミカルバイオロジー、低分子マイクロアレイ、プロテインホスファターゼ

(執筆: 清水 史郎、長田 裕之)