

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710244

研究課題名(和文)非共有結合相互作用を有する小分子化合物の標的同一・作用解析研究

研究課題名(英文)Research on the target identification and mechanism analysis of low molecular weight compound

研究代表者

南雲 陽子(NAGUMO, YOKO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：70373339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：人体に有益な作用を有する小分子化合物の実用化には、標的の同一や作用機構の確認が必要不可欠になっているが、それらは煩雑であったり困難なことが多い。そこで本研究では小分子化合物の標的分子解明に有効で、かつ化合物側に低侵襲な方法の開発を検討した。個々の化合物で無限に変わりうる化学構造を誘導化するのではなく、小分子化合物・標的分子複合体の検出方法を工夫することとした。抗体は化合物の無限の構造バラエティに適応しうる分子であり、化合物の種々部分構造を認識できる可能性を有している。そこで、化合物の構造要素を認識する抗体を調製し、小分子化合物・標的分子複合体の検出・解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The target identification and mechanism validation of a small compound is important but difficult step. To improve methods concerned, we utilized the antibody, which can recognize a variety of compound structures. We prepared anti-low molecular weight compound antibodies and applied it to target detections.

研究分野：化学生物

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：分子標的探索 生理活性物質 生物分子科学

1. 研究開始当初の背景

生理活性物質、中でも天然から得られ、人体に有益な作用を示す小分子化合物は、古くから薬として利用されてきた。古典医学ではその多くが経験的に有用と判断され、利用されてきたが、近代医学で利用される薬剤は、化学的性質や薬物動態、作用と副作用のバランス、動物実験を含む治験により、その有用性が証明されなければならない。特に最近では Evidence-based medicine の流れにより、薬剤の実用化には標的の同定や作用機構の確認が必要不可欠になっている。

しかしながら標的分子の同定は煩雑で困難なことが多いステップである。その理由として、化合物をビオチンなどでラベル化し物理的相互作用をもとに標的分子を釣ってくる場合、1) 小分子化合物の活性を失わないよう誘導化するためには、まず構造活性相関研究が必要であること、2) それゆえおのおのの化合物ごとに検討する項目が多く、手法の一般化が難しいこと、3) 誘導化できた場合でも標的分子の特定が必ずしも成功するとは限らないこと、などがあげられる。

2. 研究の目的

本研究では上記の問題解決のため、小分子化合物の標的分子・結合様式解明に有効で、かつ化合物側に低侵襲な方法の開発を検討することとした。そのために、1) 化合物の誘導化を無くす、もしくは最小限に抑える、2) 種々小分子化合物に一般化できる、といった条件を満たす手法の開発を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、個々の化合物で無限に変わりうる化学構造を誘導化するのではなく、小分子化合物・標的分子複合体の検出方法

を工夫することとした。この目的に適した検出系として化合物の無限の構造バリエーションに適応しうる分子である抗体が挙げられる。抗体は多種多様なレパートリーと、抗原に対する特異性親和性(結合反応の結合定数は 10^{-5} ~ 10^{-11} M⁻¹の範疇にある)から、化合物の種々部分構造を認識できる可能性を有している。したがって、様々な構造要素を認識する抗体を用意することで、小分子化合物・標的分子複合体を検出できると考えられる。

上記に基づき小分子化合物を対象に、標的分子の効率的探索法、結合様式解析法の検討を行うため、1) 抗小分子抗体を取得、2) 小分子化合物と標的分子複合体を抗小分子抗体で検出することによる標的分子の特定、3) 小分子化合物と標的分子の結合様式の解析、を検討する。

4. 研究成果

まずはポリクローナル抗体の調製を行った。小分子化合物に対する抗体を作成するうえで問題となるのは、その抗原性の低さである。しかし単純な小分子化合物自体で免疫応答を引き起こさなくても、タンパク質と結合すると免疫応答を引き起こすようになることが知られている。そこでモデル化合物である Rhizoxin を KLH タンパク質と conjugate し、ウサギポリクローナル抗体調製を検討した。複数のウサギに異なる抗原濃度と免疫回数で免疫し、Rhizoxin と BSA の conjugate を用いて血清の抗体価を適宜モニターした。得られた血清の反応性を各種抗原を用いて ELISA 法で評価し、Rhizoxin 部分を認識すると考えられるポリクローナル抗体を得た。また KLH を認識する抗体をできるだけ除去する検討等も行った。

Rhizoxin を認識するポリクローナル抗体が得られたので、Rhizoxin とその標的分子

子 tubulin の複合体の検出を試みた。まず Rhizoxin と tubulin の複合体形成条件を検討した。その際、Rhizoxin が tubulin と共有結合すると示唆される条件で、抗 Rhizoxin 抗体による検出ができた。このことから、Rhizoxin が tubulin と共有結合により結合することが示唆された。Rhizoxin が tubulin と共有結合するという報告はこれまでになく、これは抗 Rhizoxin 抗体がなければ見出すのが困難だったと考えられる。また Rhizoxin-tubulin 複合体の抗低分子抗体による検出ができたことになる。

次に Rhizoxin-tubulin 結合部位の解析を行った。まず Rhizoxin 類縁体を用いて tubulin との複合体の抗体検出を検討したところ、ある化学構造がない類縁体では抗 Rhizoxin 抗体による検出効率が顕著に低まった。抗体の認識能力の違いの可能性もあるが、この化学構造をもって tubulin と共有結合している可能性が示唆された。さらに非標識 Rhizoxin の結合部位を特定する検討を行った。タンパク質はラベル化されると、その pI や泳動パターンが変わる可能性がある。そこで Rhizoxin-tubulin 複合体を調整し、二次元電気泳動で Rhizoxin ラベル化された tubulin のみの分離・検出を試みた。これまでにいくつかのデータが得られており、その結果に基づき結合部位モデリングを行った。現在は MS による結合部位解析を検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

下記の発表論文は、全て査読有り。

1. Yuka TARUI, Takumi CHINEN, Yoko NAGUMO, Takayuki MOTOYAMA, Toshiaki HAYASHI, Hiroshi HIROTA, Makoto MUROI, Yasuyuki ISHII, Hisae KONDO, Hiroyuki OSADA and Takeo

USUI. Terpendole E and its derivative inhibit STLC- and GSK-1-resistant Eg5. *ChemBioChem* **15**, 934-938 (2014).

2. Tomoko SHIOBARA, Takeo USUI, Junkyu HAN, Hiroko ISODA, Yoko NAGUMO. The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin. *PLoS ONE*, **8**, e79954 (2013), DOI: 10.1371/journal.pone.0079954.
3. Takumi CHINEN, Sayaka KAZAMI, Yoko NAGUMO, Ichiro HAYAKAWA, Akiyuki IKEDO, Masatoshi TAKAGI, Akihito YOKOSUKA, Naoko IMAMOTO, Yoshihiro MIMAKI, Hideo KIGOSHI, Hiroyuki OSADA, Takeo USUI. Glaziovianin A prevents endosome maturation via inhibiting microtubule dynamics. *ACS Chem. Biol.* **8**, 884-889 (2013).
4. Andrew SIMS, Annelien ZWEEMER, Yoko NAGUMO, Dana FARATIAN, Morwenna MUIR, Michael DODDS, Inhwa UM, Charlene KAY, Max HASMANN, David HARRISON, Simon LANGDON. Defining the molecular response to trastuzumab, pertuzumab and combination therapy in ovarian cancer. *British. J. Cancer*, **106**, 1779-1789 (2012).

[学会発表](計 3件)

1. Yoko NAGUMO, Andrew SIMS, Annelien ZWEEMER, Dana FARATIAN, David HARRISON, Simon LANGDON. Mode of action of anti-HER2 antibodies in ovarian cancer. 日本薬学会大133年会、2013年3月30日、パシフィコ横浜(神奈川県)
2. 塩原 智子、臼井 健郎、韓 峻奎、磯田 博子、南雲 陽子、Capsaicin による可逆的タイトジャンクション開口メカニ

ズムの解析、日本農芸化学会、2013
年3月25日、東北大学（仙台）

3. Yoko NAGUMO, Junkyu HAN and Hiroko ISODA. Extacting Various Functions from Food Ingredients: Case Study about Capsaicin. Tunisia-Japan Symposium on Science, Society and Technology (TJASSST)、2012年11月17日、Hammamet (Tunisia)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~usui/study/top.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

南雲 陽子 (NAGUMO, YOKO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：70373339