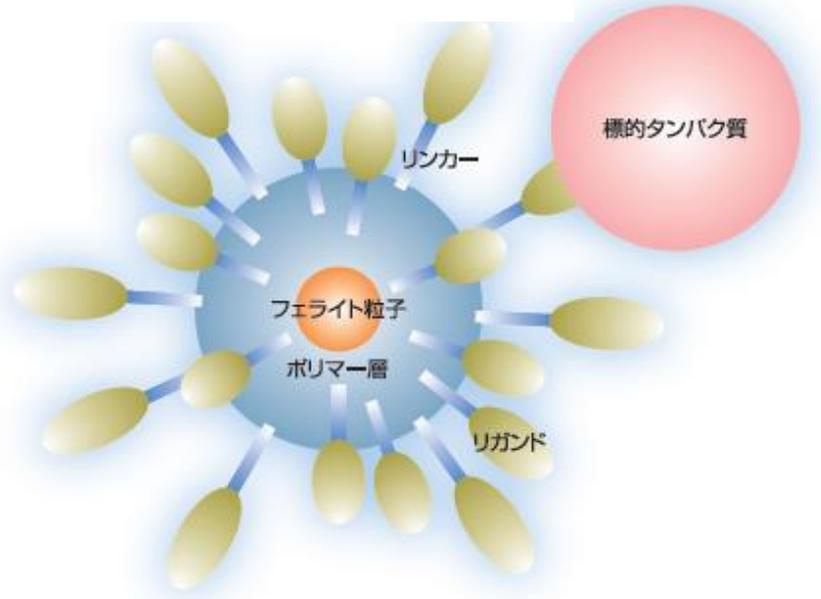
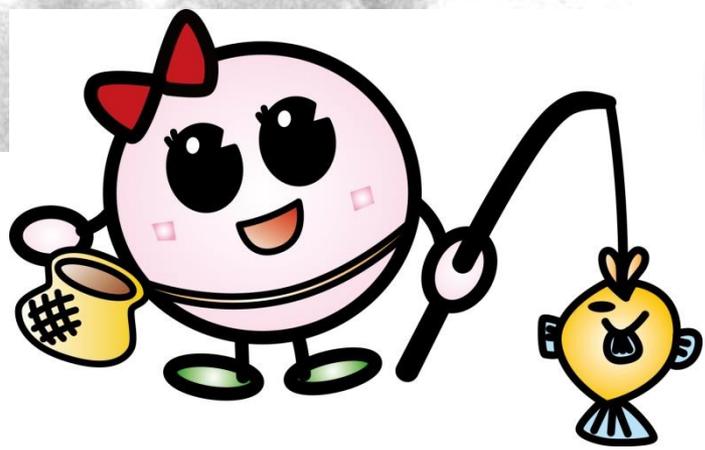


# ケミカルバイオロジーの概要

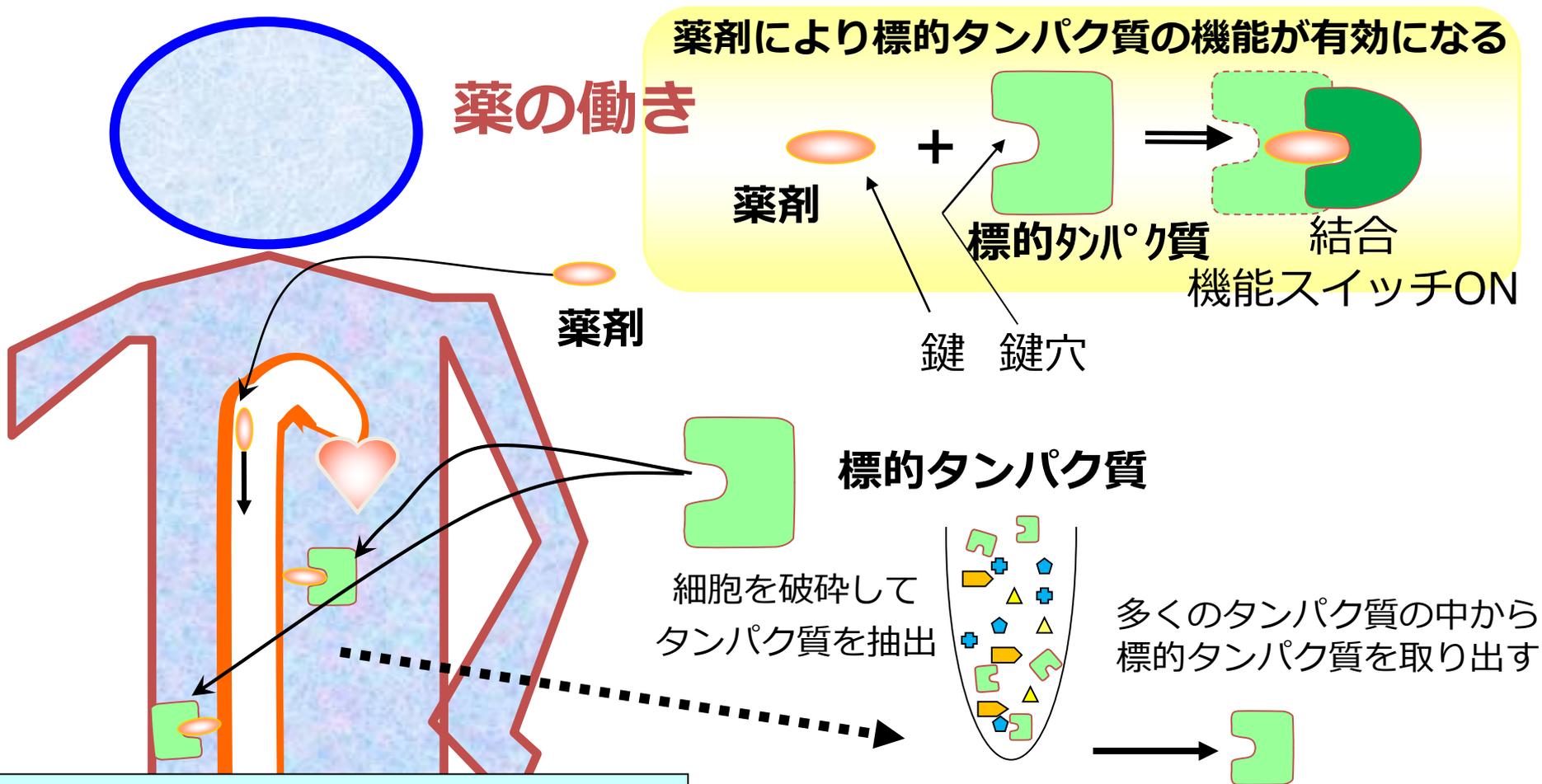


多摩川精機株式会社

# 目次

薬剤標的タンパク質のアフィニティ精製	3
FG beads <sup>®</sup> について	5
薬剤標的タンパク質のアフィニティ精製の実例 (東京工業大学・半田研究室)	9
薬剤の標的物質探索による作用機構解明の例	21
阻害剤結合タンパク質の精製	22
リガンドと標的分子の組み合わせ	23
FG beads <sup>®</sup> のラインナップ	24

# 薬剤標的タンパク質のアフィニティ精製



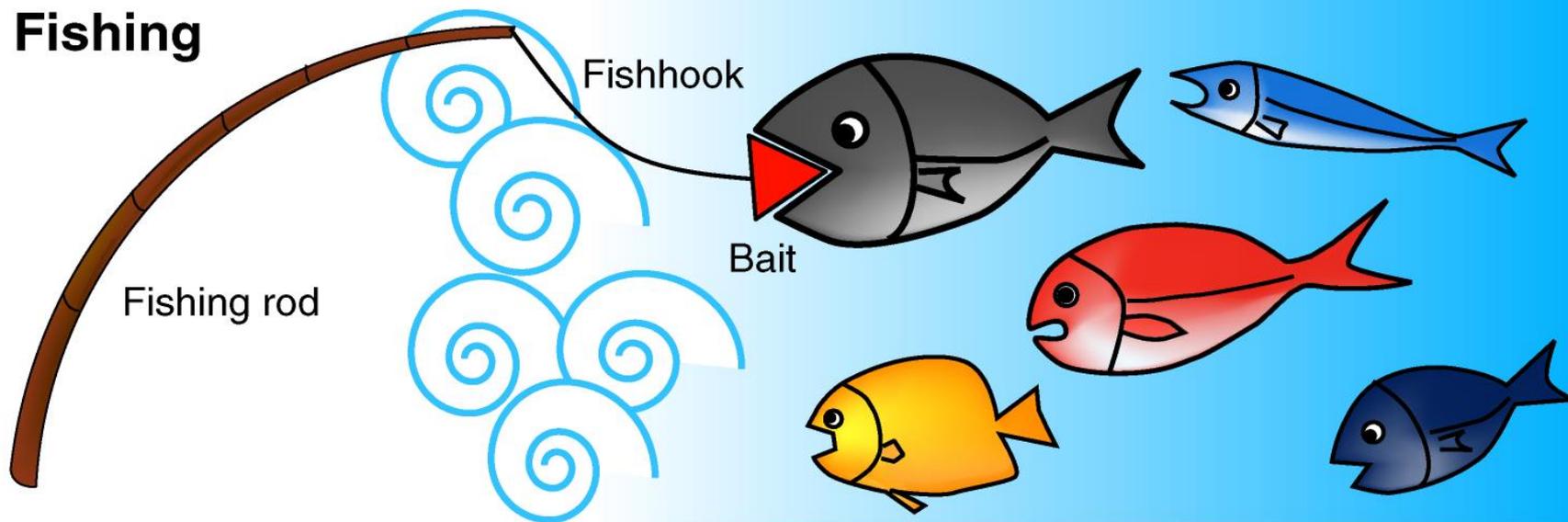
## 標的タンパク質精製の目的

- ・ 作用、副作用のメカニズム解明
- ・ 生体反応ネットワークの解析
- ・ 新規創薬ターゲットの探索 など

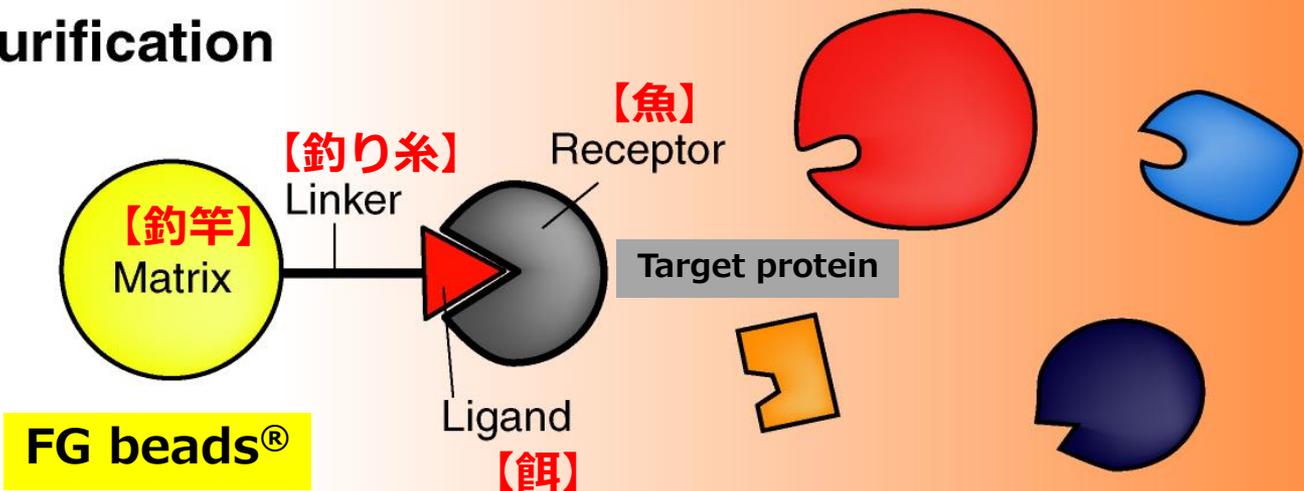
- ・ 薬剤の中には標的タンパク質が不明のものも多い
- ・ 新薬開発において標的タンパク質の単離、同定が不可欠である

アフィニティ精製は Target Fishing と言われ、よく釣りに例えられます

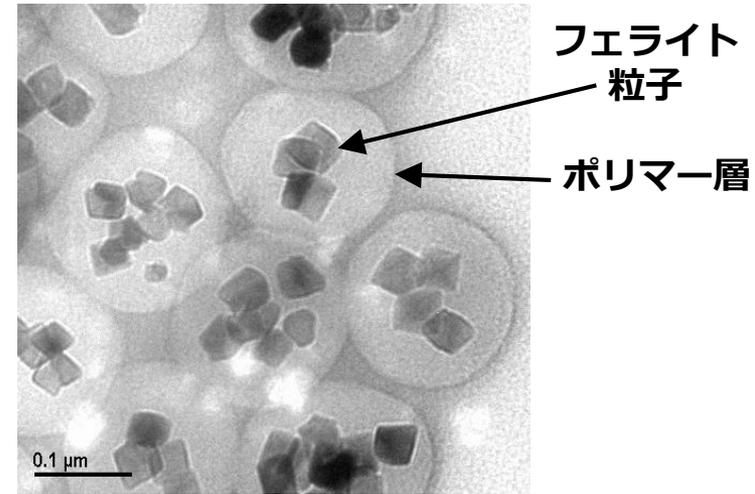
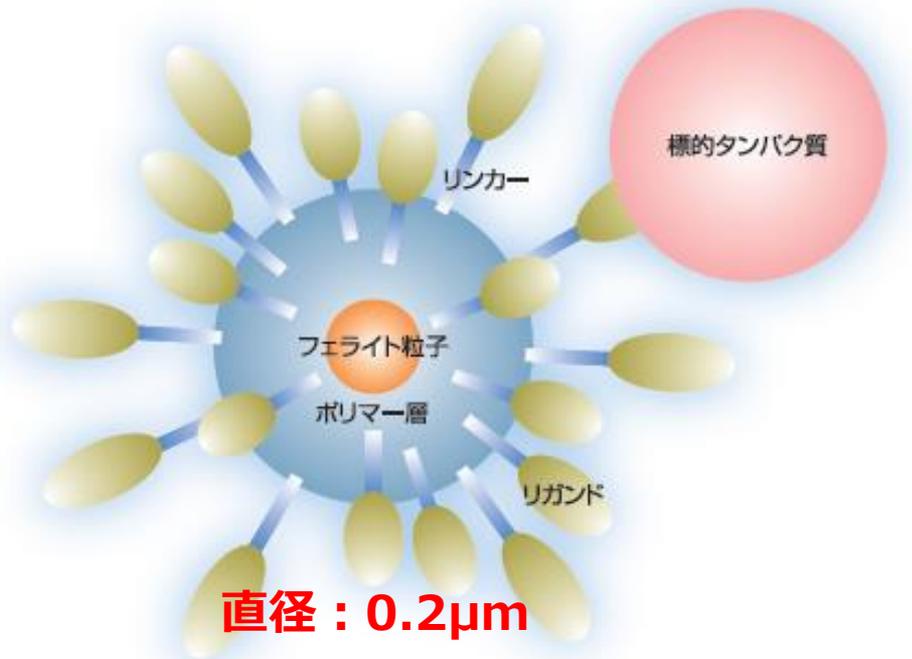
## Fishing



## Affinity Purification



# FG beads<sup>®</sup>の構造



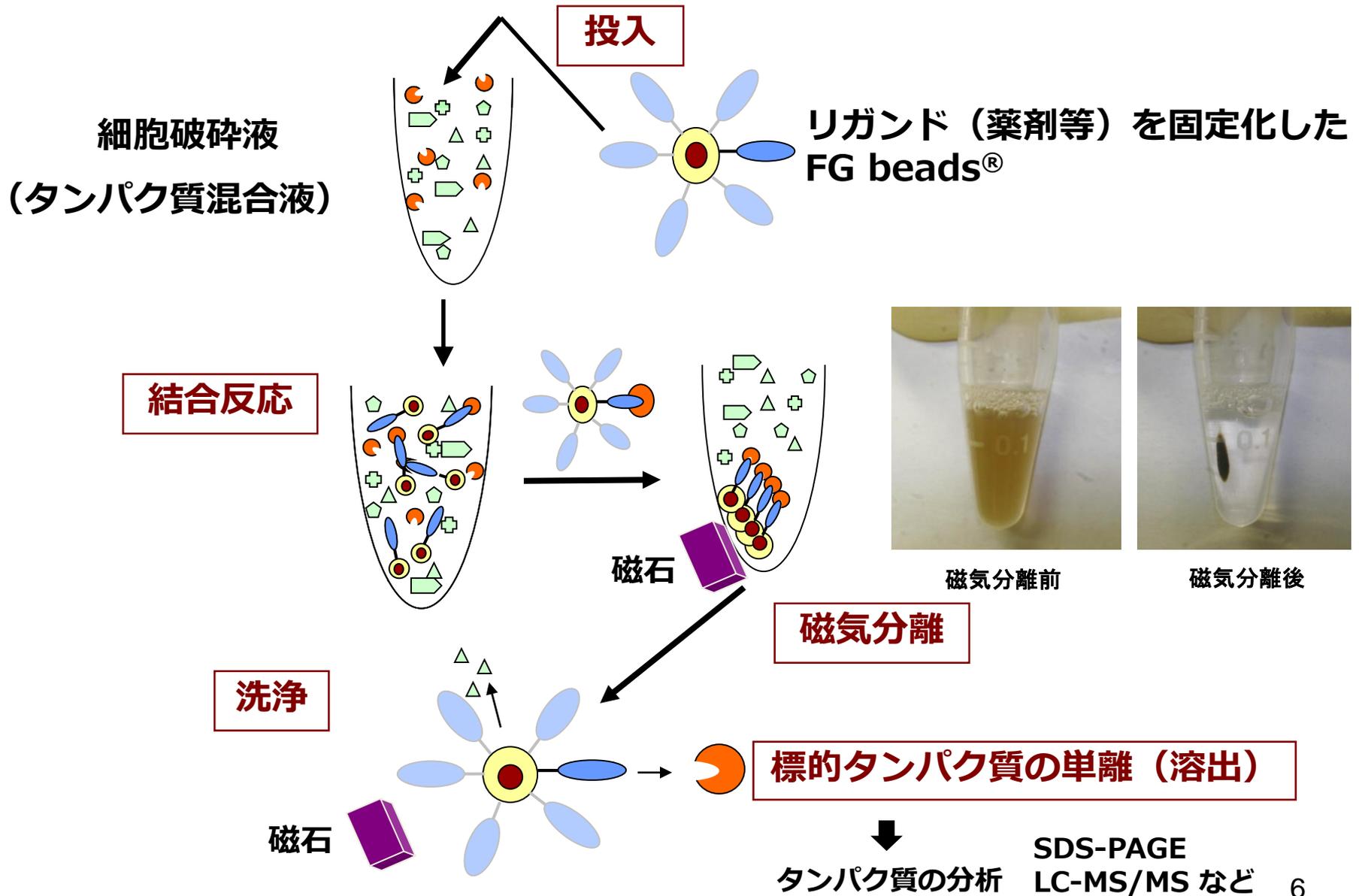
電子顕微鏡写真



FG beads<sup>®</sup>

リンカーを介してリガンドである薬剤を固定化し、多くの細胞タンパク質の中から標的タンパク質を釣り上げる。

# FG beads<sup>®</sup>を用いた標的タンパク質の精製



# FG beads®の特徴

## 高回収率

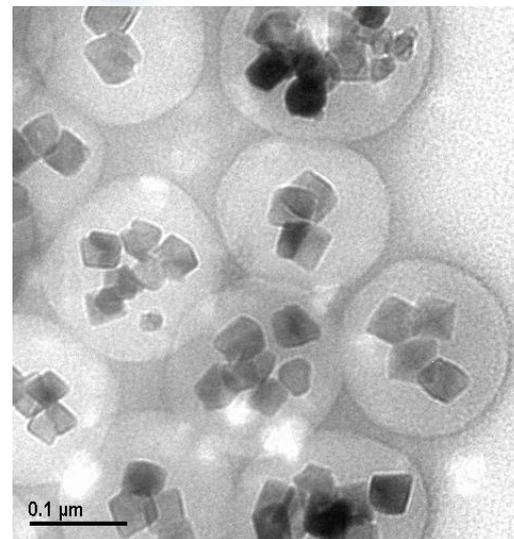
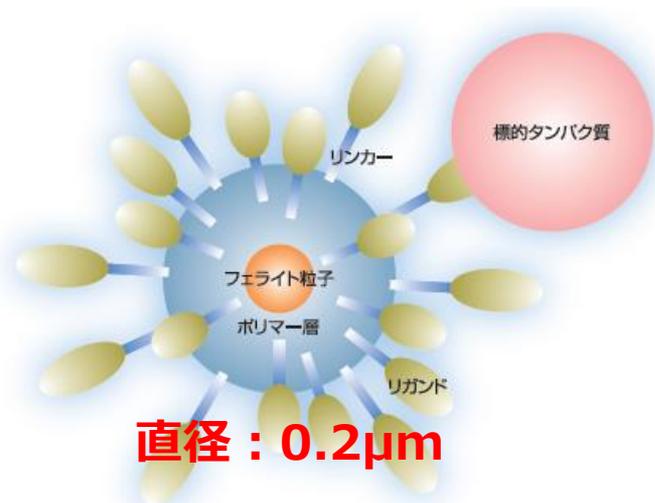
FG beadsはナノサイズのため重量当たりの表面積が大きい。分散性、可動性が高いため、標的タンパク質が効率よく結合する。

## 高純度

ビーズ表面は特殊なポリマーであるポリGMA(グリシジルメタクリレート)に被覆されている。このGMAの性質により、タンパク質の非特異的吸着が極めて少ない。

## 有機溶媒耐性

各種有機溶媒中でリガンドの固定化ができる。水に溶けない薬剤も固定化できる。

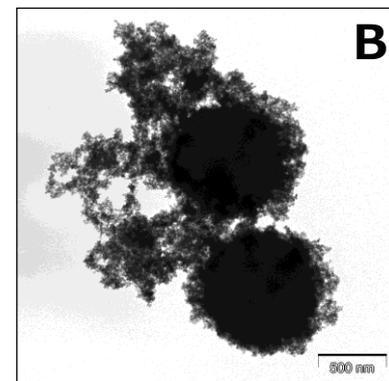
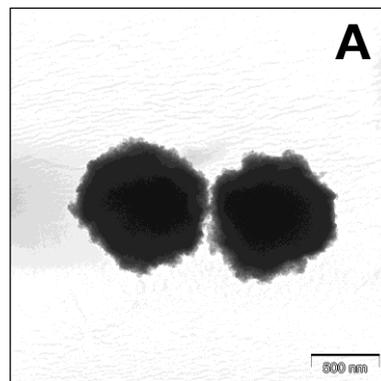
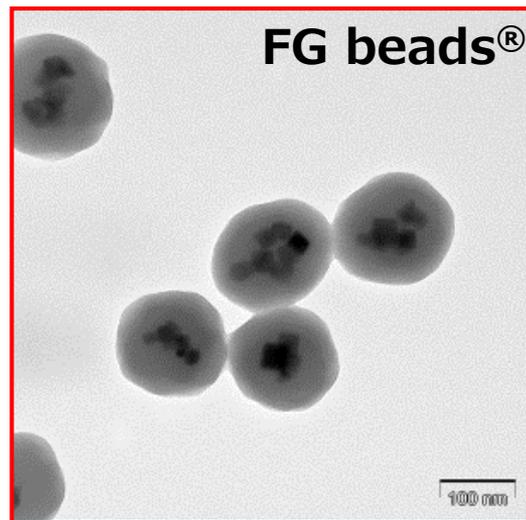
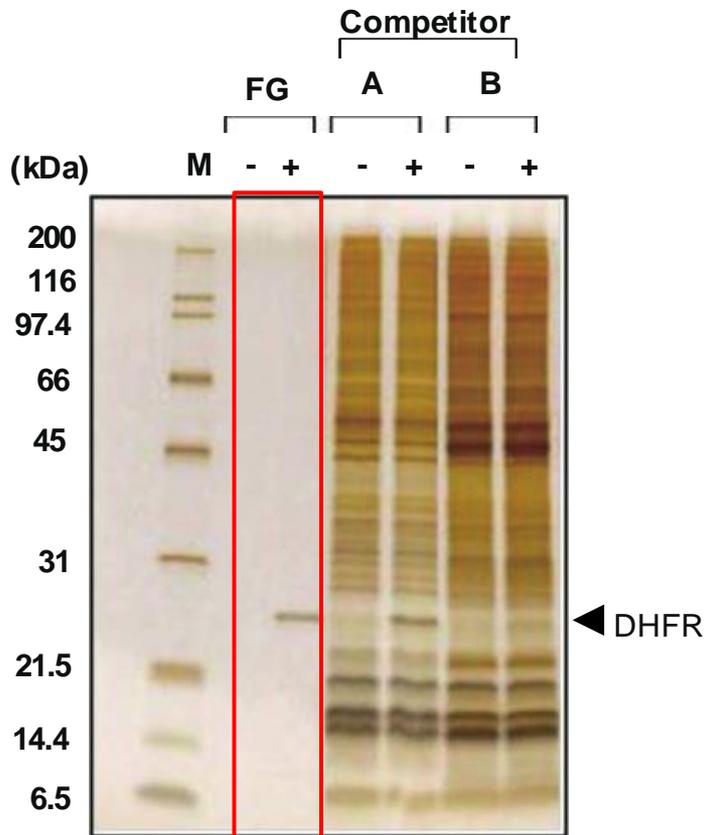


電子顕微鏡写真

# FG beads<sup>®</sup>と他社磁性ビーズの比較

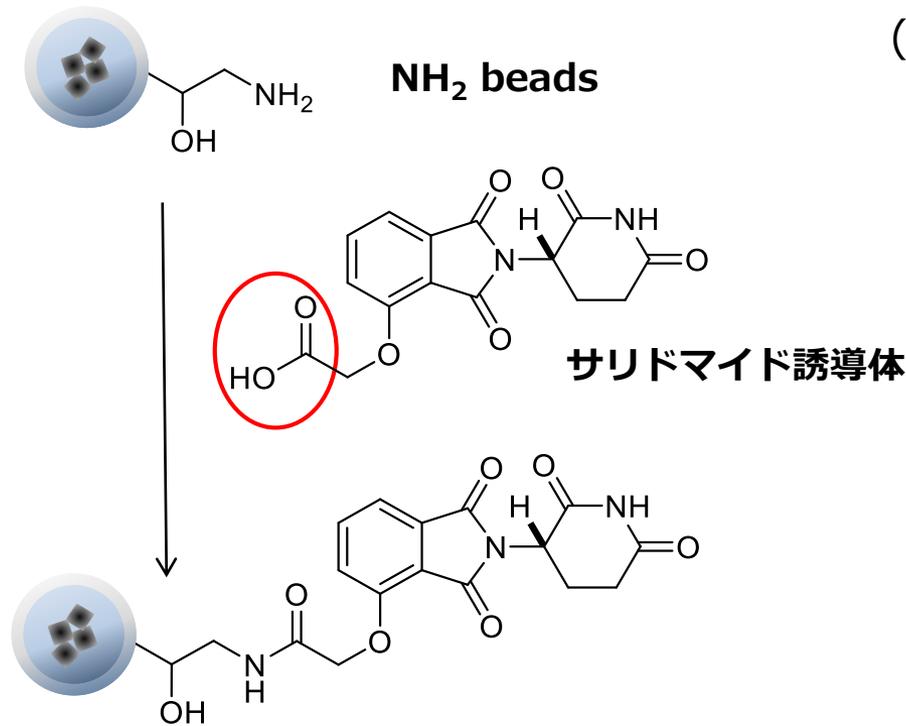
各社の磁性ビーズへ抗がん剤メトトレキサート (MTX) を固定化し、アフィニティ精製を行いました。

各ビーズは重量 (mg) を揃えて比較しました。

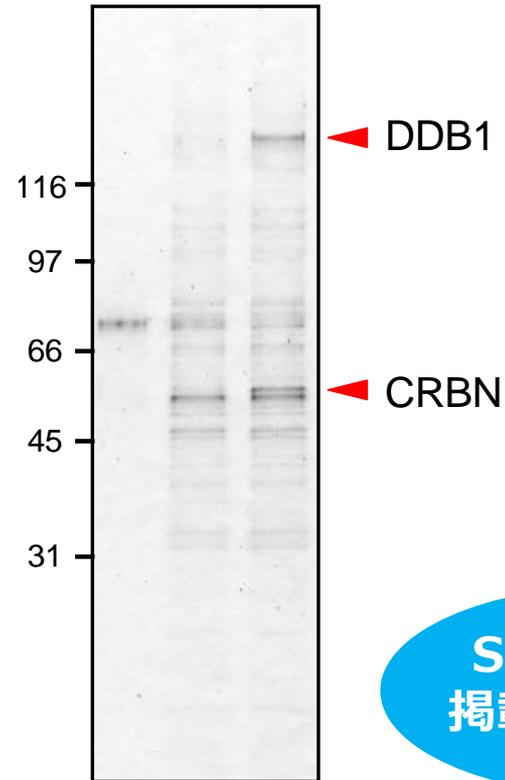


他社の磁性ビーズA、Bと比較してFG beads<sup>®</sup>では、タンパク質の**非特異的吸着が少なく**、MTXの標的タンパク質であるDHFRを**高純度で精製**することができました。

# 実例1 サリドマイド標的タンパク質の同定



(kDa)    -   -   + : Thalidomide Elution  
          -   +   + : Thalidomide immobilization



Science誌に  
掲載されました

<奇形を引き起こすメカニズムを解明>

FG beads®にサリドマイド誘導体を固定化し、ヒト細胞抽出液からアフィニティ精製を行ったところ、セレブロン(CRBN)、DDB1が同定されました。セレブロンは、タンパク質分解に関わる酵素の構成因子であり、サリドマイドはこの酵素の働きを阻害することで奇形を引き起こすことが分かりました。

# 事例1 サリドマイド標的タンパク質の同定

2010.03.12 毎日新聞

(第3種郵便物認可)

## サリドマイド

# たんぱく質の働き阻害

### 東北大など 奇形化仕組み解明

がんの治療薬として再承認されたサリドマイドが、四肢の短縮など胎児の奇形を引き起こす仕組みを、東京工業大と東北大が動物実

験で解明した。四肢の形成に重要な役割を果たしたたんぱく質の働きを、サリドマイドが阻害していたという。奇形を招かない類似の新

薬開発につながると期待される。12日付の米科学誌「サイエンス」で発表した。東工大の伊藤拓水研究員、半田宏教授らは、

磁性のある微粒子と磁石を使ってサリドマイドが「セレブロン」というたんぱく質と結合することを突き止めた。

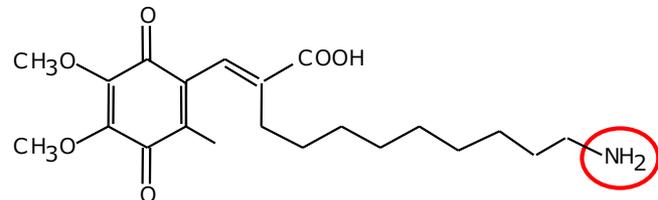
次にセレブロンの機能を調べるため、魚のゼブラフィッシュの受精卵に、セレブロンを作らないようにする物質を注入。生まれたゼブラフィッシュに、胸びれが生えなかったり耳が小さくなる奇形が生じた。さらに、ゼブラフィッシュやニワトリの受精卵で、セレブロンがサリドマイドと結合できないよう操作

した後、サリドマイドを投与すると、胸びれや翼が生え、奇形を招く性質が抑えられることを確認した。セレブロンはヒトでも四肢の形成にかかわるとみられ、研究チームは「がんなどの治療薬としてのサリドマイドの有効な作用に、セレブロンが関係しているのか今後調べたい」と話す。

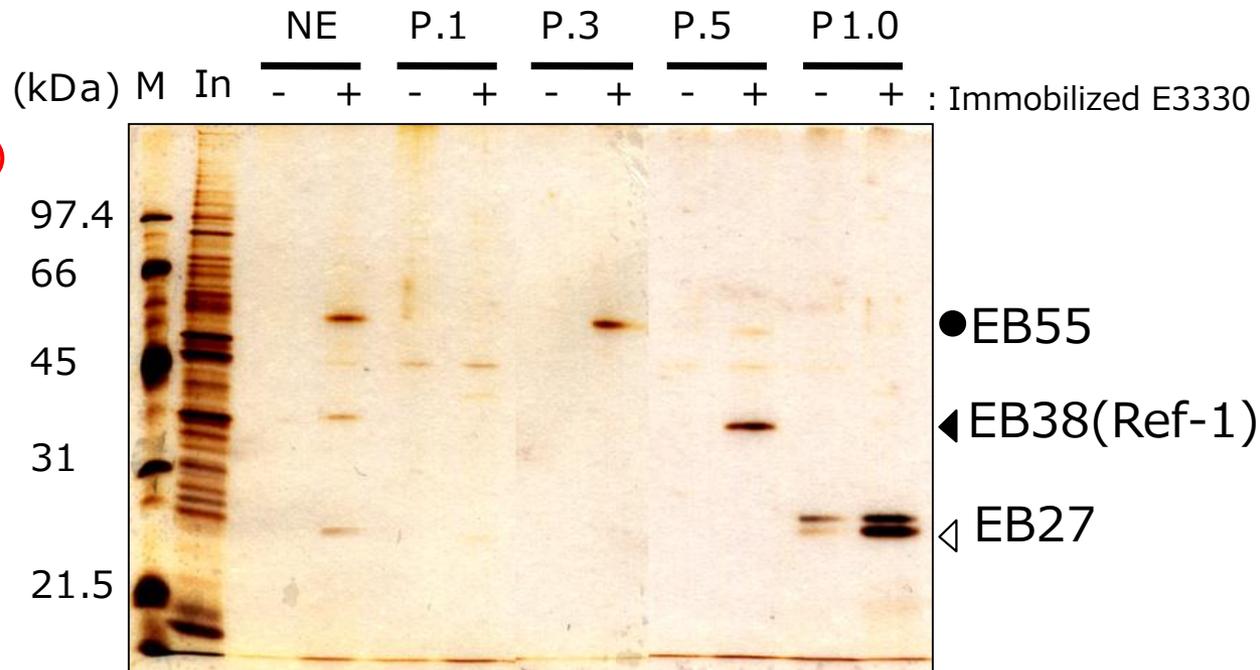
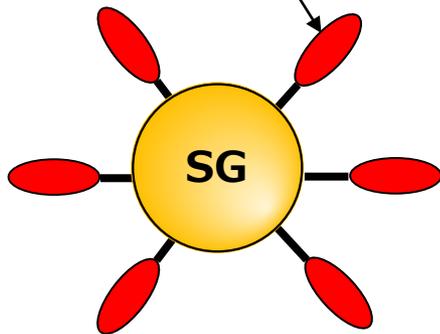
サリドマイドは1950年代以降、鎮痛・催眠剤として世界的に服用されたが、大規模な薬害が起き販売停止となった。その後、98年に米国がハンセン病の治療薬として承認。血液のがん「多発性骨髄腫」の治療薬としても米国が06年、日本が08年に承認するなど、多くの国が認めている。【須田桃子】



# 実例3 E3330結合タンパク質の精製



E3330アミノ化誘導体  
(抗炎症剤)



※核抽出液分画時の塩 (KCl) 濃度を段階的に濃くして分画

NE- KClによる分画なし

P.1- 0.1M KClで分画

P.3- 0.3M KClで分画

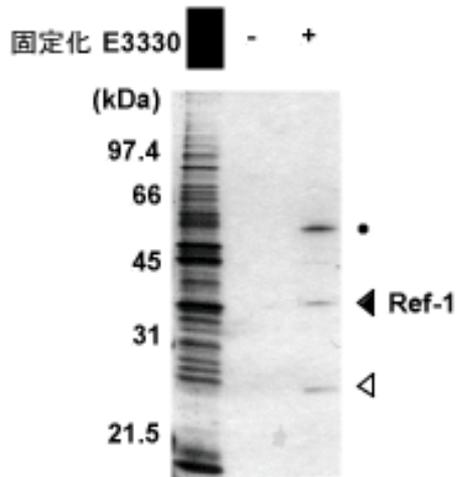
P.5- 0.5M KClで分画

P1.0-1.0 M KClで分画

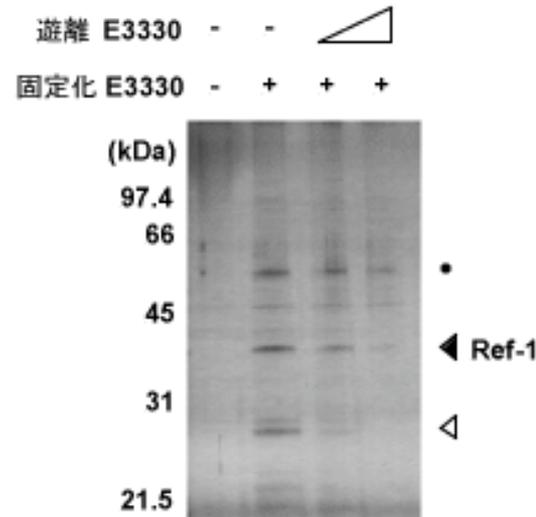
SGビーズにE3330誘導体を固定化し、Jurkat細胞の核抽出液からアフィニティ精製を実施したところ、3種類の結合タンパク質が精製され、解析の結果Ref-1が標的タンパク質であることが明らかとなりました。

# 実例3 E3330結合タンパク質の精製

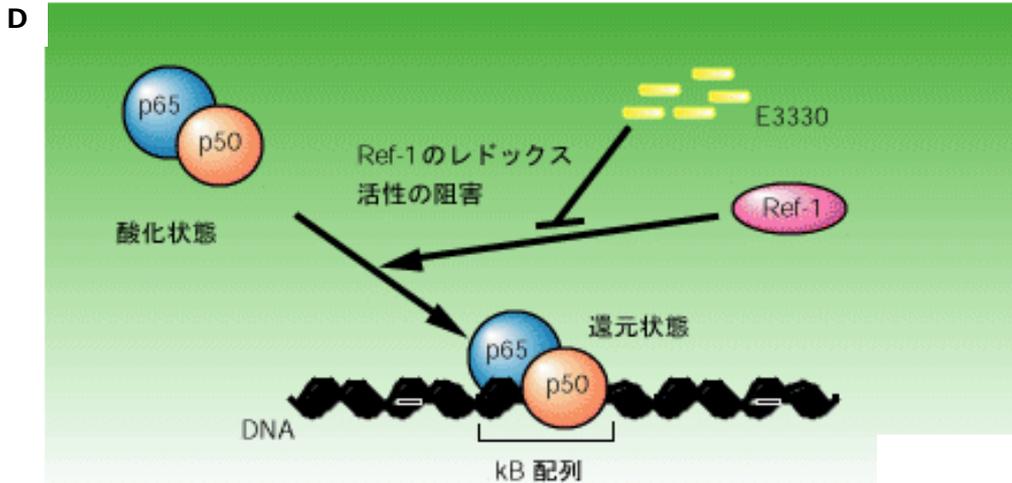
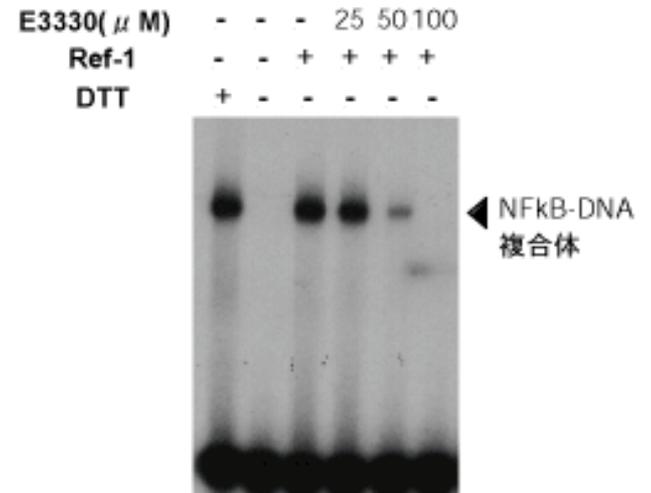
A アフィニティ精製



B E3330による競合阻害



C ゲルシフトアッセイ

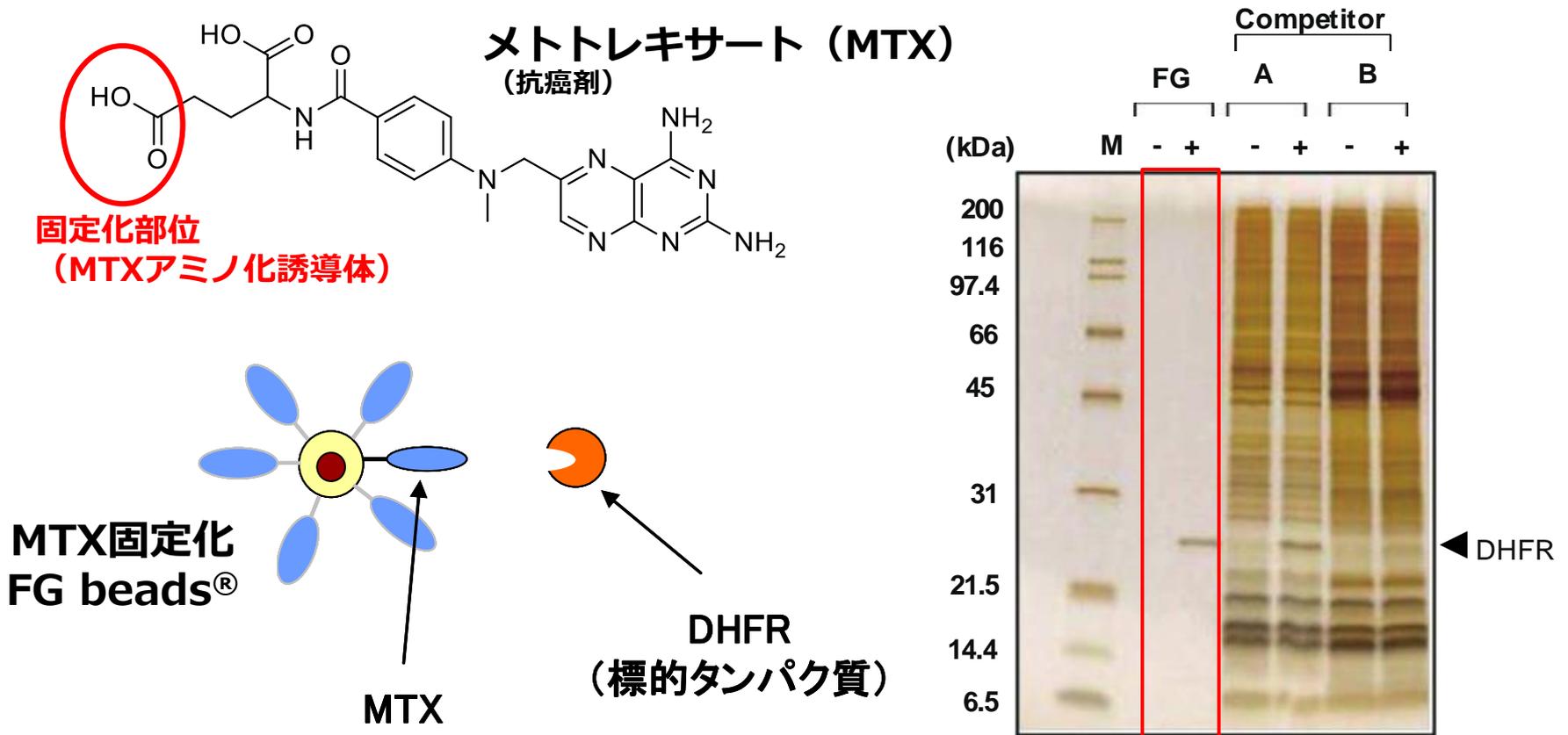


Ref-1はレドックス活性によって核内でNF-kBを還元し、そのDNA結合能を亢進させる。E3330はRef-1に結合することによって、このレドックス活性を阻害する。



E3330はNF-kBの転写促進活性を阻害し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑え、抗炎症作用を発揮するということが明らかとなりました。

# 実例4 MTX標的タンパク質の精製



各社の磁性ビーズに同様な方法にて抗がん剤メトトレキサート(MTX)を固定化し、アフィニティ精製を実施しました。他社の磁性ビーズと比較してタンパク質の非特異的な吸着が少なく、MTXの標的タンパク質であるDHFRを高純度で精製することができました。

# 実例4 MTX標的タンパク質の精製

## <MTXを用いた応用療法>

- ・ 難治性の白血病、リンパ腫に対し、MTXを他の抗癌剤と併用して投与することにより相乗的に治療効果が上がる。
- ・ 慢性リウマチへの利用（免疫抑制効果）



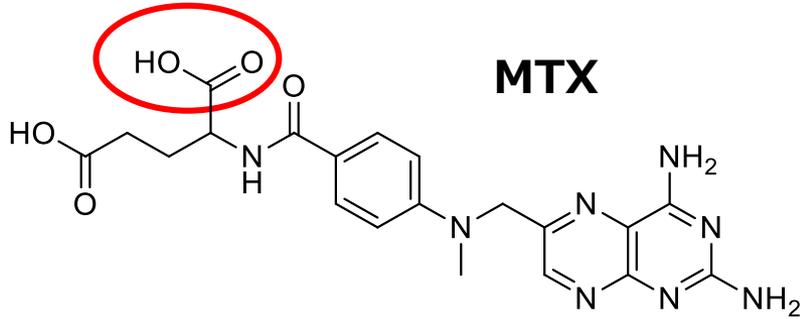
MTXのDHFRを介した作用だけでは説明が付かない点が多い



**MTXの新たな標的タンパク質の探索を実施**

# 実例4 MTX標的タンパク質の精製

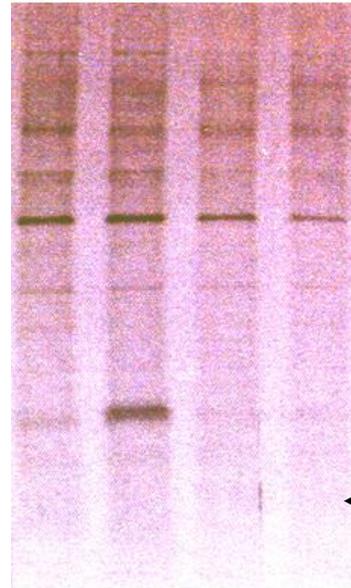
固定化部位



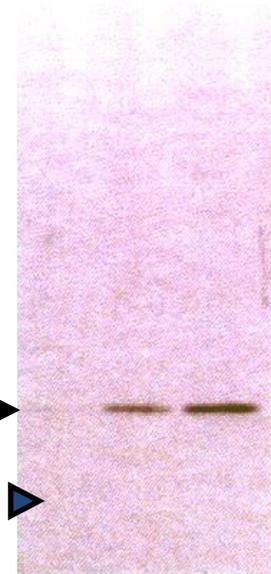
競合阻害

Drug Elution

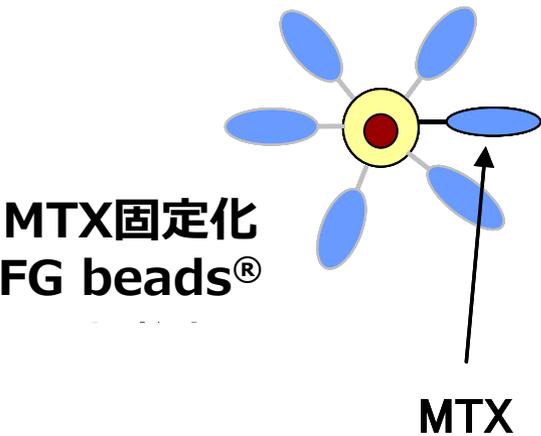
-	+	+	+	: Immobilized MTX	-	+	+	: Immobilized MTX
-	-	+	++	: MTX Competition	-	+	++	: MTX Elution



dCK  
(DHFR)



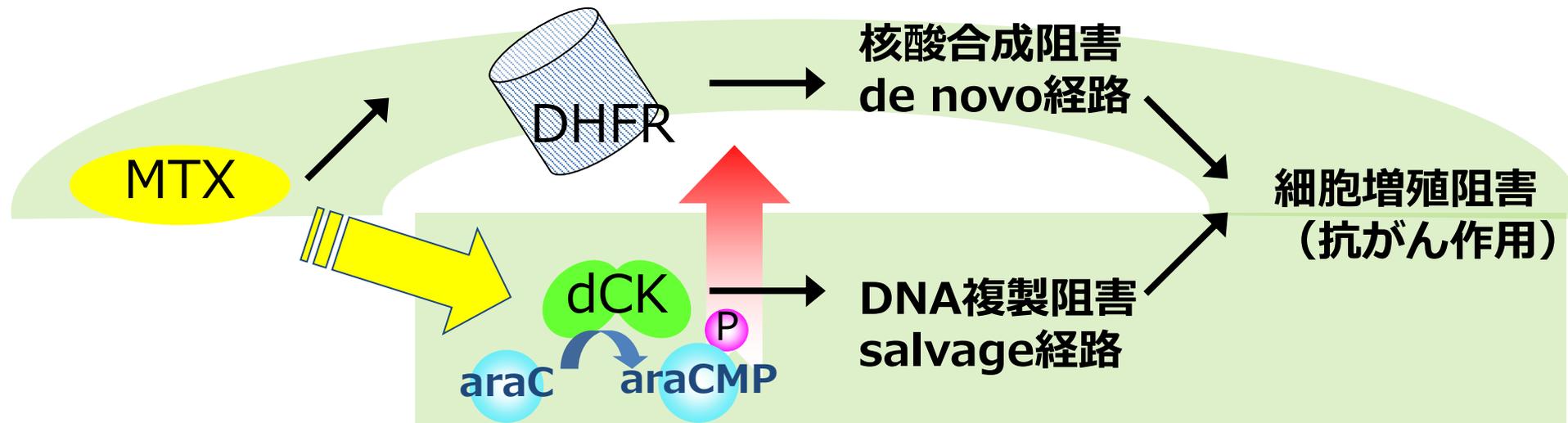
dCK : デオキシシチジンキナーゼ



(標的タンパク質)

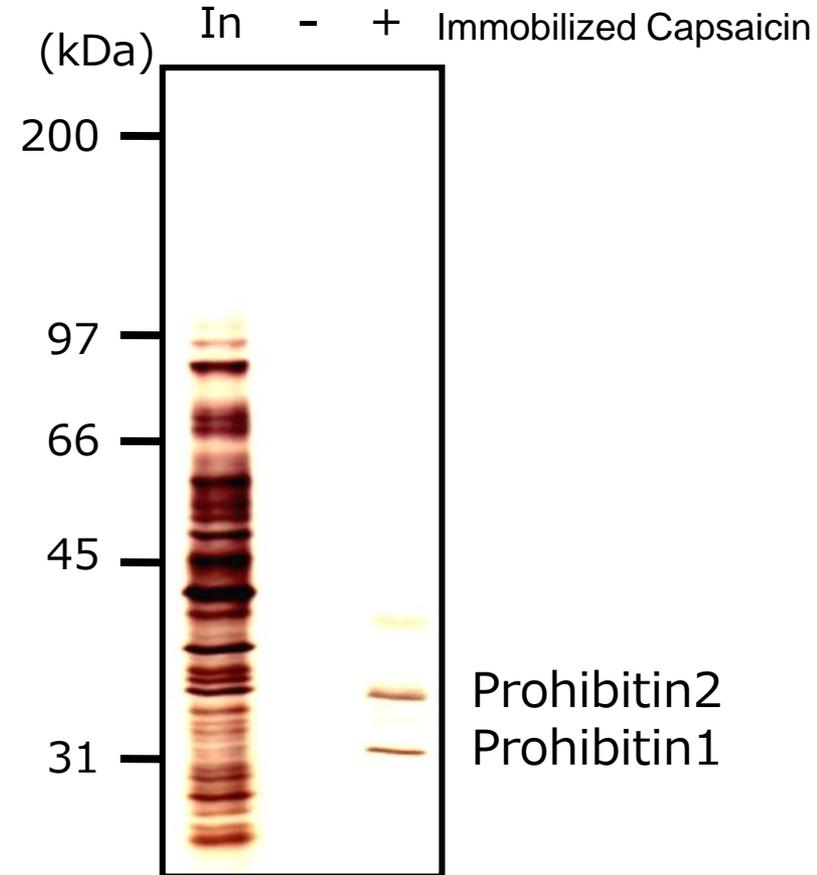
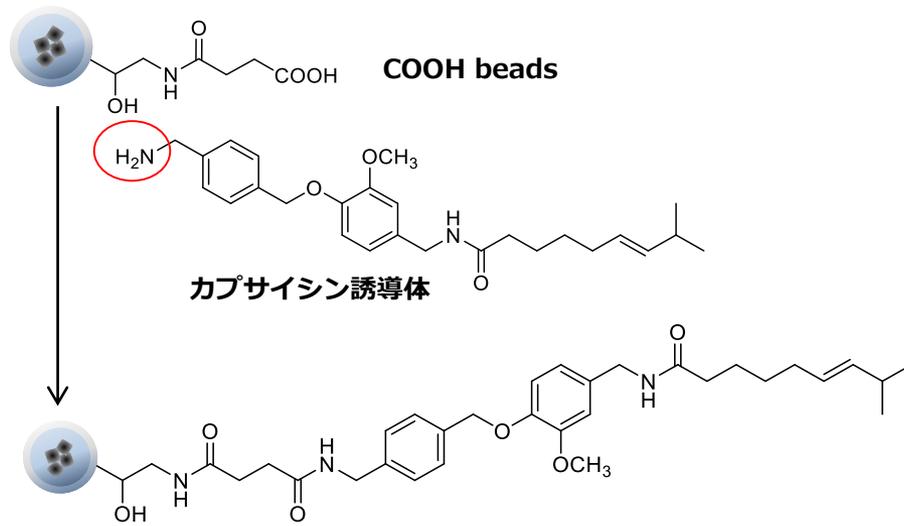
MTXをビーズへ固定化する部位を変えてアフィニティ精製を実施したところ、新たな標的タンパク質であるdCKが同定されました。

# 実例4 MTX標的タンパク質の精製



MTXと、抗癌剤であるaraCの悪性リンパ腫に対する高濃度併用療法の分子メカニズムが解明されました。MTXはDHFRに作用して細胞増殖を阻害するだけでなく、araCのリン酸化を促進し、DNA複製を阻害することで細胞増殖を阻害し、抗がん作用を発揮します。

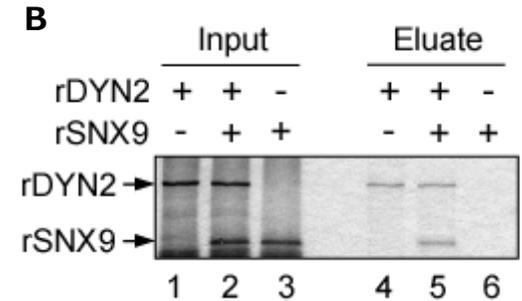
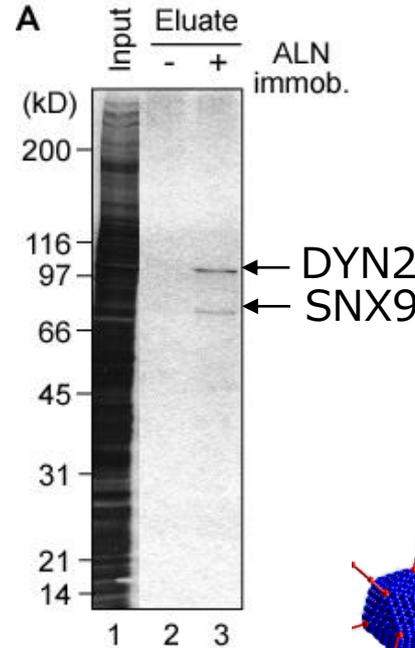
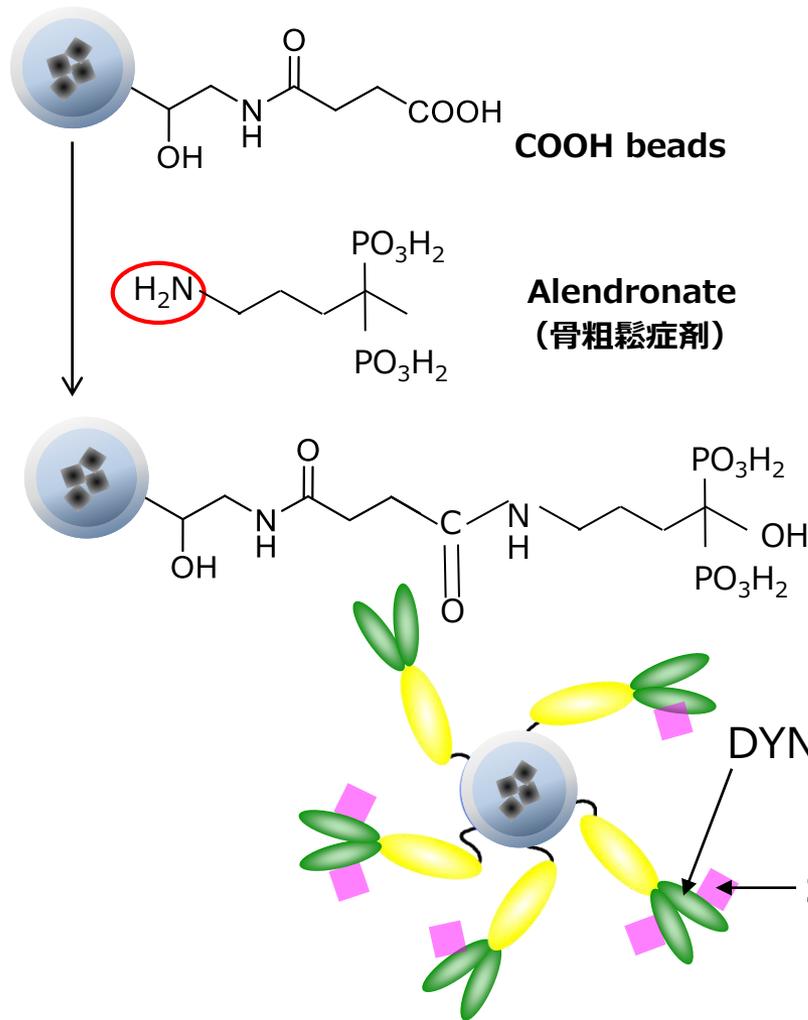
# 実例5 カプサイシン結合タンパク質の精製



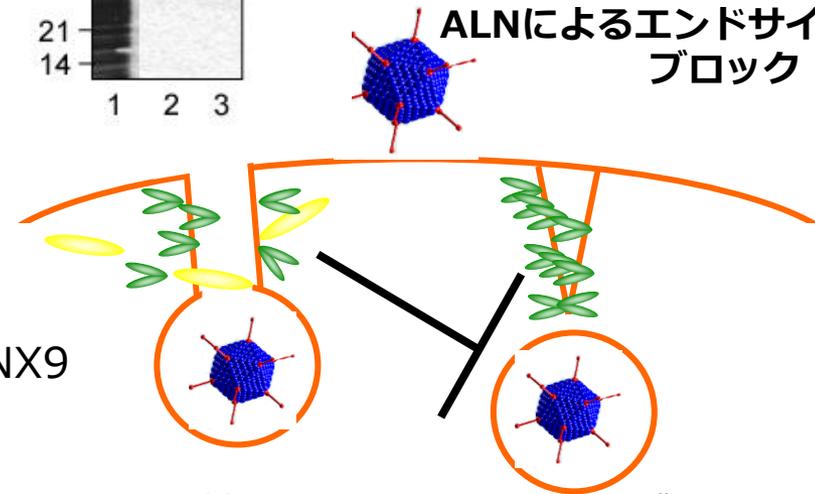
<カプサイシンの白血病細胞増殖阻害作用メカニズム>

FG beads®にカプサイシン誘導体を固定化し、ヒト白血病細胞NB4からアフィニティ精製を行ったところ、Prohibitin1、Prohibitin2が同定されました。これにより、カプサイシンによる白血病細胞のアポトーシス誘導機構が解明されました。

# 実例6 Alendronate結合タンパク質の精製

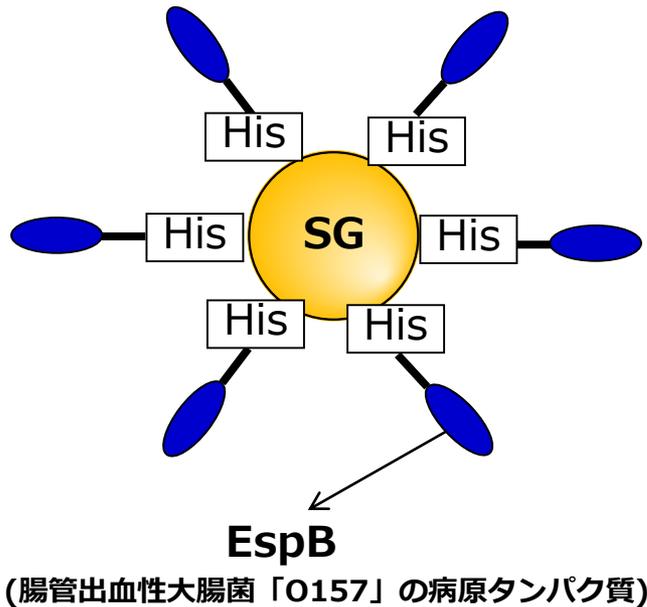


ALNによるエンドサイトーシスのブロック

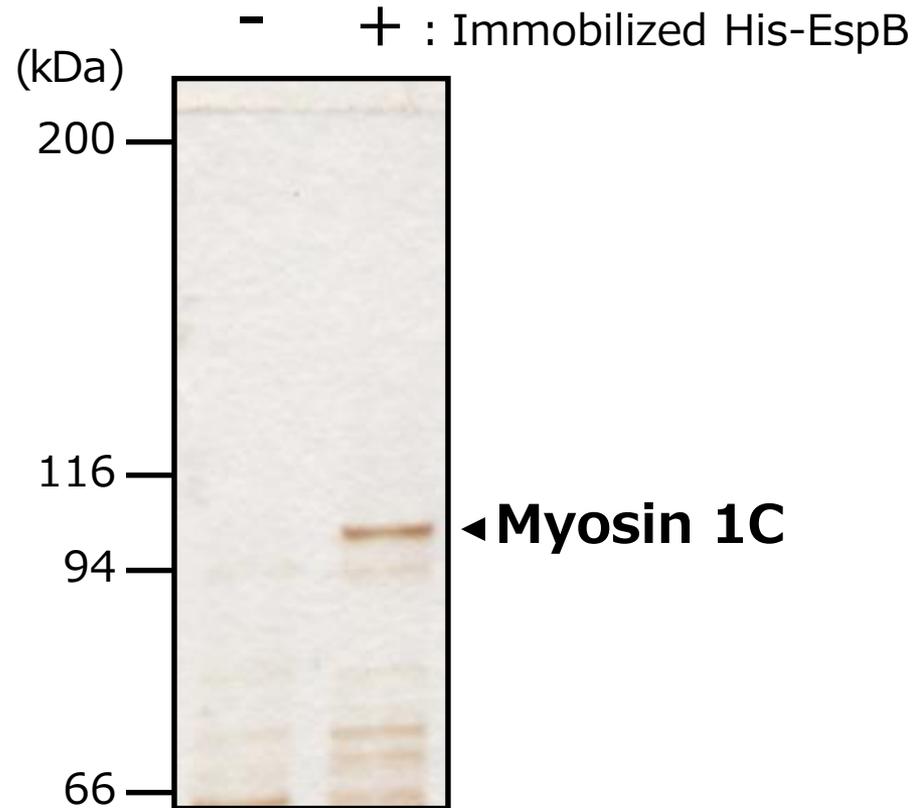


FG beads®にAlendronateを固定化し、アフィニティ精製を行ったところ、ダイナミン (DYN)2とSNX9が同定されました。ダイナミンは骨粗鬆症に関わるタンパク質ではありませんでしたが、新規の結合タンパク質を解析することにより、抗ウイルス薬として使用できる可能性の発見に繋がりました。

# 実例7 EspB結合ヒトタンパク質の精製



**EspBの作用機構：**  
**Myosin機能阻害による腸管上皮細胞の**  
**微絨毛破壊とマクロファージの貪食作用**  
**の抑制**



His-tagをつけて発現させた組換えタンパク質：EspBをSGビーズ（Tsビーズ）に固定化し、HeLa細胞抽出液からアフィニティ精製を行ったところ、Myosin1Cが同定されました。これにより、病原性大腸菌の感染分子メカニズムの解明に繋がりました。

# 薬剤の標的物質探索による作用機構解明の例

## 東京工業大学 半田研究室における実績

### 医薬品類

- ・抗がん剤 (MTX、サリドマイド、タキソール)
- ・骨粗鬆症薬 (KF21232、ビスフォスフォネート)
- ・抗炎症薬 (E3330、アスピリン)
- ・免疫抑制剤 (FK506)
- ・抗リウマチ剤 (ブシラミン)
- ・抗鎮痛薬 (サリチル酸)
- ・強心剤 (ベスナリノン)
- ・抗インフルエンザ薬 (タミフル)
- ・抗アルツハイマー薬 (ヘリセノンD)

### 生体物質

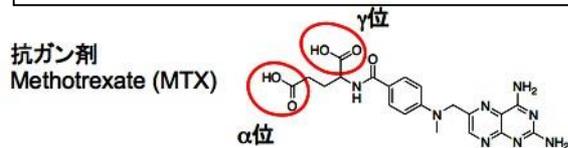
※赤字は実例で紹介した薬剤

- ・ビタミン類 (ビタミンK2)
- ・アミノ酸類 (ロイシン、アルギニン、メチオニン)
- ・ヘム関連物質
- ・2本鎖DNA、1本鎖DNA
- ・生理活性ペプチド

### 病原性因子/毒性物質

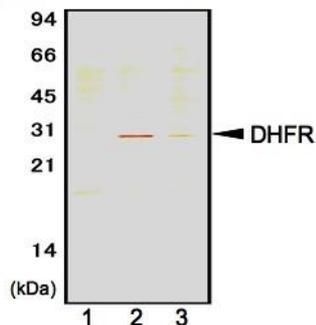
- ・病原性大腸菌の毒素 (EspB)
- ・環境ホルモン (フタル酸、アトラジン、ビスフェノールA)
- ・ウイルス因子 (AAVの組込みDNA配列)

## 抗がん剤 MTX の新規標的タンパク質



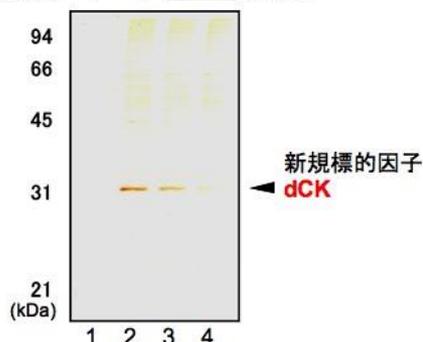
MTX α位固定化ビーズによる精製

Fixed MTX	-	+	+
Free MTX	-	-	+



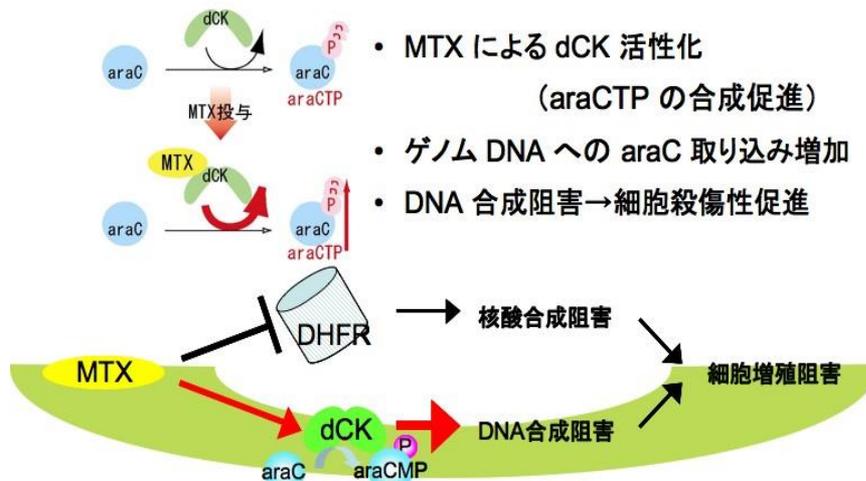
MTX γ位固定化ビーズによる精製

Fixed MTX	-	+	+	+
Free MTX	-	-	-	▲ 競合阻害



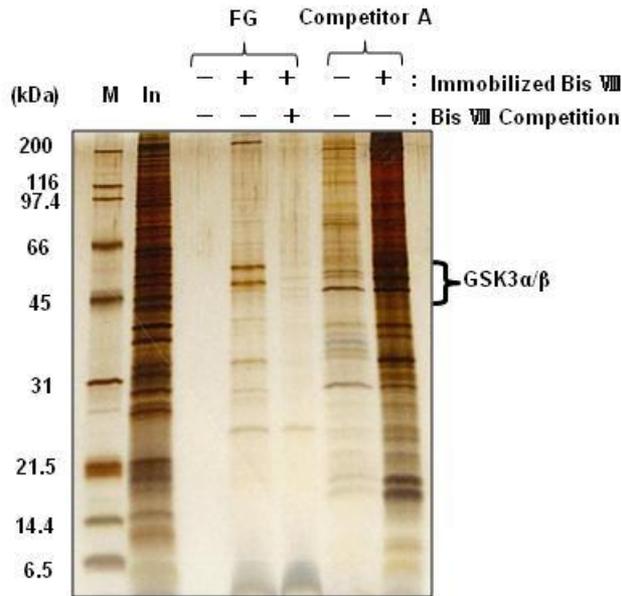
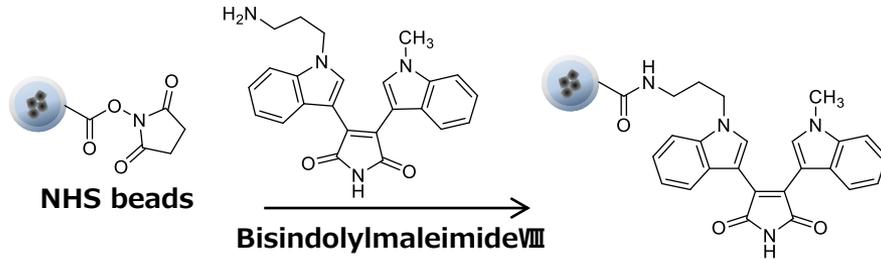
## MTXとAraC併用療法の分子メカニズム

### MTXによるdCKの活性化

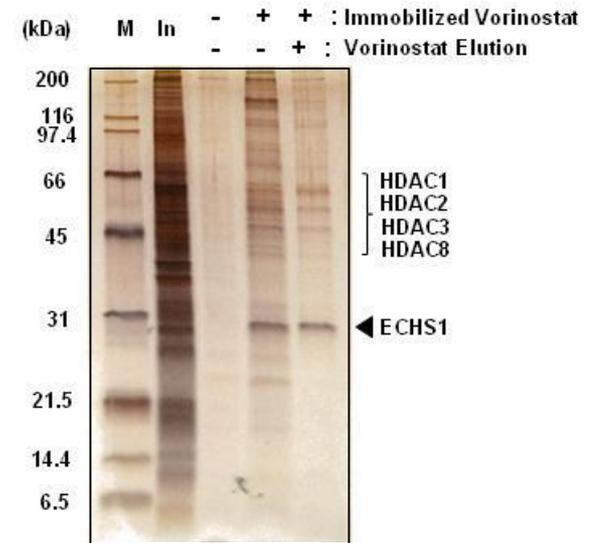
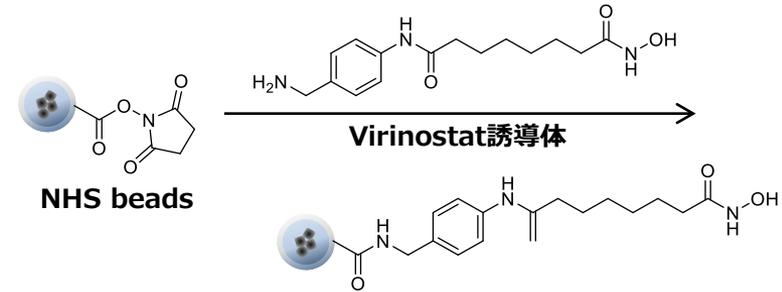


# 阻害剤結合タンパク質の精製

## ① キナーゼ阻害剤BisindolylmaleimideⅧ



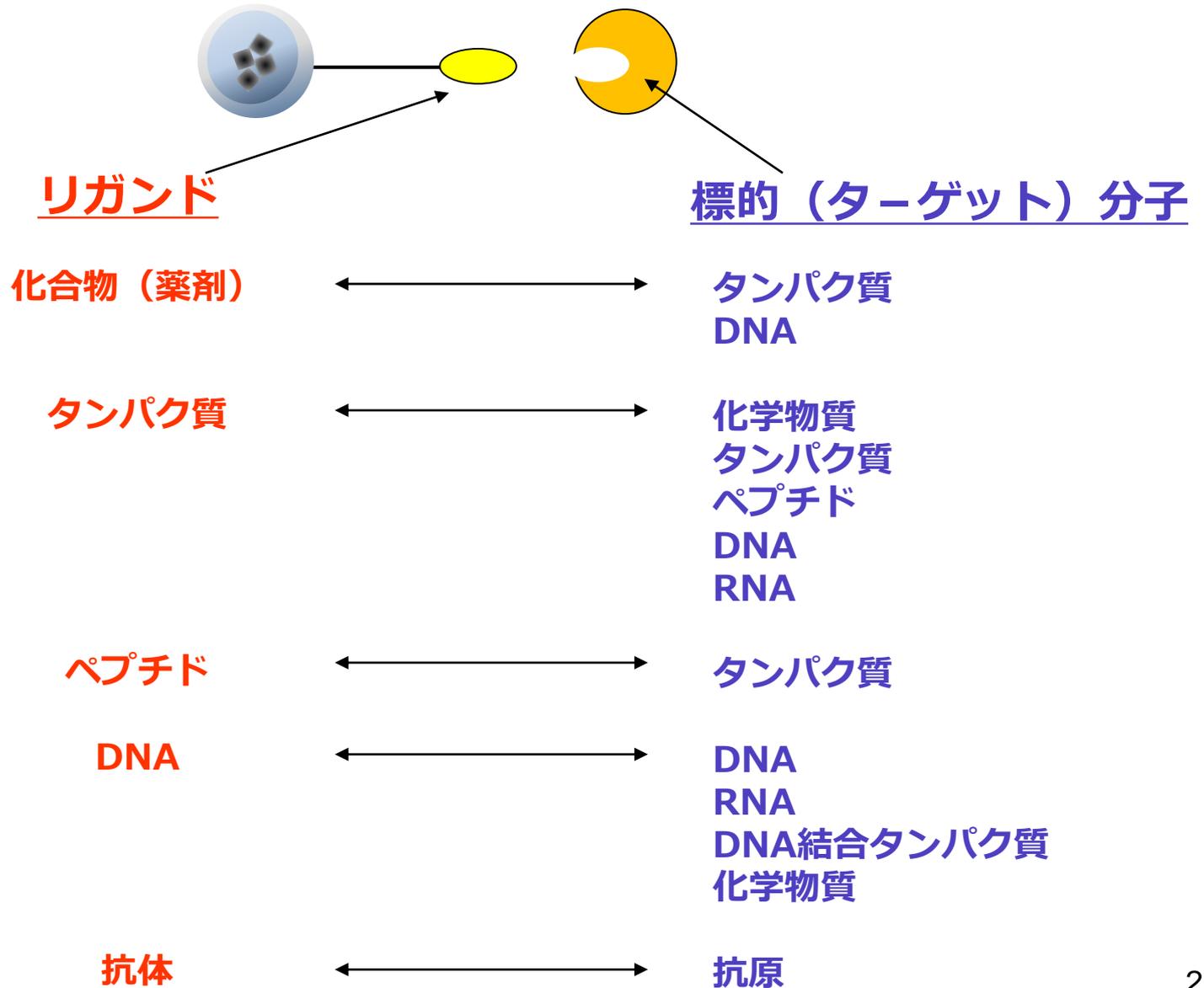
## ② HDAC阻害剤Vorinostat



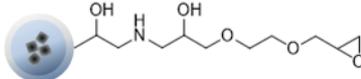
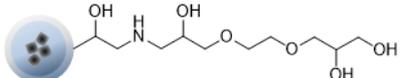
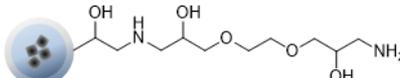
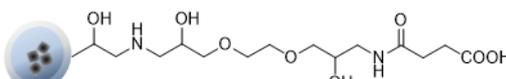
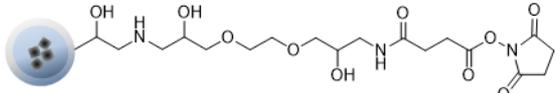
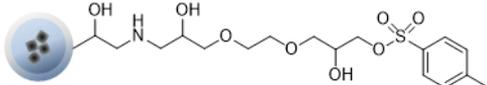
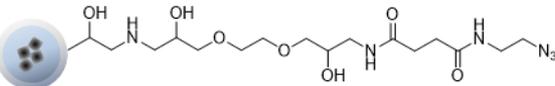
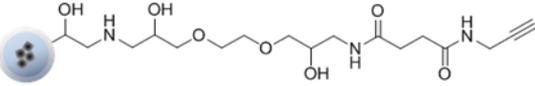
FG beads®と他社磁性ビーズAへビスインドリルマレイミドⅧ (Bis VIII) を固定化し、HeLa細胞抽出液から結合タンパク質をアフィニティ精製しました。その結果、幾つかの結合タンパク質が精製され、その中でBis VIIIの主要結合タンパク質としてGSK3α/βがウェスタンブロットティングおよびMS解析により同定されました。

HDAC阻害剤のひとつとして知られるVorinostat(AHA)の誘導体をFG beads®へ固定化し、HeLa細胞抽出液から結合タンパク質をアフィニティ精製しました。その結果、幾つかの結合タンパク質が回収されました。ウェスタンブロットティングを実施したところ、上図の4種類のHDACが確認できました。更にMS解析を実施したところ、ECHS 1が同定されました。

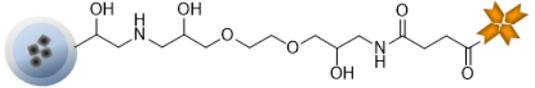
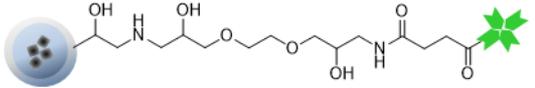
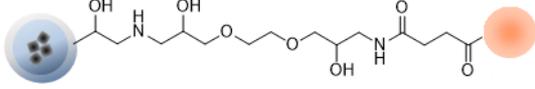
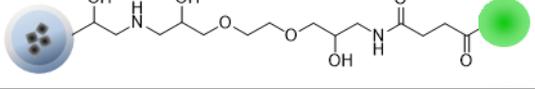
# リガンドと標的分子の組み合わせ



# FG beads®のラインナップ

型式	品名	構造	リガンド
TAS8848N1010	Plain beads		DNA
TAS8848N1110	Linker beads		R-NH <sub>2</sub> アミノ基 R-OH フェノール性水酸基
TAS8848N1120	OH beads		R-COOH カルボキシル基
TAS8848N1130	NH <sub>2</sub> beads		R-COOH カルボキシル基
TAS8848N1140	COOH beads		R-NH <sub>2</sub> /R-NHR アミノ基
TAS8848N1141	NHS beads		R-NH <sub>2</sub> /R-NHR アミノ基
TAS8848N1150	Ts beads		His-Tagタンパク質
TAS8848N1160	Azide beads		アルキン化合物
TAS8848N1161	Alkyne beads		アジド化合物

# FG beads®のラインナップ

型式	品名	構造	リガンド
TAS8848N1170	Streptavidin beads		ビオチン標識物
TAS8848N1171	NeutrAvidin beads		ビオチン標識物
TAS8848N1172	Protein A beads		IgG
TAS8848N1173	Protein G beads		IgG