

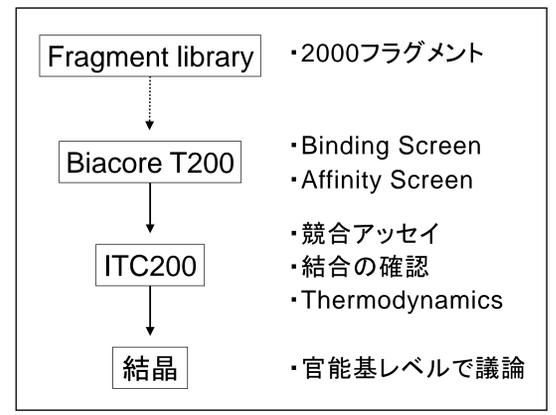
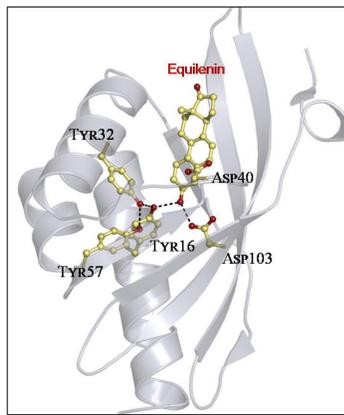
研究概要

蛋白質における低分子化合物の認識には複数の弱い相互作用を緻密な設計に基づいて配置、構築した強固な相互作用系が必須である。

蛋白質-低分子化合物間相互作用の本質的な理解はより精密な分子デザインを可能とし、特に低分子化合物をスクリーニングする際のバイアス強化が期待される。

本研究では結晶構造、機能について既に解析が行われているケトステロイド異性化酵素(KSI)に対して表面プラズモン共鳴(SPR)によるスクリーニング後、等温滴定熱量測定(ITC)を用いた熱力学的解析を組み合わせることにより、親和性・特異性創出機構を精密解析し、その原点を追求する。

KSIの結晶構造と低分子化合物スクリーニング

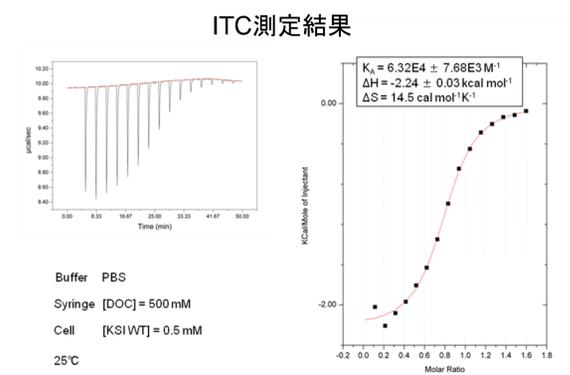
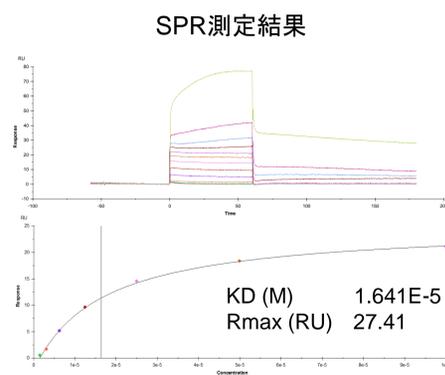
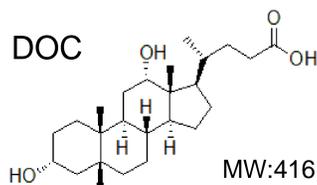


KSIは大きな疎水性ポケットを有し、最深部に少数の親水性残基をもつスクリーニングから特異性・親和性創出の原動力の理解を目指す

ポジティブコントロールの設定

SPRやITCでの評価の際、ポジティブコントロールとの相対的な比較によってヒットの成否を決定する。実験ではDeoxycholate(DOC)をポジティブコントロールとして設定した。DOCはステロイド様の構造をしている化合物で、KSIとの結合は強く既に結晶構造が解析されていた。

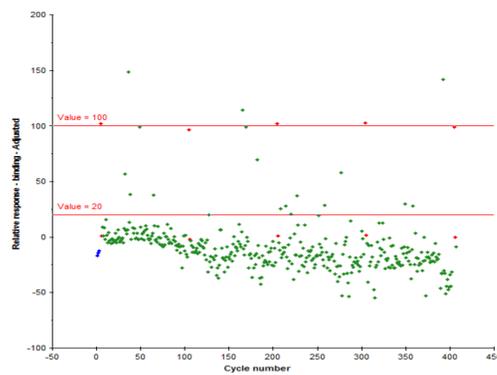
(N. C. Ha., M. S. Kim, W. W. Lee, K. Y. Choi and B. H. Oh J.Biol.Chem., 2000, 275, 41100-41106)



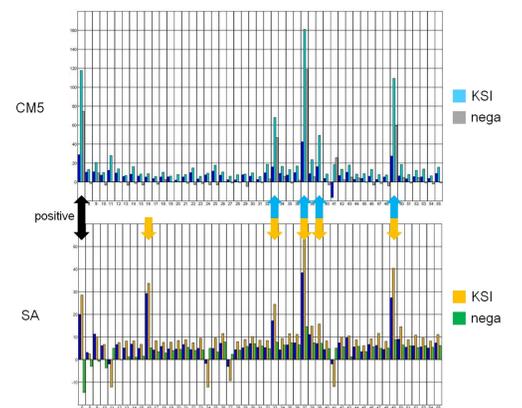
SPR、ITCの両方でKSIとの結合を確認した。ポジティブコントロールとして申し分のない性質をもっている。

SPRを用いたスクリーニング

例として2000フラグメント中384フラグメントのSPR測定結果を示す。ポジティブコントロールの結合量は約20 RUで一定であった。ポジティブコントロールの結合量の値を100、blankの値を0として規格化した値を表示する。規格化された値が20以上であり、センサグラムがポジティブコントロールと同じ箱型であるフラグメントをヒットフラグメントと見なした。

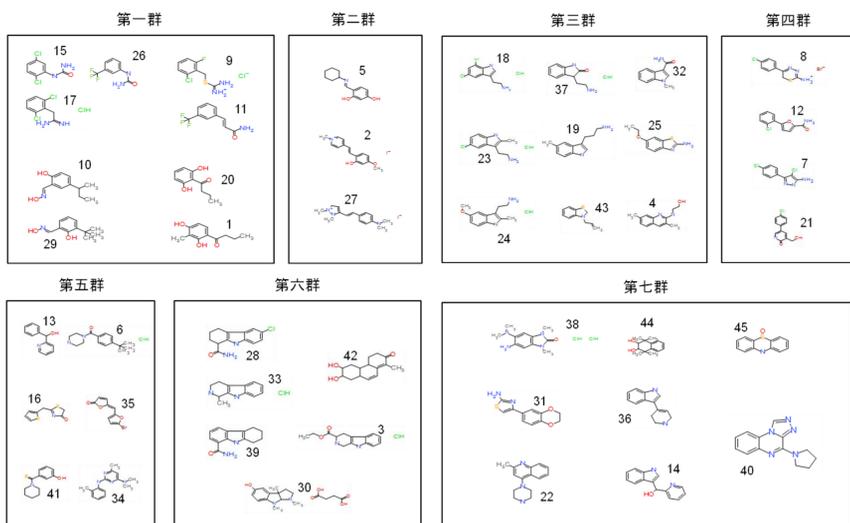


測定は結合方法の違う二種類の固定化チップを用いて行った。結果を比較し、双方でヒットしているフラグメントを抽出した。最終的に129フラグメントをヒットフラグメントとして選出した。



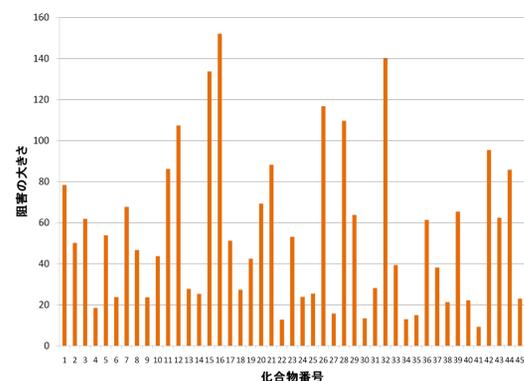
ヒットフラグメントの構造的分類

ヒットフラグメントの構造式から、類似構造をもつフラグメント毎に分類した。特に第一群、第三群、第六群は非常に高い類似性をみせた。



ITCを用いた競合阻害的解析

ヒットフラグメント中45フラグメントを入手し、ITCの一発滴定による競合阻害解析を行った。全てのフラグメントについて阻害が発生しており、KSI結合部位との結合が確認された。発生したエンタルピーの大きさと官能基の種類は非常に密接な関係性をみせ、特に一級アミドを官能基としてもつフラグメントは大きな阻害をみせた。この熱力学パラメータと分子構造を組み合わせることにより、さらなる絞り込みが可能である。



まとめ・今後の予定

- ・SPRによるスクリーニングによって、高い構造類似性をもつフラグメント群を選出できた。
- ・ITCによる競合阻害的解析によって、ヒットフラグメントの結合が確認された。また、一部の官能基を有するフラグメントは大きなエンタルピーを発生させた。
- ・ITCによるKSI・フラグメント間相互作用解析を行い、さらに候補を絞り込み、X線結晶構造解析を行う予定。
- ・数個まで絞り込んだ後、そのフラグメントの構造類似フラグメントを用いて再度スクリーニングを行う予定。
- ・使用したフラグメントライブラリは東京大学創薬オープンイノベーションセンターより提供された。