



Title	抗炎症薬創製を目的とした糖転移酵素 $\alpha$ 1-3 fucosyltransferase-VIIに関する基礎研究
Author(s)	宮代, 昌彦
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45959">https://hdl.handle.net/11094/45959</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	宮代昌彦
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第19641号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	抗炎症薬創製を目的とした糖転移酵素 $\alpha$ 1-3 fucosyltransferase-VIIに関する基礎研究
論文審査委員	(主査) 教授 八木 清仁 (副査) 教授 前田 正知 教授 山元 弘 教授 松田 敏夫

### 論文内容の要旨

種々の炎症性疾患の発症には白血球の浸潤が大きく寄与していると考えられる。白血球が炎症局所へ浸潤するための初期過程には、血管内皮上を緩やかに転がるローリング現象が重要であり、本過程には接着分子であるセレクチンおよびセレクチンリガンドのシアリルルイスX(sLe<sup>X</sup>)が関与している。セレクチン阻害薬の創薬研究は古くから行われてきたにも関わらず未だ上市に至っていない。その主たる理由は、in vitro活性が弱い、化合物が糖誘導体あるいは類似体であり血中安定性が悪い、分子量が高く経口吸収活性が低い等が指摘されており、現段階ではこれら課題を克服するにはかなりのハードルがあるといわれている。

白血球上のsLe<sup>X</sup>生合成酵素 $\alpha$ 1-3 fucosyltransferase VII (FucT-VII) 阻害薬は酵素阻害薬であることから、セレクチン阻害薬と同種薬効、かつ経口吸収を可能とする低分子化合物選出が期待できる。従って、FucT-VIIを抗炎症薬創製を目的とした新規創薬ターゲットとして選出し、本分子の性状解析およびスクリーニング系構築を行った。

FucT-VIIはゴルジ体内に存在するII型膜蛋白として知られるが、FucT-VIIのアッセイ系構築、および阻害剤の評価系構築を行う為に、全長酵素に加え、酵素源を安定かつ大量に供給することを目的に膜結合領域を欠いた可溶型酵素の発現ベクター構築および本蛋白の発現確認を行った。可溶型FucT-VII酵素は蛋白の回収を迅速および簡便に行う為、触媒領域に分泌シグナルペプチド配列とprotein Aタグを付加し、目的蛋白が培養上清中に分泌されるよう構築した。

大量安定供給が可能となったFucT-VII酵素を使用し、酵素学的性状解析を行うため、陰イオン交換樹脂QAE-toyopearl 550Cを使用したアッセイ系(AEC法)の構築を行った。本法はGDP-fucoseに対する保持能力、溶出ピーク収斂性が良好であり、酢酸アンモニウム[pH 9.0]を溶出液とした際、旧来法では困難であったLe<sup>X</sup>およびsLe<sup>X</sup>分画をone form columnで分離することを可能とした。FucTの基質特異性解析あるいは他の糖転移酵素のアッセイ系としての利用も可能であることに加え、グライコバイオロジーの種々情報収集へと応用可能な技術であることが示された。

この様な精度の高いアッセイ系は酵素性状解析に有用であるが、阻害剤スクリーニングを想定した場合、多検体を迅速、簡便に評価する必要があることから、近年High Throughput Screening(HTS)系構築は必須条件となっている。我々はロボットアッセイにも耐えうるアッセイ系構築を目指しScintillation Proximity Assay(SPA)法を用いた系の設定を検討した。SPA法は従来法であるHPLC法、TLC法、Dowex法等と異なり、反応生成物と未反応の基

質との分離が不要であり、マルチプレート対応の迅速かつ簡便な HTS 系である。我々は SPA 法の受容体基質として使用した糖蛋白 fetuin との親和性が良好である上述の安定であり可溶型の FucT-VII 酵素を用い、反応条件の最適化検討の末、SPA 法を用いた FucT-VII の HTS 系構築に初めて成功した。更に、GDP-fucose に対する  $K_m$  値は FucT-VI および FucT-VII で同等の値を示し、阻害プロファイルも含め、AEC 法と同様の酵素化学的性状を再現することができた。これら試験成績から SPA 法および取得酵素の HTS 系としての妥当性が確認された。

以上の成績から、FucT-VII 阻害薬スクリーニングフローとして、一次スクリーニングでは可溶型 FucT-VII および SPA 法を用いた HTS 系を稼動し、二次スクリーニングでは全長 FucT-VII および AEC 法を用いた阻害作用の再現性試験、およびプロファイル解析を稼動することで、無細胞アッセイ系のパートを設定することができた。

無細胞系で選出された FucT-VII 阻害剤のリード化合物としての見極めには細胞アッセイ系での評価は必須である。白血球、特に活性化 T 細胞では FucT-VII 依存的にセレクチンリガンド sLe<sup>X</sup> が細胞表面に誘導されることから、本抗原を指標とした FACS 解析により、FucT-VII 酵素活性を間接的に評価することが可能である。但し、sLe<sup>X</sup> の turnover に 3-4 日を有し、本リガンドを恒常発現する細胞をツールとした際、感度、スループット面で課題を残した。そこで MFP 誘導 GeneSwitch System を利用した全長 FucT-VII およびその生成物 sLe<sup>X</sup> を迅速、かつ簡便に誘導する細胞評価系構築に初めて成功した。既知阻害剤 panosialin の FucT-VII 阻害作用を FACS にて解析したところ、20-40  $\mu$ g/ml の濃度で sLe<sup>X</sup> 発現をほぼ完全に抑制した。また本細胞株の sLe<sup>X</sup> 発現を 20  $\mu$ g/ml panosialin 処理でほぼ 80% 抑制させ、セレクチン結合アッセイに供した結果、P-E-セレクチンに対し DMSO 処理コントロールの 57-73% の結合阻害率が確認された。このことから、panosialin の sLe<sup>X</sup> 発現抑制作用はセレクチンとの接着を阻害するに十分な作用であることが確認され、阻害剤選出の可能性が大いに期待された。

近年、FucT-VII 阻害剤に関する情報も蓄積されつつあり、近い将来リード化合物あるいは臨床入りする開発品が見出されるものと考えられる。我々の構築した HTS 系の新規細胞評価系は、薬物開発、グライコバイオロジー発展に有益な創薬ストラテジーを提示し、FucT-VII 阻害薬創製を加速するものと思われる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は炎症細胞の局所浸潤に寄与するセレクチンリガンド sLex の律速酵素である糖転移酵素 FucT-VII 阻害薬創製を目的として行われた。まず膜蛋白である FucT-VII 酵素の調製を効率かつ簡便に行うため、昆虫細胞発現系を利用した分泌型酵素発現系を確立し、酵素アッセイについては旧来法では不可能であった酵素反応生成物 Lex と sLex の分離を同一カラムで可能としたコンベンショナル陰イオン交換樹脂法、およびロボットアッセイに耐えうる SPA 法を原理とした新規ハイスループットスクリーニング系の 2 系統を構築した。更に細胞アッセイ系では GeneSwitch システムを用いた誘導型 FucT-VII のハイスループットスクリーニング系の構築に初めて成功し、迅速かつ効率的な創薬フローを設定することができた。更にこれら確立したアッセイ系を利用した FucT-VII 性状解析を通じ、FucT-VII がセレクチンリガンド発現の律速酵素であること、および炎症細胞の局所浸潤を特異的に阻害するという新規メカニズムの創薬ターゲットとして、魅力的な分子であることを立証した。

近年、FucT-VII 阻害剤に関する情報も蓄積されつつあり、近い将来リード化合物あるいは臨床入りする開発品が見出される可能性も高いと考えられるが、本研究で構築したこれら新規アッセイ系は、医薬品開発における新規創薬ストラテジーを提示し、FucT-VII 阻害薬創製、および複雑かつ多様なグライコバイオロジー領域の発展を加速するものと考えられ、薬学博士の学位論文として相応しい成果であると判断する。