

光アフィニティラベル法による薬物結合部位の同定と新規薬物標的の検索

國安明彦

Identification of the Ligand Binding Sites and Novel Drug Target Molecules by Photoaffinity Labeling

Akihiko KUNIYASU

*Department of Biofunctional Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kumamoto University, 5-1 Oehonmachi, Kumamoto 862-0973, Japan*

(Received April 25, 2003)

Photoaffinity labeling is a useful and reliable method for 1) the identification of the ligand-target receptor and 2) the structural investigation of its binding site. Using photoaffinity labeling techniques, the binding sites of four typical calcium antagonists, 1,4-dihydropyridines, benzothiazepines, phenylalkylamines, and benzothiazines, were successfully identified within the primary structure of the skeletal muscle calcium channels. The results confirm pharmacological observations of the four antagonists, which had been proposed to interact allosterically with each other. Secondarily we demonstrated that human glutathione *S*-transferase class π (GST π) is specifically photolabeled by the antidiabetic agent sulfonylurea glibenclamide (GB) and it also inhibits the enzyme activities of glutathione conjugation by GB in a competitive manner for glutathione. These results indicate that GST π is another target molecule of sulfonylurea since a subunit of ATP-sensitive potassium channels is well known to be a sulfonylurea receptor. This review focuses on photoaffinity labeling techniques as a useful tool for drug discovery and development.

Key words—calcium antagonist; glutathione *S*-transferase; photoaffinity labeling; sulfonylurea; voltage-dependent Ca²⁺ channel

1. はじめに

受容体や抗体、酵素などの機能性タンパク質は、特定の物質（リガンド）を認識し、独自の機能を発現している。リガンドがどのようなタンパク質を認識し（標的分子の同定）、又はタンパク質構造中のリガンド結合部位がどこかを解析する方法は、大きく分けると分子生物学的手法とタンパク化学的手法の2つがある。前者、特に遺伝子点変異実験は機能に関わるアミノ酸残基を pinpoint で同定できるため分解能に優れているが、どの点を変異させるかの選択がむずかしく、また変異によってタンパク質の構造変化が生じる可能性が常に付きまとっている。一方、リガンド誘導体を用いたアフィニティラベルで結合部位を解析するタンパク化学的手法は、現時

点では分解能において遺伝子点変異実験に一步譲るが、リガンドの誘導体さえ用意できれば未知の標的分子でも同定できる上、その結合部位さえも解析できる。したがって、両手法はリガンドと受容体の相互作用を明らかにする上で、本質的に相補うべき関係にある。

我々は、タンパク質修飾法の1つ、光アフィニティラベル法を用いて、受容体上のリガンド結合部位や種々のリガンド結合タンパク質を解析してきた。本稿では、光アフィニティラベル法の応用例を概説するとともに、Ca²⁺チャンネル上でのCa拮抗薬結合部位と経口糖尿病治療薬スルホニルウレア剤の新たな標的分子の同定についての我々の知見を紹介する。

2. 光アフィニティラベル法の応用

光アフィニティラベル法は、特異的修飾法の代表であり、光照射によりニトレン、カルベンと言った非常に反応性の高い化学的活性種を発生させて結合部位近傍をラベルする方法である (Fig. 1)。

熊本大学薬学部生体機能化学研究室 (〒862-0973 熊本市大江本町 5-1)

e-mail: kuniyasu@gpo.kumamoto-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

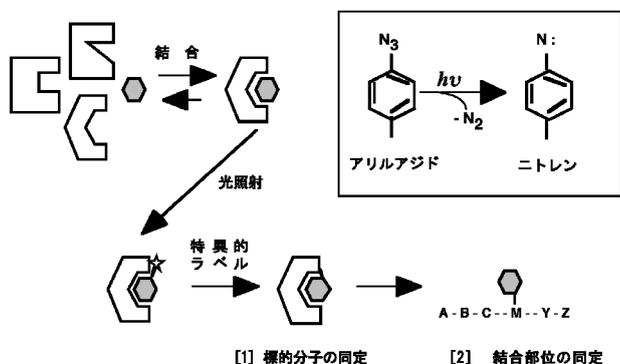


Fig. 1. Schematic Diagram of Photoaffinity Labeling

これらの化学種は、原理的にはいかなるアミノ酸残基とも反応し得ることが知られている。本法に関する基本原理については、畑中・中山らの総説に詳しく述べられている。^{1,2)}

さて、光アフィニティラベル法の応用は、Fig. 1で示すように2つに大別される。すなわち、1) 標的分子の同定 (標的となる未知の生体高分子が何であるのかを、光ラベルされた分子の分子量やアミノ酸配列を解析する)、2) リガンド結合部位の同定 (標的分子は既知であって、その中の光ラベルされた部位を1次構造上で同定する) である。これまでに構造未知のタンパク質の研究に盛んに応用され、特に薬物レセプターの同定やタンパク質分子内の薬物結合部位の同定に多大な貢献をしてきた。¹⁻³⁾

3. 光アフィニティラベル法による結合部位の同定

3-1. Ca拮抗薬の結合部位 Ca拮抗薬は降圧剤としてのみならず不整脈・狭心症など、多くの循環器病疾患治療における第1選択薬として、現在臨床的によく用いられている薬物の1つである。その化学構造により、nitrendipineやnicardipineなどに代表される1,4-ジヒドロピリジン型 (DHP類)、verapamilなどのフェニルアルキルアミン型 (PAA類)、及びdiltiazemなどのベンゾチアゼピン型 (BTZ類) の3つのタイプに分類されている。これらはいずれも、L型Ca²⁺チャンネルの $\alpha 1$ サブユニットに特異的に結合し、その薬効を発揮する。既に、L型Ca²⁺チャンネルの1次構造が明らかにされ、その高次構造を解析する研究が進んでいることから、これらCa拮抗薬のCa²⁺チャンネル上での結合部位を明らかにすることができれば、チャンネル

のCa²⁺透過機能を担う構造部に光をあてるのみならず、よりよいCa拮抗薬の創製といった応用への道が拓ける可能性もある。代表的な3群のCa拮抗薬の結合部位は、我々や欧米のグループにより、最初に骨格筋のCa²⁺チャンネル上の結合部位が、光アフィニティラベル法により明らかにされた。⁴⁻⁷⁾後に、この結果を受け、数多くの遺伝子点変異実験が行われ、結合部位の詳細な情報が得られた。

光アフィニティラベル法による結合部位の同定は、次のような実験により達成された。まず、骨格筋膜標品を用いて光感受性Ca拮抗薬誘導体で $\alpha 1$ サブユニットを特異的に光ラベルする。続いて、ラベルした $\alpha 1$ を特異性の高いプロテアーゼ (トリプシン、リシルエンドペプチダーゼ等) で消化し、生成したラベルペプチド断片を、チャンネルタンパク上の特定のペプチド配列を認識する種々の抗体 (抗ペプチド抗体) で免疫沈降できるか否かを調べる。最終的に、抗体が認識したペプチド断片のサイズからラベル部位を同定する。

最も典型的なCa拮抗薬であるDHPの結合部位は、中山らによりジアジリン誘導体 diadipine を用いて同定された。⁴⁾ 主要ラベル部位として、ドメインIIIのS5-S6リンカー部とドメインIV S6 (膜貫通領域) を含む部分の2ヵ所が特定された。また、PAAの結合部位はドメインIV S6の細胞質側領域、BTZ類はドメインIV S5-S6のリンカー部が主なラベル部位として同定されている。^{6,7)}

3-2. 新規Ca拮抗薬セモチアジルの結合部位の解析 セモチアジル (SD) は、ベンゾチアジン骨格を有するCa拮抗薬である (Fig. 2A)。本化合物は血管と心臓 (刺激伝導系) においてバランスのとれたCa拮抗作用を有し、副作用が起こりにくいことが知られている。薬理的には、従来のCa拮抗薬といずれも負のアロステリック相互作用を示す (Fig. 2B)。また、その化学構造を見ると、diltiazemとverapamilの構造を一部合わせ持っている。SDのCa²⁺チャンネル上での結合部位を同定することは、SDの結合部位がBTZ類やPAA類と同一か否か、アロステリック効果が何に起因するのかを含め、Ca拮抗薬の作用機構の基礎的理解を目指す上で重要である。そこで、我々は光感受性SD誘導体 [³H]FNAKを用いて骨格筋Ca²⁺チャンネルを光ラベルし、抗体マッピング解析により、SDのラ

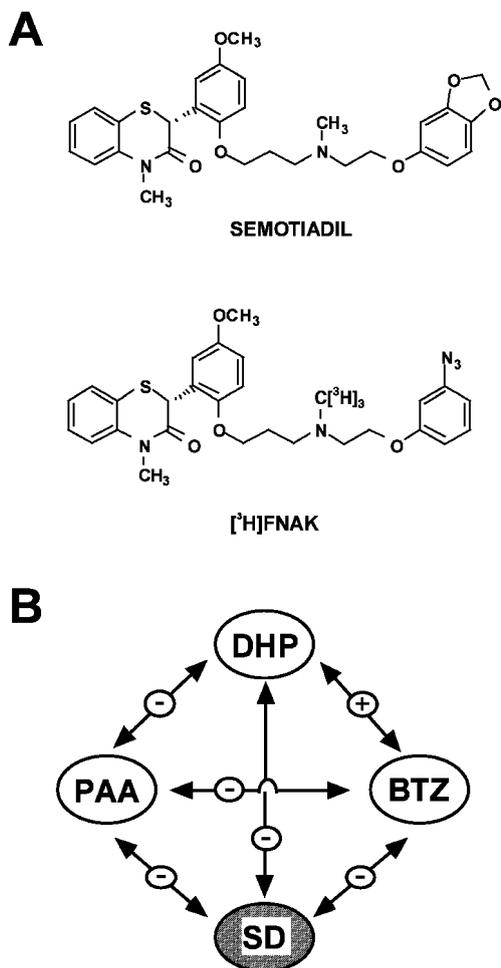


Fig. 2. A New Calcium Antagonist Semotiadil and Its Photosensitive Analog FNAK

A: Chemical structures of semotiadil and FNAK, B: Allosteric interactions among four typical calcium antagonists in the L-type calcium channel. DHP: dihydropyridines, PAA: phenylalkylamines, BTZ: benzothiazepines, SD: semotiadil.

ベル部位を同定した。⁸⁾ プロテアーゼ消化と臭化シアン分解によって生成したペプチド断片を解析した結果, Fig. 3 に示すように, ドメイン IV S6 を含む領域 (細胞膜外側から膜貫通部分を含み内側に至る領域) を最小ラベル部位として決定した. さらに, 我々は心筋組織でも同様の解析を行い, ほぼ骨格筋と対応する部位であることを確認した.⁹⁾

以上, 光アフィニティラベル法で同定された4つのCa拮抗薬の結合部位を, Fig. 4 にまとめた. いずれも互いに接近しているものの, 完全にはオーバーラップしていないことが分かる. 個々の薬物によって, 細胞膜の外側あるいは膜貫通領域といった位置の違いや, 隣接するドメイン III S5—S6 や IV S5 にまたがるといったように, 少しずつ違ってい

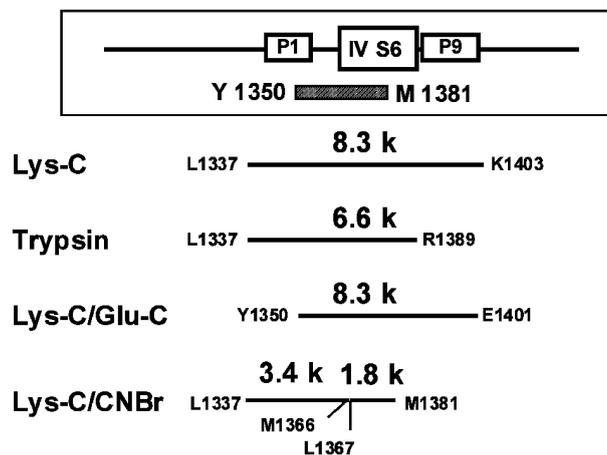


Fig. 3. Photolabeled Fragment Identified in the Region Containing Domain IV Segment 6 of the Calcium Channel α_1 Subunit from Skeletal Muscle

Observed proteolytic labeled fragments obtained from skeletal Ca channels are indicated. Consequently, the smallest labeled fragments can be deduced as Tyr1350—Met1381 (hatched bar). Proposed transmembrane domain IV S6 are also shown. Anti-peptide antibodies are: P1 (1320—1332), P9 (1382—1400). Lys-C: lysyl endopeptidase, CNBr: cyanogen bromide, Glu-C: V8 protease.

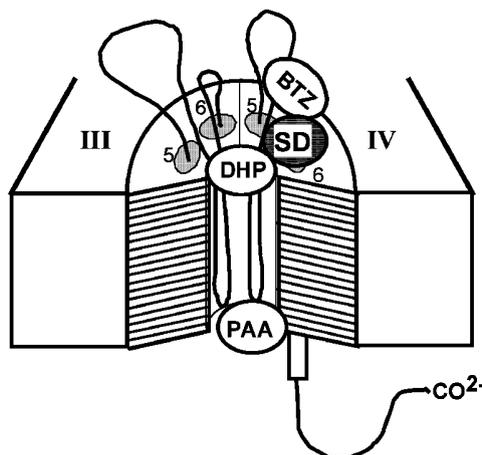


Fig. 4. Model of the Receptor Sites for Four Typical Calcium Antagonists in the Skeletal Muscle Calcium Channels Determined by Photoaffinity Labeling

た. しかしながら, 4種類の薬物すべて共通してドメイン IV S6 に結合部位がかかっており, このセグメントがCa拮抗薬のホットスポットになっている. 以上の知見より, SD と他の3つの薬物の結合部位は互いに異なるが, ドメイン IV S6 を共通して含むことから, アロステリック相互作用も起こりやすいと考えられる. よって, 薬理的に観察されていた事実も理解しやすい.

ところで, 厳密な意味でのCa拮抗薬の薬効発現

機構の解明や、現実的な創薬開発においては、光アフィニティラベル法からの情報のみでは達成しがたく、遺伝子工学的解析や構造生物学的な解析を加味した新たな情報が必要であると思われる。我々は、これを可能にするためにアミノ酸レベルの解像度の高次構造情報を得る、すなわち Ca 拮抗薬・Ca²⁺チャンネル複合体構造の解明を現在、進めている。その第一歩として、Ca²⁺チャンネルの電子顕微鏡による単分子解析を行い、解像度は 30 Å と低分解能ではあるが、電位依存性 Ca²⁺チャンネルでは初めての立体構造の像を得ることができた。¹⁰⁾ 構造生物学の目覚ましい進歩から推測すると、Ca²⁺チャンネルの結晶化とその X 線構造解析も近いうち達成されると思われるが、そうなればリガンド結合部位の詳細な情報を基盤とした組織選択性や持続性に優れた新規 Ca 拮抗薬の創製が現実のものとなる可能性が高い。

3-3. ラベルペプチドの高感度検出法の開発

これまで、光ラベルされた部位の解析は、主に抗ペプチド抗体による抗体マッピング法が用いられてきた。本法は放射性同位元素による検出に基づくことからサブ pmol オーダーで解析できるが、迅速性や解析精度など改良すべき点が残されている。当研究室の川原らは、この課題に取り組み、抗リガンド抗体と近年技術進歩の著しい質量分析法を組み合わせ、高感度かつ迅速にラベルペプチドを解析する方法を開発した。¹¹⁾ すなわち、光ラベル化合物をハプテン抗原として作製した抗リガンド抗体で、ラベルペプチド断片を選択的に釣り上げ、これを MALDI-TOF-MS 及び Nano ESI-MS/MS にかけて解析する。これにより、すべてのラベルペプチド断片の解析とその配列の同定ができる。さらに、ラベルされたアミノ酸残基までも同定可能である。ヒト血漿アルブミン上の Ca 拮抗薬 SD の結合部位の解析を行った結果、ラベルされたアミノ酸の残基の同定も含め、抗ペプチド抗体の場合と同様にサブ pmol オーダーで解析できた。この手法は、適切な力価を有する抗リガンド抗体 1 つ準備できればよく、光アフィニティラベル法の広範な応用に結びつくと期待される。

4. 光アフィニティラベル法による新規薬物標的の同定

4-1. スルホニルウレア剤の標的分子 光アフ

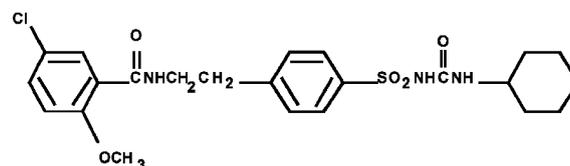


Fig. 5. Chemical Structure of Sulfonylurea Glibenclamide

ィニティラベル法のもう 1 つの応用法は、リガンドが結合する未知の標的タンパク質を明らかにすることである。グリベンクラミド (GB) (Fig. 5) は、インスリン非依存性糖尿病治療薬として臨床で広く用いられている典型的なスルホニルウレア剤 (SU 剤) である。本剤は、膵臓のスルホニルウレア受容体 (SUR) に高親和性で結合し、ATP 感受性 K⁺チャンネル (K-ATP) の機能を抑制する。これにより、インスリン分泌が促進され強力な血糖降下が起こる。GB は化学構造中にアリルアジドのような典型的な光反応基を有していないが、光ラベルが可能な化合物である。¹²⁾ これにより膵臓 SUR が光ラベルされ、その分子の存在が明らかとなり、さらにラベル分子の精製が進められた結果、SUR1 として cDNA クローニングされた。¹³⁾

ところで、我々は、当時分子実態が不明であった心筋 SUR の同定を [³H]GB を用いた光アフィニティラベル法で試みた。ところが、ラベルされたのは K-ATP サブユニットの SUR ではなく、脂質代謝関連分子である CD36 であった。後に、心筋 SUR は SUR2 としてクローニングされたが、GB との結合親和性が、膵臓 β 細胞のそれとはケタ違いに低いことが分かった。このことが、心筋 SUR がラベルされなかった理由と考えられた。CD36 は、マクロファージにおいてスカベンジャー受容体として酸化 LDL の取込みに関与し、動脈硬化症発症・進展の key 分子として注目されている。また、脂肪細胞においては FAT (脂肪酸輸送体) として機能し、エネルギー代謝に重要な働きを担っている。そこで我々は、後者の機能に着目し、マウス 3T3-L1 脂肪細胞におけるオレイン酸取込みに対する種々の SU 剤 (GB, tolbutamide など) の影響を調べた。その結果、阻害における IC₅₀ 値は >10 μM とそれほど高くはなかったが、いずれの SU 剤も濃度依存的な阻害を示した。よって、CD36 は SU 剤の標的分子の 1 つであることが本研究により明らかとなった。

4-2. ヒト単球における SU 剤結合タンパク質の同定 GB により CD36 がラベルされたことを踏まえ、我々はこのリガンドを用いる光ラベルにより、SU 剤の新たな標的分子の検索が可能ではないかと考えた。そこで生活習慣病関連分子を釣り上げることが目的とし、粥状動脈硬化症の発症・進展に關与する単球とマクロファージに着目し、それらに発現する SU 標的分子の検索を行った。今回はこのうち単球での知見を紹介する。

単球は血液中から組織内に移入してより活性化したマクロファージに分化し、生体防御反応のほか動脈硬化巣の形成や炎症反応におけるサイトカインの放出など種々の生体反応に關っている。近年、SU 剤が IL-1 β 分泌阻害や血管上皮細胞への単球接着抑制することが報告されている^{14,15)} しかし、それが単球のどの分子を標的としているのか分かっていない。そこで、SU 剤の新しい標的作用点を見つけ出すことも含めて、光アフィニティラベル法による単球の GB 結合タンパク質の検索を行った。

Figure 6 に示すように、ヒト単球由来 THP-1 細胞を [³H] GB で光ラベルしたところ、分子量 27 kDa, 60 kDa, 62 kDa に相当するタンパク質が検出された。このうち 27 kDa タンパク質を、イオン交換及び疎水性クロマトグラフィーで部分精製し、さらに SDS-PAGE にかけることで単離することに成功した。このラベル分子は、N 末端アミノ酸配列 (Fig. 6B) と内部配列解析により、グルタチオン S-トランスフェラーゼ π (GST π) であることが分かった。そこで、リコンビナント GST π を用いて、グルタチオン (GSH) と 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を基質として、その酵素活性に対する GB の影響を Lineweaver-Burk plot 解析により調べた。Figure 7A に示すように、既知の阻害剤エタクリン酸と異なり GB は CDNB に対して非拮抗的阻害を示した。一方、GSH に対してはその逆で拮抗的な阻害をした (Fig. 7B)。阻害定数 K_i は約 200 μ M と低かったが、GB はいわゆる GSH 部位に作用し、GST π の酵素活性を阻害することが示された。一見すると GB と GSH との間に構造的類似性は見られないが、GSH のアミド基やカルボン酸基、GB の SU 基、アミド基のように水素結合を形成できる置換基を比較的多く有する点では類似している。

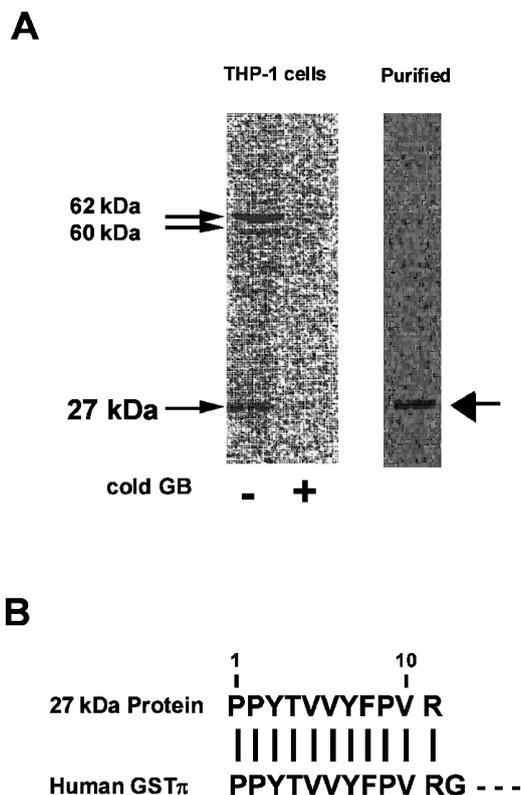


Fig. 6. Identification of Novel Target Molecules of Sulfonylurea

A: Photoaffinity labeling of human monocyte-derived THP-1 cells with [³H] Glibenclamide (GB). THP-1 cells were photolabeled with [³H] GB and analyzed by radioluminography. Arrows indicate the specific labeled bands. Right lane indicates radioluminogram of the purified 27 kDa photolabeled protein. **B:** N-terminal amino acid sequence analysis of the purified 27 kDa protein.

GST は生体の解毒機構に深く関与する酵素であるが、今回同定されたクラス π は、ヒト大腸癌、子宮癌など腫瘍細胞で著しく増加していることから腫瘍マーカーとして注目されている。THP-1 細胞は単球性白血病患者から分離された腫瘍細胞株であるため、GST π が光ラベルされやすかったのかもしれない。また、GST π 発現量と獲得耐性との間に相関性があることから、抗癌剤多剤耐性との関連も示唆されている。よって、SU 剤がこの耐性克服に利用できる可能性がでてきた。しかし、GB など既に臨床で使用されている SU 剤は、その強力な血糖降下作用のため、そのままの形ではこの目的には利用できないが、リード化合物としてとらえ、その化学構造を改良し、目的の機能のみを阻害できるように特化することは可能である。当研究室では、癌を含めた生活習慣病治療薬の開発を目指し、種々の SU 誘導体を新規合成し、検討した結果インスリン分泌

作用を持たず、目的の薬効を有する化合物がいくつか見つかってきている。

また、62, 60 kDa の他のラベルタンパク質についても、量的な問題を解決できれば GST π と同様にアミノ酸配列の同定が可能である。これら分子は、IL-1 β 分泌や血管上皮細胞への接着に関与する分子である可能性が高く、SU 剤の新たな標的として、生活習慣病治療薬の開発に寄与できるのではないかと期待している。

5. おわりに

光アフィニティラベル法の応用として、リガンド結合部位の同定と薬物標的の検索について、我々の知見を中心に紹介した。光アフィニティラベル法を適用することによって、これまで明らかになっていた3種の代表的薬物に加え、新規 Ca 拮抗薬であるセモチアジルの結合部位を Ca²⁺ チャンネル $\alpha 1$ サブユニットの1次構造上で同定することができた。これにより、骨格筋 Ca²⁺ チャンネルについての Ca 拮抗薬結合部位の全貌がほぼ明らかとなった。光ラベルの結果は、薬理的知見を満足するものであり、かつ後に行われた遺伝子点変異実験の結果といずれも大筋で一致していた。この点からも、光アフィニティラベル法がリガンド結合部位を解析する方法として優れていることが確認された。

一方、GB を用いた光アフィニティラベル実験により、腫瘍マーカーである GST π が SU 剤の新たな標的分子として釣り上がってきた。未知のリガンド標的の同定においても、有用な方法の1つであることが示された。

21 世紀の創薬を語る上で、目的とする病態と関連する分子、すなわち薬物標的の同定は最も重要なことである。現在、ゲノム解析やプロテオーム解析により、新たな標的分子の検索が盛んに進められているが、著者は光アフィニティラベル法もこれを達成する手法の1つとして有用であると確信している。今後、新規標的分子の探索のみならず、見い出した標的分子の機能に注目し、これら分子が関与する疾患に対する治療薬の創製の実現をめざしたい。

謝辞 本研究は、熊本大学薬学部生体機能化学研究室において行われたものであり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました中山 仁教授に謹んで感謝の意を表します。本研究を行うにあたり、御協力

いただきました当研究室の川原浩一博士、大神信孝博士、井伊斉昭修士、清水英介修士、林 茂樹修士並びに久木留涼子修士に深く感謝します。共同研究していただいた芝野俊郎博士（第一製薬）、A. Schwartz 教授（シンシナチ大学）、及び村田和義博士（生理学研究所、現産総研）に謹んで深くお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Hatanaka Y., Sadakane Y., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 271–288 (2002).
- 2) Nakayama H., *Yakugakukenkkyu No Shinpo*, **12**, 117–128 (1996).
- 3) Nakayama H., Hatanaka Y., Yoshida E., Oka K., Takanohashi M., Amano Y., Kanaoka Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 900–907 (1992).
- 4) Nakayama H., Taki M., Striessnig J., Glossmann H., Catterall W.A., Kanaoka Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 9203–9207 (1991).
- 5) Nakayama H., Kuniyasu A., *Jpn. Heart J.*, **37**, 643–650 (1996).
- 6) Striessnig J., Glossmann H., Catterall W. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9108–9122 (1990).
- 7) Watanabe T., Kalasz H., Yabana H., Kuniyasu A., Mershon J., Itagaki K., Vaghy P. L., Naito K., Nakayama H., Schwartz A., *FEBS Lett.*, **334**, 261–264 (1995).
- 8) Kuniyasu A., Itagaki K., Shibano T., Iino M., Kraft G., Schwartz A., Nakayama H., *J. Biol. Chem.*, **273**, 4635–4641 (1998).
- 9) Ii N., Kuniyasu A., Kawahara K., Shibano T., Schwartz A., Nakayama H., *FEBS Lett.*, **441**, 83–87 (1998).
- 10) Murata K., Odahara N., Kuniyasu A., Sato Y., Nakayama H., Nagayama K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 284–291 (2002).
- 11) Kawahara K., Kuniyasu A., Masuda K., Ishiguro M., Nakayama H., *Biochem. J.*, **363**, 223–232 (2002).
- 12) Kramer W., Oekonomopoulos R., Punter J., Summ H. D., *FEBS Lett.*, **229**, 355–359 (1988).
- 13) Aguilar-Bryan L., Nichols C. G., Wechsler S.

-
- W., Clement J. P. IV., Boyd A. E. III, Gonzalez G., Herrera-Sosa H., Nguy K., Bryan J., Nelson D. A., *Science*, **268**, 423–426 (1995).
- 14) Andrei C., Dazzi C., Lotti L., Torrisi M. R., Chimini G., Rubartelli A., *Mol. Biol. Cell.*, **10**, 1463–1475 (1999).
- 15) Desfaits A. C., Serri O., Renier G., *Metabolism*, **46**, 1150–1156 (1997).