

I - 1 SR の酵素活性測定と阻害薬のスクリーニング

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 教授 森 寿

【研究目的】

本研究では、SR 阻害薬リード化合物を同定し、新規 SR 阻害薬候補をスクリーニングするために、大腸菌でのリコンビナント SR の発現ならびに精製を行い *in vitro* および培養細胞系での、SR 活性測定系の確立と SR 阻害薬候補のスクリーニングを実施することを目的とする。また、個体レベルでの阻害薬の効果を検証するために、NMDA 受容体活性化に依存して発現する遺伝子を発光計測できる Arc-Luc Tg マウス系統 (Izumi et al., 2011) を用いた評価を行う。

【研究方法ならびに結果】

1) 変異型リコンビナントヒト SR (SR-C/D) の発現精製

マウス SR cDNA は、マウス脳由来 cDNA ライブラリーから PCR により増幅しクローン化して遺伝子配列を確認した後、リコンビナントタンパク精製のためのヒスチジンタグ (His x 6) 配列をカルボキシル末端に挿入した。また、ヒト SR cDNA は、理研バイオリソースより入手し、Smith らの報告 (Smith et al., 2010) に従い、可溶性を高めるためにアミノ酸配列の 2 番目ならびに 6 番目の Cys をそれぞれ Asp に置換し、さらに精製のためにカルボキシル末端にヒスチジンタグ配列を導入する修飾 (SR-C/D-His) を行った。これらの SR 遺伝子断片を、IPTG 添加により大腸菌でリコンビナントタンパク質を高発現するベクター pET21a に組み込んだ。出来上がった発現ベクターを、リコンビナントタンパク質発現用の大腸菌 (BL21-DE 3 株) に導入した。

大腸菌を 37°C で液体培養し、OD_{600 nm} の吸光度が 0.6 になった対数増殖期で最終濃度 0.5 mM の IPTG を加え発現誘導を行い、25°C で 16 時間以上培養した。遠心による集菌後、大腸菌ペレットを -80°C に凍結保存した。

以下のリコンビナント SR の精製は、研究分担者の水口教授の研究室で実施した。まず、凍結大腸菌ペレットを溶解液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazole) に懸濁した後、超音波破碎を行い、遠心 (35,000 rpm, 20 min, 4°C) 後、上清を His-Tag 精製カラムに通しリコンビナント SR を結合させた。次いでイミダゾール濃度を上昇させることで His-Tag 精製カラムからの溶出を行った。溶出液の蛋白濃度を測定し、SR が含まれると考えられる分画を、電気泳動 (SDS-PAGE) と CBB による蛋白質染色により確認し、Sephadex-75 カラムと溶出液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM

NaCl, 10% glycerol, 10 μ M PLP, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT) を用いてゲル濾過精製を行った。得られた分画を再度 SDS-PAGE と CBB により確認し, SR の含まれる分画をプールした後, 分注し液体窒素中で急速凍結し, 活性測定まで $-80^{\circ}C$ で保存した。この一連の発現精製過程で得られたリコンビナントSRの精製純度は70-80%であった。

2) 野生型リコンビナントヒトSRの発現精製

上記変異型のSR-C/Dを用いて, 活性測定を実施していたが, 阻害薬の K_i 値を求め定量的に評価するための実験を行うには, 活性が低い事がわかった。また, SRは十分な機能を発揮するために, 二量体化することが必要であり, また二量体形成には, 緩衝液の条件が影響を与える事が報告された(Wang and Barger, 2011)。そこで, 野生型(アミノ酸配列の2番目ならびに6番目がCys)のヒトSR遺伝子配列に精製のためにカルボキシル末端にヒスチジンタグ配列を導入した発現ベクターを構築し, 変異体SR-C/Dと同様の方法で精製を行い評価した。

3) in vitro SR 活性測定系の構築

SRの活性に対する化合物の阻害効果は, L-セリンのラセミ化反応と, 生産されるD-セリンの定量により計測した。

L-セリンのラセミ化反応は, Strisovskýら(2005)の方法に従い, リコンビナントSRを, 100 mM HEPES (pH 8.0), 1 mM $MgCl_2$, 10 μ M PLP, 1 mM ATP, 20 mM L-セリン, 5 mM DTT, ならびに DMSO に溶解した化合物(1~0.01 mM)を含む反応液125 μ L 中で, $37^{\circ}C$ で8時間以上反応させた。また, 反応初速度の解析のために, 経時的に反応を停止した。

D-セリンの定量は, Itoら(2007)の方法に従って行った。上記ラセミ化の反応液25 μ L に25 μ L の100 mM HEPES (pH 8.0), 20 μ M PLP, 2 μ g リコンビナントD-セリンデヒドラターゼ1(Dsd1)を含む溶液を加え, $30^{\circ}C$ で30分間反応させた。Dsd1は, D-セリンに対する特異性が非常に高く, D-セリンからピルビン酸とアンモニアを生成する。従って, Dsd1によってD-セリンから生産されるピルビン酸を比色反応によって計測した。そのために, 反応溶液50 μ L に50 μ L の0.05% DNP/2M HClを加え, $30^{\circ}C$ で5分間反応させた後, 100 μ L エタノールを加え, 次いで125 μ L の10M NaOHを加え, よく混和して室温で10分間反応させ, 515 nmの波長の吸光度計測を分光光度計で測定した。

4) 新規化合物のSR阻害活性の測定

ヒトSRの結晶立体構造情報をもとに, 北里大学薬学部の広野修一教授, 合田浩准教授との共同研究により見出したSR阻害薬候補19種類から, 上記in vitro SR活性測定系により, 4化合物がSR活性阻害効果を示した。この4化合物の構造情報をもとに, 研究分担者の豊岡教授が新規有機化合物

を合成した。新規化合物は、LW, MM, DR, ED の 4 種類に大別され、現時点で LW から34種、MM から37種、DR から29種、ED から37種の計137種の化合物の SR 活性阻害評価を、SR-C/D を用いて実施した。その結果、4 リード化合物から合成展開された新規化合物の中に、従来 SR 阻害薬として標準的に用いられているマロン酸と同程度、あるいは、より強力な阻害効果を示すものを見出した。MM については、IC50値を求め、従来報告されているマロン酸より、阻害活性が有意に強い事が明らかになった (図 1)。

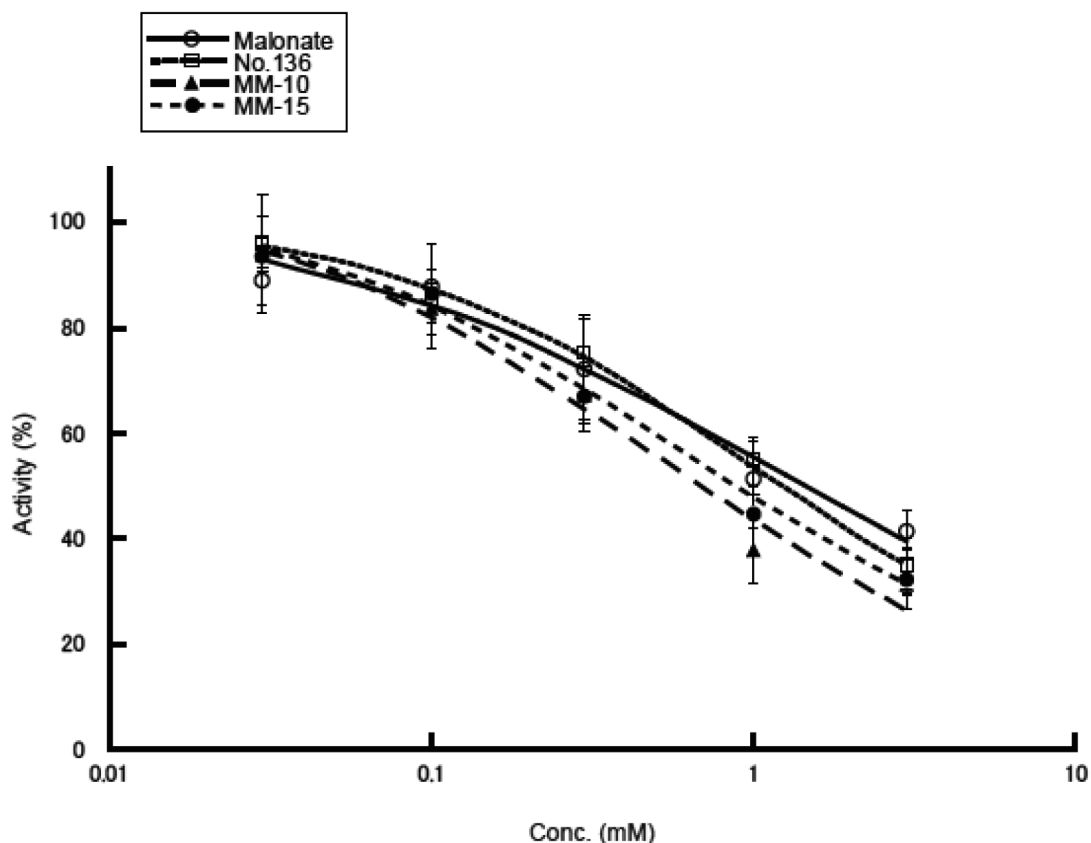


図 1 MM 化合物の SR 活性に対する阻害作用

リコンビナント SR-C/D を用いた試験管内活性評価により、MM10と MM15は、オリジナルリード化合物 (No. 136) や標準阻害薬のマロン酸 (Malonate) より強い阻害活性を示した。

5) 野生型 SR の発現と SR 活性測定

変異型 SR-C/D は、薬物の作用機構の解析過程で活性が弱い事が明らかとなったため、野生型ヒト SR を発現精製し、酵素の基本的性質の解析を実施した。その結果、野生型 SR の酵素活性は、最初に報告された文献 (Strisovský et al., 2005) にほぼ一致して高く、反応初速度の解析や阻害薬の作用解析が十分に行える事がわかった (図 2)

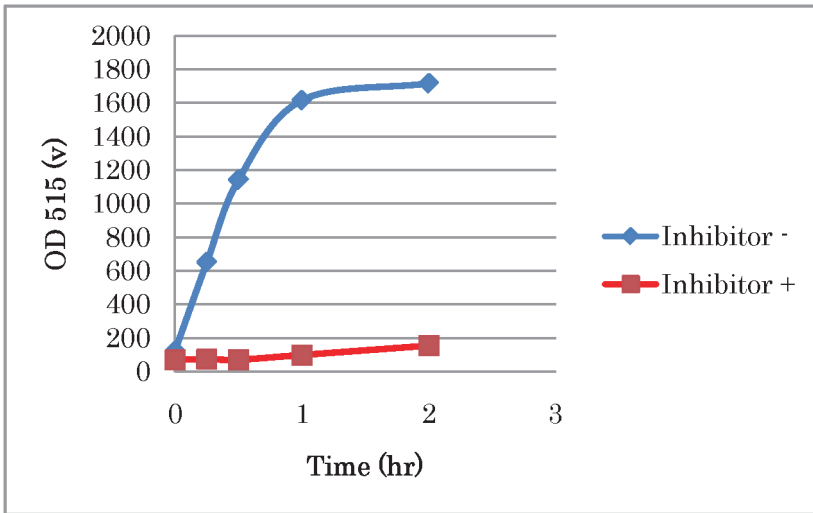


図2 野生型 SR の反応速度曲線。
反応時間30分までの初速度は、
1次関数的に上昇した。また、
阻害薬の効果も確認できた。

さらに、阻害薬の作用機構を解析するために、基質であるL-セリン濃度に対する阻害薬の効果を解析したところ、基質に対する競合阻害である事が示唆された(図3)。

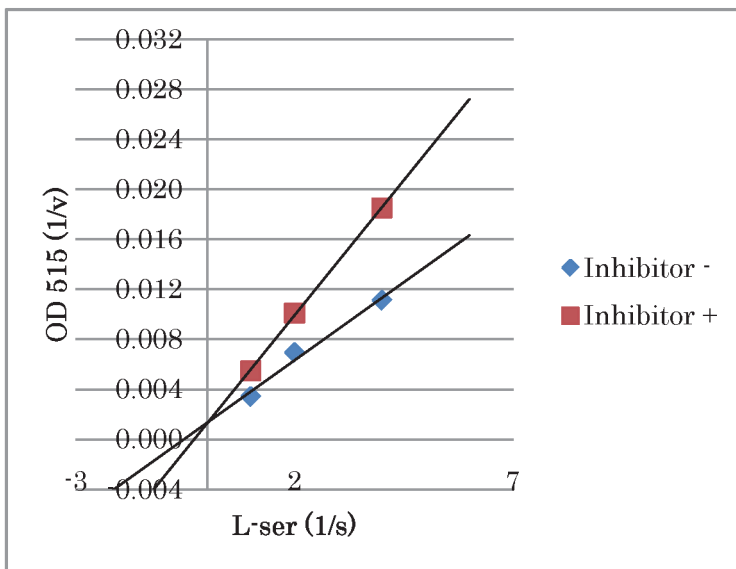


図3 基質濃度に対する阻害薬の作用。
Lineweaver-Burk プロットにおいて、
阻害薬の有無で同じX軸上の交点を示し、
競合阻害である事が示唆された。

また、阻害効果が高い薬物については、NMDA 受容体活性依存的な遺伝子発現を発光として定量評価できる Arc-Luc Tg マウス系統 (Izumi et al., 2011, 図4) を用いた解析に着手した。

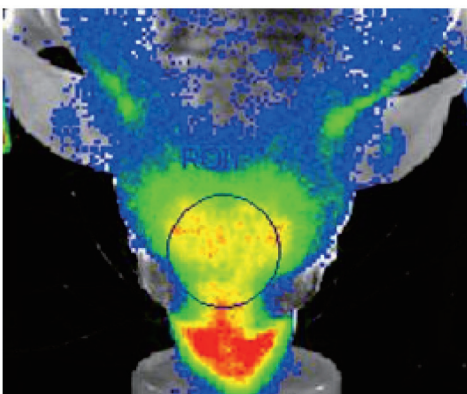


図4 Arc-Luc Tg マウスで観察される NMDA 受容体活性依存的発光

Arc-Luc Tg マウスでは、NMDA 受容体活性依存的に発現する Arc 遺伝子にホタル由来発光タンパク質 (ルシフェラーゼ Luc) 遺伝子を連結したトランスジーンが組み込まれている。図は背側より頭部を発光観察したものであり、通常飼育状態でも NMDA 受容体は機能しているため、脳からの発光 (円内) が観察できる。

【考察と今後の展望】

本研究により、リコンビナント SR の発現と *in vitro* での SR 活性測定系は確立されたと考えられる。既に *in silico* スクリーニングにより SR 阻害薬のリード化合物を同定し、それらのリード化合物から有機合成展開した新規化合物の中から、*in vitro* スクリーニングにより複数の新規 SR 阻害薬候補を同定した。今後は、見出された新規化合物の効果を定量的に解析するとともに、構造活性相関を明らかにし、さらに、新規阻害薬と SR との結晶を作製し、立体構造解析を実施することで阻害機構の解明を行う。また、マウス個体レベルでの活性測定を Arc-Luc Tg マウスで行う事で、体内動態や個体レベルでの作用機構解析を経て、新規薬物候補の同定につなげる。