

およびD-グルカミン骨格をもつメタクリレート誘導体 (1A, 1B)を重合することにより新規アフィニティー樹脂合成用担体 (2A, 2B)の開発を行った (図1). 樹脂 2A, 2B の性能を評価するため2種類の市販樹脂 Toyopearl™ (2C, 東ソー製, ポリメタクリレート系, 非特異的タンパク質吸着=多)および AffiGel™ (2D, Bio-Rad 製, アガロース系, 非特異的タンパク質吸着=少)との比較を行った. 担持するモデル化合物として, アフィニティー樹脂を用いた研究において標準的に使用される免疫抑制剤 FK506 を選択し, FK506 と特異的結合タンパク質 FKBP12 の複合体形成に影響を与えない FK506 の 32 位にスペーサーを導入した FK506 誘導体 (3A)をそれぞれの樹脂に担持した (図2).

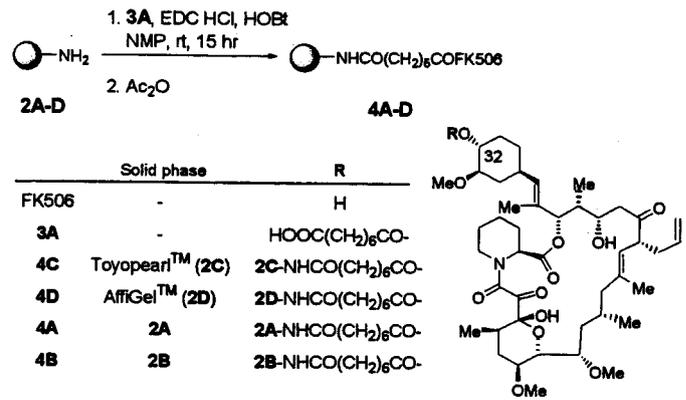


図2. アフィニティー樹脂へのFK506担持

FK506 を担持したアフィニティー樹脂 (4A-D)を用いて, ラット脳 lysate のアフィニティークロマトグラフィーを実施した結果, 新規アフィニティー樹脂 (4A, 4B)は Toyopearl™ (4C)に比べて tubulin 等の非特異的吸着が少なく, tubulin と分子量が類似する特異的結合タンパク質 FKBP52 を同定することができた. また, 4Bを用いることにより AffiGel (4D)では捕捉されないFK506の免疫抑制作用を司る標的タンパク質群 (calcineurin A/B, FKBP12/52 および calmodulin)を世界で初めて一枚のゲルから単離することに成功した (図3). これらの結果から, 新規アフィニティー樹脂合成用担体 (2A, 2B)は標的タンパク質探索に有効であり, 今後生物機能解明や医薬品の開発に広く利用されることが期待される.

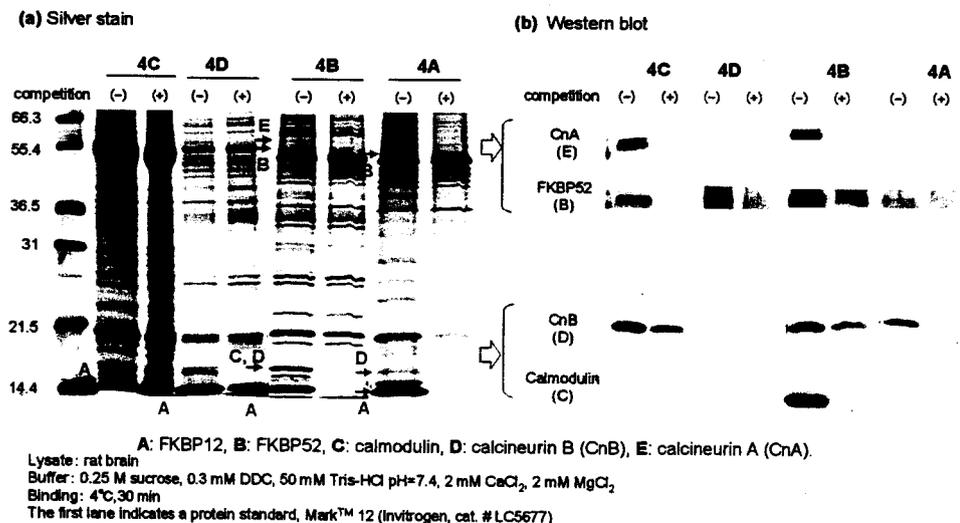


図3. FK506担持樹脂 (4A-D)とラット脳 lysate を用いたアフィニティークロマトグラフィー

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 原 哲 士

副 査 教 授 原 博

副 査 助 教 授 細 矢 憲 (京都工芸繊維大学

大学院工芸科学研究科)

副 査 講 師 福 士 幸 治

学 位 論 文 題 名

化学的に安定で非特異的タンパク質吸着が少ない アフィニティー樹脂の開発

本論文は9章からなり、図39、表10、引用文献34を含む本文90ページ、要旨2ページ、略語と生化学試薬の構造式3ページからなる和文論文である。他に参考論文3編が添えられている。

現在ポストゲノム時代の中心課題として Chemical Genomics が謳われ、積極的な投資が行われ製薬企業の注目を集めている。企業・大学等が所有する生理活性化合物ライブラリ (副作用・毒性を含む) の最大活用の重要性が認識され、いわゆる Forward Chemical Genetics 的戦略の遂行に注目が集まりつつある。興味ある生理活性物質の標的タンパク質を明らかにすることで、評価系の再構築、タンパク質の立体構造情報に基づく薬剤設計が可能となり、より強力で選択性の高い医農薬の開発につながるものと期待されている。このような研究においてアフィニティークロマトグラフィーは、直接化合物が結合する標的候補タンパク質を捕捉できるメリットがあるため、間接的な関連タンパク質情報を含む proteome 等の研究に比べ、より有効な方法の一つと考えられている。

アフィニティー樹脂を用いた標的タンパク質探索研究では、固相表面に生理活性物質をできる限り活性な状態で固定した後、標的タンパク質を含むタンパク質溶液と混合し、その特異的結合タンパク質から標的タンパク質を同定する。しかし、多くの場合非特異的にアフィニティー樹脂に吸着するタンパク質 (tubulin, actin 等) の存在が探索研究にとって大きな障害となる。

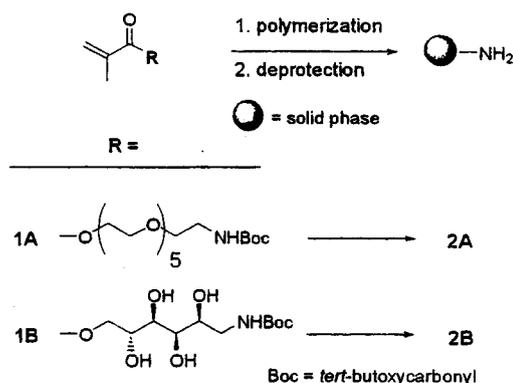


図 1. 新規アフィニティー樹脂の合成

著者はそれを克服するために、非特異的タンパク質吸着が少なく、且つ標的タンパクの捕捉能の高いアフィニティー樹脂を開発すべく、既に親水性スパーサーとして優れた非特異的タンパク質吸着抑制効果のあることが知られているポリエチレングリコールやポリオールをベースに、新たに設計し

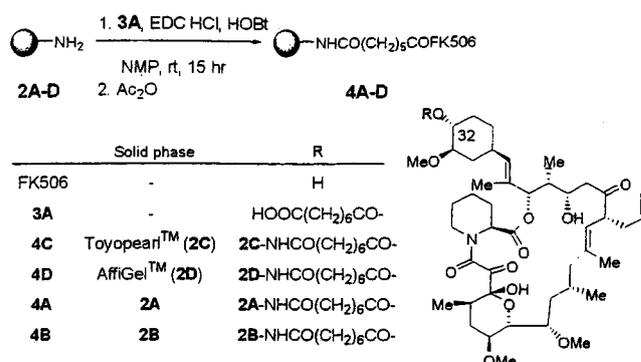


図 2. アフィニティー樹脂への FK506 担持

たヘキサエチレングリコールおよびD-グルカミン骨格をもつメタクリレート誘導体 (1A, 1B)を重合することにより新規アフィニティー樹脂調製用担体 (2A, 2B)の開発を行った (図 1). 樹脂 2A, 2B の性能を評価するため 2 種類の市販樹脂 Toyopearl™ (2C, 東ソー製, ポリメタクリレート系, 非特異的タンパク質吸着=多)および AffiGel™ (2D, Bio-Rad 製, アガロース系, 非特異的タンパク質吸着=少)との比較を行った. 担持するモデル化合物として, アフィニティー樹脂を用いた研究において標準的に使用される免疫抑制剤 FK506 を選択し, FK506 と特異的結合タンパク質 FKBP12 の複合体形成に影響を与えない FK506 の 32 位にスパーサーを導入した FK506 誘導体 (3A)をそれぞれの樹脂に担持した (図 2).

FK506 を担持したアフィニティー樹脂 (4A-D)を用いて, ラット脳タンパク質溶液のアフィニティークロマトグラフィーを実施した結果, 新規アフィニティー樹脂 (4A, 4B)は Toyopearl (4C)に比べて tubulin 等の非特異的吸着が少なく, tubulin と分子量が類似する特異的結合タンパク質 FKBP52 を同定することができた. また, 4B を用いることにより AffiGel (4D)では捕捉されない FK506 の免疫抑制作用を司る標的タンパク質群 (calcineurin A/B, FKBP12/52 および calmodulin)を世界で初めて一枚のゲルから単離することに成功した. これらの結果から, 新規アフィニティー樹脂調製用担体 (2A, 2B)は標的タンパク質探索に有効であり, 今後生物機能解明や医薬品の開発に広く利用されることが期待される.

以上のように, 本論文は Chemical Biology の領域で重要な技術である薬理活性物質と特異的相互作用をするタンパク質の効果的分離と同定を可能にする新規な, 化学的に安定で, 非特異的タンパク質吸着が少ないアフィニティー樹脂の開発に成功した経緯を取りまとめたものである. 所期の目的を達成した開発の考え方は広く範とするに足るもので, その成果は広範な関連分野の基礎から応用研究に裨益するところが大きく, 関連学会においても高く評価されている. よって審査員一同は高橋晃樹が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた.