

# 平成24年度 学内研究助成金 研究報告書

近畿大学

課題番号：SR03

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	プロスタグランジン J <sub>2</sub> の睡眠誘発物質合成酵素阻害機構の解明	
研究者所属・氏名	研究代表者：島本 茂 (理工学部・生命科学科) 共同研究者：	

## 1. 研究目的・内容

阻害剤の結合様式を原子レベルで明らかにすれば、その阻害剤をどのように改変すればより強い阻害活性を持つか、また、阻害活性を下げずにより扱いやすい性質 (安定性など) を付加できるかなどの予測が可能になる。

本研究では、L-PGDS と強力な阻害剤である PGJ<sub>2</sub> の複合体の立体構造を NMR によって明らかにする。その複合体立体構造情報から、PGJ<sub>2</sub> の結合様式と酵素反応阻害機構を明らかにする。

## 2. 研究経過及び成果

既に、pGEX ベクターを用いた L-PGDS の発現系を作成し、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N 等の安定同位体標識された遊離型 L-PGDS の大量調製が可能な精製系を確立していた為、L-PGDS は構造解析に十分な量を得ることができた。精製後の L-PGDS と PGJ<sub>2</sub> (15-deoxy-Δ<sup>12,14</sup>-PGJ<sub>2</sub>) を 1 : 1.5 の割合で混合し、10 分程度インキュベートした後にゲルろ過カラム (Superdex 75) および陽イオン交換カラムを用いて最終精製を行った。この方法で効率良く L-PGDS/PGJ<sub>2</sub> 複合体を取ることに成功した。

安定同位体標識した L-PGDS/PGJ<sub>2</sub> 複合体について多核多次元 NMR 法によって NMR シグナルの帰属を行った。アミノ酸の主鎖のシグナル帰属に必要なスペクトル (<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC, HNCA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH, HNCO など) を測定し連鎖帰属法によって帰属した。さらに、アミノ酸側鎖帰属およびプロトン間距離情報収集に必要な NOESY スペクトル ((H)CCH-TOCSY, <sup>15</sup>N-edited-NOESY, <sup>13</sup>C-edited NOESY など) の測定および解析を行った。NMR スペクトルの解析にはソフトウェア NMRPipe、NMRViewJ を用いた。複合体の蛋白質側主鎖の帰属は、ほぼ完了しており、側鎖の帰属も進行中である。ここまで得られた一部の帰属情報を既に海外の学術論文にて報告した。

しかし、まだ、側鎖と NOE の帰属が十分でない為、構造計算には至っていない。従って、今後は残りのシグナルの帰属および構造計算を行っていく予定である。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

これまでに L-PGDS の選択的阻害剤として AT-56 などの化合物が報告されてきたが、阻害活性が低く薬剤として使用するには困難な状況であった。本研究で得られる構造情報は、強力な阻害剤である PGJ<sub>2</sub> が L-PGDS をどのように阻害するかを明らかにしてくれる。その情報は、今後、新たな阻害剤を作り出す鍵となる。具体的には、複合体の構造情報から PGJ<sub>2</sub> にさらに置換基を導入し、蛋白質側との相互作用部位を増やすことで、より強い結合活性を持つリガンドを作り出す (Structure-based drug design) ことが可能になると考えられる。また、既に L-PGDS と強く結合することが明らかになっている疎水性低分子 (レチノイン酸や胆汁酸色素など) と PGJ<sub>2</sub> を適当なリンカーで繋いだ化合物を作製することでも阻害活性の高い新規化合物に繋がる可能性がある (Fragment-based drug design)。即ち、本研究で得られた複合体構造情報を基に新たな阻害剤の探索し、新規睡眠調節薬の開発を行っていく予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日 (予定を含む)
Biomolecular NMR Assignments (Springer)	雑誌	2013 年 1 月