

論文内容要旨

DNA 結合タンパク質を標的とした抗がん剤の
新規スクリーニング法の開発

指導教員：高野幹久 教授
(基礎生命科学部門医療薬剤学)

宮城 徹

【背景】

DNA 結合タンパク質は、転写因子などが含まれ、細胞の性質の決定に関わる中心的なタンパク質である。多くのがんで転写因子の発現亢進が報告されており、がんの発生・進展に転写因子が関わっていると考えられている。がん細胞で発現亢進している転写因子を標的とする抗がん剤開発の戦略としては、直接的に転写因子に結合して阻害するものと、間接的に上流シグナル経路を阻害するものがある。前者は、標的分子そのものを阻害するのであるから、より効果的であると期待される。しかし、これまでは DNA-タンパク質相互作用阻害剤の大規模スクリーニングに適したアッセイ系がなかったことから、この戦略の遂行は限定的であった。

【目的】

本研究では、DNA 結合タンパク質阻害剤の大規模スクリーニングを可能にするため、新規のアッセイ法である DSE-FRET (DNA Strand Exchange - Fluorescence Resonance Energy Transfer) 法を開発した。

【DSE-FRET の原理】

本法は、一定条件下において自然に生じる DNA 二本鎖間での鎖交換反応 (Strand Exchange) が、タンパク質の結合によって抑制される現象を利用している。一方の末端に一本鎖部分を持つ部分二本鎖 DNA (D1) と、二本鎖部分が D1 と相同で一本鎖部分が D1 の一本鎖部分と相補的な部分二本鎖 DNA (D2) を混合する。D1 と D2 は一本鎖部分で会合して四量体を形成する。D1 と D2 間で自然に鎖交換反応が生じ、やがて四量体が分離して二本の完全二本鎖 DNA となる。完全二本鎖 DNA 間での鎖交換はほとんど生じないため、ここで一連の反応が終わる。最終産物である完全二本鎖 DNA の蓄積量を計測するために、D1 を形成する DNA 鎖のうち一方は二本鎖側の末端を蛍光物質で標識し、もう一方の鎖は消光物質で標識する。これにより D1 単独では消光状態となる。しかし、D2 との間で鎖交換が生じると、蛍光物質と消光物質は別々の完全二本鎖 DNA へ分配されるので蛍光値が上昇する。一方で、D2 を加える前にタンパク質が D1 に結合すると、四量体の分離が起きず、消光状態が維持される。消光物質を D2 側に導入することで上記とは逆に、蛍光状態から消光状態に変換される系にすることもできる。

【方法と結果】

4 種類の DNA 結合タンパク質、NF- κ B (p50)、AP-1 (c-Jun)、Sp1 および TRF2 を用いて、DSE-FRET のタンパク質の検出を試みたところ、全てのタンパク質で配列特異的な結合を検出することができた。さらに、NF- κ B (サブユニット p50 および p52) 検出系について最適化を行い、阻害剤スクリーニング系を構築した。S/B と Z'-factor はそれぞれ 2.2 と 0.93 で明確かつ安定した系であることが示された。コンペティター DNA を用いた実験では、NF- κ B 結合部位への変異導入数に依存して、p50 で抑制された蛍光値が回復し、本法の特異性が示された。また、NF- κ B 阻害剤である Evans Blue および (-)-DHMEQ を用いて、p50 および p52 に対する用量依存的阻害効果を確認できた。(-)-DHMEQ は、p50 に選択的に結合すると報告されているが、本法で算出した IC₅₀ も、p50 で 8.8 μ M であったのに対して p52 では 62.5 μ M であり、両者に大きな差が認められた。

【考察】

タンパク質結合による鎖交換の抑制は、ヒストン八量体、p53 および TRF2 で報告がある。ヒストン八量体は非常に大きな複合体であり、また、p53 や TRF2 は DNA の分岐構造に結合する性質を持ち合わせて

いるため、これらは特殊例と考えられていた。しかし、本研究では一般的な転写因子である NF- κ B(p50, p52)、AP-1(c-Jun)および Sp1 でも、鎖交換が抑制されることを見出した。よって、DSE-FRET は DNA 結合タンパク質一般に適用できる方法だと考えられる。

本法は、化合物と標的タンパク質および蛍光標識 DNA を混合するだけで洗浄が不要なため、大規模スクリーニングに適している。コンペティターDNA の配列の違いを鋭敏に検出し、さらに、(-)-DHMEQ の p50 選択性も再現されたことから、阻害剤候補化合物の特性の評価にも使用できると考えられる。

本法により DNA 結合タンパク質を標的とした抗がん剤開発が大きく展開していくと期待される。