

研究題目 Bongkreic acid の細胞内輸送における

脂肪酸結合タンパク質の役割

研究組織

研究代表者：山本 篤司（鈴鹿医療科学大学 薬学部）

共同研究者：篠原 康雄（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

Bongkreic acid (BKA) はミトコンドリアを介した細胞死を抑制するため、がんやアルツハイマー病などの難治性疾患の治療薬開発に貢献することが期待される。本研究では、BKA を標的部であるミトコンドリアへ効率的に作用させるため、BKA の細胞内輸送メカニズムの理解を深めることを目的としている。脂肪酸結合タンパク質 (FABP) は、遊離脂肪酸の細胞内輸送を担うと考えられており、申請者は脂肪酸 like な構造である BKA も FABP と結合することを見出している。そこで、大腸菌発現系により精製した FABP と BKA analog を用いた解析を行い、FABP と BKA の相互作用メカニズムの解明に取り組んだ。

[1-2]研究の方法・経過

Human FABP1 の N 末端側に His タグを付加した変異体が大腸菌 (BL21 (DE3) pLysS) 内で発現させ、Ni アフィニティーグラフィーおよびゲルろ過により recombinant FABP1 を精製した。BKA analog と FABP の結合解析には、蛍光試薬 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (ANS) との競合反応を応用した。

ミトコンドリアは、Wistar 系雄性ラットの肝臓からホモジナイズと遠心分画により単離した。単離したミトコンドリアを超音波処理により反転させ、未破碎のミトコンドリアは遠心分離により除去した。次いで、超遠心分離を行い、亜粒子ミトコンドリアを調製した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

○FABP1 と BKA analog との相互作用解析

BKA は分子内に 3 つのカルボキシル基を有し化学合成が困難であった。過去の共同研究において、BKA の構造を簡素化させた BKA analog (KH-1~17) を作製し、阻害活性評価を行ってきた (*Chem Biol Drug Des*, 2015)。そこで本研究ではまず、精製した FABP1 と BKA analog とのスクリーニング解析を行った (図 1)。

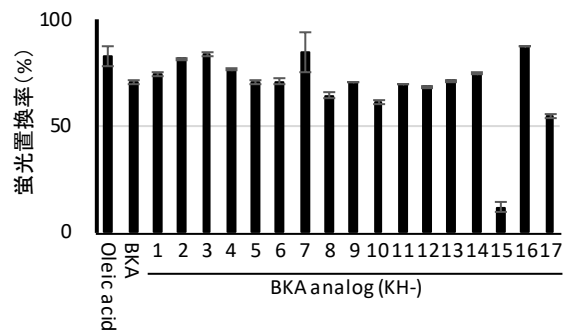


図1 BKA analogのスクリーニング解析

1 μ M FABP1と40 μ M ANSを混和し蛍光状態にした後、100 μ M BKAおよびそのanalogを添加した。蛍光強度を測定し、蛍光置換率を算出した。コントロールとして10 μ Mオレイン酸を対象とした。

スクリーニングの結果、KH-3, 7 および 16 が FABP1 と高親和性であることが見出された。また、KH-15 は FABP1 に対する親和性が著しく低いことが示された。さらに詳細に解析を行った結果、FABP1-ANS に対する BKA の IC₅₀ は $39.7 \pm 5.0 \mu\text{M}$ であったのに対し、KH-3, 7, 16 の IC₅₀ はそれぞれ 3.39 ± 0.28 , 8.07 ± 0.69 , $2.17 \pm 0.11 \mu\text{M}$ となり、これらの BKA analog は FABP1 に対して親化合物の BKA よりも 10 倍近い親和性を示すことが判明した (図 2)。

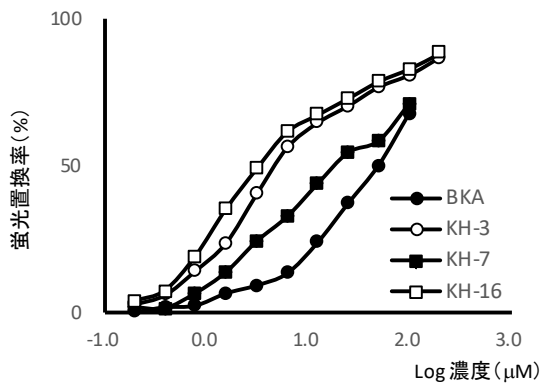


図2 FABP1に対するBKA analogの親和性解析
1 μM FABP1と40 μM ANSを混和し蛍光状態にした後、様々な濃度のBKAまたはBKA analogを添加し、蛍光強度を測定した。

○直接的 BKA 阻害活性評価系の構築

本研究では、BKA のターゲット分子である ADP-ATP 輸送体に対する BKA analog の阻害活性評価系構築にも取り組んだ。BKA の結合部位がミトコンドリアのマトリクス側に存在するため、BKA の阻害活性を評価する上で、化合物の内膜透過性を考慮する必要があった。そこで、超音波処理によりミトコンドリア内膜を反転させた亜粒子ミトコンドリアを調製し、BKA 結合部位を表面に露出させた。さらに、BKA と競合的に結合する蛍光試薬 EMA を用いることで、ADP-ATP 輸送体に対する BKA の阻害活性を直接的に評価する実験系の構築を行った (図 3)。

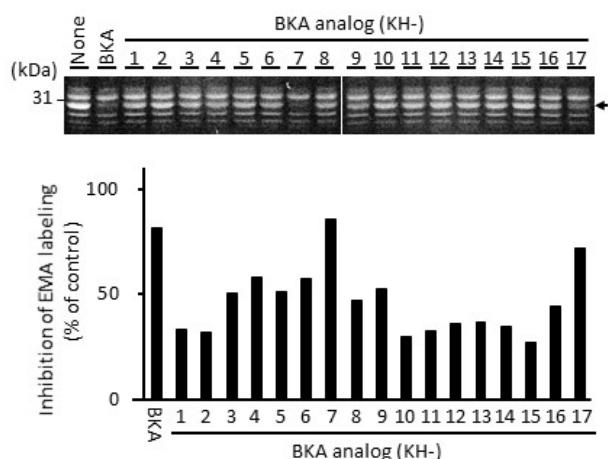


図3 EMAラベルを指標としたBKA analogの阻害活性評価
BKA analog 20 μMで前処理した亜粒子ミトコンドリア(4 mg of protein)に200 μM EMAを10秒間反応させた。反応後のサンプルをSDS-PAGEに供し、紫外線照射下でゲルを撮影した。ADP-ATP 輸送体の蛍光シグナルを数値化し、阻害活性をグラフ化した。

検討の結果、EMA の蛍光消失を指標とした阻害活性評価系の構築に成功し、BKA analog の阻害活性についても過去の報告と同様の結果となった。今回構築した評価系は、BKA 研究を効率的に進める有用なツールとなることが期待さ

れる。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

BKA に関する様々な研究が世界中で行われているが、細胞内輸送に着目した研究はほとんどなされていない。本共同研究により、FABP を介した BKA の細胞内輸送メカニズムが明らかとすることで、BKA 研究の新たな領域を切り開くことができると考えている。今回、BKA よりも親和性が高い analog (KH-3、7、16)、低い analog (KH-15) を見出すことができた。これらの構造的特徴や性質について解析を進め、FABP1 と BKA の相互作用メカニズムの解明に繋げていきたい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究では、recombinant FABP1 を用いた *in vitro* な実験に留まっているため、今後は培養細胞を用いた *in vivo* 研究についても進めていきたい。具体的には、FABP1 を恒常発現するヒト肝由来 HepG2 細胞に対して siRNA を用いた発現抑制を行い、BKA の取り込みや活性評価実験に取り組む。