

平成27年 3月31日

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 金岡 純二 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 : 900 千円	
研究代表者 : 友廣岳則	所属 : 大学院医学薬学研究部 (薬学)	職位 : 准教授
研究題目 : 多成分の薬効を高精度で判定するための基盤技術開発		

【研究概要】

物質の生理活性を評価するには、まず作用する受容体の特定が重要あり、さらにその結合状態に関する情報が1つの基準となる。光化学標識法ではあらゆるタンパク質の薬物結合部位に瞬時に解析用タグを導入可能なため、標的タンパク質の同定の他に、結合量解析やラベルアミノ酸から結合構造情報を取得できる優れた方法である。独自法ではその解析効率を飛躍的に向上させた結果、これまで数年を要しても失敗が多かったラベル位置同定をわずか数日で達成できるようになった。これにより結合ドメインにおける結合位置が解析されるため、一般的なタンパク質全体への on/off 解析ではなく、構造情報に基づいた、より精度の高い結合解析が可能となる。今回、複数因子が絡むアロステリック酵素を評価系として、この基盤技術開発を推進した。

【成果要約】

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) は6量体を形成し、ATP, ADP, GTP, NADH 等が作用して酵素反応を高度にアロステリック調整する。末端リン酸に光反応基を導入した ATP, ADP プローブを作成し、GDH への複数因子結合解析を実施した。これらプローブによるラベルアミノ酸は直ちに特定され、アロステリック制御ドメインへの結合が明らかになった。さらに独自の光反応基はクロスリンクした後に構造変化し、蛍光基クマリンを形成する。この特性により、HPLC で膨大な消化産物中でラベルペプチドのみを高感度に検出可能となった。この蛍光ピークの量は結合量を示し、一方、保持時間はラベル位置の変化、即ち結合状態の変化を反映する。実際に ATP や ADP, NADH 存在下でピーク量の減少が確認された。これら因子の添加によるピーク保持時間の変化はなく、MS 解析でもラベル位置の変化は認められなかったこと、さらに主要ピークの他に確認された複数の微量蛍光ピークも同じ変動を示したことから、競合的な阻害と考えられる。しかし、基質 Glu を加えた系では新たな蛍光ピークが観測され、結合構造の変化が示唆された。今後詳細な解析は必要であるが、複雑なアロステリック構造変化と機能発現の相関を、結合構造レベルで解析できることが示された。本法では複数結合ドメインの個別解析が可能なることから、今後はこの基盤技術を基に、複数因子の結合変動の同時解析に展開する予定である。

(別添資料)

研究成果 発表状況	<p>【雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ, 産業財産権 (特許権等) の出願・取得状況について記入】</p> <p>【論文】</p> <ol style="list-style-type: none">1. Souta Masuda, Takenori Tomohiro, Shouta Yamaguchi, Shota Morimoto, Yasumaru Hatanaka, Structure-assisted ligand-binding analysis using fluorogenic photoaffinity labeling. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i>, in press, DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.03.008. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none">2. 友廣岳則, 増田宗太, 森本正大, 山口昇太, 千葉順哉, 畑中保丸. 光アフィニティー蛍光ラベル法による構造情報に基づいた結合解析. 第 36 回日本光医学・光生物学会, 2014 Jul 25-26, 吹田.3. 山口昇太, 増田宗太, 森本正大, 千葉順哉, 友廣岳則, 畑中保丸. 光アフィニティーラベル法による複数リガンドの結合解析. 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2014 Aug 20-21, 板橋.4. 友廣岳則, 多機能光アフィニティーラベル法による標的タンパク質の解析. 第 79 回北陸質量分析談話会, 2014 Jun 14, 富山.		
経費の 執行状況	区分	執行額 (円)	備考
	消耗品費	752.5 千円	有機合成試薬, バイオ系試薬, 有機溶媒など
	機器使用料	134.6 千円	共通機器使用料
	英文校正	12.9 千円	論文の英文校正