

阻害剤によるペロ毒素作用機構の解明と治療薬開発に関する基礎研究
 Study on the Mechanism of Verotoxin Activity and Therapeutic Applications by Inhibitors

藤井政幸, 坂田政和

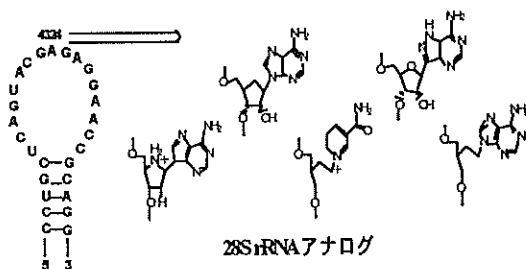
Masayuki Fujii^{1,2} and Masakazu Sakata¹

¹近畿大学九州工学部生物環境化学科, ²近畿大学分子工学研究所ヘンケル先端技術リサーチセンター

The present study describes the synthesis and evaluation of 28S rRNA and Gb3 ceramide analogs to investigate the molecular mechanisms of Verotoxin and inhibitory effects against its cellular toxic activity. Binding affinity of themically synthesized α -Gal、 α -Gal-1,4- β -Gal、 β -Gal-1,4- β -Glu、and α -Gal-1,4- β -Gal-1,4- β -Gul derived sugar receptor analogs with abrin C were examined by Surface Plasmon Resonance Apparatus. On the other hand, 28S rRNA analogswere also synthesized and evaluated its inhibitory effects against N-glycosidase activity of PAP. The optimized structure of a 28S rRNA analog as a verotoxin inhibitor involves a 16mer oligoribonucleotide containing a GAGA tetraloop. It was also revealed that incorporation of acyclic and cationic derivatives of adenosine into the analogs increased its inhibition activity.

1. 研究目的

病原性大腸菌産生ペロ毒素作用機構の原子レベルでの解析に基づきデザイン・化学合成したペロ毒素に強く結合するリガンドをテンプレートとして、表面プラズモン共鳴バイオセンサーにより、超微量のペロ毒素を簡便・迅速に検出する方法、装置を開発する。毒素とリガンドの結合は特異性が高く、強力なので、非常に高感度な検出が可能である。安価で操作が容易なペロ毒素検出装置としての実用化を目指す。また、そのリガンドをペロ毒素阻害剤として、ペロ毒素や同様の作用機構を持つ赤痢菌志賀毒素、植物毒素リシンなどへの治療薬として応用し、治療法のない病原性大腸菌感染治療薬の開発を目指す。



2. 研究成果

(1) 28SrRNAアナログの化学合成と生化学的評価

28SrRNAアナログの最適構造を探索するために、様々なステムループ構造を合成し、ペロ毒素を同様の作用機構を持つ植物由来細胞毒素PAP (pokeweed

antiviral protein)を用いてそれらの、N-グリコシダーゼ活性阻害効果を調べた。(Fig. 1)その結果、ループの中央部分のGAGA配列の両側で塩基対を形成しうるアナログ、1 (wild type)、3、5の3つの阻害活性が高いことが分かった。

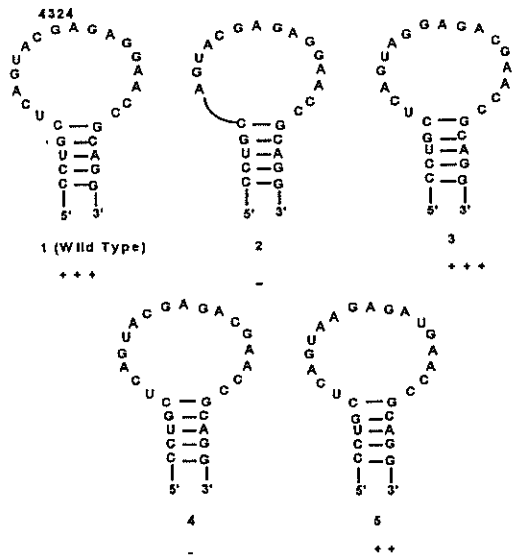


Fig. 1. 28SrRNA変異アナログとそのPAP阻害活性

このことより、毒素への結合にはGAGAテトラループ構造の形成が不可欠であることが示唆されたので、GAGAテトラループ構造を形成し得る様々なステムループ

ブを合成し、さらに、構造の最適化を計った。

(Fig. 2)その結果、やはり、PAP阻害にはGAGAテトラループ構造の形成が不可欠であること、ループ部分の配列は阻害活性にほとんど影響しないことが分かった。

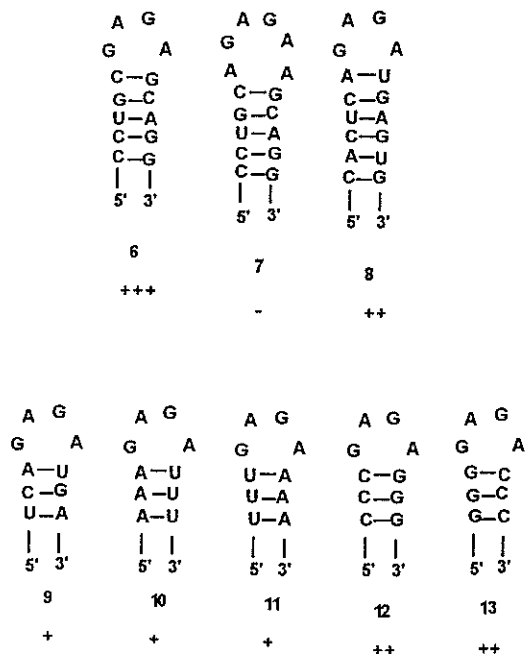


Fig. 2. GAGAテトラループ構造を有する変異アナログとPAP阻害活性

以上の結果より、GAGAテトラループ構造を有するヘアピンループ構造がPAP阻害に対して必要条件であることが分かったので、ステム部分を安定な塩基対であるGCとし、その長さの最適化を計るため、PAPを用いたRNA分解反応における速度論的なパラメータを測定した。(Table 1.) 測定では、反応の結果遊離するアデニンをクロロアセトアルデヒドとの反応で蛍光性のエテノアデニンへと変換し、HPLCを用いて蛍光検出することにより定量した。

その結果、5~6塩基対のステム部分を持つRNAアナログの14量体15、及び16量体16の k_{cat}/K_m の値が最も大きく、阻害剤の構造として適していることが示された。

以上の結果をもとに、15量体ステムループ構造を有するリン酸部分とリボース部分を化学修飾したデオキシリボース体 (DNA)18、チオリン酸エステル体 (S-DNA)19、2'-OMe体20、の3種のアナログについて同じく速度論パラメータを測定した。(Table 2) その結果、デオキシリボース体 (DNA)18、チオリン酸エステル体 (S-DNA)19や2'-OMe体20でも、毒素への取り込みN-グリコシル

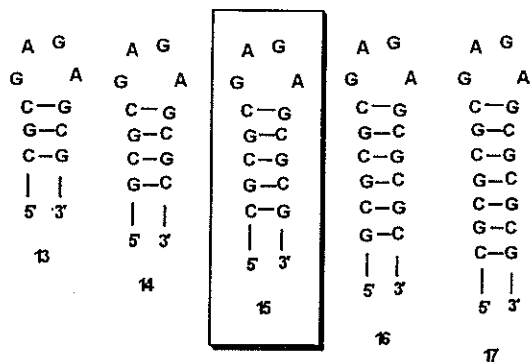


Table 1. Michaelis-Menten Kinetic Constants of rRNA Analogs for PAP.

Substrates	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
GAGA	$<10^4$	-	-
13	4.1 ± 0.3	4.1 ± 1.0	1.7×10^4
14	101 ± 7	2.7 ± 0.4	6.2×10^6
15	219 ± 14	8.1 ± 0.7	4.5×10^6
16	54 ± 9	6.0 ± 1.3	1.5×10^6
17	16 ± 1	6.1 ± 0.6	4.4×10^4

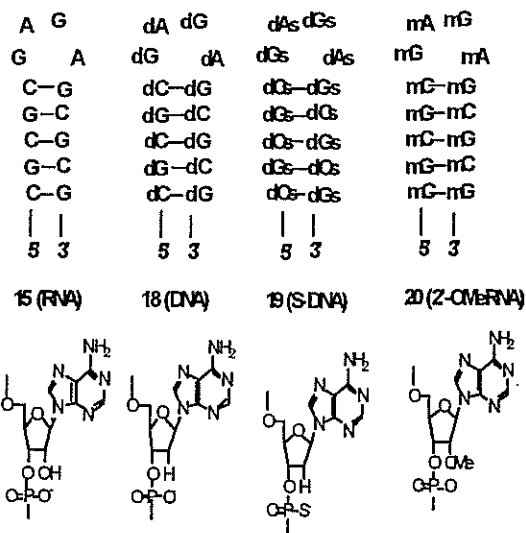


Table 2. Kinetic Parameters of VI Inhibitors for Ficin A-Chain.

Substrates	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
15	219 ± 14	8.1 ± 0.7	4.5×10^6
18	0.35 ± 0.04	26 ± 0.3	2.2×10^3
19	0.069 ± 0.01	6.1 ± 0.6	2.4×10^4
20	1.87 ± 0.05	9.6 ± 0.5	3.2×10^5

化が起こることが示された。また、チオリン酸エステル体 (S-DNA)19では分解が非常に遅いこと、また、RNAに近い構造を取ると予想される2'-OMe体20では取り込みの親和性が低いことなどが分かった。一方、デオキシリボース体 (DNA)18は毒素への親和性が高く、阻害剤の構造としてはむしろ適していることが示された。

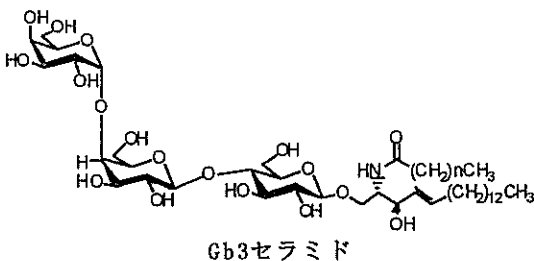
これらの誘導体18~20についてはリボソーム存在下でのPAP阻害定数 K_i を測定した。(Table 3.) その結果、デオキシリボース体 (DNA)18の阻害定数が最も小さく、最も低い濃度で阻害効果を発揮することが示された。

Table 3. K_i Values of VT Inhibitors for Ricin A-Chain.

Substrates	K_i (μ M)
18	11.3 ± 2.4
19	25.2 ± 4.5
20	21.8 ± 2.3

(2) 糖鎖受容体Gb3セラミドアナログの化学合成と毒素検出。

ペロ毒素とその細胞膜糖鎖受容体であるGb3セラミドとの結合を表面プラズモンセンサーにより検出するため (Fig. 3)、ペロ毒素の代替として細胞毒素abrin Cをセンサープリズム上に固定化し、Gb3糖鎖をリガンドとして注入して、そのセンサグラムより結合-解離の速度定数、および、解離定数を求めた (Table4)。



その結果、結合反応速度定数 $k_A = 7.24 \times 10^3$ 、解離反応速度定数 $k_B = 7.59 \times 10^{-4}$ 、結合平衡定数 $K_A = 9.53 \times 10^6$ 、解離平衡定数 $K_B = 1.05 \times 10^{-7}$ と言う値を得た。SPRセンサーの感度はリガンドの分子量に比例するため、Gb3糖鎖の分子量が504、Abrin Cの分子量は約60,000であることを考えると、今回の結果は、仮に、Gb3糖鎖をセンサープリズム上に固定化し、Abrin Cの検出を行った場合、 10^9 (ナノ

モル) レベルのAbrin Cが十分に検出可能であることを示している。

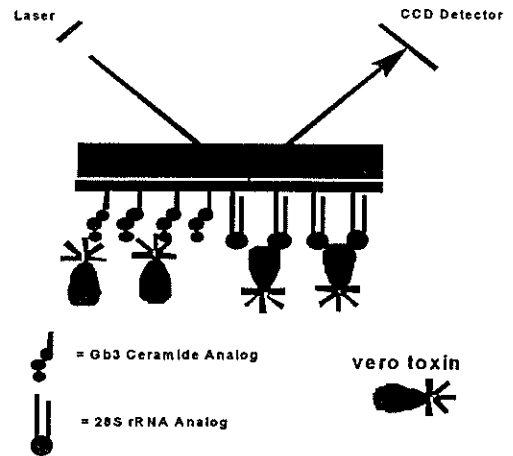


Fig. 3. SPRセンサーによるペロ毒素検出

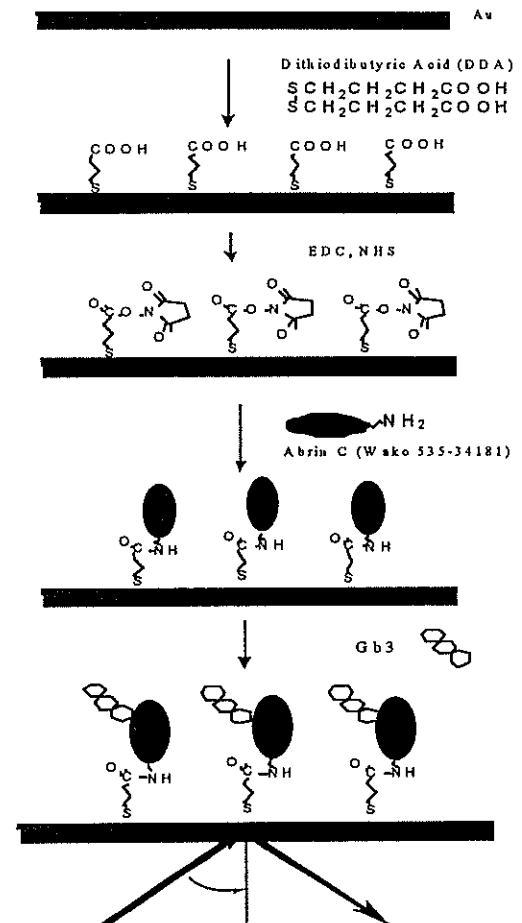
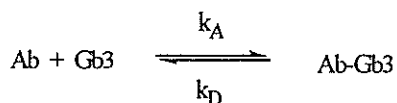


Fig. 4. SPRセンサープリズム上へのAbrin Cの固定化とGb3検出



$$K_A = k_A/k_D \quad K_D = k_D/k_A$$

Table 4. Affinity Parameters of Abrin-Gb3 Interaction

k_A	k_D	K_A	K_D
7.24×10^3	7.59×10^4	9.53×10^6	1.05×10^7

4. 成果の評価と今後の課題

表面プラズモン共鳴装置を用いた解析から、Gb3糖鎖の細胞毒素への結合能評価ができ、 10^9 (ナノモル) レベルのAbrin Cが十分に検出可能であるという有望な結果を得た。さらに結合能の強い糖鎖アナログを探索し、目標であるピコモル～フェムトモル濃度以下の検出を達成したい。糖鎖受容体アナログは毒素やウイルスの検出装置としてのみならず、医薬や機能性高分子素材 (除菌フィルターなど) への応用も可能で、その方面の検討も視野に入れて研究を進めている。

また、より簡便な検出法として、蛍光ラベルした糖鎖受容体アナログと結合した毒素をタンパク質吸着能の高いメンブレンフィルターで吸着し、蛍光分光光度計で検出する手法を検討中である。(Fig.5)

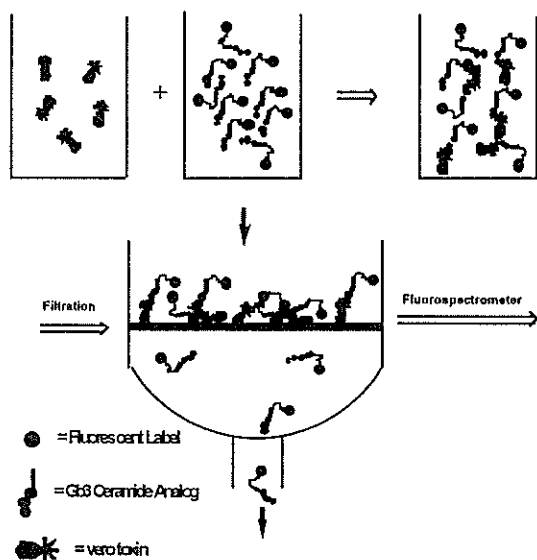


Fig. 5. 蛍光ラベル糖鎖受容体アナログによる
ベロ毒素検出

28SrRNAアナログとして、ベロ毒素に結合するステムループ構造が最適化されたことで、基本骨格が特定できた。また、DNA体、2'-OMe体、ホスホチオエステル体も毒素の基質になりうることは、それらの化学的な安定性や化学合成の容易さを考える上で大きな利点である。特に、ホスホチオエステル体は細胞内で安定で、医薬としても有望である。現在、より化学的に安定で、強い結合能を持つRNAアナログ、特に、遷移状態アナログを合成し、その評価を行うために研究中である。

検出装置の開発 (高感度化、迅速化、小型化)、その検出試薬の製品化、医薬への応用、除菌フィルターなど高分子素材としての応用など、今回の基礎データをもとに広く可能性を求めたい。

3. 発表論文リスト

- (1) Tsuyoshi Miura, Masayuki Fujii, Kazushi Shingu, Ikuo Koshimizu, Junko Naganoma, Tetsuya Kajimoto, and Yoshiteru Ida "Application of L-Threonine Aldolase-Catalyzed Reaction for the Preparation of a Peptidic of RNA: Leading Compound of Vero-toxin Inhibitors" *Tetrahedron Lett.*, 39, 7313-7316 (1998).
- (2) Masayuki Fujii and Jinsai Hidaka, "Nucleic Acid Analog Peptide Containing β -Aminoalanine Modified with Nucleobases" *Nucleosides & Nucleotides*, 6, 1421-1422 (1999)
- (3) Masakazu Sakata and Masayuki Fujii "Synthesis and Properties of Novel Acyclic Nucleotides" *Nucleic Acids Res., Symp. Ser.*, 44, 47-48 (2000).
- (4) Takanori Kubo, Krishna K. Dubey and Masayuki Fujii "A Novel Approach for the Solid Phase Synthesis of DNA-Peptide Conjugates" *Peptide Science*, 2000, 23-26 (2000)