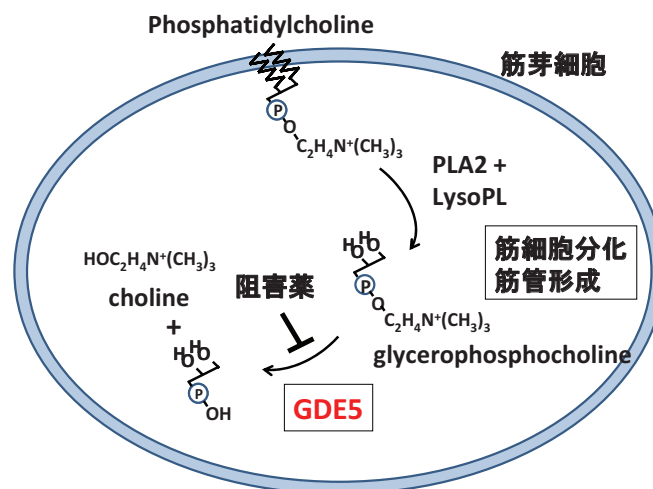


筋再生を目指した新規リン脂質代謝酵素阻害薬の探索

申請代表者 矢中 規之 広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授

■背景・目的

最近、研究代表者は glycerophosphocholine を特異的に分解する新規酵素 GDE5 を単離した。glycerophosphocholine はリン脂質由来の主要な膜成分である phosphatidylcholine の2つのアシル基が phospholipase A₂ や lysophospholipase などによって切断されることによって膜から遊離する水溶性成分であり、今までは単なるリン脂質膜の中間代謝産物（分解産物）と捉えられていたが、最近では、細胞分化やストレス応答などの種々の細胞現象に関わる重要なシグナル伝達物質として注目されている。さらに最近、研究代表者は GDE5 の生理的役割に関する研究を進める中で、マウス筋芽細胞における siRNA 法による GDE5 の発現抑制によって、マウス筋芽細胞の myogenin の発現誘導を伴って筋分化が著しく促進し、筋管形成が認められることを見出した。また、骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスを樹立し、速筋型の筋委縮症を呈することが明らかになった。以上の結果から、GDE5 の酵素阻害作用を有する化合物を探索することによって、同阻害剤による筋管形成効果を検証し、さらに *in vivo* における投与によって、筋委縮の予防や、筋再生への応用への可能性を検証することを目的とした。



■結果・考察

アッセイ系は酵素活性によって生成しうる choline, および glycerol 3-phosphate を定量することに基づく2種類の測定系を構築し、化合物スクリーニングにおける適性を検討した。

- 1) HEK293 細胞に同酵素遺伝子を形質導入し、過剰発現させた後、総タンパク質を回収し（対照は empty vector を導入した）、総タンパク質を活性測定バッファー (Mg²⁺ を含む) において酵素基質である GroPCho と反応させた。酵素反応後、生成した choline を choline oxidase によって定量した。すなわち、glycine buffer 中で horseradish peroxidase, choline oxidase, および luminol 存在下で反応させ、発生する化学発光量を luminometer により測定した。

2) GDE5 による酵素反応後, 生成した glycerol 3-phosphate を glycerol 3-phosphate dehydrogenase によって定量した. すなわち, glycerol 3-phosphate を dehydroxyacetone phosphate に変換し, この反応によって補酵素である NAD は, NADH に還元されるが, NADH は OD₃₄₀ の吸収波長を持つことから, OD₃₄₀ を測定することによって, glycerol 3-phosphate を定量した.

上記二つの測定系について, 化合物ライブラリーの評価を試験的に行い, 手技的な面, および再現性などの面から適切な系の選択を試みた.

1) の方法においては, luminol の化学発光量を経時的に観察を行ったが, 予想外に酵素反応の初速が安定せず, また酵素量などの反応条件などの検討を行ったが, 酵素活性は検出できるものの, 再現性の面で阻害剤の評価としては適当ではないと思われた.

2) においては, 酵素反応後, 生成した glycerol 3-phosphate を定量する評価系においては, HEK293 細胞に GDE5 酵素遺伝子を形質導入し, 過剰発現させた後の総タンパク質を用いていたが, 細胞内に含まれる内在性の glycerol 3-phosphate 量が予想以上に高く, GDE5 による酵素反応により生じた glycerol 3-phosphate 量の測定において問題になると考えられた.

そこで, 以下のように酵素活性測定系の改良を行った.

1) HEK293 細胞で過剰発現させた後の総タンパク質を評価に用いる酵素源として利用していたが, 本研究では, GDE5 の N 末端に strep tag を融合させ, HEK293T 細胞で過剰発現させた. 現在, 構築まで終了しており, 今後アフィニティ精製をした後に, 組換え GDE5 タンパク質の活性の確認を行った後に, 評価系に用いる予定である.

2) 酵素基質である glycerophosphocholine と酵素反応の生成物である choline の直接的な定量系を構築する. LC/MS/MS 法を用いた検出系について検討に着手した. glycerophosphocholine のイオン化条件の確立まで終了し, その 2 成分の分離条件について検討を行っている.

■結論

本研究で着目した, glycerophosphocholine はリン脂質由来の膜成分である phosphatidylcholine 分解産物と捉えられていたが, 細胞分化などの種々の生理作用を担う重要なシグナル伝達物質として最近明らかにされたことにより, glycerophosphocholine を分解する新規な酵素 (GDE5) の遮断を目指す試みは極めて新規性が高いと考えられる. 試験的な化合物評価に着手するが, 上記の理由について, 最善な評価系であるとは考えられない. 今後も, 引き続き評価系の適正化を行い, 速やかに化合物の評価を行う予定である.

同酵素は速筋型骨格筋における発現量が高く, GDE5 の酵素阻害作用を有する化合物は他組織への悪影響 (副作用) の可能性も低いと考えられ, 将来的な医薬品創出の観点においても大きく期待される.