

表面プラズモン共鳴法を用いた
薬剤の薬効メカニズム解明及び毒性予測評価に関する研究

2017

生化学

木内 啓貴

表面プラズモン共鳴法を用いた
薬剤の薬効メカニズム解明及び毒性予測評価に関する研究

目次

目次	i
略語表	iv
序論	1
本論	6

第1章 表面プラズモン共鳴法を用いた抗菌薬の
lipid II 末端ジペプチド及びモデル脂質膜親和性評価系の構築

緒言	6
----	---

第1節 Vancomycin 及び vancomycin 類似化合物の lipid II 末端ジペプチドに対する親和
性評価系の構築

第1項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒	11
1.2 測定装置及び測定条件	13
1.3 Lipid II 末端ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンドの 固定化 (アミンカップリング法)	13
1.4 抗菌薬と lipid II 末端ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンドとの 相互作用測定	13
1.5 データ解析	14

第2項 結果

2.1 センサーチップへの lipid II 末端ジペプチドリガンド類における 固定化の最適化	15
2.2 Vancomycin 類と lipid II 末端ジペプチドリガンド類の相互作用	16
2.3 Lipid II 末端ジペプチドを固定化したセンサーチップの堅牢性	22
2.4 Vancomycin 類以外の抗菌薬と lipid II 末端ジペプチドリガンド類の 相互作用 (結合選択性評価)	24

第3項 考察	29
--------	----

第4項 小括	32
--------	----

第2節 Vancomycin 及び vancomycin 類似化合物のモデル脂質膜に対する親和性評価系の

構築

第1項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒-----	33
1.2 測定装置及び測定条件-----	33
1.3 リボソームの調製-----	33
1.4 リボソームの固定化-----	34
1.5 抗菌薬と脂質膜の相互作用測定-----	34
1.6 データ解析-----	35

第2項 結果

2.1 センサーチップへのモデル脂質膜の固定化-----	37
2.2 Vancomycin 類とモデル脂質膜の相互作用評価-----	38
2.3 Vancomycin 類以外の抗菌薬とモデル脂質膜の相互作用評価-----	43

第3項 考察----- 45

第4項 小括----- 47

第3節 Daptomycin のモデル脂質膜に対する親和性評価系の構築

第1項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒-----	48
1.2 測定装置及び測定条件-----	48
1.3 リボソームの調製-----	48
1.4 リボソームの固定化-----	49
1.5 Daptomycin と脂質膜の相互作用測定-----	49
1.6 データ解析-----	49

第2項 結果

2.1 センサーチップへのモデル脂質膜の固定化-----	51
2.2 Daptomycin のモデル脂質膜に対する結合選択性評価-----	52
2.3 Daptomycin とグラム陽性菌細胞膜モデルの相互作用評価-----	53

第3項 考察----- 57

第4項 小括----- 58

第2章 表面プラズモン共鳴法を用いた thyroxine のタンパク結合に対する薬剤の競合阻害能評価系の構築

緒言-----	59
---------	----

第1項	実験材料及び方法	
1.1	試薬及び溶媒-----	62
1.2	測定装置及び測定条件-----	62
1.3	Transthyretin 及び thyroxine binding globulin の 固定化 (アミンカップリング法)-----	62
1.4	Thyroxine と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用測定-----	63
1.5	薬剤と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用測定-----	63
1.6	データ解析-----	64
1.7	Thyroxine と transthyretin 及び thyroxine binding globulin との結合における 薬剤による競合阻害評価-----	64
第2項	結果	
2.1	センサーチップへの transthyretin 及び thyroxine binding globulin における 固定化の最適化-----	65
2.2	Thyroxine と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用-----	66
2.3	薬剤と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用-----	67
2.4	Thyroxine とサイロイドホルモン結合タンパク質との結合における diclofenac による競合阻害能評価-----	68
2.5	Thyroxine とサイロイドホルモン結合タンパク質との結合における 薬剤による競合阻害能評価-----	73
第3項	考察-----	76
第4項	小括-----	78
	総括-----	79
	参考文献-----	82
	謝辞-----	90

略語表

CaCl ₂	calcium chloride
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
CL	1,1',2,2'-tetraoleoyl cardiolipin
D-Ala-D-Ala	D-alanyl-D-alanine
D-Ala-D-Lac	D-alanyl-D-lactate
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDC	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
HCl	hydrochloric acid
IC ₅₀	50 % inhibitory concentration
IC ₈₀	80 % inhibitory concentration
<i>K</i>	affinity constant (for “two-state reaction model”)
<i>K_A</i>	equilibrium association constant
<i>K_D</i>	equilibrium dissociation constant
<i>k_a</i>	association rate constant
<i>k_d</i>	dissociation rate constant
L-Ala-L-Ala	L-alanyl-L-alanine
MIC	minimum inhibitory concentration
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidyl choline
PE	phosphatidyl ethanolamine
POPC	1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine
POPE	1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol
RP	relative potency
RSD	relative standard deviation
RU	response unit
SD	standard deviation
SPR	surface plasmon resonance
T3	3,3',5-triiodo-L-thyronine

T4	L-thyroxine
TBG	thyroid binding globulin
TRH	thyrotropin-releasing hormone
TSH	thyroid stimulating hormone
TTR	transthyretin
VRE	vancomycin-resistant enterococci

序論

生体内における細胞の増殖，分化，形態形成及び癌化などをはじめとする各種病態の発症やそれに伴う生体防御反応など，すべての生物活動はタンパク質，糖鎖，脂質，核酸を中心とした生体分子間相互作用の繰り返しによって担われている¹⁻⁵⁾．生体分子間相互作用の例として，細胞接着が挙げられる．細胞は他の細胞あるいは細胞外マトリクスに接着して組織を形成している．細胞間接着分子の1つとしてカドヘリンが知られており，N末端側の細胞外ドメイン同士が結合することによって細胞と細胞を接着させる⁶⁾．この細胞接着は，安定に存在するものではなく，例えば発生の時期における形態形成過程では，結合していた細胞は離れ，再び集合して接着する場合がある⁶⁾．また，細胞間接着分子であるインテグリンは細胞表面に存在し，プロテオグリカンやフィブロネクチンなど様々な細胞外マトリクス成分と結合し，細胞接着をはじめする細胞機能を制御している⁷⁾．このように，生体内では様々な分子が相互作用を介し，特定の分子と特異的に，結合，解離することで機能を発揮する．このため，分子間相互作用を分子レベルで解析することは，生体反応の機能を詳細に解明するための一つの手段となる．さらに，分子間相互作用を理解することにより，薬剤や開発候補化合物の薬理作用及び毒性発現メカニズムの解明など，創薬研究への応用が可能と考えられる^{8,9)}．

現在，様々な分子間相互作用の測定技術が創薬研究に用いられている．ウェスタンブロッティング法や免疫沈降法では，分子同士の特異的な結合が確認できる．分子間の結合の強さ（アフィニティ）を評価するためには，enzyme-linked immunosorbent assay 法，radioimmunoassay 法，蛍光相関分光法や超遠心分析法などが用いられる．また，等温滴定型カロリメーターでは，相互作用によって出入りする熱量が評価でき，熱力学的パラメータに基づき分子間の結合様式の情報得られる．さらに，表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance, SPR）法では，選択性，結合の強さ，熱力学的な情報に加え，動的な情報である分子間の結合，解離の速さの情報を得ることが可能である．リアルタイムに相互作用を測定することで，結合，解離の速さを数値化し，より詳細な相互作用が解析できる．このように，SPR 法は，他の分子間相互作用測定技術に比べ情報量

が多く、多面的に分子間相互作用を解析できる非常に有用なツールであると考えられる¹⁰⁾。この特徴を利用し、本技術は基礎研究のみならず、低分子医薬品開発やバイオ医薬品開発にも用いられ、スクリーニング、メカニズム解明、キャラクタライズなど様々なステージで幅広く使用されている。さらに、算出した標的分子との結合、解離の速度定数を薬効の指標としても活用することができる。

SPR は光学現象であり、分子間の相互作用解析では、特定の角度の入射光と表面プラズモン（表面電荷の集団振動）が金属/液体界面で起こす共鳴現象を利用し、分子間の結合と解離に伴ってセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化をとらえている(図 1)。分子の固定化されていない側の金膜表面に光を全反射させると反射光の一部は暗くなる（強度が低下する）現象が起きる。この光の暗い部分は、センサーチップ表面の質量変化に応じて、角度が変化する。センサーチップ表面上のタンパク質 1 ng/mm^2 あたりの質量変化は、 0.1 度の角度変化に相当する。分子間相互作用測定装置 **Biacore** はこの原理を応用し、センサーチップ表面上の質量の変化をシグナルとして検出することで、結合・解離の変化を速度論的に算出する。固定化したリガンドとアナライト（分析対象物質）が結合すると、センサーチップ上の質量が増加し、ごくわずかな質量変化をも検出することができる。このため、同じ分子数のアナライトが結合しても、アナライトの分子量が大きい場合は得られるシグナルも大きくなる。一方、アナライトの分子量が小さい場合は得られるシグナルも小さくなるが、最近の測定機器では、ホルモンや 100 Da 程度の低分子化合物でも測定できることが特徴である。

実際の相互作用測定では、センサーチップ上の質量変化が、図 2 に示したセンサーグラムに変換され出力される。横軸は時間、縦軸は質量変化（単位は **response units, RU**）を表している。タンパク質では、 1000 RU が 1 ng/mm^2 あたりの質量変化に相当する。図 2 はリガンドを固定化したセンサーチップ表面に、アナライトを一定時間添加して相互作用を測定した結果を示している。①の領域は、ランニング緩衝液が一定流速で送液されている。②の領域では、アナライトが一定濃度で添加されており、固定化したリガンドにアナライトが結合、解離する過程がモニターされている（結合領域）。特異的な結合が起きると、ア

ナライト添加中にシグナル（RU 値）が経時的に上昇する．③の領域では，再びランニング緩衝液が送液されている（解離領域）．アナライトを添加している結合領域のシグナルから結合の有無がわかり，またその上昇率が大きいほど，結合速度が速いと判断できる．さらに，解離領域のシグナルの減少率が大きいほど，解離が速いことを示している．

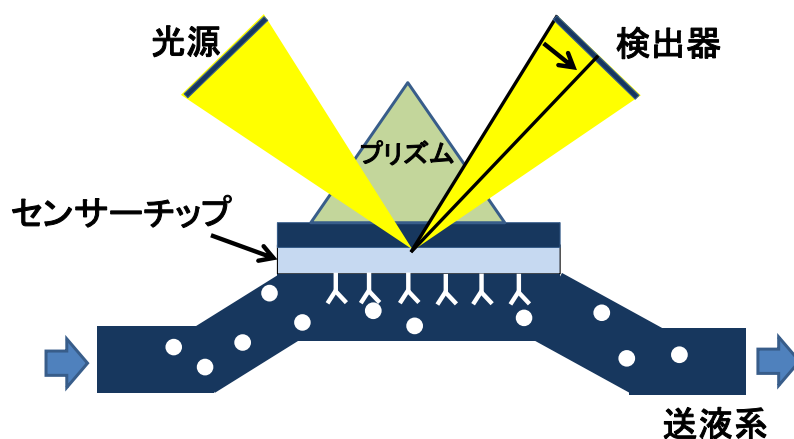


図 1. SPR システムの原理

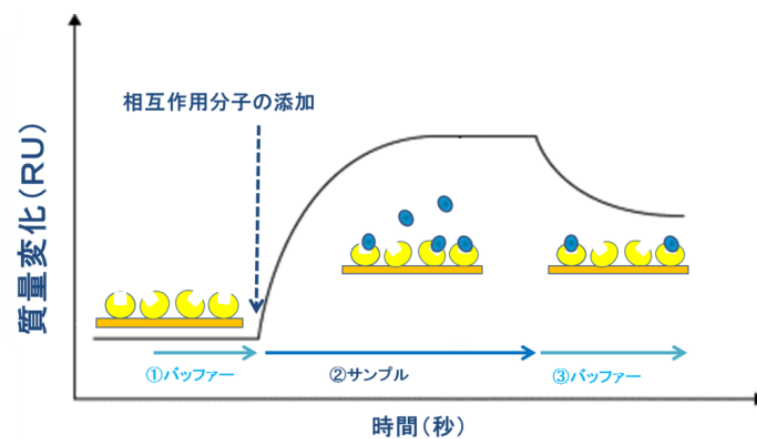


図 2. センサーチップ上における質量変化のセンサーグラムへの変換

本研究では、分子間相互作用解析装置 **Biacore** を用いて、第 1 章では薬剤の薬効メカニズム解明を実施した。抗菌薬の標的細菌の細胞膜への結合特性評価を目的に、**vancomycin** とその類似化合物をはじめとする抗菌化合物の **lipid II** 末端ジペプチドリガンド類 (**D-alanyl-D-alanine** , **L-alanyl-L-alanine** , **D-alanyl-D-lactate**, control) (図 3) に対する親和性評価系を構築した¹¹⁾。さらに、**vancomycin** 類の結合定数と最小発育阻止濃度 (**minimum inhibitory concentration**, **MIC**) を比較し、**vancomycin** 類の **lipid II** 末端ジペプチドリガンド類に対する親和性と抗菌活性との関係を考察した。また、**vancomycin** 類以外の抗菌薬 (**teicoplanin**, **erythromycin**, **linezolid** 及び **daptomycin**) における **lipid II** 末端ジペプチド類への親和性評価及び抗菌活性から、抗菌薬の結合選択性を評価した(第 1 節)¹¹⁾。第 2 節では抗菌薬の脂質膜への結合特性評価を目的に、**vancomycin** とその類似化合物をはじめとする抗菌化合物のモデル脂質膜 (哺乳動物細胞膜, グラム陽性菌細胞膜, グラム陰性菌細胞膜モデル) に対する親和性評価系を構築した¹²⁾。**Vancomycin** 類の **vancomycin** 感受性菌及び **vancomycin** 耐性菌に対する薬理活性メカニズムを解明するため、第 1 節で得られた **vancomycin** 類の **lipid II** 末端ジペプチド類への親和性評価結果及び **MIC** 結果に加えて、脂質膜への親和性結果を組み合わせて考察した。第 3 節では構築した抗菌薬の脂質膜に対する親和性評価系を応用して、**daptomycin** の脂質膜親和性評価を実施した¹³⁾。**Daptomycin** の細菌細胞膜結合特性評価を目的に、**daptomycin** の脂質膜結合における選択性などを検討した。第 2 章では、薬剤の毒性予測評価の一環として、薬剤による甲状腺ホルモンのサイロイドホルモン結合タンパク質との結合に対する競合阻害能を評価する分析法を構築した¹⁴⁾。さらに、薬剤によって引き起こされる甲状腺毒性を予測・評価することを検討した。

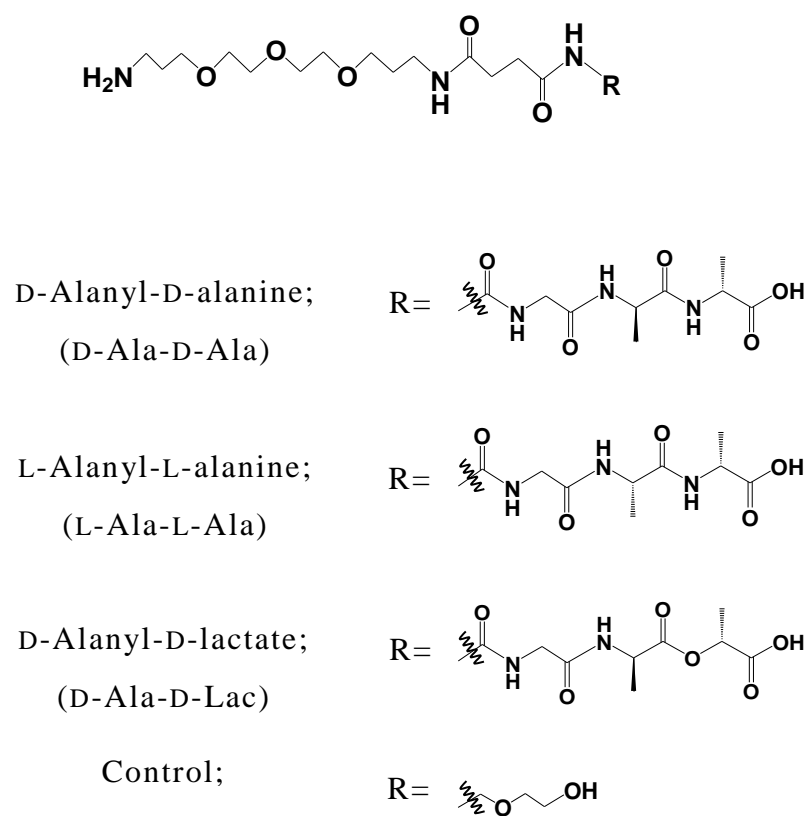


図 3. Lipid II ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンドの化学構造式

本論

第 1 章 表面プラズモン共鳴法を用いた抗菌薬の lipid II 末端ジペプチド及びモデル脂質膜親和性評価系の構築

緒言

Vancomycin (図 4) は細菌細胞壁の構成成分の一部である lipid II の末端ジペプチド (D-alanyl-D-alanine) に選択的に結合することで、細胞壁の合成を阻害し、抗菌活性を示すことが知られている (図 5)¹⁵⁻¹⁹⁾. ちなみに、vancomycin は細胞壁合成酵素の基質となる lipid II 末端ジペプチドに結合することで細胞壁合成に必要な糖転移反応やペプチド転移反応を阻害することがわかっている¹⁵⁻¹⁹⁾. また、vancomycin はグラム陽性菌に対する殺菌作用や腸球菌に対する静菌作用を有するほか、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) に対する強力な殺菌作用を示すグリコペプチド系抗菌薬として広く感染症治療薬として用いられている²⁰⁾. しかし、vancomycin 耐性菌の細菌細胞壁では、lipid II 末端のジペプチドの化学構造が D-alanyl-D-alanine から D-alanyl-D-lactate に変異しているため^{21, 22)}, vancomycin は結合できず、薬理活性が認められないことがわかっている^{21, 22)}.

これまでに、様々な vancomycin 類似化合物が合成され、多くの研究が実施されている²³⁻²⁶⁾. Van-M-02 (図 4) は vancomycin 耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE) を含むグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つ²³⁾. ΔN-Van-M-02 (図 4) は、Van-M-02 における D-alanyl-D-alanine 認識部位への寄与を評価するために、D-alanyl-D-alanine 認識部位 (N 末端) を欠損させた化合物である²³⁾. Dimer 1 及び Dimer 2 (図 4) は vancomycin 耐性菌に対して強い薬理活性を示す vancomycin のダイマーとして合成された²⁴⁻²⁶⁾.

本研究では SPR による薬剤の分子間相互作用評価研究の一環として、第 1 節では抗菌薬の lipid II への結合特性評価を目的に、SPR による vancomycin とその類似化合物をはじめとする抗菌化合物の lipid II 末端ジペプチドリガンド類 (D-alanyl-D-alanine, L-alanyl-L-alanine, D-alanyl-D-lactate, control) (図 3) に

対する親和性評価系を構築した。さらに、vancomycin 類の結合定数と最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) を比較し、vancomycin 類の lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する親和性と抗菌活性との関係を考察した。また、vancomycin 類以外の抗菌薬 (teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin) (図 6) における lipid II 末端ジペプチド類への親和性評価及び抗菌活性から、抗菌薬の結合選択性を評価した。

Teicoplanin などに代表されるグリコペプチド系抗菌薬の vancomycin 耐性菌に対する標的部位は lipid II 末端の D-alanyl-D-lactate 以外に脂質膜 (細胞膜)、膜タンパク質及び細胞壁プロテオグリカンが考えられている²⁷⁾。第 2 節では抗菌薬の脂質膜への結合特性評価を目的に、SPR による vancomycin とその類似化合物をはじめとする抗菌化合物のモデル脂質膜 (哺乳動物細胞膜、グラム陽性菌細胞膜、グラム陰性菌細胞膜モデル) に対する親和性評価系を構築した。Vancomycin 類の vancomycin 感受性菌及び vancomycin 耐性菌に対する薬理活性メカニズムを解明するため、vancomycin 類の lipid II 末端ジペプチド類への親和性評価結果及び MIC 結果に加えて、脂質膜への親和性結果を組み合わせ考察した。

第 3 節では構築した抗菌薬の脂質膜に対する親和性評価系を応用して、daptomycin の結合特性評価を実施した。Daptomycin はサイクリックリポペプチド系の抗菌薬で、グラム陽性菌や MRSA に対する強力な殺菌作用を示す薬剤として広く感染症治療薬として用いられている²⁸⁻³²⁾。Daptomycin はカルシウムと結合することでミセル体 (14-16 分子の会合体) を形成し、細菌細胞膜に作用して膜機能に障害を与え、細胞内カリウムイオンの流出を引き起こして薬効を発揮することが知られている³³⁻³⁶⁾。本研究では、SPR による抗菌薬の脂質膜親和性評価研究のひとつとして、daptomycin の細菌細胞膜結合特性評価を目的に、daptomycin のモデル脂質膜に対する親和性評価系を構築した。また、daptomycin の脂質膜結合選択性及びカルシウムの役割と機能について評価した。

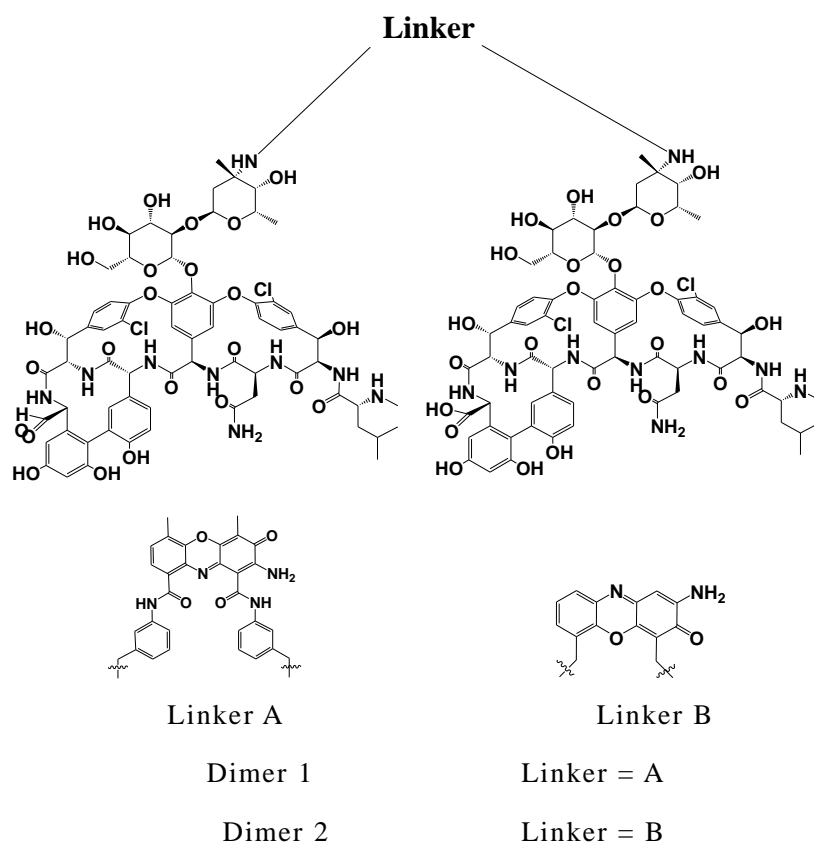
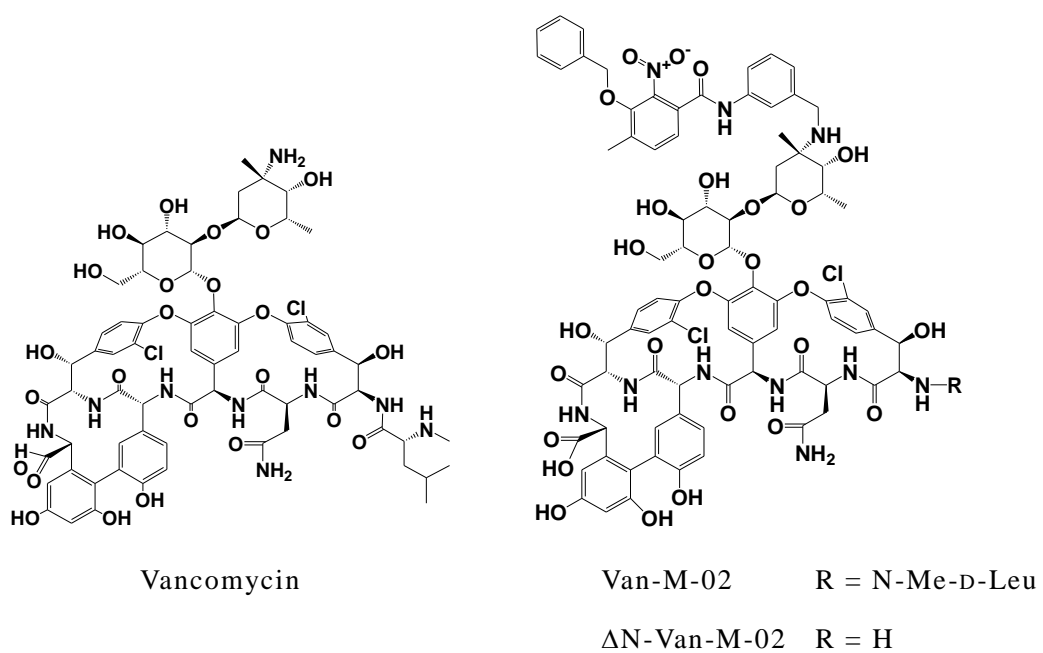


図 4. Vancomycin, Van-M-02, Δ N-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 の化学構造式

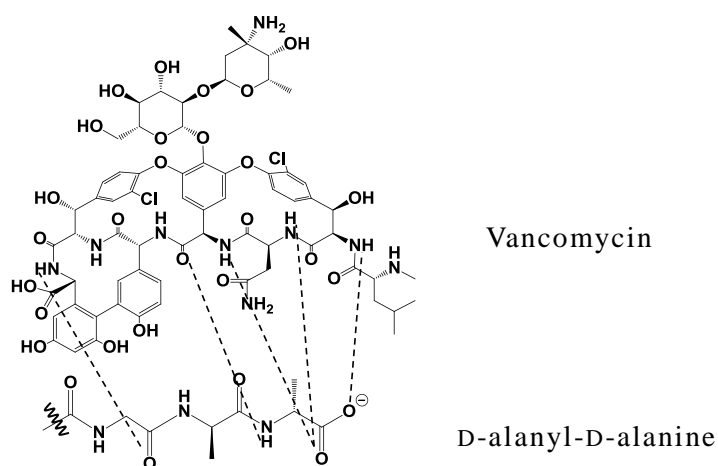
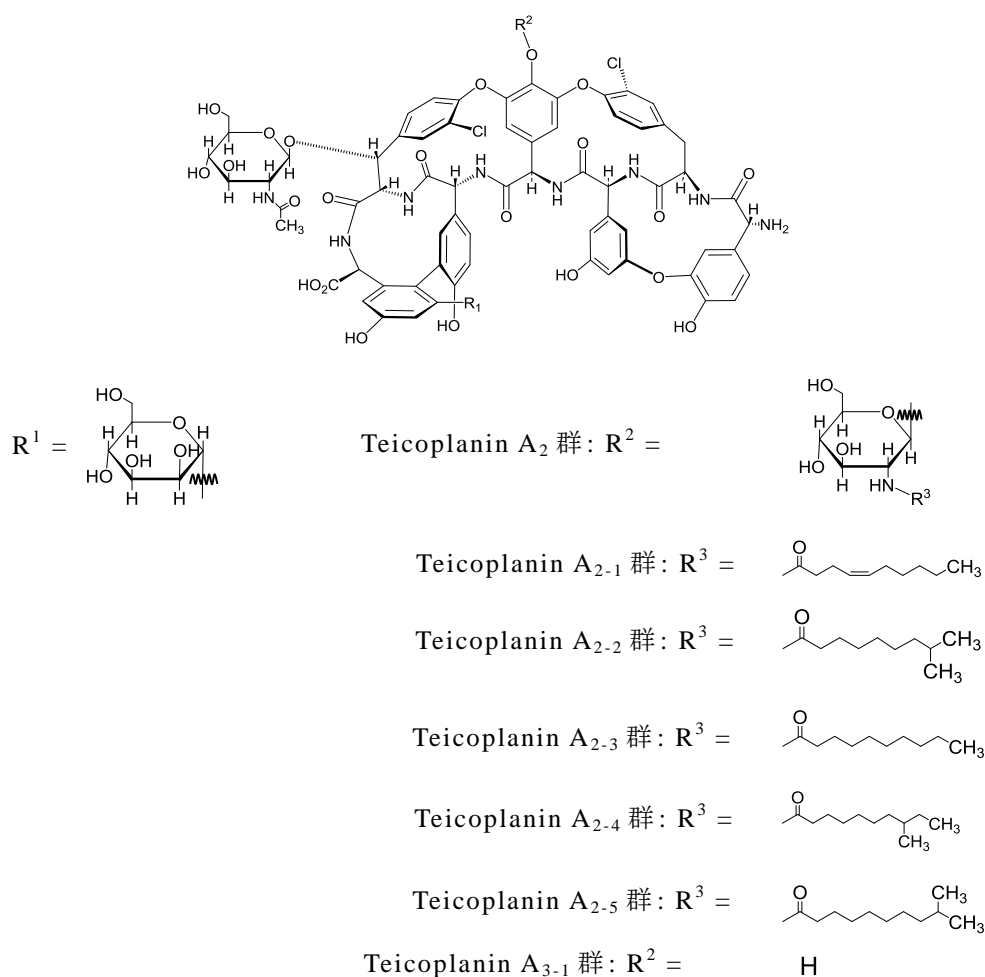


図 5. Vancomycin と lipid II 末端の D-alanyl-D-alanine との結合様式



Teicoplanin (teicoplanin A₂₋₁, teicoplanin A₂₋₂, teicoplanin A₂₋₃, teicoplanin A₂₋₄, teicoplanin A₂₋₅ 及び teicoplanin A₃₋₁ 等の混合物)

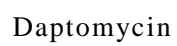
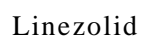
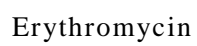


図 6. Teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin の化学構造式

第1節 Vancomycin 及び vancomycin 類似化合物の lipid II 末端ジペプチドに対する親和性評価系の構築

第 1 項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒

本研究で使用した lipid II 末端ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンド (図 3) は塩野義製薬株式会社 (大阪) で合成した³⁷⁾. 機器データは以下に示す通りである.

D-Alanyl-D-alanine ligand (purity by HPLC: approximately 97.4%), ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.21 (d, *J*=7.2 Hz, 3H) 1.27 (d, *J*=7.3 Hz, 3 H) 1.60 (quin, *J*=~7 Hz, 2 H) 1.77 (m, 2 H) 2.34 (m, 4 H) 2.86 (m, 2 H) 3.06 (m, 2 H) 3.38 (t, *J*=6.4 Hz, 2 H) 3.47 (m, 4 H) 3.51 (m, 6 H) 3.68 (d, *J*=5.8 Hz, 2 H) 3.70 (d, *J*=5.7 Hz, 2 H) 4.17 (quin, *J*=~7 Hz, 1 H) 4.32 (quin, *J*=~7 Hz, 1 H) 7.63 (br, 3 H) 7.85 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 7.90 (d, *J*=7.8 Hz, 1 H) 8.10 (d, *J*=7.2 Hz, 1 H) 8.12 (t, *J*=5.7 Hz, 1 H) 8.23 (t, *J*=5.8 Hz, 1 H) 12.5 (br, 1H), EMI-MS detection in positive ion mode: *m/z* 577.31 [M + H]⁺

L-Alanyl-L-alanine ligand (purity by HPLC: approximately 99.2%), ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.21 (d, *J*=7.2 Hz, 3H) 1.27 (d, *J*=7.3 Hz, 3 H) 1.60 (quin, *J*=~7 Hz, 2 H) 1.77 (m, 2 H) 2.34 (m, 4 H) 2.86 (m, 2 H) 3.06 (m, 2 H) 3.38 (t, *J*=6.4 Hz, 2 H) 3.47 (m, 4 H) 3.51 (m, 6 H) 3.68 (d, *J*=5.8 Hz, 2 H) 3.70 (d, *J*=5.7 Hz, 2 H) 4.17 (quin, *J*=~7 Hz, 1 H) 4.32 (quin, *J*=~7 Hz, 1 H) 7.63 (br, 3 H) 7.85 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 7.90 (d, *J*=7.8 Hz, 1 H) 8.10 (d, *J*=7.2 Hz, 1 H) 8.12 (t, *J*=5.7 Hz, 1 H) 8.23 (t, *J*=5.8 Hz, 1 H) 12.5 (br, 1H), EMI-MS detection in positive ion mode: *m/z* 577.32 [M + H]⁺

D-Alanyl-D-lactate ligand (purity by HPLC: approximately 97.6%), ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.33 (d, *J*=7.2 Hz, 3H) 1.41 (d, *J*=7.1 Hz, 3 H) 1.60 (quin, *J*=~7 Hz, 2 H) 1.77 (m, 2 H) 2.34 (m, 4 H) 2.86 (m, 2 H) 3.06 (m, 2 H) 3.38 (t, *J*=6.3 Hz, 2 H) 3.47 (m, 4 H) 3.51 (m, 5 H) 3.68 (dd, *J*=16.7, 5.9 Hz, 1 H) 3.68 (d, *J*=5.9 Hz,

2 H) 3.75 (dd, $J=16.7, 6.0$ Hz, 1 H) 4.31 (quin, $J=7.1$ Hz, 1 H) 4.92 (q, $J=7.1$ Hz, 1 H) 7.64 (br, 3 H) 7.85 (t, $J=5.4$ Hz, 1 H) 8.12 (t, $J=5.8$ Hz, 1 H) 8.18 (d, $J=7.1$ Hz, 1 H) 8.23 (t, $J=5.9$ Hz, 1 H) 13.1 (br, 1 H), EMI-MS detection in positive ion mode: m/z 578.28 $[M + H]^+$

Control ligand (purity by ^1H NMR: more than 95 %), ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.57 (quin, $J=\sim 7$ Hz, 2 H) 1.60 (quin, $J=\sim 7$ Hz, 2H) 2.28 (m, 4 H) 2.60 (t, $J=6.8$ Hz, 2H) 3.06 (m, 2 H) 3.18 (q, $J=\sim 6$ Hz, 2 H) 3.38 (t, $J=6.5$ Hz, 2 H) 3.39 (t, $J=6.1$ Hz, 2 H) 3.40 (m, 2 H) 3.43 (t, $J=6.4$ Hz, 2 H) 3.46 (m, 4 H) 3.50 (m, 6 H) 7.80 (t, $J=5.7$ Hz, 1 H) 7.86 (t, $J=5.3$ Hz, 1 H), EMI-MS detection in positive ion mode: m/z 408.36 $[M + H]^+$

Van-M-02 (purity by HPLC: approximately 93%), ΔN -Van-M-02 (purity by HPLC: approximately 78%), Dimer 1 (purity by HPLC: approximately 89%) 及び Dimer 2 (purity by HPLC: approximately 93%) は東北大学で合成された (図 4)^{23, 25, 37}.

Vancomycin (purity by HPLC: approximately 100%) は塩野義製薬株式会社 (大阪) で合成した. Teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び dimethyl sulfoxide (DMSO) は Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した. 蒸留水 (HPLC grade) はナカライテスク株式会社 (京都) より購入した. Surfactant P20, phosphate buffered saline (PBS) (2.7 mM KCl 及び 137 mM NaCl を含んだ 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.4), amine coupling kit (*N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), ethanolamine hydrochloride) は GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, England) から購入した.

1.2 測定装置及び測定条件

SPR を用いた分子間相互作用分析装置は Biacore 3000 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) を使用し, lipid II リガンド及びそのアナログリガンドの固定化用センサーチップには Sensor Chip CM5 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) を用いた. ランニング緩衝液には, PBS (lipid II リガンド及びそのアナログリガンドの固定化) 及び 5% DMSO, 0.05% Surfactant P20 を含んだ PBS (抗菌薬と lipid II リガンド及びそのアナログリガンドとの相互作用評価)を使用した. 再生溶液には 50 mM NaOH 溶液を用いた. これらのすべての溶液は用時調製し, 0.22 μm のフィルターでろ過後, 脱気して使用した.

1.3 Lipid II 末端ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンドの固定化 (アミンカップリング法)

Biacore 3000 にセンサーチップを装着した後, 流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で EDC/NHS 混液を 7 分間注入し, センサーチップ表面を活性化させた. その後, 流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 mmol/L (mM) ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解させた lipid II 末端ジペプチドリガンドまたはそのアナログリガンド (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 7 分間注入し, それぞれのリガンドをセンサーチップ上に固定化した. 固定化後, 流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5) を 7 分間注入することでセンサーチップ表面のブロッキングを実施した.

1.4 抗菌薬と lipid II 末端ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンドとの相互作用測定

抗菌薬測定溶液は, 5% DMSO 及び 0.05% Surfactant P20 を含んだ PBS を用い, 5 ポイント (0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 μM) の濃度範囲で調製した. 抗菌薬の溶解度あるいはレスポンス (RU 値) の飽和を考慮して, 添加最高濃度を 12.5 μM に設定した. また, アナライトとリガンドの結合速度が著しく速い場合や,

リガンドの固定化量が多い場合は、アナライトの供給が追いつかないため、センサーチップ近傍のアナライト濃度が所定の濃度よりも薄くなる現象が生じる（マストランスポートリミテーション）. このマストランスポートリミテーションを抑えるため流速を $30 \mu\text{L}/\text{min}$ に設定した⁸⁾. 抗菌薬測定溶液は 100 秒間 ($50 \mu\text{L}$) 注入した. 注入後, ランニング緩衝液を $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で 700 秒間送液した. すべての測定は, 25°C (測定装置内温度) で実施した. 解離領域の測定後, リガンド表面から解離せずに残存した抗菌薬を取り除くために 50 mM NaOH を流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で $10 \mu\text{L}$ 注入した. 以上の一連の操作は, 再現性を確認するために 3 回繰り返し実施した.

1.5 データ解析

抗菌薬と lipid II 末端ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンドとの相互作用測定により得られた 5 濃度のセンサーグラム ($0.781\text{-}12.5 \mu\text{M}$) を用い, BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いてグローバルフィッティングにより結合速度定数 (k_a ($1/\text{Ms}$)), 解離速度定数 (k_d ($1/\text{s}$)) を算出した. 抗菌薬と lipid II 末端ジペプチドリガンド及びそのアナログリガンドとの相互作用評価の解析モデルには, 1:1 Langmuir binding model を採用した^{38, 39)}. また, k_a 及び k_d から結合定数 (K_A ($1/\text{M}$)) を k_a/k_d として算出した.

第 2 項 結果

2.1 センサーチップへの lipid II 末端ジペプチドリガンド類における固定化の最適化

細菌細胞壁に存在する lipid II 末端ジペプチドに対する抗菌薬の相互作用を評価することは、抗菌薬の薬効メカニズムを考える上で非常に重要なことである。本研究では、lipid II 末端ジペプチド (D-alanyl-D-alanine) 及び 2 種類の lipid II 末端ジペプチドアナログ (L-alanyl-L-alanine, D-alanyl-D-lactate) リガンドを用い抗菌薬の相互作用評価を実施した (図 3)。D-alanyl-D-alanine リガンドは vancomycin 感受性菌における lipid II 末端ジペプチドに対する親和性評価のために用いた。L-alanyl-L-alanine リガンドは D-alanyl-D-alanine リガンドにおけるネガティブコントロールリガンドとして、D-alanyl-D-lactate リガンドは vancomycin 耐性菌における lipid II 末端ジペプチドに対する相互作用評価のために用いた。また、ジペプチド末端を持たないリガンドを control リガンドとして用いた。

始めに、センサーチップに lipid II 末端ジペプチドリガンド類を固定化するための緩衝液及びリガンド濃度を検討した。固定化の際に用いる緩衝液として、10 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 及び 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) を検討した。その結果、10 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) を用いることで、lipid II 末端ジペプチドリガンド類の固定化に成功した。また、リガンド濃度は 100 $\mu\text{g/mL}$ で安定に固定化できることがわかった。

本条件で 4 種の lipid II 末端ジペプチドリガンド類を固定化したセンサーチップについて、固定化量の均一性を確認するために、リガンド類の固定化を異なる日に実施し ($n = 3$), 固定化量を RU 値の増加から求め、その標準偏差 (standard deviation, SD) 及び相対標準偏差 (relative standard deviation, RSD) を算出した (表 1)。Lipid II 末端ジペプチドリガンド類の平均固定化量はそれぞれ 200 RU から 250 RU で、その相対標準偏差は 12 % 未満と精度も良好であり、センサーチップ上への lipid II 末端ジペプチドリガンド類における固定化の良好な再現性が確認できた。

表 1. センサーチップへの lipid II 末端ジペプチドリガンド類の固定化量とその繰り返し精度

Ligand type	Response units (RU)		RSD (%) ^b
	Mean (<i>n</i> = 3)	SD ^a	
Control	200	23	11.5
D-Alanyl-D-alanine	235	21	8.9
L-Alanyl-L-alanine	234	18	7.7
D-Alanyl-D-lactate	219	20	9.1

a) Standard deviation, b) Relative standard deviation

2.2 Vancomycin 類と lipid II 末端ジペプチドリガンド類の相互作用

図 7 には vancomycin とセンサーチップ上に固定化した lipid II 末端ジペプチドリガンド類 (control, D-alanyl-D-alanine, L-alanyl-L-alanine, D-alanyl-D-lactate) との相互作用を測定したセンサーグラムをそれぞれ示した. これらのセンサーグラムより, vancomycin は D-alanyl-D-alanine リガンドにのみ強い相互作用が認められることがわかった. このことから, vancomycin は lipid II 末端の D-alanyl-D-alanine を認識して結合しているが, vancomycin 耐性菌のように lipid II 末端が D-lactate に変異すると (D-alanyl-D-lactate) 結合しにくくなることが示された. また, D-alanyl-D-alanine リガンドにおけるセンサーグラムでは, 添加した vancomycin 濃度の増加に伴いレスポンスが上昇していることが確認できた. このセンサーグラムから vancomycin と D-alanyl-D-alanine リガンド間の相互作用が飽和状態に達していないことがわかった. さらに, L-alanyl-L-alanine リガンドには相互作用が認められなかった. このことは SPR 法と異なる評価系 (水晶振動子マイクロバランス法) を用いた実験における結果とも一致している⁴⁰⁾. また, control リガンドに対しても親和性が認められなかった.

これらの結果から, 本 SPR 測定系は vancomycin の lipid II 末端ジペプチド及びそのアナログに対する結合選択性を評価できることがわかった. さらに, 本評価系は他の抗菌薬においても適応可能であると考えた. そこで, 本評価系を

用いて, vancomycin 類似化合物である Van-M-02, Δ N-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 (図 4) の lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する親和性評価を実施した. 図 8 に 4 種の vancomycin 類似化合物における control, D-alanyl-D-alanine, L-alanyl-L-alanine 及び D-alanyl-D-lactate リガンドに対する相互作用を測定したセンサーグラムをそれぞれ示した. Van-M-02, Δ N-Van-M-02, Dimer 2 では, control 及び L-alanyl-L-alanine リガンドに対する相互作用はほとんどみられなかった. Dimer 1 では control 及び L-alanyl-L-alanine リガンドに対して相互作用が認められ, 添加した Dimer 1 濃度の増加に伴いセンサーグラムのレスポンスが上昇していることが確認でき, Dimer 1 と control 及び L-alanyl-L-alanine リガンド間の相互作用が飽和状態に達していないことがわかったので, 速度論的解析を実施した. また, D-alanyl-D-alanine 及び D-alanyl-D-lactate リガンドに対する相互作用は Δ N-Van-M-02 の D-alanyl-D-lactate リガンドに対する相互作用を除き, すべての相互作用において添加した vancomycin 類似化合物濃度の増加に伴いセンサーグラムのレスポンスが上昇していることが確認でき, 飽和状態に達していないことがわかった. よって本センサーグラムを用いて速度論的解析を実施した.

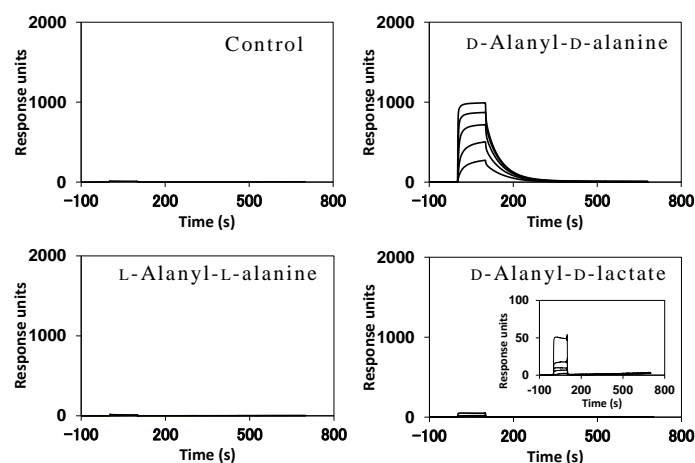
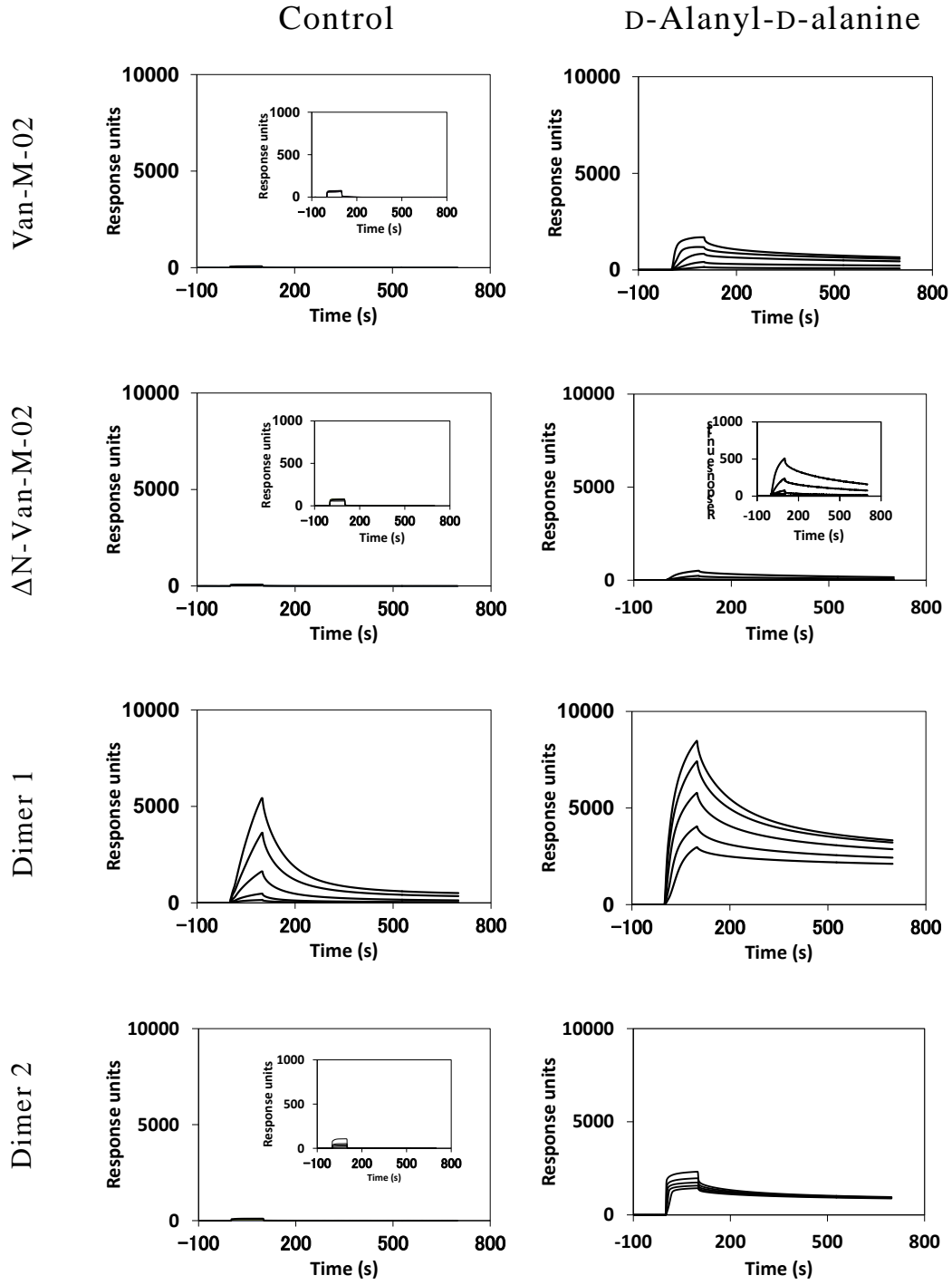


図 7. Vancomycin の lipid II 末端ジペプチドリガンド類との相互作用センサーグラム

Vancomycin 濃度 : 0.781-12.5 μ M

ランニング緩衝液 : 5% DMSO 及び 0.05% Surfactant P20 を含んだ PBS



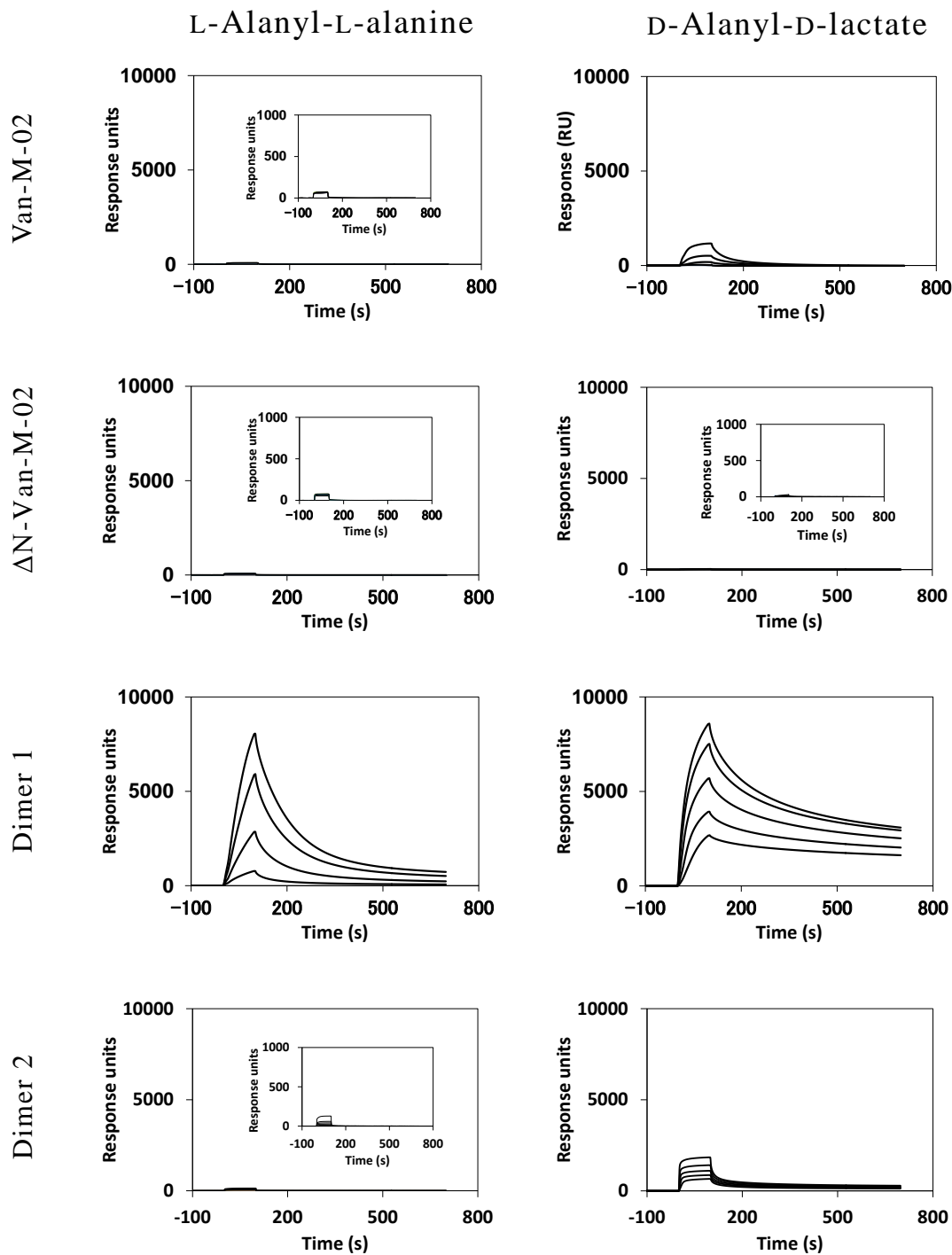


図 8. Van-M-02, Δ N-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 の lipid II 末端ジペプチドリガンド類との相互作用センサーグラム

化合物濃度 : 0.781-12.5 μ M

ランニング緩衝液 : 5% DMSO 及び 0.05% Surfactant P20 を含んだ PBS

表 2 には, 図 7, 8 に示した 5 濃度 (0.781-12.5 μM) の vancomycin, Van-M-02, $\Delta\text{N-Van-M-02}$, Dimer 1 及び Dimer 2 における lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する相互作用の結合速度定数, 解離速度定数, 結合定数を示した. 繰り返し測定 ($n = 3$) により算出した各パラメータの再現性は良好であった. $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の D-alanyl-D-lactate リガンドに対する相互作用は非常に弱く, $\Delta\text{N-Van-M-02}$ 濃度の増加に伴うレスポンスの上昇が確認できなかったため, 速度論的パラメータを算出することができなかった. 本評価系による速度論的解析には 12.5 μM 化合物の添加に対して 50 RU 以上のレスポンスが必要であると考えられる.

反応速度論的解析の結果, Van-M-02 の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する結合定数は vancomycin 及び $\Delta\text{N-Van-M-02}$ のそれよりも大きいことがわかった. このことは, Van-M-02 が他のモノマー化合物 (vancomycin, $\Delta\text{N-Van-M-02}$) よりも, D-alanyl-D-alanine リガンドに対する親和性が強いことを示している. D-Alanyl-D-alanine リガンドに対する Van-M-02 の親和性と vancomycin の親和性との違いは, 結合速度定数よりも解離速度定数の違いによる影響が大きい. また, Van-M-02 の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する k_d 値と $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する k_d 値はほとんど同じ値を示している. Van-M-02 と $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する親和性の違いは k_a 値に起因していることがわかった.

$\Delta\text{N-Van-M-02}$ の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する K_A 値は vancomycin のそれに比べて 1/250 以下の値を示した. $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する親和性は非常に弱いと示唆される. 速度論的パラメータから, $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する非常に低い k_a 値が, 低い K_A 値に寄与していると考えられる. $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する親和性が弱いのは, $\Delta\text{N-Van-M-02}$ が D-alanyl-D-alanine 認識部位を一部欠損しているためであると考えられている²³⁾. また, モノマー化合物の中で Van-M-02 のみが vancomycin 耐性菌の lipid II 末端を模した D-alanyl-D-lactate リガンドに対する親和性を示すことがわかった.

表 2. 1:1 Langmuir binding model 解析により得られた vancomycin, Van-M-02, Δ N-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 (0.781 - 12.5 μ M) の lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する相互作用における速度論的パラメータ及び結合定数と vancomycin, Van-M-02, Δ N-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 の薬理活性

Compound	Ligand type	k_a ($\times 10^2$, 1/Ms)	k_d ($\times 10^{-3}$, 1/s)	K_A ($\times 10^5$, 1/M)	MIC (μ g/ml) ^f		
					<i>S. aureus</i> , RN4220	<i>E. faecium</i> , SR7940	<i>E. faecium</i> , SR23598
Vancomycin	Control	NC ^d	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala ^a	146 \pm 7 ^e	19.3 \pm 0.7	7.58 \pm 0.28	1	> 64	> 64
	L-Ala-L-Ala ^b	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac ^c	NC	NC	NC			
Van-M-02	Control	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala	36.6 \pm 1.0	1.12 \pm 0.04	32.7 \pm 2.2	0.125	1	0.25
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac	5.27 \pm 0.74	10.5 \pm 0.1	0.495 \pm 0.080			
Δ N-Van-M-02	Control	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala	0.0518 \pm 0.0071	1.74 \pm 0.02	0.0294 \pm 0.0037	2	8	2
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac	NC	NC	NC			
Dimer 1	Control	5.03 \pm 3.04	7.08 \pm 2.85	0.658 \pm 0.159			
	D-Ala-D-Ala	71.4 \pm 3.6	1.20 \pm 0.03	59.2 \pm 4.6	1	8	2
	L-Ala-L-Ala	6.09 \pm 1.26	6.25 \pm 1.19	0.971 \pm 0.047			
	D-Ala-D-Lac	59.9 \pm 2.4	1.33 \pm 0.06	45.0 \pm 3.2			
Dimer 2	Control	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala	361 \pm 4	0.693 \pm 0.015	521 \pm 6	2	8	1
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac	255 \pm 8	1.15 \pm 0.06	221 \pm 10			

^a D-Alanyl-D-alanine, ^b L-Alanyl-L-alanine, ^c D-Alanyl-D-lactate, ^d Not calculated, ^e Mean \pm standard deviation ($n=3$), ^f MIC values were obtained from 26)

Dimer 1 はすべてのリガンド (control, D-alanyl-D-alanine, L-alanyl-L-alanine, D-alanyl-D-lactate) に対して親和性を示した. Dimer 1 の D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンドに対する K_A 値は L-alanyl-L-alanine リガンド及び control リガンドに対する K_A 値と比較して大きいことがわかった.

Dimer 2 は D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンドに対してのみ親和性を示し, Dimer 1 に比べ選択性が高いことがわかった. しかも, その K_A 値は, 他の化合物の D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンドに対する K_A 値のいずれよりも大きいことがわかった. この結果は, 非常に高い k_a 値及び低い k_d 値の両方に起因している. Dimer 1 と Dimer 2 のリガンドへの親和性の違いは Dimer 1 と Dimer 2 の異なったリンカー構造が関与していると推測される.

本 SPR 評価系によって算出した速度論的パラメータ及び相互作用結果から, vancomycin, vancomycin モノマー化合物 (Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02), vancomycin ダイマー化合物 (Dimer 1 及び Dimer 2) における vancomycin 感受性菌及び vancomycin 耐性菌の lipid II 末端を模したジペプチドとの結合特性を明らかにすることができた.

2.3 Lipid II 末端ジペプチドを固定化したセンサーチップの堅牢性

Vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対するレスポンス (RU) を用いて, 固定化したセンサーチップの堅牢性を調べた. 図 9 に vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対するレスポンスとアッセイ回数との関係を示した. 図 10 には, D-alanyl-D-alanine リガンド固定化後, アッセイ 1 回目の vancomycin との相互作用センサーグラム (実線) と D-alanyl-D-alanine リガンド固定化後 200 回目の vancomycin との相互作用センサーグラム (点線) を示した. RU はアッセイ 1 回目とアッセイ 200 回目においてほとんど変化しておらず, センサーグラムもほぼ同じ形状の結果が得られた. これらのことから, lipid II 末端ジペプチド類を固定化したセンサーチップは少なくとも 200 回まで連続測定が可能で, 堅牢性のある測定結果が得られると判断した.

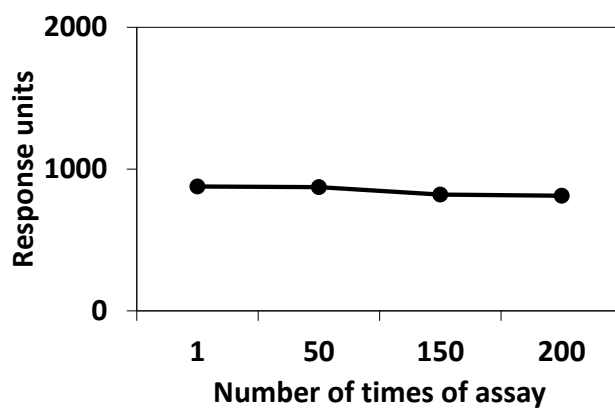


図 9. Vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対するレスポンス (Response units, RU) とアッセイ回数との関係

Vancomycin 濃度 : 12.5 μ M

ランニング緩衝液 : 5% DMSO 及び 0.05% Surfactant P20 を含んだ PBS

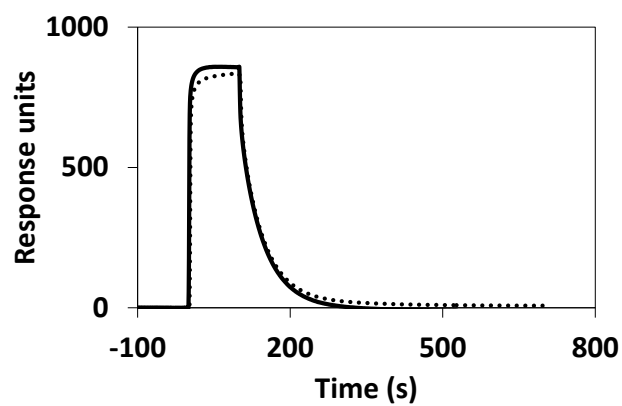


図 10. Vancomycin と D-alanyl-D-alanine リガンドとの相互作用センサーグラム (実線 : 1 回目のアッセイ, 点線 : 200 回目のアッセイ)

Vancomycin 濃度 : 12.5 μ M

ランニング緩衝液 : 5% DMSO 及び 0.05% Surfactant P20 を含んだ PBS

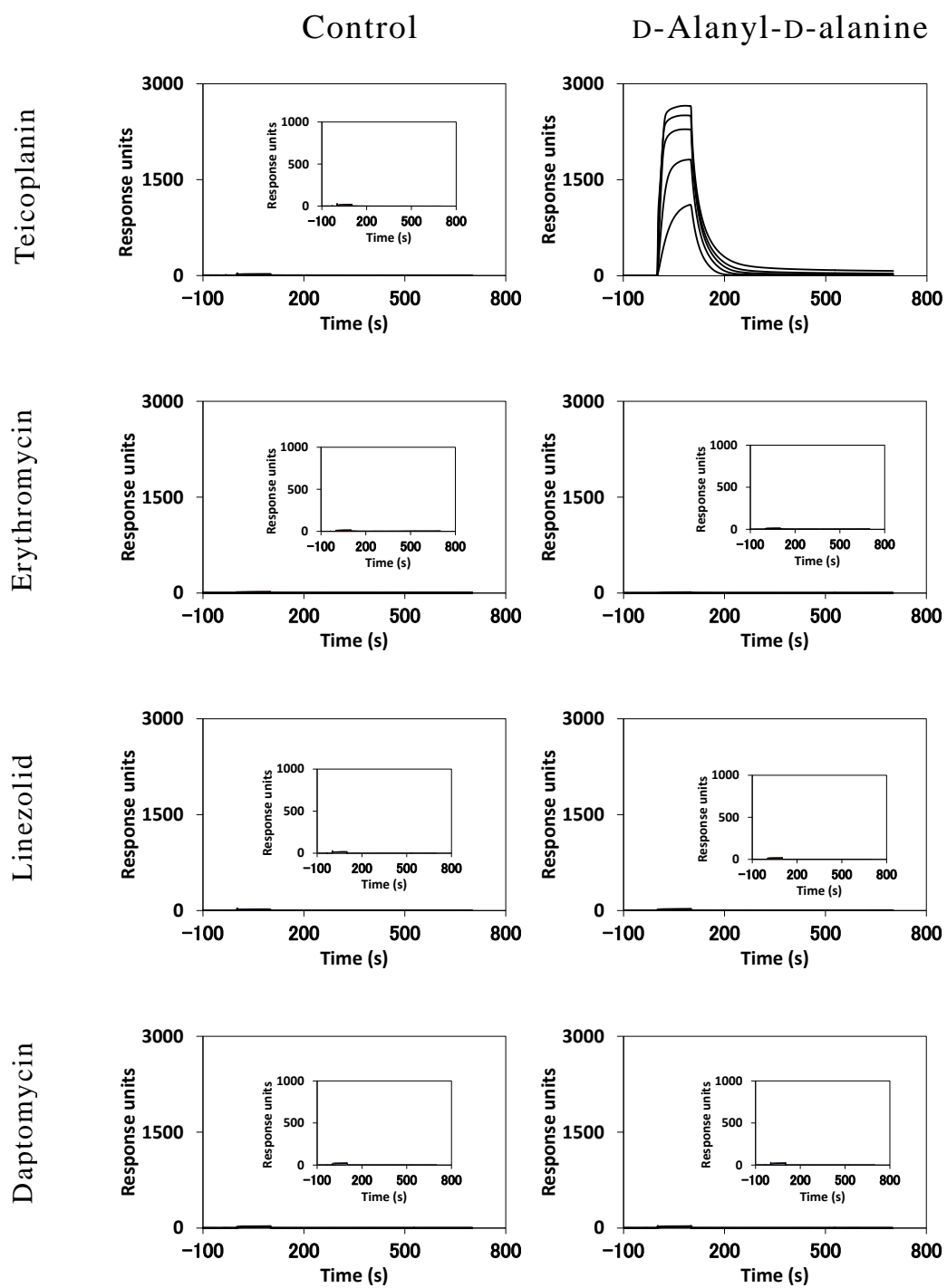
2.4 Vancomycin 類以外の抗菌薬と lipid II 末端ジペプチドリガンド類の相互作用 (結合選択性評価)

本 SPR 評価系を用いて, vancomycin 類以外の抗菌薬 (teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin) (図 6) と lipid II 末端ジペプチドリガンド類との相互作用を評価した. Teicoplanin は lipid II 末端ジペプチドの D-alanyl-D-alanine 及び D-alanyl-D-lactate に結合して, 一部の VRE を含むグラム陽性菌の細胞壁合成を阻害することが知られている^{41, 42)}. Erythromycin はマクロライド系抗菌薬で広い抗菌スペクトルを持ち, linezolid はオキサゾリジン系抗菌薬で MRSA や VRE を含む様々なグラム陽性菌によって引き起こされる感染症の治療薬として知られている⁴³⁾. Erythromycin や linezolid はリボソームと結合することでリボソームの機能に影響を与え, タンパク質の合成を阻害する⁴⁴⁾. Daptomycin はサイクリックリポペプチド系の抗菌薬で, グラム陽性菌細胞膜に結合し細胞膜からカリウムイオンを流出させることで殺菌作用を示すグラム陽性菌感染症治療薬として用いられている³³⁾. これらの lipid II 末端ジペプチドを介した殺菌作用とは異なった薬効メカニズムを持つ抗菌薬の結合選択性を調べた.

図 11 には teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin の lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する相互作用を測定したセンサーグラムをそれぞれ示した. Teicoplanin と D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンドとの相互作用についての強い親和性が確認できた. また, 添加した teicoplanin 濃度の増加に伴いセンサーグラムのレスポンス上昇が認められ, teicoplanin と D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンド間の相互作用が飽和状態に達していないことがわかった. 表 3 には, teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin における lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する相互作用の結合速度定数, 解離速度定数, 結合定数及び MIC を示した.

Erythromycin, linezolid 及び daptomycin は最大濃度 (12.5 μM) の試料溶液についてのレスポンスが 50 RU 以下と非常に低いため速度論的パラメータ (k_a , k_d 及び K_A) を算出することができなかった. なお, control リガンド及び L-alanyl-L-alanine リガンドにはどの抗菌薬も親和性が認められなかった.

Vancomycin と同じ薬理作用機序を持つ teicoplanin のみに lipid II 末端ジペプチドに対する相互作用が認められたことから、本測定系を用いることによって、抗菌薬の lipid II 末端ジペプチドに対する選択性評価に役立てることができることがわかった。さらに、teicoplanin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する K_A 値と *S. aureus* RN4220 の抗菌活性との関係は、vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する K_A 値と *S. aureus* RN4220 の抗菌活性との関係と類似していた⁴⁵⁾。このことから、本評価系は様々なグリコペプチド系抗菌薬の抗菌活性を予測することにも応用できるかもしれない。また、teicoplanin における D-alanyl-D-lactate リガンドに対する K_A 値も算出することができた。Vancomycin 耐性菌である *E. faecium* D366 の抗菌活性が認められていることから、teicoplanin における D-alanyl-D-lactate リガンドに対する親和性は *E. faecium* D366 の抗菌活性を反映しているのかもしれない⁴⁶⁾。本評価系を用いることによって、様々な作用機序の抗菌薬と lipid II 末端ジペプチド類との相互作用を測定することができた。得られた抗菌薬の lipid II 末端ジペプチド類に対する速度論的結合特性から *S. aureus* や VRE に対する抗菌活性のメカニズムを評価することができると思われる。



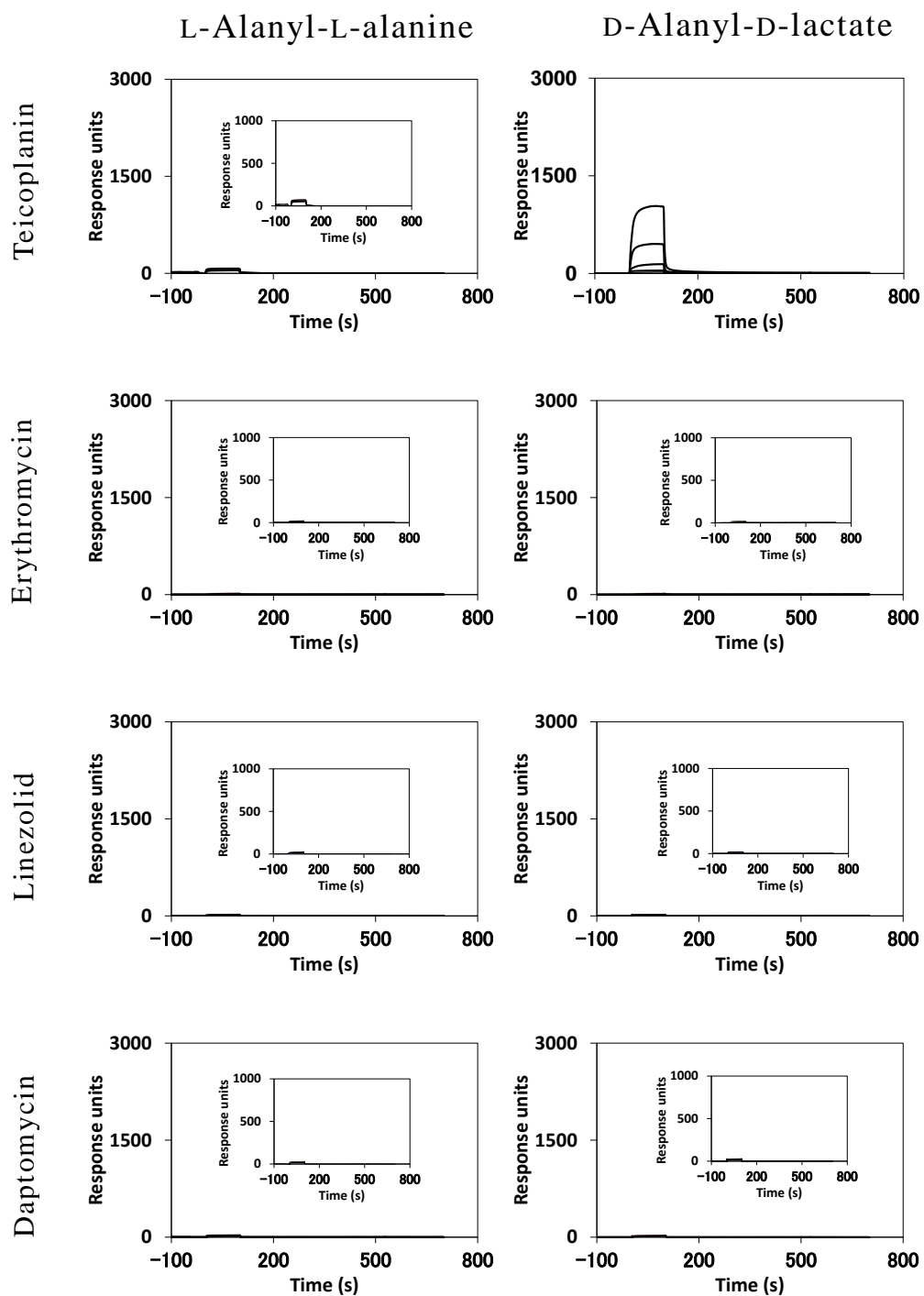


図 11. Teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin の lipid II 末端ジペプチドリガンド類との相互作用センサーグラム

Teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin 濃度 : 0.781-12.5 μM

ランニング緩衝液 : 5% DMSO 及び 0.05% Surfactant P20 を含んだ PBS

表 3. 1:1 Langmuir binding model 解析により得られた teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin (0.781 - 12.5 μM) の lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する相互作用における速度論的パラメータ及び結合定数と薬理活性

Compound	Ligand type	k_a ($\times 10^2$, 1/Ms)	k_d ($\times 10^{-3}$, 1/s)	K_A ($\times 10^5$, 1/M)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
					<i>S. aureus</i> , RN4220	<i>E. faecium</i> , D366
Teicoplanin	Control	NC ^d	NC	NC	1 ^f	0.5 ^g
	D-Ala-D-Ala ^a	135 \pm 44 ^e	23.2 \pm 7.0	5.78 \pm 0.51		
	L-Ala-L-Ala ^b	NC	NC	NC		
	D-Ala-D-Lac ^c	0.132 \pm 0.054	109 \pm 50	0.00125 \pm 0.00014		
Erythromycin	Control	NC	NC	NC	ND ^h	ND
	D-Ala-D-Ala	NC	NC	NC		
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC		
	D-Ala-D-Lac	NC	NC	NC		
Linezolid	Control	NC	NC	NC	ND	ND
	D-Ala-D-Ala	NC	NC	NC		
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC		
	D-Ala-D-Lac	NC	NC	NC		
Daptomycin	Control	NC	NC	NC	ND	ND
	D-Ala-D-Ala	NC	NC	NC		
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC		
	D-Ala-D-Lac	NC	NC	NC		

^a D-Alanyl-D-alanine, ^b L-Alanyl-L-alanine, ^c D-Alanyl-D-lactate, ^d Not calculated ^e Mean \pm standard deviation ($n=3$), ^f MIC value was obtained from 45), ^g MIC value was obtained from 46), ^h No data

第 3 項 考察

Vancomycin や vancomycin 類似化合物の vancomycin 感受性菌及び vancomycin 耐性菌における lipid II 末端を模したジペプチドに対する相互作用の速度論的パラメータを算出することができた (図 7, 8, 表 2). 既報の論文から, vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンド (本論文で用いたリガンドとは親水性リンカー部位が異なる) に対する親和性は解離定数 ($3.39 \times 10^{-6} \text{ M}$) という報告がある³⁷⁾. また, Chu らは vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する K_D 値は $2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ と算出している⁴⁰⁾. 本評価系で算出した vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する K_D 値は $1.32 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($K_D=1/K_A$ として算出) であり, 他の文献値とほぼ同等の値が得られていることがわかった. また, lipid II 末端ジペプチド類を固定化したセンサーチップは, 抗菌薬の測定において少なくとも 200 回の連続アッセイに耐えられることがわかり, 親和性評価に十分使用できることが確認できた (図 9, 10).

Lipid II 末端ジペプチドリガンドは抗菌薬と結合するためのペプチド部位, 立体構造上可動性のある親水性リンカー部位, センサーチップに固定化するためのアルキルアミン部位の 3 つのパートから構成されている (図 3)⁴⁰⁾. 既報の文献から, 合成ペプチド (分子量: ~ 1000) のセンサーチップ (Sensor Chip CM5) への固定化量は約 500 RU であるという実験結果が得られている⁴⁷⁾. また, vancomycin (分子量: 1449) 自身をセンサーチップ (Sensor Chip CM5) に固定化すると, 600 RU から 700 RU の固定化量が得られることもわかっている⁴⁸⁾. これらの固定化量の結果と分子量との関係から, lipid II 末端ジペプチドリガンド類 (分子量: ~ 550) の固定化量は 200 \sim 235 RU であり, 妥当であると考えられる (表 1). よって, 本測定系における lipid II 末端ジペプチドリガンド類の固定化量とその再現性は抗菌薬との相互作用解析に適用できるものであると判断した.

Vancomycin は細胞壁のペプチドグリカン前駆体末端である lysyl-D-alanyl-D-alanine に結合して拮抗的に細胞壁の合成を阻害することが知られている^{23, 26)}. また, vancomycin と lipid II 末端の D-alanyl-D-alanine との結合様式を図 5 に示した²³⁾. 本 SPR 評価系はリガンドとして glycyl-D-alanyl-D-

alanine を使用しているが (図 3), 実際, 選択性のある相互作用結果が得られている (図 7, 8, 11). Vancomycin と lipid II 末端との選択的な相互作用には, lysyl-D-alanyl-D-alanine と glycyl-D-alanyl-D-alanine の違いはほとんど影響しないと考えられる.

本 SPR 測定で得た親和性の結果と vancomycin 感受性菌である *S. aureus* RN4220 の抗菌活性との関係を考察した. Vancomycin, Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02 の *S. aureus* RN4220 に対する MIC はそれぞれ 1, 0.125 及び 2 μ g/mL と報告されている²⁶⁾. MIC による抗菌活性の順は Van-M-02 > vancomycin > Δ N-Van-M-02 であり, vancomycin 感受性菌の lipid II 末端を模した D-alanyl-D-alanine リガンドに対する vancomycin, Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02 の K_A 値の順と相関していた (表 2). また, VRE である *E. faecium* SR7940 (phenotype : VanA) 及び *E. faecium* SR23598 (phenotype : VanB) に対する vancomycin の MIC は両方とも 64 μ g/mL 以上であり, vancomycin の *S. aureus* RN4220 に対する MIC よりも高いことがわかっている²⁶⁾. 本 SPR 結果からも, vancomycin における vancomycin 耐性菌の lipid II 末端を模した D-alanyl-D-lactate リガンドに対する親和性は認められなかった. 一方, Van-M-02 は vancomycin と比べて *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対して非常に強い抗菌活性を示すことが報告されている (MIC = 1 μ g/mL, 0.25 μ g/mL). SPR 結果から, D-alanyl-D-lactate リガンドに対する K_A 値も算出することができた. また, Δ N-Van-M-02 においても *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対して強い抗菌活性を示すことが報告されている (MIC = 8 μ g/mL, 2 μ g/mL). しかしながら, SPR 結果からは Δ N-Van-M-02 の D-alanyl-D-lactate リガンドに対する K_A 値を得ることはできなかった. Teicoplanin などに代表されるグリコペプチド系抗菌薬の vancomycin 耐性菌に対する標的部位は lipid II 末端の D-alanyl-D-lactate 以外に膜タンパク質, 細胞壁プロテオグリカン及び脂質膜が考えられている²⁷⁾. 例えば, 膜タンパク質である *S. aureus* penicillin-binding protein 2 はグリコペプチド系抗菌薬が活性を示すための標的として考えられている⁴⁹⁾. これらのことから, Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02 は vancomycin 耐性菌の lipid II 末端ジペプチド以外の標的に結合することで, 抗菌活性が得られているのかもしれない.

Dimer 1 及び Dimer 2 の *S. aureus* RN4220 に対する MIC は 1 $\mu\text{g/ml}$ 及び 2 $\mu\text{g/ml}$ と報告されている²⁶⁾. また, Dimer 1 の *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対する MIC は 8 $\mu\text{g/ml}$ 及び 2 $\mu\text{g/ml}$ であり, Dimer 2 の *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対する MIC は 8 $\mu\text{g/ml}$ 及び 1 $\mu\text{g/ml}$ であることがわかっている²⁶⁾. Dimer 1 と Dimer 2 の *S. aureus* RN4220 に対する MIC は vancomycin の *S. aureus* RN4220 に対する MIC と同程度であるが, Dimer 1 と Dimer 2 の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する K_A 値は vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドに対する K_A 値と比較して大きかった. 従って, vancomycin ダイマーと D-alanyl-D-alanine リガンドとの親和性のみでは説明できない抗菌活性メカニズムがあるのかもしれないが, 詳細は不明である. また, Dimer 1 と Dimer 2 の *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対する MIC と D-alanyl-D-lactate リガンドに対する K_A 値との関係においても同様で, vancomycin ダイマーと D-alanyl-D-lactate リガンドとの親和性には, *in vitro* の抗菌活性には反映されない親和性が寄与しているかのかもしれない. D-alanyl-D-lactate に対する vancomycin ダイマーの相互作用は抗菌活性と関連しないという報告があり^{50, 51)}, 本結果と一致している.

また, vancomycin 類以外の抗菌薬 (teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin) における lipid II 末端ジペプチド類への親和性評価及び抗菌活性から, 抗菌薬の結合選択性を評価することができた (図 11, 表 3). 本評価系は様々な抗菌薬の lipid II 末端ジペプチド類に対する結合特性を評価することが可能であると考えられる.

第 4 項 小括

抗菌薬の lipid II 末端ジペプチド類に対する相互作用の速度論的パラメータを算出することができ、親和性を評価することができた。本評価系の lipid II 末端ジペプチド類のセンサーチップへの固定化及び抗菌薬の lipid II 末端ジペプチド類に対する相互作用における速度論的パラメータ測定の再現性は良好であった。Lipid II 末端ジペプチド類を固定化したセンサーチップは、抗菌薬の測定において少なくとも 200 回の連続アッセイに耐えられることがわかり、親和性評価に十分使用できることが確認できた。Vancomycin や vancomycin 類似化合物の vancomycin 感受性菌及び vancomycin 耐性菌の lipid II 末端を模したジペプチドに対する結合特性を評価することができた。さらに、vancomycin や vancomycin 類似化合物（モノマー）の結合定数は vancomycin 感受性菌に対する MIC 結果と相関していることがわかった。Vancomycin 類以外の抗菌薬 (teicoplanin, erythromycin, linezolid 及び daptomycin) における lipid II 末端ジペプチド類への親和性評価及び抗菌活性から、抗菌薬の結合選択性を評価することができた。本評価系は様々な抗菌薬の lipid II 末端ジペプチド類に対する結合特性を評価することが可能であると考えている。

第2節 Vancomycin 及び vancomycin 類似化合物のモデル脂質膜に対する親和性評価系の構築

第1項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒

本研究で使用した vancomycin, Van-M-02, Δ N-Van-M-02, Dimer 1, Dimer 2, teicoplanin, erythromycin, linezolid, DMSO, 蒸留水及び PBS は第1章 第1節 第1項 1.1 で記載した試薬及び溶媒を使用した. 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG), 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine (POPE) 及び 1,1',2,2'-tetraoleoyl cardiolipin (CL) は Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) から購入した. クロロホルム及び 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS) は和光純薬工業株式会社 (大阪) 社製でクロロホルムは分光分析用, CHAPS は試薬特級を使用した.

1.2 測定装置及び測定条件

SPR を用いた分子間相互作用分析装置は Biacore 3000 を使用し, センサーチップにはリポソームの固定化に有効な Sensor Chip L1 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) を用いた. ランニング緩衝液には, 2 倍濃度の PBS (5.4 mM KCl 及び 274 mM NaCl を含んだ 20 mM リン酸緩衝液) (リポソームの固定化) 及び 5% DMSO を含んだ 2 倍濃度の PBS (抗菌薬と脂質膜との相互作用評価)を使用した. センサーチップ表面からの脂質膜の除去には 2-propanol/50 mM NaOH (1:1, v/v) 及び 20 mM CHAPS を用いた. 再生溶液には 50 mM NaOH 溶液を用いた. これらのすべての溶液は用時調製し, 0.22 μ m のフィルターでろ過後, 脱気して使用した.

1.3 リポソームの調製

個々のリポソーム溶液を調製するために、POPC, POPE, POPG 及び CL をそれぞれクロロホルムに溶解させた。その後、脂質溶液 (POPC, POPG, POPG/CL (1:1, モル比) 及び POPE/POPG (4:1, モル比)) をそれぞれ遠心エバポレータにより溶媒を留去、乾燥させた後、形成されたりポソームを 2 倍濃度の PBS で再溶解した。この再溶解液 (1 mM) をほぼ透明になるまで超音波を照射し、100 nm 孔径のポリカーボネートフィルター (LiposoFast 社製) により 21 回ろ過し、100 nm に粒子径を揃えたりポソームを含む溶液を得た。孔径 100 nm リポソームを含む溶液を 300 mM NaCl を含む 2 倍濃度の PBS で 2 倍希釈し、4 種のリポソーム (POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG) 溶液のそれぞれについて、脂質濃度 0.5 mM として調製し、センサーチップ表面への固定化に用いた。

1.4 リポソームの固定化

Biacore 3000 にセンサーチップを装着した後、2-propanol/50 mM NaOH (1:1, v/v) 及び 20 mM CHAPS を流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 5 μL 注入してセンサーチップ表面を洗浄した。センサーチップ洗浄後、0.5 mmol/L リポソーム溶液を流速 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 80 μL 注入し、それぞれのリポソームをセンサーチップ上に固定化した。その後、50 mM NaOH を 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 30 μL 注入し脂質二重膜を形成させた⁵²⁾。

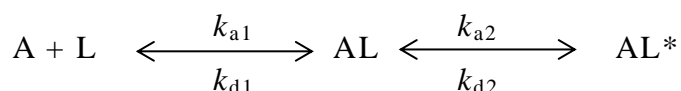
1.5 抗菌薬と脂質膜の相互作用測定

抗菌薬測定用溶液は、5% DMSO を含んだ 2 倍濃度の PBS を用い、7 ポイント (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μM) の濃度範囲で調製した。また、抗菌薬の溶解度あるいはレスポンス (RU 値) の飽和を考慮して、添加最高濃度を 50 μM に設定した。抗菌薬測定溶液は、マストランSPORTリミテーションを避けるために、流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 100 秒間 (50 μL) 注入した。注入後、ランニング緩衝液を 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 700 秒間送液した。すべての測定は、25 $^{\circ}\text{C}$ (測定装置内温度) で実施した。解離領域の測定後、脂質膜表面から解離せずに残存した抗菌薬を取り除くために 50 mM NaOH を流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 μL 注入した。以上の一連の

操作は、再現性を確認するために 3 回繰り返し実施した。

1.6 データ解析

抗菌薬-脂質膜相互作用測定により得られた 20-50 μM のセンサーグラムから BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いてグローバルフィッティングにより結合速度定数 (k_{a1} (1/Ms), k_{a2} (1/s)), 解離速度定数 (k_{d1} (1/s), k_{d2} (1/s)) 及び親和定数 (K (1/M)) を算出した。抗菌薬-脂質膜相互作用評価の解析モデルには, two-state reaction model (conformation change) を採用した⁵³⁻⁵⁵⁾。



A : 抗菌薬

L : 脂質膜

AL : 抗菌薬-脂質膜複合体 (主に静電的相互作用)

AL* : 抗菌薬-脂質膜複合体のコンフォメーション変化体
(主に疎水性相互作用による)

抗菌薬は主に脂質膜表面の極性基部分と静電的相互作用 (Step 1) により結合した後、膜内部のアルキル鎖で構成される疎水性領域に侵入し、疎水性相互作用により結合する (Step 2)。

この解析モデルにおける各 Step の親和定数は、以下に示した式により算出される⁵⁶⁻⁶¹⁾。

$$dR_1/dt = k_{a1} \cdot C_A (R_{\max} - R_1 - R_2) - k_{d1} \cdot R_1 - k_2 \cdot R_1 + k_{d2} \cdot R_2$$

$$dR_2/dt = k_{a2} \cdot R_1 - k_{d2} \cdot R_2$$

R_1 (RU) : A と L の結合により形成された complex 1

R_2 (RU) : AL のコンフォメーション変化により形成された complex 2

R_{\max} (RU) : 最大アナライト結合量

C_A : アナライト濃度

親和定数 (K) は結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}) 及び解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2})を用いて以下に示す式によって算出した.

$$K = k_{a1}/k_{d1} \cdot (k_{a2}+k_{d2})/k_{d2}$$

第 2 項 結果

2.1 センサーチップへのモデル脂質膜の固定化

本実験では、モデル脂質膜として 4 種類のリポソーム POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG を使用した。POPC は哺乳動物細胞膜モデルとして、また POPG, POPG/CL はグラム陽性菌細胞膜モデル、POPE/POPG はグラム陰性菌細胞膜モデルとして用いた^{52, 62)}。センサーチップ上に固定化する 4 種のモデル脂質膜が最適な条件下で安定に固定化できることを確認するために 3 サンプルを測定した。4 種のモデル脂質膜に関する平均固定化量 (RU), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (RSD) をそれぞれ表 4 に示した。これらの結果より、リポソーム固定化量の平均は POPC 約 9500 RU, POPG 及び POPG/CL 約 5500 RU, POPE/POPG 約 8500 RU であり、これらの固定化量の相対標準偏差は 2.9 % 以下と良好であった。これらのことから、センサーチップ上へのリポソームの固定化が良好な再現性を示し、固定化条件が適当であることが確認できた。また、薬剤-脂質膜相互作用解析において、良好な再現性を示すセンサーグラムの取得と反応速度論的解析を実施するためには、リポソームの固定化量は約 4500 RU 必要とされていることから^{52, 53, 63-65)}、今回の測定系におけるリポソーム固定化量とその再現性は薬剤-脂質膜相互作用解析に適用できるものであると判断した。

表 4. センサーチップへのリポソーム固定化量とその繰り返し精度

Lipid type	Response units		RSD (%) ^b
	Mean (n = 3)	SD ^a	
POPC	9530	99	1.0
POPG	5480	60	1.1
POPG/CL	5800	170	2.9
POPE/POPG	8390	72	0.9

a. Standard deviation

b. Relative standard deviation

2.2 Vancomycin 類とモデル脂質膜の相互作用評価

図 12 には vancomycin 及び vancomycin ダイマーである Dimer 2 (図 4) とモデル脂質膜 POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG との相互作用測定結果のセンサーグラムを示した。これらの抗菌化合物におけるモデル脂質膜との相互作用は非常に弱く, two-state reaction model を用いた速度論的パラメータを算出することができなかった。図 13 には Van-M-02, Δ N-Van-M-02 及び Dimer 1 (図 2) とモデル脂質膜 POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG との相互作用測定結果のセンサーグラムを示した。添加した Van-M-02, Δ N-Van-M-02 及び Dimer 1 濃度の増加に伴いセンサーグラムのレスポンスが上昇していることが確認できた。これらのセンサーグラムから Van-M-02, Δ N-Van-M-02 及び Dimer 1 とモデル脂質膜間の相互作用が飽和状態に達していないことがわかった。

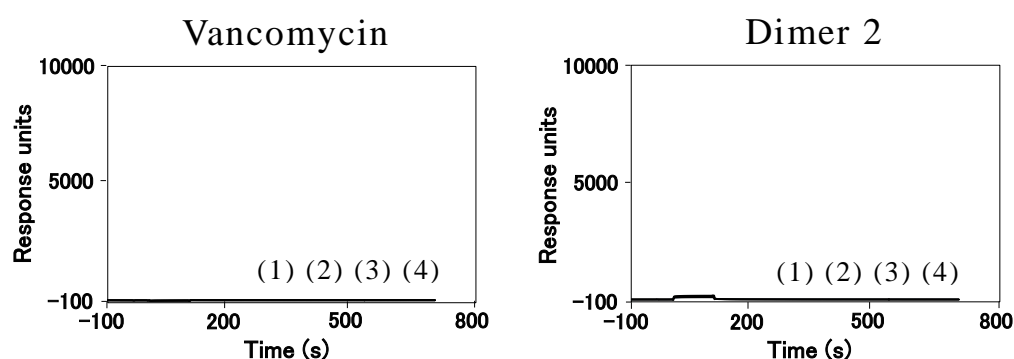


図 12. Vancomycin 及び Dimer 2 のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム
(1, POPC; 2, POPG; 3, POPG/CL; 4, POPE/POPG)

化合物濃度 : 50 μ M

ランニング緩衝液 : 5% DMSO を含んだ 2 倍濃度の PBS

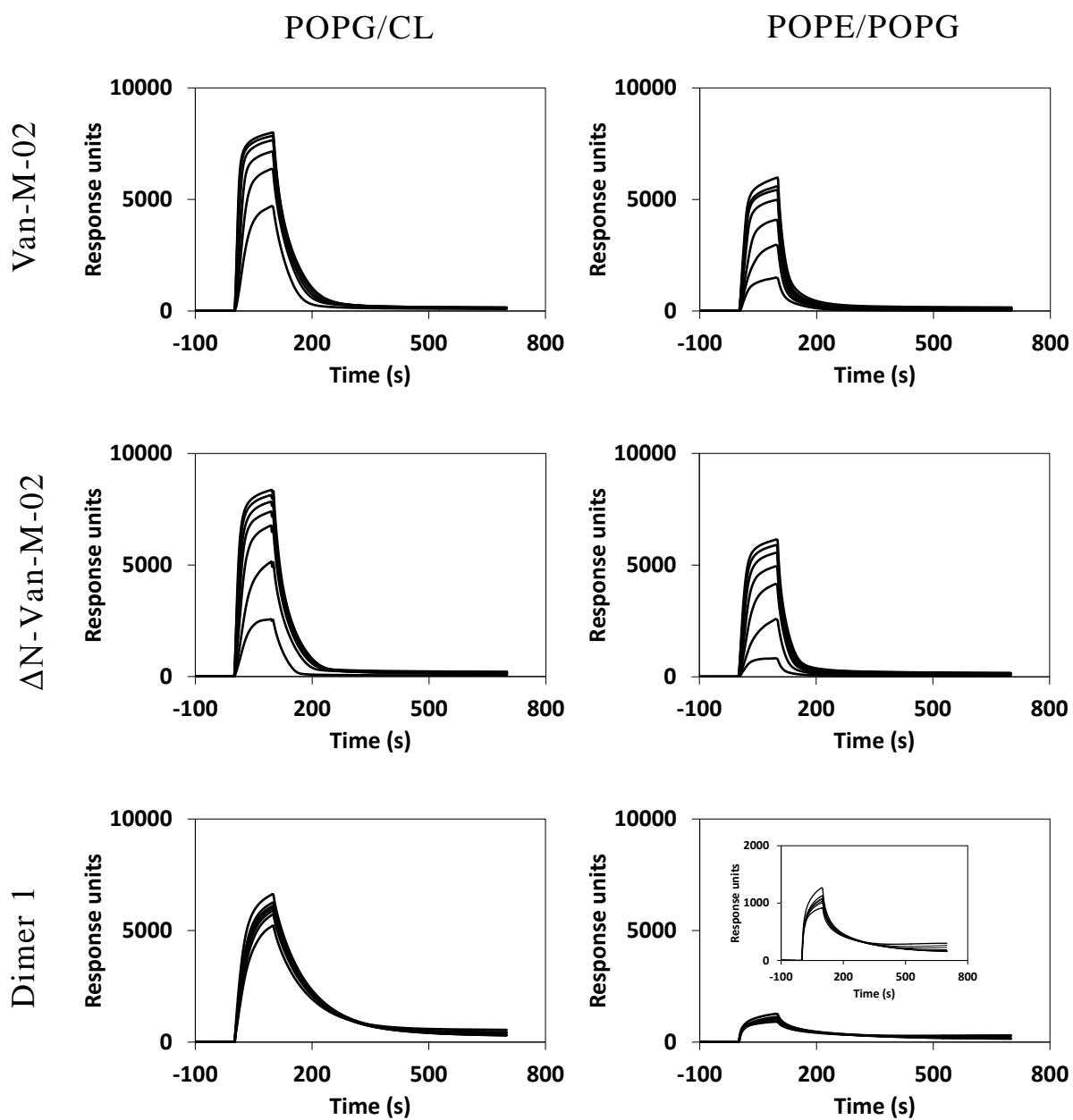


図 13. Van-M-02, ΔN -Van-M-02 及び Dimer 1 のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム

化合物濃度 : 20-50 μM

ランニング緩衝液 : 5% DMSO を含んだ 2 倍濃度の PBS

表 5 には、図 13 に示した 7 濃度 (20 - 50 μM) の vancomycin 類-モデル脂質膜相互作用の結合速度定数及び解離速度定数、親和定数を示した。繰り返し測定 ($n = 3$) により算出した各パラメータの再現性は良好であった。センサーグラムの解析に用いた解析モデルは、抗菌薬-脂質膜またはペプチド-脂質膜などにおける相互作用解析のこれまでの報告を基に two-state reaction model を選択した^{14, 17-19)}。この解析モデルは、静電的な相互作用を含む初期の結合親和性、本研究では vancomycin 類トリポソームの親水基部分との相互作用 (Step 1, k_{a1} , k_{d1} を算出) を経て、疎水的な相互作用による vancomycin 類の脂質膜内への侵入 (Step 2, k_{a2} , k_{d2} を算出) を予測した解析モデルとなっている⁵³⁻⁵⁵⁾。

Van-M-02 のグラム陽性菌細胞膜を模した POPG 及び POPG/CL に対する親和定数は哺乳動物細胞膜を模した POPC 及びグラム陰性菌を模した POPE/POPG に対する親和定数よりも大きいことがわかった。このことは Van-M-02 が POPC 及び POPE/POPG よりも POPG 及び POPG/CL に対する親和性が強いということを示している。Van-M-02 の POPG 及び POPG/CL に対する親和性と POPG 及び POPG/CL に対する親和性との違いは、主として Step 1 の結合速度定数の違いによる影響が大きい。また、 $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の POPG 及び POPG/CL に対する親和定数は POPE/POPG に対する親和定数よりも大きいことがわかった。しかしながら、POPC に対する親和定数と同程度の値であることが明らかとなった。

Van-M-02 及び $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の POPE/POPG に対する親和性は POPG 及び POPG/CL に対する親和性よりも弱いことがわかった。Van-M-02 及び $\Delta\text{N-Van-M-02}$ のグラム陰性菌への活性は低いと考えており、Van-M-02 及び $\Delta\text{N-Van-M-02}$ の POPE/POPG に対する親和性がグラム陰性菌への抗菌活性に関与しているのかもしれない。

表 5. Two-state reaction model (conformation change) 解析により得られた vancomycin, Van-M-02, ΔN-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 (20 - 50 μM) の モデル脂質膜に対する相互作用における速度論的パラメータ及び親和定数

Compound	Lipid type	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} ($\times 10^{-2}$, 1/s)	k_{a2} ($\times 10^{-4}$, 1/s)	k_{d2} ($\times 10^{-5}$, 1/s)	K ($\times 10^3$, 1/M)
Vancomycin	POPC	NC ^a	NC	NC	NC	NC
	POPG	NC	NC	NC	NC	NC
	POPG/CL	NC	NC	NC	NC	NC
	POPE/POPG	NC	NC	NC	NC	NC
Van-M-02	POPC	197 ± 96^b	10.1 ± 0.8	4.59 ± 1.00	94.2 ± 31.4	3.00 ± 1.30
	POPG	977 ± 108	3.28 ± 0.09	1.88 ± 1.00	50.1 ± 13.8	41.3 ± 7.7
	POPG/CL	1220 ± 122	2.55 ± 0.02	3.18 ± 0.66	241 ± 63	54.4 ± 4.3
	POPE/POPG	176 ± 41	5.95 ± 0.29	7.29 ± 2.09	363 ± 29	3.53 ± 0.66
ΔN-Van-M-02	POPC	424 ± 156	7.45 ± 0.54	11.0 ± 2.8	58.4 ± 20.6	20.9 ± 17.9
	POPG	453 ± 64	3.41 ± 0.12	2.85 ± 0.40	213 ± 101	15.6 ± 3.4
	POPG/CL	601 ± 60	3.19 ± 0.23	4.70 ± 1.13	351 ± 209	22.1 ± 4.8
	POPE/POPG	140 ± 58	5.00 ± 0.13	6.20 ± 0.32	211 ± 38	3.60 ± 1.33
Dimer 1	POPC	1400 ± 221	1.68 ± 0.03	19.2 ± 0.2	163 ± 19	181 ± 18
	POPG	611 ± 101	2.19 ± 0.02	15.0 ± 0.5	236 ± 21	45.6 ± 5.5
	POPG/CL	875 ± 17	1.12 ± 0.01	3.72 ± 0.92	32.9 ± 4.8	171 ± 39
	POPE/POPG	1630 ± 123	1.28 ± 0.22	34.8 ± 7.1	255 ± 62	308 ± 29
Dimer 2	POPC	NC	NC	NC	NC	NC
	POPG	NC	NC	NC	NC	NC
	POPG/CL	NC	NC	NC	NC	NC
	POPE/POPG	NC	NC	NC	NC	NC

^a Not calculated, ^b Mean \pm standard deviation ($n = 3$)

Vancomycin ダイマーである Dimer 1 はすべてのモデル脂質膜に対して、Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02 よりも大きな親和定数を示した。また、Dimer 1 はすべての lipid II 末端ジペプチド類 (D-alanyl-D-alanine, L-alanyl-L-alanine, D-alanyl-D-lactate, control) に対する親和性においても Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02 よりも強い親和性を示した (第 1 章 第 1 節)。Dimer 1 は非特異的な結合力が Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02 よりも強いと示唆される。Vancomycin ダイマーである Dimer 2 はモデル脂質膜に対して相互作用が認められなかった。この違いは Dimer 1 と Dimer 2 のリンカー構造の違いに影響されていると考えられる。

2.3 Vancomycin 類以外の抗菌薬とモデル脂質膜の相互作用評価

図 14 には teicoplanin, erythromycin 及び linezolid とモデル脂質膜 POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG との相互作用測定結果のセンサーグラムを示した。これらの抗菌薬におけるモデル脂質膜との相互作用は非常に弱く、two-state reaction model を用いた速度論的パラメータを算出することができなかった。

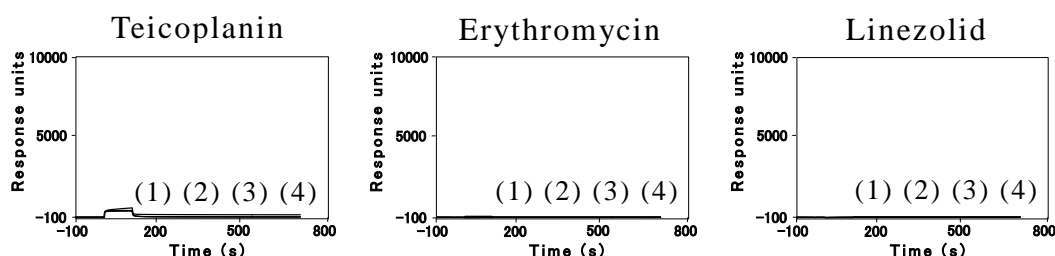


図 14. Teicoplanin, erythromycin 及び linezolid のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム (1, POPC; 2, POPG; 3, POPG/CL; 4, POPE/POPG)

化合物濃度 : 50 μ M

ランニング緩衝液 : 5% DMSO を含んだ 2 倍濃度の PBS

グリコペプチド系抗菌薬である teicoplanin は lipid II 末端ジペプチドの D-alanyl-D-alanine 及び D-alanyl-D-lactate に結合して、いくつかの VRE を含むグラム陽性菌の細胞壁合成を阻害することが知られている^{41, 42)}。実際に

D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンドに対して相互作用することが確認できている（表 3, 図 11）。しかしながら, teicoplanin はモデル脂質膜に対して親和性を示さなかった。このことから, teicoplanin の脂質膜への親和性は抗菌活性にあまり寄与していないということが考えられる。

Erythromycin はマクロライド系抗菌薬で広い抗菌スペクトルを持ち, linezolid はオキサゾリジン系抗菌薬で MRSA や VRE を含む様々なグラム陽性菌によって引き起こされる感染症の治療薬として知られている⁴³⁾。Erythromycin や linezolid はリボソームと結合することでリボソームの機能に影響を与え, タンパク質の合成を阻害する⁴⁴⁾。Erythromycin 及び linezolid はモデル脂質膜や lipid II 末端ジペプチドに対する親和性が確認できず（表 3, 図 11), このことは薬効メカニズムを反映しているのかもしれない。

第 3 項 考察

哺乳動物細胞膜，グラム陽性菌細胞膜及びグラム陰性菌細胞膜を模したモデル脂質膜に対する親和性が認められた抗菌化合物に関して，速度論的パラメータを算出することができた（図 12-14，表 5）。

Vancomycin 類似化合物である Van-M-02， Δ N-Van-M-02 及び Dimer 1 はモデル脂質膜に対して強い相互作用が認められた．Vancomycin 類のモデル脂質膜に対する親和性を抗菌活性及び lipid II 末端ジペプチド類（D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンド）に対する親和性結果（表 2）と比較した．Van-M-02 は vancomycin 感受性菌である *S. aureus* RN4220 及び VRE である *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対して強い抗菌活性を示すことがわかっている．Van-M-02 は vancomycin よりもグラム陽性菌を模した POPG 及び POPG/CL に対して高い *K* 値を示し，また vancomycin よりも D-alanyl-D-alanine リガンド及び D-alanyl-D-lactate リガンドに対して強い親和性を示した．これらのことから，Van-M-02 が強い抗菌活性を示す要因は lipid II 末端ジペプチドへの親和性だけでなく脂質膜との相互作用も相成って寄与していることが考えられる．

Δ N-Van-M-02 の *S. aureus* RN4220 に対する MIC は vancomycin と同程度であり， Δ N-Van-M-02 の *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対する抗菌活性は vancomycin の *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対する抗菌活性よりも強いことが報告されている²⁶⁾．一方で， Δ N-Van-M-02 の D-alanyl-D-alanine リガンドへの親和性は，D-alanyl-D-alanine 認識部位を一部欠損させているので，vancomycin の D-alanyl-D-alanine リガンドへの親和性よりも弱いことがわかっている． Δ N-Van-M-02 の POPG 及び POPG/CL に対する親和性は，vancomycin の POPG 及び POPG/CL に対する親和性よりも高く，このことが vancomycin 感受性菌 (*S. aureus* RN4220) 及び vancomycin 耐性菌 (*E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598) に対する強い抗菌活性の原因となっていると考えられる． Δ N-Van-M-02 の抗菌活性には脂質膜への親和性が寄与しているのかもしれない．

Teicoplanin などのグリコペプチド系抗菌薬の vancomycin 耐性菌に対する標

的部位は lipid II 末端の D-alanyl-D-lactate 以外に脂質膜，膜タンパク質（*e.g.*, penicillin-binding protein 2）及び細胞壁プロテオグリカンが考えられている^{27, 49)}。本研究から，Van-M-02 及び Δ N-Van-M-02 については vancomycin 耐性菌の脂質膜への相互作用が抗菌活性に寄与している可能性を示すことができたと考えている。

Vancomycin, teicoplanin, erythromycin 及び linezolid はいずれのモデル脂質膜に対しても親和性を示さなかったことやこれらの抗菌薬が細菌細胞膜相互作用に寄与しない薬効メカニズムに基づく抗菌活性を発揮することから^{41-44, 49)}，本 SPR 測定法の抗菌薬に対する脂質膜親和選択性が確認できた。

本 SPR 評価系は他の抗菌薬の脂質膜に対する結合選択性，薬効メカニズム及び細胞毒性に関わる評価などにも幅広く応用できることが期待される。

第 4 項 小括

SPR を用いて、哺乳動物細胞膜、グラム陽性菌細胞膜及びグラム陰性菌細胞膜を模したモデル脂質膜に対する親和性が認められた抗菌化合物に関して、速度論的パラメータを算出することができた。Vancomycin, teicoplanin, erythromycin 及び linezolid はいずれのモデル脂質膜に対しても親和性を示さなかったことやこれらの抗菌薬が細菌細胞膜相互作用に寄与しない薬効メカニズムに基づく抗菌活性を発揮することから、本 SPR 測定法の抗菌薬に対する脂質膜親和選択性が確認できた。一方で、vancomycin 類似化合物である Van-M-02, ΔN-Van-M-02 及び Dimer 1 はモデル脂質膜に対して相互作用が認められた。また、lipid II 末端ジペプチドリガンド (D-alanyl-D-alanine 及び D-alanyl-D-lactate) に対する親和性の測定結果と抗菌活性 (第 1 章 第 1 節) から、これらの化合物の脂質膜に対する結合選択性を考察することができた。さらに、これらの結合の親和性から *S. aureus* 及び VRE に対する薬効メカニズムを考察した。本 SPR 評価系は他の抗菌薬の脂質膜に対する結合選択性、薬効メカニズム及び細胞毒性に関わる評価などにも幅広く応用できることが期待される。

第3節 Daptomycin のモデル脂質膜に対する親和性評価系の構築

第1項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒

本研究で使用した daptomycin (図 6), DMSO, 蒸留水, POPC, POPG, POPE, CL, クロロホルム, CHAPS 及び PBS は第1章 第1節 第1項 1.1 及び第1章 第2節 第1項 1.1 で記載した試薬及び溶媒を使用した。

1.2 測定装置及び測定条件

SPR を用いた分子間相互作用分析装置は Biacore 3000 を使用し、センサーチップにはリポソームの固定化に有効な Sensor Chip L1 を用いた。ランニング緩衝液には、0.5 倍濃度の PBS (1.35 mM KCl 及び 68.5 mM NaCl を含んだ 5 mM リン酸緩衝液) (リポソームの固定化) 及び 50 mg/L CaCl₂ を含んだ 0.5 倍濃度の PBS (daptomycin と脂質膜との相互作用評価) を使用した。センサーチップ表面からの脂質膜の除去には 2-propanol/50 mM NaOH (1:1, v/v) 及び 20 mM CHAPS を用いた。再生溶液には 10 mM HCl 及び 50 mM NaOH 溶液を用いた。これらのすべての溶液は用時調製し、0.22 µm のフィルターでろ過後、脱気して使用した。

1.3 リポソームの調製

個々のリポソーム溶液を調製するために、POPC, POPE, POPG 及び CL をそれぞれクロロホルムに溶解させた。その後、脂質溶液 (POPC, POPG, POPG/CL (1:1, モル比) 及び POPE/POPG (4:1, モル比)) をそれぞれ遠心エバポレータにより溶媒を留去、乾燥させた後、形成されたリポソームを 0.5 倍濃度の PBS で再溶解した。この再溶解液 (1 mM) をほぼ透明になるまで超音波を照射し、50 nm 孔径のポリカーボネートフィルター (LiposoFast 社製) により 21 回ろ過し、

50 nm に粒子径を揃えたりポソームを含む溶液を得た．孔径 50 nm リポソームを含む溶液を 300 mM NaCl を含む 2 倍濃度の PBS で 2 倍希釈し，4 種のリポソーム (POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG) 溶液のそれぞれについて，脂質濃度 0.5 mM として調製し，センサーチップ表面への固定化に用いた．

1.4 リポソームの固定化

Biacore 3000 にセンサーチップを装着した後，2-propanol/50 mM NaOH (1:1, v/v) 及び 20 mM CHAPS を流速 5 μ L/min で 5 μ L 注入してセンサーチップ表面を洗浄した．センサーチップ洗浄後，0.5 mmol/L リポソーム溶液を流速 2 μ L/min で 80 μ L 注入し，それぞれのリポソームをセンサーチップ上に固定化した．その後，50 mM NaOH を 50 μ L/min で 30 μ L 注入し脂質二重膜を形成させた⁵²⁾．

1.5 Daptomycin と脂質膜の相互作用測定

Daptomycin 測定用溶液は 50 mg/L CaCl₂ を含んだ 0.5 倍濃度の PBS を用いて 6 ポイント (8.3, 13, 17, 25, 33, 50 μ M) の濃度範囲で調製した．また，daptomycin の溶解度あるいはレスポンス (RU 値) の飽和を考慮して，添加最高濃度を 50 μ M に設定した．カルシウム濃度は生体内濃度と同程度とした．Daptomycin 測定溶液は，マストランスリミテーションを避けるために，流速 30 μ L/min で 100 秒間 (50 μ L) 注入した．注入後，ランニング緩衝液を 30 μ L/min で 700 秒間送液した．すべての測定は，25°C (測定装置内温度) で実施した．解離領域の測定後，脂質膜表面から解離せずに残存した daptomycin を取り除くために 10 μ L の 10 mM HCl を 3 回，10 μ L の 50 mM NaOH を 1 回，流速 30 μ L/min で注入した．以上の一連の操作は，再現性を確認するために 3 回繰り返し実施した．

1.6 データ解析

Daptomycin-脂質膜相互作用測定により得られた 8.3-50 μ M のセンサーグラムから BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いてグローバルフィッティン

グにより結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 (K) を算出した. Daptomycin-脂質膜相互作用評価の解析モデルには, two-state reaction model (conformation change) を採用した (第 1 章 第 2 節 第 1 項 1.6 参照)^{33-35, 56-61)}.

第 2 項 結果

2.1 センサーチップへのモデル脂質膜の固定化

本実験では、モデル脂質膜として 4 種類のリポソーム POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG を使用した。POPC は哺乳動物細胞膜モデルとして、また POPG, POPG/CL はグラム陽性菌細胞膜モデル、POPE/POPG はグラム陰性菌細胞膜モデルとして用いた^{52, 62)}。センサーチップ上に固定化する 4 種のモデル脂質膜が最適な条件下で安定に固定化できることを確認するために 3 サンプルを測定した。4 種のモデル脂質膜に関する平均固定化量 (RU), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (RSD) をそれぞれ表 6 に示した。これらの結果より、リポソーム固定化量の平均は POPC 約 11000 RU, POPG, POPG/CL 約 4500 RU, POPE/POPG 約 7000 RU であり、これらの固定化量の相対標準偏差は 9.0 % 未満と良好であった。また、第 1 章 第 2 節 第 2 項 2.1 における結果と同程度であり、PBS 濃度が異なっても同様に固定化できることがわかった。さらに、センサーチップ上へのリポソームの固定化が良好な再現性を示し、固定化条件が適当であることが確認できた。今回の測定系におけるリポソーム固定化量とその再現性は daptomycin-脂質膜相互作用解析に適用できるものであると判断した。

表 6. センサーチップへのリポソーム固定化量とその繰り返し精度

Lipid type	Response units		RSD (%) ^b
	Mean (n = 3)	SD ^a	
POPC	10600	100	0.9
POPG	4850	430	8.9
POPG/CL	4310	50	1.2
POPE/POPG	6920	180	2.6

a. Standard deviation

b. Relative standard deviation

2.2 Daptomycin のモデル脂質膜に対する結合選択性評価

図 15 (A) 及び図 15 (B) には, 50 mg/L CaCl_2 を含むランニング緩衝液及び 50 mg/L CaCl_2 を含まないランニング緩衝液を用いた時の, daptomycin の POPG 及び POPG/CL に対する相互作用のセンサーグラムを示した. なお, 50 mg/L CaCl_2 を含むランニング緩衝液を用いた実験には注入サンプル中にも終濃度 50 mg/L CaCl_2 を添加した. CaCl_2 を含む条件では daptomycin は POPG 及び POPG/CL に対して強い相互作用を示したが, CaCl_2 を含まない条件では相互作用が確認できなかった. これらのことから, SPR を用いて, グラム陽性菌細胞膜に対する相互作用におけるカルシウムの重要性を示すことができた.

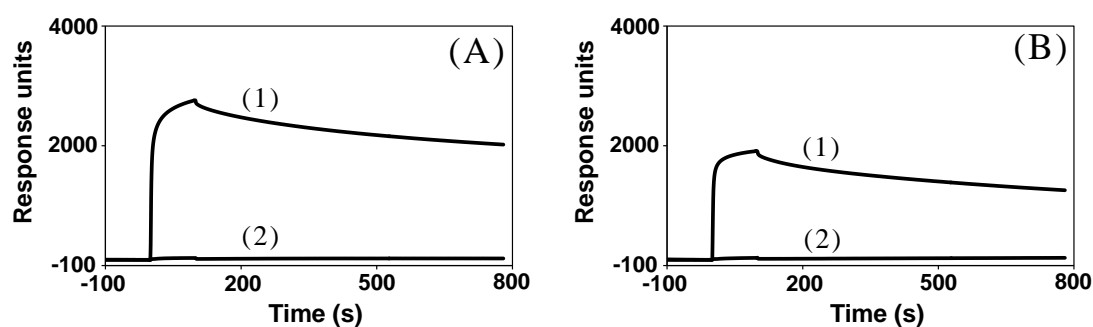


図 15. Daptomycin のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム ((A), POPG; (B), POPG/CL)

Daptomycin 濃度 : 50 μM

ランニング緩衝液 : (1) 50 mg/L CaCl_2 を含んだ 0.5 倍濃度の PBS

(2) 50 mg/L CaCl_2 を含まない 0.5 倍濃度の PBS

図 16 には daptomycin の POPC, POPG, POPG/CL 及び POPE/POPG に対する相互作用のセンサーグラムを示した (50 mg/L CaCl_2 を含むランニング緩衝液使用). グラム陰性菌細胞膜を模した POPE/POPG に対する daptomycin の相互作用は, グラム陽性菌細胞膜を模した POPG, POPG/CL に対する相互作用よりも弱いことがわかった. また, 哺乳動物細胞膜を模した POPC に対する相互作用はほとんど認められなかった. これらのことから, daptomycin の抗菌活性の特徴をモデル脂質膜への結合選択性から説明することができた.

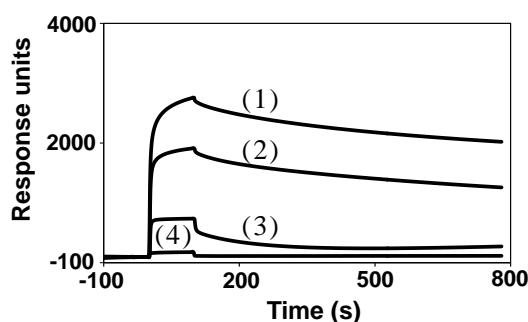


図 16. Daptomycin のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム ((1), POPG; (2), POPG/CL; (3), POPE/POPG; (4), POPC)

Daptomycin 濃度 : 50 μM

ランニング緩衝液 : 50 mg/L CaCl_2 を含んだ 0.5 倍濃度の PBS

2.3 Daptomycin とグラム陽性菌細胞膜モデルの相互作用評価

図 17 (A) 及び図 17 (B) には, センサーチップに固定化した POPG 及び POPG/CL に対する daptomycin の相互作用測定結果のセンサーグラムを示した. 添加した daptomycin 濃度の増加に伴いセンサーグラムのレスポンスが上昇していることが確認できた. これらのセンサーグラムから daptomycin とモデル脂質膜間の相互作用が飽和状態に達していないことがわかった.

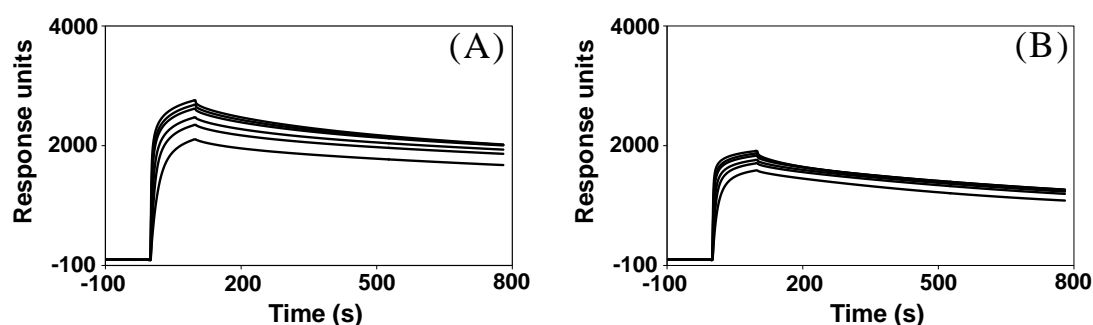


図 17. Daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルとの相互作用センサーグラム
((A), POPG; (B), POPG/CL)

Daptomycin 濃度 : 8.3-50 μM (8.3, 13, 17, 25, 33, 50 μM)

ランニング緩衝液 : 50 mg/L CaCl_2 を含んだ 0.5 倍濃度の PBS

表 7 には, 図 17 に示した 6 濃度 (8.3 - 50 μM) の daptomycin-モデル脂質膜相互作用の結合速度定数, 解離速度定数及び親和定数を示した. 繰り返し測定 ($n = 3$) により算出した各パラメータの再現性は良好であった. センサーグラムの解析に用いた解析モデルは, 第 1 章 第 2 節と同様に, 抗菌薬-脂質膜またはペプチド-脂質膜などにおける相互作用解析のこれまでの報告を基に two-state reaction model を選択した³³⁻³⁵⁾.

表 7. Two-state reaction model (conformation change) 解析により得られた daptomycin (8.3 - 50 μM) のグラム陽性菌細胞膜モデルに対する相互作用における速度論的パラメータ及び親和定数

Lipid type	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	k_{a2} ($\times 10^{-4}$, 1/s)	k_{d2} ($\times 10^{-4}$, 1/s)	K ($\times 10^6$, 1/M)
POPG	1290 ± 500^a	0.569 ± 0.117	18.3 ± 5.1	7.33 ± 3.29	8.05 ± 1.58
POPG/CL	2770 ± 1660	1.85 ± 1.14	26.8 ± 12.0	9.08 ± 5.00	6.13 ± 1.33

a. Mean \pm standard deviation ($n = 3$)

Running buffer: 50 mg/L CaCl_2 を含んだ 0.5 倍濃度の PBS

Daptomycin の POPG/CL に対する親和定数は POPG に対する親和定数よりも少し高いことがわかった．この親和性の違いは，Step 1 の結合速度定数の違いによる影響が最も大きい．POPG の k_{d1} 値が POPG/CL の k_{d1} 値に比べて低いということは，daptomycin の POPG からの解離が POPG/CL からの解離よりも遅いということを示している．また，daptomycin は POPG への親和性よりも CL に対する親和性の方が弱いということが考えられる．

図 18 (A) 及び図 18 (B) には，50 mg/L CaCl_2 を含まないランニング緩衝液を用いて，POPG 及び POPG/CL に対する daptomycin の相互作用を測定した結果のセンサーグラムを示した．添加した daptomycin 濃度の増加に伴いセンサーグラムのレスポンスが上昇していることが確認できた．これらのセンサーグラムから daptomycin とモデル脂質膜間の相互作用が飽和状態に達していないことがわかった．サンプル注入間において daptomycin は脂質膜との結合が確認できた．しかし，サンプル注入が終了すると， CaCl_2 を含むランニング緩衝液を使用した時と比較して（図 17），daptomycin の脂質膜からの速い解離が認められた．

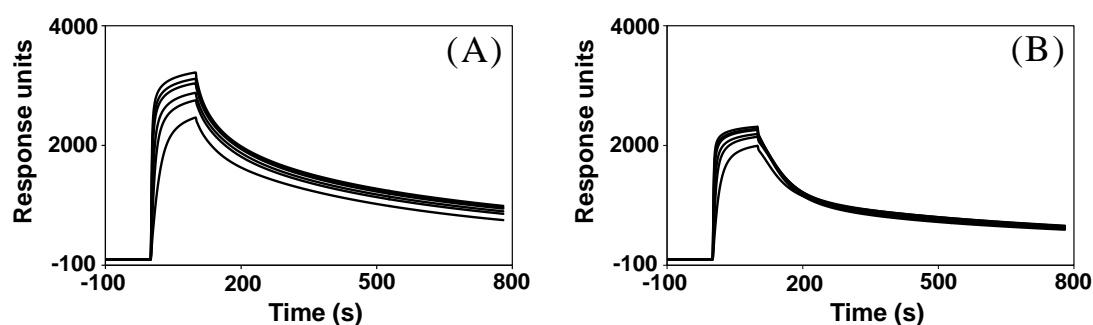


図 18. Daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルとの相互作用センサーグラム
((A), POPG; (B), POPG/CL)

Daptomycin 濃度 : 8.3-50 μM (8.3, 13, 17, 25, 33, 50 μM)

ランニング緩衝液 : 50 mg/L CaCl_2 を含まない 0.5 倍濃度の PBS

表 8 には、図 18 に示した 6 濃度 (8.3 - 50 μM) の daptomycin-モデル脂質膜相互作用の結合速度定数、解離速度定数及び親和定数を示した。Daptomycin の脂質膜モデルに対する親和定数は、 CaCl_2 を含むランニング緩衝液を使用した時の親和定数と比較して低いことがわかった。特に POPG の K 値はカルシウム存在下における POPG の K 値と比較して、1/4 の低下が認められた。この 2 つの測定条件で得られた親和定数の違いは、Step 1 の結合速度定数の違いによる影響が最も大きい。カルシウムが存在していない条件下での POPG 及び POPG/CL に対する k_{d1} 値が、カルシウム存在下での POPG 及び POPG/CL に対する k_{d1} 値よりも高いということは、カルシウムが存在していない条件下では daptomycin が POPG 及び POPG/CL から速く解離していることを意味している。これらの結果から、daptomycin が脂質膜への結合を維持するためにはカルシウムが必要であるということがわかった。

表 8. Two-state reaction model (conformation change) 解析により得られた daptomycin (8.3-50 μM) のグラム陽性菌細胞膜モデルに対する相互作用における速度論的パラメータ及び親和定数

Lipid type	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	k_{a2} ($\times 10^{-4}$, 1/s)	k_{d2} ($\times 10^{-4}$, 1/s)	K ($\times 10^6$, 1/M)
POPG	5970	16.2	81.3	22.6	1.89
POPG/CL ^a	9920	10.6	30.3	10.1	3.76

Running buffer: 0.5 倍濃度の PBS

第 3 項 考察

Daptomycin における哺乳動物細胞膜，グラム陽性菌細胞膜及びグラム陰性菌細胞膜を模したモデル脂質膜に対する相互作用の速度論的パラメータを算出することができた（図 17, 18, 表 7, 8）. また，daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルに対する結合特性を相互作用の観点から示すことができた（図 15, 16）. すなわち，daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルに対する親和性は哺乳動物細胞膜及びグラム陰性菌細胞膜モデルに対する親和性より強いことがわかった. 前節で論じたように，vancomycin, teicoplanin, erythromycin 及び linezolid はいずれのモデル脂質膜に対しても親和性を示さず，これらの抗菌薬が細菌細胞膜相互作用に寄与しない薬効メカニズムに基づく事実と符合する結果が得られている（第 1 章 第 2 節）. Daptomycin のモデル脂質膜に対する親和性からも，本 SPR 測定法によって得られる脂質膜への選択性から，抗菌薬の作用メカニズムを予測することが可能であると考えられる.

Daptomycin がグラム陽性菌細胞膜に結合し抗菌活性を示すためには，カルシウムの存在が必要であることが知られている³³⁾. Daptomycin のカルシウムを介した脂質膜への親和性は薬理活性に関係しているため，重要なファクターの 1 つとして考えられる. これまでに，daptomycin の脂質膜への相互作用メカニズム及びカルシウムの役割については，円偏光二色性スペクトル測定，蛍光分光法，示差走査熱量測定，核磁気共鳴法，蛍光共鳴エネルギー移動など様々な分析技術を用いて調べられている^{31, 66, 67)}. 本研究においても，SPR 技術を用いて，daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルへの親和性がカルシウム濃度依存的であり，カルシウム存在下でのみ，脂質膜への結合が認められることが確認できた（図 14）.

本研究は daptomycin の脂質膜親和性に対する選択性を SPR で評価できた初めての例である. また，本 SPR 評価系は他の抗菌薬の脂質膜親和性評価にも応用できることが期待される.

第 4 項 小括

SPR を用いて, daptomycin における哺乳動物細胞膜, グラム陽性菌細胞膜及びグラム陰性菌細胞膜を模したモデル脂質膜に対する相互作用の速度論的パラメータを算出することができた. また, daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルに対する結合特性を相互作用の観点から示すことができた. すなわち, daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルに対する親和性は哺乳動物細胞膜及びグラム陰性菌細胞膜モデルに対する親和性より強いことがわかった. また, カルシウム存在下における daptomycin の脂質膜選択性を明らかにすることができた. Daptomycin のグラム陽性菌細胞膜モデルへの親和性はカルシウム濃度依存的であり, カルシウム存在下でのみ, 脂質膜への結合が認められた. 本研究は, daptomycin の脂質膜親和性に対する選択性を SPR で評価できた初めての例である. また, 本 SPR 評価系は他の抗菌薬の脂質膜親和性評価にも応用できることが期待される.

第2章 表面プラズモン共鳴法を用いた thyroxine のタンパク結合に対する薬剤の競合阻害能評価系の構築

緒言

甲状腺ホルモンは甲状腺から血中に分泌され、基礎代謝亢進機能を有し、成長、成熟および正常な生理機能に関与している^{68, 69)}。甲状腺ホルモンには、L-thyroxine (T4, 図 19) と 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3, 図 19) の2種類があるが、分泌の中心はT4で、T3は血中に存在する甲状腺ホルモン全体の2%程度である^{69, 70)}。甲状腺ホルモンとしての活性は、T3の方が強力であるが、分泌されてから不活性化され血中から排泄されるまでの時間は、T3の方が短くなっている。T4はヨウ素原子を1分子中に4つ、T3はヨウ素原子を3つ含み、T4は肝臓や腎臓において、酵素によってヨウ素原子が1つ脱離してT3へ変化する⁶⁹⁾。体内に過剰のエネルギーが存在する場合、T4からT3への変化が進み、逆に飢餓状態の時は変化を減らしてエネルギーを蓄える。T4にはT3の供給を滞らせない役割もある。

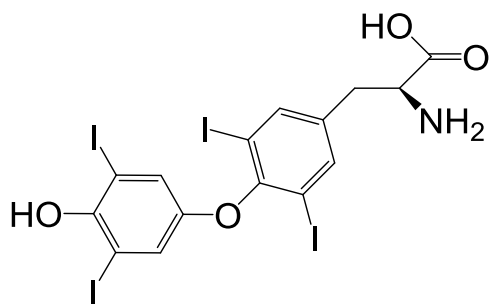
ヒトの生体内は自律神経系と内分泌系（ホルモン）によって恒常性が保たれている。甲状腺は、内分泌器官の中では最も大きな臓器である。甲状腺ホルモンは、体内で多くの臓器を刺激するため、血中の甲状腺ホルモン濃度は一定の値に維持される必要がある。そのため、生体内では、常に適度な量の甲状腺ホルモンが合成されるよう調節されている。

甲状腺ホルモン濃度を調節しているのが、脳の視床下部と下垂体である。中心的な役割を果たしているのが下垂体で、甲状腺ホルモンは下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモン（thyroid stimulating hormone, TSH）によって厳密に調節されている。血中の甲状腺ホルモン量に応じて、増加した場合は、ネガティブフィードバックにより下垂体からのTSHの分泌量が抑制され、甲状腺ホルモンの分泌が減少する。逆に血中の甲状腺ホルモン濃度が低下すると、TSHの分泌量が増加する。また、間脳にある視床下部は、下垂体にTSHの分泌を促すホルモン（thyrotropin-releasing hormone, TRH）を分泌する。TRHも甲状腺ホルモンの量を感じ、間接的に甲状腺ホルモンの合成・分泌に関わっている。血

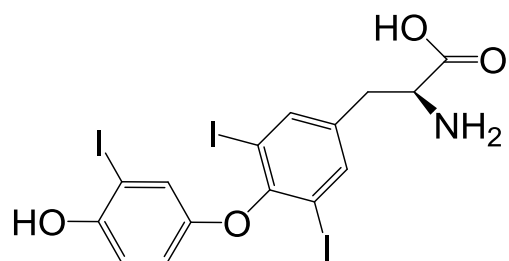
中の甲状腺ホルモン濃度や甲状腺の機能は下垂体及び視床下部が制御することによって、常に維持されるように調節されている。

生体内で甲状腺ホルモン濃度のバランスを保つことは恒常性を維持する上で非常に重要なことである。しかしながら、いくつかの薬剤をはじめとする化合物を投与することで甲状腺肥大や過形成（甲状腺機能亢進）が生じてしまうことが知られている⁷¹⁻⁷⁸⁾。薬剤などの化合物によって直接的あるいは間接的に TSH 量の上昇が引き起こされ、甲状腺ホルモン濃度が増加してしまうことが原因の 1 つであると考えられている。薬剤による TSH 濃度の増加は、①甲状腺への直接作用（薬剤によって直接甲状腺機能が障害される）、②甲状腺ホルモンのクリアランス亢進（薬剤によって血中甲状腺ホルモン量が一時的に減少する）、③中枢性変化（高次中枢で TSH または TRH に影響する）によるものが考えられている⁷⁹⁻⁸¹⁾。特に甲状腺ホルモンのクリアランスが亢進するメカニズムとしては、「薬剤による甲状腺ホルモンの肝代謝酵素の誘導」、「薬剤による肝取り込みトランスポーターの発現量上昇」、「薬剤による血中甲状腺ホルモンの輸送タンパク質との結合変化」が知られている^{80, 82-84)}。甲状腺は今後の創薬開発において安全性面で注意が必要な臓器の 1 つであると考えられる。そこで、本研究では、「薬剤による血中甲状腺ホルモンの輸送タンパク質との結合変化」に着目し、薬剤によって引き起こされる甲状腺毒性を SPR を用いて予測・評価することを検討した。

甲状腺ホルモンは脂溶性が非常に高いため、血中では 99 % がサイロイドホルモン結合タンパク質と呼ばれる輸送タンパク質に多く結合していることが知られている⁸⁵⁾。特に、ヒトでは thyroid binding globulin (TBG)、ラットでは transthyretin (TTR) と呼ばれるタンパク質に多く結合していることがわかっている^{86, 87)}。ヒトでは TTR も存在するが TBG と結合している割合の方が多い (TTR: 20%, TBG: 75%)。また、T4 と TTR/TBG との結合を競合的に阻害する薬剤は、血中の遊離 T4 濃度を上昇させることにより甲状腺機能を亢進させる結果、甲状腺肥大などの毒性を引き起こすと考えられている⁷¹⁻⁷⁸⁾。本研究では、SPR を用いて、薬剤による T4 の TTR/TBG との結合に対する競合阻害能を評価する分析法を構築した。また、TTR と TBG の阻害程度の違いから甲状腺毒性における種差を推測した。



L-Thyroxine (T4)



3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3)

図 19. L-Thyroxine (T4) 及び 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3) の化学構造式

第 1 項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒

本研究で使用した DMSO, 蒸留水及び amine coupling kit は第 1 章 第 1 節 第 1 項 1.1 で記載した試薬及び溶媒を使用した. T4, tetraiodothyroacetic acid, sodium diclofenac, genistein 及び carbamazepine は Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した. Furosemide は東京化成工業株式会社 (東京) から購入した. Ibuprofen, リン酸二水素ナトリウム・2 水和物及びリン酸水素二ナトリウム・12 水和物は和光純薬工業株式会社より購入した. TTR (生物種: ラット) は Uscn Life Science Inc. (Texas, U.S.A.) より, TBG protein (生物種: ヒト) は MyBioSource (San Diego, CA, U.S.A.) より購入した.

1.2 測定装置及び測定条件

SPR を用いた分子間相互作用分析装置は Biacore 3000 を使用し, TTR 及び TBG の固定化用センサーチップには Sensor Chip CM5 を用いた. ランニング緩衝液には, TTR, TBG の固定化及び T4 と TTR, TBG との相互作用評価いずれについても 100 mM NaCl を含んだ 10 mM リン酸緩衝液 (リン酸二水素ナトリウム・2 水和物及びリン酸水素二ナトリウム・12 水和物混合液, pH 8.5, 以下リン酸緩衝液) を使用した. 再生溶液には 50 mM NaOH 溶液を用いた. これらのすべての溶液は用時調製し, 0.22 μm のフィルターでろ過後, 脱気して使用した.

1.3 Transthyretin 及び thyroxine binding globulin の固定化 (アミンカップリング法)

Biacore 3000 にセンサーチップを装着した後, 流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で EDC/NHS 混液を 7 分間注入し, センサーチップ表面を活性化させた. その後, 流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) に溶解させた TTR (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), または 10

mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) に溶解させた TBG (20 $\mu\text{g/ml}$) を 7 分間注入し、それぞれのタンパク質をセンサーチップ上に固定化した。固定化後、流速 5 $\mu\text{L/min}$ で 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5) を 7 分間注入することでセンサーチップ表面のブロッキングを実施した。

1.4 Thyroxine と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用測定

T4 測定溶液は、10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.5) を用い、6 ポイント (0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 μM) の濃度範囲で調製した。また、T4 の溶解度あるいはレスポンス (RU 値) の飽和を考慮して、添加最高濃度を 5.00 μM に設定した。T4 測定溶液は、マストランスリミテーションを避けるために、流速 30 $\mu\text{L/min}$ で 100 秒間 (50 μL) 注入した。注入後、ランニング緩衝液を 30 $\mu\text{L/min}$ で 300 秒間送液した。すべての測定は、25 $^{\circ}\text{C}$ (測定装置内温度) で実施した。解離領域の測定後、TTR 及び TBG 表面から解離せずに残存した T4 を取り除くために 50 mM NaOH を流速 30 $\mu\text{L/min}$ で 5 μL 注入した。以上の一連の操作は、再現性を確認するために 3 回繰り返し実施した。

1.5 薬剤と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用測定

薬剤 (carbamazepine, diclofenac, furosemide, genistein, ibuprofen 及び tetraiodothyroacetic acid) 測定溶液は、10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.5) を用い、8 ポイント (0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μM) の濃度範囲で調製した。また、薬剤の溶解度あるいはレスポンス (RU 値) の飽和を考慮して、添加最高濃度を 20.0 μM に設定した。薬剤測定溶液は、マストランスリミテーションを避けるために、流速 30 $\mu\text{L/min}$ で 100 秒間 (50 μL) 注入した。注入後、ランニング緩衝液を 30 $\mu\text{L/min}$ で 300 秒間送液した。すべての測定は、25 $^{\circ}\text{C}$ (測定装置内温度) で実施した。解離領域の測定後、TTR 及び TBG 表面から解離せずに残存した薬剤を取り除くために 50 mM NaOH を流速 30 $\mu\text{L/min}$ で 5 μL 注入した。

1.6 データ解析

T4-TTR 及び T4-TBG 相互作用測定により得られた 6 濃度のセンサーグラム (0.156-5.00 μM) を用い, BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いてグローバルフィッティングにより結合速度定数 (k_a (1/Ms)), 解離速度定数 (k_d (1/s)) を算出した. T4 と TTR 及び TBG との相互作用評価の解析モデルには, 1:1 Langmuir binding model を採用した^{87, 88)}. また, k_a 及び k_d から解離定数 (K_D (M)) を k_d/k_a として算出した.

1.7 Thyroxine と transthyretin 及び thyroxine binding globulin との結合における薬剤による競合阻害評価

薬剤 (0, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μM) を含んだ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.5) をランニング緩衝液として調製した. また, 2.5 μM T4 及びランニング緩衝液と同濃度の薬剤 (0, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μM) を含む混合液を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.5) を用いて調製し, 測定溶液とした. T4 と TTR 及び TBG との結合における薬剤による競合阻害の強さを評価するため, TTR 及び TBG を固定化したセンサーチップに, 測定溶液を流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 100 秒間 (50 μL) 注入した.

薬剤による競合阻害の強さは, T4 と薬剤を含む測定溶液のレスポンス (RU) の最大値を, 薬剤を含まない測定溶液 (T4 のみを含む) のレスポンス (RU) の最大値で除し, 100 (%) を乗じることでレスポンス (RU) の減少率 (decreasing rate) として算出した ($[\text{decreasing rate}] = [\text{T4 response units}]/[\text{T4 response units without pharmaceutical}] \times 100$). また, レスポンス (RU) の減少率から 50 % 阻害濃度 (50 % inhibitory concentration, IC_{50}) あるいは 80 % 阻害濃度 (80 % inhibitory concentration, IC_{80}) を求め, T4 と TTR 及び TBG との結合における薬剤による競合阻害の強さを評価した.

第2項 結果

2.1 センサーチップへの transthyretin 及び thyroxine binding globulin における固定化の最適化

本研究の SPR を用いた T4 のサイロイドホルモン結合タンパク質への結合における薬剤の競合阻害能評価において、サイロイドホルモン結合タンパク質には TTR 及び TBG の 2 つを用いた。始めに、センサーチップに TTR 及び TBG を固定化するための緩衝液及びリガンド濃度を検討した。固定化の際に用いる緩衝液として、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) を検討した。その結果、TTR を固定化するための緩衝液として 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を、TBG を固定化するための緩衝液として 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) を用いることで、いずれについてもセンサーチップへの固定化に成功した。また、TTR 及び TBG 濃度はそれぞれ 10 µg/mL, 20 µg/mL で安定に固定化できることがわかった。

本条件でセンサーチップ上に固定化した TTR 及び TBG における固定化量の均一性を確認するために、TTR 及び TBG の固定化を異なる日に実施し ($n = 3$)、得られた固定化量 (RU) から、標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (RSD) を算出した (表 9)。TTR 及び TBG の平均固定化量は約 10000 RU で、これらの固定化量の相対標準偏差は 5.6 % (TTR) 及び 6.1 % (TBG) と精度も良好であり、センサーチップ上への TTR 及び TBG における固定化の良好な再現性が確認できた。

表 9. センサーチップへの TTR 及び TBG 固定化量とその繰り返し精度

Ligand type	Response units (RU)		RSD (%) ^b
	Mean ($n = 3$)	SD ^a	
TTR ^c	10450	590	5.6
TBG ^d	10074	609	6.1

^a Standard deviation, ^b Relative standard deviation

^c Transthyretin, ^d Thyroxine binding globulin

2.2 Thyroxine と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用

図 20 には T4 とセンサーチップ上に固定化した TTR 及び TBG との相互作用を測定したセンサーグラムをそれぞれ示した．添加した T4 の増加に伴いセンサーグラムのレスポンスが上昇していることが確認できた．このセンサーグラムから T4 と TTR 及び TBG 間の相互作用が飽和状態に達していないことがわかった．よって本センサーグラムを用いて速度論的解析を実施した．

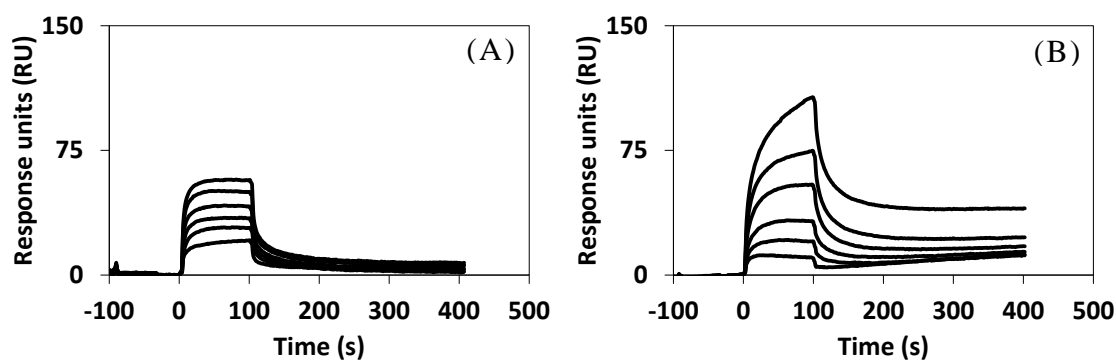


図 20. T4 の TTR (A) 及び TBG (B) との相互作用センサーグラム

T4 濃度 : 0.156-5.00 μM

ランニング緩衝液 : 100 mM NaCl を含んだ 10 mM リン酸緩衝液

表 10 には，図 20 に示した 6 濃度 (0.156-5.00 μM) の T4 における TTR 及び TBG に対する相互作用の結合速度定数，解離速度定数及び解離定数を示した．繰り返し測定 ($n = 3$) により算出した各パラメータの再現性は良好であった．反応速度論的解析の結果，T4 の TTR に対する解離定数は TBG に対する解離定数と同程度であることがわかった．しかし，T4 の TTR に対する k_a 値， k_d 値と TBG に対する k_a 値， k_d 値間には違いがみられた．TTR の k_a 値及び k_d 値は TBG の k_a 値及び k_d 値に比べて約 6 倍高いことがわかった．T4 における TTR からの解離速度は TBG からの解離速度よりも速いことから，T4-TTR 複合体は T4-TBG 複合体に比べて複合体を維持するのが難しいのではないかと考えられる．

表 10. 1:1 Langmuir binding model 解析により得られた T4 (0.156-5.00 μM) の TTR 及び TBG に対する相互作用における速度論的パラメータ及び解離定数

Compound	Ligand type	k_a ($\times 10^3$, 1/Ms)	k_d ($\times 10^{-3}$, 1/s)	K_D ($\times 10^{-7}$, M)
T4	TTR	50.2 \pm 32.2 ^a	15.8 \pm 5.4	3.55 \pm 0.96
	TBG	7.85 \pm 4.04	2.80 \pm 0.99	3.76 \pm 0.55

T4, Thyroxine hormone; TTR, Transthyretin; TBG, Tyroxine binding globulin

^a Mean \pm standard deviation ($n = 3$)

2.3 薬剤と transthyretin 及び thyroxine binding globulin の相互作用

図 21 には 薬剤 とセンサーチップ上に固定化した TTR 及び TBG との相互作用を測定したセンサーグラムをそれぞれ示した。Tetraiodothyroacetic acid は T4 と TTR 及び TBG との結合に対して強い競合阻害能を示すことが知られており⁸⁷⁾、本結果からも TTR 及び TBG に対して強い結合性が確認できた。Tetraiodothyroacetic acid 以外の薬剤の TTR あるいは TBG に対する親和性センサーグラムのレスポンスは、T4 と TTR あるいは TBG に対する親和性センサーグラムのレスポンスと比較して、低いことがわかった。Tetraiodothyroacetic acid 以外の薬剤は、添加濃度域を T4 の添加濃度よりも高くしても（図 20）、T4 を添加した時のレスポンスより低いことから（薬剤濃度：20 μM , T4 濃度：5 μM ）、carbamazepine, diclofenac, furosemide, genistein 及び ibuprofen の TTR 及び TBG に対する結合性は T4 の TTR 及び TBG に対する結合性よりも弱いと考えられる。

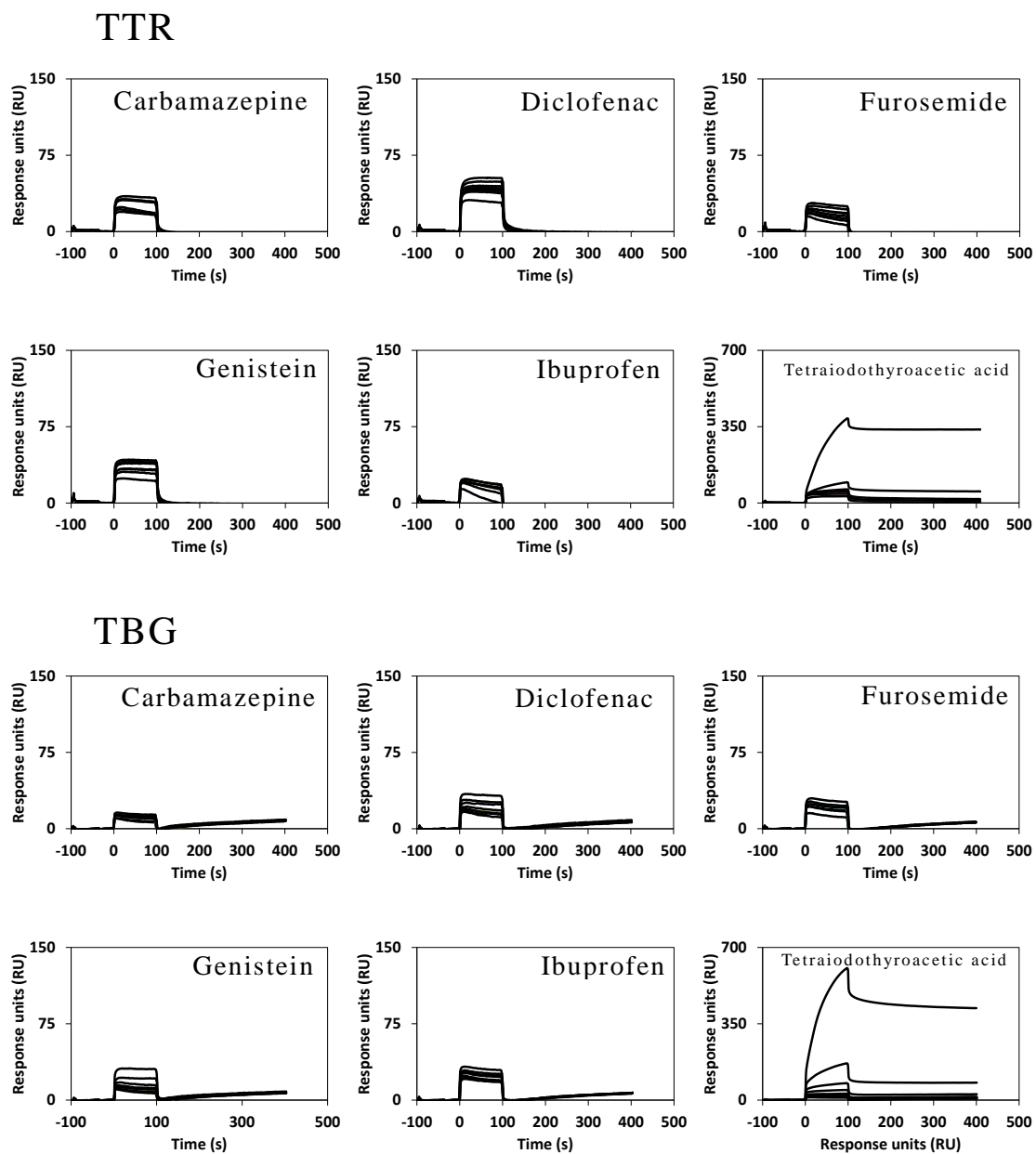


図 21. 薬剤の TTR 及び TBG との相互作用センサーグラム

薬剤濃度 : 0.156-20.0 μM

ランニング緩衝液 : 100 mM NaCl を含んだ 10 mM リン酸緩衝液

2.4 Thyroxine とサイロイドホルモン結合タンパク質との結合における diclofenac による競合阻害能評価

T4 とサイロイドホルモン結合タンパク質との結合における diclofenac による競合阻害能評価を実施した。Murk らは T4 をセンサーチップに固定化し, TTR あるいは TBG と薬剤の混合液を添加することによって競合阻害を評価していた⁸⁷⁾。本研究では, 始めに TTR 及び TBG を固定化したセンサーチップに試料溶液中の終濃度 2.5 μM T4 と 0, 2.50, 5.00, 10.0 μM diclofenac 混合液を添加し, diclofenac 濃度が増加するに従って T4 の TTR 及び TBG に対するセンサーグラムのレスポンス (RU) がどのように変化するか確認した (図 22)。Diclofenac は T4 と TTR との結合を競合的に阻害することが知られている^{71, 78, 87)}。そのため, 添加する diclofenac 濃度が増加するに従って, TTR に存在する T4 の結合部位が占有されるので, T4 の TTR に対するセンサーグラムのレスポンスが低下するのではないかと考えていた。しかしながら, 実際には diclofenac 濃度依存的な, T4 の TTR に対するセンサーグラムのレスポンス変化は見られなかった (TTR に対するレスポンス : 99 RU [0 μM], 99 RU [2.50 μM], 101 RU [5.00 μM], 110 RU [10.0 μM]; TBG に対するレスポンス: 61 RU [0 μM], 51 RU [2.50 μM], 55 RU [5.00 μM], 57 RU [10.0 μM])。このことから, TTR を固定化したセンサーチップに T4, diclofenac 混合液の添加では競合阻害を評価することはできないと判断した。

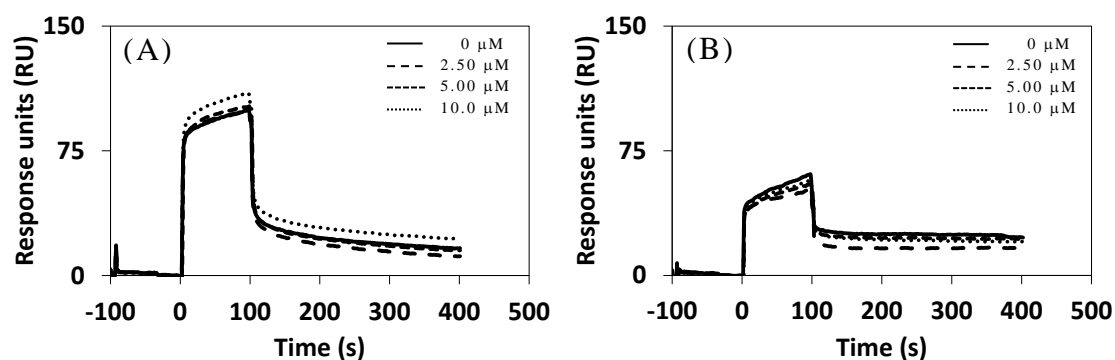


図 22. T4 と diclofenac 混合液の TTR (A) 及び TBG (B) との相互作用センサーグラム

T4 濃度 (試料溶液中の終濃度) : 2.50 μM

Diclofenac 濃度 (試料溶液中の終濃度) : 0, 2.50, 5.00, 10.0 μM

ランニング緩衝液 : 100 mM NaCl を含んだ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.5)

次に、0, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μM diclofenac を含んだリン酸緩衝液をランニング緩衝液として用い、TTR あるいは TBG が固定化されたセンサーチップに T4 (2.5 μM) を添加することによって競合阻害が確認できないか検討した。その結果、ランニング緩衝液に含まれる diclofenac 濃度の増加に伴って、T4 の TTR に対するセンサーグラムのレスポンスが低下することがわかった (図 23)。一方で、T4 の TBG に対する相互作用センサーグラムのレスポンスは、ランニング緩衝液に含まれる diclofenac 濃度が増加しても、同程度であった。この方法は diclofenac と共存した TTR あるいは TBG の条件をつくることによって、diclofenac による T4 と TTR あるいは TBG との結合における競合阻害を模倣していると考えられる。

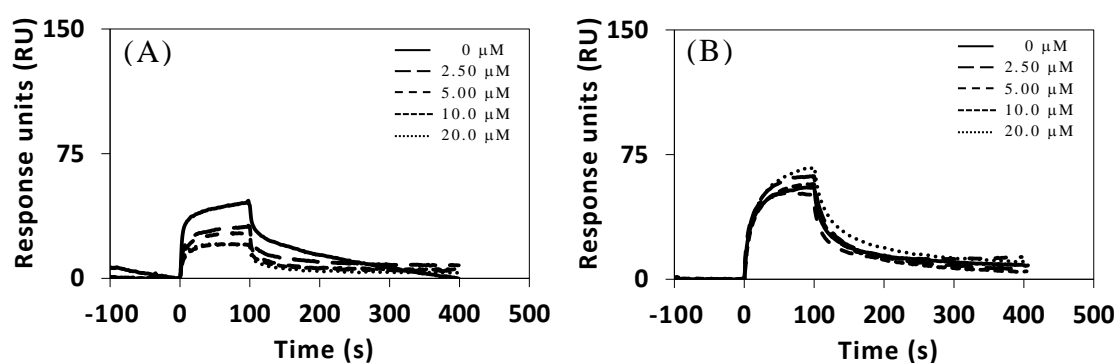


図 23. T4 (+ランニング緩衝液と同濃度の diclofenac) の TTR (A) 及び TBG (B) との相互作用センサーグラム

T4 濃度 (試料溶液中の終濃度) : 2.50 μM

ランニング緩衝液 : 100 mM NaCl 及び diclofenac (0, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μM) を含んだ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.5)

Diclofenac 単独における TTR 及び TBG への親和性結果から (図 21), 5 μM diclofenac 添加における相互作用センサーグラムのレスポンスは約 40 RU (TTR) 及び 20 RU (TBG) であった。また、センサーグラムから diclofenac の TTR 及び TBG との複合体の解離が非常に速いことが確認できた (RU 値が急速に下がっ

ているため)。一方で、5 μM T4 を TTR 及び TBG に添加した時の相互作用センサーグラムのレスポンスは約 60 RU (TTR) 及び 110 RU (TBG) であった (図 20)。Diclofenac に対して、T4 では TTR 及び TBG に対する結合は比較的遅い解離であることが確認できた。つまり、T4 の TTR 及び TBG への親和性は diclofenac の TTR 及び TBG に対する親和性よりも非常に強いということが示唆される。T4 と diclofenac 混合液の TTR との相互作用センサーグラムのレスポンスが、T4 単独と TTR との相互作用センサーグラムのレスポンスと同程度であったのは (図 22)、T4 の TTR に対する親和性が diclofenac の TTR に対する親和性に比べて非常に強いためだと考えられる。Diclofenac を含んだランニング緩衝液を用いることによって、diclofenac 濃度依存的に T4 の TTR に対するセンサーグラムのレスポンスが低下することから (図 23)、T4 の競合阻害を評価するためには、TTR あるいは TBG を diclofenac (薬剤) と常に共存させた条件下におく必要があると考えられる。

図 24 には TTR 及び TBG に対する T4 レスポンスの減少率と diclofenac 濃度との関係を示した。また、diclofenac による TTR 及び TBG に対する T4 レスポンスの減少率 (図 24) から、 IC_{50} を求めた (表 11)。算出した IC_{50} 値の再現性は良好であった ($n = 3$)。TTR に対する diclofenac の IC_{50} 値は $6.4 \pm 3.6 \mu\text{M}$ であった。一方、TBG に対する diclofenac の IC_{50} 値は、diclofenac 濃度の増加 (2.50 - 20 μM) による TBG に対する T4 レスポンスの減少がみられなかったので 20 μM 以上であった。Diclofenac による T4 と TTR との結合における競合阻害の度合いは、T4 と TBG との結合における競合阻害の度合いよりも強いことが知られおり^{71, 87)}、本結果と一致することがわかった。

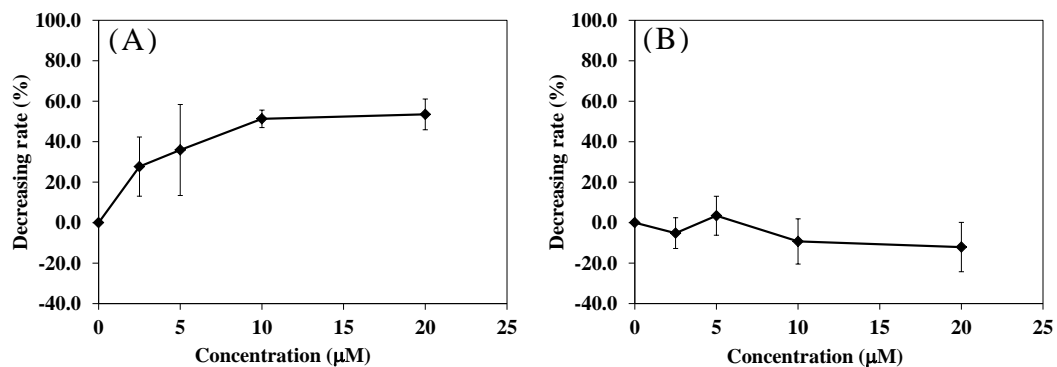


図 24. Diclofenac による TTR (A) 及び TBG (B) に対する T4 レスポンスの減少率 ($n = 3$)

T4 濃度 (試料溶液中の終濃度) : 2.50 μM

ランニング緩衝液 : 100 mM NaCl 及び diclofenac (0, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μM) を含んだ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.5)

減少率 = $\frac{[\text{T4 レスポンス(RU)}]}{[\text{ランニング緩衝液に diclofenac を含まない T4 レスポンス(RU)}]} \times 100$

[T4 レスポンス(RU)] : Diclofenac (2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μM) を含むランニング緩衝液を用いて算出した T4 の TTR あるいは TBG に対する相互作用センサーグラムのレスポンス.

[ランニング緩衝液に diclofenac を含まない T4 レスポンス(RU)] : diclofenac を含まないランニング緩衝液を用いて算出した T4 の TTR あるいは TBG に対する相互作用センサーグラムのレスポンス.

表 11. Diclofenac による 50 % 阻害濃度の算出 ($n = 3$)

Compound	Ligand type	IC ₅₀ (μM) ^a
Diclofenac	TTR	6.4 ± 3.6 ^b
	TBG	>20

TTR, Transthyretin; TBG, Tyroxine binding globulin

^a 50% inhibition concentration

^b Mean ± standard deviation ($n = 3$)

2.5 Thyroxine とサイロイドホルモン結合タンパク質との結合における薬剤による競合阻害能評価

表 12 には TTR 及び TBG に対する tetraiodothyroacetic acid, diclofenac, genistein, ibuprofen, carbamazepine 及び furosemide による T4 レスポンスの減少率から算出した IC₅₀ あるいは IC₈₀ 値を示した。また、表 12 には他の方法から算出した TTR 及び TBG に対する tetraiodothyroacetic acid, diclofenac, genistein, ibuprofen, carbamazepine 及び furosemide における競合阻害能 (relative potency, RP) を記載した。RP 値は、T4 による IC₅₀ と薬剤による IC₅₀ の比から算出され (IC₅₀ (T4)/IC₅₀ (薬剤)), 薬剤による T4 とサイロイドホルモン結合タンパク質との結合における競合阻害の強さを示している。

Tetraiodothyroacetic acid は評価した薬剤の中で、T4 と TTR 及び TBG 両方との結合に対して最も強い競合阻害能を持つ (IC₅₀ < 2.5 μM)。IC₈₀ 値を算出することができ、TTR に対しては 4.0 μM, TBG に対しては 11 μM であった。また、tetraiodothyroacetic acid の T4 と TTR 及び TBG との結合に対する RP 値においても評価した薬剤の中で最も高い値を示していることがわかった^{87, 89, 90}。さらに、tetraiodothyroacetic acid の TTR に対する IC₈₀ 値は TBG に対する IC₈₀ 値よりも小さいことが確認できた。これは、tetraiodothyroacetic acid の TTR に対する RP 値が TBG に対する RP 値よりも高いことと一致した。

表 12. Tetraiodothyroacetic acid, diclofenac, genistein, ibuprofen, carbamazepine 及び furosemide による 50 % (あるいは 80%) 阻害濃度の算出 ($n = 3$)

Ligand type	Compound	IC ₅₀ (μM) ^a	Literature RP ^c
TTR	Tetraiodothyroacetic acid	<2.5 4.0 (IC ₈₀ , μM) ^b	1.1 ⁸⁷⁾ , 11.5 ⁸⁹⁾
	Diclofenac	6.4	0.02 ⁸⁷⁾ , 0.02 ⁷¹⁾
	Genistein	7.9	0.4 ⁸⁷⁾
	Ibuprofen	>20	NC ^{d 87)}
	Carbamazepine	>20	NC ⁸⁷⁾
	Furosemide	>20	NC ⁸⁷⁾ , NC ⁷¹⁾
TBG	Tetraiodothyroacetic acid	<2.5 11 (IC ₈₀ , μM) ^b	0.6 ⁸⁷⁾ , 0.4 ⁹⁰⁾
	Diclofenac	>20	0.01 ⁸⁷⁾ , 0.00039 ⁷¹⁾
	Genistein	>20	NC ⁸⁷⁾
	Ibuprofen	>20	NC ⁸⁷⁾
	Carbamazepine	>20	NC ⁸⁷⁾
	Furosemide	>20	NC ⁸⁷⁾ , 0.0011 ⁷¹⁾

TTR, Transthyretin; TBG, Tyroxine binding globulin

^a 50% inhibition concentration

^b 80% inhibition concentration

^c Relative potency, the reference's number was shown in parentheses

^d Not calculated

Genistein による T4 と TTR との結合に対する IC₅₀ 値は 7.9 μM で, T4 と TBG との結合に対する IC₅₀ 値は 20 μM 以上であった. Genistein 及び diclofenac の T4 と TTR との結合に対する IC₅₀ 値は tetraiodothyroacetic acid よりも高い値を示した. RP 値においても tetraiodothyroacetic acid > genistein, diclofenac と競合阻害能は同じ順列を示すことがわかった.

Ibuprofen, carbamazepine 及び furosemide は T4 と TTR 及び TBG との結合に対して競合阻害しないことが知られている^{71, 87)}。本結果においても T4 と TTR 及び TBG との結合に対する IC₅₀ 値は 20 μM 以上であった。これらのことから、本評価系結果から算出された IC₅₀ 値が 20 μM 以上の薬剤は T4 の競合阻害による甲状腺毒性の危険性が少ないのではないかと考えられる。

本 SPR 評価系を用いることによって、薬剤による T4 と TTR 及び TBG に対する競合阻害能が評価できた。また、T4 と TTR 及び TBG に対する競合阻害の度合いを評価することによって、薬剤による甲状腺毒性能の強弱が予測できるのではないかと示唆される。

第3項 考察

TTR 及び TBG のセンサーチップの固定化及び T4 の TTR あるいは TBG に対する解離定数算出において、良好な再現性が確認できた (図 20, 表 9, 10). また, 薬剤 (tetraiodothyroacetic acid, diclofenac, genistein, ibuprofen, carbamazepine 及び furosemide) による T4 とサイロイドホルモン結合タンパク質 (TTR, TBG) との結合に対する競合阻害能を評価することができた (図 23, 24, 表 11, 12). 本研究では TTR 及び TBG の固定化用センサーチップに Sensor Chip CM5 を用い, アミンカップリング法によって固定化したが, ストレプトアビジンがコートされた Sensor Chip SA を固定化用センサーチップに用いてビオチン化した TTR を固定化した実験も報告されている⁹¹⁾. そこで, 実際に Sensor Chip SA にビオチン化 TTR を固定化し, T4 のビオチン化 TTR に対する親和性を評価した (ビオチン化 TTR の固定化量は 1400 RU 前後を示した). T4 のビオチン化 TTR に対するセンサーグラムのレスポンス (RU) は, Sensor Chip CM5 を用いたアミンカップリング法によって固定化した TTR に対するセンサーグラムのレスポンス (RU) と同程度の値を示した. しかしながら, T4 のビオチン化 TTR に対するセンサーグラムのレスポンス (RU) における再現性は, アミンカップリング法に比べて低かったので, TTR 及び TBG の固定化には Sensor Chip CM5 を用いた, アミンカップリング法を採用した.

T4 の TTR に対する解離定数は $0.003\text{--}1.28 \times 10^{-7}$ M ということが知られている⁹²⁾. 本 SPR 評価系から得られた T4 の TTR に対する解離定数は 3.55×10^{-7} M であり, 近い値が算出されている. また, ラジオイムノアッセイ (^{125}I 標識 T4) を用いて算出した T4 の TBG に対する解離定数は 0.37×10^{-7} M ということが知られており⁹³⁾, 本評価系から得られた T4 の TBG に対する解離定数 (3.76×10^{-7} M) と同程度の値が算出されている.

T4 と TTR あるいは TBG に対する薬剤の競合阻害能を IC_{50} あるいは IC_{80} として求め, 薬剤の競合阻害能の強弱が評価できた. また, 既報の論文から得られた薬剤の阻害活性は SPR における評価結果とほぼ同等であった. 薬剤による T4 とサイロキシン結合タンパク質との結合に対する競合阻害は, TBG よりも TTR の方が起こりやすいという結果が得られた (表 12). T4 の TTR に対する親和性における k_d 値は, T4 の TBG に対する親和性における k_d 値よりも高いこと

がわかっており (表 10), T4-TTR 複合体を維持しにくいことが, 薬剤の T4 と TTR との結合に対する競合阻害が T4 と TBG との結合に対する競合阻害よりも起こりやすい原因の一つなのかもしれない. また, 本結果からラットでは genistein 及び diclofenac によって T4 と TTR との結合が阻害され血中の T4 クリアランスの亢進が引き起こされると予想されるが, ヒトでは T4 は主に TBG と結合するため, genistein 及び diclofenac による血中の T4 クリアランスの亢進は引き起こされないのではないかと考えられる.

本 SPR 評価系は TTR と TBG の阻害程度の違いから甲状腺毒性における種差を推測できるほか, 薬剤の甲状腺毒性を予測できる評価系として幅広く応用できることが期待される.

第 4 項 小括

SPR を用いて, TTR 及び TBG のセンサーチップの固定化及び T4 の TTR あるいは TBG に対する解離定数算出において, 良好な再現性が確認できた. また, 薬剤 (tetraiodothyroacetic acid, diclofenac, genistein, ibuprofen, carbamazepine 及び furosemide) による T4 とサイロイドホルモン結合タンパク質 (TTR, TBG) との結合に対する競合阻害能を評価する分析法を構築することができた. さらに SPR を用いて, T4 と TTR あるいは TBG に対する薬剤の競合阻害能を IC_{50} あるいは IC_{80} として求め, 薬剤の競合阻害能の強弱が評価できた. また, 既報の論文から得られた薬剤の阻害活性能は SPR における評価結果とほぼ同等であった. 本 SPR 評価系は TTR と TBG の阻害程度の違いから甲状腺毒性における種差を推測できるほか, 薬剤の甲状腺毒性を予測できる評価系として幅広く応用できることが期待される.

総括

SPR を利用した分子間相互作用解析装置を用いて、抗菌薬の lipid II への結合特性評価を目的に、vancomycin とその類似化合物の lipid II 末端ジペプチドリガンド類 (D-alanyl-D-alanine や D-alanyl-D-lactate など) に対する親和性評価系を構築した。また、teicoplanin, erythromycin 及び linezolid の lipid II 末端ジペプチドリガンド類への親和性並びに結合選択性を評価し、以下の知見を得た。

- 1) Vancomycin の lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する結合選択性を評価した結果、D-alanyl-D-alanine リガンドに選択的な結合を示した。
- 2) Lipid II 末端ジペプチドリガンド類のセンサーチップへの固定化及び評価した抗菌化合物の lipid II に対する結合定数算出において、良好な再現性を確認できた。
- 3) Vancomycin モノマーの結合定数と MIC 値を比較したところ、ほぼ符合する結果が得られることがわかった。
- 4) Teicoplanin, erythromycin 及び linezolid のジペプチドリガンド類への親和性を評価した結果、teicoplanin のみが D-alanyl-D-alanine 及び D-alanyl-D-lactate リガンドに選択的な結合を示し、本 SPR 評価法では抗菌薬が有する薬効メカニズムに基づきリガンドに親和性を示していることが認められた。

抗菌薬の脂質膜への結合特性評価を目的に、vancomycin 及びその類似化合物、teicoplanin, erythromycin 並びに linezolid のモデル脂質膜（哺乳動物細胞膜、グラム陽性及び陰性菌細胞膜）に対する親和性を評価した。得られた知見を以下に示す。

- 1) Vancomycin, teicoplanin, erythromycin 及び linezolid は脂質膜を標的とし

た抗菌薬ではなく、いずれのモデル脂質膜に対しても親和性を示さなかったことから、本 SPR 測定法の抗菌薬に対する脂質膜親和選択性が確認できた。

- 2) モデル脂質膜への親和性が認められた Van-M-02, ΔN-Van-M-02 及び Dimer 1 のモデル脂質膜に対する親和定数算出において、良好な再現性を確認できた。
- 3) Van-M-02, ΔN-Van-M-02 及び Dimer 1 において、SPR によるモデル脂質膜に対する親和性結果と MIC 値から、これらの化合物の特徴を考察することができた。

Daptomycin の細菌細胞膜結合特性評価を目的に、daptomycin のモデル脂質膜（哺乳動物細胞膜、グラム陽性及び陰性菌細胞膜）に対する親和性評価系を構築した。また、daptomycin の脂質膜への結合選択性などを検討し、以下の知見を得た。

- 1) Daptomycin のモデル脂質膜選択性を評価した結果、哺乳動物細胞膜及びグラム陰性菌細胞膜に比べ、グラム陽性菌細胞膜に対して非常に強い親和性を示した。
- 2) Daptomycin のグラム陽性菌細胞膜への親和性はカルシウム濃度依存的であり、カルシウム存在下でのみ、脂質膜への結合が認められた。
- 3) モデル脂質膜のセンサーチップへの固定化及び daptomycin のグラム陽性菌細胞膜に対する親和定数算出において、良好な再現性を確認できた。

薬剤における甲状腺毒性の予測評価を目的に、薬剤による T4 の TTR/TBG との結合に対する競合阻害能を評価する分析法を構築した。得られた知見を以下に示す。

- 1) TTR あるいは TBG のセンサーチップへの固定化及び T4 の TTR あるいは TBG に対する解離定数算出において、良好な再現性が確認できた。
- 2) T4 の TTR あるいは TBG への結合に対する、薬剤の競合阻害能を IC_{50} あるいは IC_{80} として求め、その強弱を定量的に評価できた。また、既報の論文から得られた薬剤の阻害活性能は SPR における評価結果とほぼ同等であった。
- 3) 本 SPR 評価系は TTR と TBG の阻害程度の違いから甲状腺毒性における種差を推測できるほか、薬剤の甲状腺毒性を予測できる評価系として幅広く応用できることが期待される。

本研究では、SPR 技術を用いて薬剤の標的細菌あるいは結合タンパク質への結合特性を評価することができた。本 SPR 評価系は他の薬剤に対する結合選択性、薬効メカニズム及び毒性に関わる評価などにも幅広く応用できることが期待される。SPR 法は分子間相互作用における結合速度定数及び解離速度定数を短時間で算出でき、しかも少量の試料で高感度に親和性評価を実施できることが他の技術と比較して大きな利点であるといえる。正確で安定した *in vitro* 評価系を用いて、薬剤の薬効や毒性に関する情報及び種差の影響などを予測することができれば、薬剤の上市までの成功確率を向上させることができ、薬剤が患者に渡るまでの期間を短縮させることができる。より発展的な薬剤の評価系を構築することが、多くの患者を救うことにつながると期待している。

参考文献

- 1) Bade G., Khan MA., Srivastava AK., Khare P., Solaiappan KK., Guleria R., Palaniyar N., Talwar A. 2014 Serum cytokine profiling and enrichment analysis reveal the involvement of immunological and inflammatory pathways in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 9: 759 – 773.
- 2) Thapa D., Meng P., Bedolla RG., Reddick RL., Kumar AP., Ghosh R. 2014 NQO1 suppresses NF- κ B-p300 interaction to regulate inflammatory mediators associated with prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 74: 5644 – 5655.
- 3) Fuchigami T., Kibe T., Koyama H., Kishida S., Iijima M., Nishizawa Y., Hijioka H., Fujii T., Ueda M., Nakamura N., Kiyono T., Kishida M. 2014 Regulation of IL-6 and IL-8 production by reciprocal cell-to-cell interactions between tumor cells and stromal fibroblasts through IL-1 α in ameloblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451: 491 – 496.
- 4) Cheng F., Lienlaf M., Wang HW., Perez-Villarreal P., Lee C., Woan K., Rock-Klotz J., Sahakian E., Woods D., Pinilla-Ibarz J., Kalin J., Tao J., Hancock W., Kozikowski A., Seto E., Villagra A., Sotomayor EM. 2014 A novel role for histone deacetylase 6 in the regulation of the tolerogenic STAT3/IL-10 pathway in APCs. *J. Immunol.* 193: 2850 – 2862.
- 5) Bdeir K., Cane W., Canziani G., Chaiken I., Weisel J., Koschinsky ML., Lawn RM., Bannerman PG., Sachais BS., Kuo A., Hancock MA., Tomaszewski J., Raghunath PN., Ganz T., Higazi AA., Cines DB. 1999 Defensin promotes the binding of lipoprotein (a) to vascular matrix. *Blood* 94: 2007 – 2019.
- 6) Ozawa M. 2003 How do cells control the cadherin-mediated cell adhesion? *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 48: 1673 – 1682.
- 7) Theocharis AD., Skandalis SS., Gialeli C., Karamanos NK. 2016 Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97: 4 – 27.
- 8) 橋本せつ子, 森本香織. 2009 Biacore を用いた相互作用解析実験法. シュプリンガー・ジャパン (株).
- 9) 永田和宏, 半田宏. 1998 生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法 : BIACORE を中心に. シュプリンガー・フェアラーク東京
- 10) GE Healthcare. 2016 Biacore ライフサイエンス . GE Healthcare Homepage (<https://www.biacore.com/jp/lifesciences/index.html>) (2016 年 11 月現在)
- 11) Kinouchi H., Arimoto H., Nishiguchi K., Oka M., Maki H., Kitagawa H., Kamimori H. 2014 Binding properties of antimicrobial agents to dipeptide terminal of lipid II using surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 452: 67 – 75.
- 12) Kinouchi H., Arimoto H., Nishiguchi K., Oka M., Maki H., Kitagawa H., Kamimori H. 2014 Binding properties of antimicrobial agents to lipid membranes using surface plasmon

resonance. *Biol. Pharm. Bull.* 37: 1383 – 1389.

- 13) Kinouchi H., Onishi M., Kamimori H. 2013 Lipid membrane-binding properties of daptomycin using surface plasmon resonance. *Anal. Sci.* 29: 297 – 301.
- 14) Kinouchi H., Matsuyama K., Kitagawa H., Kamimori H. 2016 Surface plasmon resonance assay of inhibition by pharmaceuticals for thyroxine hormone binding to transport proteins. *Anal. Biochem.* 492: 43 – 48.
- 15) Mainardi JL., Villet R., Bugg TD., Mayer C., Arthur M. 2008 Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 32: 386 – 408.
- 16) Walsh C. 1999 Deconstructing vancomycin. *Science* 284: 442 – 443.
- 17) Higgins DL., Chang R., Debatov DV., Leung J., Wu T., Krause KM., Sandvik E., Hubbard JM., Kaniga K., Schmidt Jr. DE., Gao Q., Cass RT., Karr DE., Benton BM., Humphrey PP. 2005 Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49: 1127 – 1134.
- 18) Bugg TDH., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P., Walsh CT. 1991 Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-Alanine:D-Alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry* 30: 2017 – 2021.
- 19) Koteva K., Hong HJ., Wang XD., Nazi I., Hughes D., Naldrett MJ., Buttner MJ., Wright GD. 2010 A vancomycin photoprobe identifies the histidine kinase VanSsc as a vancomycin receptor. *Nat. Chem. Biol.* 6: 327 – 329.
- 20) Sakoulas G., Gold HS., Cohen RA., Venkataraman L., Moellering RC., Eliopoulos GM. 2006 Early use of daptomycin versus vancomycin for methicillin-resistant *staphylococcus aureus* bacteremia with vancomycin minimum inhibitory concentration >1 mg/L: a matched cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 699 – 704.
- 21) Xing B., Jiang T., Bi W., Yang Y., Li L., Ma M., Chang CK., Xu B., Yeow EKL. 2011 Multifunctional divalent vancomycin: the fluorescent imaging and photodynamic antimicrobial properties for drug resistant bacteria. *Chem. Commun.* 47: 1601 – 1603.
- 22) Xing B., Yu CW., Ho PL., Chow KH., Cheung T., Gu H., Cai Z., Xu B. 2003 Multivalent antibiotics via metal complexes: potent divalent vancomycins against vancomycin-resistant enterococci. *J. Med. Chem.* 46: 4904 – 4909.
- 23) Miura K., Yamashiro H., Uotani K., Kojima S., Yutsudo T., Lu J., Yoshida O., Yamano Y., Maki H., Arimoto H. 2010 Mode of action of Van-M-02, a novel glycopeptide inhibitor of peptidoglycan Synthesis, in vancomycin-resistant bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54: 960 – 962.
- 24) Nakamura J., Yamashiro H., Hayashi S., Yamamoto M., Miura K., Xu S., Doi T., Maki H.,

- Yoshida O., Arimoto H. 2012 Elucidation of the active conformation of vancomycin dimers with antibacterial activity against vancomycin-resistant Bacteria. *Chem. Eur. J.* 18: 12681-12689
- 25) Lu J., Yoshida O., Hayashi S., Arimoto H. 2007 Synthesis of rigidly-linked vancomycin dimers and their in vivo efficacy against resistant bacteria. *Chem. Commun.* 251 – 253.
 - 26) Yoshida O., Nakamura J., Yamashiro H., Miura K., Hayashi S., Umetsu K., Xu S., Maki H., Arimoto H. 2011 New insight into the mode of action of vancomycin dimers in bacterial cell wall synthesis. *Med. Chem. Commun.* 2: 278 – 282.
 - 27) Kim SJ., Tanaka KSE., Dietrich E., Far AR., Schaefer J. 2013 Locations of the hydrophobic side chains of lipoglycopeptides bound to the peptidoglycan of *staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 52: 3405 – 3414.
 - 28) Murray KP., Zhao JJ., Davis SL., Kullar R., Kaye KS., Lephart P., Rybak MJ. 2013 Early use of daptomycin versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia with vancomycin minimum inhibitory concentration >1 mg/L: a matched cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 56: 1562 – 1569.
 - 29) Eliopoulos GM., Willey S., Reiszner E., Spitzer PG., Caputo G., Moellering Jr. RC. 1986 In vitro and in vivo activity of LY 146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 532 – 535.
 - 30) Jones RN., Barry AL. 1987 Antimicrobial activity and spectrum of LY146032, a lipopeptide antibiotic, including susceptibility testing recommendations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31: 625 – 629.
 - 31) Lakey JH., Ptak M. 1988 Fluorescence indicates a calcium-dependent interaction between the lipopeptide antibiotic LY146032 and phospholipid membranes. *Biochemistry* 27: 4639 – 4645.
 - 32) Silverman JA., Oliver N., Andrew T., Li T. 2001 Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1799 – 1802.
 - 33) Silverman JA., Perlmutter NG., Shapiro HM. 2003 Correlation of Daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 2538 – 2544.
 - 34) Straus SK., Hancock REW. 2006 Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1215 – 1223.
 - 35) Robbel L., Marahiel MA. 2010 Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J. Biol. Chem.* 285: 27501 – 27508.
 - 36) Laganas V., Alder J., Silverman JA. 2003 In vitro bactericidal activities of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* are not mediated by inhibition of

- lipoteichoic acid biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2682 – 2684.
- 37) Nakama Y., Yoshida O., Yoda M., Araki K., Sawada Y., Nakamura J., Xu S., Miura K., Maki H., Arimoto H. 2010 Discovery of a novel series of semisynthetic vancomycin derivatives effective against vancomycin-resistant bacteria. *J. Med. Chem.* 53: 2528 – 2533.
 - 38) Oddie GW., Gruen LC., Odgers GA., King LG., Kortt AA. 1997 Identification and minimization of nonideal binding effects in BIAcore analysis: Ferritin/anti-ferritin Fab' interaction as a model system. *Anal. Biochem.* 244: 301 – 311.
 - 39) Kortt AA., Gruen LC., Oddie GW. 1997 Influence of mass transfer and surface ligand heterogeneity on quantitative BIAcore binding data. Analysis of the interaction of NC10 Fab with an anti-idiotypic Fab'. *J. Mol. Recognit.* 10: 148 – 158.
 - 40) Tseng MC., Chang YP., Chu YH. 2007 Quantitative measurements of vancomycin binding to self-assembled peptide monolayers on chips by quartz crystal microbalance. *Anal. Biochem.* 371: 1 – 9.
 - 41) Leclercq R., Courvalin P. 1997 Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clinical Infectious Diseases* 24: 545 – 556.
 - 42) Song JH., Ko KS., Suh JY., Oh WS., Kang CI., Chung DR., Peck KR., Lee NY., Lee WG. 2008 Clinical implications of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) with VanD phenotype and vanA genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 838 – 844.
 - 43) Tsiodras S., Gold HS., Sakoulas G., Eliopoulos GM., Wennersten C., Venkataraman L., Moellering Jr. RC., Ferraro MJ. 2001 Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 358: 207-208.
 - 44) Weisblum B. 1995 Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 577 – 585.
 - 45) McCallum N., Meier PS., Heusser R., Berger-Bächi B. 2011 Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55: 1391 – 1402.
 - 46) Billot-Klein D., Gutmann L., Sablé S., Guittet E., van Heijenoort J. 1994 Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.* 176: 2398 – 2405.
 - 47) Takakusagi Y., Kobayashi S., Sugawara F. 2005 Camptothecin binds to a synthetic peptide identified by a T7 phage display screen. *Bioorg. Med. Chem. Let.* 15: 4850 – 4853.
 - 48) Tseng MC., Chu YH. 2005 Using surface plasmon resonance to directly identify molecules in a tripeptide library that bind tightly to a vancomycin chip. *Anal. Biochem.* 336: 172 – 177.
 - 49) Nakamura J., Yamashiro H., Miya H., Nishiguchi K., Maki H., Arimoto H. 2013

- Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 2 can use depsi-lipid II derived from vancomycin-resistant strains for cell wall synthesis. *Chem. Eur. J.* 19: 12104 – 12112.
- 50) Jain RK., Trias J., Ellman JA. 2003 D-Ala-D-Lac binding is not required for the high activity of vancomycin dimers against vancomycin resistant enterococci. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 8740 – 8741.
 - 51) Griffin JH., Linsell MS., Nodwell MB., Chen Q., Pace JL., Quast KL., Krause KM., Farrington L., Wu TX., Higgins DL., Jenkins TE., Christensen BG., Judice JK. 2003 Multivalent drug design. Synthesis and in vitro analysis of an array of vancomycin dimers. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 6517 – 6531.
 - 52) Kamimori H., Hall K., Craik DJ., Aguilar MI. 2005 Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 337: 149 – 153.
 - 53) Kamimori H., Blazyk J., Aguilar MI. 2005 Lipid membrane-binding properties of tryptophan analogues of linear amphipathic β -sheet cationic antimicrobial peptides using surface plasmon resonance. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 148 – 150.
 - 54) Onishi M., Kamimori H. 2013 High-throughput and sensitive assay for amphotericin B interaction with lipid membrane on the model membrane systems by surface plasmon resonance. *Biol. Pharm. Bull.* 36: 658 – 663.
 - 55) Oka M., Kamimori H. 2013 Lipid membrane-binding properties of amphotericin B deoxycholate (fungizone) using surface plasmon resonance. *Anal. Sci.* 29: 697 – 702.
 - 56) Karlsson R., Falt A. 1997 Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J. Immunol. Methods* 200: 121 – 133.
 - 57) Morton TA., Myszka DG., Chaiken IM. 1995 Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Anal. Biochem.* 227: 176 – 185.
 - 58) Mozsolits H., Wirth HJ., Werkmeister J., Aguilar MI. 2001 Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1512: 64 – 76.
 - 59) Lee TH., Mozsolits H., Aguilar MI. 2001 Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors. *J. Peptide Res.* 58: 464 – 476.
 - 60) Mozsolits H., Lee TH., Clayton AHA., Sawyer WH., Aguilar MI. 2004 The membrane-binding properties of a class A amphipathic peptide. *Eur. Biophys. J.* 33: 98 – 108.
 - 61) Mozsolits H., Unabia S., Ahmad A., Morton CJ., Thomas WG., Aguilar MI. 2002

Electrostatic and hydrophobic forces tether the proximal region of the angiotensin II receptor (AT1A) carboxyl terminus to anionic lipids. *Biochemistry* 41: 7830 – 7840.

- 62) Epand RF., Savage PB., Epand RM. 2007 Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 2500 – 2509.
- 63) Kamimori H., Unabia S., Thomas WG., Aguilar MI. 2005 Evaluation of the membrane-binding properties of the proximal region of the angiotensin II receptor (AT1A) carboxyl terminus by surface plasmon resonance. *Anal. Sci.* 25: 171 – 174.
- 64) Lerch M., Kamimori H., Folkers G., Aguilar MI., Beck-Sickinger AG., Zerbe O. 2005 Strongly altered receptor binding properties in PP and NPY chimeras are accompanied by changes in structure and membrane binding. *Biochemistry* 44: 9255 – 9264.
- 65) 岡雅子 2013 神戸薬科大学大学院博士論文
- 66) Jung D., Rozek A., Okon M., Hancock REW. 2004 Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem. Biol.* 11: 949 – 957.
- 67) Jung D., Powers JP., Straus SK., Hancock REW. 2008 Lipid-specific binding of the calcium-dependent antibiotic daptomycin leads to changes in lipid polymorphism of model membranes. *Chem. Phys. Lipids* 154: 120 – 128.
- 68) Elnakish MT., Schultz EJ., Gearing RL., Saad NS., Rastogi N., Ahmed AAE., Mohler PJ., Janssen PML. 2015 Differential involvement of various sources of reactive oxygen species in thyroxine-induced hemodynamic changes and contractile dysfunction of the heart and diaphragm muscles. *Free Radic. Biol. Med.* 83: 252 – 261.
- 69) Kahl S., Elsasser TH., Rhoads RP., Collier RJ., Baumgar LH. 2015 Environmental heat stress modulates thyroid status and its response to repeated endotoxin challenge in steers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 52: 43 – 50.
- 70) Andersen S., Pedersen KM., Bruun NH., Laurberg P. 2002 Narrow individual variations in serum T(4) and T(3) in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 1068 – 1072.
- 71) Munro SL., Lim CF., Hall JG., Barlow JW., Craik DJ., Topliss DJ., Stockigt JR. 1989 Drug competition for thyroxine binding to transthyretin (prealbumin): comparison with effects on thyroxine-binding globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68: 1141 – 1147.
- 72) Kato Y., Ikushiro S., Takiguchi R., Haraguchi K., Koga N., Uchida S., Sakaki T., Yamada S., Kanno J., Degawa M. 2007 A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats. *Drug Metab. Dispos.* 35: 1949 – 1955.
- 73) Johnson S., McKillop D., Miller J., Smith IK. 1993 The effects on rat thyroid function of an hepatic microsomal enzyme inducer. *Hum. Exp. Toxicol.* 12: 153 – 158.
- 74) Wu KM., Farrelly JG. 2006 Preclinical development of new drugs that enhance thyroid

hormone metabolism and clearance: inadequacy of using rats as an animal model for predicting human risks in an IND and NDA. *Am. J. Ther.* 13: 141 – 144.

- 75) McClain RM., Posch RC., Bosakowski T., Armstrong JM. 1988 Studies on the mode of action for thyroid gland tumor promotion in rats by phenobarbital. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 94: 254 – 265.
- 76) McClain RM. 1989 The significance of hepatic microsomal enzyme induction and altered thyroid function in rats: implications for thyroid gland neoplasia. *Toxicol. Pathol.* 17: 294 – 306.
- 77) Hosokawa S., Nakamura J., Murakami M., Ineyama M., Watanabe T., Yoshioka K., Yamada T., Seki T., Okuno Y., Yamada H. 1992 Effects of diethofencarb on thyroid function and hepatic UDP-glucuronyltransferase activity in rats. *J. Toxicol. Sci.* 17: 155 – 166.
- 78) Karami-Tehrani F., Salami S., Mokarram P. 2001 Competition of tamoxifen with thyroxine for TBG binding : ligand binding assay and computational data. *Clin. Biochem.* 34: 603 – 606
- 79) Collins WT., Capen CC. 1980 Ultrastructural and functional alterations of the rat thyroid gland produced by polychlorinated biphenyls compared with iodide excess and deficiency, and thyrotropin and thyroxine administration. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 33: 213 – 231.
- 80) Schuur AG., Boekhorst FM., Brouwer A., Visser TJ. 1997 Extrathyroidal effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thyroid hormone turnover in male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology* 138: 3727 – 3734.
- 81) Rosene ML., Wittmann G., Drigo RA., Singru PS., Lechan RM., Bianco AC. 2010 Inhibition of the type 2 iodothyronine deiodinase underlies the elevated plasma TSH associated with amiodarone treatment. *Endocrinology* 151: 5961 – 5970.
- 82) Birgelen AP., Smit EA., Kampen IM., Groeneveld CN., Fase KM., Kolk J., Poiger H., Berg M., Koeman JH., Brouwer A. 1995 Subchronic effects of 2,3,7,8-TCDD or PCBs on thyroid hormone metabolism: use in risk assessment. *Eur. J. Pharmacol.* 293: 77 – 85.
- 83) Friesema ECH., Ganguly S., Abdalla A., Fox JEM., Halestrap AP., Visser TJ. 2003 Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* 278: 40128 – 40135.
- 84) Kato Y., Ikushiro S., Takiguchi R., Haraguchi K., Koga N., Uchida S., Sakaki T., Yamada S., Kanno J., Degawa M. 2007 A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats. *Drug Metab. Dispos.* 35: 1949 – 1955.
- 85) Schussler GC. 2000 The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 10: 141 – 149.
- 86) Köhrle J., Fang SL., Yang Y., Irmischer K., Hesch RD., Pino S., Alex S., Braverman LE. 1989 Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat. *Endocrinology* 125: 532 – 537.

- 87) Marchesini GR., Meimaridou A., Haasnoot W., Meulenberg E., Albertus F, Mizuguchi M., Takeuchi M., Irth H., Murk AJ. 2008 Biosensor discovery of thyroxine transport disrupting chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232: 150 – 160.
- 88) Sterling K., Hamada S., Takemura Y., Brenner MA., Newman ES., Inada M. 1971 Preparation and properties of thyroxine-binding alpha globulin (TBG). *J. Clin. Invest.* 50: 1758 – 1771.
- 89) Rickenbacher U., McKinney JD., Oatley SJ., Blake CC. 1986 Structurally specific binding of halogenated biphenyls to thyroxine transport protein. *J. Med. Chem.* 29: 641 – 648.
- 90) Hao YL., Tabachnick M. 1971 Thyroxine-protein interactions. VII. Effect of thyroxine analogs on the binding of 125-I-thyroxine to highly purified human thyroxine-binding globulin. *Endocrinology* 88: 81 – 92.
- 91) Sharif O., Hu H., Klock H., Hampton EN., Nigoghossian E., Knuth MW., Matzen J., Anderson P., Trager R., Uno T., Glynn RJ., Azarian SM., Caldwell JS., Brinker A. 2009 Time-resolved fluorescence resonance energy transfer and surface plasmon resonance-based assays for retinoid and transthyretin binding to retinol-binding protein 4. *Anal. Biochem.* 392: 162 – 168.
- 92) Chang L., Munro SL., Richardson SJ., Schreiber G. 1999 Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals. *Eur. J. Biochem.* 259: 534 – 542.
- 93) Nonneman D., Rohrer GA., Wise TH., Lunstra DD., Ford JJ. 2005 A variant of porcine thyroxine-binding globulin has reduced affinity for thyroxine and is associated with testis size. *Biol. Reprod.* 72: 214 – 220.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えていただき，終始御懇篤な御指導，御鞭撻を賜りました本学生化学講座 北川裕之教授に深謝致します．

本研究論文の審査にあたり有益な御指導，数々の貴重な御助言を賜りました本学生命分析化学講座 小林典裕教授，薬剤学講座 岩川精吾教授，薬品物理化学講座 向高弘教授に心より感謝致します．

また，本研究の遂行に際し，様々な御力添えを頂きました塩野義製薬株式会社 上森浩博士，岡雅子博士，巻秀樹博士，西口賢三博士，松山恵吾修士，東北大学大学院 有本博一教授，本学生化学講座 三上雅久講師，灘中里美講師に厚く御礼申し上げます．

最後に，長きにわたり物心両面で支えてくれた家族，友人に心より感謝いたします．