

キノウチ ヒロキ

氏名(本籍)	木内 啓貴 (徳島県)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博第 35 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 9 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	主 査 教 授 小林 典裕 副 査 教 授 岩川 精吾 副 査 教 授 北川 裕之 副 査 教 授 向 高弘

## 論文内容の要旨

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. 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<sup>1,2)</sup>. 本研究では, 表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance, SPR) 法を用いて, 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) に対する親和性評価系を構築した<sup>3)</sup>. 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<sup>3)</sup>. また, 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<sup>4)</sup>. さらに, 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<sup>5)</sup>. 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. また, 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<sup>6)</sup>. 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.

### 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

Vancomycin とその類似化合物 (Van-M-02, ΔN-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2) 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) 及び脂質膜 (POPC, POPG, POPG/CL (1:1, モル比), POPE/POPG (4:1, モル比)) に対する親和性

評価を実施した。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、POPC は哺乳動物細胞膜モデル、POPG 及び 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<sup>7,8)</sup>。表 1 には vancomycin, Van-M-02, ΔN-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 の lipid II 末端ジペプチドリガンド類に対する、結合速度定数 ( $k_a$ ; 1/Ms), 解離速度定数 ( $k_d$ ; 1/s), 結合定数 ( $K_A$ ; 1/M) 及び vancomycin 感受性菌 (*S. aureus*, RN4220), vancomycin 耐性菌 (*E. faecium*, SR7940 及び *E. faecium*, SR23598) の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) を示した。表 2 には vancomycin, Van-M-02, ΔN-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 のモデル脂質膜に対する、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。Vancomycin, Van-M-02 及び ΔN-Van-M-02 の *S. aureus* RN4220 に対する MIC はそれぞれ 1, 0.125 及び 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であることがわかっている<sup>9)</sup>。MIC による抗菌活性の順は Van-M-02 > vancomycin > ΔN-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 ΔN-Van-M-02 の  $K_A$  値の順と相関していた。また、vancomycin 耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE) である *E. faecium* SR7940 及び *E. faecium* SR23598 に対する vancomycin の MIC は両方とも 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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<sup>9)</sup>。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が報告されている (MIC = 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>9)</sup>。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。さらに、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。また、ΔN-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が報告されている (MIC = 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>9)</sup>。しかしながら、SPR 結果からは ΔN-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。ΔN-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 感受性菌及び耐性菌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。Vancomycin ダイマーである 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 Van-M-02 及び ΔN-Van-M-02 よりも強い親和性を示した。また、Dimer 1 はすべてのモデル脂質膜に対して、Van-M-02 及び ΔN-Van-M-02 よりも大きな親和定数を示した。Dimer 1 は非特異的な結合力が Van-M-02 及び ΔN-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よるものと考えられる。

表 1. 1:1 Langmuir binding model 解析により得られた vancomycin, Van-M-02, ΔN-Van-M-02, Dimer 1 及び Dimer 2 (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 vancomycin, Van-M-02, ΔN-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 (μg/ml) <sup>f</sup>		
					<i>S. aureus</i> , RN4220	<i>E. faecium</i> , SR7940	<i>E. faecium</i> , SR23598
Vancomycin	Control	NC <sup>d</sup>	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala <sup>a</sup>	146±7 <sup>e</sup>	19.3±0.7	7.58±0.28	1	> 64	> 64
	L-Ala-L-Ala <sup>b</sup>	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac <sup>c</sup>	NC	NC	NC			
Van-M-02	Control	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala	36.6±1.0	1.12±0.04	32.7±2.2	0.125	1	0.25
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac	5.27±0.74	10.5±0.1	0.495±0.080			
ΔN-Van-M-02	Control	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala	0.0518±0.0071	1.74±0.02	0.0294±0.0037	2	8	2
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac	NC	NC	NC			
Dimer 1	Control	5.03±3.04	7.08±2.85	0.658±0.159			
	D-Ala-D-Ala	71.4±3.6	1.20±0.03	59.2±4.6	1	8	2
	L-Ala-L-Ala	6.09±1.26	6.25±1.19	0.971±0.047			
	D-Ala-D-Lac	59.9±2.4	1.33±0.06	45.0±3.2			
Dimer 2	Control	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Ala	361±4	0.693±0.015	521±6	2	8	1
	L-Ala-L-Ala	NC	NC	NC			
	D-Ala-D-Lac	255±7	1.15±0.06	221±10			

<sup>a</sup> D-Alanyl-D-alanine, <sup>b</sup> L-Alanyl-L-alanine, <sup>c</sup> D-Alanyl-D-lactate, <sup>d</sup> Not calculated, <sup>e</sup> Mean ± standard deviation ( $n=3$ ),

<sup>f</sup> MIC values were obtained from 9)

表 2. 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	$k_{a1}$	$k_{d1}$	$k_{a2}$	$k_{d2}$	$K$
		(1/Ms)	( $\times 10^{-2}$ , 1/s)	( $\times 10^{-4}$ , 1/s)	( $\times 10^{-5}$ , 1/s)	( $\times 10^3$ , 1/M)
Vancomycin	POPC	NC <sup>a</sup>	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 <sup>b</sup>	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 ± 18	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

<sup>a</sup> Not calculated, <sup>b</sup> Mean ± standard deviation ( $n=3$ )

### Daptomycin のモデル脂質膜に対する親和性評価系の構築

脂質膜評価系を応用して daptomycin の脂質膜親和性評価を実施した. Daptomycin はサイクリックリポペプチド系の抗菌薬で, グラム陽性菌感染症治療薬として用いられている. 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<sup>10)</sup>. また, 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<sup>10)</sup>. 本研究では, daptomycin の脂質膜に対する結合におけるカルシウムの役割と機能について評価した. 図 1 (A) 及び図 1 (B) には, 50 mg/L CaCl<sub>2</sub> を含むランニング緩衝液及び 50 mg/L CaCl<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> を添加した. CaCl<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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 2 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<sub>2</sub> 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できた。

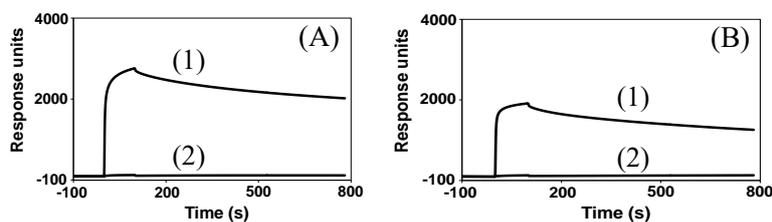


図 1. Daptomycin のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム ((A), POPG; (B), POPG/CL)

Daptomycin 濃度 : 50  $\mu$ M

ランニング緩衝液 : (1) 50 mg/L CaCl<sub>2</sub> を含んだ 0.5 倍濃度の PBS

(2) 50 mg/L CaCl<sub>2</sub> を含まない 0.5 倍濃度の PBS

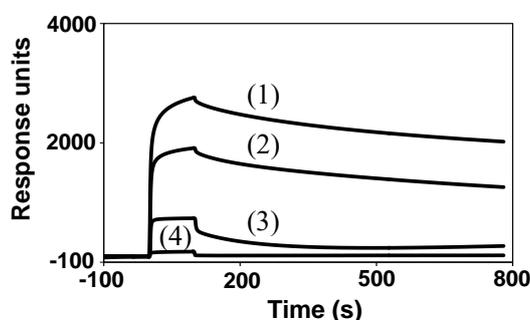


図 2. Daptomycin のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム ((1), POPG; (2), POPG/CL; (3), POPE/POPG; (4), POPC)

Daptomycin 濃度 : 50  $\mu$ M

ランニング緩衝液 : 50 mg/L CaCl<sub>2</sub> を含んだ 0.5 倍濃度の PBS

### 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

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結合していることが知られている<sup>11)</sup>。特に、ヒトでは TBG, ラットでは TTR に多く結合していることがわかっている<sup>12,13)</sup>。また、T4 と TTR/TBG との結合を競合的に阻害する薬剤は間接的に血中 T4 濃度を上昇させ、甲状腺機能が亢進した結果、甲状腺肥大などの毒性を引き起こすと考えられている<sup>14-21)</sup>。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。表 3 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予測した IC<sub>50</sub> あるいは IC<sub>80</sub> 値を示した。また、表 3 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 IC<sub>50</sub> と薬剤による IC<sub>50</sub> の比から算出されている (IC<sub>50</sub> (T4) / IC<sub>50</sub> (薬剤))。RP 値は、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 ( $IC_{50} < 2.5 \mu M$ )。  $IC_{80}$  値を算出することができ、TTR に対しては  $4.0 \mu M$ 、TBG に対しては  $11 \mu M$  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<sup>13, 22, 23</sup>。さらに、tetraiodothyroacetic acid の TTR に対する  $IC_{80}$  値は、TBG に対する  $IC_{80}$  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。Genistein による T4 と TTR との結合に対する  $IC_{50}$  値は  $7.9 \mu M$  で、T4 と TBG との結合に対する  $IC_{50}$  値は、 $20 \mu M$  以上であった。Genistein 及び diclofenac の T4 と TTR との結合に対する  $IC_{50}$  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分かった。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<sup>13, 14</sup>。本結果においても T4 と TTR 及び TBG との結合に対する  $IC_{50}$  値は  $20 \mu M$  以上であった。本評価系結果から算出された  $IC_{50}$  値が  $20 \mu M$  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かもしれない。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を予測できるのではないかと考えられる。

表 3. 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	$IC_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	Literature RP <sup>c</sup>
TTR	Tetraiodothyroacetic acid	<2.5	1.1 <sup>13</sup> , 11.5 <sup>22</sup>
		4.0 ( $IC_{80}$ , $\mu M$ ) <sup>b</sup>	
	Diclofenac	6.4	0.02 <sup>13</sup> , 0.02 <sup>14</sup>
	Genistein	7.9	0.4 <sup>13</sup>
	Ibuprofen	>20	NC <sup>d 13</sup>
	Carbamazepine	>20	NC <sup>13</sup>
	Furosemide	>20	NC <sup>13</sup> , NC <sup>14</sup>
TBG	Tetraiodothyroacetic acid	<2.5	0.6 <sup>13</sup> , 0.4 <sup>23</sup>
		11 ( $IC_{80}$ , $\mu M$ ) <sup>b</sup>	
	Diclofenac	>20	0.01 <sup>13</sup> , 0.00039 <sup>14</sup>
	Genistein	>20	NC <sup>13</sup>
	Ibuprofen	>20	NC <sup>13</sup>
	Carbamazepine	>20	NC <sup>13</sup>
	Furosemide	>20	NC <sup>13</sup> , 0.0011 <sup>14</sup>

TTR, Tansthyretin; TBG, Tyroxine binding globulin

以上の結果から、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) 橋本せつ子, 森本香織. 2009 Biacore を用いた相互作用解析実験法. シュプリングー・ジャパン (株).
- 2) 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. シュプリングー・フェアラーク東京
- 3) Kinouchi H., Arimoto H., Nishiguchi K., Oka M., Maki H., Kitagawa H., Kamimori H. 2014 *Anal. Biochem.* 452: 67 – 75.
- 4) Kinouchi H., Arimoto H., Nishiguchi K., Oka M., Maki H., Kitagawa H., Kamimori H. 2014 *Biol. Pharm. Bull.* 37: 1383 – 1389.
- 5) Kinouchi H., Onishi M., Kamimori H. 2013 *Anal. Sci.* 29: 297 – 301.
- 6) Kinouchi H., Matsuyama K., Kitagawa H., Kamimori H. 2016 *Anal. Biochem.* 492: 43 – 48.
- 7) Kamimori H., Hall K., Craik DJ., Aguilar MI. 2005 *Anal. Biochem.* 337: 149 – 153.
- 8) Epand RF., Savage PB., Epand RM. 2007 *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 2500 – 2509.
- 9) Yoshida O., Nakamura J., Yamashiro H., Miura K., Hayashi S., Umetsu K., Xu S., Maki H., Arimoto H. 2011 *Med. Chem. Commun.* 2: 278 – 282.
- 10) Silverman JA., Perlmutter NG., Shapiro HM. 2003 *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 2538 – 2544.
- 11) Schussler GC. 2000 *Thyroid* 10: 141 – 149.
- 12) Köhrle J., Fang SL., Yang Y., Irmischer K., Hesch RD., Pino S., Alex S., Braverman LE. 1989 *Endocrinology* 125: 532 – 537.
- 13) Marchesini GR., Meimaridou A., Haasnoot W., Meulenberg E., Albertus F, Mizuguchi M., Takeuchi M., Irth H., Murk AJ. 2008 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232: 150 – 160.
- 14) Munro SL., Lim CF., Hall JG., Barlow JW., Craik DJ., Topliss DJ., Stockigt JR. 1989 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68: 1141 – 1147.
- 15) Kato Y., Ikushiro S., Takiguchi R., Haraguchi K., Koga N., Uchida S., Sakaki T., Yamada S., Kanno J., Degawa M. 2007 *Drug Metab. Dispos.* 35: 1949 – 1955.
- 16) Johnson S., McKillop D., Miller J., Smith IK. 1993 *Hum. Exp. Toxicol.* 12: 153 – 158.
- 17) Wu KM., Farrelly JG. 2006 *Am. J. Ther.* 13: 141 – 144.
- 18) McClain RM., Posch RC., Bosakowski T., Armstrong JM. 1988 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 94: 254 – 265.
- 19) McClain RM. 1989 *Toxicol. Pathol.* 17: 294 – 306.
- 20) Hosokawa S., Nakamura J., Murakami M., Ineyama M., Watanabe T., Yoshioka K., Yamada T., Seki T., Okuno Y., Yamada H. 1992 *J. Toxicol. Sci.* 17: 155 – 166.
- 21) Karami-Tehrani F., Salami S., Mokarram P. 2001 *Clin. Biochem.* 34: 603 – 606.
- 22) Rickenbacher U., McKinney JD., Oatley SJ., Blake CC. 1986 *J. Med. Chem.* 29: 641 – 648.
- 23) Hao YL., Tabachnick M. 1971 *Endocrinology* 88: 81 – 92.

## 論文審査の結果の要旨

生体内における様々な反応は、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。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手段となり、薬剤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なる。本学位論文では、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance, SPR) 法を用いて、薬剤の薬効メカニズム解明の一環として、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に対する親和性評価系及びモデル脂質膜に対する親和性評価系を構築した。また、算出された親和性結果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及びモデル脂質膜に対する親和性と抗菌活性との関係を考察した。さらに、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。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。

以上のように、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。

上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。