

氏名	石濱泰
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第587号
学位授与の日付	平成10年5月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	キャピラリー電気泳動法による薬物の疎水性・酸解離定数およびタンパク質のアンフォールディングの評価に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 中川照眞 教授 半田哲郎 教授 佐治英郎

## 論文内容の要旨

新薬の開発において、その物性を評価することは候補化合物の選択において非常に重要であり、工業化上の問題（溶解性、安定性など）だけではなく、投与後の動態や活性とも関わる。キャピラリー電気泳動（以下）CEは内径100 $\mu$ m以下の熔融シリカキャピラリーを用いる電気泳動法の総称で、近年生命科学分野を中心に急速に発展している分離分析法である。著者は、泳動溶液の性質の変化に伴う溶質の電気泳動移動度の変化から溶質分子の溶液中での物性を評価できると考え、まず低分子薬物の疎水性について、泳動溶液にミセルやマイクロエマルジョン等を添加し、薬物の移動度の変化を測定することにより評価した。次に酸解離定数について検討した。あらゆる多価化合物に対して適用できるように溶質の荷電数と電気泳動移動度に関する一般式を導き、ゾーン電気泳動モードで、泳動溶液のpH変化に基づく電気泳動移動度の変化を評価した。更に、タンパク質のアンフォールディング反応の熱力学的パラメータを、キャピラリーの温度の変化に伴う電気泳動移動度の変化を評価することによって測定した。得られたパラメータを従来法によるものと比較し、CE法の特徴を明らかにした。

CE法を用いる化合物の疎水性の評価については、ミセルおよびマイクロエマルジョンにおける溶質の分配挙動を動電クロマトグラフィーを用いて検討した。ミセル分配系では、イオン性ミセルと極性溶質との静電的相互作用が認められた。一方、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)/1-ブタノール/ヘプタン/緩衝液からなるo/w型マイクロエマルジョン系と水/オクタノール系における分配係数間には高い相関が認められた。線形溶媒和エネルギー相関解析の結果、このマイクロエマルジョン系と水/オクタノール系は、分配係数に影響を与える様々な因子（水素結合性、体積、極性など）の寄与度についても一致していた。マイクロエマルジョンにおける分配係数は、ガスクロマトグラフィーで用いられている保持指標のコンセプトに基づいた移動指標(MI)を導入することにより、高い再現性で測定できることがわかった。この手法では、広い範囲の物質群の疎水性パラメータ（水/オクタノール系の分配係数の対数(logP)で-0.40から4.45の化合物）を一定条件下で迅速(15分以内)に測定することが可能であった。中性化合物の分配挙動に対するマイクロエマルジョンの界面活性剤種の影響はほとんど認められなかった。イオン性溶質の疎水性パラメータも、キャピラリーゾーン電気泳動とマイクロエマルジョン動電クロマトグラフィーによる測定を組み合わせることにより、測定可能であった。定量的移動指標-活性相関において、MIは従来の疎水性パラメータよりも生理活性に対し高い相関を有するパラメータであることが示唆された。

CEを用いる酸解離定数については、分離溶液のpHと移動度に関する一般式を誘導し、イオン強度一定の緩衝液群を用いて得られた異なるpHにおける実効移動度から回帰計算を行うことによって測定した。本法は複数個の近接したpKa値を持つ複雑な化合物（アンジオテンシン類など）に対しても適応可能であった。得られたpKa値は従来法による値と一致した。また従来法では不可能であった難溶性化合物や低純度化合物に対しても有用であった。本法は高い再現性(RSD: 1%以下)と高速性(全測定時間数十分)を有しており、微量試料(数十fmol)での測定が可能であった。

CE法を用いるタンパク質のアンフォールディング反応の評価については、温度制御されたキャピラリーを用い、キャピ

ラリー温度に対するタンパク質の電気泳動移動度の変化を測定することにより、その立体配座平衡を解析した。キャピラリー中でアンフォールディング反応を起こさせるインカラムインキュベーション法を導入し、注入溶液中での試料タンパク質の変化を抑制するとともに微量試料での測定を可能にした。キャピラリー内部の液温の影響を補正した電気泳動移動度を用いて数種のタンパク質のアンフォールディング反応の熱力学的パラメータを算出し、この結果を遠紫外部CD法による結果と比較した。その結果、本法はタンパク質の立体構造の変化に対する独自の検出法であることがわかった。

以上のように著者は、電気泳動移動度の変化に基づく溶質の物性（疎水性、酸解離定数、アンフォールディング反応の立体配座平衡の熱力学的パラメータ）の評価法を確立した。これらの方法はCEが自由溶液中での高分離能分析法であることを利用したものであり、CE本来の迅速性、再現性、自動化、微小規模であることなどの特性もそのまま活かされているので、薬物以外の化学物質についても適用できる汎用性の高い物性測定法である。

## 論文審査の結果の要旨

新薬の開発において、その物性を評価することは候補化合物の選択において非常に重要であり、工業化上の問題（溶解性、安定性など）だけではなく、投与後の動態や活性とも関わる。一方、キャピラリー電気泳動（以下CE）は内径100  $\mu\text{m}$ 以下のキャピラリーを用いる電気泳動の総称で、近年生命科学分野を中心に急速に発展している分離分析法である。著者は、泳動緩衝液の性質の変化に伴う溶質の電気泳動移動度の変化から溶質分子の溶液中での物性を評価できると考え、まず低分子薬物の疎水性について、泳動緩衝液にミセルやマイクロエマルジョン等を添加し、薬物の移動度の変化を測定することにより評価した。次に酸解離定数（pKa）について、ゾーン電気泳動モードで、泳動緩衝液のpH変化に基づく電気泳動移動度の変化から評価した。更にタンパク質のアンフォールディング反応の熱力学的パラメータを、泳動緩衝液の温度変化に伴う電気泳動移動度の変化を評価することによって測定した。

CE法を用いる化合物の疎水性の評価は、泳動緩衝液中に添加されたミセルおよびマイクロエマルジョンへの溶質の分配現象を利用する動電クロマトグラフィーによって行った。ミセルを用いた場合には、イオン性ミセルと極性溶質との静電的相互作用が認められた。一方、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）/1-ブタノール/ヘプタン/緩衝液からなるo/w型マイクロエマルジョンで得られた分配係数と水/オクタノールにおける分配係数との間には高い相関が認められた。マイクロエマルジョンにおける分配係数は、ガスクロマトグラフィーで用いられている保持指標のコンセプトに基づいた移動指標（MI）を導入することにより、高い再現性で測定できることがわかった。この手法では、広い範囲の物質群の疎水性パラメータ（水/オクタノールの分配係数の対数（logP）で-0.40から4.45の化合物）を一定条件下で迅速（15分以内）に同時測定することが可能であった。定量的移動指標-活性相関において、MIは従来の疎水性パラメータよりも生理活性に対し高い相関を有するパラメータであることが示唆された。

CEを用いる酸解離定数の評価については、泳動緩衝液のpHと移動度に関する一般式を誘導し、イオン強度一定でpHの異なる緩衝液群を用いて得られた実効移動度から回帰計算することによって行った。本法は複数個の近接したpKa値を持つ複雑な化合物（アンジオテンシン類など）に対しても適応可能であった。得られたpKa値は従来法による値と一致した。また従来法では不可能であった難溶性化合物や低純度化合物に対しても有用であった。

CE法を用いるタンパク質のアンフォールディング反応の評価については、温度制御されたキャピラリーを用い、泳動緩衝液温度に対するタンパク質の電気泳動移動度の変化を測定することにより、その立体配座平衡を解析した。キャピラリー内部の液温の影響を補正した電気泳動移動度を用いて数種のタンパク質のアンフォールディング反応の熱力学的パラメータを算出し、この結果を遠紫外部CD法による結果と比較した。その結果、本法はタンパク質の立体構造の変化に対する独自の検出法であることがわかった。

以上、本研究の成果は薬物やタンパク質の物性評価に新しい方法を提供するものであり、今後医薬品開発において微量物性測定法として役立つものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値のあるものと認める。

さらに、平成10年4月22日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果優秀と認定した。