

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS 研究

第1分野

課題番号

KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）	西田基宏 ……	1
KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告）	西田基宏 ……	6
KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 ……	10

第2分野

KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 ……	15
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 ……	22
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 ……	27
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 ……	34
KH23331	寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 ……	39

第3分野

KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 ……	47
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル ……	55
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 ……	60
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究	川上浩司 ……	65

第5分野

KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 ……	69
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 ……	74
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 ……	84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス
に関する研究

ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測

所属 千葉大学大学院薬学研究院
研究者 小林カオル

研究要旨 化合物と水素結合により相互作用すると推定された核内レセプターPXRのアミノ酸を置換することにより化合物とPXRの相互作用における水素結合の重要性について検討したが、アミノ酸置換による相互作用の低下は認められず、他の因子の関与が示唆された。

A. 研究目的

医薬品あるいは食品による薬物代謝酵素や薬物トランスポーター遺伝子の発現変動は、医薬品の体内動態や治療効果の個人内変動を引き起こす重要な要因の一つである。本研究では、臨床的に重要かつ薬物により強く誘導され治療効果に影響を与える

P450分子種（CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9）および薬物トランスポーター（P糖タンパク、OATP-C）の発現に関与する核内タンパクをターゲットとし、誘導を引き起こす可能性のある化合物と核内タンパクの相互作用について、培養細胞を用いたインビトロ実験結果とコンピューター解析結果を組み合わせることによるインシリコ予測法の確立を行い、ヒトの薬物体内動態の予測を向上させることを目的とした。

平成16年度は、誘導に関わる核内受容体のうち、Pregnane X receptor (PXR)を活性化する医薬品の構造的特徴について、培養細胞を用いたインビトロ実験系と分子動力学的手法によるコンピューター解析を組み合わせ、医薬品による誘導作用を化学構造とタンパク構造の視点から検討し、PXRの活性化に重要となる化合物の構造を明らかにした。また、化合物の構造安定化計算を行い、X線結晶解析により得られたPXRの構造とのドッキングを行い、相互作用するPXRのアミノ酸残基を推定した。平成17年度

は化合物と水素結合により相互作用すると推定されたPXRのアミノ酸残基（Ser²⁴⁷、Gln²⁸⁵、His⁴⁰⁷）を水素結合形成基を持たないアミノ酸に置換を行うことにより化合物との相互作用における重要性について検討した。

B. 研究方法

PXRへのアミノ酸置換はsite-directed mutagenesis法により行った。野生型PXR発現ベクターであるPXR-wtをtemplateとし変異を導入したプライマーを用いてPCR反応を行った。PCR産物は精製後、*DpnI*で処理し、JM109 competent cellにtransformした。目的のplasmid DNAはQIAprep Spin Miniprep Kitを用いて精製した。

*CYP3A4*遺伝子の5'上流に存在するPXR結合領域を用いたレポーターアッセイは以下の方法で行った。ヒト肝がん由来細胞（FLC7）の培養は10% FBSと抗生物質を加えたDMEM/F12を培地とし、37°C、5% CO₂の条件下で行った。細胞を24-wellプレートに播種し、約24時間後レポーターベクター（pGL3-Basic-XREM/prPXRE, 200 ng/well）、核内受容体発現ベクター（10 ng/well）および内標ベクター（phRL-TK vector, 4 ng/well, Promega）を細胞にトランスフェクションした。核内受容体発現ベクター

は、前述した方法で作成した野生型 PXR (PXR-wt)、野生型 PXR の Ser²⁴⁷ を Ala に置換した PXR-S247A、Gly に置換した PXR-S247G、Gln²⁸⁵ を Ala に置換した PXR-Q285A、Ile に置換した PXR-Q285I、Gly に置換した PXR-Q285G、His⁴⁰⁷ を Ala に置換した PXR-H407A、Ile に置換した PXR-H407I、Gly に置換した PXR-H407G および上記置換をふたつ導入した PXR (PXR-S247G/Q285A, PXR-Q285A/H407I, PXR-S247G/Q404I) を用いた。トランスフェクション後 4 時間 incubate し、その後、培地を DMEM/F12 に交換し、その直後に誘導剤を添加した。誘導剤は dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液として調製し、DMSO の最終濃度が 0.1% となるように加えた。誘導剤曝露は 24 時間とし、その後 Luciferase 活性を測定した。誘導剤として、CYP3A4 誘導剤として代表的な rifampicin、SR12813 および hyperforin を用いた。

PXR と coregulator である SRC-1e および NcoR との相互作用は、mammalian two-hybrid assay により検討した。GAL4-DNA 結合ドメインを持つ pBIND ベクターに SRC-1e あるいは NcoR の receptor interacting domain (RID) を組み込んだベクター (GAL4-SRC1, GAL-NCOR) および VP16 活性化ドメインを持つ pACT に野生型あるいはアミノ酸置換を行った PXR の ligand binding domain (LBD) を組み込んだベクター (VP16-PXRwt, VP16-S247A, VP16-Q285A, VP16-Q285I, VP16-H407A, VP16-H407I) を作成した。ヒト肝がん由来細胞 (FLC7) を 24-well プレートに播種し、約 24 時間後にレポーターベクター (pG5, 200 ng)、pBIND ベクター (GAL4-SRC1 あるいは GAL-NCOR, 100 ng/well) および pACT ベクター (VP16-PXRwt, VP16-S247A, VP16-Q285A, VP16-Q285I あるいは VP16-H407A, VP16-H407I, 100 ng/well) を細胞にトランスフェクションした。GAL4-NCOR をトランスフェクションする際には、RXRa 発現ベクター (50 ng/well) も同時にトランスフェクションした。24 時間後に誘導剤として rifampicin 5 μ M を曝露した。

さらに 24 時間後に前述した方法で Luciferase 活性を測定した。

(倫理面への配慮)

ベクター構築などの組換え DNA 実験については、組換え DNA 実験指針に基づき実施されており、倫理面での問題はないと判断した。

C. 研究結果

PXR の LBD 内にある 3 種のアミノ酸残基 (Ser²⁴⁷、Gln²⁸⁵、His⁴⁰⁷) を水素結合形成基を持たないアミノ酸に置換し、PXR のリガンドである rifampicin、SR12813 および hyperforin との相互作用に影響を与えるかどうかを検討した。

まず、CYP3A4 遺伝子の 5' 上流に存在する PXR 結合領域を用いたレポーターアッセイにより、rifampicin による転写活性化作用を野生型 PXR とアミノ酸置換した PXR で比較した。野生型では rifampicin 曝露によりレポーター活性が約 6 倍に上昇したのに対し、アミノ酸置換を行った置換型 PXR (PXR-S247A, PXR-Q285I, PXR-H407A, PXR-H407G) では rifampicin 曝露による活性上昇は 1.5 倍以下であった。一方、他の置換型 PXR (PXR-S247G, PXR-Q285A, PXR-H407I) では、rifampicin 曝露により 2-4 倍の活性上昇が認められた。PXR-Q285G では rifampicin 曝露により 23 倍の活性上昇が認められた。Rifampicin 曝露により大きな活性上昇が認められた PXR-Q285G では野生型に比較して DMSO 曝露における活性が約 1/6 に低下していたが、その他の置換型 PXR では、野生型に比較していずれも DMSO 曝露における活性が上昇していた。Rifampicin 曝露による活性上昇の程度が 1.5 倍以下であった置換型 PXR を用いた場合、いずれも DMSO 曝露による活性が野生型 PXR を用いた場合の活性に比べ、9 倍以上と大きく上昇していた。これに対し、rifampicin 曝露により 2-4 倍の活性上昇を示した置換型 PXR を用いた場合には、DMSO 曝露による活性は 4 倍以下であった。

野生型と比べてDMSO曝露における活性上昇が比較的小さかった置換型PXR (PXR-S247G, PXR-Q285A, PXR-H407I) および野生型PXRを用いて、SR12813 (0.3 μ M) および hyperforin (0.3 μ M) による活性への影響を検討した。その結果、野生型PXRではSR12813 および hyperforin の曝露によりそれぞれ7.3倍および7.8倍上昇した。PXR-S247G, PXR-Q285A および PXR-H407I ではSR12813 曝露および hyperforin 曝露により1.7-3.7倍の活性上昇であった。野生型と比べてDMSO曝露における活性上昇が比較的小さかった置換を二つ導入した2置換型PXR (PXR-S247G/Q285A, PXR-Q285A/407I, PXR-S247G/H407I) を作成し、rifampicin 曝露による影響を検討した。その結果、いずれの置換型PXRにおいても野生型と同等の活性上昇が認められた。

次に、PXRとcoregulator (SRC-1およびNCoR)との相互作用に及ぼすアミノ酸置換の影響についてmammalian two-hybrid assayにより検討した。SRC-1については、野生型PXRとSRC-1との間に相互作用が認められ、rifampicin 曝露により約2倍の活性上昇が認められた。PXR-Q285Aでは野生型に比較してSRC-1との相互作用が弱まったものの、rifampicin 曝露による活性上昇は3倍以上に上昇した。その他の置換型 (PXR-S247A, PXR-Q285I, PXR-H407A, PXR-H407I) については、SRC-1との相互作用は野生型に比較してわずかに強まったが、rifampicin 曝露による活性上昇の程度は低下した。一方、NCoRについては検討した5種の置換型PXRはいずれも、野生型に比較してDMSO曝露における活性は低い値を示した。また、野生型PXRに比較して置換型PXRでは、rifampicin 曝露による活性低下の程度も小さいものであった。

D. 考察

平成16年度の検討により、PXR活性化作用を有するバルピツール酸誘導体は、LBD内に存在する

Ser247, Gln285, His407と水素結合していることが推測された。また、これまでにPXRのLBDのX線結晶構造解析によってSR12813 (1NRL, Watkins *et al.*, 2003; 1ILH, Watkins *et al.*, 2001) ではSer247 および His407 が水素結合に関わっていることが報告され、hyperforin (1M13, Watkins *et al.*, 2003) および rifampicin (Chrencik *et al.*, 2005) ではSer247, Gln285, His407 が水素結合に関わっていることが報告されている。そこで本年度は、PXRのLBD内にある3種のアミノ酸残基 (Ser²⁴⁷, Gln²⁸⁵, His⁴⁰⁷) を水素結合形成基を持たないアミノ酸に置換し、PXRのリガンドである rifampicin, SR12813 および hyperforin との相互作用に影響を与えるかどうかを検討した。

種々の置換型PXRを作成して検討した結果、rifampicinによる活性化作用を示すもの (PXR-S247G, PXR-Q285A, PXR-Q285G, PXR-H407I) と活性化作用の非常に弱いもの (PXR-S247A, PXR-Q285I, PXR-H407A, PXR-H407G) が存在することが明らかとなった。しかし、Ser247をAlaに置換した場合には rifampicin による活性化作用が低下するのに対し、Glyへの置換では活性化作用の低下が小さいように、同じアミノ酸でも置換するアミノ酸の種類により rifampicin による活性化作用の程度が大きく異なっていた。また、DMSO曝露における活性が野生型に比較して高いものほど rifampicin による活性化作用が弱くなることが示された。さらに、DMSO曝露における活性が野生型の活性の4倍以下の置換型PXRでは、SR12813 および hyperforin による活性化が認められた。アミノ酸二つを置換した場合においても、rifampicinによる活性化作用が認められたことから、水素結合を二つ除いても化合物によるPXRの活性化に大きな影響は認められないことが明らかとなった。これらのことより、rifampicinによるPXRの活性化における水素結合の重要性は高いことが示唆された。

今回、核内レセプターの coactivator である SRC-1 および corepressor である NCoR について、PXR との相互作用がアミノ酸置換により変化するかどうかを検討した。その結果、検討した 5 種の置換体のうち PXR-Q285A 以外の 4 種では SRC-1 との相互作用は若干増強し、NCoR との相互作用はすべて弱まることが示された。さらに、PXR と SRC-1 の相互作用に対する rifampicin の増強作用が置換体では低下しており、PXR と NCoR との相互作用の減弱作用も低下していた。これらの結果は、PXR の LBD 内にあるアミノ酸を置換することにより corepressor のリクルート能が失われ、coactivator のリクルート能が増強されることを示唆している。従って、このことが、アミノ酸置換体では野生型に比較して DMSO 曝露における活性が高く、rifampicin による活性上昇が低い原因の一つであると考えられた。

Chrencik *et al.* (2005) は、Ser²⁴⁷ を Trp に置換した場合に誘導剤無処置における活性が約 4 倍上昇し、rifampicin および SR12813 による活性化作用が消失することを示し、Ser²⁴⁷ を Trp に置換することにより、立体的にリガンドの結合を阻害し、部分的に結合ポケットを満たすことで、リガンド非依存的な活性を示した可能性を示唆した。しかし、今回得られた結果と同様にアミノ酸置換により coregulator との相互作用が変化した可能性も考えられた。

Ostberg *et al.* (2002) は、His⁴⁰⁷ を Ala に置換した場合に誘導剤無処置における活性が約 3 倍に上昇し、rifampicin および SR12813 による活性化作用が低下することを報告している。今回の結果では、誘導剤無処置における活性の上昇の程度は異なるものの、rifampicin および SR12813 による活性化作用は低下しており、彼らの結果とよく一致した。一方、His⁴⁰⁷ を Gln に置換した場合については、誘導剤無処置における活性が約 2 倍上昇し rifampicin および SR12813 による活性化作用が低下するという報告と (Chrencik *et al.*, 2005)、誘導剤無処置における活

性は変化せず、rifampicin および SR12813 による活性化作用が低下するという報告がある (Ostberg *et al.*, 2002)。His⁴⁰⁷ は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), thyroid hormone receptor (TR), vitamin D receptor (VDR), retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR) など様々な核内レセプターで保存されているアミノ酸残基である。これらの核内レセプターの結晶構造から、この保存されている His は水素結合を介して直接的にリガンドや helix 12 と相互作用することが示されている (Rochel *et al.*, 2000; Nolte *et al.*, 1998; Uppenberg *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1995; Stehlin *et al.*, 2001)。今回の検討では His⁴⁰⁷ を Ala、Gly あるいは Ile に置換した場合に rifampicin による活性化作用の低下が認められたものの、rifampicin 無処置での活性上昇の影響が大きいことから、アミノ酸置換によるリガンドとの相互作用の変化よりむしろ coregulator あるいは helix 12 との相互作用に影響を与えた可能性が考えられた。

今回の検討では、PXR とバルビツール酸誘導体のドッキングから、PXR の LBD 内に存在する Ser²⁴⁷, Gln²⁸⁵, His⁴⁰⁷ がバルビツール酸誘導体との水素結合に関与することが推測されたものの、これらのアミノ酸を水素結合形成基を持たないアミノ酸に置換したことによる化合物と PXR の相互作用の低下は認められず、アミノ酸置換による PXR と coregulator との相互作用の変化が示唆された。化合物と PXR の結合には水素結合以外にも π/π 相互作用なども関与することが示唆されていることから、化合物と PXR の相互作用を予測するには、水素結合以外の因子についても考慮することが必要であると考えられた。

E. 結論

PXR とバルビツール酸誘導体とのドッキングによ

り化合物と水素結合により相互作用すると推定された PXR のアミノ酸残基 (Ser²⁴⁷、Gln²⁸⁵、His⁴⁰⁷) を水素結合形成基を持たないアミノ酸に置換し、化合物と PXR の相互作用における水素結合の重要性について検討したが、アミノ酸置換による相互作用の低下は認められず水素結合の重要性を明らかにすることはできなかった。平成 16 年度の検討より、化合物と PXR の結合には水素結合以外にも π/π 相互作用なども関与することが示唆されていることから、化合物と PXR の相互作用を予測するには、水素結合以外の因子についても考慮することが必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社