

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

| | | |
|---------|---|-------------|
| 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 …… 1 |
| 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 …… 12 |
| 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 …… 26 |
| 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 …… 37 |
| 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 …… 50 |
| KH23331 | 寄生性原虫の生育に必須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 …… 60 |
| 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 …… 66 |
| 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 …… 79 |
| 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 …… 92 |
| 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ーの基礎的および応用的研究 | 川上浩司 ……101 |
| 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 ……105 |
| 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 ……116 |
| 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 ……126 |
| 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 ……136 |
| KH53333 | 治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析 | 林 昌宏 ……150 |
| KHC3361 | C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究 | 村上恭子 ……156 |
| KHC3362 | 高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発 | 庵原耕一郎 ……162 |
| KHC3363 | HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究 | 奥平桂一郎 ……167 |

エイズ医薬品等開発研究

| | | |
|---------|---|------------|
| 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 ……173 |
| KAC3761 | 論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索 | 中村寛則 ……186 |
| KAC3762 | HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発 | 児玉耕太 ……191 |

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 核内レセプターPXRのリガンド結合ポケット内のアミノ酸27種の置換体を用いた検討により、PXRのリガンド結合に関与するアミノ酸残基は化合物によって異なり、リガンドによってはPXRとの結合に複数の結合様式が存在する可能性が示唆された。

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年度および17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。さらに、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、化合物との相互作用における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。そこで、平成18年度は、リガンド結合ポケット内のアミノ酸28種のうち、Ala²⁴⁴を除く27種についてそれぞれのアミノ酸置換体を作成し、13種類の化合物によるPXR活性化への影響を検討した。また、リガンドとPXRのドッキングを行なうことによりリガンドと相互作用するアミノ酸残基を推定した。

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。精製PCR産物をDpnIで処理した後、JM109 competent cellにtransformし、目的のplasmid DNAを精製した。

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。レポーターベクター(pGL3-Basic-XREM/prPXRE, 100 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) をトランスフェクション試薬と混合した後、ヒト肝がん由来細胞 (FLC7) (ca. 8×10^4 cells/well) とともに 48-well plate に播種した。細胞培養は 10% FBS と抗生物質を加えた DMEM/F12 を培地とし、 37°C 、5% CO_2 の条件下で行った。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 および野生型 PXR の Leu²⁰⁶、Leu²⁰⁹、Val²¹¹、Leu²⁴⁰、Met²⁴³、Met²⁴⁶、Phe²⁵¹、Phe²⁸¹、Gln²⁸⁵、Phe²⁸⁸、Trp²⁹⁹、Tyr³⁰⁶、Leu³⁰⁸、Glu³²¹、Met³²³、Leu³²⁴、His³²⁷、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴、Phe⁴²⁰、Met⁴²⁵ および Phe⁴²⁹ をそれぞれ Ala に置換した L206A、L209A、V211A、L240A、M243A、M246A、F251A、F281A、Q285A、F288A、W299A、Y306A、L308A、E321A、M323A、L324A、H327A、L411A、I414A、F420A、M425A および F429A に加え、Ser²⁰⁸、Ser²⁴⁷ および Cys²⁸⁴ を Gly に置換した S208G、S247G および C284G と His407 および Arg410 をそれぞれ Ile および Gln に置換した H407I および R410Q を用いた。トランスフェクションの 24 時間後に、誘導剤あるいは溶媒のみを添加した DMEM/F12 培地に交換した。誘導剤には、CYP3A4 誘導剤として良く知られている 13 種類の化合物 (amlodipine, clotrimazole, hyperforin, lansoprazole, lithocholic acid, nifedipine, paclitaxel, phenobarbital, rifampicin, ritonavir, RU486, simvastatin および SR12813) を用いた。なお、hyperforin は methanol 溶液、phenobarbital は水溶液、その他の活性化剤は DMSO 溶液として調製し、DMSO または methanol 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。

PXR のリガンド結合ポケットへのリガンドのドッキングは以下の方法で行った。Clotrimazole および nifedipine の安定構造は、Gaussian98 を用い、Hartree-Fock 法により作成した。基底関数系には 6-31G** を用いた。ドッキングには MOL-FS ソフトウェアを用い、化合物を PXR のリガンド結合ポケット

内に配置した。次に、ドッキングさせたモデルの周囲約 15 Å に水分子を発生させ、分子力場計算によるエネルギー極小化計算をおこなった。PXR のリガンド結合ドメインの構造は、X 線結晶構造 (PDB ID: 1NRL) の chain A および chain C を用いた。分子力場計算には AMBER7.0 を用い、力場パラメータには parm99 を使用した。

(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

1. PXR のアミノ酸置換体作成

PXR のリガンド結合ポケット内にある 28 種のアミノ酸残基のうち

Ala244 を除く 27 種についてそれぞれの Ala 置換体を作成し、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、リガンド非存在下における PXR 活性を測定した。その結果、6 種のアミノ酸残基 (Ser²⁰⁸、Ser²⁴⁷、Cys²⁸⁴、Gln²⁸⁵、His⁴⁰⁷ および Arg⁴¹⁰) の Ala 置換体では、野生型 PXR の 2 倍以上高い値を示した。平成 17 年度の検討結果より、リガンド非存在下での PXR 活性が野生型 PXR よりも高い値を示す置換型 PXR では、リガンドによる活性化に対するアミノ酸置換の影響を検出しにくいことが示唆されたため、6 種のアミノ酸残基については Ala 以外のアミノ酸への置換を行い、最も低い活性を示した置換型 PXR (S208G、S247G、C284G、W285A、H407I および R410Q) を以下の検討に用いた。

2. 構造の異なる 13 種の化合物による野生型 PXR の

活性化

PXR 活性化剤として知られている 13 種類の化合物について、PXR 依存的な CYP3A4 レポーターの転写活性化を確認した。その結果、野生型 PXR を発現させた細胞では化合物により 3-8 倍にルシフェラーゼ活性が上昇したのに対し、PXR を発現させていない細胞では活性の上昇は認められなかった。また、

溶媒 (DMSO または methanol) による PXR 活性への影響はいずれも認められなかった。

3. 化合物による PXR 活性化に対するアミノ酸置換の影響 F251A では、nifedipine, clotrimazole および rifampicin による活性化が野生型に比べて減少し、paclitaxel による PXR の活性化は完全に消失した。E321A では、用いた全ての化合物において活性の低下が認められた。特に、paclitaxel および ritonavir を処理した時の活性は野生型に比べて 80%以上減少した。また、M425A および Y306A では全ての化合物による PXR の活性化が消失した。

Fig. 1A に示したように、L411A および I414A において、nifedipine および clotrimazole による活性化が野生型に比べて減少した。しかし、rifampicin による活性化は、L411A では野生型の 35%が認められ、I414A では野生型と同等であった。また、L411A および I414A では、ritonavir, SR12813, hyperforin および simvastatin 以外のその他の化合物による活性化も野生型に比べて著しく減少した。Fig. 1B に示したように、L240A, F420A および F429A では、nifedipine および clotrimazole による活性化はほとんど認められなかった。また、ritonavir および rifampicin を除く他の化合物においてもほとんど活性化が認められなかった。L240A では、ritonavir よりも rifampicin の方が強い PXR 活性化作用を示したのに対し、F429A では、rifampicin よりも ritonavir の方が強い活性化作用を示した。F420A では、rifampicin のみで活性化が認められた。Fig. 2A に示したように、H327A では、nifedipine および clotrimazole による活性化が消失および減少したのに対し、paclitaxel によって野生型と同等以上の強い活性化が認められ、rifampicin および ritonavir による活性化も認められた。Phenobarbital, lithocholic acid, RU486, lansoprazole および hyperforin による活性化は消失した。

L308A および L324A では、nifedipine による活性化が野生型に比較して減少した。また、活性化の減少は lithocholic acid など多くの化合物によっても認められた。一方、これらの変異型 PXR は clotrimazole および rifampicin によって強く活性化された。Fig. 2B に示したように、V211A および W299A では、nifedipine による活性化は完全に消失した。一方、これらの変異型 PXR では rifampicin によって野生型と同等の強い活性化が認められ、clotrimazole によって野生型の半分の活性が認められた。SR12813 はこれら二つの変異型 PXR うち V211A のみを活性化し、RU486 は W299A のみを活性化した。

L206A, L209A および M243A はいずれも nifedipine, clotrimazole および rifampicin によって強く活性化された。M246A では、phenobarbital および lansoprazole 以外の化合物を処理した時の活性はいずれも野生型の 40-90%程度認められた。また、Q285A では、化合物による PXR の活性化に対するアミノ酸置換の影響は認められなかった。同様に、S247G, C284G, H407I, R410Q, S208G, F288A, F281A および M323A についても化合物による PXR の活性化に対するアミノ酸置換の影響はほとんど認められなかった。

4. PXR とリガンドのドッキング レポーターアッセイの結果より、アミノ酸置換により化合物による活性化が著しく低下した箇所のアミノ酸残基が化合物と相互作用すると仮定し、clotrimazole および nifedipine と相互作用する PXR のアミノ酸残基をドッキングにより推定した。

Clotrimazole による PXR の活性化は Leu²⁴⁰、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴、Phe⁴²⁰ および Phe⁴²⁹ のアミノ酸置換により著しく低下した (Fig. 1)。これらのアミノ酸残基は Phe⁴²⁰ を中心にリガンド結合ポケット内の比較的近い位置にあることから、clotrimazole は、リガンド結合ポケットの Phe⁴²⁰ を中心とした部位に配置した。

エネルギー極小化計算の結果、Ser²⁴⁷が clotrimazole と 2.56 Å の水素結合を形成し、Phe⁴²⁰が π/π 相互作用に、Leu²⁴⁰、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴ および Met⁴²⁵が CH/ π 相互作用に関与することが推定された (Fig. 3)。さらに、Ala²⁴⁴、Phe²⁵¹、Phe²⁸¹ および Phe⁴²⁹も clotrimazole との相互作用に関与すると考えられた。

Nifedipine による PXR の活性化は、Val²¹¹、Leu²⁴⁰、Trp²⁹⁹、His³²⁷、Leu⁴¹¹、Phe⁴²⁰ および Phe⁴²⁹ のアミノ酸置換により著しく低下した (Fig. 1 and 2)。これらのアミノ酸残基はリガンド結合ポケットの複数の箇所に分布しており、分子サイズの小さい nifedipine は全ての残基と同時に相互作用することは困難であったため、nifedipine は Phe⁴²⁰ または Trp²⁹⁹ を中心とした二つの部位に配置した。エネルギー極小化計算の結果、Phe⁴²⁰ を中心とした結合様式では、Ser²⁴⁷が nifedipine と 2.93 Å の水素結合を形成し、Phe⁴²⁹が π/π 相互作用に、Leu⁴¹¹ および Phe⁴²⁰が CH/ π 相互作用に関与すると推定された (Fig. 4A)。さらに、Ala²⁴⁴、Phe²⁵¹、Phe²⁸¹、Gln²⁸⁵、Phe²⁸⁸、His⁴⁰⁷ および Met⁴²⁵も nifedipine との相互作用に関与すると考えられた。一方、Trp²⁹⁹ を中心とした結合様式では、His³²⁷が nifedipine と 2.83 Å の水素結合を形成し、Val²¹¹、Trp²⁹⁹ および His⁴⁰⁷が CH/ π 相互作用に関与すると推定された (Fig. 4B)。さらに、Leu²⁰⁹、Gln²⁸⁵、Tyr³⁰⁶、Met³²³ および Leu³²⁴も nifedipine との相互作用に関与すると考えられた。

D. 考察

今年度の研究では、野生型および 27 種類の置換型 PXR を用いたレポーターアッセイにより、13 種類の化合物による PXR の活性化におよぼすアミノ酸置換の影響を検討し、PXR の活性化に関与するアミノ酸残基は化合物により異なることを明らかにした。さらに、PXR の活性化に対して特徴的なアミノ酸置換

の影響を示した化合物のうち、clotrimazole および nifedipine に関しては、レポーターアッセイの結果に基づいて PXR とのドッキングをおこない、それぞれのリガンド結合様式を推定した。

Clotrimazole に関しては、PXR の活性化が Leu²⁴⁰、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴、Phe⁴²⁰ および Phe⁴²⁹ のアミノ酸置換により著しく低下することが明らかとなったことから (Fig. 1)、これらのアミノ酸が clotrimazole による PXR の活性化に重要であることが示唆された。そこで、アミノ酸置換により clotrimazole による活性化が著しく低下した箇所のアミノ酸残基が clotrimazole と相互作用すると仮定し、ドッキングにより clotrimazole と相互作用する PXR のアミノ酸残基を推定した。その結果、Ser²⁴⁷、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴、Leu²⁴⁰ および Phe⁴²⁰が clotrimazole との重要な相互作用に関与し、さらに、Ala²⁴⁴、Phe²⁵¹、Phe²⁸¹ および Phe⁴²⁹も相互作用に関与することが示唆された (Fig. 3)。

Nifedipine に関しては、PXR の活性化が Val²¹¹、Leu²⁴⁰、Trp²⁹⁹、His³²⁷、Leu⁴¹¹、Phe⁴²⁰ および Phe⁴²⁹ のアミノ酸置換により著しく低下したことから (Fig. 1 and 2)、これらのアミノ酸残基が nifedipine による活性化に重要であることが示唆された。分子サイズの小さい nifedipine は、活性化に重要であると考えられた全ての残基と同時に相互作用することは困難であるため、nifedipine については Phe⁴²⁰ または Trp²⁹⁹ を中心としてドッキングをおこなった。その結果、二つの結合様式が推定され、一つの結合様式では Ser²⁴⁷、Leu⁴¹¹、Phe⁴²⁰ および Phe⁴²⁹が nifedipine との重要な相互作用に関与し (Fig. 4A)、もう一つの結合様式では Val²¹¹、Trp²⁹⁹、His³²⁷ および His⁴⁰⁷が重要な相互作用に関与することが示唆された (Fig. 4B)。さらに、Leu²⁰⁹、Ala²⁴⁴、Phe²⁵¹、Phe²⁸¹、Gln²⁸⁵、Phe²⁸⁸、Tyr³⁰⁶、Met³²³、Leu³²⁴ および Met⁴²⁵も相互作用に関与することが示唆された。

一方、S247G, C284G, H407I, R410Q, S208G, Q285A,

F288A, F281A および M323A に関しては、化合物による活性化にアミノ酸置換による大きな影響は認められなかった。したがって、これらの残基はリガンド依存的な PXR の活性化における重要性が低いことが示唆された。一方、M425A および Y306A は、全ての化合物による活性化が消失した。Met⁴²⁵ は coregulator との相互作用に重要な activation function 2 (AF2) ドメイン上に存在するため、アミノ酸置換により coactivator のリクルート能が低下した可能性が考えられた。また、Tyr³⁰⁶ は PXR と同じサブファミリーに属する constitutive androstane receptor および vitamin D receptor にも保存されており、これらのアミノ酸置換によりリガンド非存在下における活性およびリガンドによる活性化が消失することが報告されている (Jyrkkarinne *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2006)。その理由は明らかではないが、Tyr³⁰⁶ が PXR タンパクのフォールディングに重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

本研究で用いた 13 種類の化合物は、野生型 PXR に対して全て PXR 依存的な *CYP3A4* レポーターの活性化を示した。しかし、lansoprazole を野生型あるいは変異型 PXR を発現させた細胞に処理した時の活性と、それぞれの PXR の basal 活性との間には高い相関が認められ、lansoprazole による PXR の活性化がアミノ酸置換により低下するという知見は、いずれの置換においても得られなかった。したがって、lansoprazole による PXR の活性化にはリガンド結合以外の機構が存在する可能性が考えられた。また、用いた化合物の中で最も分子量の小さい phenobarbital による PXR の活性化は、C284G を除く全ての変異型 PXR において、野生型に比べて減少した。Phenobarbital は PXR のリガンドであるが、親和性は他のリガンドに比べて非常に弱いことから (Jones *et al.*, 2000)、アミノ酸置換によるリガンド結合への影響を受けやすいと考えられた。一方、

分子サイズの大きい ritonavir および rifampicin による PXR の活性化は他の化合物に比べてアミノ酸置換の影響を受けにくく、多くの変異型 PXR で ritonavir および rifampicin による強い活性化が認められた。その理由の一つは、rifampicin は相互作用するアミノ酸残基数が 18 残基と多く (Chrencik *et al.*, 2005)、一つのアミノ酸置換によるリガンド結合への影響が相対的に小さいためであると考えられる。しかし、用いた化合物の中で最も分子量の大きい paclitaxel は、ritonavir および rifampicin により活性化された変異型 PXR (V211A, L240A, F251A, L308A, L324A, L411A および I414A) に対し活性化作用を示さなかったことから、分子サイズ以外の要因もアミノ酸置換による PXR 活性化への影響に関与すると考えられた。SR12813 (Watkins *et al.*, 2003), hyperforin (Watkins *et al.*, 2003) および rifampicin (Chrencik *et al.*, 2005) に関しては、X 線結晶構造解析によりリガンド結合様式が明らかとなっているが、これらの化合物との相互作用に重要であると考えられているアミノ酸残基は、必ずしも本研究のレポーターアッセイにおいてアミノ酸置換により活性化の低下を示すとは限らなかった。したがって、これらの化合物は、アミノ酸置換により他のアミノ酸残基と化合物との間に新たな相互作用を生じ、PXR を活性化する可能性が考えられた。

今年度の研究結果より、PXR のリガンド結合様式は変異型 PXR を用いた活性化パターンを化合物間で比較することにより推測できる可能性が考えられた。SR12813 および simvastatin は、変異型 PXR に対し非常に良く似た活性化パターンを示した。このことより、両者の化学構造は大きく異なるものの、simvastatin のリガンド結合様式は、すでに結晶構造として報告されている SR12813 の結合様式 (Watkins *et al.*, 2003) と類似している可能性が考えられた。また、本研究では nifedipine に関して二つの結合様式が存在することを推定した。

Nifedipine と同じジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬である amlodipine は、レポーターアッセイにおいて変異型 PXR に対する活性化パターンが nifedipine と類似した結果を示した。さらに、ジヒドロピリジン誘導体である nicardipine, isradipine および BK8644 も PXR を活性化することが報告されている (Drocourt *et al.*, 2001)。これらのことより、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬は、今回推定した nifedipine の PXR 結合様式と類似した結合様式である可能性が考えられた。

以上より、PXR の活性化におけるアミノ酸置換の影響は化合物により大きく異なることが明らかとなった。また、PXR のリガンド結合に関与するアミノ酸残基は化合物によって異なり、リガンドによっては PXR との結合に複数の結合様式が存在する可能性が示唆された。本研究は、リガンド結合ポケット内のアミノ酸残基をほぼ全て置換し、化合物による PXR 活性化への影響を検討した初めての報告である。実験結果に基づいて推定したリガンド結合様式は、PXR のリガンド結合を予測する上で有用な知見になると考えられる。

E. 結論

今年度の研究では、リガンド結合ポケット内のアミノ酸 28 種のうち、Ala²⁴⁴を除く 27 種についてそれぞれのアミノ酸置換体を作成し、13 種類の化合物による PXR 活性化への影響を検討した。その結果、PXR の活性化におけるアミノ酸置換の影響は化合物によ

り大きく異なることが明らかとなった。また、2 種の化合物について PXR とのドッキングを行なうことにより、リガンドと相互作用するアミノ酸残基を推定した。その結果、PXR のリガンド結合に関与するアミノ酸残基は化合物によって異なり、リガンドによっては PXR との結合に複数の結合様式が存在する可能性が示唆された。今年度の研究において行った PXR のリガンド結合様式の推定は、リガンド結合ポケット内のアミノ酸残基をほぼ全て置換し、化合物による PXR 活性化への影響を検討するという実験結果に基づいている。この手法は、PXR のリガンド結合を予測する上で有用な知見になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toshiyuki Shimizu, Kei Akimoto, Takuya Yoshimura, Takuro Niwa, Kaoru Kobayashi, Michio Tsunoo and Kan Chiba: Autoinduction of MKC-963 [(R)-1-(1-cyclohexylethylamino)-4-phenylphthalazine] metabolism in healthy volunteers and its retrospective evaluation using primary human hepatocytes and cDNA-expressed enzymes. *Drug Metab Dispos* 34:950-954, 2006.

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

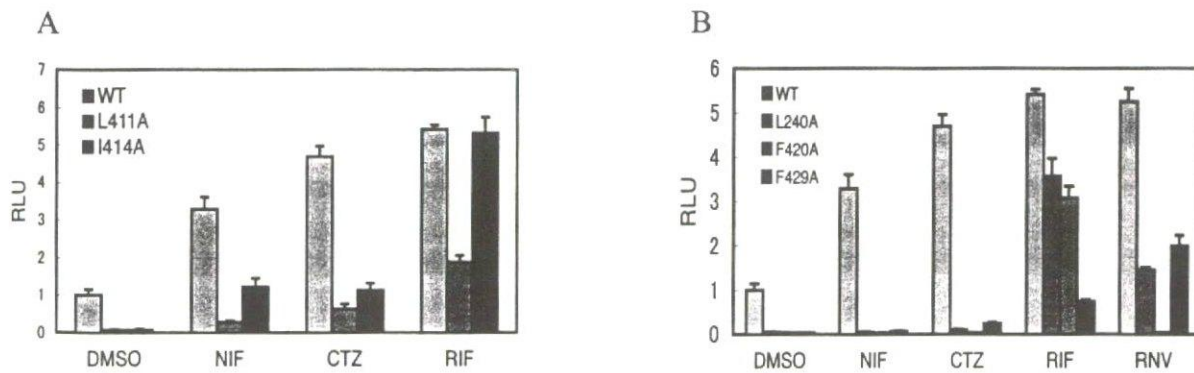


Fig. 1 Effects of L411A, I414A, L240A, F420A and F429A mutations on the PXR activation. Relative luciferase activity (RLU) is expressed as values relative to WT treated with DMSO alone. All data are mean \pm S.D. of three experiments, each performed in duplicate. NIF, 10 μ M nifedipine; CTZ, 10 μ M clotrimazole; RIF, 10 μ M rifampicin.

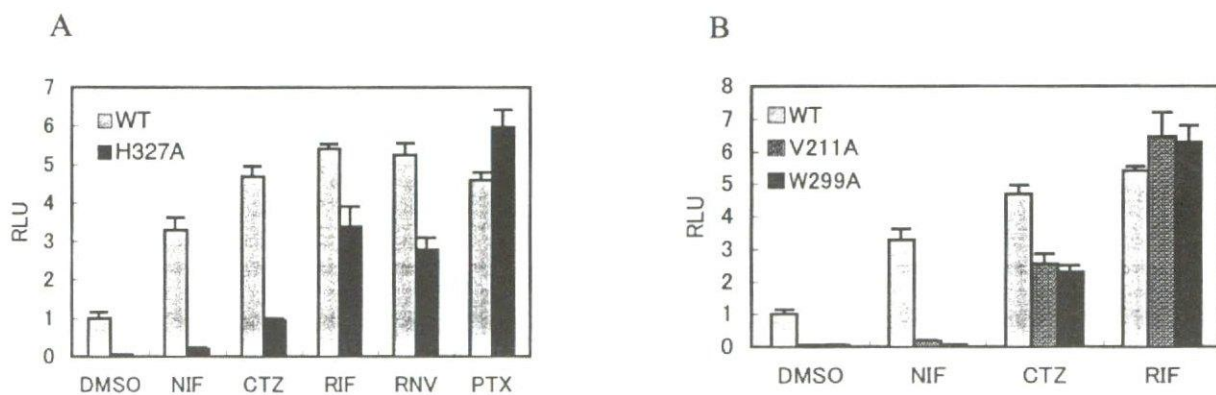


Fig. 2 Effects of H327A, V211A and W299A mutations on the PXR activation. Relative luciferase activity (RLU) is expressed as values relative to WT treated with DMSO alone. All data are mean \pm S.D. of three experiments, each performed in duplicate. NIF, 10 μ M nifedipine; CTZ, 10 μ M clotrimazole; RIF, 10 μ M rifampicin; RNV, 10 μ M ritonavir; PTX, 10 μ M paclitaxel.

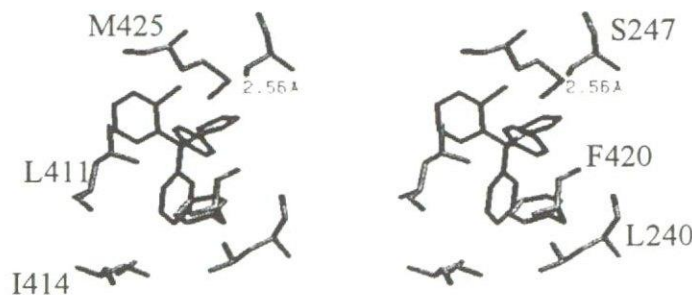


Fig. 3 Proposed interactions between PXR and clotrimazole. Clotrimazole was docked into ligand binding pocket of PXR and the energy was minimized. Stereoview of a binding mode that F420 participates in clotrimazole binding. Key residues interacting with clotrimazole are extracted.

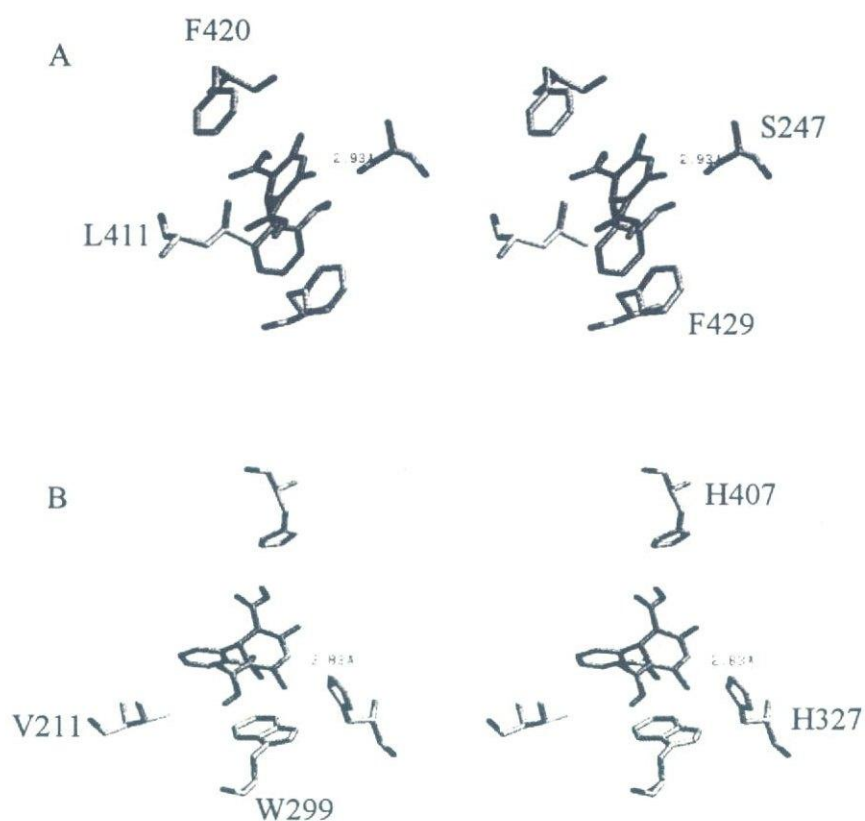


Fig. 4 Proposed interactions between PXR and nifedipine. Nifedipine was docked into a ligand binding pocket of PXR and the energy was minimized. Stereoview of binding modes that F420 (A) and W299 (B) participate in nifedipine binding. Key residues interacting with nifedipine are extracted. Hydrogen bonds are indicated with dotted line.

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19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