

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

：ナノメディシン研究

ナノ分子イメージングを活用した次世代創薬アプローチ

(H19-ナノ-一般-006)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 盛 英三

平成20年（2008年）3月

目次

I. 総括研究報告

ナノ分子イメージングを活用した次世代創薬アプローチ----- 1

主任研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

II. 分担研究報告

I. 標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計／探索（創薬スクリーニング）

①標的タンパクと相互作用する化合物の探索／設計-----13

若林繁夫 国立循環器病センター研究所循環分子生理部部長

平山令明 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学教授

②次期治療標的タンパクの構造解析-1-----18

武田壮一 国立循環器病センター研究所心臓生理部室長

盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

次期治療標的タンパクの構造解析-2-----24

増田道隆 国立循環器病センター研究所循環器形態部室長

II. 分子機能を蛍光イメージングで評価する技術（薬効スクリーニング）の開発

----- 26

望月直樹 国立循環器病センター研究所循環器動態部長

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----29

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----32

厚生科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究)

総括研究報告書

ナノ分子イメージングを活用した次世代創薬アプローチ

主任研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨：本研究の目的はがんや循環器疾患の分子標的薬剤の開発に向けて、I.標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計/探索と、II.分子機能を蛍光イメージングで評価する技術の開発を推進することである。分子構造解析研究では新規疾患関連タンパクの構造決定と、構造を決定した分子構造をもとに医薬品を *in silico* で探索/設計を目指す。本年度は CHP 2 複合体の構造にもとづく医薬品探索と蛇毒由来 ADAM ホモログタンパク質 2 種類 (RVV-X,VAP2) と細胞内情報伝達分子 IRSp53 他の構造を決定した。また、分子機能解析研究では新規 GTP 結合蛋白質 Rit, Rin ファミリーの機能を解析してあらたな分子標的治療薬の開発に繋げる研究を目指し、Rit が他の癌遺伝子 Cdc42 の水解促進に作用することを突き止めた。

分担研究者

望月直樹

(国立循環器病センター研究所・部長)

若林繁夫

(国立循環器病センター研究所・部長)

平山令明

(東海大学医学部・教授)

武田壮一

(国立循環器病センター研究所・室長)

増田道隆

(国立循環器病センター研究所・室長)

A. 研究目的

本研究の目的はがんや循環器疾患の分子標的薬剤の開発に向けて、I. 標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計/探索 (創薬スクリーニング)、II. 分子機能を蛍光イメージングで評価する技術 (薬効スクリーニング) の開発を推進することである。

I. 創薬スクリーニング：疾患関連タンパクの構造を決定し、その分子構造をもとに医薬品を *in silico* で探

索/設計する。

① 標的タンパクと相互作用する化合物の探索/設計

細胞膜を介するイオン輸送を担うタンパク質の制御破綻はさまざまな疾患の原因となる。とりわけ Na⁺/H⁺ 交換輸送体(NHE)は虚血性心疾患や慢性心臓疾患に関与するとされる重要なタンパク質であり、またその必須タンパク質 CHP の第二アイソフォーム (CHP2) は癌細胞特異的に発現し、癌の速い増殖に関与することが示唆されている。最近 CHP2/NHE1 ペプチド複合体の結晶構造を 2.7Å の解像度で明らかにした。本研究は、複合体の結晶構造に基づいた化合物デザイン、生化学的スクリーニングおよび機能解析による上記タンパク質の阻害剤の発見さらに関連する新規創薬標的の探索を行い、新しい創薬開発の基盤とすることを目的とする。

② 次期治療標的タンパクの構造解析

蛇毒 ADAM ホモログ分子の構造解析を行った。各種サイトカインや増殖因子は膜結合前駆体として細胞膜に発現し、細胞外プロテアーゼによる切断 (エクストドメインシェディング) により遊離型となり、自

分自身あるいは近隣の細胞に提示された受容体分子に結合してシグナルを伝える。ADAM ファミリータンパク質はシェディング酵素として癌、アルツハイマー病、喘息、リウマチ性関節炎、心肥大など様々な疾患に関わり、重要な創薬ターゲットの一つとなっている。しかし、ADAM は非常に多くの SS 結合を含み構造解析に必要なリコンビナントタンパク質をつくるのが非常に困難であり、立体構造の解明は進んでいない。蛇毒には ADAM と同様なタンパク質成分が多く含まれ、我々はその一つ VAPI を用いて初めて ADAM の基本立体構造を明らかにすることに成功している(Takeda et al. EMBO J (2006))。蛇毒 ADAM ホモログ分子に着目し、その立体構造解析を進めることで ADAM ファミリータンパク質の構造構築原理への理解を深め、創薬の基盤となる情報を得ることを目的とする。

細胞内情報伝達分子である IRSp53 と Fer キナーゼについても構造解析を行った。これらのタンパク質は脂質結合・変形活性をもつ共通のドメイン構造を有する。

II. 薬効スクリーニング

血管新生、血管老化における低分子量 GTP 結合蛋白質の制御機構についての研究、さらに薬剤スクリーニング系の構築を目指した。これまで cAMP 依存性に Rap1 が活性化されるが、Rit も同様に活性化されることが報告されていた。今回 Rit の活性化にともない誘導される細胞内情報伝達系の検討をまず行った。これまでに Rit の活性化による細胞内情報伝達系の調節機構はまったく解明されておらず、この分子の機能が明らかになれば、血管新生・老化における同分子のかかわりを明らかにすることができると考えた。これまでに Ras ファミリーGTP 結合タンパク質の活性化の可視化を行って来た実績から、Rit の活性化可視化プローブの作成も試みる。また Rit の可視化プローブの作成により、この分子の活性化抑制薬のスクリーニング系の構築にまで発展させることが可能と考え、本研究を行

う。

B. 研究方法

I. 標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計／探索 (創薬スクリーニング)

① 標的タンパクと相互作用する化合物の探索／設計

CHP2/NHE 複合体の結晶構造にフィットする化合物をインシリコで検索し、生化学的あるいは細胞生理学的方法に基づき化合物の効能を検討する。並行して、新たな制御因子の探索と結晶構造解析へと研究を進める。

② 次期治療標的タンパクの構造解析

①北米産ガラガラヘビ *Crotalus atrox* 由来の血管内費細胞のアポトーシス誘導活性と血小板凝集阻害活性を有する catrocollastatin/VAP2B、および②血液凝固第 X 因子 (Factor X) を特異的に活性化するラッセルクサリヘビ *Daboia russell* 由来の RVV-X (Russell's viper venom factor X activator) の 2 つの ADAM ホモログタンパク質分子をターゲットとした。それぞれを単離精製し、結晶化を行い、放射光 X 線源 (SPring-8) を用いて回折データ収集を行い、立体構造を決定した。

細胞内情報伝達分子タンパク群 (IRSp53、Fer キナーゼ) の構造を解析アプローチを以下に記す。Rac や Cdc42 のエフェクター分子 IRSp53 の脂質膜結合ドメインと、IP3 などの脂質ヘッドグループとの共結晶を作製し、X線回折法により構造を決定した。また、多数のトリプトファン変異体を作成し、FRET 解析により、リポソームとの相互作用の部域特異性についての情報を得た。Fer キナーゼの全長および脂質膜結合ドメインの結晶を作製し、X線回折法により構造の決定を目指した。

II. 分子機能を蛍光イメージングで評価する技術 (薬効スクリーニング) の開発

細胞：HEK293細胞、COS7細胞は、通常のDMEM

10%FBSで培養をおこなった。ヒト臍帯静脈の血管内皮細胞(HUVEC)はクラボウ社のHumedia-2を用いて継代培養を行って passage が8回以下の細胞を実験に用いた。

蛍光タイムラプスイメージング：

HUVEC細胞にRit-GFPを発現させて細胞の運動をモニターリングした。またCOS細胞にRitの優勢活性化型、野生型、優勢劣性型のRitを発現させて、細胞の形態変化を検討した。

活性化型Rit結合蛋白質の検討：

これまでRas分子の下流で機能するといわれているRal活性化因子RalGEF3に結合するか否かを調べた。ほかにRas associationドメインを有する複数の分子についてこれらの分子とRitとの結合をプルダウンアッセイで検討した。

Ritの胞膜移行の検討：

RitはRasファミリー分子のなかでカルボキシ末端にCAAXモチーフを有さない分子であり、その局在もこれまではっきりしていなかったが、GFP蛍光蛋白質をアミノ末端に付加してその細胞内局在を検討するとともに、細胞膜への局在化モチーフを調べた。

C. 研究結果

1. 標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計／探索（創薬スクリーニング）

①標的タンパクと相互作用する化合物の探索／設計

CHP2 を特異的に阻害する低分子を発見する目的で、NHEの一部と CHP2 からなる複合体結晶構造(図1)を基に、バーチャル・スクリーニングを行った。CHP2 の分子表面には、NHE 分子が結合する大きな空洞があり、本年度はこの空洞に結合し得る低分子を市販分子ライブラリから主としてドッキング法を用いてスクリーニングした。



図1：Na⁺/H⁺交換輸送体と制御タンパク CHP の複合体の構造

スクリーニングは主に次の5段階に分けて行った。第1段階では、蛋白質構造の準備を行った。蛋白質X線解析で得られる分子構造では、N原子とO原子の判別が困難であり、H原子の位置が求められないことから、アミノ酸側鎖の原子帰属は明確ではない。そこで、プログラム Reduce などを用いて、最も妥当な側鎖構造を構築し、最適な位置にH原子を付加した。第2段階では、CHP2表面にあり、低分子が結合できる場所の予測を行った。本年度は、NHEの一部を完全に除去した場合に得られる CHP2表面を解析の対象とした。この目的にはプログラム・システム MOE 中の Alpha Site Finder を主に活用した。CHP2 の NHE 結合部位には、少なくとも3箇所の低分子結合部位が存在することが予測された。第3段階では、現在国内で使用されている医薬分子(約1,200種)と CHP2表面の予想結合部位の結合性をドッキング計算に基づき解析した。この目的は、これらの結合部位を市販医薬分子で探ることにある。ドッキング計算にはプログラム ASEDock を用いた。第4段階では、弱いながらも結合性が確認された複数の医薬分子の化学構造に共通する特徴を抽出し、その特徴を具えた分子を、市販分子ライブラリー(約500万分子)から絞り込んだ。第5段階では、前段で探索した分子と CHP2表面の予想結合部位との結

合性をドッキング計算により求めた。

以上のバーチャル・スクリーニングに基づき、複数の阻害剤候補分子を提案した。一つの候補分子が CHP2 表面に結合する様子を次の図2に示す。阻害剤候補分子は空間充填モデルで表現した。

バーチャル・スクリーニングで得られた分子の内、20種類の化合物について、①CHP2/NHE1-ペプチド複合体の安定性の検討、②インビトロプルダウン法、③細胞を用いた共免疫沈降法によって、CHP2 と NHE1 との相互作用が影響されるかどうかをアッセイした。その結果、いずれの場合も相互作用をブロックすることはできなかった。

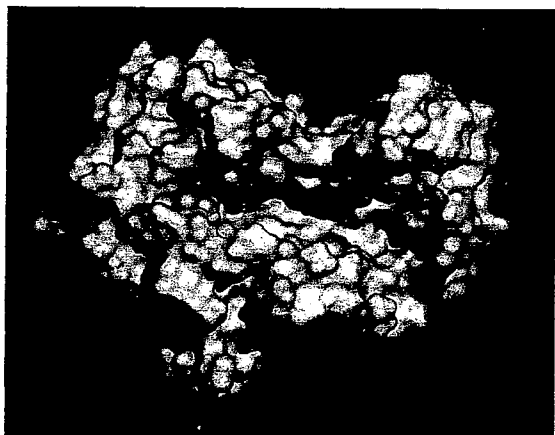


図2：CHP2疎水性の溝に結合する化合物のモデル

②次期治療標的タンパクの構造解析

ターゲットとした2つのADAMホモログ分子についてそれぞれ分子構造の決定に成功。ガラガラヘビ毒より抽出した catrocollastain/VAP2B の結晶構造を 2.15 Å の分解能で明らかにした (図3：Igarashi et al. FEBS Lett. (2007))。

本研究では3つの異なる結晶系の結晶から独立した計6分子の catrocollastain/VAP2B 分子の構造解析、精密化を行い、それらの構造および既に報告した VAP1 構造との比較から各サブドメイン間の可動性を見出し、ADAM 分子の機能との相関について議論を行った (図4)。

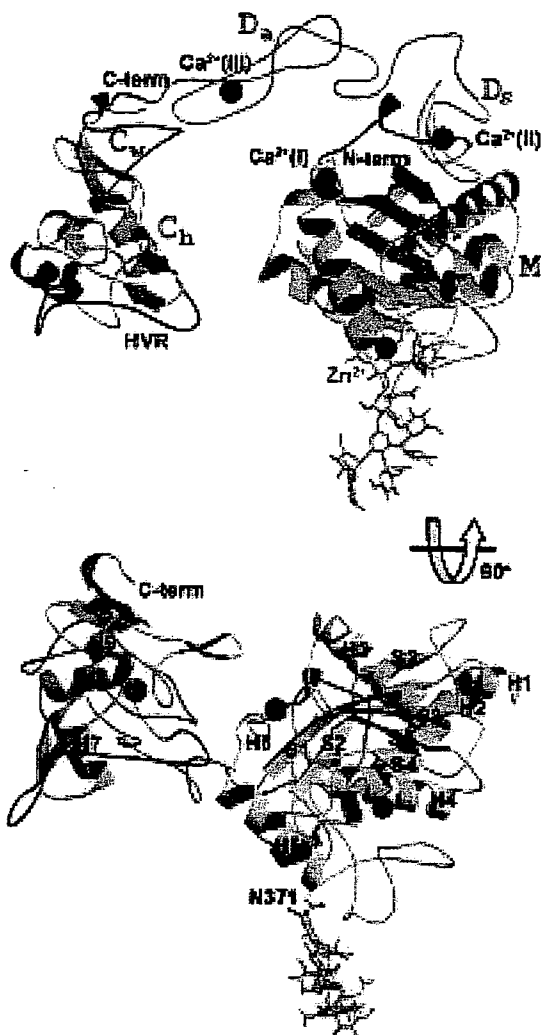


図3：M:メタロプロテアーゼドメイン、D:ディスインテグリンドメイン、C:システインリッチドメイン、HVR: Hyper Variable Region

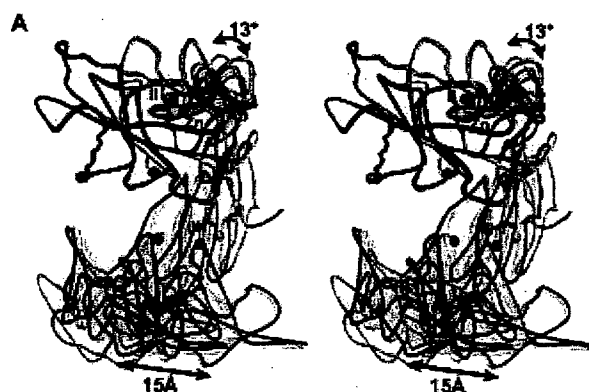


図4：緑：VAP1 M-ドメイン
青・赤：代表的 VAP2 M-ドメイン

RVV-X は ADAM と相同の重鎖に加え、C 型レクチン様の二つの軽鎖を持つ、ヘテロ三量体タンパク質である。結晶構造解析によりこれら 3 つのポリペプチド鎖の相互作用の詳細を明らかにすることに成功した(図 5、Takeda et al. FEBS Lett. (2007))。

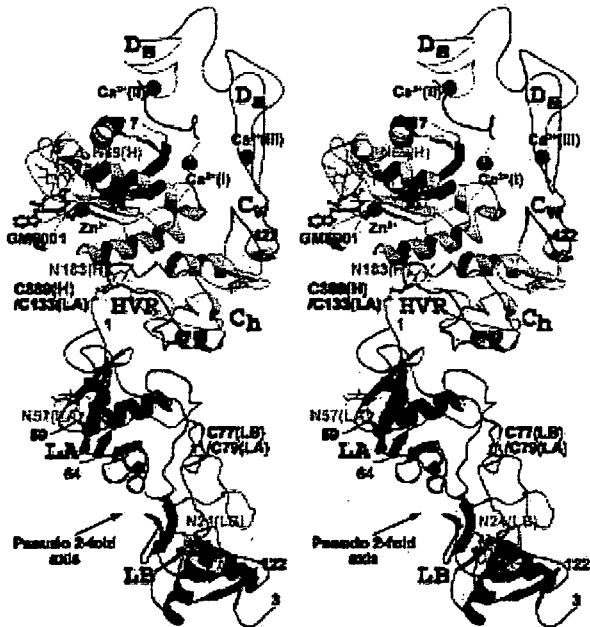


図 5 : M, D, C, HVR : 図 1 と同じ
LA, LB : レクチン様軽鎖

興味深い事に我々が VAP1 の結晶構造から ADAM におけるターゲット認識の可能性部位として同定した超可変領域(Hyper variable region (HVR)が重鎖と軽鎖の一つの相互作用部位となっていた。さらに 2 つの軽鎖は Factor X 結合因子である X-bp と非常に高い立体構造の相同性を示し、RVV-X の軽鎖は Factor X の Gla ドメインを特異的に認識するエクソサイトを形成することが示唆された。これを基にドッキングモデルと RVV-X による Factor X 活性化メカニズムを提案した (図 6)。

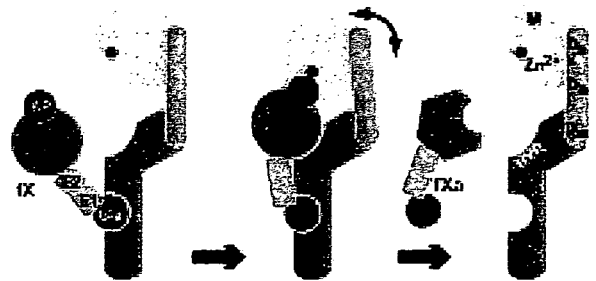


図 6 : RVV-X による Factor X 活性化メカニズム

IRSp53 の脂質結合ドメインおよび脂質結合活性部位を欠損した変異体の結晶構造を、2.0Å および 1.7 Å の高分解能で明らかにすることに成功した (図 7)。IP3 との共結晶を 2 種類作製し、結晶構造解析が進行中である。トリプトファン変異体によるリポソーム結合解析では、これまでの知見と一致しないデータがでており、脂質膜変形の新しい機構を提案すべく研究を進めている。

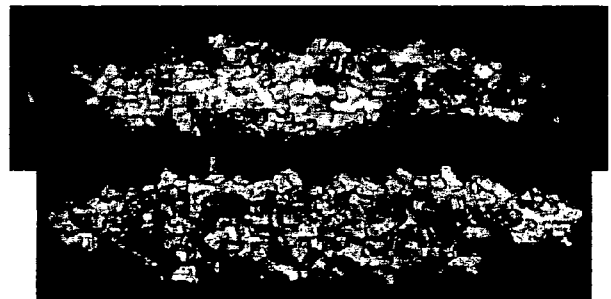


図 7 :

Fer キナーゼに関しては、脂質結合活性を持つ N-端の結晶作製に成功し、結晶構造解析が進行中である。全長については、大腸菌による効率的なタンパク発現に成功し、結晶化条件をスクリーニングしている段階である。

II. 分子機能を蛍光イメージングで評価する技術 (薬効スクリーニング) の開発

Rit の細胞膜局在化 :

Rit は GFP との融合蛋白質として COS7 細胞に発現させた時には、細胞膜に局在し、これは R 他の Ras 分子と

は違って、細胞膜のみに局在化して、ほかの細胞内小器官の膜(Golgiなど)には局在しなかった。カルボキシ末端にLysが反復して存在しこのPoly basic領域を欠損させると細胞膜への局在が阻害された。つまり、この部位が細胞膜局在に重要であることがわかった。

さらに、Thin layer chromatographyによってRitのGTP, GDPフォームが細胞内でどちらが優位であるかを検討したところGTP結合型Ritとして発現していることがわかった。つまり、GTPase活性が弱いGTPaseであることもわかった。

Rit結合蛋白質：

RAドメインをもつ分子SNX27, AF6, PI3K, RalGEF, RGLなどとRitの結合を検討したが、RGL3のみ結合して、これはGTP依存的であった。RGL3-RAドメインを用いたPull-down assayではRIT-QL(活性化型)が強く沈降してきたために、RGL3がRitの活性化を細胞内で検討するツールとして有用であることがわかった。

Ritの細胞での機能：

Ritを発現させるとRhoファミリー分子のCdc42のGAP活性が増加して、Cdc42が不活性化されることがわかった。このために、Cdc42のGAPドメインを持ち、かつRAドメインを含む分子をRitの標的あるいは結合蛋白と予想して、これらの分子とRitとの結合を調べたところKIAA1391分子との弱い結合を見出すことができた。RitによるCdc42の不活性化とHUVECの細胞運動の阻害結果は矛盾しなかった。

薬剤スクリーニング系：

これまでのPI3Kの活性化可視化プローブをHEK293細胞に発現させて、この活性阻害をみるスクリーニング系を構築したが、96 wellのプレートでは、スクリーニングの効率が悪くまた、十分なSensitivity, specificityがえられなかった。

D. 考察

1. 標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計／探索（創薬スクリーニング）

① 標的タンパクと相互作用する化合物の探索／設計

バーチャル・スクリーニングで得られた分子の内、20種類の化合物について、CHP2/NHE1-ペプチド複合体の相互作用をブロックすることはできなかった。この結果は、CHP2の結合部位に対して絞り込んだ低分子化合物によっては排除するのが困難なほどにNHE1が強力に結合することを示す。今後はCHP2の他のドメインに着目したデザインが必要と思われる。また、NHE1の新規制御因子を複数見出しており、次年度以降の機能・構造解析に取り組んでいく。

② 次期治療標的タンパクの構造解析

二つの蛇毒 ADAM ホモログタンパク質の結晶構造解析により、ADAMファミリータンパク質に共通したサブドメイン間の可動性やターゲット認識機構に関する新しい知見を得ることに成功した。特にRVV-Xの結晶構造はHVRを介したタンパク質間相互作用を明らかにした初めての例であると共に、ADAMファミリータンパク質が分子進化的に基質特異性を獲得したことを示唆する興味深い事例である。また、RVV-Xにおいては酵素活性部位と65 Å離れた部位に基質認識のエクソサイトが存在し、このような空間的に離れた部位に存在するエクソサイトが他のADAMファミリータンパク質においてもターゲット特異性の決定に重要である可能性を示唆した。

IRSp53の脂質結合ドメインの結晶構造と脂質結合部位の決定は、BARドメインの脂質膜結合の詳細を明らかにし、生体膜のダイナミックスの制御をターゲットとする薬剤の開発の基盤情報となる。Ferキナーゼの結晶構造の解明は、Fer-Fesファミリーキナーゼの特異的性質を明らかにするとともに、脂質結合とキナーゼ活性がどのように調節されているかについて示唆を得ることができる。さらに、内皮細胞

の透過性制御や機械刺激受容を調節する薬剤の開発につながる可能性がある。またこれらの研究は、新たな細胞生物学の研究領域の創成に資する。

II. 分子機能を蛍光イメージングで評価する技術 (薬効スクリーニング) の開発

血管発生時には血管内皮細胞間接着の促進が重要であり、これまでに cAMP-Epac-Rap1 の活性化が Cadherin 接着を増強させることでこれを制御していると考えて研究を行ってきた。cAMP の下流で Rit も活性化されると報告されているために、本研究では血管内皮細胞での Rit の機能を検討するとともに、Rit 可視化プローブの作成により、この cAMP-Rit 系を調節する薬剤のスクリーニングまで発展させるために本研究を行った。

これまで YFP-smallG-effectoe-CFP というプローブが非常に有効であることから、まず Rit の effector を探すことから本研究を開始した。RGL3 が GTP 結合型 Rit と相互作用することが判明した。次年度以降には、Rit-RGL3 を骨格とした分子プローブの作成を計画したい。

また、Rit の細胞内での機能が Cdc42 の水解促進作用であることも突き止めた。COS7 細胞で Rit を発現させたときに GST-CRIB によるプルダウンアッセイで上記を示すことができた。さらに血管内皮細胞を用いた cell tracking assay で GFP-Rit 発現細胞が有意に細胞運動が抑制されていた。これも Cdc42 の抑制効果として矛盾しない結果であると考えられた。

さらに薬剤スクリーニング系の構築を目標に PI3K の活性阻害、活性増強薬をスクリーニングするために 96 穴細胞培養系を確立を試みたが、細胞へのプローブの導入効率などの問題で、今後さらに改良が必要であると考えられた。

E. 結論

I. 標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計／探索 (創薬スクリーニング)

①標的タンパクと相互作用する化合物の探索／設計

CHP2/NHE 複合体の結晶構造に基づき、その相互作用部位にフィットする化合物をインシリコで検索し、生化学的あるいは細胞生理学的方法に基づき化合物の効能を検討した。並行して、新たな制御因子の探索と結晶構造解析へと研究を進めている。

②次期治療標的タンパクの構造解析

ADAM ファミリータンパク質をターゲットとした創薬の基盤となる 2 つの蛇毒 ADAM ホモログタンパク質の構造決定を行った。計 3 つの蛇毒 ADAM ホモログの構造決定により哺乳動物 ADAM の基本分子構造が明らかになり、創薬対象であるヒト ADAM 分子を実際に構造解析する足がかりが掴めた。細胞内情報伝達分子 (IRSp53, Fer キナーゼ) についても成果をあげた。

研究協力者：五十嵐智子

II. 分子機能を蛍光イメージングで評価する技術 (薬効スクリーニング) の開発

血管構築細胞の細胞間接着に重要であると予想する低分子量 GTP 結合タンパク質 Rit の機能について検討し、Rit が Cdc42 の GTPase の活性化にかかわることを示唆する結果を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(研究業績「欧文」)

【原 著】

1. Hisamitsu T, Yamada K, Nakamura TY, Wakabayashi S: Functional importance of charged residues within the putative

- intracellular loops in pH regulation by Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. *FEBS J.* 274: 4326-4335, 2007.
2. Iwata Y, Katanosaka Y, Hisamitsu T, Wakabayashi S: Enhanced Na⁺/H⁺ exchange activity contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy via involvement of P2 receptors. *Am J Pathol.* 171(5): 1576-1587, 2007.
 3. Mishima M, Wakabayashi S, Kojima C: Solution structure of the cytoplasmic region of Na⁺/H⁺ exchanger 1 complexed with essential cofactor calcineurin B homologous protein 1. *J Biol Chem.* 282(4): 2741-2751, 2007.
 4. Horio K, Muta H, Goto J, Hirayama N: A Simple Method to Improve the Odds in Finding 'Lead-Like' Compounds from Chemical Libraries. *Chem. Pharm. Bull.* 55: 980-984, 2007.
 5. Miyata T, Li M, Yu X, Hirayama N: Megsin Gene: Its Genomic Analysis, Pathobiological Functions, and Therapeutic Perspectives. *Current Genomics.* 8(3): 203-208, 2007.
 6. Nangaku M, Izuhara Y, Takizawa S, Yamashita T, Fujii-Kuriyama Y, Ohneda O, Yamamoto M, van Ypersele de Strihou C, Hirayama N, Miyata T: A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(12): 2548-2554, 2007.
 7. Sakai K, Sakurai R, Hirayama N: Molecular Mechanisms of Dielectrically Controlled Resolution (DCR). *Topics in Current Chemistry* 2007. 269: 233-272, 2007.
 8. Soga S, Shirai H, Kobori M, Hirayama N: Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites. *J.Chem.Inf.Model* 2007. 47: 400-406, 2007.
 9. Soga S, Shirai H, Kobori M, Hirayama N: Identification of the Druggable Concavity in Homology Models Using the PLB Index. *J Chem Inf Model.* 47(6): 2287-2292, 2007.
 10. Tanaka R, Hirayama N: Structure of Etoposide. *Analytical Sciences.* 23(2): x29-x30, 2007.
 11. Tanaka R, Kawamura T, Hirayama N: Structure of Tiaramide. *Analytical Sciences.* 23(6): x105-x106, 2007.
 12. Tanaka R, Hirayama N: Crystal Structure of Meticrane. *Analytical Sciences.* 23(7): x119-x120, 2007.
 13. Beppu K, Kaneko Y, Kadokawa J, Mori H, Nishikawa T: Synthesis of Sugar-Polysiloxane Hybrids Having Rigid Main-Chains and Formation of their Nano Aggregates. *Polymer Journal.* 39 (10): 1065-1070, 2007.
 14. Fukuyama N, Jujo S, Ito I, Shizuma T, Myojin K, Ishiwata K, Nagano M, Nakazawa H, Mori H: Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of Lovo cells in a mouse model in vivo. *Nutrition.* 23(1): 81-86, 2007.
 15. Fukuyama N, Tanaka E, Tabata Y, Fujikura H, Hagihara M, Sakamoto H, Ando K, Nakazawa H, Mori H: Intravenous injection of phagocytes transfected ex vivo with FGF4 DNA/biodegradable gelatin complex promotes angiogenesis in a rat myocardial ischemia/reperfusion injury model. *Basic Res Cardiol.* 102(3): 209-216, 2007.
 16. Igarashi T, Araki S, Mori H, Takeda S: Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of

- ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. FEBS Lett. 581(13): 2416-2422, 2007.
17. Kawada T, Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, Kamiya A, Uemura K, Mori H, Sugimachi M: Hypothermia reduces ischemia and stimulation-induced myocardial interstitial norepinephrine and acetylcholine releases. J Appl Physiol. 102(2): 622-627, 2007.
 18. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Li M, Zheng C, Shishido T, Mori H, Sugimachi M: Angiotensin II attenuates myocardial interstitial acetylcholine release in response to vagal stimulation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(4): H2516-2522, 2007.
 19. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Shishido T, Shimizu S, Mizuno M, Mori H, Sugimachi M: Regional difference in ischaemia-induced myocardial interstitial noradrenaline and acetylcholine releases. Auton Neurosci. 137(1-2): 44-50, 2007.
 20. Kuroko Y, Yamazaki T, Tokunaga N, Akiyama T, Kitagawa H, Ishino K, Sano S, Mori H: Cardiac epinephrine synthesis and ischemia-induced myocardial epinephrine release. Cardiovasc Res. 74(3): 438-444, 2007.
 21. Myojin K, Taguchi A, Umetani K, Fukushima K, Nishiura N, Matsuyama T, Kimura H, Stern DM, Imai Y, Mori H: Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography. Am J Neuroradiol. 28(5): 953-957, 2007.
 22. Sagae M, Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J, Ido H: Intense clean characteristic flash x-ray irradiation from an evaporating molybdenum diode. Opt Eng. 46(026502): 1-7, 2007.
 23. Sato E, Germer R, Obara H, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Ichimaru T, Takahashi K, Sato S, Takayama K: Novel monochromatic x-ray generators and their applications to high-speed radiography (6279). SPIE. 627906(1-12), 2007.
 24. Sato E, Sagae M, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Ichimaru T, Takayama K: High-sensitive radiography system utilizing a pulse x-ray generator and a night-vision CCD camera (MLX). SPIE. 6279(627941): 1-6, 2007.
 25. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawakami H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Takayama K, Onagawa J: K-edge magnification digital angiography using a 100µm-focus tungsten tube. Opt Eng. 46(026503): 1-6, 2007.
 26. Sukmawan R, Yada T, Toyota E, Neishi Y, Kume T, Shinozaki Y, Mori H, Ogasawara Y, Kajiya F, Yoshida K: Edaravone preserves coronary microvascular endothelial function after ischemia/reperfusion on the beating canine heart in vivo. J Pharmacol Sci. 104(4): 341-348, 2007.
 27. Takeda S, Igarashi T, Mori H: Crystal structure of RVV-X: An example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. FEBS Lett. 581(30): 5859-5864, 2007.
 28. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: Important role of endogenous hydrogen peroxide in pacing-induced metabolic coronary vasodilation in dogs in vivo. J Am Coll Cardiol. 50(13): 1272-1278,

- 2007.
29. Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, Komaki F, Mori H, Kawada T, Sunagawa K, Sugimachi M: Characterization of ouabain-induced noradrenaline and acetylcholine release from in situ cardiac autonomic nerve endings. *Acta Physiol (Oxf)*. 191(4): 275-284, 2007.
 30. Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, Takeshita S, Mori H, Kodama M, Kangawa K, Aizawa Y, Nagaya N: Single injection of a sustained-release prostacyclin analog improves pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 177(2): 195-201, 2008.
 31. Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, Takaki A, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiyama F: Role of Cu,Zn-SOD in the synthesis of endogenous vasodilator hydrogen peroxide during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(1): H441-448, 2008.
 32. Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu K, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T, Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N: Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1/ErbB signaling. *J Clin. Invest* 117:1771-1181, 2007
 33. Takaya A, Kamio T, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M: R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol Biol Cell*. 18:1850-60,2007
 34. Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M: A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin. Invest* 117: 2812-2824, 2007
- 【総説】
1. 若林繁夫, 岩田裕子, 中村(西谷)友重, 久光隆, ベンアマー・ヨセフ: Na⁺/H⁺交換輸送体の構造・機能と病態的意義. 循環器病研究の進歩(通巻47号). XXVIII(1): 73-82, 2007.
 2. 若林繁夫, 久光隆, ベンアマー・ヨセフ, 中村(西谷)友重, 岩田裕子: 動物細胞 Na⁺/H⁺交換輸送体: 分子から疾患まで. 生化学. 79(6): 579-587, 2007.
 3. 武田壮一: ADAMファミリータンパク質のドメイン構造. 生化学. 79(11): 1051-1055, 2007.
 4. 武田壮一: 蛇毒メタロプロテアーゼの結晶構造とADAMファミリーの基質認識機構. 日本結晶学会誌. 49: 192-197, 2007.
- 【学会発表】
1. Takeda S: "Snake venom metalloproteinases: crystal structures and relationship to the mammalian ADAM family proteins", The 5th Aso International Meeting (AIM) Thrombosis, Hemostasis, and Vascular Science, Aso, Kumamoto, Japan, 2007.5.
 2. Takeda S: "ADAMs'MDC domain architecture revealed by the crystal structures of snake venom metalloproteinases", Gordon Research Conference: Matrix Metalloproteinases, II

- Ciocco, Barga, Italy, 2007.6.
3. 武田壮一: "蛇毒高分子量メタロプロテアーゼの結晶構造から見えてきた ADAM ファミリータンパク質の基本構造", BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会), 「ベノミクス・毒生物ゲノムプロジェクト」ワークショップ, 横浜, 2007.12.
 4. 五十嵐智子, 荒木聡彦, 盛英三, 武田壮一: "ヘビ毒メタロプロテアーゼの X 線結晶構造解析による ADAM タンパク質の基本構造の解明" 第 7 回日本蛋白質科学会年会, 仙台, 2007.5.
 5. Kuroko Y, Yamazaki T, Tokunaga N, Akiyama T, Ishino K, Sano S, Mori H: "Poster: Cariporide reduces myocardial norepinephrine efflux and myoglobin release evoked by ischemia and reperfusion", 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会, 兵庫・神戸, 2007.3.
 6. Mori H: "Structural biological approach to approach cardiovascular disease (Invited Lecture)", 13th World Congress on Heart Disease, Vancouver, Canada, 2007.7.
 7. Mori H, Nagaya N, Miyahara Y, Fujii T: "Two cell therapies to treat myocardial infarction in rats (一般演題)", World Congress of the ISHR, Bologna, Italy, 2007.6.
 8. Nagaya N, Ohgushi H, Shimizu W, Yamagishi M, Noguchi T, Noda T, Doi K, Ishida Y, Ohnishi S, Kitakaze M, Nakatani T, Mori H, Kamakura S, Kangawa K, Miyatake K, Tomoike H, Kitamura S: "Clinical trial of autologous bone marrow esenchymal stem cell transplantation for severe chronic heart failure", American Heart Association, Orland, Florida, 2007.11.
 9. Nishiura N, Mori H: "Poster: The modification of the measuring system in small animal isolated papillary muscle (II)", 第 84 回日本生理学会大会, 大阪, 2007.3.
 10. Yada T, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: "一般演題: Role of endogenous hydrogen peroxide in tachypacing-induced metabolic coronary vasodilatation in canine coronary microcirculation in vivo", 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会, 兵庫・神戸, 2007.3.
 11. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: "Protective role of hydrogen peroxide and erythropoietin during acute coronary occlusion/Reperfuion in native coronary collateral circulation in dogs in vivo", American Heart Association, Orland, Florida, 2007.11.
 12. Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, Takaki A, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: "Crucial role of Cu/Zn-SOD in the synthesis of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation in vivo", American Heart Association, Orland, Florida, 2007.11.
 13. Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, Takaki A, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: "一般演題: Role of Cu,Zn-SOD in the synthesis of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation in vivo", 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会, 兵庫・神戸, 2007.3.
 14. Hisamitsu T, Ben Ammar Y, Nakamura TY, Wakabayashi S: "Dimerization is necessary for the physiological activity of Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. (Poster)", Experimental

- Biology Annual Meeting 2007, Washington D.C.(USA), April 28-May 2. 2007.
15. Wakabayashi S: "Structural and functional aspects of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 and its obligatory binding partner CHP. (Symposium)", Experimental Biology Annual Meeting 2007, Washington D.C.(USA), April 28-May 2.2007.
 16. 若林繁夫: "創薬標的としてのイオントランスポーター・チャネル", 第8回創薬ビジョンシンポジウム, 京都テルサ, 2007.1.
 17. 若林繁夫, ベンアマー・ヨセフ, 武田壮一, 久光隆: "Na⁺/H⁺交換輸送体とその必須結合因子 CHP の構造と制御", 第84回日本生理学会大会・シンポジウム, 大阪国際交流センター, 2007.3.
 18. 久光隆, ベンアマー・ユセフ, 若林繁夫: "Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 のアミノ末端切断部位とサブユニットストイキオメリーの決定", 第2回トランスポーター研究会, 昭和大学, 2007.6.10.
 19. 岩田裕子, 中村(西谷)友重, 荒井勇二, 若林繁夫: "活性化型 Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)の心筋過剰発現マウスは拡張型心筋症を引き起こす", 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, パシフィコ横浜, 2007.12.11.
 20. 久光隆, ベンアマー・ユセフ, 若林繁夫: "アフィニティー精製に基づく Na⁺/H⁺交換輸送体1の新規結合タンパク質の同定", 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, パシフィコ横浜, 2007.12.11.
 21. 中村(西谷)友重, 岩田裕子, 若林繁夫: "活性化型 Na⁺/H⁺交換輸送体1 (NHE1)高発現マウス心筋における心肥大、心不全発症の分子・細胞メカニズム", 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会, 2007.12.11.
 22. 平山令明, 酒井健一: "Dielectrically Controlled Resolution (シンポジウム)", (DCR)の分子メカニズム「モレキュラー・キラリティー2007」, 東京理科大, 2007.5.15.
 23. 平山令明: "In silico screening: from nice-to-use to must-use technology for drug discovery", 情報計算化学生物学会・2007年大会, 広島大学, 2007.10.5.
 24. 曾我真司, 白井宏樹, 小堀正人, 平山令明: "PLB を利用した蛋白質モデル構造における医薬分子結合部位の予測", 第30回情報化学討論会, 京都大学, 2007.11.16.
 25. 曾我真司, 白井宏樹, 小堀正人, 平山令明: "アミノ酸組成を利用した医薬分子結合部位の予測", 第30回情報化学討論会, 京都大学, 2007.11.16.
- H. 知的財産権の出願・登録
1. 特願 2007-123841: 血管内皮型一酸化窒素合成酵素活性剤、及び一酸化窒素欠乏に起因疾病の予防または治療剤、発明者: 盛 英三、出願日: 平成 19 年 5 月 8 日
 2. 特願 2007-130239: 目的物質精製用タグおよび精製用タグを用いた目的物質の精製方法、発明者: 若林繁夫、出願日: 平成 19 年 5 月 16 日

分担研究報告書

ナノ分子イメージングを活用した次世代創薬アプローチ

タンパク構造解析に基づく阻害剤の発見/創製

分担研究者：若林繁夫 国立循環器病センター研究所循環分子生理部部長

平山令明 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学教授

研究要旨：本研究プロジェクトではがんや循環器疾患の分子標的薬剤の開発に向けて、標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計/探索（創薬スクリーニング）、分子機能を蛍光イメージングで評価する技術（薬効スクリーニング）の開発を推進している。本分担研究グループでは結晶構造解析に基づいた候補化合物のバーチャルスクリーニング、さらには生化学的スクリーニングを経て阻害剤を発見し創薬へと展開する研究を担当する。細胞膜イオントランスポーターの一つである Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE)の必須サブユニットであるCHP(CHP2アイソフォーム)を標的蛋白質として薬剤設計を行い、数十種類の候補化合物をピックアップできた。そのうち20種類についてCHP2/NHE相互作用をブロックするかどうかの検討を行った。

A. 研究目的

細胞膜を介するイオン輸送を担うタンパク質の制御破綻はさまざまな疾患の原因となる。とりわけ Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE)は虚血性心疾患や慢性心臓疾患に関与するとされる重要なタンパク質であり、またその必須タンパク質CHPの第二アイソフォーム(CHP2)は癌細胞特異的に発現し、癌の速い増殖に関与することが示唆されている。最近CHP2/NHE1ペプチド複合体の結晶構造を 2.7\AA の解像度で明らかにした(図1)。本研究は、複合体の結晶構造に基づいた化合物デザイン、生化学的スクリーニングおよび機能解析による上記タンパク質の阻害剤の発見さらに関連する新規創薬標的の探索を行い、新しい創薬開発の基盤とすることを目的とする。

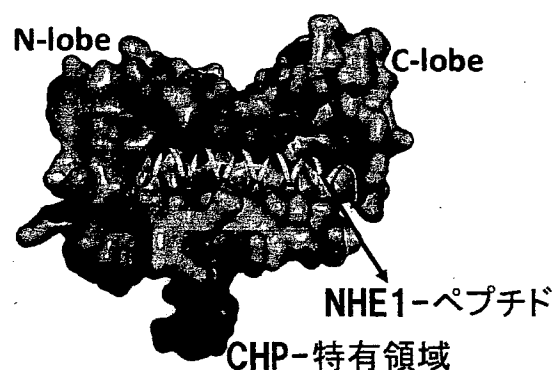


図1. CHP2/NHE1-ペプチド複合体の結晶構造
(Ben Ammar et al. EMBO J. 2006)

B. 研究方法

CHP2/NHE複合体の結晶解析で得られたCHP2の構造情報を活用して、CHP2に特異的に結合し、その作用を阻害できる分子のバーチャルスクリーニングを行った。スクリーニングは、ドッキング法および分子構造類似性に基づく探索法を併用して行っ

た。スクリーニングの対象とした分子データベースは、現在国内で使用されている医薬分子データベース（約1,200分子）および現在入手が可能な市販分子データベース（約500万分子）であり、いずれも本研究者らによって構築されたデータベースである。生化学的あるいは細胞生理学的方法に基づき化合物の効能を検討する。

C. 研究結果

CHP2の分子表面には、NHE分子が結合する大きな空洞があり、本年度はこの空洞に結合し得る低分子を市販分子ライブラリから主としてドッキング法を用いてスクリーニングした。

スクリーニングは主に次の5段階に分けて行った。第1段階では、蛋白質構造の準備を行った。蛋白質X線解析で得られる分子構造では、N原子とO原子の判別が困難であり、H原子の位置が求められないことから、アミノ酸側鎖の原子帰属は明確ではない。そこで、プログラムReduceなどを用いて、最も妥当な側鎖構造を構築し、最適な位置にH原子を付加した。第2段階では、CHP2表面にあり、低分子が結合できる場所の予測を行った。本年度は、NHEの一部を完全に除去した場合に得られるCHP2表面を解析の対象とした。この目的にはプログラム・システムMOEの中のAlpha Site Finderを主に活用した。CHP2のNHE結合部位には、少なくとも3箇所の低分子結合部位が存在することが予測された。第3段階では、現在国内で使用されている医薬分子（約1,200種）とCHP2表面の予想結合部位の結合性をドッキング計算に基づき解析した。この目的は、これらの結合部位を市販医薬分子で探ることにある。ドッキング計算にはプログラムASEDockを用いた。第4段階では、弱いながらも結合性が確認された複数の医薬分子の化学構造に共通する特徴を抽出し、そ

の特徴を具えた分子を、市販分子ライブラリー（約500万分子）から絞り込んだ。第5段階では、前段で探索した分子とCHP2表面の予想結合部位との結合性をドッキング計算により求めた。

以上のバーチャル・スクリーニングに基づき、複数の阻害剤候補分子を提案した。一つの候補分子がCHP2表面に結合する様子を図2に示す。阻害剤候補分子は空間充填モデルで表現した。

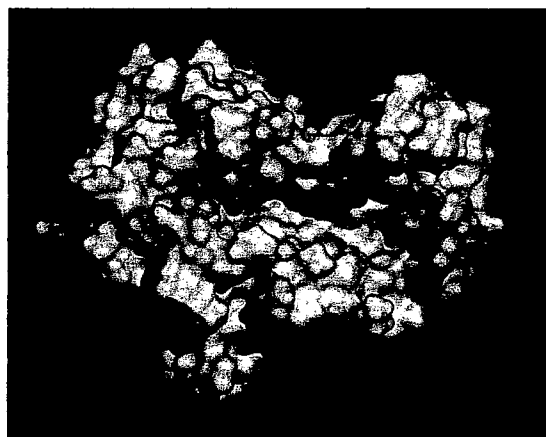


図2.CHP2表面に結合する候補分子

バーチャル・スクリーニングで得られた分子の内、20種類の化合物について、①CHP2/NHE1-ペプチド複合体の安定性の検討、②インビトロプルダウン法、③細胞を用いた共免疫沈降法によって、CHP2とNHE1との相互作用が影響されるかどうかをアッセイした。図3はCHP2/NHE1-ペプチド複合体の安定性を検討したデータの一部を示す。複合体を1mMの種々の薬剤候補存在下で24時間インキュベートした。複合体は解離することにより不安定になり分解されやすくなるという性質があり、EGTA存在下でCa²⁺キレートすると分解される(図3)。



図3. CHP2/NHE1-ペプチド複合体の安定性の検討。EGTA存在下では複合体は解離し分解されるが、化合物1-8存在下では影響なかった。

しかし、化合物1-8にはそのような作用はなかった。結果として20種類の化合物につき、上記の①-③のいずれの方法を用いた場合でも相互作用をブロックすることはできなかった。また、化合物をあらかじめCHP2と前処理する実験も行った。後者の実験のためにCHP2をSephacryl樹脂に結合したカラムを作製した（この方法はCHPカラムとNHEタグを用いた蛋白質精製法として特許を出願した：特願2007-130239）。CHPカラムと化合物をあらかじめインキュベートしたのちNHEフラグメントを後から加えても相互作用は阻害されなかった。これらの結果は、CHP2のNHE結合部位に対する低分子化合物によっては排除するのが困難なほどにNHEが強力に結合することを示している。

D. 考察と展望

平成19年度までの研究では、CHP2/NHE1の相互作用をブロックするような化合物は得られなかった。今後はCHP2の他のドメインにも着目したデザインが必要と思われる。また、CHP2以外の標的も視野に入れる必要があるかもしれない。現在、NHE1の新規制御因子を複数見出しており、次年度以降の機能・構造解析に取り組み、創薬へと展開したい。

E. 研究発表

【原著】

1. Hisamitsu T, Yamada K, Nakamura TY, Wakabayashi S: Functional importance of charged residues within the putative intracellular loops in pH regulation by Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. FEBS J. 274: 4326-4335, 2007.
2. Iwata Y, Katanosaka Y, Hisamitsu T, Wakabayashi S: Enhanced Na⁺/H⁺ exchange activity contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy via involvement of P2 receptors. Am J Pathol. 171(5): 1576-1587, 2007.
3. Mishima M, Wakabayashi S, Kojima C: Solution structure of the cytoplasmic region of Na⁺/H⁺ exchanger 1 complexed with essential cofactor calcineurin B homologous protein 1. J Biol Chem. 282(4): 2741-2751, 2007.
4. Horio K, Muta H, Goto J, Hirayama N: A Simple Method to Improve the Odds in Finding 'Lead-Like' Compounds from Chemical Libraries. Chem. Pharm. Bull. 55: 980-984, 2007.
5. Miyata T, Li M, Yu X, Hirayama N: Megsin Gene: Its Genomic Analysis, Pathobiological Functions, and Therapeutic Perspectives. Current Genomics. 8(3): 203-208, 2007.
6. Nangaku M, Izuhara Y, Takizawa S, Yamashita T, Fujii-Kuriyama Y, Ohneda O, Yamamoto M, van Ypersele de Strihou C, Hirayama N, Miyata T: A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27(12): 2548-2554, 2007.
7. Sakai K, Sakurai R, Hirayama N: Molecular

- Mechanisms of Dielectrically Controlled Resolution (DCR). Topics in Current Chemistry 2007. 269: 233-272, 2007.
8. Soga S, Shirai H, Kobori M, Hirayama N: Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites. J.Chem.Inf.Model 2007. 47: 400-406, 2007.
 9. Soga S, Shirai H, Kobori M, Hirayama N: Identification of the Druggable Concavity in Homology Models Using the PLB Index. J Chem Inf Model. 47(6): 2287-2292, 2007.
 10. Tanaka R, Hirayama N: Structure of Etoposide. Analytical Sciences. 23(2): x29-x30, 2007.
 11. Tanaka R, Kawamura T, Hirayama N: Structure of Tiaramide. Analytical Sciences. 23(6): x105-x106, 2007.
 12. Tanaka R, Hirayama N: Crystal Structure of Meticrane. Analytical Sciences. 23(7): x119-x120, 2007.

【総説】

1. 若林繁夫, 岩田裕子, 中村(西谷)友重, 久光隆, ベンアマー・ヨセフ: Na⁺/H⁺交換輸送体の構造・機能と病態的意義. 循環器病研究の進歩(通巻47号). XXVIII(1): 73-82, 2007.
2. 若林繁夫, 久光隆, ベンアマー・ユセフ, 中村(西谷)友重, 岩田裕子: 動物細胞Na⁺/H⁺交換輸送体: 分子から疾患まで. 生化学. 79(6): 579-587, 2007.

【学会発表】

1. Hisamitsu T, Ben Ammar Y, Nakamura TY, Wakabayashi S: "Dimerization is necessary for the physiological activity of Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. (Poster)", Experimental Biology Annual Meeting 2007, Washington D.C.(USA), April 28-May 2. 2007.
2. Wakabayashi S: "Structural and functional aspects of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 and its obligatory binding partner CHP. (Symposium)", Experimental Biology Annual Meeting 2007, Washington D.C.(USA), April 28-May 2.2007.
3. 若林繁夫: "創薬標的としてのイオントランスポーター・チャンネル", 第8回創薬ビジョンシンポジウム, 京都テルサ, 2007.1.
4. 若林繁夫, ベンアマー・ヨセフ, 武田壮一, 久光隆: "Na⁺/H⁺交換輸送体とその必須結合因子 CHPの構造と制御", 第84回日本生理学会大会・シンポジウム, 大阪国際交流センター, 2007.3.
5. 久光隆, ベンアマー・ユセフ, 若林繁夫: "Na⁺/H⁺交換輸送体NHE1のアミノ末端切断部位とサブユニットストイキオメトリーの決定", 第2回トランスポーター研究会, 昭和大学, 2007.6.10.
6. 岩田裕子, 中村(西谷)友重, 荒井勇二, 若林繁夫: "活性化型Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)の心筋過剰発現マウスは拡張型心筋症を引き起こす", 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, パシフィコ横浜, 2007.12.11.
7. 久光隆, ベンアマー・ユセフ, 若林繁夫: "アフィニティー精製に基づくNa⁺/H⁺交換輸送体1の新規結合タンパク質の同定", 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, パシフィコ横浜, 2007.12.11.
8. 中村(西谷)友重, 岩田裕子, 若林繁夫: "活性化型Na⁺/H⁺交換輸送体1 (NHE1)高発現マウス心筋における心肥大、心不全発症の分子・細胞メカニズム", 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会, 2007.12.11.

9. 平山令明, 酒井健一: "Dielectrically Controlled Resolution (シンポジウム)", (DCR)の分子メカニズム「モレキュラー・キラリティー2007」, 東京理科大, 2007.5.15.
10. 平山令明: "In silico screening: from nice-to-use to must-use technology for drug discovery", 情報計算化学生物学会・2007年大会, 広島大学, 2007.10.5.
11. 曾我真司, 白井宏樹, 小堀正人, 平山令明: "PLBを利用した蛋白質モデル構造における医薬分子結合部位の予測", 第30回情報化学討論会, 京都大学, 2007.11.16.
12. 曾我真司, 白井宏樹, 小堀正人, 平山令明: "アミノ酸組成を利用した医薬分子結合部位の予測", 第30回情報化学討論会, 京都大学, 2007.11.16

F. 知的財産権の出願・登録

特願 2007-130239: 目的物質精製用タグおよび精製用タグを用いた目的物質の精製方法、発明者: 若林繁夫、
出願日: 平成 19 年 5 月 16 日

分担研究報告書

ナノ分子イメージングを活用した次世代創薬アプローチ

次期治療標的タンパクの構造解析-1

分担研究者 武田壮一 国立循環器病センター研究所心臓生理部室長

盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

研究要旨：本研究プロジェクトはがんや循環器疾患の分子標的薬剤の開発に向けて、標的タンパクの分子構造解析に基づく薬剤設計/搜索(創薬スクリーニング)、分子機能を蛍光イメージングで評価する技術(薬効スクリーニング)の開発を推進している。本分担研究グループでは次期標的タンパクの構造解析を担当する。本年度の標的タンパクとして蛇毒由来ADAMホモログタンパク質2種類について構造決定を行った。これらの新規タンパク質の構造解析によりシェディング酵素であるADAMを対象とした創薬への基盤情報を得た。

A. 研究目的

各種サイトカインや増殖因子は膜結合前駆体として細胞膜に発現し、細胞外プロテアーゼによる切断(エクストドメインシェディング)により遊離型となり、自分自身あるいは近隣の細胞に提示された受容体分子に結合してシグナルを伝える。ADAMファミリータンパク質はシェディング酵素として癌、アルツハイマー病、喘息、リウマチ性関節炎、心肥大など様々な疾患に関わり、重要な創薬ターゲットの一つとなっている。しかし、ADAMは非常に多くのSS結合を含み構造解析に必要なリコンビナントタンパク質をつくるのが非常に困難であり、立体構造の解明は進んでいない。蛇毒にはADAMと相同なタンパク質成分が多く含まれ、我々はその一つVAP1を用いて初めてADAMの基本立体構造を明らかにすることに成功している(Takeda et al. EMBO J (2006))。蛇毒ADAMホモログ分子に着目し、その立体構造解析を進めることでADAMファミリータンパク質の構造構築原理への理解を深め、創薬の基盤となる情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、①北米産ガラガラヘビ *Crotalus atrox* 由来の血管内皮細胞のアポトーシス誘導活性と血小板凝集阻害活性を有する catrocollastatin/VAP2B、および②血液凝固第X因子 (Factor X) を特異的に活性化するラッセルクサリヘビ *Daboia russell* 由来の RVV-X (Russell's viper venom factor X activator) の2つのADAMホモログタンパク質分子をターゲットとした。それぞれを単離精製し、結晶化を行い、放射光X線源 (SPring-8) を用いて回折データ収集を行い、立体構造を決定した。

C. 研究結果

ターゲットとした2つのADAMホモログ分子についてそれぞれ分子構造の決定に成功した。

ガラガラヘビ毒より抽出した catrocollastatin/VAP2B の結晶構造を 2.15 Å の分解能で明らかにした(図1: Igarashi et al. FEBS Lett. (2007))。