

2008/20/6A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 盛 英 三

平成21年（2009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
盛 英三

II. 分担研究報告

1. タンパク構造解析に基づく阻害剤の発見/創製 ----- 11
若林繁夫
平山令明
2. 創薬標的タンパクの構造解析 - 1 ----- 19
武田壮一
盛 英三
3. 次期治療標的タンパクの構造解析 - 2 ----- 22
増田道隆
4. ナノ分子機能イメージングを活用した次世代創薬アプローチ ----- 24
望月直樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

主任研究者 盛 英三 東海大学医学部 教授

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。本年度は分子機能解析に関して CHP2 複合体の構造にもとづく医薬品探索を昨年に引き続いて推進し、新規タンパク構造解析に関しては心筋トロポニンの精密化した構造解析と BAR-ドメインスーパーファミリータンパクの構造解析に成果を挙げた。分子機能イメージングに関しては血管構築を可視化できるゼブラフィッシュを用いた薬効スクリーニング系の開発に大きな成果を挙げた。

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

Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE)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。本プロジェクトでは、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、さらには関連する新規創薬標的の探索と構造生物学的アプローチによって、新しい創薬開発の基盤を得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

心筋トロポニン：我々は心筋の収縮に関わる重合アクチンの調節を司るトロポニンのコアドメインの結晶構造の解明に世界に先駆けて成功した(Takeda et al. Nature (2003)。この結晶構造については結晶を得るために心筋トロポニン TnI に特異的に存在する A キナーゼ (PKA) によるリン酸化部位を切除したコンストラクトを用いたため、この部位の構造情報が含まれていなかった。PKA リン酸化による心筋のカルシウム感受性の変調機構の分子機構を知ることは重要な生理機能の理解にとどまらず、トロポニンをターゲットにした新たなカルシウム感受性変

調薬物（カルシウムセンシタイザー、カルシウムデセンシタイザーなど）をデザインする上で重要な構造情報を与えると考えられる。そこで本研究では PKA リン酸化部位を含む全長ヒト心筋 TnI および TnT と TnC から成る心筋トロポニン・コアドメインを調製、結晶化し X 線結晶構造解析により構造決定を行うことを目的とする。

BAR ドメインスーパーファミリー:アクチン細胞骨格制御活性とともに脂質膜結合・変形活性をもつ新規のタンパク質ファミリー (BAR ドメインスーパーファミリー) に属する分子 I-BAR ファミリーが、生体膜のダイナミクスを調整する分子として注目を集めている。これらのタンパク質のうち、今年度は Fer を主たるターゲットとして研究を進めた。Fer は SH3 ドメインを持たない代わりに、脂質膜結合・変形ドメイン (F-BAR ドメイン) を持つ特異な非受容体型のチロシンキナーゼである。Fer はユビキタスに発現して細胞接着制御に関わり、特に内皮細胞では接着分子のリン酸化を介して透過性の制御に関わる。内皮細胞の細胞間接着分子 PECAM-1 のキナーゼであり、また、一部の癌の増悪にも関係する。F-BAR ドメインおよび全長のタンパク結晶構造解析に取り組んだ。

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を行い、これらの分子を介した情報伝達系を制御可能な薬剤の開発のためのスクリーニング系の構築を目指した。これまで低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化を可視化する系を構築しており、この分子プローブを用いたスクリーニング系の開発に努力してきた。今年度は、生体での低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化を可視化する生物個体の作製と、血管構築を可視化できる個体であることの両方の条件をみたくゼブラフィッシュの作成を試みた。分子の機能イメージングとともに、開発薬剤の生体での効果判定に利用可能である個体の作成を目指した。

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

昨年度は、NHE が接触する CHP2 表面の窪み (concavity) に相補的に結合可能な分子を探索したが、両蛋白質の結合を阻害できる分子を見出すことはできなかった。そこで、今年度は、次の二つのアプローチで阻害剤のバーチャル・スクリーニングを行った。第一の方法は、低分子結合による CHP2 のアロステリック変化を期待した方法である。CHP2 と NHE の複合体の X 線構造を精査し、NHE との接触部位にはないが、CHP2 の表面上に見られる concavity で、その部位に低分子が結合すると CHP2 に構造変化を誘起できると予測される場所を特定した。次に、それらの concavity に結合し得る分子の特徴を我々が独自に開発した方法を用いて解析し、それらの特徴を有する分子を Sigma-Aldrich から販売されている化合物のライブラリー (分子量が 700 以下の 64, 176 化合物) から選択した。ASEDock³⁾を用いたドッキング・シミュレーションにより評価し、最終的に各 concavity に対して各々 20 個の低分子を候補化合物として選択した。第二の方法は、NHE 表面にあるアミノ酸残基の内、CHP2 との結合に深く関与している残基を抽出し、それらのアミノ酸をミミックする低分子を探索する方法である。特に CHP2 の中に深く潜入している残基の中で近接している 3 個のアミノ酸 (Phe, His および Asn) の側鎖をファーマコフォア (pharmacophore) と考え、このようなファーマコフォアを持つと予想される 311 分子を先の Sigma-Aldrich から販売されている化合物のライブラリーから探索した。これらの各分子の立体構造に先のファーマコフォアの束縛条件を課して、ASEDock で CHP2 にドッキングさせ、強く結合したものを候補分子とした。

CHP (CHP2 および CHP1) の大きな窪みには NHE の細胞質ドメインが強固に結合するが、上述したバーチャルスクリーニングの基準となる CHP 表面のいくつかの concavity は NHE の他の領域と相互作用し NHE 活性制御に関わる可能性が高い (EMBO J. 2006)。従って、化合物スクリーニングの基盤情報として膜蛋白質である NHE の全体構造 (CHP との複合体として) を知る必要がある。Strept

タグ標識 NHE (NHE1 アイソフォーム) と His タグ CHP (CHP2 あるいは CHP1) を pFastBac-Dual ベクターに挿入し、ポリヘドリンと P10 プロモータ制御下に SF9 昆虫細胞に両者を共発現する系を構築した。SF9 細胞をバキュロウイルスで感染したのち 48 時間後に細胞を回収し、遠心操作によって細胞膜分画を回収した。膜分画を 102 種類の界面活性剤 (Anatrace 製) で処理し、NHE1/CHP 複合体の可溶性の程度を検討した。可溶性の優れた界面活性剤に関して、可溶性膜分画から Streptactin 親和性カラムを用いて NHE1/CHP 複合体を精製した。

② 次期治療標的タンパクの構造解析

心筋トロポニン: ヒト心筋 TnT, TnI および TnC をそれぞれ大腸菌に大量発現し、個別に各種クロマトグラフィーにより精製した。各サブユニットを 6M 尿素存在下で再構成し、再構成された三量体成分を陰イオン交換カラムで単離した。単離した再構成トロポニン (Tn58K) を用いて Sitting-drop 法により結晶化スクリーニングを行った。得られた単結晶について放射光 X 線源 (Spring-8) を用いて回折データ収集を行い、以前の構造モデル (Tn46K および Tn52K) を用いた分子置換法により立体構造を決定した。

BAR ドメインスーパーファミリー: Fer キナーゼの全長および F-BAR ドメインの結晶を作製し、X線回折法により構造を決定する。また、構造に基づくデザイン変異体を多数作成し、in vivo, in vitro における機能解析により膜変形能の部域特異性についての情報を得る。

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

プラスミド: トランスポゾンによる DNA のゼブラフィッシュゲノムへの DNA 挿入のための実験系に用いるプラスミドを構築した。プラスミドは血管内皮細胞特異的に発現する転写因子 Fli のプロモーターを用いて、低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化を可視化する Raichu (Ras and interacting molecule chimeric unit) を Tol2 で挟み込む DNA となるように設計した。このプローブは Yellow

Fluorescent protein (YFP) と Cyan fluorescent protein (CFP) の間に低分子量 GTP 結合蛋白質とその標的分子の低分子量 GTP 結合蛋白質結合ドメインを挿入したキメラ分子となっている。

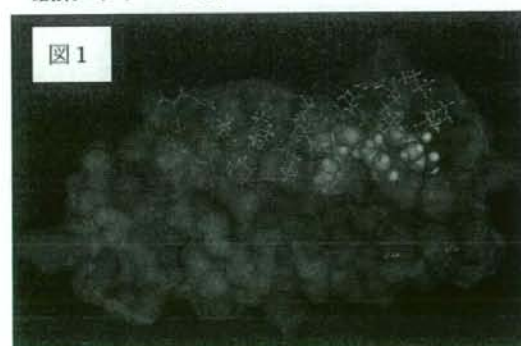
ゼブラフィッシュ: 野生型ゼブラフィッシュはストレイン AB を用いた。通常飼育で、夜一昼サイクルを厳密に管理し、採卵を行った。

受精卵へのインジェクション: 実体顕微鏡下で、1 細胞期に、上記のように作製したプラスミドを DNA のまま、またトランスポゾン mRNA の状態でマイクロインジェクションで注入した。

蛍光タイムラプスイメージング: 体節間を走行する血管 intersomitic vessel (ISV) が顕微鏡で観察可能となる受精後 2.4 時間から数時間かけて、倒立型の共焦点レーザー顕微鏡で蛍光蛋白質の発現を解析して血管構築の YFP による可視化との低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化による YFP-CFP 間の fluorescent resonance energy transfer (FRET) の検出が行えるか否かを検討した。

C. 研究結果

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

構造に基づく化合物のスクリーニングのうち、第一の方法で見出された concavity の内の一つを図 1 に示す。矢印の先にある小球が存在する領域が concavity である。空間充填モデルで示した中央の分子が NHE の断片である。この concavity は NHE と CHP2 が接触する丁度境界に

位置し、この部分への低分子の結合は蛋白質-蛋白質相互作用に影響を与えることが期待される。第二の方法で見出された化合物の一つが、CHP2 に結合する様子を図2に示す。この化合物は、CHP2 との相互作用に重要と思われる3個のアミノ酸残基側鎖の特徴を具えていると共に、ドッキング計算ではCHP2 への結合性が高いと予想された。

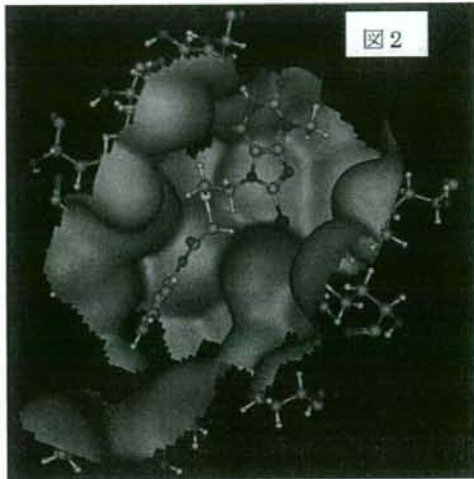


図2

結晶構造解明のための NHE/CHP 複合体の発現と精製に関しては、ヒト1型 NHE アインフォーム (NHE1) およびヒト CHP1 あるいは CHP2 を昆虫細胞 (SF9) に共発現し、NHE1/CHP 複合体を精製する系をほぼ確立した。NHE1 の細胞外ループに HA タグを挿入し、さらに C 末端に Strep タグを導入した。CHP は C 末に His タグを導入した。これらを Dual 発現ベクターに構築し SF9 細胞で発現すると、生細胞においてかなり多くの HA 標識された NHE1 の発現が確認された。膜標品の調製、界面活性剤 (Foscholine-14) による可溶化、アフィニティークラムを経て、NHE1/CHP 複合体を精製した。1L の SF9 細胞カルチャー溶液から約 0.2-0.5mg のタンパク質を得ることが可能であり、構造的あるいはタンパク質化学的なアプローチが行えるレベルである。また、ゲルろ過 (Sephacryl S300) によって複合体の分子量はおよそ 260kD であると推定され、タンパク質は溶液中で2分子の NHE1 と2分子 CHP が会合したヘテロ4量体 (すなわち dimer of NHE1/CHP heterodimer) として存在す

ると考えられた。

②次期治療標的タンパクの構造解析

心筋トロポニン: 今回全長ヒト心筋 TnI を含む三量体コアダメイン Tn58K を用いて新たな結晶化スクリーニングを行い、2003年に報告した条件とは全く異なる2条件で合計3種類の新規の結晶を得ることに成功した。この内の1つ (ここでは結晶3と呼ぶ) は結晶化条件と用いた TnI コンストラクトは異なるものの、2003年に報告した結晶の一つ (Tn52k) とほぼ同一の結晶格子を持ち、実際の構造解析においてもほぼ同一の結果を得た (Tn52K で観測された以上の構造情報を得ることは出来なかった)。一方、残り2つの内の一つ (結晶2と呼ぶ) については3Å分解能の結晶データを用いて精密化を行った。結晶2は単位格子に Tn2 分子が存在し、それぞれ独立に構造決定した。また、残りの結晶 (結晶1) は含水量が約43%と少なく (以前の、Tn52K、Tn43K はそれぞれ約51%)、結晶格子も小さく、回折分解能も高かった。この結晶1について構造解析を行い、2Å分解能までの回折データを使って構造精密化を行うことに成功した (前回の構造解析では Tn46K および Tn52K についてそれぞれ2.6Åおよび3.3Å分解能であった)。これにより分子を構成する各原子位置をこれまでより高い精度で決定することが出来た。結晶1には単位格子に TnI 分子が含まれていたため、今回結晶1, 2の二つより計3分子の新たなヒト心筋トロポニン・コアダメインの構造決定を行ったことになる。2003年の構造解析4分子と合わせ合計7分子の独立した結晶構造を自分たちで得ることが出来た。

BAR ドメインスーパーファミリー:F-BAR ドメインの結晶構造解析に成功した。構造を基にした多数の変異体をデザインし、それらの脂質膜結合・変形活性を解析した。その結果、Fer の低い脂質膜結合・変形活性は、C-末側の SH2-キナーゼドメインによる負の制御を受けているためではなく、それ自体の活性が極めて低いことによることが示唆された。また、F-BAR ドメインのどの部域の正電荷が膜結合に重要であるかを示唆する知見を得た。

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。

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

プラスミドの構築：

低分子量 GTP 結合蛋白質の生体内可視化のために、まず Rho ファミリー分子 RhoA, Rac, Cdc42 の可視化プローブをベクター内に挿入して、血管内皮細胞で特異的に発現



図 3

するようなプラスミドを 図 3 に示すように構築した。実際、トランスポゾン mRNA と一緒にインジェクションした個体では、YFP の蛍光が観察できた

ことから、世代を越えて挿入遺伝子が、継代されれば、目的の分子可視化ゼブラフィッシュの樹立になる。

FRET プローブの発現確認：

低分子量 GTP 結合蛋白質の FRET プローブがゼブラフィッシュで発現可能か否かは、pCS2 ベクターに FRET プローブ cDNA を発現させ、これから *in vitro* で mRNA を作製し、授精卵への injection を行って蛍光を観察することで確認した。また、共焦点レーザー顕微鏡によって YFP/CFP の ratio イメージが十分検出可能であることも確認した。

蛍光検出による血管形成過程の可視化：

受精卵の血管構築は 3 次元であるために、共焦点レーザー顕微鏡による時間・空間解像度が十分であるか否かを



図 4

検討した。図 4 に示すように Dorsal aorta からの ISV の背側への血管の新生が十分可視化できることが確認できた。また、空間解像度の問題も filopodia が十分観察できるだけの解像度であり、今後

の filopodia あるいは細胞の遊走時の Rho ファミリー分子の活性化の可視化に十分たえられるだけの検出感度があった。

D. 考察

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

平成 20 年度では、CHP2 のいくつかの concavity に着目したデザインを行った。これにより、CHP2 に結合する可能性が高い化合物が数多く同定できた。30 種類の化合物をピックアップして購入したので、CHP2 との相互作用などの検討をする予定である。また、NHE1 全体と CHP との複合体が SF9 細胞から比較的大量に精製することが可能となった。結晶化に向けた準備をするとともに、精製蛋白質を用いて化合物をスクリーニングする方法も検討していく。

②次期治療標的タンパクの構造解析

心筋トロポニン：今回新たに得られた構造および以前の構造を合わせて比較することにより、分子内に存在する可動領域を新たに同定することが出来た。PKA リン酸化部位については残念ながら生理的に重要な新たな発見は得られなかった。さらなる結晶構造解析を実施する。

BAR ドメインスーパーファミリー：Fer キナーゼの結晶構造の解明により、Fer 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・変形活性がどのように遮蔽されているか、逆に、どのようにしたら発揮されるのかについて示唆を得ることができた。さらに研究を進め、局在とキナーゼ活性の制御メカニズムの詳細を明らかにすることにより、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内でのシグナル伝達の制御

が重要であり血管内皮細胞内のシグナル伝達の可視化が、生体で可能になれば、血管新生の抑制を目指したあるいは血管新生を目指した治療法の開発につながると考える。

低分子量 GTP 結合蛋白質の Rho ファミリー分子の活性化はとくに細胞の進展や、収縮制御を行っているために細胞の運動に不可欠である。これらの分子の生体での活性化をイメージングした研究はなく、本研究が目指すまさに分子の機能のイメージングである。本研究の重要性は、さらにこの機能のイメージングに、今後開発予定である血管新生抑制、あるいは血管新生促進作用のある薬剤の効果判定まで個体を用いることで可能となることである。

われわれは分子の可視化を生体で行うことをこれまでの目標にしてきたが、今後もさらに様々な分子プローブをゼブラフィッシュに導入して、薬剤の効果判定や、機能の解明に繋げていきたいと考える。動物個体を用いた有効性を実証し、個体を用いたスクリーニング系の開発につなげていく計画である。

結論

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/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

心筋トロポニン：ヒト心筋トロポニン三量体コアドメインの新規結晶構造の決定を行った。画期的な知見は得ることが出来なかったが、分子内に存在する可動領域を新たに明らかにすることが出来た。また、今回 2 Å 分解能のデータを用いることが出来、これにより原子位置座標の精度が非常に高い構造モデルを得ることに成功した。このモデルは今後トロポニンをターゲットとしたインシリコ・ドラッグディスカバリーを進める上では非常

に有効な構造基盤となるであろう。

BAR ドメインスーパーファミリー:F-BAR の構造決定を行ない、生体膜のダイナミクスの制御をターゲットとした次世代創薬や新研究領域創成の手がかりをつかんだ。

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

薬剤のスクリーニングあるいは効果判定に役立つ動物個体になることを目指して、血管新生における低分子量 GTP 結合蛋白質の可視化ゼブラフィッシュを作製した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

(研究業績)

【著書】

1. Takeda S. "VAP1: snake venom homolog of mammalian ADAMs." In: Messerschmidt A, editor. Handbook of Metalloproteins: John Wiley & Sons, Inc. (2008)

【原著】

1. Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., Wakabayashi, S.: Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* 103(8): 891-899, 2008.
2. Lu, Y., Pang, T., Wang, J., Xiong, D., Ma, L., Li, B., Li, Q., Wakabayashi, S.: Down-regulation of P-glycoprotein expression by sustained intracellular acidification in K562/DOX cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377(2): 441-446, 2008.
3. Y. Izuhara, S. Takahashi, M. Nangaku, S. Takizawa, H. Ishida, K. Kurokawa, C. v. Y. d. Strihou,

- N. Hirayama and T. Miyata (2008). "Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1. Its Mechanism and Effectiveness on Coagulation and Fibrosis." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(4): 672-677.
4. T. Akimoto, H. Hara, T. Nakano and N. Hirayama (2008). "Crystal Structure of (4SR, 5RS)-5-(4-Cyanophenyl)-4-trimethylsilyl-3-methylisoxazoline." *Anal. Sci.* 24: x165-x166.
 5. S. Soga, H. Shirai, M. Kobori and N. Hirayama (2008). "Chemocavity: specific concavity in protein reserved for the binding of biologically functional small molecules." *J. Chem. Inf. Model.* 48: 1679-1685.
 6. R. Tanaka and N. Hirayama (2008). "Crystal Structure of Benzethonium Chloride Monohydrate." *Anal. Sci.* 24: x163-x164.
 7. R. Tanaka and N. Hirayama (2008). "Crystal Structure of Linezolid." *Anal. Sci.* 24: x43-x44.
 8. R. Tanaka and N. Hirayama (2008). "Crystal Structure of Guanabenz Acetate." *Anal. Sci.* 24: x5-x6.
 9. R. Ogawa, T. Fujino, N. Hirayama and K. Sakai (2008). "Practical resolution of racemic trans-2-benzylaminocyclohexanol with di-p-toluoyl-L-tartaric acid via diastereomeric salt formation based on the Pope and Peachey method." *Tetrahedron Asymmetry* 19(21): 2458-2461.
 10. J. Goto, R. Kataoka, H. Muta and N. Hirayama (2008). "ASEDock-Docking Based on Alpha Spheres and Excluded Volumes." *J. Chem. Inf. Model.* 48: 583-590.
 11. H. Obata, Y. Sakai, S. Ohnishi, S. Takeshita, H. Mori, M. Kodama, K. Kangawa, Y. Aizawa, N. Nagaya: Single Injection of a Sustained-release Prostacyclin Analog Improves Pulmonary Hypertension in Rats. : *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 195-201
 12. T. Yada, H. Shimokawa, K. Morikawa, A. Takaki, Y. Shinozaki, H. Mori, M. Goto, Y. Ogasawara, F. Kajiya: 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.* 2008; 294: H441-H448
 13. E. Sato, H. Obara, T. Enomoto, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, A. Ogawa, S. Sato, K. Takayama, J. Onagawa: X-ray Spectra from a Brass-target Plasma Triode: *Jpn. J. Med. Phys.* 2008; 27(4): 163-171
 14. Y. Sato, E. Sato, S. Ehara, T. Enomoto, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, A. Ogawa, S. Sato, J. Onagawa: Magnification K-Edge Angiography Utilizing 100- μ m-Focus Tungsten Tube and Gadolinium-Based Contrast Media: *Jpn. J. Appl. Phys.* 2008; 47(6): 4772-4776
 15. H. Matsukiyo, M. Watanabe, E. Sato, A. Osawa, T. Enomoto, J. Nagao, P. Abderyim, K. Aizawa, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, S. Ehara, S. Sato, A. Ogawa, J. Onagawa: X-ray fluorescence camera for imaging of iodine media in vivo: *Radiol Phys Technol.* 2009; 2: 46-53
 16. A. Osawa, M. Watanabe, E. Sato, H. Matsukiyo, T. Enomoto, J. Nagao, P. Abderyim, K. Aizawa, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, S. Ehara, S. Sato, A. Ogawa, J. Onagawa: Embossed radiography utilizing energy subtraction: *Radiol Phys Technol.* 2009; 2: 77-86
 17. Komi Y, Suzuki Y, Shimamura M, Kajimoto S, Nakajo S, Masuda M, Shibuya M, Itabe H, Shimokado K, Oettegen P, Nakaya K, Kojima S: Mechanism of inhibition of tumor angiogenesis by beta-hydroxyisovalerylshikonin. *Cancer Sci.* 100 (2): 269-277, 2009.

18. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HK3, KodamT, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, and Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol.* 10: 513-526, 2008
19. Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 283:24234-24244
20. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 27: 522-534, 2008
21. Yasuda N, Miura S, Akazawa H, Tanaka T, Qin Y, Kiya Y, Imaizumi S, Fujino M, Ito K, Zou Y, Fukuhara S, Kunimoto S, Fukuzaki K, Sato T, Ge J, Mochizuki N, Nakaya H, Saku K, Komuro I. Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep* 9:179-186 (2008)

【総説】

1. 中村(西谷)友重、古林創史、久光 隆、岩田裕子、若林繁夫: Na⁺/H⁺交換輸送体: 機能調節と薬物標的としての意義. *遺伝子医学MOOK*12: 255-261, 2009.
2. Takeda S. "Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinase." *Semin Cell Dev Biol* (in press)
3. 荒木聡彦、五十嵐智子、武田壮一 「血管内被細胞の破壊毒素: 明らかになった ADAM 型細胞表面プロ

テアーゼの構造」表面 46(4), 24-33 (2008)

【学会発表】

1. 中村(西谷)友重、岩田裕子、若林繁夫: "Na⁺/H⁺交換輸送体の活性化は心肥大・心不全を引き起こす: 細胞内イオン代謝と分子機構の解析" 第85回日本生理学会大会 京王プラザホテル東京, 2008. 3. 26.
2. 久光 隆、若林繁夫: "Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 とその新規結合タンパク質カルシニューリンとの相互作用の解析" 第3回トランスポーター研究会年会(シンポジウム) 京都大学薬学部, 2008. 6. 7.
3. Iwata, Y., Wakabayashi, S.: "Enhanced Na⁺/H⁺ exchange activity participates in pathogenesis of Muscular dystrophy and cardiomyopathy" 第31回心筋代謝研究会 東京慈恵会医科大学, 2008. 7. 13.
4. Iwata, Y., Nakamura, TY., Arai, Y., Wakabayashi, S.: "Activation of Na⁺/H⁺ exchange is sufficient to induce hypertrophy and failure" 第25回国際心臓研究学会日本部会総会 横浜市開港記念会館, 2008. 12. 5.
5. 若林繁夫、宮崎美穂、久光 隆: "SF9 細胞からの Na⁺/H⁺交換輸送体/CHP 複合体の発現と精製" 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル, 2008. 12. 10.
6. 岩田裕子、若林繁夫: "Ca²⁺透過性チャネル TRPV2 のドミナントネガティブ変異体による筋ジストロフィーの病態改善効果" 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル, 2008. 12. 10.
7. 久光 隆、若林繁夫: "Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 とカルシニューリンとの新規相互作用の生理的意義の解析" 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル, 2008. 12. 10.
8. 中村(西谷)友重、Jeromin, A., 若林繁夫: "新しい心機能調節因子としての Ca²⁺センサータンパク質

- NCS-1 の役割” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル, 2008. 12. 9.
9. 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蛋白質モデル構造における医薬分子結合部位の予測」日本薬学会第 128 年会 (横浜) パシフィコ横浜 2008. 3. 26.
 10. 磯貝秀人, 幸田 元, 平山令明: 「標的分子の立体構造情報に基づくリガンド平面構造の探索法」日本薬学会第 128 年会 (横浜) パシフィコ横浜 2008. 3. 26.
 11. 曾我真司, 白井宏樹, 小堀正人, 平山令明: 「アミノ酸の共起性から見た蛋白質の低分子化合物結合部位」第 8 回日本蛋白質科学会年会 (東京) タワーホール船堀 2008. 6. 10.
 12. N. Hirayama: “Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites” XXth International Symposium on Medicinal Chemistry (Vienna, Austria) September 4, 2008
 13. 東田欣也, 後藤純一, 平山令明: 「疑似分子プローブと標的構造に基づく de novo 医薬分子設計法の開発」第 36 回構造活性相関シンポジウム (神戸) 神戸国際会議場 2008. 11. 2.
 14. 曾我真司, 白井宏樹, 小堀正人, 平山令明: 「アミノ酸の共起性から見た蛋白質の低分子化合物結合部位」第 36 回構造活性相関シンポジウム (神戸) 神戸国際会議場 2008. 11. 3.
 15. 米沢朋, 吉川枝理, 重成敦子, 金藤聡美, 光永滋樹, 田中正史, 平山令明, 猪子英俊: 「マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値の抽出技術の研究開発」第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム (東京) 虎の門パストラル 2008. 11. 6.
 16. 井上雄介, 北澤将史, 沖津修, 橋本誠一, 中島秀典, 藤井秀明, 長瀬博, 磯貝秀人, 平山令明: 「ラット肝細胞株 H4IIEC3 を用いた肝糖新生抑制化合物および siRNA の探索研究」第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム (東京) 虎の門パストラル 2008. 11. 6.
 17. 菅野拓也, 田中一則, 柳澤佳子, 秦野伸二, 平山令明, 池田穰衛: 「酸化ストレス性神経細胞死を選択的に抑制する新規低分子化合物の選抜と同定」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2008. 12. 10.
 18. T. Kanno, K. Tanaka, Y. Yanagisawa, S. Hadano, N. Hirayama, and J.-E. Ikeda: “Identification of novel neuroprotectant by the NAIP-based drug screening for an anti-oxidative stress cell death compounds.” *Neuroscience* 2008 (Washington DC) 2008. 11. 16.
 19. O. Ishida, I. Hagino, N. Nagaya, T. Shimizu, Y. Sawa, H. Mori, T. Yagihara: Adipose-Derived Stem Cell Sheet Transplantation Therapy for Failed Heart: 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会. 2009
 20. T. Fujii, N. Fukuyama, Y. Ikeya, E. Tanaka, T. Sekka, Y. Shinozaki, K. Yamada, K. Umetani, K. Hyodo, E. Sato, K. Fukushima, T. Tanabe, H. Mori: Development of Microangiographic Systems for Visualization, Quantification and Therapeutic Evaluation of Angiogenic Vessels: The 11th International Symposium on Anti-Angiogenic Agents. *ANGIO* 2009, San Diego, (United States)
 21. O. Ishida, I. Hagino, N. Nagaya, T. Shimizu, Y. Sawa, H. Mori, T. Yagihara, : Adipose-Derived Stem Cell Sheet Transplantation Therapy on Swine Chronic Heart Failure Model : Scientific Sessions 2008, American Heart Association
 22. T. Yada, H. Shimokawa, O. Hiramatsu, Y. Shinozaki, H. Mori, M. Goto, Y. Ogasawara, F. Kajiya, : Crucial Role of Hydrogen Peroxide as an Endogenous EDHF during Acute Coronary Occlusion and Injection of Erythropoietin in Canine Coronary Native

Collateral Microcirculation in Vivo, :
Scientific Sessions 2008, American Heart
Association

23. K. Yamada, R. Kuroda, H. Toyokawa,
H. Ikeura-Sekiguchi, M. Yasumoto, N. Sei, H. Ogawa,
M. Koike, R. Suzuki, F. Sakai, K. Mori, H. Mori,
N. Fukuyama, E. Sato: Development of advanced
quantum-beam sources and their applications as
sophisticated imaging tools: Compton Sources for
X/gamma Rays: Physics and Applications: 2008 in
Italy
24. H. Mori, N. Fukuyama, Y. Ikeya, T. Fujii, N. Nagaya,
Y. Miyahara, O. Ishida, S. Takeda: CONTRIBUTIONS
OF NANOTECHNOLOGY TO CARDIOVASCULAR
REGENERATIVE MEDICINE: Fourth Annual Meeting of
American Academy of Nanomedicine. 2008
25. 武田壮一、五十嵐智子、盛英三「ラッセルクサリヘ
ビ由来血液凝固第X因子活性化プロテアーゼ RVV-X
の結晶構造」、第8回日本蛋白質科学会年会、タワ
ーホール船堀（東京）、2008.6（ポスター発表）
26. 武田壮一「蛇毒ホモログの結晶構造から見えてきた
ADAMファミリープロテアーゼの立体構造と作用機
構」、シンポジウム「膜近傍におけるプロテオリシ
ス」、第60回日本細胞生物学会年会、パシフィコ横
浜、2008.6（招待講演）
27. 武田壮一「蛇毒高分子量メタロプロテアーゼの結晶
構造と作用機構」、第55回毒素シンポジウム、ラフ
ォーレ山中湖（山梨県）、2008.7（招待講演）
28. 武田壮一「発生・分化・病態に関わるADAMプロテ
アーゼ - 出血蛇毒素の結晶構造から見えてきた
ADAMの作用機構」、シンポジウム「生体分子による
生物間の攻撃と防御」、東京大学弥生講堂・一条ホ
ール、2008.11.8（招待講演）
29. 武田壮一「心筋トロポニン三量体コアドメインの新
規結晶構造と構造比較」、生体運動研究合同班会議、
東京大学数理科学研究科・大講義室、2009.1.10
（口頭発表）G.

30. 石田治、宮原義典、永谷憲識、盛英三「重症心不全
に対する脂肪組織由来幹細胞シート移植治療法の
開発」、第8回日本再生医療学会、2009

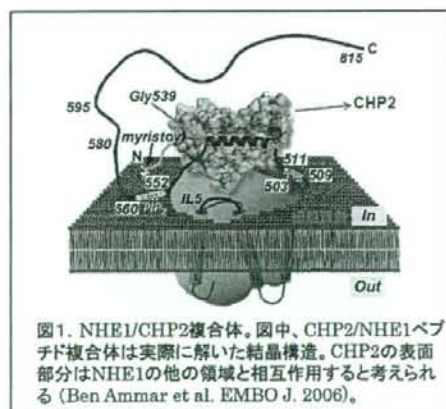
知的財産権の出願・登録

なし

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、昨年度とは異なったストラテジーに基づいて数十種類の候補化合物をピックアップできた。また今回対象としている蛋白質の機能は CHP と NHE の相互作用によって発揮される。従って、創薬スクリーニングの基盤情報としては、CHP の構造のみならず膜蛋白質である NHE 全体の 3 次元構造を視野に入れる必要があり、結晶構造解明のための第一歩である蛋白質の発見・精製を試みたので報告したい。

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 2.7Å 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

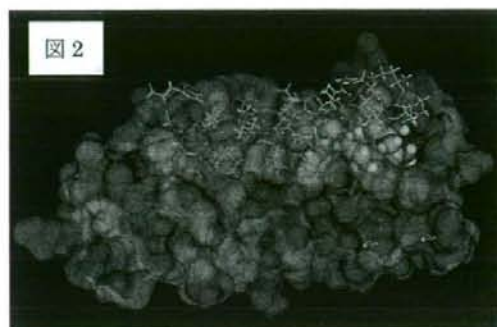
害剤の発見、さらには関連する新規創薬標的の探索と構造生物学的アプローチによって、新しい創薬開発の基盤とすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 構造に基づく化合物のスクリーニング。

昨年度は、NHE が接触する CHP2 表面の窪み (concavity) に相補的に結合可能な分子を探索したが、両蛋白質の結合を阻害できる分子を見出すことはできなかった。そこで、今年度は、次の二つのアプローチで阻害剤のバーチャル・スクリーニングを行った。

第一は、低分子結合による CHP2 のアロステリック変化を期待した方法である。CHP2 と NHE の複合体の X 線構造を精査し、NHE との接触部位にはないが、CHP2 の表面上に見られる concavity で、その部位に低分子が結合すると CHP2 に構造変化を誘起できると予測される場所を 4箇所特定した (プログラム・システム MOE¹⁾ の Alpha Site Finder 法を使用)。それらの concavity に結合し得る分子の特徴を我々が開発した Alpha Site Filter 法²⁾ (投稿中) を用いて解析し、それらの特徴を有する分子を Sigma-Aldrich から販売されている化合物のライブラリー (分子量が 700 以下の 64,176 化合物) から選択した。選択した分子と CHP2 の親和性の強さは



ASEDock³⁾を用いたドッキング・シミュレーションにより評価し、最終的に各 concavity に対して各々 20 個の低分子を候補化合物として選択した。

第二は、NHE 表面にあるアミノ酸残基の内、CHP2 との結合に深く関与している残基を抽出し、それらのアミノ酸をミミックする低分子を探索する方法である。図 2 に、X 線解析で得られている CHP2 と NHE の複合体の構造を示す。NHE 分子の大部分は棒で表現した。その内、特に CHP2 の中に深く潜入している残基の中で近接している 3 個のアミノ酸の原子を球で表現した。これらのアミノ酸はこの図で左から Phe、His および Asn である。これらの残基の側鎖をファーマコフォア (pharmacophore) と考え、このようなファーマコフォアを持つと予想される 311 分子を先の Sigma-Aldrich から販売されている化合物のライブラリーから探索した。これらの各分子の立体構造に先のファーマコフォアの束縛条件を課して、ASEDock で CHP2 にドッキングさせ、強く結合したものを候補分子とした。

2. 結晶構造解明に向けた NHE/CHP 複合体の発現と精製。

CHP(CHP2およびCHP1)の大きな窪みにはNHEの細胞質ドメインが強固に結合するが、上述したバーチャルスクリーニングの基準となる CHP 表面のいくつかの concavity は NHE の他の領域と相互作用し NHE 活性制御に関わる可能性が高い (EMBO J. 2006)。従って、化合物スクリーニングの基盤情報として膜蛋白質である NHE の全体構造 (CHP との複合体として) を知る必要がある。現在、動物細胞由来の膜蛋白質の構造解析に関しては、多くの場合まず蛋白質の発現・精製の段階が極めて困難な状況にある。そこで、Strept タグ標識 NHE (NHE1 アイソフォーム) と His タグ CHP (CHP2 あるいは CHP1) を pFastBac-Dual ベクターに挿入し、ポリヘドリンと P10 プロモータ制御下に SF9 昆虫細胞に両者を共発現する系を構築した。SF9 細胞をバキュロウイルスで感染したのち 48 時間後に細胞を回収し、遠心操作によって細胞膜分画を回収した。膜分画を 102 種類の界面活性剤 (Anatrace 製) で処理し、NHE1/CHP 複合体の可溶化の程度を検討した。可溶化能の優れた界面活性剤に関して、可溶化膜分画から Streptactin 親和性カラムを用いて NHE1/CHP 複合体を精製した。

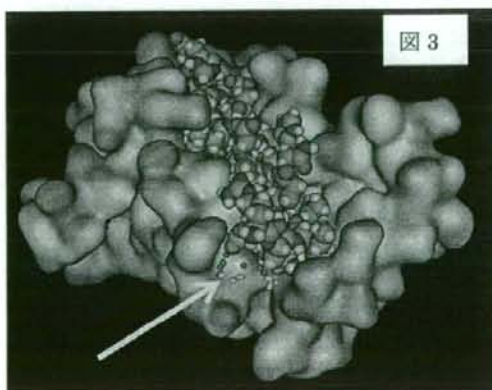
C. 研究結果

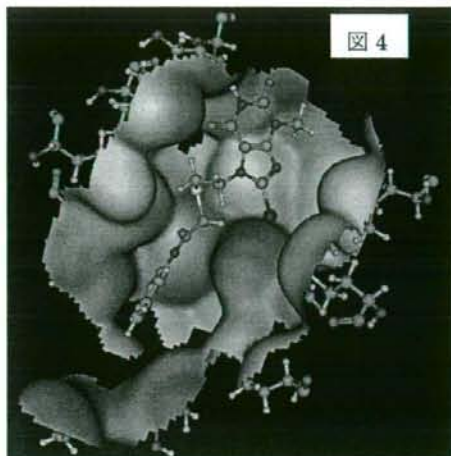
1. 構造に基づく化合物のスクリーニング。

第一の方法で見出された concavity の内の一つを図 3 に示す。矢印の先にある小球が存在する領域が concavity である。空間充填モデルで示した中央の分子が NHE の断片である。この concavity は NHE と CHP2 が接触する丁度境界に位置し、この部分への低分子の結合は蛋白質-蛋白質相互作用に影響を与えることが期待される。

第二の方法で見出された化合物の一つが、CHP2 に結合する様子を図 4 に示す。この化合物は、CHP2 との相互作用に重要と思われる 3 個のアミノ酸残基側鎖の特徴を具備していると共に、ドッキング計算では CHP2 への結合性が高いと予想された。

見出された化合物のうち、優先順位の高い 30 種類の化合物を購入し、現在 i) 共免疫沈降法、ブルダウン法に基づいた NHE1/CHP2 相互作用への化合





物の影響、ii)細胞を用いた NHE1 活性制御に対する化合物の効果を検討している。

1) MOE (Molecular Operating Environment), version 2006.0801; Chemical Computing Group Inc.: Montreal, Quebec, Canada, 2006.

2) H.Muta and N.Hirayama, *J.Chem.Inf.Model.*, to be submitted.

3) J.Goto, R.Kataoka, H.Muta and N.Hirayama (2008). "ASEDock-Docking Based on Alpha Spheres and Excluded Volumes." *J.Chem.Inf.Model.* 48: 583-590.

2. 結晶構造解明に向けた NHE1/CHP 複合体の発現と精製。

ヒト 1 型 NHE イソフォーム (NHE1) およびヒト CHP1 あるいは CHP2 を昆虫細胞 (SF9) に共発現し、NHE1/CHP 複合体を精製する系をほぼ確立

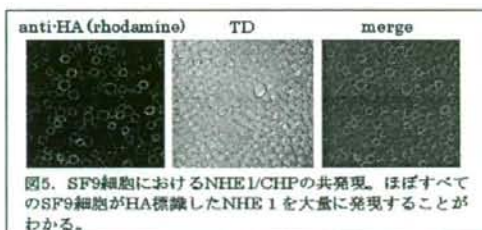


図5. SF9細胞におけるNHE1/CHPの共発現。ほぼすべてのSF9細胞がHA標識したNHE1を大量に発現することがわかる。

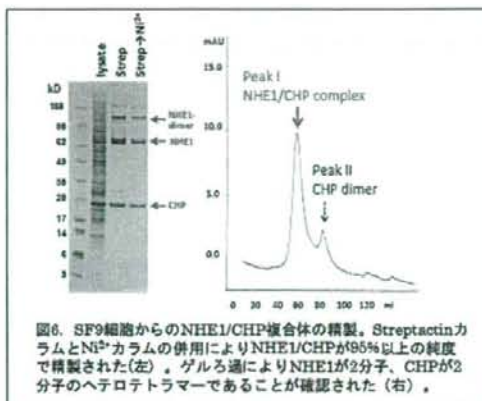


図6. SF9細胞からのNHE1/CHP複合体の精製。Streptactinカラムと Ni^{2+} カラムの併用によりNHE1/CHPが95%以上の純度で精製された(左)。ゲルろ過によりNHE1が2分子、CHPが2分子のヘテロテトラマーであることが確認された(右)。

した。NHE1 の細胞外ループに HA タグを挿入し、さらに C 末端に Strep タグを導入した。CHP は C 末に His タグを導入した。これらを Dual 発現ベクターに構築し SF9 細胞で発現すると、生細胞においてかなり多くの HA 標識された NHE1 の発現が確認された (図 5)。膜標品の調製、界面活性剤 (Foscholine-14) による可溶性、アフィニティークラムを経て、NHE1/CHP 複合体を精製した (図 6)。1 L の SF9 細胞カルチャー溶液から約 0.2-0.5mg のタンパク質を得ることが可能であり、構造的あるいはタンパク質化学的なアプローチが行えるレベルである。また、ゲルろ過 (Sephacryl S300) によって複合体の分子量はおおよそ 260kD であると推定され、

タンパク質は溶液中で 2 分子の NHE1 と 2 分子 CHP が会合したヘテロ 4 量体 (すなわち dimer of NHE1/CHP heterodimer) として存在すると考えられた (若林ら: "SF9 細胞からの Na⁺/H⁺交換輸送体 /CHP 複合体の発現と精製" 2008 年生化学会・分子生物学会合同年会)。

D. 考察と展望

平成 20 年度では、CHP2 のいくつかの concavity に着目したデザインを行った。これにより、CHP2 に結合する可能性が高い化合物が数多く同定できた。30 種類の化合物をピックアップして購入したので、CHP2 との相互作用などの検討をする予定である。また、NHE1 全体と CHP との複合体が SF9 細胞から比較的大量に精製することが可能となった。結晶化に向けた準備をするとともに、精製蛋白質を用いて化合物をスクリーニングする方法も検討していく。また現在、NHE1 の新規制御因子を複数見出ししており、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. Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., Wakabayashi, S.: Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* 103(8): 891-899, 2008.
2. Lu, Y., Pang, T., Wang, J., Xiong, D., Ma, L., Li, B., Li, Q., Wakabayashi, S.: Down-regulation of P-glycoprotein expression by sustained intracellular acidification in K562/DOX cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377(2): 441-446, 2008.
3. Y.Izuhara, S.Takahashi, M.Nangaku, S.Takizawa, H.Ishida, K.Kurokawa, C. v. Y. d. Strihou, N.Hirayama and T.Miyata (2008). "Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1: Its Mechanism and Effectiveness on Coagulation and Fibrosis." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(4): 672-677.
4. T.Akimoto, H.Hara, T.Nakano and N.Hirayama (2008). "Crystal Structure of (4SR,5RS)-5-(4-Cyanophenyl)-4-trimethylsilyl-3-methylisoxazoline." *Anal.Sci.* 24: x165-x166.
5. S.Soga, H.Shirai, M.Kobori and N.Hirayama (2008). "Chemocavity: specific concavity in protein reserved for the binding of biologically functional small molecules" *J.Chem.Inf.Model.* 48: 1679-1685.

6. R.Tanaka and N.Hirayama (2008). "Crystal Structure of Benzethonium Chloride Monohydrate." *Anal.Sci.* 24: x163-x164.
7. R.Tanaka and N.Hirayama (2008). "Crystal Structure of Linezolid." *Anal.Sci.* 24: x43-x44.
8. R.Tanaka and N.Hirayama (2008). "Crystal Structure of Guanabenz Acetate." *Anal.Sci.* 24: x5-x6.
9. R.Ogawa, T. Fujino, N.Hirayama and K. Sakai (2008). "Practical resolution of racemic trans-2-benzylaminocyclohexanol with di-p-toluoyl-L-tartaric acid via diastereomeric salt formation based on the Pope and Peachey method." *Tetrahedron Asymmetry* 19(21): 2458-2461.
10. J.Goto, R.Kataoka, H.Muta and N.Hirayama (2008). "ASEDock-Docking Based on Alpha Spheres and Excluded Volumes." *J.Chem.Inf.Model.* 48: 583-590.

【総説】

1. 中村(西谷)友重、古林創史、久光 隆、岩田裕子、若林繁夫 : Na⁺/H⁺交換輸送体 : 機能調節と薬物標的としての意義. 遺伝子医学 MOOK12: 255-261, 2009.

【学会発表】

1. 中村(西谷)友重、岩田裕子、若林繁夫 : "Na⁺/H⁺交換輸送体の活性化は心肥大・心不全を引き起こす : 細胞内イオン代謝と分子機構の解析" 第 85 回日本生理学会大会 京王プラザホテル東京, 2008.3.26.
2. 久光 隆、若林繁夫 : "Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 とその新規結合タンパク質カルシニューリンとの相互作用の解析" 第 3 回トランスポーター研究会年会(シンポジウム) 京都大学薬学部, 2008.6.7.
3. Iwata, Y., Wakabayashi, S. : "Enhanced Na⁺/H⁺ exchange activity participates in pathogenesis of Muscular dystrophy and cardiomyopathy" 第 31 回心筋代謝研究会 東京慈恵会医科大学, 2008.7.13.
4. Iwata, Y., Nakamura, TY., Arai, Y., Wakabayashi, S. : "Activation of Na⁺/H⁺ exchange is sufficient to induce hypertrophy and failure" 第 25 回国際心臓研究学会日本部会総会 横浜市開港記念会館, 2008.12.5.
5. 若林繁夫、宮崎美穂、久光 隆 : "SF9 細胞からの Na⁺/H⁺交換輸送体/CHP 複合体の発現と精製" 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生

- 化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル,
2008.12.10.
6. 岩田裕子、若林繁夫：“Ca²⁺透過性チャネル TRPV2 のドミナントネガティブ変異体による筋ジストロフィーの病態改善効果” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル, 2008.12.10.
7. 久光 隆、若林繁夫：“Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 とカルシニューリンとの新規相互作用の生理的意義の解析” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル, 2008.12.10.
8. 中村(西谷)友重、Jeromin, A., 若林繁夫：“新しい心機能調節因子としての Ca²⁺センサータンパク質 NCS-1 の役割” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートピアホテル, 2008.12.9.
9. 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蛋白質モデル構造における医薬分子結合部位の予測” 日本薬学会第 128 年会 (横浜) パシフィコ横浜 2008.3.26.
10. 磯貝秀人、牟田 元、平山令明：“標的分子の立体構造情報に基づくリガンド平面構造の探索法” 日本薬学会第 128 年会 (横浜) パシフィコ横浜 2008.3.26.
11. 曾我真司、白井宏樹、小堀正人、平山令明：“アミノ酸の共起性から見た蛋白質の低分子化合物結合部位” 第 8 回日本蛋白質科学会年会 (東京) タワーホール船堀 2008.6.10.
12. N.Hirayama: “Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites” XXth International Symposium on Medicinal Chemistry (Vienna, Austria) September 4, 2008
13. 東田欣也、後藤純一、平山令明：“疑似分子プローブと標的構造に基づく de novo 医薬分子設計法の開発” 第 36 回構造活性相関シンポジウム (神戸) 神戸国際会議場 2008.11.2.
14. 曾我真司、白井宏樹、小堀正人、平山令明：“アミノ酸の共起性から見た蛋白質の低分子化合物結合部位” 第 36 回構造活性相関シンポジウム (神戸) 神戸国際会議場 2008.11.3.
15. 米沢朋、吉川枝理、重成敦子、金藤聡美、光永滋樹、田中正史、平山令明、猪子英俊：“マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値の抽出技術の研究開発” 第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム (東京) 虎の門パストラル 2008.11.6.
16. 井上雄介、北澤将史、沖津修、橋本誠一、中島秀典、藤井秀明 長瀬博、磯貝秀人、平山令明：“ラ

ット肝細胞株 H4IIEC3 を用いた肝糖新生抑制化合物および siRNA の探索研究」第 26 回バイオテクノロジーシンポジウム（東京）虎の門パストラル 2008.11.6.

- 17.菅野拓也, 田中一則, 柳澤佳子, 秦野伸二, 平山 令明, 池田穰衛:「酸化ストレス性神経細胞死を選択的に抑制する新規低分子化合物の選抜と同定」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会（神戸）2008.12.10.

- 18.T.Kanno, K.Tanaka, Y.Yanagisawa, S.Hadano, N.Hirayama, and J.-E.Ikeda: "Identification of novel neuroprotectant by the NAIP-based drug screening for an anti-oxidative stress cell death compounds." Neuroscience 2008 (Washington DC) 2008.11.16.