

2009, 2006 A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 盛 英 三

平成22年 (2010年) 3月

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 盛 英三

平成22年（2010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	13
--------------------------	----

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
-----------------	----

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

研究代表者 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. 分子機能イメージング技術の開発を推進することである。本年度は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ADAMTS13の構造解析とFerキナーゼのN-末端側に位置するF-BARドメインの結晶構造解析に成功した。分子機能イメージングに関してはがん・先天性心疾患・白血病の原因となっているSHP2に関して、SHP2が結合する基質の同定、それを拮抗するin-silico薬剤スクリーニング系の確立、SHP2変異に基づくゼブラフィッシュ疾患モデルの作成に成果を挙げた。

研究分担者

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. 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)

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壊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る。私達は最近、活性化型NHEを高発現するマウスが著明な心肥大・心不全を起こす

正常マウス Tgマウス

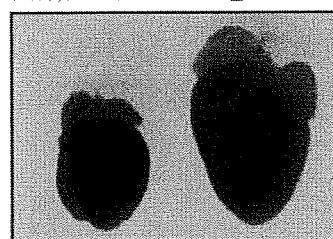


図1. NHEのトランスジェニック(Tg)マウスでは著明な心肥大・心不全が起こる。NHE阻害剤カリポライドは病態を著明に改善する。NHEが心不全治療の優れた標的になりうることを示している。

ことを見出しており(図1)、活性化を抑える薬剤の有効性を明らかにした¹⁾。またNHEには細胞質側に必須サブユニットCHPが常時結合していること、その第二アイソフォーム(CHP2)はがん細胞特異的に発現し、がん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²⁾。これまでの実験結果は、CHP2とNHEの相互作用は非常に強固であることを示し、昨年度までに試みた*in silico*探索法で見い出された低分子はこの相互作用を凌駕してCHP2を阻害することはできなかつた。そこで今年度はCHP2-NHE複合体分子の動的相互作用を分子動力学 (MD: molecular dynamics) で解析することにより、CHP2上でNHEとの結合性が弱い領域を特定し、その領域にNHEに代わって結合できる低分子を*in silico*探索することを目指した。さらに、NHEの活性化機構を明らかにし、関連する新規創薬標的の探索も併せて行い、新しい創薬開発の基盤とすることを目的とした。

- 1) Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., Wakabayashi, S.: *Circ. Res.* 103: 891-899, 2008.
- 2) Ben Ammar, Y., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., Wakabayashi, S.: *EMBO J.* 25(11): 2315-2325, 2006.

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:

ADAMTS13は血漿von Willebrand因子 (VWF) を切断するメタロプロテアーゼである。遺伝的もしくは自己抗体の出現などにより後天的にADAMTS13活性が欠損すると、血中に超高分子量VWFマルチマーが蓄積し、これが微小血管で血小板血栓形成を引き起こし、重篤な疾患である血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) を生じる。本研究ではADAMTS13の機能不全によるTTP発症のメカニズムの解明と新しい治療法の開発を目的にADAMTS13のVWF認識ドメインを含む領域ADAMTS13-DTCS (287-685アミノ酸残基) の結晶構造の決定を行う。

脂質膜結合・変形タンパク質:

生体膜のリモデリングは、膜輸送や飲・食作用、細胞やオルガネラの形状形成などの基盤をなす重要な細胞活性である。この活性は細胞骨格と膜変形分子の共同作用として実現されている。アクチン細胞骨格の制御に中心的な役割を果たしているRhoファミリー低分子GTP結合タンパク質のエフェクター分子の中に、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ファミリーがあることが明らかにされた。I-BARの代表といえるIRSp53や、FerキナーゼなどのF-BARドメインの構造研究は、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の可能性を開くものである。これらの分子機能の詳細を明らかにするため、タンパク結晶構造解析に取り組み、構造を基にしたデザイン変異体の機能解析から脂質膜変形能の分子的基盤を解明する。今年度も引き続きFerキナーゼをターゲットとして研究を進める。

FerとFes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を制御している。我々は、内皮細胞の細胞間接着分子PECAM-1のキナーゼとしてFerを同定し報告している。また、Fer/Fesは一部のがんの増悪化にも関係することが知られている。Fer/Fesは、ほとんどが細胞質に存在することから、F-BARドメインは活性が負に制御されていることが考えられる。逆にキナーゼ活性はF-BARドメインにより負に制御されているとの報告がある。脂質膜結合活性や、ドメイン間制御の詳細を明らかにするため、Ferの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む。

II. 薬効スクリーニング

チロシン脱リン酸化酵素SHP2は、脱リン酸化酵素であるにも関わらず、低分子量Ras蛋白質の活性化によるErkの活性化を起こし、細胞の増殖促進に働く。従って、遺伝子変異 (PTP11NがSHP2の遺伝子名である) によりSHP2のアミノ酸変異がおきてSHP2が恒常的活性化型変異を起こした場合には、Noonan症候群、Leopard症候群といった先天性心疾患をとともなる先天異常を起こしてしまう。しかし、SHP2が如何にしてRas活性化 (ひいては増殖作用) を有しているのか不明であったため治療法の開発の標的さえ見つからなかつた。SHP2が病態に関与する疾患とし

て胃がんも考えられている、ヘリコバクターピロリのCag A蛋白質に結合することでSHP2が活性化して、胃細胞の過剰増殖から胃がんの発症に至る系や、若年性骨髄単球性白血病でもSHP2の異常が報告されている。

本研究ではSHP2酵素の基質の同定から、SHP2の阻害薬の候補化合物の探索ならびに、阻害効果の判定のためのアッセイ系の確立を目指す。

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

1. MD計算

X線解析で得られたCHP2-NHE複合体の構造にpH=7.0の状態を仮定して水素原子を付加し、分子力場法で最適化した構造を出発構造とした。分子力場には、CHARMmおよびAmberの異なる2種類の力場を用いて独立なMD計算を行った。MD計算を含む以下のすべての計算はソフトウェア・システムMOE³⁾で行った。

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

2. 低分子データベース

Sigma-Aldrichのカタログにある分子の内、分子量が200から700までの50,504分子をまず選別し、種々のフィルターを通し、最終的に独立性の高い1,000分子を選択した。この選択にはMOEのDiverse Subsets機能を用いた。分子間の距離および類似性を計算するためにfingerprint (MACCS Structural Keys)およびTanimoto指数を各々用いた。

3. NHE結合部位の特定およびドッキング・シミュレーションによる低分子探索

CHP2上でNHEが結合する部位を特定するために、MOEのAlpha Site Finderを用いた。ソフトウェアASEDock⁴⁾を使用し、特定された領域に対して、上記1,000分子をドッキングさせ、結合性を判別した。ドッキングの際、CHP2の非水素原子は固定し、水素原子の位置のみを最適化し

た。低分子については全原子を最適化した。収束条件はRMS Gradientで0.01 (kcal/mol/Å per atom)とした。

- 4) 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.

4. 結晶構造解明に向けたNHE/CHP複合体の発現・精製・安定性の確認

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²⁾。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。そこで、SF9昆虫細胞を用いて、NHE/CHP複合体を発現・精製する系を構築した。

5. NHEのホルモンによる活性化機構と新しい分子内創薬標的ドメインの同定

これまでの構造機能研究により、CHP結合ドメイン直後の領域 (50残基程度)は生理活性脂質であるホスファチジルイノシトール2リン酸 (PIP2)が結合するドメインであり、ホルモンによる活性化に必須であることが明らかになっている。そこで、この脂質結合ドメイン (LIDと略す)を蛍光ラベルし、脂質モニタープローブとして細胞に発現するとともに、LIDのペプチドを合成して脂質結合特性を調べた。ペプチドとphorbol ester (PE)との結合は、トリプトファン残基と蛍光性PEアナログSAPDとの蛍光エネルギー移動 (FRET)を測定することによって行った。さらに、変異導入を行って、脂質結合とNHEの活性との相関を検討した。

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:

ADAMTS13-DTCSを糖鎖修飾酵素変異株CHO Lec 3.2.8.1に分泌発現させ、各種クロマトグラフィーにより精製した。単離したADAMTS-DTCS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SPring-8のアンジュレータービームラインBL41XUを用

いて回折データ収集を行った。OsCl₃を含む重原子置換体結晶を用い、OsのL3吸収端近傍の4波長回折強度データセットを用いて実験的に2.9Å分解能での位相決定を行い、最終的には2種類の重原子を含まない結晶を用いて2.6Åおよび2.8Åでの精密化を行い、構造決定を行った。

結晶構造を基に様々な変異ADAMTS-MDTC分子を作成し、VWF切断活性を測定した。

脂質膜結合・変形タンパク質：

Fer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、機能解析により膜変形能の構造的基盤を明らかにした。

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

SHP2 野生体ならびに変異体の発現 plasmid の構築：

SHP2はアミノ末端にSH2ドメインがタンデムに2個つながっている。C末端側1/2にチロシン脱リン酸化酵素活性があり、通常N末端とC末端が結合しているがSH2がリン酸化チロシンに結合することによって、解放されてS脱リン酸化酵素の活性部位が基質を認識することが可能となる。これが正常なシグナル伝達系でのSHP2の活性化機構であるが、PTP11Nの遺伝子変異によって生じ、D61G、E76D、T42Aのアミノ酸変異によってSHP2が恒常的活性化型となる。本研究ではこれらの恒常的活性化型を細胞で発現するplasmidを構築した。またこれらの精製蛋白質を得るためにタグ付き蛋白質を発現させるようなプラスミドも構築した。また、ゼブラフィッシュにヒト型SHP2変異体を発現させるために、pCS2ベクターに変異SHP2をコードするcDNAを挿入した。

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。一細胞期の卵にSHP2 D61G mRNAをインジェクションして数日間の観察をおこなった。心臓の形態、ならびに両眼間の距離ならびに両眼の大きさを指標にD61G変異体の発現によって、Noonan症候群の症状を呈するモデル

を作成することができるか否かを検討した。心臓の形態変化は実体顕微鏡下で、イメージングソフト Fluoviewを用いて画像を構築した後に計測を行って心臓、眼症状の異常を定量的に解析するように努めた。

SHP2 の基質の同定：

これまでにFocal adhesion kinaseがSHP2の基質となりうる事が報告されていたがわれわれはERKの活性化を抑制する系の抑制系にSHP2が作用すると考えて、その基質の同定を試みた。

（倫理面への配慮）

ゲノム解析、プロテオーム解析等を扱う際にはそのための倫理規定（ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、遺伝子治療臨床研究に関する指針）を遵守して行った。動物実験は、各機関の実験動物取り扱い規定に基づき、また、動物愛護に配慮して行った。特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう、十分な麻酔薬を使用した。

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. MD 計算

MD計算の結果は、NHEのN末端はCHP2のconcavity内に比較的強くつなぎとめられているが、C末端は、CHP2のNHE結合部位から大きくずれることがあることを示した。またこのC末端のヘリックス構造は壊れやすいこともシミュレーションは示した。具体的には、C末端のアミノ酸の内、533G、534I、535E、537Iおよび538Cの領域がCHP2結合部位から外れる傾向にあり、かつ二次構造が崩壊し易いことが示唆された。

2. 低分子結合部位の特定

CHP2内の空間（複合体からNHEを除いた空間）に計算することができるalpha spheres（プログラムAlpha Site Finderで計算される）の内、MD計算の結果から運動性が高いと示唆されたNHEの5アミノ酸の全原子から2.0Å以内にあるalpha spheresを図2に示した。この部位（hot

spot) に結合するNHE部分はNHEの他の部分に比較して分子運動が大きい。従って、この部位がCHP2とNHEが動的に相互作用する過程で、溶媒に露出する可能性は高い。

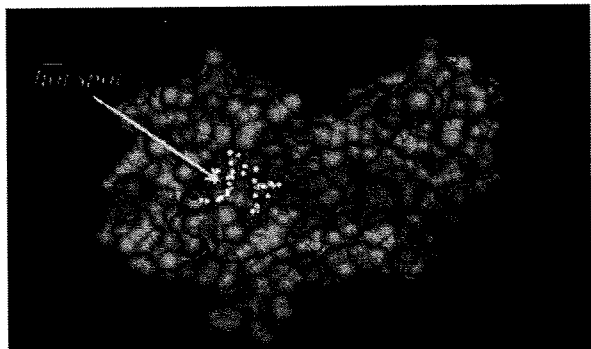


図2. CHP2(溶媒露出表面で表現)内のhot spot領域を表現するalpha spheres。白および赤球は疎水および親水的な領域を示す。NHEのC末5残基をstick-modelで示した。hot spot領域では、NHEとCHP2との相互作用は弱いと、MD計算は予測した。

3. ドッキング・シミュレーションによる低分子探索

hot spotに結合することが可能な分子を上記の1000分子からドッキング・シミュレーションにより *in silico* 探索した。分子の結合性は標的分子と低分子の相互作用エネルギーに相当する U_{total} で判断した。結合性が高いと予想された分子の一つがCHP2に結合する様子を図3に示す。結合性が高いと予想された20分子を生理活性評価を行うべき候補分子として提案した。

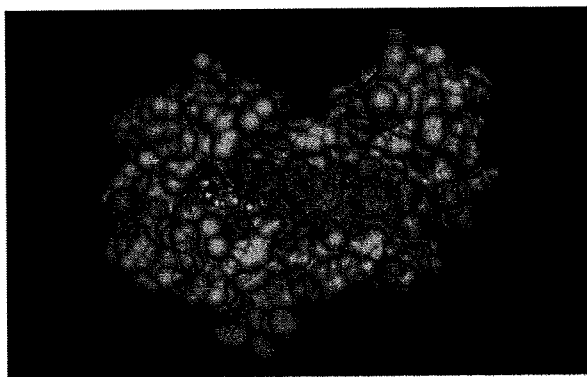


図3. hot spotに結合する低分子の一つ(ドッキング・シミュレーションの結果)。低分子はspace-filling modelで、NHEはstick-modelで表示した。

4. 結晶構造解明に向けたNHE/CHP複合体の発現・精製・安定性の確認

昨年までの研究により、ヒト1型NHEアイソフォーム(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した⁵⁾。今年度は精製標品を用いて、蛋白質安定性の検討、活性測定のための再構成系の構築を試みた。その過程で精製標品が比較的早期に安定性を失うことにより結晶化を試みることは難しいと判断された。不安定化の原因がおそらくCHP結合部位直後の領域が壊れやすいことにあると考えられたので、その領域に結合する因子を探索する必要があると判断された。

5) 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

5. NHEのホルモンによる活性化機構と新しい分子内創薬標的ドメインの同定

上述した蛋白質精製の実験結果を受けて、CHP結合部位直後の領域 (LIDと略す) を研究する過程で、偶然LIDに phorbol ester (PE) が結合することを発見した (図4)。GFP標識したLIDを細胞に発現したところ、興味深いこと

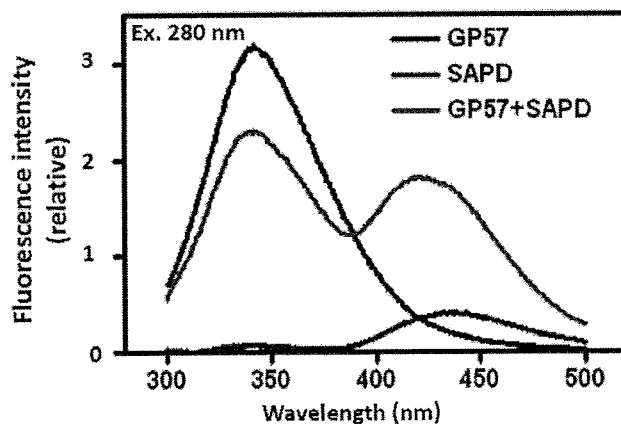


図4. NHEの脂質結合ドメイン(LID)に相当するペプチド(GP57)のトリプトファン残基と蛍光性PMAアナログSAPD間の蛍光エネルギー移動。両者が結合することを示す。

に、このプローブはPMAなどのPE添加後細胞膜に集積することがわかった (図5)。すなわちプロテインキナーゼC (PKC) のC1ドメインのように、PE結合によりLIDの塩基性残基クラスターを含む脂質結合ドメインの一部が露出し、細胞膜の酸性リン脂質への結合親和性が増加すると考えられた。LIDに変異を導入すると、PE結合、PEによる膜への集積は失われ、同時にNHEのPEやホルモンによる活性化は消失した。さらに、試みた4種類のPKC阻害剤はNHE活性化を阻害しなかったため、NHEの制御がこれまで考え

られてきたようにPKCによるものではなく、LIDへのPEの直接結合とそれに伴う脂質への相互作用増強の結果としてNHEの構造変化を伴う活性化が起こると考えられる⁶⁾。面白いことに、PKC阻害剤のうちでスタウロスポリンだけはLIDを介してNHE活性を直接阻害することがわかったので、スクリーニングを念頭においてスタウロスポリンの構造相関に基づいて市販化合物をピックアップした。

6) 若林ら：N⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)の生理活性脂質による活性調節、2009年日本生化学会大会

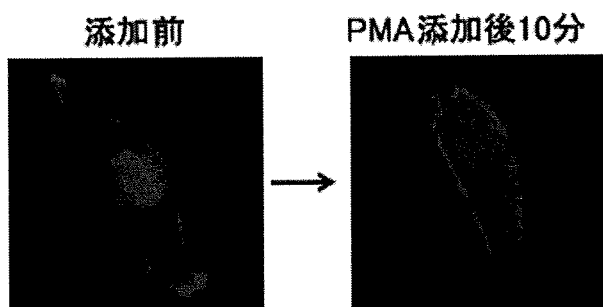


図5. GFPで蛍光ラベルしたNHEの脂質結合ドメイン(LID)を細胞に発現してPMAを添加すると、細胞膜に集積する。

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：

全てのADAMTSファミリータンパク質は分子N末端側からメタロプロテアーゼ(M)、ディスインテグリン様(D)、thrombospondin type-1 (T)、システインリッチ(C)およびスパーサー(S)の各ドメインを共通して持ち、このMDTCSドメイン部がADAMTSファミリータンパク質の機能に重要であることが分かっている。今回我々はこれらの機能ドメインの内ADAMTS13のMドメインを除くDTCS部について構造決定を行った。既に欧米グループが他のADAMTSについてMD部の構造決定を報告していたので、これらと合わせMDTCSドメイン部全体のモデルを世界で初めて提案することが出来た(図6)。その他、(1) Dドメイン全体とCドメインのN末側領域(C_A)は、アミノ酸配列の相同性は17%しかないにもかかわらず、構造的に近縁のADAMファミリータンパク質のCドメインと相同な折り畳み構造をとること、(2) T1ドメインの立体構造が先に構造解析されたthrombospondin-1とよく一致すること、(3) CドメインのC末側領域(C_B)はC_AとSドメインとの連結ドメインであること、(4) Sドメインは10本のβストランドから

なる2枚のアンチパラレルなβシートからなる構造ドメインであること、(5) C_AドメインとSドメインは複数の残基を介して相互作用していること、などが明らかになった。さらに、得られた立体構造を元に変異体を作成し、それらのVWF切断活性を測定することでADAMTS13の分子表面にVWF認識部位をマッピングすることに成功した。

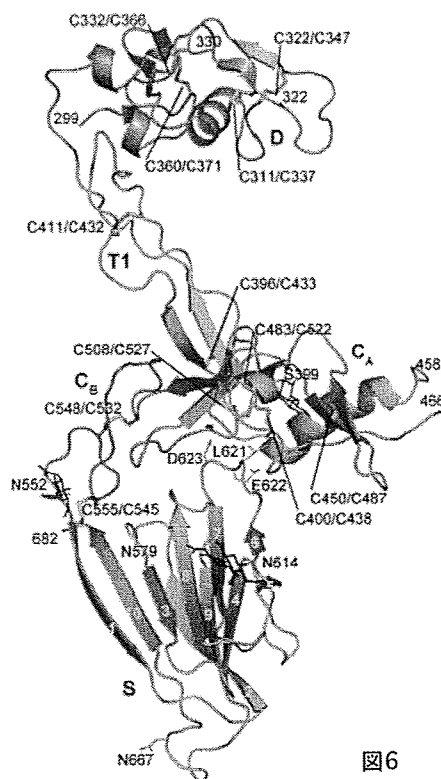


図6

脂質膜結合・変形タンパク質：

国立循環器病センター研究所の増田は心臓生理部・ベーンアマー室長および武田室長との共同研究により、FerキナーゼのN-末端側に位置するF-BARドメインの結晶構造解析に成功した(図7)。F-BARドメインの基本骨格はTocaファミリーのF-BARドメインと類似していたが、これらのF-BARの特徴である二量体間の端-端結合サイトは保存されていなかった。さらに、BARスーパーファミリーで広く保存されている、膜結合表面のリジンやアルギニンの一部を欠いていることがわかった。構造を基に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、SH2-キナーゼドメインによる負の制御のためではなく、それ自体の活性が低いことによることが明らかになった。

F-BARのC端側にあるCoiled-coilドメインは膜結合を強める働きがあること、F-BARドメインのどの領域の正電荷が膜結合・変形活性に重要であるかを明らかにする知見を得た。これらの結果については論文作成中である。

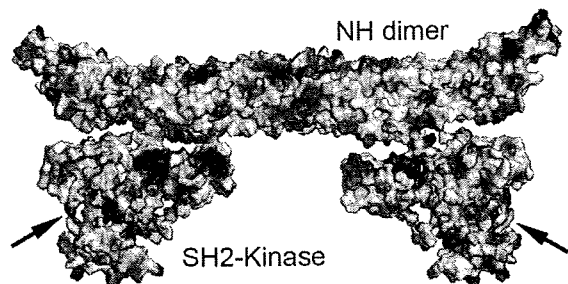


図7 Ferキナーゼの構成モデル

全長については、効率的なタンパク発現に成功したが、現時点では分解能が7Åと低い結晶しか得られておらず、構造解析に至っていない。

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

まず基質分子Xを同定した：

Xは、リン酸化部位を複数有しておりこのなかで近接するTyrのリン酸化ペプチドを用いて脱リン酸化活性を測定したところSH2をもつ分子が結合するTyrがSHP2によって効率よく脱リン酸化されることを突き止めた。さらに、この基質のリン酸化ペプチドを用いて、恒常的活性化型SHP2 (D61G, D61Y など) を用いて脱リン酸化活性を測定したところ、顕著な脱リン酸化を認めた。一方、脱リン酸化不活性化型SHP2 (C/S) 変異体では全く酵素反応が生じないことも確認した。

SHP2 の構造解析からの予測による SHP2 阻害化合物候補分子の探索：

SHP2の脱リン酸化酵素ドメインはすでに報告されており(3B70)、これをもとにしてSigma-Aldrichの化合物ライブラリーの6,500化合物のドッキング計算を行った。SHP2の構造のなかでmalate ionが結合する部位が存在し、二つの立体配座によって、候補を絞り込んだところ60、31の候補化合物にSHP2結合能があるのではないかと予想できる結果となった。

SHP2 異常の疾患モデルとしてのゼブラフィッシュの有用性：

D61G変異mRNAのinjectionにより心嚢の拡大と、眼の縮小と、両眼の乖離が顕著となっており、Noonan症候群の症状を一致する所見をゼブラフィッシュでも呈することがわかった。またD61Y変異体のインジェクションでは、胚胎の形成の異常も認められ、Rasのシグナル活性化を示唆する所見もえられた。(図8)



図8 野生型

SHP2 D61G

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

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、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。

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：

新たに解明した立体構造とそれに基づく変異体解析が

らADAMTS13の分子表面に存在するいくつかの可変ループ部が協同して伸展したVWFを認識するメカニズムが明らかになった。

脂質膜結合・変形タンパク質：

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(図7)。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。

今回明らかにしたFerキナーゼのドメインはバナナ形をしているN-末端の二量体であり、凹型の脂質膜結合表面を上向きに置いた。SH2-キナーゼはFesの構造

(Filippakopoulos et al. Cell, 2008)よりモデル化した。N-末端とSH2の間には約60アミノ酸のリンカーがあり、これら3つの部分構造の関係は不明。この図では、正の表面電荷を持つSH2のリガンド結合サイトが、負電荷を示すN-末端の凸型表面と相互作用し、キナーゼ活性部位(矢印)が外側を向くように置いた。赤は負、青は正の表面電荷を示す。

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

SHP2はがん・先天性心疾患・白血病の原因遺伝子となっていることから創薬の対象となると考えた。先天性疾患であっても、症状を軽減することが可能であろう。また胃がんの発症にもSHP2シグナルの過剰反応が*pirori*菌によっておこることからも胃がんに対する治療薬の候補となりうる。さらにsomatic mutationがおきた場合には急性白血病の原因にもなるので、SHP2の阻害薬としての可能性は少なくとも3つの疾病で考えられる。

このためにSHP2にまず結合活性があると予想できるものをスクリーニングの対象とした。化合物ライブラリーのなかで90化合物をSHP2結合活性があると予想して

SHP2阻害薬の候補化合物として選択することができた。われわれは本研究でSHP2の酵素活性を測定するアッセイ系を確立しており、90の候補化合物について同アッセイで阻害効果の有無を検証可能である。

もし、阻害効果が認められればさらに、化合物の側鎖の改変によるより高効率の阻害効果をもつ化合物の生成も可能になると予想している。また、このアッセイ系では構造予測がなくてもランダムスクリーニングでも酵素の活性阻害を調べることが可能と判断する。個体でのSHP2変異による活性化を表現型で探ることが可能となった。SHP2のD61G変異体のmRNAインジェクションではNoonan症候群と同様な症状を呈することがわかり、このゼブラフィッシュにSHP2阻害効果がみられた薬剤候補を投与することで個体でのSHP2阻害活性も検討可能になった。個体での阻害薬の効果の判定はマウスや大型動物への投与などの煩雑な過程へのスクリーニング系としても有用であると考えられる。ゼブラフィッシュで効果のないものは、動物投与を行うまでもなく効果が期待できないために、無駄に動物を殺生することなく薬剤の効果判定を行えることになる。

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

がんや循環器疾患では、NHEのホルモンによる活性化が増悪因子として重要であるため、この活性化を特異的に抑制する薬物が有効である。従って、これまでのCHPを標的としたものと並行して、NHEに関連した新しい標的の発見もまた重要なテーマとなる。今回偶然にも、NHE1が発がん因子であるホルボールエステルの直接的相互作用によって活性化されることを見出し、その結合ドメインが優れた創薬ターゲットとなることを明らかにした。

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：

今回の結晶構造解析により全てのADAMTS分子に共通した基本構造が明らかになった。変形性関節炎(OA)に深く

関与するアグリカナーゼ (ADAMTS4およびADAMTS5) はOA治療薬のターゲットと考えられている。我々の立体構造はこれらアグリカナーゼのexosite inhibitorの設計などにも役立つと考えられる。

脂質膜結合・変形タンパク質:

I-BARや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

本研究はSHP2阻害薬開発の大きな一歩となる重要なアッセイ系の確立ならびにin silicoのスクリーニングの可能性を示す研究となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

【原 著】

1. Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Shigekawa, M., Wakabayashi, S.: Dominant-negative inhibition of Ca^{2+} influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. (2009) *Hum. Mol. Gen.* 18(5): 824-834.
2. Cha, C. Y., Oka, C., Earm, Y. E., Wakabayashi S., Noma A.: A Model of Na^+/H^+ Exchanger and Its Central Role in Regulation of pH and Na^+ in Cardiac Myocytes. *Biophys. J* (2009) 97(10): 2674-2683.
3. Zanou, N., Iwata, Y., Schakman, O., Lebacqz, J., Wakabayashi, S., Gailly, P.: Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. *FEBS Letters* (2009) 583(22): 3600-3604.
4. T. Kawamura and N.Hirayama (2009). " Crystal Structure of Ganciclovir." *X-ray Structure Online* 25: 51-52.
5. F. Anzai, T. Kataishi, T. Nakano, M. Hirayama and N.Hirayama (2009). "Crystal Structure of a Novel Diyne, 1,4-Bis(4-((Z)-1-phenyl-2-(trimethylsilyl) vinyl)phenyl)buta-1,3-diyne." *X-ray Structure Analysis Online* 25: 63-64.
6. T. Kataishi, F. Anzai, T. Nakano, M. Hirayama and N.Hirayama (2009). "Crystal Structure of 1,4-bis[4-((2Z)-(trimethylsilyl)-1-phenylethenyl) phenylethynyl]benzene," *X-ray Structure Analysis Online* 25: 111-112.
7. Y. Izuhara, N. Yamaoka, H. Kodama, T. Dan, S. Takizawa, N.Hirayama, K. Meguro, C. van Ypersele de Strihou and T. Miyata (2010). "A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates." *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30: (published on line 20 January, 2010)
8. H. Muta and N.Hirayama (2010). "Alpha Sphere Filter Method: Application of Pseudomolecular Descriptors in Virtual Screening of 2D Chemical Structures." *J. Comput. Chem.* 31: in the press
9. 東田欣也、後藤純一、平山令明 (2009). "疑似分子プローブと標的分子構造に基づく de novo 医薬分子設計法の開発" *SAR News* 16, 16-20.
10. Nakayama D, Ben Ammar, Takeda S. "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the blood coagulation factor V-activating proteinase (RVV-V) from Russell's viper venom" *Acta Cryst*, F65, 1306-1308, (2009)
11. Akiyama, M, Takeda S., Kokame, K, Takagi, J, Miyata, T. "Crystal structures of the non-catalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor" *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 19274-19279 (2009)
12. Akiyama, M, Takeda S., Kokame, K, Takagi, J, Miyata,

- T. "Production, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the exosite-containing fragment of human von Willebrand factor-cleaving proteinase, ADAMTS13" *Acta Cryst*, F65: 739-742, (2009)
13. K. Yamada, R. Kuroda, H. Toyakawa, H. Ikeura-Sekiguchi, M. Yasumoto, M. Koike, F. Sakai, K. Mori, H. Mori, N. Fukuyama, E. Sato: A trial for fine and low-dose imaging of biological specimens using quasi-monochromatic laser-Compton X-rays: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 2009; A 608: S7-S10
14. T. Nishikawa, N. Iwakiri, Y. Kaneko, A. Taguchi, K. Fukushima, H. Mori, N. Morone, J. Kadokawa: Nitric Oxide Release in Human Aortic Endothelial Cells Mediated by Delivery of Amphiphilic Polysiloxane Nanoparticles to Caveolae: *Biomacromolecules*. 2009; 10: 2074-2085
15. Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, and Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* 323: 524-527, 2009
16. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab* 10: 178-188, 2009
17. Mori M, Nakagami H, Koibuchi N, Miura K, Takami Y, Koriyama H, Hayashi H, Sabe H, Mochizuki N, Morishita R, Kaneda Y. Zyxin mediates actin fiber reorganization in epithelial-mesenchymal transition and contributes to endocardial morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 20: 3115-3124, 2009
18. Miura K, Nam JM, Kojima C, Mochizuki N, Sabe H. EphA2 Engages Git1 to Suppress Arf6 Activity Modulating Epithelial Cell-Cell Contacts. *Mol. Biol. Cell* 20: 1949-1959, 2009,
19. Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD. FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages. *J. Biol. Chem.* 284: 8548-8556, 2009
20. Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, Mochizuki N. Angiopoietin-1 Induces Kruppel-like Factor 2 Expression through a Phosphoinositide 3-Kinase/AKT-dependent Activation of Myocyte Enhancer Factor 2. *J. Biol. Chem.* 284: 5592-5601, 2009

【総説】

1. 武田壮一 「ADAMファミリー蛋白質の立体構造と作用機構」特集・膜蛋白質の切断とその制御 蛋白質核酸酵素 54(13), 1754-1759 (2009)
2. 武田壮一 「蛇毒メタロプロテアーゼの立体構造とラッセルクサリヘビ毒素によるX因子活性化機構」血栓止血学会誌 20(3), 307-314 (2009)
3. M. Masuda and N. Mochizuki: Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Semin Cell Dev Biol*, in press. doi:10.1016/j.semcdb.2010.01.010

【学会発表】

1. 岩田裕子、若林繁夫: Ca²⁺透過チャネル TRPV2 阻害による筋変性疾患改善効果 第5回 TRP チャネル研究会 2009年6月4-5日 岡崎カンファレンスセンター
2. 若林繁夫、岩田裕子: 筋ジストロフィー発症に関わる TRPV2 モーダルシフトの病態的意義 特定領域研究「細胞感覚」平成21年度夏の班会議 2009年6月29-30日 沖縄コンベンションセンター
3. Iwata, Y., Wakabayashi, S: Ca²⁺-permeable channel TRPV2 as a promising therapeutic target for

- muscular dystrophy 第 8 回 日筋ジストロフィーシンポジウム 2009 年 7 月 3-4 日 Institut de Myologie Hopital de la Salpetriere, Paris FRANCE
4. 岩田裕子、若林繁夫：拡張型心筋症発症における Ca^{2+} 透過チャンネル TRPV2 の病態的役割 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日 神戸ポートピアホテル
 5. 中村(西谷)友重、若林繁夫：Neuronal Ca^{2+} Sensor-1 (NCS-1) の心筋 Ca^{2+} シグナル調節因子としての機能解析 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日 神戸ポートピアホテル
 6. 古林創史、若林繁夫：心筋細胞における Ca^{2+} 結合蛋白質 CHP3 の生理機能の解析 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日 神戸ポートピアホテル
 7. 若林繁夫、中村(西谷)友重、久光 隆： $\text{N}^{\text{a}}/\text{H}^{\text{+}}$ 交換輸送体(NHE1)の生理活性脂質による活性調節 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸ポートピアホテル
 8. 岩田裕子、若林繁夫：イオン輸送体を標的とした筋ジストロフィー治療薬の開発～ Ca^{2+} 透過チャンネル TRPV2 阻害による心筋症改善効果～ 精神・神経疾患研究委託費 19 指-7 班会議 2009 年 12 月 3-4 日 東京都千代田区 都市センターホテル
 9. 若林繁夫、平山令明：標的タンパクと相互作用する化合物の探索/設計 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研究報告会 2009 年 12 月 16 日 霞ヶ関ビル 33F 東海大学校友会館
 10. 若林繁夫： $\text{Na}^{\text{a}}/\text{H}^{\text{+}}$ 交換輸送体の脂質センシングドメインは活性制御に必須である 特定領域研究「細胞感覚」平成 21 年度冬の班会議 2009 年 12 月 23-24 日 箕面観光ホテル
 11. 堤紗理、片石拓海、安西文明、滋野裕士、山田悠介、平山令明、中野多一「ビニルシランもしくはビニルゲルマンユニットを末端に有するフェニレンエチニレン誘導体の合成と性質」第 5 6 回 有機金属化学討論会 (京都) 同志社大学今出川キャンパス 2009 年 9 月 11 日
 12. S. Soga, H. Shirai, M. Kobori and N. Hirayama ‘Chemocavity: Specific Concavity in Protein Reserved for the Binding of Biologically Functional Small Molecules’ 17th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) and 8th European Conference on Computational Biology (ECCB) July 1, 2009 (Stockholm Sweden)
 13. 朝川直行、小林誠一、後藤純一、平山令明「AutoGPA モデルによる受容体ポケットの特徴抽出」第 37 回構造活性相関シンポジウム (東京) 北里大学薬学部 2009 年 11 月 12 日
 14. 小林誠一、朝川直行、後藤純一、平山令明「AutoGPA: グリッドとファーマコフォアモデルの連携による 3D-QSAR モデルの自動構築」第 37 回構造活性相関シンポジウム (東京) 北里大学薬学部 2009 年 11 月 13 日
 15. 平山令明「PLB 法を用いた低分子結合部位の差別化」第 10 回 日本バイオインフォマティクス学会創薬インフォマティクス研究会「活性ポケットをインフォマティクスで理解する」(東京) 産総研 臨海副都心センター 2009 年 12 月 2 日
 16. Takeda S, Akiyama M, Kokame K, Takagi J, Miyata T: “Crystal structures of the non-catalytic domains of ADAMTS13”, Gordon Research Conference: Matrix Metalloproteinases, Les Diablerets, Switzerland, 2009. 9. 2-3 (poster)
 17. H. Mori: A creative care approach to the elderly with cognitive impairment in a group home in japan: 25th International Conference of Alzheimer’s Disease International, 10-13 March 2010, Thessaloniki, Macedonia - Greece”
 18. H. Mori, T. Fujii, N. Fukuyama, Y. Ikeya, Y. Shinozaki, K. Fukushima, K. Umetani, T. Tanabe: Fingertip microangiography using synchrotron radiation toward prediction of diabetic angiopathy: European Congress of Radiology, March 4-8, 2010, in Vienna, Austria.

19. H. Mori, T. Fujii, N. Fukuyama, Y. Ikeya, Y. Shinozaki, K. Umetani, T. Tanabe: Development of Fingertip Microangiography using Synchrotron Radiation to Determine Fixed Combination in the Treatment of Metabolic Syndrome.: The 2 International Conference on Fixed Combination in the Treatment of Hypertension, Dyslipidemia and Diabetes Mellitues 10-12 December 2009. Valencia, Spain.
20. T. Yada, H. Shimokawa, O. Hiramatsu, M. Satoh, N. Kashihara, Y. Shinozaki, H. Mori, A. Takaki, M. Goto, H. Nakamoto, Y. Ogasawara, F. Kajiya: Cardioprotective Effect of Hydrogen Peroxide and Erythropoietin During Acute Coronary Occlusion in Canine Coronary Native Collateral Microvessels in vivo: American Heart Association (Orland, Florida)
21. 中山大輔、Ben Ammar Youssef、武田壯一「ラッセルクサリヘビ毒由来血液凝固第V因子活性化プロテアーゼのX線結晶構造解析」日本結晶学会年会、関西学院大学、2009. 6(口頭発表)
22. 中山大輔、Ben Ammar Youssef、武田壯一「ラッセルクサリヘビ毒由来血液凝固第V因子活性化プロテアーゼの構造解析」第82回日本生化学会大会、神戸国際会議場、2009. 10(ポスターおよび口頭発表)
23. 秋山正志、武田壯一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行「ADAMTS13 非触媒ドメインの結晶構造解析と von Willebrand 因子に対する複数の非連続エキソサイトの同定」第82回日本生化学会大会、神戸国際会議場、2009. 10(ポスター)
24. 武田壯一「蛇毒プロテアーゼの結晶構造から見えてきたADAM/ADAMTSファミリープロテアーゼの作用機構」、SPC シンポジウム、第32回日本血栓止血学会学術集会、北九州国際会議場、2009. 6. 4(口頭発表)
25. 秋山正志、武田壯一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行「X線解析によるADAMTS13の部分立体構造の決定とエキソサイトの同定」、SPC シンポジウム、第32回日本血栓止血学会学術集会、北九州国際会議場、2009. 6. 4(口頭発表)
26. 武田壯一、秋山正志、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行「ADAMTS13の部分結晶構造と von Willebrand 因子認識・切断機構」、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本全日空ホテルニュースカイ、2009. 5. 21(ポスター発表)
27. T. Yada, H. Shimokawa, O. Hiramatsu, Y. Shinozaki, H. Mori, M. Goto, Y. Ogasawara, F. Kajiya: Role of H₂O₂ as an Endogenous EDHF during Coronary Occlusion and Injection of Erythropoietin in Canine Coronary Native Collateral Microvessels: 第73回日本循環器学会総会・学術集会. 2009
28. Y. Ikeya, N. Fukuyama, T. Fujii, S. Takeshita, K. Nishigami, Y. Tsutumi, H. Mori: In-hospital Microangiography for Vascular Regeneration Therapy: 第73回日本循環器学会総会・学術集会. 2009

H. 知的財産権の出願・登録
なし

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)

平成 21 年度分担研究報告書

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长

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、昨年度とは異なった戦略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。がんや循環器疾患では、NHE のホルモンによる活性化が増悪因子として重要であるため、この活性化を特異的に抑制する薬物が有効である。従って、これまでの CHP を標的としたものと並行して、NHE に関連した新しい標的の発見もまた重要なテーマとなる。今回偶然にも、NHE1 が発がん因子であるホルボールエステルの直接的相互作用によって活性化されることを見出し、その結合ドメインが優れた創薬ターゲットとなることを明らかにしたので報告する。

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る。

正常マウス Tgマウス



図1. NHEのトランスジェニック(Tg)マウスでは著明な心肥大・心不全が起こる。NHE阻害剤カリポライドは病態を著明に改善する。NHEが心不全治療の優れた標的になりうることを示している。

私達は最近、活性化型 NHE を高発現するマウスが著明な心肥大・心不全を起こすことを見出しており(図1)、活性化を抑える薬剤の有効性を明らかにしたり。また NHE には細胞質側に必須サブユニット CHP が常時結合していること、そ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²⁾。これまでの実験結果は、CHP2 と NHE の相互作用は非常に強固であることを示し、昨年度までに試みた *in silico* 探索法で見出された低分子はこの相互作用を凌駕して CHP2 を阻害することはできなかった。そこで今年度は CHP2-NHE 複合体分子の動的相互作用を分子動力学(MD: molecular dynamics)で解析することにより、

CHP2 上で NHE との結合性が弱い領域を特定し、その領域に NHE に代わって結合できる低分子を *in silico* 探索することを目指した。さらに、NHE の活性化機構を明らかにし、関連する新規創薬標的の探索も併せて行い、新しい創薬開発の基盤とすることを目的とした。

B. 研究方法

1. MD 計算

X 線解析で得られた CHP2-NHE 複合体の構造に pH=7.0 の状態を仮定して水素原子を付加し、分子力場法で最適化した構造を出発構造とした。分子力場には、CHARMm および Amber の異なる 2 種類の力場を用いて独立な MD 計算を行った。MD 計算を含む以下のすべての計算はソフトウェア・システム MOE³⁾ で行った。

2. 低分子データベース

Sigma-Aldrich のカタログにある分子の内、分子量が 200 から 700 までの 50,504 分子をまず選別し、種々のフィルターを通し、最終的に独立性の高い 1,000 分子を選択した。この選択には MOE の Diverse Subsets 機能を用いた。分子間の距離および類似性を計算するために fingerprint(MACCS Structural Keys) および Tanimoto 指数を各々用いた。

3. NHE 結合部位の特定およびドッキング・シミュレーションによる低分子探索

CHP2 上で NHE が結合する部位を特定するために、MOE の Alpha Site Finder を用いた。ソフトウェア ASEDock⁴⁾ を使用し、特定された領域に対して、上記 1,000 分子をドッキングさせ、結合性を判別した。ドッキングの際、CHP2 の非水素原子は固定し、水素原子の位置のみを最適化した。低分子については全原子を最適化した。収束条件は RMS Gradient で 0.01(kcal/mol/Å per atom)とした。

4. 結晶構造解明に向けた NHE/CHP 複合体の発現・精製・安定性の確認

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²⁾。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。そこで、SF9 昆虫細胞を用いて、NHE/CHP 複合体を発現・精製する系を構築した。

5. NHE のホルモンによる活性化機構と新しい分子内創薬標的ドメインの同定

これまでの構造機能研究により、CHP 結合ドメイン直後の領域(50 残基程度)は生理活性脂質であるホスファチジルイノシトール 2 リン酸(PIP2)が結合するドメインであり、ホルモンによる活性化に必須であることが明らかになっている。そこで、この脂質結合ドメイン(LID と略す)を蛍光ラベルし、脂質モニタープローブとして細胞に発現するとともに、LID のペプチドを合成して脂質結合特性を調べた。ペプチドと phorbol ester(PE)との結合は、トリプトファン残基と蛍光性 PE アナログ SAPD との蛍光エネルギー移動(FRET)を測定することによって行った。さらに、変異導入を行って、脂質結合と NHE の活性との相関を検討した。

C. 研究結果

MD 計算の結果は、NHE の N 末端は CHP2 の concavity 内に比較的強くつなぎとめられているが、C 末端は、CHP2 の NHE 結合部位から大きくずれることがあることを示した。またこの C 末端のヘリックス構造は壊れやすいこともシミュレーションは示した。具体的には、C 末端のアミノ酸の内、533G、534I、535E、537I および 538C の領域が CHP2 結合部位から外れる傾向にあり、かつ二次構造が崩壊し易いことが示唆された。

2. 低分子結合部位の特定

CHP2 内の空間(複合体から NHE を除いた空間)に計算することができる alpha spheres(プログラム

Alpha Site Finder で計算される) の内、MD 計算の結果から運動性が高いと示唆された NHE の 5 アミノ酸の全原子から 2.0 Å 以内にある alpha spheres を図 2 に示した。この部位 (hot spot) に結合する NHE 部分は NHE の他の部分に比較して分子運動が大きい。従って、この部位が CHP2 と NHE が動的に相互作用する過程で、溶媒に露出する可能性は高い。

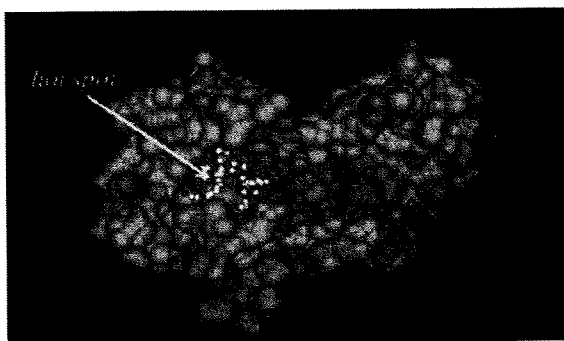


図2. CHP2(溶媒露出表面で表現)内のhot spot領域を表現するalpha spheres。白および赤球は疎水および親水的な領域を示す。NHEのC末5残基をstick-modelで示した。hot spot領域では、NHEとCHP2との相互作用は弱いと、MD計算は予測した。

3. ドッキング・シミュレーションによる低分子探索

hot spot に結合することが可能な分子を上記の 1000 分子からドッキング・シミュレーションにより *in silico* 探索した。分子の結合性は標的分子と低分子の相互作用エネルギーに相当する U_{total} で判断した。

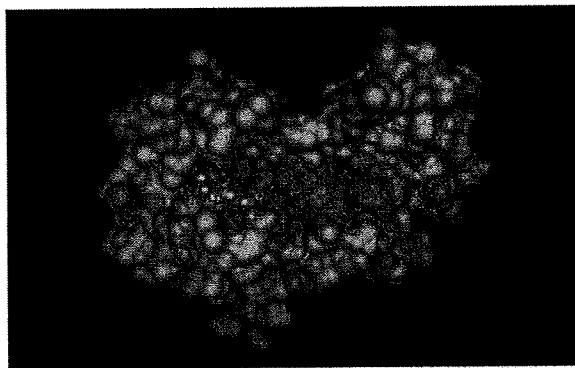


図3. hot spotに結合する低分子の一つ(ドッキング・シミュレーションの結果)。低分子はspace-filling modelで、NHEはstick-modelで表示した。

結合性が高いと予想された分子の一つが CHP2 に結合する様子を図 3 に示す。結合性が高いと予想された 20 分子を生理活性評価を行うべき候補分子として提案した。

4. 結晶構造解明に向けた NHE/CHP 複合体の発現・精製・安定性の確認

昨年までの研究により、ヒト 1 型 NHE アイソフォーム (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した⁵⁾。今年度は精製標品を用いて、蛋白質安定性の検討、活性測定のための再構成系の構築を試みた。その過程で精製標品が比較的早期に安定性を失うことにより結晶化を試みることは難しいと判断された。不安定化の原因がおそらく CHP 結合部位直後の領域が壊れやすいことにあると考えられたので、その領域に結合する因子を探索する必要があると判断された。

5. NHE のホルモンによる活性化機構と新しい分子内創薬標的ドメインの同定

上述した蛋白質精製の実験結果を受けて、CHP 結合部位直後の領域 (LID と略す) を研究する過程で、偶然 LID に phorbol ester (PE) が結合することを発見した (図 4)。GFP 標識した LID を細胞に発現したところ、興味深いことに、このプローブは PMA などの PE 添加後細胞膜に集積することがわかった (図 5)。すなわちプロテインキナーゼ C (PKC)

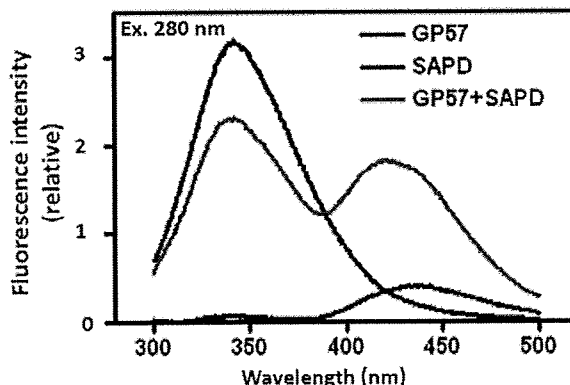


図4. NHEの脂質結合ドメイン(LID)に相当するペプチド(GP57)のトリプトファン残基と蛍光性PMAアナログSAPD間の蛍光エネルギー移動。両者が結合することを示す。

の C1 ドメインのように、PE 結合により LID の塩基性残基クラスターを含む脂質結合ドメインの一部が露出し、細胞膜の酸性リン脂質への結合親和性が増加すると考えられた。LID に変異を導入すると、PE 結合、PE による膜への集積は失われ、同時に NHE の PE やホルモンによる活性化は消失した。さらに、試みた 4 種類の PKC 阻害剤は NHE 活性化を阻害しなかったため、NHE の制御がこれまで考えられてきたように PKC によるものではなく、LID への PE の直接結合とそれに伴う脂質への相互作用増強の結果として NHE の構造変化を伴う活性化が起こると考えられる⁹⁾。面白いことに、PKC 阻害剤のうちでスタウロスポリンだけは LID を介して NHE 活性を直接阻害することがわかったので、スクリーニングを念頭においてスタウロスポリンの構造相関に基づいて市販化合物をピックアップした(平山)。

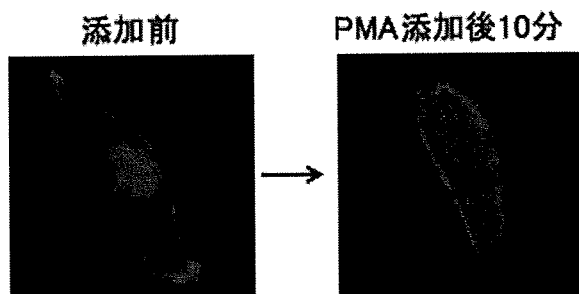


図5. GFPで蛍光ラベルしたNHEの脂質結合ドメイン(LID)を細胞に発現してPMAを添加すると、細胞膜に集積する。

(参考文献・発表)

1) Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., Wakabayashi, S.: *Circ. Res.* 103: 891-899, 2008.
 2) Ben Ammar, Y., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., Wakabayashi, S.: *EMBO J.* 25(11): 2315-2325, 2006.
 3) MOE (Molecular Operating Environment), version 2006.0801; Chemical Computing Group Inc.: Montreal, Quebec, Canada, 2006.
 4) 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.

5)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
 6)若林ら：N⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)の生理活性脂質による活性調節、2009 年日本生化学会大会

D. 研究発表

【原著】

1. Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Shigekawa, M., Wakabayashi, S.: Dominant-negative inhibition of Ca²⁺ influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. (2009) *Hum. Mol. Gen.* 18(5): 824-834.
 2. Cha, C.Y., Oka, C., Earm, Y.E., Wakabayashi, S., Noma A.: A Model of Na⁺/H⁺ Exchanger and Its Central Role in Regulation of pH and Na⁺ in Cardiac Myocytes. *Biophys. J.* (2009) 97(10): 2674-2683.
 3. Zanou, N., Iwata, Y., Schakman, O., Lebacqz, J., Wakabayashi, S., Gailly, P.: Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. *FEBS Letters* (2009) 583(22): 3600-3604.
 4. T.Kawamura and N.Hirayama (2009). " Crystal Structure of Ganciclovir." *X-ray Structure Online* 25: 51-52.
 5. F.Anzai, T.Kataishi, T.Nakano, M.Hirayama and N.Hirayama (2009). "Crystal Structure of a Novel Diyne, 1,4-Bis(4-((Z)-1-phenyl-2-(trimethylsilyl)vinyl)phenyl)buta-1,3-diyne." *X-ray Structure Analysis Online* 25: 63-64.
 6. T.Kataishi, F., Anzai, T.Nakano, M.Hirayama and N.Hirayama (2009). "Crystal Structure of 1,4-bis[4-((Z)-1-phenylethenyl)phenylethynyl]benzene," *X-ray Structure Analysis Online* 25: 111-112.
 7. Y.Izuhara, N.Yamaoka, H. Kodama, T. Dan,

- S.Takizawa, N.Hirayama, K. Meguro, C.van Ypersele de Strihou and T. Miyata (2010). "A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates." *J.Cereb. Blood Flow Metab.*30: (*published on line 20 January,2010*)
8. H.Muta and N.Hirayama (2010). "Alpha Sphere Filter Method: Application of Pseudomolecular Descriptors in Virtual Screening of 2D Chemical Structures." *J.Comput.Chem.* 31: *in the press*
9. 東田欣也、後藤純一、平山令明 (2009)."疑似分子プローブと標的分子構造に基づく de novo 医薬分子設計法の開発" *SAR News* 16, 16-20.
6. 古林創史、若林繁夫: 心筋細胞における Ca^{2+} 結合蛋白質 CHP3 の生理機能の解析 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日 神戸ポートピアホテル
7. 若林繁夫、中村(西谷)友重、久光 隆: Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE1)の生理活性脂質による活性調節 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸ポートピアホテル
8. 岩田裕子、若林繁夫: イオン輸送体を標的とした筋ジストロフィー治療薬の開発～ Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 阻害による心筋症改善効果～ 精神・神経疾患研究委託費 19 指-7 班会議 2009 年 12 月 3-4 日 東京都千代田区 都市センターホテル

【学会発表】

1. 岩田裕子、若林繁夫: Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 阻害による筋変性疾患改善効果 第 5 回 TRP チャネル研究会 2009 年 6 月 4-5 日 岡崎カンファレンスセンター
2. 若林繁夫、岩田裕子: 筋ジストロフィー発症に関わる TRPV2 モーダルシフトの病態的意義 特定領域研究「細胞感覚」平成 21 年度夏の班会議 2009 年 6 月 29-30 日 沖縄コンベンションセンター
3. Iwata, Y., Wakabayashi, S: Ca^{2+} -permeable channel TRPV2 as a promising therapeutic target for muscular dystrophy 第 8 回仏日筋ジストロフィーシンポジウム 2009 年 7 月 3-4 日 Institut de Myologie Hopital de la Salpetriere, Paris FRANCE
4. 岩田裕子、若林繁夫: 拡張型心筋症発症における Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 の病態的役割 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日 神戸ポートピアホテル
5. 中村(西谷)友重、若林繁夫: Neuronal Ca^{2+} Sensor-1 (NCS-1)の心筋 Ca^{2+} シグナル調節因子としての機能解析 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日 神戸ポートピアホテル
9. 若林繁夫、平山令明: 標的タンパクと相互作用する化合物の探索/設計 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研究報告会 2009 年 12 月 16 日 霞ヶ関ビル 33F 東海大学校友会館
10. 若林繁夫: Na^+/H^+ 交換輸送体の脂質センシングドメインは活性制御に必須である 特定領域研究「細胞感覚」平成 21 年度冬の班会議 2009 年 12 月 23-24 日 箕面観光ホテル
11. 堤紗理、片石拓海、安西文明、滋野裕士、山田悠介、平山令明、中野多一「ビニルシランもしくはビニルゲルマンユニットを末端に有するフェニレンエチニレン誘導体の合成と性質」第 5 6 回有機金属化学討論会 (京都)同志社大学今出川キャンパス 2009 年 9 月 11 日
12. S.Soga, H.Shirai, M.Kobori and N.Hirayama 'Chemocavity: Specific Concavity in Protein Reserved for the Binding of Biologically Functional Small Molecules' 17th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) and 8th European Conference on Computational Biology(ECCB) July 1, 2009 (Stockholm Sweden)