

200912006B

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-21年度 総合研究報告書

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19年度-21年度 総合研究報告書

研究代表者 盛 英三

平成22年（2010年）3月

# 目次

## I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 41

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)

総合研究報告書

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推進である。H19-21年度において CHP2 複合体の構造にもとづく医薬品探索を推進し、新規タンパク構造解析に関しては ADAM ファミリータンパク、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等に成功した。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

##### H19-H20年度：

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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>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。本グループは 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<sup>1)</sup>。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。

##### H21年度：

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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>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・心不全を起こすことを見出しており (図 1)、活性化を抑える薬剤の有効

## 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阻害剤カリボ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。

性を明らかにした<sup>2)</sup>。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。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 H 2 1 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する。

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

### ② 次期治療標的タンパクの構造解析

#### H 1 9 年度:

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 (エクドメインシエディング) 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がん、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。

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目的に研究を行った。これらのタンパクは脂質結合・変形活性をもつ共通のドメイン構造を有する。

#### H 2 0 年度:

心筋の収縮に関わる重合アクチンの調節を司る心筋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られられる。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、一部のがん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む。

#### H21年度:

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

#### H19年度:

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。

## H20年度:

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満たす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す。

## H21年度:

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った。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 CagA 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

##### H19-H20年度:

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。

H19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、H20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。

#### H21年度:

以下の新たな創薬アプローチを実施した。

#### 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 MOE<sup>3)</sup> 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 ASEDock<sup>4)</sup> 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<sup>2)</sup>。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

#### H19年度:

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領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。

#### H20年度:

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領域特異性についての情報を得る。

#### H21年度:

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。OsCl<sub>3</sub> 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 2.9 Å 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 2.6 Å および 2.8 Å 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-MDTCS 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

#### H19年度:

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。

## H20年度:

**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-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を 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授精後 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。

## H21年度:

**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-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 の基質となりうること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)

#### H19年度:

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 2) 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。

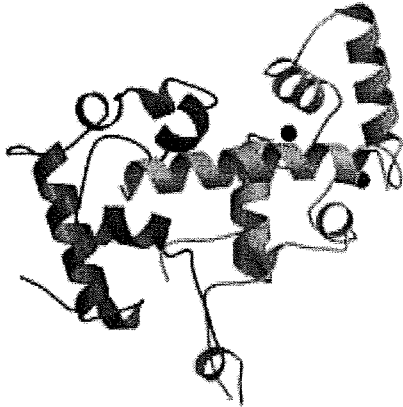


図2：Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体と制御タンパク CHP の複合体の構造

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3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。

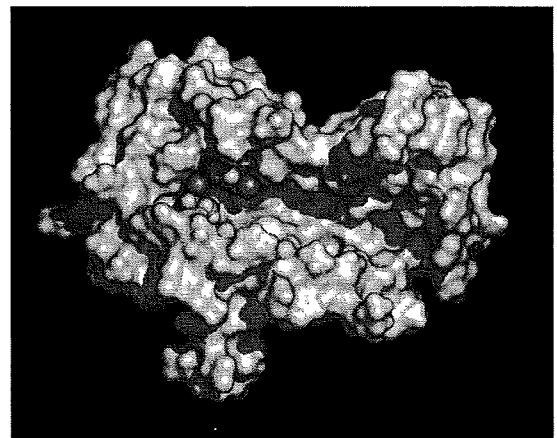


図3：CHP2 疎水性の溝に結合する化合物のモデル

H20年度：

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4に示す。

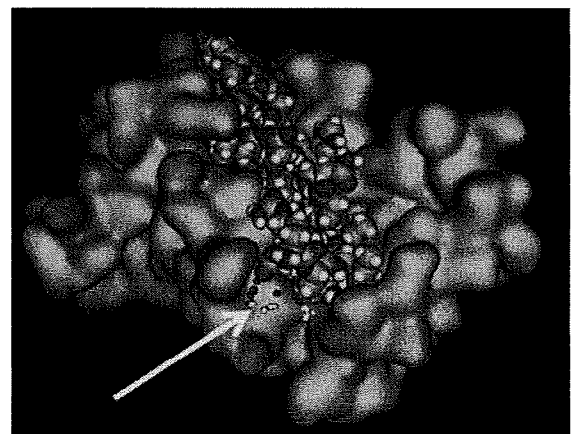


図4

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 5 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。

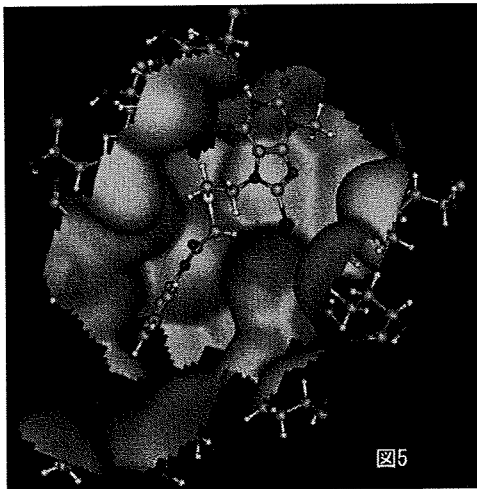


図5

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。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、アフィニティーカラムを経て、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。

## H21年度:

### 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 2.0 Å 以内にある alpha spheres を図 6 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。

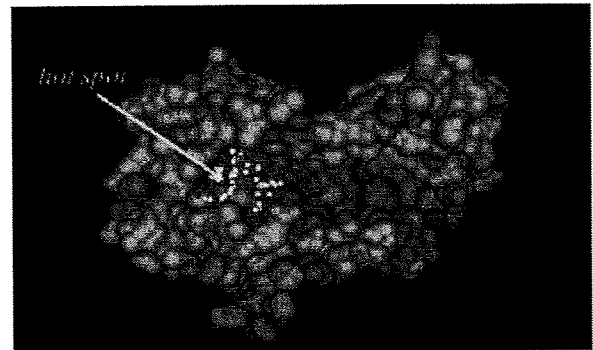


図6. CHP2(溶媒露出表面で表現)内のhot spot領域を表現するalpha spheres。白および赤球は疎水および親水的な領域を示す。NHEのC末5残基をstick-modelで示した。hot spot領域では、NHEとCHP2との相互作用は弱いと、MD計算は予測した。

的に相互作用する過程で、溶媒に露出する可能性は高い。

### 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 7 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。

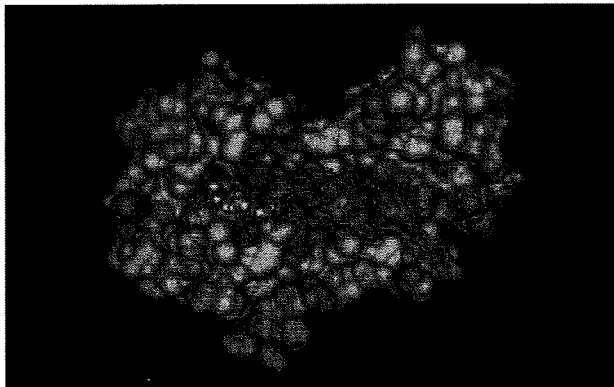


図7. hot spotに結合する低分子の一つ(ドッキング・シミュレーションの結果)。低分子はspace-filling modelで、NHEはstick-modelで表示した。

#### 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<sup>5)</sup>。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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体/CHP複合

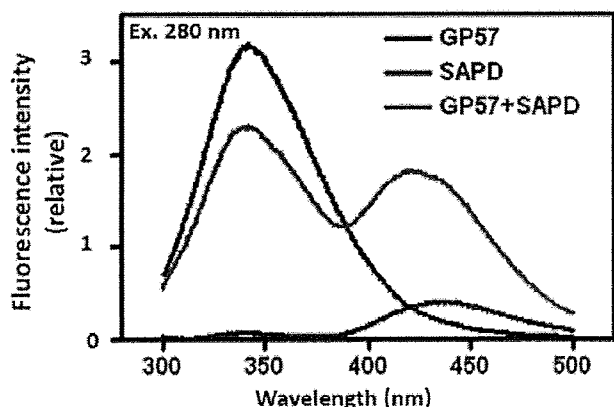


図8. NHEの脂質結合ドメイン(LID)に相当するペプチド(GP57)のトリプトファン残基と蛍光性PMAアナログSAPD間の蛍光エネルギー移動。両者が結合することを示す。

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8)。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9)。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ので、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<sup>6)</sup>。面白いことに、PKC阻害剤のうちでスタウロsporin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sporin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：Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>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

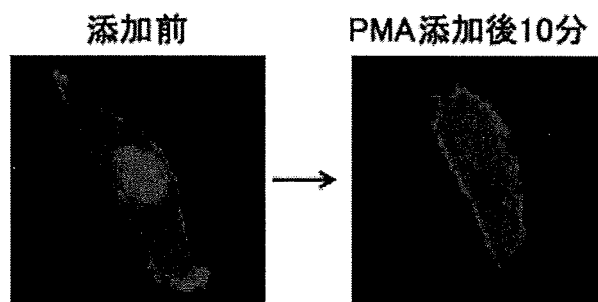


図9. GFPで蛍光ラベルしたNHEの脂質結合ドメイン(LID)を細胞に発現してPMAを添加すると、細胞膜に集積する。

②次期治療標的タンパクの構造解析

H19年度：

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 2.15Å の分解能で明らかにした (図 10 : Igarashi et al. FEBS Lett. (2007))。

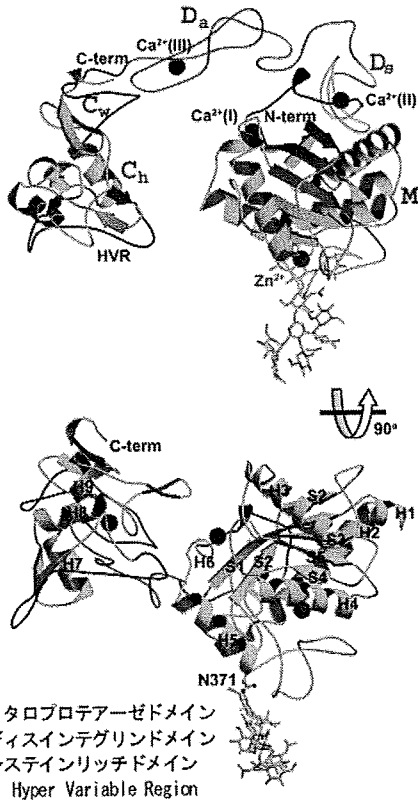


図 10 : M:メタロプロテアーゼドメイン  
D:ディスインテグリンドメイン  
C:システインリッチドメイン  
HVR: Hyper Variable Region

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 11)。

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 12、Takeda et al. FEBS Lett. (2007))。

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

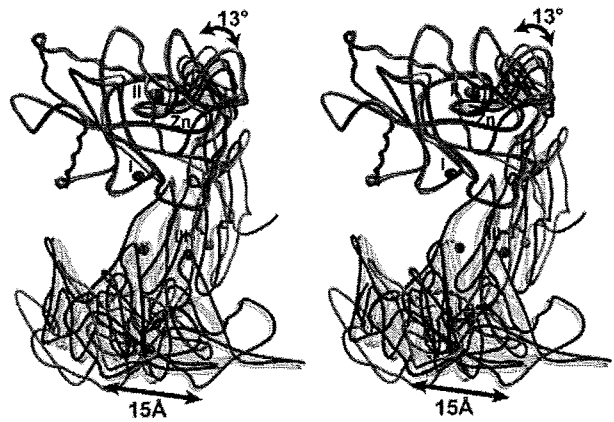


図 11 : 緑 : VAP1 M-ドメイン  
青・赤 : 代表的 VAP2 M-ドメイン

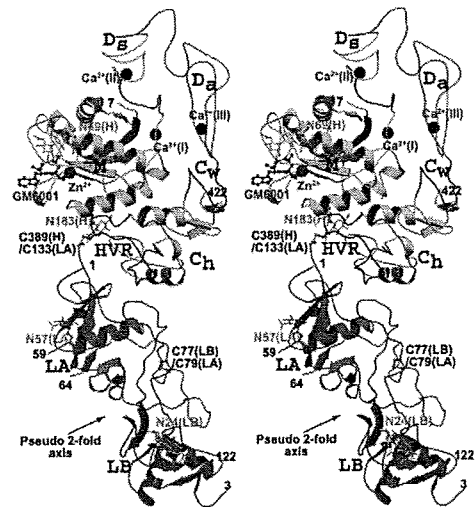


図 12 : M, D, C, HVR : 図 1 と同じ  
LA, LB : レクチン様軽鎖

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 13)。

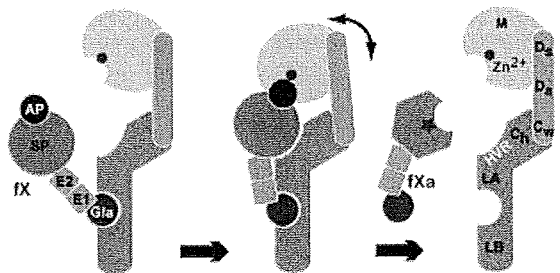
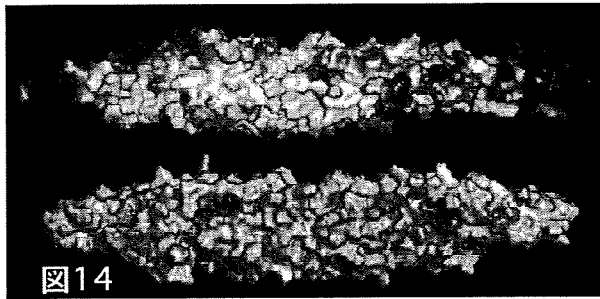


図 13 : RVV-X による Factor X 活性化メカニズム

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1.7Åの高分解能で明らかにする事に成功した(図14)。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。



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。

#### H20年度:

心筋トロポニン:今回全長ヒト心筋 TnI を含む三量体コアドメイン 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)とは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 Tn1 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・コアド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 ドメインのどの領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。

#### H21年度:

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15)。その他、(1) D ドメイン全体と C ドメインの N 末側領域(C<sub>N</sub>)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<sub>C</sub>)は C<sub>N</sub> 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<sub>N</sub> ドメイン

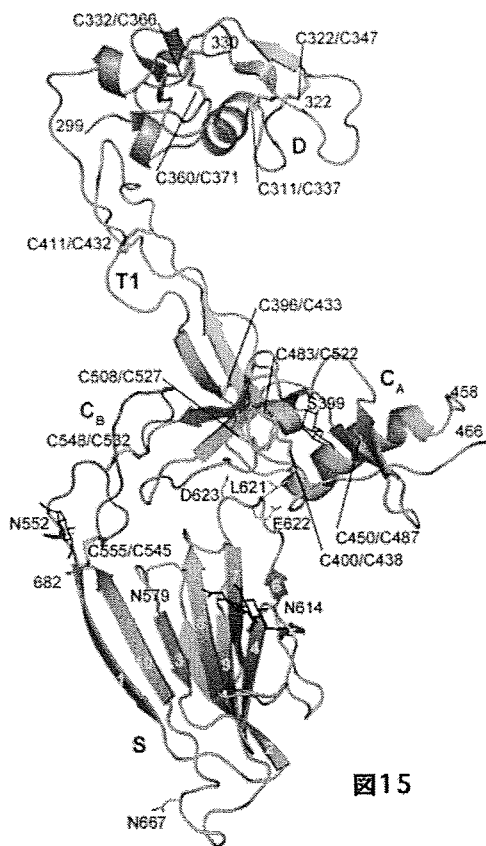


図15

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。

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 16)。

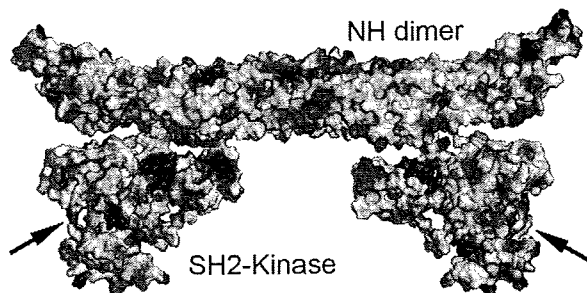


図16

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 ドメインのどの部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

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

H19年度:

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。カルボキシ末端側に 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, Ra1GEF, 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Sensitibity, specificityが得られなかった。

#### H20年度：

##### 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

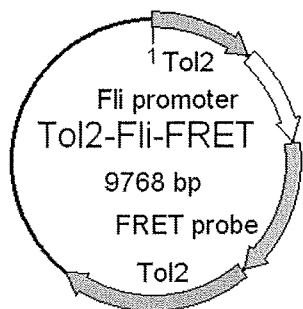


図17

現するようなプラスミドを図 17 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検討した。図 18 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。

#### H21年度：



図18

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：

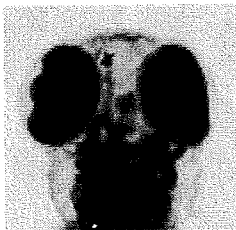
SHP2 の脱リン酸化酵素ドメインはすでに報告されており (3B70)、これをもとにして Sigma-Aldrich の化合物ラ

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。(図 19) 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、Ras のシグナル活性化を示唆する所見もえられた。

野生型



SHP2 D61G

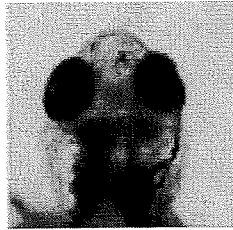


図 19

## 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

##### H19年度：

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。CHP2 の他のドメインに着目したデザインが必要であることを示した。

##### H20年度：

H20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。

##### H21年度：

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している。細胞膜イオントランスポーターの一つである Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>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・一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。

#### ②次期治療標的タンパクの構造解析

##### H19年度：

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 6.5 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かし、生体膜のダイナミ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。

## H20年度:

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。今後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。

## H21年度:

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から ADAMTS13 の分子表面に存在するいくつかの変異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。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。図 16 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 (薬剤スクリーニング) の開発

### H19年度:

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-effector-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。今後は Rit-RGL3 を骨格とした分子プローブの作成を計画したいと考えた。

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。

### H20年度:

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。

#### H 2 1 年度 :

SHP2 は癌・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。また胃癌の発症にも 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癌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のが可能と判断する。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

##### H 1 9 年度 :

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た。

##### H 2 0 年度 :

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た。

##### H 2 1 年度 :

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と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。