

平成30年6月15日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13098

研究課題名(和文)非構造的たんぱく質を制御する合成分子の創製

研究課題名(英文) Exploration of synthetic molecules that control intrinsically disordered proteins

研究代表者

大神田 淳子 (Ohkanda, Junko)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：50233052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非構造的領域(intrinsically disordered proteins; IDPs)の構造変化と相互作用を制御する合成化合物は新しい創薬への道を拓くブレークスルーとなると期待されるが、IDPsの詳細は未だ不明な点が多く阻害剤すらほとんど見つかっていない。本研究では、概日時計転写因子ClockとBmal1について遺伝子組換え型たんぱく質を取得し、蛍光偏光変化を指標とする両者のヘテロ2量体形成評価系を構築した。低分子化合物ライブラリ評価実験の結果、Clock/Bmal1の分子間相互作用を有意に阻害する低分子化合物を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Synthetic compounds that control the structural changes and interactions of intrinsically disordered proteins (IDPs) are expected to be a breakthrough that paves the way for new drug discovery. However, details of IDPs are still unknown, and almost no inhibitors that specifically disrupt IDP's functions have been found. In this study, we focused on the Circadian Clock transcription factors Clock and Bmal1 that are known as typical IDPs in which more than 30% in length are highly disordered. We obtained truncated version of recombinant Clock and Bmal1, and constructed a system of fluorescent polarization assay for heterodimer formation of Clock/Bmal1. As a result of evaluation of low-molecular-weight aromatic compound library, we succeeded in finding a compound which significantly inhibits intermolecular interaction of Clock / Bmal1.

研究分野：生物有機化学

キーワード：非構造的たんぱく質 概日時計転写因子 IDPs 阻害剤探索 Bmal1 Clock

1. 研究開始当初の背景

(1) 全たんぱく質の 40% を占める非構造的領域(intrinsically disordered proteins; IDPs) が、弱く短寿命なたんぱく質間相互作用(PPI)の調節を担っていることが明らかになってきた。IDPs の構造変化と相互作用を制御する合成化合物は新しい創薬への道を拓くブレークスルーとなると期待される。ところが IDPs の生物学的な詳細は未だ未解明であり、阻害剤すらほとんど報告されていない。加えて、リン酸化等の翻訳後修飾による可逆的な構造変化を受けるなど構造の変化には複雑な要因が絡んでいる。

(2) これまで、たんぱく質阻害剤の合理設計は複合体結晶構造などの“静”の情報に基づいて行われてきた。一方、IDPs についてはその構造が不安定なために結晶構造等の解析が困難であり、構造に関する研究は NMR 解析によるごく限られた例を除いてほぼ皆無に等しい。従って、IDPs に結合する化合物を創製するための論理的手法は現在のところ全くない。

(3) 一般に非構造的たんぱく質は凝集しやすく実験科学的な扱いが難しく、研究の進展を滞らせる一因となっている。IDPs 標的型阻害剤の探索法として細胞レポーターアッセイを用いる戦略が考えられるが、必ずしも標的 IDPs に作用する阻害剤を発見できる保証はない。標的 IDPs を安定的に扱える in vitro 実験系の確立が早急に望まれている。

(4) 概日時計の調節を司る転写因子である Bmal1, Clock は全体の 30% 以上がゆらぎ構造を持つ IDPs であり、ヘテロ二量体を形成して E-box 配列 DNA に結合し概日リズム遺伝子産物 CRY, PER の発現を誘導する。概日リズムは生物に広く保存されており、遺伝子発現フィードバックループにより生体内の様々な代謝活動の調節を行うことがわかっている。また最近の研究においてこの概日リズム機構の乱れが不眠症や腫瘍形成の原因となる可能性が示唆されている。したがって Bmal1, Clock の阻害剤を発見できれば、未だ不明な点が多い概日リズムの分子機構の解明、不眠症の治療薬の開発や腫瘍形成抑制の新たな知見を得るための一助となると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、概日時計転写因子である Clock, Bmal1 転写因子を標的 IDP たんぱく質と設定し、両者の部分配列を遺伝子組換え体として発現・精製する方法を確立する。

(2) 取得した Clock, Bmal1 を用い、蛍光サーマルシフトもしくは蛍光偏光強度変化を指標とし E-box 配列を含む 2 本鎖 DNA 存在下におけるヘテロ 2 量体形成を評価する実験系

を構築する。

(3) 2 量体形成評価系により低分子化合物ライブラリをスクリーニングし、Clock/Bmal1 ヘテロ 2 量体形成を阻害する化合物を探索する。本研究によって得られた化合物は、合目的的に見出された IDPs 阻害剤として新規性が高く、複雑な概日時計調節機構の解明に役立つ分子ツールとしての可能性が期待される。

3. 研究の方法

(1) Bmal1/Clock 複合体結晶構造に基づき、ヘテロ 2 量体形成に直接的な関与は少ないと考えられた transactivation domain (TAD) を削除した配列をモデルたんぱく質として用いる。各々の配列と Trx, His-Tag を組み込んだベクター pET29, pET32b を作成し、大腸菌 BL21 から発現・精製する。

(2) 発現・精製した Bmal1, Clock の E-box オリゴ DNA 存在下におけるヘテロ 2 量体形成を蛍光偏光強度変化を指標として評価し、文献値と比較して評価系としての妥当性を検討する。

(3) リアルタイム PCR 装置を用いた蛍光サーマルシフトアッセイによる化合物の Bmal1, Clock 結合試験も試みる。

(4) 結合試験の際に PEG200 等を用い、分子クラウディング環境が会合体形成に与える効果も検討する。

(5) 芳香族系低分子化合物、内因性脂質化合物、およびインドール系低分子化合物ライブラリについて、96-well フォーマットによるライブラリスクリーニングを実施し、Bmal1/Clock の分子間相互作用を阻害する化合物を発見する。

4. 研究成果

(1) ヒト Bmal1, Clock の全長 626, 855 アミノ酸残基について IDP 予測データベース Disport により解析したところ、Bmal1, Clock それぞれのおよそ 50%, 30% が非構造的領域であることが分かった(図 1)。両者の TAD ドメインはいずれも非構造的性が高いことが示された。bHLH-PASa-PASb ドメイン間の複合体結晶構造が解析されており、両者の相互作用を観察するモデルとして必ずしもリコンビナントたんぱく質の扱いを難しくする TAD ドメインは必要ではないと予想し、本研究では bHLH-PASa-PASb 配列を用いることとした。

両者ともに N 末端に His タグを、より非構造的性が高く扱いが難しいと予想された Clock については可溶性を高めるためのチオレドキシン(Trx)タグも付与した配列をコードした pET ベクターを作成し、大腸菌を形質転換

して常法によりたんぱく質発現を誘導した。このとき、Bmal1, Clock を単独に形質転換したものの、Bmal1/Clock の共発現体についても検討した。

いずれの場合も目的たんぱく質が封入体として発現したため、発現精製には実験プロトコルの最適化を必要とした。種々の条件検討を行った結果、ペレットを 8M 尿素可溶化したのち Ni-NTA カラム精製し、濃度勾配をゆるやかにかけた透析によってゆっくり再構成することにより、目的の Bmal1, Clock それぞれ、および Bmal1/Clock 共発現体を得た (図 2)。なお SDS-PAGE 分析したところ、Ni-NTA カラム精製にも分離不可能なたんぱく質の混入が認められたが、精製条件は今後の課題として結合試験に進むこととした。

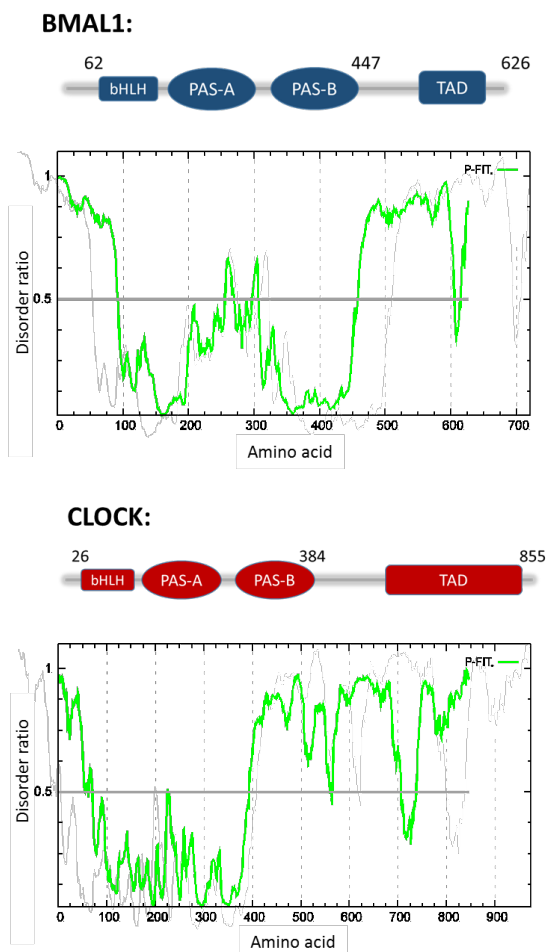


図 1 . Disprot による解析結果

(2) まず、発現した Clock と Bmal1 のヘテロ 2 量体形成能を、E-Box 2 本鎖 DNA への結合能を計測することで検証した。用意した 2 本鎖オリゴ DNA は Per2 E-box を含む 20 塩基対であり、アンチセンス鎖の 5'末端に FAM を付与したものをを用いた。この DNA に各種たんぱく質を加えたときの蛍光偏光値(FP)の変化を測定した。たんぱく質試料として、単独に発現精製した Bmal1, Clock、Bmal1/Clock

共発現体、および Bmal1、Clock の等量混合物の 4 種類について検討した。

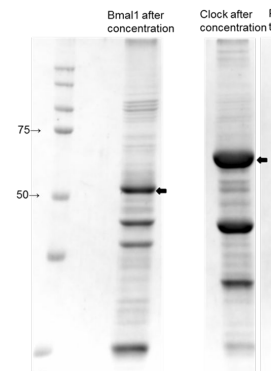


図 2 . Bmal1 および Clock の SDS-PAGE

実験の結果、Bmal1, Clock をそれぞれ単独で加えた場合にはいずれも FP 値の顕著な変化は認められなかった。一方、Bmal1/Clock 共発現体を用いた場合、および Bmal1 と Clock を等量混合した場合には顕著な FP 値の増加が観察された (図 3)。共発現体のデータは 1:1 複合体形成モデルとの良い一致を示し、解離定数は文献値 ($K_d = 58 \text{ nM}$) とほぼ一致した (図 4)。

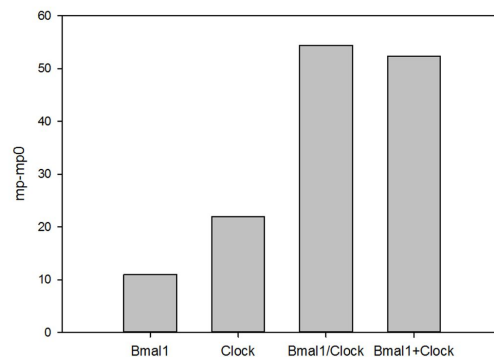


図 3 . 蛍光偏光による Bmal1, Clock, Bmal1/Clock の E-box dsDNA への結合試験の結果

また E-box 配列を含まないコントロール 2 本鎖 DNA には結合しないことを確認した。以上の結果から、本研究で発現・精製した Bmal1, Clock は、ヘテロ 2 量体を形成して E-box に選択的に結合することを明らかにした。

次に、細胞内の分子クラウディング環境が Bmal1/Clock 相互作用および DNA の結合にどのような効果を示すかを、PEG200(10% v/v)を加えた Tris 緩衝液中で検証した。その結果、PEG200 の添加により解離定数が約 6 倍増加することが分かり、細胞内のクラウディン

グ環境が IDPs の分子間相互作用に有意な影響を及ぼすことが示唆された。

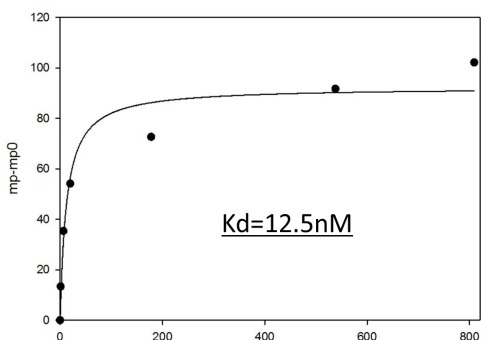


図 4 . Bmal1/Clock の E-box dsDNA に対する結合滴定実験の結果

一方、蛍光色素を用いたサーマルシフトアッセイによる化合物の結合アッセイ系の構築を試みた。測定機器にはリアルタイム PCR 装置を用いた。モデルとして 14-3-3 たんぱく質と既知阻害剤を用いて実験を行ったところ、阻害剤の存在下でメルティング曲線の明瞭なシフトが観察された。このように本法で化合物の結合によるたんぱく質構造の安定化が評価できることが分かったが、報告者の異動に伴い測定機器へのアクセスが容易となった蛍光偏光変化の評価系に絞って研究を進めることにした。

(3) 構築した評価系を用い、芳香族系低分子化合物 10 個についてスクリーニングを実施した。96 穴プレートに Clock, Bmal1、各化合物を加え、室温で振とうした後、dsDNA を加え、さらに 20 分静止し、蛍光偏光を測定した。実験の結果、再現性よく阻害活性を示す化合物を見出した (図 5, compound #1)。

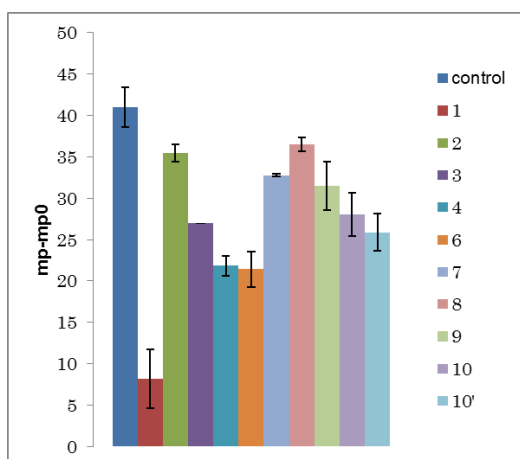


図 5. 化合物スクリーニングの結果

詳細な確認実験の結果が待たれるが、この

化合物は濃度依存的な阻害活性を示した。また構造類縁体については活性が認められず、一定の構造活性相関があることも明らかになった。

以上、本研究では、IDPs モデルとして TAD を除去した Bmal1, Clock たんぱく質の発現と精製を行い、DNA 結合機能を指標とする評価系の構築に成功した。96 ウエルフォーマットに展開可能な本評価系は、Bmal1/Clock 阻害剤の探索スクリーニングに有用であると考えられる。一方、Bmal1 と Clock の機能は確認できたものの、それらの純度向上は今後の課題であり、異なるタグの使用などの検討が必要である。今回スクリーニングにより見出された低分子化合物は今後 PPI 阻害活性試験に供し、より詳細な分子間相互作用解析を行ってゆく予定である。

5 . 主な発表論文等 (2016.4-2018.3 まで)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

大神田淳子、たんぱく質を鋳型にして薬剤を創る ~ 低分子の標的誘導型自己組織化によるたんぱく質間相互作用の調節 ~、化学と生物、査読有、2017、55(11)、724-726. DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu. 55.724

大神田淳子、たんぱく質作用面を認識する合成中分子の設計戦略、有機合成化学協会誌、総合論文、査読有、2017、75(7)、735-745. DOI:10.5059/yukigoseikyokaishi. 75.735

J. Ohkanda, Protein-guided self-assembly for controlling protein-protein interactions, J. Soc. Jpn. Wom. Sci. 査読無、2017、17、1-7. DOI:10.5939/sjws.17001

〔学会発表〕(計 23 件)

大神田淳子、ジテルペン配糖体によるたんぱく質間相互作用の制御、日本農芸化学会年会、2018 年

大神田淳子、細胞内 PPIs の調節に向けた合成中分子戦略、医薬産業政策研究所 政策研究 第 1 回ワークショップ【低分子医薬品とバイオ医薬品の研究開発の現状と将来像】、2017 年 (招待講演)

大神田淳子、Assembled synthetic mimics of protein surfaces and interactions, 3rd Yoshida Prize Symposium, 2017 年 (招待講演)

大神田淳子、たんぱく質表面構造と機能の模倣に向けた分子戦略、日本プロセス化学会サマーシンポジウム、2017 年 (招待講演)

大神田淳子、たんぱく質間相互作用を調節する中分子戦略、第 52 回天然物化学談話会、2017 年

大神田淳子、細胞内信号伝達系の調節を指向した中分子戦略、日本農芸化学会中部支部会シンポジウム、2017 年

大神田淳子、たんぱく質表面を認識する合成分子の創製～通過点：7つの職場と10の研究室～、北海道大学 Ambitious Leader's Program Ambitious 物質科学セミナー、2017年（招待講演）

大神田淳子、たんぱく質間相互作用を対象とする創薬、創薬科学特別講義 I ライフイノベーションセミナー、2017年（招待講演）

大神田淳子、ジテルペン配糖体によるたんぱく質間相互作用の調節、新規素材探索研究会、2017年

大神田淳子、A Strategy for Modulating Intracellular Protein Interactions by Assembled Synthetic Agents, 第7回生体分子科学シンポジウム・第27回ケミカルバイオロジー研究所セミナー・第3回女性研究者支援センターロールモデルセミナー、2017年

大神田淳子、「部品の組み立て法」による生理活性分子の創出、第5回サイエンスフォーラムシンポジウム『生命科学と物質科学に挑むケミストリー』、2017年

大神田淳子、たんぱく質間相互作用を対象とする創薬、日本大学生産工学部大学院特別講義、2017年

大神田淳子、たんぱく質構造を模倣する合成分子の創製、平成28年度生産工学研究所リサーチ・グループ支援事業・シンポジウム バイオ学際研究による生産工学イノベーション、2017年

大神田淳子、たんぱく質間相互作用を調節する合成中分子を創る、有機合成化学協会関西支部 有機合成2月セミナー 有機合成のニュートレンド2017、2017年

大神田淳子、Chemical controlling of intrinsically disordered proteins, Asian Chemical Biology Initiative, Ho Chi Minh City, 2017年

大神田淳子、たんぱく質構造に基づく生理活性合成分子の合理設計、信州大学医学部麻酔蘇生学教室カンファレンス特別講義、2016年

大神田淳子、部品の組み立て法による生理活性分子の創出、平成28年度大学間連携共同教育推進事業地域連携による「ものづくり」継承支援人材育成協働プロジェクト第42回 歯工学連携講演会、2016年

大神田淳子、細胞内たんぱく質間相互作用を制御する合成分子を創る、生命化学研究会ポストカンファレンスミニシンポジウム、2016年

大神田淳子、たんぱく質間相互作用を制御する合成分子の創製、ミニシンポジウム「ネオ生体機能関連化学」、2016年

大神田淳子、たんぱく質間相互作用を対象とする創薬、京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻、基盤生物化学特論II、2016年

① 大神田淳子、Rational design of synthetic

agents that control intracellular protein-protein interactions, 16th Akabori Conference, 2016年

② 大神田淳子、タンパク質間相互作用を調整する合成分子の創製、第21回日本女性科学者の会奨励賞受賞記念講演、2016年

③ 大神田淳子、「創薬のアイデア」なでしこ Scientist トーク、2016年

〔図書〕(計1件)

J. Ohkanda, "Self-Assembled Receptors for Protein Surface Recognition" In: Atwood, J. L. (Ed.) Comprehensive Supramolecular Chemistry II, 2017, vol. 4, pp351-369. Oxford: Elsevier. ISBN: 9780128031988

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/johkanda/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大神田 淳子 (OHKANDA, Junko)
信州大学・学術研究院農学系・教授
研究者番号：50233052

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

今西 未来 (IMANISHI, Miki)
京都大学・化学研究所・講師
研究者番号：80362391

(4)研究協力者

細谷 侑佑 (HOSOYA, Yusuke)