

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300123
 研究課題名（和文）
 細胞内カルシウムシグナル分子を標的とする創薬基礎科学
 研究課題名（英文） The development of the molecular target drugs for intracellular calcium signal pathway
 研究代表者
 小林 良二（KOBAYASHI RYOJI）
 香川大学・医学部・教授
 研究者番号：00020917

研究成果の概要：

S100 タンパク質（S100）、Neuronal calcium sensor（NCS）、CaMKK の分子標的薬を開発し、新しいCaシグナル機構の生理学的意義を明らかにした。新しいS100活性測定法を案出し、S100拮抗薬を見いだした。NCS分子標的薬のスクリーニング法としてPpCaMKが有用であることを見いだし、スクリーニング法を確立し、NCS拮抗薬を発見した。更に、CaMKK阻害薬(ST0609)を利用し、新しいCaMKKカスケードの標的分子を発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	7,200,000	2,160,000	9,360,000

研究分野：神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学、生体分子、バイオテクノロジー、シグナル伝達、分子標的薬、創薬、薬理学、カルシウム

1. 研究開始当初の背景

Ca²⁺は細胞機能調節において中心的な役割を担っている。その中でも、細胞内Ca²⁺シグナル変換を担うCa²⁺受容タンパク質（EF-hand protein）およびプロテインキナーゼは細胞機能調節や疾患との関連が示唆

されることから、創薬の標的分子として注目されている。CaMを標的分子とする創薬研究において、私達はW7（Mol Pharmacol 17, 66-72, 1980）、W66（Arch Biochem Biophys 288, 202-207, 1991）、W77（Arch Biochem Biophys 292, 563-569, 1992）を開発し、有用な成果を生み出してきた。また、プロ

テインキナーゼ阻害薬の開発においても、CaMKII阻害薬であるKN62 開発 (J Biol Chem. 265, 4315-4319, 1990) などの成果をあげ、これら薬物は世界的規模で用いられている。最近においては世界に先駆けてCaMKK阻害薬の開発に成功した (J Biol Chem 277, 15813-15818, 2002, J Biol Chem. 278, 10908-10913, 2003)。この過程で開発された創薬方法論や分子薬理学的アプローチは、他のCa²⁺シグナル伝達系の解明においても適用でき、極めて有力な新しいアプローチ法になるものと考えられる。一方、Calmodulin以外のCa²⁺受容タンパク質を標的分子とする創薬研究は、大きな成果が期待されるにも関わらず未開拓の分野である。S100 protein family による細胞機能調節についてはCalmodulinとは異なった新たなシグナル系の存在が断片的な形で示唆されている。約 20 種類のS100 タンパク質が同定され、S100 タンパク質の標的分子として 30 種を超えるタンパク質が推定されているが、根拠に乏しい。従って、これらを選択的標的分子とする創薬研究により、S100 タンパク質を介する新しいシグナル系の生理的役割について包括的理解が得られ格段の進歩が期待できる。

2. 研究の目的

低分子Ca²⁺受容タンパク質を標的分子とする創薬研究は、大きな成果が期待されるにも関わらず未開拓の分野であることから、本研究においてはS100 protein family を創薬ターゲットとして、これらを選択的拮抗薬または阻害薬を開発することが第1の目的である。さらに、これらを選択的拮抗薬または選択的阻害薬を分子プローブとして利用し、分子生物学的研究、構造生物学的研究、生理学的・細胞学的研究を展開し、S100 protein family を介する新しいCa²⁺シグナル機構の生理学的意義および病態学的意義を明らかにすることが第2の目的である。さらに、S100 と同様の開発手法により、神経特異的なCa受容タンパク質であるNCSに対する分子標的薬の開発を進め、新規に開発したCaMKK阻害薬 (ST0609) の分子薬理学を推進し、Caシグナ

ル分子に対する分子標的薬科学の基盤を確立することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

分子生物学、生化学的技法により S100 タンパク質は Ca 依存的に TPR タンパク質を標的とすることを見いだした。21 種におよぶ標的分子候補およびそれらの truncation mutants, 13 種の S100 タンパク質などを大腸菌発現タンパク質として取得し、pull down 法、SPR 法などにより相互作用を網羅的に検討した。さらに、この標的分子の中から、S100 との相互作用によって触媒活性が上昇する PP5 を薬物スクリーニング系に採用した。PP5 の活性測定においては最適ナリン酸化ペプチド基質を選択することにより、高感度で簡便な S100 活性スクリーニング法を確立した。Calmodulin 拮抗薬等の開発において蓄積した化合物ライブラリーの中から S100 選択的拮抗薬を見いだした。NCS については、分子内に NCS ドメインを保有する protein kinase (PpCaMK) を用いることにより、高感度に NCS 拮抗薬をスクリーニングする方法を確立した。ST0609 に関わる分子薬理学的研究においては、すでに確立した CaMKK 活性測定法、真核細胞への遺伝子導入等の生化学的方法、分子生物学的方法などを併用した。

4. 研究成果

(1) S100 タンパク質の標的タンパク質の同定-S100 タンパク質の標的分子の同定は S100 タンパク質の細胞機能調節メカニズムを解明する上で決定的に重要である。S100 タンパク質の標的分子を網羅的に解析した結果、tetratricopeptide ドメイン (TPR) を含むタンパク質を同定した。分子シャペロン系の FKBP52, Cyclophilin40, Hsp-organizing protein (Hop), 神経軸索内輸送に関わるキネシン軽鎖、タンパク質脱リン酸化酵素 protein phosphatase 5 (PP5) などの一群のタンパク質が S100A1, S100A2, S100A6 の標的分子であることを明らかにした。この中で、Hop, キネシン軽鎖、Tom70 については、S100 タンパク質による調節機構を分子レベルで

解明した (Shimamoto S. et al: *Journal of Biological Chemistry* 283, 28246-28258, 2008)。S100 タンパク質が PP5 分子内の TPR ドメイン (分子内阻害領域) に結合し、PP5 を open conformation に変換することにより、PP5 を数十倍活性化することを新たに発見した。この新事実を基に、PP5 活性化を指標とする S100 タンパク質活性測定法を案出した。さらに in vitro の PP5 活性測定法を改良することにより、高速、安定的な S100 拮抗薬のスクリーニング法を開発した。新開発の S100 拮抗薬スクリーニング法を利用して多数の低分子化合物をスクリーニングし、その結果、新規に S100 拮抗薬シード化合物としてメチルベンゼンスルホナマイド化合物を見いだした。これ以外に、DSCG, Amlexanox, Tranilast など既存薬物が S100 拮抗作用を持つことを明らかにした。新規に見いだしたリード化合物の誘導体の中から最適な S100 拮抗薬の創製が期待できる。

(2) 分子標的薬創製と共に、新しい創薬スクリーニングツールの開発も重要であり、本研究の目標の一つである。Field Effect Transistor 原理を利用する Si-Nanowire 創薬ツールの開発を行なった。分子標的薬開発の対象となる生体分子 (無標識) を Si-nanowire に固着させ、高速に候補化合物をスクリーニングする。新設計の Si-nanowire を作成し、動作原理を確認し実用に供するレベルにした。今後、更なる高感度検出、他検体同時処理システムの構築を目指している。

(3) NCS は Ca に応答して標的タンパク質と相互作用を持ち、生理作用を発揮するが、いずれの系もタンパク質相互作用であり、高感度で簡便な薬物スクリーニング法として確立することは難しい。CaMKII に類似した Protein Kinase で C 末端側に NCS ドメインを有する酵素 PpCaMK (植物) を用いることにより、上記の問題を克服し、高感度に NCS 活性を測定することが可能となった。新たに確立した測定系を用いることにより、repaglinide が NCS な選択的な拮抗薬であることを見いだした。

(4) 新規開発の CaMKK 阻害薬 ST0609 を利用し、更にプロテオミクス法を用いることにより CaMKK の新規標的酵素を探索した。その結果、神経組織に局在する SAD-kinase が新たな標的として見いだされた。CaMKK によるリン酸化により SAD-kinase 活性は約 60 倍活性化を受ける。遺伝子導入実験においてもこの経路は確認され、CaMKI, CaMKIV のみならず CaMKK/SAD-kinase 系による神経機能制御が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Yurimoto S, Hatano N, Tsuchiya M, Kato K, Fujimoto T, Masaki T, Kobayashi R, and Tokumitsu H : Identification and Characterization of Wolframin, the Product of the Wolfram Syndrome Gene (WFS1), as a Novel Calmodulin-Binding Protein. *Biochemistry* 48(18), 3946-3955, 2009 査読有

② Murao K, Li J, Imachi H, Muraoka T, Masugata H, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T and Tokumitsu H : Exendin-4 regulates Glucokinase expression via CaMKK/CaMKIV pathway in pancreatic β cell line. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2009 査読有

③ Toyoshima T, Ishida T, Nishi N, Kobayashi R, Nakamura T, and Itano T : Differential gene expression of 36-kDa microfibril associated glycoprotein in rat organs. *Cell and Tissue Res.* 332(2), 271-278, 2008 査読有

④ Matsumoto K, Murao K, Imachi H, Nishiuchi T, Cao W M, Yu X, Li J, Ahmed R A M, Iwama H, Kobayashi R, Tokumitsu H, and Ishida T: The Role of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Cascade on MIP-1a Gene Expression of ATL Cells. *Experimental Hematology* 36 (4), 390-400,

2008 査読有

⑤ Shimamoto S, Takata M, Tokuta M, Oohira F, Tokumitsu H, and Kobayashi R: Interactions of S100A2 and S100A6 with the tetratricopeptide repeat proteins, Hsp90/Hsp70-organizing protein and kinesin-light chain. *Journal of Biological Chemistry* 83(42), 28246-28258, 2008 査読有

⑥ Fujimoto T, Yurimoto S, Hatano N, Nozaki N, Sueyoshi N, Kameshita I, Mizutani A, Mikoshiba K, Kobayashi R, and Tokumitsu H: Activation of SAD Kinase by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase. *Biochemistry* 47 (13), 4151-4159, 2008 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 藤本智仁、カルモデュリン・キナーゼ I アイソフォームの活性化機構の解析、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 10 日、神戸

② 嶋本聖子、ユビキチンリガーゼ CHIP の Ca²⁺結合タンパク質 S100 による調節、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 10 日、神戸

③ 揺本-横倉沙紀、機能的プロテオミクス法を用いたカルモデュリン結合タンパク質の網羅的探索、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 9 日、神戸

④ 高田麻紀、Interactions of S100A2 and S100A6 with the tetratricopeptide repeat proteins, Hsp90/Hsp70-organizing protein and kinesin-light chain、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 9 日、神戸

⑤ 嶋本聖子、S100 タンパク質による Hsp70/Hsp90 分子シャペロン複合体の形成調節、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 12 日、横浜

⑥ 高田麻紀、Kinesin light chain (KLC) と KLC 結合蛋白質の相互作用に対する S100 蛋白質の影響について、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 12 日、横浜

⑦ 小池克英、S100 タンパク質による Immunophilin/Hsp90 複合体の形成調節、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会 2007 年 12 月 12 日、横浜

⑧ 藤本智仁、SAD-B の CaM-KK によるリン酸化と活性化、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 11 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 良二 (KOBAYASHI RYOJI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：00020917

(2) 研究分担者

徳光 浩 (TOKUMITSU HIORSHI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：20237077