

機関番号：33101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790120

研究課題名（和文） 転写因子NF- $\kappa$ Bをターゲットとした創薬

研究課題名（英文） Drug discovery targeting transcriptional factor

研究代表者

浅田 真一 (Shinichi Asada)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50424883

研究成果の概要（和文）：

高脂血症や高ステロール血症は動脈硬化をもたらす最大の危機因子であり、その発症には生活習慣が深く関わる生活習慣病である。動脈硬化の進展にはサイトカインが大きく関与していることから、サイトカイン産生を抑制することで動脈硬化の予防につながるものと考えられる。そこで本研究ではサイトカイン産生に働く核内転写因子NF- $\kappa$ Bをターゲットとし、新規に相互作用する核内転写調節因子の探索を目的としている。これまでに、調節因子探索のプロープとなるNF- $\kappa$ Bp65転写活性化部位由来ペプチドの合成を完了し、現在生体内において相互作用する分子の探索を行っている。

研究成果の概要（英文）：

Hyperlipidemia and / or hypercholesteremia are known to be the highest risk factors to bring down the arteriosclerosis and its pathogeny is closely related to one's lifestyle. Since several cytokines are involved in the progression of these diseases, the inhibitions of the cytokine-expression from the living cells may be lead to the prophylaxis of arteriosclerosis. This research is targeting the transcriptional factor NF-kappaB, which controls the expression of the cytokines, and is desired to discover the novel modulation factor that interact to NF-kappaB within the nuclear. Regulation factors have been reported to interact with transcriptional activation domains. We have chmecically synthesized several peptides derived from the transcriptional activation domain of NF-kappaB p65 and currently trying to identify the binding proteins from the cellular nuclear extracts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質、ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)は細胞質に存

在し、炎症、細胞分化・増殖、免疫機能、アポトーシスなどの生体内の様々な機能を担

う転写因子である。NF- $\kappa$ B はストレスやサイトカイン、UV 照射等、細胞外からの様々な刺激によって活性化されるが、主要なものの一つに炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )がある。その活性化異常は慢性炎症や動脈硬化、発がん等の様々な疾患の一因となっている。従って、サイトカイン産生を抑制することで動脈硬化やがん等の予防につながるものと考えられる

NF- $\kappa$ B は 50kDa と 65kDa のヘテロダイマーを形成し、非活性化型は、細胞質で Inhibitor- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B)と複合体を形成している。細胞に活性化刺激が加わると I- $\kappa$ B がリン酸化され分解される。この分解により、NF- $\kappa$ B が核内に移行しサイトカインの産生を誘導することが知られているが、核内における活性化/非活性化調節機構については未だに明らかとなっていない

## 2. 研究の目的

NF- $\kappa$ B 活性化機構の解明はこれらの疾患の治療薬開発の足がかりになると予想される。そこで、サイトカイン産生に関与する NF- $\kappa$ B をターゲットとし、新規に相互作用する核内転写調節因子について探索するとともに、相互作用阻害剤の創薬の可能性を探索する。

## 3. 研究の方法

NF- $\kappa$ B の 50kDa と 65kDa の 2 つのサブユニットのうち、転写活性化領域は 65kDa サブユニットにのみ存在している。また、この転写活性化領域にはさらに 2 つのサブ領域 (TA1, TA2)からなっているが、それら領域と相互作用して転写を活性化する核内調節因子は知られていない。そこでまずこれらの領域に着目し、TA1 領域または TA2 領域と特異的に結合する核内タンパク質の分離・同定を試みる。これまでに NF- $\kappa$ B p65 の TA1 領域と結合する核内因子として DNA dependent protein kinase (DNA-PK)が同定されており (Asada ら、未発表)。そこで、この結果の再確認を行うとともに、核内転写因子探索のためのプローブとなる NF- $\kappa$ B p65 の TA1, TA 2 領域中の転写活性化領域を化学合成する。

## 4. 研究成果

### 1.NF- $\kappa$ B と結合する核内蛋白質 : DNA-PK

NF- $\kappa$ B p65 の転写活性化領域 TA1 と GST の融合蛋白質を用いてこれと結合する蛋白質を HeLa 核抽出液より分離・精製し、SDS-PAGE にて得られたバンドを MS にて解析した結果、DNA-PK であった。そこでこの結合を確認するため、<sup>35</sup>S メチオニンラベルを用いて In Vitro で DNA-PK を合成し、NF- $\kappa$ B p65 TA1 領域との結合を

プルダウンアッセイ系にて確認するための DNA-PK の各サブユニット (cs 及び Ku70/80)発現 DNA コンストラクションを継続中である。

### 2.化学合成ペプチドプローブ (ポリプロリンロッド)

NF- $\kappa$ B p65 の転写活性化領域 TA1 および TA2 と結合するタンパク質を HeLa 核抽出液より抽出するための TA1 および TA2 ペプチドプローブ (及びネガティブコントロールとなるアラニン置換ペプチド) の化学合成と、これらペプチドを先端に釣り餌として結合する釣り竿となる「ポリプロリンロッド」の化学合成を行った(図 1)。



図 1 ; 合成したペプチド

なお、ESX は、核内転写因子として、その転写活性化領域が DRIP130 を介して転写活性化を行うことが明らかとなっており、これらをポジティブコントロールとして用いることで、この系の検証を行う。

現在、このペプチドをプローブとした結合蛋白質探索実験及び DNA-PK との結合解析を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Nishikawa Y, Takahara Y, Asada S, Shigenaga A, Otaka A, Kitagawa K, Koide T. A structure-activity relationship study elucidating the mechanism of sequence-specific collagen recognition by the chaperone HSP47. Bioorg Med Chem. 2010 Jun 1;18(11):3767-75 査読有

② Yamazaki CM, Kadoya Y, Hozumi K, Okano-Kosugi H, Asada S, Kitagawa K, Nomizu M, Koide T.

A collagen-mimetic triple helical supramolecule that evokes integrin-dependent cell responses. Biomaterials. 2010 Mar;31(7):1925-34. 査読有

③ Okano-Kosugi H, Matsushita O, Asada S, Herr AB, Kitagawa K, Koide T.  
Development of a high-throughput screening system for the compounds that inhibit collagen-protein interactions.  
Anal Biochem. 2009 Nov 1;394(1):125-31.  
査読有

[学会発表] (計4件)

①吉原博夢、浅田真一、北川幸己、星野洋、朝倉充俊

インスリン製剤の構造安定性～凍結融解時及び長時間の振動時～

日本薬学会第131年会、2011年3月

② Asada S, Yoshihara H, Asakura T, Kitagawa K.

The Stability of pharmaceutical drugs/functional foods under various storage environments.

The 5<sup>th</sup> International Niigata Symposium on Diet and Health, 2010年10月

③吉原博夢、浅田真一、北川幸己、朝倉俊成  
種々の保管環境におけるインスリン製剤の構造安定性について

日本薬学会第130年会、2010年3月

④小出隆規、関谷敦志、久保田絢也、小杉日登美、浅田真一

色素上皮由来因子 (PEDF) の配列特異的なコラーゲン認識とその意義

日本薬学会第130年会、2010年3月

[その他]

ホームページ等

<http://yakuhinseizou.nupals.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅田 真一 (Shinichi Asada )

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50424883