

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06493

研究課題名(和文) 抗がん剤耐性克服へ向けた核内受容体の活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Structural study of regulation mechanism of the nuclear receptor proteins related to drug metabolism

研究代表者

小橋川 敬博 (Kobashigawa, Yoshihiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：90455600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PXR (Pregnane X Receptor) およびCAR (Constitutive Androstane Receptor) は薬物などの低分子生体異物に対するセンサーとして機能し、リガンドの結合により活性化され、薬物の代謝・排泄に関わるタンパク質群の発現を誘導する。そのため薬物間相互作用やがんの薬物療法抵抗性に関わる。本研究では、PXRおよびCARのリガンド結合による機能制御機構の構造生物学的解明を目指し、PXRおよびCARと補助活性化因子および補助抑制因子との相互作用の物理化学的解析、PXRおよびCARと補助活性化因子および補助抑制因子との相互作用の簡便な評価系の確立を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したGST(+)/GST(-)ヘテロ二量体を用いることで2種類の任意のタンパク質同士で人為的に二量体を形成させることが可能である。加えて、GST(+)/GST(-)ヘテロ二量体はグルタチオンを固定化した固体表面に結合させることが可能である。そのため、結合が弱いタンパク質同士のCryo-EMやX線回折等による立体構造解析への応用や、2種類の酵素からなる人工的なヘテロ二量体を固体表面上に結合させた固定化酵素への応用、2種類の別々の抗原を認識する抗体由来の一本鎖抗体を用いた二重特異性抗体など、今後、様々な応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pregnane X Receptor (PXR) and Constitutive Androstane Receptor (CAR) function as sensor proteins for xenobiotics such as drugs, and association of agonists induce the expression of proteins involved in drug metabolism. Therefore, PXR and CAR are involved in drug-drug interactions and are related to resistance of cancers for drug. To elucidate structural mechanisms for regulation of functions of PXR and CAR, biophysical studies for analyze interaction between PXR and CAR with both the coactivator and the corepressor proteins. Moreover, we attempted to establish a convenient method for evaluation of interactions between PXR and CAR with both the coactivator and the corepressor proteins.

研究分野：構造生物学

キーワード：核内受容体 PXR CAR 分子間相互作用 薬物間相互作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん薬物療法は、様々な遺伝子変異に合わせた分子標的薬の開発により、治療効果が年々向上している。一方、薬剤耐性は大きな課題である。薬が奏功し、がんが縮小した場合でも、数年以内に耐性が生じ、がんの再増殖が始まる。多剤排出トランスポーターや薬物代謝酵素の発現は薬剤耐性の主な要因の一つである。

PXR (Pregnane X Receptor) および CAR (Constitutive Androstane Receptor) は薬物などの低分子生体異物に対するセンサーとして機能し、リガンドの結合により活性化され、薬物の代謝・排泄に関わるタンパク質群の発現を誘導する。PXR および CAR はリガンド結合ドメイン (LBD) と DNA 結合ドメインを有しており、LBD への作動薬の結合を契機として、さらに、別の核内受容体である RXR (Retinoid X Receptor) の LBD とヘテロ 2 量体を形成する。このヘテロ 2 量体は標的遺伝子プロモーター上に存在する応答配列 (XRE: Xenobiotic Response Element) に結合し、薬物代謝・排泄に関わるタンパク質群の転写を促す。PXR および CAR の LBD は、薬物に対する選択性が低く、様々な薬物により活性化されるため、薬物間相互作用の主要な原因タンパク質の一つである。様々ながんにおいて PXR および CAR の発現が見られ、薬物療法抵抗性の要因にもなっている。PXR 拮抗薬の投与は、がんの薬物感受性を向上させることが報告されており、PXR および CAR の活性調節作用を持つ化合物は、薬物療法に対する抵抗性を改善し得る。一方で、PXR および CAR は、エネルギー代謝、脂質代謝、胆汁酸代謝など、生体機能維持にも関わるため、定常活性の阻害は生体機能に障害を生じ得る。そのため、薬物療法に対する抵抗性の改善を目的として PXR および CAR の活性を変調する調節薬を利用する際には、その化合物が作動薬、拮抗薬、逆作動薬のいずれとして作用するかを識別する必要がある。現在までのところ、作動薬、拮抗薬、逆作動薬を迅速に識別できる系は確立されていない。その最大の要因は、PXR および CAR の活性制御機構の詳細が未解明であり、作動薬、拮抗薬、逆作動薬の結合に伴い「どのような構造・物性上の変化が生じるか」が不明だからである。すなわち、物理化学的検出対象が未同定と言える。本研究では、PXR および CAR に対する作動薬、拮抗薬、逆作動薬の迅速評価系の確立を目指し、その最初の段階として、PXR および CAR の活性制御機構の詳細を構造生物学的手法に基づき解明する。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、抗がん剤耐性の克服を目指し、薬物の代謝・排泄に関わる酵素類やトランスポーターの発現を誘導する核内受容体ファミリータンパク質、PXR および CAR のリガンド結合による活性制御機構を物理化学的手法、構造生物学的手法、計算化学的手法に基づき解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

作動薬、拮抗薬、逆作動薬の結合に伴い PXR および CAR の補助活性化因子および補助抑制因子に対する親和性がどのように変化するか、さらには、補助活性化因子および補助抑制因子に対する親和性の変化がどのような動的構造状態の変化により引き起こされるかについて物理化学的手法、構造生物学的手法、計算化学的手法により明らかにする。

#### ・PXR および CAR と薬物および補助活性化因子、補助抑制因子との相互作用解析

PXR および CAR について、大腸菌発現系を構築した。可溶性の向上およびアフィニティークロマトグラフィーによる精製を可能にするために N 末端にマルトース結合タンパク質タグ (MBP-tag) を付加し、C 末端に His-tag を付加した。得られた CAR および PXR について、既知結合薬物を添加して示差走査蛍光測定を行い、薬物結合性を有することを確認した。次に、PXR および CAR について薬物存在下および非存在下において補助活性化因子由来ペプチドおよび補助抑制因子由来ペプチドとの相互作用について等温滴定熱量測定により解析した。

#### ・NanoLuc ルシフェラーゼを用いた薬物結合状態および非結合状態における PXR および CAR と補助活性化因子、補助抑制因子との相互作用解析

等温滴定熱量測定は、分子間相互作用を熱量変化により検出する。相互作用の様式によっては熱量変化を生じないため、分子間相互作用を等温滴定熱量測定により検出することが困難になることがある。そこで、分子間相互作用を化学発光により高感度に検出する手法の構築を試みた。スプリット NanoLuc ルシフェラーゼは、深海エビ由来のルシフェラーゼである NanoLuc ルシフェラーゼを二つの断片 (SmBiT および LgBiT) に分割したものである。SmBiT と LgBiT の間の

相互作用は弱く ( $K_D = 190\mu\text{M}$  程度)、これらの断片を混合しただけではルシフェラーゼ活性を示さない。しかし、SmBiT および LgBiT を相互作用し合う 2 種類のタンパク質にそれぞれ融合させた場合には、融合させたタンパク質間の分子間相互作用を介して SmBiT と LgBiT が会合し、ルシフェラーゼ活性を示す。これによりタンパク質分子間相互作用を化学発光により高感度



に検出することが可能である。PXR および CAR について SmBiT との融合タンパク質を作製し、その相互作用相手となる補助活性化因子由来配列および補助抑制因子由来配列については LgBiT との融合タンパク質を作製し、PXR および CAR と補助活性化因子および補助抑制因子との相互作用解析系を構築した (図 1)。また、この系を用いて、薬物結合状態および非結合状態における PXR および CAR について、補助活性化因子、補助抑制因子との相互作用を解析した。

・薬物結合状態および薬物非結合状態における PXR および CAR の分子動力学法による動的構造状態の解析

作動薬結合状態の PXR および CAR を開始構造とし、作動薬を含む状態および含まない状態の両方について各  $500\text{ns} \times 5\text{runs} =$  合計  $2.5\mu\text{s}$  の分子動力学計算を行った。分子動力学計算は分子動力学ソフトウェア AMBER を用いた。計算は、九大の共用の大型計算機である Ito システム、もしくは、ラボの Linux PC を用いた。

#### 4. 研究成果

・薬物結合状態および非結合状態における PXR および CAR と補助活性化因子、補助抑制因子との相互作用解析

作動薬結合状態、逆作動薬結合状態、薬物非結合状態における CAR について補助活性化因子および補助抑制因子との相互作用について等温滴定熱量測定により解析した。その結果、作動薬結合状態の CAR において、補助活性化因子由来ペプチドおよび補助抑制因子由来ペプチドの滴定に伴い熱量変化が観測された。薬物非結合状態においても、補助活性化因子由来ペプチドの添加に伴いわずかに熱量変化が観測された。逆作動薬結合状態では補助活性化因子由来ペプチドおよび補助抑制因子由来ペプチドのいずれの滴定においても熱量変化は観測されなかった。この結果は、逆作動薬結合状態の CAR の測定において、補助活性化因子由来ペプチドおよび補助抑制因子由来ペプチドは結合しているが熱量変化を生じないために熱量変化が観測されなかった可能性、いずれのペプチドについても CAR に対する結合親和性が著しく弱い可能性の 2 つが考えられる。等温滴定熱量測定による情報だけでは と のどちらであるかについて確定することは困難であるため、分子間相互作用を発光シグナルとして直接観測する系の構築を試み、検証することとした。

・NanoLuc ルシフェラーゼを用いた薬物結合状態および非結合状態における PXR および CAR と補助活性化因子、補助抑制因子との相互作用解析

NanoLuc ルシフェラーゼを用いた CAR および PXR と補助活性化因子および補助抑制因子との相互作用解析系を構築した。作製したコンストラクトは、いずれも、大腸菌発現系により調製した。その結果、PXR および CAR の両方において、作動薬結合状態および薬物非結合状態の両方において補助活性化因子との相互作用に伴う化学発光が観測された。PXR および CAR の両方について、薬物非結合状態における転写活性 (定常活性) が抑制されることが知られている変異体についても同様の解析を行った。その結果、薬物非結合状態においても補助活性化因子との相互作用が観測され、定常活性を有することを示唆するデータが得られた。これまでの報告では、CAR は高い定常活性を有するが、PXR についてはそのような報告はない。構築した相互作用解析系の妥当性を含め、得られた結果の妥当性についてはさらなる詳細な検証が必要である。

・薬物結合状態および薬物非結合状態における PXR および CAR の分子動力学法による動的構造状態の解析

作動薬である CITCO が結合した CAR を開始構造とし、CITCO が結合した状態および CITCO を除いた状態について、各  $500\text{ns} \times 5\text{runs} =$  合計  $2.5\mu\text{s}$  の分子動力学計算を行った。12 番目の  $\alpha$ -ヘリックスは補助活性化因子の結合を制御する領域となっているが、CITCO 結合状態および CITCO 非結合状態の両方の分子動力学計算において 12 番目の  $\alpha$ -ヘリックスの動的挙動の顕著

な相違は観測されなかった。計算時間が不十分であった可能性、CAR は薬物非存在下でも高い定常活性を示すことが知られているがそのことを反映している可能性の 2 つの可能性が考えられる。今回の研究データだけで解釈するのは不十分であり、今後、より広い構造空間を探索できる特殊な分子動力学法を用いた解析が必要である。

#### ・ヘテロ二量体型 GST 変異体の創製とタンパク質間相互作用検出系への応用

前述のように CAR および PXR と補助活性化因子および補助抑制因子との相互作用解析において NanoLuc ルシフェラーゼを利用することの妥当性については検証を要する。そこで、プルダウンアッセイによる新たな評価系の構築を試みることにした。

GST-tag は MBP-tag や His-tag と同様に組み換えタンパク質の精製において汎用されるアフィニティタグであり、市販のグルタチオン固定化樹脂により精製可能である。MBP-tag や His-tag は単量体であるが、GST-tag は安定なホモ二量体として溶液中で存在するという他のアフィニティタグにはない特徴を有する。そこで、ヘテロ二量体を形成する GST-tag 変異体ペアを創製し、プルダウンアッセイによる簡便なタンパク質間相互作用検出系への応用を試みた。

#### 立体構造に基づくヘテロ二量体型 GST-tag 変異体の設計と計算化学的評価

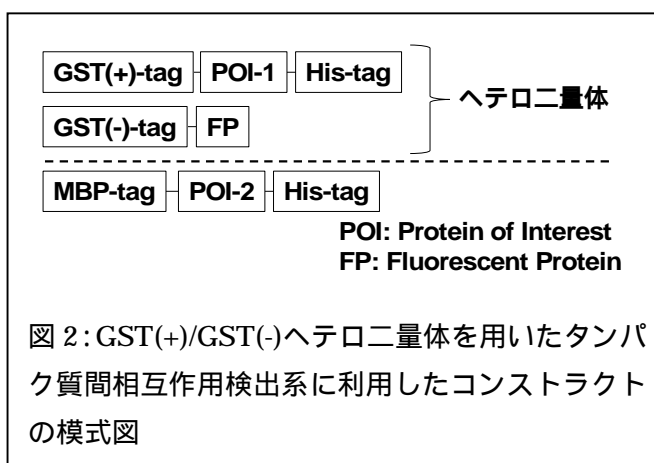
最初にヘテロ二量体型 GST-tag 変異体を立体構造情報に基づいて設計した。GST-tag の二量体界面に存在し、かつ、分子間で塩橋を形成している残基に着目し、それらを入れ替えることで一方は正に、もう一方は負に偏る GST-tag 変異体 (GST(+)) および GST(-)) を設計した。この変異体ペアでは静電的な相補性によりヘテロ二量体は形成できるが、ホモ二量体形成は静電反発により抑えられることが期待される。次に、分子動力学計算 (500ns × 5runs = 合計 2.5μs) を行った。その結果、GST(+)) と GST(-)) の間のヘテロ二量体の解離は観測されなかったことから GST(+)) と GST(-)) が安定な複合体を形成することが示唆された。

#### ヘテロ二量体型 GST-tag 変異体の物理化学的評価および酵素化学的評価

分子動力学計算により GST(+)) と GST(-)) が安定なヘテロ二量体を形成することが示唆されたので、GST(+)) と GST(-)) を実際に調製して物理化学的手法に基づき評価することとした。GST(+)) と GST(-)) を大腸菌発現系において共発現したところ、グルタチオン固定化樹脂による精製が可能であることが明らかとなった。また、ゲルろ過クロマトグラフィー分析を行ったところ、GST(+)) 同士および GST(-)) 同士のホモ二量体形成は抑えられており、GST(+)) と GST(-)) が安定なヘテロ二量体を溶液中において形成していることが明らかとなった。表面プラズモン共鳴による解析を行ったところ、GST(+)) 同士および GST(-)) 同士の相互作用は弱く、結合は観測されなかった。一方、GST(+)) と GST(-)) の間の相互作用は強く、 $K_D = 9\text{nM}$  程度であった。市販の蛍光性の GST の基質である CellFlour GST を用いて酵素活性について評価を行った。その結果、GST(+)) / GST(-)) ヘテロ二量体は野生型 GST-tag の 4 割程度の比活性を有することが明らかとなった。

#### ヘテロ二量体型 GST-tag 変異体の物理化学的評価および酵素化学的評価

GST(-)) と蛍光タンパク質 (FP: Florescent Protein) との間の融合タンパク質、GST(+)) と POI-1 (POI: Protein of Interest) との融合タンパク質によるヘテロ二量体をプレイトタンパク質として、MBP と POI-2 との融合タンパク質をベイトタンパク質として糊化デンプンを用いたプルダウンアッセイ系を構築した (図 2)。本研究では、モデルタンパク質として POI-1 には FKBP12 を、POI-2 には mTOR FRB ドメインを用いた。FKBP12 と mTOR FRB ドメインの間の相互作用は、低分子化合物であるラパマイシン依存



的であり、ラパマイシン存在下では FKBP12 と mTOR FRB ドメインは強固に相互作用し、ラパマイシン非存在下ではほとんど結合しない。ラパマイシン添加状態をポジティブコントロールとして、非添加状態をネガティブコントロールとしてプルダウンアッセイ系の構築と検証を行った。糊化デンプンに MBP-mTOR FRB をあらかじめ固定化し、そこに、GST(+)-FKBP12/GST(-)-FP ヘテロ二量体を添加した。GST(+)-FKBP12/GST(-)-FP ヘテロ二量体は、ラパマイシンをあらかじめ結合させたものとラパマイシンを添加していないものの 2 種類の条件で行った。その後、洗浄操作を行い、最後にマルトースを含む溶出バッファーでベイトタンパク質とベイトタンパク質を介して糊化デンプンに結合したプレイトタンパク質を溶出した。この溶出液について、プレイトタンパク質を 2 種類の方法、GST(-)) に融合した蛍光タンパク質由来の蛍光、および、

CellFlour GST を用いた GST 活性による蛍光を測定し、タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出した。その結果、2 種類の検出系の両方においてラパマイシン存在下でのみ FKBP12 と mTOR FRB ドメインの間の相互作用が観測され、構築したタンパク質相互作用検出系が正常に動作することが確認された。感度については、CellFlour GST を用いた方が 2 桁以上高かった。今後、CAR および PXR と補助活性化因子および補助抑制因子との相互作用解析への適用を行いたい。

最後に、本研究で構築した GST(+)/GST(-)ヘテロ二量体を用いることで 2 種類の任意のタンパク質同士で人為的に二量体を形成させることが可能である。加えて、GST(+)/GST(-)ヘテロ二量体はグルタチオンを固定化した固体表面に結合させることが可能である。そのため、結合が弱いタンパク質同士の Cryo-EM や X 線回折等による立体構造解析への応用や、2 種類の酵素からなる人工的なヘテロ二量体を固体表面上に結合させた固定化酵素への応用、2 種類の抗体由来の一本鎖抗体からなる二重特異性抗体への応用など、今後、様々な分野への利用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Du Yan, Kobashigawa Yoshihiro, Okazaki Kyo, Ogawa Mizuki, Kawaguchi Tomoyuki, Sato Takashi, Morioka Hiroshi	4. 巻 In press
2. 論文標題 Structure-based design, biophysical characterization, and biochemical application of the heterodimeric affinity purification tag based on the <i>Schistosoma japonicum</i> glutathione-S-transferase (SjGST) homodimer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvae028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大水良太, 並河真菜, 佐藤卓史, 森岡弘志, 小橋川敬博
2. 発表標題 薬物間相互作用に関わる核内受容体 Constitutive androstane receptor (CAR) の活性制御機構に関する構造生物学的研究
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森岡 弘志  (Morioka Hiroshi)  (20230097)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授   (17401)	
研究分担者	関口 光広  (Sekiguchi Mitsuhiro)  (40822490)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授   (23303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------