

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510277

研究課題名(和文)レンチノロールを基にした分子間相互作用阻害剤の合理的デザイン

研究課題名(英文)Rational design of protein-protein interaction inhibitors

研究代表者

佐藤 慎一 (Sato, Shinichi)

京都大学・物質・細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：70534478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：釣竿法を利用した標的タンパク質同定により生理活性物質レンチノロールの標的タンパク質 S100タンパク質を決定した。本研究ではレンチノロール-S100タンパク質複合体の構造解析を行い、その構造情報を基にレンチノロールを分子設計して、標的タンパク質への特異性の向上を目指した。研究成果として、大量調整したS100タンパク質とレンチノロールの共結晶作製条件を見出した。複合体の構造解析によりレンチノロールの新たな薬効の発見が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Protein-protein interactions are central to most biological processes and expected to represent an important class of drug targets near future. However, it remains challenging to design small-molecule inhibitors of protein-protein interaction, in part due to the lack of structural information of the small molecule-protein complexes. We recently identified S100 protein as a target protein of wrenchnolol which is a bioactive compound we found. Biological experiment revealed that the wrenchnolol inhibits the protein-protein interaction between S100 protein and its partner protein Annexin. In this project, we identified a crystallization condition of a complex between wrenchnolol and Annexin. Structural determination of the complex would permit the design of new wrenchnolol analogs with better activities.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：X線結晶構造解析 ケミカルバイオロジー

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室ではこれまでに、転写因子 ESX の働きを阻害する化合物レンチノロール (図 1) を発見し、その作用機序を明らかにしてきた [JACS 125, 4992-4993 (2003) および JACS 126, 3461-3471 (2004)]。この化合物は、乳がんの患者約 30% で発現している Her2 がん遺伝子の発現を選択的に抑える。その作用機序は、レンチノロールが ESX の  $\alpha$ -ヘリックスを模倣し、核内でメディエーター複合体の Sur-2 サブユニットと結合することにある。その結果、Her2 がん遺伝子の転写が抑制される。しかしながら、レンチノロールが「核への局在が見られない」、「Her2 がん遺伝子発現に依存しない細胞毒性を有する」などの分子生物学・細胞生物学的な実験結果から、他の生体内標的の存在が示唆されていた。そこで申請者は、タンパク質精製を効率化するために開発した「釣竿法」( JACS (2007) ) を活用して、レンチノロールのアフィニティー担体を作製し、ヒト細胞抽出液から標的タンパク質を精製した。このアフィニティー精製で標的タンパク質 Sur-2 とは違うレンチノロール結合タンパク質を発見した (未発表)。そのタンパク質は S100 プロテインという EF-hand 構造を有するカルシウム結合タンパク質であった。このように、タンパク質間相互作用を標的とする薬剤は、しばしば複数の相互作用を標的することから、高い特異性を有する薬剤開発は困難である。レンチノロールにおいても、その標的タンパク質同定の結果から、ESX - Sur-2 複合体の相互作用を標的とするだけでなく、S-100A11 - アネキシン 1 の複合体も標的とすることが明らかになった。本研究では、レンチノロール - 標的タンパク質 S100 プロテイン複合体の構造を解析し、その構造情報を基にレンチノロールを分子設計し、薬剤対象となる相互作用 ( ESX - Sur-2 ) に、より高い特異性を有する分子への最適化を目指した。

## 2. 研究の目的

タンパク質間相互作用を標的とする小分子化合物は、創薬研究のみならず、タンパク質分子の生体内機能を解明する上でも有用な道具となる。しかし、任意のタンパク質間相互作用を標的とする薬剤を合理的にデザインする方法はない。本研究では、我々が発見したレンチノロールを基に、タンパク質間相互作用の阻害剤を合理的にデザインする方法の開発を目指す。具体的な本研究の目的は 3 つある。

生理活性化合物であるレンチノロールとその標的タンパク質の複合体の X 線結晶構造解析を行う

複合体の構造情報を基に誘導体を設計・合成し、レンチノロールの薬理活性を向上させる

レンチノロール骨格を土台として、任意のタンパク質間相互作用を標的とする化合物を創出する

## 3. 研究の方法

タンパク質の発現には T7 系発現ベクター pET3 ベクターを用いた。標的タンパク質 S-100A11、S-100A13 および S-100A16 の cDNA はヒト HeLa 細胞から調整した cDNA mRNA ライブラリーからの RT-PCR 法により得た。標的タンパク質の発現にはそれぞれの cDNA を組み込んだ pET ベクターを大腸菌 BL21CodonPlus(DE3)-RIPL 株に導入した形質転換株を利用した。目的タンパク質は、ヒスチジンタグのフュージョンタンパク質として発現し、ニッケルカラムによりアフィニティー精製した。アフィニティー精製画分は、更にイオン交換・ゲル濾過クロマトグラフィーを行うことで精製標品を得た。それぞれの標的タンパク質の大量調整は、各 20L の培養・発現を行い、最終的に各 100mg の精製標品を得た。

#### 4. 研究成果

結晶構造解析を行うために、レンチノロールアフィニティー樹脂により同定した標的タンパク質 S-100A11、S-100A13 および S-100A16 を大腸菌発現系により大量発現・精製を行った（各 100 mg）。また、レンチノロール（図 1）を合成により、大量調整した。調整した S100 タンパク質とレンチノロールは完全な S100 タンパク質-レンチノロール複合体を形成させるために、モル比でレンチノロール過剰となるように混ぜることで複合体形成を行った。複合体の形成は、レンチノロール-S100 タンパク質の UV 吸収をモニタリングすることで行った。複合体の UV 吸収波形は、レンチノロールの UV 吸収波形と S100 タンパク質の UV 吸収波形をそれぞれ合算することで予想した。得られた S100 タンパク質-レンチノロール複合体は、限外ろ過を利用して緩衝液の置換（50 mM Tris-HCl (pH. 7.0) containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>）を行い、最終的に 2 mM の濃度まで S100 タンパク質-レンチノロール複合体を濃縮した。得られた S100A11-レンチノロール複合体溶液は、共結晶作製条件をキットによりそれぞれ 960 種の条件をスクリーニングした。このスクリーニングにより数種類の結晶を作製することに成功した。しかしながら、X線結晶解析が行える良質のタンパク質の結晶を得るまでには至らず、再度、結晶化条件を検討することで良質の結晶を得られる条件を決定する必要がある。今後、良質な共結晶を作製し、X線結晶解析により S100A11-レンチノロール複合体の共結晶の構造を解く予定である。

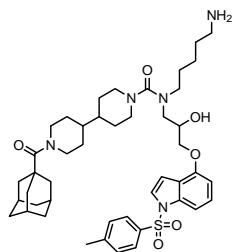


図 1. レンチノロール

#### 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 2 件)

— Hirata N., Nakagawa M., Fujibayashi Y., Yamauchi K., Murata A., Minami I., Tomioka M., Kondo T., Kuo T. F., Endo H., Inoue H., Sato S., Ando S., Kawazoe Y., Aiba K., Nagata K., Kawase E., Chang Y. T., Suemori H., Eto K., Nakauchi H., Yamanaka S., Nakatsuji N., Ueda K., Uesugi M., A chemical probe that labels human pluripotent stem cells., *Cell Rep.*, 6(6), 1165-1174, 2014 (査読有)

— Takemoto, N., Suehara, T., Frisco, H. L., Sato, S., Sezaki, T., Kusamori, K., Kawazoe, Y., Park, S. M., Yamazoe, S., Mizuhata, Y., Inoue, R., Miller, G. J., Hansen, S. U., Jayson, G. C., Gardiner, J. M., Kanaya, T., Tokitoh, N., Ueda, K., Takakura, Y., Kioka, N., Nishikawa, M., and Uesugi, M., Small molecule-induced clustering of heparan sulfate promotes cell adhesion., *J. Am. Chem. Soc.*, 135(30), 11032-11039, 2013 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

— Sato, S.,  
A Small-Molecule Based Method for Live-Cell Imaging of an Endogenous RNA, Kyoto, Japan, Kyoto University, iCeMS-RIKEN Joint Symposium on Mesoscopic Chemical Biology, February, 2014 (Symposium Organizer)

— 領田優太、渡邊瑞貴、Bilal KHAMB、白川貴詩、佐藤慎一、川添嘉徳、酒井寿郎、上杉志成

転写因子 SREBP の活性化を阻害する内因性化合物、日本薬学会第 133 年会、横浜、パシフ

イコ横浜、2013年

— Sato, S.,

Development of small-molecule fluorescent probes for live imaging of endogenous RNAs, Fukuoka, Japan, Fukuoka International Congress Center, December, 2012

(Workshop Organizer)

〔図書〕(計2件)

— Sato, S., and Uesugi M.,

Affinity-based isolation of molecular targets of clinically used drugs, *Case Studies in Chemical Biology*, 2014, *in press*

— Murata, A and Sato, S.,

In vitro Selection of RNA Aptamers for a Small-Molecule Dye, *Methods in Molecular Biology*, 1111, 17-28, 2014 (査読有)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 慎一 (SHINICHI SATO)

京都大学 物質 - 細胞統合システム

拠点・助教

研究者番号 : 70534478