

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590150

研究課題名(和文) 転写因子NF- κ Bをターゲットとした創薬

研究課題名(英文) A Drug Discovery-study targeting the transcriptional factor, NF-KappaB

研究代表者

浅田 真一 (Asada, Shinichi)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50424883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では核内転写因子NF- κ Bと特異的に相互作用する核内調節因子を探索し、その相互作用を模した小分子化合物を得ることで、動脈硬化予防へとつながるリード化合物の探索を行うことを最終目的としている。そこでNF- κ B p65の転写活性化領域をmimicするペプチドプローブの化学合成を試みたが、このペプチドの合成収率が低く改善が見られないため、リコンビナントペプチドをペプチドプローブとして核内調節因子の探索を行った。その結果、ヒト培養細胞核抽出液からNF- κ B p65のTA2領域と特異的に相互作用する新規タンパク質が同定された。現在、この相互作用のメカニズム解明を行っている。

研究成果の概要(英文)：We have aimed to obtain the small molecules that regulate the nuclear transcriptional factor, NF- κ B, consequently find out the lead molecules for the preventive drugs of arteriosclerosis. The chemically synthesized affinity peptide probes that mimic the transactivation domains of NF- κ B p65 were planned to identify the nuclear co-activator for the NF- κ B. However, the yield of the chemically synthesized peptide was too low to utilize as an affinity probe, recombinant peptide was used for this probe alternatively. Using probe this recombinant NF- κ Bp65 TA2 region as a probe, a novel protein specifically interact with this region was found by an affinity pull-down assay and identified. Further analysis is proceeding to reveal the dynamics of this interaction and to reach the goal of this study.

研究分野：生物有機化学

キーワード：転写因子 核内調節因子 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

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。サイトカインの産生には、転写因子 NF- κ B が深く関わっていることが知られている。NF- κ B の転写活性化領域には TA1、TA2 の二つの領域が存在し、それらはともに α -ヘリックス構造を形成して DNA ポリメラーゼ TFIIID と相互作用することで、転写が活性化することが知られている。また、これらの領域には XX モチーフ(;疎水性アミノ酸、X:任意のアミノ酸)と呼ばれる α -ヘリックス形成を導く配列を有している。

筆者らはこれまでに NF- κ Bp65 同様に XX モチーフを有する転写因子 ESX をターゲットとして、ESX と相互作用する核内転写因子の探索を行っている。その結果、ESX と相互作用する核内調節因子 hDRIP130 を同定し、この転写調節因子が ESX の核内転写活性化を抑制することで、ESX 下流である Her2 の発現を抑制することを見出した。hDRIP130 と相互作用する ESX の結合部位を模倣したペプチドおよびその構造を元にスクリーニングを行った小分子化合物 Wrenchnolol は、Her2 過剰発現細胞特異的に Her2 の発現を抑制してアポトーシスへと誘導した。このように、XX モチーフを持つ転写因子をターゲットとした核内調節因子を探索することで医薬品の開発へとつながるものである。

2. 研究の目的

本研究では上記 ESX と特異的に相互作用する核内因子探索を行った際と同様の手法を用いてサイトカイン産生に働く核内転写因子 NF- κ Bp65 と特異的に相互作用する核内調節因子を探索し、その相互作用を模した小分子化合物を得ることで、動脈硬化予防へとつながるリード化合物の探索を行うことを最終目的としている。

はじめに既知の NF- κ B 転写活性化部位 (TA1 および TA2) と結合する新規細胞核内因子の探索を行い、その相互作用分子の同定を行うこととした。NF- κ B のサブユニットである NF- κ Bp65 にはその活性化領域として2つのドメインの存在が報告されている。これら二つの領域とも、XX モチーフ(;疎水性アミノ酸、X:任意のアミノ酸)と呼ばれる α -ヘリックス構造を形成して RNA ポリメラーゼホロ酵素の一部である TFIIID と結合することが明らかとなっており、これらの領域と核内で相互作用するタンパク質の探索を行うこととした。相互作用するタンパク質を見出してその相互作用メカニズムを明らかにすることで、阻害剤のデザイ

ンを行うことが可能である。

3. 研究の方法

NF- κ Bp65 と結合する核内タンパク質探索のためのプローブの作成

NF- κ Bp65 の TA1 領域は 20 アミノ酸残基に満たない。これを直接固相プローブとして結合タンパク質を探索するには、ビーズなどの担体との結合を行うために、プローブ近傍に空間が少なく本来細胞内で結合しているタンパク質が相互作用することができない可能性がある。そこで、ポリプロリン α -ヘリックス構造により、線状構造をとることが知られているポリプロリン鎖をあたかも「釣竿」の様に用い、その末端に「釣餌」となる NF- κ Bp65TA1 または TA2 ポリペプチドをジスルフィド架橋で結合したプローブの化学合成を試みた。合成したプローブはポリプロリンロッドの TA1/TA2 結合部位とは反対の末端でビーズと結合することで固相化し、特異的相互作用タンパク質の探索に用いることとした。

また、化学合成プローブの代わりとして GST 融合 TA1/TA2 ペプチドの大腸菌組み換えタンパク質も作成した。このペプチドをグルタチオンビーズと結合させて精製を行うと同時に固相プローブとし、相互作用タンパク質の探索を行うこととした。化学合成ペプチド、組み換えペプチドのいずれの場合も、その転写活性化領域中の XX モチーフ部位が α -ヘリックス構造を取ることができない配列 ((A)XX(A) 配列:2 か所の Ala 置換体、1 か所の場合もあり)も、化学合成ペプチド、大腸菌離婚美男とペプチド、共に作成し、相互作用タンパク質探索の際の negative control とした。

特異的相互作用タンパク質の探索(分離)

ヒト培養細胞(Jurkat 細胞)を大量に培養し、この細胞の核画分から抽出した核抽出液を得た。上記 で作成した化学合成プローブまたは大腸菌組換プローブと各抽出液を混和し、特異的に相互作用する分子を結合させた。非結合画分を洗いだしたのち、SDS サンプルバッファーにて結合タンパク質を溶出させ、SDS-PAGE にて分離した。得られたゲルを CBB で染色していくつかのバンドを検出した。この際、TA1 または TA2 との相互作用は見られるが、Ala 置換体では相互作用が見られないバンドを各転写活性化部位特異的に結合するタンパク質であるとした。

結合タンパク質の同定

転写活性化領域と特異的に相互作用するタンパク質のバンドを SDS-PAGE ゲルより切りだし、ゲル内でトリプシン消化を行った。その後これらサンプルをゲルから抽出し、MALDI-TOF-MS によりそこに含まれるペプチド断片の質量分析を行った。この結果を元に

PMF 法を、さらに MS/MS 法で得られた各フラグメントのアミノ酸配列情報を MASCOT Search にて検索し、この領域と特異的に結合するタンパク質を同定した。

4. 研究成果

NF- Bp65 と結合する核内タンパク質探索のためのプローブの作成

(i)化学合成ペプチドの作成

XX モチーフを含む NF- Bp65 の TA1 領域 (⁵³²EDFSSIADMDFSALLSQISS⁵⁵¹) 及び TA2 領域 (⁴²⁹TQAGEGTLSEALLQLQFD⁴⁴⁷) 及びそれぞれの Ala 置換体は、N 末端に Cys, C 末端をアミドとして Fmoc-固相法を用いて合成した。また、ポリプロリンロッドは、まず Building Block としての Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH を液相法にて合成し、これを用いてポリプロリンロッド (アセチル-CGGPPPPPPPPGALEVLFGQK-アミド) は、Fmoc 固相法にて縮合した。その後、脱保護と同時に Cys を -SPy 化することで、TA1 または TA2 領域とジスルフィド架橋を選択的に行えるようにした。

TA1 または TA2 とポリプロリンロッドはそれぞれ空気酸化条件下にてジスルフィド架橋を行い、HPLC にて分離・生成を行った。得られたプローブは、ポリプロリンロッド N 末端側のアミノ基を介して、CNBr-activated Sepharose と共有結合させ、固相プローブビーズとしたが、その後の探索に用いるには得られたペプチド (ビーズ) の収量 (および収率が低く、相互作用タンパク質の探索には用いることが出来なかった。

(ii)大腸菌組み換えプローブの設計・作成の作成

NF- Bp65 TA1/TA2 領域および各 Ala 置換体は、3' 末端に attB1 サイトを持ち、5' 末端約 20bp が相補的に重なるように 2 本の相対するプライマー (長さ約 80bp) を設計した。これらプライマーを PCR 法にて中央部分で相補鎖を形成させ、互いのプライマーを鋳型として増幅した。得られた PCR 産物は、BP クロナーゼを用いて pDONR221 (Invitrogen) に導入してエントリークローンを得た。各クローンは Sequencing を行って配列を確認したのち、LR クロナーゼを用いて N 末端に GST 遺伝子を持つ pDEST15 に導入し、GST 融合発現ベクターとした。これらプラスミドを大腸菌 BL-21AI に形質転換し、arabinose を加えて目的のペプチドを発現させ、大腸菌可溶画分をグルタチオンセファロースビーズと結合させた。非結合画分を洗い出した状態でビーズと結合したままのものを組み替え固相プローブとした。

特異的相互作用タンパク質の探索 (分離)

ヒト培養細胞 (Jurkat 細胞) 湿重量 3g をホモジナイザーを用いて画成分を分離し、これを高張バッファーを加えて核成分としたの

ちに、等張液で透析を行い核画分を得た。この核画分を大腸菌組換え NF- Bp65TA1/TA2 プローブビーズに加えてしばらく転倒混和ののち、非結合成分を取り除いてから、ビーズに SDS Sample Buffer を加えて特異的結合成分を溶出した。これを 15% アクリルアミドゲルを用いて分離し、CBB でゲルを染色したところ、NF- Bp65 TA2 と結合するが、Ala 置換体とは結合しない 27KDa のバンドを見出した。これに対し、NF- Bp65TA1 と特異的に相互作用するバンドは見出されなかった。

結合タンパク質の同定

上記で得られた NF- Bp65TA2 ドメインと特異的に結合するバンドをゲルから切り出し、ゲルを脱色 / 乾燥したのちにトリプシンを加えてゲル内消化を行った。アセトニトリルを加えて溶出されてきたペプチド断片を MALDI-TOF-MS によりペプチド断片の質量分析を行った。その結果を PMF 法にて分析したとともに、一部ペプチド断片を MS/MS 法により測定し、いずれの結果も MASCOT サーチ (Matrix Bioscience) を行ったところ、195 アミノ酸残基からなるタンパク質 ZNF-503-AS2 であることが判明した。このタンパク質は、DNA との結合部位を有する核内タンパク質であるが、NF- Bp65 との相互作用に関しては一切知見が得られていないものであった。

本研究では、化学合成ペプチドプローブを用いて相互作用因子の探索を行う予定であったが、ポリプロリンロッドと核転写活性化領域ペプチドのヘテロダイマー化の効率が低く、この収率改善に時間がかかって当初の目標 (小分子阻害剤の探索) に至らなかった。今後は、ZNF-503-AS2 と NF- Bp65 との相互作用の検証を行うとともに、相互作用部位の詳細な解析を行う予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 真一 (Asada Shinichi)
新潟薬科大学薬学部 助教
研究者番号：50424883

(2)研究分担者

北川 幸己 (Kitagawa Kouki)
新潟薬科大学薬学部 教授
研究者番号：60093853