

創薬加速化のための  
タンパク質リガンド相互作用解析  
における熱分析技術の開発

2014 年 1 月

關口 光広

創薬加速化のための  
タンパク質リガンド相互作用解析  
における熱分析技術の開発

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
博士(生物工学)学位論文

關口 光広

目次	.....	i
略語	.....	ii
序論	.....	1
第一章	FKBP12 と mTOR 融合タンパク質とリガンドの熱分析と構造生物学的な解析を利用した効果的な評価法の確立	.....17
第一節	背景	.....18
第二節	実験項	.....23
第三節	結果	.....32
第四節	まとめ	.....54
第二章	酵素誘導を担うタンパク質 PXR とリガンドの創薬加速化を目指した熱分析評価法の確立	.....55
第一節	背景	.....56
第二節	実験項	.....61
第三節	結果	.....66
第四節	考察	.....86
第五節	まとめ	.....92
総括	.....	93
参考文献	.....	96
謝辞	.....	107
発表論文目録	.....	108

## 略語

ALIS: automated ligand identification system

AR: androstane receptor

CAR: constitutive androstane receptor

CYP: cytochrome P450

DBD: DNA binding domain

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

DSC: differential scanning calorimetry

DSF: differential scanning fluorometry

ER: estrogen receptor

FBDD: fragment based drug design

FKBP12: FK506 binding protein 12

FKBP38: FK506 binding protein 38

FRB: FK506 rapamycin binding

GB1: B domain of streptococcal protein G

Hsp90: heat shock protein 90

HSQC: heteronuclear single-quantum coherence

IPTG: isopropyl- $\beta$ -D(-)-thiogalactopyranoside

ITC: isothermal scanning calorimetry

LBD: ligand binding domain

mTOR: mammalian target of rapamycin

Ni-NTA: nickel-nitrilotriacetic acid

NMR: nuclear magnetic resonance

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PCN: pregnelone-16 alpha-carbonitrile

PCR: polymerase chain reaction

PDB: protein data bank

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor

PXR: pregnane X receptor

RXR: retinoid X receptor

SBDD: structure based drug design

SDS: sodium dodecyl sulfate

SPR: surface plasmon resonance

SRC1: steroid receptor coactivator

STD: saturation transfer difference

TdCD: temperature-dependent circular dichroism

T<sub>m</sub>: transition midpoint temperature

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

YT: yeast-tryptone

XRE: xenobiotic response element

アミノ酸とその略号

アミノ酸	3 文字表記	1 文字表記
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

## 序論

医薬品の探索、開発は時代と共に多くの変化を遂げてきている。古くは天然有機化合物の探索や知見の利用が行われ、様々な有用な化合物 penicillin G, streptomycin, tacrolimus などが得られてきた (Figure 1-1)<sup>1</sup>。

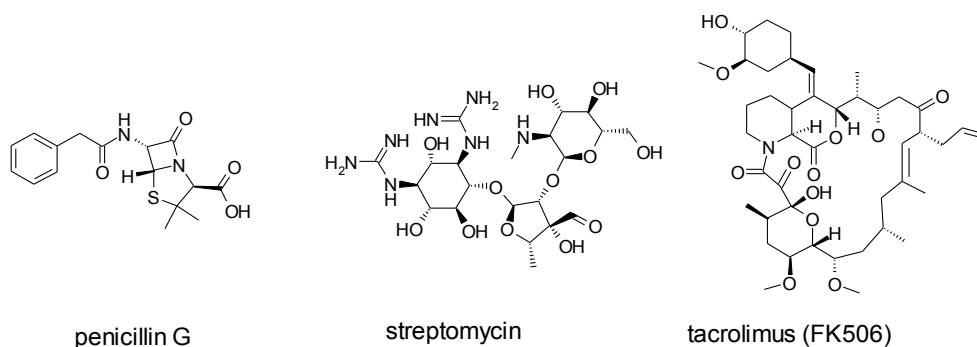


Figure 1-1. Structures of natural medicines, penicillin G, streptomycin, and tacrolimus.

近年においては病因を分子レベルで解明し、ターゲットとなるタンパク質などを明らかにすることを利用した合理的な医薬品開発が可能になってきた。1990年代に入るとハイスループットスクリーニングが行われるようになり、大量のライブラリー化合物を高速で評価し、その中から新しいリード化合物の探索が行われている<sup>2</sup>。さらに2000年代に入るとタンパク質3000プロジェクト<sup>3,4</sup>をはじめとしたタンパク質の立体構造が明らかになってきたことを背景に、効率的に創薬を進める SBDD, FBDD (Figure 1-2) といった手法が広まってきた<sup>5,6</sup>。

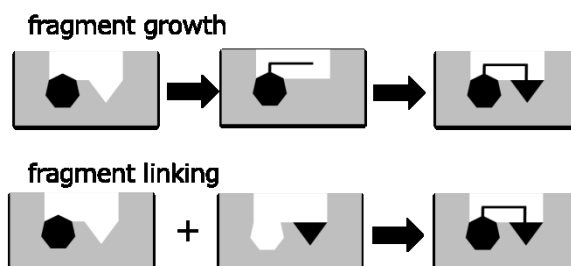


Figure 1-2. The methods of FBDD, fragment growth and fragment linking.



これらのどの手法においても重要であるのは、ターゲットとなるタンパク質の医薬品候補化合物の相互作用解析である。ターゲット分子との相互作用を明らかにすることで、mode of action の解明、構造活性相関研究、選択性の向上など医薬品開発を進める上で重要な情報が得られる。低分子とタンパク質の相互作用解析を行う物理化学的な手法としては、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR)、核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance: NMR)、X線結晶構造解析、熱分析など様々な手法が存在する。

SPR はタンパク質を膜状に固定化し、ligand を送液することでタンパク質への結合と解離を検出し相互作用を明らかにする手法である (Figure 1-3)。SPR はスループット性が高いことや解離定数が求められ順位付けが容易のため、創薬スクリーニングの段階では汎用的に用いられる<sup>7</sup>。一方で SPR では、膜にタンパク質を固定化するため溶液条件とは異なる場合があることや、疎水性の高いタンパク質は非特異吸着が発生しやすいことなど様々な不利な点が存在し、全てのタンパク質への対応は困難である。

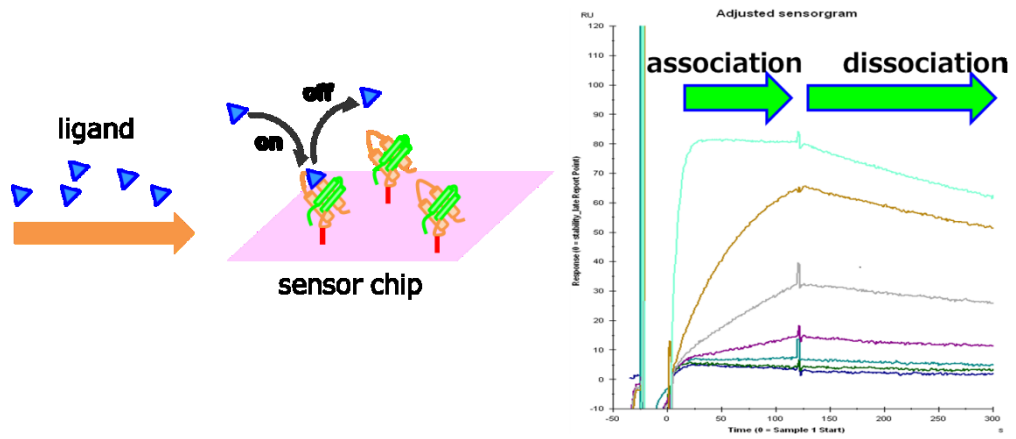
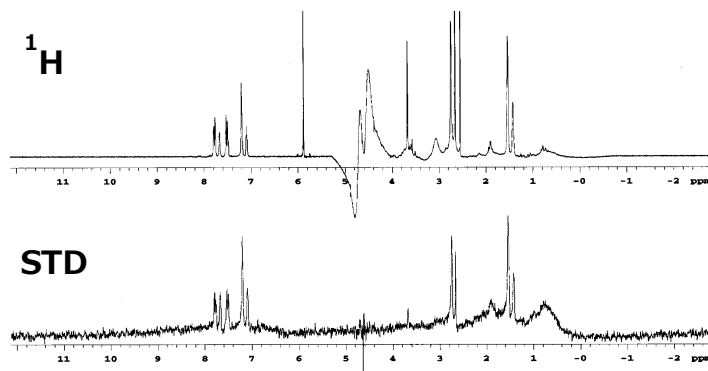


Figure 1-3. The conceptual diagram of SPR (Surface plasmon resonance). SPR observed ligand association and dissociation to target protein.

NMR においては大きく分けて ligand 検出とタンパク質検出の 2 種類の手法が存在する (Figure 1-4)。ligand 検出の手法としては WaterLogsy や STDNMR などが知られている<sup>8</sup>。ともに溶液中におけるタンパク質と相互作用している ligand のシグナルを検出する方法であり、中程度のスループットを有しているが、タンパク質使用量が多く、また偽陽性判定も多いという懸念点がある。一方タンパク質検出方法としては <sup>15</sup>N HSQC 法がある<sup>9</sup>。これは ligand 非共存下と共存下におけるアミノ酸の各 HSQC シグナルを検出し、シグナルの移動によって相互作用を判別する方法である。本方法は相互作用に関するアミノ酸を特定することが出来るため、相互作用界面の特定が可能である。本方法を利用したスクリーニング方法である SAR by NMR<sup>10</sup> は創薬の段階で利用されている。また近年ランタノイド金属を用いた NMR 相互作用解析法も確立しつつある。これはランタノイド金属の常磁性効果を利用し ligand の結合位置を特定する方法である<sup>11</sup>。これらタンパク質側を検出する方法は得られる情報は多いが、スループットが低いこと、タンパク質使用量が多いことやタンパク質を安定同位体で標識する必要があり、安易には行えない。

**(a) ligand detection (STDNMR)**



**(b) protein detection ( $^{15}\text{N}$  HSQC)**

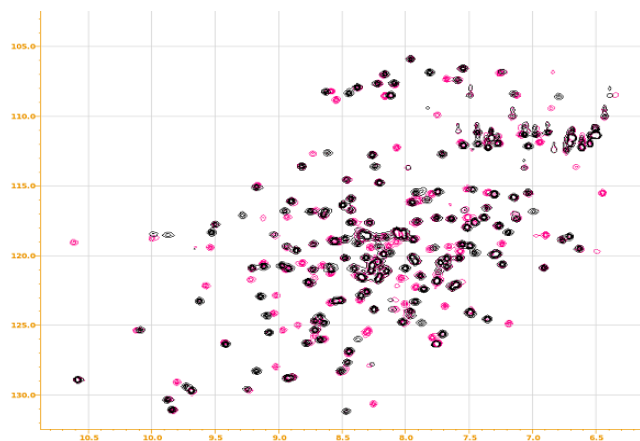


Figure 1-4. NMR interaction analysis could be divided into two kinds of methods. (a) ligand detection method (STDNMR) (b) protein detection method ( $^{15}\text{N}$  HSQC).

X線結晶構造解析はタンパク質とリガンドの共結晶を作成する方法であり、相互作用の有無、結合界面、構造変化など最も多くの情報を得ることが出来る<sup>12</sup>。一方でデメリットとしてはスループットが低いことやタンパク質使用量が多いこと、結晶構造は溶液構造とは異なる場合があることがあげられる。そのため、NMR や X線結晶構造解析は1次スクリーニングではなく、ヒット化合物のバリデーションなどの2次評価に利用されることが多い。

一方、タンパク質とリガンド間の相互作用を解析する手段としての熱分析の方法はITC、DSC および DSF の3種類存在する。

等温滴定型カロリメトリー (Isothermal Titration Calorimetry: ITC) は標的分子に相互作用する低分子を滴下した際に起こる結合反応に伴う熱量を観測する方法である (Figure 1-5)。2つの分子が相互作用する際には熱の吸収や発熱が起こり、これを滴定することによって結合定数 ( $K_d$ )、結合比 (stoichiometry,  $n$ )、反応のエンタルピー変化 ( $\Delta H$ )、およびエントロピー変化 ( $-T\Delta S$ ) を求めることが出来る<sup>13</sup>。

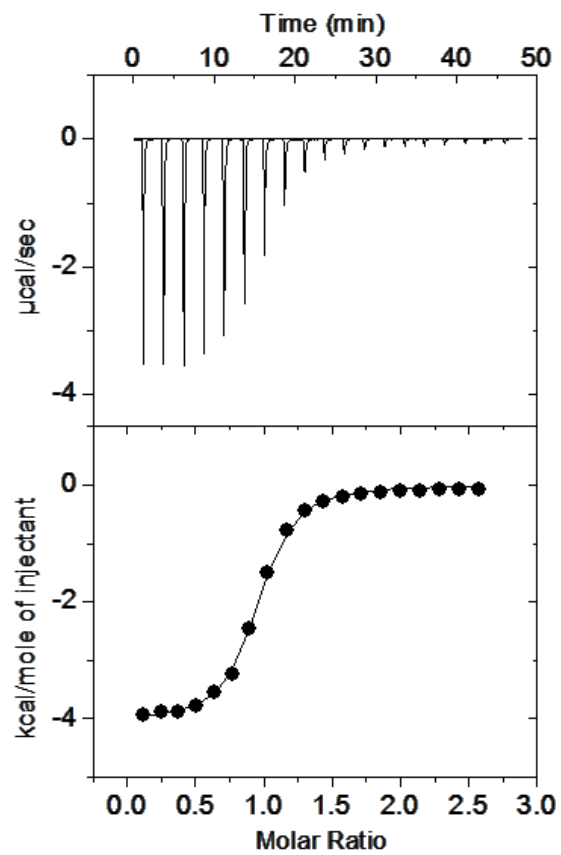


Figure 1-5. Calorimetric titration of the protein solution with the ligands. Upper panel show the heat flow associated with the ligand, and lower panel shows binding isotherms corresponding to the data in upper panel and the fitted curves.

ITC は $\Delta H$  を実測で求めることが出来る唯一の装置である。ギブスの自由エネルギー $\Delta G$  ( $\Delta G = -RT\ln K$ )は $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  と表される。つまり結合はエンタルピーとエントロピーの総和として求められる。エンタルピーは水素結合や van der Waals 相互作用や水素結合などに由来する特異的な結合を示す値である一方、エントロピーは疎水性相互作用などの非特異的な結合を示す値である。近年、市販されている HIV プロテアーゼ阻害剤やスタチンの標的タンパク質とのレトロスペクティブな解析が実施され、新しい世代の薬はよりエンタルピー駆動型であることが示された<sup>14</sup>。また、我々は骨粗しょう症薬などで利用されている市販ビスフォスフォネート薬剤とターゲットであるファルネシルニリン酸合成酵素 (FPPS) の間の熱力学的な解析を実施したところ、より世代が新しい薬剤ほどエンタルピー駆動型であることを確認した (Figure 1-6)<sup>15,16</sup>。このように新しい薬ほどエンタルピー駆動型の化合物であること、つまり標的特異性が高い化合物であり、best in class の化合物であるということが ITC を用いて $\Delta H$  を比較することで証明された。このような背景を踏まえ、創薬の段階でエンタルピーを実測して、構造変換等へ利用することが検討され始めた<sup>17,18</sup>。

また、ITC 測定は 1 つ当たりの測定時間が 1 時間程度と従来はスクリーニングとしては利用できなかったが、 $\Delta H$  の簡易スクリーニング法として SITE 法が開発され、本方法を利用して SBDD の段階での $\Delta H$  の順位付けも行われるようになってきた<sup>19</sup>。

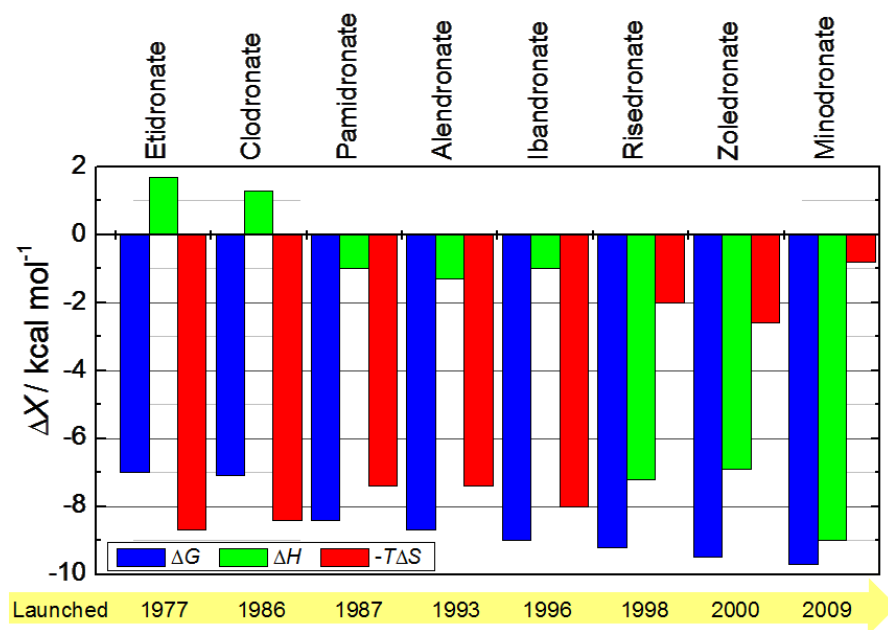


Figure 1-6. Enthalpic and entropic contribution to the binding affinity of bisphosphonates



示差走査型カロリーメトリー(Differential Scanning Calorimetry: DSC)は昇温過程におけるタンパク質の立体構造変化に由来する熱の出入りを検出することが出来る<sup>20</sup>(Figure 1-7)。水溶液中のタンパク質は天然状態と変性状態の2状態間の平衡で存在する。タンパク質溶液を昇温させると立体構造の自由度が増大し、安定化に寄与している様々な因子が弱められ熱変性が引き起こされる(アンフォールディング)。DSCにおいてはタンパク質のアンフォールディングに伴う $\Delta H$ を観測することが出来る。タンパク質の熱変性の際には $\Delta H$ は吸熱のピークとしてあらわれ、その吸熱ピークの中点、つまり半分のタンパク質が変性した温度を熱変性中点( $T_m$ )と呼ぶ。また同時に熱変性の際の熱容量変化( $\Delta C_p$ )も測定することが出来る。 $T_m$ はタンパク質の熱安定性を評価する1つの指標として用いられ、 $T_m$ が高い分子は低い分子と比較して熱に安定なタンパク質であると言える。この指標を基にして多くのバイオ医薬品の熱安定性試験が実施されている<sup>21</sup>。また ligand 共存下ではタンパク質は ligand と複合体を形成し、熱安定性が向上するため  $T_m$  が上昇する。この現象を利用してタンパク質リガンド相互作用解析にも利用されている<sup>22</sup>。一方で DSC においてはタンパク質使用量が SPR よりは多く、また 1 サンプルあたりの測定時間も 1 時間程度有するためスループットは低い。

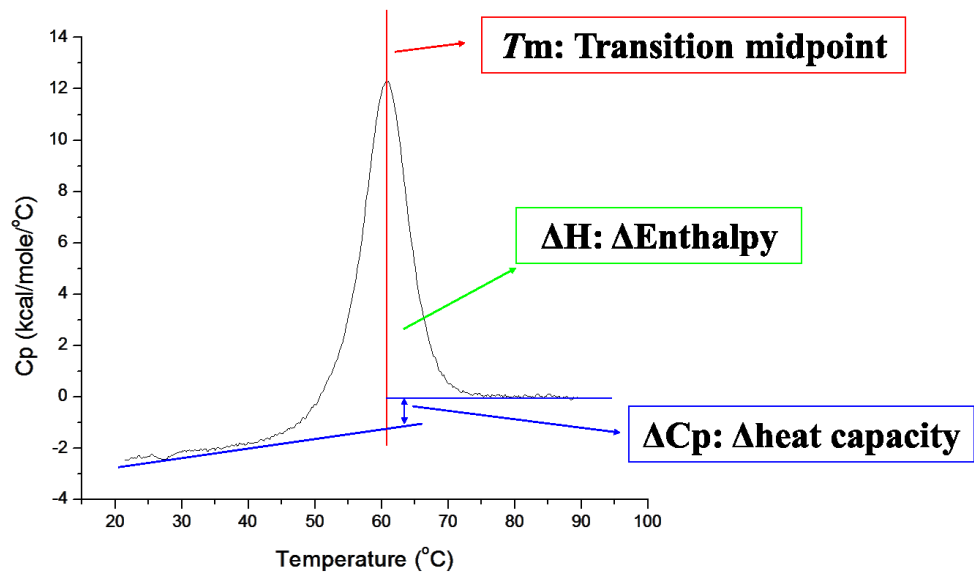


Figure 1-7. A schematic DSC curve of protein solution. DSC measures the heat capacity of states and the excess heat associated with transitions that can be induced by temperature change.

DSF (Differential Scanning Fluorometry) は、DSC と同じくタンパク質溶液を昇温しその過程におけるタンパク質立体構造変化をとらえることが出来る。DSC と大きく異なるのはその検出法である。DSF においてはタンパク質溶液に蛍光色素 (例えば Sypro Orange) を添加する。タンパク質溶液を昇温すると、タンパク質はアンフォールディングし、内側に存在する疎水性領域が外側に曝される。蛍光色素は疎水性領域と相互作用し、蛍光を示す。その作用を利用して蛍光を検出することでタンパク質のアンフォールディングの際の温度  $T_m$  を検出する。本方法は DSC と同様に抗体の熱安定性の検討<sup>23</sup> や ligand 相互作用解析<sup>24</sup> で利用されている。また、我々はランタノイド結合タンパク質の他のタンパク質との融合の際の linker の最適な長さを判断するために DSF を利用し、最も  $T_m$  が高い安定な linker の選択を行っている<sup>11</sup>。

DSF の最大の特徴としては、タンパク質使用量とスループットである。DSF の 1 回あたりのタンパク質使用量は 0.1-1 $\mu$ g 程度となり、これは DSC の 1/100 であり、また 96 穴や 384 プレートを使用できることから DSC と比較して高いスループットを有している。一方で、DSC と比較してのデメリットとしては溶媒の使用に制限があることや、複数のピークが存在する場合に解析が困難であることがあげられる。タンパク質の熱安定性試験の際には DSF の高いスループットで多くのタンパク質の測定を実施し、必要な際に DSC で詳細に解析するのが最も賢明であると考えられる。

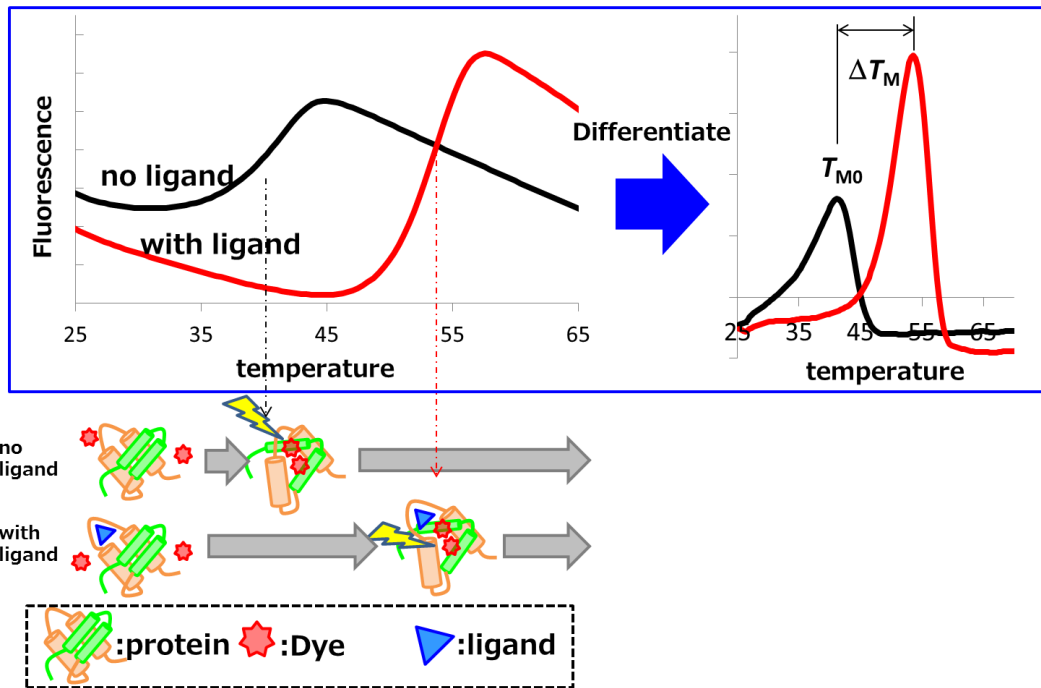


Figure 1-8. The conceptual diagram of differential scanning fluorometry (DSF). The temperature at which a protein unfolds is measured by an increase in the fluorescence of a dye, which has a higher affinity for the hydrophobic parts of a protein that are exposed upon unfolding. In the presence of the ligand, protein is stabilized because of ligand binding,  $T_m$  shifted higher also same as DSC.

これら 3 種の熱分析的な解析は、タンパク質リガンド相互作用解析に有効であり、効果的なスクリーニング法を創作すれば、目的の相互作用を有する化合物の探索に有用であると推測される。本研究においては効率的な新しい熱分析による相互作用解析技術の開発のため、2 つのターゲットに対する研究を実施した。1 つ目としてはイソメラーゼの FKBP12 と mTOR の系であり、2 つ目としては核内受容体の PXR である。

天然物として得られた FK506 や rapamamycin は FKBP12 に結合する。しかしそれだけでは活性は得られない。このタンパク質リガンド複合体が、さらに他のタンパク質である calcineurin や mTOR と結合することによって免疫抑制作用や抗がん作用を発現するユニークな作用機序を有している。そこで、抗がん剤の創薬をめざし、ligand が FKBP12 に結合した後に、mTOR に結合するか否かを判別する熱力学的なスクリーニング方法の確立を目指した。FKBP12 と mTOR の融合タンパク質を作成し、NMR の情報をサポートに DSC を利用したところ、容易に FKBP12 のみと結合する化合物と FKBP12 および mTOR と 3 者複合体を形成している化合物を 1 度の実験で判別する方法を確立した。本実験は第一章で記載する。

一方、PXR はヒトの薬物代謝の主要な酵素である CYP3A を誘導するタンパク質として知られている。PXR への結合を評価することは、その薬物の代謝に大きく影響を与えるため、早期に把握しておくことが必要である。既存の reporter gene assay は細胞系で実験していることから様々な制限があり、物理化学的な相互作用解析測定法が必要であった。そこで PXR タンパク質を作成し、熱力学相互作用解析を用いて評価した。その結果、DSC を用いることで reporter gene assay と同等の結果を得ることが出来た。しかし一方で DSC はスループットが高くはなく、初期のスクリーニング向きではないため、高いスクリーニング能力を有する DSF を検討した。本来 DSF では PXR のような疎水性の大きなポケットを有

するタンパク質においては Dye と競合してしまうため利用が困難である。そこで、新しいパラメーター( $dF/dT$ )<sub>50</sub> を定義(蛍光強度の温度変化あたりの変化が初期状態と比較して半分になるリガンド濃度)し、本数値の利用を検討した。その結果、DSC の  $T_m$  や reporter gene assay の  $EC_{50}$  と高い相関性を得ることが出来た。これにより DSF を用いて高いスループットで PXR との相互作用解析が可能になり、CYP3A 誘導評価を物理化学的な方法で可能にした。本内容は第二章に記載する。

2つのタンパク質、FKBP12 および PXR との熱分析を利用した相互作用解析の手法を開発し、効果的なスクリーニング法を創作すれば、目的の相互作用を有する化合物の探索に効果的であり、創薬を加速化することが可能であることを示した。

## 第一章

# FKBP12 と mTOR 融合タンパク質とリガンドの熱分析と構造 生物学的な解析を利用した効果的な評価法の確立

## 第一節 背景

FK506<sup>25,26</sup> や rapamycin<sup>27,28</sup> はともに peptidylprolyl cis/trans isomerase (PPI) 作用を有する FKBP12 (FK506 binding protein 12) に結合する化合物として知られている (Figure 2-1)。これら2つはともに天然物由来であり、FK506 は筑波山で採取された *Streptomyces tsukubaensis* より単離され、一方 rapamycin は Easter 島で採取された *Streptomyces hygroscopicus* より単離された。これら2つの化合物はともに移植時の免疫抑制剤として臨床で使用されているが、rapamycin は抗がん剤としても利用されている。この臨床での利用用途が異なることは、FKBP12 に結合した後のターゲットが異なることに由来する。FKBP12-FK506 複合体は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  依存性フォスファターゼとして作用する calcineurin と結合してその作用を阻害する<sup>29,30</sup>。一方 FKBP12-rapamycin 複合体は mTOR と結合し mTOR の生物活性を阻害する<sup>31</sup>。

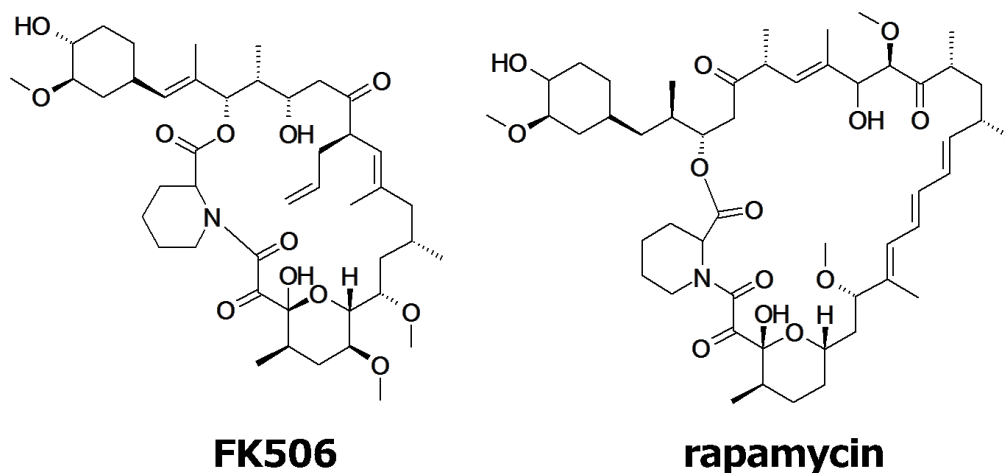


Figure 2-1. Structures of FK506 and rapamycin.



mTOR は 2549 アミノ酸残基からなる大きなキナーゼタンパク質であり、N 端から HEAT repeat ドメイン(1-1480)、FAT ドメイン(1513-1910)、FRB ドメイン(2015-2114)、kinaseドメイン(2181-2484)および FATCドメイン(2517-2549)の機能性ドメインがある(Figure 2-2)。

mTOR は機能的にも構造的にも重要な 2 つのタンパク質複合体 mTORC1 および mTORC2 を形成する。mTORC1 は、mTOR、Raptor および mLST8 (GβL) からなる複合体で、栄養源の他、成長因子、ホルモン、ストレスなどによって活性化され、活性化された mTORC1 は、4EBP1 や p70S6K といったタンパク質合成や細胞増殖に関わる分子をリン酸化し、mRNA の翻訳(4EBP1)、オートファジーの抑制(ATG13)やリボゾームの生合成(p70S6K) などに関与している<sup>32-34</sup>。一方 mTORC2 は、mTOR、Rictor、mLST8 (GβL) および Sin1 からなる複合体で rapamycin 非感受性であり Akt や SGK および PKC をリン酸化し、アポトーシスの抑制、細胞の成長、細胞骨格の制御などに関与している<sup>35,36</sup>。このように mTOR は細胞の成長と生存の重要な制御を行うため、抗がん剤の重要なターゲットの 1 つであると考えられている(Figure 2-3)<sup>37,38</sup>。



Figure 2-2 mTOR contains five distinct functional domains from N-terminals 12 HEAT repeats, an FAT domain, an FRB domain, a catalytic domain, and an FATC domain.

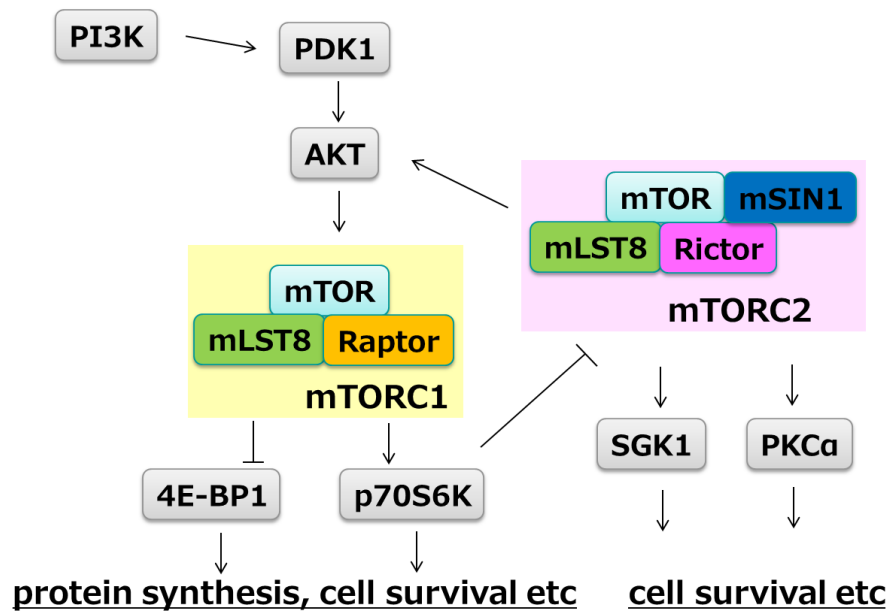


Figure2-3. mTOR was formed two functionally and structurally distinct multiprotein complex, mTORC1 and mTORC2. mTORC1 transmits nutrient availability signals to control numerous cellular functions. mTORC2 regulates actin cytoskeleton assembly and activates a protein kinase, AKT. mTORC1 and mTORC2 play a key role in the regulation of cell growth and survival.

mTOR の 5 つのドメインの中で活性本体である kinase ドメインは変異が入りやすいことや選択性を出しにくいことから、創薬のターゲットとしては困難である。一方、FRB ドメインはそのドメインに rapamycin が結合し活性を阻害することから創薬のターゲットとしてなり得る。

近年、mTOR FRB ドメインの溶液中の構造が明らかにされ (Figure 2-4)<sup>39</sup>、また新しい阻害剤との複合体構造が NMR で解析された<sup>40,41</sup>。これらの論文において FRB ドメインは大腸菌の不溶性画分より得られ、可溶化、巻き戻し、精製の 3 段階の工程を経て得られている。さらに常温において FRB ドメインの溶解性と安定性は非常に悪く、長時間のスクリーニングには向かないことが分かった。抗がん剤を目的とした mTOR FRB ドメイン阻害の探索のためには安定で溶解性の高い FRB ドメインが必要になってくる。

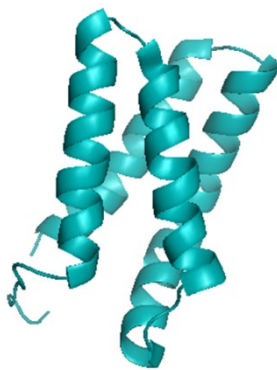


Figure 2-4. Structure of mTOR FRB (PDB: 2NPU).

そこで、FKBP12とmTOR FRBを融合させたタンパク質 FKBP12-mFRB タンパク質を作成した。この融合タンパク質は大腸菌培養後、可溶性画分より得られ、簡単な2つのステップのクロマトグラフィーで単離された。さらに FK506 や rapamycin との相互作用を DSC と NMR を用いて検討し、FKBP12-FRB 融合蛋白質を用いることで容易に結合の判別が可能であることを示した (Figure 2-5)。この FKBP12-FRB 融合タンパク質と DSC および NMR を用いた相互作用解析は単なる FRB 阻害剤のスクリーニングだけでなく、FKBP12 依存的な FRB 阻害と FKBP12 非依存的な FRB 阻害を容易にスクリーニングすることも可能とした。

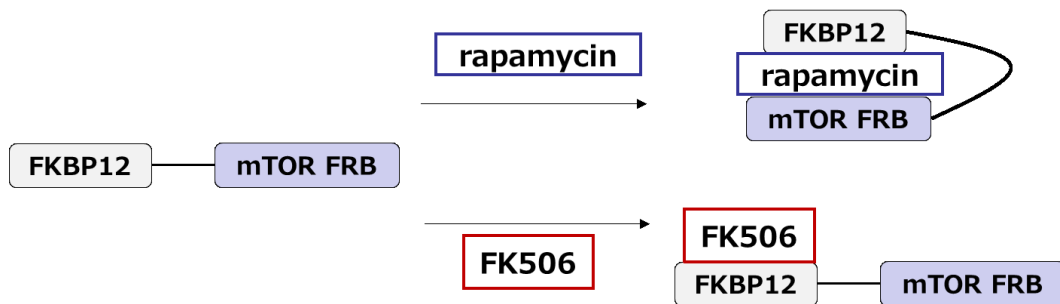


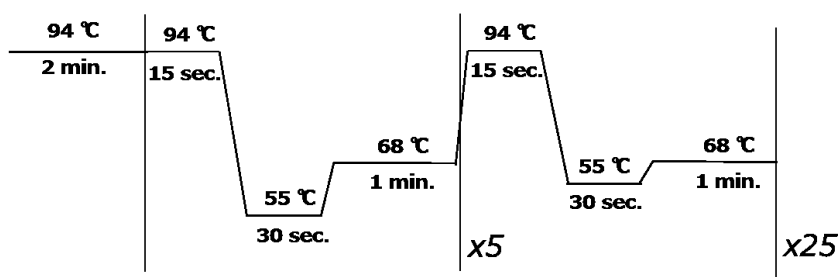
Figure 2-5. Discrimination of FK506 and rapamycin using FKBP12-mTOR FRB fusion protein.

## 第二節 実験項

### 1) FKBP12 のコンストラクト作成

ヒト FKBP12 核酸配列がコードされた断片に対して forward primer FKBP12-f (5'- CCTCTAGACATATGATGGGAGTGCAGGTGGAAACC-3') と reverse primer FKBP12-r (5'-AGACTCGAGATTATCATTCCAGTTTTAGAAGCTCC-3')を設計した(Sigma Genosys Japan)。次にその primer と DNA polymerase として KOD -plus-(東洋紡)を用いて PCR (iCycler, Biorad)を実施した。PCR は 2 mM dNTPs を 5  $\mu$ L、25 mM MgSO<sub>4</sub> を 2 $\mu$ L、KOD -Plus- buffer を 5 $\mu$ L、Primer (FKBP12-f, FKBP12-r)を各 1 $\mu$ L、template の DNA を 1  $\mu$ L、KOD -Plus- DNA polymerase を 1  $\mu$ L および滅菌水を 26  $\mu$ L 加え、全体を 50  $\mu$ L として下記に示す cycle を実施した。

-PCR cycle-



増幅された断片については QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した後に制限酵素 *Nde* I , *Xho* I (タカラバイオ)を処理し末端を切断した。増幅された PCR 産物は *Nde* I , *Xho* I にて処理された pGBHPS ベクター<sup>42</sup> (北海道大学(現熊本大学)の小橋川准教授より譲受)と ligation high version 2 (東洋紡)を用いて ligation を実施した。得られた反応物は 大腸菌 DH-5  $\alpha$  competent cell(タカラバイオ)に形質転換した。

## 2) mTOR FRB コンストラクトの作成

ヒト mTOR FRB (2015-2114)の核酸配列がコードされた断片に対して forward primer FRB-f (5'- CCTCTAGACATATGGAGCTGATCCGAGTGGCCATC - 3') と reverse primer FRB-r (5'- AGACTCGAGATTACTGCTTTGAGATTTCGTC GGAAC - 3')を設計した (Sigma Genosys Japan)。次に primer と DNA polymerase として KOD -plus-を用いて PCR を実施した (条件は FKBP12 と同様)。QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit にて精製後、制限酵素 *Nde* I と *Xho* I で処理された pGBHPS ベクターに導入し大腸菌 DH-5  $\alpha$  competent cell に形質転換した。

## 3) FKBP12-FRB 融合コンストラクトの作成

ヒト FKBP12 とヒト FRB が融合した配列は以下のように作成した。ヒト mTOR FRB (2015-2114)の核酸配列がコードされた断片に対して forward primer FRB-f2 (5'- CGGGGTACCGAGCTGATCCGAGTGGCC - 3')と reverse primer FRB-r2 (5' - AGACTCGAGATTACTGCTTTGAGATTTCGTCGGAAC - 3')を設計した (Sigma Genosys Japan)。次に、primer と DNA polymerase として KOD -plus-を用いて PCR を実施した (条件は FKBP12 と同様)。その後制限酵素 *Kpn* I (タカラバイオ)と *Xho* I を用いて末端を切断した。続いてヒト FKBP12 の核酸配列がコードされた断片に対して forward primer FKBP12-f と reverse primer FKBP12-r2 (5'- AGAGGATCCTTCCAGTTTTAGAAAGCTCC - 3') および DNA polymerase として KOD -plus-を用いて PCR を実施した (条件は FKBP12 と同様)。その後制限酵素 *Nde* I と *Bam*H I (タカラバイオ)を用いて末端を切断した。リンカーの配列は GSGSSGSSGSSGT を設計しオリゴヌクレオチドとして linker-f(5'- GATCCGGCAGCTCGGGTAGTAGCGGGAGCTCCGGTAC - 3')と linker-r (5' - CGGAGCTCCCGCTACTACCCGAGCTGCCG - 3')を用い末端を *Bam*H I と *Kpn* I で制限酵素処理を実施した。得られた 3 つの PCR 産物 (FKBP12, FRB,

linker) を ligation high version 2 を用いて ligation を実施した。続いて QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit にて精製後、FKBP12-f と FRB-r2 の 2 つの primer を用いて PCR を実施した(条件は FKBP12 と同じ)。QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit にて再度精製後、*Nde* I と *Xho* I で処理された pGBHPS ベクターに導入し大腸菌 DH-5  $\alpha$  competent cell に形質転換した。

#### 4) FKBP38 PPI コンストラクトの作成

FKBP38 の PPI ドメイン(92-210)の核酸配列がコードされた断片に対して forward primer FKBP38-f (5'- CCTCTAGACATATGGAGTGGCTGGACATTC - 3')

と reverse primer FKBP38-r (5' - AGACTCGAGATTACTCCAGGTCAGGC CCGTCC - 3')を設計した(Sigma Genosys Japan)。DNA polymerase として KOD -plus-を用いて PCR を実施した(条件は FKBP12 と同様)。QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit にて精製後 *Nde* I と *Xho* I で処理された pGBHPS ベクターに導入し大腸菌 DH-5  $\alpha$  competent cell に形質転換した。

#### 5) FKBP38-FRB 融合コンストラクトの作成

ヒト FKBP38 とヒト FRB が融合した配列は以下のように作成した。ヒト FKBP38 の核酸配列がコードされた断片に対して forward primer FKBP38-f と reverse primer FKBP38-r2 (5' - GGACGGGCCTGACCTGGAGGGATCCTCT - 3') を設計した(Sigma Genosys Japan)。DNA polymerase として KOD -plus-を用いて PCR を実施した(条件は FKBP12 と同様)。その後制限酵素 *Nde* I と *Bam*H I を用いて末端を切断した。リンカーの配列は FKBP12-FRB と同様に GSGSSGSSGSSGT と設計し、オリゴヌクレオチドとして linker-f と linker-r を用い末端を *Bam*H I と *Kpn* I で制限酵素処理を実施した。得られた 2 つの PCR 産物(FKBP38, linker)と前述で作成した FRB を ligation high version 2 を用いて

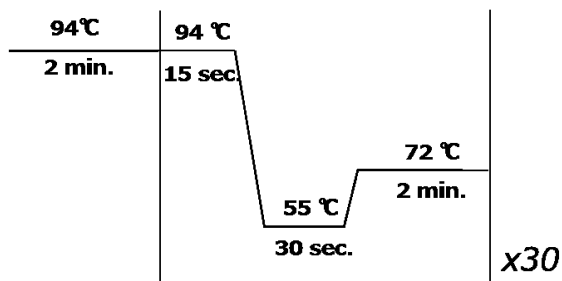
ligation を実施した. 続いて QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit にて精製後 FKBP38-fとFRB-r2 の2つの primer を用いてPCRを実施した(条件はFKBP12と同じ)。QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit にて再度精製後 *Nde* I と *Xho* I で処理された pGBHPS ベクターに導入し大腸菌 DH-5  $\alpha$  competent cell に形質転換した。

#### 6) 形質転換

形質転換された大腸菌は2x XY 培地 (Invitrogen) に ampicillin (Sigma aldrich) を0.5%含有させたプレートに植菌し、37度で一晩培養した。プレートに生成したコロニーについてコロニーPCRを実施した。

#### 7) コロニーPCR

コロニーを楊枝でピックアップし、3  $\mu$ L の滅菌水入りPCR チューブに溶解させた。溶解後、95 $^{\circ}$ C、2分間溶液を温めた。続いて T7 promoter 5' - TAATACG ACTCACTATAGGG - 3' (Sigma Genosys Japan, 50 pmol/ul) 及び T7 terminator 5' - ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG -3' (Sigma Genosys Japan、50 pmol/nl)をそれぞれ0.06  $\mu$ L、Ex Taq(タカラバイオ)を3  $\mu$ L 加えPCRを実施した。PCR cycle は以下に示すように行った。



PCR 後のサンプルについて、enVISION<sup>™</sup> (Amresco) を2  $\mu$ L 加えてアガロー



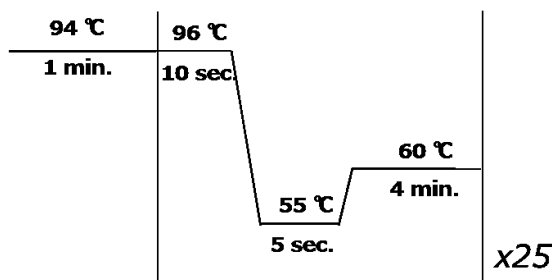
ス 1.5% GTG (Lonza) のゲル濃度で電気泳動を実施した。電気泳動後に目的の長さの DNA を有しているコロニーについて 2x YT 培地 10 mL で一晩培養をした。

#### 8) plasmid の作成

培養後のサンプルについては 4000 rpm で 10 分間遠心 (LX-120, TOMY) し、菌体のみを回収した。DNA の精製は QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて実施した。

#### 9) DNA シークエンスの確認

T7 forward primer と reverse T7 primer および DNA polymerase として KOD-plus-を用いて PCR を実施した。PCR は Big Dye terminator を 1  $\mu$ L、sample buffer を 3.5  $\mu$ L、Primer (T7 forward, reverse) を各 1  $\mu$ L、各 plasmid を 1  $\mu$ L ずつ、および滅菌水を 11.5  $\mu$ L 加えて全体として 20  $\mu$ L として下記の cycle を実施した。



PCR 産物については Gel Filtration Cartridge (EdgeBio) を用いて遠心 (4400 rpm, 3 min) して精製した。続いて遠心エバポレーター (CVE-200D, EYELA) を用いて溶液を乾固させた。完全に乾固した後に Hi-Di formamide (Applied Biosystems) を 20  $\mu$ L 加えて 90°C、2 分間溶液を温め、室温まで静置後、DNA sequencer を用いて配列の確認を実施した。DNA sequencer は ABI3100 を用い

キャピラリーは 3100 / 3130xl 50-cm Capillary Array (61 cm x 50  $\mu$ m, Applied Biosystems)、ポリマーは POP6 (POP6<sup>TM</sup> polyer for 3100/3130-avant genetic analyzer, Applied Biosystems)を用いた。

#### 10) 培養(FKBP12, FKBP12-FRB, FKBP38-FRB の非ラベル体)

plasmidは大腸菌 competent cell BL21 (DE3) (Merck life science)に形質転換し 2xYT 培地プレート(ampicillin 0.5%)にて一晩 37°C で培養した後、得られたコロニーをピックアップし 2x YT 培地(ampicillin 0.5%)にて一晩 37 °C で振とう培養(LX-120, TOMY)した。菌体は 900 mL にスケールアップし、37 °C で 4 時間程度培養(Innova 4230, New Brunswick Scientific)し、濁度 OD<sub>600</sub> = 0.6~0.7 において IPTG(calbiochem) 100 mg/mL 溶液を 1 mL 加えて 16 °C で 24 時間振とう培養した。培養後 4°C、20 分間、4000 rpm の遠心を実施し菌体を回収した。

#### 11) ラベル体用の M9 最少培地の作成方法

最初に Vitamin mixture を作成した。純水 50 mL あたりに Biotin(和光純薬)を 50 mg、Choline chloride(ナカライテスク)を 50 mg、Folic acid(Sigma Aldrich)を 50mg、Naiacinamide(和光純薬)を 50mg、D-Pantothenate(Sigma Aldrich)を 50mg、Pyridoxal(ナカライテスク)を 50 mg、Riboflabine(ナカライテスク)を 5 mg および Thiamine(ナカライテスク)を 50 mg 加えて作成した。

続いて培地成分としては、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O を 17.1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 3.0 g、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl を 1.0 g および NaCl を 0.5g 水に溶かし 1 L とし、オートクレーブ(LSX-700, TOMY)を実施した。続いてグルコース(ナカライテスク)を 2.0 g、ampicillin を 0.1 g、100 mM CaCl<sub>2</sub> (ナカライテスク)を 1 mL、2 M MgSO<sub>4</sub> (和光純薬)を 1 mL および Vitamin mixture を 1 mL 加えて作成した。

#### 12) 培養(FKBP12, FKBP12-FRB, FKBP38-FRB の $^{15}\text{N}$ ラベル体用)

plasmid は大腸菌 competent cell Rosetta2 (DE3)に形質転換し 2xYT 培地プレート(ampicillin 0.5 %)にて一晩 37 °C で培養した後、得られたコロニーをピックアップし、ラベル体用の M9 最少培地(ampicillin 0.5 %)にて一晩 37 °C で振とう培養した。菌体は M9 最少培地(ampicillin 0.5 %)を用いて 900 mL にスケールアップし、Celtone-N(Spectral Stable Isotope)を 1 g 加えて、37 °C で 4 時間程度培養し、濁度  $\text{OD}_{600} = 0.6\sim 0.7$  において IPTG (100 mg/ml)を 1 mL 加えて 16 °C で 24 時間振とう培養した。培養後 4 °C、20 分間、4000 rpm で遠心し菌体を回収した。

#### 13) 培養(FKBP12, FKBP12-FRB, FKBP38-FRB の $^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}$ ラベル体)

plasmid は大腸菌 competent cell Rosetta2 (DE3)に形質転換し 2xYT 培地プレート(ampicillin 0.5 %)にて一晩 37 °C で培養した後、得られたコロニーをピックアップしラベル体用の M9 最少培地{ampicillin 0.5 %, グルコースは  $^{13}\text{C}$  グルコース(Cambridge Isotope Laboratories, Inc)を使用}にて一晩 37 °C で振とう培養した。菌体は M9 最少培地(ampicillin 0.5 %)を用いて 900 mL にスケールアップし、Celtone-CN(Spectral Stable Isotope)を 1 g 加えて、37 °C で 4 時間程度培養し、濁度  $\text{OD}_{600} = 0.6\sim 0.7$  において IPTG (100 mg/ml)を 1 mL 加えて 16 °C で 24 時間振とう培養した。培養後 4 °C、20 分間、4000 rpm で遠心し菌体を回収した。

#### 14) タンパク質の精製

回収した菌体を 40 mL の PBS (PBS tablet, Calbiochem) で懸濁し、4°C で超音波破碎 (SONIFIER 250, Branson, 出力 20 %, Output 8、10 分)を行った。破碎液を 4 °C、4000 rpm で 1 時間遠心し上清を回収。回収された上清に対して予め

PBS で平衡化した Ni-NTA Superflow(QIAGEN)を 5 mL(50%スラリー)加えて目的タンパク質を吸着させた。50 mL x 3 の wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole)で非特異吸着を除いた後、10 mL の elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazole)で目的タンパク質を溶出した。続いて 20  $\mu$ L の PreScission Protease(GE Healthcare)を加え 4  $^{\circ}$ C 16 時間インキュベートして N 末端側の GB1 を切断した。切断後、サンプルは Hiload 16/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィー(AKTA 10S, GE Healthcare)により精製した。その際 buffer は 20 mM Tris-HCl pH 8.0 150 mM NaCl を用いた。タンパク質の収量は Nano Drop(Thermo Scientific)を用いて得られた吸光度から確認し、FKBP12: 40 mg/L, FKBP38 PPI: 25 mg/L, FKBP12-FRB: 24 mg/L, FKBP38-FRB: 17 mg/L であった。

#### 15) DSC の測定条件

DSC は VP-DSC (MicroCal)を使用した。昇温速度は 1 $^{\circ}$ C /分とし、20  $^{\circ}$ C から 80  $^{\circ}$ C まで測定した。測定の際のタンパク質濃度は 50  $\mu$ M、リガンド濃度は 1 mM とし、バッファーは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl に 5 % DMSO を加えて実施した。解析はソフトウェア Origin 7.0 を使用した。

#### 16) NMR の測定条件

装置は UNITY INOVA600 および 800 MHz(Agilent Technology)を使用した。タンパク質は PBS (pH7.4)もしくは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 150 mM NaCl に溶解させた。リガンドの FK506(社内で単離)や rapamycin(フナコシ)は DMSO- $d_6$  (ACROS)に溶解させ 100mM とし、タンパク質に対して 5 %重量加え、その後 25  $\mu$ L の D<sub>2</sub>O (ACROS)を加えて全量を 250 $\mu$ L とした。全ての測定温度は

25 °C で実施した。データの解析には VnmrJ 2.2D (Agilent Technology) および Olivia (<http://fermi.pharm.hokudai.ac.jp>) を利用した。相互作用の解析には  $^{15}\text{N}$  HSQC を利用し、主鎖の帰属には 3 次元 NMR [HNCO, HNCA, HNCACB, C(CO)NH, HBHA(CO)NH, (HCA)CO(CA)NH, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HN(CA)HA, H(CCO)NH] を利用した。

### 第三節 結果

#### 1) FKBP12 と FRB の融合タンパク質のデザインと発現精製

mTOR FRBドメインタンパク質を単独で 25 °C で NMR 測定と解析を実施したが、溶解性と安定性が不足しているため、シグナルの強度が低下してくることがわかった。一般にタンパク質の溶解性や安定性向上のためには GB1、thioredoxin や MBP といった安定な可溶性タグを付属させてタンパク質を発現精製することが多い。本実験においては、これらのタグではなく高安定性高溶解性の FKBP12 または FKBP38 PPIドメインを融合させて発現した。この融合は安定性や溶解性の向上だけでなく、FKBP12 依存的と非依存的な mTOR 阻害剤のスクリーニングに使用できると期待して考案した。

FKBP12、FRB および rapamycin の 3 次元構造<sup>43,44</sup>によると、FKBP12 の C 末端は FRB ドメインの N 末端の近隣に存在しており、これより FKBP12 の C 末端と FRB の N 末端の間に linker を介して融合させることが賢明であると推測された。FRB ドメインの N 末端(E2014 から W2023)は X 線結晶構造ではフレキシブルであり、それを考慮すると FKBP12 の E107 から FRB の H2024 までは 28 Å であり、最低限 7 アミノ酸分の距離である。そこで linker としてはその約 2 倍の 13 アミノ酸(GSGSSGSSGSSGT)をデザインした。

FKBP12-FRB 融合タンパク質は N 端側に GB1 と 6 つの Histidine からなる His-tag が付属した形で発現させた(Figure 2-6)。タンパク質は可溶性画分より Ni-NTA で回収され、続いて PreScission protease を用いて FKBP12-FRB と GB1、His-tag を切断した後、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製した(Figure 2-7(a))。精製の各ステップにおいては SDS-PAGE により確認し、最終的には 1 つのバンドで得られていることを確認した(Figure 2-7(b))。回収量は 34 mg/L であり、これは物理化学的な解析するには十分な量であり、25 °C、1 週間の各種 NMR 測定でも安定であった。

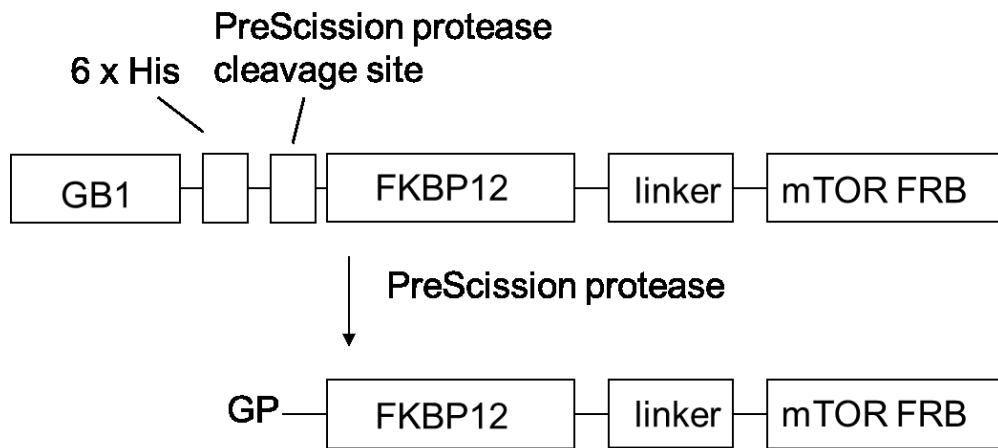
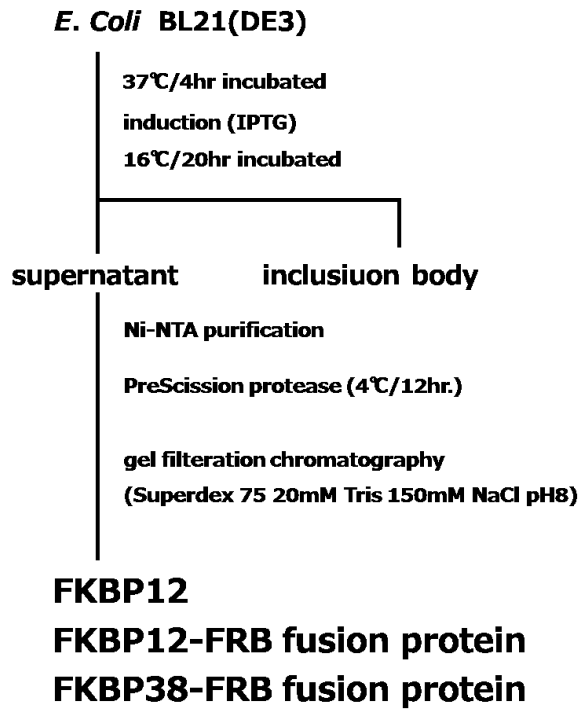


Figure 2-6. Schematic representation of construction of the FKBP12-mTOR FRB fusion protein.

(a)



(b)

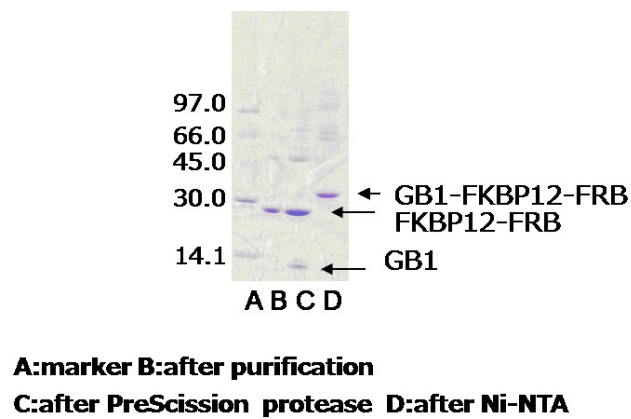


Figure 2-7. (a) Purification scheme of FKBP12 and FKBP12-mTOR FRB fusion protein. (b) SDS-PAGE analysis for purification of lane A: marker, lane B: after purification by gel filtration chromatography, lane C: after PreScission protease digestion, lane D: after Ni-NTA purification.



## 2) DSC 測定と解析

FKBP12 と FKBP12-FRB 融合タンパク質に対してリガンド FK506 と rapamycin との示唆走査型カロリメトリー (DSC) の測定を実施した。リガンド非共存下において FKBP12 の熱変性中点 ( $T_m$ ) は  $65.8(\pm 0.1)$  °C で観測された。続いてリガンド FK506 や rapamycin を加えると  $T_m$  はそれぞれ  $77.6(\pm 0.4)$  °C、 $76.5(\pm 0.1)$  °C であった。これは FKBP12 にリガンドが結合したことによってタンパク質が安定化され  $T_m$  が上昇したと推定された (Figure 2-8)。

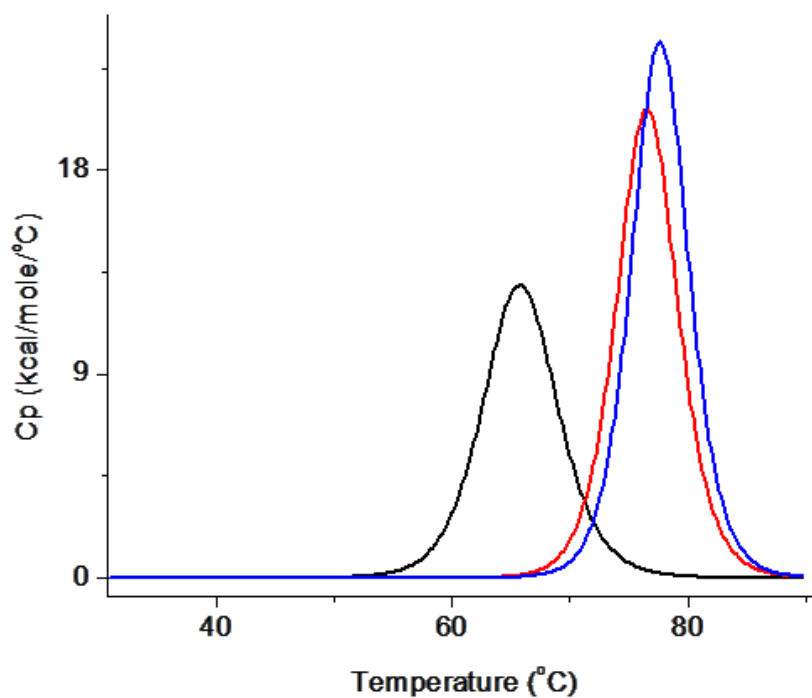


Figure 2-8. DSC curve of FKBP12 without ligand (black), with FK506 (blue), and rapamycin (red).

続いて FKBP12-FRB 融合タンパク質の  $T_m$  の測定を実施すると2つのピーク (43.8 (±0.4) °C、49.6 (±0.1) °C) が得られた (Figure 2-9)。この 2 つのピークが得られたということは、2 つのタンパク質の間には直接相互作用が存在しない、もしくは非常に弱いことが推察される。また、FKBP12-FRB 融合タンパク質中の FKBP12 と単独の FKBP12 の  $T_m$  を比較すると融合タンパク質中の FKBP12 の方が低い。タンパク質を融合することによって  $T_m$  が低下してしまうことは他のタンパク質でも観測されており<sup>45-47</sup>、これは融合のために低下したと考えられた。続いてこの FKBP12-FRB 融合タンパク質に FK506 を添加した際の DSC は 1 つのピークは変化しないのに対して (43.8 (±0.4) °C から 43.9 (±0.2) °C)、1 つのピークは高温側にシフトした (49.6 (±0.4) °C から 70.5 (±0.2) °C)。FK506 は FKBP12 に結合し FRB には結合しないことが知られており、これから低温側のピーク (43.8 (±0.4) °C) は FRB 由来であり、高温側のピーク (49.6 (±0.4) °C) が FKBP12 由来であり、FK506 の共存により高温側のピークが結合により安定化したことが推察された。さらに FKBP12-FRB 融合タンパク質に rapamycin を共存させると DSC は 2 つであったピークが変化して高温側の 1 つのピーク (74.9 (±0.3) °C) を与えた。これは rapamycin の共存によって FKBP12、rapamycin、FRB の 3 者複合体が形成されたことを示し、これは論文の情報<sup>48</sup>と一致した。以上 FKBP12-FRB 融合タンパク質のリガンドの結合を DSC で解析を行うことでそれぞれのドメインごとの結合を明らかにすることが可能となった。

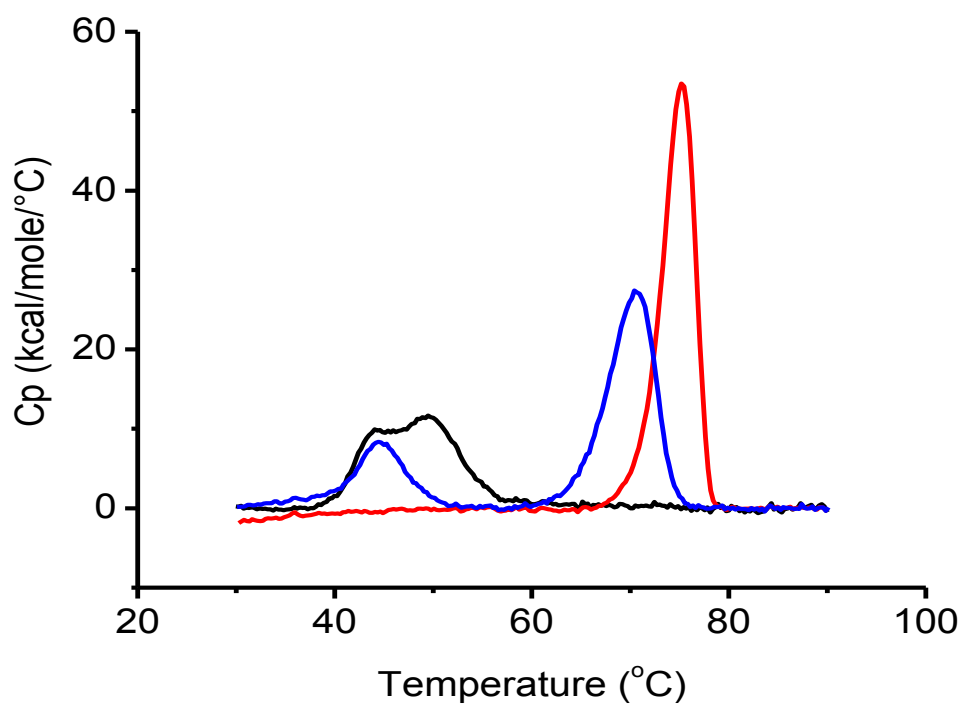


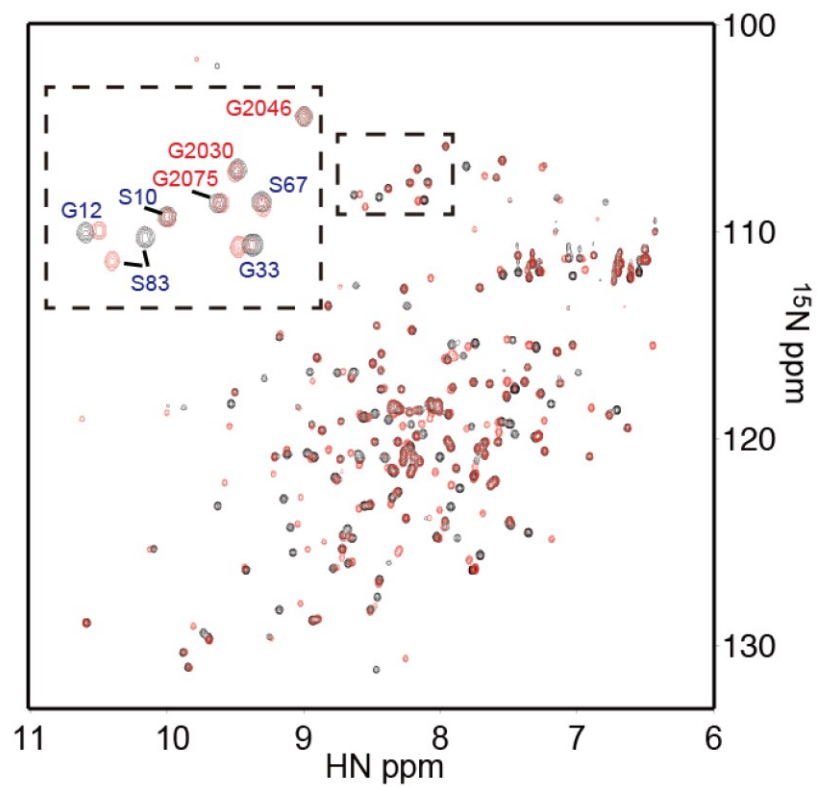
Figure 2-9. Heat capacity curves of FKBP12-FRB fusion protein under three different conditions without ligand (black), in the presence of FK506 (blue) and in the presence of rapamycin (red).

### 3) NMR 測定

続いてタンパク質の NMR を用いたリガンドとの相互作用解析を実施した。最初に主鎖の帰属のために 2 次元 NMR ( $^{15}\text{N}$  HSQC) と 3 次元 NMR 測定 [HNCO, HNCA, HNCACB, C(CO)NH, HBHA(CO)NH, (HCA)CO(CA)NH, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HN(CA)HA, H(CCO)NH] を実施した。その結果、FKBP12 についてはアミノ酸の 97% の帰属に成功した。一方 FKBP12-FRB 融合タンパク質についてはリガンドフリーの場合 79%、FK506 共存下の場合 79%、rapamycin 存在の場合 80% の帰属に成功した。

Figure 2-10(a) には FKBP12-FRB 融合タンパク質のリガンドなしと FK506 共存下での  $^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルを重ね合わせたデータを表示し、Figure 2-10(b) にはそれぞれのアミノ酸の化学シフト値の差をグラフとして示した。化学シフト値の変化は FKBP12 側では大きいものに対して、FRB 側ではとても小さいことがわかる。これより、NMR から FK506 は FKBP12 とのみ相互作用していることが確認された。また、FKBP12 側で変動が観測されたアミノ酸を調べると FK506 と相互作用する界面を中心に存在することがわかる (Figure 2-11)<sup>49</sup>。

(a)



(b)

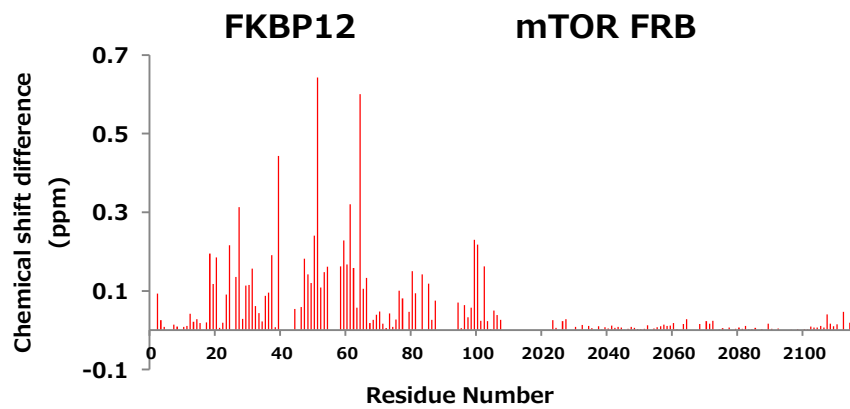


Figure 2-10. (a) Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the FKBP12-FRB fusion protein in the absence (black) and presence (red) of FK506. (b) Chemical shift differences between the FKBP12-FRB fusion protein in the presence and absence of FK506.

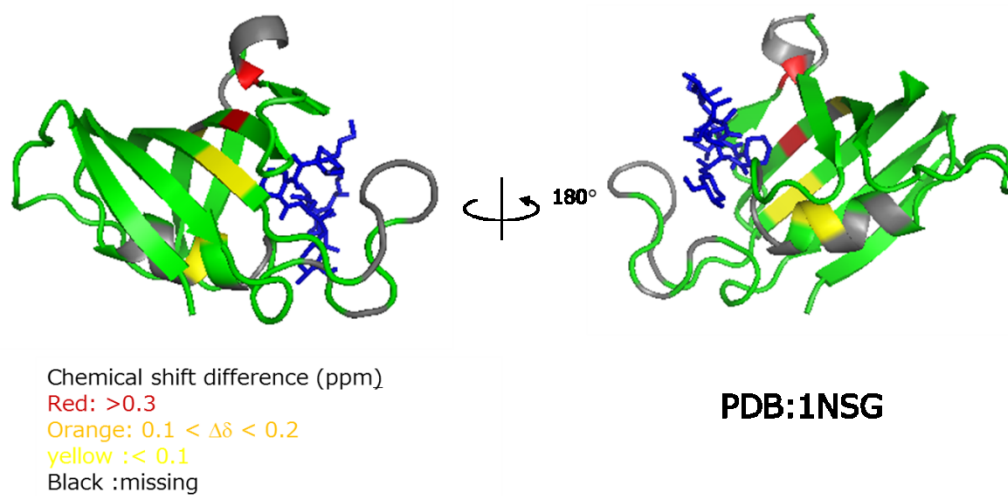
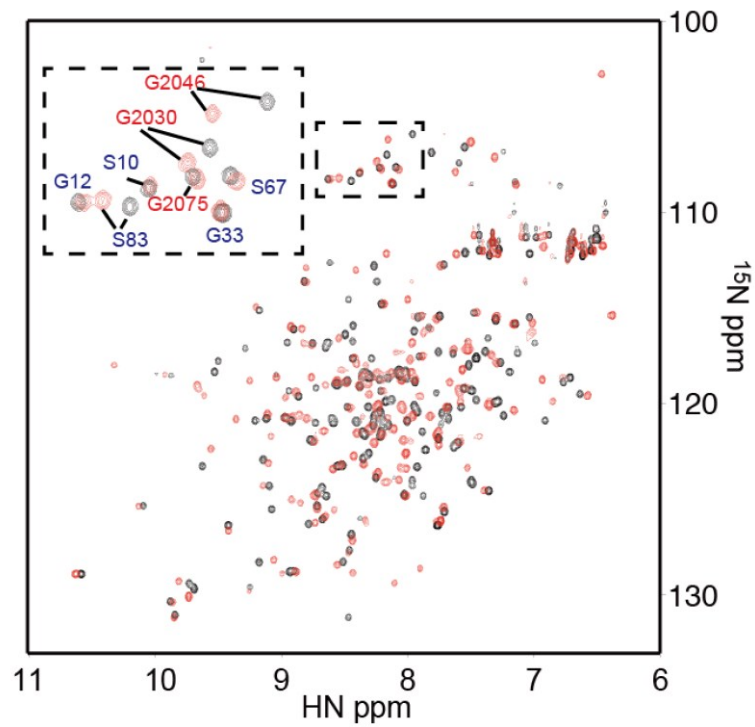


Figure 2-11. Chemical shift difference of FKBP12 mapped on crystal structure (1NSG) of in the absence and presence of FK506. Red represents chemical shift differences  $> 0.3$  ppm, orange of 0.2 and yellow of 0.1 ppm, and black represents Pro or missing residues.

一方で、FKBP12-FRB 融合タンパク質に rapamycin 共存下で  $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定すると FKBP12 側と FRB 側ともに大きな化学シフト値の変化が観測され (Figure 2-12(a), (b))、rapamycin は FKBP12 と FRB の両方と相互作用していることが確認された。大きな化学シフト値の変化は特に FKBP12 側では R18 から S39 および F46 から M66 の間、FRB 側では I2021 から E2052 および D2102 から V2106 の間で観測された。FKBP12, rapamycin, FRB の X 線 3 者複合体結晶構造<sup>43,44</sup>と比較すると、これらアミノ酸はちょうど 3 者複合体の相互作用界面であることがわかる (Figure 2-13)。FKBP12-FRB 融合タンパク質に対して FK506、rapamycin の 2 つの異なる薬物の結合状態を NMR で解析することによってその差異を端的に捉えることが可能となった。

(a)



(b)

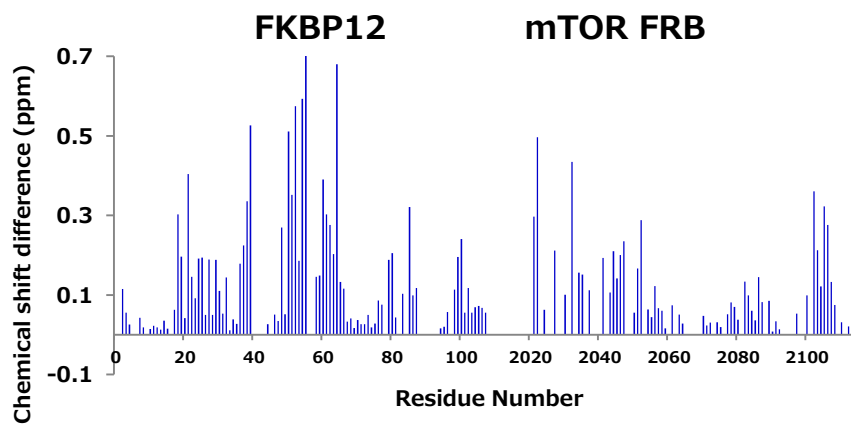


Figure 2-12. (a) Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the FKBP12-FRB fusion protein in the absence (black) and presence (red) of rapamycin. (b) Chemical shift differences between the FKBP12-FRB fusion protein in the absence and presence of rapamycin.



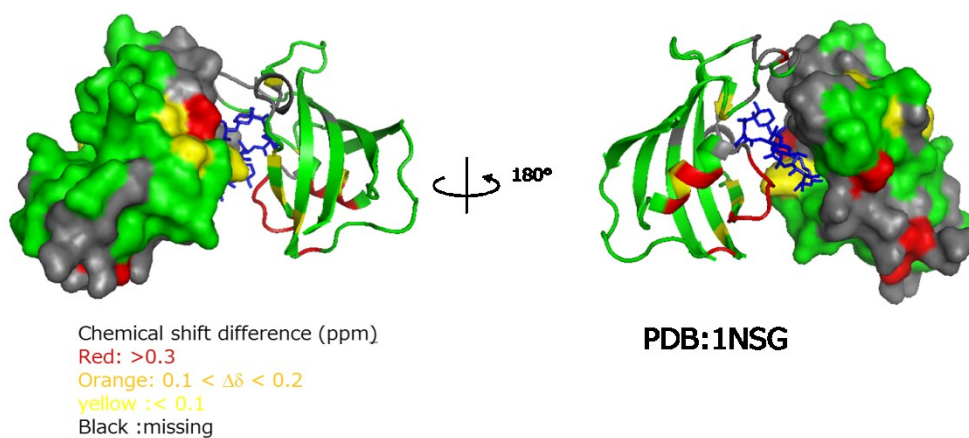


Figure 2-13. Chemical shift difference of FKBP12 mapped on crystal structure (1NSG) of FKBP12 in the absence and presence of rapamycin. Red represents chemical shift differences > 0.3 ppm, orange of 0.2 and yellow of 0.1 ppm, and black represents Pro or missing residues. FKBP12 was shown in ribbon, FKBP12 in surface and rapamycin in stick.

FKBP38 の PPI ドメイン(以下 FKBP38 と表記)は FKBP12 の PPI ドメインと一部立体構造が異なるため、FK506 や rapamycin とは相互作用しないことが知られている(Figure 2-14)。FKBP12 に作用せず FRB のみに結合する薬物の探索を可能とするようなフォーマットの作成を目的としてFKBP12をFKBP38のPPIドメインに置き換え FKBP38-FRB の作成を検討した。FKBP38-FRB 融合タンパク質は大腸菌培養後、可溶性画分より安定性が高く、溶解性も高いタンパク質として得られた。

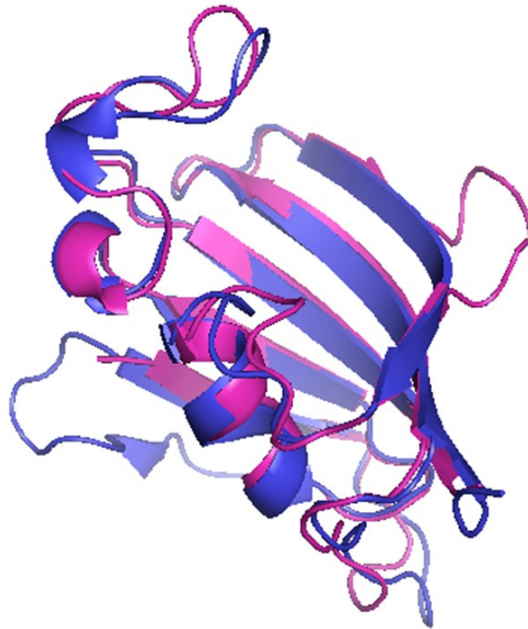


Figure 2-14. Overlay crystal structures of FKBP12 (1FKK, purple) and FKBP38 PPI domain (3EY6, blue)

FKBP38-FRB と ligand 間の DSC を測定したところ、ligand 非共存下での  $T_m$  は  $48.5^{\circ}\text{C}$  であったのに対し、FK506 共存下では  $48.4^{\circ}\text{C}$ 、rapamycin 共存下では  $49.6^{\circ}\text{C}$  となり rapamycin 共存下のみでは  $T_m$  の上昇が認められた (Figure 2-15)。以上より、FKBP38-FRB と FK506 は相互作用せず rapamycin は相互作用していることが確認された。

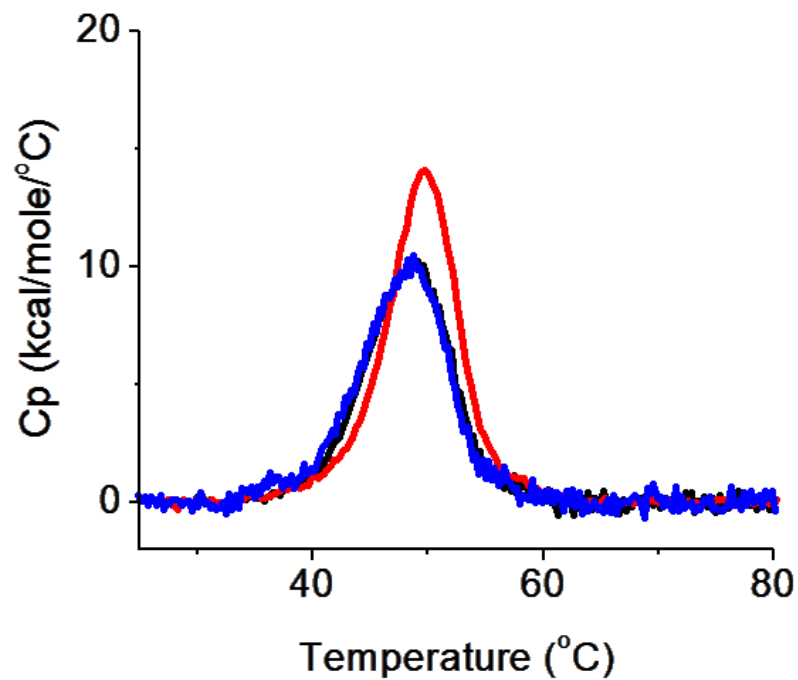
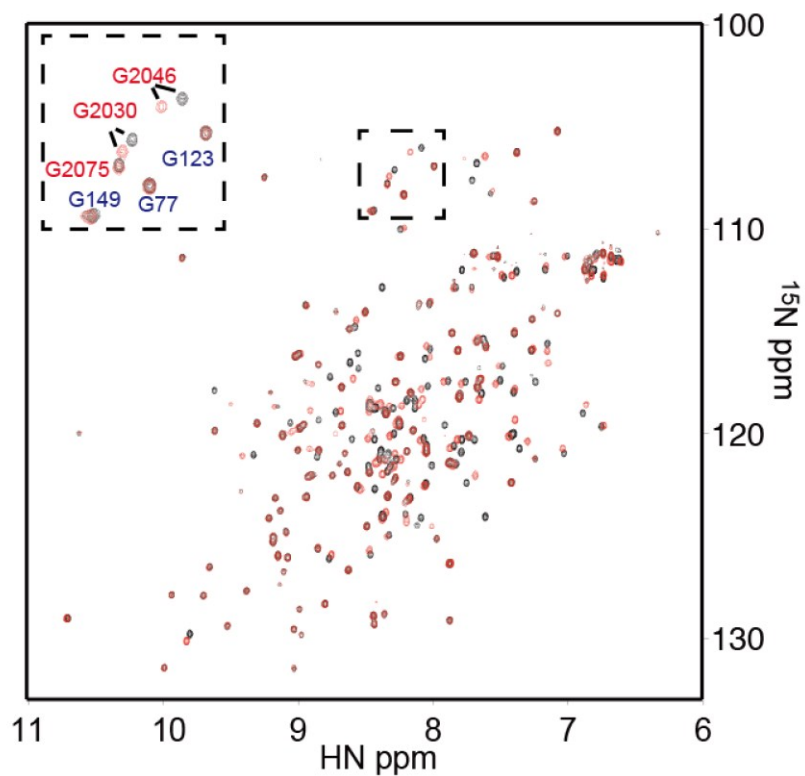


Figure 2-15. Heat capacity curve in DSC. Results were observed FKBP38-FRB (0.03 mM) protein with three different conditions, no ligand (black), FK506 (green), rapamycin (red), respectively.

この融合タンパク質に対して rapamycin 共存下で  $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定すると、FKBP38 側ではほとんど化学シフト値が変動しないのに対して FRB 側では大きな変化が観測された (Figure 2-16a, b)。これより、FKBP38-FRB は FRB 単独に作用するリガンドの探索に利用可能であると考えられる。

(a)



(b)

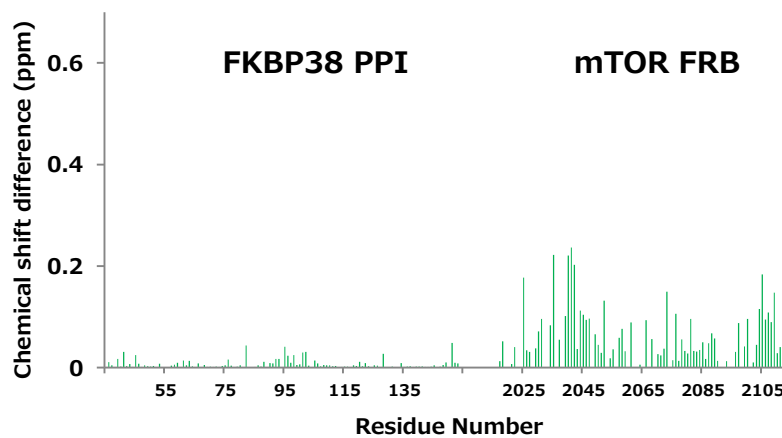
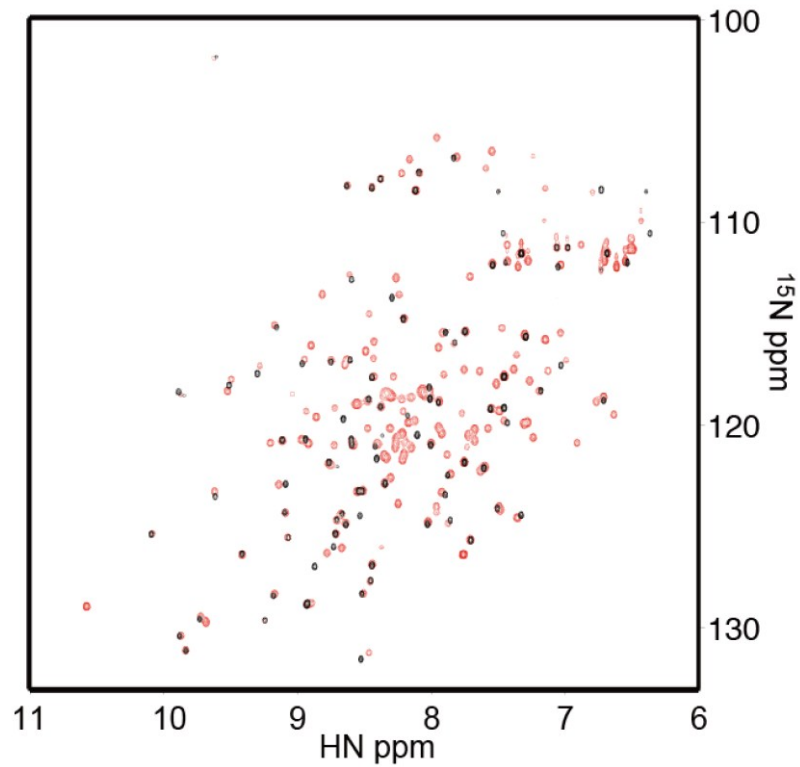


Figure 2-16. (a) Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the FKBP38-FRB fusion protein in the absence (black) and presence (red) of rapamycin. (b) Chemical shift differences between the FKBP38-FRB fusion protein in the absence and presence of rapamycin.

#### 4) 融合タンパク質 FKBP12-FRB および FKBP38-FRB とタンパク質 FKBP12 および FKBP38 PPI の NMR スペクトルの比較

Figure 2-17 (a), (b)には FKBP12 と FKBP12-FRB の  $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの重ね合わせとその変動を示す。単体と融合タンパク質由来の FKBP12 の化学シフト値の変化は T21 と C 末端で 0.2 ppm 以上の変化が観測された。C 末端については、C 末端側に 13 残基からなる linker と FRB ドメインが結合しているため、化学シフト値が異なると推測された。また T21 についても、立体構造を調べると C 末端の近隣に位置することがわかり、これも融合によって生成したアーティファクトであると推測された。この2つの領域以外には大きな化学シフト値の変化はないことから、FKBP12 と FRB は互いに相互作用することもなく独立していることが推測される。これは DSC 測定において 2 つのピークが別々に観測されたことから支持される。

(a)



(b)

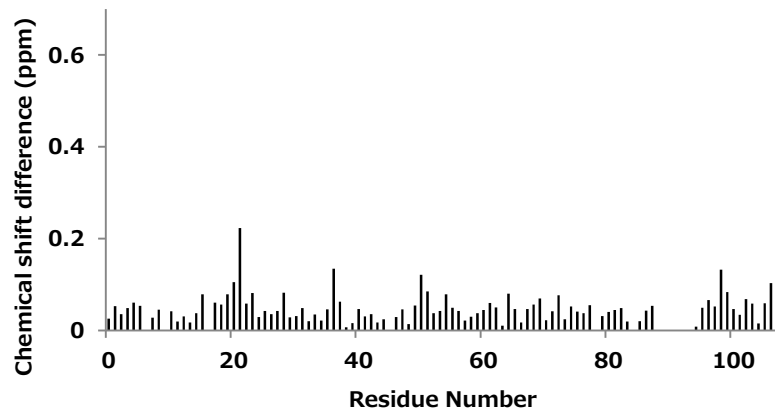
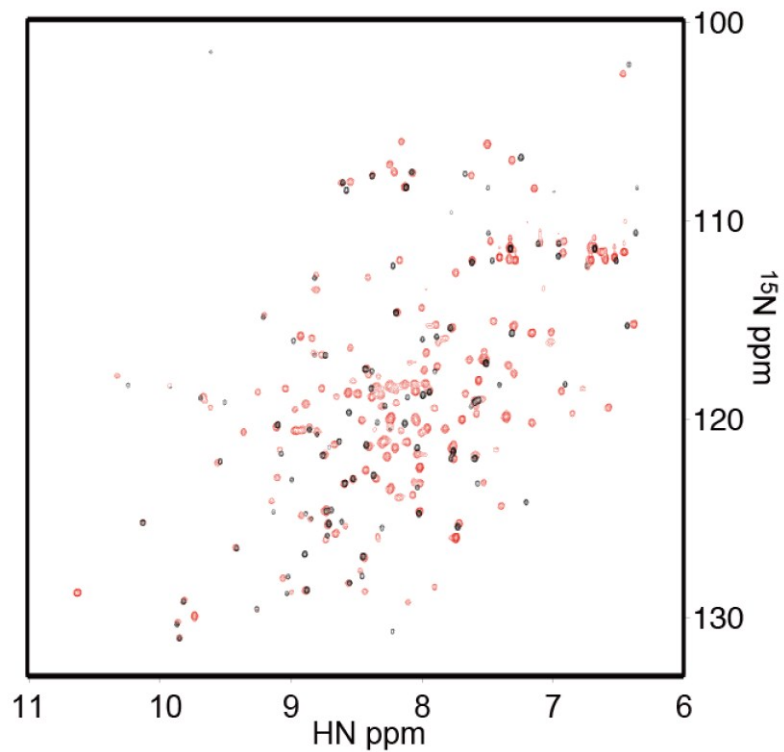


Figure 2-17. (a) Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of isolated FKBP12 (black) and the FKBP12-FRB fusion protein (red). (b) Chemical shift differences between the isolated FKBP12 and FKBP12-FRB fusion protein.

Figure 2-18 (a), (b)には rapamycin 共存下における FKBP12 と FKBP12-FRB の  $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの重ね合わせとその変動を示す。大きな化学シフト値の変化は R42 から E61 および A81 から T96 に観測された。これら変動している領域を X 線結晶構造<sup>43,44</sup> 上にマッピングし Figure 2-19,20 に記す。F46 から M49 はヘリックスであり、L50 から I56 および A81 から T96 はループであり、これらは FKBP12 と FRB の相互作用解析界面に存在し、FKBP12 と FRB はタンパク脂質間相互作用を形成していることがわかった。論文データ<sup>48</sup> によると FRB への相互作用は rapamycin 単独と FKBP12 共存下での rapamycin では 2000 倍程度結合力が異なり、FKBP12 と FRB のタンパク質間相互作用の重要性が示されており、我々のデータはこれを支持している。さらに DSC においても rapamycin 共存下の FKBP12-FRB 融合タンパク質の DSC curve が 1 つピークで観測されていることからタンパク質リガンド間だけでなくタンパク質間相互作用の存在が示唆され、論文を支持している。また、我々はランタノイド金属を用いた FKBP12, FRB, rapamycin 複合体の解析も試み、溶液中でも X 線結晶構造と同じく 3 者複合体構造を形成していることを確認している<sup>11</sup>。



(a)



(b)

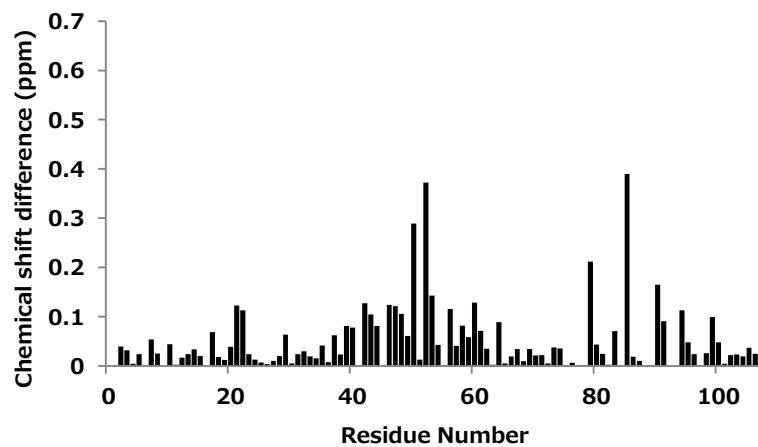


Figure 2-18. (a) Overlay of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of isolated FKBP12 (black) and the FKBP12-FRB fusion protein (red) in the presence of rapamycin. (b) Chemical shift difference of the FKBP12 residues between the isolated FKBP12 and FKBP12-FRB fusion protein in the presence of rapamycin.

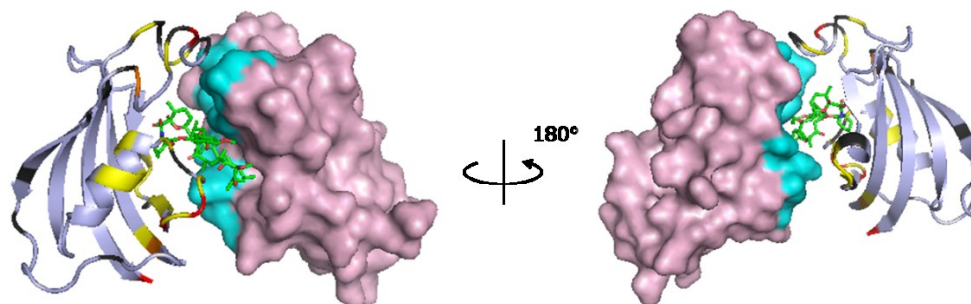


Figure 2-19. The FKBP12 residues shifted upon fusion with FRB domain in the presence of rapamycin were mapped on the crystal structure (1NSG) of the FKBP12–FRB–rapamycin ternary complex. Red represents chemical shift differences  $> 0.3$  ppm, orange of 0.2 and yellow of 0.1 ppm, and black represents Pro or missing residues. FKBP12 was shown in ribbon, FRB in surface and rapamycin in stick. FRB residues in contact with FKBP12 in the crystal structure of the FKBP12–FRB–rapamycin ternary complex<sup>44</sup> were colored cyan.

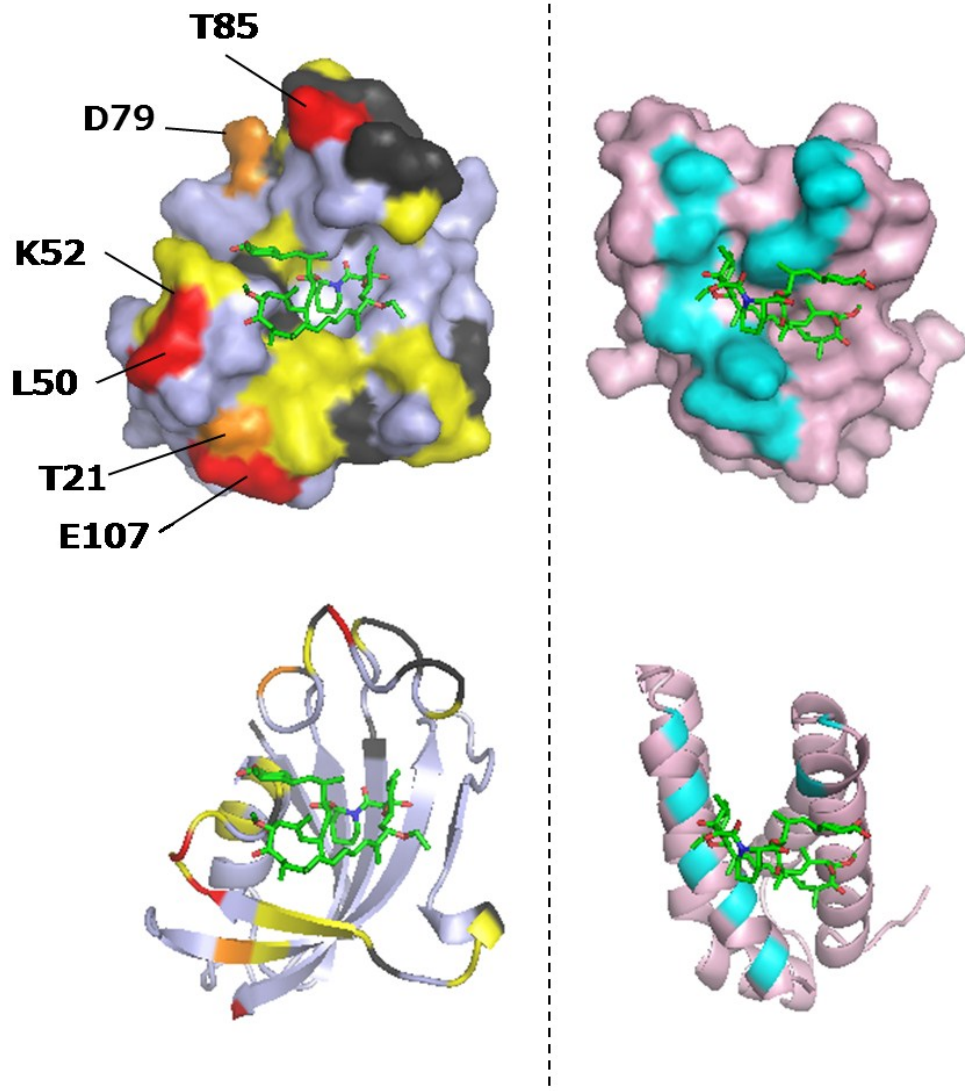


Figure 2-20. Open-book representation of Figure 2-19.

#### 第四節 まとめ

抗がん剤の創薬をめざし、ligand が FKBP12 に結合した後に、mTOR に結合するか否かを判別する物理化学的なスクリーニング方法の確立を目指した。mTOR FRB ドメインだけでは不安定であったことから、FKBP12 や FKBP38 PPI ドメインを FRB の N 端に融合させることでタンパク質の安定性と溶解性向上に成功した。続いて DSC, NMR を用いた相互作用解析実験より、FK506 は FKBP12 のみに結合すること、rapamycin は FKBP12 及び mTOR FRB と 3 者複合体を形成することを DSC からはタンパク質のドメインレベルで、NMR からはアミノ酸レベルでそれぞれ評価を可能にした。また、FKBP38-FRB との比較により、FKBP12 と FRB のタンパク質間相互作用は rapamycin 共存下で初めて形成されることも分かった。

これら融合タンパク質を用いることで FKBP12 依存的な mTOR 阻害剤と FKBP12 非依存的な mTOR 阻害剤の探索を 1 度の実験で判別することが可能となった。

## 第二章

# 酵素誘導を担うタンパク質 PXR とリガンドの創薬加速化を 目指した熱分析評価法の確立

## 第一節 序論

チトクローム P450(CYP)3A は薬物代謝や解毒作用に重要な役割を果たす。一般的に細胞が生体異物の刺激を受けると、化学的対処するタンパク質が誘導される。PXR は核内受容体の 1 つで CYP3A の転写活性化を制御し、また多くの様々な構造を有する CYP3A 誘導活性化化合物によって活性化される<sup>50-55</sup>。

PXR は N 端に DNA 結合ドメイン(DBD)、C 端側に ligand 結合ドメイン(LBD)を有する。これは CAR、AR、ER、PPAR などといった他の核内受容体と同じ特徴を有している<sup>55,56</sup>。Ligand 結合ドメインに ligand が結合すると PXR は Hsp90 から遊離され、核内受容体の 1 つである RXR や核内受容体スーパーファミリーの 1 つである SRC1 と活性型の複合体を形成する(Figure 3-1)。活性型複合体は CYP3A 遺伝子のプロモーター領域にある XRE に結合し、CYP3A 遺伝子を活性化し、CYP3A タンパク質の発現を誘導する(Figure 3-2)。よって PXR の LBD への ligand の結合能力を評価することは CYP3A の誘導、つまり薬の代謝を理解する上で必要不可欠な要素である。

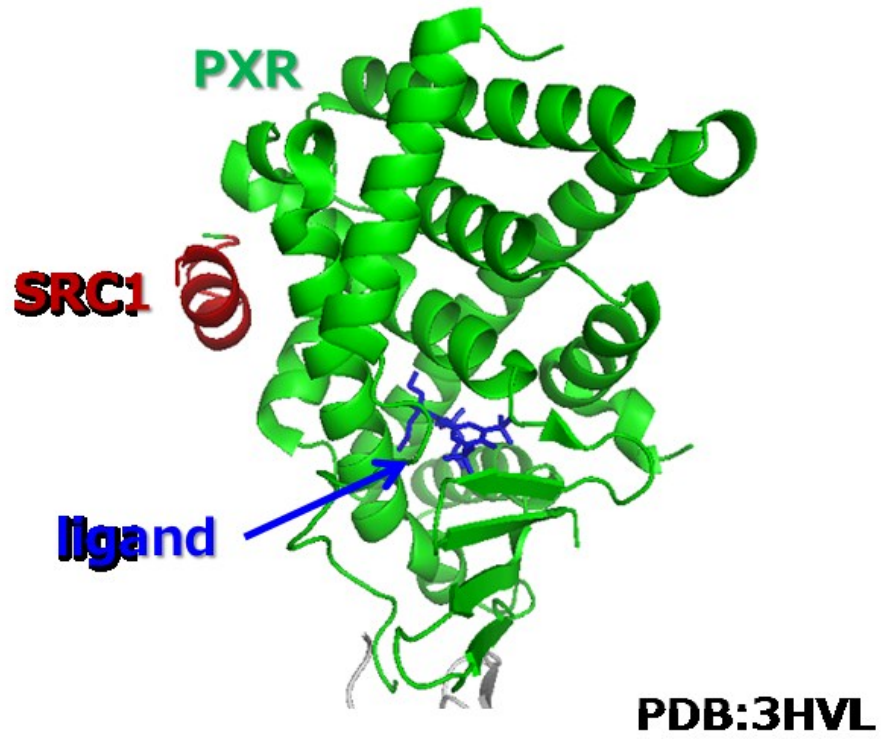


Figure 3-1. Complex structure of PXR, SRC1, and ligand (3HVL).

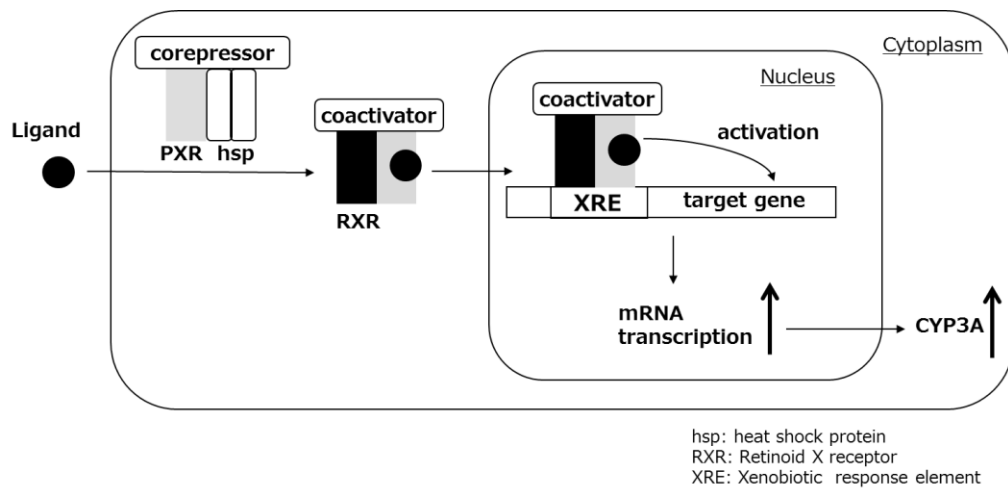


Figure 3-2. Schematic representation of PXR activation. A ligand associate with PCR LBD , PXR is released from heat shock protein 90 (HSP90) and is activated by forming a complex with the retinoid X receptor (RXR) and another member of the nuclear receptor superfamily such as steroid receptor coactivator 1 (SRC1). The activated form of PXR then binds to a xenobiotic response element (XRE) located in the promoter region of the target CYP3A gene, thereby regulating transcription.



Reporter gene assay は CYP3A の酵素誘導を評価するのに一般的に使用されており、高いスループットで医薬品候補化合物のスクリーニングも可能である (Figure 3-3)<sup>57-59</sup>。しかし、この reporter gene assay の使用は限られている部分がある。例えば殺細胞活性を有する化合物はヒト由来細胞に毒性があるため正しい評価が困難であることや、溶解性が悪い化合物や膜透過性が悪い化合物も濃い濃度においては正しい評価は困難である。さらに reporter gene assay では最終的には遺伝子の増強を検出しており、PXR への直接的な結合を評価しているのではないため、PXR への構造活性相関研究には直接的には利用できない。

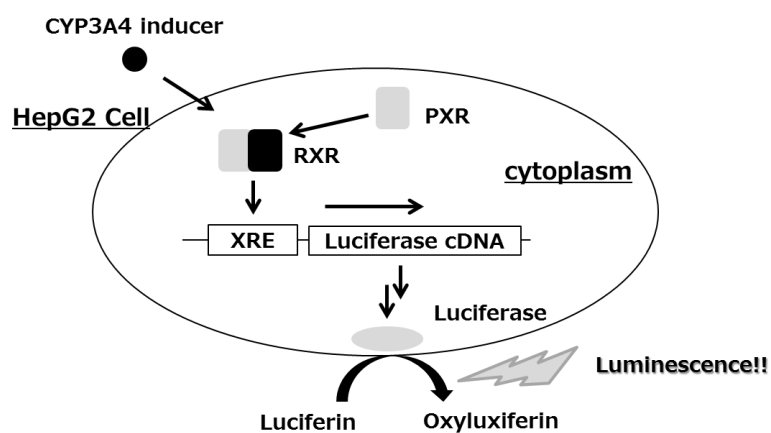


Figure 3-3. PXR reporter gene assay. HepG2 cells are co-transfected with PXR expression plasmid and CYP3A4 reporter plasmid. CYP3A4 inducer binds and activates the expressed human PXR, which in turn binds to XRE in the reporter construct and activates the transcription of reporter gene luciferase. The production of luciferase activity, determined by luciferase assay, represents the PXR activation by inducer.

第一章でも述べたように、一般的に DSC においてはタンパク質の熱変性の際のアンフォールディングを評価するため、タンパク質の熱安定性評価に使用される<sup>21</sup>。また、リガンドが結合すると熱変性中点 ( $T_m$ ) はリガンドが非共存状態より上昇する。そのため、タンパク質のリガンド結合能評価にも使用される<sup>22</sup>。一方、DSF においては DSC 同様に昇温過程におけるタンパク質のアンフォールディングを観測するが、その検出方法が異なる。DSF においては、蛍光色素を用いてアンフォールディングの際の疎水性面の露出を検出する。本方法は DSC と比較してスループットが高く、測定に必要なタンパク質量が少ないことが特徴である。一方で PXR のような大きい疎水性のポケットを有するタンパク質への利用は困難である。それは温度上昇に伴い蛍光強度が減少し、ligand の結合による正しい  $\Delta T_m$  の検出が難しいからである。

そこで、熱分析を利用した PXR と ligand の相互作用解析を利用した新しいスクリーニング方法を開発した。熱分析としては DSF を利用し、その解析のために新しいパラメータとして  $(dF/dT)_{50}$  ( $F$  は蛍光強度、 $T$  は温度) を定義し、これを利用する方法を確立した。 $(dF/dT)_{50}$  は単位温度変化あたりの蛍光強度変化が初期値と比較して半分になった際の ligand 濃度を意味する。この値と reporter gene assay で得られた  $EC_{50}$  を比較すると、良い相関が得られた。本章では PXR タンパク質の作成と作成タンパク質の評価、熱分析、reporter gene assay の結果との比較について記載する。

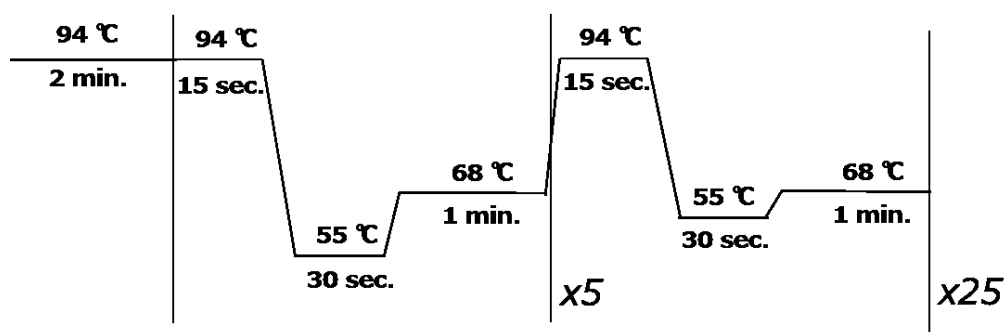
## 第二節 実験項

### PXR-SRC1 融合タンパク質の作成

#### 1) plasmid の作成

ヒト PXR(130-434)の核酸配列がコードされた断片に対して forward primer PXR-f (5' - CCTCTAGACATATGAGTGAACGGACAGGGACTCAGCCACT GGG - 3')と reverse primer PXR-r (5' - AGAGGTACCGCTACCTGTGATACCG AACAAC - 3')を作成し (Invitrogen)、PCR を実施した。PCR は 2 mM dNTPs を 5  $\mu$ L、25 mM MgSO<sub>4</sub> を 2  $\mu$ L、KOD -Plus- buffer を 5  $\mu$ L、Primer (PXR-f, PXR-r) を各 1  $\mu$ L、template の DNA を 1  $\mu$ L、KOD -Plus- DNA polymerase を 1  $\mu$ L および滅菌水を 26  $\mu$ L 加え、全体を 50  $\mu$ L として下記に示す cycle を実施した。

-PCR cycle-



増幅された断片については QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit を用いて精製した後に制限酵素 *Nde* I , *Kpn* I を処理し末端を切断した。Linker (GSSGSSSG)と SRC1(678-710)については forward primer SRC-f (5' - CGGGGTACCGGCT CGAGTGGTAGCTCTAGCGGGTCTTCTCATAGCTCATTGACAGAACG - 3')と reverse primer SRC-r (5' - CACTTTGTCTGTGCGAGCCTGATTAATCTCGA GCGG - 3')を用いて上記同様の条件、サイクルで PCR を実施した。増幅された断片については、QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit を用いて精製した後に制限

酵素 *Kpn* I、*Xho* I で処理した。得られた 2 つの断片 (PXR と linker-SRC1) については Ligation high version 2 を用いて ligation を実施した。続いて PXR-f と SRC-r を用いて上記の条件、サイクルで PCR を実施し、同様に QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit で精製した。PCR 産物は *Nde* I、*Xho* I にて処理された pGBHPS ベクターと ligation high version 2 を用いて ligation を実施した。得られた反応物は 大腸菌 DH-5  $\alpha$  competent cell に形質転換した。形質転換、コロニー PCR、plasmid の作成、DNA シークエンスの確認を実施し、その方法については第一章と同様に実施し、PXR-SRC1 の plasmid を得た。

## 2) 培養

plasmid は 大腸菌 competent cell Rosetta2 (DE3) に形質転換し 2xYT 培地プレート (ampicillin 0.5 %) にて一晩 37 °C で培養した後、得られたコロニーをピックアップし 2x YT 培地 (ampicillin 0.5 %) にて一晩 37 °C で振とう培養した。菌体は 900 mL にスケールアップし、37 °C で 4 時間程度培養し、濁度 OD<sub>600</sub> = 0.6~0.7 において IPTG (100 mg/mL) を 1 mL 加えて 16 °C で 24 時間振とう培養した。培養後 4 °C、20 分間、4000 rpm で遠心を実施し菌体を回収した。

## 3) タンパク質の精製

回収した菌体を 40 mL の PBS で懸濁し、4 °C で超音波破碎 (出力 20 %、Output 8、10 分) を行った。破碎液を 4 °C、4000 rpm で 1 時間遠心し上清を回収し、上清に予め PBS で平衡化した Ni-NTA Superflow を 5 mL (50 % スラリー) 加えて目的タンパク質を吸着させた。50 mL x 3 の wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole) で非特異吸着を除いた後、10 mL の elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazole) で目的タンパク質を溶出した。続いて 20  $\mu$ L の PreScission protease を加え 4 °C で 16

時間インキュベートして N 末端側の GB1 を切断した。切断後、サンプルは Hiload 16/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。その際 buffer は PBS added 5 % glycerol を用いた。最終的には SDS-PAGE で目的物の発現を確認し、濃度は Nano Drop で確認した。タンパク質の収量は 10 mg / 900 mL であった。

#### 4) LC/MS の測定条件

装置は Hclass 付属 Synapt G2 HD-MS (Waters)を使用した。測定の際のカラムは MS PREP desalting column (Waters)、流速は 0.5 mL/min、移動相は A 液: 0.1 % ギ酸含有 H<sub>2</sub>O 溶液、B 液: 0.1 % ギ酸含有 CH<sub>3</sub>CN 溶液をグラジエント B: 5 %→95 % (10 分) で溶出させた。MS (ESI) の測定は positive, sensitive mode で実施した。

#### 5) ITC の測定条件

装置は Auto-iTC200 (GE Healthcare)を使用した。測定の際の溶媒は PBS, 5% glycerol, 5% DMSO を用い、測定前に脱気を実施した。reference cell には Milli-Q 水を充填させた。測定は 25 °C で行い、ligand の滴定は 4 μL ずつ 20 回行い滴定の間隔は 4 分とした。滴定の間滴定シリンジは 1000 rpm で回転させ攪拌した。データの解析は Origin 7.0 software (Origin Lab)を用いた。

#### 6) SPR の測定条件

装置は Biacore A100 (GE Healthcare)を使用した。PXR-SRC1 はアミンカップリング試薬 (Amine Coupling kit, type 2 BR-1006-33, GE Healthcare)を用いてチップ CM5 (GE Healthcare)に固定化した。固定化後、移動相は 10% DMSO が含有した HBS-N buffer (GE Healthcare)で送液し、タンパク質濃度は 20 μM、リ

バンドは 10, 30, 100, 300, 1000  $\mu\text{M}$  で行った。解析は解析専用ソフトウェア Biacore A100 Evaluation (GE Healthcare)で実施した。

#### 7) DSC の測定条件

DSC は VP-DSC (GE Healthcare)を使用した。昇温速度は  $1^\circ\text{C}$  /分とし、 $20^\circ\text{C}$  から  $80^\circ\text{C}$  まで測定した。測定の際のタンパク質濃度は  $30 \mu\text{M}$ 、リガンド濃度は  $500 \mu\text{M}$  で実施。バッファーは PBS, 5 % glycerol に 5 % DMSO を加えて実施した。解析はソフトウェア Origin 7.0 (Origin Lab)を使用した。

#### 8) DSF の測定条件

装置は StepOne Plus (Applied Biosystems)を使用した。全ての測定においてタンパク質 PXR-SRC1 の濃度は  $1 \mu\text{M}$  で測定し、ligand の濃度は 0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 200, 400,  $1000 \mu\text{M}$  で実施した(高濃度は必要な際に実施)。測定溶媒は PBS, 5 % glycerol, 5 % DMSO に 1000 倍希釈した Protein Thermal Shift Dye (Applied Biosystems)を加えた。測定は  $25^\circ\text{C}$  から  $95^\circ\text{C}$  までを昇温速度  $1.75^\circ\text{C}$  /分で行った。測定データの解析は Thermal shift software (Applied Biosystems)で行い、データの表示は Microsoft Excel (Microsoft)を用いて行った。

#### 9) 結合評価実験に用いた化合物について

SR-12813、Hyperforin は Enzo Life Sciences より購入した

Rifabutin は SEQUOIA より購入した

Felodipine、Nifedipine、troleandomycin、Verapamil、Phenylbutazone、Phenytoin、PCN、Naproxen、Diclofenac、Quercetin、Furosemide、Nadolol、Chlorpromazine は Sigma-Aldrich より購入した

Nicardipine、Rifampicin、Ticlopidine、Omeprazole、Phenobarbital、

Theophylline、Caffeine、Atenolol は和光純薬工業株式会社より購入した

Ritonavir、Carbamazepine は Toronto research chemical Inc.より購入した

Lansoprazole は LKT Laboratories Inc.より購入した

Dexamethasone は PerkinElmer より購入した

Pioglitazone はフナコシ株式会社より購入した

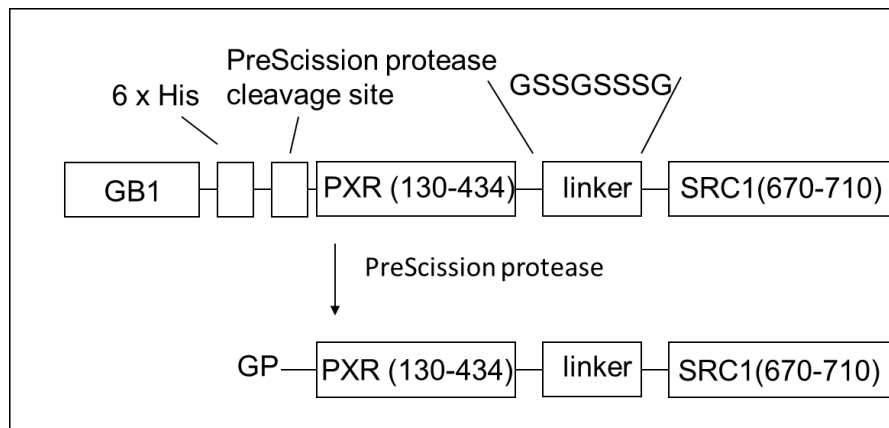
### 第三節 結果

#### 1) PXR-SRC1 タンパク質のデザイン、発現、精製

PXR LBD は非常に大きく伸縮性のある疎水性のポケットを有しているため、PXR LBD タンパク質単独では不安定であることが知られている<sup>60-62</sup>。PXR が様々な ligand と相互作用するのはこの特徴のためである。LxxLL モチーフ(x は任意のアミノ酸)を有する SRC1 は PXR の LBD の表面に結合することが知られており、この結合によって PXR の LBD の構造的な揺らぎが抑えられる。コレステロールを下げる化合物として知られている SR12813<sup>63</sup> はヒトとラビットの PXR の有効な活性化剤としても知られている<sup>61</sup>。SR12813 は SRC1 非共存下では幾つかの配向での X 線結晶構造が得られているが<sup>60</sup>、SRC1 共存下では1つの配向の結晶構造しか得られていない<sup>65</sup>。つまり、SRC1 が構造の揺らぎを抑えることがこの結果から示唆されている。また、最近になって PXR と SRC1 が融合したコンストラクトが安定であり、ligand との結合実験に有用であることが示された<sup>66,67</sup>。そこで、物理化学的な評価のために PXR LBD (130-434) と linker (10 アミノ酸) と SRC1 (678-710) を連結させた融合タンパク質を作成することにした。融合タンパク質(以後 PXR-SRC1)の発現は N 端側に GB1 および His-tag を結合させた形で大腸菌を用いて実施した(Figure 3-4(a))。発現されたタンパク質は破碎後上清より得られ、Ni-NTA を用いて精製した後、Precision protease を用いて GB1 と His-tag を PXR-SRC1 から切断した。続いてゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて精製し単離した(Figure 3-4(b))。PXR-SRC1 融合タンパク質は SDS-PAGE 上で 1 つのバンドとして得られていることを確認し、MS を用いて目的分子量も確認した。収量は培養量 1 L あたり 10 mg 程度であり、ITC, DSC, DSF などの物理化学的な分析を行うのに十分な量が得られた。



(a)



(b)

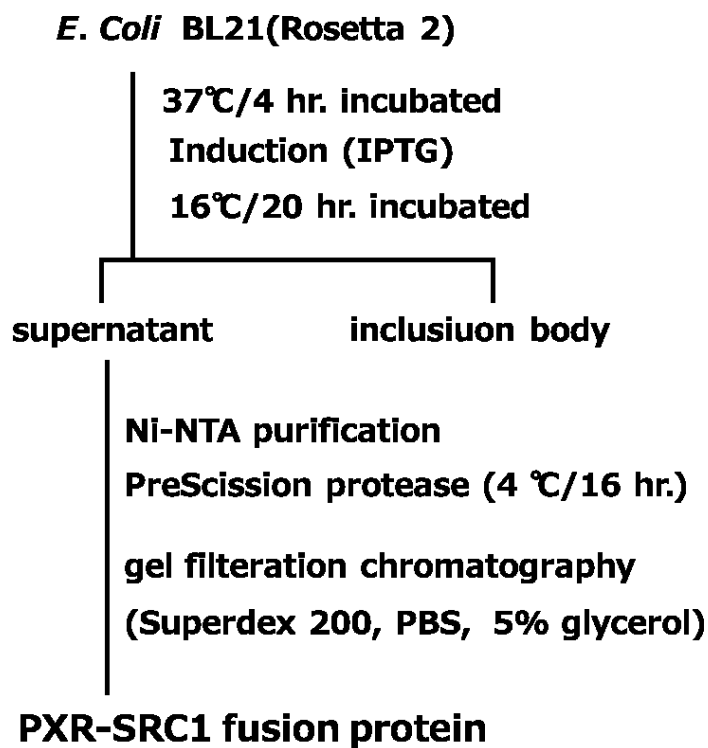


Figure 3-4 (a) Construct of PXR-SRC1 fusion protein. (b) Purification scheme of PXR-SRC1 fusion protein

## 2) PXR-SRC1 と SR12813 の ITC, DSC, DSF を用いた結合解析

融合タンパク質 PXR-SRC1 の結合活性を調べるために、SR12813 との ITC 測定を 3 つの温度 15 °C、25 °C、37 °C で実施した(Figure 3-5)。その結果、PXR-SRC1 と SR12813 の結合比は約 0.9 となり、PXR-SRC1 融合タンパク質 1 つに対して 1 つの SR-12813 が結合していることが明らかになった。解離定数 (Kd)は温度 15 °C、25 °C、37 °Cにおいてそれぞれ 0.41  $\mu$ M, 0.67  $\mu$ M, 0.90  $\mu$ M であった(Table 3-1)。この解離定数より $\Delta C_p$ は-0.13 cal/molとなり、 $\Delta C_p$ が小さいことから結合の際に大きな構造変化は起こっていないことが推測された。これら ITC の結果より、PXR-SRC1 は正しく発現されたとし、DSC や DSF を用いた相互作用解析実験に用いることが可能と判断した。

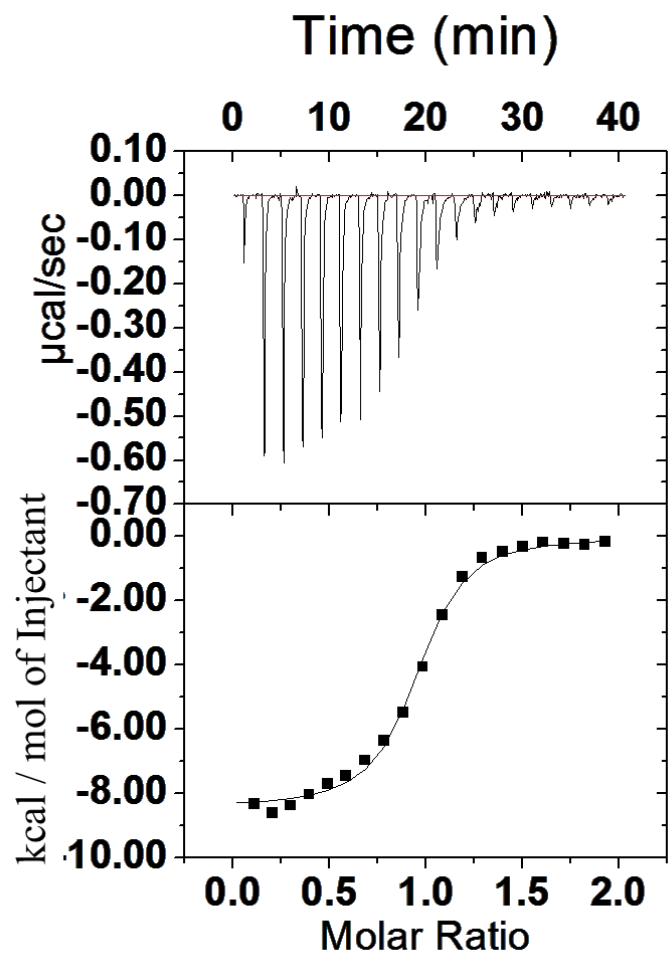


Figure 3-5. Calorimetric titrations (upper panel) and resulting integrated binding isotherms (lower panel) of the association between SR12813 and PXR-SRC1 at 25 °C.

Table 3-1. ITC analysis of the association between PXR-SRC1 and SR12813 at three temperatures (15, 25, 37°C).

Temp (°C).	dG (kcal/mol)	dH (kcal/mol)	-TdS (kcal/mol)	$K_d$ ( $\mu$ M)	stoichiometry
15	-8.5	-6.0	-2.5	0.41	0.92
25	-8.4	-8.2	-0.2	0.67	0.91
37	-8.6	-8.9	0.3	0.90	0.93

次に DSC の測定を実施した。Ligand 非共存下では PXR-SRC1 (30  $\mu\text{M}$ ) の  $T_m$  は 52.6  $^{\circ}\text{C}$  で観測された。一方、様々な濃度の SR12813 (30, 100, 300, 500  $\mu\text{M}$ ) を加えたところ、SR12813 非共存下と比較して  $\Delta T_m$  はそれぞれ 7.7、9.2、9.7、9.8、9.6 $^{\circ}\text{C}$  となり (Figure 3-6)、SR12813 の増加とともに濃度依存的に  $\Delta T_m$  の上昇が認められた (Table 3-2)。

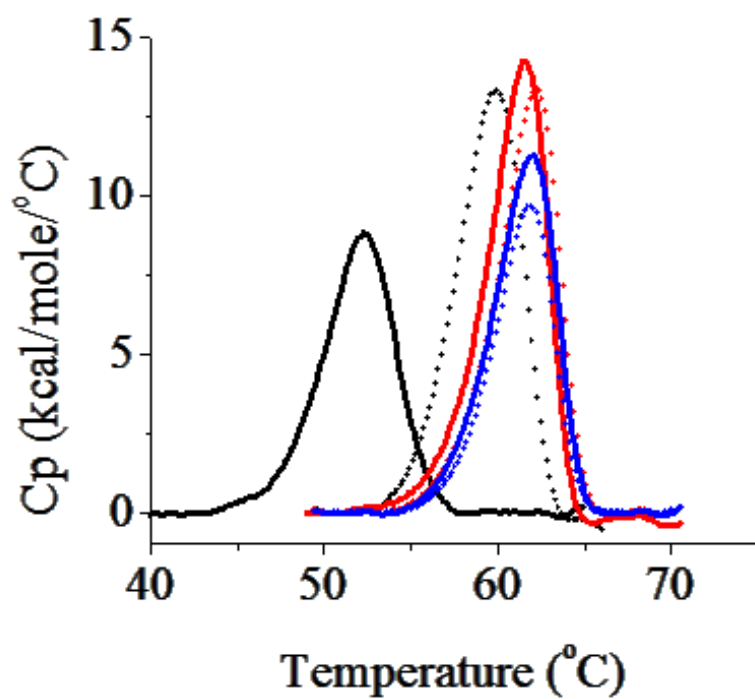


Figure 3-6. Heat capacity curves measured by DSC for PXR-SRC1 at different SR12813 concentrations: 0  $\mu\text{M}$  (black straight), 30  $\mu\text{M}$  (black dot), 100  $\mu\text{M}$  (red straight), 300  $\mu\text{M}$  (red dot), 500  $\mu\text{M}$  (blue straight) and 1 mM (blue dot).

Table 3-2.  $T_m$  shift values of DSC at different SR12813 concentrations.

ligand concentration ( $\mu\text{M}$ )	30	100	300	500	1000
$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	7.7	9.2	9.7	9.8	9.6

さらに融合タンパク質 PXR-SRC1 の DSF 測定を実施した。SR12813 非共存下において蛍光強度が高い数値から始まり、融合タンパク質のアンフォールディングと共に蛍光強度が低下することが観測された (Figure 3-7)。一方で SR12813 の濃度を増やしていくと、初期の蛍光強度の低下が認められ、高濃度になるとさらにアンフォールディングの際の蛍光強度上昇が認められるようになった。これらの結果より、用いた蛍光試薬 Protein Thermal Shift Dye が PXR-SRC1 と大きな疎水性のポケットで相互作用していることが示唆された。そこで、Dye 共存下で DSC 測定を実施し、相互作用の有無を検討した。Dye を 1000 倍および 300 倍希釈で PXR-SRC1 (30  $\mu$ M) の DSC 測定を実施すると  $T_m$  は 53.1 $^{\circ}$ C および 53.4 $^{\circ}$ C に観測された (Figure 3-8)。これらの値は PXR-SRC1 単独の値 52.6 $^{\circ}$ C と比較して若干高かった。さらに、PXR-SRC1 に SR12813 共存下で DSC を測定すると  $T_m$  62.0 $^{\circ}$ C であったのに対して、さらに Dye を 300 倍および 100 倍希釈で追加して測定すると  $T_m$  はそれぞれ 61.2 $^{\circ}$ C と 60.0 $^{\circ}$ C と低下した (Figure 3-9)。これより Dye は PXR-SRC1 と相互作用し、その相互作用部位は SR12813 と同じポケットつまり疎水性の大きなポケットであることがわかった。



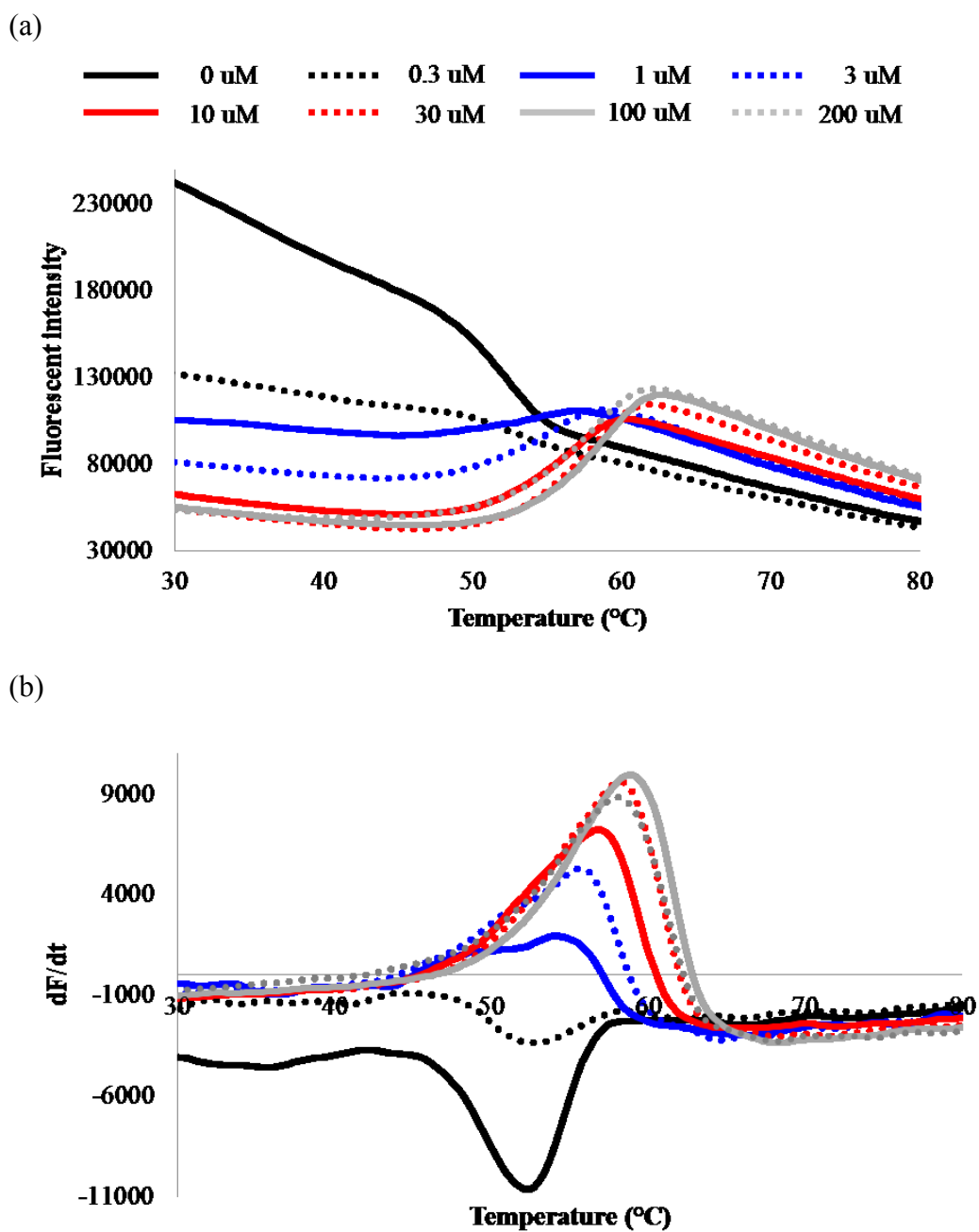


Figure 3-7. DSF at 1  $\mu\text{M}$  PXR-SRC1 and different concentrations of SR12813: 0  $\mu\text{M}$  (black straight), 0.3  $\mu\text{M}$  (black dot), 1  $\mu\text{M}$  (blue straight), 3  $\mu\text{M}$  (blue dot), 10  $\mu\text{M}$  (red straight), 30  $\mu\text{M}$  (red dot), 100  $\mu\text{M}$  (gray straight), and 200  $\mu\text{M}$  (gray dot). (a) Fluorescent intensities (b) the derivative of the fluorescent intensities (dF/dT).

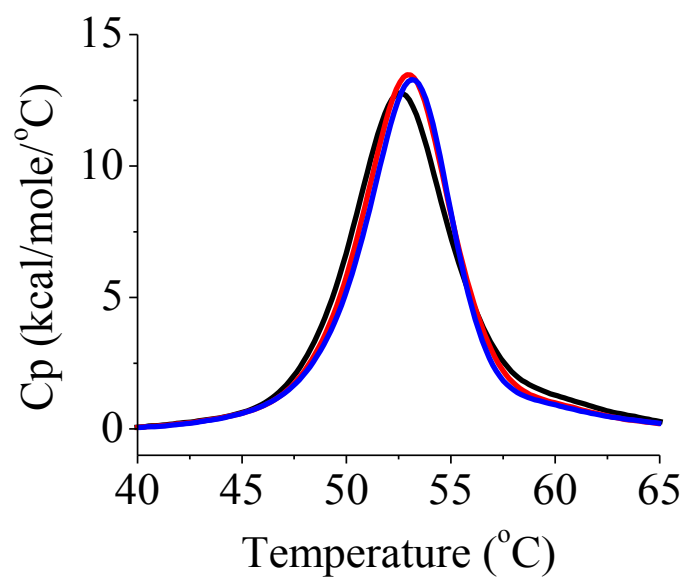


Figure 3-8. Heat capacity curves obtained by DSC. Curves were measured for PXR without ligand (black) or in the presence of Protein Thermal shift™ Dye diluted 1000 (red) or 300 (blue) times.

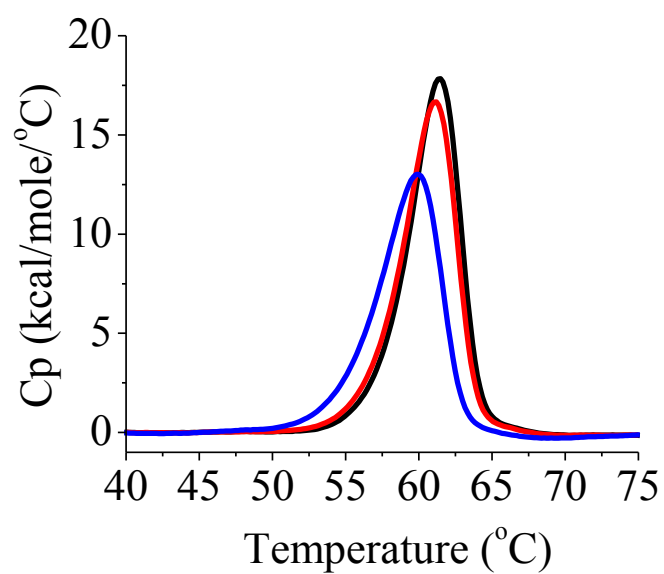
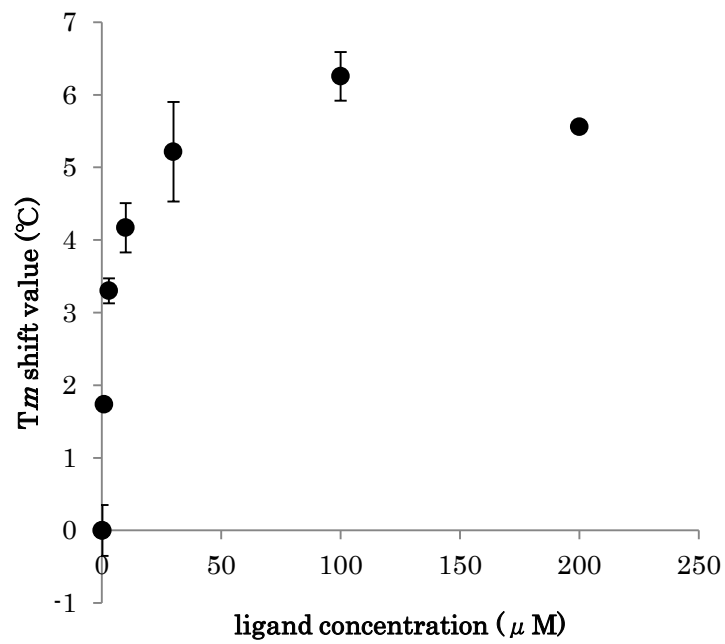


Figure 3-9. Heat capacity curves obtained by DSC. Curves were measured for PXR with SR128131 (black) or in the presence of Protein Thermal shift™ Dye diluted 300 (red) or 100 (blue) times.

DSF 測定において、 $\Delta T_m$  は SR12813 濃度を 0.3, 1, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{M}$  と上げていくと 0, 1.8, 3.3, 4.2, 5.2, 6.3  $^{\circ}\text{C}$  と濃度依存的に上昇していることが観測された。この  $\Delta T_m$  は DSC の  $\Delta T_m$  より小さく、これは Protein Thermal shift Dye が SR12813 と競合しているためであると推測される (Figure 3-10(a))。そこで、 $\Delta T_m$  ではなく、蛍光強度変化に着目した。蛍光強度の温度変化当たりの変化量の最大値  $dF/dT$  は濃度 0.3, 1, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{M}$  において初期値を 1 とすると 0.42, -0.23, -0.59, -0.77, -0.80, -0.81 となった。 $dF/dT$  が初期値と比較して半分になるときの濃度を  $(dF/dT)_{50}$  と定義するとその濃度は 0.4  $\mu\text{M}$  となった (Figure 3-10(b))。

一方、PXR-SRC1 と SR-12813 の Biacore A100 を用いた SPR 実験も検討したが、非特異的吸着が観測されたため特異的な相互作用の検出は困難と判断した。

(a)



(b)

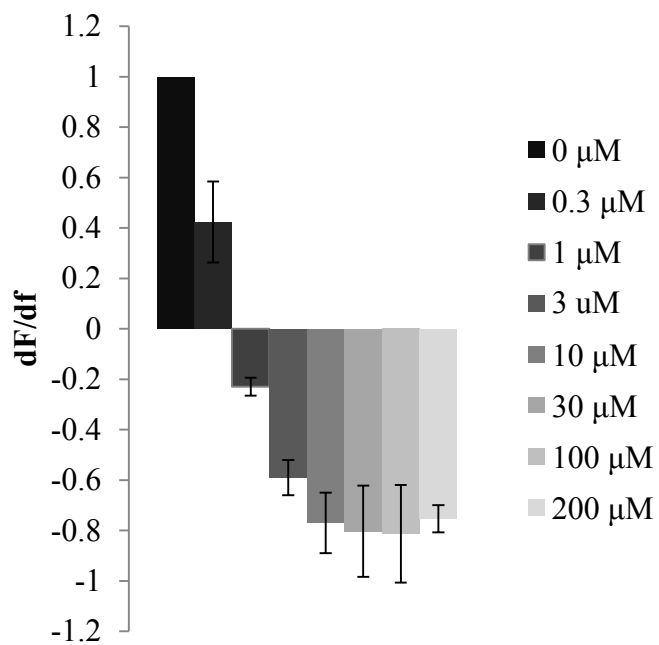


Figure 3-10. DSF at 1  $\mu\text{M}$  PXR-SRC1 and different concentrations of SR12813:  $\Delta T_m$  (a) and  $dF/dT$  (b) are plotted against the SR12813 concentration.

### 3) DSC と DSF を用いた 29 化合物の相互作用解析

PXR-SRC1 に対して 29 個の異なる ligand について DSF と DSC を用いた相互作用解析を実施した。29 化合物は論文上<sup>64,68-71</sup>で reporter gene assay のデータがあるものを選択した。誘導能の強い ( $EC_{50} < 10 \mu\text{M}$ ) 化合物として SR12813, hyperforin, rifabutin, felodipine, nicardipine, rifampicin, ritonavir, nifedipine, troleandomycin, lansoprazole, verapamil を選択した。続いて誘導能が中程度 ( $10 \mu\text{M} < EC_{50} < 1000 \mu\text{M}$ ) の化合物としては ticlopidine, omeprazole, phenylbutazone, phenytoin, carbamazepine, dexamethasone, phenobarbital を選択した。一方で誘導能があるが細胞毒性や溶解性の問題により濃度が測定できない化合物としては PCN, pioglitazone, naproxen, theophylline, caffeine, diclofenac を選択し、誘導能がない化合物としては quercetin, furosemide, nadolol, atenolol, chlorpromazine を選択した (Figure 3-11)。

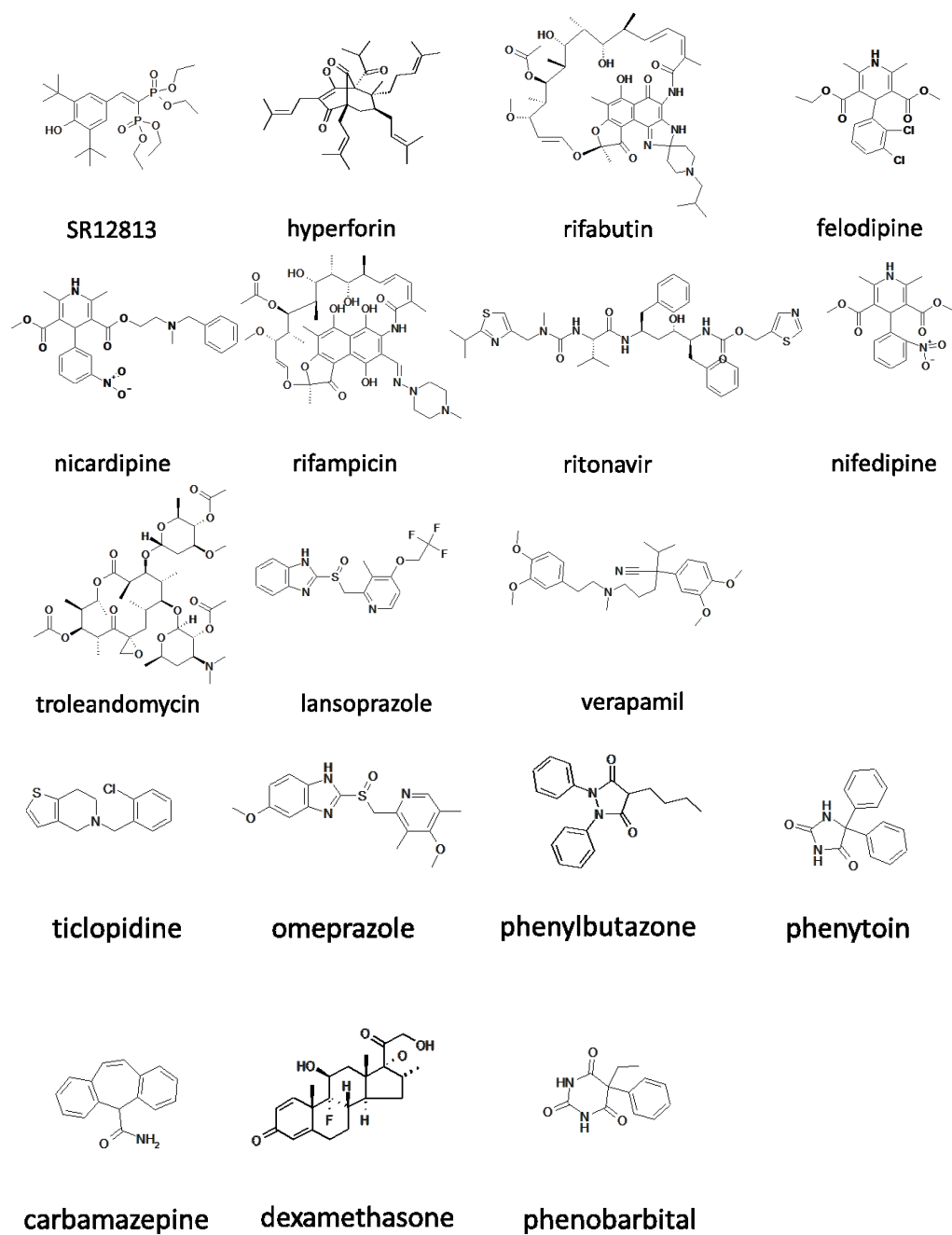
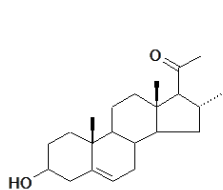
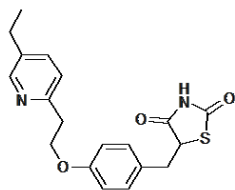


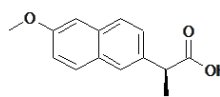
Figure 3-11. Structures of 29 compounds measured by DSC and DSF.



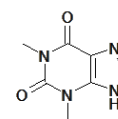
**PCN**



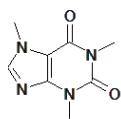
**pioglitazone**



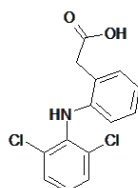
**naproxen**



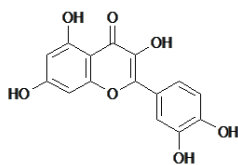
**theophylline**



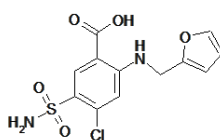
**caffeine**



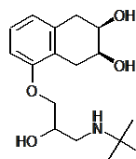
**diclofenac**



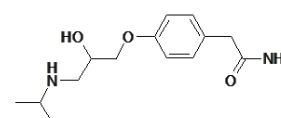
**quercetin**



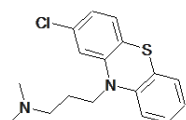
**furosemide**



**nadolol**



**atenolol**



**chlorpromazine**

Figure 3-11. Continued (Structures of 29 compounds measured by DSC and DSF.)



最初に DSC 測定を実施した。Rifampicin を加えると  $T_m$  は 52.6 °C から 58.2 °C に上昇し、これはリガンド相互作用によって PXR-SRC1 の熱安定性が上昇したためであると考えられる。続いて phenytoin を加えると  $T_m$  は 54.3 °C に上昇し、この  $T_m$  上昇値は SR12813 や rifampicin より低いことからアフィニティは比較的弱いと推測される。続いて nanodol や caffeine を加えたところ、 $T_m$  シフトは観測されなかった。このことより nanodol や caffeine は PXR-SRC1 と相互作用しないと推測された。同様にして 29 個の化合物の測定を実施した (Table 3-3)。

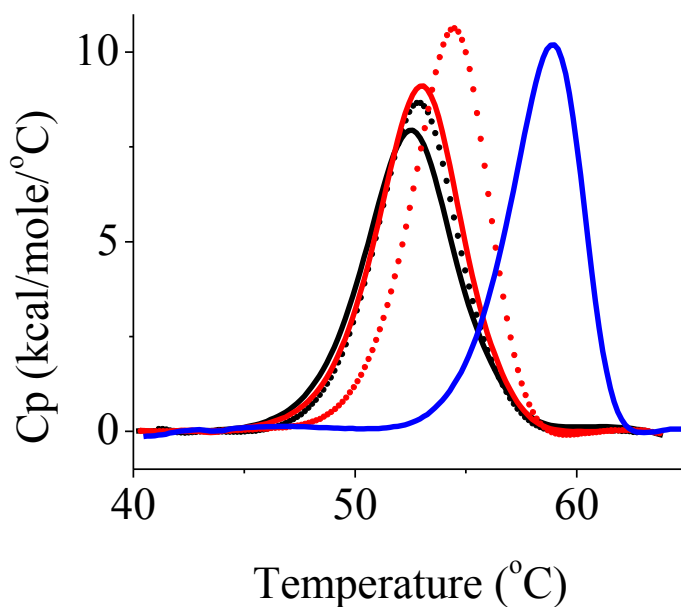


Figure 3-12. Heat capacity curve obtained by DSC. All scans were measured with 30  $\mu$ M PXR-SRC1 and 500  $\mu$ M of phenobarbital (black dot), PCN (red straight), phenytoin (red dot), and rifampicin (blue straight), or no ligand (black straight).

続いて DSF の測定を検討した。 $\Delta T_m$  と  $(dF/dT)_{50}$  の値の検出を試みたが、 $\Delta T_m$  については弱い相互作用を有すると考えられる化合物はほとんど動かかなくなった。一方で、 $(dF/dT)_{50}$  の値は 29 個の化合物すべてについて値を求めることが可能であった。例えば、nifedipine を 0, 0.3, 10, 30, 100, 200  $\mu\text{M}$  と加えていくと  $dF/dT$  の値は、それぞれ 1, 1.28, 1.63, 1.15, 0.85, 0.44, 0.26, 0.15 と変化し、この変化から  $(dF/dT)_{50}$  の値を求めると 27  $\mu\text{M}$  と算出された。同様にして nicardipine、ticlopidine、phenytoin、PCN の  $(dF/dT)_{50}$  値はそれぞれ 0.92, 46, 240, 290  $\mu\text{M}$  と算出された (Figure 3-13)。Table 3-3 には 29 個の化合物全ての測定結果を示す。

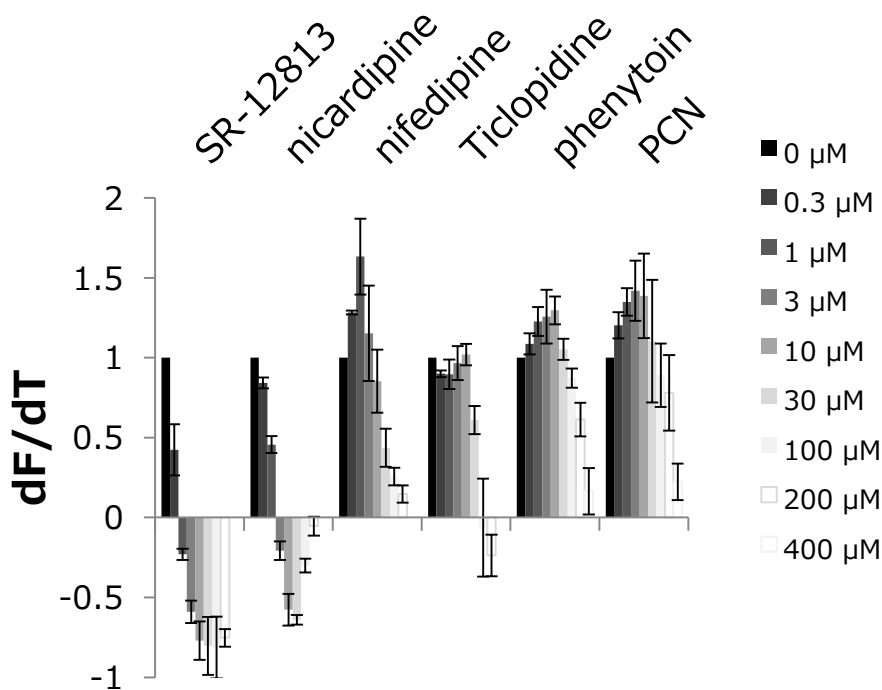


Figure 3-13.  $dF/dT$  values obtained by DSF and plotted against different ligand concentrations.

Table 3-3. Summary of DSC, DSF, and reporter gene assay data of 29 compounds.

	DSC	DSF		reporter gene assays	
	$\Delta T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	(dF/dT) <sub>50</sub> (μM)	EC <sub>50</sub> (μM)	ref No.
SR12813	8.8	5.9	0.4	0.1	68
Hyperforin	9.4	3.1	0.5	0.2	68
Rifabutin	6.8	3.8	9.2	0.2	64
Felodipine	5.8	3.5	1.9	0.3	64
Nicardipine	5.8	3.5	0.9	0.4	64
Rifampicin	5.5	2.5	21.6	0.7	68
Ritonavir	6.6	3.1	1.9	1.4	69
Nifedipine	3.8	-1.0	26.6	2.0	69
Troleandomycin	3.4	2.8	18.3	5.0	69
Lansoprazole	1.9	1.0	32.3	6.5	64
Verapamil	2.5	0.7	68.9	9.5	64
Ticlopidine	2.6	0.7	45.8	13.1	70
Omeprazole	2.9	0.4	110.8	21.0	64
Phenylbutazone	2.2	-0.4	79.1	36.0	64
Phenytoin	2.0	0.3	240.1	45.0	64
Carbamazepine	2.0	0	252.2	51.0	69
Dexamethasone	1.2	0	195.8	100.0	69
Phenobarbital	0.5	-0.4	543.6	370.0	71
PCN**	0.5	0	290.3	>10	68
Pioglitazone	1.4	1.4	88.0	>200	64
Naproxen	0.5	-0.3	300.7	>200	64
Theophylline	0.1	0.7	265.6	>200	64
Caffeine	-0.1	0	940.0	>200	64
Diclofenac	1.2	1.7	153.3	>200	64
Quercetin	-0.1	-2.4	87.4	no induction	70
Furosemide	0.4	0	434.2	no induction	70
Nadolol	-0.2	0	953.6	no induction	70
Atenolol	0.0	0	827.3	no induction	70
Chlorpromazine	2.1	-0.4	72.1	no induction	70

\*measured at 200 μM

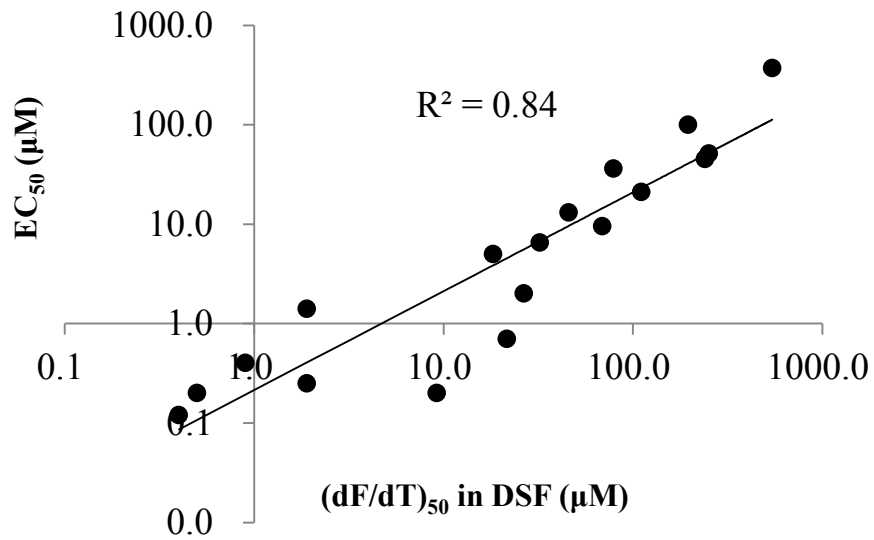
#### 第四節 考察

CYP3A は臨床で使用されている多くの薬物の代謝において大きな役割をし、PXR はその CYP3A の誘導に大きな役割を果たしている。Reporter gene assay は PXR による CYP3A 誘導化の評価に広く使用されている。しかし、この assay は様々な問題を抱えている。それは殺細胞活性のある化合物が測定できないこと、膜透過性、安定性、溶解性が悪い化合物が測定できないことなどである。また、この assay は PXR と薬物の相互作用を直接観測しているわけではないので、検出されている結果が偽陽性である可能性もあり、構造活性相関の検討も難しい。これら様々なデメリットを考慮すると、reporter gene assay ではない他の評価法が必要であると考えられる。そこで熱分析法、DSC、DSF を用いた PXR と薬物の結合評価を実施し、CYP3A の誘導を評価した。

本研究では 29 個の化合物の相互作用解析を実施した。論文上での reporter gene assay の  $EC_{50}$  値と今回得られた DSC の  $T_m$  を比較したところ (Figure 3-14(a))、一部の化合物では誘導能が低いため比較不可能であったが、それ以外の化合物については  $r^2 = 0.86$  と良い相関が得られた。DSC はタンパク質の安定性評価や ligand 相互作用評価の測定においては大いに有用な手法であるが、1 回あたりに必要なタンパク質量は約 10-30  $\mu\text{M}$  (本実験の PXR-SRC1 の場合、換算すると 200 – 600  $\mu\text{g}$ ) と非常に多く、また 1 回あたりの測定時間も 2 時間程度と非常に長い。このことから薬物スクリーニングの一環として利用することは難しく、利用は限定される。一方で、蛍光をベースとした熱分析法である DSF は 1 サンプルあたりに使用されるタンパク質は 1  $\mu\text{M}$  (同様に換算すると 0.4  $\mu\text{g}$ ) と少なく、また 1 回あたりの測定時間は 45 分程度要するが一度に 96 穴や 384 穴などのプレートを利用することが可能であり<sup>24, 72</sup>、高いスループット能を有する。DSF においては、タンパク質疎水性面と相互作用する蛍光試薬の蛍光強度を測定し、その蛍光強度はタンパク質溶液を昇温しアンフォールディン

グさせた際の疎水性面の露出に伴い上昇する。一般的にはその蛍光強度の上昇から  $T_m$  を求め、安定性や ligand との相互作用を評価する<sup>72-75</sup>。しかし、PXR の場合は蛍光試薬である Protein Thermal Shift Dye と ligand が疎水性ポケットで競合しあうため、 $\Delta T_m$  が小さく、検出が困難な化合物も存在した。この問題を打開させるため、 $(dF/dT)_{50}$  の値を活用した。論文情報による reporter gene assay の  $EC_{50}$  と  $(dF/dT)_{50}$  の値を比較すると  $r^2 = 0.84$  と良い相関を示した (Figure 3-14(b))。この値は DSF の  $\Delta T_m$  よりも良い相関 ( $r^2=0.71$ ) を示し (Figure 3-15 (a))、これは比較的弱い結合能の化合物の  $\Delta T_m$  が小さいためであると考えられる。さらに、 $(dF/dT)_{50}$  と DSC の  $\Delta T_m$  の値を比較すると  $r^2 = 0.88$  と非常に良い相関であり (Figure 3-15(b))、DSF と DSC の熱分析測定の相関性の高いことが確認された。一方で、DSC と DSF の  $\Delta T_m$  は、リガンドと Dye が競合するため、 $(dF/dT)_{50}$  よりも相関性は低かった (Figure 3-16)。

(a)



(b)

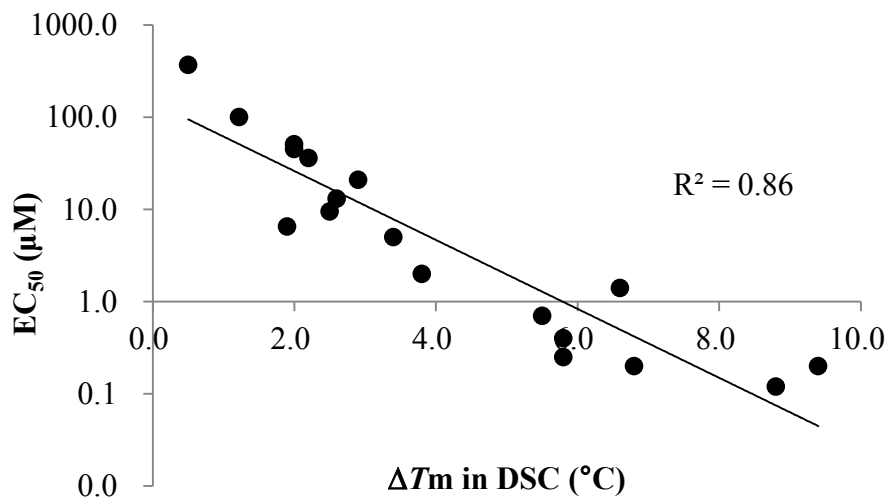
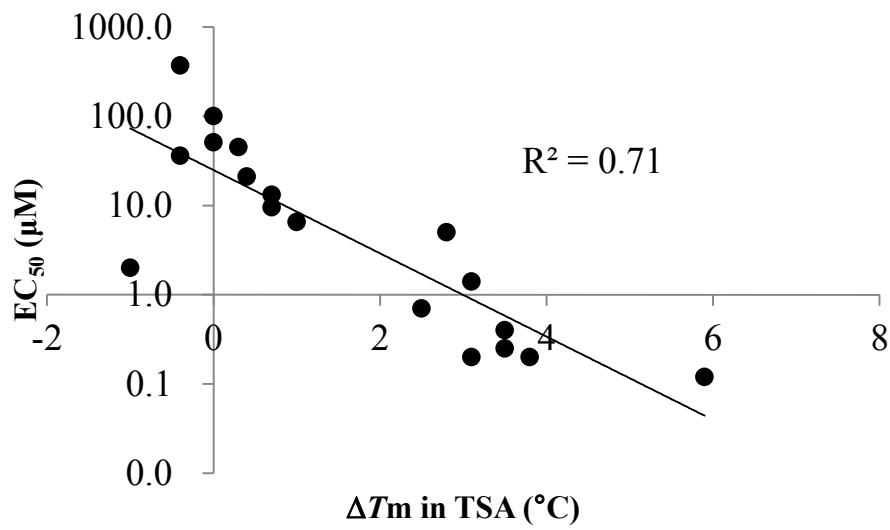


Figure 3-14. (a) Correlation between  $\Delta T_m$  values obtained by DSC and  $EC_{50}$  values from reporter gene assays. (b) Correlation between  $(dF/dT)_{50}$  values obtained by DSF and  $EC_{50}$  values from reporter gene assays.

(a)



(b)

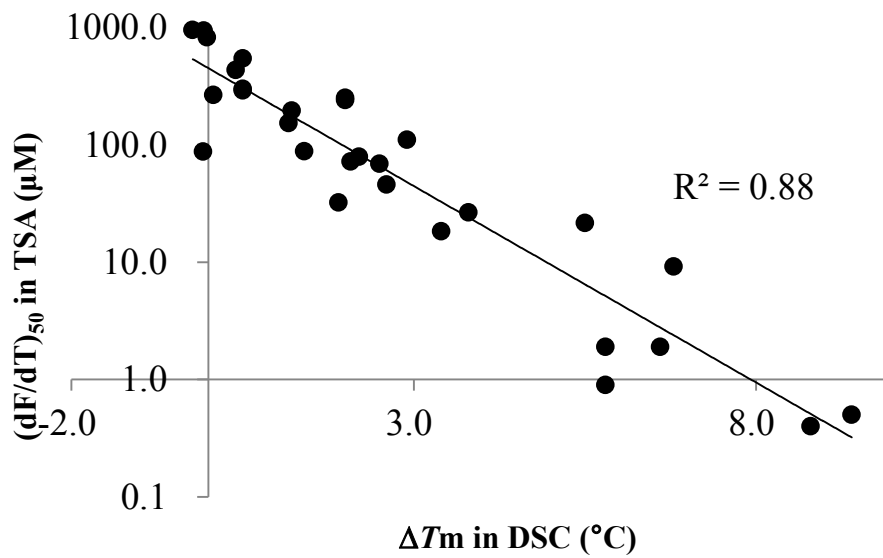


Figure 3-15. (a) Correlation between  $\Delta T_m$  shift values obtained by DSF and  $\text{EC}_{50}$  values. (b) Correlation between the  $\Delta T_m$  values obtained by DSC and  $(\text{dF}/\text{dT})_{50}$  values by DSF.

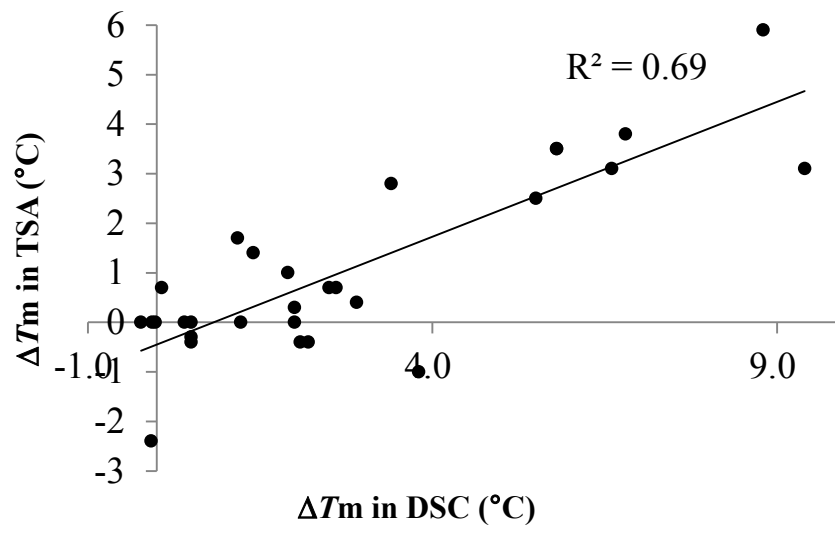


Figure 3-16. Correlation between  $\Delta T_m$  values obtained by DSC and DSF.



*In vitro* の PXR 相互作用解析としては TdCD や ALIS を用いた評価が最近報告された<sup>66</sup>。TdCD や ALIS を用いた手法と DSF を用いた手法の reporter gene assay の EC<sub>50</sub> 値の比較をすると、ともに良い相関性を示しているが、一方で DSF は TdC や ALIS と比較してスループットが高い。DSF は既存の方法より多くの化合物の PXR による CYP3A の誘導評価に有用であると考えられ、特に reporter gene assay をはじめとした他の別法より先に使うプレスクリーニングとしての利用が最適であると考えられる。

## 第五節 まとめ

酵素誘導を担うタンパク質 PXR との相互作用解析を行い、既存の reporter gene assay の問題を解決できるスループットの高い誘導能評価系の構築を検討した。PXR タンパク質は SRC1 と融合させて発現することにより安定で大量に取得することに成功し、ITC、DSC を用いることでそのタンパク質の構造が問題ないことを確認した。さらに DSC を用いて PXR との解析を実施し、reporter gene assay の  $EC_{50}$  と良い相関を示した。一方、DSF においては、Protein Thermal Shift Dye と ligand が疎水性ポケットで競合しあうことを明らかにした。それにより既存の評価系である  $T_m$  ではなく、新しい評価系  $(dF/dT)_{50}$  の値を使うことで幅広い相互作用を高いスループットで評価することが可能であることを見出した。

## 総括

創薬を進める上で、ターゲットとなるタンパク質との医薬品候補化合物の相互作用を明らかにすることは、mode of action の解明、構造活性相関研究、選択性の向上など様々な重要な情報を得るために必要不可欠である。低分子とタンパク質の相互作用解析を行う物理化学的手法としては、SPR、NMR、X線結晶構造解析、熱分析的な手法など様々存在する。本論文においては、2つのターゲットタンパク質、FKBP12 および PXR に対する新しい熱分析の手法を開発し創薬の加速化へ貢献した。

第一章ではFKBP12とmTORに対する相互作用をDSCとNMRで解析した。FK506やrapamamycinはFKBP12に結合する。しかしそれだけでは活性は得られない。このタンパク質リガンド複合体が、さらに他のタンパク質 calcineurin や mTOR と結合することによってそのシグナル伝達を阻害し、免疫抑制作用や抗がん作用を発現するユニークな作用機序を有している。そこで、抗がん剤の創薬をめざし、ligand が FKBP12 に結合した後に、mTOR に結合するか否かを判別する物理化学的なスクリーニング方法の確立を目指した。FKBP12 と mTOR の融合タンパク質を作成し、NMR と DSC による解析を実施した。その結果、容易に1度の実験でFKBP12のみと結合する化合物とFKBP12およびmTORと3者複合体を形成している化合物を判別する方法を確立した。本研究から、DSCからはタンパク質のドメインレベルでの相互作用が解析できる一方、NMRではアミノ酸レベルで相互作用している残基を明らかに出来ることを示した。タンパク質発現や精製の際には安定化のためにタグをつけて発現させることもあり、本方法を用いれば目的タンパク質に結合しているのか、タグに結合しているのか容易に判別が可能であり、今まで解析が困難であった不安定タンパク質への応用も期待される。

第二章においてはPXRタンパク質に対してDSC, DSFを用いて相互作用解析を実施した。PXRはヒトの薬物代謝の主要な酵素であるCYP3Aを誘導する

タンパク質として知られている。PXR への結合を評価することは、その薬物の代謝に大きく影響を与えるため、早期に把握しておくことが必要である。既存の reporter gene assay は細胞系で実験していることから様々な制限があり、物理化学的な相互作用解析測定法が必要であった。そこで PXR タンパク質を作成し、DSC、DSF を用いて評価した。DSC からは reporter gene assay と同等の結果を得ることが出来た。一方、DSF においては疎水性のポケットで dye と ligand が競合してしまうことから通常の解析では評価が困難であった。そこで、新しいパラメーター $(dF/dT)_{50}$  (蛍光強度の温度変化あたりの変化が初期状態と比較して半分になるリガンド濃度)を定義し、利用を検討した。結果、 $(dF/dT)_{50}$  の値は DSC の  $T_m$  や reporter gene assay の  $EC_{50}$  と高い相関性を得ることが可能となった。この新しい指標 $(dF/dT)_{50}$  を用いれば、今まで DSF での解析が困難であった疎水性の高いタンパク質や大きな疎水性のポケットを有するタンパク質の解析が可能であると考えられる。

以上、熱分析と構造生物学的な手法を利用した FKBP12 と PXR との相互作用解析から、効果的なスクリーニング法を創作すれば、目的の相互作用を有する化合物の探索を効率的に実施できることを示した。さらに、今まで困難であった安定性の低いタンパク質や疎水性の高いタンパク質に対しても熱分析の手法を用いた相互作用解析が可能であることを示した。

## 参考文献

1. Grabley, S.; Thiericke, R. Bioactive agents from natural sources: Trends in discovery and application. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **1999**, *64*, 101-154.
2. Williams, G. P. Advances in high throughput screening. *Drug Discovery Today* **2004**, *9(12)*, 515-516 and reference cited therein.
3. 横山茂之 理化学研究所におけるプロジェクトの現状と今後の展望 *蛋白質核酸酵素* **2005**, *50(7)*, 836-845.
4. 横山茂之、木川隆則、白水美香子、宮野雅司、倉光成紀 網羅的解析拠点の研究成果、*蛋白質核酸酵素* **2008**, *53(5)*, 632-637.
5. 田中大輔 Fragment-based drug discovery:その概念と狙い *YAKUGAKU ZASSHI* **2010**, *130(3)*, 315-323.
6. Erlanson, D. A.; McDowell, R. S.; O'Brien, T. Fragment-based drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47(14)*, 3463-3482.
7. Huber, W.; Mueller, F. Biomolecular interaction analysis in drug discovery using surface plasmon resonance technology. *Current Pharmaceutical Design* **2006**, *12(31)*, 3999-4021.
8. Ludwig, C.; Guenther, U. L. Ligand based NMR methods for drug discovery. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed.)* **2009**, *14(12)*, 4565-4574.

9. Meyer, B.; Peters, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding protein. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *24(8)*, 864-890.
10. Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **1996**, *274(5292)*, 1531-1534.
11. Kobashigawa, Y.; Saio, T.; Ushio, M.; Sekiguchi, M.; Yokochi, M.; Ogura, K.; Inagaki, F. Convenient method for resolving degeneracies due to symmetry of the magnetic susceptibility tensor and its application to pseudo contact shift-based protein-protein complex structure. *Journal of Biomolecular NMR* **2012**, *53(1)*, 53-63
12. Blundell, T. L.; Jhoti, H.; Abell, C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1(1)*, 45-54.
13. Freire, E.; Mayorga, O. L.; Staume, M. Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry* **1990**, *62(18)*, 950A-957A.
14. Freire, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in the class from best in class ? *Drug Discovery Today* **2008**, *13(19-20)*, 869-874.
15. 関口光広、川崎佑子、川崎匡史、平倉穰、湯田真道、寺村俊夫 ビスフォスフォネート薬剤の生物物理化学的な解析 *新薬と臨床* **2012**, *61(9)*, 1683-1688.
16. Kawasaki, Y.; Sekiguchi, M.; Kawasaki, M.; Hirakura, Y. Thermodynamic Evaluation of the Binding of Bisphosphonates to Human Farnesyl

- Pyrophosphate Synthase. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *62(1)*, 77-83.
17. Ferenczy, G. G.; Keseru, G. M. Thermodynamics guided lead discovery and optimization. *Drug Discov Today* **2010**, *15(21-22)*, 919-932.
18. Edink, E.; Rucktooa, P.; Retra, K.; Akdemir, A.; Nahar, T.; Zuiderveld, O.; van Elk, R.; Janssen, E.; van Nierop, P.; van Muijiwijk-Koezen, J.; Smit, A. B.; Leurs, R.; de Esch, I. J. Fragment growing induces conformational changes in acetylcholine-binding protein: a structural and thermodynamic analysis. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133(14)*, 5363-5371.
19. Kobe, A.; Caaveiro, J. M. M.; Tashiro, S.; Kajihara, D.; Kikkawa, M.; Mitani, T.; Tsumoto, K. Incorporation of rapid thermodynamic data in fragment-based drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56(5)*, 2155-2159.
20. Bruylants, G.; Wouters, J.; Michaux, C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12(17)*, 2011-2020.
21. Ionescu, R. M.; Vlasak, J.; Rrice, C.; Kirchmeier, M. Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies *Journal of the Pharmaceutical Sciences* **2008**, *87(4)*, 1414-26.
22. Waldron, T. T.; Murphy, K. P. Stabilization of proteins by ligand binding: Application to drug screening and determination of unfolding energetics. *Biochemistry* **2003**, *42(17)*, 5058-5064.



23. He, F.; Hogan, S.; Latypov, RF.; Narhi, LO.; Razinkov, VI. High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. *Journal of the Pharmaceutical Sciences* **2010**, *99(4)*, 1707-1720.
24. Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* **2007**, *2(9)*, 2212-2221.
25. Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhama, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics* **1987**, *40(9)*, 1249-1255.
26. Kino, T.; Hatanaka, H.; Miyata, S.; Inamura, N.; Nishiyama, M.; Yajima, T.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *The Journal of Antibiotics* **1987**, *40(9)*, 1256-1265.
27. Vezina, C.; Kudelski A.; Sehgal, SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing Streptomyces and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* **1975**, *28(10)*, 721-726.
28. Sehgal, S. N.; Baker, H.; Vezina, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* **1975**, *28(10)*, 727-732.

29. Liu, J.; Farmer, J. D. Jr.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes *Cell* **1991**, *66(4)*, 807-815.
30. Schreiber, S. L. Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways. *Cell* **1992**, *70(3)*, 365-370.
31. Huang, S.; Bjornsti, M. A. Houghton, P. J. Rapamycin: Mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biology & Therapy* **2003**, *2(3)*, 222-232.
32. Heitman, J.; Movva, N. R.; Hall, M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **1991**, *253(5022)*, 905-909.
33. Schmelzle, T.; Hall, M. N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **2000**, *103(2)*, 253-262.
34. Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **2006**, *124(3)*, 471-484.
35. Jacinto, E.; Loewith, R.; Schmidt, A.; Lin, S.; Ruegg, M. A.; Hall, A.; Hall, M. N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive *Nature Cell Biology* **2003**, *6(11)*, 1122-1128.
36. Sarbassov, D. D.; Guertin, D. A.; Ali, S. M.; Sabatini, D. M. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* **2007**, *307(5712)*, 1098-1101.
37. Chan, S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *British Journal of Cancer* **2004**, *91(8)*, 1420-1424.

38. Rosner, M.; Hanneder, M.; Siegel, N.; Valli, A.; Fuchs, C.; Hengstschager, M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutation Research* **2008**, *659(3)*, 284-292.
39. Dames, S. A. A fast and simple method to prepare the FKBP-rapamycin binding domain of human target of rapamycin for NMR binding assays. *Protein Expression and Purification* **2008**, *59(1)*, 31-37.
40. Leone, M., Crowell, K. J., Chen, J., Jung, D., Chiang, G. G., Sareth, S., Abraham, R. T., Pellecchia, M. The FRB domain of mTOR: NMR solution structure and inhibitor design. *Biochemistry* **2006**, *45(34)*, 10294-10302.
41. Veverka, V.; Crabbe, T.; Bird, I.; Lennie, G.; Muskett, F. W.; Taylor, R. J.; Carr, M.D. Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* **2008**, *27(5)*, 585-595.
42. Kobashigawa, Y.; Kumeta, H.; Ogura, K.; Inagaki, F. Attachment of an NMR-invisible solubility enhancement tag using a sortase-mediated protein ligation method. *Journal of Biomolecular NMR* **2009**, *43(3)*, 145-150.
43. Choi, J.; Chen, J.; Schreiber, S. L.; Clardy, J. Structure of the FKBP12-Rapamycin Complex Interacting with Binding Domain of Human FRAP. *Science* **1996**, *273(5272)*, 239-242.
44. Liang, J.; Choi, J.; Clardy, J. Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographica section D* **1999**, *55(Pt 4)*, 736-744.

45. Blondel, A.; Nageotte, R.; Bedouelle, H. Destabilizing interactions between the partners of a bifunctional fusion protein. *Protein Engineering* **1996**, *9*(2), 231-238.
46. Novokhatny, V.; Ingham, K. Thermodynamics of maltose binding protein unfolding. *Protein Science* **1997**, *6*(1), 141-146.
47. Auton, M.; Sowa, K.E.; Smith, S. M.; Sedlak, E.; Vijayan, K. V.; Cruz, M. A. Destabilization of the A1 Domain in von Willebrand Factor Dissociates the A1A2A3 Tri-domain and Provokes Spontaneous Binding to Glycoprotein Iba and Platelet Activation under Shear Stress. *The Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*(30), 22831-22839.
48. Laura, A. B.; Corey, W. L.; Thomas J. W. Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*(13), 4715-4721.
49. Kissinger, C. R.; Parge, H. E.; Knighton, D. R.; Lewis, C. T.; Pelletier, L. A.; Tempczyk, A.; Kalish, V. J.; Tucker, K. D.; Showalter, R. E.; Moomaw, E. W.; Gastniel, L. N.; Habuka, N.; Chen, X.; Maldonado, F.; Barker, J.; Bacquet, R.; Villafranca, E. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*, **1995**, *378*(6557), 641-644.
50. Bertilsson, G.; Heidrich, J.; Svensson, K.; Asman, M.; Jendeborg, L.; Syndow-Beckman, M.; Ohlsson, R.; Postlind, H.; Blomquist, P.; Berkenstam, A. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

*United States of America* **1998**, *95(21)*, 12208-12213.

51. Lehmann, J. M.; McKee, D. D.; Watson, M. A.; Willson, T. M.; Moore, J. T.; Kliewer, S. A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *The Journal of Clinical Investigation* **1998**, *102(5)*, 1016-1023.
52. Xie, W.; Joyce, L.; Barwick, J. L.; Cynthia, M.; Simon, A.; Pierce, M.; Safe, S.; Blumberg, B.; Guzelian, P. S.; Evans, R. M. Reciprocal activation of xenobiotic response gene by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes & Development* **2000**, *14(23)*, 3014-3023.
53. Suino, K.; Peng, L.; Reynolds, R.; Li, Y.; Cha, J. Y.; Repa, J. J.; Kliewer, S. A.; Xu, H. E. The nuclear xenobiotic receptor CAR: Structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Molecular Cell* **2004**, *16(6)*, 893-905.
54. Waxman, D.J. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, *369(1)*, 11-23.
55. Tolson, A. H.; Wang, H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62(13)*, 1238-1249.
56. Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **1988**, *240(4854)*, 889-895.
57. Goodwin, B.; Hodgson, E.; Liddle, C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Molecular Pharmacology* **1999**, *56(6)*, 1329-1339.
58. Moore, L.B.; Parks, D.J.; Jones, S. A.; Bledsoe, R. K.; Consler, T. G.; Stimmel,

- J. B.; Goodwin, B.; Liddle, C.; Blanchard, S. G.; Willson, T. M. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275(20)*, 15122-15127.
59. Luo, G.; Cunningham, M.; Kim, S.; Burn, T.; Lin, J.; Sihz, M.; Hamilton, G.; Rizzo, C.; Jolley, S.; Gilbert, D.; Downey, A.; Mudra, N.; Graham, R.; Carroll, K.; Xie, J.; Madan, A.; Parkinson, A.; Christ, D.; Selling, B.; Lecluyse, E.; Gan, L. S. CYP3A4 induction by drug : Correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metabolism & Disposition* **2002**, *30(7)*, 795-824.
60. Watkins, R. E.; Wisely, G. B.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Lambert, M. H.; Williams, S. P.; Willson, T. M.; Kliewer, S. A.; Redinbo, M. R. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: Structural determinants of directed promiscuity. *Science* **2001**, *292(5525)*, 2329-2333.
61. Chrencik, J. E.; Orans, J.; Moore, L. B.; Xue, Y.; Peng, L.; Collins, J. L.; Wisely, G. B.; Lambert, M. H.; Kiewer, S. A.; Redinbo, M. R. Structural disorder in complex of human pregnane X receptor and the macrolide antibiotic rifampicin. *Molecular Endocrinology* **2005**, *19(5)*, 1125-1134.
62. Xue, Y.; Chao, E.; Zuercher, W. J.; Willson, T. M.; Collins, J. L.; Redinbo, M. R. Crystal structure of the PXR-T1317 complex provides a scaffold to examine the potential for receptor antagonism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15(5)*, 2156-2166.
63. Berkhout, T. A.; Simon, H. M.; Patel, D. D.; Bentzen, C.; Niesor, E.; Jackson, B.; Suckling, K. E. The novel cholesterol-lowering drug SR-12813 inhibits cholesterol synthesis via an increased degradation of

- 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271(24)*, 14376-14382.
64. Jones, S. A.; Moore, L. B.; Shenk, J. L.; Wisely, G. B.; Hamilton, G. A.; McKee, D. D.; Tomkinson, N. C. O.; LeCluyse, E. L.; Lambert, M. H.; Willson, T. M.; Kliewer, S. A.; Moore, J. T. The pregnane X receptor: A promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Molecular Endocrinology* **2000**, *14(1)*, 27-39.
65. Watkins, R. E.; Davis-Searles, P. R.; Lambert, M. H.; Redinbo, M. R. Coactivator binding promotes the specific interaction between ligand and the pregnane X receptor. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *331(4)*, 815-828.
66. Xiao, L.; Nichbarg, E.; Wang, W.; Thomas, A.; Ziebell, M.; Prosisse, W. W.; Lesburg, C. A.; Taremi, S. S.; Gerlach, V. L.; Le, H. V.; Cheng, K. C. Evaluation of *in vitro* PXR-based assays and *in silico* modeling approaches for understanding the binding of a structurally diverse set of drugs to PXR. *Biochemical Pharmacology* **2011**, *81 (5)*, 669-679.
67. Wang, W.; Prosisse, W. W.; Chen, J.; Taremi, S. S.; Le, H. V.; Madison, V.; Cui, X.; Thomas, A.; Cheng, K. C.; Lesburg, C. A. Construction and characterization of a fully active PXR/SRC-1 tethered protein with increased stability. *Protein Engineering Design & Selection* **2008**, *21(7)*, 425-433.
68. El-Sankary, W.; Gibson, G. G.; Ayrtton, A.; Plant, N. Use of reporter gene assay to predict and rank the potency and efficacy of CYP3A4 inducers. *Drug Metabolism & Disposition* **2002**, *29(11)*, 1499-1504.
69. McGinnity, D. F.; Zhang, G.; Kenny, J. R.; Hamilton, G. A.; Otmani, S.; Stams, K. R.; Haney, S.; Brassil, P.; Stresser, D. M.; Riley, R. J. Evaluation of Multiple *in Vitro* systems for assessment of CYP3A4 induction in drug

- discovery: human hepatocytes, pregnane X receptor reporter gene, and Fa2N-4 and HepaRG cells. *Drug Metabolism & Disposition* **2009**, *37(6)*, 1259-1268.
70. Sinz, M.; Kim, S.; Zhu, Z.; Chen, T.; Anthony, M.; Dickson, K.; Rodrigues, A. D. Evaluation of 170 xenobiotics as transactivators of human pregnane X receptor (hPXR) and correlation to known CYP3A4 drug interactions *Current Drug Metabolism* **2006**, *7(4)*, 375-388.
71. Lemaire, G.; Sousa, G. D.; Rahmani, R. A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *68(12)*, 2347-2358.
72. Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B. A.; Lane, P.; Salemme, F. R. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery, *J Biomolecular Screening* **2001**, *6(6)*, 429-440.
73. Lo, M. C.; Aulabaugh, A.; Jin, G.; Cowling, R.; Bard, J.; Malamas, M.; Ellestad, G.: Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical Biochemistry* **2004**, *332(1)*, 153-159.
74. Sorrell, F. J.; Greenwood, G. K.; Birchall, K.; Chen, B. Development of a differential scanning fluorimetry based high throughput screening assay for the discovery of affinity binders against an anthrax protein. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *52(5)*, 802-808.
75. Wan, K. F.; Wang, S.; Brown, C. J.; Yu, B. C.; Entzeroth, M.; Lane, D. P.; Lee, M. A. Differential scanning fluorimetry as a secondary screening platform for small molecule inhibitors of Bcl-XL. *Cell Cycle* **2009**, *8(23)*, 3943-3952.



## 謝辞

本論文の作成にあたり、親切丁寧な御指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系 繁森英幸教授、王碧昭教授、中村幸治教授、山田小須弥准教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を行うに際し、終始ご指導と御鞭撻を賜りました北海道大学大学先端生命科学院 稲垣冬彦特任教授および熊本大学大学院生命科学研究部生命分析化学分野 小橋川敬博准教授に心より感謝申し上げます。

山之内製薬(現アステラス製薬)入社時より創薬研究への多大な御指導御助言を頂きましたアステラス製薬バイオリードプロジェクト森啓太郎氏、創薬推進研究所 鈴村謙一博士、川崎匡史氏には深く感謝申し上げます。

北海道大学在学時より多大なる御指導を賜り研究者としての基礎を築いて下さりました北海道大学大学院薬学研究院 小林淳一教授、久保田高明准教授、石山玄明助教および星薬科大学森田博史教授には心より厚く御礼申し上げます。

本論文の作成の機会をお与え戴きましたアステラス製薬株式会社 創薬推進研究所 寺村俊夫博士、湯田真道氏には心より深謝致します。

本研究に関し多大なご協力を戴きました北海道大学大学院先端生命科学研究院 小椋賢治特任助教、横地政志氏、斉尾智英氏、生塩理尋氏およびアステラス製薬株式会社研究本部 平倉穰博士、木曾鉄生博士、森口博行氏、楠崎佑子博士には深く感謝いたします。また本研究を行うにあたり、アステラス製薬創薬推進研究所創薬分析研究室の諸氏をはじめとする多くの方々にお世話になりました。ここに深く御礼申し上げます。

最後に、本論文の作成を常に励ましてくれた妻、両親並びに友人に心より感謝いたします。

## 発表論文目録

1. An evaluation tool for FKBP12-dependent and -independent mTOR inhibitors using a combination of FKBP-mTOR fusion protein, DSC and NMR. **Sekiguchi, M.**; Kobashigawa, Y.; Kawasaki, M.; Yokochi, M.; Kiso, T.; Suzumura, K.; Mori, K.; Teramura, T.; Inagaki, F. *Protein Engineering Design and Selection* **2011**, *24(11)*, 811-817.
2. Convenient method for resolving degeneracies due to symmetry of the magnetic susceptibility tensor and its application to pseudo contact shift-based protein-protein complex structure. Kobashigawa, Y.; Saio, T.; Ushio, M.; **Sekiguchi, M.**; Yokochi, M.; Ogura, K.; Inagaki, F. *Journal of Biomolecular NMR*. **2012**, *53(1)*, 53-63.
3. High-Throughput Evaluation Method for Drug Association with Pregnane X Receptor (PXR) Using Differential Scanning Fluorometry. **Sekiguchi, M.**; Kobashigawa, Y.; Moriguchi, H.; Kawasaki, M.; Yuda, M.; Teramura, T.; Inagaki, F. *Journal of Biomolecular Screening* **2013**, *18(9)*, 1084-1091.
4. Thermodynamic Evaluation of the Binding of Bisphosphonates to Human Farnesyl Pyrophosphate Synthase. Kawasaki, Y.; **Sekiguchi, M.**; Kawasaki, M.; Hirakura, Y. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *62(1)*, 77-83.