

過渡的たんぱく質間相互作用を調節する合成分子の創出

信州大学学術研究院（農学系）

大神田 淳子

諸言

弱く短寿命な過渡的たんぱく質間相互作用(transient protein-protein interactions: PPIs)は細胞内信号伝達系の調節を担う動的な相互作用であり[1]、これらの調節に主たる役割を果たしている天然変性ドメイン(intrinsically disordered proteins/regions: IDPs, IDRs)の生物学的機能解明に注目が集まっている。[1-3] IDPs/IDRsはヒト全たんぱく質の40%に存在すると予測されており、リン酸化等の翻訳後修飾がこれらの可逆的な構造遷移に深く関与することもわかってきた。[2] IDPsの構造変化と相互作用を制御する合成化合物は新しい創薬への道を拓くブレークスルーとなると期待される。ところがIDPsの生物学的な詳細については未解明であり、阻害剤すらほとんど報告されていない。これまで、たんぱく質阻害剤の合理設計は複合体結晶構造などの“静”の情報に基づいて行われてきた。一方、IDPsについてはその構造が不安定なために結晶構造等の解析が困難であり、構造に関する研究はNMR解析によるごく限られた例を除いてほぼ皆無に等しい。従って、IDPsに結合する化合物を創製するための論理的手法は現在のところ全くない。さらに、非構造的たんぱく質は凝集しやすいため実験科学的な扱いが難しく、研究の進展を滞らせる一因ともなっている。IDPs標的型阻害剤の探索法として細胞レポーターアッセイを用いる戦略が考えられるが、必ずしも標的IDPsに作用する阻害剤を発見できる保証はない。標的IDPsを安定的に扱えるin vitro実験系の確立が早急に望まれている。

目的

このような背景を踏まえ、本研究では、IDPsの代表例である概日時計転写因子BMAL1/CLOCKの過渡的PPIsに焦点を当て、遺伝子組み換えモデルたんぱく質の構築と分光学的手法に基づく結合試験系の確立、および化合物ライブラリスクリーニングによる阻害剤探索を検討することを目的とした。概日時計の調節を司る転写因子であるBmal1, Clockは全体の30%以上がゆらぎ構造を持つIDPsであり、ヘテロ二量体を形成してE-box配列DNAに結合し概日リズム遺伝子産物CRY, PERの発現を誘導する(図1)。概日リズムは生物に広く保存されており、遺伝子発現フィードバックループにより生体内の様々な代謝活動の調節を行うことがわかっている。また最近の研究によれば、概日リズム機構の乱れが不眠症や腫瘍形成の原因となる可能性が示唆されている。したがってBmal1, Clockの阻害剤を発見できれば、未だ不明な点が多い概日リズムの分子機構の解明、不眠症の治療薬の開発や腫瘍形成抑制の新たな知見を得るための一助となると考えられる。

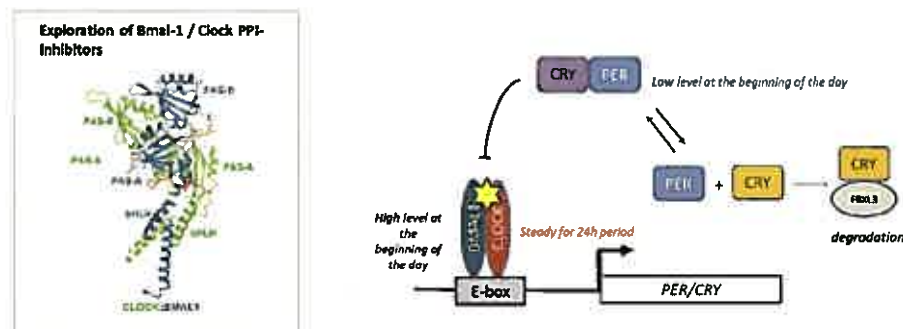


図1. Bmal-1 / Clock複合体結晶構造⁴⁾と概日時計フィードバックループの概略図

本研究では第1に、概日時計転写因子であるClock, Bmal1転写因子を標的たんぱく質と設定し、両者の部分配列を遺伝子組換え体として発現・精製する方法を確立する。第2に、取得したClock, Bmal1を用い、蛍光サーマルシフトもしくは蛍光偏光強度変化を指標としE-box配列を含む2本鎖DNA存在下におけるヘテロ二量体形成を評価する実験系を構築する。第3に、確立した評価系により化合物ライブラリスクリーニングを実施し、Clock/Bmal1ヘテロ二量体形成を阻害する化合物を探索する。本研究によって得られた化合物は、合目的的に見出されたIDPs阻害剤として新規性が高く、複雑な概日時計調節機構の解明に役立つ分子ツールとしての可能性が期待される。

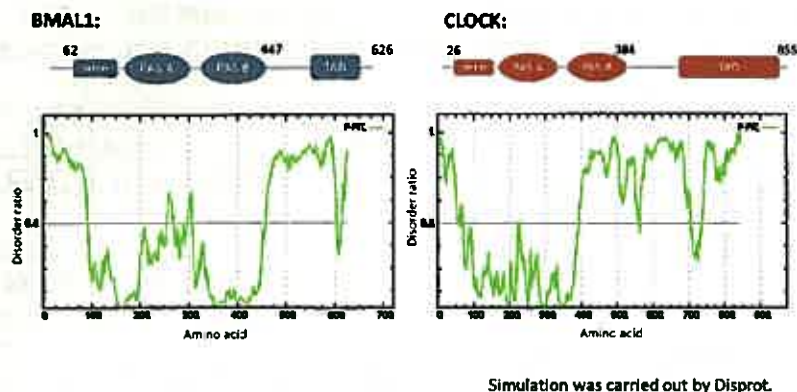


図2. Bmal-1とClock構造のゆらぎ解析の結果

実験

Bmal1/Clock複合体結晶構造に基づき、ヘテロ2量体形成に直接的な関与は少ないと考えられたtransactivation domain (TAD)を削除した配列をモデルたんぱく質として設計した。各々に可溶性タグおよびHis-Tagを組み込んだベクターpET29, pET32bを作成し大腸菌BL21から発現し、Ni-NTA樹脂を用いて精製した。発現・精製したBmal1, Clockモデルたんぱく質について、E-boxオリゴDNA存在下におけるヘテロ2量体形成を蛍光偏光強度変化を指標として評価し、文献値と比較して評価系としての妥当性を検討した。芳香族系低分子化合物およびインドール系低分子化合物ライブラリについて96-wellフォーマットによるライブラリスクリーニングを実施し、Bmal1/Clockの分子間相互作用を阻害する化合物の探索を試みた。

結果と考察

ヒトBmal1, Clockの全長626, 855アミノ酸残基についてIDP予測データベースDisprotにより解析したところ、Bmal1, Clockそれぞれのおよそ50%, 30%がIDRであることが示唆された(図2)。また両者のTADドメインはいずれも非構造性が高いことが示された。複合体結晶構造から、両者の相互作用にTADドメインは必ずしも必須ではないと考え、本研究ではbHLH-PASa-PASb配列を用いることとした。両者ともにN末端にHisタグを、より非構造性が高く扱いが難しいと予想されたClockについては可溶性を高めるためのタグも付与した配列をコードしたpETベクターを作成し、大腸菌を形質転換して常法によりたんぱく質発現を誘導した。このとき、Bmal1, Clockを単独に形質転換したもの、Bmal1/Clockの共発現体についても検討した。いずれの場合も目的たんぱく質が封入体として発現したため、発現精製には実験プロトコルの最適化を必要とした。種々の条件検討を行った結果、目的のBmal1, Clockをそれぞれ数mg程度ずつ得ることに成功した(図3a)。SDS-PAGE分析からNi-NTAカラム精製の段階で分離不可能なたんぱく質の混入が認められたが、結合試験に進むこととした。

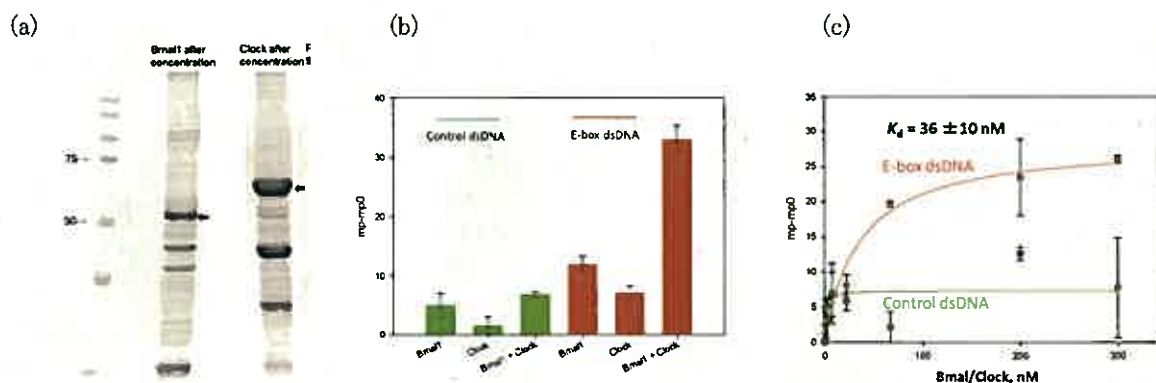


図3. (a) Bmal1およびClockのSDS-PAGE、(b) 蛍光偏光によるBmal1, Clock, Bmal1/ClockのE-box dsDNAへの結合試験の結果、(c) Bmal1/ClockのE-box dsDNAに対する結合滴定実験の結果

発現したClockとBmal1のヘテロ2量体形成能を、E-Box 2本鎖DNAへの結合能を計測することで検証した。2本鎖オリゴDNAとして、Per2 E-box[4]を含む20塩基対の、アンチセンス鎖の5'末端にFAMを付与したものを用いた。またコントロールとしてPer2 E2 boxの変異配列を準備した。[5] このDNAに各種たんぱく質を加えたときの蛍光偏光値(FP)の変化を測定した。たんぱく質試料として、単独に発現精製したBmal1, Clock, Bmal1/Clock共発現体、およびBmal1, Clockの等量混合物の4種類について検討した。実験の結果、コントロールDNAに対してはBmal1, Clockをそれぞれ単独で加えた場合、またBmal1/Clockの等量混合物いずれも結合しなかった。一方、

E-box配列に対しては、Bmal1やClock単独で用いた場合に比べ、等量混合物は明らかに強い結合を示した(図3b)。共発現体のデータは1:1複合体形成モデルとの良い一致を示し、解離定数は文献値 ($K_d = 58 \text{ nM}$)[4]とほぼ一致した(図3c)。以上の結果から、本研究で発現・精製したBmal1, Clockは、ヘテロ2量体を形成してE-boxに選択的に結合することを確認した。

次に、細胞内の分子クラウディング環境がBmal1/Clock相互作用およびDNAの結合にどのような効果を示すかを、PEG200(10% v/v)を加えたTris 緩衝液中で検証した。その結果、PEG200の添加により解離定数が約6倍異増加することが分かり、細胞内のクラウディング環境がIDPsの分子間相互作用に有意な影響を及ぼすことが示唆された。

続いて、構築した評価系を用いて化合物ライブラリスクリーニングを実施し、Bmal1/ClockのE-box結合を阻害する化合物の探索を検討した。96穴プレートにClock, Bmal1, 各化合物を加え、室温で振とうした後、dsDNAを加え、さらに20分静止し、蛍光偏光を測定した。化合物ライブラリとしてヘテロ環を含む低分子化合物約1800個を用意し、現在までに524個についてスクリーニングを完了した。その結果、有意な阻害活性を示すヒット化合物が見出された(図4)。このうちcompound#1について精査したところ、濃度依存的な結合阻害活性を示すこと、compound#1に構造が極めて類似した他のライブラリ化合物では活性は認められなかったことがわかった(図5)。これらの結果から、compound#1の阻害活性は化学構造に依存しており、化合物がBmal1もしくはClockのいずれかに特異的に結合していることが示唆された。

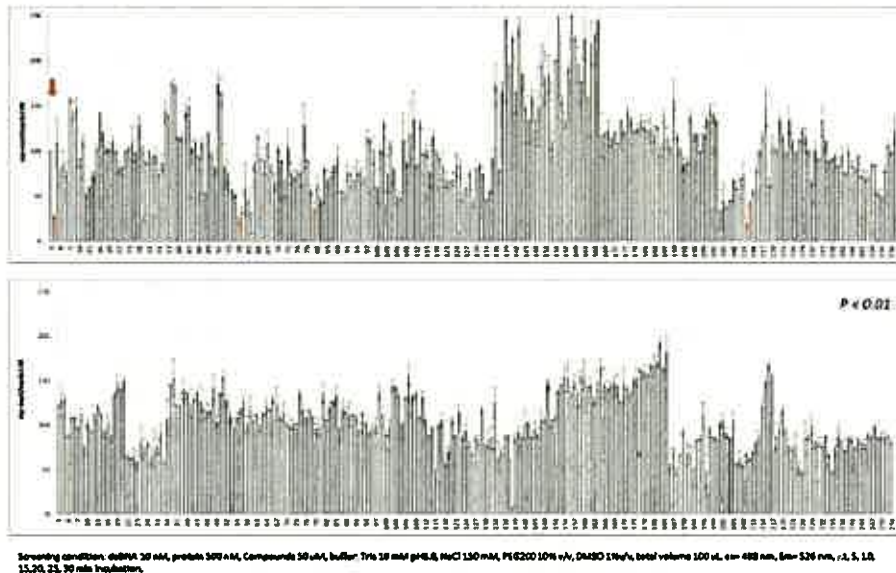


図4. 化合物ライブラリスクリーニングの結果

結語

以上のように本研究では、IDPsモデルとしてBmal1, Clock遺伝子組換えたんぱく質の発現と精製とDNA結合機能を指標とする評価系の構築を達成した。96ウェルフォーマットに展開可能な本評価系は、Bmal1/Clock阻害剤の探索スクリーニングに有用であると考えられる。一方、Bmal1とClockの機能は確認できたものの、それらの純度向上は今後の課題であり、異なるタグの使用などの検討が必要である。今回スクリーニングにより見出された低分子化合物は今後 PPI阻害活性試験と細胞レポーターアッセイに供し、より詳細な検討を行ってゆく予定である。

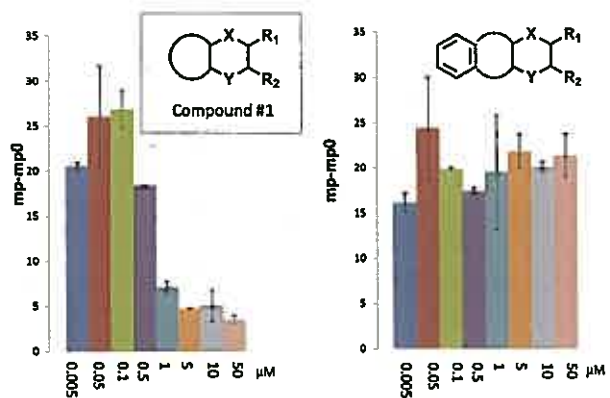


図5. ヒット化合物の濃度依存的な阻害活性の検証

文献

- [1] T. Chouard *Nature* 2011, 471, 151-153.
- [2] C. Y. Chen, W. I. Tou *Drug Discov. Today* 2013, 18, 910-915.
- [3] G. L. Dignon, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, 115, 9929.
- [4] N. Huang, et al. *Science* 2012, 337, 189-194.
- [5] J. S. Takahashi, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 2608.