

財団法人 日中医学協会

2011年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 鈴木 亨  
所属機関名： 東京大学  
所属部署名： 医科学研究所 職名：助教  
所 在 地： 東京都港区白金台4-6-1  
電 話： 03-5449-5303 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

疾患関連蛋白質の高次構造に基づく機能阻害剤探索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 鈴木 亨	職名：助教
所属機関名： 東京大学	部署名：医科学研究所
中国側研究者氏名： Mark Bartlam	職名：教授
所属機関名： 南開大学	部署名：生命科学院

4. 当該研究における発表論文等

## 5. 成果の概要

数種の大腸菌発現ベクターを検討した結果、全長はほとんど不溶性画分に存在してしまうため調製が困難であったが、今までよりも 100 アミノ酸ほど長い組み換え Tob タンパク質 (1-263 アミノ酸) を大量に調製できるようになった。既知の Tob 結合タンパク質である CNOT7 や PABP との直接結合も問題なく検出することができたので、Tob 結合低分子化合物を同定したときに、その効果を検索する手段に利用できる見込みとなった。次に立体構造解析を行うために高純度タンパク質の精製、結晶化の検討を行ったが、C 末端側の配列はやはり流動性が高い性質を持つと考えられ、単独での結晶化は困難であった。相互作用タンパク質との結合状態によって C 末端の流動性がなくなり、しっかりととした構造をとることが推測されたので、現在は CNOT7 との共結晶化を進めるための精製を行っている。

一方、Tob や CNOT7 と結合する低分子化合物の探索を進めた。in silico スクリーニングではいくつか候補を得たものの実際に結合を検出できるものの同定には到らなかった。Biacore を用いたフラグメントスクリーニングでは約 2000 の低分子化合物ライブラリーの中から 100 程度の Tob 結合低分子を選抜することができた。現在その中から Tob と CNOT7 の結合に影響する低分子をさらに探索する解析を進めている。

---

## 6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

中国人共同研究者は組み換えタンパク質の大量調製、精製、及び結晶化の最適化条件の探索を進めた。Tob タンパク質の精製までは順調に進めることができたが、結晶化の検討では 100 以上の条件を試したもの、良好な結果は得られなかった。熱力学的な解析などの結果から、相互作用分子との共結晶化が有効なのではないかと考え、現在 TobD2 (今回精製した 1-263 アミノ酸の組み換えタンパク質) と CNOT7 が相互作用したものの精製を開始している。精製同時に Tob と CNOT7 結合タンパク質に結合する低分子化合物の探索を行った。すでに解析結果の得られている Tob の前半 3 分の 1 [Tob (1-138)] と COT7 全長の 3 次元構造の情報に基づき、約 60 万の化合物データベースを使用して結合候補化合物のスクリーニングを行った。このスクリーニングでは特に CNOT7 の触媒活性部位、Tob と CNOT7 の相互作用面に焦点をあてて探索した。CNOT7 に関しては 4 つの候補を得た。しかし、Biacore による相互作用評価ではほとんど相互作用を検出することができず、in vitro 反応で CNOT7 の酵素活性を調べる解析でも何も影響を与えないという結果を得た。In silico スクリーニングの改善を検討すると共に、Biacore によるフラグメントスクリーニングで良い候補を得つつあるので、その低分子化合物で Tob との共結晶解析を主として進めるよう議論を進めている。

一日中医学協会助成事業  
疾患関連蛋白質の高次構造に基づく機能阻害剤探索

研究者氏名 助教 鈴木 亨、田代 晋也、  
教授 津本 浩平、  
教授 山本 雅  
所属機関 東京大学医科学研究所  
共同研究者名 教授 Mark Bartlam、白玉巍  
共同研究者所属機関 南開大学

＜要旨＞

細胞内シグナル分子 Tob (Transducer of ErbB2) は RNA 分解酵素である CNOT7, mRNA 結合タンパク質 PABP, 骨形成関連分子 Smad など様々なタンパク質分子と物理的に相互作用し、多様な生命現象に関与している。Tob 遺伝子の発現を欠損したマウスでは癌の自然発症率の増加のほか、骨芽細胞の割合の上昇に伴う骨密度の亢進が観察されている。従って、Tob と他の因子との相互作用を抑制するなど、Tob の機能に影響を与える低分子化合物を探査することは骨形成不全や癌の治療に効果のある薬剤開発の手掛かりとなる可能性がある。そこで立体構造面での理解を深めると共に、Tob と結合する低分子化合物、その中でも特に機能阻害、相互作用状態に影響を与える化合物の探索を *in vitro*、およびデータベースを使用した *in silico* で進めた。立体構造解析については、結晶化までいたるにはさらなる改善が必要であるものの、これまでの 138 アミノ酸から 263 アミノ酸まで延ばした Tob の構造に取り組むことのできる可能性が持ち上がってきた。また Tob に結合する低分子化合物の探索も進み、約 2,000 の低分子化合物の中から、100 程度の候補を得ることができた。そのなかでも既知の相互作用分子の会合に影響を与える化合物の選別が可能な段階まで到達することができた。

＜Key Words＞ Tob, CNOT7, mRNA 制御、相互作用阻害

＜緒言＞

細胞内シグナル分子 Tob は細胞の増殖、癌化、骨形成、DNA 損傷依存的細胞死などに関与することが示されている分子である。その多様な生命現象に関与する上で、Tob は RNA 分解酵素 CNOT7, mRNA 結合タンパク質 PABP, 骨形成関連分子 Smad など様々なタンパク質分子と物理的に相互作用することが重要である。Tob 遺伝子欠損マウスは癌の自然発症率が高く、骨芽細胞の割合の上昇に伴う骨密度の亢進も観察されている。一方で、ある種のヒト癌細胞では Tob の発現を抑制すると抗癌剤の処理に強い感受性を示すという興味深い結果も得られた。従って、Tob と他の因子との相互作用を抑制したり、あるいは Tob のタンパク質としての安定性に影響を与える低分子化合物を探査することは骨形成不全や癌の治療に効果のある薬剤開発の手掛かりとなる可能性があるとともに、Tob の新たな生物学的機能の発見にもつながることが期待される。研究者らを含むグループの近年の成果により、部分的なものではあるが Tob の 3 次元立体構造を X 線構造解析により明らかにすることができた。また、Tob 類似タンパク質の Btg2 では全体構造を明らかにした。このような研究背景を踏まえ、本研究ではより全長に近い Tob タンパク質の立体構造の解明に取り組むと共に、Tob と結合する低分子化合物、その中でも特に機能阻害、相互作用状態に影響を与える化合物の探索を進めた。

＜対象と方法＞

「結晶化の検討と *in silico* スクリーニング」ヒトの Tob cDNA を大腸菌やバキュロウイルスを用いて組み換えタンパク質を作製する系に導入する。様々な長さの cDNA を挿入した構築を用意し、安定で且つ大

量に調製が可能な、なるべく全長に近い Tob タンパク質を選別する。その選別した構築の Tob を大量調製、精製して X 線結晶化、その後の構造解析の検討へと進めていく。並行して、すでに解析された CNOT7 の立体構造、Tob の部分立体構造の結果を利用して、結合する低分子化合物の探索をする。

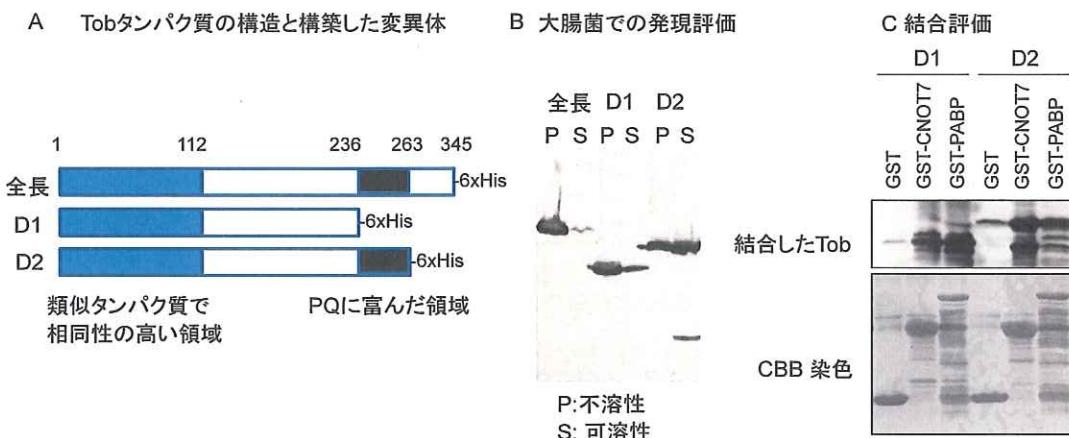
「低分子化合物のスクリーニング」構造解析結果の得られている Tob(1-138)を用いた。用いた装置は Biacore T200 で、センサーチップ CM5 上にアミンカップリング法により Tob(1-138)を約 4000RU 固定化した。固定化バッファとしては PBS+0.005% Tween20 を用いた。

本研究中で用いたライブラリは、創薬オープンイノベーションセンターより提供されたフラグメントスクリーニング用ライブラリ(化合物濃度 10 mM, 1,994 化合物)である。このライブラリは主に可溶化度を指標に集められた分子量 200 Da 前後の化合物群であり、濃度 200 μM の条件下では 5%DMSO を含むバッファ中で十分な溶解度を示すことが確かめられている。このライブラリについて、化合物を溶解している DMSO も含めて DMSO 濃度 5%、化合物最終濃度 200 μM となるように 25 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 150 mM NaCl, 10 μM MgCl<sub>2</sub>, 0.005% Tween20 バッファを用いて希釈した。得られた化合物群をプレート(1 プレート 384 ウェル、計 6 枚)に分注し、Tob(1-138)を固定化した流路上に流した。

### <結果>

すでに報告されている Tob の結晶構造はアミノ末端側 138 アミノ酸からなる全長の 3 分の 1 相当のものである。より全長に近い Tob タンパク質の立体構造解析を試みるため、まずは大腸菌で大量に組み換えタンパク質を調製する系のなかでもカルボキシ末端に精製用タグ(今回の場合ヒスチジン)を附加するベクター(pET26b)を利用した。これは Tob タンパク質の C 末端側の領域がタンパク質としての安定性に大きく寄与しており、カルボキシ末端側を欠損させたり、エピトープタグを附加した場合に哺乳動物細胞内では安定性が大きく向上するという性質に基づき、大腸菌内でもその性質が反映されることを推測した上での方策である。しかし、全長 Tob はやはり殆どすべてが不溶性画分として発現してしまう結果となった。カルボキシ末端の領域は安定性だけではなく、不溶化性の要因ともなっていると考えられた。次にカルボキシ末端を欠損した欠失変異体を作製し、大腸菌での発現状況を調査した。作製した変異体はカルボキシ末端領域の特徴配列であるプロリン、グルタミン酸(PQ) rich 領域に着目して、開始メチオニンから PQ 領域の手前まで(1-236; D1)と PQ 領域まで(1-263; D2)の 2 つである(図 1 A)。2 つの構築では、全長に比べて不溶化性からの改善を示し、特に PQ 領域を含んだ D2 では可溶性画分の飛躍的な増加がみられた(図 1 B)。そしてこのように調製した Tob の D1、D2 は CNOT7 や PABP と in vitro で特異的に、且つ強く結合する性質も保持していたので、その後の解析に使用できるものと考えられた(図 1 C)。

図 1 Tob タンパク質調製の評価

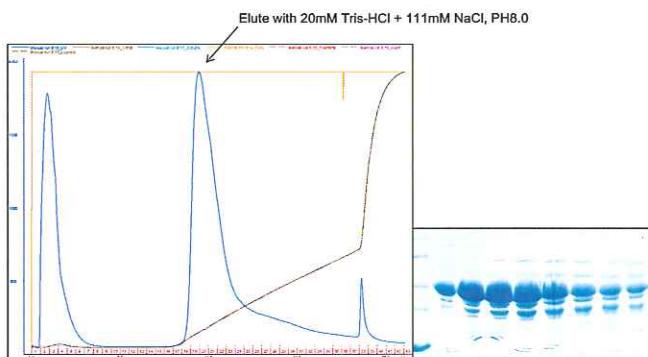


### 「結晶化の検討」

図1の結果より TobD 2が可溶性も高く、大量の調製が可能と考えられたので、精製、及び結晶化の検討を行った。まず大腸菌の可溶化液を Ni-NTA カラムで大部分の His タグ付き Tob タンパク質を回収した。次にイオン交換カラム (Resource Q)、ゲルろ過カラム (Sephadex 75) にかけて精製を行った。イオン交換カラムによる精製の例を図2に示すが、良好な精製結果が得られている。そして、3つのカラムにかけて精製した Tob について結晶化の検討を行った。これまでに Crystal Screen I, II, Index 1-96, Wizard I, II など数多くの結晶化 kit を用いて検討したが、結晶を得ることができなかつた。Tob はリン酸化タンパク質であり、Tob(1-138)には含まれず、TobD 1 や D 2 に含まれる領域に主要なリン酸化部位を有している。そのリン酸化部位について、リン酸化状態を模倣するアミノ酸であるグルタミン酸に置換した Tob でも同様の検討を行ったが、結果は同じであった。

図2 TobD 2 の精製

Purification of TobD2-6His with Ion Exchange Chromatography(Resource Q)



### 「Tob, CNOT7 に結合する低分子化合物の in silico スクリーニング」

文献でえられた構造をもとに、約 60 万の化合物を含むデータベースの中から、Tob (CNOT7 との結合面) と CNOT7 (触媒活性部位) に結合する低分子化合物の探索を行った。先に CNOT7 について有力な候補が 4 つ得られ、そのうち 2 つが入手可能なものだったので、結合を評価した。しかし、2 つとも結合強度を示す値が 5 以下と極めて低く、結合の可能性を認められなかつた。(結合する例は図4 参照) 1 つの例を図3 に示す。

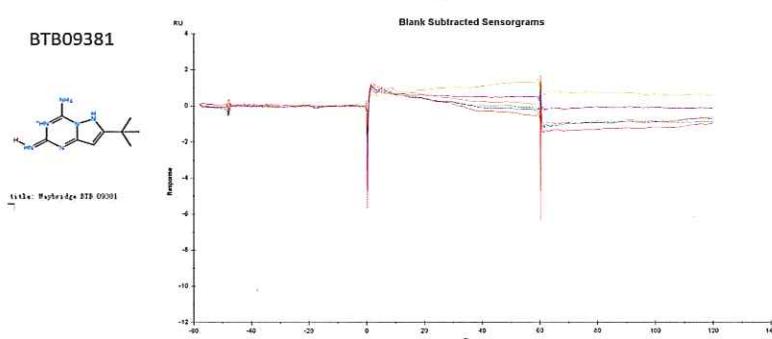


図3 CNOT7 結合候補低分子化合物の評価。左は得られた候補の構造を示している。

CNOT7 の酵素活性は in vitro で測定できるので、少なくとも酵素活性に影響するかどうかも検討したが、この結合活性の結果と一致して、高濃度の設定でも CNOT7 がポリ AR NA を分解する活性を変化させないことも確認された。

### 「Tob に結合する低分子化合物探索」

フラグメントスクリーニング用ライプラリ (化合物濃度 10 mM, 1994 化合物) を用いて、Tob に結合する低分子化合物の探索を行った。このライプラリについて、化合物を溶解している DMSO も含めて DMSO 濃度

5%、化合物最終濃度 200  $\mu$ M となるように 25 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 150 mM NaCl, 10  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 0.005% Tween20 バッファを用いて希釀した。得られた化合物群をプレート(1 プレート 384 ウェル、計 6 枚)に分注し、Tob1N138 を固定化した流路上に流した。この際、コンタクトタイムを 15 秒と比較的短めにとることで、非特異的な結合を防いだ。6 プレート中のうち一つについての結果を例として図 4 に示す。

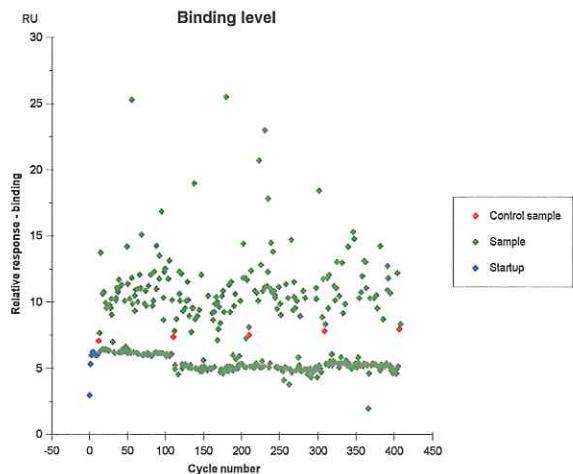


図4 フラグメントスクリーニングの結果

緑点が各化合物サンプルを示し、赤点がネガティブコントロールとして用いた測定バッファを表す。グラフ縦軸は化合物が結合した量に対応する。本研究ではポジティブコントロールが存在しないため、各プレートから結合量上位 5%、なおかつ性質の良い結合を示した化合物を選択した。ここでいう性質の良い結合とは、結合、解離ともに速い結合のことである。(フラグメントスクリーニングの場合、得られる化合物の結合が弱いため、特異的な結合で解離が遅くなることはめったにない)。結果として、約 100 種類の化合物が選択された。次に Tob の機能に何らかの影響を与える目的にかなうものを選別するために、これらの特異的と考えられる結合を示した化合物について競合実験を行い、実際に蛋白質間相互作用を阻害する化合物を選別している段階である。

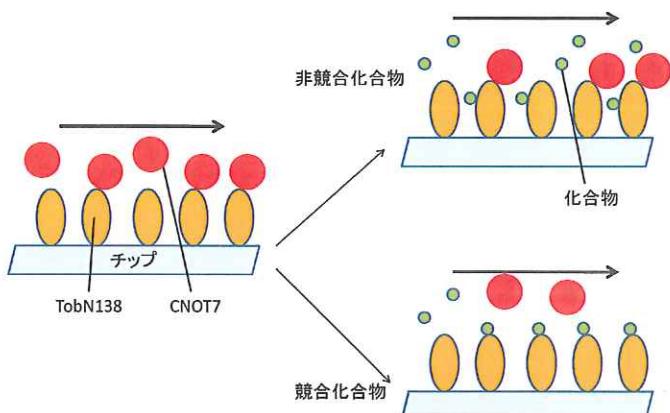
#### <考察>

今回の研究の結果、これまでよりも 100 アミノ酸以上長い組み換え Tob タンパク質を調製することができになり、精製標品も得ることができた。しかし結晶化となると困難な点が多く、今までの研究結果からも C 末端部位の流動性が大きく不利な側面を与えていると考えられた。Tob と CNOT7 の熱力学的相互作用評価した結果、Tob の P Q に富んだ領域が CNOT7 との結合に際し、流動的ではなくなり、しっかりと構造をとる可能性が示唆されている。従って CNOT7 や PABP などの既知の相互作用分子との共結晶を作製することが有力な改善手段と考えられる。C 末端側の役割を考察する上でもその法が望ましいと考えられるので、現在 CNOT7 などとの共結晶化の条件検討を開始している。

Tob、CNOT7 と結合する低分子化合物の探索はデータベースを利用した *in silico* スクリーニングと Biacore を用いた *in vitro* スクリーニングの両方を用いた。*in silico* スクリーニングではより結合部位を限定させて探索できるという利点があり、目的とする低分子の同定が期待された。実際にいくつかの候補が得られたが、それらは結合しないという結果になった。Tob についてもいくつかも候補を得ているが CNOT7 の例を考えると、まずはスクリーニングについて改善をしなければならないかもしれない。さらにデータベース上に 60 万の化合物があるが、水や DMSO などに対する溶解度が考慮されていない点も問題があるかもしれない。同定されたうち、いくつかの低分子化合物は溶解しないためにその後の解析に進められないものも存在した。溶解しやすくなるような改変を加えるなどの手法も視野にいれるべきかもしれない。いずれにせよ、Tob についても得られた最終候補は、化合物が入手でき次第結合の評価

をする必要があると考えている。

一方で BiacoreT200 を用いたフラグメントスクリーニングでは特異的に結合する分子を得ることができた。こちらの解析は非特異的結合に注意することと、結合面を選択することは困難であるため、目的の化合物を得るために何段階かのスクリーニングを行うことに多少の困難は存在するが、あくまで結合がスクリーニングの指標なので、効果的に進める事が出来た。約 2000 の化合物のうち 100 程度 Tob 結合低分子化合物として絞り込むことができ、現在 BiacoreT200 を用いた競合アッセイで CNOT7 との結合を阻害する化合物を探索している段階である。競合アッセイの概念図を参考資料として以下に示す。



参考資料 競合アッセイの概念図

チップ上に Tob(1-138)を固定化した状態で化合物と CNOT7 を同時に流す。競合する化合物の場合は CNOT7 の結合が阻害され、競合しない場合は阻害されない。もし仮に CNOT7 の結合が化合物の結合によって阻害された場合は、CNOT7 は化合物に比べ約 100 倍分子量が大きいため、チップ上にかかる重さを認識する Biacore は CNOT7 単独を流した場合に比べ小さなレスポンスを示すと推測される。

#### <参考文献>

1. Wang H., et al. Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *The EMBO Journal* (2010) **29**, 2566-2576.
2. Horiuchi M., et al. Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *The Journal of Biological Chemistry* (2009) **284**, 13244-13255.
3. Suzuki T., et al. Proteasome-mediated degradation of Tob is pivotal for triggering UV-induced apoptosis. *Oncogene* (2009) **28**, 401-411.
4. Yang X., et al. Crystal structures of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Research* (2008) **36**, 6872-6881.
5. Okochi K., et al. Interaction of anti-proliferative protein Tob with poly(A)-binding protein and inducible poly(A)-binding protein: implication of Tob in translational control. *Genes to Cells* (2005) **10**, 151-163
6. Yoshida Y., et al. Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer. *Genes & Development* (2003) **17**, 1201-1206
7. Suzuki T., et al. Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation. *Genes & Development* (2002) **16**, 1356-1370

作成日：2012年3月14日