

【目的】天然変性たんぱく質 (intrinsically disordered proteins: IDPs) は、細胞内の信号伝達系の調節や過渡的な反応場を形成する液-液相分離構造の構築において中心的な役割を担っており、詳細な機能の解明が求められている。しかし構造情報が乏しく実験的な評価系が未だ確立されていない IDPs の化学生物学的な研究はほとんど行われていない。概日時計転写因子 Bmal1 および Clock は全長の 30%以上が非構造領域を持つ IDPs として知られており、ヘテロ 2 量体を形成し E-box 配列 DNA に結合し概日リズム遺伝子産物 CRY、PER の発現を誘導するたんぱく質である。Bmal1/Clock のヘテロ 2 量体形成を調節する化合物は概日時計機構解明の分子プローブあるいは不眠症等の創薬に向けたリードとして有用と考えられる。本研究では、Bmal1 および Clock の IDP モデルたんぱく質を設計し、両者のヘテロ 2 量体形成を分光学的手法により簡便に検出可能とする、*in vitro* たんぱく質間相互作用 (PPI) 評価系の構築を目指した。さらにこの検出系を基盤とする HTS ライブラリスクリーニングを実施し、Bmal1/Clock 相互作用阻害剤を見出すことを目的とした。

【方法】シミュレーションに基づき Bmal1/Clock の PPIs には直接関与しないと予想した転写活性化領域 (TAD) を両者から除去し、それぞれの N 末端にチオレドキシンおよび His タグを付与した遺伝子組み換え型モデルたんぱく質を設計した。大腸菌を各々のプラスミドで形質転換し、発現誘導、超音波破碎、沈殿の取得、尿素変性、Ni-NTA カラム精製、及び透析による再構成を経て精製した。得られたたんぱく質のヘテロ 2 量体形成は、5'-FAM 修飾 E-Box 配列含有 オリゴ DNA 断片への 2 量体依存的な結合に基づく蛍光偏光強度変化を指標として評価した。この *in vitro* 評価系を用いて約 1,800 個の芳香族系化合物ライブラリのスクリーニングを実施し、蛍光偏光強度の増加を有意に阻害する化合物を探索した。得られたヒット化合物について濃度依存的な阻害活性および選択性を評価した。

【結果】種々の実験条件の最適化を経て遺伝子組み換え型 Bmal1 及び Clock モデルたんぱく質の発現・精製を達成した。蛍光偏光滴定実験の結果、Bmal1/Clock 両者のヘテロ二量体と E-box オリゴ dsDNA が 1 : 1 複合体を形成し、その際の解離定数は文献値と一致することを確認した。この *in vitro* 評価系に基づいた 96 well フォーマット HTS スクリーニングを 1,780 個の芳香環化合物ライブラリに対して実施し、4 種類の基本骨格を有する化合物群に分類される 27 個のヒット化合物を見出した。そのうち化合物 1 について精査した結果、濃度応答的な阻害活性を示すことを明らかにし、また zinc finger の GC Box 結合試験を用いた評価によりその活性は Bmal1/Clock 選択的であることが示唆された。以上より本研究では概日時計転写因子の IDP モデルたんぱく質を用いた分光学的 *in vitro* PPI 評価系を確立し、Bmal1/Clock PPI に選択的な阻害活性を示す低分子化合物を見出すことに成功した。

天然変性たんぱく質概日時計機構転写因子 Bmal1 および Clock

