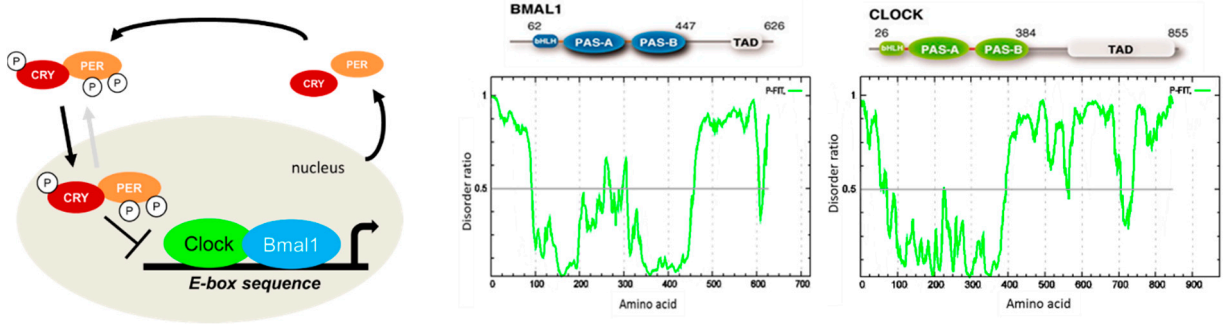
4　非構造性たんぱく質を標的とする化学生物学	大神田　淳子

【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、超音波破砕、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



4. 非構造性たんぱく質を標的とする化学生物学

大神田　淳子

信州大学 学術研究院 農学系

Key words：天然変性たんぱく質，概日時計遺伝子，蛍光偏光結合試験，芳香族低分子ライブラリ

緒　言

天然変性たんぱく質（intrinsically disordered proteins：以下 IDPs）は、ヒトの全たんぱく質の約 40%に存在すると予想されている。最近の研究で IDPs が短寿命なたんぱく質間相互作用（PPIs）［1］や RNA 合成等の反応場を構築する液―液相分離に［2］において重要な役割を果たすことが明らかにされ、その生物学的な役割の解明に高い関心が集まっている［1］。IDPs の構造変換は主として生体分子との相互作用やリン酸化等の可逆的な翻訳後修飾を通じて過渡的に行われるため、結合パートナーの過剰発現や翻訳後修飾酵素活性の変調による IDPs の機能不全ががんや神経変性疾患など多様な疾病の原因となることもわかっており、IDPs は未開拓の新しい創薬標的としても注目されている［3］。したがって、IDPs の構造変化と相互作用を制御する合成化合物は、細胞機能の解明に役立つ化学プローブとして、また新しい創薬を拓くリード化合物としても有用であると期待される。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。

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、IDP 構造解析研究は、もともと結晶構造等の解析が困難であったところ NMR や計算化学によるシミュレーション研究によって端緒についたところである。したがって IDPs 阻害剤を創製するための論理的な手法は未だ見出されていない。加えて IDPs 一般に凝集しやすく実験的な扱いが難しい。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。こうした課題に対し、仮に標的 IDPs の特定の機能を *in vitro* で再現可能なモデルたんぱく質を創出できれば、IDP 指向型阻害剤の創出に向けたツールとして有用であると考えた。そこで、本研究では天然変性概日時計転写因子の Bmal1/Clock のヘテロ 2 量体形成に着目し、両者のたんぱく質間相互作用（PPI）に必要なドメイン構造を有するモデルたんぱく質を設計・創出することを着想した。そしてモデルたんぱく質の 2 量体形成を簡便に評価可能な分光学的 *in vitro* 評価系を確立し化合物スクリーニングに供することで阻害剤のリード化合物を見出すことを目標とした。

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 に結合し概日時計遺伝子産物 CRY、PER の発現を誘導する。概日時計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。また最近の研究においてこの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。

以上の知見を踏まえ本研究では具体的に以下を目標とした。概日時計転写因子である Bmal1、Clock 転写因子を標的 IDP 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大腸菌から発現・精製する方法を確立する。取得した Bmal1、Clock のヘテロ 2 量体形成と続く 5’-FAM 修飾 E-Box 配列含有 オリゴ DNA 断片への結合を、蛍光偏光強度変化を指標として評価する実験系を構築する。構築した評価系を低分子化合物ライブラリスクリーニングに供し、Bmal1/Clock ヘテロ 2 量体形成を阻害する化合物を探索する。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検証し、Bmal1/Clock PPI 阻害剤としての有用性を検討する。見出された化合物は、概日時計調節機構を阻害する分子ツールおよび創薬リードとしての応用が期待される。

方　法

1. IDP モデルたんぱく質の設計

DisProt stability simulation プログラムを用いて Bmal1　(O00327.2) 及び Clock　(O15516.1) の全長アミノ酸配列から構造のゆらぎを予測し、2 量体形成に必要最小限のドメインを残したモデルたんぱく質を設計した。

2. たんぱく質の発現精製

大腸菌 BL21 を作製したベクターを用いて形質転換し培養後 IPTG の添加により発現誘導したのち集菌、超音波破砕したのち、目的たんぱく質を沈殿として取得した。沈殿を尿素を用いて可溶化し、Ni-NTA カラム精製、透析による再構成を経て目的たんぱく質を取得した。

3. 蛍光偏光を用いた DNA 結合試験系の確立

遺伝子組換え型 Bmal1 と Clock のヘテロ 2 量体形成能は、E-Box 2 本鎖 DNA への結合親和性を計測することで評価した。2 本鎖オリゴ DNA は Per2 E-box を含む 20 塩基対であり、アンチセンス鎖の 5’末端に FAM を付与したものを用いた。なお E-Box を含まないオリゴ DNA をコントロールとして用いた。DNA に各種たんぱく質を加え蛍光偏光値（FP）の変化を測定した。結合試験の際に PEG200 を添加し、分子クラウディング環境が会合体形成に与える効果を検討した。

4. 芳香環化合物ライブラリのスクリーニング

芳香族系低分子化合物およびインドール含有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 PPI を阻害する化合物を探索した。96 well プレートに Bmal1、Clock、各化合物を加え、室温で振とうした後、dsDNA を加えて 20 分静止し、蛍光偏光を測定した。有意な阻害活性を示したヒット化合物について濃度依存的な活性試験を実施して再現性を確認した。

結果および考察

1. Bmal1 および Clock モデルたんぱく質の設計・発現・精製と再構成

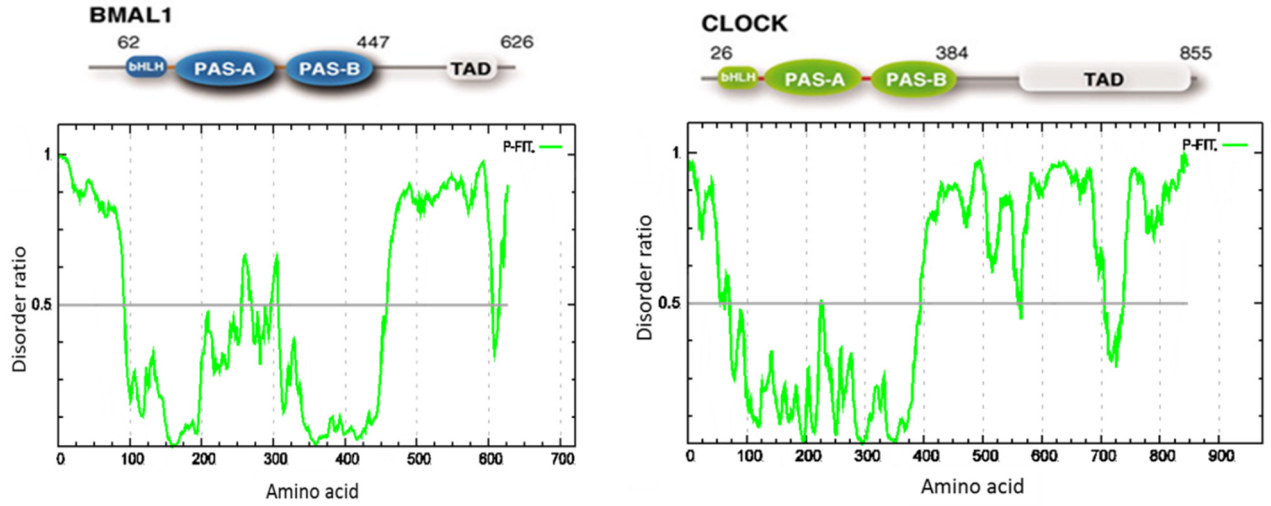


図 1.　Bmal1、Clock 全長配列のゆらぎについてシミュレーションした結果
DisProt プログラム（www.disprot.org）により Bmal1　(O00327.2) 及び
Clock　(O15516.1) について解析した。

ヒト Bmal1、Clock の全長 626、855 アミノ酸残基について DisProt 解析を行った結果、Bmal1、Clock それぞれのおよそ 30%、50%が非構造性領域であることが分かった。特に、Bmal1 の PAS-A の一部、 Clock の PAS-B、および両者の TAD （Trans Activation Domain）が不安定であることが示唆された（図 1）。これまでの研究により PAS-AB ドメイン領域は Bmal1/Clock 間の PPI に重要であることが示唆されている［4］。一方、激しい構造のゆらぎが示唆された TAD ドメインはリコンビナントたんぱく質の扱いを難しくし、また両者の相互作用を観察するうえで必ずしも必要ではないと予想した。そこで bHLH-PASA-PASB 配列の N 末端側に His-tag およびたんぱく質の可溶性を向上させる trx-tag（チオレドキシンタグ）を導入した配列をモデルとし、これらを組み込んだベクターpET29、pET32b を作製した。

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ところ、Bmal、Clock いずれも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、ペレットを 8 M 尿素で可溶化したのち Ni-NTA カラム精製し、濃度勾配をゆるやかにかけた透析によって 24 時間かけて再構成することにより、目的の Bmal1 および Clock をそれぞれ 1 L 培地から 2～3 mg 程度取得することができた。なお Ni-NTA カラム精製の際に分離不可能なたんぱく質の混入が若干認められたが、精製条件は今後の課題として結合試験に進むこととした。

2. 蛍光偏光を用いた DNA 結合試験系の確立

前項で取得した遺伝子組換え型 Bmal1、Clock の 2 量体形成能を、蛍光基 FAM を付与した dsDNA 鎖を用い蛍光偏光（FP）変化を指標とする結合滴定試験によって評価した。実験の結果、Bmal1、Clock のいずれか、もしくは両者の等量混合物を E-box 配列を含まないコントロール DNA に加えた場合、いずれも FP 値の顕著な変化は認められなかった（図 2 左：緑の棒グラフ）。一方、E-box 配列含有 DNA を用いた場合、Bmal1 もしくは Clock のみを加えても FP 値の大きな変化は認められなかったが、両者の等量混合物を加えると顕著な FP 値の増加が観察され、Bmal1 と Clock の 2 量体形成に伴う E-box 選択的な DNA-たんぱく質複合体の形成が示唆された（図 2 左：赤の棒グラフ）。続いて Bmal1、Clock の等量混合物と E-boxDNA の滴定実験を行ったところ、実験結果は 1:1 複合体形成モデルと良く一致し、文献値 （K_d = 58 nM）［4］とほぼ同程度の解離定数（K_d = 36±10 nM）を与えることを確認した（図 2 右）。以上の結果から、本研究で作製した遺伝子組換え型 Bmal1、Clock モデルたんぱく質はヘテロ 2 量体を形成し、E-box 配列選択的な DNA 結合能を有すると結論した。

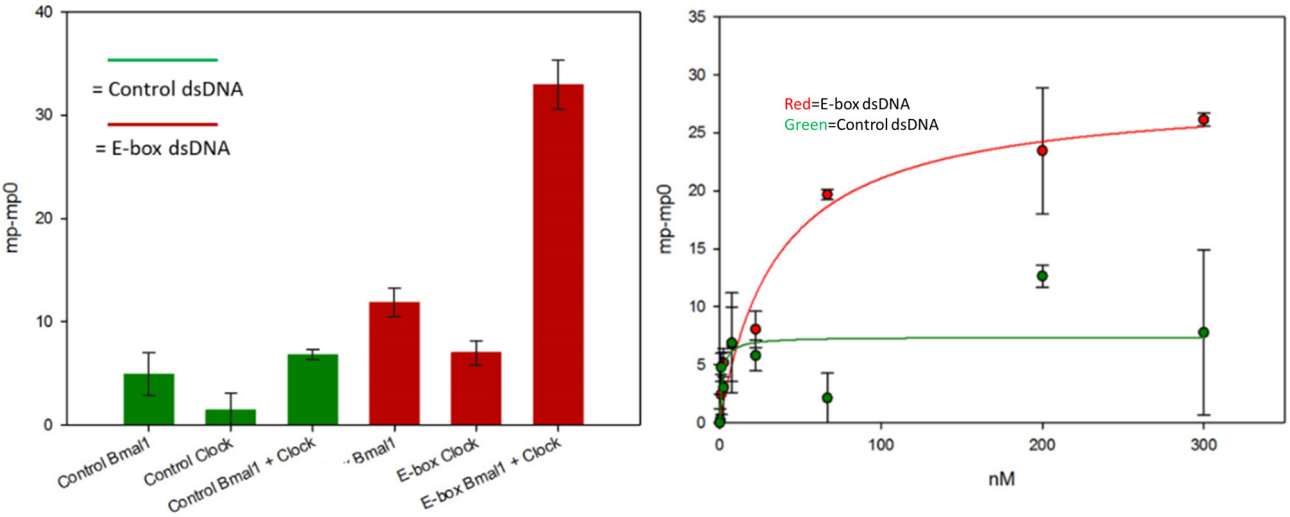


図 2. E-box dsDNA と Bmal1/Clock 間の結合滴定試験の結果

左）各種 dsDNA に Bmal1、Clock、Bmal1/Clock 等量混合物を作用させた場合の FP 値の変化：proteins = 500 nM、dsDNA = 510 nM、10 mM Tris HCl pH8.0、NaCl 150 mM、PEG200 10 %v/v、Ex = 488 nm、Em = 526 nm、r.t.、20 min incubation、n = 3。

右）各種 dsDNA と Bmal1/Clock1 : 1 混合物の結合滴定実験の結果：dsDNA 10 nM、proteins （nM）：300、200、66.7、22.2、7.4、2.5、0.82、0.27、10 mM Tris HCl pH8.0、NaCl 150 mM、PEG200 10 %v/v、or 10 mM Tris HCl pH 8.0、NaCl 150 mM、Ex = 488 nm、Em = 526 nm、r.t.、n = 3。

3. 芳香環化合物ライブラリのスクリーニング結果と考察

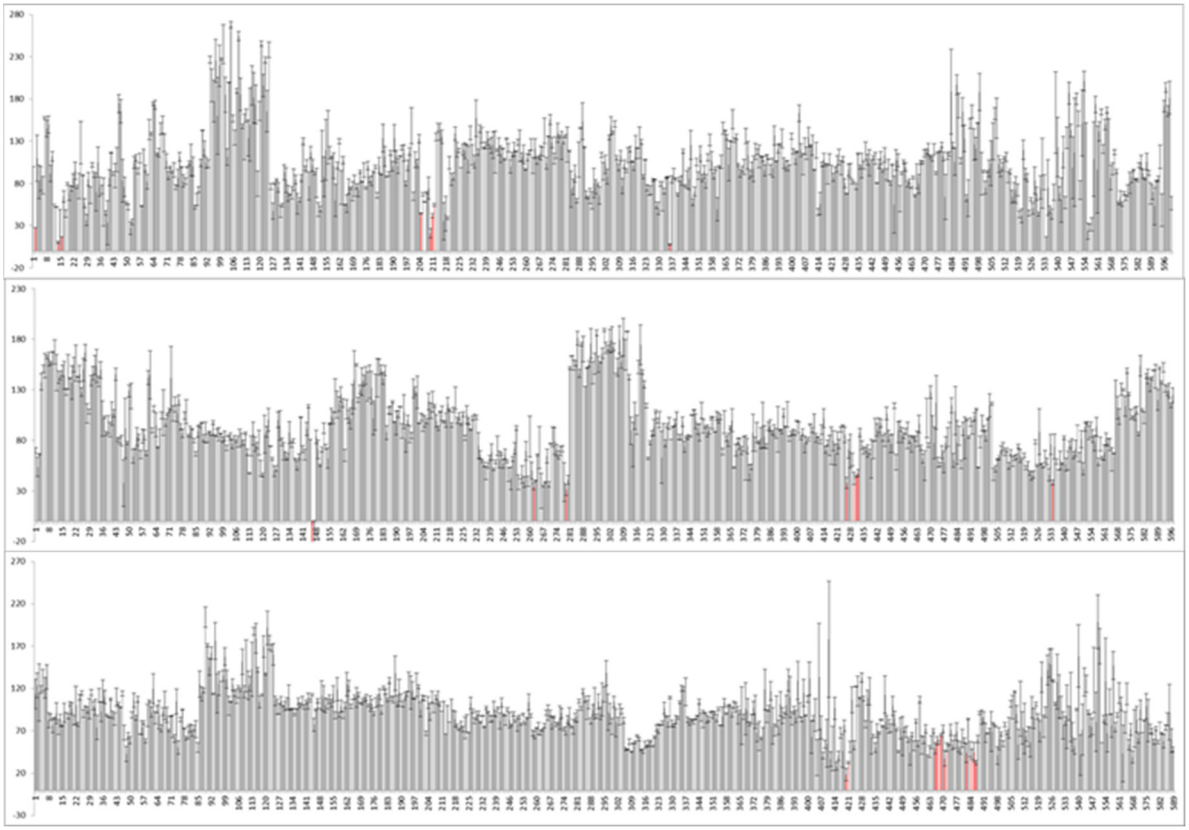


図 3. 化合物ライブラリースクリーニングの結果

含窒素複素環化合物および芳香族系低分子化合物ライブラリ 1,780 個のうち p-value < 0.05 をヒット化合物とした（赤）。Compound: 50 μM、dsDNA 10 nM、proteins 500 nM、10 mM Tris HCl pH8.0、NaCl 150 mM、PEG200 10%v/v、Ex = 488 nm、Em = 526 nm、r.t.、n = 2。

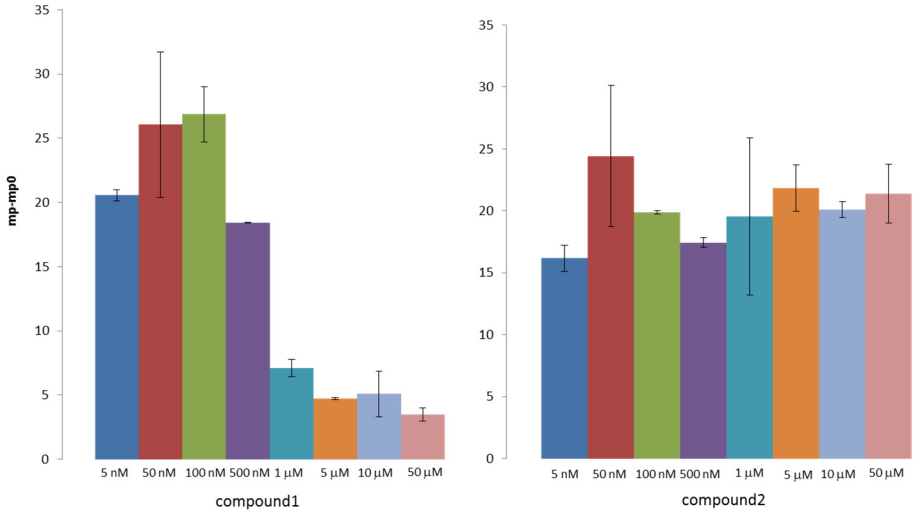


図 4. 化合物 1 および 2 の Bmal1/Clock 結合阻害試験の結果

左）化合物 1　右）化合物 2：dsDNA 10 nM、proteins 500 nM、Compound = 5 nM ～ 50 μM in 10 mM Tris HCl pH8.0、NaCl 150 mM、PEG200 10 %v/v、Ex = 488 nm、Em = 526 nm、n = 3。

前項で確立した Bmal1、Clock の 2 量体形成評価系を用いて、含窒素複素環化合物および芳香族系低分子化合物ライブラリ 1,780 個について 96 well フォーマット HTS スクリーニングを実施した。T 検定により p 値 0.05 未満について FP の有意な減少がみられたと判断し Bmal1/Clock PPI の阻害剤候補ヒット化合物とした（図 3）。その結果、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。

ヒット候補化合物のうち、化合物 1 について化合物濃度依存的な E-box 結合阻害活性を検討した。その結果、化合物 1 は明瞭な濃度依存的な阻害活性を示すことを確認できた一方（図 4 左）、化合物 1 と類似の構造をもつ化合物 2 については全く変化が認められず、この結果から化合物 1 が化学構造依存的に Bmal1 もしくは Clock に結合し両者の 2 量体形成を阻害することが示唆された。また、化合物 1 は zinc finger たんぱく質と DNA の特異的結合に対しては阻害活性を示さなかったことから、DNA 側に結合して Bmal1/Clock 複合体の形成を阻害しているのではないことが示唆された。

以上、本研究では、IDPs モデルとして TAD を除去した Bmal1、Clock たんぱく質の発現と精製を行い、DNA 結合機能を指標とする評価系の構築に成功した。96 well 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ている。本知見を踏まえ、現在ヒット化合物の活性の確認および構造展開を進めている。一方、Bmal1 と Clock モデルたんぱく質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ことがわかった。現在、両者の PPI を直接観測可能なスクリーニング系の開発を検討しており、今後ヒット化合物のより詳細な分子間相互作用解析に生かしていくとともに、有望な化合物については細胞実験を含めた生物評価を行う予定である。また、本助成研究の一環としてジテルペン系天然物誘導体を用いたリン酸化 IDPs 変調剤の開発にも取り組んでおり、興味深い結果が得られつつあることを付記しておく［5］。以上本研究により、遺伝子組換え型 IDP モデルたんぱく質を切り口とする新しい IDP 化学生物学研究に向けた有益な知見を得ることができたと考えている。

共同研究者・謝辞

本報告書に記載の内容は、信州大学農学部の細谷侑佑君（現信州大学総合理工学研究科修士 1 年）の卒業研究の成果である。共同研究者の京都大学化学研究所の今西未来講師、北海道大学大学院理学研究院の鈴木孝紀教授のご協力に深謝します。また化合物ライブラリをご提供くださった京都大学化学研究所の上杉志成教授に感謝します。

文　献

1） Uversky VN. Introduction to intrinsically disordered proteins (IDPs). Chem Rev. 2014 Jul 9;114(13):6557-60. doi: 10.1021/cr500288y.

2） Dignon GL, Zheng W, Best RB, Kim YC, Mittal J. Relation between single-molecule properties and phase behavior of intrinsically disordered proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Oct 2;115(40):9929-9934. doi: 10.1073/pnas.1804177115.

3） Ruan H, Sun Q, Zhang W, Liu Y, Lai L. Targeting intrinsically disordered proteins at the edge of chaos. Drug Discov Today. 2019 Jan;24(1):217-227. doi: 10.1016/j.drudis.2018.09.017.

4） Huang N, Chelliah Y, Shan Y, Taylor CA, Yoo SH, Partch C, Green CB, Zhang H, Takahashi JS. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex. Science. 2012 Jul 13;337(6091):189-94. doi: 10.1126/science.1222804.

5） Ohkanda J, Kusumoto A, Punzalan L, Masuda R, Wang C, Parvatkar P, Akase D, Aida M, Uesugi M, Higuchi Y, Kato N. Structural effects of fusicoccin upon upregulation of 14-3-3-phospholigand interaction and cytotoxic activity. Chemistry. 2018 Oct 26;24(60):16066-16071. doi: 10.1002/chem.201804428.