

DNA 結合タンパク質を標的とした抗がん剤の
新規スクリーニング法の開発

2014

宮城 徹

略語表

AP-1: activator protein 1

DNA: deoxyribonucleic acid

DSE: DNA strand exchange

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediamine- N' , N' , N' , N' -tetraacetic acid

ELSA: enzyme linked immunosorbent assay

EMSA: electrophoresis mobility shift assay

FRET: fluorescece resonance energy transfer

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

TRF1: telomeric repeat-binding factor 1

TRF2: telomeric repeat-binding factor 2

目次

第一章 序論.....	1
第一節 がん治療における分子標的薬.....	1
第二節 DNAとタンパク質の相互作用を標的とした抗がん剤開発の意義と課題.....	1
第三節 従来のスクリーニング法の問題点.....	2
第四節 本研究の目的.....	3
第二章 DSE-FRET 原理と実証.....	4
第一節 DNA鎖交換反応(DSE).....	4
第二節 蛍光共鳴エネルギー転移(FRET).....	4
第三節 DSE-FRETの原理.....	5
第四節 DSE-FRETでのNF- κ B(p50)の検出.....	6
第一項 NF- κ Bについて.....	6
第二項 プローブDNAの設計.....	6
第三項 リンカー配列の比較.....	6
第四項 NF- κ B(p50)の濃度依存的検出.....	9
第五項 NF- κ B(p50)検出の特異性の確認.....	10
第五節 DSE-FRETでのAP-1(c-Jun)の検出.....	11
第一項 AP-1について.....	11
第二項 プローブDNAの設計.....	11
第三項 AP-1(c-jun)の濃度依存的検出.....	12
第四項 AP-1(c-jun)検出の特異性の確認.....	13
第六節 DSE-FRETによるSp1の検出.....	14
第一項 Sp1について.....	14
第二項 プローブDNAの設計.....	14
第三項 Sp1の濃度依存的検出.....	15
第四項 Sp1検出の特異性の確認.....	16
第五項 ミスマッチプローブの設計.....	17
第六項 ミスマッチプローブによるSp1の濃度依存的検出.....	18

第七項	ミスマッチプローブによる Sp1 検出の特異性の確認.....	19
第七節	DSE-FRET による TRF2 の検出.....	20
第一項	TRF2 について.....	20
第二項	昆虫細胞による TRF2 タンパク質の発現と精製.....	20
第三項	プローブ DNA の設計.....	29
第四項	TRF2 Δ B の検出.....	29
第八節	考察.....	32
第一項	タンパク質による鎖交換の停止の一般性について.....	32
第二項	DSE-FRET の実用性について.....	32
第三項	ミスマッチによる鎖交換抑制の増強について.....	32
第三章	NF- κ B 阻害剤スクリーニング系の最適化.....	34
第一節	抗がん剤標的としての NF- κ B.....	34
第二節	スクリーニング系の最適化.....	36
第一項	塩濃度.....	36
第二項	反応液量.....	38
第三項	反応時間.....	41
第四項	タンパク質濃度依存性評価.....	42
第五項	プローブ濃度.....	42
第六項	配列特異性評価.....	45
第七項	化合物評価.....	47
第三節	考察.....	50
第四章	総括.....	51
参考文献	52
謝辞	58

第一章 序論

第一節 がん治療における分子標的薬

古典的な抗がん剤の創薬は、培養がん細胞や腫瘍移植動物を用いたスクリーニングを使用して行われてきた。創薬の過程で得られた医薬品候補物質の作用機序が明らかになる場合もあるが、あくまで後付けの説明であった。しかし、近年、疾患の分子メカニズム研究の発展および技術進歩の恩恵を受け、病態に深くかかわるタンパク質分子を標的とした創薬手法が可能となった。一般的には疾患において変異あるいは過剰発現しているタンパク質を標的とする。標的分子が決定されているので、レポーターアッセイや無細胞系のスクリーニング法を構築して大規模ライブラリーをスクリーニングすることが可能となった。その結果、一部の乳癌で過剰発現している HER2 を標的としたトラスツズマブ(ハーセプチン)、慢性骨髄性白血病などでみられる異常融合タンパク質 Bcr-Abl を標的としたイマチニブ(グリベック)、多くの固形癌で過剰発現している EGFR を標的としたセツキシマブ(アービタックス)、EGFR 経路のチロシンキナーゼを標的としたゲフィニチブ(イレッサ)、多発性骨髄腫でプロテアソームを標的としたボルテゾミブ(ベルケイド)などが市販され、高い効果を上げているものもある。

分子標的薬は、がん細胞に特異的・特徴的に発現するタンパク質を標的とすることで、効果的かつ副作用が少ないというメリットがあるため、創薬において重要な位置を占めている。

第二節 DNA とタンパク質の相互作用を標的とした抗がん剤開発の意義と課題

転写因子に代表される DNA 結合タンパク質は、細胞の性質の決定に関わる中心的なタンパク質であり、iPS 細胞の作製に必要な山中ファクターが4つすべて転写因子であることは象徴的にこのことを表している。多くの疾患で転写因子の発現亢進が報告されており、がんではその発生・進展あるいは抗がん剤耐性に転写因子が関わっていると考えられている。実際に、転写因子を標的とした抗がん剤開発が進められており、実用化には至っていないものの、*in vivo* あるいは動物モデルにおいてがん細胞の死滅あるいは増殖抑制効果のある化合物が多く報告されている¹⁻⁴。また、転写因子以外の DNA 結合タンパク質では、テロメア結合タンパク質(TRF2)のがん細胞での発現亢進などが報告されている⁵。

がん細胞で発現亢進している DNA 結合タンパク質を標的とする抗がん剤開発の戦略としては、間接的に上流シグナル経路を阻害するものと、直接的に DNA 結合タンパク質に結合して阻害するものがある。後者は、標的分子そのものを阻害するのであるから、効果と特異性が高いと期待されるが、一般的には転写因子(核内受容体を除く)のように低分子リガンドの結合部位を持たないタンパク質を標的とした特異的阻害剤の開発は難しいと考えられてきた⁶。

そこで、転写因子の結合配列を有する二本鎖 DNA(デコイオリゴ)の薬剤化の試みがなされ⁷、NF- κ B を標的分子としたアトピー性皮膚炎治療薬の第 II 相試験でヒトで改善傾向が認められるに至った⁸。しかしながら、デコイオリゴは分子が大きいため薬剤の送達が課題であり、製剤化の問

題により治験が遅れている⁹。

薬剤送達の問題が少ない低分子化合物による転写因子の DNA 結合阻害剤の開発については、近年になって報告がされてきている。承認に至った例はまだないが、第 II 相試験中のものに抗リウマチ薬の T-5224 (富山化学)がある。T-5224 は、炎症に関わる転写因子である c-Fos/activator protein-1 (AP-1)を特異的に阻害する低分子化合物で、AP-1 の立体構造に基づいた薬剤設計によって見出された¹⁰。また、抗がん剤としては前臨床段階にある IS3 295 がある¹¹。これは、転写因子 STAT3 の DNA 結合を阻害するプラチナ製剤で、NCI2000 diversity setを EMSA(Electrophoresis Mobility Shift Assay)法でスクリーニングすることで得られた。さらに、動物実験レベルではあるが、抗がん剤候補化合物である DHMEQ¹²は、構造的に非常に近いタンパクである NF- κ B (p50)と NF- κ B (p52)のうち、前者にのみ特異的に結合することが報告されており、高い特異性を持った阻害剤の開発が可能であることを示している。これらの例で証明されたように、タンパク質の DNA 結合を阻害する低分子剤を取得することは可能であるが、チロシンキナーゼ阻害剤などと比べるとその成功例は少ない。この原因の一つとして、DNA-タンパク質相互作用阻害剤の大規模スクリーニングに適したアッセイ系が存在しなかったことが考えられる。

第三節 従来のスクリーニング法の問題点

DNA-タンパク質相互作用を解析する方法で最も一般的なものは、EMSA(ゲルシフトとも呼ばれる)法である¹³。これは、DNA にタンパク質が結合すると、電気泳動における易動度が変化することを利用した方法である。特殊な機器や試薬を必要としないこと、抗体を使用すれば特異性の確認ができる(スーパーシフト)ことなど、優れた方法であるが、電気泳動を行うことからスループットは低い。

従来法で最もスループットが高いのは ELSA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)である¹⁴。プラスチック担体に DNA を固相化し、標的のタンパク質と反応させる。DNA に結合したタンパク質は抗体を用いて検出する。一般的に 96 ウェルマイクロプレートでの実施が可能であることから自動化に適しているが、洗浄操作が必要なため、そのスループットは大規模ライブラリーのスクリーニングには十分ではない。また、特異性の高い抗体が必要で、汎用性とコスト面で問題がある。転写因子に限定すれば、レポーター遺伝子を導入した細胞を用いたレポーターアッセイが一般的に行われている。96 ウェルマイクロプレートでのアッセイも可能であるが、細胞を用いるため手間とデータの安定性に課題が残る。

これら従来法の欠点を克服する方法として以下に述べるようなホモジニアスな方法が提案されているが、現在のところ、これらの方法によって抗がん剤スクリーニングに成功したという報告はない。

Heyduck らは、タンパク質が結合した場合にのみ連結される DNA プローブによるホモジニアスな方法を考案している¹⁵。しかし、Wang らや Jantz らが指摘するように^{16,17}、この方法は DNA プロ

ープの設計が煩雑であり、さらに、離れた二箇所の配列に結合しうる DNA 結合タンパク質での使用に限定されるという問題がある。

Wang らは、エキソヌクレアーゼ III を利用して、DNA 結合タンパク質を検出できるホモジニアスな方法を発表している¹⁶。しかしながら、Wang ら自身が指摘しているように、エキソヌクレアーゼ III を利用した方法は弱い結合の DNA 結合タンパク質の検出には不向きである。さらに、薬物のスクリーニングにおいては、被検物質のエキソヌクレアーゼ III への作用を常に考慮する必要があり、解析が煩雑になる。さらにエキソヌクレアーゼ III 活性の品質管理も必要となる。

Kobayashi らは、蛍光相関分光法を用いて、DNA 結合タンパク質をホモジニアスに検出している¹⁸。しかし、この方法は核酸単独と核酸-タンパク質複合体の大きさの違いを認識するものであり、小さいタンパク質では十分なシグナル/ノイズ比が得られない。さらにこの方法には特殊な機器が必要であるため汎用性が高いとはいえない。

第四節 本研究の目的

本研究では、大規模ハイスループットスクリーニング (HTS) に使用可能なアッセイ系の開発を目的として、DSE-FRET (DNA Strand Exchange - Fluorescence Resonance Energy Transfer) 法を開発した。本法は、転写因子などの DNA 結合タンパク質を標的とした治療薬開発を加速化させるものである。

第二章 DSE-FRET 原理と実証

第一節 DNA 鎖交換反応(DSE)

DNA の鎖交換反応(DNA Strand Exchange; DSE)は、異なる二つの二本鎖 DNA 間で DNA 鎖の交換が行われる現象で、染色体の相同組換えにおいてみられる。Thompsonらは *in vitro*において DSE が自発的かつ速やかに生じることを報告している¹⁹。この *in vitro* での鎖交換は、ヒストン八量体や転写因子 p53、テロメア結合タンパク質 TRF1 および TRF2 の結合によっても停止することが報告されている²⁰⁻²²。ヒストン八量体と結合する DNA は 147bp であり、一般的な転写因子の結合部位と比べると非常に長い。また、p53 による鎖交換停止は、DNA 分岐構造への結合活性によるものと考えられていた。TRF1 および TRF2 は、テロメア末端構造の維持に関与しており、DNA 構造の安定化はその機能の一部であると考察されている。つまり、タンパク質結合による鎖交換停止は一部のタンパク質のみで生じる特殊な現象であると考えられていた。

しかし、鎖交換が二本鎖 DNA 間に塩基の相違がある場合にも停止することが報告されている²³ことから、本研究では、一般的な転写因子の結合でも鎖交換が停止するとの仮説を立て、鎖交換停止を指標にして DNA-タンパク質相互作用を検出する方法の開発を行った。

第二節 蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)

鎖交換の進行度の検出には、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET; Fluorescence Resonance Energy Transfer)現象を利用した。FRET は、蛍光物質(供与体)を励起した際に、近隣の物質(受容体)にエネルギーが転移する現象である。転移したエネルギーは、受容体が蛍光物質ならば蛍光(励起した蛍光物質の蛍光よりも長波長となる)となり、蛍光物質でなければ熱となり消光される。前者を FRET と呼び、後者を消光(quenching)と呼んで区別する場合もあるが、本研究においては後者を含めて FRET としている。FRET の効率 η は、供与体と受容体の距離の 6 乗の関数として距離とともに急速に減少する。これを利用して、ホモジニアスアッセイに広く利用されている²⁴。DNA 二本鎖の検出に利用できる蛍光物質と消光物質の組み合わせについては、Marras らの報告に詳しい²⁵。

第三節 DSE-FRET の原理

DSE-FRET の原理を図 2-3-1 に示した。一方の末端に一本鎖部分を持つ部分二本鎖 DNA (Duplex1) と、二本鎖部分が Duplex1 と相同で一本鎖部分が Duplex1 の一本鎖部分と相補的な部分二本鎖 DNA (Duplex2) を混合する。Duplex1 と Duplex2 は一本鎖部分で会合して十字構造の四量体を形成する。Duplex1 と Duplex2 間で自然に鎖交換反応が生じ、やがて四量体が分離して二本の完全二本鎖 DNA となる(図 2-3-1A)。完全二本鎖 DNA 間での鎖交換はほとんど生じないため、ここで一連の反応が終わる。最終産物である完全二本鎖 DNA の蓄積量を計測するために、Duplex1 を形成する DNA 鎖のうち一方は二本鎖側の末端を蛍光物質で標識し、もう一方の鎖は消光物質で標識する。これにより Duplex1 単独では消光状態となる。しかし、Duplex2 との間で鎖交換が生じると、蛍光物質と消光物質は別々の完全二本鎖 DNA へ分配されるので蛍光値が上昇する。一方で、Duplex2 を加える前にタンパク質が Duplex1 に結合すると、四量体の分離が起きず、消光状態が維持される(図 2-3-1B)。DNA 結合タンパク質の阻害剤が存在すると図 2-3-1A と同じく鎖交換反応が進んで蛍光が発せられる。

なお、消光物質の位置を Duplex2 末端に変更すれば、鎖交換によって消光する系(Duplex1 の残量を計測する系)を組むこともできる。この系ではタンパク質結合によって蛍光値が高く維持され、阻害剤によって蛍光値が低下する。

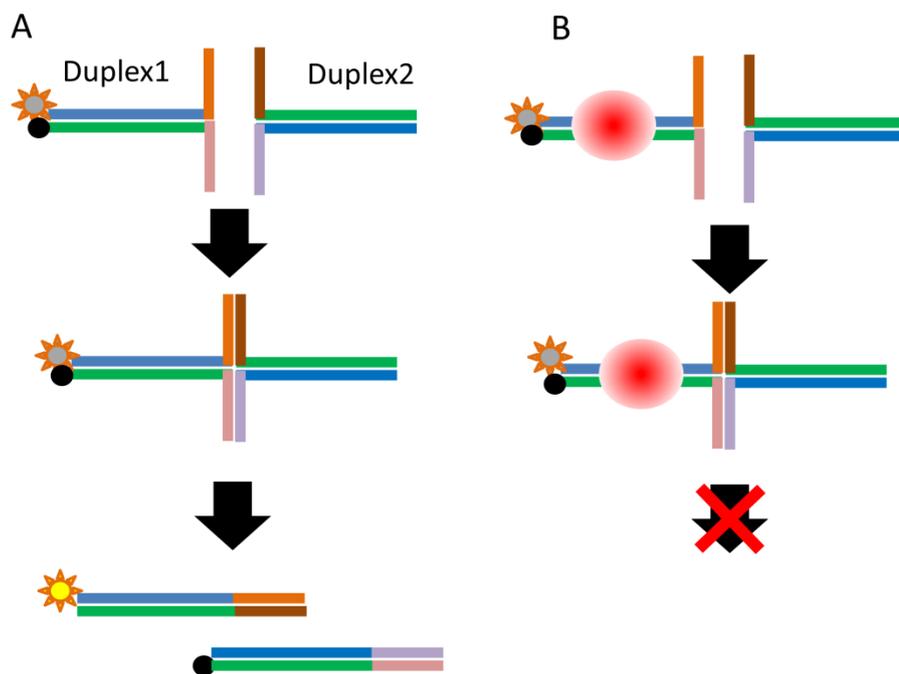


図 2-3-1 DSE-FRET の原理

第四節 DSE-FRET での NF- κ B(p50)の検出

第一項 NF- κ B について

DSE-FRET が思惑通り機能することを確認するため、転写因子 NF- κ B(p50)を用いて検討を行った。NF- κ B は Rel ファミリーに属する DNA 結合配列を持つ転写因子で、NF- κ B 結合配列 GGGACTTTCC に結合する。NF- κ B のコンポーネントには、p50、p52、p65(RelA)、RelB などがあり、主にヘテロダイマーを形成して DNA に結合するが、ホモダイマーでも結合することができる。本実験では組換えヒト p50 ホモダイマー(分子量 94kDa)を用いた。

第二項 プローブ DNA の設計

リンカー(一本鎖)部分の長さは、in vitro で鎖交換を検出する Yang らの報告²⁶で 20 mer、Mckinney らの報告²⁷で 9mer であったことを参考にして 15 mer とした。自己高次構造を形成しないように配慮して 4 組を設計した。

二本鎖部分の配列は、Chen らの報告²⁸を参考にしたが、合成 DNA の品質を考慮して、全長が 50 mer 以下になるように 35 mer に短縮した。

蛍光標識は最も一般的なフルオレセイン(6-FAM)を採用した。消光物質はフルオレセインとの組み合わせで一般的な Dabcyl とした。

NF κ B-01-5F : 5' 6FAM-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGCGACTCACTATAGGcggtgtctcgcctcgc 3'

NF κ B-02-3D : 5' gcgagcgagacaccgCCTATAGTGAGTCGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT -Dabcyl 3'

NF κ B-03 : 5' AGTTGAGGGGACTTTCCAGGCGACTCACTATAGGgccacagagcgagcg 3'

NF κ B-04 : 5' cgctcgcctctgtggcCCTATAGTGAGTCGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT 3'

NF κ B-11-5F : 5' 6FAM-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGCGACTCACTATAGGgtggttggttaaggg 3'

NF κ B-12-3D : 5' cccttaccacaaccac CCTATAGTGAGTCGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-Dabcyl 3'

NF κ B-13 : 5' AGTTGAGGGGACTTTCCAGGCGACTCACTATAGGcaccacaccattccc 3'

NF κ B-14 : 5' gggaaatggtgtggtgCCTATAGTGAGTCGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT 3'

下線部は NF κ B 結合配列であり、小文字は二量体において一本鎖になるリンカー配列である。

なお、蛍光標識 DNA は日本バイオサービスに発注した。非標識 DNA は日本遺伝子研究所に発注した(以下すべて同じ)。

第三項 リンカー配列の比較

2 種類の合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ 20 μ l の二量体形成溶液(10 mM HEPES-NaOH (pH7.9)、50 mM KCl、30 mM NaCl、0.1 mM EDTA、2.5 mM DTT、10% Glycerol、0.05 % CA-630)中に混合して、加熱変性とアニーリングによって二本鎖 DNA (01F/04、01F/14、11F/04、11F/14、02D/03、02D/13、12D/03、12D/13、01F|02D、11F|12D。数字は上記合成ヌクレオチド名の下2ケタ。"/"は部分二本鎖を、|"は完全二本鎖を示す。)を調製した。合成オリゴヌクレオチドは全て

20 pmol 使用した。

加熱変性とアニーリングは以下の温度条件で行った。

95°C 120 秒 - 90°C 30 秒 - 85°C 90 秒 - 80°C 90 秒 - 77°C 90 秒 - 75°C 90 秒 - 72°C 90 秒 - 70°C 90 秒 - 67°C 90 秒 - 65°C 90 秒 - 62°C 90 秒 - 60°C 90 秒 - 57°C 90 秒 - 55°C 90 秒 - 52°C 90 秒 - 50°C 90 秒 - 47°C 90 秒 - 45°C 90 秒 - 42°C 90 秒 - 40°C 90 秒 - 37°C 90 秒 - 35°C 90 秒 - 32°C 90 秒 - 30°C 90 秒

0.28 pmol の duplex1 (01F/04 あるいは 01F/14) を 20 μ L の反応溶液 (12 mM HEPES-NaOH pH7.9、50 mM KCl、0.1 mM EDTA、30.5 mM DTT、11 % glycerol、0.06 % CA-630、5 mM NaCl、0.05 mM PMSF、1 μ M ZnSO₄) で希釈し、NF κ B 結合溶液 (10 mM HEPES-NaOH pH7.9、50 mM KCl、0.1 mM EDTA、25 mM DTT、10 % glycerol、0.05 % CA-630) で希釈した 2.8 μ L (0.28 pmol) の duplex2 (02D/03 あるいは 02D/13) を加えた後、30°C で反応させた。蛍光値の測定は、リアルタイム PCR 装置ロータージェン 2000 (コルベットライフサイエンス社) を用いた。

01F/04、01F/14、11F/04 および 11F/14 は、NF κ B-01-5F に導入されたフルオレセインによって蛍光を発する。しかし、それぞれ 02D/03、02D/13、12D/03 および 12D/13 と混合して鎖交換が生じ、完全な二本鎖二量体 01F|02D および 11F|12D に変換されるとフルオレセインは DABCYL によって消光される。したがって蛍光値の低下によって、鎖交換を検出することができる。

鎖交換検出の結果を図 2-4-1 に示した。部分二本鎖プローブを混合すると、蛍光値は経時的に低下した。01F/14D と 02D/13 の組み合わせが最も効率が高く、蛍光物質のないブランクと同レベルまで低下した。

なお、01F/04 と 03/02D の組み合わせで鎖交換効率が低かった原因を解析したところ、以下に示すように、NF κ B-01-05F のリンカー 3' 側 7 塩基と NF κ B-03 のリンカー 3' 側 7 塩基が相補的であることがわかった。

NF κ B-01-5F : 5' CGGTGTCTCGCTCGC 3'

NF κ B-03 : 3' GCGAGCGAGACACCG 5'

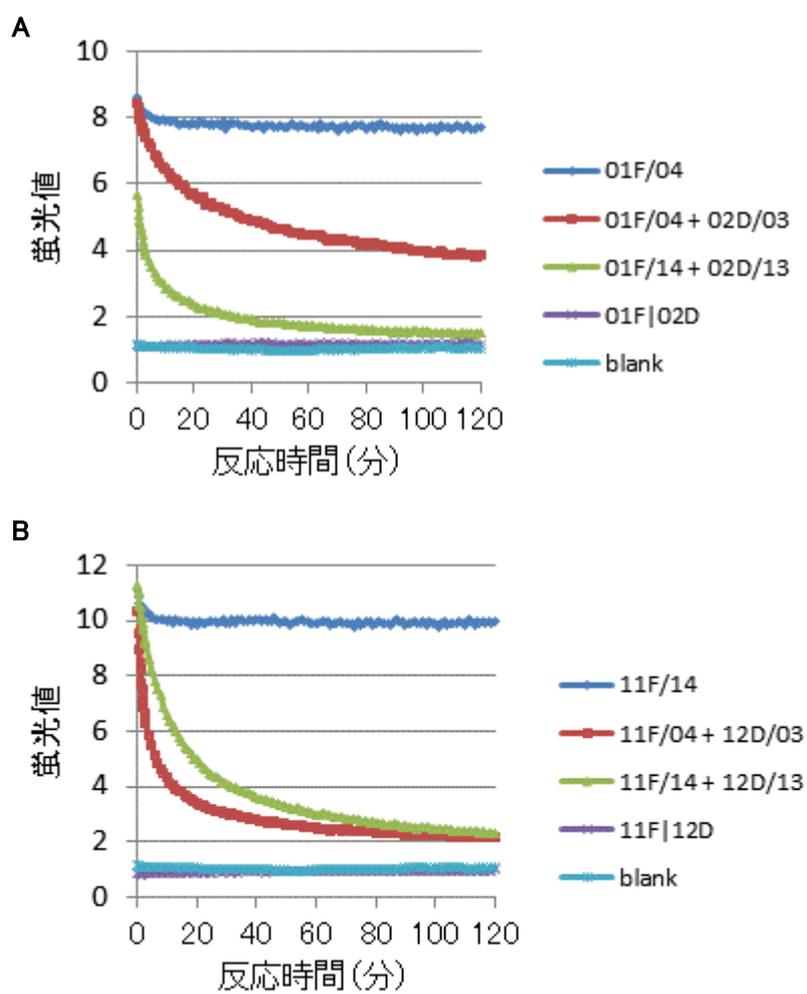


図 2-4-1 DSE-FRET の蛍光値経時変化

第四項 NF- κ B(p50)の濃度依存的検出

0.28 pmol の duplex1(01F/14)と組み換えヒトNF κ B p50(プロメガ社)を20 μ L の反応溶液(10 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 10% glycerol, 0.05% Igepal CA-630)中に混合し、25°Cで30分間反応させた。その後氷上で5分間静置し、NF- κ B結合溶液(10 mM HEPES-NaOH pH7.9, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 10% glycerol, 0.05% CA-630)で希釈した2.8 μ L(0.28 pmol)のduplex2(02D/13)を加えた後、30°Cで11分間反応させた。蛍光値の測定は、リアルタイムPCR装置ロータージェーン2000(コルベットライフサイエンス社)を用いた。

01F/14は、NF κ B-01-5Fに導入されたフルオレセインによって蛍光を発する。しかし、01F/14を02D/13と混合して鎖交換が生じ、完全な二本鎖二量体01F|02D(NF κ B-01-5FとNF κ B-02-3D)と13|14(NF κ B-13とNF κ B-14)になると、フルオレセインはNF κ B-02-3DのDABCYLによって消光される。したがって蛍光値の低下によって、鎖交換を検出することができる。つまり、タンパク質の結合によって鎖交換が阻害されると、タンパク質の結合がない場合と比べて蛍光値は上昇する。

実際に図2-4-2に示したように、NF- κ B(p50)濃度に依存した蛍光値の上昇が観察された。

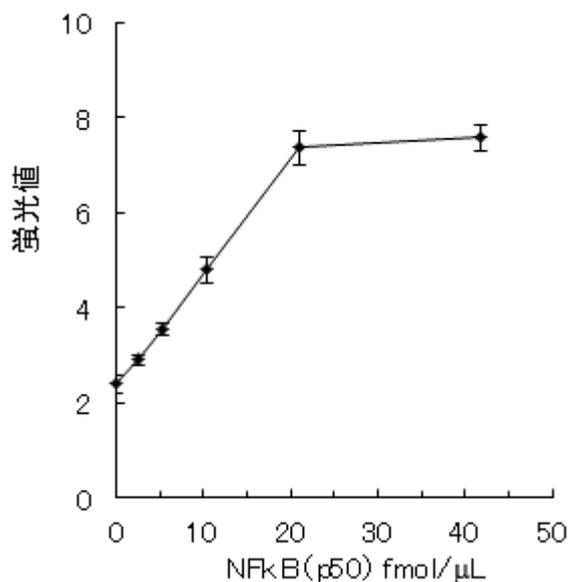


図2-4-2 DSE-FRETによるNF- κ B(p50)の検出

第五項 NF- κ B(p50)検出の特異性の確認

コンペティターを用いて、DSE-FRET による p50 検出の配列特異性を検証した。

NF- κ B 結合配列を持つ合成オリゴヌクレオチド NFcpt01 と NFcpt02、NF- κ B 結合配列を持たない合成オリゴヌクレオチド APcpt01 と APcpt02 をそれぞれ混合してデコイオリゴ二量体 NFcpt と APcpt を調製した。

コンペティターDNA の配列を以下に示す。NFcpt01 と 02、APcpt01 と 02 のそれぞれの組で二本鎖を形成させて用いた。

NFcpt01: 5' GCACTAGGGACTTTCCGCCACG 3'

NFcpt02: 5' CGTGGCGGAAAGTCCCTAGTGC 3'

APcpt01: 5' GGTGTCATGAGTCAGCTCGGAG 3'

APcpt02: 5' CTCCGAGCTGACTCATGACACC 3'

下線部は NF- κ B 結合配列である。

1.68 pmol のデコイオリゴ二量体と 0.42 pmol の duplex1(01F/14D)、および 1.58 pmol の組み換えヒト NF κ B p50(プロメガ社)、0.42 pmol の duplex2(02/13)を 34.2 μ L の NF κ B 反応溶液中(第四項と同じ)に混合した後、30°Cで 21 分間反応させた。蛍光値の測定はリアルタイム PCR 装置ロータージーン 2000(コルベットライフサイエンス社)を用いた。

図 2-4-3 に示したように、NF- κ B 結合配列をもつデコイオリゴ二量体(NFcpt)で特異的に NF- κ B(p50)の結合が阻害された。

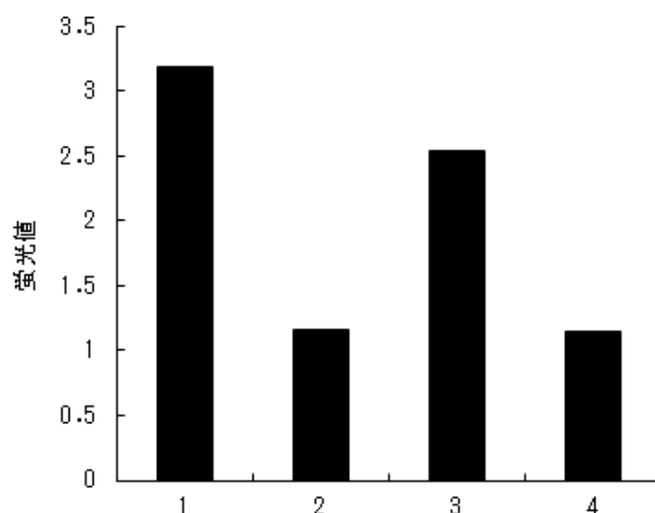


図 2-4-3 コンペティターDNA による特異性確認

1: NF κ Bp50 タンパク質 0 nM

2: NF κ Bp50 タンパク質 46.2 nM

3: NF κ Bp50 タンパク質 46.2 nM、NFcpt 49.1 nM

4: NF κ Bp50 タンパク質 46.2 nM、APcpt 49.1 nM

第五節 DSE-FRET での AP-1(c-Jun)の検出

第一項 AP-1 について

DSE-FRET で、組み換えヒト AP-1(c-Jun)タンパク質による鎖交換反応阻害の検出を試みた。

AP-1 は c-Jun と c-Fos で形成されるヘテロダイマーの転写因子で、ロイシンジッパー型の DNA 結合モチーフを持ち、AP-1 結合配列(たとえば TGAGTCA)に結合する。c-Jun のホモダイマー(80 kDa)も DNA 結合活性を持つ。

第二項 プローブ DNA の設計

合成オリゴヌクレオチドの配列を以下に示す。

AP-15T : TAMRA- 5' CCTGTCGCTTGATGAGTCAGCCGGAAagggaatggacaggtt 3'

AP-28B : 5' cggtcagagagtagcct TTCCGGCTGACTCATCAAGCGACAGG 3' BHQ1

AP-36 : 5' aacctgtccattccc TTCCGGCTGACTCATCAAGCGACA 3'

AP-21 : 5' CCTGTCGCTTGATGAGTCAGCCGGAA aggctactctctgaccg 3'

二本鎖部分は市販の EMSA 用 DNA(プロメガ社)を参考にした。ただし、Fos/Jun 複合体は DNA 結合により DNA を曲げる(bend する)ことが報告されているため²⁹、末端の安定性を考慮して 5 mer 追加して 26 mer とした。

NF- κ B の系では鎖交換によって消光するシステムであったが、AP-1 では鎖交換によって発光するシステムを試した。蛍光標識は、フルオレセイン以外でも可能なことを確認するため、TAMRA を用いた。消光物質は BHQ1 を用いた。

下線部は AP-1 結合配列。小文字はリンカー配列。リンカー配列は、NF- κ B とは異なる配列を設計した。

図 2-5-1 に示すように、上記の DNA セットでも NF- κ B のセットと同様に速やかに鎖交換が進行した。蛍光値は 15T/28B と 21/36 を混合してから 30 分間で速やかに上昇し、その後緩やかに、最終生成物モデル(15T|36)のレベルに近づいた。

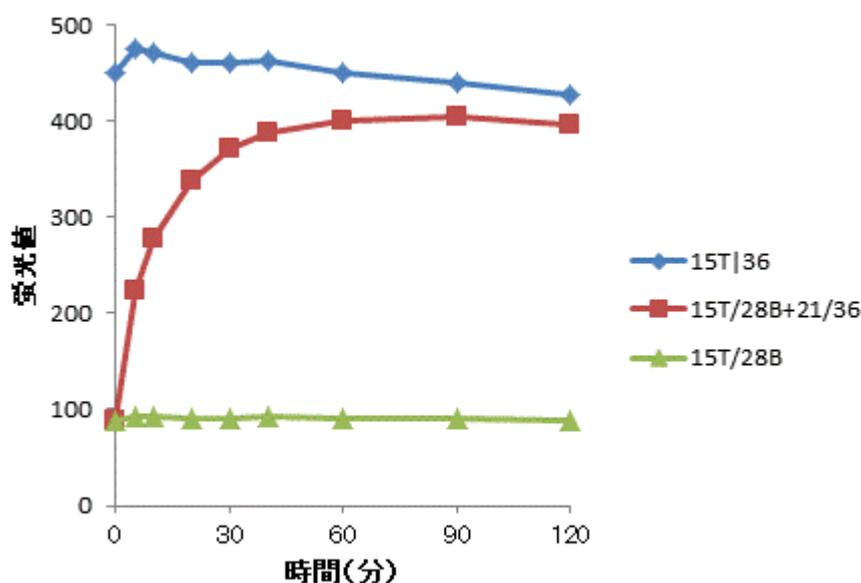


図 2-5-1 AP1 プロブセットの鎖交換

第三項 AP-1(c-Jun)の濃度依存的検出

96 ウェル(half-area)マイクロプレートで、5 μ L の 5 nM duplex1(15T/28B)と 40 μ L の組み換えヒト c-Jun タンパク質(プロメガ社)を反応溶液(10 mM Tris-HCl [pH7.5], 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 4% glycerol, 1 mM MgCl₂, 0.05% Igepal CA-630)中で混合し、室温で 30 分間反応させた。5 μ L の duplex2(50 nM 21/36)を添加し、室温で 30 分静置したのち蛍光値を蛍光マイクロプレートリーダー(Ultra、テカン社)で測定した(励起 535 nm、検出 595 nm)。

図 2-5-2 に示したように、c-Jun 濃度に依存した蛍光値低下が確認できた。

蛍光値の低下(鎖交換の抑制)は、7.5 nM まで速やかに低下した。0.5 nM のプローブに対して、18.7~37.5 nM でほぼ鎖交換がほぼ完全に抑制された。

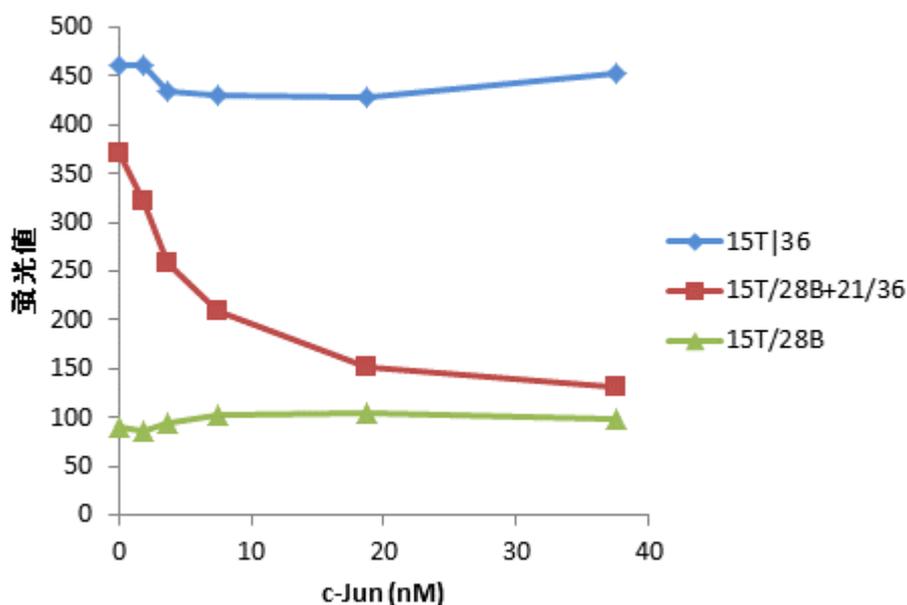


図 2-5-2 DSE-FRET による AP-1(c-Jun)の検出

15T|36: 最終産物のモデル

15T/28B+21/36 : 鎖交換反応

15T/28B: ベースライン

c-Jun 濃度はホモ二量体換算で、終濃度(50 μ L): 1.9 nM, 3.8 nM, 7.5 nM, 18.7 nM, 37.5 nM。

第四項 AP-1(c-Jun)検出の特異性の確認

コンペティターを用いて、DSE-FRET による c-Jun 検出の配列特異性を検証した。

AP-1 結合配列を持つ合成オリゴヌクレオチド AP_{cpt}05 と 06、AP-1 結合配列に変異を導入した AP_{cpt}07 と 08 をそれぞれ混合して、特異的コンペティター Ac05|06 と非特異的コンペティター Ac07|08 を調製した。

コンペティターDNA の配列を以下に示す。

AP_{cpt}05 : 5' CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA 3'

AP_{cpt}06 : 5' TTCCGGCTGACTCATCAAGCG 3'

AP_{cpt}07 : 5' CGCTTGAAGCGACTGCCGGAA 3'

AP_{cpt}08 : 5' TTCCGGCAGTCGCTTCAAGCG 3'

下線部が AP1 結合配列で、赤字は変異導入部分である。

図 2-5-3 に示したように、特異的コンペティター (Ac05|06) でコンペティター濃度依存的に蛍光値が上昇した。50 nM ではほぼ c-Jun 未添加 (c-Jun-) と同レベルまで蛍光値が回復した。つまり、c-Jun による鎖交換抑制がほぼ完全に解除された。一方で、AP1 結合配列に変異を導入したコンペティター (Ac07|08) では、蛍光値の上昇がみられなかった。

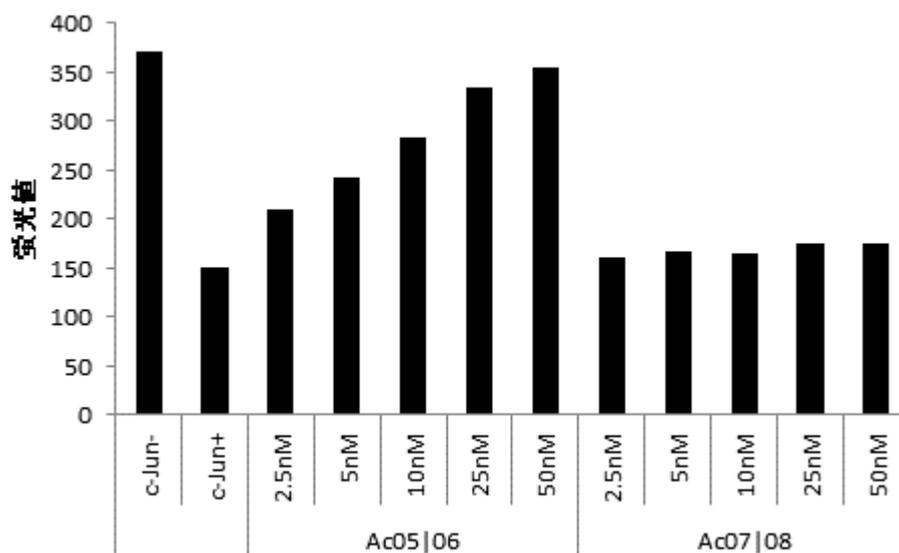


図 2-5-3 コンペティターDNA による特異性確認

DSE-FRET にコンペティターDNA (2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM) を添加し、c-Jun (18.8 nM, ホモ二量体換算) による鎖交換抑制の阻害への影響を調べた。

第六節 DSE-FRET による Sp1 の検出

第一項 Sp1 について

DSE-FRET で、組み換えヒト Sp1 タンパク質による鎖交換反応阻害の検出を試みた。

Sp1 は Zn フィンガー型の DNA 結合モチーフを持つ 93kDa の転写因子で、Sp1 結合配列(例えば GGGGCGGGGC)に結合する。NF- κ B(p50)と AP-1(c-Jun)が二量体を形成して DNA に結合するのに対し、Sp1 は単量体で結合する^{30, 31}。

第二項 プローブ DNA の設計

合成オリゴヌクレオチドの配列を以下に示す。

SP-05-5C3 : 5' Cy3- ATTCGATCGGGGCGGGGCGACGAGCggaatggacaggtt 3'

SP-08-3B1 : 5' cggtcagagagtagcctGCTCGTCGCCCCGCCCGATCGAAT -BHQ1 3'

SP-07 : 5' ATTCGATCGGGGCGGGGCGACGAGCaggctactctctgaccg 3'

SP-06 : 5' aacctgtccattcccGCTCGTCGCCCCGCCCGATCGAAT 3'

二本鎖部分は市販の EMSA 用 DNA(プロメガ社)を参考にした。リンカー配列は AP-1 と同じものとした。AP-1 と同様に、鎖交換によって発光するシステムとした。蛍光物質は Cy3 を採用した。

Cy3 は TAMRA と同じ波長で測定できる。

鎖交換の結果を図 2-6-1 に示した。鎖交換の効率は同じリンカーを使った AP-1 と比べて著しく低かった。この原因は不明である。AP-1 プローブに比べて GC 含量が高いことが影響しているかもしれない。あるいは Cy3 が鎖交換を阻害するのかもしれない。鎖交換の蛍光値(05C/08B+07/06)は完全消光状態(05C/08B)の約 5 倍であり十分高いと考え、Sp1 タンパク質の検出実験を行うこととした。

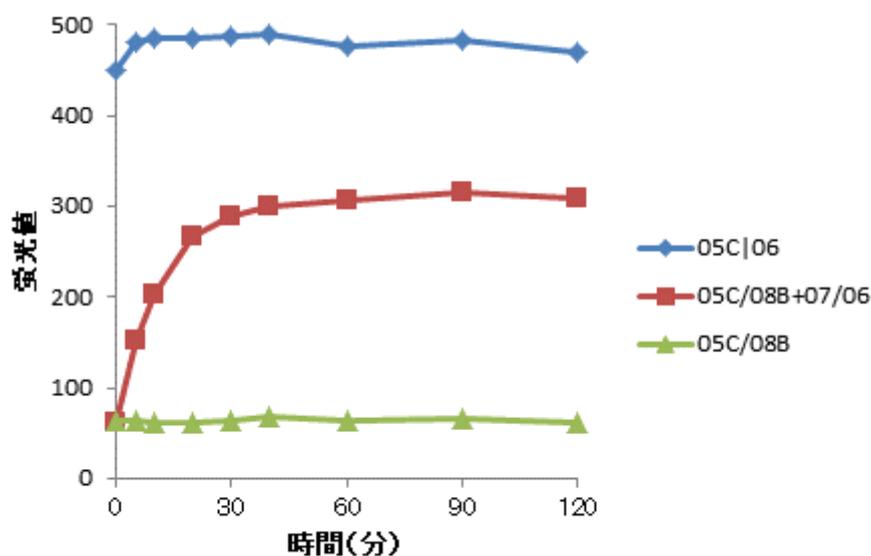


図 2-6-1 Sp1 プローブセットの鎖交換

第三項 Sp1 の濃度依存的検出

96 ウェル(half-area)マイクロプレートで、5 μ L の duplex1(5 nM 05C/08B)と 40 μ L の組み換えヒト Sp1 タンパク質(プロメガ社)を反応溶液(10 mM HEPES-NaOH [pH7.9], 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 10% glycerol, 0.05% Igepal CA-630)中で混合し、室温で 30 分間反応させた。5 μ L の duplex2(50 nM 07/06)を添加し、室温で 30 分静置したのち蛍光値を蛍光マイクロプレートリーダー(Ultra、テカン社)で測定した(励起 535 nm、検出 595 nm)。

結果を図 2-6-2 に示した。

Sp1 タンパク質の濃度依存的に蛍光値が低下した。

鎖交換抑制の程度は、NF- κ B(p50)や AP-1(c-Jun)と比べると小さかった。50 nM と 75 nM で大きな差がなかったため、Sp1 タンパク質の濃度不足が原因ではないと考えられる。Sp1 タンパク質あるいはその夾雑物によって鎖交換が促進されるような、想定外の副反応が起きている可能性がある。

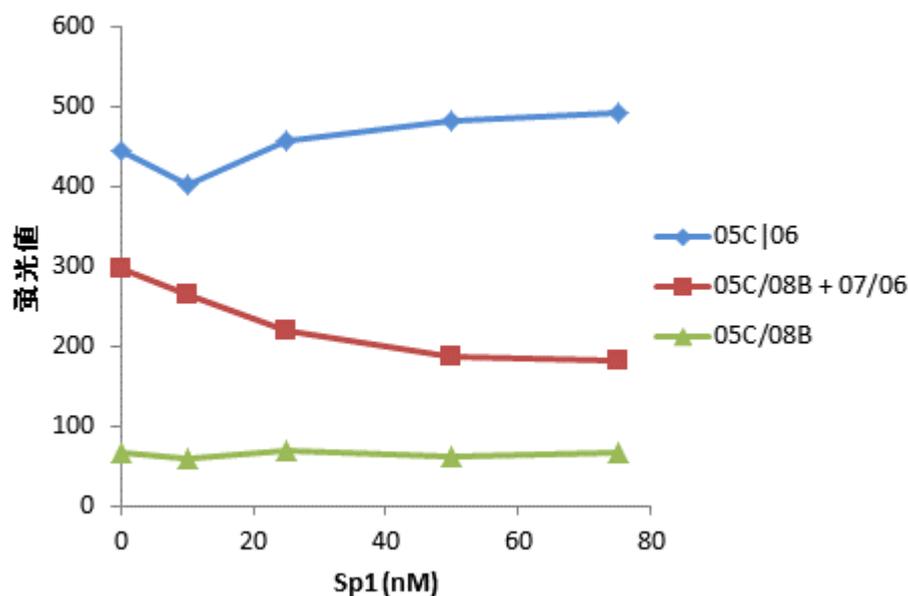


図 2-6-2 DSE-FRET による Sp1 の検出

05C|06: 最終産物のモデル

05C/08B+07/06 : 鎖交換反応

05C/08B: ベースライン

Sp1 濃度は終濃度(50 μ L): 10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM。

第四項 Sp1 検出の特異性の確認

コンペティターを用いて、DSE-FRET による Sp1 タンパク質検出の配列特異性を確認した。

Sp1 結合配列を持つ合成オリゴヌクレオチド SPcpt05 と SPcpt 06、Sp1 結合配列に変異を導入した SPcpt07 と SPcpt 08 をそれぞれ混合して、特異的コンペティター-Sc05|06 と非特異的コンペティター-Sc07|08 を調製した。

コンペティターDNA の配列を以下に示す。

SPcpt05 : ATTCGATCGGGGCGGGGCGACGAGC

SPcpt06 : GCTCGTCGCCCCGCCCCGATCGAAT

SPcpt07 : ATTCGATCGTGTCTGTCTGACGAGC

SPcpt08 : GCTCGTCGACACGACACGATCGAAT

下線部が Sp1 結合配列、赤字が変異を示している。

図 2-6-3 に示したように、Sp1 結合配列を持つコンペティター(Sc05|06)でのみ高い阻害効果がみられ、Sp1 未添加(Sp1-)と同レベルまで蛍光値が回復した。

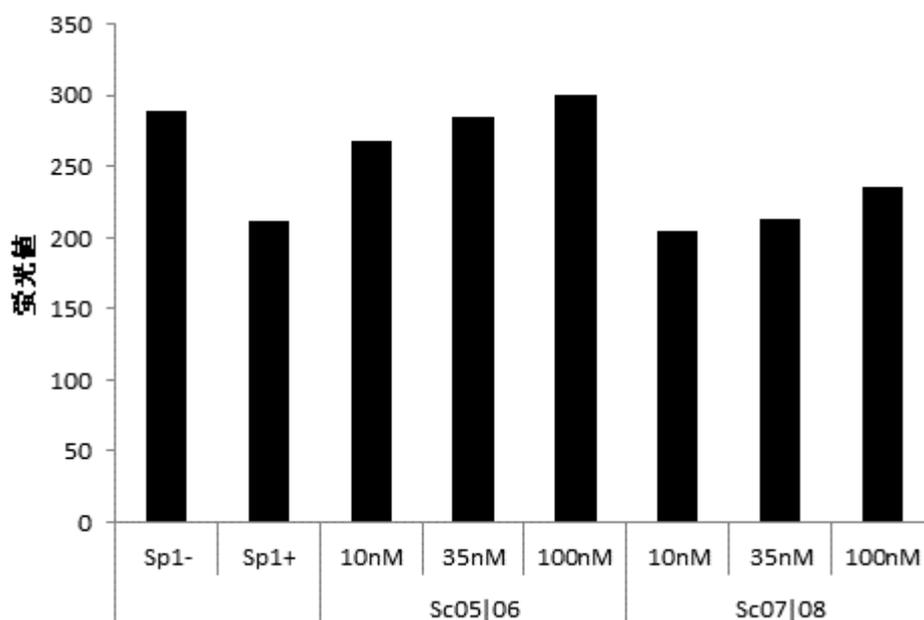


図 2-6-3 コンペティターDNA による特異性確認

DSE-FRET にコンペティターDNA(10 nM, 35 nM, 100 nM)を添加し、Sp1(50 nM)による鎖交換抑制の阻害への影響を調べた。

第五項 ミスマッチプローブの設計

Sp1による鎖交換抑制は、NF- κ B(p50)やAP-1(c-Jun)と比べて小さい。抑制を増強するために、プローブへのミスマッチ導入を行った。

ミスマッチ導入による増強効果は、NF- κ B(p50)用のプローブ配列検討の過程で偶然見出した現象で、NF- κ Bでは室温では軽微な効果であったが、Sp1では大きな効果があるかもしれないと考えた。

合成オリゴヌクレオチドの配列を以下に示す。

SP-05-5C3 : 5' Cy3- ATTCGATCGGGGCGGGGCGACGAGCgggaatggacaggtt 3'

SP-08-3B1 : 5' cggtcagagagtagcctGCTCGTCGCCCGCCCCGATCGAAT -BHQ1 3'

SP-07 :5' ATTCGATCGGGGCGGGGCGACGAGCaggctactctctgaccg 3'

SP-21 :5' ATTCGATCGGGGCGGGGCGCGAGC aggctactctctgaccg 3'

SP-41 :5' ATTCGATCGGGGCGGGGCG_CGAGC aggctactctctgaccg 3'

SP-06 :5' aacctgtccattcccGCTCGTCGCCCGCCCCGATCGAAT 3'

SP-22 :5' aacctgtccattccc GCTCGCGGCCCGCCCCGATCGAAT 3'

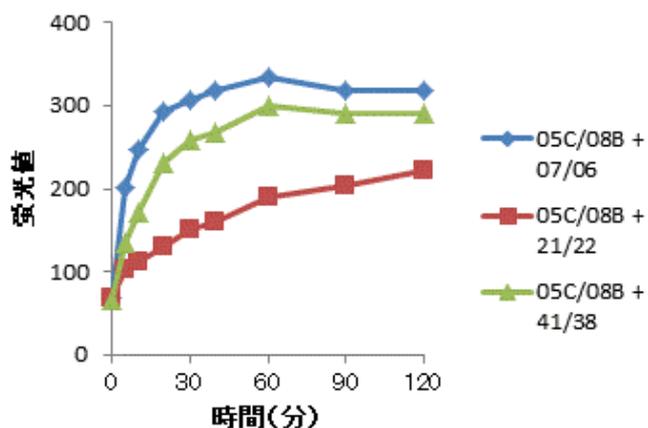
SP-38 :5' aacctgtccattccc GCTCGACGCCCGCCCCGATCGAAT 3'

赤字で示した部分が元となった DNA に対して変更した部分である。なお、SP-41 は塩基を置換するのではなく欠損させた。

SP-05-5C3 と SP-08-3B1 からなる duplex1 (05C/08B) に対して、duplex2 として、SP07 と SP-06 からなる 06/07、SP21 と SP-22 からなる 21/22、あるいは SP-41 と SP-38 からなる 41/38 を反応させた。21/22 と 41/38 は、05C/08B との鎖交換において、分岐部分にミスマッチを生じる。

結果を図 2-6-4 に示した。21/22 は鎖交換が大きく低下した。41/38 でも低下したが軽微であった。Panyutin らは、ミスマッチによって鎖交換が停止すると報告している²³。今回の検討で 21/22 でも遅延しつつも鎖交換が進行したのは、反応液にマグネシウムが存在しないことが影響している可能性がある。

41/38 と 21/22 では、前者が Duplex2 内でミスマッチ(欠損)が生じているのに対し、後者ではミスマッチはない。後者では Duplex2 の安定性が高いために、鎖交換効率が低いのだろうと考えられる。



17 図 2-6-4 ミスマッチプローブの鎖交換

第六項 ミスマッチプローブによる Sp1 の濃度依存的検出

ミスマッチプローブを用いて、Sp1 の濃度依存的検出を試みた。

図 2-6-4 で示したように、21/22 は、30 分後では鎖交換効率が 06/07 の 50%程度にとどまったが、120 分後では 70%程度にまで上昇した。このため、30 分後と 120 分後で評価した(図 2-6-5)。30 分値および 120 分値で、41/38 で鎖交換抑制の増強が認められた。一方で、21/22 は、120 分値でのみ増強が認められた。ミスマッチ導入によって Sp1 による鎖交換抑制が増強されるが、Sp1 未添加での鎖交換率が低い状況では増強効果が表れにくいのであろう。

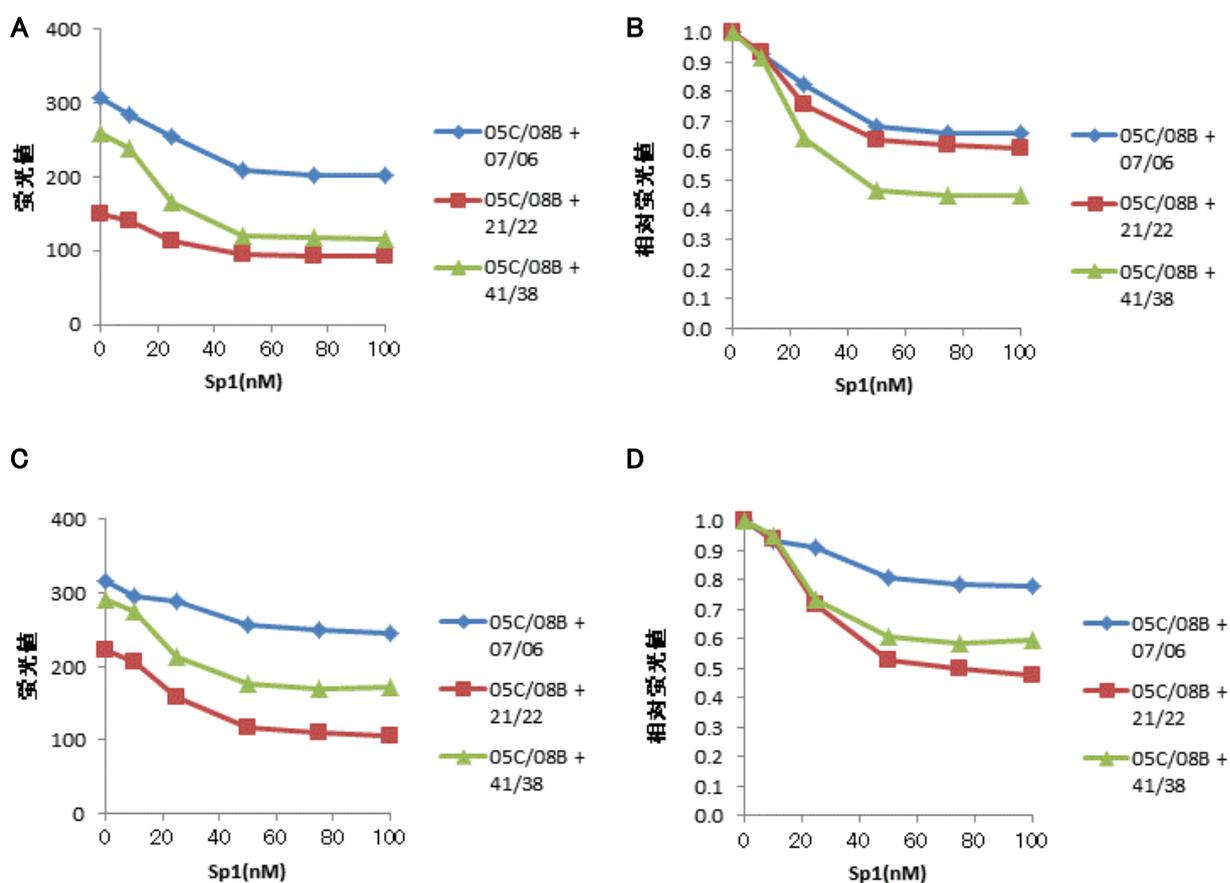


図 2-6-5 ミスマッチプローブによる Sp1 の検出

A: プローブ混合 30 分後の蛍光値

B: プローブ混合 30 分後の Sp1 未添加に対する相対蛍光値

C: プローブ混合 120 分後の蛍光値

D: プローブ混合 120 分後の Sp1 未添加に対する相対蛍光値

第七項 ミスマッチプローブによる Sp1 検出の特異性の確認

ミスマッチプローブによって増強された DSE-FRET の特異性を本節第四項と同様の方法で確認した。duplex1 として 05C/08B、duplex2 として 41/38 を用いた。

図 2-6-6 に示すように、特異的コンペティター(Sc05|06)では濃度依存的に蛍光値上昇がみられたのに対し、非特異的コンペティター(Sc07|08)では蛍光値の上昇はほとんどなかった。

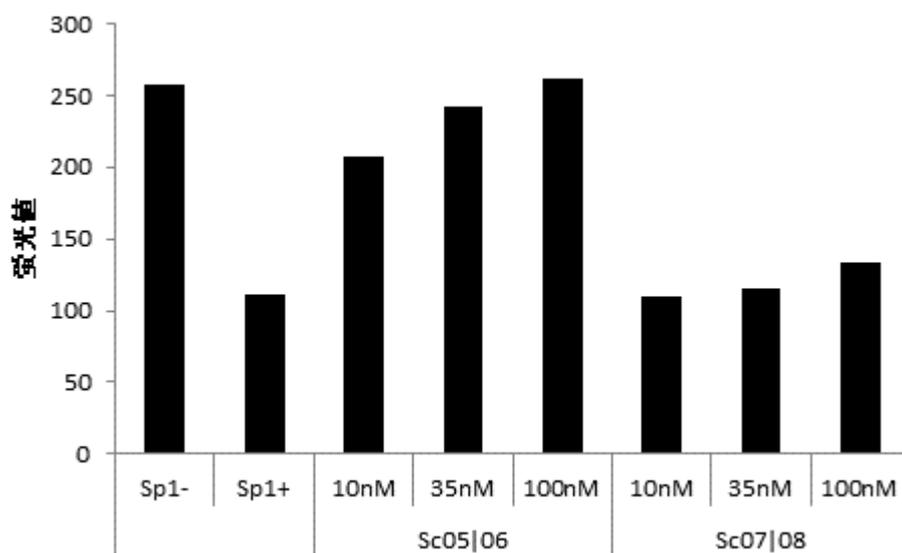


図 2-6-6 ミスマッチプローブによる Sp1 の検出の特異性の確認

第七節 DSE-FRET による TRF2 の検出

第一項 TRF2 について

Telemetric Repeat Binding Factor 2 (TRF2)は、テロメアの二本鎖 DNA に配列特異的(TTAGGG)に結合するタンパク質で、染色体末端を保護するテロメア構造(t-loop)の維持および制御において重要な役割を果たしている^{34, 35}。DNA 結合性の薬剤テロメスタチンで t-loop を形成を阻害するとがん細胞がアポトーシスを起こすことから、TRF2 阻害剤でも同様の機序で抗がん作用が期待できる。実際に、ドミナントネガティブな欠損型 TRF2 の導入によって TRF2 のテロメアへの結合を阻害すると、露出した染色体末端が DNA 損傷応答を引き起こして染色体末端が融合し、アポトーシスや老化が誘導されることが報告されている^{32, 33}。また、多剤耐性株において TRF2 発現を RNA 干渉で抑えると薬剤感受性が部分的に回復し、逆に TRF2 を過剰発現させると耐性が強化されたことから、抗がん剤耐性への関与も示されている⁵。

第二項 昆虫細胞による TRF2 タンパク質の発現と精製

組換えヒト TRF2 は先行文献^{36, 37}を参考に、昆虫細胞 Sf9 で発現させた。TRF2 は N 末側の Basic ドメイン(Bドメイン)と C 末側の Myb ドメイン(Mドメイン)で DNA に結合する。B ドメインは配列ではなく分岐構造を認識して結合するとされ、Mドメインは配列 TTAGGG を認識して結合するとされているため、Bドメイン欠損(Δ B)の組み換え体の作製を行った。なお、精製のため、HisTag を付加した。

Bacmid 取得までの手順

1) cDNA (IHW09084、湧永製薬 北岡氏から分与された) から全長 TRF2 断片を PCR により取得した。

PCR 条件

25 uL PrimestarMax premix (Takara 社)
2 uL 0.26 ng/uL cDNA
2 uL 5uM primer (TRF2-F-1-1)
2 uL 5uL primer (TRF2-R-1362-1)
19 uL water
50 uL total

Cycle 98°C 10sec - 55°C 5 sec - 72°C 15sec x 35 cycle (ABI 社 9700 を使用)

→ 全長 TRF2 で、1530bp の増幅物を取得した。

2) pIVEX2.4d (ロシュ) NotI/XhoI へ挿入し、JM109 形質転換し、プラスミドを取得した。

PCR 増幅物をフェノールクロロホルム処理、続いてエタノール沈殿で精製した。

精製物を制限酵素で処理し、アガロース電気泳動で精製したものをライゲーションに用いた。

3) シーケンス確認

プライマーは、TRF2-F995-1、TRF2-F260-1、TRF2-F630-1、TRF2-F1371-1 を使用した。

4) 全長 TRF2 プラスミドから、 ΔB (dB)、 ΔM (dM)、および $\Delta B \Delta M$ (dBdM) フラグメントを PCR で増幅して取得した。

プライマー

dB : TRF2-F-133-1、TRF2-R-1503-1 1398 bp

PCR 条件

25 uL PrimestarMax premix (Takara 社)
2 uL 137pg/ μ L plasmid
2 uL 5uM forward primer
2 uL 5uM reverse primer
19 uL water
50 uL total

Cycle : 98°C 10sec - 55°C 5 sec - 72°C 15sec x 30 cycle (ABI 社 9700 を使用)

5) pIVEX2.4d ベクターの NotI/XhoI サイトへ挿入し、JM109 を形質転換し、プラスミドを取得した。精製はプロメガのキットを使用した。

- 6) 5)で得られたプラスミドはダイデオキシサイクルシーケンス法で配列を確認した。
- 7) XbaI / XhoI 切断して pFastBac1 (invitrogen 社) の XbaI / XhoI サイトへ挿入し、JM109 を形質転換した。
- 8) プラスミドを調製し、XhoI/EcoRI で目的断片が挿入されていることを確認した。
- 9) プラスミドは、pFB-TRF2-dB-1 と命名した。
- 10) 上記プラスミドで DH10Bac (invitrogen 社) を形質転換し、培養して、フェノールクロロフォルム処理で Bacmid を得た。
- 11) Bacmid に TRF2 断片が挿入されていることは PCR で確認した。
- PCR 条件
- 5 uL Primestar Max premix (Takara 社)
 - 1 uL bacmid (未定量)
 - 2 uL 0.8uM TRF2-F995-1
 - 2 uL 0.8uM M13R18
- 10 uL total
- Cycle : 98°C 10sec - 55°C 5 sec - 72°C 15sec x 35 cycle (ABI 社 9700 を使用)
- 12) 大量培養で、Bacmid を得た。
- 精製は、キアゲン社の large construct kit を使用した。

感染からタンパク質取得までの手順

1) Sf9 細胞の準備

Confluent になった細胞 (75mm フラスコ 1 枚) をはがして、培地ごと 50mL チューブに移した。

6 ウェルプレートに 1.5mL ずつ 培地(Sf-900II SFM ※抗生物質無し)を分注した。

そこに 9×10^5 Sf9 (0.5mL 程度) を入れ、28°C 1 時間(細胞の定着を待つ) 静置した

2) トランスフェクション

培地を除去して DNA-セルフェクチン混合液を加えた。

DNA-セルフェクチン混合液は、1 μ g の DNA(100 μ l) に対して、6/100 希釈のセルフェクチンを 100 μ l 加えて調製した。

28°C で 72 時間培養後、ピペティングで軽く懸濁し、培養液を回収した。

3) ウィルス液の回収

遠心(1000xg、5 分)で培養上清(P1)を回収した。使用まで 4°C 保存した。

4) P1 感染

75mm フラスコの Sf9 を 1:3 で継代し、1 時間静置した。

各フラスコに 1mL の P1 ウィルス液を入れ、28°C で 72 時間培養した。

4) P2 ウィルス液と細胞の回収、可溶化

スクレイパーで細胞をはがし、遠心(1000xg、5 分)し、上清を P2 として回収した。

沈殿を氷冷した PBS で洗浄し、氷冷した可溶化液(1% IGEPAL CA630)を加えて懸濁した後、遠心(10,000xg 10 min 4°C)して上清を回収した。

クローニング用プライマー

Full ORF 用

TRF2-F-1-1

ATAAGAAT GCGGCCGC atggcgggaggaggcg

Fw 用。5' に NotI(GCGGCCGC)を付加した。

TRF2-R-1503-1

TTCCG CTCGAG TCAGTTCATGCCAAGTCTTTTC

Rev 用。5' に XhoI(CTCGAG)を付加した。

センス鎖配列 : gaaaagacttggcatgaactga CTCGAG CGGAA

末端欠損体用

TRF2-R-1362-1

TTCCG CTCGAG TTCTTCTACAGTCCACTTCTGC

delM の Rev 用。文献³⁷を改変、5' に XhoI 付加。

シーケンス用プライマー

おおよそ 400bp 刻みで両鎖をシーケンス確認できるようにプライマーを設定した。

T7-1 TAATA CGACT CACTA TAGGG

pIVEX2.4d-R-831-2 TTAGCAGCCGGATCTTACCG

TRF2-F-260-1 GACATCATGCAGGCTTTGCT

TRF2-F-630-1 TGGCCCATCCTGTTATCCAG

TRF2-F-995-1 CCTCAAAAACAAGAGACCCAG

TRF2-F-1371-1 ACTGTAGAAGAAAGCGAGTGG

TRF2-R-88-1 AGCCCCGGCTCGTGGCG

TRF2-R-450-1 ACCAGTTTTCTACTGGATTCCG

TRF2-R-821-1 GGAGGATTCCGTAGCTGCC

TRF2-R-1191-1 GATTCTTCTCTCCAGGGAGG

pFastBac1 用プライマー

pFB-F4050 GGATCCCGGTCCGAAGCGC)

pFB-R4171 CTCTACAAATGTGGTATGGC

プライマーの位置 TRF2 ORF

1	<u>atggcgggag</u> <u>gaggcgggag</u> tagcgacggc agcgggcggg cagctggcag gcgggcgtcc cgcagtagcg
61	ggcgggcccg gcgggggcgc cacgagccgg ggctgggggg cccggcggag cgcggcgcgg gggaggcacg
121	<u>gctggaagag</u> <u>gcagtcaatc</u> gctgggtgct caagttctac ttccacgagg cgctcgggc cttcggggt agccggtacg
181	gggacttcag acagatccgg gacatcatgc aggctttgct tgtcaggccc ttgggaagg agcacaccgt gtcccattg
241	ctcggggtta tgcagtgtct gtcgggatt gaagaagggg aaaatttaga ctgttccttt gatatggagg ctgagctcac
301	accactgga tcagctatca atgtgctgga gatgattaa acggaattta cactgacaga agcagtggtc <u>gaatccagta</u>
361	<u>gaaaactggt</u> caaggaagct gctgtcatta tttgatcaa aaacaaagaa tttgaaaagg cttcaaaaat tttgaaaaa
421	catatgtcca aggacccac aactcagaag ctgagaaatg atctcctgaa tattattcga gaaaagaact tggcccatcc
481	tgttatccag aacttttcat atgagacctt ccagcagaag atgctgcgct tcttgagag ccacctggat gacccgagc
541	cctacctct cagatggcc aaaaaggctt tgaatctga gtccgctgcc tcaagtacag ggaaggaaga
601	taaacagcca gcaccagggc ctgtggaaaa gccaccaga gaaccgcaa <u>ggcagctacg</u> <u>gaatcctcca</u>
661	accaccattg gaatgatgac tctgaaagca gtttcaaga ctctgtctgg tgcacaggat tctgaggcag cctttgcaaa
721	actggaccag aaggatctgg ttcttctac tcaagctctc ccagcatcac cagc cctcaa aaacaagaga
781	cccagaaaag atgaaaacga aagttcagcc ccggctgacg gtgagggtgg ctcggaactg cagccaaga
841	acaagcgcag gacaataagc agattggtct tggaggagga cagccagagt actgagccca gcgcaggcct
901	caactcctcc caggaggccg cttcagcgc accatccaag ccaccgttc tcaaccaacc <u>cctccctgga</u>
961	<u>gagaagaatc</u> ccaaagtacc caaaggcaag tggaacagct ctaatggggt tgaagaaaag gagacttggg
1021	tggaagagga tgaactgtt caagttcagg <u>cagca</u> ccaga tgaagacagt acaaccaata taacaaaaa
1081	<u>gcagaagtgg</u> actgtagaag aaagcagtg gtcaaggct ggagtgcaga aatatgggga aggaaactgg gctgccattt
1141	ctaaaaatta cccatttgtt aaccgaacag ctgtgatgat taaggatcgc tggcggacca <u>tgaaaagact</u> <u>tggcatgaac</u>
1201	<u>tga*****</u> <u>*****</u>
1261	
1321	
1381	
1441	
1501	

赤字が FwSeq プライマー

網掛けが RvSeq プライマー

下線はクローニングプライマー

プライマーの位置 TRF2 ΔB

1	<u>**gaggcacg gctggaagag gcagtcaatc gctgggtgct caagttctac ttccacgagg cgctgcgggc ctttcggggt</u>
61	agccggtagc gggacttcag acagatccgg gacatcatgc aggctttgct tgcaggccc ttggggaagg agcacaccgt
121	gtcccgattg ctgcgggta tgcagtgtct gtcgaggatt gaagaagggg aaaatttaga ctgttccttt gatatggagg
181	ctgagctcac accactggaa tcagctatca atgtgctgga gatgattaa acggaattta cactgacaga agcagtgtc
241	<u>gaatccagta gaaaactggt</u> caaggaagct gctgtcatta tttgatcaa aaacaagaa tttgaaaagg cttcaaaaat
301	ttgaaaaa catatgtcca aggacccac aactcagaag ctgagaaatg atctcctgaa tattattoga gaaaagaact
361	tgcccatcc tgttatccag aacttttcat atgagacctt ccagcagaag atgtgctgct tcttgagag ccacctggat
421	gacgccgagc cctacctct cactgatggc aaaaaggctt tgaatctga gtccgctgcc tcaagtacag
481	ggaaggaaga taacagcca gcaccagggc ctgtggaaaa gccaccaga gaaccgcaa <u>ggcagctacg</u>
541	<u>gaatcctcca</u> accaccattg gaatgatgac tctgaaagca gcttcaaga ctctgtctgg tgcacaggat tctgaggcag
601	cctttgcaa actggaccag aaggatctgg ttcttctac tcaagctctc ccagatcac cagc cctcaa
661	aaacaagaga cccagaaaag atgaaaacga aagttcagcc ccggctgacg gtgagggtgg ctcggaactg
721	cagcccaaga acaagcgcac gacaataagc agatttgtct tggaggagga cagccagagt actgagccca
781	gcgcaggcct caactcctcc caggaggccg cttcagcgc accatccaag cccaccgttc tcaaccaacc
841	<u>cctcctgga gagaagaatc</u> ccaaagtacc caaaggcaag tggaacagct ctaatgggt tgaagaaaag
901	gagacttggg tggaagagga tgaactgtt caagttcagg cagcaccaga tgaagacagt acaaccaata taacaaaaa
961	<u>gcagaagtgg actgtagaag aaagcgagtg</u> ggtcaaggct ggagtgcaga aatatgggga aggaaactgg gctgccattt
1021	ctaaaaatta cccatttgtt aaccgaacag ctgtgatgat taaggatcgc tggcggacca <u>tgaaaagact tggcatgaac</u>
1081	<u>tga***** *****</u>
1141	
1201	
1261	
1321	
1381	
1441	
1501	

赤字が FwSeq プライマー

網掛けが RvSeq プライマー

下線はクローニングプライマー

細胞・培養等の条件の検討結果(TRF2ΔB)

組換えヒト TRF2ΔB の発現について、細胞・培養等の条件の検討結果を図 2-7-1 に示した。当初、他のタンパク質で実績のある条件(図 2-7-1 の番号19番に近いもの。ただし、細胞は継代培養されていたもの)で試みたが、目的産物が少なく、目的物よりも小さいバンドが多数みられた。TRF2 全長、TRF2ΔM、TRF2ΔBM でも同様のバンドがみられたことから(データ示さず)、分解されていることが疑われた。そのため、細胞の種類、バキュロウィルスの液量(0.2mL~1mL)や感染後の培養時間(34~108 時間)、および血清(FBS)の添加有無の比較をして最適条件を探した。細胞については、研究室内で冷凍保存されていた Sf9 株(Sf9Y)、新規に購入した Sf9 株(Sf9N)に加えて、Sf9 と類似ではあるが、細胞が大きく収量が多いとされる Sf21 を用いた。Sf9 は、一般的には血清を添加した培地で培養するが、無血清培地に馴化した株も市販されている。管理の簡便性やコストから、当初は無血清培地用の Sf9 を用いていた。

目的産物の収量および純度に最も影響したのは細胞の種類だった。研究室内で冷凍保存されていた Sf9Y が最も収量が高かった。また、新規購入の Sf9N で顕著だが、血清を加えた方が収量が高かった(レーン 3 と 4)。感染後の培養時間の影響は軽微だが、短いほうが分解産物は少なかった(レーン 25 から 27)。DSE-FRET には、最も純度がよく、かつ収量も多かった 26 番の産物を用いた。

電気泳動 番号	感染条件 細胞	継代時希釈	感染日	ウイルスロットと使用量	2% FBS	培養 時間	Ni-NTA精製物 ng/uL	
1	Sf9N	x3	非感染コントロール			72h	467	
2	Sf9N	x3	非感染コントロール		○	72h	569	
3	Sf9N	x3	080617	080128_P3	1mL	72h	242	
4	Sf9N	x3	080617	080128_P3	1mL	○	72h	450
5	Sf21	x3	非感染コントロール			72h	585	
6	Sf21	x3	非感染コントロール		○	72h	664	
7	Sf21	x3	080617	080128_P3	1mL	72h	779	
8	Sf21	x3	080617	080128_P3	1mL	○	72h	683
9	Sf21	x3	080604	080522_P4	1mL	86h	682	
10	Sf21	x3	080604	080522_P4	1mL	94h	602	
11	Sf21	x3	080604	080522_P4	1mL	108h	563	
12	Sf21	x3	080604	080602_P5	1mL	86h	724	
13	Sf21	x3	080604	080602_P5	1mL	94h	785	
14	Sf21	x3	080604	080602_P5	1mL	108h	832	
15	Sf9Y	x3	非感染コントロール			68h	771	
16	Sf9Y	x3	非感染コントロール		○	68h	563	
17	Sf9Y	x3	080619	080128_P3	0.2mL	68h	342	
18	Sf9Y	x3	080619	080128_P3	0.2mL	○	68h	491
19	Sf9Y	x3	080619	080128_P3	1mL	68h	321	
20	Sf9Y	x3	080619	080128_P3	1mL	○	68h	683
21	Sf9Y	x3	080619	080612-2-1_P4	1mL	68h	278	
22	Sf9Y	x3	080619	080612-2-1_P4	1mL	○	68h	512
23	Sf9Y	x2	080620	080128_P3	1mL	34h	435	
24	Sf9Y	x2	080620	080128_P3	1mL	48h	435	
25	Sf9Y	x2	080620	080128_P3	1mL	○	34h	717
26	Sf9Y	x2	080620	080128_P3	1mL	○	48h	662
27	Sf9Y	x2	080620	080128_P3	1mL	○	70h	659
28	Sf9Y	x2, 培養上清除去	080620	080128_P3	1mL	34h	302	

細胞株

- Sf9N (新規購入した Sf9)
- Sf9Y (冷凍保存の Sf9)
- Sf21

培養と感染

- 72cm² フラスコ コンフルエント
- 継代 (±FBS)
- 一時間静置
- + 0.2mL~1mL ウィルス液
- 培養 (34~108 時間)
- 回収、PBS で洗浄、凍結 (-80°C)
- 細胞溶解とキアゲンスピンカラム精製

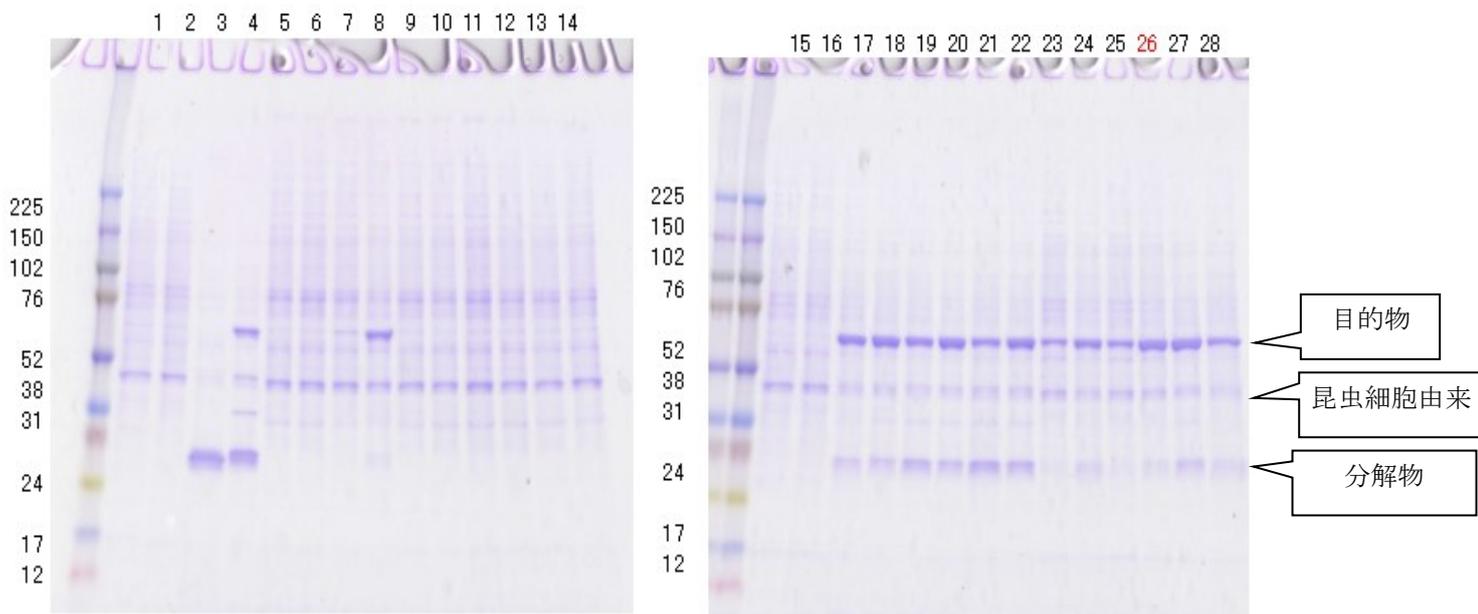


図 2-7-1 組換え TRF2 Δ B 発現条件の検討

表に示した条件を試みた。精製した TRF2 を SDS-PAGE で分析した結果を写真に示した (CBB 染色)

第三項 プローブ DNA の設計

TRF2 の認識配列は、5' YTAGGGTTR 3' である³⁸。認識配列が多いほど鎖交換停止能は高くなると考えて、TTAGGG を 4 回繰り返した。合成 DNA の品質および費用を考慮して全長を 50mer とした。なお、テロメア繰返配列は 4 つが組となって分子内で四重鎖構造を形成することが報告されているが、今回は相補鎖が十分存在するので影響はないと予測した。

プローブ配列を以下に示す。

TLM-01-5C 5' Cy3-AGTTGAGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGCAGG cggtgtctogctcgc 3'
TLM-02-3B 5' gcgagcgagacaccg CCTGCCCTAACCCCTAACCCCTAACTCAACT -BHQ1 3'
TLM-05 5' AGTTGAGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGCAGG caccacaccattccc 3'
TLM-06 5' gggaatggagtgtg CCTGCCCTAACCCCTAACCCCTAACTCAACT 3'

変異テロメアオリゴ

TLM-13-5C3 5' Cy3-AGTTGAGTTAGCGTTAGCGTTAGCGTTAGCGCAGG cggtgtctogctcgc 3'
TLM-14-3B1 5' gcgagcgagacaccg CCTGCGCTAACGCTAACGCTAACGCTAACTCAACT -BHQ1
TLM-15 5' AGTTGAGTTAGCGTTAGCGTTAGCGTTAGCGCAGG caccacaccattccc 3'
TLM-16 5' gggaatggagtgtg CCTGCGCTAACGCTAACGCTAACGCTAACTCAACT

赤字部分が変異させた塩基を示している。

第四項 TRF2 Δ B の検出

合成オリゴヌクレオチド TLM-06 と 5' 末端を Cy3 で標識した合成オリゴヌクレオチド TLM-01-5C3 を混合して蛍光二量体 01C/06 を形成させた。01C/06 は TRF2 結合配列を持つ。合成オリゴヌクレオチド TLM-16 と 5' 末端を Cy3 で標識した合成オリゴヌクレオチド TLM-13-5C3 を混合して蛍光二量体 13C/16 を形成させた。13C/16 は TRF2 結合配列を持たない。合成オリゴヌクレオチド TLM-05 と 3' 末端を BHQ1 で標識した合成オリゴヌクレオチド TLM-02-3B1 を混合して二量体 02B/05 を形成させた。02B/05 は TRF2 結合配列を持つ。合成オリゴヌクレオチド TLM-15 と 3' 末端を BHQ1 で標識した合成オリゴヌクレオチド TLM-14-3B1 を混合して二量体 14B/15 を形成させた。14B/15 は TRF2 結合配列を持たない。100 fmol の 01C/06 あるいは 13C/16 と 1 μ g の TRF2 Δ B を反応溶液 (10 mM HEPES-NaOH pH7.9、150 mM KCl、0.1 mM EDTA、5 mM DTT、10 % glycerol、0.05 % CA-630、20 μ L) 中に混合して、25°C で 30 分間反応させた。01C/06 あるいは 13C/16 に、それぞれ 100 fmol の 02B/05 あるいは 14B/15 を加えて 50 μ L とした後、25°C で 60 分間反応させて、蛍光プレートリーダー Ultra (テカン社) を用いて Cy3 の蛍光値を測定した。

01C/06 は、02B/05 と混合させると四量体を形成し、分岐移動を経て完全な鎖交換が行われて、TLM-01-5C3 と TLM-02-3B1 からなる消光二量体 01C|02B に変換される。TLM-01-5C3 の Cy3 は、01C/06 では蛍光を発するが、01C|02B では近傍に BHQ1 があるため消光される。よって、鎖交換が進むと蛍光値が低下する。しかし、タンパク質が DNA に結合すると鎖交換が抑制されるた

め、蛍光値低下が妨げられる。13C/16 と 14B/15 の組み合わせでも同様の現象が起きる。

組換えヒト TRF2 Δ B の透析バッファーは文献^{39, 40}を参考に 2 種類を比較した。

バッファーD とバッファーDK は下記の通り、KCl濃度のみが異なる。

Buffer D

Opresko PL. et al. J. Biol. Chem 2002 277(43) 41110-41119

ヒスタグ TRF1の精製後の透析バッファー

20 mM HEPES pH7.9
100 mM KCl
3 mM MgCl ₂
1 mM DTT
20 % glycerol
0.5 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

Buffer D+K (300mM KCl)

Bianchi A. et al. The EMBO Journal Vol.16 No.7 pp.1785-1794, 1997

ヒスタグ TRF1の精製後の透析バッファー

20 mM HEPES pH7.9
300 mM KCl
3 mM MgCl ₂
1 mM DTT
20 % glycerol
0.5 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

バッファーD で透析した組換え TRF2 Δ B は、結合配列をもつプローブの鎖交換蛍光値 (01C/06+05/02B) を上昇させたが、蛍光二量体 (01C/06) 単独の場合でも蛍光値の上昇がみられた (図 2-7-2A)。一方で、結合配列を持たないプローブの場合、蛍光値に変化がなかった (図 2-7-2B)。よって、TRF2 Δ B のプローブへの結合の結果、蛍光値が上昇したと考えられる。蛍光二量体については、TRF2 と蛍光物質が相互作用して蛍光値が上昇した可能性がある。

バッファーDK の場合、蛍光二量体の蛍光値上昇は比較的軽微であった。鎖交換の蛍光値は大きく上昇している (図 2-7-2C)。こちらでも結合配列を持たないプローブでは蛍光値に変化がなかった (図 2-7-2D)。

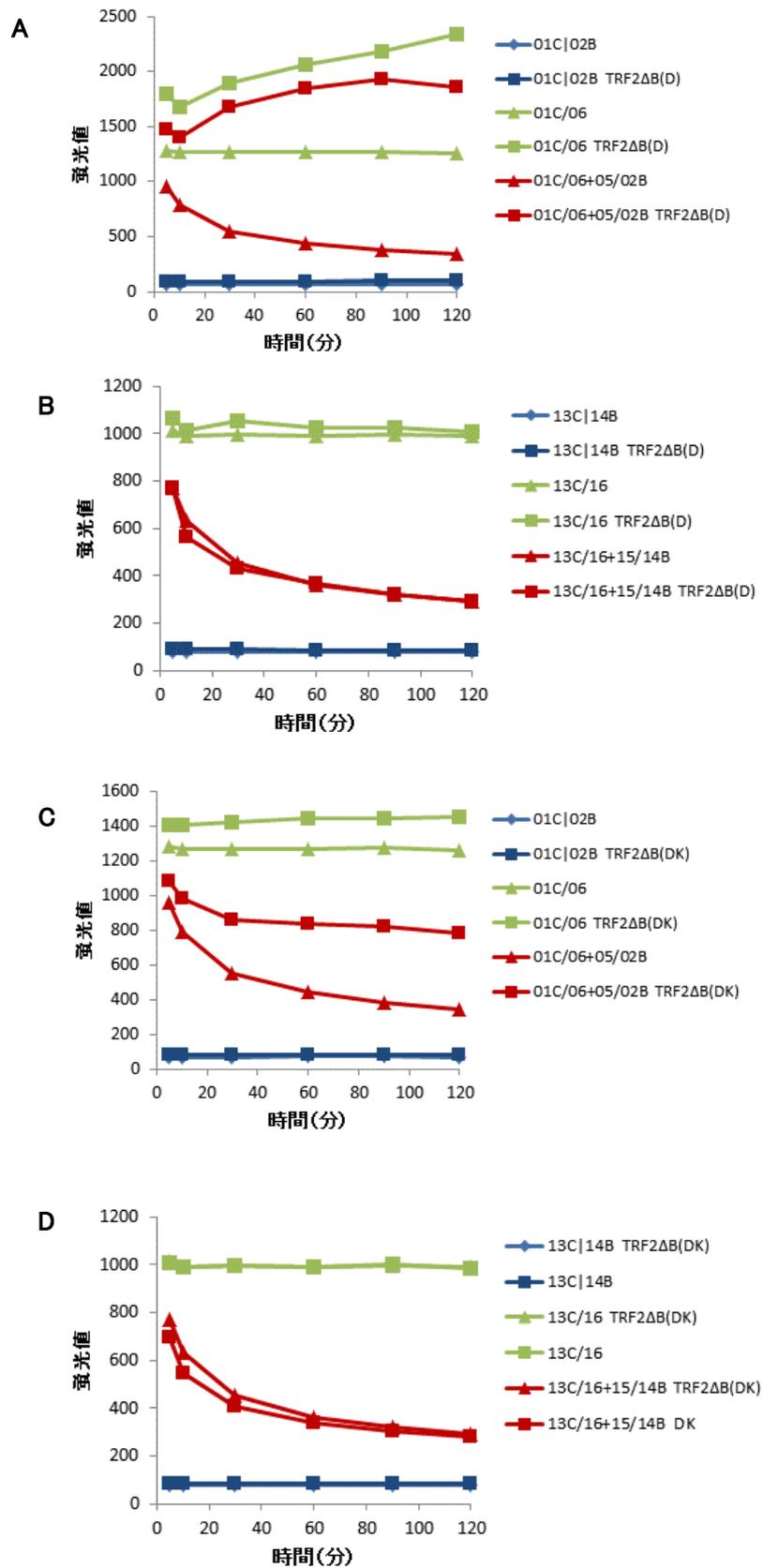


図 2-7-2 DSE-FRET による組換え TRF2Δ の検出

A: テロメア配列を持つプローブに、バッファーDで透析した TRF2ΔB を添加した。

B: テロメア配列を持たないプローブに、バッファーDで透析した TRF2ΔB を添加した。

C: テロメア配列を持つプローブに、バッファーDKで透析した TRF2ΔB を添加した。

D: テロメア配列を持たないプローブに、バッファーDKで透析した TRF2ΔB を添加した。

第八節 考察

第一項 タンパク質による鎖交換の停止の一般性について

タンパク質の結合による鎖交換の停止は、これまで、ヒストン八量体、p53 および TRF2 で報告されている。序論で述べたように、これらは特定のタンパク質による特別な反応だと解釈されていた。しかし、本研究では、NF- κ B (p50)、AP-1(c-Jun) および Sp1 でも鎖交換が停止することを見出した。これらはそれぞれ、Rel ドメイン、ロイシンジッパー、および Zn フィンガーという、それぞれ異なる構造のドメインで DNA に結合する。また、NF- κ B (p50)、AP-1(c-Jun) はホモ二量体を形成して DNA に結合するのに対し、Sp1 は単量体で結合する。このように、本章で示した 3 つの DNA 結合タンパク質は異なる性質を有するものである。よって、鎖交換停止は、DNA 結合タンパク質一般に見られる現象であると考えられる。

第二項 DSE-FRET の実用性について

本研究では、鎖交換の停止を利用した新規の方法によって DNA 結合タンパク質阻害剤のスクリーニング系を構築することを目標としている。ここまでで示したように、NF- κ B (p50)、AP-1(c-Jun) および Sp1 で、タンパク質の DNA への結合を濃度依存的かつ配列特異的に検出できることが示された。また、蛍光物質として Fluorescein、TAMRA、および Cy3 が使用できることが示された。これらは一般的な蛍光プレートリーダーで使用できる蛍光物質であることから、本法の汎用性の高さが示されたといえる。実際に、AP-1 と Sp1 の検討は、96 ウェル(half-area)マイクロプレートで実施している。以上から、DSE-FRET がハイスループットスクリーニングに適していることが示された。

NF- κ B (p50) では鎖交換によって消光するシステム、他のタンパク質では発光するシステムを構築し、どちらでも良好に機能することが示された。阻害剤スクリーニングにおいては、前者のシステムは阻害効果が高いと蛍光値が低くなり、後者は高くなる。蛍光を用いたスクリーニング系では、被検化合物が持つ自家蛍光あるいは蛍光吸収に起因する偽陽性および偽陰性の問題があるが、有望な医薬品候補化合物を見逃さないためには、偽陽性よりも偽陰性を避けること重要である。前者のシステムでは蛍光特性のある被検化合物が偽陰性となり、後者のシステムでは消光特性のある被検化合物が偽陰性となる。タンパク質未添加の対照ウェルを化合物ごとに設定すればこの問題は解決できるが、大規模スクリーニングにおいては現実的ではない。本法では、スクリーニング対象ライブラリ内の被検化合物の特性に合わせて、システムを選択することで、この問題に対処できる。

第三項 ミスマッチによる鎖交換抑制の増強について

Sp1 による鎖交換抑制は、NF- κ B (p50) や AP-1 と比べると弱いが、ミスマッチプローブにより増強された。コンペティターを用いた実験で配列特異性が確認できたことから、阻害剤スクリーニングにも使用できると考えられる。増強効果のメカニズムは不明であるが、ミスマッチ部分で鎖交換が一時的に停止することでタンパク質の DNA への安定的な結合が可能となるのかもしれない。

ない。導入するミスマッチの種類によっては鎖交換効率が著しく低下するが、現在のところ、適切なミスマッチを予測することは困難である。したがって、ミスマッチプローブを設計する際には複数の配列を検討する必要がある。しかしながら、ミスマッチ導入は DSE-FRET を様々な標的タンパク質で適用するにあたって非常に有用な手法であり、ミスマッチ配列の検討に時間を要したとしても検討する価値のある選択肢である。

第三章 NF- κ B 阻害剤スクリーニング系の最適化

第一節 抗がん剤標的としての NF- κ B

NF- κ B は免疫反応において中心的な役割を果たす転写因子で、サイトカインや電離放射線による刺激を受けて、p50、p65、p52、RelB、c-Rel といった複数コンポーネントの組み合わせからなるヘテロあるいはホモ二量体として DNA に結合し、標的遺伝子の発現を導く。多くのがんで異常発現が認められ、がん細胞のアポトーシスを防ぐ働きをしていると考えられている⁴¹⁻⁴³。例を表 3-1 に示した (Rayet らの総説⁴¹の表を引用)。さらに、がん細胞株において、NF- κ B をノックダウンするとがん細胞の増殖が低下あるいはアポトーシスが誘導されるという報告がなされている⁴⁴⁻⁴⁹。一方で、p65 以外の NF- κ B サブユニット (p50、p52、RelB、c-Rel) ノックアウトマウスでは、免疫系に異常をきたすものの、その他に重大な異常が生じなかったことから⁵⁰⁻⁵³、薬剤によって NF- κ B 機能を抑制しても致死的な副作用を起こさないと期待できる。これらのことから抗がん剤の分子標的として注目されており、精力的に研究されてきたが²、未だ NF- κ B 特異的な阻害剤で抗がん剤として臨床応用されたものはない。これまでの NF- κ B 阻害剤開発は、主に NF- κ B の核移行段階に関わるリン酸化酵素である I κ B (inhibitor-of-NF- κ B) kinase を標的として取り組まれてきた⁴²。そこで本研究では新たなアプローチとして、NF- κ B そのものを阻害する、つまり、NF- κ B の DNA 結合活性を阻害する薬剤の取得を目指すこととした。NF- κ B はサブユニットの組み合わせによって機能が異なると考えられ、細胞そのままあるいは細胞から抽出した NF- κ B タンパク質を用いたアッセイ系では、特異的な阻害剤をスクリーニングすることは難しい。しかし、DSE-FRET を用いれば、組み換えタンパク質を使用することで、特定の組み合わせの NF- κ B に限定した阻害剤スクリーニングが可能となる。

前章において、DSE-FRET で NF- κ B 検出が可能であることは示したが、本章ではスクリーニングに使用するための条件最適化を行った結果を示す。

表 3-1 がんにおける NF- κ B の遺伝子異常および過剰発現
(Rayet らの報告⁴¹を改変)

Gene	Alteration	Type of cancer
<i>c-rel</i>	Amplification	Diffuse large cell lymphoma
	Amplification	Primary mediastinal B-cell lymphoma
	Amplification	Follicular large cell lymphoma
	Rearrangement/overexpression	Follicular lymphoma
	Rearrangement/overexpression	Diffuse large cell lymphoma
	Overexpression	Non-small cell lung cancer
<i>relA</i>	Chromosomal rearrangement	B-cell non-Hodgkin's lymphoma
	Chromosomal rearrangement	Multiple myeloma
	Amplification	Diffuse large cell lymphoma
	Amino acid substitution	Multiple myeloma
	Amplification	Squamous head and neck carcinoma
	Amplification	Breast adenocarcinoma
	Amplification	Stomach adenocarcinoma
	Overexpression	Thyroid carcinoma cell lines
	Splicing variant	Non-small cell lung carcinoma
	<i>nfkb1</i>	Chromosomal rearrangement
Overexpression		Non-small cell lung carcinoma
Overexpression		Colon cancer cell lines
Overexpression		Prostate cancer cell lines
Overexpression		Breast cancer cell lines
Overexpression		Bone cancer cell lines
Overexpression		Brain cancer cell lines
<i>nfkb2</i>	Rearrangement/overexpression	Cutaneous T-cell lymphoma
	Chromosomal rearrangement	B-cell non-Hodgkin's lymphoma
	Chromosomal rearrangement	B-cell chronic lymphocytic leukemia
	Chromosomal rearrangement	Multiple myeloma
	Overexpression	Breast carcinoma
	Overexpression	Colon carcinoma
<i>bcl-3</i>	Rearrangement/overexpression	B-cell chronic lymphocytic leukemia
	Rearrangement/overexpression	B-cell non-Hodgkin's lymphoma
<i>ikba</i>	Mutation/truncation	Hodgkin's lymphoma
<i>ikbe</i>	Mutation/truncation	Hodgkin's lymphoma

第二節 スクリーニング系の最適化

第一項 塩濃度

NF- κ B の DNA 結合親和性に影響する因子として塩濃度が知られている⁵⁴⁻⁵⁶。また、鎖交換反応にも塩濃度は影響すると考えられるため、塩濃度の検討を行った。なお、温度については室温付近で差がなく、pH については pH7~8.5 で最も親和性が高い報告されており⁵⁴、現行の条件が pH7.9 であるため検討を行わなかった。

30 mM から 150 mM の KCl 濃度で DSE-FERT を実施したところ、30 mM KCl で鎖交換の効率が著しく低下した。90 mM 以上では差がなかった。60 mM では 90 mM よりも低い差は小さかった(図 3-2-1A)。p50 および p52 への影響は、タンパク質未添加の蛍光値との比で表した(図 3-2-1B, C)。相対蛍光値が低いほど、タンパク質による鎖交換阻害の程度が大きいことを意味する。p50 は 60 mM KCl で最も蛍光値が低く、p52 は 60 mM と 90 mM で最も低かった。この結果から、以後の検討は、60 mM KCl で行うこととした。

なお、NF- κ B は、大腸菌で発現させた組み換えヒト p50 および p52 を用いた。これらは共同研究先の愛知医科大学梅澤一夫教授から分与されたコンストラクトをもとに、広島大学田原研究室の塩谷文章特任助教の指導の下、三好龍也氏らにより調製されたものを譲り受けた。

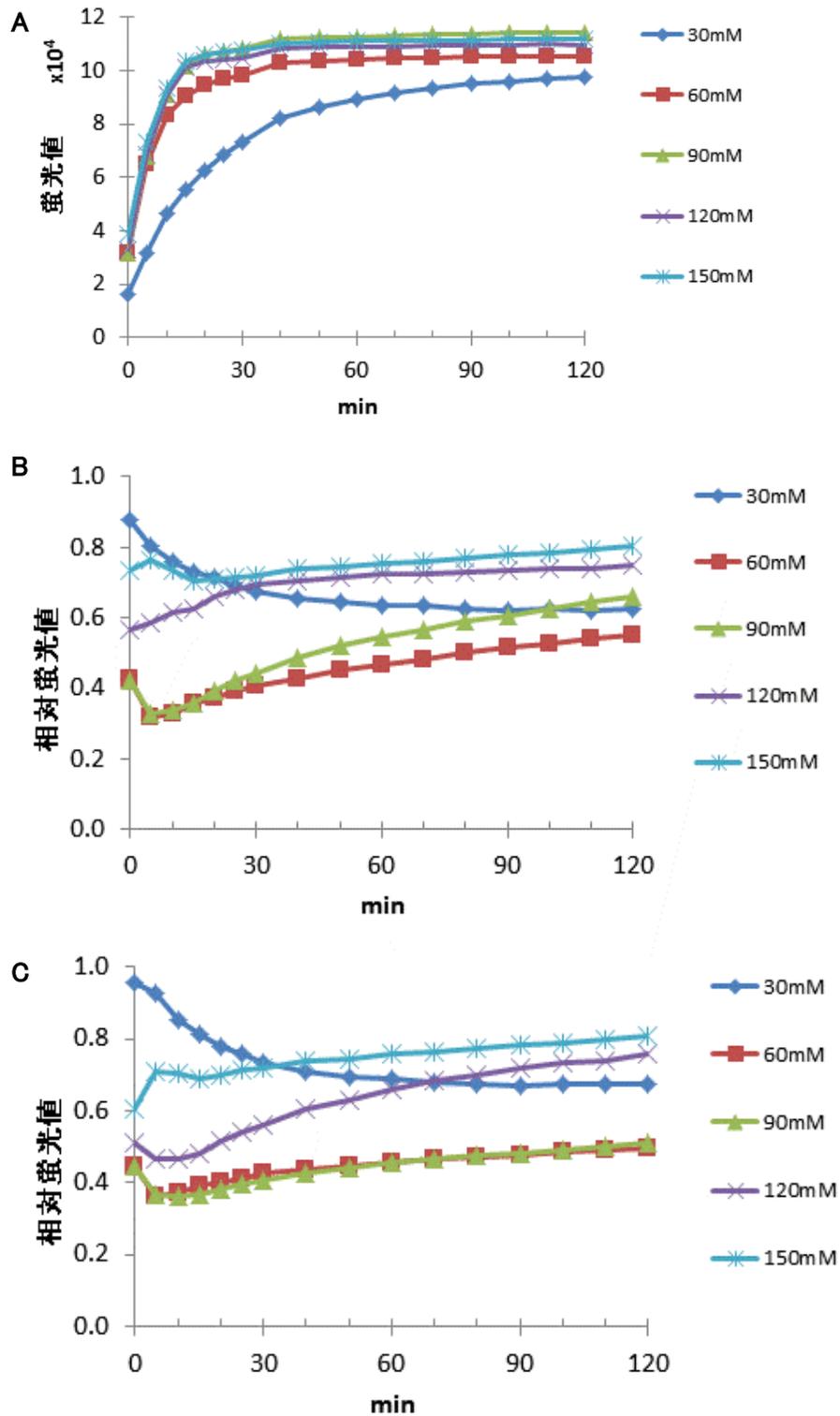


図 3-2-1 鎖交換に対する KCl 濃度の影響

A: 30, 60, 90, 120, 150 mM KCl における DSE-FRET (タンパク質未添加) の蛍光値。
 B: p50 による鎖交換の抑制 (蛍光値の低下)。p50 未添加の蛍光値に対する相対値。
 C: p52 による鎖交換の抑制 (蛍光値の低下)。p52 未添加の蛍光値に対する相対値。
 5 μ l の 80 nM 01F/14D に、40 μ l のタンパク質溶液 (100nM 組換えヒト p50 あるいは p52) を加え、続いて 5 μ l の 160nM 02/13 を加えて、蛍光値を測定した。バッファー組成は、10 mM HEPES-NaOH (pH7.9)、60~150 mM KCl、0.1 mM EDTA、25 mM DTT、10 % glycerol、0.05 % CA-630 とした。

第二項 反応液量

当初設定した条件では、5 μ l の阻害剤に、5 μ l の duplex1 を加え、さらに 35 μ l のタンパク質、最後に 5 μ l の duplex2 を加えていた。タンパク質は duplex1 だけでなく duplex2 にも結合するため、duplex2 の添加前後でタンパク質濃度の大きな変化がないようにする必要があったと考えていたからである。しかし、当初設計の条件では、図 3-2-2 で示すように Evans Blue (EB) のように吸光特性のある被検物質の場合には蛍光が吸収されてアッセイが成立しないことが明らかになった。EB は 100 μ M で NF- κ B を阻害することが報告されているが⁵⁷、DSE-FRET では、終濃度 100 μ M で鎖交換蛍光値 (01F/14D + 02/13) が半減し、1000 μ M では 1/10 以下になった。蛍光リファレンス (01F/02) でも同様であったので、EB が鎖交換を阻害するのではなく、単に励起光や蛍光が吸収されたと考えられた。蛍光値への影響が少ない終濃度 10 μ M で、p50 および p52 の結合への影響調べたが、阻害効果は明確ではなかった(図 3-2-3)。

この問題を解決するため、液量の配分を以下のように変更した。さらに、混合の手順も、阻害剤とタンパク質を混合した後 30 分間静置し、duplex1 を添加した後にさらに 10 分間静置した。

	変更前		変更後
阻害剤	5 μ l	→	0.5 μ l
duplex1	5 μ l	→	5 μ l
タンパク質	35 μ l	→	5 μ l
duplex2	5 μ l	→	40 μ l

図 3-2-4 に示した通り、タンパク質未添加 (Protein-) では、EB 添加によって蛍光値の変化はほとんどなかった。一方で、p50 によって抑制された鎖交換蛍光値 (01F/14F+02/13) は、EB によって回復した。つまり、EB による p50 の阻害を検出することが可能となった。よって、これ以降は変更後の液量でアッセイを行った。

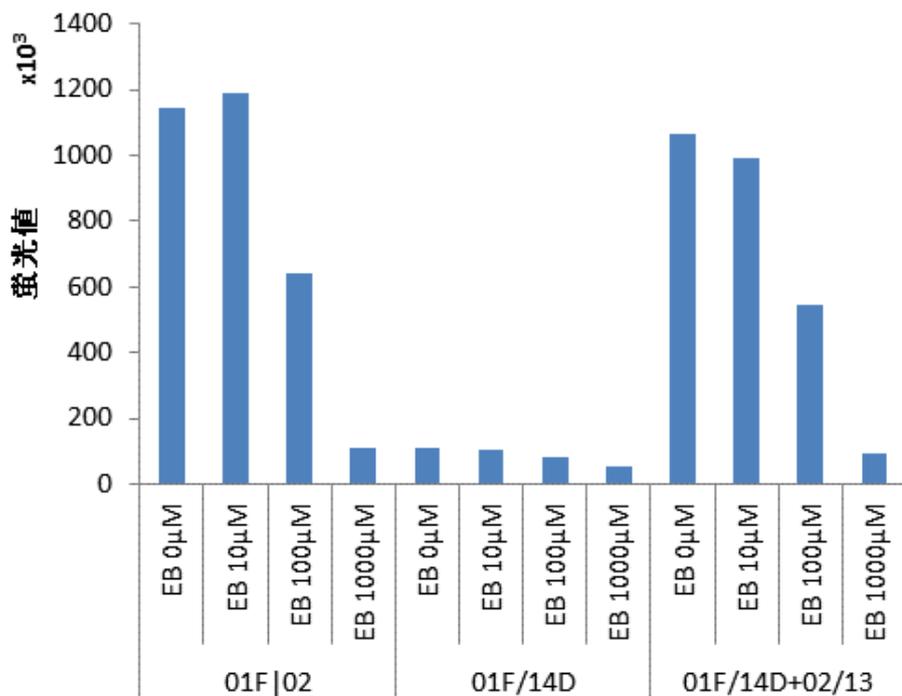


図 3-2-2 DSE-FRET における EvansBlue(EB)の影響

01F|02: 蛍光リファレンス(鎖交換産物モデル)、01F/14D: 消光リファレンス(duplex1)、01F/14D+02/03: duplex1とduplex2を混合。蛍光値はs60分後に測定した。タンパク質未添加。EB濃度は終濃度を示している。

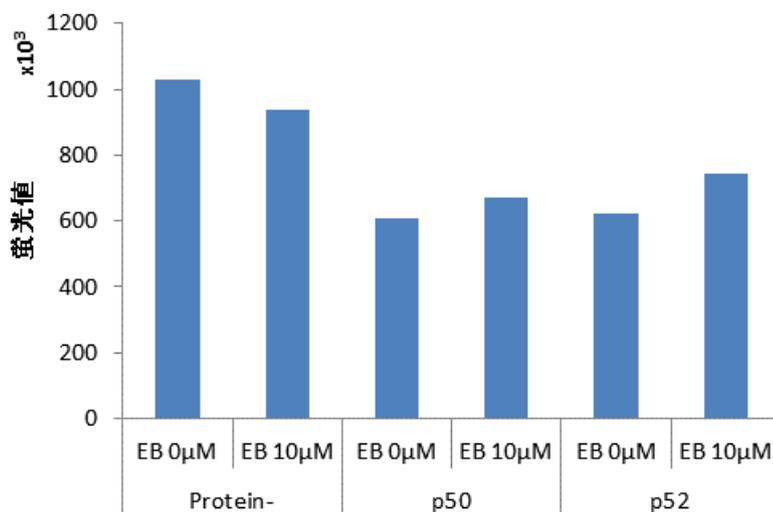


図 3-2-3 DSE-FRET による NF-κB 検出における EvansBlue(EB)の影響

5μlの100μM Evans Blue(終濃度10μM)と5μLの80nM duplex1、35μlの57nM(終濃度40nM)のp50またはp52を添加し、続いて5μlの160nM duplex2を添加した後、混合し、60分後に測定した。

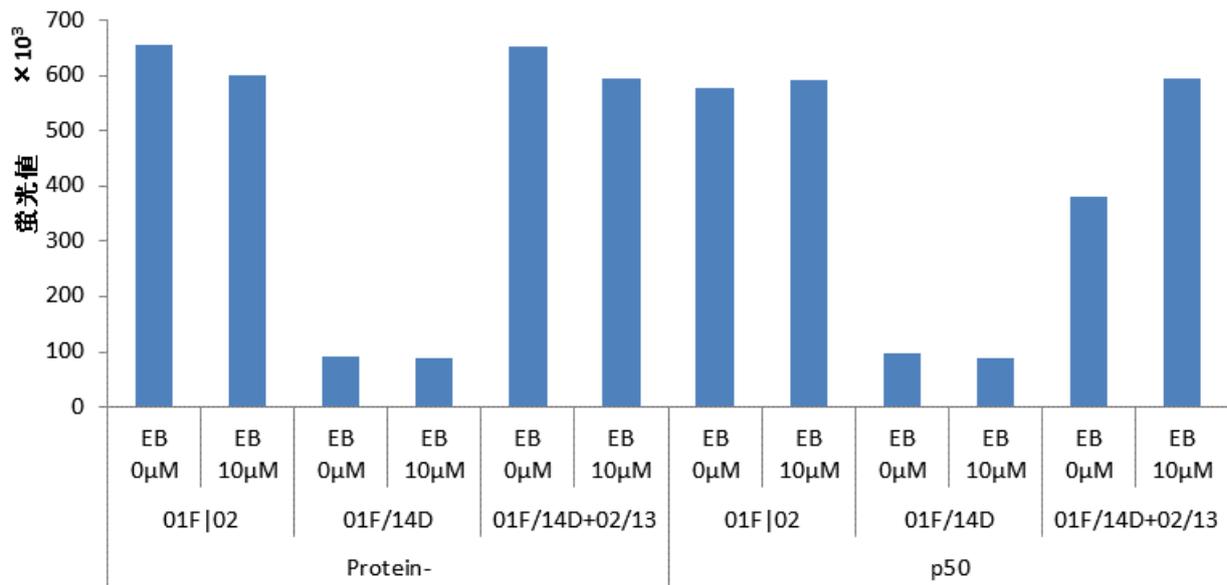


図 3-2-4 液量変更による DSE-FRET による NF- κ B 検出における EvansBlue(EB)の影響の軽減
 0.5 μ l の 1000 μ M Evans Blue (終濃度 10 μ M)と 5 μ l の 40 nM duplex1、5 μ l の 400 nM (終濃度 40nM) の p50 を添加し、続いて 40 μ l の 10 nM duplex2 を添加した後、混合して 60 分後に蛍光値を測定した。

第三項 反応時間

従来は、duplex1 とタンパク質の混合後、速やかに duplex2 を添加していた。しかし、duplex1 とタンパク質を長時間反応させれば、より鎖交換抑制効果が高まると考え、反応時間の検討を行った（図 3-2-5）。

5 分間の反応でも、従来の液量配分（p50 40 μ l 5min、赤い四角）よりも新しい液量配分（p50 5 μ l 5min、緑色の三角）の方が鎖交換抑制効果が高かった。新しい液量配分では、反応時間が長いほど鎖交換抑制効果が高かった。

反応時間は長いほどよいが、スループットの低下につながることから、30 分間を採用した。

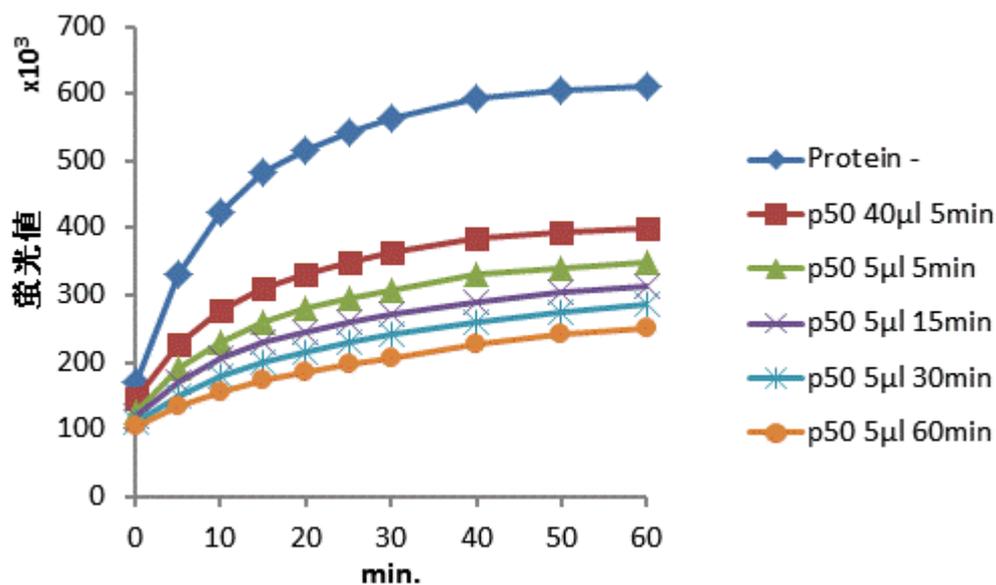


図 3-2-5 反応時間の影響

5 μ L の 40 nM duplex1 に、5 μ l の 400 nM (終濃度 40nM) p50、あるいは 40 μ l の 50 nM (終濃度 40nM) p50 を添加し、5 分から 60 分間静置した後、40 μ l の 10 nM duplex2 を添加して蛍光値を測定した。

第四項 タンパク質濃度依存性評価

液量配分および反応時間を定めたので、蛍光値のタンパク質濃度依存性について確認した。

p50 の濃度依存的に蛍光値の低下が認められた(図 3-2-6A)。1600 nM の p50 (duplex1 との反応では 800 nM、終濃度では 160 nM) でほぼ完全に鎖交換を抑制した。また、蛍光リファレンス(鎖交換の最終産物 01F|02)と消光リファレンス (duplex1 単独、01F/14D) では p50 による蛍光値変化はほとんどなかった(図 3-2-6B)。

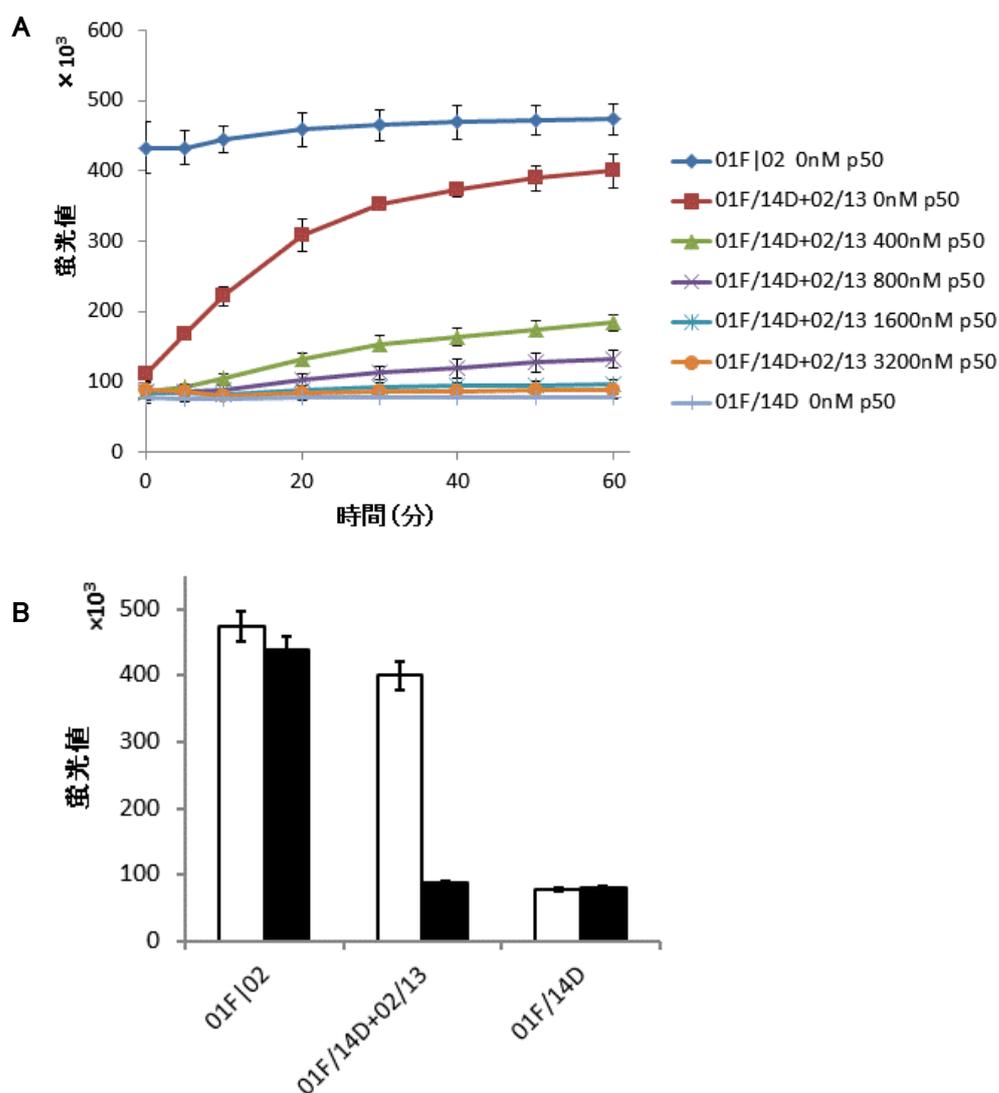


図 3-2-6 濃度依存的な NF- κ B (p50) の検出

5 μ L の 40 nM duplex1 に、5 μ l の 400~3200 nM の p50 を添加し、30 分間静置した後、40 μ l の 10 nM duplex2 を添加して蛍光値を測定した。エラーバーは $\pm 3x$ 標準偏差 (n=4)。

A: 蛍光値の経時的変化。

B: 蛍光リファレンス(01F|02)、鎖交換(01F/02+02/13)、消光リファレンス(01F/14D)への p50 の影響。白抜きバーは p50 未添加、黒塗りのバーは p50 添加。

第五項 プローブ濃度

プローブ濃度の最適化を行った。

予備検討から、duplex1 の濃度は蛍光強度を決める最も重要な要素であること、duplex1 に対する duplex2 の比率が高い方が鎖交換の効率が高く、また、duplex1 の濃度が低い方がタンパク質による鎖交換抑制の効果が高いことが分かっていた。

そこで、duplex1 と duplex2 の濃度を、これまでの 4nM:8nM から下げて、最適な濃度を比率を検討した(図 3-2-7)。予備検討の結果と一致して、蛍光値は duplex1 濃度に依存し、鎖交換の初速度および 60 分での到達点は、duplex2 濃度が高い方が高かった。また、鎖交換抑制の度合い(%Suppress)は、duplex1 濃度が低く、duplex2 比率が低い方が大きく、1nM:2nM で最大の 93%であった(表 3-2-1)。

アッセイ系としての評価は、鎖交換の抑制率だけでなく、S/B と Z'-factor が重要である。S/B は、2nM:4nM が最も高かったが、他条件との差は小さく、どの条件でも十分使用できるレベルであった。Z'-factor も、どの条件でも良好であり、中でも 2nM:8nM で 0.93 と非常に高い値であった(表 3-2-1)。Z'-factor を重視し、2nM:8nM を採用した。なお、2nM:8nM では鎖交換が完全には抑制されていないため、添加する p50 を増量すれば、S/B と Z'-factor がより高くなると予測されるが、スクリーニングコストの上昇を考慮すると現状で十分であると考えた。

表 3-2-1 プローブ濃度の影響

Duplex1 (nM)	Duplex2 (nM)	%Suppress	S/B	Z'-factor
4	8	58	1.9	0.77
2	4	76	2.3	0.90
2	8	71	2.2	0.93
1	2	93	2.1	0.83
1	8	76	1.9	0.82

%Suppress =

$$100 - \left(\text{平均蛍光値}_{[\text{タンパク質添加}]} - \text{平均蛍光値}_{[\text{消光リファレンス}]} \right) / \left(\text{平均蛍光値}_{[\text{タンパク質未添加}]} - \text{平均蛍光値}_{[\text{消光リファレンス}]} \right) \times 100$$

$$S/B = \text{平均蛍光値}_{[\text{タンパク質未添加}]} / \text{平均蛍光値}_{[\text{タンパク質添加}]}$$

Z'-factor =

$$1 - \left(3 \times \text{標準偏差}_{[\text{タンパク質未添加}]} + 3 \times \text{標準偏差}_{[\text{タンパク質添加}]} \right) / \left(\text{平均蛍光値}_{[\text{タンパク質未添加}]} - \text{平均蛍光値}_{[\text{タンパク質添加}]} \right)$$

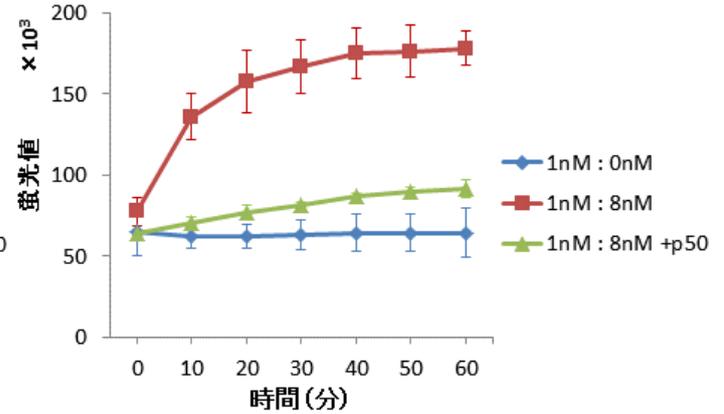
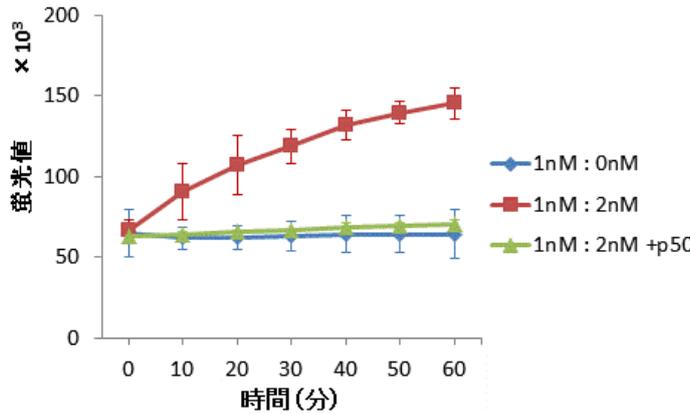
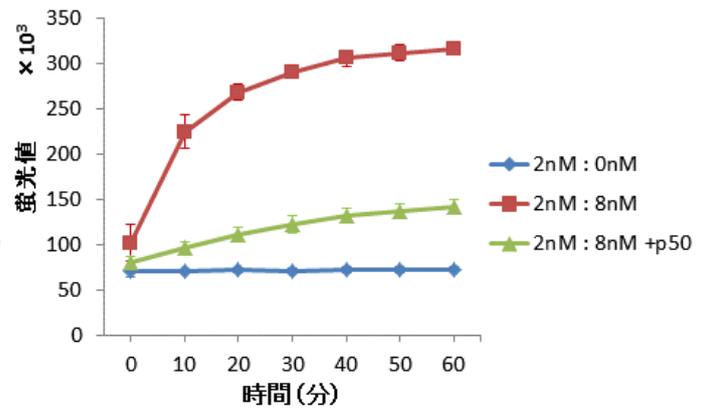
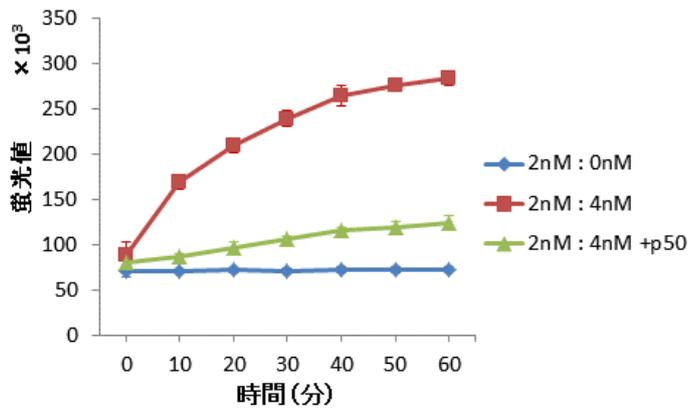
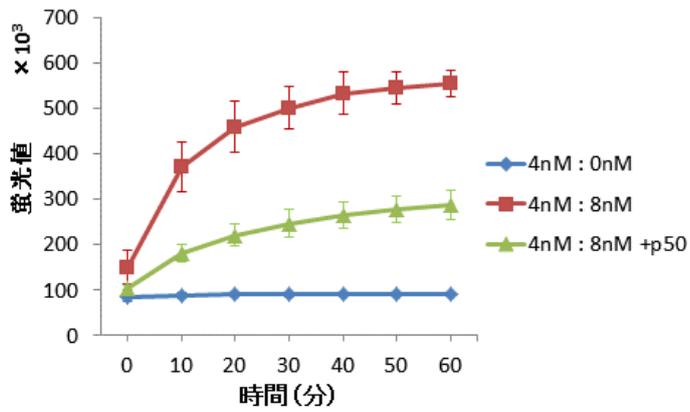


図 3-2-7 プローブ濃度の検討

5 μ L の各濃度 duplex1 に、5 μ l の 400nM p50 を添加し、30 分間反応させた後、35 μ l の各濃度 duplex2 を添加して蛍光値を測定した。凡例は、duplex1 と duplex2 の終濃度と、p50 添加の有無を示している。エラーバーは $\pm 3 \times$ 標準偏差 (n=4)。

第六項 配列特異性評価

ここまでで決定した条件で、NF- κ B 結合の配列特異性の確認を行った。配列特異的に結合できていれば本来の結合様式であることが示唆され、適切な阻害剤スクリーニングを実施できると期待できる。

配列特異性確認のために、NF- κ B 結合配列の保存配列(図 3-2-8)に変異を導入したコンペティターDNA を作成した。以下に配列を示す(赤字が変異部分)。変異の数は、1、2、3、4 塩基とした。

NF-cpt1 5' AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC 3'
3' TCAACTCCCTGAAAGGGTCCG 5'

NF-cpt2 5' AGTTGAGAGGACTTTCCAGGC 3'
3' TCAACTC TCCTGAAAGGGTCCG 5'

NF-cpt3 5' AGTTGAGATGACTTTCCAGGC 3'
3' TCAACTC TACTGAAAGGGTCCG 5'

NF-cpt4 5' AGTTGAGATTACTTTCCAGGC 3'
3' TCAACTC TAA TGAAAGGGTCCG 5'

NF-cpt5 5' AGTTGAGATTACTTTCAAGGC 3'
3' TCAACTC TAA TGAAAGTGTCCG 5'

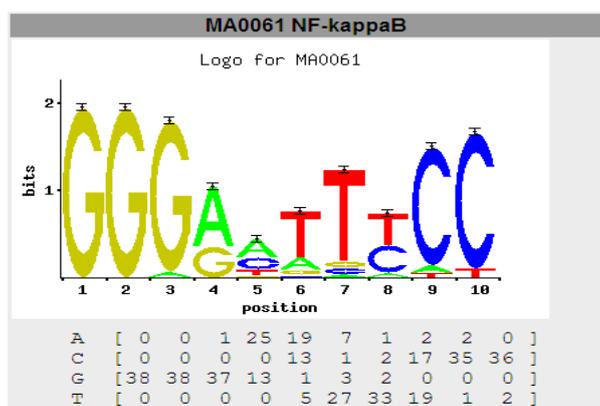


図 3-2-8 NF κ B 結合配列の保存配列
(<http://jaspar.genereg.net/> による。設計時点のもの)

さらに、NF-cpt5 と同じ変異を導入したプローブ(83F/92D、87/96)でも特異性を確認した。

NF κ B-83-5F 5' 6FAM- AGTTGAGATTACTTTACAGGCGACTCACTATAGG cgggtgtctcgctcgc 3'
NF κ B-92-3D 5' gggaatggtgtggtg CCTATAGTGAGTCGCCTGTGAAAGTAATCTCAACT -Dabcyl 3'
NF κ B-96 5' gcgagcgagacaccg CCTATAGTGAGTCGCCTGTGAAAGTAATCTCAACT 3'
NF κ B-87 5' AGTTGAGATTACTTTACAGGCGACTCACTATAGG caccacaccattccc 3'

図 3-2-9 に示したように、p50 の DNA 結合は、完全な NF- κ B 結合配列を持ったコンペティター (NF-cpt1) でほぼ完全に阻害され、保存配列への変異導入数に増加に伴って阻害効果が低下した。

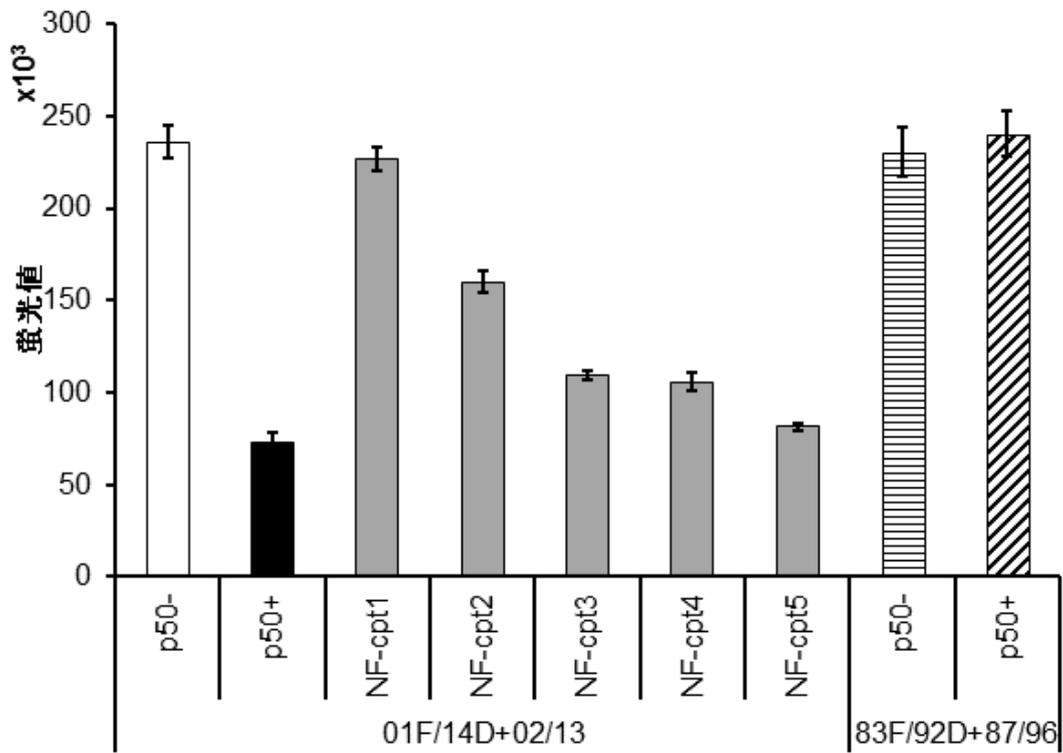


図 3-2-9 特異性の確認

2.5 μ L の 2000 nM コンペティターDNA と 2.5 μ l の 400nM p50 を添加し、30 分静置した後、5 μ l の 20 nM duplex1 を加えてさらに 30 分間反応させた後、40 μ l の 10 nMduplex2 を添加して、60 分後の蛍光値を測定した。エラーバーは $\pm 3 \times$ 標準偏差。

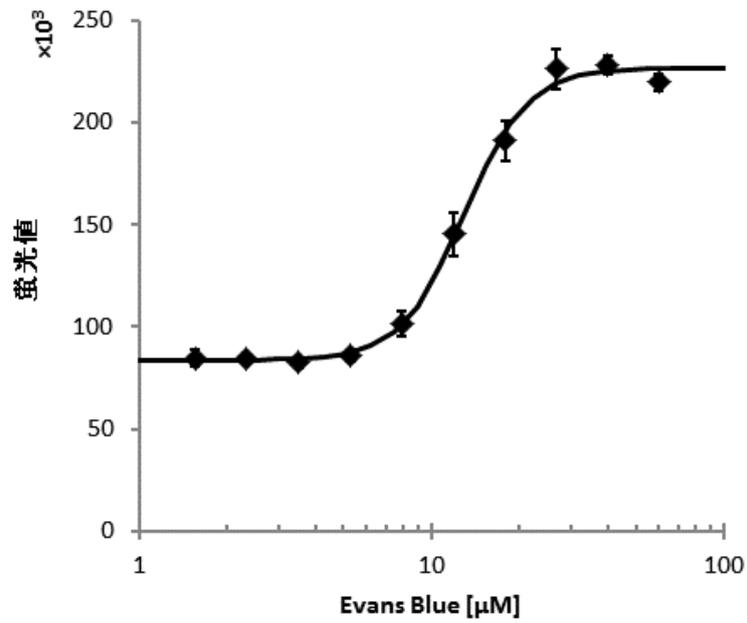
第七項 化合物評価

ここまでで定めた条件で、既知の NF- κ B 阻害剤を検出できるか確認した。

阻害剤は Evans Blue(EB)と dehydroxymethylepoxyquinomicin ([-]-DHMEQ)を用いた。EB は EMSA によって NF- κ B 阻害効果が認められており、分子モデリングで p50 の DNA 結合領域に結合すると予想されている⁵⁷。EB について用量応答性試験を行った結果を図 3-2-10 に示した。EB 濃度に依存して蛍光値が上昇した。前述のように、EB は 100 μ M で NF- κ B を完全に阻害した報告されている⁵⁷。これは核抽出液を用いた EMSA による報告であるので、単純比較はできないが、DSE-FRET では 30 μ M で完全に NF- κ B を阻害し、大きな差のない結果であった。p50 と p52 の IC₅₀ はそれぞれ 12.9 μ M と 12.8 μ M で、差がなかった。(-)-DHMEQ は細胞レベルの実験で NF- κ B 阻害効果が認められた薬剤で、p50 や p65 のシステイン残基に結合するが、p52 には結合しないとされてる⁵⁸。(-)-DHMEQ の用量応答性試験の結果を図 3-2-11 に示した。なお、(-)-DHMEQ は共同研究先の愛知医科大学 梅澤一夫教授より分与されたものである。

DSE-FRET の蛍光値は、(-)-DHMEQ 濃度の上昇に伴って上昇し、阻害剤濃度依存的な NF- κ B 阻害効果を確認できた。p50 と p52 の IC₅₀ は、それぞれ、8.8 μ M と 62.5 μ M で大きな差があり、Yamamoto らの報告⁵⁸どおり、(-)-DHMEQ の p50 選択性が確認できた。ただ、EMSA では p52 を全く阻害しないされているのに DSE-FRET で p52 の阻害が認められた原因については不明で、今後の検討課題である。

A



B

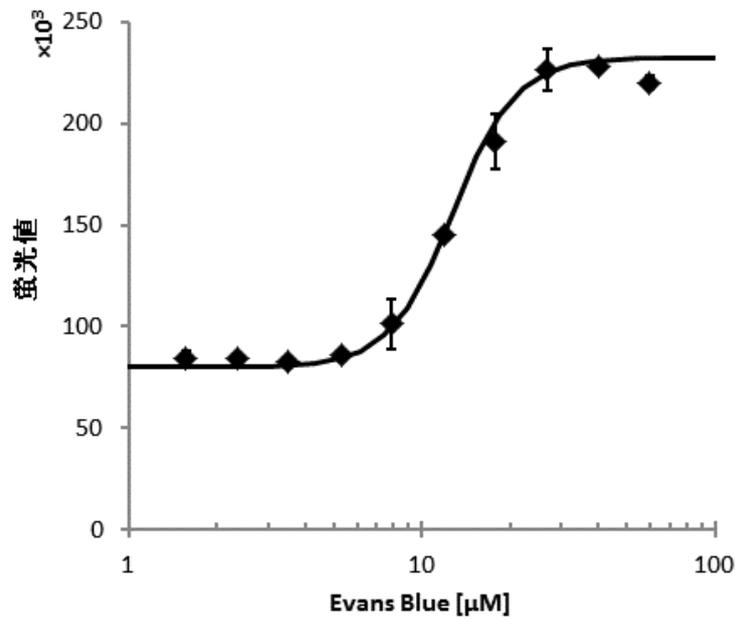


図 3-2-10 EvansBlue(EB)の用量応答性試験

0.5 μL の各濃度の EB、5 μl の 400n M p50 混合し 30 分静置した後、5 μl の 20 nM duplex1 を加えてさらに 30 分間反応させた後、40 μl の 10 nM duplex2 を添加して、60 分後の蛍光値を測定した。エラーバーは土標準偏差(n=4)。A: p50、B: p52。横軸の EB 濃度は、duplex1 を含む 10 μl での値で示している。

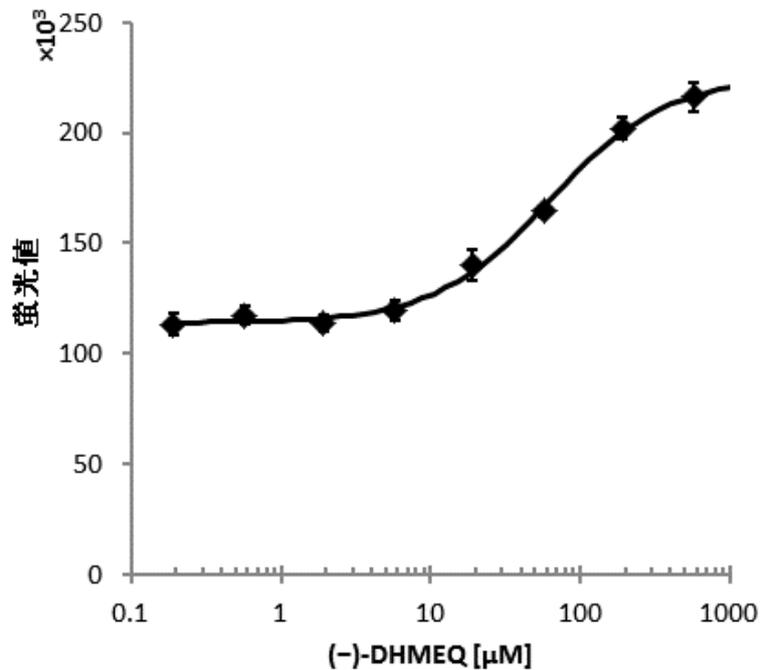
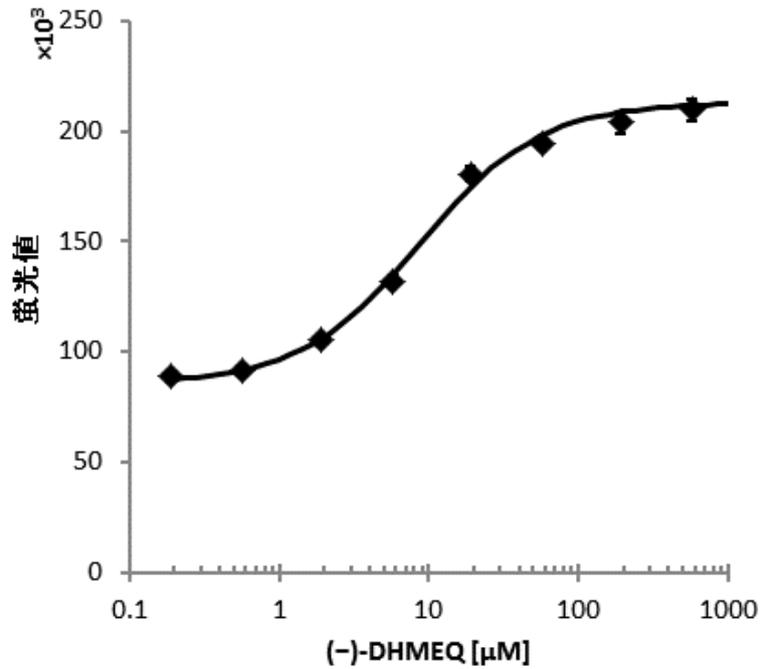


図 3-2-11 (-)-DHMEQ の用量応答性試験

0.5 μL の各濃度の(-)-DHMEQ と 5 μl の 400 nM p50 混合し 30 分静置した後、5 μl の 20 nM duplex1 を加えてさらに 30 分間反応させた後、40 μl の 10 nM duplex2 を添加して、60 分後の蛍光値を測定した。エラーバーは±標準偏差(n=4)。A: p50、B: p52。横軸の(-)-DHMEQ 濃度は duplex1 を含む 10 μl での値で示している。

第三節 考察

本章では、DSE-FRET を用いて、NF- κ B 阻害剤スクリーニング系の最適化を行った。

反応溶液の塩濃度、各要素(阻害剤、duplex1、NF- κ B タンパク質、duplex2)の液量、反応時間、プローブ濃度および比率を検討することで、S/B が 2.2、Z'-factor が 0.93 と、精度の高いアッセイ系となった。また、液量の検討により、吸光特性を持つ被検化合物の評価も可能となった。EB と (-)-DHMEQ を用いて、化合物の用量応答性試験の実施も可能であることが示された。変異導入コンペティターDNA を用いた阻害実験では、変異導入数に応じた阻害効果がみられ、さらに、(-)-DHMEQ の p50 選択性も認められたことから、本法が、タンパク質と阻害剤の親和性の違いを鋭敏に検出できる条件となっていることが示された。

アッセイに要する時間は 120 分程度で、当初の条件よりも長くなったが、そのほとんどはインキュベーション時間であるため、大規模スクリーニングへの適用に問題はない。最終液量は 50 μ l であり、384 ウェルでのアッセイが可能である。自動分注機を用いて追加検討を行えば、さらに少量の液量にして 1536 ウェルへの対応も可能であろう。

今回設定した液量やプローブ濃度は、他の標的タンパク質でも利用できるだろう。一方で、塩濃度や pH は標的タンパク質によって至適条件が異なると考えられる。塩濃度や pH については、核内の条件と同一にすべきとの考えもあるだろうが、精製された組換えタンパク質を用いた *in vitro* 系と、様々な高分子が高濃度で存在する核内では、そもそも大きな違いがあり、同じ条件にはできない。まずは、感度高く阻害剤候補化合物を得るために、核内条件からの乖離が大きくなりすぎない程度に、*in vitro* 系での最適化を行うべきであろう。

第四章 総括

本研究では、大規模ハイスループットスクリーニング (HTS) に使用可能なアッセイ系の開発を目的として、DSE-FRET (DNA Strand Exchange - Fluorescence Resonance Energy Transfer) 法を開発した。

DSE-FRET は、新しい原理に基づいた DNA 結合タンパク質阻害剤スクリーニング法である。

本法は、in vitro において DNA 鎖交換反応 (DNA Strand Exchange [DSE]) が、タンパク質の結合によって停止することを利用し、鎖交換の程度を蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer [FRET]) を利用して検出する。

タンパク質の結合による鎖交換の停止は、特定のタンパク質のみで認められる特殊な現象であると考えられていたが、本研究で一般的な転写因子 (NF- κ B、AP-1、Sp1) でも認められる現象であることを明らかにした。この現象を FRET と組み合わせることで、ホモジニアスな DNA-タンパク質結合アッセイ法の構築に成功した。

NF- κ B 阻害剤スクリーニング系の最適化検討を行い、精度と処理能力の高い条件を見出すことができた。

転写因子などの DNA 結合タンパク質は、抗がん剤をはじめとする治療薬の標的として有望視されながら、その阻害剤は未だ承認に至ってない。DSE-FRET はこれまで実施できなかった大規模スクリーニングを可能し、DNA 結合タンパク質の阻害剤開発を推進するための強力なツールとなるだろう。

参考文献

1. Darnell JE Jr., Nat Rev Cancer. 2002 Oct;2(10):740–9. Transcription factors as targets for cancer therapy.
2. Gilmore TD, Herscovitch M., Oncogene. 2006 Oct 30;25(51):6887–99. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting.
3. Yue P, Turkson J., Expert Opin Investig Drugs. 2009 Jan;18(1):45–56. Targeting STAT3 in cancer: how successful are we?
4. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B., J Cell Biochem. 2013 May;114(5):967–74. HIFs, angiogenesis, and cancer.
5. Ning H, Li T, Zhao L, Li T, Li J, Liu J, Liu Z, Fan D., Cancer Biol Ther. 2006 Aug;5(8):950–6. TRF2 promotes multidrug resistance in gastric cancer cells.
6. Arkin MR, Wells JA., Nat Rev Drug Discov. 2004 Apr;3(4):301–17. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream.
7. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T., Nat Med. 1997 Aug;3(8):894–9. In vivo transfection of cis element “decoy” against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction.
8. アンジェス MG(株) プレスリリース平成 20 年 2 月 8 日
9. アンジェス MG(株) プレスリリース平成 26 年 5 月 2 日
10. Aikawa Y, Morimoto K, Yamamoto T, Chaki H, Hashiramoto A, Narita H, Hirono S, Shiozawa S., Nat Biotechnol. 2008 Jul;26(7):817–23. Treatment of arthritis with a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1.
11. Turkson J, Zhang S, Mora LB, Burns A, Sebt S, Jove R., J Biol Chem. 2005 Sep 23;280(38):32979–88. A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells.

12. Umezawa K., *Biomed Pharmacother.* 2011 Jul;65(4):252–9. Possible role of peritoneal NF- κ B in peripheral inflammation and cancer: lessons from the inhibitor DHMEQ.
13. Garner MM, Revzin A., *Nucleic Acids Res.* 1981 Jul 10;9(13):3047–60. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system.
14. Gubler ML, Abarzúa P., *Biotechniques.* 1995 Jun;18(6):1008, 1011–4. Nonradioactive assay for sequence-specific DNA binding proteins.
15. Heyduk T, Heyduk E., *Nat Biotechnol.* 2002 Feb;20(2):171–6. Molecular beacons for detecting DNA binding proteins.
16. Wang J, Li T, Guo X, Lu Z., *Nucleic Acids Res.* 2005 Feb 1;33(2):e23. Exonuclease III protection assay with FRET probe for detecting DNA-binding proteins.
17. Jantz D, Berg JM., *Nat Biotechnol.* 2002 Feb;20(2):126–7. Binding assays get into the groove.
18. Kobayashi T, Okamoto N, Sawasaki T, Endo Y., *Anal Biochem.* 2004 Sep 1;332(1):58–66. Detection of protein–DNA interactions in crude cellular extracts by fluorescence correlation spectroscopy.
19. Thompson BJ, Camien MN, Warner RC., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Jul;73(7):2299–303. Kinetics of branch migration in double-stranded DNA.
20. Grigoriev M, Hsieh P., *Mol Cell Biol.* 1997 Dec;17(12):7139–50. A histone octamer blocks branch migration of a Holliday junction.
21. Prabhu VP, Simons AM, Iwasaki H, Gai D, Simmons DT, Chen J., *J Mol Biol.* 2002 Mar 8;316(5):1023–32. p53 blocks RuvAB promoted branch migration and modulates resolution of Holliday junctions by RuvC.
22. Poulet A, Buisson R, Faivre–Moskalenko C, Koelblen M, Amiard S, Montel F, Cuesta–Lopez S, Bornet O, Guerlesquin F, Godet T, Moukhtar J, Argoul F, Déclais AC, Lilley DM, Ip SC, West SC, Gilson E, Giraud–Panis MJ., *EMBO J.* 2009 Mar 18;28(6):641–51. TRF2 promotes, remodels and protects telomeric Holliday junctions.

23. Panyutin IG, Hsieh P., *J Mol Biol.* 1993 Mar 20;230(2):413–24. Formation of a single base mismatch impedes spontaneous DNA branch migration.
24. De Angelis DA., *Physiol Genomics.* 1999 Aug 31;1(2):93–9. Why FRET over genomics?
25. Marras SA, Kramer FR, Tyagi S., *Nucleic Acids Res.* 2002 Nov 1;30(21):e122. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes.
26. Yang Q, Lishanski A, Yang W, Hatcher S, Seet H, Gregg JP., *Genome Res.* 2003 Jul;13(7):1754–64. Allele-specific Holliday junction formation: a new mechanism of allelic discrimination for SNP scoring.
27. McKinney SA, Freeman AD, Lilley DM, Ha T., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 19;102(16):5715–20. Observing spontaneous branch migration of Holliday junctions one step at a time.
28. Chen Z, Ji M, Hou P, Lu Z., *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 7;345(3):1254–63. Exo-Dye-based assay for rapid, inexpensive, and sensitive detection of DNA-binding proteins.
29. Rajaram N, Kerppola TK., *EMBO J.* 1997 May 15;16(10):2917–25. DNA bending by Fos-Jun and the orientation of heterodimer binding depend on the sequence of the AP-1 site.
30. Su W, Jackson S, Tjian R, Echols H., *Genes Dev.* 1991 May;5(5):820–6. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1.
31. Yu B, Datta PK, Bagchi S., *Nucleic Acids Res.* 2003 Sep 15;31(18):5368–76. Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites.
32. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T., *Science.* 1999 Feb 26;283(5406):1321–5. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2.
33. Smogorzewska A, de Lange T., *EMBO J.* 2002 Aug 15;21(16):4338–48. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells.

34. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T., *Cell*. 1999 May 14;97(4):503–14. Mammalian telomeres end in a large duplex loop.
35. Stansel RM, de Lange T, Griffith JD., *EMBO J*. 2001 Oct 1;20(19):5532–40. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang.
36. Fouché N, Cesare AJ, Willcox S, Ozgür S, Compton SA, Griffith JD., *J Biol Chem*. 2006 Dec 8;281(49):37486–95. The basic domain of TRF2 directs binding to DNA junctions irrespective of the presence of TTAGGG repeats.
37. Mao Z, Seluanov A, Jiang Y, Gorbunova V., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 7;104(32):13068–73. TRF2 is required for repair of nontelomeric DNA double-strand breaks by homologous recombination.
38. de Lange T., *Genes Dev*. 2005 Sep 15;19(18):2100–10. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres.
39. Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA., *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):41110–9. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases.
40. Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T., *EMBO J*. 1997 Apr 1;16(7):1785–94. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA.
41. Rayet B, Gélinas C., *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6938–47. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer.
42. Haefner B., *Drug Discov Today*. 2002 Jun 15;7(12):653–63. NF-kappa B: arresting a major culprit in cancer.
43. Dejardin E., *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1161–79. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development.
44. Higgins KA, Perez JR, Coleman TA, Dorshkind K, McComas WA, Sarmiento UM, Rosen CA, Narayanan R, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Nov 1;90(21):9901–5. Antisense inhibition of the p65

subunit of NF- κ B blocks tumorigenicity and causes tumor regression.

45. Guo J, Verma UN, Gaynor RB, Frenkel EP, Becerra CR., *Clin Cancer Res.* 2004 May 15;10(10):3333–41. Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the nuclear factor- κ B p65 subunit.

46. Tian W, Liou HC., *PLoS One.* 2009;4(4):e5028. RNAi-mediated c-Rel silencing leads to apoptosis of B cell tumor cells and suppresses antigenic immune response in vivo.

47. Xu Y, Josson S, Fang F, Oberley TD, St Clair DK, Wan XS, Sun Y, Bakthavatchalu V, Muthuswamy A, St Clair WH., *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3267–71. RelB enhances prostate cancer growth: implications for the role of the nuclear factor- κ B alternative pathway in tumorigenicity.

48. Li Q, Gao Y, Xu ZG, Jiang H, Yu YY, Zhu ZG., *Clin Exp Med.* 2013 Feb;13(1):11–9. Effect of antisense oligodeoxynucleotide targeted against NF- κ B/P65 on cell proliferation and tumorigenesis of gastric cancer.

49. Jacque E, Billot K, Authier H, Bordereaux D, Baud V., *Oncogene.* 2013 May 23;32(21):2661–9. RelB inhibits cell proliferation and tumor growth through p53 transcriptional activation.

50. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D., *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):321–30. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses.

51. Caamaño JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventós-Suárez C, Snapper CM, Bravo R., *J Exp Med.* 1998 Jan 19;187(2):185–96. Nuclear factor (NF)- κ B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses.

52. Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, Lira SA, Bravo R., *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):331–40. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family.

53. Köntgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S., *Genes Dev.* 1995 Aug 15;9(16):1965–77. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression.

54. Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Malek S, Ghosh G., J Biol Chem. 2000 Aug 11;275(32):24392–9. Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers.
55. Menetski JP., J Biol Chem. 2000 Mar 17;275(11):7619–25. The structure of the nuclear factor-kappaB protein-DNA complex varies with DNA-binding site sequence.
56. Hart DJ, Speight RE, Cooper MA, Sutherland JD, Blackburn JM., Nucleic Acids Res. 1999 Feb 15;27(4):1063–9. The salt dependence of DNA recognition by NF-kappaB p50: a detailed kinetic analysis of the effects on affinity and specificity.
57. Sharma RK, Otsuka M, Pande V, Inoue J, João Ramos M., Bioorg Med Chem Lett. 2004 Dec 20;14(24):6123–7. Evans Blue is an inhibitor of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB)-DNA binding.
58. Yamamoto M, Horie R, Takeiri M, Kozawa I, Umezawa K., J Med Chem. 2008 Sep 25;51(18):5780–8. Inactivation of NF-kappaB components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues.

謝辞

本研究は、広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科 教授 高野幹久先生(主指導教官)、教授 田原栄俊先生(副指導教官)、准教授 永井純也先生(副指導教官)のご指導のもとで行いました。特に田原先生には、大学院入学の機会をいただき、研究の遂行、論文の作成・投稿をはじめ全般において始終ご指導をいただきました。深く感謝いたします。

組換え NF- κ B の取得は、広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科 特任助教 塩谷文章先生、大学院生・学部生 三好龍也さん、山本拓弥さんによるものです。また、がん研究センター研究所への試薬・資材の送付などもしていただきました。深く感謝いたします。

広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科准教授 嶋本彰先生には TRF2 を標的とした DSE-FRET 構築の際などご指導・ご助言をいただきました。深く感謝いたします。

広島大学大学院医歯薬保健学総合研究科 助教 阿武久美子先生には、本研究開始当初、細胞実験等の技術指導をしていただきました。深く感謝いたします。

NF- κ B のコンストラクトおよび DHMEQ は、愛知医科大学 医学部 分子標的医薬探索寄附講座 教授 梅澤一夫先生から分与していただきました。深く感謝いたします。

本研究の実験の多くの部分は、共同研究先の国立がん研究センター研究所の一角をお借りして実施しました。快く受け入れてくださった分子細胞治療研究分野 分野長 落谷孝広先生と研究室の皆様へ深く感謝いたします。また、研究補助員 井上文子さんには、研究環境の整備においてお力添えをいただきました。深く感謝いたします。

本研究の着想は、湧永製薬株式会社と広島大学の共同研究の中で得たものです。湧永製薬株式会社 岡 孝紀 博士には多くのご指導・助言をいただきました。深く感謝いたします。

日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター 中島一格所長、検査三課 柏瀬貢一課長には、大学院入学を許可していただき、勤務時間外とはいえ業務とは無関係の研究に取り組むことを快く認めていただきました。深く感謝いたします。

2014 年 6 月

宮城 徹