

博 士 論 文

DSE-FRET assay を用いた
DNA 結合タンパク質の阻害剤探索

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

薬学専門プログラム 細胞分子生物学研究室

城間 喜智

目次

略語.....	3
序論.....	4
1. 実験方法.....	8
1.1. 細胞培養.....	8
1.2. DSE-FRET.....	9
1.2-1. DSE-FRET の原理.....	9
1.2-2. 使用 oligo の配列および duplex の作成.....	10
1.2-3. NF- κ B および TRF2 の精製.....	12
1.2-4. タンパク定量.....	16
1.2-5. DSE-FRET assay.....	17
1.3. <i>In silico</i> 解析.....	18
1.4. PK8 細胞からの核抽出.....	19
1.5. Electrophoretic mobility shift (EMSA) assay	20
1.6. Surface Plasmon Resonance (SPR) 解析.....	23
1.7. ウェスタンブロット解析.....	23
1.8. 細胞増殖曲線.....	25
1.9. コロニーフォーメーションアッセイ.....	25
1.10. Prestoblue を用いた細胞生存率の測定.....	25
1.11. FISH 解析.....	26
2. 結果.....	28
2.1. NF- κ B(RelA)阻害剤の探索.....	28
2.1-1. <i>In silico</i> 解析と DSE-FRET を用いた RelA 特異的な阻害剤の探索.....	28
2.1-2. 化合物 A55 は RelA に直接結合することで RelA-DNA 結合を阻害している...31	
2.1-3. 化合物 A55 は RelA 特異的な阻害剤である.....	33
2.1-4. 化合物 A55 は RelA の Arg41 と Gln119 を介して結合していると予測された...35	
2.2. TRF2 阻害剤の探索.....	36
2.2-1. TRF2-DNA 結合の評価をするために DSE-FRET を最適化した.....	36
2.2-2. TRF2 阻害剤の探索.....	37
2.2-3. TRF2 阻害剤#198 はがん細胞の増殖を抑制した.....	42
2.2-4. TRF2 阻害剤#198 はがん細胞に DNA 損傷を与え、細胞死を誘導した.....	44
3. 考察と結論.....	47
参考文献.....	49
謝辞.....	54

略語

DHMEQ	Dehydroxymethylepoxyquinomicin
EMSA	Electrophoretic mobility shift assays
DSE	DNA strand exchange
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
HTS	High-throughput screening
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
RHD	Rel homology domain
SPR	Surface plasmon resonance
TBS	Tris-buffered saline
PDB	Protein data bank
IC50	Half maximal inhibitory concentration
TRF1	Telomeric repeat binding factor 1
TRF2	Telomeric repeat binding factor 2
ALT	Alternative of lengthening telomere

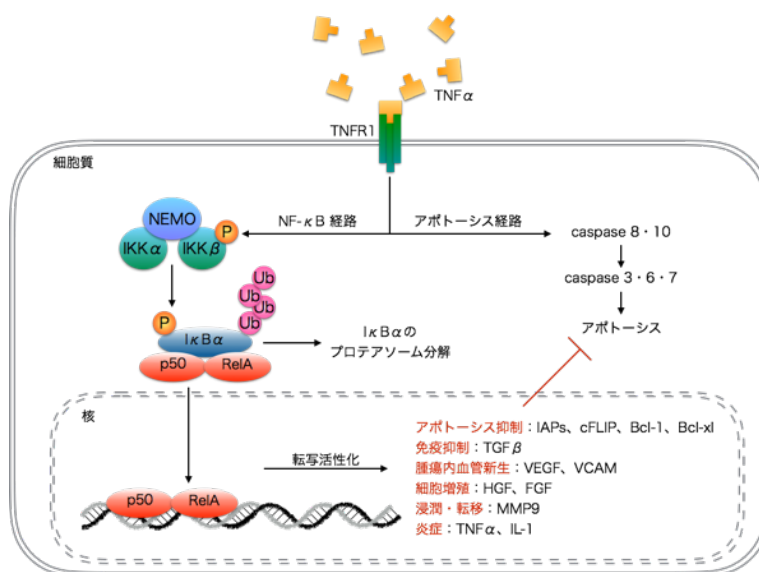
序論

がん治療の標的となる DNA 結合タンパク質

DNA 結合タンパク質は細胞の性質決定に重要なタンパク質である。その中でも転写因子は多くのがん細胞において発現が亢進しており、がんの悪性化に寄与している。特に転写因子 nuclear factor κ B (NF- κ B)はがん細胞の組織浸潤・転移や血管新生、増殖の促進、薬剤耐性獲得などに関与しており、抗がん剤の分子標的として注目されている^{1,2}。また、転写因子以外にも治療標的となる DNA 結合タンパク質がある。染色体末端であるテロメアに結合するタンパク質 telomeric repeat binding factor 2 (TRF2)は肺、肝臓、胃、子宮頸部のがん細胞で発現が上昇しており、TRF2 の過剰発現は発がん性を亢進させ、がんの悪性化に寄与している³。

転写因子 NF- κ B

NF- κ B は免疫や炎症、ストレス応答など様々な生体反応に重要な機能を持つ転写因子である⁴。興味深いことに、多くの癌において NF- κ B タンパク質が恒常的に活性化しており、悪性化に寄与していることが知られている (Figure 1)。転移に関しては、matrix metalloproteinases (MMPs)や urokinase types of plasminogen activator (uPA)、そして Interleukin-8 (IL-8) などが NF- κ B によって転写活性化されることが報告されている^{5,6}。さらに細胞周期を調節するサイクリン D1 や c-MYC⁷⁻⁹、血管新生因子の VEGF¹⁰、抗アポトーシス遺伝子である inhibitors of apoptosis proteins (IAP)^{11,12}や FADD-like IL-1 β converting enzyme inhibitory protein (FLIP)^{13,14}の発現に関しても NF- κ B が関与している。



NF-κB 阻害剤

そのため、NF-κB は癌治療の標的因子として注目されてきた。既に臨床で用いられている薬の中にも NF-κB を阻害する作用を持つものとしてクルクミンやアスピリンなどが上げられる¹⁵⁻¹⁷。しかし、これらの NF-κB 阻害作用は特異性が低い。一方、NF-κB 阻害剤として開発された dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) や NF-κB デコイオリゴなどがある。梅澤らが開発した DHMEQ は NF-κB の二量体化や DNA 結合を担う Rel homology domain (RHD) に直接結合することで阻害効果を発揮する¹⁸。DHMEQ はグリオブラストーマを移植されたマウスにおいて抗腫瘍効果を示している¹⁹。NF-κB デコイオリゴは NF-κB の DNA 結合を競合的に阻害する²⁰。したがって既存の NF-κB 阻害剤は NF-κB シグナリング全体に影響を与えることが予想される。一方で、NF-κB サブユニット毎の特異的な阻害剤はいまだに開発されていない。

NF-κB のサブユニット

NF-κB は 5 つのサブユニットで構成され、それぞれ RelA, RelB, cRel, p50 そして p52 がある。特に p50-RelA と p52-RelB の二つのヘテロダイマー が主に機能していることが知られている。p50-RelA のヘテロダイマー が介する経路は古典的経路と呼ばれ、生存、増殖、炎症、自然免疫に関与する²¹。対して p52-RelB は非古典的経路と呼ばれ、B 細胞の成熟やリンパ球新生などの獲得免疫に関わる²²。この理由から、NF-κB 経路全体の阻害は多くの遺伝子の制御に関わるため、思わぬ作用を及ぼす可能性がある。

RelA の阻害剤を探索する意義

NF-κB の中でも RelA は pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) 患者で多く発現しており、腫瘍形成や悪性化に関わっていることが知られ^{23, 24}、ゲムシタビン耐性の細胞株が siRelA によって耐性が失われたことが報告されている²⁵。このように RelA を阻害する低分子化合物は膵癌に対する治療効果を増強する薬剤として用いられる可能性がある。

テロメア結合タンパク質 TRF2 について

テロメアは染色体末端部分の TTAGGG の繰り返し配列のことであり、DNA 損傷や染色体末端結合を防ぎ、染色体の安定性を高めている。一般的に、染色体の末端は DNA の二本鎖切断の切断部分と同じ形であるために、DNA 損傷だと認識されるが、テロメアは t-loop と呼ばれるループ構造を取ることによって、物理的に DNA 損傷応答因子が相互作用できなくさせる^{26, 27}。この t-loop 構造を形成・維持するために重要な DNA 結合タンパク質複合体であるシェルタリン複合体がある (Figure 2)。この複合体は TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, Pot1 そして TPP1 で構成されている²⁸⁻³⁴。これらタンパク質の中でも TRF2 は t-loop の形成・維持に必須のタンパク質であり、in vitro の実験で TRF2 を欠いたシェルタリン複合体は t-loop を形成できないことが知られている³⁵。さらに DNA 結合ドメインを欠失した

TRF2 を発現した細胞においてテロメアにおける DNA 損傷や染色体末端結合が起きる³⁶⁻³⁹。これらの報告から、TRF2 は染色体末端を保護するシェルタリン複合体の中でも必須なタンパク質である。

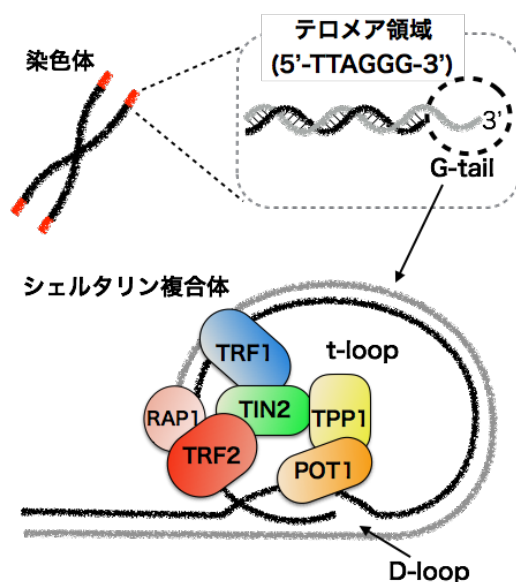


Figure 2: テロメアの構造とシェルタリン複合体

TRF2 とがん

さらに、TRF2 はテロメアの保護だけでなく、がんの悪性化にも関与することが知られている。TRF2 は様々ながん細胞で高発現しており、p53 や Wnt/ β カテニン、WT1 のシグナル経路に関与していることが報告されている⁴⁰⁻⁴²。また TRF2 の高発現は血管新生や免疫逃避機構を向上させる^{43, 44}。加えて、マウスモデルにおいて TRF2 の発現を抑制すると腫瘍形成が抑えられるため、抗がん治療の標的として注目されている^{42, 43, 45}。

テロメアを標的とする薬剤

これまでにテロメアを標的とする薬剤について多く報告がされている。例えば、相同組み換えによるテロメア伸長機構である alternative of lengthening telomere (ALT) を用いているがん細胞においては、VE-821 などの ATR 阻害剤が細胞死を誘導することが知られている⁴⁶。またテロメア結合タンパク質に関わる阻害剤としては、Malia blasco らが Ras 経路の阻害剤が TRF1 の発現を抑制してテロメアでの DNA 損傷を誘導し、がんの幹細胞性を阻害したことを報告した⁴⁷。さらに間接的な TRF2 阻害剤であるテロメスタチンは G4 構造 (DNA の二次構造) を固定することで、TRF2 が物理的にテロメアと相互作用できなくさせる⁴⁸。テロメスタチンの誘導体は in vivo、in vitro 両方の実験でグリオブラストーマに対して抗腫瘍効果を示した⁴⁹。これらの報告はテロメアを標的とする薬剤の探索はがん治療に繋がる可能性を示している。

DNA 結合タンパク質阻害剤の探索方法

しかしながら、直接的な TRF2 阻害剤や NF- κ B サブユニット特異的な阻害剤については報告がない。その理由として、現在までによく使われている阻害剤のスクリーニング方法に問題がある。よく使われる方法の一つにルシフェラーゼレポーターアッセイがあり、ハイスループット性に非常に優れた方法である。しかし、多くのタンパク質群から一つのタンパク質を区別するのが難しい。例えば、RelA を阻害したとしても他の NF- κ B タンパク質が結合することでルシフェラーゼの発現を上昇させることが可能であるため、RelA 特異的な阻害剤の探索方法としては適さない。さらに、上述のように下流の遺伝子の転写を活性化させる転写因子であれば DNA 結合能を評価できるが、TRF2 のように転写活性化能を持たないとされている DNA 結合タンパク質の評価には適さない。最近では、がんに関連する DNA 結合タンパク質を標的とした低分子化合物を素早く簡便に評価できる HTS 方法が多数開発されてきている⁵⁰。我々も 2014 に新しい High throughput screening (HTS) 方法として DNA 鎖交換反応 (DNA strand exchange: DSE) と蛍光共鳴エネルギー転移反応 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) を組み合わせた DSE-FRET 法を開発した⁵¹。DSE-FRET はホリデイジャンクションが自発的に DNA 鎖交換を行うことを利用している。ホリデイジャンクションとは、相同組換えなどの多くの種類の遺伝子組換えの重要な中間体である 4 重鎖の核酸構造である。そしてこのホリデイジャンクションの DSE は NF- κ B や p53、AP1、TRF2 などの DNA 結合タンパク質が阻害することが知られている⁵²⁻⁵⁴。DSE-FRET は従来の DNA-結合タンパク質と DNA の結合を評価する方法と比べて、簡便かつ素早く多くのサンプルを一度に評価できるメリットを持つ。さらに精製したタンパク質を利用できるため、NF- κ B サブユニット毎の DNA 結合能を評価でき、遺伝子の転写などを介す必要がないため、TRF2 の評価も可能である。

本研究の目的

本研究では DSE-FRET assay を用いて NF- κ B サブユニットである RelA 特異的な阻害剤とテロメア結合タンパク質 TRF2 の阻害剤を探索し、それら化合物の機能解析を行うことを目的とした。

1. 実験方法

1.1. 細胞培養

Table 1: 使用細胞

Cell line	classification	medium
Sf-9	Insect cell line	Sf-900 II
HeLa1.2.11	Human cervical carcinoma	DMEM
PK-8	Human pancreas carcinoma	RPMI
Panc-1	Human pancreas epithelioid carcinoma	RPMI
CFPAC	Human pancreas adenocarcinoma	RPMI
MIA PaCa-2	Human pancreas carcinoma	RPMI

Sf-9 細胞は加湿していないインキュベーター（SANYO）内で 28°C に設定し、培養した。その他の細胞は、5% 二酸化炭素、95% 空気、水蒸気飽和、37°C の条件の下、CO₂ インキュベーター（SANYO）内で培養した。

これらの細胞を以下[1]-[3]の培地を用いて維持培養した。

[1] Sf-900II

Sf-900 II 無血清培地（Invitrogen）に Antibiotic-Antimycotic (100×) liquid（GIBCO）を最終濃度 0.1×になるよう添加した培地。

[2] DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM; SIGMA）に、10% FBS (Hyclone)、0.5 × Antibiotic-Antimycotic liquid（GIBCO）を添加した培地。血清は 56°C、30 分間処理により非動化したものを使用した。

[3] RPMI

Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium（RPMI; SIGMA）に 10% FBS (Hyclone)、0.5 × Antibiotic-Antimycotic liquid（GIBCO）を添加した培地。血清は 56°C、30 分間処理により非動化したものを使用した。

1.2-1. DSE-FRET の原理

DSE-FRET は DNA の鎖交換反応 (DNA strand exchange; DSE 反応)、蛍光共鳴エネルギー移動反応 (fluorescence resonance energy transfer; FRET 反応)、DNA 結合タンパク質による鎖交換反応の阻害の組み合わせによって行われている。

お互いに相補的なリンカー配列を持っている 2 本鎖の DNA である duplex1 と duplex2 が結合することで、ホリデイジャンクションを形成し、互いの DNA 鎖が交換されることにより最終的に 2 本鎖の DNA が 2 本できるように設計されている。また、DNA 鎖交換反応は DNA へのタンパク質の結合により阻害される。

以下[1] NF- κ B DSE-FRET および [2] telomere DSE-FRET について説明する。

[1] NF- κ B DSE-FRET

NF- κ B DSE-FRET では duplex1 を構成する DNA oligo の片鎖に蛍光物質、もう一方の片鎖に消光物質を標識した (Figure 3)。このため、鎖交換反応の開始時は蛍光物質と消光物質の距離が近いため、蛍光値は低く保たれ、鎖交換反応が進行すると時間依存的に蛍光値が上昇する。本アッセイでは duplex1 と duplex2 に NF- κ B の認識配列を導入し、NF- κ B を加えることで鎖交換反応を抑制する性質を利用した。この系に、候補化合物を加えることで、その化合物の NF- κ B の DNA への結合阻害効果を評価した (Figure 4)。

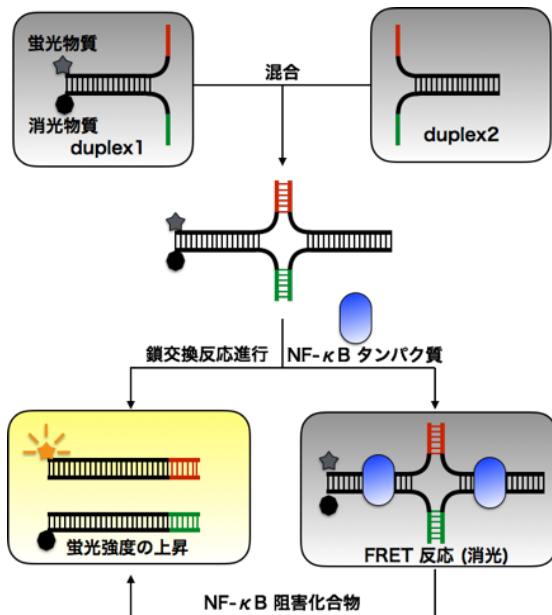


Figure 3: NF- κ B DSE-FRET assay 原理

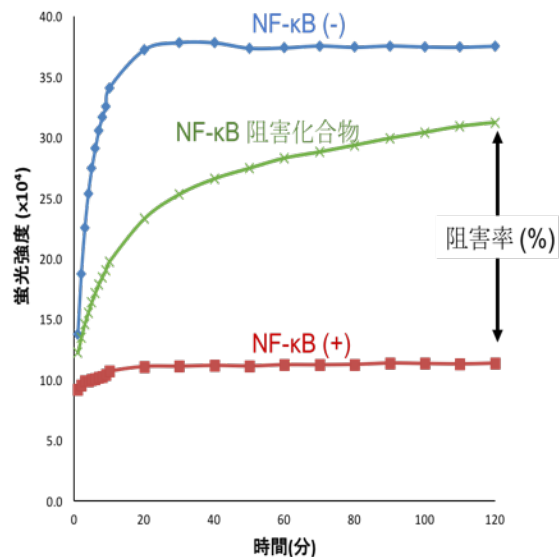


Figure 4: NF- κ B DSE-FRET assay の評価法

[2] Telomere DSE-FRET

Telomere DSE-FRET では duplex1 の片鎖に蛍光物質、 duplex2 の片鎖に消光物質を標識している。DNA の鎖交換反応が完了すると、それぞれ標識されている蛍光物質と消光物質が接近し、FRET 反応が起こり、蛍光強度が時間依存的に減少するように設計した。本アッセイでは duplex1 及び duplex2 ヘテロメア DNA 配列を導入した。このときテロメア DNA 結合タンパク質 TRF2 の存在下において DNA の鎖交換反応は阻害される (Figure 5)。この系に TRF2 とテロメア DNA との結合阻害候補物質を添加した時の反応の進行度を阻害率として算出し評価した (Figure 6)。

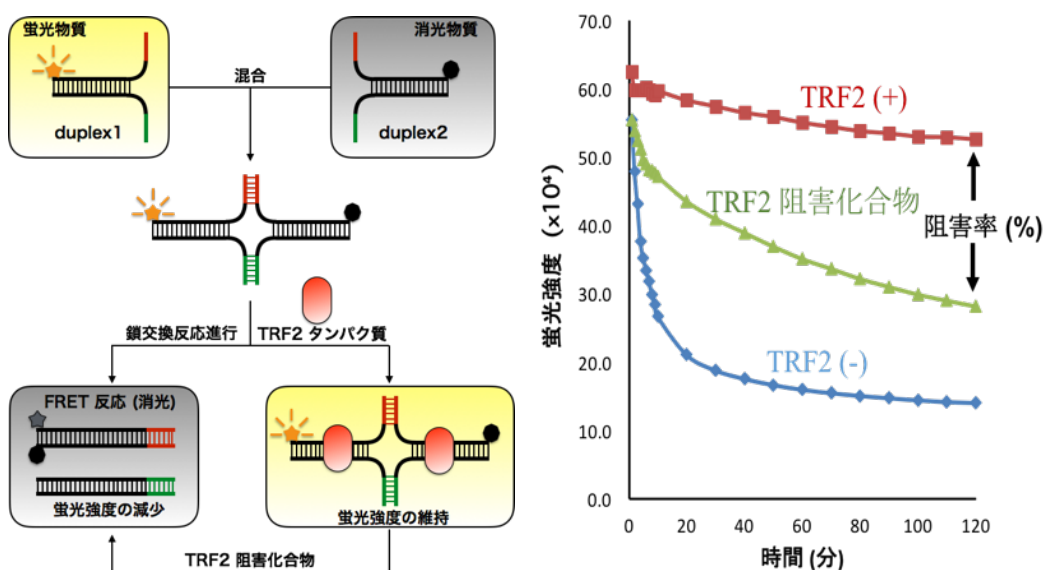


Figure 5: Telomere DSE-FRET assay の原理 Figure 6: Telomere DSE-FRET assay の評価法

※阻害率の計算は Microsoft Excel を用いて行った。

$$\% inhibition = \frac{(\Delta A - \Delta B)}{(\Delta C - \Delta B)} \times 100$$

A は化合物を加えたときの蛍光、B は溶媒 (DMSO) を加えたときの蛍光、C はタンパク質を含まないときの蛍光、 Δ は最後の蛍光 (120 分) から最初の蛍光 (1 分) を引いた値

※自家蛍光の計算も Microsoft Excel を用いて行った。

$$Autofluorescence = \frac{A}{B}$$

A は化合物と蛍光を發さないオリゴの混合物の蛍光、B は蛍光を發さないオリゴのみの蛍光

1.2-2. 使用 oligo の配列および duplex の作成

本アッセイで使用した oligo の配列を Table2 に示した。

網かけの部分はテロメア配列 (TTAGGG)₄、または NF- κ B の結合配列 (GGGACTTCC) を示している。赤または青色で示した配列はリンカー配列であり、同色の配列は、互いに相補的な配列である。

Table 2: oligo の配列

oligo 名	配列
Telomere DSE-FRET	
TLM-01-5F	5' FAM-AGTTGAGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGCAGGCGGTGTCTCGCTCGC-3'
TLM-06	5'-GGGAATGGTGTGGTG CCTGCCCTAACCTAACCTAACCTAACCTCAACT-3'
TLM-02-3D	5'-GCGAGCGAGACACCG CCTGCCCTAACCTAACCTAACCTAACCTCAACT-Dabcyl-3'
TLM-05	5' AGTTGAGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGCAGG CACCACACCATTCCC-3'
NF-κB DSE-FRET	
NF-κB-01-5F	5'-6FAM-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGCGACTCACTATAGGCGGTGTCTCGCTCGC
NF-κB-14-3D	5' GGGAATGGTGTGGTG CCTATAGTGAGTCGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-Dabcyl
NF-κB-02	5' GCGAGCGAGACACCG CCTATAGTGAGTCGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
NF-κB-13	5' AGTTGAGGGGACTTTCCAGGCGACTCACTATAGG CACCACACCATTCCC

5F: 5' FAM, 3D: 3' Dabcyl

Duplex の作成は以下の通り行った。5 μM の Table 2 の oligo を *4×DFB と DNase RNase free water を用いて 最終濃度が 0.5 μM となるよう Table 3 のように希釈した。GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて 95°C, 90 秒→85°C, 90 秒→80°C, 90 秒→75°C, 90 秒→以下 5°C ずつ下げて時間は同じ 90 秒→35°C, 90 秒のプログラムでアニーリング反応を行った。作成した duplex は Table 4 に示した。

*4× DFB: 40mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、200 mM KCl、0.4 mM EDTA

Table 3: oligo 希釈

試薬	使用量
5 μM oligo1	6 μL
5 μM oligo2	6 μL
4× DFB	15 μL
water	33 μL
total	60 μL

Table 4: duplex の組み合わせ

duplex 名	oligo1	oligo2
TLM-01F/06	TLM-01-5F	TLM-06
TLM-05/02D	TLM-02-3D	TLM-05
NF-κB-01F/14D	NF-κB-01-5F	NF-κB-14-3D
NF-κB-02/13	NF-κB-02	NF-κB-13

1.2-3. NF-κB および TRF2 の精製

NF-κB タンパクは大腸菌 BL-21 細胞にそれぞれのプラスミドベクターを導入し、精製した。TRF2 は Sf-9 細胞にバキュロウイルスを導入し、精製した。以下に[1] NF-κB および[2] TRF2 の精製法を記述する。

[1] NF-κB の精製

1) plasmid DNA

NF-κB 精製に使用したプラスミドは愛知医科大学 梅澤 一夫先生より分与を受けた。

p50、p52 は Full length を、p65、RelB、c-Rel は DNA 結合 domain、dimerization domain が pGEX-6P-1 ベクターにクローニングされている (Figure 7, Table 5)。

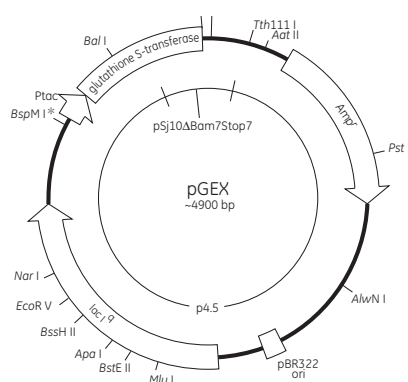


Figure 7: pGEX ベクターマップ

Table 5: 使用したプラスミド

insert	Original vector	大腸菌
p50 (1-405)	pGEX-6P-1	BL21
p52 (1-435)	pGEX-6P-1	BL21
p65 (1-325)	pGEX-6P-1	BL21
RelB (1-325)	pGEX-6P-1	BL21
c-Rel (1-307)	pGEX-6P-1	BL21

2) トランスフォーメーション

1.5 mL チューブに滅菌水 79 μL 入れ、トランスフォーメーションする DNA を 1 μL 加えた。20 μL の ※5× KCM を加えた。100 μL のコンピテントセルを加え、氷上で 20 分静置した。室温で 10 分静置した。300 μL の LB 培地を加え、37°C で 1 時間震盪した。遠心 (8,000 rpm、5 分、室温) し、細胞を回収した。ペレットを懸濁し、アンピシリン

レートに播種し、37°Cで一晩静置した。5 mL の LB 培地にアンピシリンを 150 µg / mL になるように加えた。コロニーをチップの先でピックアップし、アンピシリンを加えた LB 培地に加え、37°Cで一晩培養した。

※ 5×KCM: 0.5 M KCl, 0.15 M CaCl₂, 0.25 M MgCl₂

3) BL21 からの NF-κB タンパク精製

200 mL の LB 培地にアンピシリンを 100 µg / mL になるように加えた。LB 培地に 2) でミニカルチャーした BL21 を加えた。OD 600 の値が 0.3~0.6 になるまで 37°Cで培養後、1M IPTG を 20 µL 加え、25°Cで 3 時間震盪することにより NF-κB を発現させた。培養液を 50 mL チューブに移し、遠心 (8,500 rpm、15 分、4°C) を行った。10 mL の^{※1}Extraction buffer を加えて、sonication (power 4、10 秒 on / off、10 分) 行った。遠心 (14,000 rpm、10 分、4°C) を行い、上清を 15 mL チューブに移した。事前に Extraction buffer で平衡化しておいた Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare、17-0756-01) を 200 µL 加え、4°Cで 6 時間混和した。^{※2}Wash buffer I を加えて、氷上で 5 分静置した。2,000 ×g で遠心し、上清を除去した。5 mL の Wash buffer I を用いて、Glutathione Sepharose 4B を洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。上清を除去し、^{※3}Wash buffer II を 5 mL 加え、氷上で 5 分静置した。Glutathione Sepharose 4B を 1.5 mL チューブに移した。26G の針を用いて、Wash buffer II を完全に取り除いた。^{※4}Elution buffer を加え、4°Cで 30 分、50 rpm で転倒混和し、NF-κB を溶出した。1.5 mL チューブの底に 24G の針で穴を空け、さらにそのチューブの下に新しい 1.5 mL チューブをセットし、1,000~2,000 ×g で遠心をし、上清のみを回収した。精製したタンパク質量を定量し、-80°C で保存した。

^{※1}Extraction buffer : 20 mM HEPES-NaOH (pH7.6), 500 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% Glycerol, 0.5% Nonidet P-40

^{※2}Wash buffer I : 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10% Triton, 使用する直前に 1mM DTT, 1mM PMSF を加える

^{※3}Wash buffer II : 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5% Triton, 使用する直前に 1mM DTT, 1mM PMSF を加える

^{※4}Elution buffer : 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5% Glycerol, 使用する直前に 0.013 g / mL Glutathione, 40 mM NaOH を加える。

[2] TRF2 の精製

1) plasmid DNA

TRF2 の野生型または欠損変異型を pFastBac 1 にクローニングした plasmid DNA を Table 6 に、vector map 及びクローニングサイトを Figure 8 に示した。なお、この plasmid DNA は、湧永製薬（当時）宮城徹先生より分与いただいた。

それぞれの DNA を 1 ng / 3 μ L となるように DNase RNase free water で希釈した。

Table 6 使用 plasmid DNA

plasmid DNA
pFB-TRF2-Full
pFB-TRF2- Δ M
pFB-TRF2- Δ B

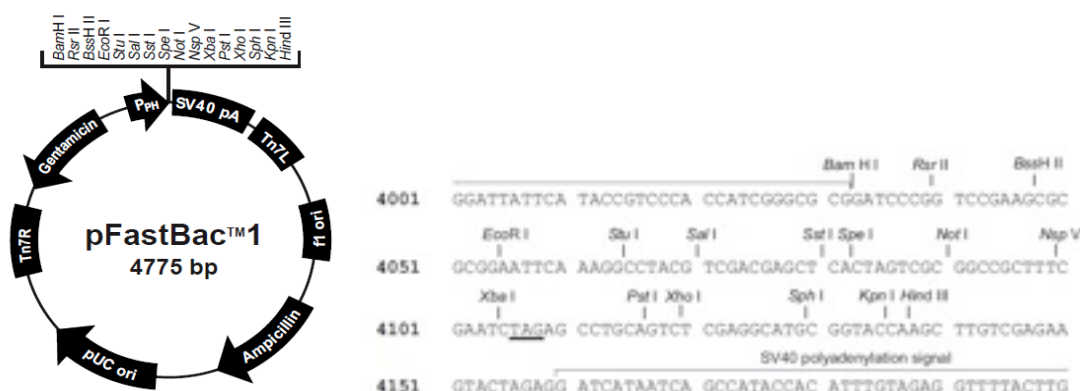


Figure 8:pFastBac1 ベクターマップ及びクローニングサイト

2) トランスフェクション

75 cm² フラスコ 1 枚分の Sf-9 をスクレーパーで剥離し、50 mL チューブに移した。改良ノイバウエル型血球計算盤を用いて顕微鏡下で細胞数を数えた。それをもとに、8 \times 10⁵ cells/well となるように SF-900 II 無血清培地 / Ab(-) で希釈後、6 well culture plate にまきこみ、1 時間通常培養の条件下においた。Cellfectin® II Reagent (Thermo Fisher Scientific) を SF-900 II 培地で希釈し、vortex 後、室温で 30 分静置した。DNA を、1 μ g/100 μ L となるように SF-900 II 培地で希釈した。DNA と、Cellfectin® II Reagent を穏やかに混和し、30 分間静置した。DNA と、Cellfectin® II Reagent の複合体を細胞に加え、ディッシュを前後左右に混ぜた後、28°C インキュベーター内で 4~5 時間培養した。SF-900 II 無血清培地 / Ab(+) 2 mL で培地替えを行なった。

3) 組み換えウイルスの増幅

トランスフェクションし、SF-900 II 無血清培地 / Ab(+) 2 mL で培地替えを行なった Sf9 細胞を 28°C の条件下で 72 時間培養した。ピペティングで軽く懸濁して培養液を回収した。培養液を 15 mL チューブ (FALCON) に移し、1500 rpm で 5 分間遠心操作を行なった。上清を回収し、P1 ウイルス液として使用まで遮光、4°C で保存した。75 cm² フラスコ 1 枚分の Sf-9 を 1:3 で継代した。28 °C の条件下で約 1 時間静置し、細胞の接着を待った。フラスコ 1 枚あたり 1 mL の P1 ウイルス液を入れた。28°C で 72 時間培養を行なった。P1 感染後 72 時間の Sf9 細胞をスクレイパーで剥がした。培養液ごと 50 mL チューブに移し、1500 rpm で 5 分間遠心操作を行なった。上清のみを回収し、0.45 μm filter (Millex-HV, 33 mm, sterilized) でフィルター濾過を行なった。P2 ウイルス液として使用まで遮光、4°C で保存した。75cm² フラスコ 1 枚分の Sf9 を 1:3 で継代し、28 °C の条件下で約 1 時間静置した。フラスコ 1 枚あたり 1 mL の P2 ウイルス液を入れ、28°C で 72 時間培養を行なった。P2 感染後 72 時間の Sf9 細胞 をスクレイパーで剥がした。培養液ごと 50 mL チューブに移し、1500 rpm で 5 分間遠心操作を行なった。上清のみを回収し、0.45 μm filter (Millex-HV, 33 mm, sterilized) でフィルター濾過を行なった。P3 ウイルス液として使用まで遮光、4°C で保存した。

4) 組み換えウイルスの SF-9 細胞への感染

75 cm² フラスコ 5~8 枚分の Sf-9 を 1:4 で継代した。28 °C の条件下で 48 時間培養を行なった。フラスコ 1 枚あたり 1 mL の P3 ウイルス液および 10%牛胎児血清 (FBS: HyClone) となるように FBS を加えた。28 °C、48 時間の条件下で培養を行なった。

5) 感染細胞からの TRF2 の精製

6×His-TRF2 の精製方法は Ni-NTA Agarose (QIAGEN) のオープンクロマトグラフィーによる 6×His タグ標識タンパク質精製プロトコールを参考に、至適化した。P3 感染細胞スクレーパーでフラスコの器壁から剥離させ、50 mL チューブに移した。1500 rpm で 5 分間遠心操作した後、ペレットを氷冷 PBS(-) で洗浄した。1500 rpm で 5 分間遠心操作し、細胞を収集した。回収した細胞に、フラスコ 1 枚当たり 1% NP-40 を含む ^{※1}Lysis buffer 4 ml を加え、細胞を懸濁し、氷上で 10 分間静置した。ライセートを 10,000 ×g、4°C で 10 分間遠心し、6×His タグタンパク質を含む粗抽出液を得た。Ni-NTA agarose (清澄化したライセート 4 ml 当たり 50% Ni-NTA 懸濁液 200 μl) を 15 mL チューブにとり、[※]¹Lysis buffer で平衡化した。粗抽出液を、平衡化した Ni-NTA に添加し、4°C で 1~2 時間振盪 (ロータリーシェーカーで 200 rpm) した。粗抽出液 / Ni-NTA Agarose 混合液を氷上で静止し、Ni-NTA Agarose を完全に沈殿させ、上清 (flow though 分画) を取り除いた。Ni-NTA Agarose に ^{※2}Wash buffer 800 μL / フラスコ 1 枚 を加え、2 回洗浄した (wash

分画)。Ni-NTA agarose に Wash buffer を加え、カラムにロードし、wash buffer を完全に取り除いた。^{※3}Elution buffer 400 μ L / フラスコ 1 枚でタンパク質を抽出した。Slide-A-Lyzer MWCO 10K Dialysis Cassette (PIERCE) を^{※4}Dialysis buffer に 30 秒浸した。Dialysis buffer からカセットを取り出し、ペーパータオルで余分な水分を取り去った。18 G 針付きシリンジ (NIPRO) のシリンジ内に少量の空気を残して、Dialysis buffer で希釈したサンプルを吸引した。カセットの角にあるシリンジポートを通して針の先を射し込んだ。カセット内にサンプルを入れた。シリンジのピストンを引き上げてカセット内の空気を取り除いた。シリンジ内に空気を保持したままカセットからシリンジの針を引き抜いた。サンプルを注入したカセットを Dialysis buffer 2L に浸し、4°C で 2 時間透析操作を行なった。buffer を 1L の新しい Dialysis buffer と交換し 3 時間透析操作を行なった。90 分後に Dialysis buffer 交換をさらに 1 回行った。サンプルと同量の空気を 18 G 針付きシリンジ内に満たした。サンプル注入時と異なるシリンジポートへ針の先端を射し込んだ。カセット内にゆっくりと空気を入れた。カセットを斜めに傾けて、カセット内のサンプルを回収した。サンプルをシリンジから適当な容器に移し、タンパク質の定量を行なった。サンプルを液体窒素で急速凍結し、-80°C に保存した。

^{※1}Lysis buffer : 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, Adjust pH to 8.0 using NaOH

^{※2}Wash buffer : 50 mM NaH₂PO₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, Adjust pH to 8.0 using NaOH

^{※3}Elution buffer : 50 mM NaH₂PO₄ 300 mM NaCl 250 mM imidazole, Adjust pH to 8.0 using NaOH

^{※4}Dialysis buffer : 20 mM HEPES(pH 7.9), 300mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 % glycerol, 0.5mM PMSF

1.2-4. タンパク定量

10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、^{※16}× SDS buffer を加えた NF- κ B または TRF2 を 3, 6, 12 μ L ずつアプライした。BSA を 125, 250, 500, 1000 ng / well となるようにアプライした。^{※2}Running buffer を用いて、120V の定電圧で電気泳動を行った。^{※3}SYPRO Ruby 固定液を入れたタッパーにゲルを浸し、室温で 30 分固定した。stain SYPRO Ruby protein gel stain 1 \times (Invitrogen, S-12000) を用い、遮光して室温で染色した。^{※4}destain SYPRO Ruby Wash にて、遮光下で 30 分間洗浄した。MilliQ を用い室温で 5 分洗浄した。この操作は 2 回繰り返した。Typhoon FLA 7000 を用いて、シグナルを検出した。ImageJ を用いて、BSA のバンドを定量し、検量線を作成した。TRF2 または NF- κ B のバンドを定量し、求めた検量線から TRF2 および NF- κ B の濃度を算出した。

^{※16}× SDS buffer: 0.35 M Tris-HCl (pH 6.8), 30% Glycerol, 11% SDS, 0.6 M DTT, 0.012% Bromophenol Blue

*²Running buffer: 25 mM Tris, 19 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS

*³SYPRO Ruby 固定液 : 50% methanol, 7% acetic acid

*⁴destain SYPRO Ruby Wash : 10% methanol, 7% acetic acid

1.2-5. DSE-FRET assay

0.5 μM に調製した duplex を、duplex1 は 0.08 μM 、duplex2 は 0.16 μM となるように *¹1 \times DFB を用いて希釈した。TRF2 または NF- κ B が 1 well あたり 16 pmol となるように希釈した protein mix を準備した。protein mix の組成は Table 7,8 に示した。96 well plate に 5 μL の 0.08 μM duplex1、40 μL の protein mix、5 μL の 0.16 μM duplex2 を順番に入れた。溶液がこぼれないように注意しプレートを揺すって、よく混合した。duplex2 を入れたら、蛍光プレートリーダー EnVision (Perkin Elmer) により蛍光値 (Ex / Em = 495 nm / 520 nm) を測定した。測定は 10 分おきに行い、120 分後までの蛍光値を測定した。ただし、最初の 10 分間は鎖交換反応の進行が速いため、1 分毎に測定した。

*¹ 1 \times DFB : 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、50 mM KCl、0.1 mM EDTA

Table 7: TRF2 protein mix の組成

試薬	1 well あたりの量 (μL)
3.52 μM TRF2	4.26
25 ng / μL poly dI-dC	2
* ² 2 \times NGB	25
water	8.74
total	40

Table 8: NF- κ B protein mix の組成

試薬	1 well あたりの量 (μL)
NF- κ B (p50, p52, RelA, c-Rel)	x
25 ng / μL poly dI-dC	2
* ² 2 \times NGB	25
water	13 - x
total	40

*²2 \times NGB : 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、126 mM KCl、0.2 mM EDTA、5 mM DTT、20% glycerol、0.025% NP-40

1.3. *In silico* 解析

RelA と DNA 間の相互作用を阻害する化合物を特定するため、階層的ドッキングプロトコルに従って構造ベースの *In silico* スクリーニングを実施した。

1) RelA の結合ポケット予測

RelA の表面にある小分子結合ポケットは SiteMap プログラムを使用して予測した。DNA と複合体を形成した RelA ホモダイマーの結晶構造 (PDB コード 2RAM) の DNA と水分子を除去し、ポケット予測に使用した。ポケット予測用のタンパク質構造は、Maestro (Schrodinger, Inc.) のタンパク質調製ユーティリティを使用して調製した。計算には 1.0Å の標準グリッドを使用し、少なくとも 15 の結合可能な部分を持つ上位 5 つのバインディングポケットを予測した (Table 9)。

Table 9: SiteMap predicted binding pockets on NF-κB p65 (RelA) surface

Pocket #	Pocket Volume (Å ³)	SiteScore	Chain	Residues
Pocket 1	137.8	0.97	B	Met32, Arg33, Phe34, Arg35, Tyr36, Lys37, Gly40, Arg41, Ala43, Gly44, Gly92, Lys93, Cys95, Asn115, Gly117, Ile118, Gln119
Pocket 2	212.3	0.92	B	Phe34, Tyr36, His88, Cys120, Val121, Lys122, Lys123, Leu126, Asp151, Tyr152, Leu154, Asn155, Asp185, Arg187, Ala188, Pro189, Asn190, Thr191, Ala192, Glu193, Leu194, Lys195, Asp217, Lys218, Val219, Gln220, Asp223, Ile224, Arg274
Pocket 3	194.1	0.87	A	Gly31, Arg33, Phe34, Tyr36, His88, Cys120, Val121, Lys122, Lys123, Leu154, Asn155, Asp185, Arg187, Ala188, Pro189, Asn190, Ala192, Glu193, Leu194, Lys195, Asp217, Lys218, Val219
Pocket 4	155.7	0.8	B	Thr71, Arg73, Ser75, Glu101, Arg133, Ile134, Asn137, Asn138, Asn139, Pro140, His142, Val143, Ile145, Gln162, Thr164, Leu174
Pocket 5	141.3	0.73	A	Arg30, Thr78, Lys79, Asp80, Pro82, Arg84, His86, Asp151, Tyr152, Asp153, Asn155, Ala156, Phe184, Asn190, Thr191, Arg274, Ser276,

2) 階層的ドッキング -1 段階目 FRED

ナミキ商事が所有する約 400 万の市販化合物 (<http://www.namiki-s.co.jp>) を階層的ドッキングにかけた。まず初めに、分子ドッキングプログラムである FRED を使用して、RelA の表面にある推定された小分子結合ポケットにドッキングした。分子ドッキング用のレセプターは、OEDocking (OpenEye Scientific Software) の「make_receptor」にて準備した。FRED はドッキングに事前に生成された分子コンフォメーションを利用するため、スクリーニングライブラリ内の化合物あたり最大 200 のコンフォメーションを OMEGA プログラムにて生成した。ドッキングは「high」ドッキング解像度モードを使用して実行した。すべての化合物に関して、Chemgauss4 のスコアリング関数を使用してランク付けを行った。

3) 階層的ドッキング -2 段階目 Glide

次に、上位 10000 の分子に対して、分子ドッキングプログラム Glide を用いて再度ドッキングを行った。リガンドは、水素を追加し、OPLS-2005 forcefield を使用して原子電荷を割り当て、リガンドのイオン化状態と互変異性状態を生成する LigPrep を使用して準備した。レセプターの調製には、分子モデリングプログラム Maestro を用いた。分子ドッキング用のグリッドは、SiteMap ポケットを使用して生成した。分子ドッキングは、Glide の標準精度 (SP) モードと超精度 (XP) モードを使用して実行した。化合物は、Glide の「Docking score」に基づいてランク付けし、上位 100 の化合物を選択した。次に、重複したものをのぞいて、結合ポケットとの相互作用の視覚的分析を実行した。鎖 B の Arg35 や Arg41 など、DNA 結合界面の正に帯電した残基との相互作用を優先し、最終的に 50 の化合物を選択した。購入可能であった 41 化合物をナミキ商事から購入した。

1.4. PK8 細胞からの核抽出

3 枚の 150 mm dish (Nunc) で培養した PK8 細胞を PBS (-) で 2 度洗浄した。スクレイパーを用いて細胞を剥離し、50 mL チューブに回収後遠心 (1,000rpm、3 分間、室温) した。上清を廃棄して、細胞ペレットの体積 (Cell Pellet Volume: 以下 CPV) を目測した。ペレットを CPV の 5 倍量の ^{※1}buffer A で均一にサスペンドして、氷上で 15 分間静置することで細胞を膨潤させた。遠心し (2,000 rpm、3 分間、4°C)、上清を廃棄した後の細胞ペレットの体積 (CPV-A) を目測した。細胞ペレットに CPV-A の 2 倍量の buffer A を加え、Dounce homogenizer Type A を用いて冷却状態でホモジナイズした (50 回)。遠心し (4,750 rpm、5 分間、4°C)、上清を廃棄した後の核ペレットの体積 (NPV) を目測した。NPV と等量の ^{※2}buffer C を加え、ローテーター (トーワラボ) を用いて転倒混和した (50 rpm、30 分間、4°C)。その間に 10 分間隔で 3 回タッピングした。遠心し (20,000 rpm、10min 4°C)、10 mL シリンジと 18G の針を用いて上清を回収した。Slide-A-Lyzer

Dialysis Cassettes (Thermo Fisher Scientific : 3500MWCO) を用いて、^{※3}buffer D 中で一晩透析した(4°C)。 Bradford 法を用いてタンパク質定量を行った。 100× protease inhibitor cocktail (ナカライテスク) を 1× になるように添加し、使用するまで-80°C で保存した。

^{※1}buffer A : 10mM HEPES-NaOH (pH7.9), 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 用事調整で 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF

^{※2}buffer C : 20mM HEPES-NaOH (pH7.9), 600mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 25% Glycerol, 0.2mM EDTA, 用事調整で 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF

^{※3}buffer D : 20mM HEPES-NaOH (pH7.9), 100mM KCl, 20% Glycerol, 0.2mM EDTA, 用事調整で 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF

1.5. Electrophoretic mobility shift (EMSA) assay

1) ³²P 標識コンセンサスオリゴ DNA の作製

EMSA には Table 10 に示すオリゴ DNA をユーロフィンジェノミクスに依頼し合成した。赤字部分はテロメア配列もしくは NF-κB 認識配列を示す。ネガティブコントロールとして TRF2 および NF-κB が結合しないオリゴ DNA (EMSA SP1 oligo)を合成した。これらのオリゴ DNA は *TE buffer を用いて 250 μM に希釈し-20°Cで保存した。

*TE buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA

Table 10: EMSA で使用するオリゴ DNA

オリゴ名	配列
EMSA TLM oligo A	5'-G TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG -3'
EMSA TLM oligo B	5'-CTA ACCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAAC -3'
EMSA NF-κB oligo A	5'-AGTTGAG GGGACTTTCC CAGGC-3'
EMSA NF-κB oligo B	5'-GCCTG GGAAAGTCC CCTCAACT-3'
EMSA SP1 oligo A	5'-ATT CGATCGGGGCGGGGCG GAGC-3'
EMSA SP1 oligo B	5'-GCT CGCCCCGCCCCGATCG AAT-3'

赤字はテロメア配列、緑字は NF-κB 認識配列

次に Table 11 に従って試料を混和し、GeneAmp PCR system 9700 (applied Biosystems) を用いて、Table 12 に示すタイムコースでアニーリングを行った。

Table 11: オリゴ DNA のアニーリング

試薬	Final concentration	必要量
Oligo A	25 μ M	2 μ L
Oligo B	25 μ M	2 μ L
10 \times annealing buffer	1 \times	2 μ L
DNase free water		12 μ L
total		20 μ L

Table 12: アニーリング反応

	Step 1	Step 2	Step 3
Temperature	95 $^{\circ}$ C	60 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C
time	5 min	5 min	30 min

精製した 25 μ M オリゴ DNA は DNase free water で 1.75 μ M に希釈した。Table 13 に従って混和し、37 $^{\circ}$ Cの湯浴で 10 分間反応させ、オリゴ DNA を 32 P 標識した。

Table 13: オリゴ DNA の標識

試薬	必要量
DNase free water	5 μ L
1.75 μ M オリゴ DNA	2 μ L
10 \times T4 oligonucleotide kinase buffer	1 μ L
[γ - 32 P] ATP (6000 ci/nmol at 10 mCi/mL)	1 μ L
5~10 U/ μ L T4 oligonucleotide kinase	1 μ L
total	10 μ L

0.5 M EDTA を 1 μ L 加えてリン酸化反応を停止した後、59 μ L の TE buffer を加えることで、0.05 μ M の 32 P 標識オリゴ DNA 溶液を作成した。MilliQ であらかじめ平衡化した G25 カラム (GE Healthcare) を用いて、0.05 μ M の 32 P 標識オリゴ DNA 溶液から不要な放射性物質を除去した。精製後のオリゴ DNA は 4 $^{\circ}$ Cで保存した。

2) EMSA

Table 14-16 に従って混和し、20 分間室温で静置した。1.5 μ L の^{*}10 \times gel loading buffer を加えた。200 V で 30 分間プレ泳動し、4% acrylamide gel (Table 17) にサンプルを全量アプライし、50 V で 2 時間電気泳動した。ゲルドライヤーに下から 3MM ペーパー大、3MM ペーパー小、ゲル、ラップの順に敷き、80 $^{\circ}$ Cで 60 分間ゲルを乾燥させた。イメージングプレートに室温で 1 時間感応させ、Typhoon FLA7000 (GE Healthcare) を用いてシ

グナルを検出した。

Table 14: TRF2 とオリゴ DNA の結合反応

試薬	必要量
TRF2	2 μ L
* ² 5 \times gel shift buffer	3 μ L
DNase free water	6 μ L
10 mM 化合物 (in DMSO)	0.5 μ L
0.05 μ M ³² P 標識オリゴ DNA	2 μ L
total	13.5 μ L

TRF2 の濃度は実験によって適宜変更した。

Table 15: NF- κ B とオリゴ DNA の結合反応

試薬	必要量
NF- κ B	2 μ L
* ² 5 \times gel shift buffer	3 μ L
DNase free water	6 μ L
10 mM 化合物 (in DMSO)	0.5 μ L
0.05 μ M ³² P 標識オリゴ DNA	2 μ L
total	13.5 μ L

NF- κ B の濃度は実験によって適宜変更した。

Table 16: 核抽出物とオリゴ DNA の結合反応

試薬	必要量
6.215 μ M PK8 Nuclear Extract	3.2 μ L
* ² 5 \times gel shift buffer	3 μ L
RNase free water	4.8 μ L
10 mM 化合物 (in DMSO)	0.5 μ L
0.05 μ M ³² P 標識オリゴ DNA	2 μ L
total	13.5 μ L

*¹10 \times gel loading buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2% bromophenol blue, 40% glycerol

*²5 \times gel shift buffer: 20% Glycerol, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 用時調製で 0.25 mg/mL poly dI-dC, 2.5 mM DTT

Table 17: 4%ポリアクリルアミドゲルの作成

試薬		必要量
*	5× TBE buffer	3 mL
	30% acrylamide mix (59:1)	4 mL
	80% Glycerol	940 μL
	滅菌水	21.8 mL
10% AP		225 μL
TEMED		15 μL
total		30 mL

*先に混和し、真空ポンプ（DIAVAC）を用いて5~10分間脱気した。

1.6. Surface Plasmon Resonance (SPR) 解析

Series S Sensor Chip CM5（GE Healthcare）に GST 抗体（BR-1002-23：GE Healthcare）をアミノカップリング法にて固定した。4 μg/mL の GST-RelA または GST-p52 を流路に流し（5 μL/min、180 秒間）、センサーチップにキャプチャーさせた。リファレンスとして、5 μg/mL GST（GE Healthcare）を流路に流し（5 μL/min、180 秒間）、センサーチップにキャプチャーさせた。50 mM NaOH を用いて流路を洗浄した。Running buffer でチップ表面を平衡化した。0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μM の化合物（in ^{*}Running buffer）を流路へ流し、化合物と GST-RelA または GST-p52 との相互作用を測定した。（設定：association phase 60 秒間、dissociation phase 60 秒間、30 μL/min）

^{*}Running buffer：10mM HEPES (pH8.0)、60mM KCl、0.0125% NP-40、100μM EDTA、1% DMSO

1.7. ウェスタンブロット解析

1) SDS-PAGE / トランスファー

ミニスラブゲル 0.75 mm または 1 mm（ATTO、MAB-075、MAB-10）を用いて、^{*}10%ポリアクリルアミドゲルを作成した。サンプルまたはマーカー（Bio Rad、161-0374B05）を作成したゲルにアプライした。^{**}2Running buffer を用いて、定電圧（120V）で電気泳動を行った。Immobilon-P メンブレン（Millipore、IPVH00010）を、100% メタノールに浸した後、MilliQ で 2 回洗浄し、^{**3}Transfer buffer に浸した。泳動終了後、ゲル、スポンジ、3MM ペーパー（Whatman、3030-700）を Transfer buffer に浸しておいた。下

からケース（陽極側）、スポンジ、3MM ペーパー、メンブレン、ゲル、3MM ペーパー、スポンジ、ケース（陰極側）の順番で積み上げた。積み上げたものを Owl Bandit VEP-2 タンク式ブロッティング（Thermo Fisher、OW-VEP-2）にセットし、定電流 150 mA、6 時間以上、4℃でタンパク質をメンブレンへと転写した。

*¹10% ポリアクリルアミドゲル

Stacking gel: 5% acrylamide solution (acrylamide : N,N'-methylenebisacrylamide = 29 : 1), 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.15% TEMED

Resolving gel: 10% acrylamide solution (acrylamide : N,N'-methylenebisacrylamide = 29 : 1), 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.06% TEMED

*²Running buffer: 25 mM Tris, 19 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS

*³Transfer buffer: 23 mM Tris, 195 mM Glycine, 10% (v/v) Methanol

2) 抗原抗体反応 / 検出

ボールペンでメンブレンのマーカーの下端に印をつけた。メンブレンを*TBST / 5% (w/v) スキムミルク（雪印、4903050168095）で、約 5 分間ブロッキングを行った。TBST / 5% スキムミルクを用いて抗体を Table 18 に示すように希釈した。メンブレンを希釈した抗体に反応させ、3 時間以上室温または 4℃で抗原抗体反応を行った。メンブレンを TBST で 3 回（5 分 / 1 回）洗浄した。メンブレンを TBST / 5% スキムミルクを用いて、5000 倍に希釈した Peroxidase 標識 Goat 抗マウス / 抗ラビット二次抗体（Jackson Immuno Research、111-035-003 / 115-035-003）と 1 時間反応させた。メンブレンを TBST で 4 回（15 分 / 1 回）洗浄した。メンブレンをクリアファイルに移し、Western Lightning Plus ECL（Perkin Elmer、NEL10500EA）の 1 液、2 液を混合したものを滴下し、5 分間静置した。ImageQuant LAS 4000 を用いて、シグナルを検出した。

*TBST : 24.8 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% tween 20, HCl を用いて pH 7.8 に調整した

Table 18: 抗体の希釈

抗体名	製造会社	製品番号	希釈率
pATM (Ser1981)	MILLIPORE	05-740	1: 1000
ATM	Calbiochem	PC116	1: 200
pChk2 (Thr68)	Cell signaling	2661S	1: 1000
Caspase3	Cell signaling	#9662	1:1000
Cleaved caspase3	Cell signaling	#9661	1:1000
Cleaved PARP	Cell signaling	#5625	1:1000
Cdk4	Santa Cruz	Sc260	1:1000
RelA	Cell signaling	#8242	1:2000
RelB	Gene Tex	GTX102333	1:500
cRel	Gene Tex	GTX113264	1:500
p50	Gene Tex	GTX100772	1:500
p52	Millipore	#05-361	1:1000
TRF2	Novus (IMGENEX)	NB100-56506 (IMG-124A)	1: 500
KU70	Santa Cruz	sc-1486	1: 2000
β -actin	SIGMA	A5441	1: 5000

1.8. 細胞増殖曲線

35 mm ディッシュに 1×10^4 cells/dish の細胞を播種した。翌日に DMSO または任意の濃度の化合物を含む培地に交換し、培養を継続した。播種してから 2, 4, 6, 8 日後に計数した。

1.9. コロニーフォーメーションアッセイ

100 mm ディッシュに 1×10^3 cells/dish の細胞を播種した。翌日に DMSO または 5~20 μ M の化合物を含む培地に交換し、48 時間培養を継続した。化合物を含まない培地に交換し、播種してから 10 日後、形成されたコロニーを 4% ギムザ染色液 (in PBS(-)) を用いて染色し、計数した。

1.10. Prestoblue を用いた細胞生存率の測定

細胞生存率の測定は Prestoblue assay のスタンダードプロトコルにしたがって行った (Thermo Fisher Scientific, A13261)。細胞を 96 well plate に播種したのち、化合物を 96 時間暴露した。10% Prestoblue 試薬を含む新しい培地に替え、CO₂ インキュベーター内で 37°C 1 時間静置した。その後、Enspire (PerkinElmer) を用いて蛍光値 (Ex / Em = 560

nm / 590 nm) を測定した。DMSO を処理した細胞の蛍光値を 100 % とし、各条件での細胞生存率を求めた。

1.11. FISH 解析

細胞を $1\text{-}5\times 10^4$ cells/mL となるように培地で希釈し、8 well 組織培養用カルチャースライドに播種した。翌日に DMSO または $5\text{-}20\ \mu\text{M}$ の化合物を含む培地に交換し、24-48 時間培養を継続した。培地を除き、PBS (-) で 5 分間の洗浄を 2 回行った。0.25 % TritonX-100 (WAKO) in PBS (-) で氷上、2 分間透過処理を行った。4% paraformaldehyde in PBS (-) で室温、15 分間固定した後、PBS(-)で 2 回洗浄した。0.5% TritonX-100 (WAKO) in PBS (-) に氷上で 10 分間浸し透過処理を行った後、PBS(-)で 3 回洗浄した。PBS (-) を除去し、^{※1} Blocking solution を加え、30 分間ブロッキングを行った。一次抗体を Blocking solution で希釈し 37°C で 1 時間反応させた。その後、PBS (-) で 5 分間の洗浄を 3 回行った。※これ以降の操作は遮光条件下で行った。

二次抗体を Blocking solution で希釈し、室温で 45 分間反応させた。その後、PBS (-) で 5 分間の洗浄を 3 回行った。4% paraformaldehyde in PBS (-) で室温、5 分間固定した後、PBS (-) で 5 分間の洗浄を 2 回行った。70%, 95%, 100% エタノールを用いて脱水処理を行った。脱水時間はそれぞれ 3, 2, 2 分間で行った。スライドガラスを風乾し、Cy3 標識 5'-(CCCTAA)₄ のテロメアプローブを含む ^{※2} hybridizing solution で浸した。ヒートブロックを用いて 80°C で 3 分間静置した。遮光下、4°C で 4 時間以上静置した。フレームを除去し、^{※3} washing solution で 5 分間の洗浄を 2 回行った。PBS (-) で 3 回洗浄した。DAPI を PBS (-) で 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、5 分間反応させた後、PBS (-) で 3 回洗浄した。スライドガラスを風乾した後、マウント剤をウェルの端にのせ、カバーガラスをかぶせて全体をマウント剤に浸した。5 分後、カバーガラスの周囲に透明なマニキュアを塗り、封入した。BZ-X810 (Keyence) を用いて撮影し、画像解析ソフト Columbus (PerkinElmer) を用いて解析を行った。

^{※1} Blocking solution: 1 mg/ml BSA, 3% goat serum, 0.1% Triton X100, 1 mM EDTA pH 8.0

^{※2} hybridizing solution: 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 70% formamide (deionized) (和光製、製品番号 066-02301), 0.5% blocking reagent (Roche 製、製品番号 11096176001), 5000 倍希釈 Cy-3 標識 3'-(CCCTAA)₄-5' (from 100 μM stock, PANAGENE 製、製品番号 F1002)

^{※3} washing solution: 70% formamide (ナカライ製、製品番号 16229-95), 10mM Tris-HCl (pH 7.2)

Table 19: 抗体の希釈

一次抗体	製造会社	製品番号	希釈率
Rap1	BETHYL	A300-306A	1:500
53BP1	Novus	NB100-304	1:500
TRF2	Novus (IMGENEX)	NB100-56506 (IMG-124A)	1:200
γ H2AX	Millipore	07-164	1:500

Table 20: 抗体の希釈

二次抗体	製造会社	製品番号	希釈率
Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG	Invitrogen	A11001	1:500
Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG	Invitrogen	A11008	1:500
Alexa Fluor 594 Goat anti-mouse IgG	Invitrogen	A11005	1:500
Alexa Fluor 594 Goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	A21207	1:500

2 結果

2.1. NF- κ B (RelA)阻害剤の探索

2.1-1. *In silico*解析と DSE-FRET を用いた RelA 特異的な阻害剤の探索

スクリーニングの概要を Figure 8 に示す。初めに、DSE-FRET assay を用いて 32,914 化合物 (東京大学コアライブラリー、理化学研究所が所有する NPDepo, known drug ライブラリー) の RelA-DNA 結合阻害効果を評価した。化合物濃度は 10 μ M または 5 μ g/mL でネガティブコントロールに DMSO を用いた。ライブラリープレート毎に Z factor を求めた結果、どのプレートも 0.7 以上であった。DSE-FRET の結果、RelA-DNA 結合を 30%以上阻害し、p52-DNA 結合は 10%以下の阻害率そして自家蛍光が 2.5 以下の化合物として suramin と NP322 が同定された (Figure 8a)。次に、*in silico* スクリーニングを行った。RelA 表面にある標的となりそうなポケット構造を調べるために小分子の結合ポケットを予測した。2つのモノマー間のわずかな構造の違い (RMSD2.8Å) のため、ポケット予測には RelA ホモダイマーを使用した。予測された 5つの内4つの SiteScore 値が新薬に繋がりそうなポケットのカットオフ値である 0.8 以上であった^{55, 56}。最も高いスコアを示したポケット 1 は 0.97 であり (Table 9, Figure 9)、DNA 結合部分に隣接するループ L1 アミノ酸残基部分である。RelA-DNA の結晶構造解析 (PDB コード: 2RAM)において、これらの残基は DNA 結合と大きく関わることを示されている⁵⁷。興味深いことに、このポケット近くの Cys38 と Cys120 は RelA-DNA 結合の阻害剤開発の標的となっている^{58, 59}。ポケット 2 と 3 は同じようにそれぞれ RelA のモノマーの一つにあるポケットを示した。このポケットの残基は間接的な DNA 結合に関与する。その他二つのポケットは DNA 結合部分から遠い所にあるため、今回のスクリーニングには適さなかった。

以上のことから、ポケット 1 とポケット 3 に対して階層的マルチステップドッキングプロトコルを用いて *in silico* スクリーニングを行った (Figure 8b)。FRED と Glide を用いたドッキングシミュレーションを行い、100 化合物に絞った後、重複したものをのぞいて、結合ポケットとの相互作用の視覚的分析を実行した。鎖 B の Arg35 や Arg41 など、DNA 結合界面の正に帯電した残基との相互作用などを考慮し、50 化合物を購入用に選択した。そのうち購入可能であった 41 化合物を取得した。

取得した 41 化合物に対して DSE-FRET を行い、RelA-DNA 結合を評価した結果、A55 (2-(3-carbamoyl-6-hydroxy-4-methyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl) acetic acid)のみ自家蛍光が弱く (2.5 以下)、RelA-DNA 結合を阻害した (50%以上)。その他の 40 化合物は自家蛍光が高いか RelA-DNA 結合阻害効果が弱かった。再試と p52-DNA 結合に対する影響を調べるために 50 μ M の濃度で A55 と suramin、NP322 を評価した。Suramin と NP322 は RelA と p52 の両方とも阻害した一方で、A55 は RelA のみ阻害した (Table 21)。このことから、A55 を RelA 選択的阻害剤の候補として同定した。

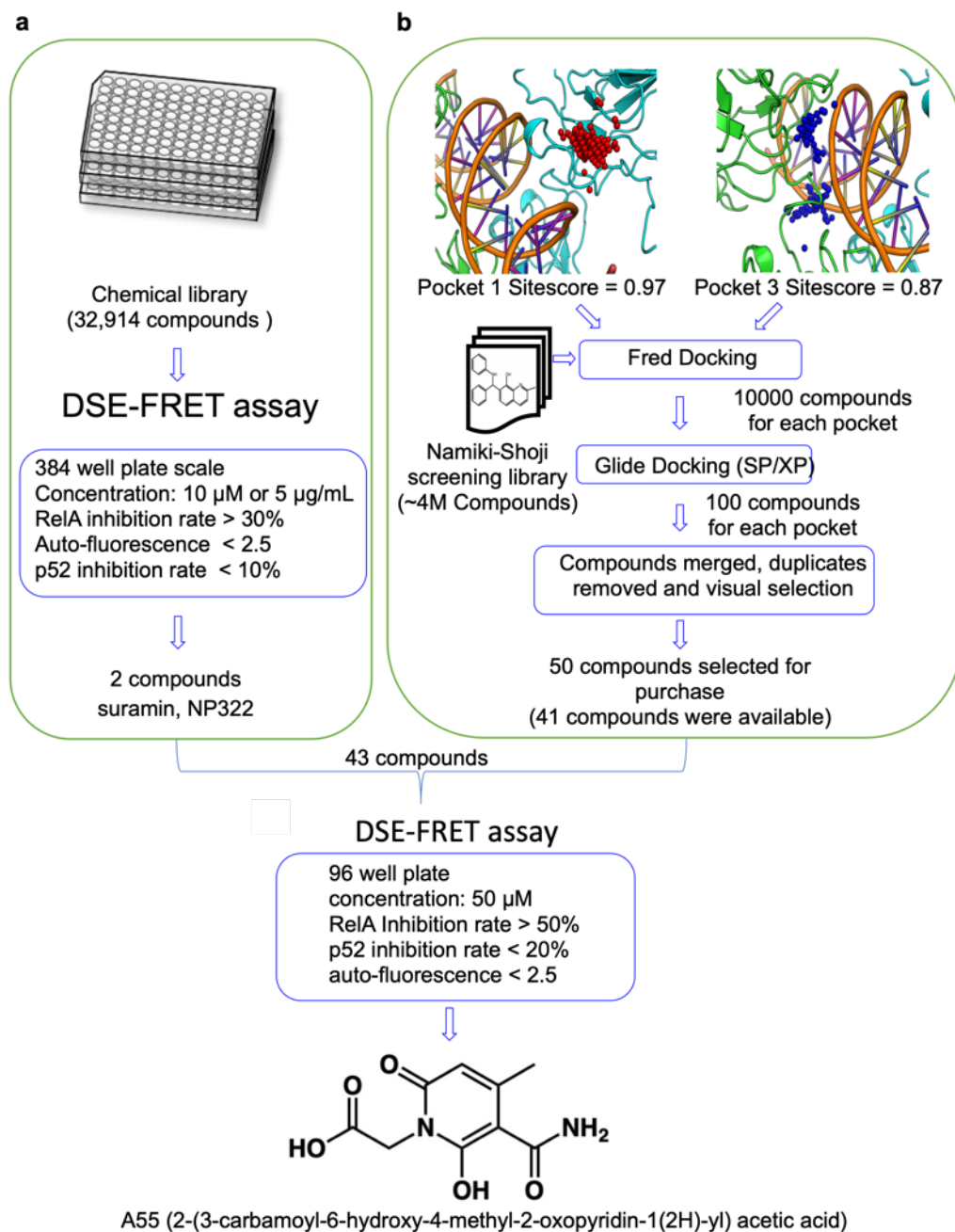


Figure 8: *In silico* 解析と DSE-FRET を用いた RelA 選択的な阻害剤の探索

(a): DSE-FRET を用いた RelA 選択的な阻害剤の探索。(b): *In silico* 解析による階層的な RelA-DNA 結合を阻害する化合物の探索。a,b にて得られた RelA 阻害候補化合物の再試を行い、RelA 阻害剤として A55 を取得。

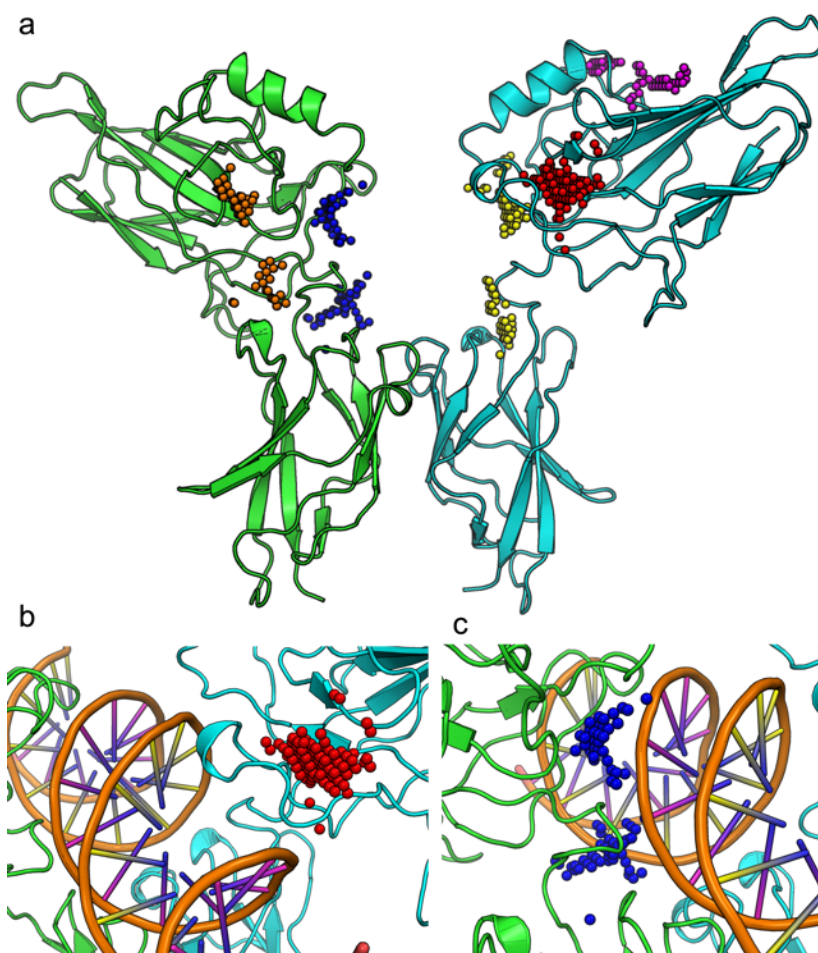


Figure 9: RelA の低分子結合ポケットの予測

(a): RelA ホモダイマー と予測された5つのポケット (赤: ポケット1、黄: ポケット2、青: ポケット3、マゼンタ: ポケット4、オレンジ: ポケット5)の図。(b,c): スクリーニングで用いたポケット1 (b)とポケット3 (c)の拡大図。

Table 21: 候補化合物の DSE-FRET による RelA および p52 の阻害評価

#	Compound name	Structure	auto-fluorescence @ 50 μ M			Hit Judgement of:		Kinetic assay @ 50 μ M			
			Run1	Run2	Average	RelA	p52	Inhibition % Δ RFU(120 min, 0 min)	Kinetic fig	Inhibition % Δ RFU(120 min, 0 min)	Kinetic fig
1	NP322		1.0	1.2	1.1	1	1	92		89	
2	Suramin hexasodium salt		1.1	1.8	1.5	1	1	107		73	
3	A55		1.9	1.2	1.6	1		63		7	

2.1-2. 化合物 A55 は RelA に直接結合することで RelA-DNA 結合を阻害している

A55 の RelA に対する阻害効果が濃度依存的か調べるために、2-10 μM の濃度で DSE-FRET を行った。その結果、A55 は濃度依存的に RelA-DNA 結合を阻害した (Figure 10)。さらに、EMSA 法においても、A55 が RelA や p52 に対して阻害効果を示すか調べた。その結果、A55 は RelA に対して高い阻害効果を持つが、p52 に対しては高濃度でないと阻害しないことがわかった (Figure 11)。また、A55 と GST-RelA および GST-p52 との結合解離を調べるため SPR 解析を行った (Table 22)。GST-RelA に対して A55 0.625-20 μM では R_{max} が 7.3 μM , K_d が 2.87 μM であり、A55 3.125-100 μM では R_{max} が 4.7 μM で K_d が 13.0 μM であった。理論値の R_{max} と実測値の R_{max} が近い値を示したため、A55 と RelA は一対一の関係で結合している可能性がある。一方、GST-p52 に対して A55 0.625-20 μM では R_{max} と K_d 共に計測出来ず、A55 3.125-100 μM では R_{max} が 11.4 μM で K_d が 1.27 μM であった。以上の結果から A55 は RelA とは強く結合するが、p52 とは弱い結合であることが示された。

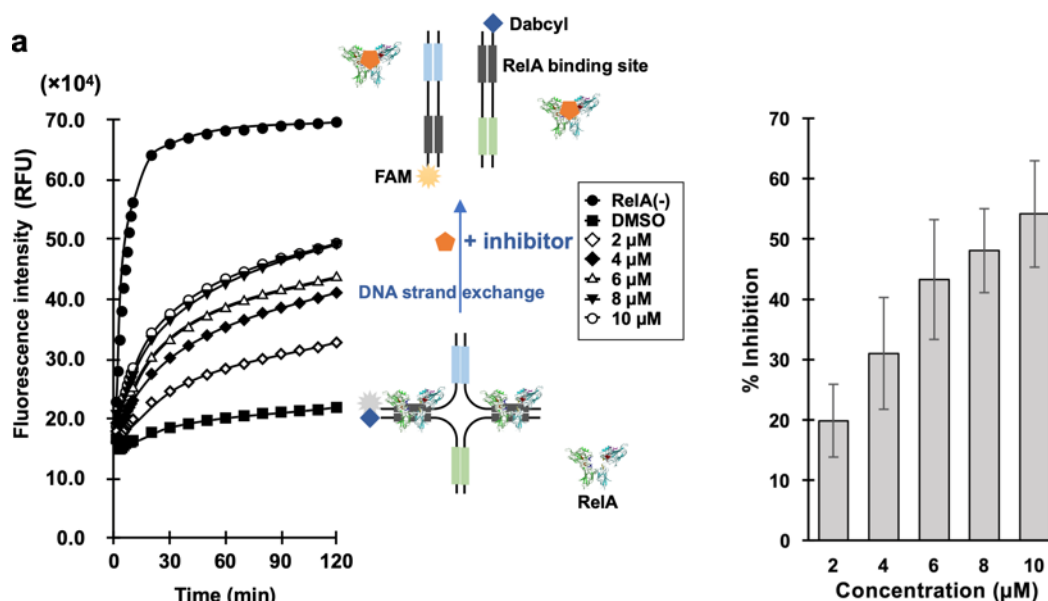


Figure 10: DSE-FRET assay を用いた A55 による RelA 阻害効果の濃度依存性

(a): 左図: DSE-FRET のイメージ図と A55 による蛍光値の変化、右図: A55 (2-10 μM) の RelA 阻害率

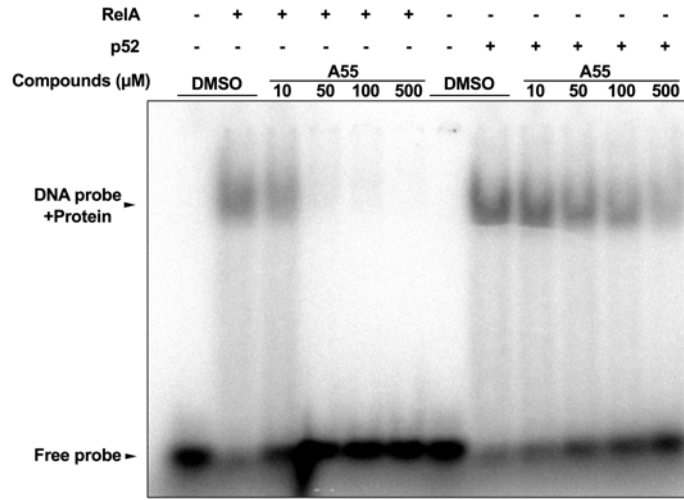


Figure 11: EMSA 法による A55 の RelA および p52 に対する阻害効果
 Lane2-6: RelA に対する阻害効果、Lane8-12: p52 に対する阻害効果

Table 22: A55 の GST-RelA および GST-p52 に対する SPR 解析

Concentration range	GST-RelA (MW 61.0kDa)				Theoretical Rmax	Rmax	Kd
	immobilized ligand (RU)	Binding to reference (sample: green, reference: red)	Difference (Sample - Reference)	Kinetic analysis or Equilibrium analysis			
100 μM - 3.13 μM					4.5	4.7	13.0 μM
20 μM - 0.625 μM					5.0	7.3	2.87 μM
	GST-p52 (MW 73.4kDa)				Theoretical Rmax	Rmax	Kd
	immobilized ligand (RU)	Binding to reference (sample: green, reference: red)	Difference (Sample - Reference)	Kinetic analysis or Equilibrium analysis			
1110					3.4	11.4	1.27 μM
930					2.9	n.d. (not determined)	n.d.

2.1-3. 化合物 A55 は RelA 特異的な阻害剤である

A55 の NF- κ B タンパク質に対する 50%阻害濃度 (IC₅₀) を DSE-FRET にて求めた。その結果、RelA の IC₅₀ 値は 9.31 μ M でその他のタンパク質は計測出来なかった (Figure 12)。また、他のタンパク質が存在する中でも阻害効果を示すのか調べるため、膀胱癌細胞株 PK8 の核抽出物を用いて EMSA を行った。NF- κ B は通常細胞質に存在し、TNF- α などの刺激によって核内に移行、DNA と結合する²。そのため、まず初めに PK8 に TNF- α (50 ng/mL) を暴露し、核タンパクを抽出した (Figure 13)。もっとも核内 RelA の存在量が多かった TNF- α 10 分処理の核タンパクを EMSA に用いた。EMSA の結果から、2つのバンドシフトが見られ (lane 2)、それから二つのバンドが NF- κ B の認識配列を持つコンピティターオリゴによって消失していることから、NF- κ B が結合していることが示された。さらに、上のバンドが RelA の抗体により、さらにシフトしている (super shift) ことから、上のバンドが RelA-DNA のバンドであることが判明した。濃度を振った A55 が上のバンドのみ影響し、下のバンドには影響しなかったことから、A55 は NF- κ B オリゴに結合している核タンパク質のうち RelA のみ阻害したことが示された (Figure 14)。以上のことから A55 は RelA 特異的な阻害剤であることが示された。

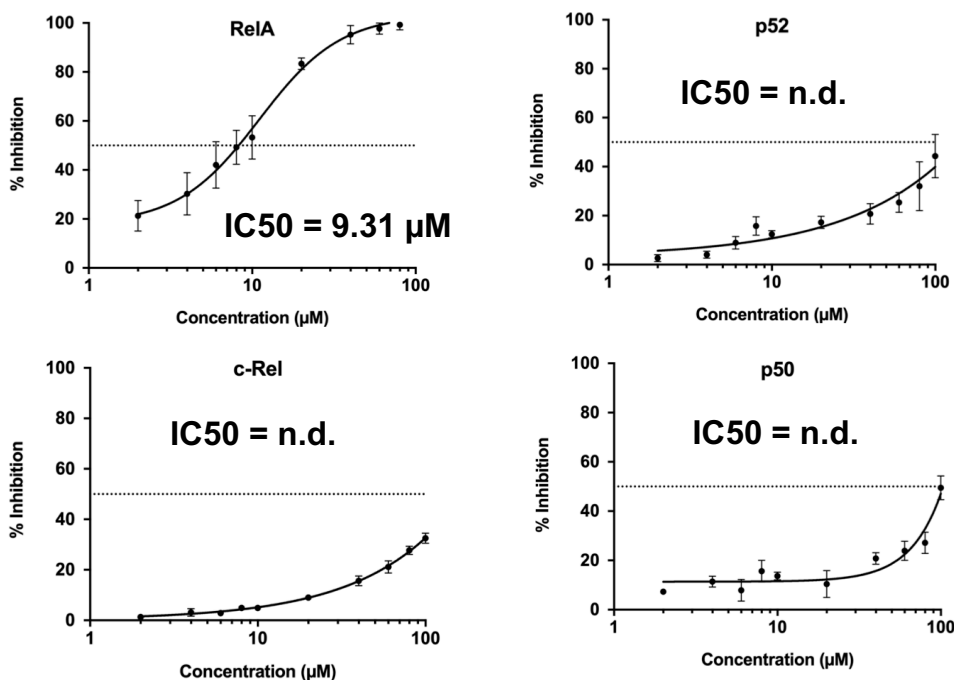


Figure 12: DSE-FRET assay を用いた A55 による NF- κ B タンパク質の阻害評価
RelA, c-Rel, p52, p50 に対する A55 の IC₅₀ 値を GraphPad Prism により算出した。

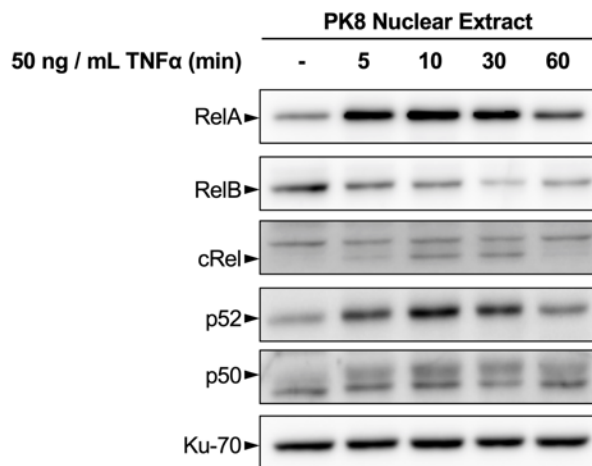


Figure 13: TNF- α 刺激による PK8 核抽出物内の NF- κ B 発現比較

PK8 細胞に TNF- α (50 ng/mL) を 5-60 分間処理し、核抽出を行い、NF- κ B タンパク質の発現を比較した。Ku-70 をローディングコントロールとした。

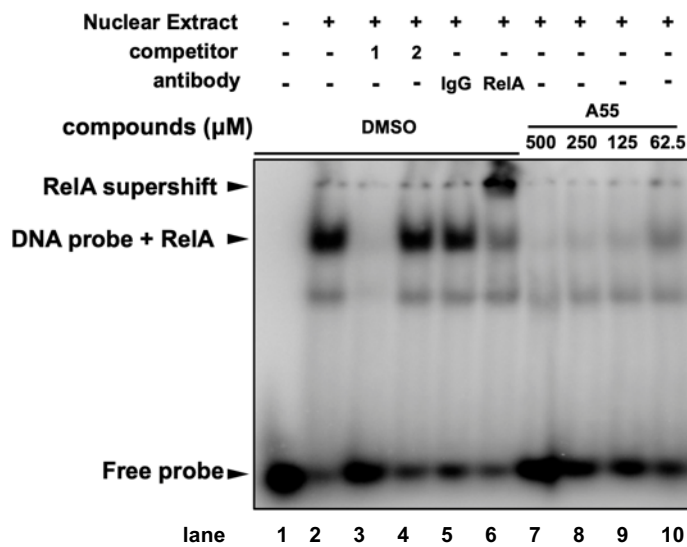


Figure 14: PK8 核抽出物を用いた EMSA 法による A55 の RelA 阻害効果の検討

Figure13 における TNF- α 10 分間処理した PK8 細胞の各抽出物を用いた。Lane1: プローブのみ、 Lane2: PK8 細胞の各抽出物とプローブのみ、 Lane3,4 (competitor assay): 非標識の NF- κ B プローブ (lane3), 非標識の sp1 プローブ (lane4), Lane5,6 (super shift): ラビット IgG (lane5), RelA 抗体 (lane6), Lane7-10: A55 62.5-500 μ M における阻害活性

2.1-4. 化合物 A55 は RelA の Arg41 と Gln119 を介して結合していると予測された

次に、A55 と RelA がどのように結合しているか予測するため、ドッキング予測を行った。A55 のドッキング予測によるといくつかの水素結合を介して、L1 ループの近傍に結合することが予測された (Figure 15)。具体的には、A55 のピリジン環の 2 位のカルボニル基が RelA の Arg41 側鎖と 2 つの水素結合を形成することがわかった。さらに、Arg41 の主鎖カルボニルは、カルバモイル窒素との水素結合接触にも関与している。Arg41 はループ L1 残基であり、DNA 相互作用において重要な役割を果たす⁵⁷。さらに、A55 のピリジン環のヒドロキシおよびアセテート置換基と RelA の Gln119 側鎖の間の水素結合は、A55 と RelA の結合をさらに安定化させていると予測された。

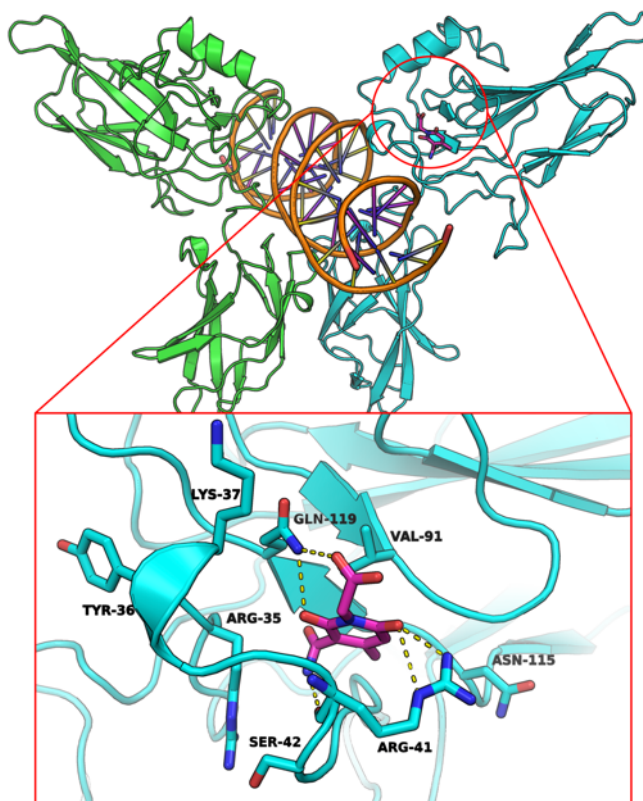


Figure 15: Docking simulation による A55 と RelA の結合予測図

Figure 9 で示したポケット 1 における A55 と RelA の結合が予測された部位。A55 はマゼンタで示しており、黄色の点線は水素結合の部分を示している。

2.2. TRF2 阻害剤の探索

2.2-1. TRF2-DNA 結合の評価をするために DSE-FRET を最適化した

TRF2 阻害剤の探索を始める前に TRF2 の結合配列である TTAGGG を組み込んだ DSE-FRET の検証・最適化を行った。まずは TRF2 濃度依存的に DNA の鎖交換反応を抑制するか調べたところ、20 ng/μL の TRF2 濃度で十分であることが示された (Figure 16a)。次に、TRF2 の DNA 結合および鎖交換反応抑制がオリゴの配列依存的かどうか調べるために、TRF2 認識配列である TTAGGG から TTAGCG に変異を加えたオリゴを用いて DSE-FRET を行った。その結果、変異が入っている場合、TRF2 高濃度 (40 ng/μL) においても鎖交換反応は抑制されなかった (Figure 16 b)。さらに Table 23 で示した competitor を用いて競合実験を行った。TTAGGG の配列を組み込んだ competitor のみ TRF2 の鎖交換反応抑制を阻害した (Figure 16 c)。加えて、TRF2 の変異タンパク質である TRF2^{ΔM} (DNA 結合部位である MYB ドメインを欠損した TRF2) および TRF2^{ΔB} (Basic ドメインを欠損した TRF2) を用いて DSE-FRET を行った所、TRF2^{ΔM} のみ鎖交換反応を抑制できなかった (Figure 16d)。以上のことから、TRF2 の DNA ドメインによる配列特異的な DNA 結合によって鎖交換反応が抑制されていることが示された。

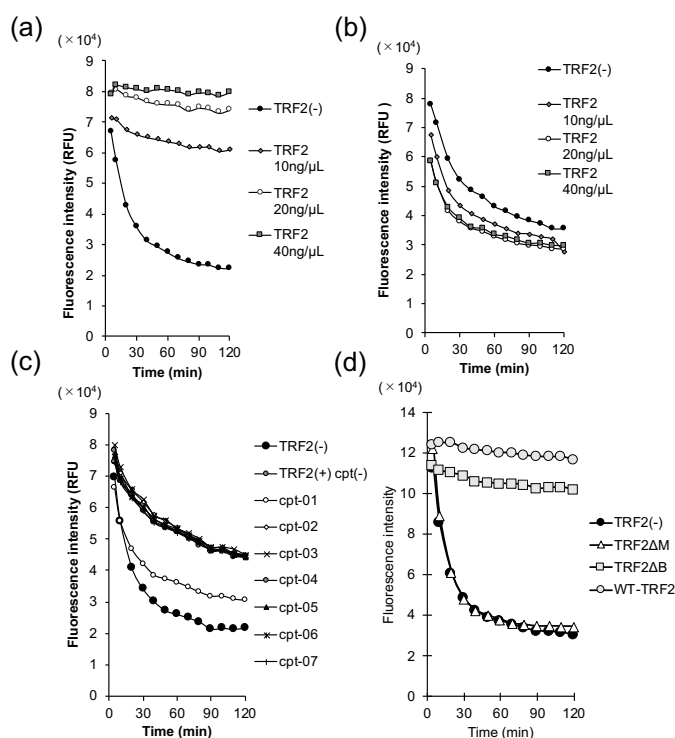


Figure 16: Telomere DSE-FRET の TRF2 結合特異性の評価

(a): TRF2 の濃度依存的な DNA 鎖交換反応の阻害。(b): duplex の TRF2 結合部位である TTAGGG を TTAGCG に変えた変異 duplex による DSE-FRET。(c) Table 23 で示した competitor を用いた DSE-FRET。(d): TRF2 の変異体 TRF2^{ΔB} および TRF2^{ΔM} を用いた DSE-FRET。

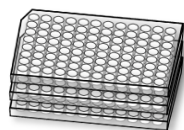
Table 23: 用いた competitor の配列

competitor name	sequence
telomere sequence	
cpt-01	TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
	AATCCCAATCCCAATCCCAATCCC
mutant telomere sequence	
cpt-02	TTAG <u>CG</u> TTAG <u>CG</u> TTAG <u>CG</u> TTAG <u>CG</u>
	AATCG <u>CAATCG</u> CAATCG <u>CAATCG</u> C
cpt-03	TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
	A <u>ACCCCAAC</u> CCCA <u>ACCCCAAC</u> CCC
cpt-04	TCAGGGTCAGGGTCAGGGTCAGGG
	AGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCC
cpt-05	TGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGG
	A <u>CTCCCACT</u> CCCA <u>CTCCCACT</u> CCC
cpt-06	TTAGGCTTAGGCTTAGGCTTAGGC
	AATCCGAATCCGAATCCGAATCCG
scrambled sequence	
cpt-07	GTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGT
	CATTCACTCACACTCACACTCA

2.2-2. TRF2 阻害剤の探索

Telomere DSE-FRET を用いて、産業技術総合研究所が所有する 12,212 の化合物を評価し、TRF2 阻害剤を探索した (Figure 17)。化合物濃度 50 μ M において TRF2 阻害率 50% 以上であり、自家蛍光が 2.5 以下の化合物として #10 を同定した (Figure 18)。さらに、#10 の類縁体を 103 種合成し、DSE-FRET により TRF2 阻害効果を評価したところ 17 種で阻害活性が見られ (Table 24)、その中から最も阻害活性が高かった化合物として #198 を同定した。次に #198 の IC₅₀ 値を調べるため、濃度を振って DSE-FRET を行った。その結果、#198 の IC₅₀ 値は 46.9 μ M となった (Figure 19)。さらに DSE-FRET 以外のアッセイ系でも同じ結果が出るか、EMSA にて検証を行った。その結果、#198 10 μ M においても TRF2 の DNA 結合を阻害することがわかった (Figure 20)。これらのことから、新規 TRF2 阻害剤として #198 を同定した。

AIST chemical library
(12,212 compounds)



DSE-FRET assay

384 well plate scale
Concentration: 10 μM
TRF2 inhibition rate > 50%
auto-fluorescence < 2.5



Candidate compound (#10)

Figure 17: Telomere DSE-FRET による TRF2 阻害剤探索の概要

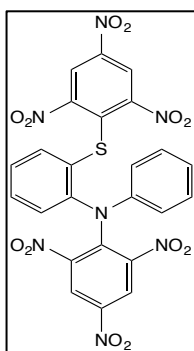
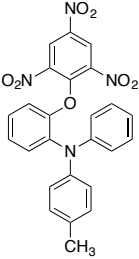
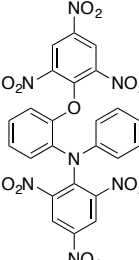
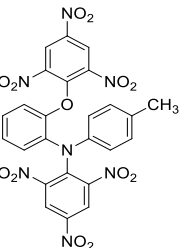
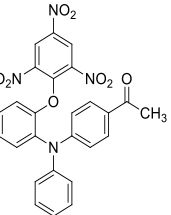
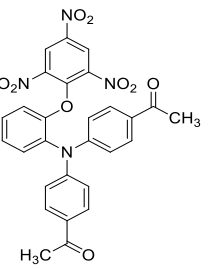
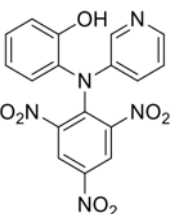
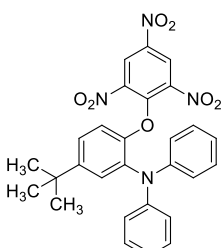
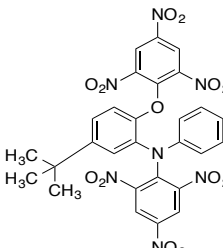
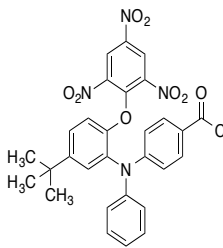
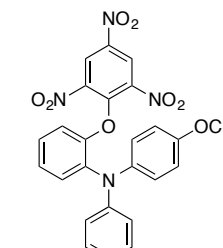
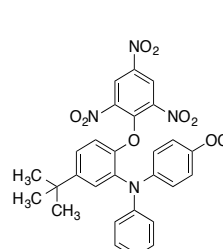


Figure 18: 化合物 #10 の構造と TRF2-テロメア DNA 結合阻害活性
50 μM における阻害率 53.2 % (DSE-FRET)

Table 24: 化合物 #10 の誘導体の構造と阻害活性

番号	構造	分子量	阻害率 (%)			
			12.5 μM	25 μM	50 μM	100 μM
#144		472.41	0.9	20.2	38.3	42.3

#145		486.44	1	26.9	38.7	22.0
#151		607.4	13.3	35.2	39.6	23.8
#153		621.43	3.3	6.8	22.6	28.8
#168		514.44	16.8	16.5	25.5	29.6
#171		556.48	14.4	25.8	24.7	29.9
#178		397.3	3.5	13.3	40.2	30.6

#192		528.51	16.5	27.7	33.6	27.5
#198		663.51	17.3	34.9	55.5	67.5
#201		570.56	0	19.5	23.0	31.2
#204		502.44	1.7	15.9	20.4	20.8
#207		558.55	0	18.2	23.7	33.9

#224		635.43	34.1	43.3	54.2	57.1
#225		514.46	8.0	21.9	36.9	38.4
#226		530.46	6.6	15.4	19.3	24.1
#227		556.64	0.0	6.9	18.4	21.4
#228		514.51	0.0	6.5	11.8	13.4

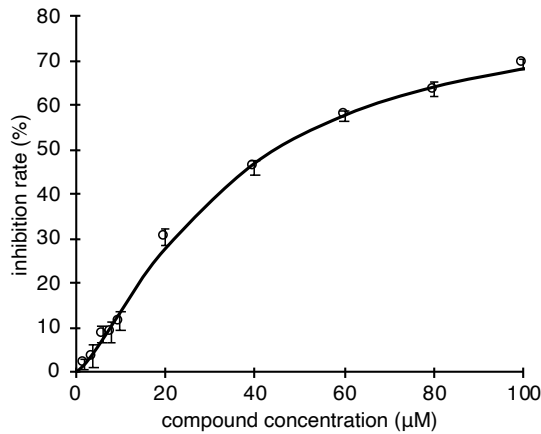


Figure 19: 化合物 #198 の TRF2-テロメア DNA 結合阻害活性
DSE-FRET assay を用いて化合物の濃度を 11 点 (1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM) に振り TRF2-テロメア DNA 結合阻害効果を評価した。

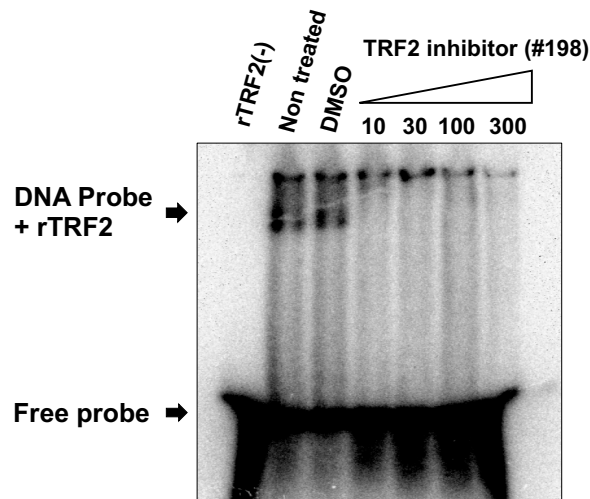


Figure 20 : EMSA 法による#198 の TRF2 に対する阻害効果
リコンビナント TRF2 (rTRF2)を用いて、#198 10-300 μM の TRF2 阻害効果を検討した。

2.2-3. TRF2 阻害剤#198 はがん細胞の増殖を抑制した

次に#198 の細胞への影響を調べるため、子宮頸がん細胞株 HeLa1.2.11 細胞を用いて検証を行った。まず初めに、増殖への影響を調べるために増殖曲線を作成した。35 mm dish に HeLa1.2.11 細胞を 1×10^4 cells/dish の細胞を播種し、翌日に DMSO または 5-20 μM の #198 を含む培地に交換し、培養を継続した。播種してから 2, 4, 6, 8 日後に計数した結果、#198 は濃度依存的に細胞の増殖を抑制した (Figure 21)。加えて、コロニーフォーメーションアッセイを行ったところ、同様に#198 濃度依存的なコロニー形成の抑制が見られた (Figure 22)。さらに、他の癌腫における生存率への影響 (EC50)を調べた結果、Table 25

に示した EC50 が得られた (Figure 23)。これらの結果から、#198 はがん細胞の増殖を抑制することが示された。

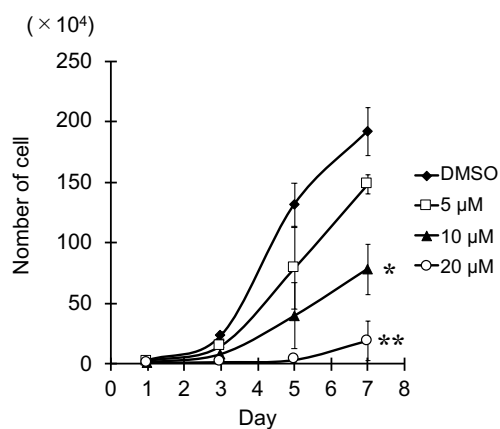


Figure 21: 化合物 #198 が細胞増殖に与える影響

HeLa1.2.11 細胞に化合物 #198 5-20 μM を暴露し、day1,3,5,7 において細胞計数を行った。

*P<0.05, **P<0.01

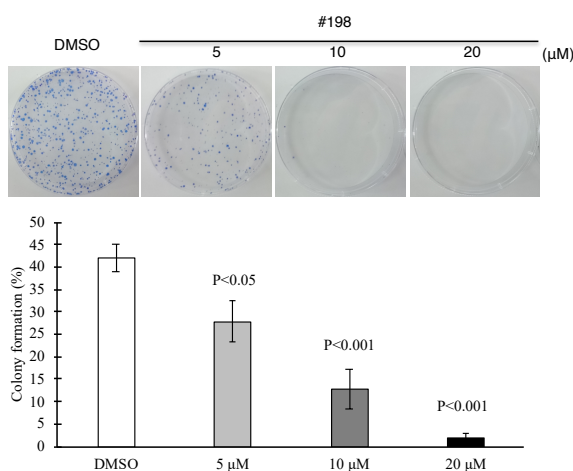


Figure 22: 化合物 #198 がコロニー形成能に与える影響

HeLa1.2.11 細胞 を 100 mm dish に 1000 個播種し、翌日化合物を 48 時間暴露し、播種してから 10 日後に固定、4% ギムザで染色し、コロニー数を計測した。

Table 25: 化合物 #198 のがん細胞株に対する EC50

細胞株	#198 の EC50 値 (μM)
HeLa1.2.11	22.2
PK8	37.2
Panc-1	30.9
CFPAC	27.5
MIA PaCa-2	13.9

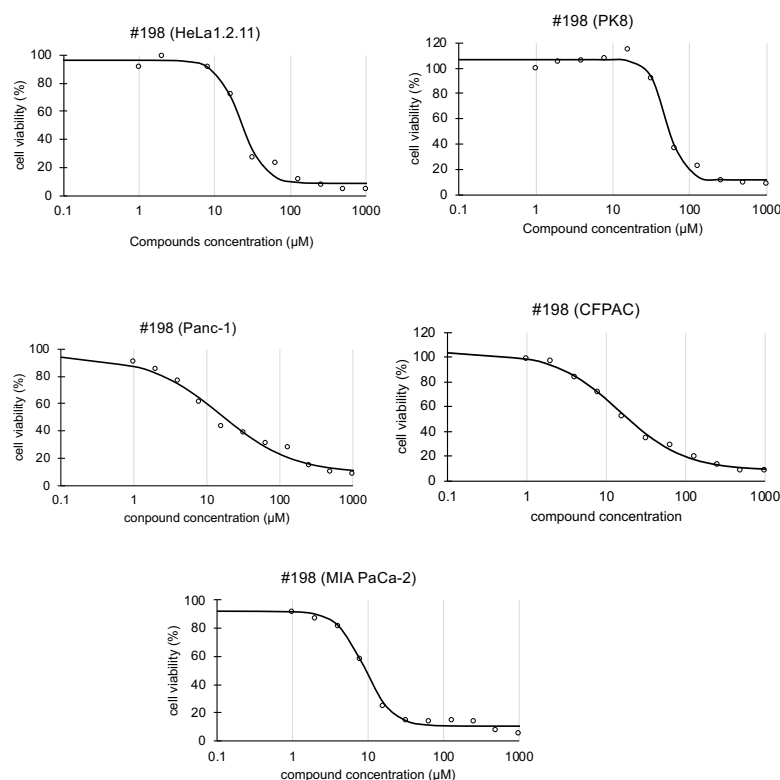


Figure 23: PrestoBlue 法 を用いた化合物 #198 の細胞生存率への影響の検討
 化合物#198 の HeLa1.2.11 細胞、 PK8 細胞、 Panc1 細胞、 CFPAC 細胞、 MIA PaCa2 細胞
 の生存率への影響の検討。細胞を化合物含有培地で 96 時間培養した後、PrestoBlue 法を用いて
 細胞の生存率を算出した。

2.2-4. TRF2 阻害剤#198 はがん細胞に DNA 損傷を与え、細胞死を誘導した

次に#198 が TRF2 を阻害し、テロメアで DNA 損傷応答が起きているか調べた。HeLa1.2.11 細胞に DMSO または 20 μM の#198 を処理し、FISH を行った。DNA 損傷マーカーとして知られている 53BP1 とテロメアを染色し、テロメアにおける DNA 損傷である telomere dysfunction induced foci (TIF: 53BP1 などの DNA 損傷マーカーとテロメアが重なって観察される foci) を計測した。また、一つの細胞あたり 4 つ以上 TIF が観察された細胞を TIF 陽性細胞とした。その結果、DMSO に比べて#198 20 μM を処理した細胞は優位に TIF 陽性細胞が増加した(Figure 24)。このことから、#198 は TRF2 を阻害し、テロメアの t-loop 構造を崩壊させていることが示唆された。さらに#198 が HeLa1.2.11 細胞にアポトーシスを誘導しているかを検討した。まず、アポトーシスを誘導している時間を調べるため、HeLa1.2.11 に対して#198 20 μM を処理し、2, 6, 24, 48 時間処理した細胞をサンプリングした。それらをウェスタンブロットによりアポトーシスマーカーとして知られて

いる cleaved PARP や cleaved caspase3 を調べた。その結果、2 時間処理で cleaved caspase3 の蓄積が観察され、24 時間処理で cleaved PARP の蓄積が観察された(Figure 25)。さらに 48 時間処理したサンプルをフローサイトメトリーにてアポトーシスマーカーとして知られる Annexin V 陽性となる細胞を計測した。その結果、DMSO は 10%程度だったのに対して、#198 を処理した細胞は 60%程度が Annexin V 陽性であった (Figure 26)。以上のことから、#198 はがん細胞にアポトーシスを誘導していることが示された。

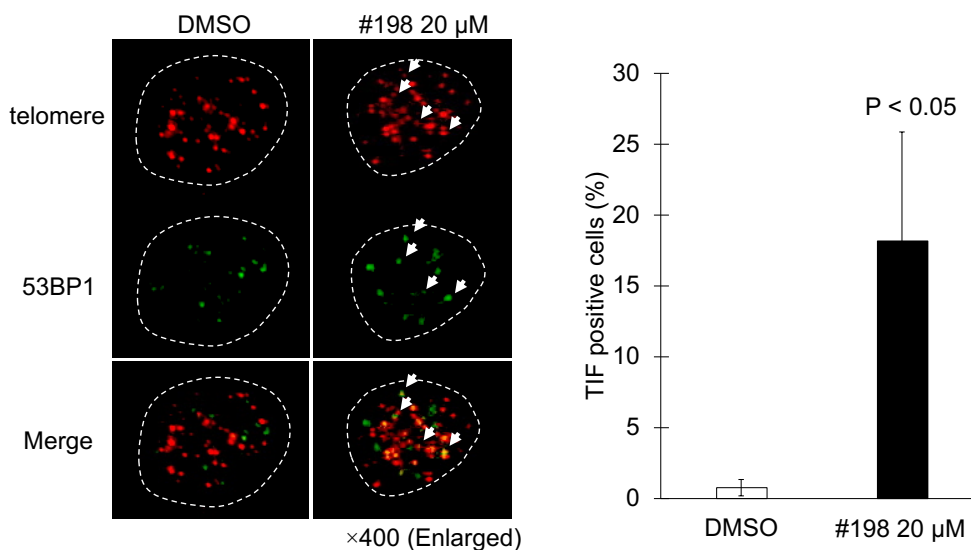


Figure 24: 化合物 #198 の TRF2-テロメア DNA 結合阻害によって生じる
テロメア DNA における DNA 損傷応答

左図：HeLa1.2.11 細胞に化合物を 24 時間処理した細胞を固定し、Telomere FISH により テロメアにおける DNA 損傷を検出した。(倍率 400 倍、赤色蛍光：テロメア、緑色蛍光：53BP1、青色蛍光：DAPI)。右図：画像を画像解析ソフト Columbus にてテロメアにおける DNA 損傷 (TIF) を計測した。細胞に 4 つ以上 TIF が検出されたものを TIF 陽性細胞とした。

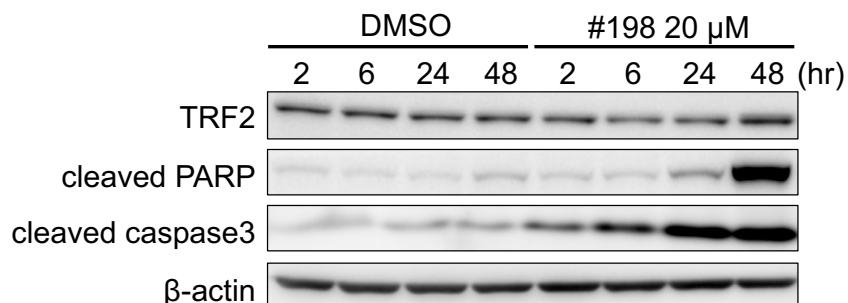


Figure 25: 化合物 #198 を処理した HeLa1.2.11 細胞のウェスタンブロット解析
化合物#198 20 μM を HeLa1.2.11 細胞に 2-48 時間処理し、サンプリングした。β-actin はローディングコントロールとした。

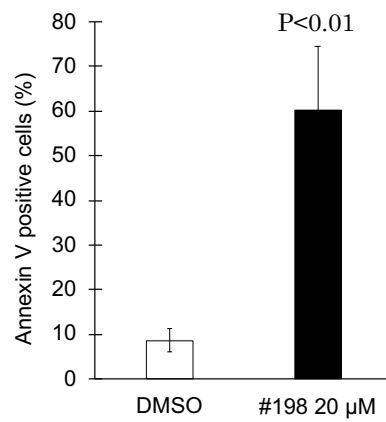


Figure 26: フローサイトメトリーを用いた Annexin V 陽性細胞の検出
化合物#198 20 μM を 48 時間処理した HeLa1.2.11 細胞をフローサイトメトリーにて Annexin V 陽性率を算出した。

3. 考察と結論

本研究において、DSE-FRET assay によってさまざまな DNA 結合タンパク質に対する阻害剤を探索できることを示した。以下に NF- κ B 阻害剤と TRF2 阻害剤の本研究で明らかとなった知見と課題について述べる。

NF- κ B (RelA) 阻害剤 A55 について

リコンビナントな RelA, cRel, p50, p52 を用いた DSE-FRET assay によって A55 は選択的 RelA 阻害剤だと示唆された (Figure 12)、RelB に関してはホモダイマーの DNA 結合能が低い⁶⁰、DSE-FRET で評価できなかったが、A55 が RelA 選択的であることは SPR 解析と EMSA 解析によって支持された。SPR 解析によって A55 は RelA に強く結合するが、p52 に対しては結合が弱かったこと (Table 22)、EMSA 解析において A55 が RelA-DNA 結合 (upper band) のみに影響を与え、他のタンパク質が結合していると思われるバンド (lower band) には影響なかったこと (Figure 14)、さらに、500 μ M の高濃度の A55 であっても下のバンドへの影響が少なかったことから A55 は RelA 選択的な阻害剤であることが示された。

RelA 特異的な阻害剤は NF- κ B 研究用のツールとしてだけでなく、癌治療のツールとしても用いられる可能性がある。RelA は膵管腺癌 (PDAC) 患者において高発現しており、がんの悪性化に関わっている²⁴。また、ゲムシタビン耐性の細胞株において RelA を siRNA によりノックダウンすると薬剤耐性が低下したという報告がある²⁵。これらのことから、RelA 特異的な阻害剤である A55 はがんの薬剤抵抗性を低下させる薬として応用できるかもしれない。しかしながら、RelA をノックアウトしたマウスにおいて肝臓、神経、皮膚、腸管などの組織のアポトーシスにも関連していることが報告されている⁶¹。そのため、RelA を阻害するリスクは考えなければならない。本研究では阻害剤の同定に焦点を当てていたため、動物を用いた実験は行っておらず、副作用などのリスクは評価できておらず、今後の課題である。

A55 は、分子量が小さく、リガンド効率は非常に高くなっている (LE = 0.44)。さらに、A55 を使用した ChEMBL⁶² データベースに対する類似性検索では、この化合物の既知の生物活性は不明であった。また、この化合物の PAINS⁶³ および Eli Lilly MedChem Rules⁶⁴ に従った化合物の評価では、構造上に問題はなかった。以上のことから、A55 の合成展開が可能であり、リード化合物として用いられる可能性がある。

本研究において RelA 特異的な阻害剤 A55 を初めて同定した。今後、合成展開や生物学的な活性を評価する必要があるが、NF- κ B のさらなる研究に貢献することやがん治療につながる薬のリード化合物としてこの A55 は有用である。

TRF2 阻害剤 #198 について

本研究で同定した TRF2 阻害剤#198 は DSE-FRET と EMSA という異なる評価系において TRF2 阻害効果を示した (Figure 19, 20)。TRF2 を直接阻害する阻害剤は今までに報告されていないため、#198 は新規の阻害剤となる。また、TRF2 を阻害することで予想されるテロメアにおける DNA 損傷の誘発も観察された (Figure 24)。さらに HeLa1.2.11 細胞に細胞死を誘導し (Figure 25, 26)、増殖を抑えることを示した (Figure 21, 22)。今後は #198 の阻害効果の特異性や正常細胞、動物などへの影響を調べる必要がある。また、NF- κ B(RelA)阻害剤 A55 と同様に化合物#198 と TRF2 の結合部位の予測を試みたが、RelA とは異なり、TRF2 のタンパク質構造はフラットなため、ポケット構造が予測できなかった。結合部位を調べるためには X 線結晶構造解析などを行う必要がある。

テロメアの特殊な機構を標的とした癌治療は注目されている。実際に、テロメアの G4 構造 (グアニンリッチな DNA がとる立体構造) を安定化するリガンド (テロメスタチンなど) はグリオブラストーマの腫瘍増殖を抑制するという報告⁴⁹や、テロメア伸長機構である Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) を用いるがん細胞は DNA 損傷応答因子である ATR の阻害剤 VE-821 に対して感受性が高いことなどが報告されている⁴⁶。TRF2 に関しては肺、肝臓、胃、子宮頸がんにおいて高発現していることが知られており、がんの悪性化に関わっていることが報告されている³。近年では、がんの免疫逃避機構に TRF2 が必要であることも報告された⁴⁴。これらのことから、今後さらなる詳細な解析が必要ではあるが、TRF2 阻害剤はがん治療の一つの方法として活用できる可能性がある。

しかしながら、テロメアは染色体の保護に重要であるため、がん細胞のみならず、正常細胞においても影響を及ぼす可能性がある。Karlsder らは TRF2 の DNA 結合ドメインを欠損した TRF2^{ΔBM} を正常線維芽細胞である MRC-5 や IMR-90 に発現させた際には影響はなかったとしている一方で、CD4 陽性の T 細胞に対しては染色体末端の結合やアポトーシスを誘導したと示している³⁸。そのため、TRF2 阻害剤も免疫系に影響を与えてしまう可能性がある。しかし、分化能の高い ES 細胞において TRF2 をノックアウトしても染色体末端結合は起こらないという報告がなされ^{65, 66}、ES 細胞と分化した細胞ではテロメア保護における TRF2 の重要性が異なると考えられる。これらのことから、TRF2 の機能について未だ不明な部分もあるため、本研究で同定した TRF2 阻害剤は研究用ツールとしても活用されることが期待できる。

参考文献

- 1 Fusella F, Secli L, Busso E, et al. The IKK/NF- κ B signaling pathway requires Morgana to drive breast cancer metastasis. *Nature communications*. 2017; 8: 1-17.
- 2 Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science*. 1996; 274: 787-789.
- 3 Muñoz P, Blanco R, Blasco MA. Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and aging. *Cell Cycle*. 2006; 5: 718-721.
- 4 Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*. 2008; 132: 344-362.
- 5 Farina AR, Tacconelli A, Vacca A, Maroder M, Gulino A, Mackay AR. Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*. 1999; 10: 353.
- 6 Novak U, Cocks BG, Hamilton JA. A labile repressor acts through the NF κ B-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic acids research*. 1991; 19: 3389-3393.
- 7 Kim DW, Gazourian L, Quadri SA, Sherr DH, Sonenshein GE. The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*. 2000; 19: 5498-5506.
- 8 Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS. NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and cellular biology*. 1999; 19: 5785-5799.
- 9 Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ. Regulation of NF- κ B by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science*. 1997; 275: 523-527.
- 10 Kiriakidis S, Andreakos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF- κ B-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF- κ B inhibitor I κ B α and a kinase-defective form of the I κ B kinase 2. *Journal of cell science*. 2003; 116: 665-674.
- 11 Wang C-Y, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998; 281: 1680-1683.
- 12 Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes &*

- development*. 1999; 13: 239-252.
- 13 Yeh W-C, Itie A, Elia AJ, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*. 2000; 12: 633-642.
- 14 Boise LH, González-García M, Postema CE, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. 1993.
- 15 Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 1994; 265: 956-959.
- 16 Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kB is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 24995-25000.
- 17 Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kB RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clinical Cancer Research*. 1999; 5: 119-127.
- 18 Ariga A, Namekawa J-i, Matsumoto N, Inoue J-i, Umezawa K. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced nuclear translocation and activation of NF-kB by dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 24625-24630.
- 19 Fukushima T, Kawaguchi M, Yorita K, et al. Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor-kB, on glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2012; 14: 19-28.
- 20 Suzuki M, Inoue G, Gemba T, et al. Nuclear factor-kappa B decoy suppresses nerve injury and improves mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in a rat lumbar disc herniation model. *European Spine Journal*. 2009; 18: 1001-1007.
- 21 Senftleben U, Li Z-W, Baud V, Karin M. IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity*. 2001; 14: 217-230.
- 22 Senftleben U, Cao Y, Xiao G, et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kB signaling pathway. *Science*. 2001; 293: 1495-1499.
- 23 Li Q, Yang G, Feng M, et al. NF-kB in pancreatic cancer: Its key role in chemoresistance. *Cancer letters*. 2018; 421: 127-134.
- 24 Kabacaoglu D, Ruess DA, Ai J, Algül H. NF-kB/Rel Transcription Factors in Pancreatic Cancer: Focusing on RelA, c-Rel, and RelB. *Cancers*. 2019; 11: 937.
- 25 Pan X, Arumugam T, Yamamoto T, et al. Nuclear factor-kB p65/relA silencing induces apoptosis and increases gemcitabine effectiveness in a subset of pancreatic cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14: 8143-8151.
- 26 Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large

- duplex loop. *Cell*. 1999; 97: 503-514.
- 27 Choi KH, Farrell AS, Lakamp AS, Ouellette MM. Characterization of the DNA binding specificity of Shelterin complexes. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: 9206-9223.
- 28 Baumann P, Cech TR. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*. 2001; 292: 1171-1175.
- 29 Kim SH, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet*. 1999; 23: 405-412.
- 30 Bae NS, Baumann P. A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. *Mol Cell*. 2007; 26: 323-334.
- 31 Bombarde O, Boby C, Gomez D, et al. TRF2/RAP1 and DNA-PK mediate a double protection against joining at telomeric ends. *EMBO J*. 2010; 29: 1573-1584.
- 32 Wang F, Podell ER, Zaug AJ, et al. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*. 2007; 445: 506-510.
- 33 Chen Y, Yang Y, van Overbeek M, et al. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science*. 2008; 319: 1092-1096.
- 34 de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005; 19: 2100-2110.
- 35 Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J*. 2001; 20: 5532-5540.
- 36 Deng Y, Guo X, Ferguson DO, Chang S. Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. *Nature*. 2009; 460: 914-918.
- 37 Rai R, Zheng H, He H, et al. The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J*. 2010; 29: 2598-2610.
- 38 Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*. 1999; 283: 1321-1325.
- 39 Cesare AJ, Hayashi MT, Crabbe L, Karlseder J. The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. *Mol Cell*. 2013; 51: 141-155.
- 40 Fujita K, Horikawa I, Mondal AM, et al. Positive feedback between p53 and TRF2 during telomere-damage signalling and cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 2010; 12: 1205-1212.
- 41 Diala I, Wagner N, Magdinier F, et al. Telomere protection and TRF2 expression are enhanced by the canonical Wnt signalling pathway. *EMBO Rep*. 2013; 14: 356-363.
- 42 El Mai M, Wagner KD, Michiels JF, et al. The Telomeric Protein TRF2 Regulates

- Angiogenesis by Binding and Activating the PDGFRbeta Promoter. *Cell Rep.* 2014; 9: 1047-1060.
- 43 Zizza P, Dinami R, Porru M, et al. TRF2 positively regulates SULF2 expression increasing VEGF-A release and activity in tumor microenvironment. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: 3365-3382.
- 44 Cherfils-Vicini J, Iltis C, Cervera L, et al. Cancer cells induce immune escape via glycocalyx changes controlled by the telomeric protein TRF2. *EMBO J.* 2019; 38.
- 45 Biroccio A, Cherfils-Vicini J, Augereau A, et al. TRF2 inhibits a cell-extrinsic pathway through which natural killer cells eliminate cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 818-828.
- 46 Flynn RL, Cox KE, Jeitany M, et al. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science.* 2015; 347: 273-277.
- 47 Bejarano L, Bosso G, Louzame J, et al. Multiple cancer pathways regulate telomere protection. *EMBO Mol Med.* 2019; 11: e10292.
- 48 Tahara H, Shin-Ya K, Seimiya H, Yamada H, Tsuruo T, Ide T. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene.* 2006; 25: 1955-1966.
- 49 Nakamura T, Okabe S, Yoshida H, et al. Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole. *Sci Rep.* 2017; 7: 3605.
- 50 Shiroma Y, Takahashi RU, Yamamoto Y, Tahara H. Targeting DNA binding proteins for cancer therapy. *Cancer Sci.* 2020.
- 51 Miyagi T, Shiotani B, Miyoshi R, et al. DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins. *Cancer science.* 2014; 105: 870-874.
- 52 Grigoriev M, Hsieh P. A histone octamer blocks branch migration of a Holliday junction. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 7139-7150.
- 53 Prabhu VP, Simons AM, Iwasaki H, Gai D, Simmons DT, Chen J. p53 blocks RuvAB promoted branch migration and modulates resolution of Holliday junctions by RuvC. *J Mol Biol.* 2002; 316: 1023-1032.
- 54 Poulet A, Buisson R, Faivre-Moskalenko C, et al. TRF2 promotes, remodels and protects telomeric Holliday junctions. *EMBO J.* 2009; 28: 641-651.
- 55 Halgren T. New method for fast and accurate binding-site identification and analysis. *Chemical biology & drug design.* 2007; 69: 146-148.
- 56 Halgren TA. Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *Journal of chemical information and modeling.* 2009; 49: 377-389.
- 57 Chen Y-Q, Ghosh S, Ghosh G. A novel DNA recognition mode by the NF- κ B p65

- homodimer. *Nature structural biology*. 1998; 5: 67-73.
- 58 Liang M-C, Bardhan S, Pace EA, et al. Inhibition of transcription factor NF- κ B signaling proteins IKK β and p65 through specific cysteine residues by epoxyquinone A monomer: correlation with its anti-cancer cell growth activity. *Biochemical pharmacology*. 2006; 71: 634-645.
- 59 Widen JC, Kempema AM, Villalta PW, Harki DA. Targeting NF- κ B p65 with a helenalin inspired bis-electrophile. *ACS chemical biology*. 2017; 12: 102-113.
- 60 Ruben SM, Klement JF, Coleman TA, Maher M, Chen C-H, Rosen CA. I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes & development*. 1992; 6: 745-760.
- 61 Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999; 18: 6910-6924.
- 62 Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic acids research*. 2012; 40: D1100-D1107.
- 63 Baell JB, Holloway GA. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of medicinal chemistry*. 2010; 53: 2719-2740.
- 64 Bruns RF, Watson IA. Rules for identifying potentially reactive or promiscuous compounds. *Journal of medicinal chemistry*. 2012; 55: 9763-9772.
- 65 Markiewicz-Potoczny M, Lobanova A, Loeb AM, et al. TRF2-mediated telomere protection is dispensable in pluripotent stem cells. *Nature*. 2021; 589.7840: 110-115.
- 66 Ruis P, Van Ly D, Borel V, et al. TRF2-independent chromosome end protection during pluripotency. *Nature*. 2021; 589.7840: 103-109.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導してくださいました広島大学医系科学研究科の田原栄俊教授、高野幹久教授、紙谷浩之教授、高橋陵宇准教授、山本佑樹助教に心より感謝いたします。また、山陽小野田市立山口東京理科大学の嶋本顕教授、国立がん研究センターの塩谷文章主任研究員、そして木根原匡希博士、村岡賢博士に学士の頃からご指導いただき、研究を進めることが出来ました。心より感謝いたします。

組み換え TRF2 のコンストラクトは、DSE-FRET を確立してくださいました宮城徹博士より分与していただきました。深く感謝いたします。

NF- κ B のコンストラクト及び DHMEQ は愛知医科大学医学部分子標的探索寄付講座の梅澤一夫教授から分与していただきました。深く感謝いたします。

大量の化合物スクリーニングに関しては東京薬科大学の伊藤昭博教授、理化学研究所の長田裕之博士、吉田稔博士、Ashutosh Kumar 博士、Kam Y. Zhang 博士、産業技術総合研究所の新家一男博士に化合物の提供から、HTS の実施、*in silico* スクリーニングまで行っていただきました。心から感謝いたします。

TRF2 の化合物合成に関して、当時 広島大学医歯薬保健学研究科の武田敬教授、佐々木道子准教授には多くの化合物を合成していただきました。深く感謝いたします。

本研究の審査、ご助言を賜りました、広島大学 医系科学研究科の古武弥一郎教授、熊本卓哉教授、河合秀彦准教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、これまでの研究生生活を共にし、研究面でも精神面でも支えてくださいました細胞分子生物学研究室の皆様心より感謝いたします。特に三好龍也修士、山本拓弥修士、藤田豪修士には大変感謝しております。

そして経済面で支援して下さった広島大学の学生支援グループの皆様方並びに独立行政法人日本学生支援機構の皆様方にも深く感謝しております。

最後に、学生生活を支え、見守ってくれた家族に深く感謝いたします。

城間 喜智