

博 士 論 文

NMR を用いた TRAF6 を標的とする
タンパク質間相互作用阻害剤の創製

守 谷 潤

博士論文
(薬科学)

NMR を用いた TRAF6 を標的とする
タンパク質間相互作用阻害剤の創製

エーザイ株式会社

エーザイ・プロダクトクリエーション・システムズ
ネクスト・ジェネレーション・システムズ機能ユニット

守谷 潤

指導教員

東京大学大学院薬学系研究科

教授 嶋田 一夫

1. 本研究の内容は、2015年12月に開催された東京大学大学院薬学系研究科における教授会にて審査された。本博士論文は、以下に記す主査・副査による個別試問にて2016年1月に審査された。

なお、副査は試問が実施された順に記載した。

主査 教授 嶋田 一夫

副査 教授 橋本 祐一

准教授 石川 稔

教授 清水 敏之

教授 船津 高志

2. 本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

- (1) Jun Moriya, Masayoshi Sakakura, Yuji Tokunaga, Robert Scott Prosser, Ichio Shimada

“An NMR method for the determination of protein binding interfaces using TEMPOL-induced chemical shift perturbations”

Biochim. Biophys. Acta, **1790**, 1368–1376, 2009

- (2) Jun Moriya, Koh Takeuchi, Kenji Tai, Kenzo Arai, Naoki Kobayashi, Naoki Yoneda, Yoshifumi Fukunishi, Atsushi Inoue, Miho Kihara, Takumi Murakami, Kenichi Chiba, Ichio Shimada

“Structure-based development of a protein–protein interaction inhibitor targeting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6”

J. Med. Chem., **58**, 5674–5683, 2015.

3. 本論文の基礎となる研究は、嶋田 一夫教授の指導の下に東京大学大学院薬学系研究科、産業技術総合研究所およびエーザイ株式会社において行われた。

略語表

AP1	activator protein 1
BMM	bone marrow-derived monocyte
CSP	chemical shift perturbation
CT	constant time
DIRECTION	difference of inversion recovery rate with and without target irradiation
DTT	1,4-dithiothreitol
FBS	fetal bovine serum
FID	free induction decay
GWAS	genome wide association study
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
IL	interleukin
INPHARMA	interligand NOE for pharmacophore mapping
IPTG	isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
ITC	isothermal titration calorimetry
LB	Luria–Bertani
MD	molecular dynamic
MSM-MTS	machine-learning score modification-multiple target screening
MWCO	molecular weight cutoff
NF-κB	nuclear factor-κB
NMR	nuclear magnetic resonance

NOE	nuclear Overhauser effect
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PAINS	pan assay interference compounds
PPI	protein–protein interaction
PRE	paramagnetic relaxation enhancement
PS	paramagnetic shift
RANK	receptor activator of NF-κB
RESP	restricted electrostatic potential
SASA	solvent accessible surface area
SDS–PAGE	sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis
SGDD	structure-guided drug discovery
SNP	single nucleotide polymorphism
SPR	surface plasmon resonance
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TF	transcription factor
TLR	Toll-like receptor
TMS	tetramethylsilane
TNF	tumor necrosis factor
TNFRSF	TNF receptor superfamily
TOCSY	total correlation spectroscopy
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy
UBA	ubiquitin aldehyde
YUH1	yeast ubiquitin hydrolase 1

目次

第 1 章 序論

第 1 節	PPI を標的とする化合物探索の課題	1
第 2 節	本研究における PPI 創薬標的 : TRAF6	1
第 3 節	分子間結合解析のための NMR 手法	4
第 1 項	立体構造解析における NMR 法の特徴	4
第 2 項	NMR 法を用いた分子間結合界面解析手法	5
第 3 項	PS を用いた結合界面決定手法のコンセプトと立証に用いたモデル相互作用系	9
第 4 節	本論文の内容	11

第 2 章 実験材料と実験方法

第 1 節	<i>in silico</i> スクリーニングとドッキング計算による化合物選抜	21
第 2 節	ペプチドとタンパク質の調製	22
第 3 節	SPR 解析による TRAF6–RANK 結合阻害の評価	25
第 4 節	破骨細胞分化阻害の評価	25
第 5 節	Ubiquitin–YUH1(C90S)相互作用の ITC 測定と PS 解析のための NMR 測定	26
第 1 項	Ubiquitin–YUH1(C90S)相互作用の ITC 測定	26
第 2 項	¹³ C シグナル帰属のための測定	26
第 3 項	TEMPOL による PS 値の測定	29
第 6 節	TRAF6–TRI1 結合界面の PS 解析	30
第 1 項	Y473 シグナルの帰属	30
第 2 項	PS 解析のための NMR 測定	30
第 7 節	SASA の計算	30
第 8 節	TRAF6 と TRI1 のドッキング計算	31

第 9 節	化合物合成と構造確認	31
第 10 節	TRAF6 に関する NMR 測定	35
第 11 節	DIRECTION データに基づいたドッキングおよび分子動力学計算	37
第 12 節	TRAF ファミリータンパク質に対する TRI4 のドッキング計算	38
第 3 章 結果		
第 1 節	TRAF6 の TNFRSF 結合界面に結合する化合物の探索	39
第 2 節	TRAF6–TRI1 複合体の立体構造解析	41
第 3 節	PS を用いた分子間結合界面決定手法の開発と TRAF6–TRI1 複合体への応用	42
第 1 項	PS を用いた分子間結合界面決定手法の開発	42
第 2 項	PS を用いた結合界面決定手法の TRAF6–TRI1 複合体への応用	45
第 4 節	複合体構造モデルに基づいた化合物合成展開と TRI4 創製	46
第 5 節	TRAF6–TRI4 複合体の立体構造解析	47
第 6 節	他の TRAF ファミリータンパク質に対するドッキング計算	50
第 4 章 考察		
第 1 節	TRAF6 を標的とした化合物スクリーニングに関する考察	81
第 1 項	化合物スクリーニングにおけるヒット率について	81
第 2 項	絞り込まれる化合物の結合様式に関する考察	82
第 2 節	TEMPOL を用いた PS 解析結果の考察	83
第 1 項	タンパク質の表面検出にあたり観測された PS と SASA の齟齬に関する考察	83
第 2 項	PPI 界面検出にあたり観測された PS と SASA の齟齬に関する考察	84
第 3 項	TEMPOL による PS を用いた分子間結合界面決定手法の特徴	86
第 3 節	TRI4 の作用メカニズムに関する立体構造的観点からの考察	87
第 1 項	TRI4 の TRAF6 相互作用様式の由来について (TRI1 との比較)	87

第2項	TRI4の標的PPI阻害メカニズム	88
第3項	他のTRAFファミリータンパク質に対する標的選択性	89
第4節	本研究により得られた化合物探索戦略の他のPPIに対する応用	90
第5節	化合物探索におけるNMR活用に関する考察	90
第5章 結論		101
第6章 引用文献		102
謝辞		114

第 1 章 序論

第 1 節 PPI を標的とする化合物探索の課題

ヒトの生体内には 13 万から 65 万種のタンパク質間相互作用 (protein–protein interaction; PPI) が存在するとされており^{1,2}、その役割はシグナル伝達、免疫応答および細胞認識など多岐にわたる。したがって、PPI はがんや免疫疾患などのさまざまな疾患に対する創薬標的群として極めて重要である³⁻⁵。近年、いくつかの PPI 標的に対する阻害化合物が発見されてきてはいるものの、実際に製造承認に至った薬剤は数種類であり、従来標的である酵素や GPCR に対する薬剤に比べるとその割合は圧倒的に少ない^{6,7}。その理由としては第一に、酵素基質のように化合物デザインのテンプレートとなる内在性低分子リガンドが存在しないため、内在性リガンド構造を模した低分子化合物を起点とするなどの効果的な化合物探索戦略が採れない点が挙げられる。第二の理由として、内在性低分子リガンドの様に収納される明確なポケットが存在しないことが挙げられる (Figure 1)。従来標的である酵素や受容体に対するリガンドは一般的に標的タンパク質の結合ポケットにはまり込み、分子全体を利用して標的タンパク質との効率的結合が可能となっている。一方、PPI 界面は一般的に平坦であるため、低分子化合物が効率的に結合することが困難である。さらに一般的に創薬標的となるポケットの表面積 (300–1000 Å²) に比べ PPI の表面積は広い (1500–3000 Å²)⁸ ため、PPI 界面全体を低分子化合物でカバーすることは難易度が高い。このような理由により、PPI は重要な創薬標的であるにもかかわらず、低分子阻害剤創製の実績は乏しいのが現状である。一方、抗体などの高分子薬は効率的な PPI 阻害が実現可能であるが、細胞膜透過性が低く、細胞外の限られた分子しか標的とすることができない。したがって、PPI に対する効果的な化合物探索手法の開発は、創薬研究における重要な課題である。

第 2 節 本研究における PPI 創薬標的 : TRAF6

関節性リウマチに対する創薬標的として重要な PPI を形成するタンパク質の一つに腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF) 受容体関連因子 6 (TNF receptor associated factor 6; TRAF6)

が知られている⁹。TRAF6 は TNF 受容体スーパーファミリー (TNF receptor superfamily; TNFRSF) などとの結合を通じ、炎症などに関与するシグナル伝達を仲介する細胞内アダプタータンパク質である (Figure 2a)^{9,10}。これらのシグナル伝達は、TNFRSF 中のアミノ酸共通配列、P-x-E-x-x-(aromatic/acidic) (x は任意のアミノ酸残基)、が TRAF6 の C 末端ドメイン (TRAF-C ドメイン) 上の共通表面を認識することにより誘起される¹¹。さらに、インターロイキン (interleukin; IL) -1 受容体や Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) の下流に存在するアダプタータンパク質である IL-1 受容体関連キナーゼ (IL-1 receptor associated kinase; IRAK) と呼ばれるタンパク質群も上記共通配列を有しており、TRAF6 上の共通表面に結合することが知られている (Figure 2b)⁹。これらの相互作用は、nuclear factor- κ B (NF- κ B) ファミリーや activator protein 1 (AP1) ファミリーに属する転写因子 (transcription factor; TF) を活性化し、最終的には免疫応答、炎症反応および破骨細胞の分化を促進する¹²。したがって、TRAF6 上の共通表面に結合し PPI を阻害する化合物は、複数の免疫・炎症に関与するシグナル伝達経路を同時に遮断し、炎症性疾患に著効を示すことが期待される¹³。実際、RANK リガンド、CD40 リガンドおよび IL-1 受容体に対する抗体は、関節性リウマチモデルマウスの症状を改善することが実験的に示されており¹⁴⁻¹⁷、本シグナル伝達経路は創薬標的として有望である。また、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) ベースのゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) において、間接性リウマチ患者に TRAF6 のイントロン領域の変異が統計的有意性を持って観測されたことから、TRAF6 はヒトにおいても関節性リウマチに関与していることが指摘されている^{18,19}。関節性リウマチに関しては抗体注射・点滴薬以外に著効を示す薬剤がほとんど存在しない (研究途中の 2013 年 3 月に低分子薬ゼルヤンツ®が日本において製造販売承認取得) ため、安価で経口投与可能な低分子薬剤に対する高いニーズが存在する。さらに、抗体は細胞膜透過性が低く、細胞内の PPI 阻害は一般的に困難とされているため、TRAF6 の関与する PPI を直接的に阻害するためには低分子化合物の活用が適している。以上のような複数の観点から、TRAF6 の TRAF-C ドメインに対する低分子薬剤探索研究は有意義である。なお、TRAF6 は上流側分子との結合を担う TRAF-C ドメイン以外に、下流へのシグナル伝達を直接担う RING ドメイ

ンおよび zinc finger ドメインを N 末端側に有しており、これらのドメインはそれぞれについて、経路の異なる複数のシグナル伝達を惹起する²⁰⁻²²。これらのドメインも創薬標的候補であるが、網羅的にシグナル伝達を遮断して、より強い薬効を追求するためには、より上流の相互作用に与する TRAF-C ドメインを標的とする方が適すると考えた。

TNFRSF の一つである receptor-activator of NF- κ B (RANK) 受容体の細胞内ドメインペプチド(以後 RANK ペプチド;配列: PTEDEY)と TRAF6 の複合体結晶構造は既に解明されている。その結合界面面積は、約 1000 Å²と PPI としては比較的狭いものの、界面形状は極めて平坦であることが明らかとなっている (Figure 3a)^{11, 23}。TRAF6 と RANK ペプチドの結合は、いくつかの“鍵相互作用”によって特徴付けられる。鍵相互作用の一つとして、TNFRSF 中のアミノ酸残基共通配列の 3 番目のグルタミン酸残基の側鎖と TRAF6 の間に形成される結合界面に平行な水素結合、および主に TRAF6 の β -strand 7 (b7) と RANK ペプチドの各主鎖原子との間に形成される結合界面に鉛直な水素結合が挙げられる (Figure 3)。さらに、TRAF6 の M450、F471 および Y473 の側鎖によって形成される浅い疎水性ポケットは、TNFRSF 共通配列中の Pro 残基とファンデルワールス相互作用を形成する (Figure 3)。先行研究から、F471 と Y473 に点変異導入を行うと、TRAF6-TNFRSF 間の結合親和性が顕著に低下することが明らかとなっており、本ファンデルワールス相互作用も鍵相互作用の一つである¹¹。本相互作用部位については以後、Pro site と呼ぶ。ここまで述べたように、TRAF6-TNFRSF 間には複数の鍵相互作用が形成されるものの明確な結合ポケットが存在せず、結合親和性は低い (TRAF6-RANK ペプチドの解離定数 (K_D) = 78 μ M¹¹)。したがって、TRAF6 の低分子創薬標的としての適性 (*druggability*) は、明確な結合ポケットのある標的に比べ低いと考えられる。実際、これまで報告されている TRAF6-TNFRSF 結合阻害剤は 2014 年に報告された 1 化合物のみであり、本化合物の結合親和性は内在性ペプチドよりも低い¹³。

以上述べてきたように、TRAF6 は魅力的な創薬標的であるにもかかわらず、TNFRSF との結合界面は酵素など従来の標的に比べ広く平面的で、内在性の低分子リガンドが存在しないため、難度の高い創薬標的である。このような広く平面的な PPI を標的とした効果的阻害剤探索アプロ

一チの一つとして、立体構造に基づく化合物探索 (structure-guided drug discovery; SGDD) が挙げられる。本研究においては、核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) 法により得られる結合界面の立体構造情報を活用した。特に、より詳細かつ精度・確度の高い立体構造情報を得るために、既存の NMR 手法の活用だけでなく、常磁性シフト (paramagnetic shift; PS) を用いた手法の開発・応用も行った。次節において、分子間結合界面に関する立体構造情報を得るための NMR 手法を概説し、PS を用いた手法の位置づけについて述べる。

第3節 分子間結合解析のための NMR 手法

第1項 立体構造解析における NMR 法の特徴

標的タンパク質-化合物複合体の立体構造の活用は、効果的な PPI 阻害剤創製を可能とする。成功例としては、Bcl-2 や IL-2 を標的とした活性化合物デザインが挙げられる^{24,25}。例えば Bcl-2 に対する化合物デザインにおいては、Bcl-2 表面で近傍に結合する 2 種類の化合物を立体構造情報に基づいてリンキングすることにより高活性化合物創製に成功している。さらに、立体構造に基づく化合物デザインにより、ヒト血清アルブミンに対する結合親和性を低下させ、化合物の標的選択性向上および血中におけるタンパク質結合率の低下も達成したことが報告されている。創薬標的タンパク質の立体構造解析を実験的に行う手法としては主に、X 線結晶構造解析法および NMR 法が挙げられ、近年、PPI およびタンパク質-化合物複合体を含む多くのタンパク質立体構造がこれら 2 手法によって明らかとなっている。X 線結晶構造解析法は、各原子の電子密度に基づく精緻な立体構造決定が可能という利点を有するものの、結晶化の条件探索においてしばしば困難を伴う。一方、NMR 法については、任意の溶液条件下で立体構造解析が可能という利点を有する一方で、タンパク質中の水素核間の距離情報を網羅的に収集する従来の解析手法 (ディスタンスジオメトリー法)²⁶ では、高分子量タンパク質や溶解性の低いタンパク質の立体構造決定は困難であった。一方、化合物デザインの観点から特に重要となる、分子間結合界面の構造情報を選択的に抽出する NMR 手法も存在する²⁷⁻³¹。分子間結合界面を解析する NMR 手法の分子量・溶解度制限は、分子全体を解析対象とするディスタンスジオメトリー法よりも緩やかであり、中

には分子量的制約をほとんど受けない手法も存在する。これら分子間結合界面情報を計算科学的手法と組み合わせることにより、従来法では構造決定が困難であった PPI およびタンパク質-化合物複合体の構造モデルを高い精度で構築することが可能である。ただし、各 NMR 手法はその原理的背景により、得られる情報の精度や性質、また適用範囲が異なるため、目的に応じて適切に手法を選択すること、また場合によっては解析精度を向上させるために複数の NMR 手法を用いて多面的に立体構造情報を得ることが重要となる。次項では、結合界面情報を得るための NMR 手法について概説する。

第2項 NMR 法を用いた分子間結合界面解析手法

分子間結合界面の構造情報を得るための NMR 手法のうち、特にタンパク質-化合物結合において化合物側のシグナルを観測対象とし、化合物の結合配向を決定する手法として、INPHARMA 法^{32, 33}および DIRECTION 法^{34, 35}が挙げられる。これら 2 手法の利点として、タンパク質を安定同位体標識する必要がない点が挙げられる。一方、タンパク質側を観測対象として結合界面を同定するための手法としては、複合体形成に伴う化学シフト変化を指標とする化学シフト摂動 (chemical shift perturbation; CSP) 法^{27, 36, 37}、分子間の水素核間の磁化移動を基礎とする分子間核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect; NOE) の観測^{38, 39} および交差飽和法^{29, 40}、複合体形成に伴う溶媒露出度の変化に基づく水素-重水素交換法²⁸ および常磁性物質を用いる手法が挙げられる。以下、それぞれの手法について概説する。

INPHARMA 法

INPHARMA 法は、標的タンパク質の同一表面に対して競合的に結合する 2 種類のリガンドの結合時の相対配向を明らかにする手法であり、原理的にはタンパク質の水素核を仲介した間接的な NOE 現象を基礎とする (Figure 4)^{32, 33}。したがって、一方のリガンドと標的タンパク質の複合体立体構造が既知の場合、他方のリガンドの結合様式を比較的高い精度で提示することができる。このように、本手法は高い精度を有するだけでなく、標的タンパク質の分子量制限が無い

という利点も有する。一方、一つのサイトに同程度の結合親和性で競合する複数のリガンドが必要になるという制限が存在する。また、適用可能な結合親和性は、 K_D 値として、mM– μ M 程度の範囲である。

DIRECTION 法

DIRECTION 法は、化合物中の各水素原子の標的タンパク質への近接度を評価する手法である (Figure 5) ³⁵。本法においては、標的タンパク質存在下の化合物各水素核における分子間交差緩和速度を測定する。分子間交差緩和速度は、化合物水素核周囲に存在する標的タンパク質の水素核密度（水素間距離の -6 乗の和）に比例することが知られており、化合物との結合様式を反映する情報となる。本実験データはドッキング計算に組み込むことにより、より精緻な複合体立体構造決定が可能になることが示されている ³⁴。本手法の適用においては、 K_D が mM– μ M 程度の範囲である必要があると推定されており、 K_D が nM よりも小さな結合親和性の高い分子間結合の解析は困難である ³⁵。

化学シフト摂動法 (CSP 法)

CSP 法は、複合体形成に伴うタンパク質中の各原子の化学シフト変化量を算出し、変化量の大きな原子を結合界面原子として同定する手法である ^{27, 36, 37}。この手法においては一般的に、観測対象のタンパク質を ^{15}N もしくは ^{13}C の安定同位体で標識する必要があるが、解析が簡便であるためタンパク質結合界面の決定に広く用いられている。しかし、複合体形成に伴う化学シフト変化はリガンドの近接に伴う化学環境の直接的な変化のみならず、結合に伴い結合界面から離れた部位において誘起される間接的な構造変化にも鋭敏である。よって、本手法により得られる“分子間結合界面情報”の意味には注意が必要となる。

分子間 NOE

分子間 NOE を観測することにより、分子間にて近接する水素核対を同定できる。したがって、タンパク質複合体の結合界面のみならず、タンパク質間の配向の決定および大まかな距離の推定が可能となる。しかし一般的に、タンパク質-化合物の分子間 NOE を観測する場合、タンパク質を安定同位体標識し、NOE スペクトルの帰属や相互作用するタンパク質両者の化学シフト情報を得る必要があり、解析に多大な時間を要する。また、弱い相互作用系においては分子間 NOE の観測が困難になるという欠点が存在する。

交差飽和法

交差飽和法は、分子間 NOE と同様に、相互作用する分子間の ^1H 間における双極子-双極子相互作用に基づく手法である^{29, 40}。タンパク質 1 とタンパク質 2 の相互作用系において、タンパク質 1 を ^2H , ^{15}N により標識しタンパク質 2 は非標識とする。ただし、タンパク質 1 のアミド ^2H は、溶媒中の水素原子との交換により、 ^1H に置換する。まず、タンパク質 2 の脂肪族領域の ^1H に対するラジオ波照射を行う。すると、交差飽和現象により、タンパク質 2 の飽和はタンパク質 1 のアミド ^1H に伝播する。タンパク質 1 は高度に重水素化されているため、タンパク質 1 に対する交差飽和はタンパク質 2 との結合界面のみに留まる。伝播した飽和は ^1H - ^{15}N 相関スペクトル上の各シグナルの強度減少として観測される。交差飽和法は、距離に依存した双極子-双極子相互作用に基づく手法であるため、正確性が高く、また分子間 NOE に比べ解析が容易である。また、重水素化タンパク質のメチル基のみを ^1H , ^{13}C 標識し観測対象とする変法も報告されている⁴¹。しかし、非交換性水素原子を完全に重水素化したタンパク質を得る必要があり、適用可能なタンパク質発現系が限定される。また、交差飽和法においては、観測対象となる原子はアミドおよびメチル ^1H に限られる。

水素-重水素交換法

水素-重水素交換法は、 ^{15}N 安定同位体標識した解析対象タンパク質の主鎖アミド水素が溶媒中

の重水素と交換する速度を、 ^1H – ^{15}N HSQC スペクトル上で残基ごとに解析をする手法である²⁸。複合体形成に伴い結合界面に存在するアミド水素が溶媒から遮蔽されると重水素との交換速度が減少することを利用して、結合界面を決定することができる。しかし、水素結合の有無など溶媒露出度以外の要因も交換速度に影響を与えるため、結合界面検出法としての精度は高くない。また、原理上、非交換性水素は解析対象とならないという欠点が存在する。

常磁性物質を用いる手法

常磁性物質とは、分子中に不対電子をもち、外部磁場を与えた際に磁性を示す物質と定義される。常磁性物質における不対電子の磁気モーメントの大きさは核スピンにおける磁気モーメントの大きさの約 576 倍である。したがって、常磁性物質近傍の核スピンの緩和過程においては核スピン–核スピン間よりも電子スピン–核スピン間の双極子–双極子相互作用が支配的要因となる。この現象が常磁性物質による緩和促進効果 (paramagnetic relaxation enhancement: PRE) である (Figure 6a)。PRE は、電子スピンと核スピンの双極子–双極子相互作用に基づくため、その大きさはスピン間の距離に依存する。この現象を利用して、溶液中を自由拡散する常磁性物質を用いたタンパク質間結合界面同定が可能となる。その概念を Figure 7 に示す。常磁性物質が溶液中にて自由拡散している場合、溶媒中の常磁性物質と距離の短いタンパク質表面の原子には大きな PRE が誘起される。タンパク質が複合体を形成すると、界面原子は溶媒中の常磁性物質からの距離が離れるため、PRE は減少する。このように、複合体形成に伴う、結合界面における溶媒露出度の減少を PRE の減少として検出することにより、結合界面を同定することができる。

これまで、溶液中を自由拡散する常磁性物質が誘起する PRE を、NMR シグナルの強度減少として検出することで、タンパク質の表面原子およびタンパク質–タンパク質間またはタンパク質–低分子化合物間の相互作用界面原子を決定する試みがなされている^{42–44}。本法は、溶媒露出度に基づくため、CSP 法に比べて結果の解釈が明確である。また、原理的に全ての NMR 観測対象原子が解析対象になるという特徴は、水素–重水素交換法や交差飽和法にはない利点である。さらに、 ^1H 間の双極子–双極子相互作用に基づく交差飽和法や分子間 NOE の解析では精度の高い解析が

困難であった、糖、ヌクレオチド、有機化合物など、水素密度の低い分子とタンパク質間の相互作用系を解析対象とする場合でも、溶媒露出度の変化を結合界面の指標とする本手法には、高精度に結合界面を検出できると考えられる。しかし、本解析に一般的に用いられる常磁性物質、ニトロキシラジカル的一种である 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL) により誘起される PRE には、タンパク質側の運動性および分子量が影響することから⁴⁴、結合前後で運動性、分子量が大きく変化する場合などに、溶媒露出度変化のみを正確に抽出することは困難であった。

第3項 PS を用いた結合界面決定手法のコンセプトと立証に用いたモデル相互作用系

上述した PRE の欠点を克服するため、私は常磁性シフト、PS の活用を発案した (Figure 6b)。PS は常磁性物質の対電子により NMR 観測核に誘起される化学シフト変化であり、そのメカニズムの違いからコンタクトシフトと擬コンタクトシフトに分類される。Prosser らは、常磁性物質として酸素分子を用い、溶液中を自由拡散する常磁性物質が誘起する PS は主にコンタクトシフト由来であることを示している⁴⁵。コンタクトシフトは、観測核の s 軌道もしくは p 軌道に非局在化した対電子が、それぞれ spin delocalization もしくは spin polarization と呼ばれるメカニズムにより、原子核の位置に付加的磁場を創生し、観測核の化学シフトを変化させる現象である⁴⁶。この化学シフト変化の大きさ ($\Delta\delta$) は以下の式で示すように、観測対象原子の溶媒露出度と常磁性物質の局所濃度に比例する一方、タンパク質の運動性および分子量に依存しないことが経験的に知られている⁴⁷。

$$\Delta\delta = k\alpha\Omega[P]_{\text{local}}$$

k: 比例定数、 α : spin delocalization および spin polarization の寄与の大きさによって決定する定数、 Ω : 原子の溶媒露出度、 $[P]_{\text{local}}$: 各原子周囲の局所的な酸素濃度

したがって、PRE に比べて PS は、タンパク質-低分子相互作用から PPI の解析まで幅広い解析対象について、結合前後で運動性、分子量が大きく変化する場合でも、正確な溶媒露出度の解析ができる、適用範囲の広く正確性の高いパラメータであると考えた。

本研究において私は、yeast ubiquitin とその加水分解酵素である yeast ubiquitin hydrolase 1 (以後 YUH1) の相互作用系を解析対象として PS を用いた手法を検証した。Yeast ubiquitin は 76 アミノ酸残基からなる分子量約 8.6 kDa のタンパク質、YUH1 は 234 アミノ酸残基からなる分子量約 26 kDa のタンパク質である。したがって、複合体形成に伴い ubiquitin の分子量は約 4 倍に増加する。YUH1 は、ubiquitin と強く結合する C90S 変異体を用いた ($K_D = 220$ nM)。以後特に断らない限り、YUH1 と表記する場合は YUH1(C90S)を指すものとする。Yeast ubiquitin および野生型 YUH1 のアミノ酸配列を Figure 8 に示す。Yeast ubiquitin の立体構造は決定されていないが、human 由来 ubiquitin については立体構造が報告されている⁴⁸。Human ubiquitin と yeast ubiquitin には 3 アミノ酸残基 (19、24、28 番目の残基) の変異が存在するが、両者の NMR スペクトルにおいて、変異残基以外の残基に由来する主鎖 ^1H および ^{15}N の化学シフト値がほぼ同一であることから、大きな構造の違いは存在しないと考えられる。本研究においては、human ubiquitin の立体構造を用いて結果の解釈を行う。以後、yeast ubiquitin を ubiquitin と表記する。

Ubiquitin–YUH1 複合体の立体構造は報告されていないが、ubiquitin の C 末端カルボキシル基をアルデヒド基に置換して YUH1 の C90 のメルカプト基と共有結合を形成させた複合体、ubiquitin aldehyde (UBA) –YUH1 複合体の立体構造が報告されている (Figure 9)。UBA–YUH1 複合体について報告されている ubiquitin の主鎖 ^1H および ^{15}N の化学シフトと、実際に測定した ubiquitin–YUH1(C90S)複合体の ubiquitin 化学シフトは C 末端に存在する残基 (R72–G76) を除いてよく一致したことから、本研究における結果の解釈は UBA–YUH1 複合体の立体構造を用いて行うこととした。Ubiquitin–YUH1 の結晶構造において結合界面を形成している部位は、第 1 ループ (T7、L8、T9、G10、K11)、 β ストランド 4 (D39、R42、I44)、ストランド 3 と 4 を連結する第 4 ループ (A46、G47、K48) および C 末端 (L71–G76) である (Figure 9)。

第4節 本論文の内容

本研究における目的は、これまで低分子阻害剤がほとんど知られていなかった TRAF6–TNFRSF 相互作用を標的とする低分子阻害剤を探索・創製し、その作用メカニズムを立体構造の観点から解明することである。

初期化合物探索においては、TRAF6 の結合相手である RANK ペプチドの立体構造に基づく機械学習を取り入れた *in silico* 化合物探索手法を活用し、ヒット化合物 TRI1 の取得に成功した。本化合物を起点とした SGDD を行うために、TRAF6–TRI1 複合体の立体構造モデル構築を行ったところ、Pro site（第2節で定義）が TRI1 との結合に関与するモデルと関与しないモデルの2種類が得られた。そこで正しい構造モデルを実験的に選択するために、PS を評価指標として複合体形成に伴う Pro site の溶媒露出度変化を解析した。その結果、TRI1 添加に伴う Pro site の PS 減少が観測され、Pro site が TRI1 と相互作用する構造モデルが実験的に支持された。なお、PS については、ubiquitin–YUH1 相互作用系を解析対象とした検証実験によって、タンパク質分子量や運動性の影響をほとんど受けずに溶媒露出度変化の解析が可能な正確性の高いパラメータであることを証明した。本結果と矛盾しない TRAF6–TRI1 複合体構造モデルを選択し、本構造に基づく化合物合成展開を行った結果、最終的に内在性ペプチドを上回る結合親和性を有する化合物、TRI4 の創製に成功した。次に、TRI4 の結合様式を明らかにするために、複数の NMR 手法により得られた分子間結合解析データに基づいたドッキング計算を行い TRAF6–TRI4 複合体の高精度構造モデルを構築した。得られた構造モデルから、TRI4 は TRAF6–TNFRSF 結合界面の一部の鍵相互作用を阻害するだけでなく、その周辺部位とも相互作用を形成することにより内在性リガンドを上回る結合親和性を獲得し、標的 PPI 阻害作用を発揮することが明らかとなった。

本研究においては TRAF6 に対する新規低分子阻害剤を創製しただけでなく、NMR により得られる結合界面に関する立体構造情報と計算科学を組み合わせ構築した複合体構造モデルが化合物デザイン・作用機序解明に有用であること、および界面が広く平坦な PPI の阻害には一部の鍵相互作用阻害で十分な場合があることを示した。これらの知見は、他の PPI を標的とした化合物探索においても応用可能と考える。

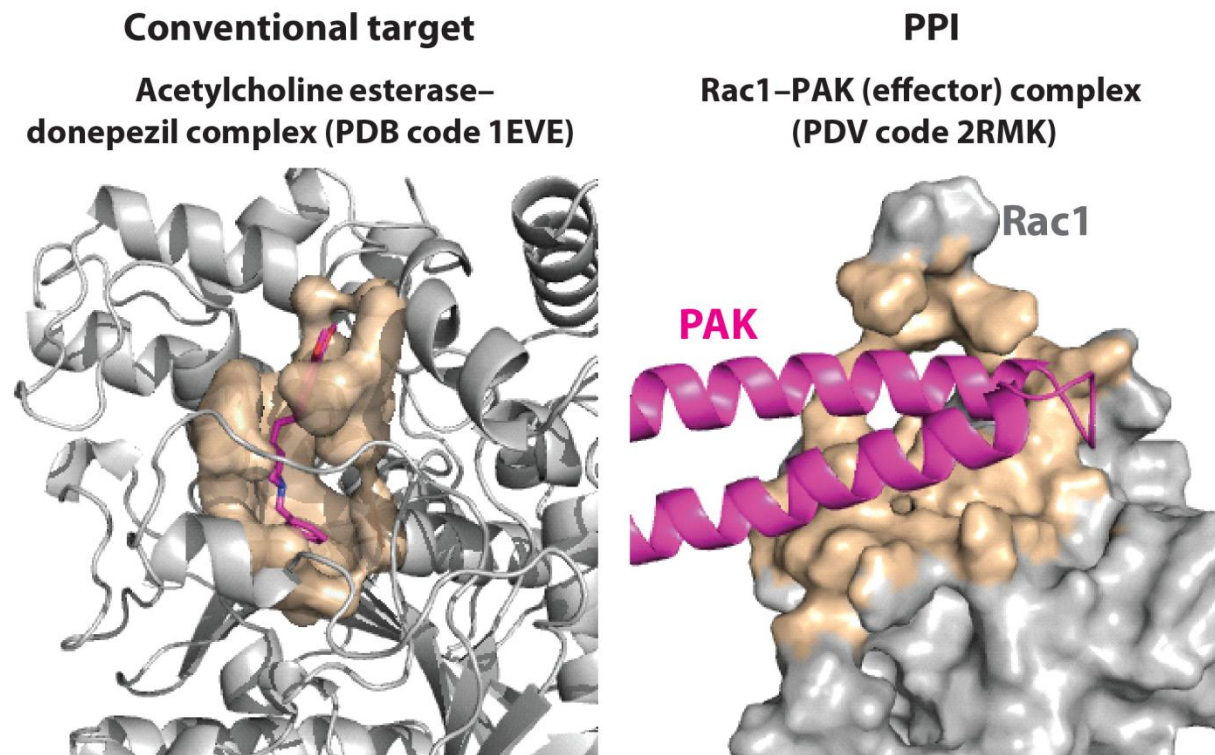


Figure 1 従来型標的と PPI の分子間結合界面の比較

従来型標的として Acetylcholine esterase–donepezil 複合体 (PDB code 1EVE)、PPI として Rac1–PAK 複合体 (PDB code 2RMK) の構造を示した。Acetylcholine esterase および Rac1 は灰色で、donepezil および PAK は紫で示した。Donepezil および PAK から 5 Å 以内に存在する部位をオレンジ表面表示とした。従来型標的には深いポケットが存在するのに対し、PPI 界面は広く平坦である。

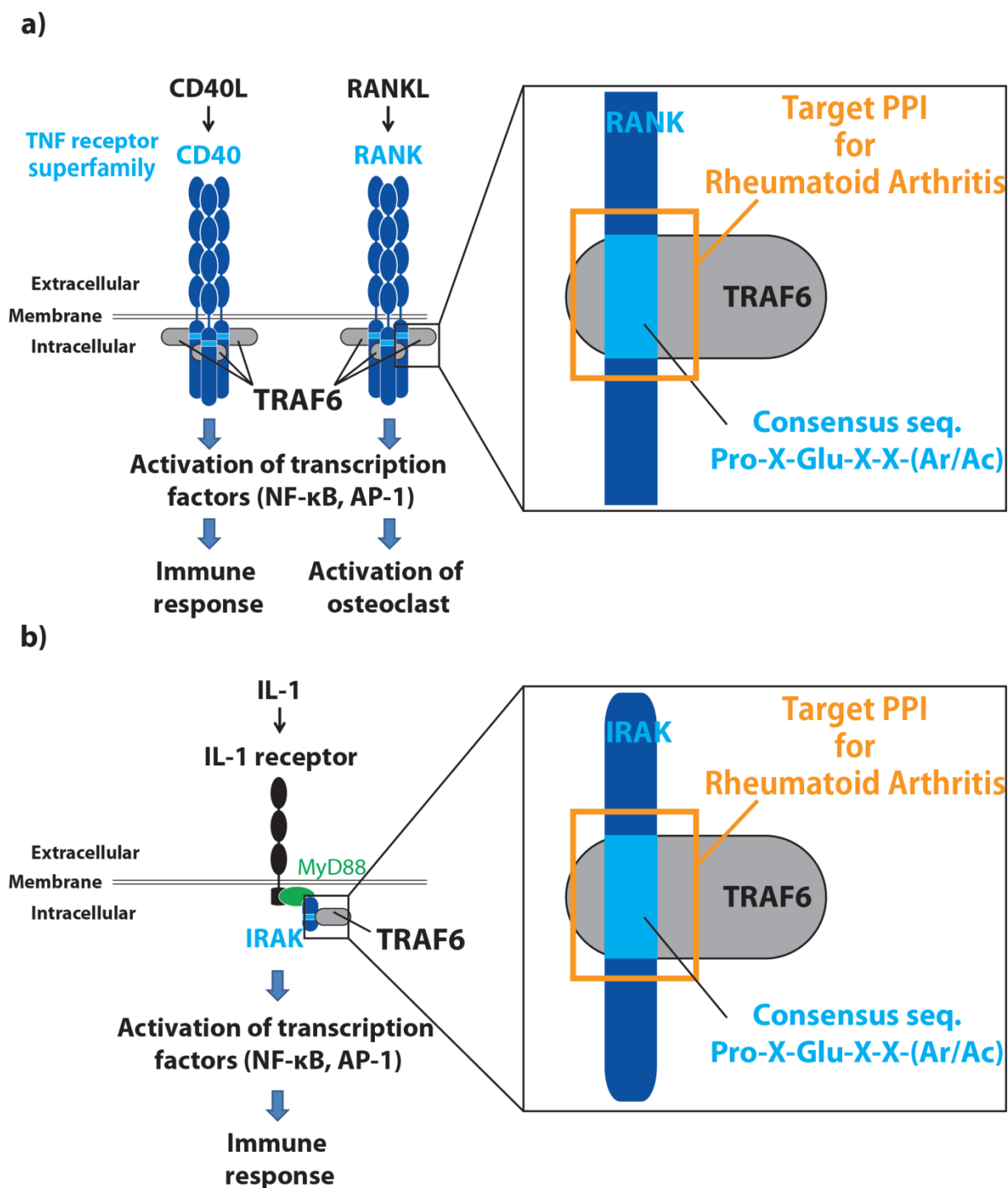


Figure 2 TRAF6 が関与するシグナル伝達経路と本研究における標的 PPI

(a) TNFRSF を介するシグナル伝達経路において TRAF6 が関与する相互作用。(b) IL-1 受容体を介するシグナル伝達経路において TRAF6 が関与する相互作用。どちらの相互作用においても、共通 6 残基が TRAF6 との結合に関与する。

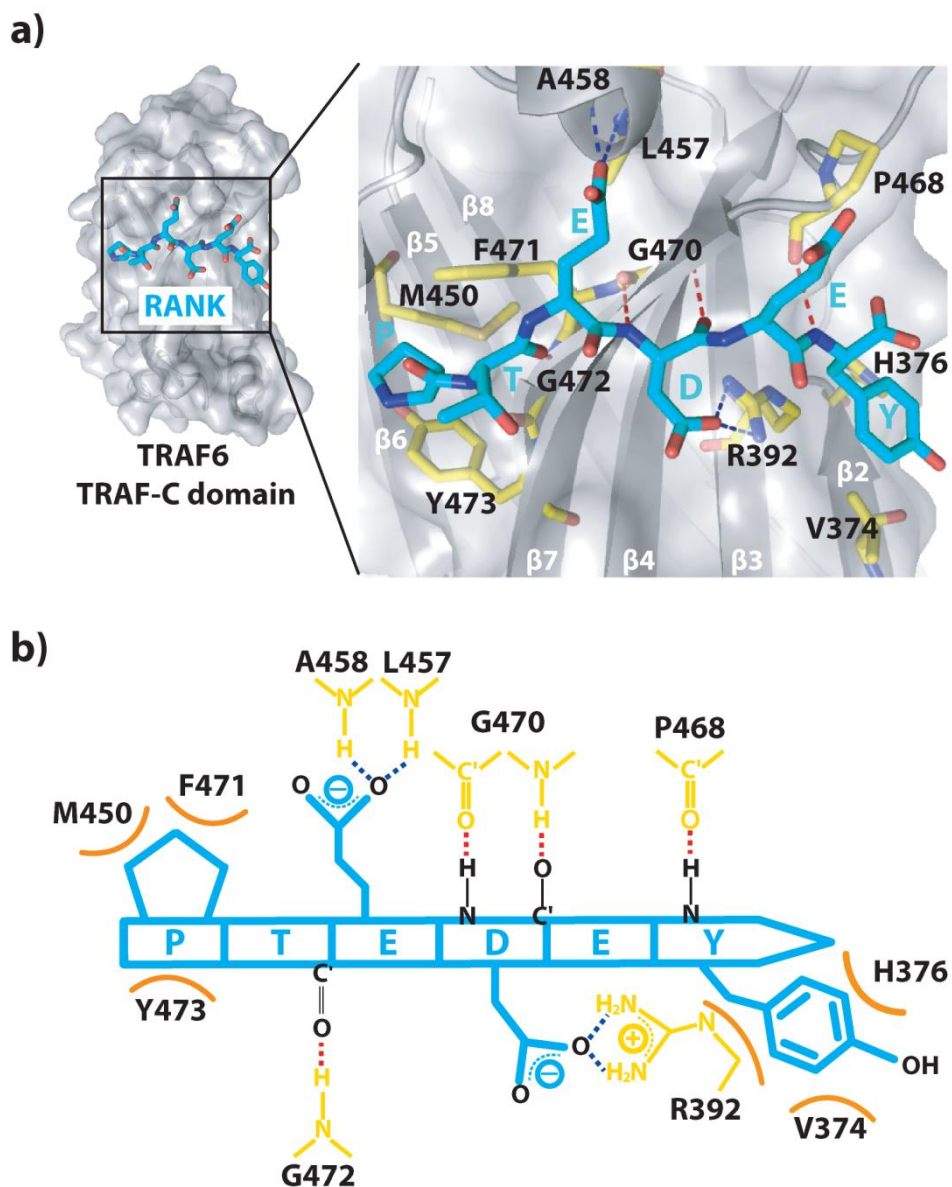


Figure 3 TRAF6–RANK 複合体立体構造と鍵相互作用

(a) TRAF6 (灰色リボンおよび表面表示) と RANK ペプチド (シアンスティック) の複合体 X 線結晶構造 (PDB code 1LB5)。相互作用に関与する TRAF6 の残基は黄スティックで表示した。赤点線は主鎖間の相互作用、青点線はその他の水素結合および静電相互作用を示す。(b) TRAF6–RANK 相互作用の模式図。赤および青点線は (a) に対応する。ファンデルワールス相互作用は、オレンジ曲線で示した。RANK ペプチドの共通配列 (PTEDEY) のみ表示した。

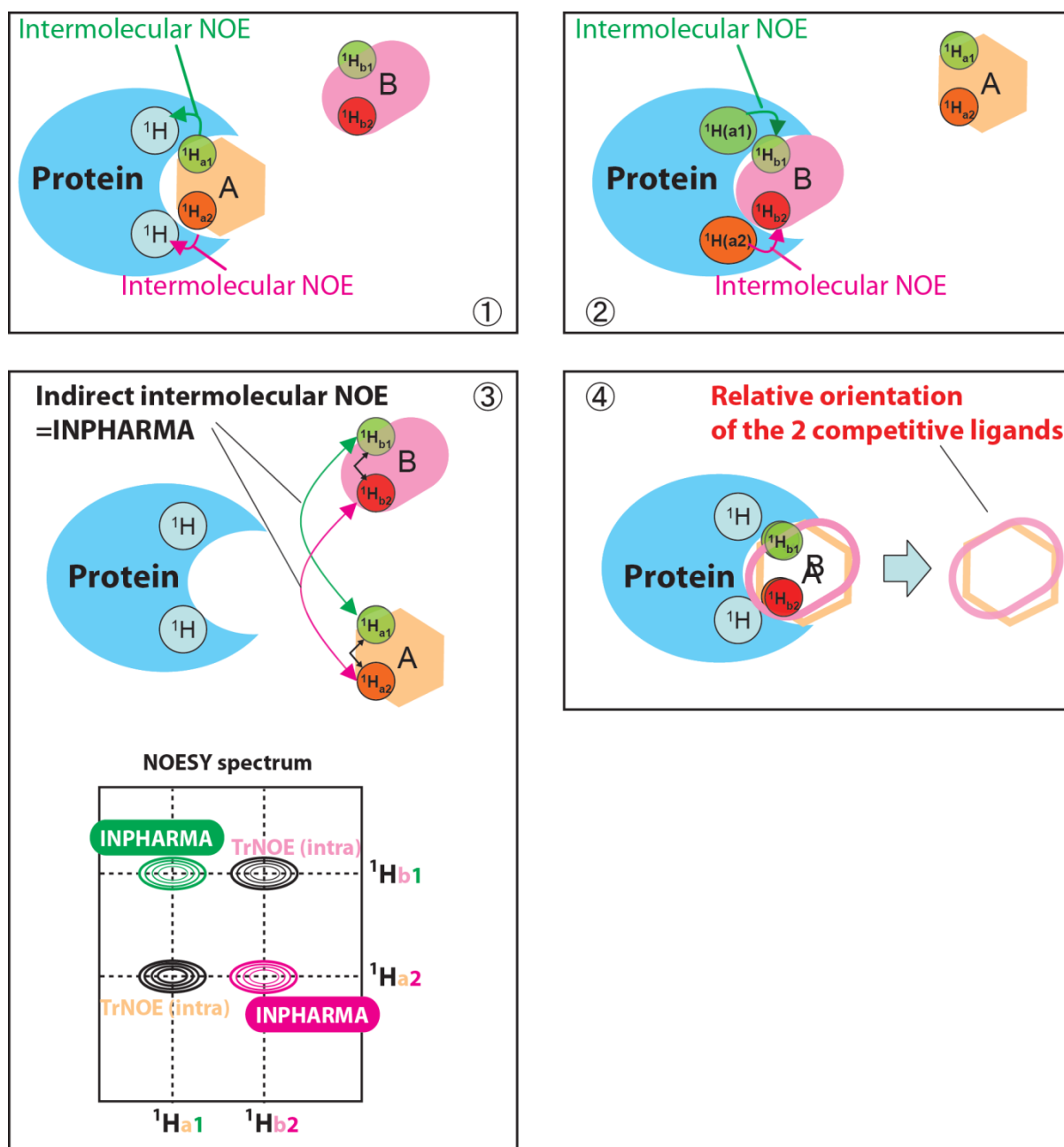
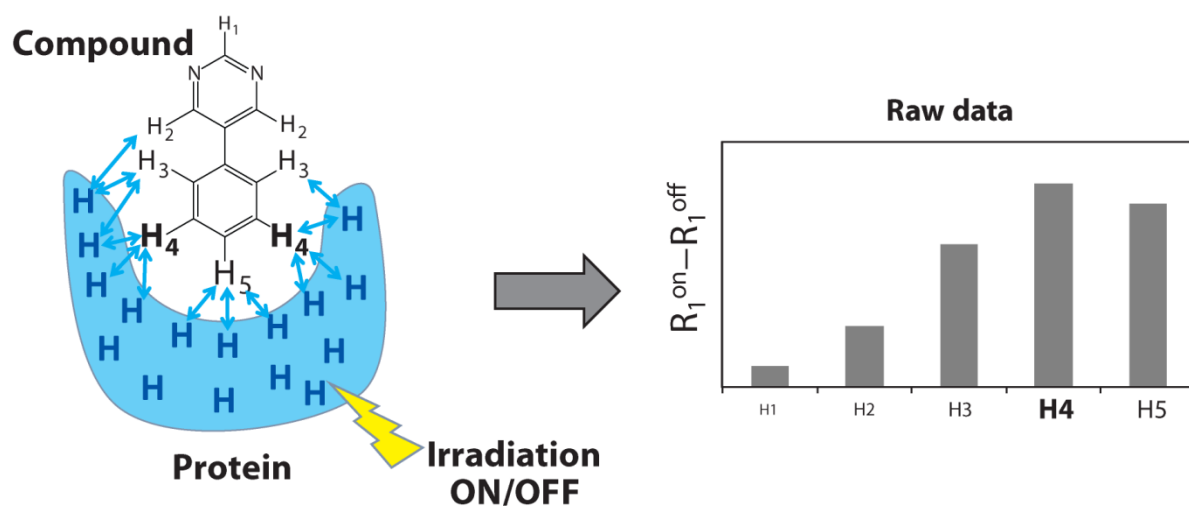


Figure 4 INPHARMA 法の原理

①リガンド A の水素核とタンパク質の水素核間のスピン拡散（分子間 NOE）、②タンパク質の水素核とリガンド B の水素核間のスピン拡散（分子間 NOE）、③タンパク質の水素核を介し、リガンド A と B の水素核間に間接的 NOE が観測される、④間接的 NOE の情報から、リガンド A と B のタンパク質結合状態における相対配向が明らかとなる。

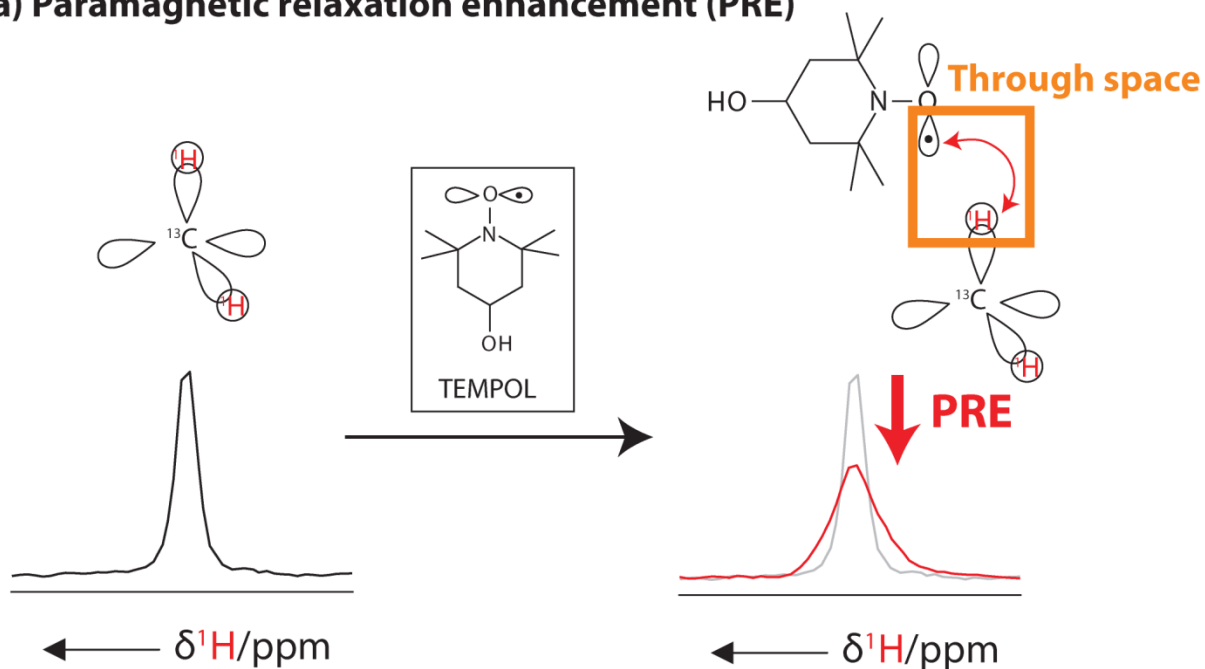


$R_{1^{on}} - R_{1^{off}}$: difference of longitudinal relaxation rate with and without irradiation

Figure 5 DIRECTION 法の原理

リガンド化合物の水素核を観測対象とし、タンパク質に対するラジオ波照射有無による、縦緩和速度の差を測定する。化合物水素核がタンパク質近傍に存在するほど縦緩和速度の差が大きくなることを利用し、タンパク質からの距離を定量する手法である。

a) Paramagnetic relaxation enhancement (PRE)



b) Paramagnetic shift (PS)

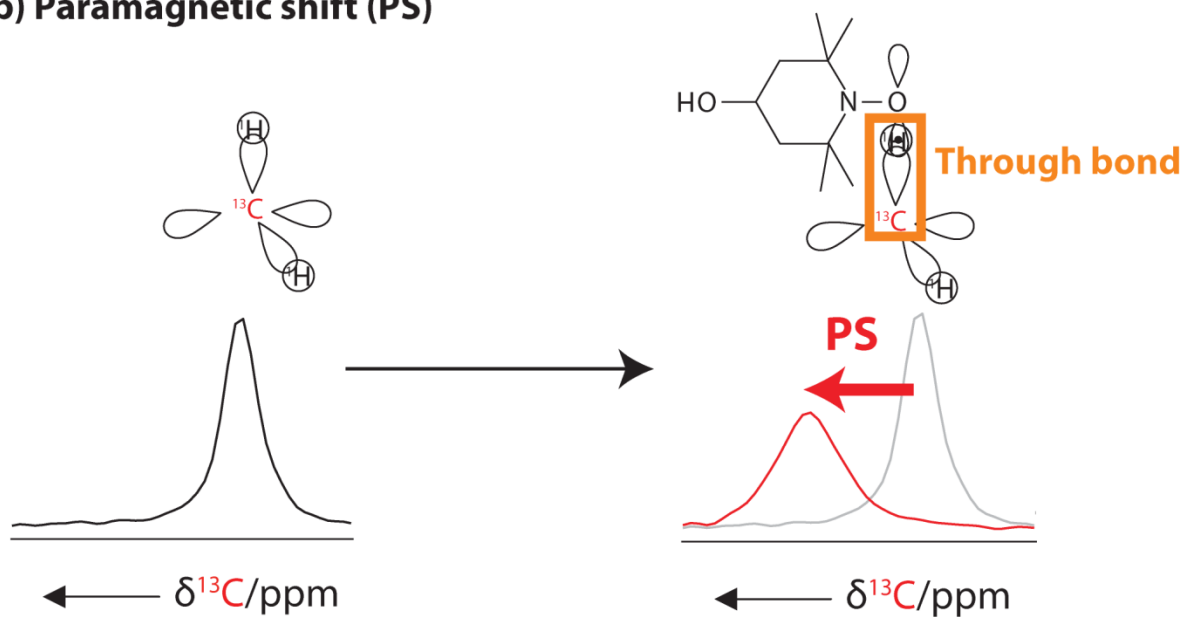


Figure 6 PRE (a) および PS (b) のメカニズムと NMR スペクトル変化

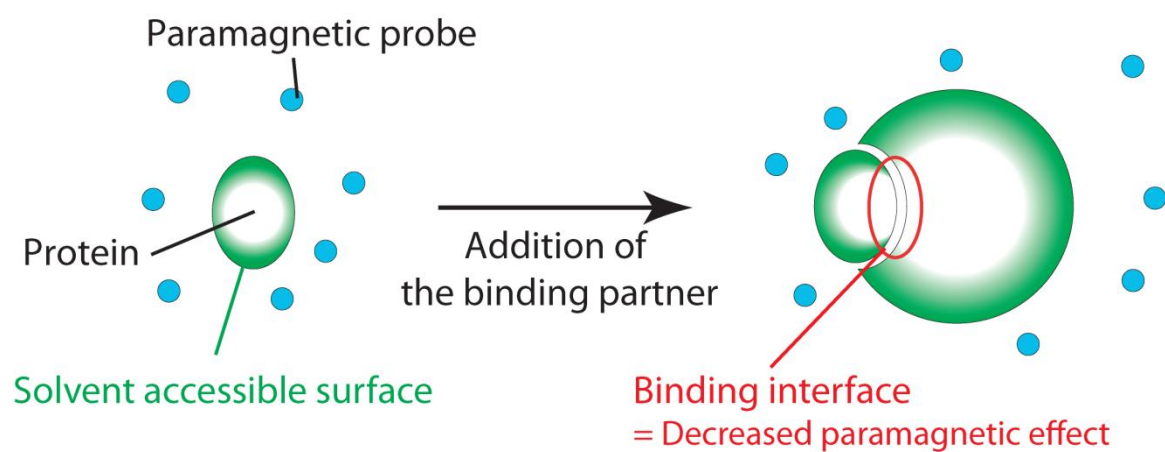
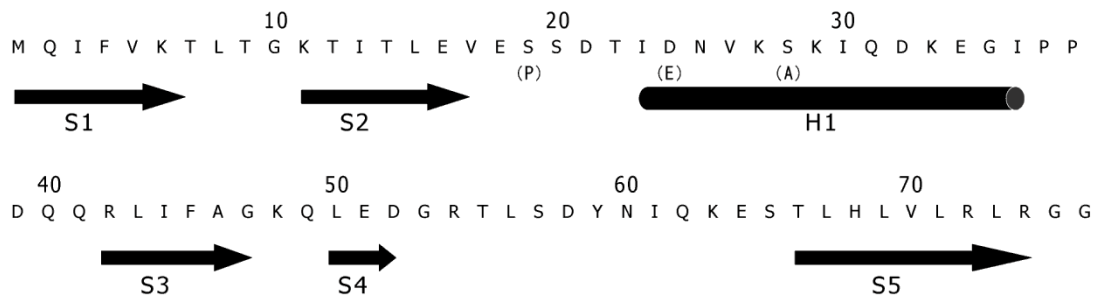


Figure 7 常磁性効果を利用した分子間結合界面決定手法の原理

分子間結合界面においては常磁性物質のアクセスが制限され、距離が離れるため、複合体形成に伴う常磁性効果の減少として結合界面を決定することができる。

Yeast ubiquitin



YUH1 (wild type)

M S G E N R A V V P I E S N P E V F T N F A H K L G L K N E W A Y F D I Y S L T E P E L L A F L P R P V K A I V L L
 F P I N E D R K S S T S Q Q I T S S Y D V I W F K Q S V K N A G L Y A I L H S L S N N Q S L L E P G S D L D N F
 L K S Q S D T S S S K N R F D D V T T D Q F V L N V I K E N V Q T F S T G Q S E A P E A T A D T N L H Y I T Y V E
 E N G G I F E L D G R N L S G P L Y L G K S D P T A T D L I E Q E L V R V R V A S Y M E N A N E E D V L N F A M L
 G L G P N W E

Figure 8 Yeast ubiquitin と野生型 YUH1 のアミノ酸配列

Yeast ubiquitin と human ubiquitin で異なるアミノ酸残基は 19、24 および 28 番である (human ubiquitin におけるアミノ酸残基は括弧内に記載した。)。野生型 YUH1 における C90 は赤で着色した。

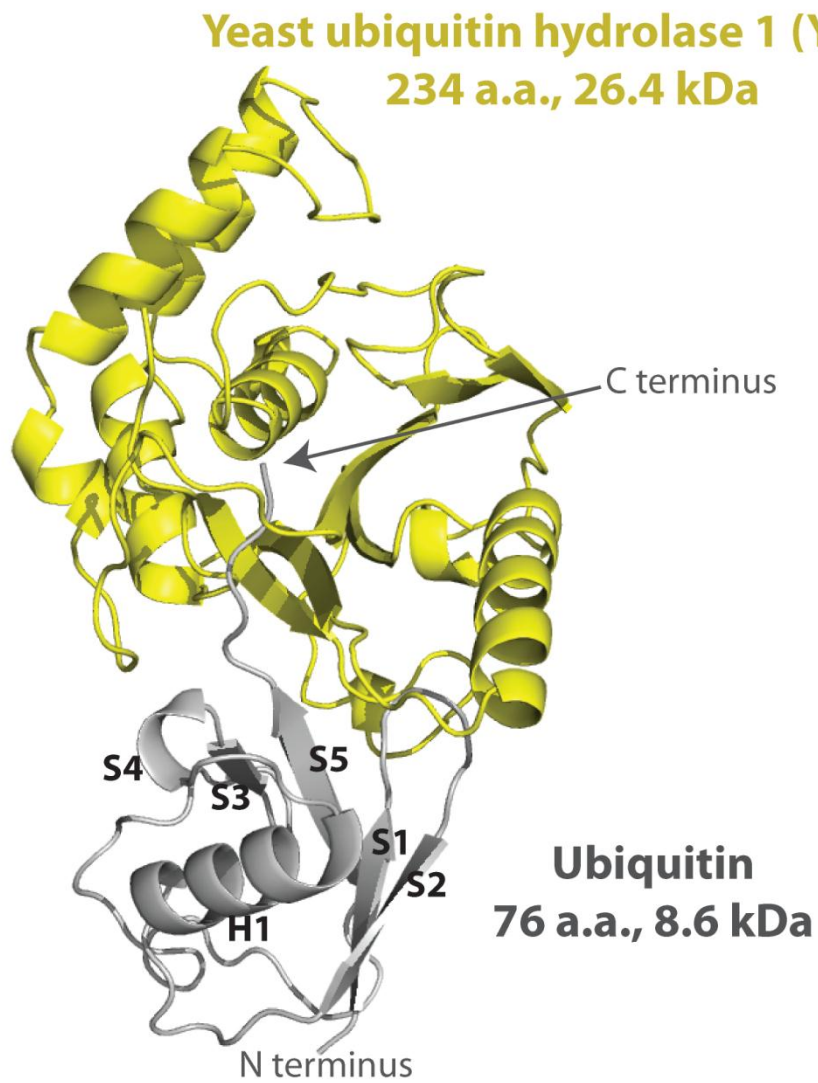


Figure 9 Human ubiquitin aldehyde (UBA) –YUH1 複合体結晶構造 (PDB code 1CMX)

第 2 章 実験材料と実験方法

第 1 節 *in silico* スクリーニングとドッキング計算による化合物選抜

分子シミュレーションパッケージである myPresto⁴⁹ (<http://presto.protein.osaka-u.ac.jp/myPresto4/>) に実装されている machine-learning score modification-multiple target screening (MSM-MTS) 法^{50, 51}を用い、第一次 *in silico* スクリーニングを行った。本スクリーニングにおいて鑄型となる TRAF6 の 3 次元構造は、TRAF6-RANK ペプチド複合体の結晶構造 (PDB code 1LB5) の水素位置を全体の自由エネルギーが最小となるように Maestro (シュレーディンガー株式会社) で最適化し RANK ペプチドを取り除いた構造とした。MSM 法は活性既知分子が高スコアを獲得するように計算パラメータを最適化する手法であるが、本研究においては上述の Maestro で水素位置を最適化した TRAF6 結合状態の RANK ペプチド (アミノ酸配列: PTEDEY) を既知活性分子として用いた。MTS 法は標的タンパク質を含む複数のタンパク質に対して化合物のドッキング計算を行い、標的タンパク質へのドッキングスコアが他のタンパク質よりも相対的に高い化合物を選抜する手法である。今回は、本手法において標準的に使用されている 181 タンパク質 (http://www.jbic.or.jp/activity/st_pr_pj/mypresto/files2/in-silico_manual_v4.200_ja.pdf) に対し、標的タンパク質である TRAF6 のドッキングスコアを比較した。MSM-MTS 法の詳細な使用方法は、株式会社日立東日本ソリューションズ作成のマニュアルに従った。評価対象とした化合物は 2009 年当時の LigandBox^{52, 53}に登録されている 100 万化合物とした。この 100 万化合物は、37 のサプライヤーから供給された、多様な構造を有する市販化合物群である。MSM-MTS 法により 20,000 化合物を選抜し、続いて Glide (シュレーディンガー株式会社) standard precision (SP) モードを用いて 2,000 化合物まで絞込みを行った。さらに、2,000 化合物に対して Glide extra precision (XP) モードによるドッキングスコアを算出し、優先順位付けを行った。なお、Glide 計算においては MSM-MTS 法で作成した TRAF6 の構造から格子データを作成し、スクリーニングに用いた。力場は OPLS2001 を使用した。2,000 化合物から購入可能な 1,659 化合物を

選び出し、さらに MACCS key を改良した 2 次元フィンガープリントを用いて MOE (Chemical Computing Group 社) によって化合物構造を分類し、840 の化合物クラスターを得た。それらのうち、薬としての構造適正 (*drug-likeness*) の観点から最終的に 682 化合物を *in silico* ヒット化合物として選抜した。また、一部化合物については類似化合物を追加し、総数 734 化合物について表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance; SPR) による TRAF6-RANK 結合阻害 (後述) および破骨細胞への分化阻害 (後述) を評価した。734 化合物のうち 487 化合物はナミキ商事株式会社から粉体として購入した。購入した化合物は、100 mM となるように重水素化 DMSO (以下、DMSO-d6) に溶解させた。

第 2 節 ペプチドとタンパク質の調製

特に記載のない限り、試薬は和光純薬株式会社から購入した。安定同位体標識試薬は、Cambridge Isotope Laboratories 社から購入した。

RANK ペプチドの調製

ヒト RANK 受容体の TRAF6 結合配列 (343-QMPTEDEY-349) は各アミノ酸を原料として合成を行い、逆相高速液体クロマトグラフィー (reverse phase-high performance liquid chromatography ; RP-HPLC) にて精製されたサンプルを用いた。SPR 解析において使用する RANK ペプチドについては、センサーチップ表面に固定化するために N 末端がビオチン化されたペプチドを同様の手順で調製した。いずれも株式会社東レリサーチセンターから購入した。

TRAF6 の C 末端ドメイン (C ドメイン) の調製

TRAF6 の C ドメイン (残基番号 346-504) をコードした遺伝子を組み込んだ pET-24d プラスミド (Novagen 社) にて形質転換を行った大腸菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3) による発現を行った⁵⁴。非標識 TRAF6 については、50 mg/L カナマイシンを含む Luria-Bertani (LB) 培地中で大腸菌を培養した。均一 ¹⁵N 標識もしくは均一 ¹³C, ¹⁵N 標識した TRAF6 については、

それぞれの安定同位体標識用に調製された、50 mg/L カナマイシンを含む C.H.L.培地（クロレラ工業株式会社）中で大腸菌を培養した。均一 ^2H 標識された TRAF6 については、1 g/L NH_4Cl 、2 g/L ^2H -グルコース、1 g/L ^2H -Celtone、240 mg/L MgSO_4 、8 mg/L CaCl_2 、12 mg/L FeCl_3 、0.2 mg/L ZnSO_4 、1 mg/L ビオチン、5 mg/L チアミン、1 mg/L 塩化コリン、1 mg/L 葉酸、1 mg/L ニコチンアミド、1 mg/L ピリドキサル、0.1 mg/L リボフラビン、6 mg/L アデノシン/グアノシン/チミジン/シチジン、および 50 mg/L カナマイシンを含む M9 培地中で大腸菌を培養した。均一 ^2H 、 ^{15}N 標識された TRAF6 については、1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ および 1 g/L ^2H 、 ^{15}N -Celtone 以外は、 ^2H 標識された TRAF6 の場合と同組成の M9 培地中で大腸菌を培養した。37 °C で培養開始後、培地の濁度（OD₆₀₀）が 0.6 に達した時点で、終濃度が 0.5 mM となるように isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、発現誘導を行った。IPTG 添加後 20 °C で 12 時間培養し、培養液を 9,530 g にて 10 分間遠心して菌体を回収した。回収した 1 L 分の菌体に 50 mL の BugBuster (Merck 社)、50,000 ユニットの lysozyme (Epicentre 社)、4,000 ユニットの Benzonase® Endonuclease (Merck 社)、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルである Complete tablet™ (Roche 社) を 1 粒添加し、菌体を懸濁した。24,150 g にて 30 分間遠心後、上清を、緩衝液 A (20 mM Tris-HCl (pH 8.5)、100 mM NaCl、1 mM dithiothreitol (DTT)) にて平衡化した AKTA システム (GE healthcare 社) に接続した Ni アフィニティカラム (His Trap FF clude 5 mL; GE healthcare 社) に吸着させた。次に、0 mM から 500 mM のイミダゾールグラジエントによって TRAF6 の溶出を行い、イミダゾール濃度 110 mM 付近に溶出する TRAF6 を回収した。TRAF6 画分をアミコンウルトラ MWCO 10,000 (Millipore 社) で 10 mL 以下まで濃縮し、緩衝液 B (20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2)、100 mM NaCl) にて平衡化した AKTA システムに接続した HiLoad 26/60 Superdex 75 pg カラム (GE healthcare 社) で精製した。TRAF6 を含む画分を回収し、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて純品であることを確認した。最終収量は、1–3 mg/L culture であった。TRAF6 の変異体をコードするプラスミドは Quikchange™ 法 (Agilent Technologies 社) を用いて、野生型のプラスミドを鋳型として調製した。TRAF6 変異体の発現精製は、野生型と同様の手順で行った。

Ubiquitin の調製

Ubiquitin をコードした遺伝子を組み込んだ pET-26b プラスミド (Novagen 社) にて形質転換を行った大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) による発現を行った。非標識 ubiquitin については、50 mg/L カナマイシンを含む LB 培地中で大腸菌を培養した。均一 ^{13}C 標識した ubiquitin については、1 g/L NH_4Cl 、2 g/L ^{13}C -グルコース、2 mM/L MgSO_4 、100 μM /L CaCl_2 、1 μM /L FeCl_3 、50 μM /L ZnSO_4 、1 mg/L ビオチン、5 mg/L チアミン、および 50 mg/L カナマイシンを含む M9 培地中で大腸菌を培養した。均一 ^{13}C 、 ^{15}N 標識した ubiquitin については、1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、2 g/L ^{13}C -グルコース、1 g/L ^{13}C 、 ^{15}N -celtone、2 mM/L MgSO_4 、1 mg/L ビオチン、5 mg/L チアミン、および 50 mg/L カナマイシンを含む M9 培地中で大腸菌を培養した。培養開始後、 OD_{600} が 1.0 に達した時点で、終濃度が 1 mM となるように IPTG を添加し発現誘導を行った。IPTG 添加後 37 °C で 6 時間培養し、培養液を 9,530 g にて 20 分間遠心して菌体を回収した。回収した 1 L 分の菌体を、40 mL の緩衝液 (50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0)) で懸濁し、以後の精製を行った。精製は、陽イオン交換オープンカラム (SP sepharose FF) およびゲルろ過カラム (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg) を用いて行った。詳細は、文献に従った⁵⁵。最終収量は 60–80 mg/L culture であった。

YUH1 の調製

YUH1 の C90S 変異体プラスミドは、pET-20b / YUH1(wt) プラスミドを鋳型とし、Quikchange 法を用いて調製した。本プラスミドにて形質転換を行った大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) による発現を行った。大腸菌は、50 mg/L カナマイシンを含む LB 培地中で培養した。 OD_{600} が 1.0 を越えた時点で、終濃度が 1.0 mM となるように IPTG を添加し、発現誘導を行った。IPTG 添加後 6 時間培養し、培養液を 9,530 g にて 20 分間遠心して菌体を回収した。回収した 1 L 分の菌体を、40 mL の緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) で懸濁し、以後の精製に用いた。精製は、陰イオン交換オープンカラム (DEAE sepharose FF)、ゲルろ過カラム (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg)、陰イオン交換カラム (Resource Q) を用いて行った。詳細は、文献に従った⁵⁵。最終収量は 50 mg/L culture であった。

第3節 SPR 解析による TRAF6–RANK 結合阻害の評価

実験は 25 °C において、流速 20 μ L/min の HBS–EP 緩衝液 (GE healthcare 社) 下で行った。ビオチン化した RANK ペプチドを BIAcore (GE healthcare 社) の SA センサーチップに固定化した。評価化合物共存下で、2.5 μ g/mL の TRAF6 を RANK ペプチドが固定化されたフローセルおよび何も固定化されていないフローセルにインジェクトし、化合物非存在下におけるレスポンスに対する減少割合を TRAF6–RANK 結合阻害の評価指標とした。複数の化合物濃度条件下で測定を行ってレスポンスの減少割合を算出し、フィッティングカーブから 50% のレスポンス減少が得られた濃度 (half maximal (50%) inhibitory concentration; IC₅₀) を算出した。

第4節 破骨細胞分化阻害の評価

初代マウス骨髄単球 (primary mouse bone marrow-derived monocyte; BMM) を 6 から 10 週齢のマウス (BALB/c, Male) の大腿骨から採取した。BMM 細胞を 10% 活性炭素で処理したウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) を含む alpha-MEM に懸濁させ、96 ウェル培養用プレートにウェルあたり 6×10^5 個となるように細胞を播種した。培養の開始段階で、細胞を 30 ng/mL RANKL、10 ng/mL M-CSF および複数濃度の評価化合物で処理した。7 日間培養後、BMM 細胞の破骨細胞への分化については、破骨細胞に特異的に発現する酵素である酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP; tartrate-resistant acid phosphatase) の活性を *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) を基質として反応させることにより測定した。具体的には、培養液を除いた後、10 mM *p*NPP、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 5.8)、0.15 M KCl、0.1% (v/v) Triton X-100、10 mM 酒石酸ナトリウム、1 mM アスコルビン酸および 0.1 mM FeCl₃ を含む 100 μ L の基質溶液を各ウェルに添加した。37 °C で 30 分インキュベーションした後、100 μ L の 0.3 M NaOH を添加し、脱リン酸化された *p*NPP の吸光波長である 405 nm の吸光度を測定した⁵⁶。一方、細胞の生存率は、細胞の酸化還元状態を蛍光で観測する AlamarBlue (Life technologies Japan) を用いて評価した。具体的には、10 μ L の AlamarBlue 溶液を 7 日間培養後の 100 μ L の培養液に添加した。5.0% CO₂ インキュベータにて 37 °C で 7 時間インキュベーションした後、AlamarBlue の蛍光を測定

し (Ex: 560 nm、Em: 590 nm)、細胞内の還元状態を評価した。

第5節 Ubiquitin-YUH1(C90S)相互作用の ITC 測定と PS 解析のための NMR 測定

第1項 Ubiquitin-YUH1(C90S)相互作用の ITC 測定

Ubiquitin と YUH1(C90S) の結合定数を決定するために等温滴定型カロリメトリー (isothermal titration calorimetry; ITC) 実験を行った。ITC 実験には MicroCal VP-ITC calorimeter を用い、実験は 30 °C にて行った。データ解析には ORIGIN 5.0 を用いた。

ITC 実験用のサンプル調製のために、ubiquitin と YUH1 をそれぞれ別の透析膜 (MWCO 2,500) に入れ、1 L の同じ透析外液 (50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2)、50 mM NaCl) 中にて 24 時間の透析を行った。TEMPOL 存在下における ITC 実験を行う際は 500 mL の透析外液に 40 mM となるように TEMPOL を添加し、透析を行った。Ubiquitin および YUH1(C90S) の濃度はそれぞれ 5 μ M および 10 μ M とした。熱量の測定にあたっては、ubiquitin に対して YUH1(C90S) を滴定した。それぞれの滴定の間隔を 210 s とし、10 μ L ずつ全 29 回の滴定を行った。コントロール実験として、上記と同様のパラメータにて透析外液に対して ubiquitin を滴定した。実験によって得られた結合熱からコントロール実験により得られた希釈熱を差し引きシグモイド曲線にてフィッティングをかけた。得られた曲線から ubiquitin と YUH1 の結合定数等の熱力学的パラメータを算出した。

第2項 ^{13}C シグナル帰属のための測定

NMR 測定には Bruker Avance 800 (cryo TCI probe) もしくは Avance 600 (cryo TXI probe) を用いた。特別な記載のない限り、測定は 30 °C にて行った。主鎖アミド基を観測する NMR 実験においては、50 mM NaCl を含むリン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 6.0) を、その他の NMR 実験においては、リン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.2) を用いた。pH 6.0 と pH 7.2 において、 ^{13}C の化学シフトはほぼ同等であった。

Free ubiquitin に関する NMR 実験

脂肪族側鎖帰属のために行った、 ^1H – ^{15}N heteronuclear single quantum coherence (HSQC)、 ^1H – ^{13}C constant time (CT) HSQC および (H)C(CO)NH⁵⁷ スペクトルの測定には 1.5 mM の均一 ^{13}C , ^{15}N 標識した ubiquitin を用いた。 ^{13}C – ^{13}C total correlation spectroscopy (TOCSY) スペクトル⁵⁸は 1.5 mM の均一 ^{13}C 標識した ubiquitin を用いて測定した。芳香族側鎖帰属のために行った、 ^1H – ^{13}C CT HSQC および ^{13}C -edited NOESY–HSQC スペクトルの測定には、1.7 mM の均一 ^{13}C , ^{15}N 標識した ubiquitin を用いた。スペクトル中心およびスペクトル幅は、 ^{15}N については 117.5 ppm および 33 ppm、 ^1H については 4.7 ppm および 16 ppm とした。脂肪族 ^{13}C 核のスペクトル中心およびスペクトル幅は、 ^1H – ^{13}C CT HSQC においては 38 ppm および 33 ppm、(H)C(CO)NH においては 38 ppm および 66 ppm、 ^{13}C – ^{13}C TOCSY においては 38.5 ppm および 69 ppm とした。芳香族 ^{13}C 核のスペクトル中心およびスペクトル幅は、126 ppm および 11 ppm とした。ポイント数および積算回数は、 ^1H – ^{15}N HSQC においては 128 (^{15}N) \times 1024 (^1H) および 8 回、脂肪族の ^1H – ^{13}C CT HSQC においては 384 (^{13}C) \times 1024 (^1H) および 8 回、(H)C(CO)NH においては 64 (^{13}C) \times 24 (^{15}N) \times 512 (^1H) および 16 回、 ^{13}C – ^{13}C TOCSY については 128 (^{13}C) \times 1024 (^{13}C) および 48 回、芳香族の ^1H – ^{13}C CT HSQC においては 99 (^{13}C) \times 1024 (^1H) および 8 回、 ^{13}C -edited NOESY–HSQC においては 128 (^{13}C) \times 16 (^{15}N) \times 1024 (^1H) および 16 回とした。(H)C(CO)NH、 ^{13}C – ^{13}C TOCSY および ^{13}C -edited NOESY–HSQC のミキシング時間はそれぞれ、20 ms、16 ms および 150 ms とした。 ^{13}C – ^{13}C TOCSY の自由誘導減衰 (FID; free induction decay) に対しては 2048 ポイントまで zell-fill を行った結果、最終的なデジタル分解能は、直接観測軸について 6.78 Hz (0.034 ppm) となった。 ^{13}C – ^{13}C TOCSY の測定時間は 4.5 時間であった。

水分子の水素核との NOE を観測するために、1.7 mM の均一 ^{13}C 標識した ubiquitin を用いて、 ^{13}C -edited NOESY–HSQC を測定した。ポイント数および積算回数は 128 (^{13}C) \times 16 (^{15}N) \times 1024 (^1H) および 16 回とした。ミキシング時間は、150 ms とした。

Ubiquitin-YUH1 複合体に関する NMR 実験

特に記載が無い限り、各測定は 1.5 mM の ubiquitin と 1.8 mM の YUH1 を用いて行った。脂肪族側鎖帰属のための、 ^1H - ^{15}N HSQC、transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY)-HNCA⁵⁹ および TROSY-HN(CO)CACB⁶⁰ スペクトルは均一 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識 ubiquitin と YUH1 複合体を用いて測定した。 $(\text{H})\text{C}(\text{CO})\text{NH}$ スペクトルは均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 ubiquitin と YUH1 複合体を用いて測定した。 ^{13}C - ^{13}C TOCSY スペクトルは均一 ^{13}C 標識 ubiquitin と YUH1 複合体を用いて測定した。芳香族側鎖帰属のための、 ^1H - ^{13}C CT TROSY および ^{13}C -edited NOESY-HSQC (2D) スペクトルはそれぞれ、均一 ^{13}C 標識 ubiquitin と YUH1 複合体および 2 mM 50% ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識 ubiquitin と 2.4 mM YUH1 複合体を用いて測定した。スペクトル中心およびスペクトル幅は、 ^{15}N については 117 ppm および 34 ppm、 ^1H については 4.7 ppm および 16 ppm とした。脂肪族 ^{13}C 核のスペクトル中心およびスペクトル幅は、 $(\text{H})\text{C}(\text{CO})\text{NH}$ においては 39 ppm および 66 ppm、TROSY-HN(CO)CACB においては 38 ppm および 60 ppm、 ^{13}C - ^{13}C TOCSY においては 38.5 ppm および 69 ppm とした。芳香族 ^{13}C 核のスペクトル中心およびスペクトル幅は、126 ppm および 22 ppm とした。ポイント数および積算回数は、 ^1H - ^{15}N HSQC においては $128 (^{15}\text{N}) \times 1024 (^1\text{H})$ および 8 回、TROSY-HNCA においては $32 (^{13}\text{C}) \times 24 (^{15}\text{N}) \times 512 (^1\text{H})$ および 32 回、TROSY-HN(CO)CACB においては $64 (^{13}\text{C}) \times 24 (^{15}\text{N}) \times 512 (^1\text{H})$ および 32 回、 $(\text{H})\text{C}(\text{CO})\text{NH}$ においては $48 (^{13}\text{C}) \times 24 (^{15}\text{N}) \times 512 (^1\text{H})$ および 48 回、 ^{13}C - ^{13}C TOCSY については $64 (^{13}\text{C}) \times 1024 (^{13}\text{C})$ および 320 回、 ^1H - ^{13}C CT TROSY については $111 (^{13}\text{C}) \times 1024 (^1\text{H})$ および 24 回、 ^{13}C -edited NOESY-HSQC (2D) については $64 (^1\text{H}) \times 1024 (^1\text{H})$ および 128 回とした。 $(\text{H})\text{C}(\text{CO})\text{NH}$ 、 ^{13}C - ^{13}C TOCSY および ^{13}C -edited NOESY-HSQC (2D) のミキシング時間はそれぞれ、20 ms、16 ms および 120 ms とした。 ^{13}C - ^{13}C TOCSY の FID に対しては 2048 ポイントまで zell-fill を行った結果、最終的なデジタル分解能は、直接観測軸について 6.78 Hz (0.034 ppm) となった。 ^{13}C - ^{13}C TOCSY の測定時間は 18 時間であった。

第3項 TEMPOL による PS 値の測定

PS 値の測定は、YUH1 非存在下および存在下における均一 ^{13}C 標識 ubiquitin の ^{13}C – ^{13}C TOCSY を解析することによって行った。TEMPOL (Sigma–Aldrich 社) は終濃度 40 mM となるように 1 M ストック溶液 (D_2O) からサンプルに加えた。TEMPOL 存在下におけるシグナルの帰属は、TEMPOL 非存在下におけるシグナルからの TEMPOL 添加に伴う化学シフト変化を追跡することにより行った。TEMPOL 存在下における化学シフトと非存在下における化学シフトの差を測定し PS 値とした。コントロール実験として、50 mM のアスコルビン酸を添加し TEMPOL を還元した後に ^{13}C – ^{13}C TOCSY を測定した。サンプル条件や NMR 測定条件は、第2項で述べた ^{13}C – ^{13}C TOCSY 測定と同一である。化学シフト値は、分解能の高い ^{13}C – ^{13}C TOCSY の直接観測軸の値を採用した。TOCSY においては、一つの炭素核の化学シフト値は複数のピークにおいて測定される。例えばロイシンの場合、 $\text{C}_{\delta 1}$ の化学シフト値は $\text{C}_{\delta 1}$ – C_α 、 $\text{C}_{\delta 1}$ – C_β 、 $\text{C}_{\delta 1}$ – C_γ および $\text{C}_{\delta 1}$ – $\text{C}_{\delta 2}$ の 4 ピークから得ることができる。このようなケースにおいては、帰属できたピークすべての平均値を用いた。

^{13}C – ^{13}C TOCSY を PS 解析に用いる利点として、

1. ^{13}C の化学シフトを直接観測軸において得ることができるため、測定時間を増加させることなく正確な化学シフトを得ることができる。
2. 一つの ^{13}C 原子に由来するピークが複数個出現するため、縮重のないシグナルを選んで解析を行うことができる。
3. 常磁性物質による横緩和促進効果を顕著に受ける ^1H を介した磁化移動経路が存在しないため、線幅増大に伴うシグナルの消失や縮重が起こりにくい。

が挙げられる。しかし、 ^{13}C – ^{13}C TOCSY の直接観測軸においては ^{13}C – ^{13}C カップリングによるシグナルの分裂を避けることができないという欠点が存在する。芳香族領域における ^{13}C – ^{13}C TOCSY を測定したところ、130 ppm 付近にカップリングにより分裂したシグナルが集中しシグナルを分離して観測することができなかった。そこで芳香族領域に関しては ubiquitin については ^1H – ^{13}C CT HSQC スペクトルを、ubiquitin–YUH1 複合体については ^1H – ^{13}C CT TROSY ス

ペクトル用いて PS を測定することとした。

第 6 節 TRAF6–TRI1 結合界面の PS 解析

第 1 項 Y473 シグナルの帰属

^1H – ^{13}C 相関 NMR スペクトルにおいて、Pro site (TNFRSF に共通して存在するプロリン残基が結合する TRAF6 表面のサイト、Figure 3 も参照のこと) に存在する Y473 由来シグナルを帰属するために野生型 TRAF6 および Y473F TRAF6 の芳香族領域における ^1H – ^{13}C CT TROSY を測定した。Y473F TRAF6 の ^1H – ^{13}C CT TROSY において消失したシグナルを Y473 由来シグナルと帰属した。 C_β と C_γ シグナルの化学シフト領域は異なることから、これら 2 シグナルは容易に判別することができる。 ^1H – ^{13}C CT TROSY の測定条件は、以下のとおり。

サンプル：25 μM ^{13}C , ^{15}N 標識 TRAF6、測定に用いた装置：Avance 700 (cryo TCI probe)、ポイント数：128 (^{13}C) x 1024 (^1H)、積算：256、スペクトル中心：125 ppm (^{13}C), 4.75 ppm (^1H)、スペクトル幅：30 ppm (^{13}C), 14 ppm (^1H)。

第 2 項 PS 解析のための NMR 測定

PS 値の測定は、TRI1 非存在下および存在下における均一 ^{13}C 標識 TRAF6 の ^1H – ^{13}C CT TROSY を測定・解析することによって行った。TEMPOL は終濃度 40 mM となるように 1 M ストック溶液 (D_2O) からサンプルに加えた。サンプル条件や NMR 測定条件は、第 1 項で述べた ^1H – ^{13}C CT TROSY 測定と同一である。PS 値は、TEMPOL 添加に伴う Y473 由来シグナルの ^{13}C 化学シフト差によって計算した。

第 7 節 SASA の計算

溶媒露出面積 (solvent accessible surface area; SASA) の算出には MOLMOL⁶¹ におけるアルゴリズムを用いた。プローブ半径は 1.4 Å とした。Ubiquitin 単独状態の結晶構造 (PDB code 1UBI) および UBA–YUH1 複合体の結晶構造 (PDB code 1CMX) を計算に用いた。YUH1 結合に伴う

SASA 変化量 (Δ SASA) の算出は UBA–YUH1 複合体の構造において、YUH1 非存在下における SASA から YUH1 存在下における SASA を差し引くことにより行った。

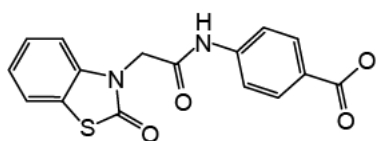
第 8 節 TRAF6 と TRI1 のドッキング計算

TRAF6 と TRI1 の相互作用様式を以下の手順で予測した。TRAF6 の構造は TRAF6–RANK ペプチド複合体結晶構造 (PDB code 1LB5) から RANK を削除し、pH 7.0 でのイオン化状態を予測し水素を付加した後、水素位置を最適化した (一連の構造作成は Maestro におけるタンパク質座標作成ウィザード、Protein preparation wizard で行った)。TRI1 は、Maestro 上で構造作図したものを三次元化し、pH 7.0 におけるイオン化状態を EPIC で予測し水素付加を行った後、量子化学計算ソフトウェア Jaguar で構造最適化した (DFT 法、基底関数は HF/6-31G*を使用)。TRAF6 と TRI1 のドッキング計算には Maestro の Induced fit wizard を用いた。本 wizard においては、RANK ペプチドの各原子から 5 Å の距離に存在するアミノ酸残基に自由度を与えた。XP モードのドッキングスコアを計算し、トップスコア構造モデルを選択した。

第 9 節 化合物合成と構造確認

化合物構造確認のための NMR 測定は、Bruker Avance 400 (TXI probe) もしくは 700 MHz (cryo TCI probe) を用いた。測定は 25 °C の DMSO-d₆ 中で行い、¹H 化学シフトは内部標準である tetramethylsilane (TMS) のメチル水素シグナルを 0 ppm として算出した。化合物濃度は 1 mM とした。データは以下の形式で報告する : chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, dd= double doublet, br = broad), coupling constant (Hz), integration。高分解のマスペクトルは、Waters Q-TOF LCT Premier XE system を用いて行った。本装置のイオン化法は、electrospray ionization 法である。Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) で解析したところ、すべての化合物はほぼ 100%の純度を有していることが確認された。本解析における HPLC 部分は Waters Acquity system を用い、PDA および ELS による検出を行った。LC–MS 測定のパラメータは以下のとおりである : Acquity UPLC BEH C8 column, 1.7 μm, 50 × 2.1

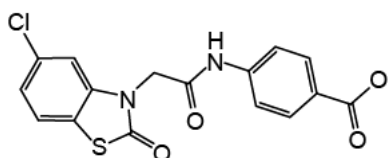
mm, 1.9 min gradient, 1% (0.1% formic acid/MeCN) / 99% (0.1% formic acid/ H₂O) to 100% (0.1% formic acid/MeCN). 化合物の精製は Shimadzu HPLC system を用いて行った (CAPCELL PAK-C18 ACR, 50 × 20 mm; Mobile phase: A = water containing 0.1% AcOH, B = MeCN containing 0.1% AcOH, gradient: 0–7 min, linear 0–100% of B, 7–9.2 min, isocratic 100% of B, 9.2–10 min, isocratic 1% of B)。



TRI1: 4-[2-(2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-3-yl)acetamido]benzoic acid

本化合物はナミキ商事株式会社から購入した。

¹H NMR (700 MHz, DMSO-d₆): 12.80 (brs, 1H), 10.77 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.36 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 4.88 (s, 2H); LC–MS: 1.05 min, HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd. for C₁₆H₁₂N₂O₄S, 329.0596; found 329.0594.

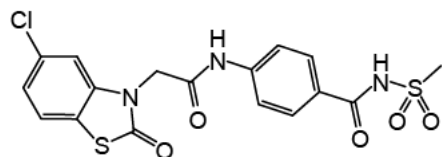


TRI2: 4-[2-(5-chloro-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-3-yl)acetamido]benzoic acid

前 駆 体 と し て 、 tert-butyl 4-[2-(5-chloro-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-3-yl)acetamido]benzoate を以下の手順で合成した。CH₂Cl₂ (6 mL) に溶かした 2-(5-chloro-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-3-yl)acetic acid (80 mg, 0.328 mmol)、tert-butyl 4-aminobenzoate (63.4 mg, 0.328 mmol) および O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) (125 mg, 0.328 mmol) の混合物に、N,N-diisopropylethylamine (114 μL, 0.656 mmol) を添加し、

室温にて終夜攪拌した。反応物を真空中で乾燥させた後、EtOAcに溶解させた。続いて、10%のクエン酸、純水、飽和 NaHCO₃、および飽和食塩水で洗浄した。得られた溶液は無水 Na₂SO₄ 存在下で乾燥させた。得られた粉体に hexane–EtOAc (2 : 1) に溶解させ、不溶成分を濾取して真空中で乾燥させ、白色の固体を得た (77 mg, 54%)。氷冷した CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解させた tert-butyl 4-[2-(5-chloro-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-3-yl)acetamido]benzoate (75 mg, 0.179 mmol) 溶液に、TFA (570 µL, 7.4 mmol) を加え、2 時間室温にて攪拌した。反応物を真空中で乾燥させた後、diethyl ether を加えた。不溶成分を濾取して真空中で乾燥させ、白色の固体を得た (60 mg, 92%)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 12.75 (br s, 1H), 10.77 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H); LC–MS: 1.15 min, HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd. for C₁₆H₁₁ClN₂O₄S, 363.0206; found 363.0208.



TRI3:

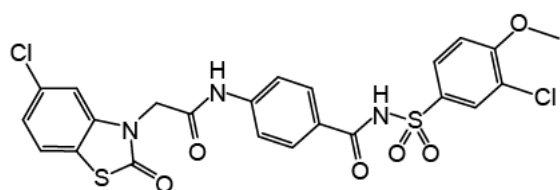
4-(2-(5-Chloro-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-3-yl)acetamido)-N-(methanesulfonyl)benzamide

CH₂Cl₂ (4mL) に溶解させた TRI2 (150 mg, 0.413 mmol)、methanesulfonamide (196 mg, 2.07 mmol) および HATU (157 mg, 0.328 mmol) の混合物に、N,N-diisopropylethylamine (144 µL, 0.826 mmol) を添加し、室温にて終夜攪拌した。反応物を CH₂Cl₂ (30 mL) に溶解させ、純水 (10 mL) および飽和食塩水 (10 mL) で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ 存在下で乾燥させた。不溶成分をフィルター除去した後、真空中で乾燥させた。得られた粉体は HPLC (H₂O/MeCN/CH₃COOH) により精製し、目的とする化合物画分を真空中で乾燥させ、白色の固

体を得た (42.3 mg, 23%)。

^1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6): 12.02 (br, 1H), 10.63 (br, 1H), 7.90 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 4.88 (s, 2H), 3.02 (br, 3H).

LC-MS: 1.15 min, HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}_2$, 440.0141; found 440.0140.



TRI4:

4-(2-(5-Chloro-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-3-yl)acetamido)-N-(3-chloro-4-methoxyphenyl)sulfonylbenzamide

CH_2Cl_2 (3 mL) に溶解させた TRI2 (30 mg, 0.083 mmol)、3-chloro-4-methoxybenzene-1-sulfonamide (27.5 mg, 0.124 mmol) および HATU (31.4 mg, 0.083 mmol) の混合物に、 N,N -diisopropylethylamine (29 μL , 0.165 mmol) を加え、室温にて終夜攪拌した。反応物は CH_2Cl_2 (20 mL) に溶解させ、純水 (7 mL) および飽和食塩水 (7 mL) で洗浄した後、無水 Na_2SO_4 存在下で乾燥させた。不溶成分をフィルター除去した後、真空中で乾燥させた。得られた粉体は HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{CH}_3\text{COOH}$) により精製し、目的とする化合物画分を真空中で乾燥させ、白色の固体を得た (12.9 mg, 28%)。

^1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6): 12.41 (br, 1H), 10.63 (br, 1H), 7.88 (br, 1H), 7.84 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.82 (br, 1H), 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.57 (br, 2H), 7.28 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.24 (br, 1H), 4.87 (s, 2H), 3.91 (s, 3H).

LC-MS: 1.40 min, HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$, 566.0014; found 566.0014.

第 10 節 TRAF6 に関する NMR 測定

精製された TRAF6 に対し、終濃度 5 mM となるように重水素化 DTT (DTT-d10) を、周波数ロック用に 10%となるように D₂O を添加し、NMR 測定用サンプルとした。100% D₂O 条件下で測定する NMR 実験に用いるサンプル調製の際は、アミコンウルトラ MWCO 10,000 を用いて、重水素化 NMR 緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2) , 100 mM NaCl, 5 mM DTT-d10, 100% D₂O) に置換した。滴定実験においては、10 mM の RANK ペプチドストック溶液 (D₂O) もしくは、10 mM もしくは 100 mM の化合物ストック溶液 (DMSO-d₆) から、適切な終濃度となるようにサンプル添加を行った。NMR 測定には Bruker Avance 800 (cryo TCI probe)、Avance 700 (cryo TCI probe)、もしくは Avance 600 (cryo TCI probe) を用いた。特別な記載のない限り、測定は 25 °C にて行った。各核種のスペクトル中心およびスペクトル幅は以下のとおりである; ¹³C : 54 ppm および 34 ppm、¹⁵N : 118 ppm および 36 ppm、¹H : 4.7 ppm および 16 ppm。データ解析は Sparky⁶² および TOPSPIN (Bruker 社) を用いて行った。

RANK 非結合状態および結合状態の TRAF6 の主鎖アミドシグナルの帰属は、HNCA スペクトルを用いて行った。HNCA の測定には、均一 ¹³C,¹⁵N 標識された TRAF6 を、非結合状態においては 160 μM、RANK ペプチド (1 mM) 結合状態では 500 μM の濃度で用いた。HNCA を用いた解析の結果、非結合状態および RANK 結合状態においてそれぞれ、Pro 残基を除く帰属可能な残基のうち 72%および 74%の主鎖アミドシグナルの帰属を完了した。化合物を用いた滴定実験において、消失したシグナルを除くほとんどのシグナルについて、化合物濃度増加に伴いシグナル位置が変化したことから、TRAF6 と化合物の結合解離は NMR の時間スケールにおいて、中程度から速い速度の交換状態にあると考えられる。そこで、化合物の解離定数 (K_D) は、化合物濃度を変えた複数の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定し、標準化したシグナル移動度の化合物濃度依存性に基づいて決定した^{63, 64}。具体的には以下の通り。

シグナル移動度の標準化は、式 $\Delta\delta = ([0.2 \times \Delta\delta_N]^2 + \Delta\delta_H^2)^{1/2}$ を用いて行った。なお、 $\Delta\delta_N$ は ¹⁵N 方向の、 $\Delta\delta_H$ は ¹H 方向の化学シフト変化量を表す。得られたプロットは、一般的に使用されている以下の式によって、 $\Delta\delta_{\max}$ と K_D を変数としてフィッティングを行った⁶⁴。

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\max}\{([P]_t + [L]_t + K_D) - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_D)^2 - 4[P]_t[L]_t}\} / 2[P]_t$$

なお、 $\Delta\delta_{\max}$ はすべての TRAF6 が化合物結合状態の場合の標準化されたシグナル移動度、 $[P]_t$ は系中の全 TRAF6 濃度、 $[L]_t$ は系中の全化合物濃度である。

R431、L432、M450、D451、E455 および F471 のシグナルを解析対象とし (TRI4 の K_D 解析においては、TRI4 添加によるシグナル消失のため M450 を評価対象残基から除外した)、平均値を最終的な K_D とした。エラーバーは、それらの標準偏差に基づいて付与した。

RANK ペプチドによる TRI1 の TRAF6 表面からの追い出しは、20 μ M TRI1 と 20 μ M 均一 2 H 標識 TRAF6 のサンプルに 50 μ M RANK ペプチドを添加することにより評価した。TRI4 による RANK ペプチドの TRAF6 表面からの追い出しは、100 μ M RANK ペプチドと 20 μ M 均一 2 H 標識 TRAF6 のサンプルに 200 μ M TRI4 を添加することにより評価した。

TRI4 に対する野生型および変異型 (R392A、V474A および E498A) TRAF6 の結合親和性を見積もる実験においては、75 μ M TRI4 に対し 5 μ M の各 TRAF6 を添加し、遊離の TRI4 のシグナルからの移動度を比較した。TRI4 シグナルの移動度が大きいほど結合親和性が高いと判断した。

INPHARMA 実験においては、200 μ M RANK ペプチド、200 μ M TRI4、および 17 μ M 非標識 TRAF6 サンプルについて NOESY スペクトルを測定した。コントロール実験として、非標識 TRAF6 の代わりに、均一 2 H 標識 TRAF6 を用いた同様の実験を行った。NOESY スペクトルにおけるミキシング時間は 800 ms とした。測定温度は、磁化移動効率を高めるため、10 $^{\circ}$ C とした。

DIRECTION 実験においては、以前報告されたパルス系列を用い、150 μ M TRI4 と 16 μ M TRAF6 の混合サンプルについて TRAF6 の磁化飽和有無の 2 条件において反転回復法の測定を行った³⁵。緩和のための待ち時間は、0.1、0.2、0.4、0.6 s の 4 条件とした。TRAF6 の磁化飽和を行う場合は、飽和のための電磁波の中心周波数を 0 ppm、磁化飽和を行わない場合は周波数を -30 ppm とした。飽和時間は 2 s とした。磁化が平衡状態に戻るまでの待ち時間は 6 s とした。TRI4 の各水素核のシグナル強度を緩和のための待ち時間に対してプロットし、理論式³⁵によるフィッティングを行った。フィッティングにより得られた TRAF6 の縦緩和速度について、TRAF6 の磁化飽和有無における差を計算した。

第 1 1 節 DIRECTION データに基づいたドッキングおよび分子動力学計算

TRAF6 構造 (PDB code 1LB5) に対して Protein preparation wizard (シュレーディンガー株式会社) を適用し、水素原子の発生と位置の最適化を行った。TRI4 については、Maestro を使用して構造を描画し、安定コンフォメーションを探索した後、量子化学計算プログラムである Jaguar (基底関数は HF/6-31G* を使用) を用いて 3 次元構造の最適化を行った。TRAF6 と TRI4 のドッキング計算には Maestro の Induced fit wizard を用いた。本 wizard においては、RANK ペプチドの各原子から 5 Å の距離に存在するアミノ酸残基に自由度を与えた。SP モードのドッキングスコアを計算し、トップスコア構造モデルを選択した。本構造に対し、sievgene/myPresto⁶⁵ を用い、再度 TRAF6 に対する TRI4 のドッキング計算を行い、スコア上位 3 構造を選択した。タンパク質原子の電荷として、AMBER parm99 の原子電荷を用いた。sievgene プログラムにより TRI4 について 100 コンフォマーを発生させた。TRAF6 の構造は初期構造に固定した。TRAF6 と TRI4 の相互作用エネルギー計算には $60 \times 60 \times 60$ のポテンシャル格子を使用した。しかし得られた 3 構造モデルは NMR 実験データ (INPHARMA および DIRECTION) と合致しなかった。

続いて cosgene/myPresto⁴⁹ を用いて室温の生理食塩水中で 2 ns の分子動力学 (molecular dynamics; MD) 計算を行った。2 ns 経過後の複合体構造を元に、sievgeneNMR/myPresto^{34, 35} を用いて実測の DIRECTION データに合致する安定構造を探索した。具体的には、通常的自由エネルギーに基づくスコア計算に加え、複合体構造モデルにおける化合物の各水素核とタンパク質の水素核との距離の 6 乗の逆数の和 ($\sum 1/r^6$) と実際に得られた DIRECTION データの相関度もスコア算定に組み込んだ上で、ドッキング計算を行った³⁴。3 種類の初期構造についてそれぞれ sievgeneNMR/myPresto を用いた計算のスコア上位 2 種類の構造 (合計 6 種類) を抽出し、スコアが最も高く INPHARMA データと合致する構造を最終構造として選択した。本計算の詳細パラメータは以下の通りである。TRAF6 の原子の力場と電荷は AMBER parm99 により設定した⁶⁶。TRI4 の原子の電荷は Gaussian98^{67, 68} (基底関数として HF/6-31G*)、restricted electrostatic potential (RESP) 法により規定した。MD 計算は、TIP3P の水分子で覆った (CAP water) 球の中で行った⁶⁹。系の総電荷をゼロとするために、0.1% の Na⁺ および Cl⁻ イオンを系に追加した。

CAP water の球の中心は、TRAF6 の重心に設定した。球のサイズは TRAF6 の原子から最大 10 Å とした。静電相互作用の計算には、Fast multipole 法を使用した⁷⁰。ファンデルワールス相互作用距離のカットオフ値は 12 Å とした。始めに、溶媒（水およびカウンターイオン）の挙動を平衡化するため、TRAF6 および TRI4 を固定し、溶媒に対して 1,000 ps の MD 計算を行った。続いて水素原子について SHAKE 法を適用し、100 K、200 K および 300 K の順番に温度を変化させながら 2 fs ごとに系全体に対する 2 ns の MD 計算を行った⁷¹。

TRAF6-TRI4 複合体構造の安定性を確かめるために、最終的に選択したモデルに対して 4 ns の MD 計算を行い、40 ps ごとに合計 100 構造を抽出した。本 MD 計算には cosgene/myPresto を用いた。計算パラメータは、上述の MD 計算と同様である。

第 1 2 節 TRAF ファミリータンパク質に対する TRI4 のドッキング計算

ドッキング計算には Glide XP を用いた。ドッキング計算の鋳型となる TRAF2、TRAF3、TRAF5 および TRAF6 (以後 TRAF2/3/5/6) の 3 次元構造はリガンド非結合状態の結晶構造 (TRAF2, PDB code 1CA4; TRAF3, PDB code 1FLK; TRAF5, PDB code 4GJH; TRAF6, PDB code 1LB5) の水素位置を全体の自由エネルギーが最小となるように Maestro で最適化した構造とした。TRI4 の構造最適化は、Maestro における EPIC を用いたイオン状態の推定および Jaguar による量子メカニズム座標計算により行った。力場は OPLS2001 を用いた。TRAF2/3/5/6-TRI4 複合体構造モデルの比較は、最もドッキングスコアの高い構造モデル間で行った。

第3章 結果

第1節 TRAF6 の TNFRSF 結合界面に結合する化合物の探索

第1章で述べたように、本研究の創薬標的となる TRAF6 の TNFRSF 結合表面は平坦である²³ため、主に従来の創薬標的である酵素や受容体を対象として構築されてきた化合物ライブラリ群からヒット化合物を見出すことは難度が高いと想定された。そこで初期化合物の探索には、より広いケミカルスペースから化合物を探索するため、多様な構造を有する多数の化合物を短期間で評価可能な *in silico* スクリーニングを活用した。評価対象化合物は、LigandBox^{52, 53}に含まれる約 100 万化合物とした。LigandBox は、主に市販化合物から構成される化合物データベースであり全世界 37 のサプライヤーが保有する多様な構造を有する化合物から構成されている。また、全原子の 3 次元座標と原子電荷の情報が含まれているため、ドッキング計算において迅速に使用可能である。*in silico* スクリーニング手法としては、内在性リガンドの鍵相互作用を阻害する化合物を見出すため、machine-learning score modification-multiple target screening (MSM-MTS) 法^{50, 51}を活用した。MTS 法は、標的タンパク質に加えて 181 の標準タンパク質に対しても *in silico* スクリーニングを行い、標的タンパク質に対するスコアが高い化合物を優先的に選抜する手法である。本手法は、標的タンパク質に対してのみドッキング計算を行う従来法に比べ、真のヒット化合物を見出す可能性がより高いことが報告されている⁵¹。また、標準タンパク質と比べて標的タンパク質に対して高いスコアを獲得する化合物をヒットとするため、標的選択性の高い化合物を選抜できることが期待される。MSM 法においては、既に標的に結合することが実験的に明らかになっている分子 (RANK ペプチド) が標的タンパク質 (TRAF6) に対して高いドッキングスコアを獲得するよう、他のタンパク質とのドッキングスコアに重み付けを行い、その重み付けを化合物評価に適用する手法である⁵⁰。MSM-MTS 法を用いて LigandBox の 100 万化合物を 20,000 化合物まで絞り込んだ後、個々のソフトウェアに依存するバイアスを避けるため Glide SP および XP (シュレーディンガー株式会社) による相互検証を行い、最終的に 2,000 化合物まで絞り込みを行った。これらヒット化合物について薬としての構造適正 (*drug-likeness*) および購入可能性の

観点から、一部類似化合物も含めて 734 化合物を選抜し、SPR 法による TRAF6-RANK 結合の阻害作用評価、およびマウス骨髄細胞の破骨細胞分化阻害作用の評価（破骨細胞分化アッセイ）を行った。その結果、両アッセイ系において $IC_{50} < 500 \mu M$ の阻害作用が観測された 4 化合物を見出した (Figure 10)。なお、破骨細胞分化アッセイにおいて細胞数は減少しなかったことから、本化合物作用は分化阻害によるものである。これらヒット 4 化合物をそれぞれ、均一 ^{15}N 標識した TRAF6 に添加し、 1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、いずれの化合物についてもスペクトルパターンの変化が観測された (Figure 11)。この結果から、これら 4 化合物は TRAF6 に対して結合することが実験的に確認された。

続いて、これら 4 化合物から、薬剤候補品として最も優れた化合物を選ぶために、化合物の性質に関するプロファイリングを行った。これら 4 化合物のうち 1 化合物は pan assay interference compounds (PAINS) ⁷² に該当したため除外した。その他 3 化合物 (TRI1、compound 2 および compound 3) については、立体構造から計算した膜透過性、溶解性、hERG 阻害活性、ナトリウムチャンネル阻害、血漿中の遊離化合物割合、およびミクロソームにおける安定性などのパラメータは同程度であり、これらのパラメータで化合物の優劣を付けることはできなかった。一方、HSQC スペクトル測定（測定時間 2 時間）前後の 1H 1D スペクトルにおける TRAF6 由来シグナルの強度を比較したところ、TRI1 はシグナル強度に影響を与えなかった一方、compound 2 および compound 3 については TRAF6 シグナル強度を、それぞれ 62% および 42% に減少させた

(Figure 12)。この結果は、これら 2 化合物が TRAF6 凝集を誘起することを強く示唆する。化合物共存下におけるタンパク質の凝集は、合成展開における活性判断を誤らせるだけでなく立体構造解析を困難にする。そこで、唯一タンパク質の安定性に影響を与えなかった化合物 (TRI1) を合成展開候補品として選択した。なお、TRI1 自身およびカルボキシル基がパラ位ではなくメタ位に結合した TRI1 類似化合物のアッセイ評価履歴を公共データベースである PubChem を用いて調査したところ、753 種のアッセイ中で活性が報告されていたのは、プロスタグランジン E2 受容体結合を評価した 1 アッセイのみであった。このデータから、TRI1 骨格には、非特異的に複数のタンパク質に結合する性質 (*promiscuity*) は無いと推定した。

第2節 TRAF6-TRI1 複合体の立体構造解析

TRI1 は、RANK 結合部位に対する *in silico* スクリーニングによって選抜されたことから、本化合物の結合部位は RANK 結合部位であると想定されたが、このことを実験的に確認するために、上述の CSP 実験結果 (Figure 11a) を詳細に解析した。一般的に、タンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおいては主に主鎖のアミド基に由来するシグナルが観測されるため、本 CSP 実験では 1 個のシグナルで 1 残基を代表させ化合物添加に伴うシグナル移動度を残基単位で評価する。はじめに、非結合状態および RANK ペプチド結合状態の TRAF6 についてそれぞれ、HSQC スペクトルにおける各シグナルの由来残基を決定する作業 (帰属) を行った。三重共鳴 (HNCA) 測定を行い、定法どおりに帰属を行った結果、プロリン残基を除く帰属可能な残基のうち、非結合状態および RANK ペプチド結合状態の TRAF6 についてそれぞれ、72%および 74%の帰属を完了した (Figure 13)。CSP 実験において、TRI1 添加に伴い化学シフト変化したシグナルには、ストランド 64 や 67 など RANK ペプチド結合部位の残基由来シグナルが含まれていることが明らかとなった (Figure 11a, Figure 14a,b)。さらに、Figure 14c に示すように、TRAF6 添加によって化学シフト変化した TRI1 のシグナル (黒→赤) が、RANK ペプチド添加によって非結合状態の TRI1 のシグナル位置に戻った (赤→青) ことから、RANK ペプチドと TRI1 は TRAF6 に対して競合することが明らかとなった。以上の結果から、TRI1 がペプチド結合部位に結合することが実験的に支持された。なお、ペプチド結合部位の裏に位置するストランド 65, 66, 68 上の残基由来のシグナルについても、TRI1 添加による化学シフト変化が観測された (Figure 14b)。これらの残基は NMR を用いた CSP 解析においては RANK ペプチドの結合によっても影響を受ける (Figure 15a-c) もの、結晶構造においては RANK 結合に伴う大きな立体構造変化は見られない (Figure 15d)。したがって、溶液中においては、ペプチド結合に伴い何らかの構造変化が起こりうる部位と推定される。また、RANK ペプチド結合部位およびその裏 (ストランド 65, 66, 68) に位置する残基由来のシグナルそれぞれについて、HSQC スペクトルにおける TRI1 滴定に伴う化学シフト変化を指標として K_D 値を計算したところ、各残基から計算した値はほぼ同一であり、その平均値は 1.9 mM であった (Table 1)。この結果から、TRI1 が 2 箇所の異なる部位に

同時に結合する可能性は低いと考える。

TRI1 が TRAF6 の RANK 結合表面に結合することが実験的に支持されたことから、SGDD のための複合体立体構造を得るために RANK 結合表面に対する TRI1 のドッキング計算を行った。本ドッキング計算においては、高精度の計算を行うために induced fit アルゴリズムを活用した。なお、TRAF6–TRI1 複合体の共結晶化を試みたが、多くの条件で非結合状態の TRAF6 結晶が析出し、複合体結晶を得ることはできなかった。ドッキング計算により得られたスコア上位 10 構造モデルを比較したところ、大きく分けて 2 種類の構造モデルが得られた (Figure 16)。一方の構造モデルは Pro site (TNFRSF に共通して存在するプロリン残基が結合する TRAF6 表面のサイト、Figure 3 も参照のこと) との相互作用を有するモデル (Figure 16、オレンジおよびマゼンタ)、もう一方のモデルは Pro site と相互作用せず RANK ペプチドに対して垂直方向に結合するモデル (Figure 16、緑) であった。どちらのモデルも CSP 実験データと大きく矛盾しないものであり、構造モデルの選択には CSP よりも高精度の構造パラメータに基づき検証する必要があると考えた。そこで、自身で開発した常磁性物質を用いた結合界面解析手法を活用し、TRI1 結合に伴う Pro site の溶媒露出度変化を解析することにより、構造モデルの絞込みを行うこととした。次節においては、本手法の開発および本手法を用いた TRAF6–TRI1 複合体の結合界面解析について述べる。

第 3 節 PS を用いた分子間結合界面決定手法の開発と TRAF6–TRI1 複合体への応用

第 1 項 PS を用いた分子間結合界面決定手法の開発

第 1 章、第 3 節、第 2 項で述べたとおり、本手法は自由拡散する常磁性物質がタンパク質表面に誘起する PS が、複合体形成に伴い、結合界面において減少することを観測する手法である (Figure 7)。これまでの知見から⁴⁷、PS は従来用いられてきた PRE と異なり、複合体形成に伴う分子量変化に影響を受けずに比較的精度よく結合界面を検出できるパラメータであると推定された。そこでまず、常磁性物質 TEMPOL によって ¹³C 核に誘起される PS を指標として非結合状態の ubiquitin の表面検出を試み、続いてその結果を YUH1 結合状態の ubiquitin において

観測される PS と比較することにより、結合界面の検出を試みた。なお、YUH1 結合に伴い ubiquitin の見かけの分子量は約 4 倍に増加する。

TEMPOL による PS を用いた ubiquitin 表面の同定

はじめに、PS がタンパク質表面を検出するパラメータとして活用可能であることを検証することを目的とし、ubiquitin の各 ^{13}C 原子に対する PS を評価した。TEMPOL (40 mM) 存在下および非存在下において、ubiquitin の ^{13}C – ^{13}C TOCSY スペクトル (脂肪族領域) および ^1H – ^{13}C CT HSQC スペクトル (芳香族領域) を測定した。TEMPOL 添加に伴いすべてのシグナルにおいて、異なる大きさの低磁場シフトが観測された (Figure 17a)。全 265 原子中、分離して観測された 194 原子について PS 値を決定した。なお、アスコルビン酸にて TEMPOL 還元後に測定した ^{13}C – ^{13}C TOCSY が、TEMPOL 添加前に測定したスペクトルと一致したことから、この低磁場シフトは TEMPOL の常磁性に由来することが明らかとなった (Figure 17b)。観測された PS 値と結晶構造 (PDB code 1UBI) から算出した SASA を原子ごとにプロットした結果、大小の傾向は概ね一致した (Figure 18)。具体的には、0.04 ppm の PS を閾値とすることにより比較的精度よく表面と内部の判定を行うことができ (Figure 19)、観測された PS 値が 0.04 ppm 以下であった 79 原子中 60 原子は立体構造においてタンパク質内部に存在し (*i.e.* SASA = 0 Å²)、0.04 ppm 以上の PS が観測された 113 原子中 102 原子はタンパク質表面に存在した (*i.e.* SASA > 0 Å²)。実際に、観測された PS の大きさに基づいて ubiquitin 中の原子を色分けすると、PS によってタンパク質内部と表面を概ね判別できることがより明確になった (Figure 20)。しかし、表面に存在することが正確に判別できたいくつかの原子について、SASA から想定されるよりも特に大きな PS が観測された原子 (I44- $\text{C}_{\gamma 1}$, $\text{C}_{\gamma 2}$, C_δ , V70- $\text{C}_{\gamma 1}$ および $\text{C}_{\gamma 2}$) や、逆に特に小さな PS が観測された原子 (K6- C_ϵ , E18- C_γ , S20- C_β , T22- C_γ および K63- C_ϵ) が存在した (Figure 18)。

一方、0.04 ppm を閾値とした区分では、表面と内部の判別を誤る原子も存在した。0.04 ppm 以上の PS が観測されたにもかかわらず、タンパク質内部に存在する原子は K6- C_α , T14- C_β , Q31- C_β , K33- C_γ , F45- C_α , I61- C_α , L67- C_α , V70- C_β , L71- C_γ および R72- C_γ であった。PS が 0.04

ppm より小さかったにもかかわらず、タンパク質表面に存在する原子は M1-C β , Q2-C β , I13-C α , C β , C γ 2, L15-C α , C δ 2, V17-C α , D21-C α , I23-C δ , K29-C δ , I30-C γ 2, K33-C α , R42-C α , C β , L43-C δ 1, S65-C β および L69-C β であった。PS と SASA の齟齬の原因は、第 4 章、第 2 節にて考察する。

TEMPOL による PS を用いた ubiquitin-YUH1 複合体結合界面の同定

TEMPOL により ^{13}C 核に誘起される PS を用いてタンパク質表面が比較的高い精度で検出できることが明らかとなったことから、続いて ubiquitin-YUH1 結合界面の検出を試みた。TEMPOL (40 mM) 存在下および非存在下において、YUH1 結合状態の ubiquitin の ^{13}C - ^{13}C TOCSY (脂肪族領域) および ^1H - ^{13}C CT TROSY (芳香族領域) を測定した。なお、ubiquitin-YUH1 の結合親和性は、40 mM TEMPOL によって影響を受けないことは ITC を用いて確認した (Figure 21)。TEMPOL 添加に伴いほぼすべてのシグナルにおいて異なる大きさの低磁場シフトが観測された (Figure 17c)。全 265 原子中 172 原子について、YUH1 存在下および非存在下の両条件にて PS 値を決定した。YUH1 存在下および非存在下における PS 値を原子ごとに比較した結果、YUH1 結合に伴い PS 値が減少する原子が存在した (Figure 22)。複合体形成に伴う PS 変化の定量的評価を行うため、YUH1 結合に伴う PS の変化量 ($\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}}$) を算出し、SASA 変化量 (ΔSASA) と比較した (Figure 23)。その結果、0.05 ppm 以上の $\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}}$ が観測された T7-C β , C γ , L8-C α , C β , C γ , C δ 1, C δ 2, T9-C γ , I36-C γ 1, C γ 2, C δ , D39 C β , I44-C γ 2, C δ , V70-C β , C γ 1, C γ 2, L71-C β , C γ , C δ 1, C δ 2, L73-C δ 1 および C δ 2 は、 ΔSASA が 3.5 \AA^2 以上の YUH1 との結合界面に存在する原子であった (Figure 24)。

$\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}}$ と ΔSASA に齟齬のある原子も存在した。複合体形成に伴う PS 変化がほとんど観測されなかった T9-C β および K11-C δ は、結晶構造において結合界面に存在していた (Figure 23)。一方、0.05 ppm 以上の顕著な $\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}}$ が観測された K6-C β , C δ および Q49-C β は、結晶構造においては結合界面外に位置していた (Figure 23)。PS と SASA の齟齬の原因は、第 4 章、第 2 節にて考察する。

上述した一部の例外を除き、結合界面外に存在するほとんどの原子においては、YUH1 結合 (約

4 倍の分子量増加) に伴う PS 値の変化は 0.035 ppm 以下であった (Figure 23)。以上の結果から、一部の例外はあるものの、TEMPOL の誘起する PS を用いて比較的高い精度で、複合体形成に伴う溶媒露出度の変化に基づいて結合界面を検出できることが明らかになったため、本手法を TRAF6–TRI1 複合体界面の解析に応用することとした。

第 2 項 PS を用いた結合界面決定手法の TRAF6–TRI1 複合体への応用

第 2 節で述べたように、TRAF6–TRI1 複合体については大きく分けて 2 種類の構造モデルが得られた。この 2 種類の構造モデルのうち一方のみにおいて、Pro site が TRI1 との結合に関与する (Figure 16、オレンジおよびマゼンタ)。そこで、Pro site を形成する残基のうち Y473 に着目し、TRI1 添加に伴う溶媒露出度変化について PS を指標として解析し、TRI1 結合への関与を評価することとした。

Y473 の芳香族側鎖 C₈および C_εを観測対象とし、40 mM TEMPOL 非存在下および存在下における 50 μM ¹³C 標識 TRAF6 の ¹H–¹³C CT TROSY スペクトルを測定した。TRI1 非存在下における PS を計算したところ、C₈および C_εについてそれぞれ、0.10 ppm および 0.07 ppm であった (Figure 25)。続いて、5 mM の TRI1 存在下において同様の測定を行った。なお、TRAF6 に対する TRI1 の K_D 値 (1.9 mM) から計算すると、本サンプル濃度条件においては、96%以上の TRAF6 が TRI1 結合状態として存在する。TRI1 存在下では Y473–C₈および C_εにおける PS はほとんど観測されなかった (Figure 25)。以上の結果から、TRAF6 の Pro site を形成する Y473 側鎖は、TRI1 添加によって溶媒露出度が減少することが示された。なお、TEMPOL 添加に伴い ¹H 軸方向に共通して観測されるシグナルの低磁場シフトは、常磁性物質として酸素分子を用いた研究で示されているように ⁷³、ロックシグナルに対する TEMPOL の PS に起因するものと考えられる。

上記結果から、TRAF6–TRI1 構造モデルのうち Pro site が TRI1 との結合に関与するモデル (Figure 16、マゼンタおよびオレンジ) が確からしいと考え、これらのうち最安定構造モデルを選択した (Figure 16、マゼンタ)。なお、Pro site が TRI1 との結合に関与しない全ての構造モ

デル (Figure 16、緑) において Pro site は溶媒に露出しており、TRI1 結合に伴う構造変化により Pro site が溶媒から遮蔽された可能性は極めて低いと考えられた。選択した最安定構造モデルにおいては、TRI1 のベンゾチアゾロン環 (以後 ring-1) と Pro site の間のファンデルワールス相互作用に加え、ring-1 とベンゼン環 (以後 ring-2) をつなぐリンカー部が TRAF6 の G470 のカルボニル基と、末端のカルボン酸は R392 のグアニジル基と水素結合を形成する (Figure 26a、b)。G470 および R392 は、RANK ペプチドと鍵相互作用を形成する残基である。

本構造モデルに RANK ペプチドを重ね合わせたところ、TRI1 のカルボキシル基より先に合成展開の余地があると考えられた (Figure 26c)。そこで、このカルボキシル基の延伸を基本方針として TRI1 からの化合物合成展開を行った。

第4節 複合体構造モデルに基づいた化合物合成展開と TRI4 創製

はじめに、TRI1 の ring-1 (ベンゾチアゾロン環) の構造最適化を行った結果、5 位の位置に塩素基を導入することにより化合物の結合親和性が向上することが明らかとなった (TRI2; Figure 27)。そこで TRI2 を骨格として、カルボキシル基から構造を延伸する合成展開を行った。カルボキシル基の延伸においては、200 個程度の周辺化合物を合成しその結合親和性を評価した。その結果、TRI2 のカルボキシル基をメチルスルホンアミド基 (TRI3) もしくは (3-クロロ-4-メトキシフェニル) スルホンルベンザミド基 (TRI4) で修飾すると、結合親和性が大きく向上した。特に、TRI4 については類似化合物の中で最大の結合親和性を有し、RANK ペプチド ($K_D = 78 \mu\text{M}$) を上回る $35 \mu\text{M}$ の結合親和性を有することが明らかとなった。TRI4 が TRAF6-TNFRSF 相互作用の阻害作用を有することを確認するため、TRI4 による TRAF6 表面からの RANK ペプチド追い出し実験を行った。その結果、TRAF6 添加により広幅化した RANK ペプチド由来シグナルは、TRI4 添加によって遊離の RANK ペプチドシグナルに戻る傾向が観測された (Figure 28)。この結果は、TRI4 により RANK ペプチドが TRAF6 表面から追い出されることを示しており、本化合物は内在性 PPI の阻害作用を有することを意味する。さらに、破骨細胞分化阻害活性を評価したところ、細胞死を誘起しなかった最高濃度である $150 \mu\text{M}$ の TRI4 により 40% の分化抑制作用

を示した。本実験結果は、TRI4が TRI1 を上回る細胞分化阻害活性を有することを示唆しており、合成展開により化合物構造の最適化が進展したことを示している。なお、TRI1 および TRI4 について、化合物濃度を変化させて ^1H 1D スペクトルを測定したところ、各アッセイ系において用いた最高濃度においても化合物シグナルの化学シフト値や線幅はほとんど変化しなかった (Figure 29)。この結果は、これまでの示してきたデータは化合物凝集 (分子間相互作用) に伴う悪影響を受けていないことを示している⁷⁴。

TRI4 を均一 ^{15}N 標識した TRAF6 に添加し ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、複数の残基に大きな CSP が観測され、一部のシグナルは消失した (Figure 30a,b)。これらの残基を TRAF6 の立体構造上にマッピングしたところ、TNFRSF 結合部位だけでなく、その裏に存在する B5、B6 および B8 上の残基においても TRI4 添加に伴う顕著な影響が観測された (Figure 30c)。TRI4 濃度を変化させ、TNFRSF 結合部位およびその裏に存在する残基について K_D 値を計算したところ、いずれの部位においてもほぼ同一の値が得られた (Table 1)。このことは、TRI4 の結合部位が一箇所であり、裏面の化学シフト変化は、結合に伴う遠位の間接的化学シフト変化であることを強く示唆する。実際、TNFRSF 結合部位に存在する R392 および V474 に Ala 変異を導入した TRAF6 を TRI4 に添加したところ、野生型 TRAF6 の場合と比べ、TRI4 のシグナル移動度が減少したのに対し、TNFRSF 結合部位の裏に存在する E498 (Figure 30c、緑で着色した残基) に Ala 変異を導入した TRAF6 の場合、野生型 TRAF6 と同等の TRI4 シグナル移動度が観測された (Figure 30d)。このことは、TRI4 の結合部位が TNFRSF と同等であり、その裏面は TRI4 との相互作用に関与しないとの考察を支持する。さらに、TRI4 添加に伴う CSP の大きさとシグナル強度減少の割合はよく相関したことから (Figure 30e)、TRI4 結合状態と非結合状態は、化学シフト差 (Hz) に比べ同等または早い一つの交換として記述できることが示唆される。

第5節 TRAF6–TRI4 複合体の立体構造解析

TRAF6–TRI4 複合体の立体構造を決定するために X 線結晶構造解析を行った。はじめに共結晶化法を試みた。その結果、0.5 mg/mL (25 μM) TRAF6、400 μM TRI4、25–30% PEG8K、

100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 °C の条件において 12 時間程度で結晶が析出した。数日間結晶を成長させ、構造解析を行ったところ、本結晶は混合溶液中の化合物非結合状態の TRAF6 が結晶化したものであることが明らかとなった。一方、非結合状態の TRAF6 結晶に対して TRI4 のソーキング実験を行ったが、TRI4 との複合体構造を得ることはできなかった。この原因として、非結合状態の TRAF6 の結晶構造において、化合物結合に重要な Pro site がクリスタルパッキングにより占有されている点が挙げられる (Figure 31)。以上の結果から X 線結晶構造解析による複合体立体構造解析は困難であると考え、溶液状態で立体構造解析が可能である NMR 法を用いることとした。

TRI4 と RANK ペプチドは TRAF6 の表面において同程度の結合親和性で競合することから、INPHARMA 実験を行うこととした。INPHARMA は、標的タンパク質の同一表面に対して競合的に結合する 2 種類のリガンドの間に観測される間接的な NOE を指標とし、タンパク質結合状態における相対配置を明らかにする手法である (Figure 4)³²。200 μ M の TRI4 および RANK ペプチドと 17 μ M の TRAF6 を混合し、NOESY スペクトルを測定したところ、TRI4 の ring-1 中の水素核 (r1-2,3) と RANK ペプチドの Pro 残基中の β および γ 水素核の間に NOE が観測された (Figure 32)。本 NOE は TRAF6 を均一重水素標識すると観測されなくなったことから、TRAF6 の水素核を仲介する間接的な磁化移動に由来することが確認された。以上の結果から、TRI4 の ring-1 は TRAF6 の Pro site に結合することが実験的に示された。しかし、本実験においては ring-2 および ring-3 の立体構造情報は得られなかった。そこで、さらに構造情報を収集するために、DIRECTION 実験を行った。

DIRECTION 法は、標的タンパク質存在下の化合物各水素核における分子間交差緩和速度を選択的に抽出する手法である (Figure 5)。分子間交差緩和速度は、化合物水素核周囲に存在する標的タンパク質の水素核密度 (水素間距離の⁻⁶乗の和) に依存することが知られており、化合物との結合様式を反映する情報となる。本実験データをドッキング計算に組み込むことにより、より精緻な複合体立体構造決定が可能になることが示されている³⁴。そこで、200 μ M の TRI4 と 17 μ M の TRAF6 を混合したサンプルについて測定を行い、Figure 33a に示すように TRI4 の各サイト

に対する縦緩和速度差の定量値を得た。

はじめに、DIRECTION 実験データを組み入れずに、TRAF6 の TNFRSF 結合界面に対して TRI4 のドッキング計算を行ったところ、最安定構造モデルとして Figure 33b のような構造が得られた。本構造に基づき、TRI4 各水素核周囲の TRAF6 の水素核密度を計算したところ、DIRECTION 実験の結果とほとんど相関しないことが明らかとなった。また上記最安定構造モデルも含めた全構造モデルについて INPHARMA 実験の結果と合致せず、実験事実から本構造の妥当性は極めて低いことが示された。次に、DIRECTION 実験のデータと TRI4 各水素核周囲の TRAF6 の水素核密度の相関度をドッキングスコアに組み入れて計算したところ、DIRECTION 実験結果とシミュレーション結果の相関度が最も高い構造モデルとして Figure 33c のような構造が得られた。本構造モデルにおいては、TRI4 の ring-1 が TNFRSF の保存された Pro site と相互作用しており、INPHARMA 実験結果と矛盾しない。本構造モデルにおける TRAF6 と TRI4 の間の相互作用の詳細を Figure 34 に示す。Ring-1 の塩素原子は TRAF6 の M450、F471 および Y473 とファンデルワールス相互作用を形成しており、TRI1 に対する TRI2 の活性向上を説明するものである。Ring-1 と ring-2 を結ぶリンカー中のアミド酸素原子は、G472 のアミド N-H 基と水素結合を、ring-2 は F410 と π - π スタッキング相互作用を形成している。特に G472 は RANK ペプチドとの水素結合にも関与しており、本相互作用は内在性の鍵相互作用の直接阻害に寄与するものと考えられる。TRI4 の ring-1 および ring-1 と ring-2 を結ぶリンカー部の複合体構造を RANK ペプチドの場合と比較すると、ring-1 による Pro site とのファンデルワールス相互作用と G472 に対する水素結合は、RANK ペプチドの相互作用と類似していることが分かる (Figure 35)。一方 ring-3 は、RANK ペプチドと異なる部位に相互作用している。ring-3 は H394 と CH- π 相互作用を形成している。H394 を Ala に変異させた TRAF6 に対する TRI4 の結合親和性は 150 μ M に低下したことから (Figure 36)、H394 が TRI4 との結合に関与していることが実験的に支持された。ここまで記述してきた相互作用は、4 ns の MD 計算の各トラジェクトリにおいて保持されており、本結果からも TRI4 が TRAF6 と安定的に結合することが示唆される (Figure 37)。

Ring-2 と ring-3 をつなぐスルホニル酸素は R392 のグアニジウム基と水素結合を形成する。本

水素結合は、上記 MD トラジェクトリの 25%において保持されている。実際に、R392A TRAF6 に対する TRI4 の結合親和性は野生型 TRAF6 に比べ 3 倍程度低下したことから (Figure 36 および Figure 30d)、本結合が TRI4 の親和性向上に寄与していることが実験的に支持される。なお、TRI4 の溶解度を NMR ^1H 1D スペクトルを用いて評価したところ、5.4 より低い pH において溶解度が大きく減少したことから、本酸素原子を含むアシルスルホンアミド基の $\text{p}K_{\text{a}}$ は 5.4 付近に存在する。したがって、中性条件において本アシルスルホンアミド基はイオン型として存在し、R392 側鎖と静電的相互作用を形成すると考えられる。R392 は RANK ペプチドとの相互作用にも関与しており (Figure 3)、TRI4 の R392 との相互作用も RANK 結合の直接阻害に寄与するものと考えられる。また、ring-3 の塩素原子は、いくつかのトラジェクトリにおいて TRAF6 の Q396、C403 および V474 とファンデルワールス相互作用を形成している。この塩素原子を除いた化合物 (TRI5) を TRAF6 に添加したところ、各シグナルの移動度が明らかに減少した (Figure 38)。このことは、TRI4 に比べて TRI5 の結合親和性が低下することを強く示唆しており、本塩素原子が TRAF6 との高い結合親和性に寄与することを実験的に支持するものである。

第 6 節 他の TRAF ファミリータンパク質に対するドッキング計算

TRI4 の TRAF ファミリータンパク質間における標的選択性について考察を行うために、同一条件下で非結合状態の TRAF2/3/5/6 構造に対する TRI4 のドッキング計算を行った。その結果得られた最安定構造モデルを比較したところ、TRAF2/3/5 においては TRI4 の ring-1 が 63–64 loop と相互作用する一方、TRAF6 においては第 5 節に記載したモデルと類似した、ring-3 が 63–64 loop と相互作用するモデルが得られた (Figure 39)。また、最安定複合体構造モデルのドッキングスコアは、TRAF2/3/5 についてはそれぞれ -2.611、-3.236、-3.488 であったのに対し、TRAF6 については -5.360 であり、TRAF6 に対して比較的安定的に結合することが示唆された。

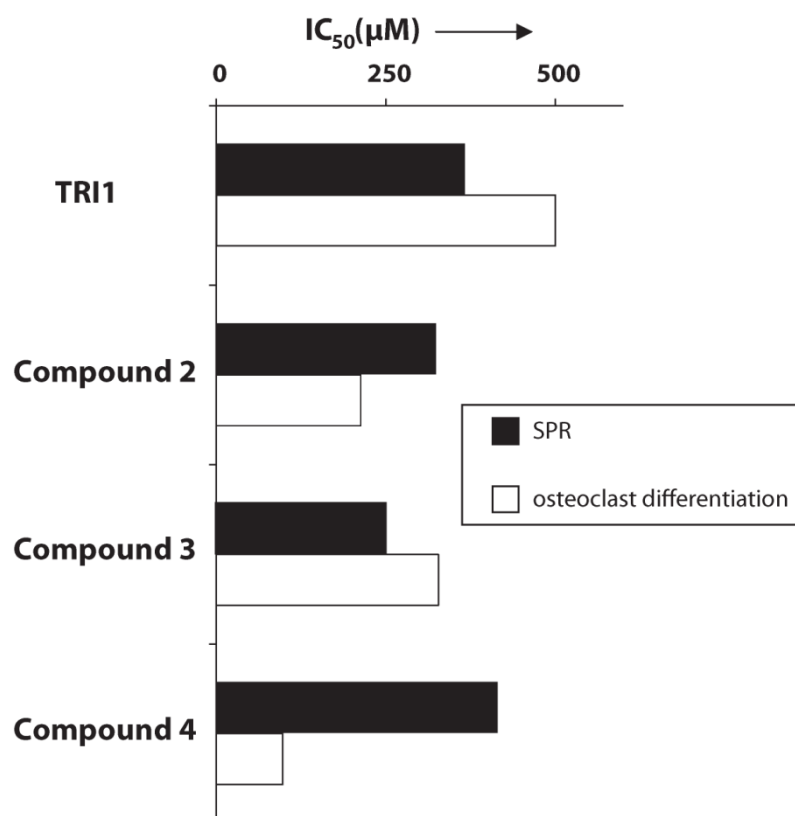


Figure 10 スクリーニングヒット化合物の SPR および破骨細胞分化阻害アッセイ結果

(a) SPR 競合アッセイ (黒横棒) および破骨細胞分化阻害アッセイ (白横棒) における half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀)。SPR アッセイにおいては、固定化された RANK ペプチドと TRAF6 の結合阻害作用を観測した。破骨細胞分化阻害アッセイにおいては、DMSO コントロールデータによって標準化された TRAP 活性を評価した。

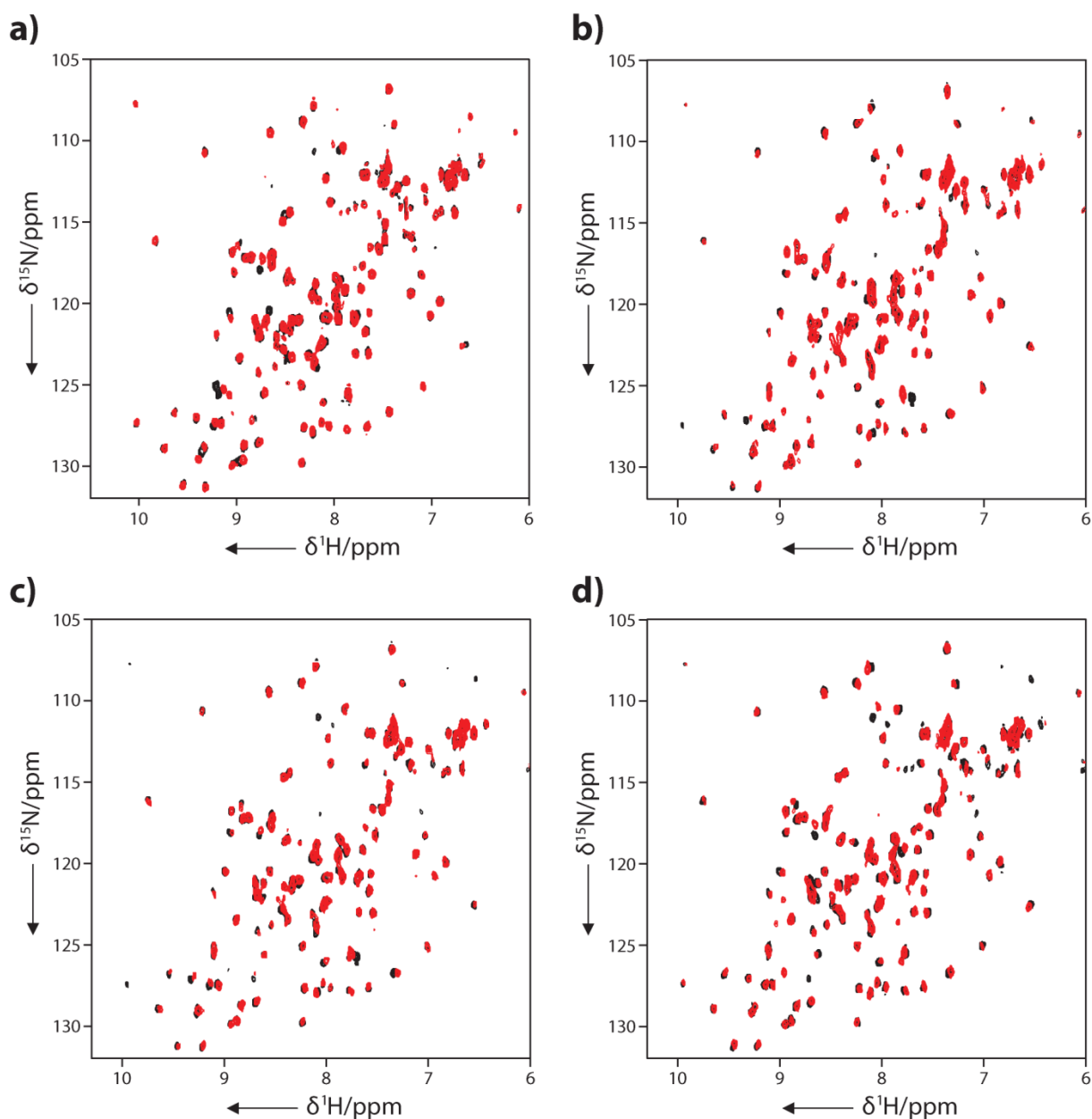


Figure 11 スクリーニングヒット化合物の NMR による TRAF6 との結合解析結果

TRI1 (a)、compound 2 (b)、compound 3 (c) および compound 4 (d) に関する、NMR による結合確認実験の結果を示す。それぞれ、非結合状態 (黒) および 1 mM 化合物添加時 (赤) の 50 μ M TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを重ねて表示した。いずれの化合物も TRAF6 のスペクトル変化を誘起したことから、これらの化合物はすべて TRAF6 に結合すると考えられる。

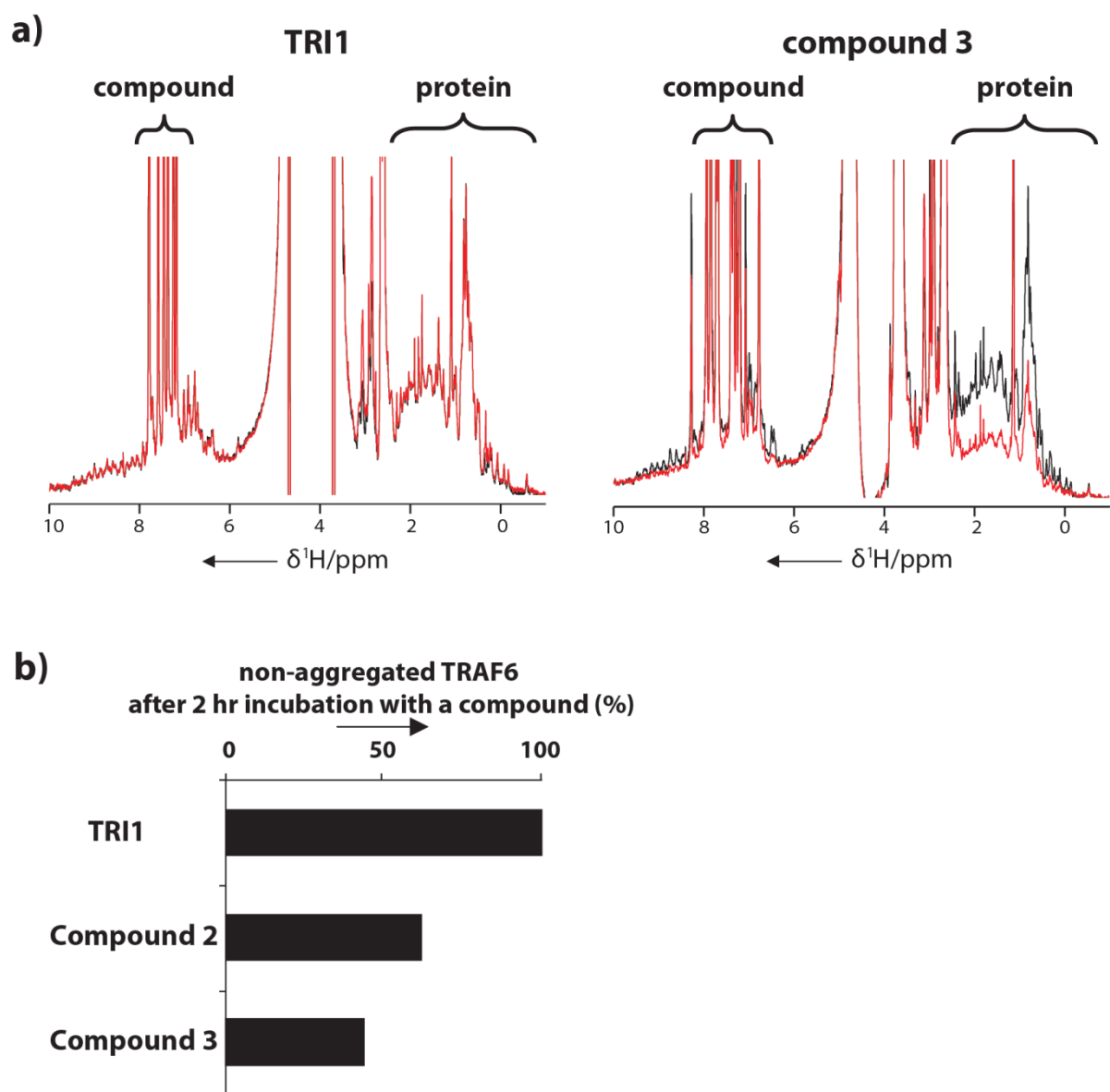


Figure 12 スクリーニングヒット化合物が TRAF6 の安定性に及ぼす影響

(a) 1 mM TRI1 もしくは compound 3 と 2 時間インキュベート前 (黒) および後 (赤) の 50 μM TRAF6 の ^1H 1D スペクトル。(b) 化合物と 2 時間インキュベートした後の非凝集 TRAF6 の割合 (%)。 ^1H 1D スペクトルにおけるタンパク質シグナル強度を指標として評価した。

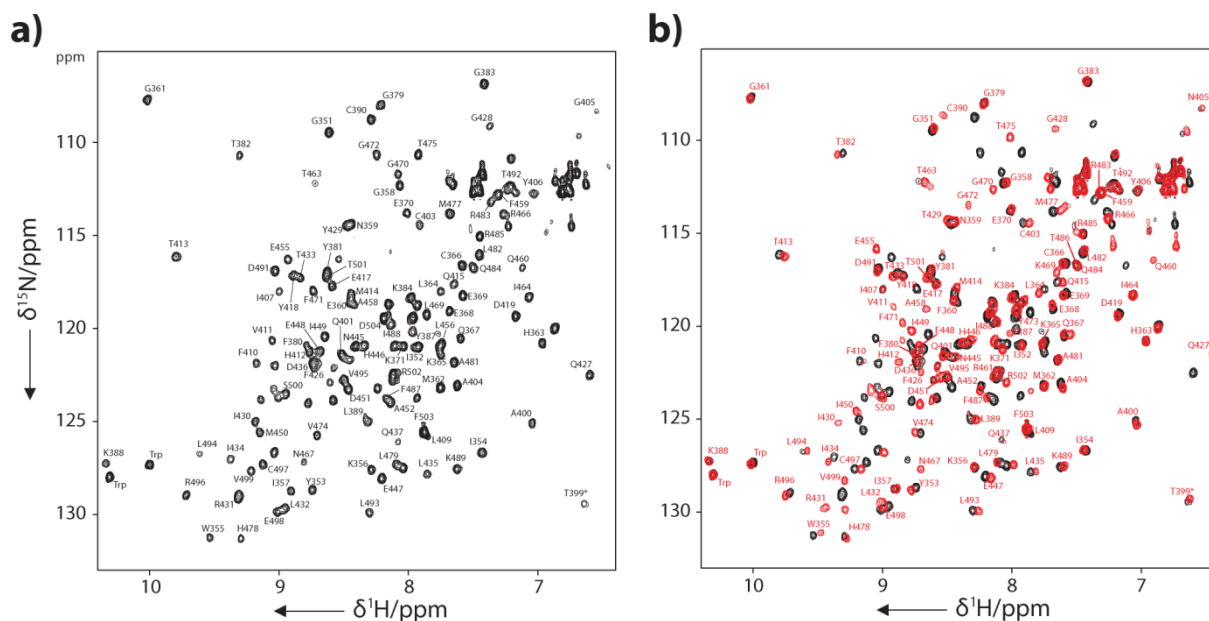


Figure 13 非結合状態 (a) および RANK ペプチド結合状態 (b) TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

(a) 非結合状態 TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。各シグナルの帰属を近傍に記載した。(b) 非結合状態 (黒) および RANK ペプチド結合状態 (赤) TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。RANK ペプチド結合状態 TRAF6 のシグナル帰属を赤で近傍に記載した。

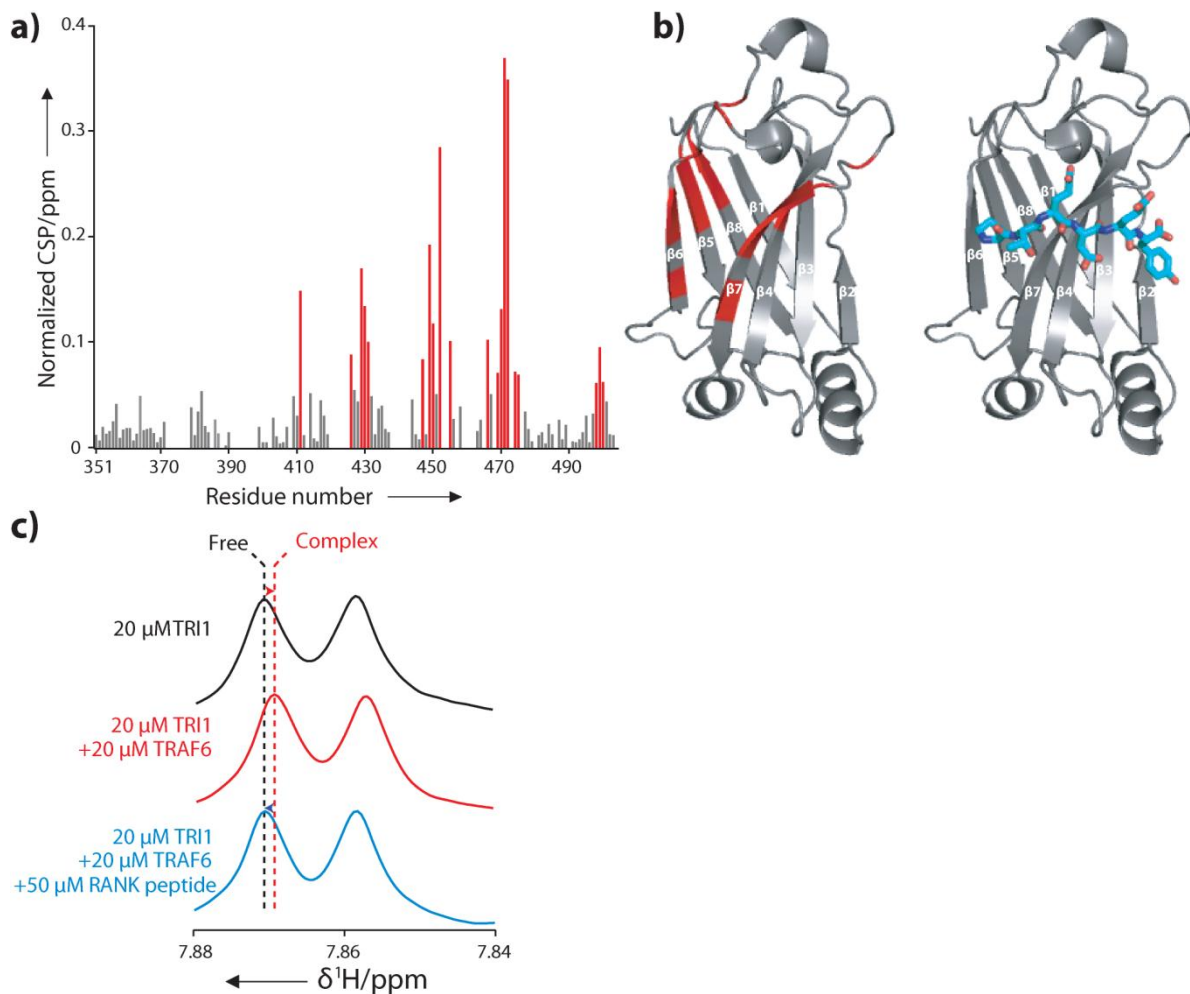


Figure 14 TRAF6 と TRI1 の相互作用解析

(a) 1 mM TRI1 添加に伴い TRAF6 の主鎖アミドシグナルに誘起される CSP の残基ごとのプロット。シグナル移動度上位 20 残基について、赤で着色した。(b) (左) TRI1 添加に伴う CSP 上位 20 残基の TRAF6 立体構造上へのマッピング。(a) において赤で着色した残基を、立体構造において同色で着色した。(右) TRAF6-RANK ペプチド複合体構造 (PDB code 1LB5) を、左図と同じ向きで表示した。RANK ペプチドはシアンスティックで示した。(c) TRAF6 に対する TRI1 と RANK ペプチドの競合実験。 ^1H 1D スペクトルを用いて評価した。20 μM TRI1 由来のシグナル (黒) の化学シフトは、20 μM 均一 ^2H 標識 TRAF6 添加により変化した (赤)。さらに 50 μM RANK ペプチドを添加すると、TRI1 由来のシグナルは TRAF6 添加前のシグナル位置に戻った (青)。

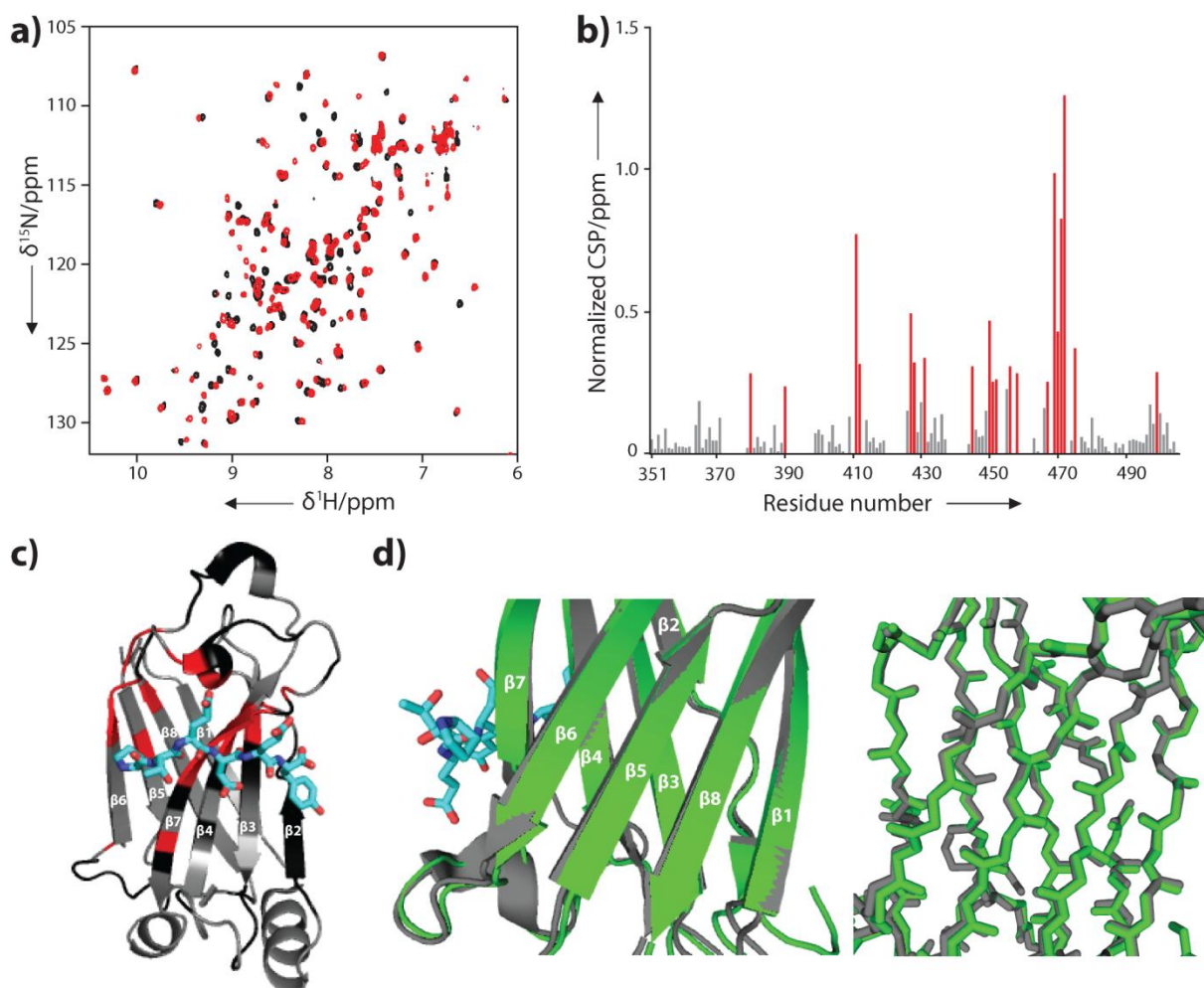


Figure 15 TRAF6 と RANK ペプチドの相互作用解析

(a) 非結合状態（黒）および 80 μ M RANK ペプチド添加時（赤）50 μ M TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。(b) RANK ペプチド添加に伴い TRAF6 の主鎖アミドシグナルに誘起される CSP の残基ごとのプロット。RANK ペプチド添加に伴うシグナル移動度上位 20 残基を赤で着色した。(c) RANK ペプチド添加に伴い NMR シグナルが大きな影響を受けた残基を TRAF6-RANK 複合体の立体構造 (PDB code 1LB5) 上にマッピングした。(b) において赤で着色した残基を TRAF6 構造上に同色でプロットした。また、プロリン残基および未帰属のため評価対象外となった残基は黒で着色した。RANK ペプチドはシアンスティックで示した。構造は、Figure 14b と同じ向きで示した。(d) RANK ペプチド結合部位の裏側の β シートの、非結合状態および RANK 結合状態 TRAF6 の構造比較 (PDB code 1LB4 および 1LB5)。左の図においては、非結合状態および RANK 結合状態 TRAF6 の主鎖構造をそれぞれ、緑および灰色のリボン表示とした。RANK ペプチドはシアンスティック表示とした。右の図においては、原子レベルの一致度を比較するため、TRAF6 の主鎖をスティック表示とした。

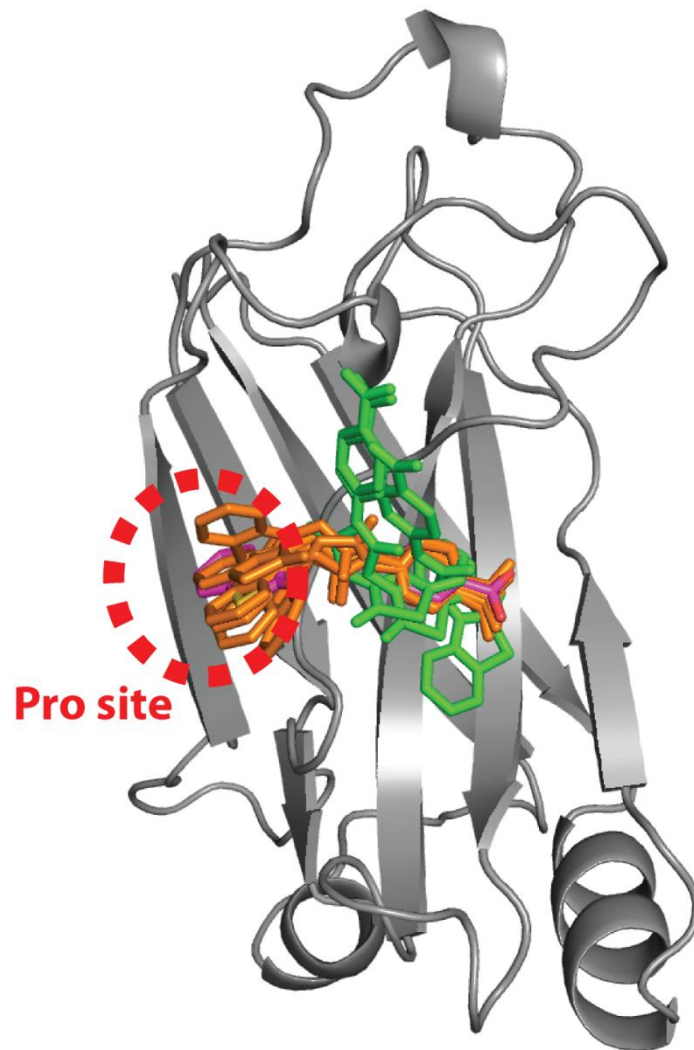


Figure 16 TRAF6-TRI1 ドッキング計算スコア上位 10 構造モデル

Pro site と相互作用する構造モデルをオレンジスティックで、Pro site と相互作用せず RANK ペプチドとは垂直方向に結合する構造モデルを緑スティックで示した。最安定構造モデルはマゼンタスティックで示した。

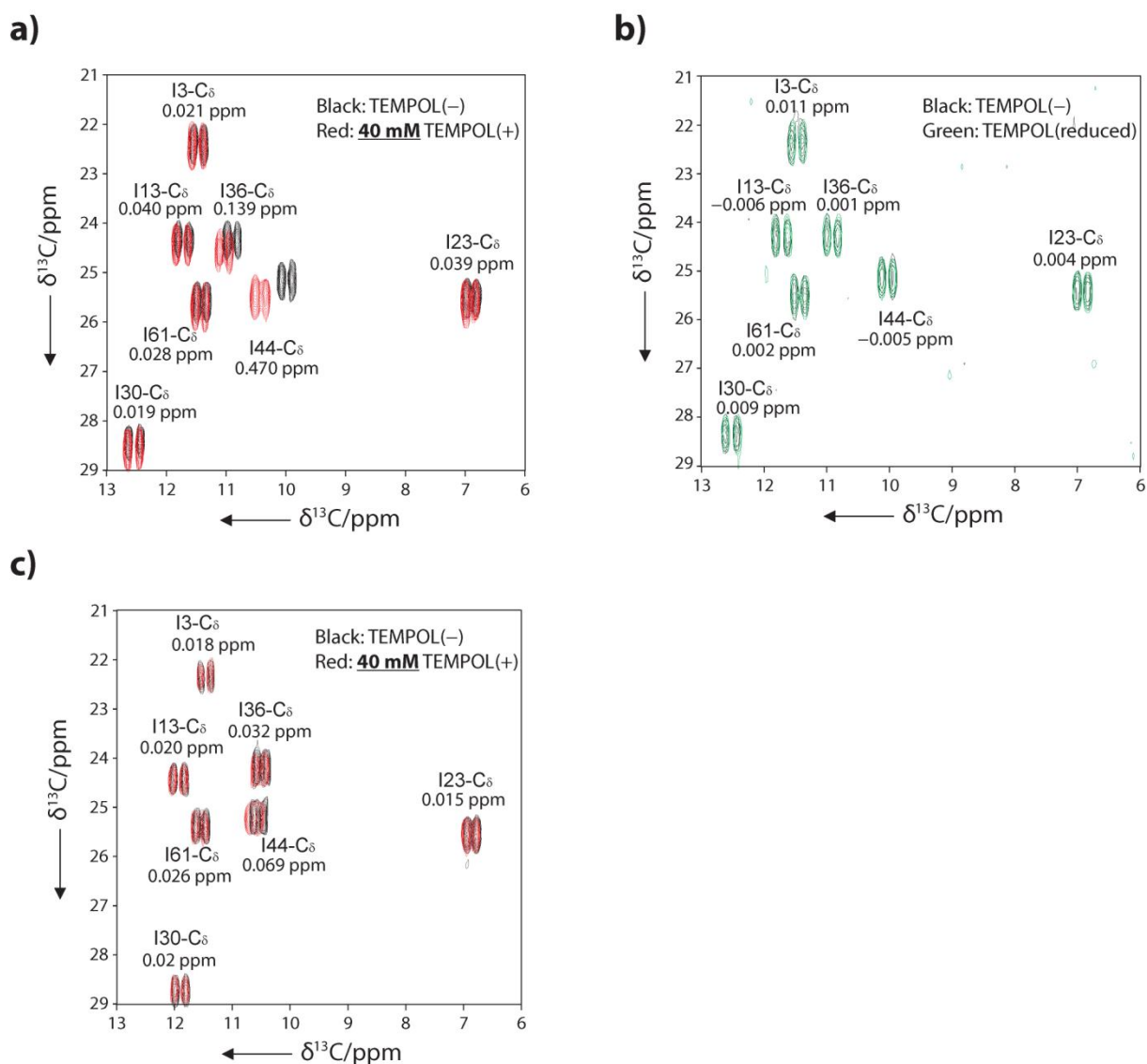


Figure 17 非結合状態および YUH1 結合状態 ^{13}C ubiquitin の ^{13}C - ^{13}C TOCSY スペクトルにおけるイソロイシンの $\text{C}\delta$ - $\text{C}_{\gamma 1}$ 領域

^{13}C 直接観測軸 (横軸) の帰属をシグナル近傍に記載した。観測された PS 値は帰属の下に示した。

(a) 黒および赤で示したスペクトルはそれぞれ、40 mM TEMPOL 非存在下および存在下において測定した非結合状態 ^{13}C ubiquitin の ^{13}C - ^{13}C TOCSY スペクトルである。(b) 緑で示したスペクトルは、50 mM アスコルビン酸添加により 40 mM TEMPOL を還元した後に測定した非結合状態 ^{13}C ubiquitin の ^{13}C - ^{13}C TOCSY スペクトルである。(c) 黒および赤で示したスペクトルはそれぞれ、40 mM TEMPOL 非存在下および存在下において測定した YUH1 結合状態 ^{13}C ubiquitin の ^{13}C - ^{13}C TOCSY スペクトルである。

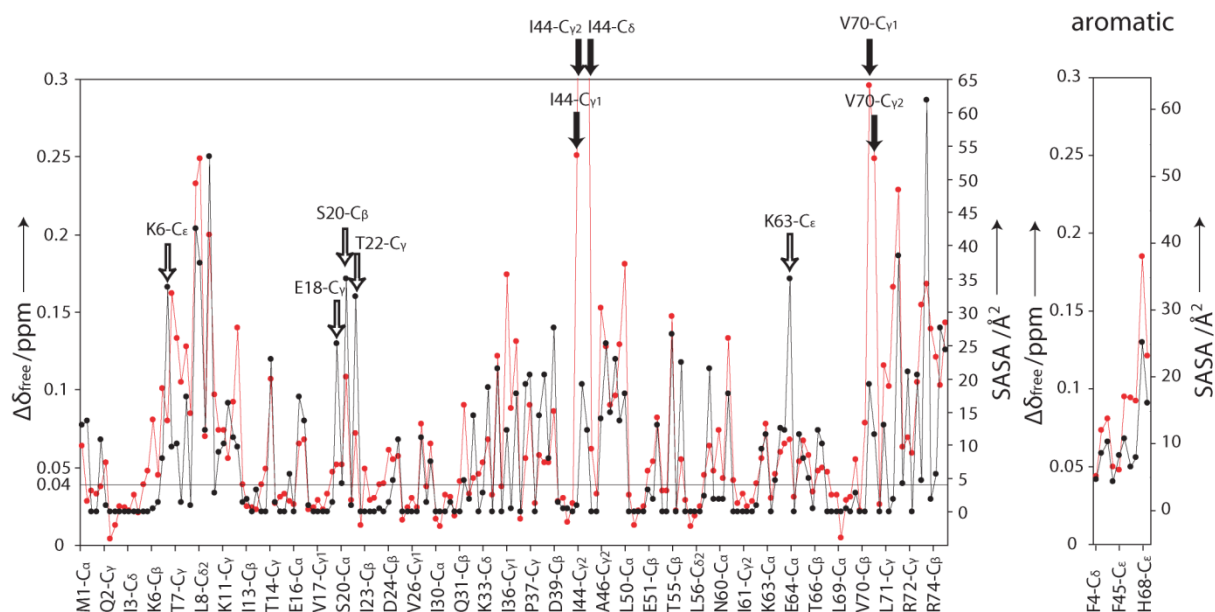


Figure 18 Ubiquitin の各 ^{13}C 核に誘起された PS (赤線、左軸) と SASA (黒線、右軸) の比較

横軸は左から残基番号順で並んでいる (*i.e.* Q2-C α , Q2-C β , Q2-C γ , I3-C α ...). 以後の Figure においても同様である。結晶構造において表面に存在する原子 (SASA > 0 Å 2) のうち、SASA から想定されるよりも特に大きな PS が観測された原子を黒塗りの矢印で、SASA から想定されるよりも特に小さな PS が観測された原子を白抜きの矢印で示した。

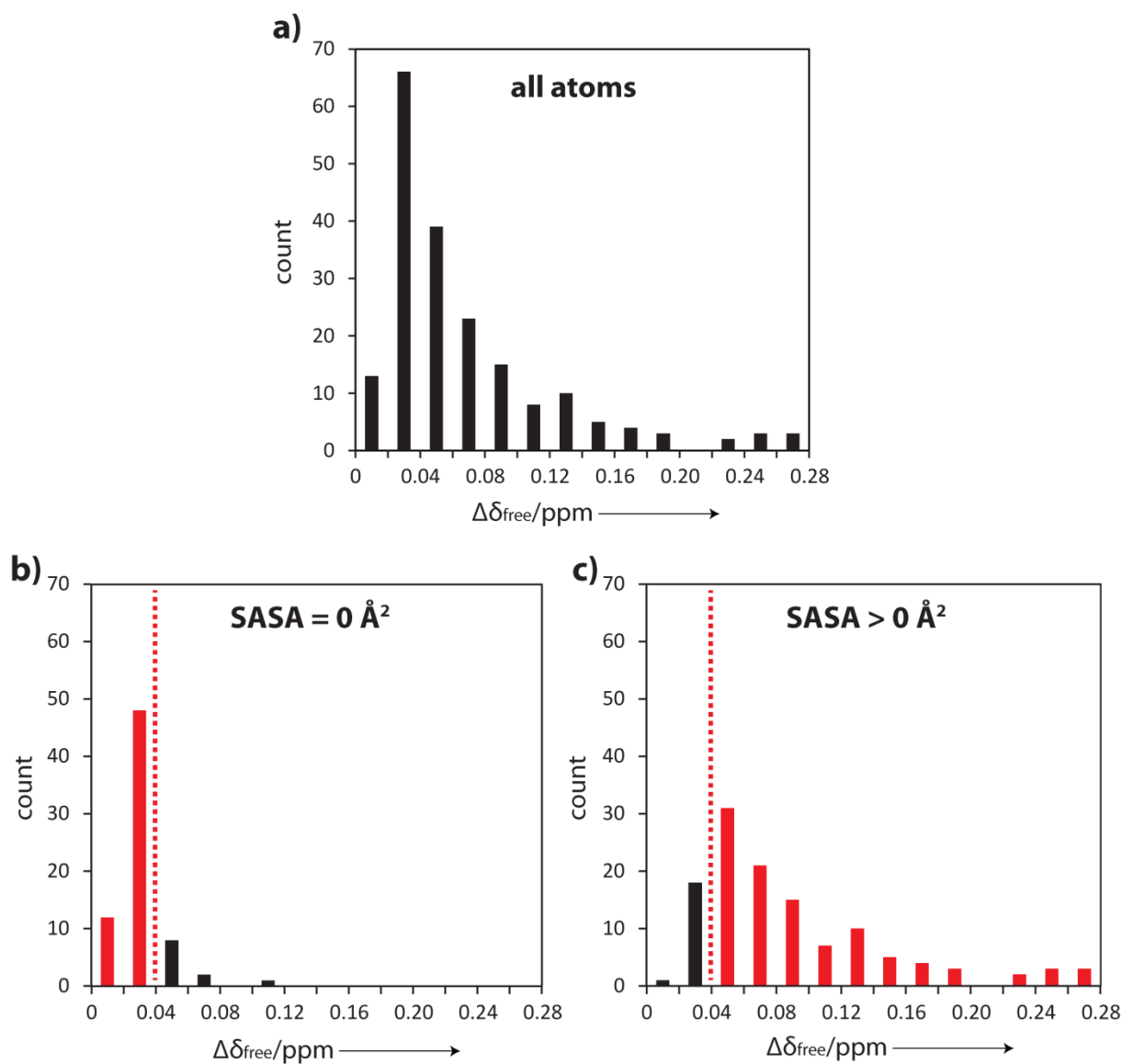


Figure 19 Ubiquitin の ^{13}C 核に誘起された PS 値の分布

(a) 解析対象となった全ての ^{13}C 核において観測された PS 値 ($\Delta\delta_{\text{free}}$) の分布。(b) Ubiquitin 内部 (SASA = 0 Å²) に存在する ^{13}C 核において観測された PS 値の分布。 $\Delta\delta_{\text{free}}$ が 0.04 ppm 以下の分布を赤で着色した。(c) Ubiquitin 表面 (SASA > 0 Å²) に存在する ^{13}C 核において観測された PS 値の分布。 $\Delta\delta_{\text{free}}$ が 0.04 ppm 以上の分布を赤で着色した。なお、SASA は ubiquitin の X 線結晶構造 (PDB code 1UBI) について、MOLMOL を用いて計算した。

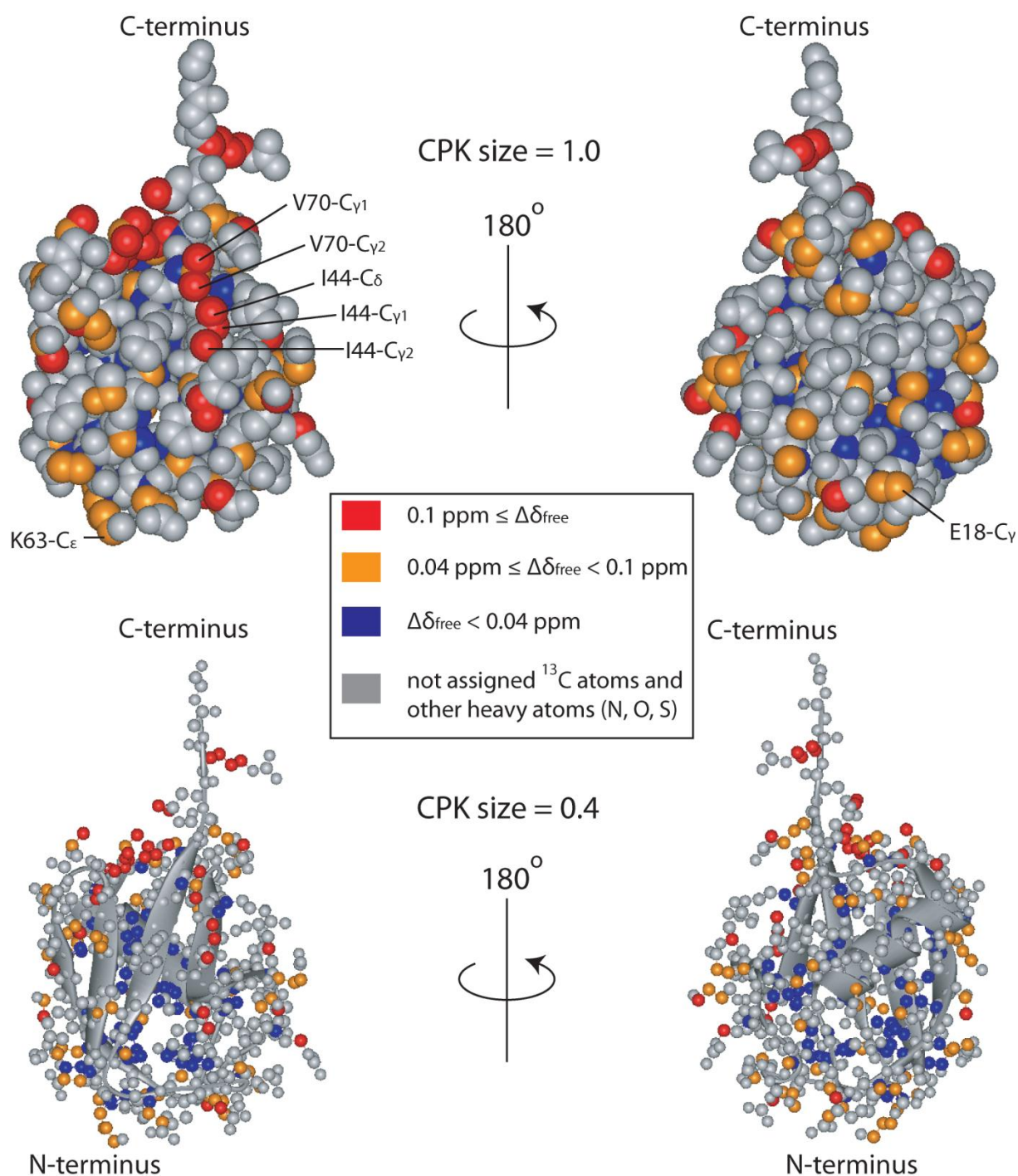


Figure 20 Ubiquitin の各 ^{13}C 核に誘起された PS の立体構造上へのマッピング

Ubiquitin の各 ^{13}C 核に誘起された PS の値に基づき、X 線結晶構造 (PDB code 1UBI) の各原子を色付けした。 $\Delta\delta_{\text{free}} \geq 0.1 \text{ ppm}$ 、 $0.04 \text{ ppm} \leq \Delta\delta_{\text{free}} < 0.1 \text{ ppm}$ および $\Delta\delta_{\text{free}} < 0.04 \text{ ppm}$ の原子をそれぞれ、赤、オレンジおよび青で着色した。未帰属の炭素原子およびその他の重原子は灰色で着色した。下図においてはタンパク質内部の原子を露出させるため CPK サイズを小さくした。

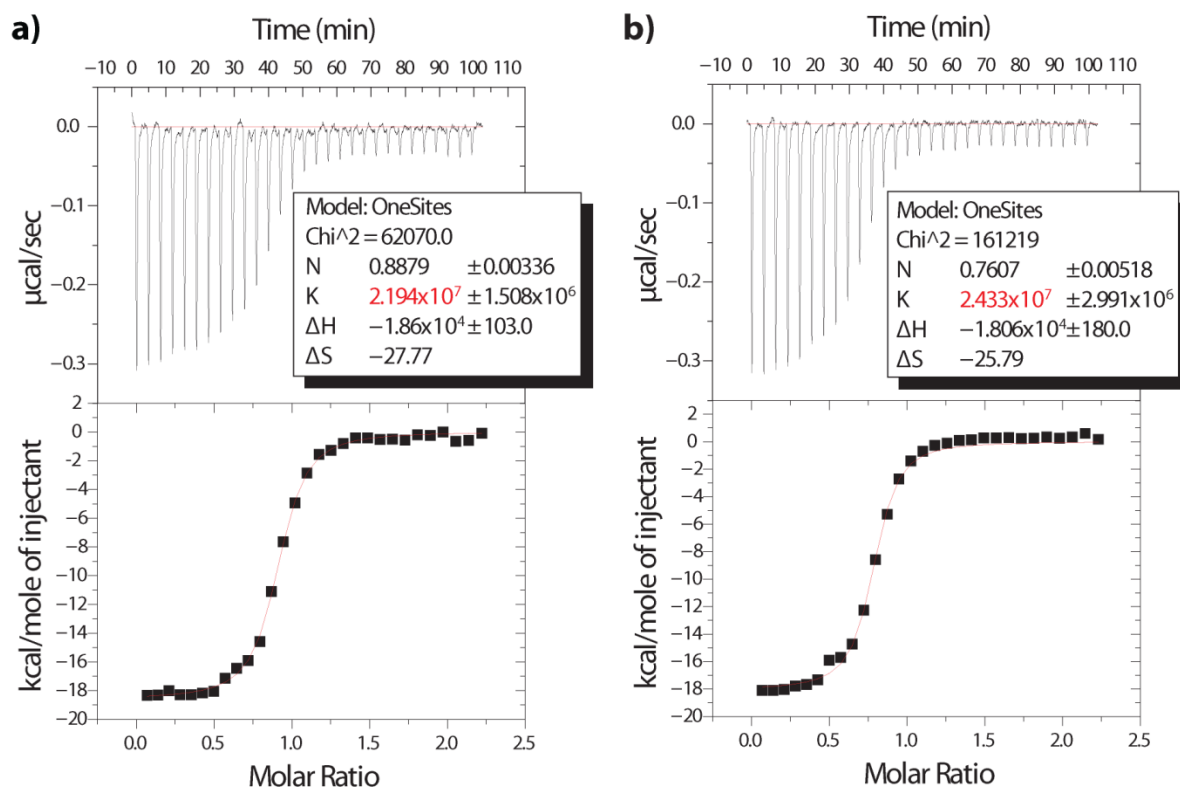


Figure 21 40 mM の TEMPOL 非存在下 (a) および存在下 (b) における ubiquitin-YUH1(C90S)の ITC による相互作用解析結果

得られたストイキオメトリーは N 、結合定数は K 、結合に伴うエンタルピーの変化量は ΔH 、結合に伴うエントロピーの変化量は ΔS で表した。TEMPOL 添加によって、結合定数 K だけでなく他のパラメータもほとんど影響を受けなかった。

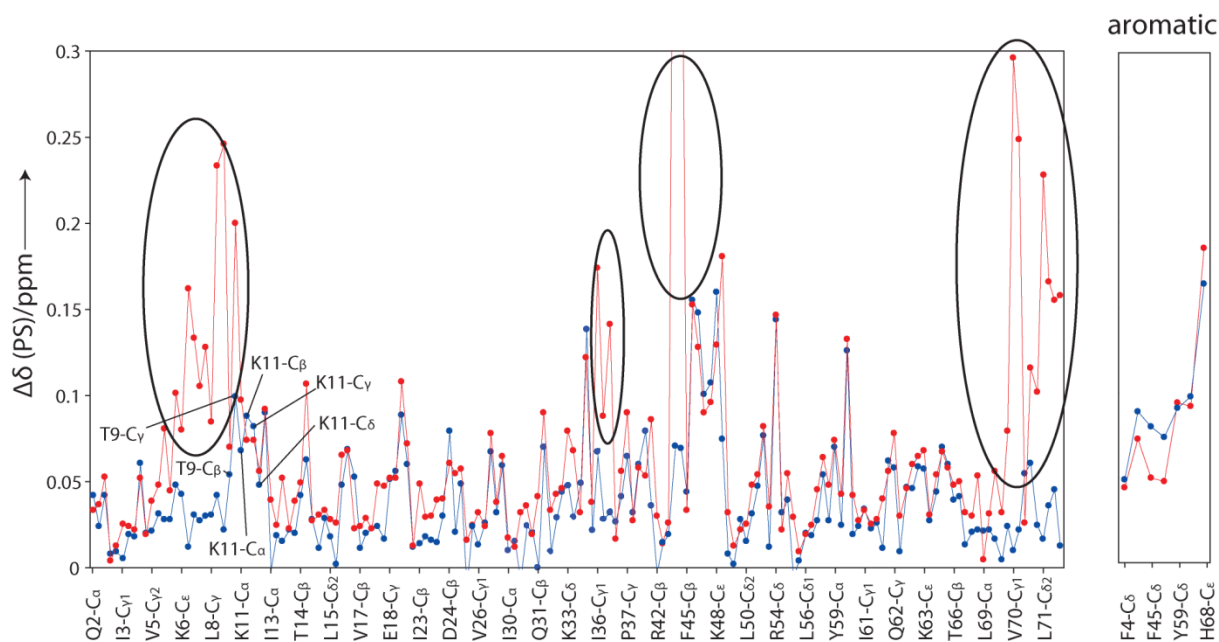


Figure 22 非結合状態（赤線）およびYUH1結合状態（青線）ubiquitinの各 ^{13}C 核に誘起されたPS

YUH1結合に伴い特に顕著なPS値の減少が観測された領域を楕円で囲んだ。

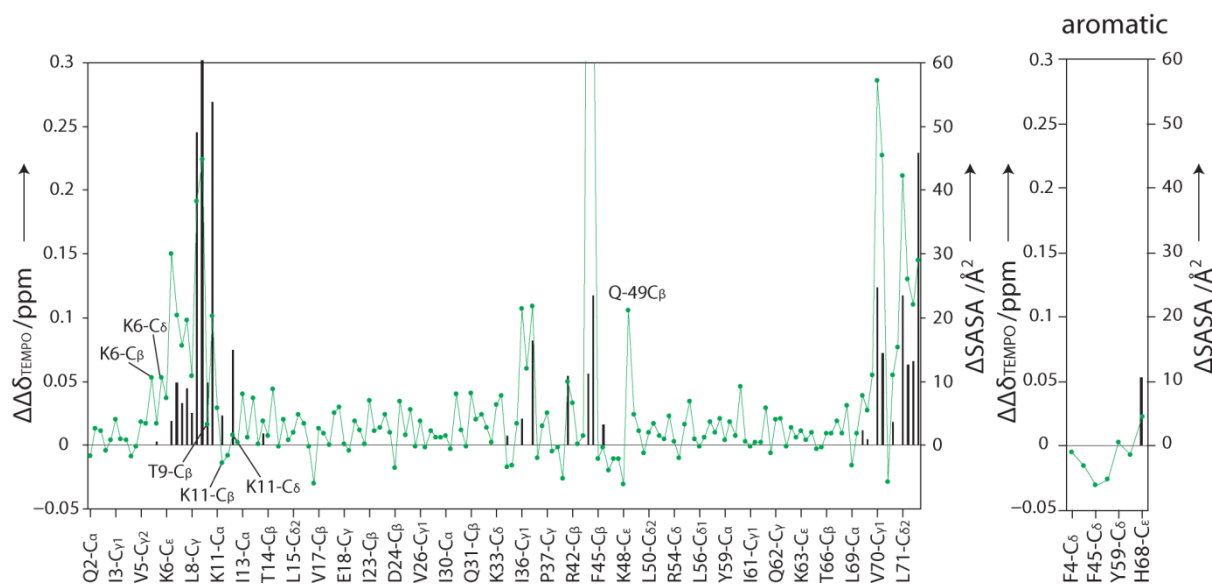


Figure 23 各 ^{13}C における $\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}}$ （緑線、左軸）および ΔSASA （黒棒、右軸）

$\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}}$ はYUH1添加前のPSからYUH1添加後のPSを差し引いて計算した。 ΔSASA はUBA-YUH1複合体の結晶構造（PDB code 1CMX）において、YUH1非存在状態のSASAからYUH1存在状態のSASAを差し引くことにより計算した。

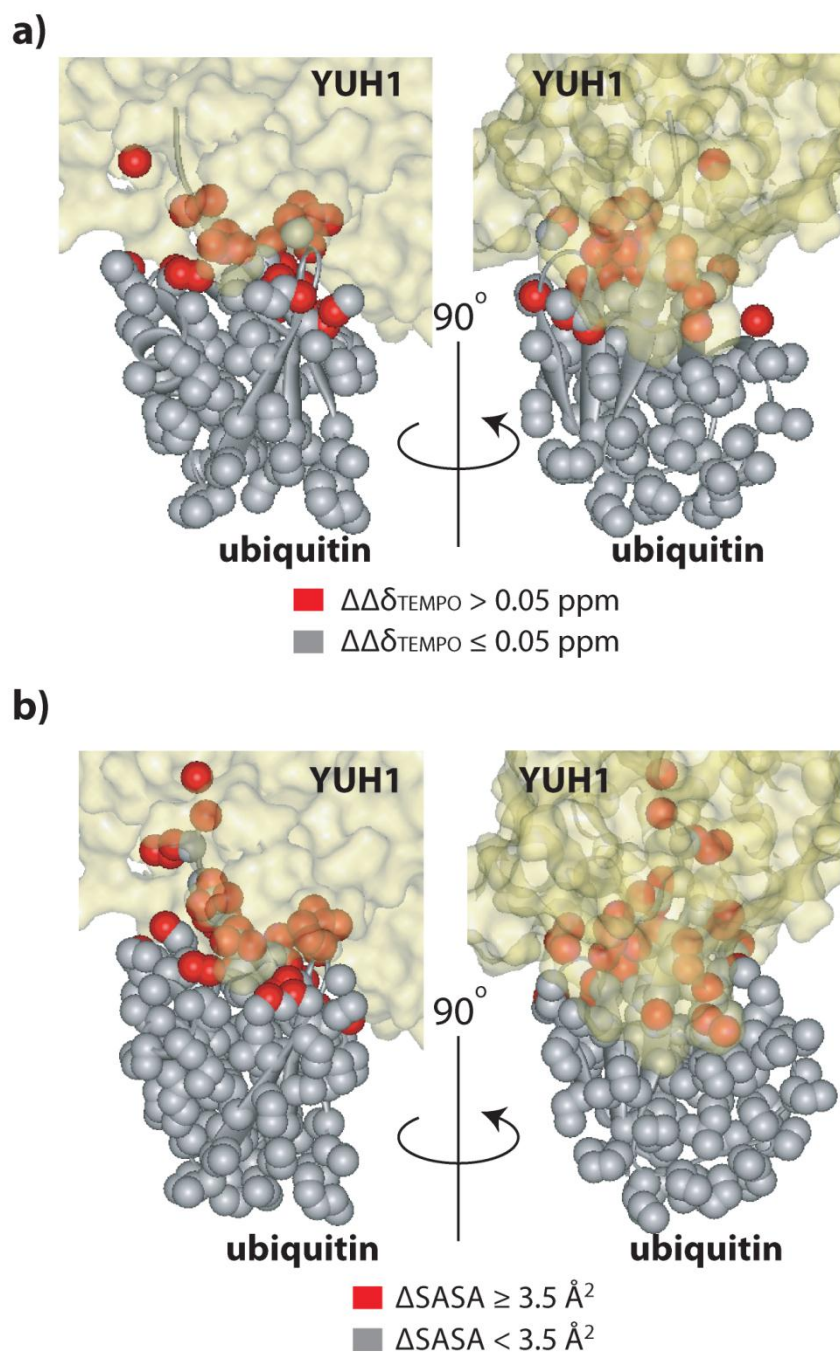


Figure 24 複合体形成に伴い顕著な PS 減少もしくは SASA 減少が観測された原子

(a) $\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}}$ に基づくマッピング。 $\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}} > 0.05 \text{ ppm}$ の原子は赤で、 $\Delta\Delta\delta_{\text{TEMPO}} \leq 0.05 \text{ ppm}$ の原子は灰色でそれぞれ着色した。解析対象となった原子のみ表示した。YUH1 は黄表面表示とした。(b) ΔSASA に基づくマッピング。 $\Delta\text{SASA} \geq 3.5 \text{ \AA}^2$ の原子は赤で、 $\Delta\text{SASA} < 3.5 \text{ \AA}^2$ の原子は灰色でそれぞれ着色した。すべての脂肪族および芳香族炭素原子を表示している。YUH1 は黄表面表示とした。

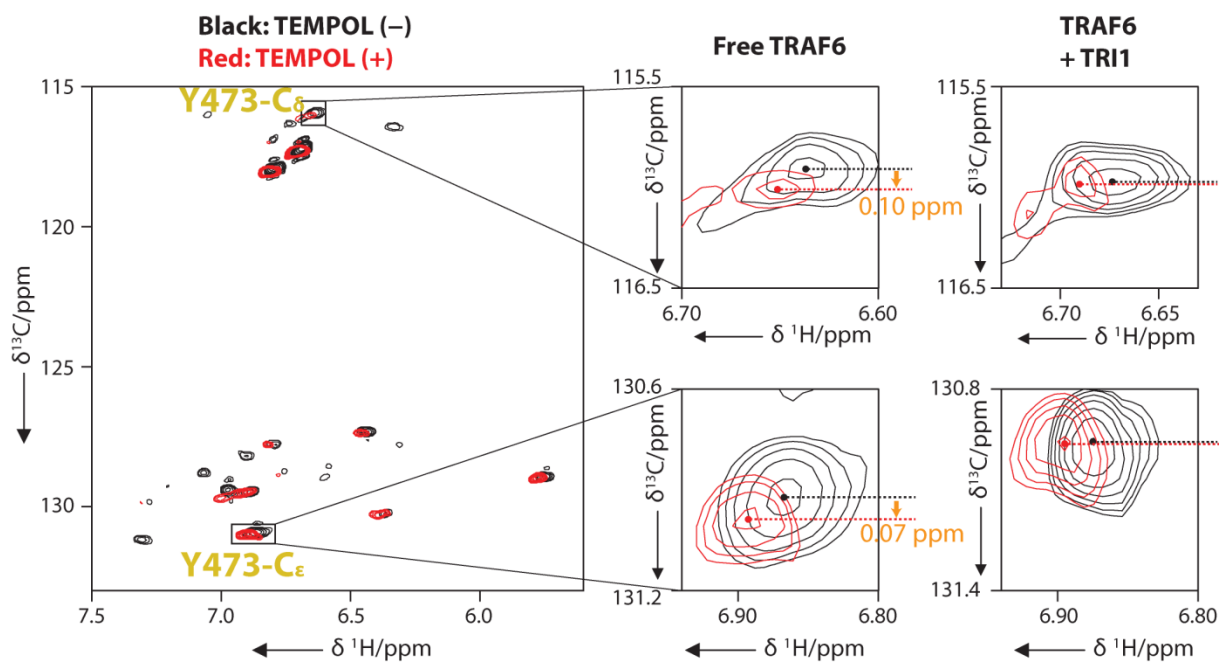


Figure 25 TRI1 添加による TRAF6 の Y473-C_δ および C_ε における PS 変化

40 mM TEMPOL 非存在下 (黒) および存在下 (赤) における 50 μM TRAF6 の ^1H - ^{13}C CT TROSY スペクトル全体像を左側に、C_δ および C_ε シグナルの拡大図を中央に示す。右側のスペクトルは、40 mM TEMPOL 非存在下 (黒) および存在下 (赤) における 50 μM TRAF6 / 5 mM TRI1 の ^1H - ^{13}C CT TROSY スペクトルにおける C_δ および C_ε シグナルの拡大図である。

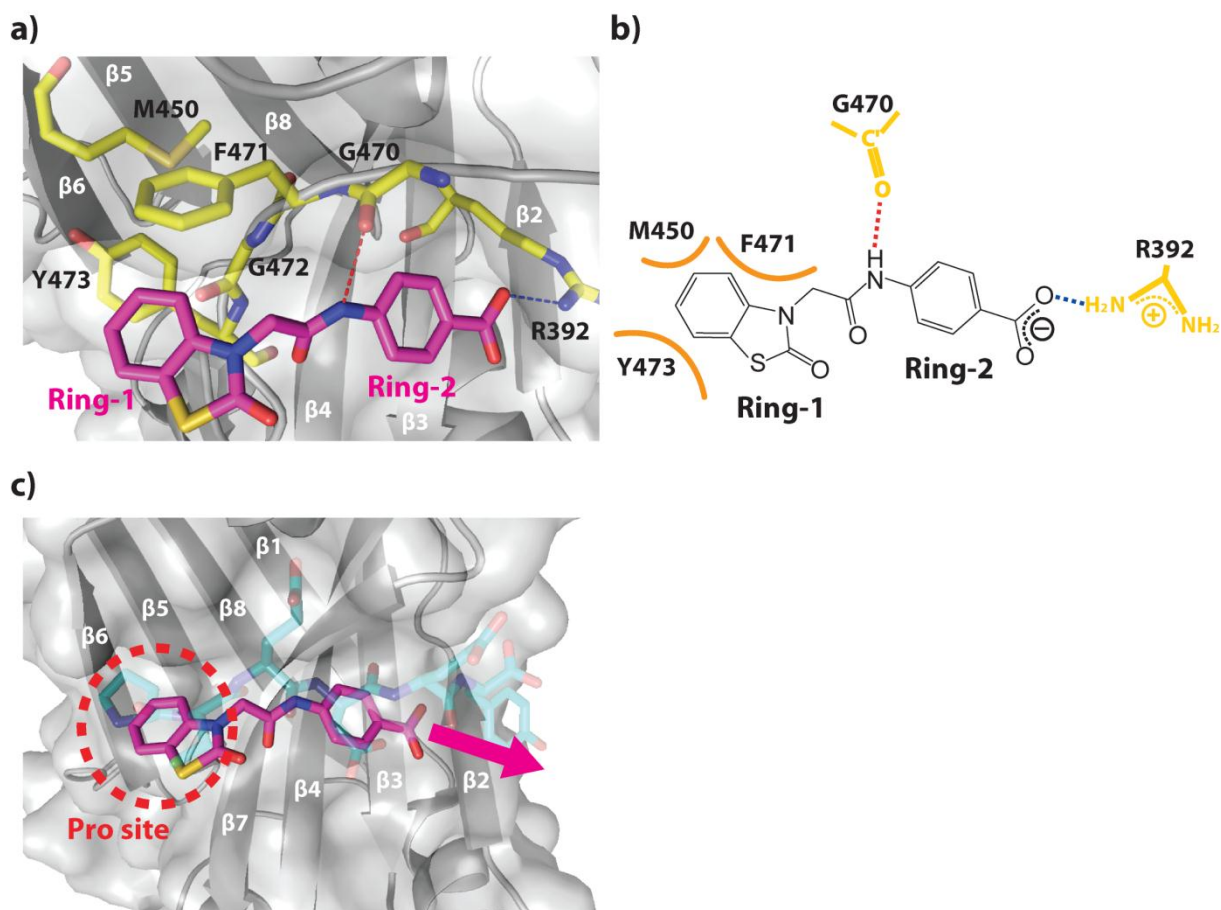


Figure 26 TRAF6-TRI1 複合体の最安定構造モデル

(a) TRAF6-TRI1 複合体の最安定構造モデルを示す。TRI1 はマゼンタスティックで、TRI1 結合に関与する TRAF6 残基は黄スティックで示す。赤および青点線はそれぞれ、G470 の主鎖カルボニル基および R392 の側鎖との水素結合を示す。(b) TRAF6-TRI1 複合体モデルの模式図。各点線は (a) に対応する。ファンデルワールス相互作用はオレンジ曲線で示す。(c) TRI1 (マゼンタスティック) と RANK ペプチド (半透明シアンススティック) の TRAF6 表面における重ね合わせ。Pro site は赤点線の円で示す。カルボン酸から延伸可能と考えた方向をマゼンタ矢印で示した。

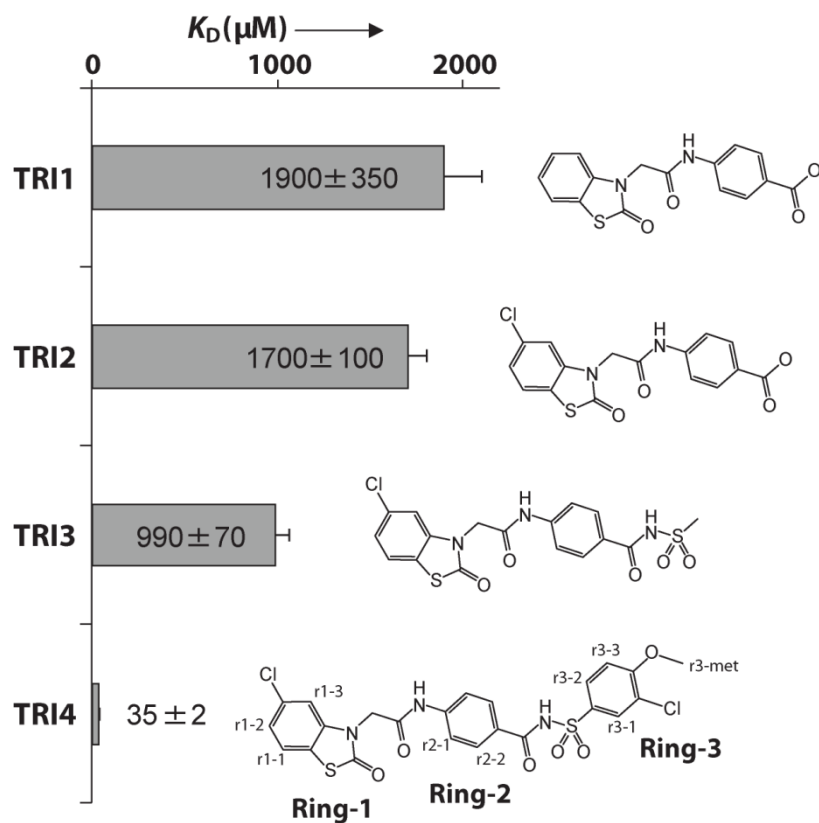


Figure 27 TRI 化合物の化学構造と TRAF6 に対する結合親和性

結合親和性は、化合物滴定に伴う TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおける R431、L432、M450、D451、E455 および F471 由来シグナルの化学シフト変化を指標にして算出した。なお、TRI4 の K_D 解析においては、TRI4 添加によるシグナル消失のため M450 を評価対象残基から除外した。各シグナルについて算出された値の平均値とした。各棒グラフから左右に延びる細いバーは標準偏差を示す。

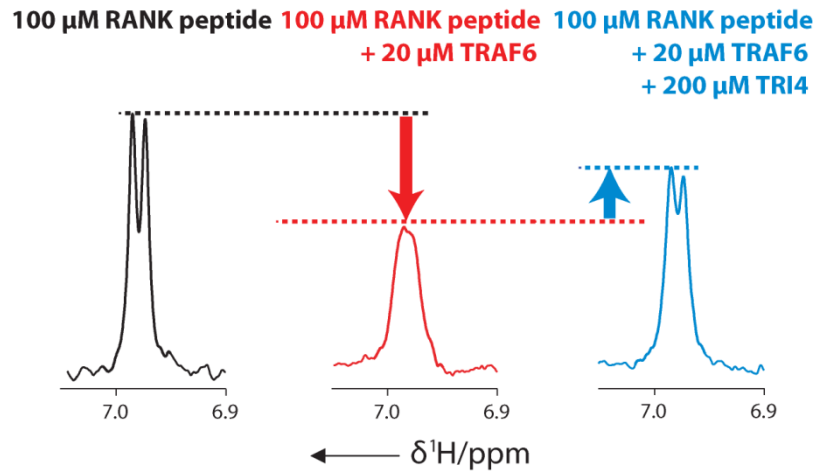


Figure 28 TRAF6 表面における TRI4 と RANK ペプチドの競合実験

100 μM RANK ペプチドの ^1H 1D スペクトルにおけるシグナル（黒）は、20 μM 均一 ^2H 標識 TRAF6 の添加によって広幅化した（赤）。また、わずかな化学シフト変化も観測された。このようなスペクトル変化パターンは、TRAF6 と RANK の相互作用が NMR 化学シフト変化の時間スケールと同等の交換速度を有する（intermediate exchange である）ことを示唆する。このシグナル広幅化および化学シフト変化は、200 μM TRI4 を添加することによって部分的に元に戻った（青）。このことは、RANK ペプチドが TRI4 によって TRAF6 表面から追い出されたことを示している。

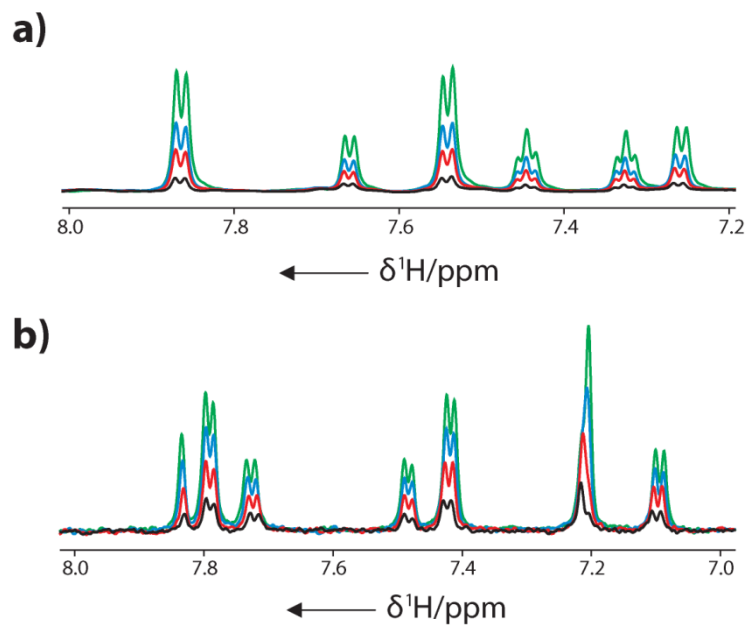


Figure 29 各濃度における TRI1 (a) と TRI4 (b) の ^1H 1D スペクトル

(a) 200 μM (黒)、600 μM (赤)、1000 μM (青) および 1800 μM (緑) TRI1 の ^1H 1D スペクトル

(b) 50 μM (黒)、100 μM (赤)、150 μM (青) および 200 μM (緑) TRI4 の ^1H 1D スペクトル
各アッセイにおける最大濃度を超える濃度 (200 μM) において、TRI4 の化学シフト値はわずかに変化しているものの、線幅は変化していない。これらの結果は、TRI1 および TRI4 について、凝集もしくは分子間相互作用がほとんど無いことを示している。

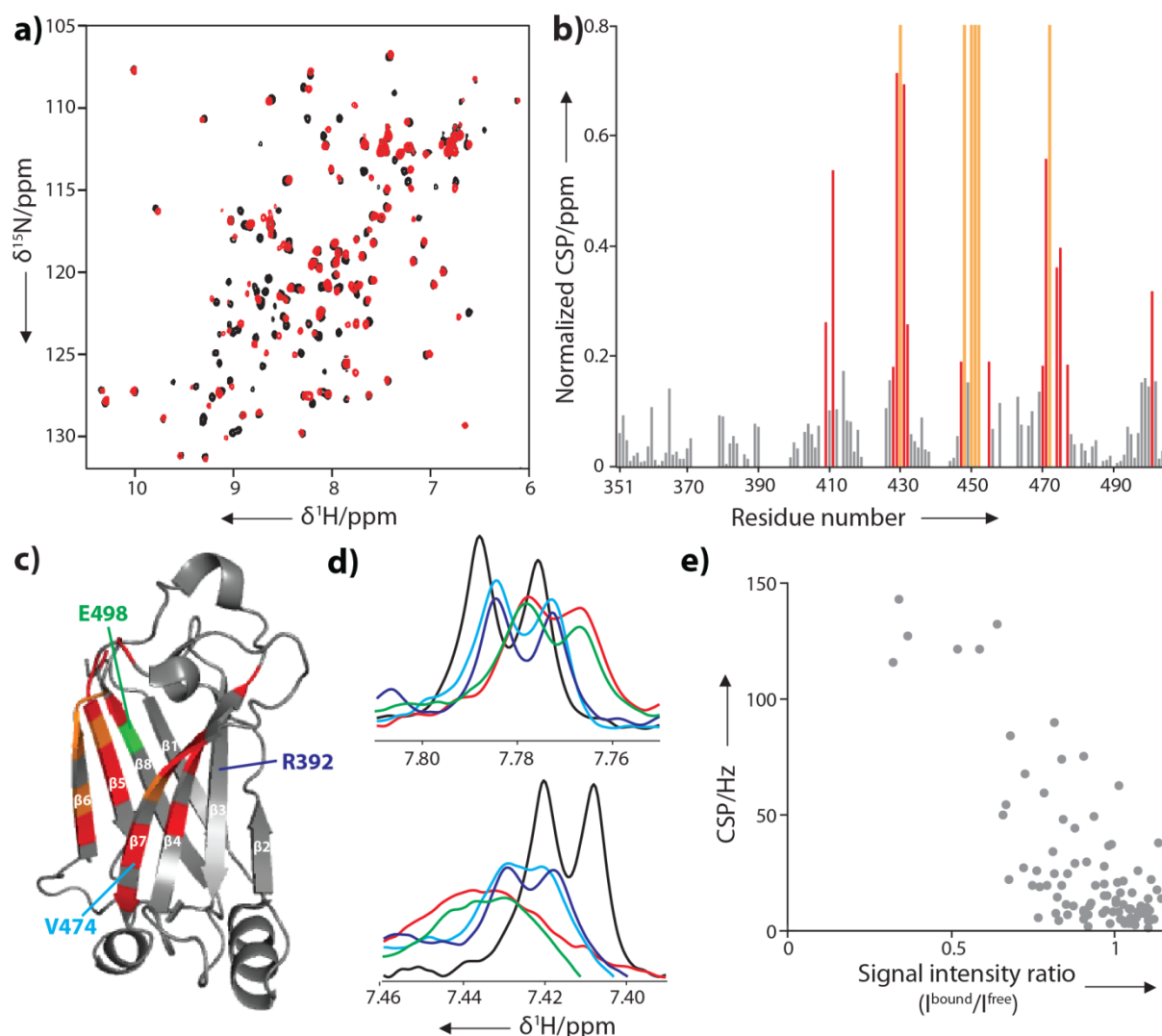


Figure 30 NMR による TRAF6 と TRI4 の相互作用解析

(a) 非結合状態 (黒) および 180 μM TRI4 添加時 (赤) の 50 μM TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。(b) TRI4 添加に伴い TRAF6 の主鎖アミドシグナルに誘起される CSP の残基ごとのプロット。TRI4 添加に伴いシグナルが消失した残基 (6 残基) をオレンジで、シグナル移動度上位 14 残基を赤で着色した。(c) TRI4 添加に伴い NMR シグナルが大きな影響を受けた残基を TRAF6 の立体構造上にマッピングした。(b) においてオレンジおよび赤で着色した残基を TRAF6 構造上に同色でプロットした。構造は、Figure 14b と同じ向きで示している。E498 は緑で着色した。(d) 遊離の TRI4 のシグナルを黒で、野生型、R392A、V474A および E498A TRAF6 を添加した後の TRI4 のシグナルをそれぞれ、赤、青、水色および緑で示した。各変異導入残基の位置は (c) に示した。いずれのスペクトルも、化合物濃度は 75 μM 、TRAF6 濃度は 5 μM である。上のスペクトルは TRI4 の r2-1 水素、下のスペクトルは TRI4 の r3-2 水素由来シグナルである (水素名は Figure 27 を参照のこと)。(e) TRI4 添加に伴う CSP とシグナル強度減少割合 ($I_{\text{bound}}/I_{\text{free}}$) の相関。各 TRAF6 主鎖アミドシグナルについて、50 μM TRAF6 に 180 μM TRI4 を添加した際の、CSP とシグナル強度減少割合をプロットした。CSP は Hz 単位で、式 $\Delta\delta = (\Delta\delta_{\text{N}}^2 + \Delta\delta_{\text{H}}^2)^{1/2}$ を用いて計算した。なお、 $\Delta\delta_{\text{N}}$ は ^{15}N 方向の、 $\Delta\delta_{\text{H}}$ は ^1H 方向の化学シフト変化量を表す。

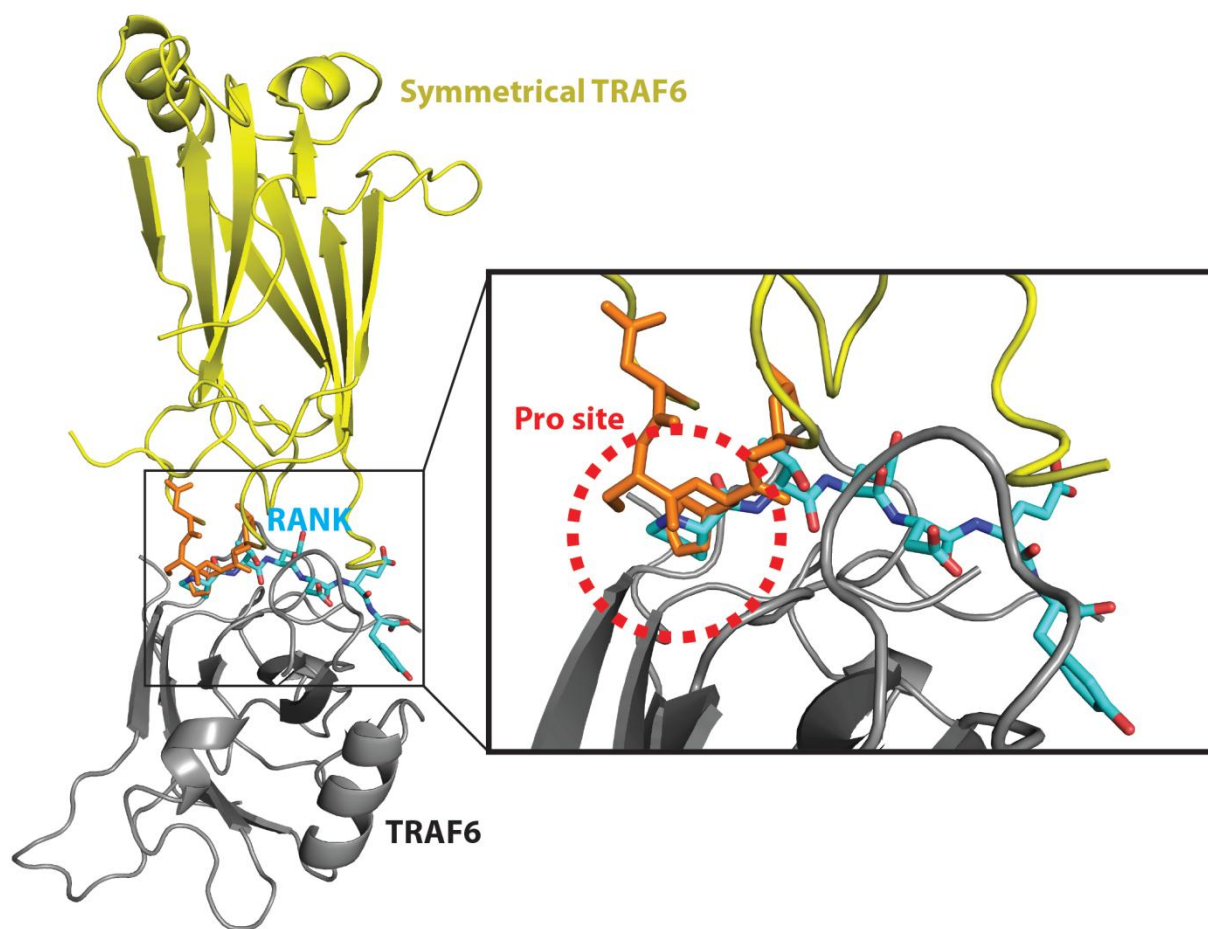


Figure 31 非結合状態の TRAF6 結晶構造と RANK ペプチドの重ね合わせ

TRAF6 分子（灰色リボン表示）に対し、TRAF6-RANK 複合体構造（PDB code 1LB5）を重ね合わせ、RANK ペプチド（シアンスティック構造）のみを残した。TRAF6 の Pro site（赤丸）には、対称 TRAF6 分子（黄リボン表示およびオレンジスティック表示）のうちオレンジスティックで示したループ部分が、灰色で示した TRAF6 の Pro site（赤丸）にはまり込んでいる。そのため、ソーキング法では化合物が入り込むことができず複合体結晶構造が得られなかったと考えられる。

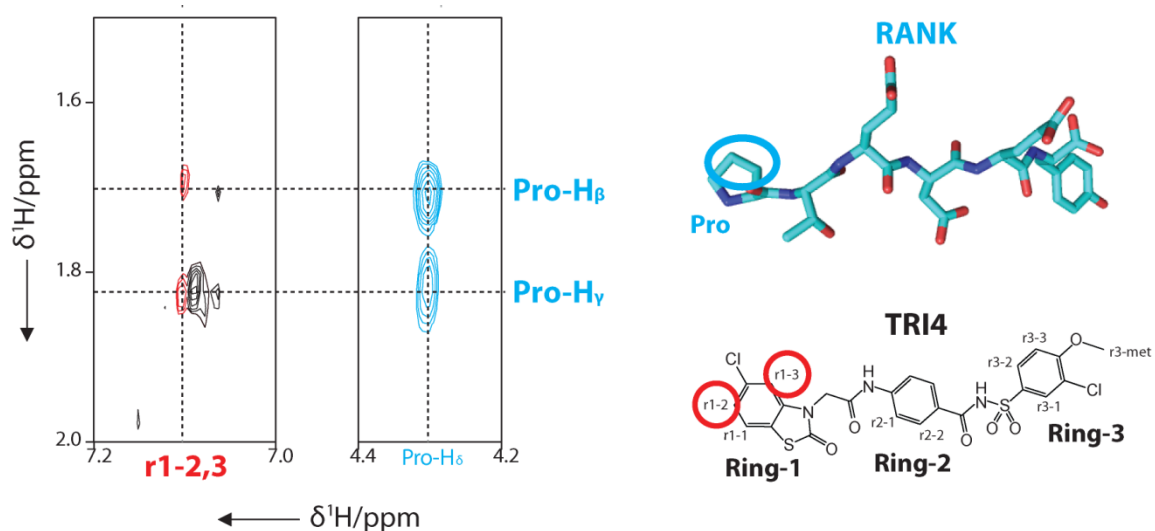
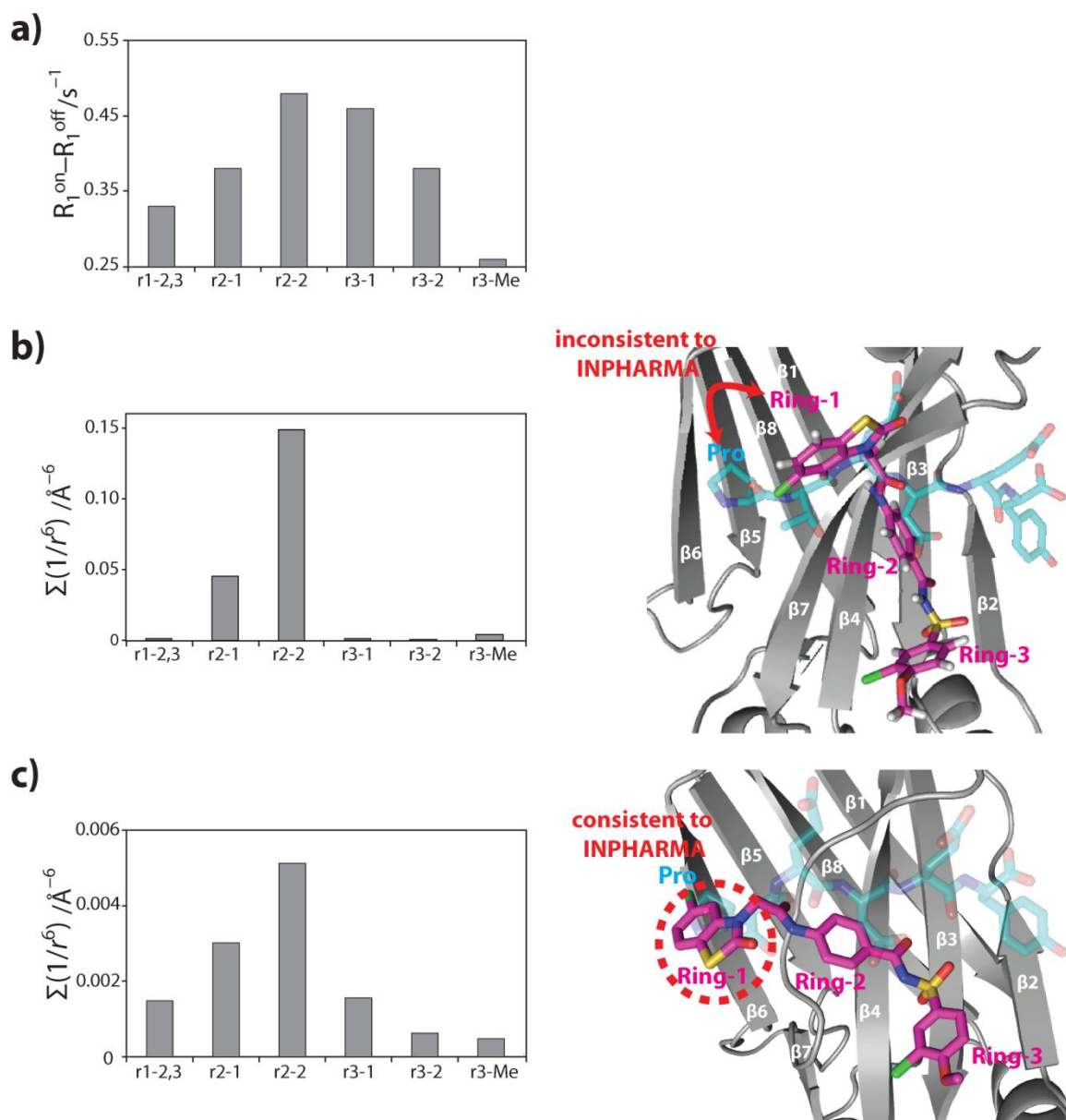


Figure 32 INPHARMA 実験の結果

左図において、RANK ペプチドと TRI4 の間の INPHARMA NOE シグナルは赤で着色した。RANK ペプチドの分子内 NOE シグナルは青で着色した。TRAF6 由来の NOE シグナルは黒で着色した。本スペクトルにおいては、同一（正）符号のシグナルのみを表示した。右図において、INPHARMA NOE シグナルが観測された部位を、青丸（RANK ペプチド）および赤丸（TRI4）で囲んだ。



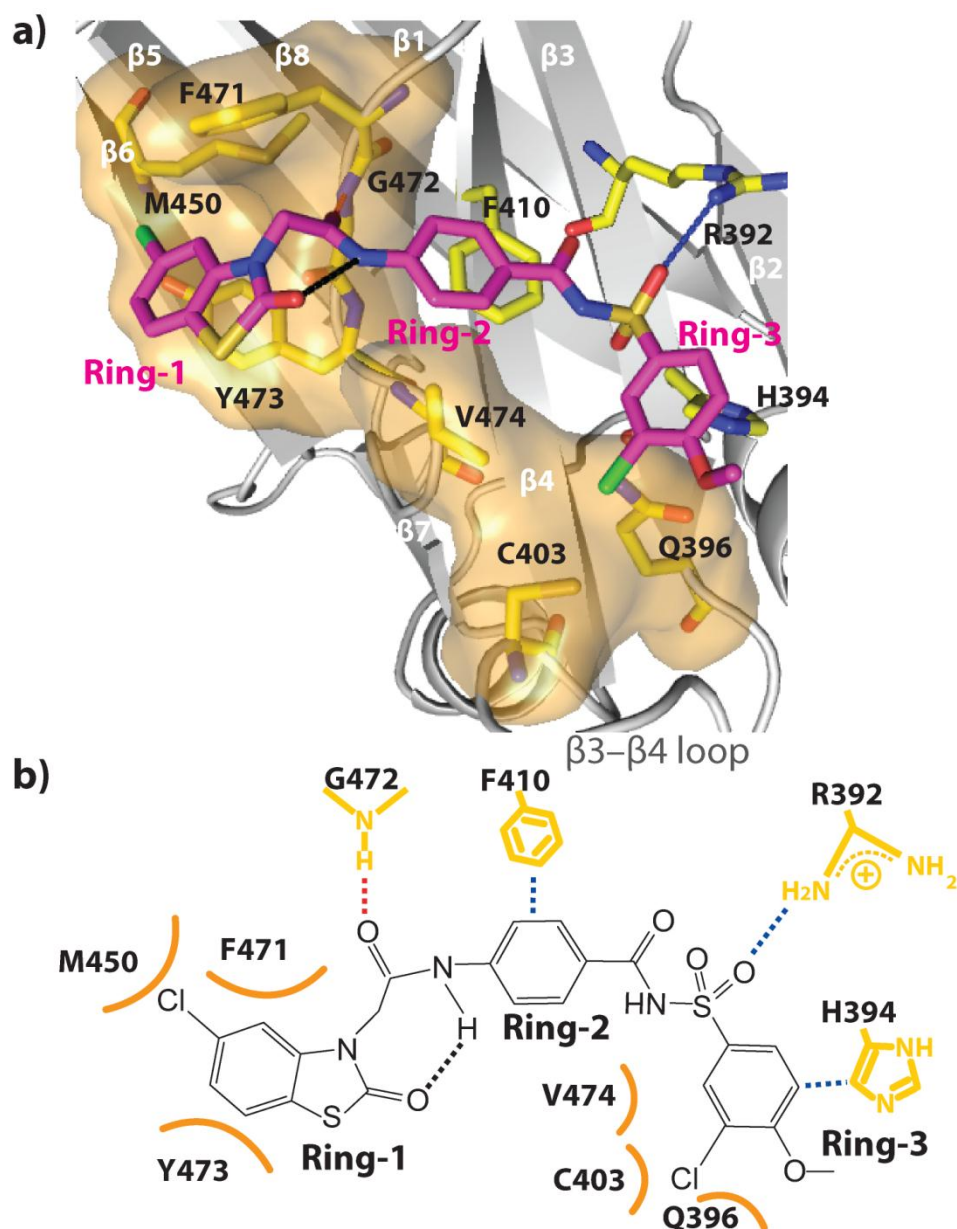


Figure 34 TRAF6-TRI4 複合体の最終構造モデル

(a) TRAF6-TRI4 最終構造モデルにおける鍵となる相互作用。赤および青点線はそれぞれ、TRAF6の主鎖および側鎖の関与する相互作用である。黒点線は TRI4 分子内の水素結合である。TRI4 との結合に関与する TRAF6 残基は黄スティックで示した。Ring-1 および ring-3 とファンデルワールス相互作用を形成すると考えられる残基は半透明のオレンジ表面で示した。(b) TRAF6-TRI4 構造モデルの模式図。各点線は (a) に対応する。ファンデルワールス相互作用はオレンジ曲線で示した。

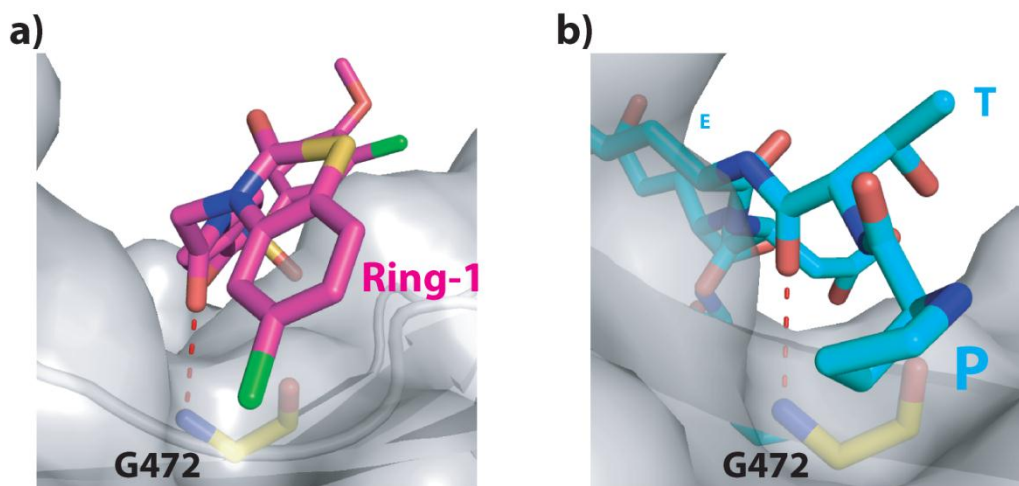


Figure 35 TRAF6 G472 のアミド基と TRI4 もしくは RANK ペプチドの水素結合

TRAF6 は灰色のリボンおよび表面表示とした。G472 は黄スティックで示した。TRI4 (a) および RANK ペプチド (b) はそれぞれ、マゼンタおよびシアンスティックで示した。赤点線は分子間の水素結合を示す。

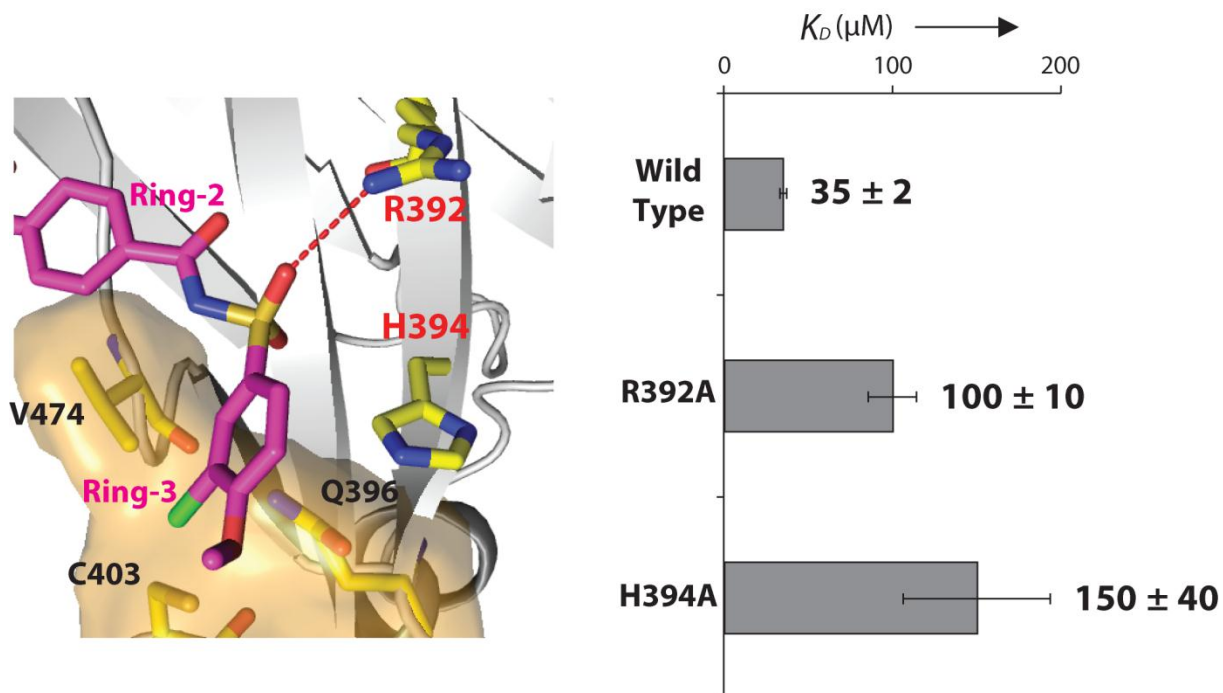


Figure 36 野生型および点変異を導入した TRAF6 に対する TRI4 の結合親和性解析

左図には、TRAF6（灰色リボン、黄スティックおよび半透明オレンジ表面表示）結合状態における TRI4（マゼンタスティック）の ring-2・ring-3 周辺構造を示す。得られた最終構造モデルにおいて結合への関与が示唆される 2 残基に変異導入を行った（R392A および H394A）。結合親和性の測定は、化合物滴定に伴う TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおける各シグナル位置の変化を指標にして行った。最終的な K_D 値は、各シグナルについて算出された値の平均値を用いた。各棒グラフから左右に延びる細いバーは標準偏差を示す。

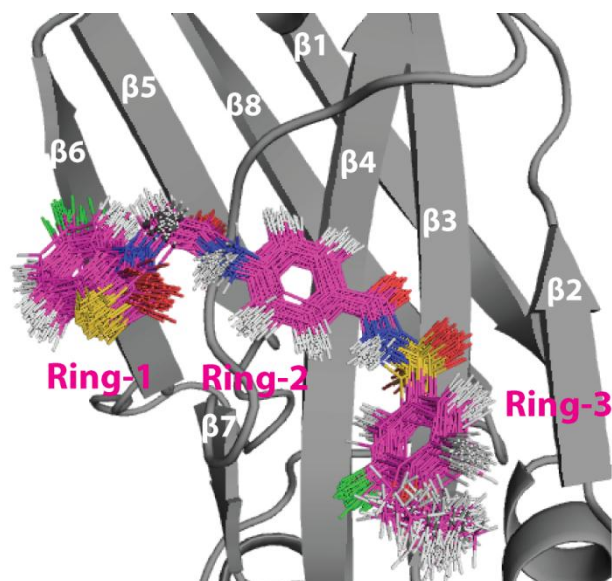


Figure 37 TRAF6-TRI4 最終構造モデルを元にした MD 計算トラジェクトリの重ね合せ

4 ns の MD 計算において 40 ps ごとに抽出した 100 構造の重ね合わせ。TRAF6 は灰色リボン表示、TRI4 はマゼンタの線表示とした。

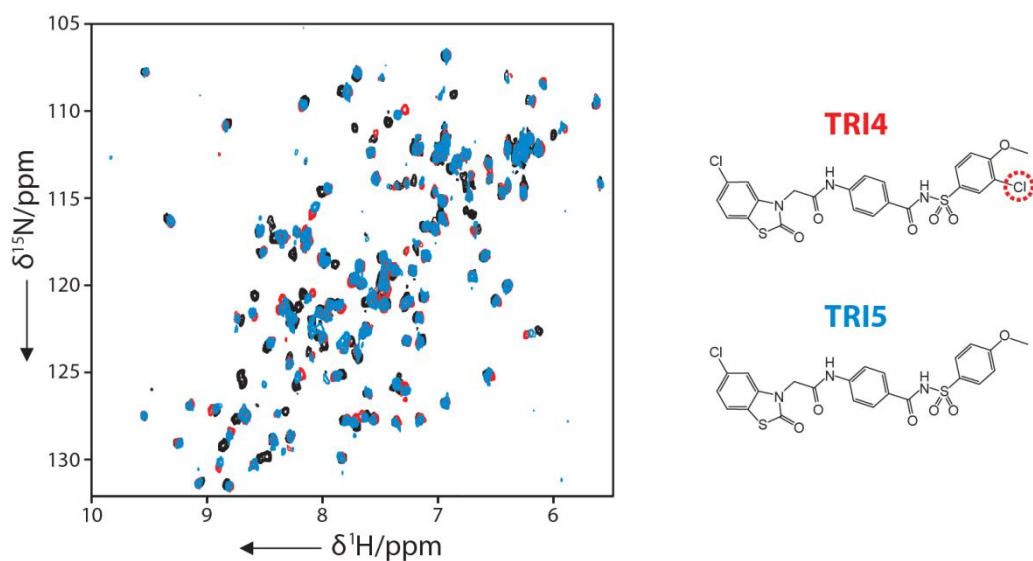


Figure 38 非結合状態（黒）および TRI4（赤）もしくは TRI5（青）存在下 TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

非結合状態 50 μM TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを黒で示した。100 μM TRI4 もしくは 500 μM TRI5 存在下の 50 μM TRAF6 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルはそれぞれ、赤もしくは青で示した。TRI4 は TRI5 に比べて、より低い濃度でより大きなスペクトル変化を誘起したことから、TRI4 の TRAF6 に対する結合親和性は、TRI5 よりも高いと考えられる。

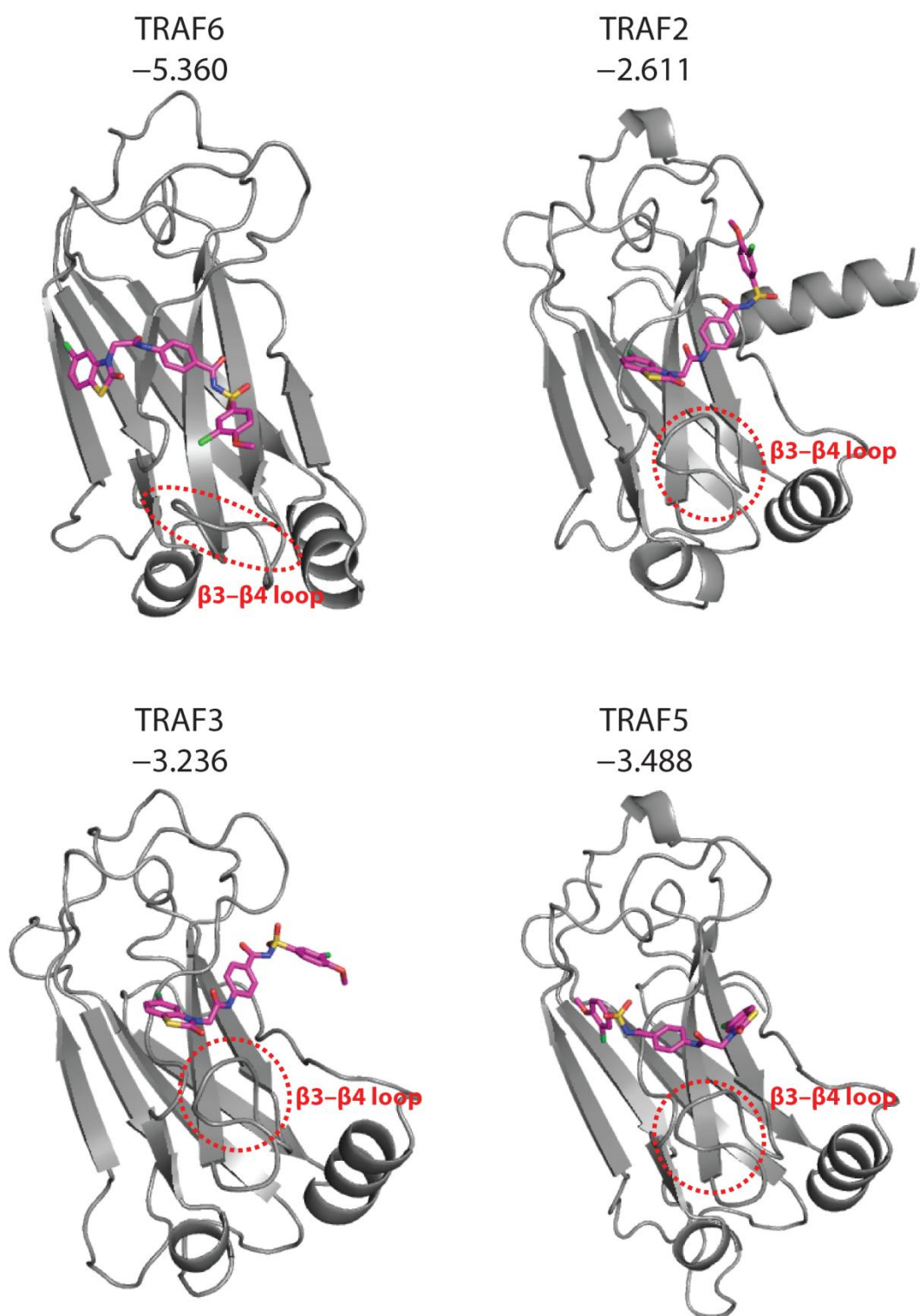


Figure 39 TRAF ファミリータンパク質に対する TRI4 ドッキング計算の最安定構造モデル比較

各 TRAF タンパク質名称の下に記載した数値は、本ドッキング構造モデルのスコアである。スコアの絶対値が大きいほど化合物が安定的に結合することを示している。

residue	Strand or loop	TRI1 K_D (μ M)	TRI4 K_D (μ M)
R431	β 5	2400	37
L432	β 5	1500	33
M450	β 6	2000	—
D451	β 6	1600	34
E455	loop	1500	38
F471	β 7	2200	35
Average		1900	35
STD		350	2.1

Table 1 TRAF6 の残基ごとに計算した結合親和性

TRI1 と TRI4 に関して、各残基において計算した K_D 値および各残基が位置するストランド番号。

TRI4 添加時の M450 については、シグナルが消失したため計算できなかった。STD : standard deviation (標準偏差)。

第4章 考察

第1節 TRAF6 を標的とした化合物スクリーニングに関する考察

平坦な結合界面を有する TRAF6-TNFRSF の結合阻害作用を有する低分子化合物の効果的探索を企図し、本研究においては内在性リガンドである RANK ペプチド構造を利用した *in silico* スクリーニング (MSM-MTS 法) を行った。本節では、本スクリーニングのヒット率および得られた化合物 TRI1 に関する考察を行う。

第1項 化合物スクリーニングにおけるヒット率について

本研究においては化合物探索の最初期段階で *in silico* スクリーニング手法の一つである MSM-MTS 法を活用し多様な構造を有する 100 万化合物から 20,000 化合物まで絞込みを行い、続いて原理の異なる *in silico* スクリーニング手法である Glide による絞込みなどを経て、最終的に 734 化合物を選抜した。このうち NMR 解析により TRAF6 への結合が認められた (Figure 11) 少なくとも 4 化合物を真のヒットと考えると、*in silico* 手法を用いた化合物選抜後のヒット率は約 0.57% である。本標的に対してランダムスクリーニングを行った事例の報告は存在しないが、酵素や PPI を含む多様な創薬標的に対する NMR を用いたランダムスクリーニングのヒット率を解析した文献によると⁷⁵、標的への結合評価におけるヒット率はすべて 1% 以下であり、特に PPI に限ればそのヒット率は平均 0.24% と低い。TRAF6 においては、標的部位が極めて平面的で、一般的な低分子薬剤に比べて比較的大きな内在性 RANK ペプチド (分子量 752.7) の結合親和性が 100 μ M と低いことから、TRAF6 に対して高い結合親和性を有する低分子化合物の創製は比較的難度が高いと考えられる。このような難度の高い標的に対し、上記文献平均値よりも高い割合でヒット化合物を見出したことから、今回採用した *in silico* スクリーニングフローは、化合物絞込みの効率向上に有効であったと考えられる。

第2項 絞り込まれる化合物の結合様式に関する考察

本研究の印刷公表前に報告された唯一の TRAF6–TNFRSF 結合阻害剤として、Chatzigeorgiou らが発見した低分子化合物、6877002 が挙げられる¹³。6877002 の結合部位は、TNFRSF ペプチドの C 末端残基結合領域付近であり (Figure 40)、TRI4 の結合部位 (TNFRSF ペプチドの N 末端残基結合領域付近) とは重複しない。6877002 も *in silico* スクリーニングを基に発見された化合物であるが、その化合物探索コンセプトは本研究とは異なるものである。Chatzigeorgiou らはまず、TRAF6 上で化合物が入り込めるポケットが TNFRSF ペプチドの C 末端残基結合領域である R466 (Figure 40) 付近に存在する可能性を考えた。次に、そのポケットに対して *in silico* スクリーニングおよび細胞を用いた化合物評価を行い、最終的に 6877002 を見出した。このように、Chatzigeorgiou らは当初から結合部位を残基レベルで限定して化合物を探索した。

一方、本研究において用いた MSM-MTS 法は、実験的に標的に結合することが明らかとなっているリガンド (活性化合物、ペプチドを含む) が高いドッキングスコアを獲得するようにパラメータを調整する工夫を施したものであり、本研究においては TRAF6 と結合することが実験的に確かめられている RANK ペプチドを活性化合物と定義してパラメータ調整に用いた。その結果得られた初期ヒット化合物 TRI1 や最終化合物 TRI4 は、Pro site (TNFRSF に共通して存在するプロリン残基が結合する TRAF6 表面のサイト、Figure 3 も参照のこと) も含む TNFRSF ペプチドの N 末端残基結合領域に結合する化合物であった (Figure 34)。第3章、第5節で述べたとおり、TRI4 の ring-1 および ring-1 と ring-2 をつなぐリンカー部の複合体構造は、RANK ペプチドの構造と類似しており (Figure 35)、TRI4 のこのような構造的特徴は、RANK ペプチドを活性化合物とした化合物スクリーニングに由来するものと考ええる。TNFRSF ペプチドの N 末端残基は TRAF6 との結合に必須であることが知られており、このような鍵相互作用を直接的にブロックする競合化合物を探索する際に、機械学習を活用した MSM-MTS 法は有効であったと考える。以上述べたように、先例とはコンセプトの異なる *in silico* 化合物探索手法である MSM-MTS 法を用いたことが、既報化合物 6877002 とは作用メカニズムが異なり、かつ結合親和性の高い化合物の創製につながったものと考ええる。

第2節 TEMPOL を用いた PS 解析結果の考察

本研究においてはまず、TEMPOL がタンパク質の ^{13}C 核に誘起する PS を指標とした分子間結合界面決定手法の開発を行った。その方法を TRAF6–TRI1 結合界面の決定と複合体モデル選択に応用し、化合物デザインのために有用な立体構造情報を提示した。PS は、結合に伴う分子量変化や運動性変化の影響を受けないことから、正確に溶媒露出度を反映すると考えられたが、一部の原子においては SASA との齟齬が見られた。本節第1項および第2項ではこの齟齬の原因を考察し、それを踏まえて第3項では本 NMR 手法の特徴について議論する。

第1項 タンパク質の表面検出にあたり観測された PS と SASA の齟齬に関する考察

0.04 ppm の PS 値を閾値したとき、結晶構造に基づいて定義したタンパク質内部 ($\text{SASA} = 0 \text{ \AA}^2$) と表面 ($\text{SASA} > 0 \text{ \AA}^2$) の判別を精度よく (約 85% の原子について) 行うことができた (Figure 19)。しかし、表面に存在することを正確に判別ができた原子の中に、同等の SASA を有する他の原子より顕著に大きな PS が観測された原子が存在した (I44- $\text{C}_{\gamma 1}$, $\text{C}_{\gamma 2}$, C_δ , V70- $\text{C}_{\gamma 1}$ および $\text{C}_{\gamma 2}$) (Figure 18)。これらの原子は ubiquitin の疎水性表面に局在する (Figure 41) ことから、常磁性中心近傍が疎水的性質を有する TEMPOL の滞在時間が他の部位に比べて長くなったため、顕著な PS が観測された可能性が考えられる。同様の考察は、他の文献においてもなされている⁴³。一方、K6- C_ϵ , E18- C_γ , S20- C_β , T22- C_γ および K63- C_ϵ については、同等の SASA を有する他の表面原子に比べて誘起された PS が小さかった (Figure 18)。これらの原子については、既に報告されているように⁷⁶、水和水によって TEMPOL の接近が妨げられた可能性が挙げられる。実際、 ^{13}C -edited NOESY–HSQC スペクトルにおいて帰属できなかった K63- C_ϵ を除いて、K6- C_ϵ , E18- C_γ , S20- C_β および T22- C_γ に直接結合している水素核と水の水素核との間に NOE ピークが観測されたことから (Figure 42)、安定的に存在する水和水によって TEMPOL の接近が妨げられている可能性がある。なお、これらの原子はいずれも親水性残基の側鎖末端に存在するため、水和水の影響を受けやすかったものとする。

次に、0.04 ppm の PS 値を閾値とした時、結晶構造を用いて計算した SASA から判定された内

部・表面の区別と齟齬が生じた 15%の原子について (Figure 19)、その齟齬の原因を考察する。はじめに、0.04 ppm 以上の PS が観測されたにもかかわらず、結晶構造においてタンパク質内部に存在する原子について考察する。K6-C α , T14-C β , Q31-C β , K33-C γ , F45-C α , I61-C α , V70-C β , L71-C γ および R72-C γ はタンパク質表面からの距離 (closest approach) が 2 Å 以内に存在していた。また、I61-C α を除き、これらの原子が属するアミノ酸の側鎖末端は結晶構造においてタンパク質表面に露出している。したがって、結晶構造においては溶媒がアクセスできない構造を保持するものの、溶液中においては、タンパク質表面の揺らぎによって一時的にタンパク質内部の原子が溶媒に露出し、TEMPOL と接触した可能性が考えられる。一方、観測された PS が 0.04 ppm 以下であったにもかかわらず、結晶構造においてタンパク質表面に存在する原子 (SASA > 0 Å²) も存在した。これら 19 原子中 13 原子においては、溶媒露出面積が 2 Å² 以下であり、他の表面原子に比べると狭い (Figure 18 の右軸において 2 Å² は極めて小さい値である)。さらに、これらの原子が属するアミノ酸の側鎖は、ubiquitin の他の部位と相互作用を形成していた。したがって、これらのアミノ酸側鎖は構造が固定されているため、SASA の計算に用いた 1.4 Å のプローブは接近可能であるが、長径が約 5 Å の TEMPOL は接近できない可能性がある。別の可能性としては、上述のように、水和水によって TEMPOL の接近が妨げられた可能性が挙げられる。

以上の考察では、PS と SASA のパターンの差異が特徴的な原子を取り上げ、TEMPOL の局所的滞在時間の違い、水和水による TEMPOL との接触頻度の低下、タンパク質自身の溶液中における揺らぎ、および SASA 計算におけるパラメータ設定により、TEMPOL により誘起される PS と SASA の相関が低下する可能性を指摘したが、本研究においては適切な閾値を設定することにより 85%の原子について結晶構造と齟齬のない結果を得られた。特に、明らかに表面に露出する原子および内部に存在する原子については、ほぼ完璧に判別できたことから (Figure 20)、PS を指標として比較的高い精度で表面と内部の判別することが可能であると結論できる。

第2項 PPI 界面検出にあたり観測された PS と SASA の齟齬に関する考察

YUH1 結合に伴い PS 値が 0.05 ppm 以上減少した原子は一つの領域に局在し、既に明らかと

なっている複合体結晶構造におけるほとんどの結合界面原子と一致した (Figure 24)。この結果から、PS を用いて結合界面を同定することに成功したと結論した。しかし、複合体形成に伴う PS 値の減少が観測されなかったにもかかわらず、結晶構造解析において結合界面に存在する原子、またはその逆の挙動を示す原子がわずかに存在した (Figure 23)。これらの原子について考察を行う。

T9-C_βおよび K11-C_βにおいては、複合体形成に伴う PS 値の減少が観測されなかったにもかかわらず、結晶構造においては結合界面に存在する。YUH1 との複合体状態において、T9-C_βにおいては 0.054 ppm の PS が誘起されている (Figure 22)。この値は、非結合状態の ubiquitin において設定したタンパク質表面の判定基準 (0.04 ppm 以上) を適用すると、表面に存在すると判定される。さらに、同じ残基に存在する T9-C_γについては、非結合状態の ubiquitin に比べると PS 値が大きく減少したため結合界面に存在すると判定されたものの、YUH1 結合状態においても 0.1 ppm の大きな PS が観測され (Figure 22)、溶液中では YUH1 結合状態においても溶媒に露出することを示している。結晶構造において T9 は結合界面の端に存在し、側鎖近傍には構造を固定する水素結合可能な部位が存在しない (Figure 43a)。したがって、複合体状態における T9 側鎖は溶液中において運動性を有し、一時的に溶媒に露出することにより複合体状態においても比較的大きな PS が観測された可能性が考えられる。また、K11-C_βおよび K11 中の他の脂肪族 ¹³C についても、複合体状態において 0.04 ppm 以上の PS が誘起されていることから (Figure 22)、K11 側鎖も複合体において溶媒に露出する状態を取ることが示唆される。K11 は結合界面の端に位置し、末端のアミノ基が分子内 (ubiquitin) の E34 のカルボキシル基と静電相互作用を形成しているため、K11 は構造が固定されていると考えられる (Figure 43b)。一方、K11 近傍には静電相互作用を形成しうる負電荷を有する残基が、YUH1 側に存在しない。したがって、K11 近傍の YUH1 側に運動性が存在し、一時的に K11 が溶媒に露出した構造を取る可能性が考えられる。

一方、K6-C_β, C_βおよび Q49-C_βは、複合体形成に伴い PS が大きく減少したにも関わらず、結晶構造においては非結合界面に存在する原子である。K6 の側鎖先端のアミノ基は、YUH1 非結合状態の ubiquitin においては溶媒に露出しているが、複合体形成に伴い側鎖が折れ曲がり、

ubiquitin の T7 の主鎖カルボニル酸素原子と水素結合を形成する (Figure 44a)。また、Q49 の側鎖 NH₂ は、YUH1 非結合状態の ubiquitin において溶媒に露出しているが、複合体においては水和水を介して YUH1 の D35 のカルボキシル基と相互作用を形成することが結晶構造から示唆される (Figure 44b)。以上より、K6 および Q49 の側鎖は結合界面には存在しないものの、複合体形成に伴い構造を固定するような構造変化を受け、SASA および PS が減少したと考えられる。

第3項 TEMPOL による PS を用いた分子間結合界面決定手法の特徴

従来使用されてきたパラメータである PRE は、TEMPOL などのように電子緩和時間の長い常磁性物質を緩和源とした場合、観測対象分子の回転相関時間の寄与が含まれてしまうことが報告されている^{44, 77}。このため PRE 自体に、複合体形成に伴う溶媒露出度変化以外に、分子量変化や運動性変化の影響も含まれる。一方、ubiquitin-YUH1 相互作用系を解析対象とした実験で示したように、PS は複合体形成に伴う分子量変化 (回転相関時間) の影響をほとんど受けない。そのため PS は、PRE と比較して純粋な溶媒露出度変化を検出でき、タンパク質-低分子相互作用だけでなく、複合体形成に伴い分子量が大きく変化する PPI の結合界面解析まで幅広く活用可能な正確性の高いパラメータである。

また、溶媒露出度の変化に基づく本手法は、特に、水素核間の双極子-双極子相互作用に基づく分子間 NOE 解析や交差飽和法では精度の高い解析が困難であった、糖およびヌクレオチド、場合によっては低分子薬剤候補化合物など、タンパク質に比べて水素密度の低い分子を解析対象とする場合に、有用性が高いと考える。また、TRAF6-TR11 複合体 ($K_D = 1.9$ mM) のように、結合親和性が極めて低い相互作用系においても、観測対象 (本研究では TRAF6) の結合飽和度を高めれば結合界面原子を検出できることが明らかとなった。この結果から、本手法は、nM-mM レンジの結合親和性を有する相互作用系が解析可能な、適用範囲の広い手法といえる。なお、比較的速い分子間結合・解離が手法の原理的基盤である INPHARMA や DIRECTION 法の適用範囲は、一般的に親和性が nM オーダーよりも強い薬剤候補化合物を対象とする解析には適用が難し

い。PSに基づく手法はさらに、TRAF6–TRI1 複合体における Y473-C₈および C_eを対象とした解析で示したように、タンパク質の部位選択的な解析も可能である。そのため、側鎖全体の帰属が困難なケースにおいても本手法は活用可能である。

一方、本節第1項と第2項にて考察したように、溶媒露出度自体がタンパク質の運動性などの影響を受ける場合もある。得られる構造情報の確度を向上させるためには、本研究で用いたようなMD計算も含め、活用可能なデータを本手法と組み合わせ、総合的に考察を行うことが重要と考える。

第3節 TRI4 の作用メカニズムに関する立体構造的観点からの考察

PSにより得られた結合界面情報を元に選択したTRAF6–TRI1 複合体立体構造モデルを利用して化合物合成展開を行うことにより、最終的に内在性RANK ペプチドを凌駕する結合親和性を有する化合物TRI4を得た。本節ではTRI4のTRAF6との相互作用様式について、TRI1から概ね保存されている相互作用（第1項）および新たに獲得した相互作用（第2項）を分析することにより、TRI4が高い結合親和性を獲得できた理由および標的PPI阻害のメカニズムについて考察する。また第3項においてはTRI4のTRAF6結合における、他のTRAFファミリータンパク質に対する標的選択性について議論する。

第1項 TRI4 の TRAF6 相互作用様式の由来について（TRI1 との比較）

TRI4は、*in silico* スクリーニングヒット化合物であるTRI1を起点として合成展開を行った結果、創製された化合物である。どちらの化合物についてもTRAF6のHSQCスペクトルにおける各シグナルについて計算した*K_D*値がほぼ一定であったことから、TNFRSF結合部位と1：1で結合することが強く示唆された（Table 1）。両化合物の構造モデルを比較すると、ring-1とring-2を結ぶリンカーと87ストランドの間の相互作用様式など、細かい相互作用について相違点はあるものの、TRI4はTRI1の結合様式を概ね維持している（Figure 26とFigure 34の比較）。例えば、Pro siteについては、塩素原子導入による若干の位置変化があるものの、ポケットとのフ

ンデルワールス相互作用は維持されている。また、R392 との水素結合（静電相互作用）についても保持されている。TRI4 におけるアシルスルホンアミド基の pK_a は 5.4 前後であるため、生理条件下においては負電荷を有し、TRI1 におけるカルボキシル基の性質を維持するものである。TRAF6 のペプチド結合部位は正電荷の雰囲気にあることが知られており¹¹、負電荷を有する分子は速い結合にも貢献する可能性がある。さらにアシルスルホンアミド基は、負電荷を維持したまま化合物の延伸が可能である。この性質が、TRI1 の相互作用様式を維持したまま、ring-3 による付加的相互作用を形成する TRI4 の相互作用様式につながったものと考えられる。

第2項 TRI4 の標的 PPI 阻害メカニズム

最終的に得られた TRAF6–TRI4 複合体立体構造モデルにおいて、TRI4 の ring-1 と ring-2 は TNFRSF (RANK もしくは CD40) ペプチドに沿って結合している (Figure 33c)。さらに ring-1 および ring-1 と ring-2 をつなぐリンカー部については、TNFRSF ペプチドと同様の相互作用様式である (Figure 35)。したがって、ring-1 および ring-2 は TNFRSF ペプチドの結合阻害に直接的に関与する部位である。しかし、ring-3 を持たない TRI3 の結合親和性は極めて低い ($K_D = 990 \mu M$) ことから、結合親和性の獲得には ring-3 の相互作用が重要である。Ring-3 は TNFRSF ペプチド結合部位から大きく外れた位置 (B3–B4 ループ付近) で TRAF6 と相互作用している (Figure 33c、Figure 34)。CH- π 結合に関与する H394 の Ala 変異導入およびファンデルワールス相互作用への関与が示唆される ring-3 の塩素を除くことにより (TRI5) 結合親和性が低下することから (Figure 36、Figure 38)、B3–B4 ループ付近にフィットするよう構造最適化されたことが TRI4 の高親和性獲得要因であると考えられる。以上をまとめると、TRI4 は、ring-1 および ring-2 による TNFRSF ペプチドの直接的な競合阻害と ring-3 による高親和性獲得が組み合わせられることにより、標的 PPI を効果的に阻害するものと考えられる。

一方、TRAF2 において、B3–B4 ループは TNFRSF (CD40) ペプチドとの相互作用に寄与している (Figure 45a)。この一因として、TRAF2 の B3–B4 ループは、TRAF6 と比較して 1 残基欠失しループが短いため、TNFRSF ペプチドとの間の空間を適切に埋められる点が挙げられる。一

方、TRAF6における63-64ループはTNFRSFペプチド結合部位から大きく外れており (Figure 45b)、TNFRSFペプチドとの間には空間が存在する。TRI4はこのようにしてできた比較的大きな空間に適切にはまり込み、結合親和性を獲得したと考えられる。

第3項 他の TRAF ファミリータンパク質に対する標的選択性

第2項において、TRI4のring-3がTRAF6の特徴的63-64ループ構造により形成される空間にはまり込み、適切な相互作用を形成することにより結合親和性に寄与すると述べた。この相互作用は、他のTRAFファミリータンパク質に対する標的選択性にも貢献する可能性がある。第2項において言及したTRAF2だけでなく、TRAF3およびTRAF5においても63-64ループにおける1残基欠失が存在する。非結合状態のTRAF2/3/5/6の63-64ループ構造を重ね合わせるとTRAF2/3/5の構造はほぼ一致し (Figure 46)、いずれもTRI4のring-3相互作用部位をせり出したループが塞いでいる。実際に、TRAF2/3/5/6に対するドッキング計算結果を比較すると、TRAF2/3/5に対するTRI4の結合様式はTRAF6-TRI4複合体構造モデルと大きく異なるという結果が得られた (Figure 39)。さらに、最安定構造モデルのドッキングスコア絶対値を比較すると、TRAF6に対するTRI4のドッキングスコアが最も高かったことから (Figure 39)、TRI4がTRAF6に対する標的選択性を有する可能性が示唆される。以上の考察を裏付けるためにはTRAF2/3/5に対するTRI4の結合親和性を実験的に評価する必要があるものの、これまで得られた結果から、ring-3はTRAF6との高い親和性に寄与するだけでなく、TRI4の標的選択性にも寄与する可能性があると考えられる。2014年に報告された文献¹³において、TRAF2/3/5を介するシグナル伝達は糖尿病性肥満および炎症に対して抑制的に作用するのに対し、TRAF6を介するシグナル伝達は逆にこれらを悪化させることがモデルマウスを用いた実験で示されている。したがって、TRAFファミリータンパク質のうちのTRAF6とTNFRSFペプチドの相互作用を選択的に阻害する化合物は、薬効の増強および副作用の低減につながる可能性が期待される。

第4節 本研究により得られた化合物探索戦略の他の PPI に対する応用

前節において、PPI 阻害のためには一部の鍵相互作用を阻害するだけで十分であり、界面全体と相互作用を形成する必要はない場合があることを示した。この PPI 阻害に関する概念がどのような PPI に対して一般的に有効であるか、本節において議論する。

本研究において標的とした PPI、TRAF6–TNFRSF 複合体の結合界面面積は約 1000 Å² であり、一般的な PPI 界面面積 (1500–3000 Å²) と比べると狭く、鍵相互作用を形成する部位が比較的狭い範囲に集中している。TRAF6–TNFRSF 複合体のように、数残基のモチーフが相互作用に関わる PPI は多数知られており⁷⁸、全体の 15–40%を占めるという推計も存在する⁷⁹。このような標的群に対しては本研究で活用した MSM-MTS 法を用いた化合物スクリーニングおよび鍵相互作用を標的とした立体構造に基づく化合物設計戦略は有効な選択肢となる。結合界面の広い PPI についても、界面全体が均等に結合自由エネルギーに関与しているわけではなく、全結合自由エネルギーに対する各界面部位の寄与は異なる。全体の結合自由エネルギーに対して特に大きな寄与のある界面部位はホットスポットと呼ばれ^{80,81}、ホットスポットが界面の限られた領域に局在している PPI については、結合界面が広い場合においても低分子の標的になり得ることが報告されている⁷⁹。このような標的に対しては、本研究における化合物探索戦略が活用できる可能性がある。なお、ホットスポットの位置を実験的に同定する手法(アラニンスキャンニング)⁸¹や計算科学的手法を用いて推定する方法^{82,83}などが複数開発されており、これらの手法を活用して標的とする PPI のホットスポット位置を事前に解析することにより、低分子阻害剤探索の難易度を評価することが可能である。

第5節 化合物探索における NMR 活用に関する考察

本論文を通して、NMR は化合物探索の様々な場面において活用可能であることを示してきた。本章の最後に、PPI 阻害作用を有する低分子化合物探索における NMR の活用について、本論文における実験結果を元に考察する。

本研究の標的 TRAF6 のようにタンパク質の溶解度が低く (TRAF6 の溶解度は 50–100 μM)、

従来法であるディスタンスジオメトリーによる複合体立体構造決定²⁶が困難な場合、NMR により選択的に抽出した分子間結合界面の構造情報をドッキング計算結果の解釈に活用すること、もしくはドッキング計算に組み込むことによって迅速かつ確度の高い構造モデルの選択・構築が可能となった。

具体的事例の一点目として、PS を用いた溶媒露出面解析法の開発・活用を行い、実験データに基づく、初期ヒット化合物 TRI1 と TRAF6 の複合体立体構造モデル選択に活用した（第3章、第3節、第2項、Figure 25）。このような初期ヒット化合物との構造モデルは、化合物設計の方向性を決定する際に有用な情報となる（Figure 26）。二点目として、最終化合物 TRI4 と TRAF6 の複合体立体構造モデル構築について、DIRECTION 法により得られた TRI4 の各水素核の TRAF6 からの距離情報を組み込んだドッキング計算を行った（第3章、第5節、Figure 33）。その結果得られた構造モデルから、INPHARMA 実験結果と矛盾しないモデルを得ることに成功した（Figure 33）。本構造モデルにより、本章第3節に記載したように、TRI4 のユニークな標的 PPI 阻害メカニズムが明らかとなった。以上述べたように、NMR および X 線結晶構造解析などによる精緻な構造決定ができない場合においても、NMR により得られる結合界面に関する部分的な実験データと計算科学的手法を組み合わせることにより、化合物設計およびメカニズム解明に有用な立体構造情報を得ることが可能であることが本研究によって示された。なお、序論にも記載したとおり、各 NMR 手法の適用範囲が異なるため、状況に応じて手法を使い分ける、もしくは組み合わせることが重要である。

また、NMR の特長の一つとして、溶液中で解析対象由来のシグナルを直接観測できるため、分子間結合を高い信頼性で容易に解析できる点が挙げられる。例えば、第3章、第1節で示した TRAF6 と初期ヒット4化合物の相互作用解析のように、溶液中で分子を混合するだけで結合有無の判定が可能となる。さらに、第3章、第2節および第3章、第4節においてそれぞれ示した TRI1 および TRI4 と RANK ペプチドの TRAF6 に対する競合評価も分子を混合するだけで確度の高い評価が可能である（Figure 14c、Figure 28）。このような NMR の特長は、創薬において、化合物の薬効が標的への特異的結合に由来すること（*Target engagement*⁸⁴）を証明する際などに有効

である。*Target engagement* は医薬品の承認を得る際に、近年特に必要とされる項目になりつつある。

さらに、NMR はタンパク質および化合物の性状解析においても有用である。タンパク質や化合物の凝集性や低い安定性は、構造解析に適さないだけでなく各種アッセイ結果に影響を与え、化合物設計の方向性を誤らせる可能性がある。したがって、タンパク質および化合物の性状を確認することは重要である。本研究においては、4 個の初期ヒット化合物が TRAF6 の凝集性に及ぼす影響の解析に NMR を活用し、TRAF6 の安定性に対して影響を与えない化合物 TRI1 を選抜した（第 3 章、第 1 節、Figure 12）。また、TRI1 および TRI4 については複数の化合物濃度における NMR スペクトルを測定することにより、化合物自身の凝集性（分子間相互作用）や分解がほとんど無いことを確認した（第 3 章、第 4 節、Figure 29）。

以上述べたように、NMR は測定条件下の標的タンパク質および化合物の状態（凝集や分解の有無など）を溶液中でモニターしながら、分子間結合の検出、分子間競合評価および化合物結合部位・様式などに関する情報抽出を行うことができる。これらの情報は、合理的な化合物選抜および化合物設計に貢献し、化合物探索研究を加速するものとする。

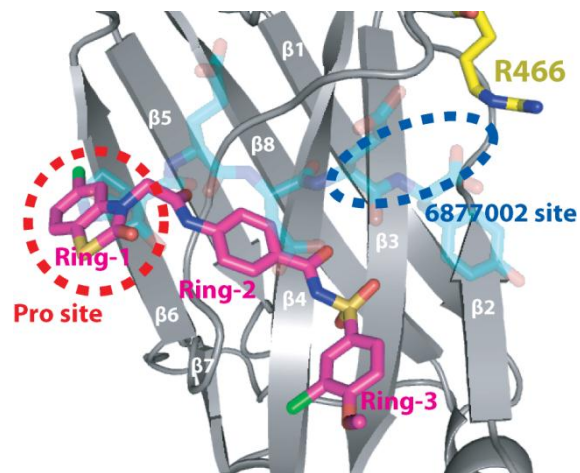
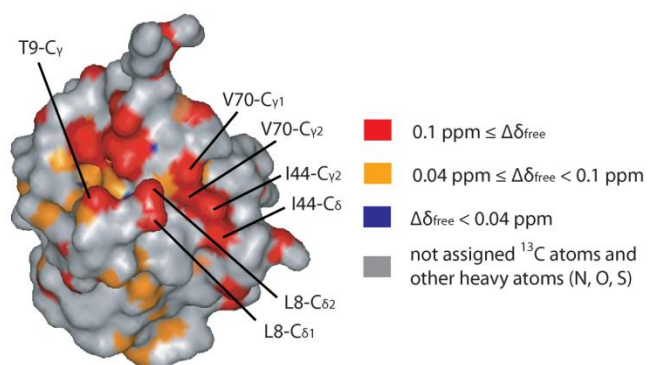


Figure 40 6877002 の結合部位

TRAF6-TR14 複合体構造モデル上に、文献¹³に示されている 6877002 の結合部位を青点線で囲んだ。R466 は黄スティック表示とした。RANK ペプチドは半透明シアンスティック表示とした。

a) Paramagnetic shift analysis



b) Property of ubiquitin surface

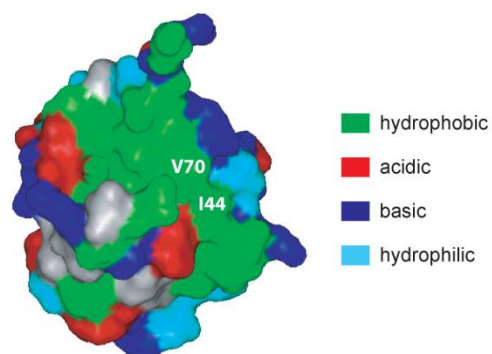


Figure 41 非結合状態 ubiquitin の各 ^{13}C 核に誘起された PS および各アミノ酸残基の性質

Ubiquitin の X 線結晶構造 (PDB code 1UBI) 上に色付けした。(a) 各原子は、Figure 20 と同じ基準に従い着色した。(b) 疎水性残基、酸性残基、塩基性残基および親水性残基をそれぞれ、緑、赤、青および水色で着色した。

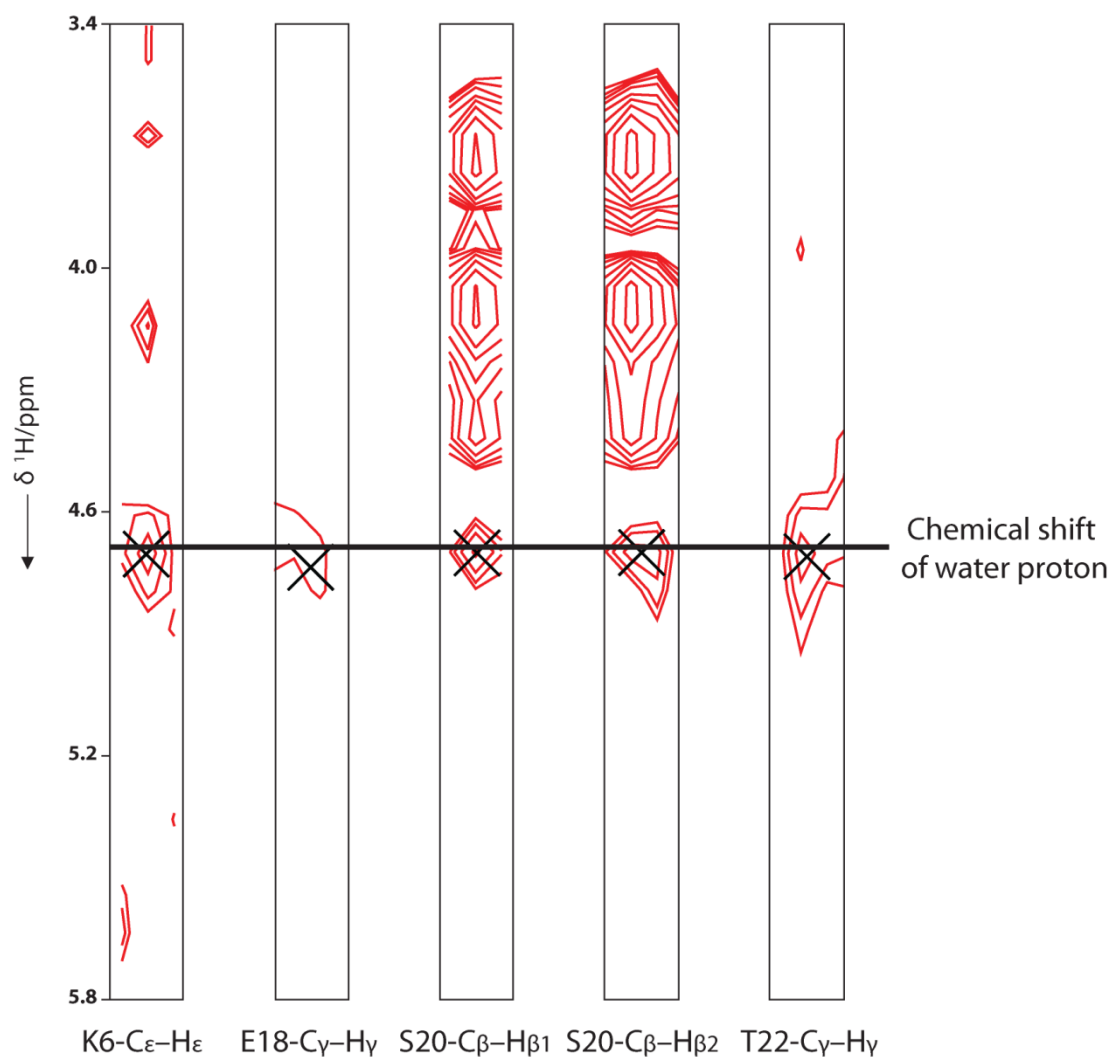


Figure 42 Ubiquitin の水素核と水の水素核の間に観測された NOE シグナル

Ubiquitin サンプルについて ^{13}C -edited NOESY-HSQC を測定した。本図に示すように、観測された PS が SASA から想定されるよりも小さかった原子 (K6-C ϵ , E18-C γ , S20-C β および T22-C γ) に隣接する水素核と水の水素核の間には、NOE シグナルが観測された。このことから、これらの原子については、安定的に存在する水和水の影響で TEMPOL が接近できない可能性が考えられる。なお、E18 のシグナルはシグナルが低磁場側にシフトしているように見えているが、強度が低いため正確な水の化学シフトからずれているものと考えている。

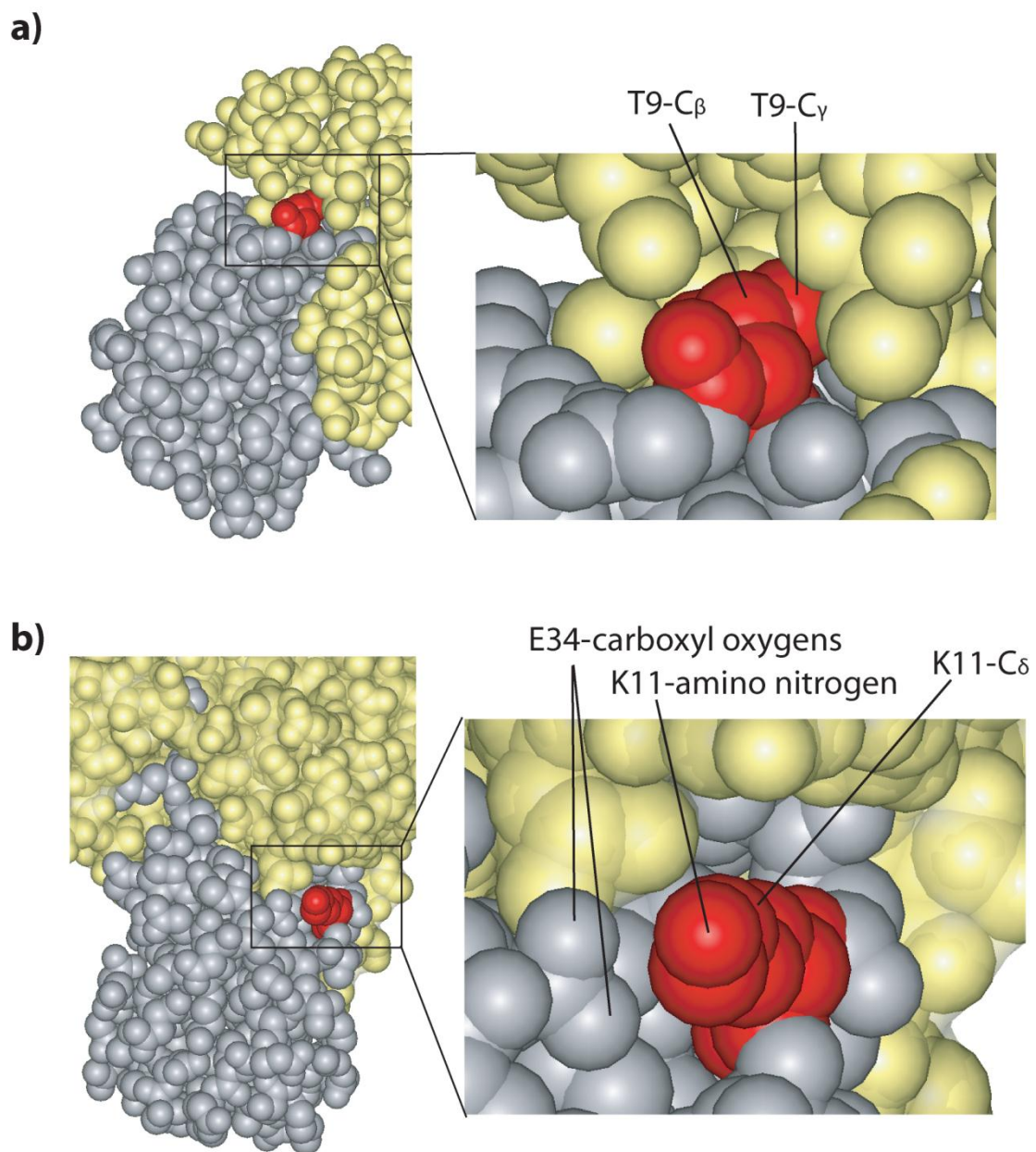


Figure 43 Ubiquitin の T9 (a) および K11 (b) の周辺構造

Ubiquitin は灰色、YUH1 は黄色の CPK 表示とした。T9 (a) および K11 (b) は赤で着色した。

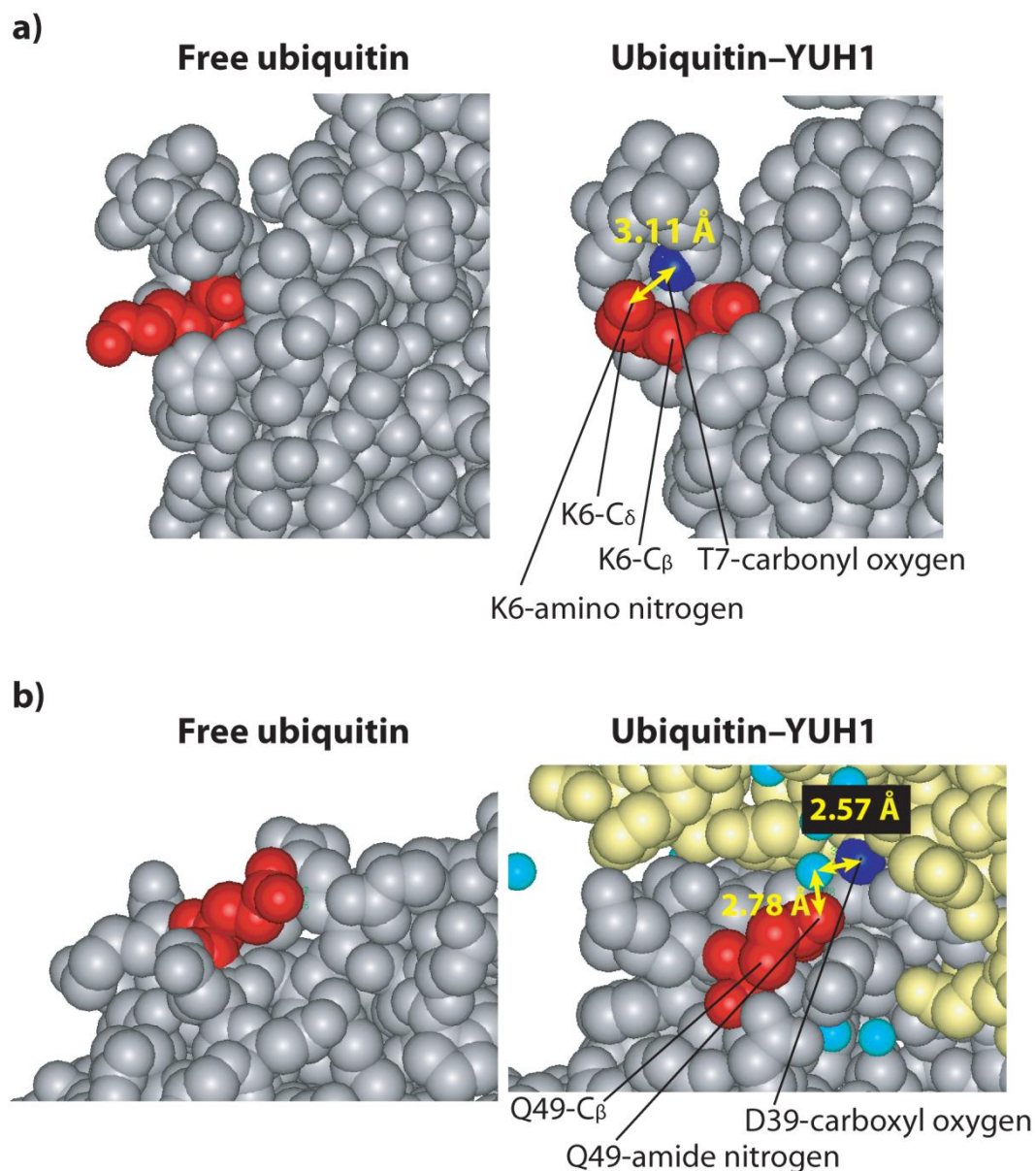


Figure 44 Free ubiquitin および ubiquitin-YUH1 複合体における K6 (a) および Q49 (b) の周辺構造

Ubiquitin は灰色、YUH1 は黄色の CPK 表示とした。K6 (a) および Q49 (b) は赤で、T7 のカルボニル炭素原子 (a) および D39 のカルボキシル炭素原子 (b) は青で着色した。(a) の ubiquitin-YUH1 複合体構造においては、見易さのため YUH1 の構造は省略した。(b) の ubiquitin-YUH1 複合体構造については、結晶構造において観測される水分子をシアン CPK で表示した。

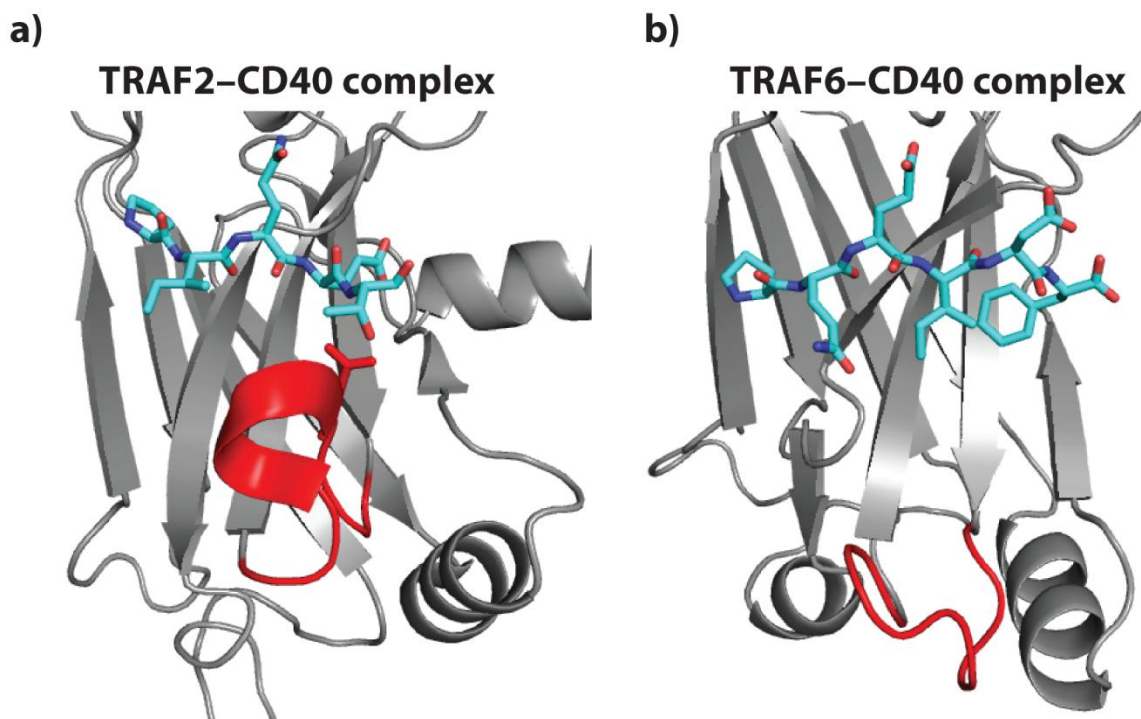


Figure 45 TRAF2 (a) および TRAF6 (b) と CD40 ペプチドの相互作用様式

TRAF2 および TRAF6 をグレーのリボン表示で、CD40 ペプチド (配列 PQEIDF) をシアンのスティック表示で示した。83-84 ループは赤で着色した。TRAF2-CD40 複合体においては、83-84 ループに存在する D399 側鎖 (赤スティック表示) が CD40 との相互作用に関与している。TRAF2-CD40 複合体および TRAF6-CD40 複合体の PDB code はそれぞれ、1QSC および 1LB6 である。

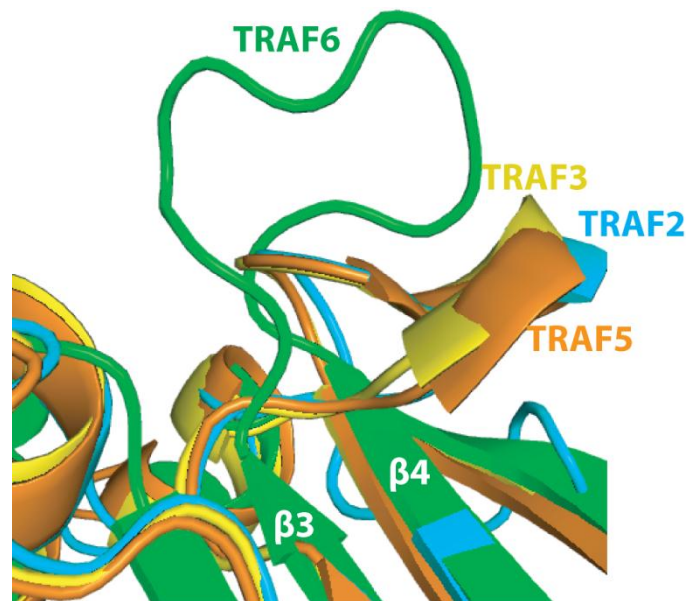


Figure 46 各 TRAF タンパク質における $\beta 3$ - $\beta 4$ ループ構造の比較

各 TRAF タンパク質における $\beta 3$ - $\beta 4$ ループの構造を重ねた。TRAF2、TRAF3、TRAF5 および TRAF6 構造はそれぞれ、シアン (PDB code 1CA4)、黄 (PDB code 1FLK)、オレンジ (PDB code 4GJH) および緑 (PDB code 1LB4) で示した。

第 5 章 結論

本研究において私は、TRAF6–TNFRSF 相互作用に対する PPI 阻害剤探索を行い、新規活性化化合物、TRI4 を見出しただけでなく、その各ステップにおいて NMR および計算科学的手法により得られる立体構造情報の活用が効果的な化合物探索・設計につながることを示した。初期化合物の探索には、標的 PPI 複合体の立体構造に基づく *in silico* 化合物探索手法として、MSM-MTS 法を活用した。その結果、内在性の鍵相互作用をブロックする初期ヒット化合物 TRI1 の取得に成功した。TRAF6–TRI1 複合体立体構造モデルの構築においては、常磁性物質が ^{13}C 核に誘起する化学シフト変化である PS に基づく新規分子間結合界面決定手法を開発・活用し、ドッキング計算により得られた複数の TRAF6–TRI1 立体構造モデルから最も確からしい構造を選択した。なお、本研究において、PS は解析対象の分子量や運動性に影響を受けず、正確な溶媒露出度の解析が可能なパラメータであることを証明した。本 NMR 実験データにより裏付けられた立体構造モデルを活用し化合物合成展開を行った結果、これまで報告の無かった内在性リガンドの結合親和性を凌駕する化合物、TRI4 の創製に成功した。最後に、INPHARMA および DIRECTION などの NMR 実験データに基づき、TRAF6–TRI4 複合体の立体構造モデルを構築し、TRI4 のユニークな PPI 阻害メカニズムを立体構造の観点から解明した。

序論において、PPI 阻害剤探索のボトルネックとして、低分子性テンプレートが存在しない点および結合界面が広い点を挙げた。本研究を通じて、前者については標的 PPI の立体構造を活用した化合物スクリーニング（MSM-MTS 法）が有効であること、後者については必ずしも PPI 界面全体を直接阻害する必要は無く、結合を特徴づける鍵相互作用を標的とすることにより低分子化合物を用いた効果的な PPI 阻害が可能であることを明らかにした。また、標的 PPI の鍵相互作用部位に対する相互作用だけでは結合親和性を十分に得られない場合、標的 PPI とは異なる部位・様式の相互作用を化合物に導入することにより、内在性 PPI を凌駕する結合親和性獲得が可能であることを示した。本研究成果は、TRAF6 を標的とする創薬の可能性を示しただけでなく、NMR と計算科学的手法を組み合わせ得られる立体構造情報を活用した PPI 阻害剤探索方針の一例を提示するものであり、他の PPI 阻害化合物探索にも資すると考える。

第 6 章 引用文献

1. Stumpf, M. P. H.; Thorne, T.; de Silva, E.; Stewart, R.; An, H. J.; Lappe, M.; Wiuf, C.
Estimating the size of the human interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6959–6964, 2008.
2. Venkatesan, K.; Rual, J.-F.; Vazquez, A.; Stelzl, U.; Lemmens, I.;
Hirozane-Kishikawa, T.; Hao, T.; Zenkner, M.; Xin, X.; Goh, K.-I.; Yildirim, M. A.; Simonis, N.;
Heinzmann, K.; Gebreab, F.; Sahalie, J. M.; Cevik, S.; Simon, C.; de Smet, A.-S.; Dann, E.;
Smolyar, A.; Vinayagam, A.; Yu, H.; Szeto, D.; Borick, H.; Dricot, A.; Klitgord, N.; Murray, R.
R.; Lin, C.; Lalowski, M.; Timm, J.; Rau, K.; Boone, C.; Braun, P.; Cusick, M. E.; Roth, F. P.;
Hill, D. E.; Tavernier, J.; Wanker, E. E.; Barabasi, A.-L.; Vidal, M. An empirical framework for
binary interactome mapping. *Nat. Methods* **6**, 83–90, 2009.
3. Arkin, M. R.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein–protein interactions:
progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug Discovery* **3**, 301–317, 2004.
4. Pagliaro, L.; Felding, J.; Audouze, K.; Nielsen, S. J.; Terry, R. B.; Krog-Jensen, C.;
Butcher, S. Emerging classes of protein–protein interaction inhibitors and new tools for their
development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 442–449, 2004.
5. Wells, J. A.; McClendon, C. L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at
protein–protein interfaces. *Nature* **450**, 1001–1009, 2007.
6. Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How many drug targets are there?
Nat. Rev. Drug Discovery **5**, 993–996, 2006.
7. Gul, S.; Hadian, K. Protein–protein interaction modulator drug discovery: past
efforts and future opportunities using a rich source of low- and high-throughput screening
assays. *Expert Opin. Drug Discovery* **9**, 1393–1404, 2014.
8. Lo Conte, L.; Chothia, C.; Janin, J. The atomic structure of protein–protein

recognition sites. *J. Mol. Biol.* **285**, 2177–2198, 1999.

9. Wu, H.; Arron, J. R. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *BioEssays* **25**, 1096–1105, 2003.

10. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756, 2003.

11. Ye, H.; Arron, J. R.; Lamothe, B.; Cirilli, M.; Kobayashi, T.; Shevde, N. K.; Segal, D.; Dzivenu, O. K.; Vologodskaya, M.; Yim, M.; Du, K.; Singh, S.; Pike, J. W.; Darnay, B. G.; Choi, Y.; Wu, H. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* **418**, 443–447, 2002.

12. Kobayashi, T.; Walsh, M. C.; Choi, Y. The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes infect.* **6**, 1333–1338, 2004.

13. Chatzigeorgiou, A.; Seijkens, T.; Zarzycka, B.; Engel, D.; Poggi, M.; van den Berg, S.; van den Berg, S.; Soehnlein, O.; Winkels, H.; Beckers, L.; Lievens, D.; Driessen, A.; Kusters, P.; Biessen, E.; Garcia-Martin, R.; Klotzsche-von Ameln, A.; Gijbels, M.; Noelle, R.; Boon, L.; Hackeng, T.; Schulte, K. M.; Xu, A.; Vriend, G.; Nabuurs, S.; Chung, K. J.; Willems van Dijk, K.; Rensen, P. C.; Gerdes, N.; de Winther, M.; Block, N. L.; Schally, A. V.; Weber, C.; Bornstein, S. R.; Nicolaes, G.; Chavakis, T.; Lutgens, E. Blocking CD40–TRAF6 signaling is a therapeutic target in obesity-associated insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2686–2691, 2014.

14. Kamijo, S.; Nakajima, A.; Ikeda, K.; Aoki, K.; Ohya, K.; Akiba, H.; Yagita, H.; Okumura, K. Amelioration of bone loss in collagen-induced arthritis by neutralizing anti-RANKL monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 124–132, 2006.

15. Durie, F. H.; Fava, R. A.; Foy, T. M.; Aruffo, A.; Ledbetter, J. A.; Noelle, R. J. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* **261**, 1328–1330, 1993.

16. van den Berg, W. B.; Joosten, L. A.; Helsen, M.; van de Loo, F. A. Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin. Exp. Immunol.* **95**, 237–243, 1994.
17. Joosten, L. A.; Helsen, M. M.; van de Loo, F. A.; van den Berg, W. B. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum.* **39**, 797–809, 1996.
18. Raychaudhuri, S.; Thomson, B. P.; Remmers, E. F.; Eyre, S.; Hinks, A.; Guiducci, C.; Catanese, J. J.; Xie, G.; Stahl, E. A.; Chen, R.; Alfredsson, L.; Amos, C. I.; Ardlie, K. G.; Consortium, B.; Barton, A.; Bowes, J.; Burt, N. P.; Chang, M.; Coblyn, J.; Costenbader, K. H.; Criswell, L. A.; Crusius, J. B.; Cui, J.; De Jager, P. L.; Ding, B.; Emery, P.; Flynn, E.; Harrison, P.; Hocking, L. J.; Huizinga, T. W.; Kastner, D. L.; Ke, X.; Kurreeman, F. A.; Lee, A. T.; Liu, X.; Li, Y.; Martin, P.; Morgan, A. W.; Padyukov, L.; Reid, D. M.; Seielstad, M.; Seldin, M. F.; Shadick, N. A.; Steer, S.; Tak, P. P.; Thomson, W.; van der Helm-van Mil, A. H.; van der Horst-Bruinsma, I. E.; Weinblatt, M. E.; Wilson, A. G.; Wolbink, G. J.; Wordsworth, P.; Consortium, Y.; Altshuler, D.; Karlson, E. W.; Toes, R. E.; de Vries, N.; Begovich, A. B.; Siminovitch, K. A.; Worthington, J.; Klareskog, L.; Gregersen, P. K.; Daly, M. J.; Plenge, R. M. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat. Genet.* **41**, 1313–1318, 2009.
19. Okada, Y.; Wu, D.; Trynka, G.; Raj, T.; Terao, C.; Ikari, K.; Kochi, Y.; Ohmura, K.; Suzuki, A.; Yoshida, S.; Graham, R. R.; Manoharan, A.; Ortmann, W.; Bhangale, T.; Denny, J. C.; Carroll, R. J.; Eyler, A. E.; Greenberg, J. D.; Kremer, J. M.; Pappas, D. A.; Jiang, L.; Yin, J.; Ye, L.; Su, D. F.; Yang, J.; Xie, G.; Keystone, E.; Westra, H. J.; Esko, T.; Metspalu, A.; Zhou, X.; Gupta, N.; Mirel, D.; Stahl, E. A.; Diogo, D.; Cui, J.; Liao, K.; Guo, M. H.; Myouzen, K.; Kawaguchi, T.; Coenen, M. J.; van Riel, P. L.; van de Laar, M. A.; Guchelaar, H. J.; Huizinga, T.

- W.; Dieude, P.; Mariette, X.; Bridges, S. L., Jr.; Zhernakova, A.; Toes, R. E.; Tak, P. P.; Miceli-Richard, C.; Bang, S. Y.; Lee, H. S.; Martin, J.; Gonzalez-Gay, M. A.; Rodriguez-Rodriguez, L.; Rantapaa-Dahlqvist, S.; Arlestig, L.; Choi, H. K.; Kamatani, Y.; Galan, P.; Lathrop, M.; consortium, R.; consortium, G.; Eyre, S.; Bowes, J.; Barton, A.; de Vries, N.; Moreland, L. W.; Criswell, L. A.; Karlson, E. W.; Taniguchi, A.; Yamada, R.; Kubo, M.; Liu, J. S.; Bae, S. C.; Worthington, J.; Padyukov, L.; Klareskog, L.; Gregersen, P. K.; Raychaudhuri, S.; Stranger, B. E.; De Jager, P. L.; Franke, L.; Visscher, P. M.; Brown, M. A.; Yamanaka, H.; Mimori, T.; Takahashi, A.; Xu, H.; Behrens, T. W.; Siminovitch, K. A.; Momohara, S.; Matsuda, F.; Yamamoto, K.; Plenge, R. M. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**, 376–381, 2014.
20. Kobayashi, N.; Kadono, Y.; Naito, A.; Matsumoto, K.; Yamamoto, T.; Tanaka, S.; Inoue, J. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* **20**, 1271–1280, 2001.
21. Hostager, B. S. Roles of TRAF6 in CD40 signaling. *Immunol. Res.* **39**, 105–114, 2007.
22. Yamazaki, K.; Gohda, J.; Kanayama, A.; Miyamoto, Y.; Sakurai, H.; Yamamoto, M.; Akira, S.; Hayashi, H.; Su, B.; Inoue, J. Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Sci. Signaling* **2**, ra66, 2009.
23. Kato, M.; Utata, R.; Tsuganezawa, K.; Tanaka, A. [Basic detection methods for protein–protein interaction inhibitors]. *Protein, Nucleic Acid, and Enzyme (蛋白質・核酸・酵素)* **54**, 1557–1562, 2009.
24. Braisted, A. C.; Oslob, J. D.; Delano, W. L.; Hyde, J.; McDowell, R. S.; Waal, N.; Yu, C.; Arkin, M. R.; Raimundo, B. C. Discovery of a potent small molecule IL-2 inhibitor through fragment assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3714–3715, 2003.
25. Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.;

- Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677–681, 2005.
26. Wuthrich, K. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* **243**, 45–50, 1989.
27. Chen, Y.; Reizer, J.; Saier, M. H., Jr.; Fairbrother, W. J.; Wright, P. E. Mapping of the binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIAGlc. *Biochemistry* **32**, 32–37, 1993.
28. Gouda, H.; Shiraishi, M.; Takahashi, H.; Kato, K.; Torigoe, H.; Arata, Y.; Shimada, I. NMR study of the interaction between the B domain of staphylococcal protein A and the Fc portion of immunoglobulin G. *Biochemistry* **37**, 129–136, 1998.
29. Takahashi, H.; Nakanishi, T.; Kami, K.; Arata, Y.; Shimada, I. A novel NMR method for determining the interfaces of large protein–protein complexes. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 220–223, 2000.
30. Sakakura, M.; Noba, S.; Luchette, P. A.; Shimada, I.; Prosser, R. S. An NMR method for the determination of protein-binding interfaces using dioxygen-induced spin-lattice relaxation enhancement. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5826–5832, 2005.
31. Sakakura, M.; Oo-Puthinan, S.; Moriyama, C.; Kimura, T.; Moriya, J.; Irimura, T.; Shimada, I. Carbohydrate binding mechanism of the macrophage galactose-type C-type lectin 1 revealed by saturation transfer experiments. *J. Biol. Chem.* **283**, 33665–33673, 2008.
32. Sanchez-Pedregal, V. M.; Reese, M.; Meiler, J.; Blommers, M. J.; Griesinger, C.; Carlomagno, T. The INPHARMA method: protein-mediated interligand NOEs for pharmacophore mapping. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4172–4175, 2005.

33. Ono, K.; Takeuchi, K.; Ueda, H.; Morita, Y.; Tanimura, R.; Shimada, I.; Takahashi, H. Structure-based approach to improve a small-molecule inhibitor by the use of a competitive peptide ligand. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2597–2601, 2014.
34. Fukunishi, Y.; Mizukoshi, Y.; Takeuchi, K.; Shimada, I.; Takahashi, H.; Nakamura, H. Protein–ligand docking guided by ligand pharmacophore-mapping experiment by NMR. *J. Mol. Graphics Modell.* **31**, 20–27, 2011.
35. Mizukoshi, Y.; Abe, A.; Takizawa, T.; Hanzawa, H.; Fukunishi, Y.; Shimada, I.; Takahashi, H. An accurate pharmacophore mapping method by NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 1362–1365, 2012.
36. Foster, M. P.; Wuttke, D. S.; Clemens, K. R.; Jahnke, W.; Radhakrishnan, I.; Tennant, L.; Reymond, M.; Chung, J.; Wright, P. E. Chemical shift as a probe of molecular interfaces: NMR studies of DNA binding by the three amino-terminal zinc finger domains from transcription factor IIIA. *J. Biomol. NMR* **12**, 51–71, 1998.
37. Bertini, I.; Felli, I. C.; Gonnelli, L.; Pierattelli, R.; Spyrali, Z.; Spyroulias, G. A. Mapping protein–protein interaction by ^{13}C -detected heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **36**, 111–122, 2006.
38. Garrett, D. S.; Seok, Y. J.; Peterkofsky, A.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M. Solution structure of the 40,000 Mr phosphoryl transfer complex between the N-terminal domain of enzyme I and HPr. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 166–173, 1999.
39. Varani, L.; Gunderson, S. I.; Mattaj, I. W.; Kay, L. E.; Neuhaus, D.; Varani, G. The NMR structure of the 38 kDa U1A protein–PIE RNA complex reveals the basis of cooperativity in regulation of polyadenylation by human U1A protein. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 329–335, 2000.
40. Nakanishi, T.; Miyazawa, M.; Sakakura, M.; Terasawa, H.; Takahashi, H.; Shimada, I. Determination of the interface of a large protein complex by transferred cross-saturation

measurements. *J. Mol. Biol.* **318**, 245–249, 2002.

41. Takahashi, H.; Miyazawa, M.; Ina, Y.; Fukunishi, Y.; Mizukoshi, Y.; Nakamura, H.; Shimada, I. Utilization of methyl proton resonances in cross-saturation measurement for determining the interfaces of large protein–protein complexes. *J. Biomol. NMR* **34**, 167–177, 2006.
42. Petros, A. M.; Kopple, K. D. NMR studies of protein surfaces. The interaction of lysozyme with tri-N-acetylglucosamine. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 65–68, 1990.
43. Petros, A. M.; Mueller, L.; Kopple, K. D. NMR identification of protein surfaces using paramagnetic probes. *Biochemistry* **29**, 10041–10048, 1990.
44. Arumugam, S.; Hemme, C. L.; Yoshida, N.; Suzuki, K.; Nagase, H.; Berjanskii, M.; Wu, B.; Van Doren, S. R. TIMP-1 contact sites and perturbations of stromelysin 1 mapped by NMR and a paramagnetic surface probe. *Biochemistry* **37**, 9650–9657, 1998.
45. Prosser, R. S.; Luchette, P. A. An NMR study of the origin of dioxygen-induced spin-lattice relaxation enhancement and chemical shift perturbation. *J. Magn. Reson.* **171**, 225–232, 2004.
46. Chapter 2 The hyperfine shift. *Coord. Chem. Rev.* **150**, 29–75, 1996.
47. Bezsonova, I.; Evanics, F.; Marsh, J. A.; Forman-Kay, J. D.; Prosser, R. S. Oxygen as a paramagnetic probe of clustering and solvent exposure in folded and unfolded states of an SH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1826–1835, 2007.
48. Alexeev, D.; Bury, S. M.; Turner, M. A.; Ogunjobi, O. M.; Muir, T. W.; Ramage, R.; Sawyer, L. Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: chemically synthesized and native ubiquitin fold into identical three-dimensional structures. *Biochem. J.* **299 (Pt 1)**, 159–163, 1994.
49. Fukunishi, Y.; Mikami, Y.; Nakamura, H. The filling potential method: a method for estimating the free energy surface for protein–ligand docking. *J. Phys. Chem. B* **107**, 13201–

13210, 2003.

50. Fukunishi, Y.; Kubota, S.; Nakamura, H. Noise reduction method for molecular interaction energy: application to *in silico* drug screening and *in silico* target protein screening. *J. Chem. Inf. Model.* **46**, 2071–2084, 2006.
51. Fukunishi, Y.; Mikami, Y.; Kubota, S.; Nakamura, H. Multiple target screening method for robust and accurate *in silico* ligand screening. *J. Mol. Graphics Modell.* **25**, 61–70, 2006.
52. Fukunishi, Y.; Mikami, Y.; Sakai, K.; Kusudo, H.; Nakamura, H. Advanced *in-silico* drug screening to achieve high hit ratio – development of 3D-compound database. *Synthesiology* **2**, 60–68, 2009.
53. Kawabata, T.; Sugihara, Y.; Fukunishi, Y.; Nakamura, H. LigandBox: A database for 3D structures of chemical compounds. *Biophysics (Biophys. Soc. Jpn.)* **9**, 113–121, 2013.
54. Ye, H.; Cirilli, M.; Wu, H. The use of construct variation and diffraction data analysis in the crystallization of the TRAF domain of human tumor necrosis factor receptor associated factor 6. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **58**, 1886–1888, 2002.
55. Sakamoto, T.; Tanaka, T.; Ito, Y.; Rajesh, S.; Iwamoto-Sugai, M.; Kodera, Y.; Tsuchida, N.; Shibata, T.; Kohno, T. An NMR analysis of ubiquitin recognition by yeast ubiquitin hydrolase: evidence for novel substrate recognition by a cysteine protease. *Biochemistry* **38**, 11634–11642, 1999.
56. Perez-Amodio, S.; Jansen, D. C.; Schoenmaker, T.; Vogels, I. M.; Reinheckel, T.; Hayman, A. R.; Cox, T. M.; Saftig, P.; Beertsen, W.; Everts, V. Calvarial osteoclasts express a higher level of tartrate-resistant acid phosphatase than long bone osteoclasts and activation does not depend on cathepsin K or L activity. *Calcif. Tissue Int.* **79**, 245–254, 2006.
57. Grzesiek, S.; Anglister, J.; Bax, A. Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins by isotropic mixing of ^{13}C magnetization. *J.*

Magn. Reson., Ser. B **101**, 114–119, 1993.

58. Eletsky, A.; Moreira, O.; Kovacs, H.; Pervushin, K. A novel strategy for the assignment of side-chain resonances in completely deuterated large proteins using ^{13}C spectroscopy. *J. biomol. NMR* **26**, 167–179, 2003.
59. Salzmänn, M.; Pervushin, K.; Wider, G.; Senn, H.; Wüthrich, K. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13585–13590, 1998.
60. Salzmänn, M.; Wider, G.; Pervushin, K.; Senn, H.; Wüthrich, K. TROSY-type triple-resonance experiments for sequential NMR assignments of large proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 844–848, 1999.
61. Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51–55, 1996.
62. Goddard, T. D.; Kneller, D. G. SPARKY3, University of California, San Francisco.
63. Clubb, R. T.; Omichinski, J. G.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. Mapping the binding surface of interleukin-8 complexed with an N-terminal fragment of the type 1 human interleukin-8 receptor. *FEBS lett.* **338**, 93–97, 1994.
64. Williamson, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **73**, 1–16, 2013.
65. Fukunishi, Y.; Mikami, Y.; Nakamura, H. Similarities among receptor pockets and among compounds: analysis and application to *in silico* ligand screening. *J. Mol. Graphics Modell.* **24**, 34–45, 2005.
66. Case, D. A.; Darden, T.; Cheatham, T. E., III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Merz, K. M.; Wang, B.; Pearlman, D. A.; Crowley, M.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Schafmeister, C.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Kollman, P. A. *AMBER 8*, University of California: San Francisco, 2004.

67. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian* 98, Revision A.9; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1998.
68. Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21**, 1049–1074, 2000.
69. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935, 1983.
70. Greengard, L.; Rokhlin, V. A fast algorithm for particle simulations. *J. Comput. Phys.* **135**, 280–292, 1997.
71. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341, 1977.
72. Baell, J. B.; Holloway, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* **53**, 2719–2740, 2010.
73. Ulmer, T. S.; Campbell, I. D.; Boyd, J. The effects of dissolved oxygen upon amide

- proton relaxation and chemical shift in a perdeuterated protein. *J. Magn. Reson.* **157**, 181–189, 2002.
74. LaPlante, S. R.; Carson, R.; Gillard, J.; Aubry, N.; Coulombe, R.; Bordeleau, S.; Bonneau, P.; Little, M.; O'Meara, J.; Beaulieu, P. L. Compound aggregation in drug discovery: implementing a practical NMR assay for medicinal chemists. *J. Med. Chem.* **56**, 5142–5150, 2013.
75. Hajduk, P. J.; Huth, J. R.; Fesik, S. W. Druggability indices for protein targets derived from NMR-based screening data. *J. Med. Chem.* **48**, 2518–2525, 2005.
76. Niccolai, N.; Spiga, O.; Bernini, A.; Scarselli, M.; Ciutti, A.; Fiaschi, I.; Chiellini, S.; Molinari, H.; Temussi, P. A. NMR studies of protein hydration and TEMPOL accessibility. *J. Mol. Biol.* **332**, 437–447, 2003.
77. Pintacuda, G.; Otting, G. Identification of protein surfaces by NMR measurements with a paramagnetic Gd(III) chelate. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 372–373, 2002.
78. Neduva, V.; Linding, R.; Su-Angrand, I.; Stark, A.; de Masi, F.; Gibson, T. J.; Lewis, J.; Serrano, L.; Russell, R. B. Systematic discovery of new recognition peptides mediating protein interaction networks. *PLoS Biol.* **3**, e405, 2005.
79. London, N.; Raveh, B.; Schueler-Furman, O. Druggable protein–protein interactions – from hot spots to hot segments. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 952–959, 2013.
80. Clackson, T.; Wells, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **267**, 383–386, 1995.
81. Bogan, A. A.; Thorn, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **280**, 1–9, 1998.
82. Kozakov, D.; Hall, D. R.; Chuang, G. Y.; Cencic, R.; Brenke, R.; Grove, L. E.; Beglov, D.; Pelletier, J.; Whitty, A.; Vajda, S. Structural conservation of druggable hot spots in protein–protein interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13528–13533, 2011.

83. Kozakov, D.; Hall, D. R.; Napoleon, R. L.; Yueh, C.; Whitty, A.; Vajda, S. New Frontiers in druggability. *J. Med. Chem.* **58**, 9063-9088, 2015.
84. Durham, T. B.; Blanco, M. J. Target engagement in lead generation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 998–1008, 2015.

謝辞

本研究を遂行するにあたって素晴らしい環境を与えていただき、また時には厳しく、時には温かく御指導、御鞭撻下さいました東京大学大学院薬学系研究科 嶋田 一夫教授に心より感謝を申し上げます。研究を前に進め論文執筆を行うために必要な、科学的な考え方や物事への取り組み方に関しまして、多くのことを勉強させていただきました。

TRAF6-TRI4 複合体の立体構造計算および論文作成にあたり御指導、御鞭撻下さいました、産業技術総合研究所 福西 快文博士に心より感謝を申し上げます。

実験方法、論文の書き方、さらには研究者としての心構えに至るまで多くのお時間を割いて直に御指導いただき、TRAF6-TRI4 複合体の構造解析に関する論文出版に導いて下さいました、産業技術総合研究所 竹内 恒博士に心より感謝を申し上げます。

実験操作から論理的な文章の書き方に至るまで多くのお時間を割いて直に御指導いただき、常磁性物質を用いた分子間結合界面決定法の開発に関する論文出版に導いて下さいました、横浜国立大学大学院生命医科学研究科 坂倉 正義助教に心より感謝を申し上げます。

常磁性物質を用いた複合体結合界面決定法の開発および論文作成にあたり御協力下さいました、産業技術総合研究所 徳永 裕二博士に心より感謝を申し上げます。

エーザイ株式会社筑波研究所において TRAF6 を標的とした創薬プロジェクトを共に進め、本研究の礎を築いて下さいました、田井 健二、新井 謙三、小林 直樹、米田 直樹、井上 篤、木原 美穂、村上 拓己、千葉 健一各研究員に心より感謝を申し上げます。また、本研究に御協力下さいました、鈴木 秋一、藤本 晶子、萩原 幸司、中尾 光輝、池森 恵、澤田 光平、百々 哲史、吉永 貴志、櫛田 郁夫各研究員に心より感謝を申し上げます。論文執筆にあたりサポートして下さいました、上司・先輩・同期・後輩に感謝いたします。

本論文を御審査くださいました副査の先生方に心より感謝を申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり励ましてくれた家族に感謝します。

2016年3月 守谷 潤