

令和4年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究		
研究課題名		EBV 陽性がん治療薬の創出に向けた BRD4 ET ドメイン阻害剤の開発		
新規・継続の別		新規 継続		
研究代表者	所属	横浜市立大学大学院生命医科学研究科	40 歳 以下○	35 歳 以下○
	職名・氏名	助教・小沼 剛		
研究分担者 (適宜行を追加 して下さい)	所属		/	/
	職名・氏名			
	所属		/	/
	職名・氏名			
受け入れ教員	職名・氏名			
概要 (100～150 字程度)		Epstein-Barr (EB) ウイルスはガンマヘルペスウイルスに分類されるヒト腫瘍ウイルスであり、宿主細胞に感染することで自身の維持、拡大を図っている。EBV 陽性がんを発症すると多くは難治性で悪性度が高いことが知られている。発がんの要因にはウイルスだけでなく宿主細胞の多くの遺伝子が関わっており、それらを創薬標的として治療薬の開発を目指す。		
研究目的 (300 字程度)		これまでの研究から、ヒトの転写制御因子 BRD4 が前初期遺伝子の一つである <i>BZLF1</i> のエンハンサーとプロモーターを活性化することが知られている。このことは、BRD4 の機能を阻害することで <i>BZLF1</i> の発現を抑制し、溶解感染への移行を防げることを示唆している。BRD4 は、2 つのプロモドメイン (BrD) と ET ドメインという 3 つの構造ドメインから構成される蛋白質である。BrD 阻害剤である JQ1 は EBV の再活性化の阻止に有効であることが細胞レベルで示されている。しかしながら、生体内でこれらの阻害剤の半減期が短すぎる等、薬物動態において問題があり、がん治療薬として認可された BRD4 阻害剤はまだ存在しない。本研究では、EBV 感染に起因するがんの治療薬の創出を目指し、BRD4 阻害剤の開発を行う。		
研究内容・成果 (1000 字程度・Web 会議の回数も記載)		小沼はこれまでに、全く阻害剤が開発されていない ET ドメインに着目し、カルバゾール誘導体が ET ドメインに結合することを見出している。さらに ET ドメインとカルバゾール誘導体との複合体について NMR を用いた立体構造解析を行い、結合様式を明らかにした。そこで本研究では、より強く結合するカルバゾール誘導体を探索するため、NMR の二次元スペクトルを利用した化合物スク		

リーニングを行うこととした。

この実験を実施するには、 ^{15}N ラベルした ET ドメインを精製する必要がある。そこで安定同位体試薬である $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を 1 g/L 含んだ M9 培地を調製し、大腸菌の大量培養により目的蛋白質を発現させた。これを HisTrap カラムやゲルろ過カラムによる精製を行い、純度の高い ^{15}N ラベル化 ET ドメイン (^{15}N]-ET) を得た。

まずは ^{15}N]-ET 単独で ^1H - ^{15}N HSQC の二次元スペクトル測定を行い、リファレンススペクトルとした。続いて 6 種類の ET ドメイン阻害剤の候補化合物をそれぞれ滴定し、同測定を行った (図 1)。その結果、6 種類すべての化合物についてシグナルの化学シフト変化が観測された。中でも、化合物 STOCK7S-53638 や化合物 Z2720617776 は化学シフト変化が大きかった。これは、これらの化合物が他の化合物よりも強く ET ドメインに結合することを示唆している。また、6 種類の化学構造を比較することで、ET への結合に重要なエピトープを発見した。

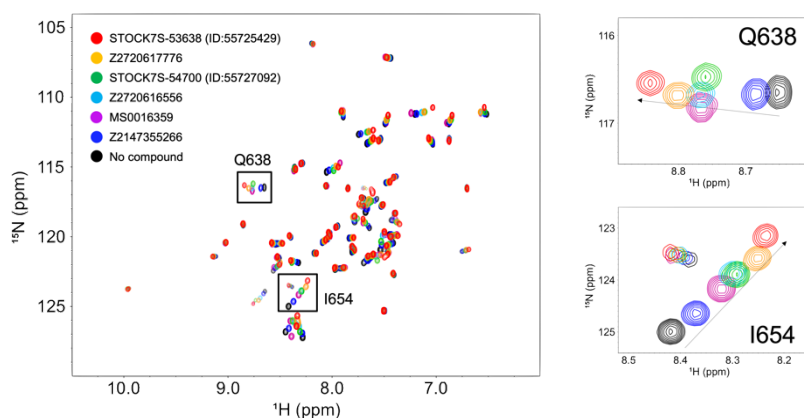


図 1 (左図) 低分子化合物存在下および非存在下における ET ドメインの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル
(右図) 化学シフト変化が比較的大きかったシグナル

続いて、化合物 Z2720617776 の ^{15}N]-ET への親和性を見積もるため、異なる濃度の化合物 Z2720617776 を滴定し、 ^{15}N]-ET の ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った。(図 2 左)

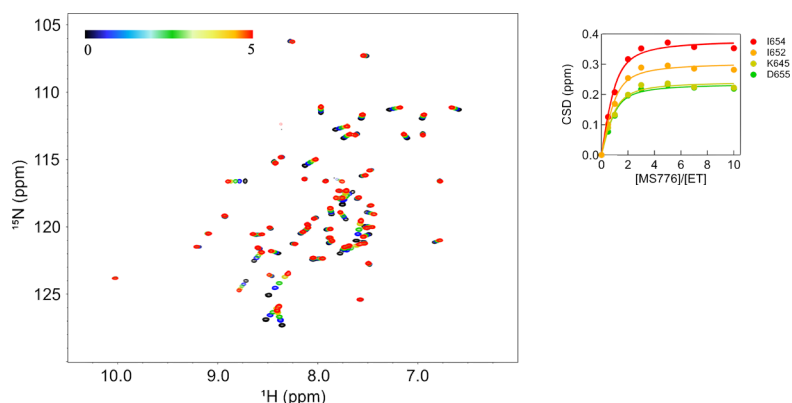
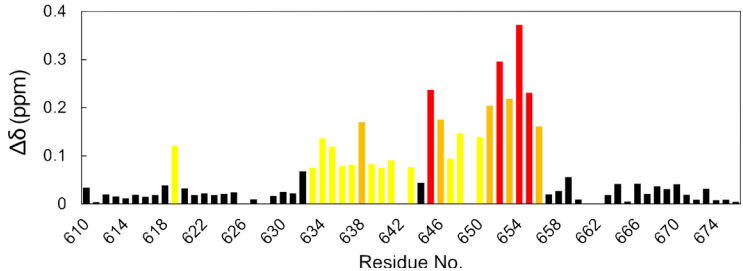


	図 2 (左図) 異なる濃度の化合物 Z2720617776 存在下における ET ドメインの ^1H-^{15}N HSQC スペクトル (右図) 代表的なアミノ酸残基の化学シフト変化 比較的に大きく変化したシグナルについて定量解析を行うことで親和性を見積もった ($K_d = 28.2 \text{ uM}$)。 さらに、化合物 Z2720617776 の^{15}N-ET への結合において ET ドメインの重要なアミノ酸残基を同定するため、ET ドメインのアミノ酸配列に対して化学シフト変化をプロットした (図 3)。この結果から、ET ドメインの K645、I652、I654、D655 が相互作用に  <table border="1"><caption>Figure 3 Data: Chemical Shift Change (Δδ in ppm) by Residue</caption><thead><tr><th>Residue No.</th><th>Δδ (ppm)</th></tr></thead><tbody><tr><td>610</td><td>0.02</td></tr><tr><td>614</td><td>0.02</td></tr><tr><td>618</td><td>0.02</td></tr><tr><td>622</td><td>0.12</td></tr><tr><td>626</td><td>0.02</td></tr><tr><td>630</td><td>0.02</td></tr><tr><td>634</td><td>0.08</td></tr><tr><td>638</td><td>0.15</td></tr><tr><td>642</td><td>0.08</td></tr><tr><td>646</td><td>0.25</td></tr><tr><td>650</td><td>0.18</td></tr><tr><td>654</td><td>0.38</td></tr><tr><td>658</td><td>0.15</td></tr><tr><td>662</td><td>0.02</td></tr><tr><td>666</td><td>0.02</td></tr><tr><td>670</td><td>0.02</td></tr><tr><td>674</td><td>0.02</td></tr></tbody></table> 図 3 化合物 Z2720617776 結合による ET ドメインのアミノ酸残基ごとの化学シフト変化 重要な残基であることが分かった。 今後、園下教授のショウジョウバエを利用して、化合物 Z2720617776 の活性評価を行う予定である。また、化合物 Z2720617776 の類似化合物についてさらなる化合物スクリーニングを行う予定である。 園下教授との web 会議は月 2 回の頻度で毎月行った。今後も同頻度で情報交換を行う予定である。	Residue No.	Δδ (ppm)	610	0.02	614	0.02	618	0.02	622	0.12	626	0.02	630	0.02	634	0.08	638	0.15	642	0.08	646	0.25	650	0.18	654	0.38	658	0.15	662	0.02	666	0.02	670	0.02	674	0.02
Residue No.	Δδ (ppm)																																				
610	0.02																																				
614	0.02																																				
618	0.02																																				
622	0.12																																				
626	0.02																																				
630	0.02																																				
634	0.08																																				
638	0.15																																				
642	0.08																																				
646	0.25																																				
650	0.18																																				
654	0.38																																				
658	0.15																																				
662	0.02																																				
666	0.02																																				
670	0.02																																				
674	0.02																																				
成果	【学会報告】 参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと 特になし 【論文発表】 著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと 特になし 【新聞報道】 特になし																																				