

マグネシウムチャネルのユビキチン化を阻害する分子の論理的薬物探索

廣明 秀一, 天野 剛志

名古屋大学大学院創薬科学研究科

概要

筆者らは、腎尿細管のタイトジャンクション(TJ)においてマグネシウムイオンの選択的再取り込みに関わる細胞間接着分子、クローディン(CLDN)16/19 と、その安定性を制御している分子である LNX3 に着目した。具体的には、LNX3 と CLDN16/19 の相互作用を阻害する低分子を探索すれば、LNX3 による CLDN16/19 の分解を一過的に抑えることで、マグネシウム恒常性維持に関わる医薬品の開発につながると考えた。大腸菌組換えタンパク質を用いた試験管内結合実験から、LNX3 の 1 番目の PDZ ドメイン(LNX3-PDZ1)と CLDN16 の C 末端の間に明確な相互作用を認めた。他方、2 番目の PDZ ドメイン(LNX3-PDZ2)と CLDN16/19 の C 末端の間にも相互作用を認めたものの、特異的相互作用とは断定できなかった。

次に筆者らがすでに発見している、PDZ ドメインの阻害剤に共通の母核構造を有する化合物のライブラリ(アントラニル酸誘導体化合物のフォーカストライブラリ)を用いて、LNX3-PDZ1 に結合する化合物を、NMR スクリーニング法を用いて探索した。その結果、PDZドメインの CLDN 結合ポケット部分に弱く特異的に結合する非ペプチド性化合物を複数同定した。しかし、これらプロトタイプ化合物は試験管内での結合定数が弱いと考えられ、このまま医薬品開発のリード化合物になりうるとは考えにくい。そこで、これらの化合物の精密分子設計を進めるために、LNX3-PDZ1 と CLDN16 の C 末端ペプチドの複合体の立体構造決定を試みた。現在、複合体のおよそ 3.5 Å 相当の分解能の回折点を与える結晶作成に成功しており、今後の解析が待たれる。

1. 研究目的

人体にとってマグネシウム(Mg^{2+})は、生命維持と健康を維持するのに欠かすことのできないイオンである。生体内では 4 番目に多く存在する陽イオンであり、細胞内においてもカリウムに次いで 2 番目に多く、様々な酵素の補助因子として不可欠である。そのため、ヒト血清中でも、マグネシウム濃度は 1.8~2.3 mg/dL の範囲で恒常的に維持されている。このマグネシウムが一時的に欠乏すると、尿細管におけるマグネシウム再吸収が亢進すると同時に、生体内のおよそ 50%のマグネシウムを蓄えている骨からの遊離も促進される。これらのマグネシウムの欠乏は低カルシウム血症、筋肉の痙攣、冠動脈のれん縮を引き起こす。また、長期にわたるマグネシウムの不足が、骨粗鬆症、

心疾患、糖尿病のような生活習慣病のリスクを上昇させることが示唆されている。他方、最近、注目されている、医薬品の副作用としての低マグネシウム血症も注目されている。具体的には、プロトンポンプ阻害剤、上皮成長因子受容体阻害剤、利尿薬、およびカルシニューリン阻害剤による低マグネシウム血症が報告されている。そのため、生体内におけるマグネシウム輸送機構や再取り込み機構、ならびにそれに関わるタンパク質分子の構造と機構を解明することは重要である。

今回、筆者らは遺伝性低マグネシウム血症(HOMG)の原因遺伝子としてクローディン16(CLDN16, Paracellin-1, HOMG3)および CLDN19(HOMG5)に着目した^{1,2}。CLDN は上皮細胞の頂端に近い部分で隣り合う細胞間を

強固に接着させ、タイトジャンクション(密着結合, TJ)という細胞間接着装置を形成する, 4 回膜貫通タンパク質である。CLDN16/CLDN19 の遺伝子変異により遠位尿管(ヘンレ管)でのマグネシウム再取り込みの不全が起こり, 低マグネシウム血症となる。岐阜薬科大学の五十里らは, CLDN16 のエンドサイトーシスが LNX3 (PDZRN3) が支配するユビキチン化により促進されることを示し, LNX3 阻害剤が低マグネシウム血症の治療・予防に使える可能性を提案している³。一方, CLDN19 の C 末端のアミノ酸配列は, -GPLGV (isoform 1), -AREYV (isoform 2) と CLDN16 のそれ(-DVTRV)とは電荷分布が異なり, LNX3 よりむしろ LNX1 の基質の配列に近い。これより応募者は, CLDN19 は LNX3 ではなく LNX1 が主導するユビキチン化機構によりエンドサイトーシスされる, と予想した。そのため, 例えば TJ 上の CLDN16 または CLDN19 のいずれかまたは双方が減少傾向にある腎臓(尿管)細胞に, LNX3 阻害剤または LNX1 阻害剤またはその双方を投与することで, 細胞間隙からの CLDN16/19 の減少を緩和し, マグネシウム再取り込み機能を保護できる可能性が高い, と考えた(図 1)。

本研究の究極の目標は, 低マグネシウム血症の治療薬の合理的分子設計・合理的探索である。特に, EGF 受容体シグナル伝達系の阻害が誘導する傍細胞間マグネシウムチャネル構成タンパク質 CLDN16/19 のエンドサイトーシ

スを阻害すべく, CLDN16/19 の主たるユビキチン化酵素 LNX3 を阻害する化合物を同定することを第一目標とする。

2. 研究方法

2.1 タンパク質試料の調製

筆者らは, 既に複数の PDZ ドメインの大腸菌大量発現系を構築し, その X 線結晶構造ないし NMR 溶液構造の決定に成功している^{4,5}。それらの成功例に倣い, ヒト LNX3 の 2 つの PDZ ドメイン, LNX3-PDZ1 と LNX3-PDZ2 ドメインのグルタチオン転移酵素 (GST) との融合タンパク質発現系を設計した。その後, 当該融合タンパク質をコードした遺伝子を含むプラスミドにより大腸菌を形質転換し, ¹⁵N NH₄Cl と ¹³C₆ グルコースをそれぞれ唯一の窒素源, 炭素源とする最小培地で大腸菌を培養し, IPTG 添加によるタンパク質発現誘導後, 7~13 時間後に集菌した。菌体を緩衝液中で超音波破碎後, 遠心分離を行い, 沈殿を除去した。上清に含まれた融合タンパク質を, グルタチオンを固定化した樹脂 (glutathione-Sepharose FF, GE Healthcare Life Sciences Corp) に捕集し, 樹脂上で HRC3V protease を作用させることで, GST タグを除去した。得られた租 PDZ ドメインはさらに Superdex75 column (GE Healthcare Life Sciences Corp.) を用いてゲルろ過にて 98% 以上の純度まで精製した。それぞれの試料を NMR 測定用またはタンパク質結晶化の緩衝液(後述)に透析したのち遠心濃縮器により濃縮し, NMR 試料とした。

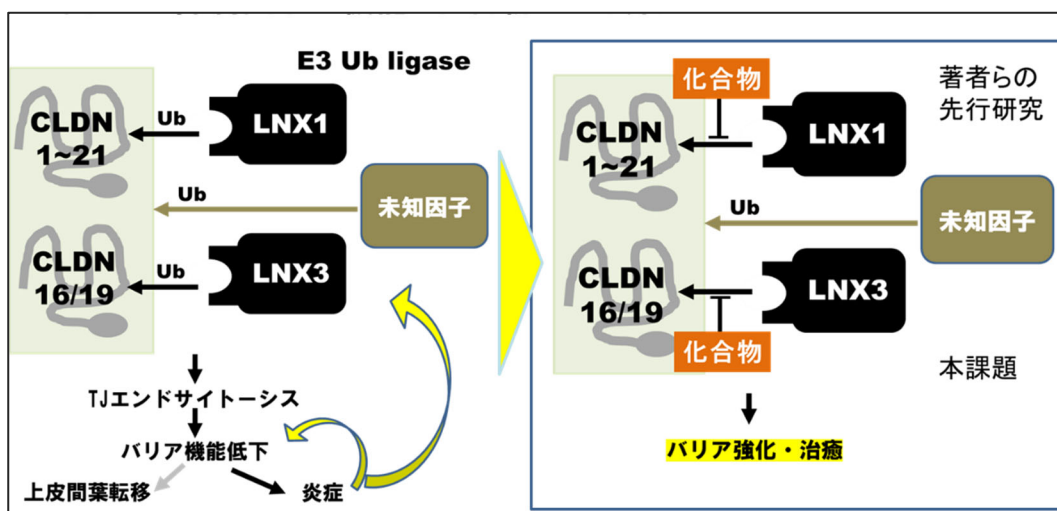


図 1 TJ 抑制因子の機能と化合物による介入

2. 2 CLDN16/19 タンパク質試料の調製

LNX3-PDZ ドメインとの生理的な相互作用相手を決定するために、CLDN16 ならびに CLDN19 の C 末端試料を調製した。具体的にはそれぞれの C 末端のアミノ酸 8 残基を、チオレドキシシ(Trx) + His x6 タグとの融合タンパク質として、定法によりプラスミドを構築し、大腸菌で発現した。プラスミドの構築ならびに融合タンパク質の発現精製は、筆者らがすでに NMR 試料調製法としてすでに確立した方法に準じた⁶。

2. 3 試験管内相互作用実験

LNX3-PDZ1 および LNX3-PDZ2 の GST 融合タンパク質を用いて、それぞれが CLDN16 または CLDN19 の C 末端のどちらとどの程度結合するのかを半定量的に解析するために試験管内相互作用実験を行った。まず GST 融合 PDZ ドメイン試料と CLDN の C 末端融合タンパク質をそれぞれ 10 nmol ずつ混合して溶液の全体量を Tris 緩衝液で 180 μ l とし、4°C で 1 時間静置した。緩衝液で洗浄・平衡化した Co-Agarose (和光純薬) 樹脂 (スラリー) 20 μ l を添加し更に時々混和しつつ 2 時間静置した。上清を除去後 Tris 緩衝液 100 μ l で 7 回洗浄後、500 mM imidazole 含有 Tris 緩衝液で溶出し、15% SDS-PAGE で解析し、CBB で染色した。

2. 4 NMR 測定

阻害剤相互作用の探索には、終濃度 0.1 mM の ¹⁵N 標識した各 PDZ ドメインを NMR 試料管に入れ、HSQC を測定することにより行った。試料測定は以下の通りである。

PDZ1: 20 mM MOPS-NaOH (pH 6.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% DMSO-d₆ (90% H₂O - 10% D₂O)

PDZ2: 20 mM MOSP-NaOH (pH 6.5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% DMSO-d₆ (90% H₂O - 10% D₂O)

測定は Bruker 社製 Cryoprobe を装備した 600 MHz 超電導デジタル NMR 装置 Avance III (名古屋大学設置) を用い、20°C で行った。NMR 信号は、Linux ワークステーション上で NMRPipe⁷ を用いてノイズ除去・フーリエ変換などを行い、最終的に Sparky⁸ を用いて表示し、解析した。

2. 5 NMR 主鎖信号の帰属

CLDN ペプチドならびに阻害剤との相互作用を NMR で解析するためには、まず、それぞれの PDZ ドメインのポリペプチド鎖主鎖 NH の NMR シグナルの帰属が必須で

ある。LNX3-PDZ2 に関しては、今回実験に使用した PDZ ドメインコンストラクトとアミノ酸配列がよく似た試料の立体構造決定の先行研究があり (PDB: 1WH1), そのデータ取得に用いられた付随情報として、国際的な生物系試料の NMR データベースである Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) に、NMR 信号の帰属情報が公開されていた (BMRB:11201)。その情報を参考にしつつ、HNCA, CBCACONH の 3D-NMR スペクトルを参考に主鎖帰属を行った。一方、LNX3-PDZ1 に関しては、同様の類似の溶液中の構造決定の先行研究はあるものの (PDB: 1UHP), NMR 信号の帰属は BMRB には登録されていなかった。そこで、13C/15N-二重標識された PDZ1 ドメインの NMR 試料を準備し、HNCACB, CBCACONH, HNCOC, HNCACO, HNCA, HNCOCA の 6 組の 3 次元 NMR を測定後、主鎖帰属支援ソフトウェア MARS⁹ を利用し、ほぼすべての主鎖信号の一意的帰属を完了した。

2. 6 NMR による阻害剤スクリーニング

これまでに筆者らは N 置換アントラニル酸骨格を有する化合物 flufenamic acid が、複数の PDZ ドメインの郡特異的阻害剤となりうることを報告している¹⁰。その知見を活用してアントラニル酸骨格化合物からなるマイクロライブラリを構築し、がん増殖に関わるシグナル伝達タンパク質 Dishevelled の PDZ ドメイン阻害剤を in silico screening と NMR 実験を組合せることで効率よく同定することに成功した¹¹。本研究でも、その際に用いたのと同じ当研究室所有の N 置換アントラニル酸化合物マイクロライブラリならびに、先行研究で筆者らが PDZ ドメインの郡特異的阻害剤であることを見だした 2 つの低分子化合物 diclofenac ならびに flufenamic acid を用いた (図 2)。更に TJ 増強作用が着目されているフラボノイドである naringenin についても相互作用を調査した。また、LNX3 は傍細胞間マグネシウムチャンネルを特異的に制御する E3 ユビキチンリガーゼと考えられていることから、他の TJ 構成クロードインはむしろ認識しないと考えられた。この仮説を検証するため、一般的な TJ を構成するクロードインの代表である CLDN3 の C 末端ペプチド (NH₂-GTAYDRKDYV-COOH) との相互作用についても検討した。阻害剤スクリーニングは、まず ¹⁵N 標識の PDZ ドメインに対し NMR 試料管中で 2 等量、ついで結合が弱く変化が小さかったものについては 10 等量の化合物を添加し、HSQC スペクトルを測定した。化合物添

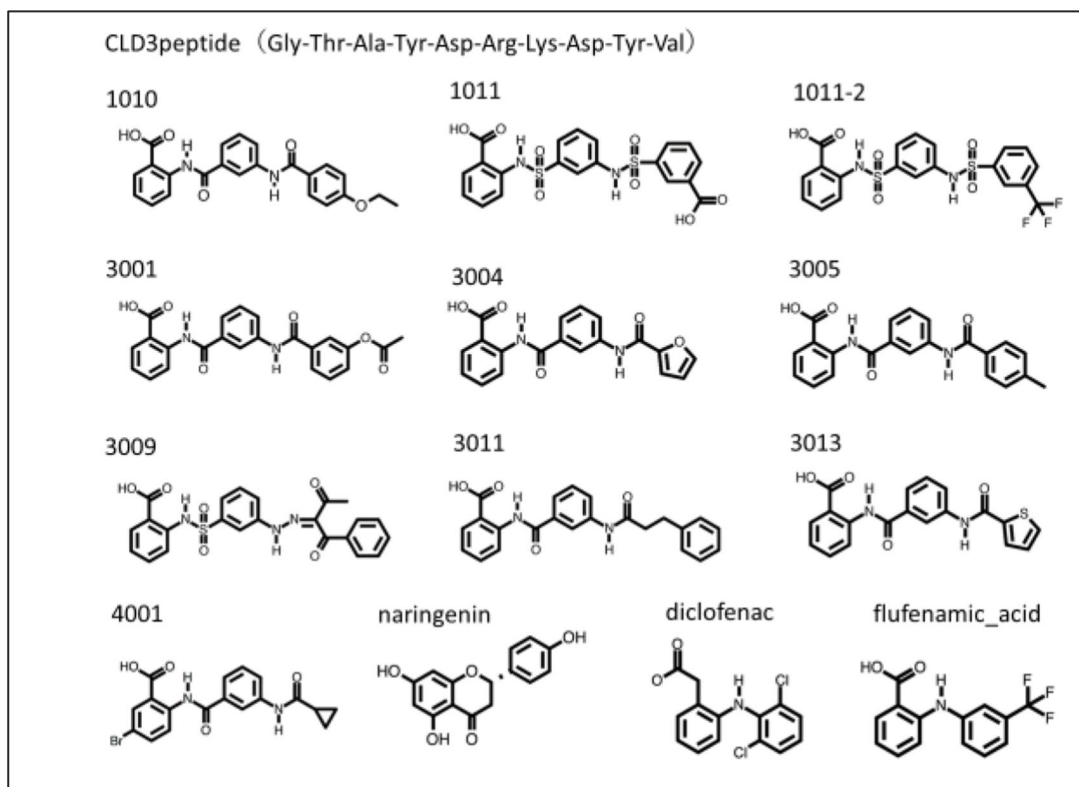


図 2 使用した化合物の構造

加前の HSQC スペクトルと比較し、各信号の化学シフト移動度を次式に基づいて標準化した。

$$\Delta\delta_{\text{normalized}} = \{\Delta\delta(^1\text{H})^2 + [\Delta\delta(^{15}\text{N})/5]^2\}^{1/2}$$

ここで $\Delta\delta(^1\text{H})$ と $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ はそれぞれ化合物添加に伴う ^1H と ^{15}N の各 NH 基の化学シフト変化である。それぞれの化合物につき、この標準化後の化学シフト変化を残基ごとに plot したグラフを作成した。また、各化合物ごとに有意な変化を示したアミノ酸残基を可視化するため、Schumann らの方法により統計処理して、有意な相互作用残基を決定し、PDZドメインの立体構造上に表示した¹²。

2.7 立体構造解析のための結晶化

筆者らは、前述のように、TJ と密接に関連している細胞間接着装置であるアドヘレンスジャンクション(AJ)の主要接着装置膜タンパク質である nectin-3 の細胞質側 C 末端と、それに結合する裏打ちタンパク質 afadin の PDZドメインの複合体の結晶構造解明に成功している⁵。この時確立したのと同様の手法で、LNX3 の PDZドメインと CLDN16 の C 末端ペプチドの複合体の結晶構造解明に取り組んだ。

具体的には、すでに構築した LNX3-PDZ1ドメインの GST 融合タンパク質発現系を利用して、PDZ1 のさらに C 末端に、数アミノ酸のリンカーを挟んで、CLDN16 の C 末端 4 残基を更に融合させた LNX3-PDZ1-CLDN16 融合タンパク質を作成した。前述と同様の精製プロトコルにより試料精製を行った後、タンパク質結晶化のスクリーニングを実施した。結晶化条件検討のために Hampton Research 社の Crystal Screen Kit, Crystal Screen Kit 2, ならびに Index Kit を使用した。それぞれ 50, 48, 96 条件の結晶化条件に相当する。結晶化母液のタンパク質濃度は 18 mg/ml(母液条件:20 mM MES 150 mM NaCl (pH6.5))とし、温度は 4°C と 20°C の両方を試し、また、結晶化法は sitting drop 法と hanging drop 法の両方を検討した。

3. 研究結果

3.1 LNX3 における CLDN 認識の責任ドメインの決定 (図 3)

LNX3 に含まれる二つの PDZドメインと CLDN16/CLDN19 の 2 種の低マグネシウム血症の間の相

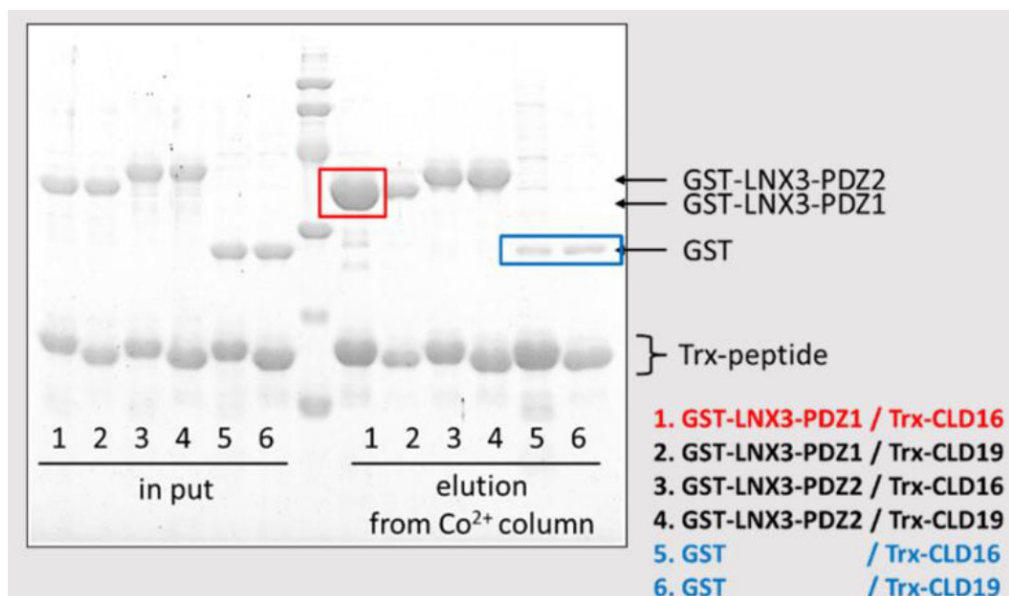


図 3 CBB 染色したプルダウンアッセイの結果

相互作用について、試験管内タンパク質相互作用実験、いわゆるプルダウン実験を行った。図 3 は得られた結果を 15% SDS-PAGE で解析し CBB 染色した結果である。Trx-peptide と記されたところで観測されているバンドが、樹脂で捕捉した CLDN の C 末端を含む融合タンパク質であり、それより上部に観測されたバンドが、それぞれの PDZ ドメインを含む GST 融合タンパク質である。パネル右側のレーン 5, 6 は GST のみを流した時の結果であり、非特異的な結合量の指標である。GST に PDZ ドメインを融合することで、いずれのレーンでも強いタンパク質の結合が観察されたことから、PDZ1 ドメインも PDZ2 ドメインも、CLDN の C 末端に結合するものの、その結合特異性が異なることが示された。図より明らかなように、特に強い結合が見られたのは、PDZ1 ドメインと CLDN16 の組合せである。次に顕著な結合が見られたのは PDZ2 ドメインと CLDN19 の組合せであった。

以下の研究では、LNX3-PDZ1 と CLDN16 の相互作用に焦点を絞り、その分子認識機構の解明と、阻害剤探索を進めた。

3. 2 LNX3-PDZ1 ドメインの NMR 主鎖帰属の完成(図 4)

ついで、阻害剤探索の標的となる LNX3-PDZ1 ドメインの NMR の主鎖帰属を定法に従って行った。帰属が完了したシグナルについて、残基名を記してある。対象となるアミノ酸から NH シグナルのない proline 残基を除いた 91 残基

のうち、判別がつかなかった T339 と T342 を除く 89 残基、98% の帰属が完了した。PDZ ドメインは、2 番目の β ストランドと 1 番目の α ヘリックスの間の浅い溝に、他のタンパク質の C 末端を認識して結合する典型的なペプチド結合ポケットを持つ。図では b2 に属する残基の信号に黄色 Y で、a1 に属する残基に赤 Y で印をつけた。

3. 3 LNX3-PDZ1 に結合する非ペプチド性低分子化合物の発見(図 5, 図 6)

今回検証した 15 個の化合物(アントラニル酸誘導体 12 種、その他低分子 2 種、CLDN3 ペプチド)いずれも、PDZ2 に添加することで、その NH シグナルに何らかの変化を起こした。このうち CLDN3 を添加した場合のシグナル移動は小さく(data not shown)、典型的な C 末端ペプチドが結合した際の変化とはことなり、ヘリックスにしか化学シフト変化が表れていないところから、CLDN3 は LNX3-PDZ1 には結合しにくいことがわかった。

また、ほかの低分子化合物はすべて、CLDN 結合ポケットの両側(b2 と a1)に存在するアミノ酸残基に変化が見られたことから、ポケットに結合して、阻害剤の候補化合物となりうるが、その結合強度には大きなばらつきがあった。まず NPL-3001, naringenin, diclifenac, flufenamic acid は、2 等量添加では解析可能な化学シフト変化は観測されず、10 等量添加で変化が見られたことから、実用的なアフィニティーではないことが推測された。他の化合物について、標準化された化学シフト変化の絶対値から、更に精査し、

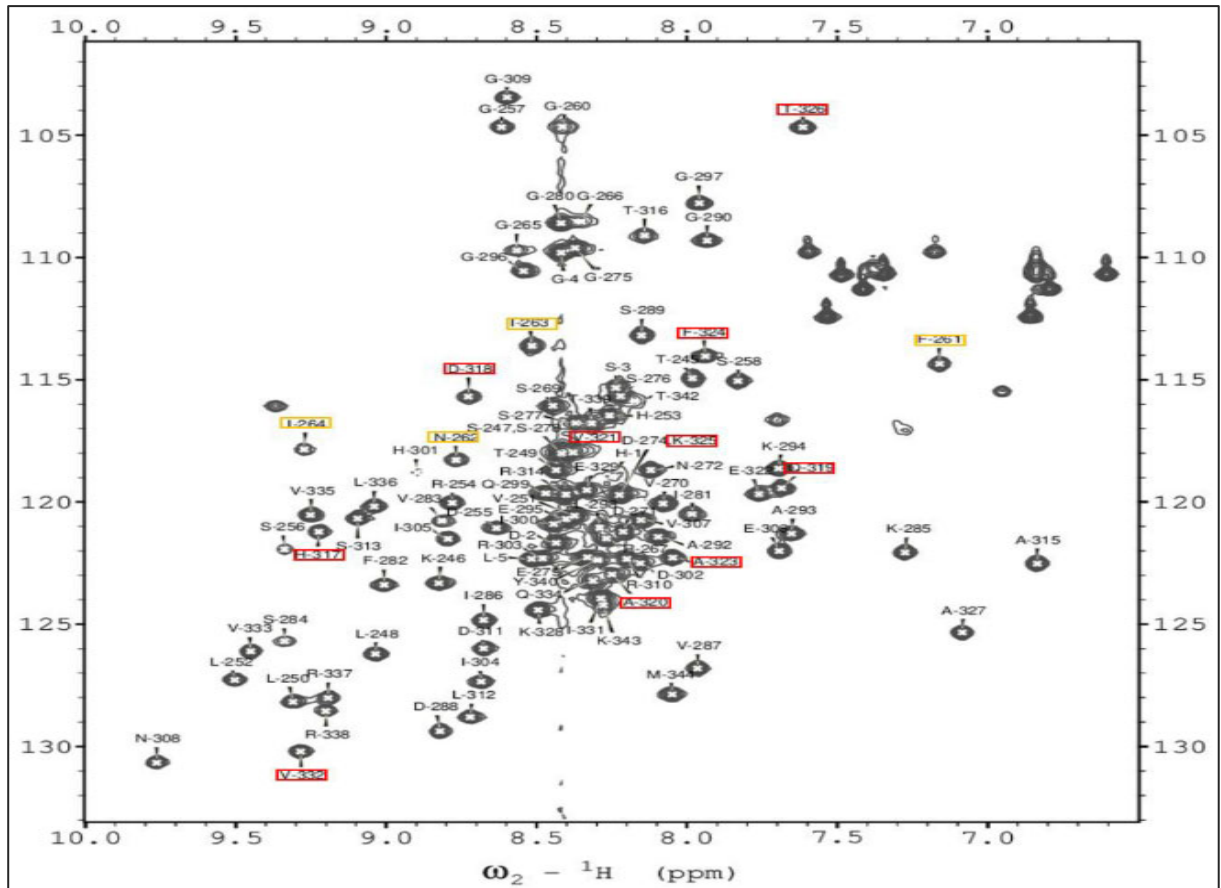


図4 LNX3-PDZ1ドメインの¹H-¹⁵N 2次元化学シフト相関NMRスペクトル (HSQC スペクトル)
 ピーク上部の数字はアミノ酸残基番号を示す。リガンド結合ポケットを構成するβ2に属するアミノ酸を黄枠、
 α2に属するアミノ酸を赤枠で示した。

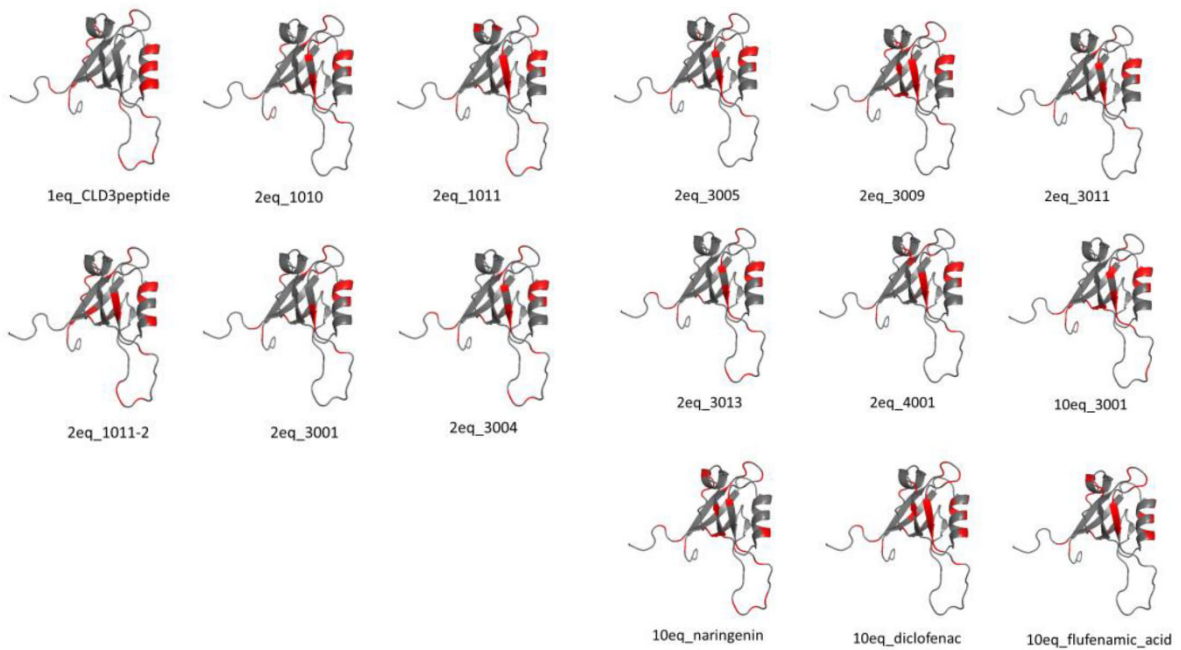


図5 各化合物により化学シフトに変化があったアミノ酸残基のPDH1ドメインの構造上へのマッピング

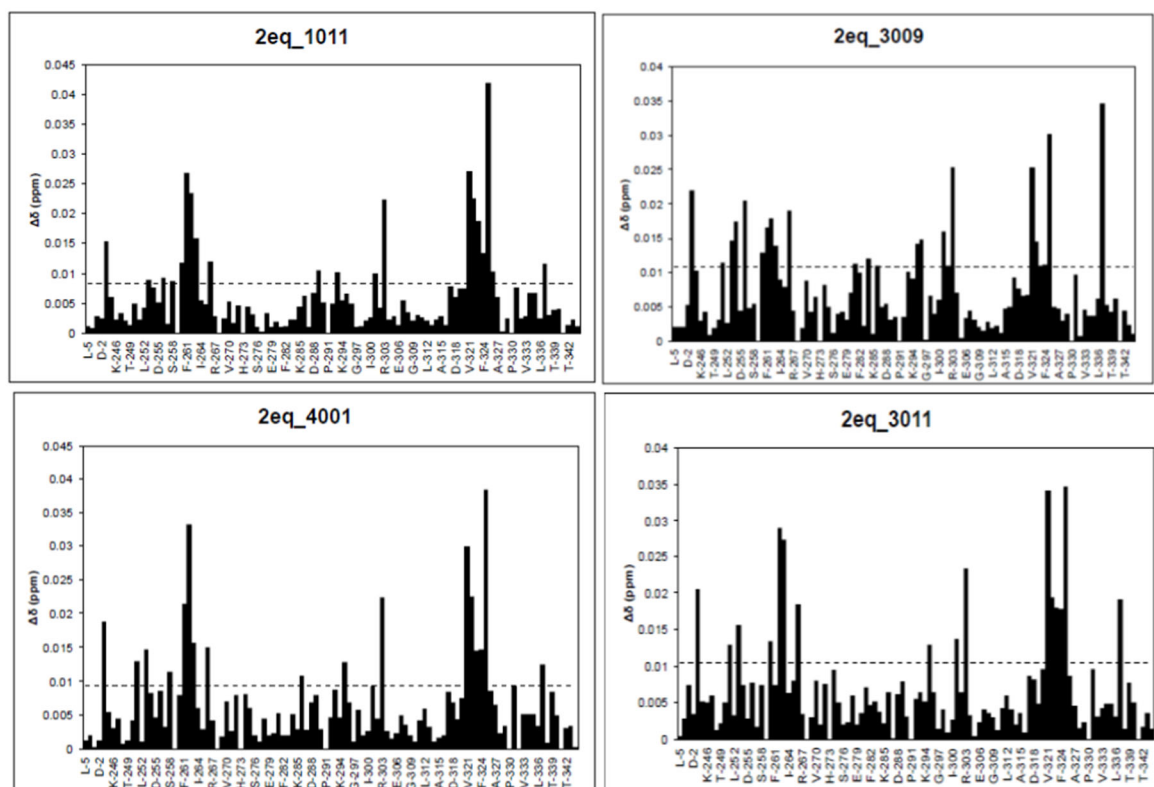


図 6 各化合物により誘導された各アミノ酸残基ごとの化学シフト変化

以下の 4 つの化合物を見だした。具体的には、NPL-1011, NPL-4001, NPL-3009, NPL-3011 であり、化合物名は誘導した化学シフト変化の大きさ順に並べてある CLDN3 ペプチドをネガティブコントロールとして、これらの化合物によって誘導された化学シフト変化を残基ごとにプロットしたグラフを図 6 に掲げる。

3. 4 LNX3-PDZ1 と CLDN16 の C 末端ペプチドの複合体の結晶化(図 7)

LNX3-PDZ1 ドメインの C 末端に CLDN16 の C 末端 4 アミノ酸を融合したキメラタンパク質を精製し、結晶化スクリーニングを行った。複数の条件で、特に温度が 4°C の条件でタンパク質の結晶が観察された。そのうちの一つを、共同研究者である東京医科歯科大学の沼本助教の協力で放射光施設 Spring-8 にて X 線結晶回折実験を行っていただいた。その結果、3.5 Å 相当の回折点を与える新規のタンパク質結晶であることが分かった。この結晶は、Crystal Screen 2 - #48 の条件(1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 12% v/v Glycerol)で結晶化したものである。現在、その条件ならびに類似の条件で得られた複数のタンパク質結晶を評価しつつ、最も分解能が高い結

晶の構造解析ならびに精密化を、分子置換法を用いて実施中である。しかし、現時点で精密化中の状態ではあるが、結晶の性質により原子分解能が 2.8Å 以下まで改善する可能性は低いため、最善の結晶ではないと判断している。特に立体構造に基づいた精密分子設計を目指すためにも、より高分解能な構造につながる上質な結晶を得るために、新たな結晶化条件の探索に着手した。今後の期待が持たれる。

4. 考 察

本研究課題では、まず、分子内の役割分担が未解明な、LNX3 に含まれる 2 つの PDZ ドメインのペプチドに対する基質特異性に関して、preliminary ながら一定の知見を得ることができた。すなわち、LNX3-PDZ1 ドメインは、CLDN3 の C 末端ペプチドとはほとんど相互作用しない。また、CLDN19 の C 末端とも弱くしか相互作用せず、CLDN16 の C 末端に強く相互作用した。このことは、LNX3-PDZ1 + CLDN19 キメラ PDZ ドメインが、類似条件では結晶化しなかったことから、弱いながら間接的に支持されている。他方、LNX3-PDZ2 については、CLDN



図 7 LNX3-PDZ1 + CLDN16 C 末端ペプチド複合体の結晶

16/19 と同程度の相互作用が本当にあるのか、分子内で基質結合部位として機能しているか、など、未解明の点が多い。LNX3-PDZ2 について、合成ペプチドと SPR (BIACORE) 実験などを組合せて、さらなる解明を続ける予定である。

今回、筆者らは、LNX3-PDZ1 ドメインの低分子・非ペプチド性の阻害剤候補として、NPL-1011, NPL-4001, NPL-3009 ならびに NPL-3011 の4つの N 置換型アントラニル酸誘導体を発見・同定した。この 4 つの化合物は 1011/3009 と 3011/4001 の 2 群に更に分類可能で、前者はスルホンアミド、後者はアミド結合で、アントラニル酸誘導体の A 環と B 環が連結されているという違いがある。大変興味深いことに、今回解析した LNX3 と類縁のタンパク質で、CLDN3 を含む一般的な上皮細胞で発現・機能している TJ の内在化促進・分解促進因子である LNX1¹³ について、筆者らはすでにその CLDN 認識責任ドメインを決定し、立体構造も決定し、LNX1-PDZ2 阻害剤を 3 種同定している。この 3 種の化合物のうち 2 種が今回活性を確認した NPL-1011 と 3009 である。この化合物を MDCK 細胞に一定時間曝露すると、CLDN2 を主たるクローディングとする TJ が強化されることを観察している。他方、NPL-3011 ならびに 4001 には MDCK 細胞の TJ 強化活性はないことも確認している。すなわち、下記表1のように、この 4 種 2 群の化合物のうち、前者のグループを LNX1/3 の郡特異的阻害剤の候補物質として、後者のグループを LNX3 の特異的阻害剤の候補物質として、それぞれ位置付けることが

可能である。TJ を専門に抑制分解する E3 ユビキチン化酵素の特異的阻害剤を探索・開発している研究グループは現時点では筆者らのグループだけと考えられる。本研究課題を通じて、傍細胞経路マグネシウムチャネル特異的な強化剤につながる LNX3 阻害剤と、マグネシウムチャネルも含めた腎臓上皮細胞のタイトジャンクションを総合的に強化する LNX1/3 同時阻害剤という、新たな阻害剤のコンセプトを確立できた。

5. 今後の課題

今回の研究で発見した 4 種の化合物はアフィニティーが低く、おそらく数 10 μ M 以上の K_d 値であると考えられる。そこで、さらなる小さな K_d 値をもつ新規化合物を探索する、あるいは分子設計する必要がある。そのために有効なインシリコ探索手法をすでに開発済みである。すなわち、Dishevelled PDZ ドメイン阻害剤を探索発見したときに用いた手法である NMR-DPI 指標を用いた多重探索を行えばよい。NMR-DPI とは、(1) 複数のドッキングプログラムで、図 1 に上げた化合物を LNX3-PDZ1 の立体構造に対してドッキングし、そのドッキングから得られた予測 K_d 値またはそれに代わるスコア値を得て、化合物を順位づけする。(2) すでに今回の実験で得られているように、標準化した化学シフト移動度を指標に、NMR から得られた結合親和性を、やはり化合物の順位スコアとする。(3) (1) で得られた順位スコアのうち、(2) で実験的に得られている順位スコアを最もよく傾向が一致するドッキングプログラム(アルゴリズム、パラメータセット、あるいはその両者の組合せ)を、最も予測能力が高いドッキング法と定める。(4) (3) で決定した方法に従い、新規のアントラニル酸誘導体に対して仮想スクリーニングを行い、今まで得ている化合物の最高スコアを与える化合物の中から、高活性の化合物を探索する。Docking performance index (NMR-DPI) は、(3) の過程で、ドッキング実験と NMR 実験の整合性を比較するために筆者らが定義導入した index 計算法である¹¹。この手法を近日中に実施し、より K_d 値の小さい LNX3-PDZ1 阻害剤を入手するとともに、培養細胞を用いた遠位尿管(ヘンレ管)での TJ 強化活性の確認を行う予定である。

最後となったがまだまだ途上ではあるものの今後のさらなる発展が期待される TJ 制御機構に関する基盤的研究

をご支援くださった、ソルト・サイエンス研究財団の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

6. 文献

1. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, et al. (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* (80-.). 285:103–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10390358/>
2. Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey A V., Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, et al. (2006) Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am. J. Hum. Genet.* 79:949–957. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17033971/>
3. Marunaka K, Furukawa C, Fujii N, Kimura T, Furuta T, Matsunaga T, Endo S, Hasegawa H, Anzai N, Yamazaki Y, et al. (2017) The RING finger- and PDZ domain-containing protein PDZRN3 controls localization of the Mg^{2+} regulator claudin-16 in renal tube epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 292:13034–13044.
4. Hiroaki H, Satomura K, Goda N, Nakakura Y, Hiranuma M, Tenno T, Hamada D, Ikegami T (2018) Spatial Overlap of Claudin- and Phosphatidylinositol Phosphate-Binding Sites on the First PDZ Domain of Zonula Occludens 1 Studied by NMR. *Molecules* 23:2465. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30261614>
5. Fujiwara Y, Goda N, Tamashiro T, Narita H, Satomura K, Tenno T, Nakagawa A, Oda M, Suzuki M, Sakisaka T, et al. (2015) Crystal structure of afadin PDZ domain-nectin-3 complex shows the structural plasticity of the ligand-binding site. *Protein Sci.* 24:376–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534554>
6. Tenno T, Goda N, Tateishi Y, Tochio H, Mishima M, Hayashi H, Shirakawa M, Hiroaki H (2004) High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling. *Protein Eng. Des. Sel.* 17:305–314. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166312>
7. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6:277–293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8520220>
8. Goddard TD, Kneller DG (2004) Sparky 3, 2004, University of California, San Francisco. Available from: <http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>
9. Jung Y-SS, Zweckstetter M (2004) Mars - Robust automatic backbone assignment of proteins. *J. Biomol. NMR* 30:11–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452431>
10. Tenno T, Goda N, Umetsu Y, Ota M, Kinoshita K, Hiroaki H (2013) Accidental interaction between PDZ domains and diclofenac revealed by NMR-assisted virtual screening. *Molecules* 18:9567–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23966078>
11. Hori K, Ajioka K, Goda N, Shindo A, Takagishi M, Tenno T, Hiroaki H (2018) Discovery of Potent Dishevelled/Dvl Inhibitors Using Virtual Screening Optimized With NMR-Based Docking Performance Index. *Front. Pharmacol.* 9:983. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30233369>
12. Schumann FH, Riepl H, Maurer T, Gronwald W, Neidig K-P, Kalbitzer HR (2007) Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *J. Biomol. NMR* 39:275–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17955183>
13. Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M (2009) The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *J. Cell Sci.* 122:985 – 94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19295125>

Rational Drug Discovery for Inhibiting Ubiquitination of Magnesium Channels

Hidekazu Hiroaki, Takeshi Tenno

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University

Summary

We are focusing on the paracellular Mg^{2+} -selective channel that is responsible for reuptake of Mg^{2+} . The paracellular Mg^{2+} is composed by two claudins (CLDNs), CLDN16 and 19, the molecules involved in intercellular adhesion. It is known that the physiological stability of these CLDNs is controlled by LNX3, a specific E3 ubiquitinating enzyme. In this study, we tried to discover small molecules that inhibit the interaction between LNX3 and CLDN16/19, since such molecules could lead to the development of LNX3 inhibitors. Transient inhibition of degradation of CLDN16/19 by LNX3 may result in recovering disfunction of magnesium homeostasis, thereby offering a new crew for development of novel drugs for hypomagnesemia. In vitro binding experiments with the bacterially expressed proteins showed that the first PDZ domain of LNX3 (LNX3-PDZ1) bound the C-terminus of CLDN16. We further confirmed CLDN3 and CLDN19 did not show any binding. On the other hand, between the second PDZ domain (LNX3-PDZ2) and the C-termini of both CLDN16/19 were unclear and seemed non-specific, although certain interaction was observed.

Next, the authors succeeded in discovering four non-peptidic inhibitors against LNX3-PDZ1 by using the NMR-screening method. This screening was performed using our original focused library of compounds of anthranilic acid derivatives, since we already identified that anthranilic acid is the common pharmacophore for pan-PDZ domain specific inhibitors. Unfortunately, all these prototype compounds did not show enough high affinity against LNX3-PDZ1. It is unlikely to become a lead compound for further drug development. Then, we attempted to advance the precise molecular design of LNX3-PDZ1 specific inhibitors with structural information of atomic resolution by X-ray crystallography of LNX3-PDZ1 / CLDN16 complex. At present, we have succeeded in obtaining a crystal that gives diffractions whose resolution is equivalent to approximately 3.5 Å. Further structural refinement is now on the way.