

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13101

研究課題名(和文)点変異たんぱく質と低分子ツールを用いる細胞内信号伝達未踏領域への挑戦

研究課題名(英文)Elucidation of intracellular signal transductions by use of point mutated proteins and molecular tools

研究代表者

加藤 修雄 (Kato, Nobuo)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：50150537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：14-3-3タンパク質はリン酸化タンパク質を捕捉することで細胞内信号伝達を制御している。本研究は、ヒト14-3-3の7種のアイソフォームの機能を点変異体と低分子ツールを用いることで解明することを目的とした。野生型14-3-3には、アイソフォームを用い、そのLys120に対する数種の点変異体を取得した。点変異体のモデルペプチド会合能はいずれの場合も野生型より大きく減弱したが、シテルペン配糖体・フシコクシン(FC)の誘導体の添加によって一部その会合能の回復が見られた。よって、点変異体とFC誘導体を用いた表現型解析は14-3-3アイソフォームの機能解析に有用な手法となり得る。

研究成果の概要(英文)：14-3-3 proteins regulate intracellular signal transductions by associating with phosphorylated proteins. This study aimed to elucidate the functions of seven isoforms of human 14-3-3 protein by using their point mutants and small molecule chemical tools. The isoform was used for wild type 14-3-3, and several point mutants on its Lys 120 were obtained. In any cases, the binding affinities of the point mutants toward model peptides were attenuated as compared with that of the wild type, but the association ability was partly recovered by derivatives of diterpene glycoside, fusicoccin (FC). Thus, phenotypic analysis using 14-3-3 point mutants and FC derivatives can be a useful method for functional analysis of 14-3-3 isoforms.

研究分野：化学生物学

キーワード：タンパク質間相互作用 14-3-3タンパク質 フシコクシン コチレニン

1. 研究開始当初の背景

細胞内信号伝達の主たる実態の一つは、機能タンパク質のリン酸化-脱リン酸化をスイッチとするものであり、最終的には入力信号に対応した遺伝子/表現型発現によって完了する。リン酸化状態の相違による細胞内局在や下流タンパク質とのタンパク質間相互作用 (PPI) の変調がスイッチ本体であるが、その過程に介在するのが真核細胞生物に普遍的 (酵母からヒトまで) に発現している 14-3-3 タンパク質である。14-3-3 タンパク質は、クライアントタンパク質をリン酸化依存的に捕捉し、信号の受け渡しに参与している。したがって、細胞内信号伝達の全容解明には、14-3-3 タンパク質による制御機構解明が不可欠であると同時に、その機能を変調させることで、信号伝達や表現型を逆に制御することが可能であると考えられる。14-3-3 タンパク質の機能が明らかにされて以降 (1990 年代)、このアダプタータンパク質を研究対象とする公表論文数は増加の一途を辿り、近年は年間 800 報を超える学術領域を形成するに至っている。細胞の分化・増殖・アポトーシス等への関与、アルツハイマー・がん等の疾病への関与など多くの研究成果が得られて来た。しかし、現在なお未踏の領域として、アイソフォームの存在意義・特異的機能の解明が残されている。すなわち、ヒト細胞中には 7 種のアイソフォーム ($\beta, \gamma, \epsilon, \eta, \sigma, \tau, \zeta$) が発現しているが、個々のアイソフォームの固有の機能に関する知見は十分に解明されているとは言いがたい。その全容解明が困難であるのは、アイソフォーム間の相同性が極めて高く、特にクライアント会合溝はヒトの 7 種のみならず、生物種を超えてほぼ完全に保存されているからである。たとえば、アイソフォームの一つをノックアウトすると細胞内の他のアイソフォームが代用されることが知られており、したがって、ノックアウト手法によって機能解析を行うことは極めて困難である。以上の理由から、アイソフォームの存在意義、特異的機能の解明は未踏領域として残されてきた。

2. 研究の目的

本研究は、14-3-3 点変異体と低分子ツールを用いることで、アイソフォームの機能を解明しようとするものである。具体的には、野生型よりクライアント捕捉能に劣る 14-3-3 点変異体と、点変異体とクライアントの会合のみを選択的に安定化できる低分子化合物を用いることを基本戦略とした。究極の目的達成のためには、形質転換によってそれぞれの点変異体を有する細胞系を樹立し、低分子ツールの非添加/添加時のトランスクリプトーム解析など表現型解析を遂行する必要があるが、1 年間の萌芽研究においては、そうした戦略を可能とする点変異体と低分子ツールの組合せを見出し、基本戦略の適用可能性の立証を研究目的とした。

3. 研究の方法

申請者は、ジテルペン配糖体・フシコクシン/コチレニン (FC/CN : 図 1) 類が 14-3-3 とそのクライアントの PPI を安定化 (正に変調) することに着目し、意図的に分子設計した合成類縁体が表現型を制御しうること (*Chem. Bol.*, **2013**, *20*, 583; *ACS Chem. Bol.*, **2013**, *8*, 1869) を示すとともに、抗がん剤として期待できる類縁体の創出 (*Anticancer Agents Med. Chem.*, **2012**, *12*, 791; *Int. J. Oncol.*, **2015**, *47*, 315) にも成功している。

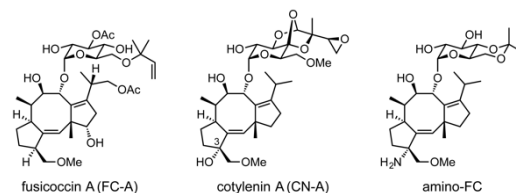


図 1. FC, CN および amino-FC.

そして、研究展開の中で特異なクライアント選択性の発現を期待して、アミノ基を有する amino-FC を創製したが、予想に反して 14-3-3 PPI に対する安定化能をほとんど示さないことが判明した。分子形状は CN-型とほぼ同一であり、受入れ難い結果であったが、逆にこの性状は本研究における低分子ツールとして適していると考えられる。すなわち、amino-FC が安定化能を示さないのは、生理的条件下にプロトン化する 3 位アミノ基と、やはりプロトン化している 14-3-3 中の残基との電荷反撥であると考えられるので、原因となる残基を点変異させれば、安定化能が回復すると考えられるからである。図 2a は、CN 糖鎖を amino-FC 型に変換した CN 型誘導體であり、実際、14-3-3 PPI に対する安定化能が確認されている ISIR-050 が 14-3-3 ζ の結合サイトに会合した構造の一部を示した図であるが、Lys120 が 16 位エーテル酸素および 3 位水酸基との間に水素結合を形成していることが示唆される。

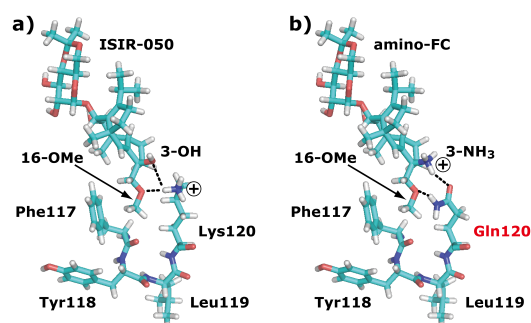


図 2. ISIR-050 および amino-FC の 14-3-3 に対する仮想的結合様式。

amino-FC は ISIR-050 のヒドロキシ基がアミノ基に置換した構造であるので、前者と同様の結合様式を取ろうとすると、Lys120 との間に電荷反撥を生じることが容易に想定できる。したがって、たとえば、Lys120 を Gln に点変異した 14-3-3 が野生型と同様の機能を有するとすれば、amino-FC が点変異体のみ PPI 安定化能をもつことが期待できる (図 2b)。

この Lys120 はヒトの 7 種のみならず、生物種を超えて 14-3-3 の全てのアイソフォームに保存されているので、1 つのアイソフォームで研究手法の妥当性を立証できれば、全てのアイソフォームに適用可能と考えることができる。本研究では野生型としてヒトのアイソフォームを用い、Lys120Gln を含む数種の点変異 14-3-3 を取得し、そのモデルペプチド会合能に対する amino-FC およびその誘導体の安定化効果を検証することとした。蛍光標識したモデルペプチドの蛍光偏光 (FP) 測定によって K_D 値を求め、低分子ツール非存在/存在下の値を比較することで安定化効果を評価した。

14-3-3 タンパク質によって認識されるクライアントタンパク質のアミノ酸配列として主に 2 種知られている。内部配列 (mode 1 型) である $\cdots\text{RSX-pS/T-X}(i+1)\text{P}\cdots$ および C 端配列 (mode 3 型) $\cdots\text{XXX-pS/T-X}(i+1)\text{-COOH}$ である。14-3-3/リン酸化ペプチド/FC 誘導体の 3 者会合体の X 線構造解析結果 (たとえば、PDB ID: 3SPR) から推察できるように、我々は、FC/CN の 14-3-3 PPI に対する安定化効果が、リン酸化位置に隣接した $i+1$ 位が中程度の大きさを持つ疎水性アミノ酸である場合に顕著であり、また、mode 1 型より mode 3 型に対して大きいことを明らかにしていた。本研究では、点変異体においても同様の傾向があることを期待し、主に mode 3 型をモデルペプチドとして選択した。

4. 研究成果

米国 Kahn 教授 (南カリフォルニア大学) より恵与頂いた野生型 14-3-3 ζ プラスミド (vector: pTriEx-4) に、以下のプライマーを用いて変異導入、大腸菌 (Rosetta-gami 2TM (DE3)) に形質移入し、それぞれの点変異体を His タグ付き組換えタンパク質として取得した。いずれの場合も変異体の発現に問題はなかった。

Lys120Gln

forward: tatttgcagatgaaaggagattactac

reverse: tttcatctgcaaatagaagactttgct

Lys120Glu

forward: tatttggaaatgaaaggagattactac

reverse: tttcatttccaaatagaagactttgct

Lys120Met

forward: tatttggatgatgaaaggagattactac

reverse: tttcatcatcaaatagaagactttgct

Lys120Ala

forward: tatttggcgatgaaaggagattactac

reverse: tttcatccgcaaatagaagactttgct

amino-FC およびその誘導体は、当研究室、米山徹博士によって合成されたものを使用した。

モデルペプチドは、N 端 Lys の主鎖アミノ基を 5-carboxyfluorescein (FAM) によってカルバメート化した FAM-KRSH-pS-X-COOH を購入 (東レリサーチ) し、そのまま使用した。当初の計画で第一候補とした Lys120Gln に対

する mode 3 型リン酸化ペプチドの会合能を FP 測定によって評価した。変異体に対するペプチドの会合能は野生型に対する場合に比較して著しく減弱したが、野生型に対する $i+1$ X のアミノ酸残基依存的会合能の傾向、すなわち、 K_D 値の小さな上位のペプチドの X アミノ酸は序列こそ厳密には一致しないものの、変異体に対しても同様の傾向にあることが確認できた。すなわち、野生型の上位、X= Trp ($K_D=0.20 \mu\text{M}$), Ile ($K_D=0.49 \mu\text{M}$), Val ($K_D=0.63 \mu\text{M}$), Tyr ($K_D=0.79 \mu\text{M}$), Phe ($K_D=1.1 \mu\text{M}$), Cys ($K_D=1.2 \mu\text{M}$), Leu ($K_D=1.6 \mu\text{M}$), Met ($K_D=2.3 \mu\text{M}$), Ala ($K_D=2.3 \mu\text{M}$) の上位 9 種は、変異体に対しても上位の 9 種であった。変異体に対する値は、それぞれ、以下の通りであった。40, 150, 180, 72, 110, 230, 45, 150, 220 μM 。この 2 桁の会合能の低下自身は、細胞系での表現型解析の際に単独では機能を発揮しないと言う意味では肯定的な結果と考えることはできるが、amino-FC 等の低分子ツールの効果の検証が正確には行えない欠点となった。実際、amino-FC 添加時にその効果が確実に見られたのは、通常、100 nM のペプチドに対して 100 μM の FC 誘導体の添加で評価するのに対して、1 nM のペプチドに対して 400 μM という高濃度の amino-FC を添加した時に、X=Ile (150 \rightarrow 87 μM), Val (180 \rightarrow 140 μM) だけであった。もちろん、研究目的達成のためには、少なくとも野生型に対するのと同程度の K_D 値まで会合能を回復させる必要があり、全く不十分な結果ではある。しかし、FC 誘導体が Lys120Gln 変異体とリン酸化ペプチドの会合を弱いながら安定化した事実は、研究の方向性を否定するものではないと言える。

ついで、Lys120Gln が amino-FC との水素結合を期待したのに対して、静電的相互作用を期待して作成した Lys120Glu 変異体を評価した。この変異体に対するモデルペプチドの解離定数は、さらに増大 (野生型に対する場合より 3 桁) し、議論できる精度で K_D 値を求めることはできなかった。しかし、図 3 のグラフ形状から明らかなように、この場合も X=Ile のペプチドの K_D 値が amino-FC の添加によって低下することが確認できる。しかし、

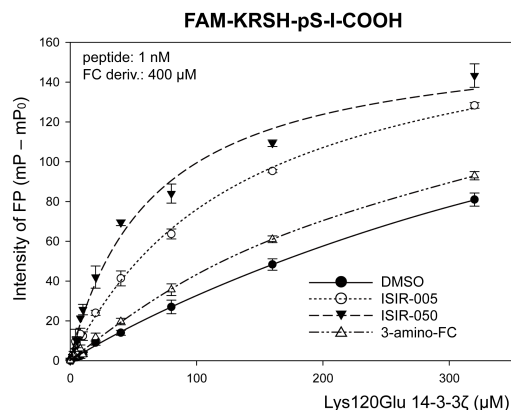


図 3. 蛍光偏光 (FP) 測定結果. ISIR-005 は、ISIR-050/amino-FC の 3 位無置換体。

amino-FC の安定化効果は ISIR-050 や ISIR-005 (3 位無置換体) の安定化効果より小さく、意図した静電的相互作用が寄与しているとは言い難い。

上述のように、Lys120Gln および Lys120Glu のペプチド会合能はいずれの場合も野生型に比較し著しく減弱した。Lys120 の保存性は、ヒトの 7 種のアイソフォームに同一手法を適用できるという意味で研究遂行上は利点であるが、一方で、機能発現に重要な残基であることを意味する。特に、Asp124 との水素結合/静電相互作用によって、9 本の α -ヘリックスからなる 14-3-3 の構造維持に重要である可能性が示唆された。そこで、これら変異体の構造変化の可能性を円偏光二色性 (CD) スペクトルによって検証したその結果 (図 4) 、

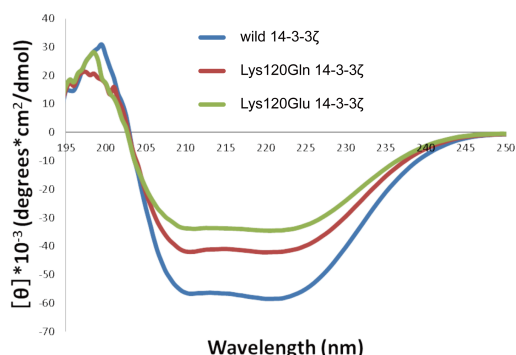


図 4. 野生型および点変異 14-3-3 の CD スペクトル。

点変異体のヘリックス性は野生型より低下していることが強く示唆された。その程度は、Lys120Glu においてより顕著であり、先述した会合能の評価結果に一致している。すなわち、点変異体の会合能の低下が構造の脆弱性に起因しており、野生型での Lys120 と Asp124 の相互作用の重要性が示唆された。もう一点、Lys 側鎖と異なり、Gln や Glu の側鎖末端がアミドあるいはカーボキシレート基であり、いわば分岐型であることが構造の脆弱性の要因である可能性も考えられる。

その点を明らかにする目的で、分岐のない側鎖を持つ Lys120Met 変異体を取得し、そのペプチド会合能を検証した。しかしながら、この変異体は、mode 3 型ペプチドに対する会合能をほとんど示さず、むしろ、mode 1 型ペプチドの一部に対して選択的な会合能を持つことが判明した。X=Cys の mode 1 (FAM-KRSH-pS-CP-COOH) の K_D 値 (1.4 μ M) を示した。この組合せに対して、弱いながら FC-A による安定化効果 ($K_D=0.38 \mu$ M, 400 μ M FC-A) も認められた。Lys120Met が mode 3 ペプチドに親和性を示さないのは、Met への変異によって周辺環境の疎水性が高まり、mode 3 ペプチド C 端カーボキシレートと相容れなかったためと考えられる。X=Cys の mode 1 ペプチドと最も高い親和性を示したのも同様の理由によるのであろう。この特異なペプチド選択性は興味深い、目的をアイソフォームの機能解析に限定するならば、ペプチド選択性が野生型と大きく異なることは望ましくない。

最後に、Lys120Ala 変異体について記述する。FC/CN の強い 14-3-3 PPI 安定化能に 16-OMe 基が必須であることが知られている。すなわち、図 2 に示すように、14-3-3 の狭い疎水性ポケットに OMe 基が差し込まれる必要がある。その観点から、amino-FC 以外にも、野生型 14-3-3 PPI を安定化しない FC 誘導体が存在する。16-OSMe-FC である。硫黄原子の嵩高さ、あるいは、S-C 結合の長さから、この疎水ポケットに受入れられないためと考えられる。Lys120Ala は、この疎水ポケットの拡大を指向して設計した。しかし、この場合もペプチド会合能は著しく減弱し、16-OMe-FC による有意な会合能の回復も認められなかった。

以上、本研究は、14-3-3 点変異体と変異体の PPI のみを安定化し得る低分子化合物を用いて、14-3-3 アイソフォームの機能解析を目指したものであったが、十分な結果を得るには至らなかった。しかし、減弱した変異体のリン酸化ペプチド会合能は、限定的とは言え、FC 誘導体によって回復した結果も得られており、本手法を否定するものでもない。今後、変異位置の最適化や目的に合致する新たな FC 誘導体の創製など、さらなる研究展開を期待したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ :

http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/organization/thi/thi_04/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 修雄 (KATO, Nobuo)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号 : 5 0 1 5 0 5 3 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし