

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08382

研究課題名（和文）N-リン酸化タンパク質の受容体発見を目指す化学とその応用

研究課題名（英文）Chemical approach towards identifying a putative receptor of N-phosphorylated proteins

研究代表者

山口 泰史（Yamaguchi, Yasuchika）

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：10183980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、N-リン酸化タンパク質の受容体タンパク質を見つけ出す方法論の開発であった。新しい情報伝達系の確立を目指した。

一つの成果は、新規安定ホスホヒスチジン誘導体類の合成であった。スケールアップも可能であった。さらにライブラリー合成法自体は確立できた。

本研究課題で合成した化合物の中から、ある感染症プロジェクトにおいて、強い活性を示す新規化合物を発見した。この発見を創薬研究へと育てていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の目的は、N-リン酸化タンパク質の受容体タンパク質を見つけ出す方法論の開発という基礎的なものであった。研究の過程で多くの新規化合物を合成した。これらを感染症プロジェクトの評価系にかけたところ、これまでの知見では説明できない活性化化合物を発見できた。つまり新しいメカニズムをもつ医薬品創成に役立つ結果である。感染症分野の新薬の期待は大きいことから、この発見を実際の創薬につなげていく予定である。

研究成果の概要（英文）：The original aim of this project was to develop a new methodology for finding unknown receptor proteins that recognize N-phosphorylated proteins. We used chemically stable N-phosphorylated amino acid analogs and peptides for our purpose. Thus, we tried to find out a new information system that uses N-phosphorylation as an intermediate.

So far what we have achieved are following: We have synthesized several stable phospho-amino acid analogs, which could be incorporated into peptide libraries. Within our library we discovered exceptionally active lead compounds for an infectious disease project. Since the medical need of this field is huge, we continue medicinal chemistry efforts with these findings.

研究分野：医薬品化学

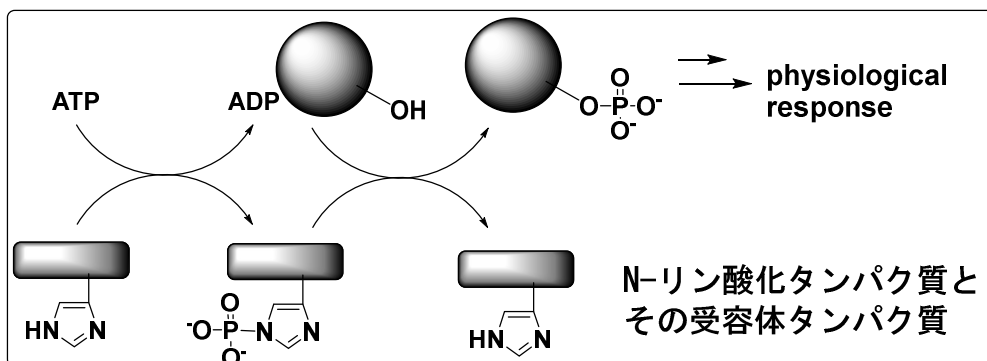
キーワード：N-リン酸化 ホスホヒスチジン ペプチドライブラリー

1. 研究開始当初の背景

近年、チロシン、セリンおよびスレオニン残基のリン酸化・脱リン酸化反応による細胞内情報伝達機構の理解は飛躍的に進んだ。これらリン酸エステル (P-O 結合) に対し、リン酸アミド (P-N 結合) を生じるヒスチジン、リジン、アルギニンのリン酸化については、まったく進歩がみられない。この理由は、リン酸エステル (P-O 結合) とは違い、リン酸アミド (P-N 結合) は反応性が高く、容易に加水分解されることに起因する。

チロシンキナーゼ発見者として著名な Tony Hunter (Salk Institute) は、2000 年 雑誌 Cell に発表した総説 (Signaling-2000 and Beyond) で、N-リン酸化の重要性を予見し、何らかの解析 tool を開発できれば、この分野で新しい発見に寄与できると指摘した。しかし、リン酸エステル (P-O 結合) で多用されてきたリン酸化体を認識する抗体すら、N-リン酸化体の不安定性のため作れなかった。2013 年、Princeton 大学の Muir らは安定なホスホン酸をもつヒスチジンアナログをハプテンとし、初めて N-リン酸化ヒスチジンを認識する polyclonal 抗体の作成に成功したにすぎない。(Nat. Chem. Biol.)

しかし、単に N-リン酸化体を認識する抗体を作り出し、そのタンパク質を同定しただけでは、情報伝達系を確立できない。なぜなら N-リン酸化タンパク質は、バクテリアの二成分制御系 (Two-Component system) のように、リン酸を受け取る受容体タンパク質と対になって存在していると考えられているからである (news & views, 2013, Nat. Chem. Biol.)。つまり、ヒスチジン等の N-リン酸化体は「一時的な中間体」として存在し、受容体タンパク質に特異的にリン酸残基を受け渡す。受容体タンパク質がリン酸化され、はじめて生理学的役割を果たすのである。したがって、N-リン酸化を経由する系は、キナーゼ触媒存在下、ATP から直接リン酸化を受ける情報伝達系とは明らかに異なる。ヒトを含む高等動物でも、N-リン酸化タンパク質は知られているものの、情報系としてその生理学的意義が確立されたものはない。多くの科学者がこの問題の解決を試みたが、従来の分子生物学的および生化学的なアプローチからは何ら成果が得られなかった。本研究で、化学的な思考に基づき、N-リン酸化タンパク質とその受容体タンパク質を見つけ出す新規方法論の開発に挑戦した。



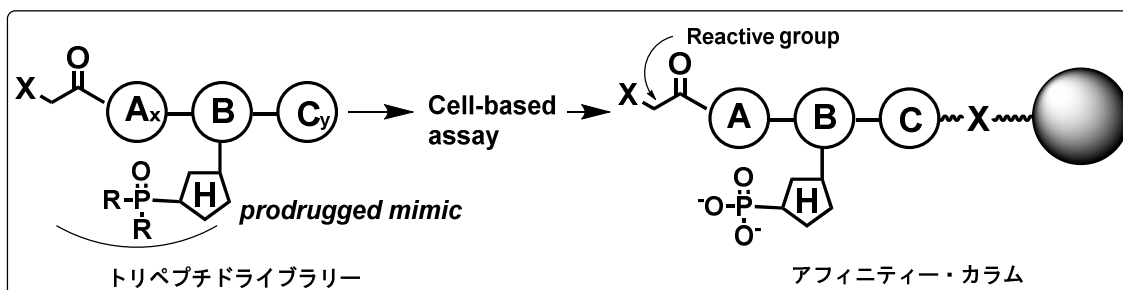
2. 研究の目的

本研究の第 1 の目的は、N-リン酸化タンパク質の受容体タンパク質を見つけ出す方法論の開発である。これを基盤として、創薬ターゲットになりうる「新規情報伝達系」の発見を試みるのが、第 2 の目的であった。リン酸エステルであるチロシン等のリン酸化は、キナーゼを触媒として、ATP から直接酸素原子にリン酸残基が移る。一方ヒスチジン等の N-リン酸化体は「一時的な中間体」として存在し、受容体タンパク質の酸素原子に受け渡すと考えられている。生理学的な役割を担うのは後者であり、その解明なくしては、情報系の理解は進まない。本研究では、この反応プロセスを化学的に模倣する N-リン酸化アミノ酸の安定アナログを含むペプチドと反応性官能基を利用し、受容体タンパク質を見つける。この結果をもとに新しい情報伝達系の確立を目指した。

3. 研究の方法

当初の計画では 3 つの段階で研究を進める予定であった。すなわち、a 化学合成を主とする準備段階、b 方法論の確立と確認段階、c ヒト細胞での情報伝達系を確立する段階である。研究期間内に a, b, c のすべての段階を順次確立する。a すでに合成しているヒスチジンの安定 C-P 模倣化合物を用い研究を開始することから、研究初期に ジ/トリペプチドライブラリー構築を終えることができる。可逆阻害と不可逆阻害両方に対応できるように合成を行う。またホスホン酸部位をプロドラッグ化して細胞吸収性を可能とする。b グラム陽性菌と陰性菌の抗菌活性を指標に研究コンセプトを確認する。バクテリアには、必須 (essential) のヒスチジンキナーゼと対になるレスポンスレギュレーター (二成分制御系) が存在する。この阻害活性は研究コンセプト成否を表す。c ヒト細胞系を使い、共有結合形成可能なアフィニティー・カラムで、受容体タン

パク質を単離・同定する。



しかし、化学合成を基盤とするところで大きな問題に遭遇した。aすでに合成しているヒスチジンの安定 C-P 模倣化合物を用い研究を開始することから、研究初期にペプチド合成法は確立できた。しかし、ホスホン酸部位に由来する化学的な安定性と溶解性の問題に遭遇した。種々誘導体を作成し、うまい解決法がなかった。プロドラッグ化等も試みたが、やはり安定性に問題があった。溶解性、安定性と細胞透過性の問題をいっぺんに解決する方法を見つけることができなかった。したがって、段階 b の研究コンセプトの確認までに至らなかった。

4. 研究成果

(1) ホスホヒスチジンを模倣した化合物を設計した。それぞれの合成方法を開発し、ほぼ最適化できた。類縁体を合成する方法を確立できた。

(2) 新規ホスホン酸または C-P 結合を有する誘導体を含む Building Block を含むペプチドを合成した。

(3) 上記の化合物群および単純な誘導体から、メディカルニーズの高い、ある感染症の細胞評価系において、強い活性を示す分子量 400 以下の新規化合物を発見した。この化合物はこれまでに知られていない新しい作用機序をもつ可能性が高い。また、構造の新規性、分子量、物性等を考慮すると、既に創薬リード化合物の域にある。特許取得後、本研究課題のスピンオフとして、この発見から創薬への展開を図る予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shindo N, Fuchida H, Sato Mi, Watari K, Shibata T, Kuwata K, Miura C, Okamoto K, Hatsuyama Y, Tokunaga K, Sakamoto S, Morimoto S, Abe Y, Shiroishi M, Caaveiro J. M. M., Ueda T, Tamura T, Matsunaga N, Nakao T, Koyanagi S, Ohdo S, Yamaguchi Y, Hamachi I, Ono M, Ojida A	4. 巻 15
2. 論文標題 Selective and reversible modification of kinase cysteines with chlorofluoroacetamides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 250 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0204-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta T, Tilkanont T, Ayertey F, Nakagawa M, Tung NH, Bolah P, Blagooee H, Appiah AA, Ocloo A, Ohashi M, Tanoue K, Yamaguchi Y, Ohta N, Yamaoka S, Iwanaga S, Uto T, Shoyama S.	4. 巻 164
2. 論文標題 Establishment of a quantitative and qualitative analysis and isolation method for tetracyclic iridoids from <i>Morinda lucida</i> Benthams leaves.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 475-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田智絵, Tanatorn Tilkanont, Nguyen Huu Tung, Frederick Ayertey, 田上兼輔, Alfred A. Appiah, Augustine Ocloo, 大橋光子, 宇都拓洋, 山口泰史, 岩永史郎, 太田伸生, 正山征洋
2. 発表標題 Morinda lucida含有テトラサイクリックイリドイドの定量分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口 泰史
2. 発表標題 いかにして、活性ある化合物 (functionally active compounds) を見つけだすか? : 先人に学ぶ
3. 学会等名 日産化学株式会社 創薬セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 安藤 章、山口 泰史 他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 454
3. 書名 薬系 有機化学	

1. 著者名 日比野、石倉、北川、須本、波多江、山口 泰史 他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 廣川書店	5. 総ページ数 368
3. 書名 新編 医薬化学	

1. 著者名 山口 泰史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 三共出版	5. 総ページ数 120
3. 書名 大学生のための有機反応問題集 第2版	

1. 著者名 臨床医薬品化学研究会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 264
3. 書名 現場で役に立つ！ 臨床医薬品化学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	田上 兼輔 (Tanoue Kensuke) (70738236)	長崎国際大学・薬学部・助手 (37303)	
連携研究者	正山 征洋 (Shoyama Yukihiro) (70037604)	長崎国際大学・薬学部・教授 (37303)	
連携研究者	黒川 健児 (Kurokawa Kenji) (80304963)	長崎国際大学・薬学部・教授 (37303)	
連携研究者	藤田 英明 (Fujita Hideaki) (80291524)	長崎国際大学・薬学部・教授 (37303)	
連携研究者	王子田 彰夫 (Ojida Akio) (10343328)	九州大学・薬学研究科(研究院)・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関