

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19197

研究課題名(和文)人工翻訳後修飾

研究課題名(英文)Synthetic post-translational modifications

研究代表者

上杉 志成(Uesugi, Motonari)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：10402926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、翻訳後修飾と同じ効果を小分子化合物で生み出すことに挑戦する。これまでの試薬は、いずれも「デザイン」された試薬であり、現時点での知識を活用したものである。本研究では、細胞内の特定のタンパク質に特異的に共有結合して機能を改変する化合物を網羅的に「発見」する。さらに、発見された化合物がどのようにしてタンパク質の機能を改変するのか、そのメカニズムを研究した。1657個の反応性合成化合物、83個の反応性天然物をプロテオームでスクリーニングし、2つの有望な合成化合物と1つ有望な天然物を同定した。これらの化合物は標的タンパク質の機能を変調していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多数のタンパク質に対して多数の化合物をスクリーニングし、「人工翻訳後修飾」を探索した例はこれまでになく、世界初。利用する反応性化合物ライブラリーは世界的に独自性が高い。成功すれば、これまでになかった新しい知識を生み出して、生理活性小分子化合物や創薬の研究方向を変革する潜在的可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Small-molecule probes that are covalently attached to a protein of interest often serve as tools for biological research by facilitating detection and purification of the protein and its binding partners. This project proposes a new approach to discovering covalent chemical probes that label specific proteins. To identify such probe-protein pairs in an unbiased way, we have been taking advantage of our in-house chemical library that consists of 1,657 electrophile synthetic compounds and 83 reactive natural products. The screening of the library isolated three promising molecules: two synthetic molecules and one natural product. We are currently in the process of analyzing their effects on the biological functions of the target proteins.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 化合物ライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、細胞内の内因性タンパク質に特異的に共有結合する化合物の研究は行われてきた。例えば、京都大学の浜地らによる研究では、特定のタンパク質に結合する薬物に反応性置換基を導入することで、そのタンパク質を選択的に化学修飾する方法を開発している。特定の細胞内タンパク質をラベルして検出する優れた方法である。しかし、細胞内の翻訳後修飾のように、タンパク質の機能を改変することは困難である。一方、オックスフォード大学の Davis らは、タンパク質の特定のアミノ酸と反応する様々な試薬を開発してきた。これらの試薬はタンパク質の化学修飾や機能解析に極めて有用である。しかし、細胞内の翻訳後修飾のように、特異的な内因性タンパク質のみに反応し、機能を改変することはできない。

本研究では、翻訳後修飾と同じ効果を酵素ではなく、小分子化合物で生み出すことに挑戦する。分子量の小さな化合物が特定のタンパク質だけを認識して一つのアミノ酸に特異的に反応し、しかもそのタンパク質の機能を改変する——そのような魔法のような化合物は存在するのだろうか？代表者は存在すると考えている。その理由は3つある。

[理由1] 生物が作り出す天然物の中には、特定のタンパク質を認識して特異的に共有結合し、タンパク質の機能を阻害するものがある。例えば、北里大学の太田らが発見したラクタシスチンはプロテアゾームのスレオニンに特異的に反応し、プロテアゾームがタンパク質を分解するのを阻害する。この化合物は有用な研究用試薬となっている。このようにスクリーニングによって発見された天然物の中には、特定のタンパク質に共有結合して、タンパク質の機能を阻害するものが存在する。

[理由2] そのような化合物は、人工的な合成化合物に存在するのだろうか。申請者らは1657個の反応性化合物ライブラリーから、TRPA1（わさび辛味成分や低温を感知するイオンチャンネル）を特異的かつ強力に活性化する化合物を発見し、報告した[J. Am. Chem. Soc., 2015]。この化合物はTRPA1の1つのシステインに共有結合する。標的とするタンパク質によっては、特異的に共有結合し、その機能を調節する合成化合物が存在する。

[理由3] 研究計画で詳述するように、パイロット的なスクリーニングを行い、解析したところ、極めて有望な化合物を発見した。同様のスクリーニングを続ければ、様々な興味深い化合物が発見できると予想される。

## 2. 研究の目的

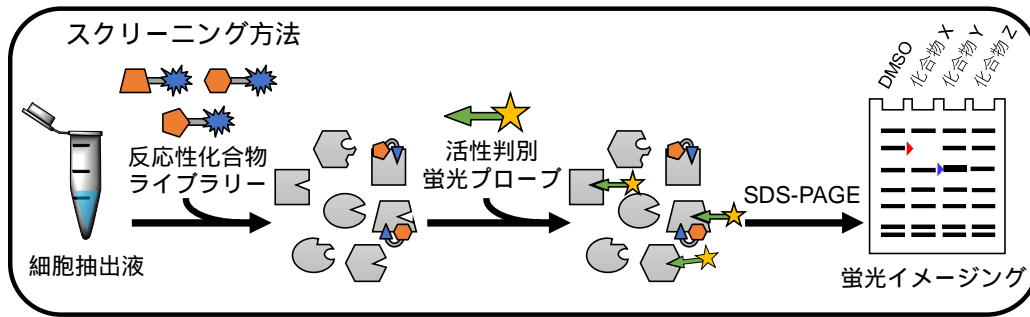
本研究では、翻訳後修飾と同じ効果を小分子化合物で生み出すことに挑戦する。これまでの試薬は、いずれも「デザイン」された試薬であり、現時点での知識を活用したものである。本研究では、細胞内の特定のタンパク質に特異的に共有結合して機能を改変する化合物を網羅的に「発見」する。さらに、発見された化合物がどのようにしてタンパク質の機能を改変するのか、そのメカニズムを解明する。これによって、新たな知識が生産できると期待できる。生命の根幹をなす翻訳後修飾を小分子化合物で人工的に行う「人工翻訳後修飾」を開拓する。

多数のタンパク質に対して多数の化合物をスクリーニングし、「人工翻訳後修飾」を探索した例はこれまでになく、世界初。利用する反応性化合物ライブラリーは世界的に独自性が高い。成功すれば、これまでになかった新しい知識を生み出して、生理活性小分子化合物や創薬の研究方向を変革する潜在的可能性がある。

## 3. 研究の方法

### ●スクリーニング

独自の反応性化合物ライブラリー（1657個の反応性合成化合物及び100個の反応性天然物）を利用する。まず、細胞抽出液にライブラリー化合物を一つ一つ加え、反応させる。次に、プロテオーム中にある多数の酵素の活性を一気に判別する蛍光プローブを加えて反応させ、SDS-PAGEで分離し、酵素の蛍光バンドを検出する。酵素の活性が変調されると、その酵素の蛍光バンドに変化が生じる。



●反応性化合物ライブラリー

本研究で使用する化合物ライブラリーは、マイルドな親電子反応性基を備えた 1657 個の化合物からなる(図1)。分子量は 300 以上であり、反応性基と医薬品的な構造のハイブリッドである。すでに研究室が所有している。条件が揃えば、システイン、セリン、リシンなどに共有結合すると考えられる。代表者らの知る限り、これほど多数の反応性化合物を持つ研究室は他に存在しない。

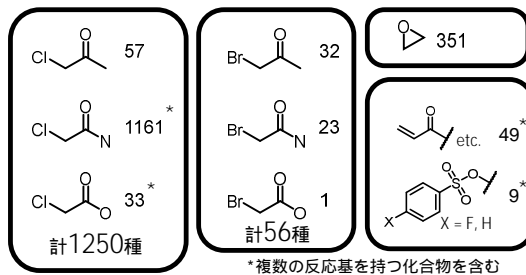


図1 反応性化合物ライブラリー(合計 1657 個)

●活性判別蛍光プローブ

スクリーニングには、活性判別蛍光プローブを用いる(図2)。このプローブを細胞や細胞抽出液に加えると、多数のタンパク質(酵素)の活性アミノ酸に共有結合し、それらのタンパク質がプロテオームレベルで蛍光標識される。SDS-PAGE で電気泳動すれば、それらの標識されたタンパク質は蛍光バンドとして検出される。つまり、細胞中のタンパク質の酵素活性を多数同時に検出できる。スクリプス研究所の Cravatt らが開発した Activity-based probe という手法。

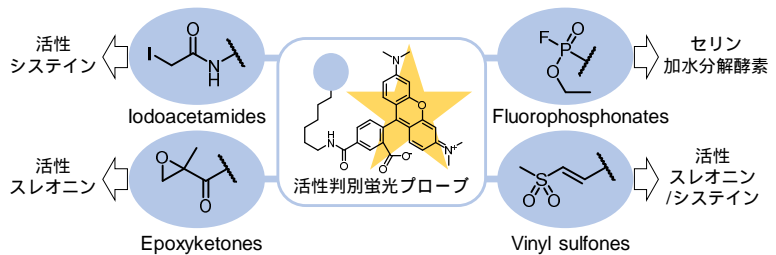


図2 活性判別蛍光プローブの化学構造

●スクリーニングの原理

本研究では、代表者独自の反応性化合物ライブラリーと活性判別蛍光プローブを組み合わせる(図3)。まず、細胞抽出液にライブラリー化合物を一つ一つ加え、反応させる。次に、活性判別蛍光プローブを加えて反応させ、SDS-PAGE で分離し、蛍光バンドを検出する。反応点と同じである場合やライブラリー化合物が酵素活性を阻害する場合は、その酵素のバンドが消失する(化合物X)。ライブラリー化合物が酵素活性を増強すれば、その酵素のバンドは強くなるか新しく現れる(化合物Y)。何も効果がない場合はバンドに変化はない(化合物Z)。

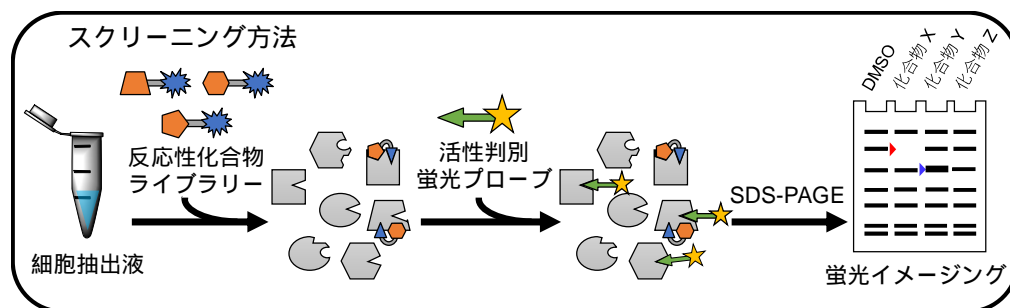


図3 スクリーニングの原理

●反応性天然物ライブラリー

反応性官能基を備えた生理活性天然物は数多い。その中で、標的タンパク質が判明していない天然物 100 種を準備し、同様のスクリーニングを行う。これによって、反応性天然物の標的タンパク質の解明を網羅的に行う。

代表者の研究室は天然物とその誘導体のコレクションがある。多くは旧名古屋大学理学部化学科天然物化学研究室で単離構造決定された歴史的海洋天然物である（山田静之名誉教授寄贈）。その中の反応性天然物と、新たに購入する天然物を合わせた多様な 100 種の生理活性天然物について、同様の研究を行う。

#### 4. 研究成果

##### ●反応性合成化合物のスクリーニング

まず、マイルドな親電子反応性基を備えたハロゲン化アセチル化合物 1306 個、エポキシ化合物 351 個をスクリーニングした。これらの化合物 5 個の混合液を 331 プール準備し、その一つ一つのプールを細胞抽出液と反応させた。次に、プロテオーム中にある多数の酵素の活性を一気に判別する蛍光プローブを加えて反応させ、SDS-PAGE で分離し、酵素の蛍光バンドを検出した。特定の酵素の蛍光バンドが消失するプールを選択し、そのプール中にある 5 個の化合物を個別に評価して、個別の化合物を特定した。その結果、2 つの有望化合物 (C8 と C9) を同定した。

##### ●C8 と C9 の標的決定

蛍光バンドのサイズから判断すれば、C8 は約 50KDa の酵素、C9 は約 40KDa の酵素と選択的に反応している。それぞれ 0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M という低濃度で選択的に反応していると考えられた。そこで、これら二つの化合物について、反応する酵素の同定を試みた。

蛍光プローブをビオチンプローブに切り替えて、それぞれの化合物が競合するバンドをゲルから切り出し、質量分析ペプチドシーケンシングによって標的酵素の同定を行った。残念ながら、明確な標的酵素の同定に至らなかった。そこで、iTRAQ という手法でプロテオームレベルでの標的決定を開始した。iTRAQ 法では、複数サンプル間でタンパク質の存在量を網羅的に比較することができる。測定の要となるのが、同位元素を巧妙に組み合わせた Isobaric Tag である。このタグにより、複数サンプル間でペプチドの存在量が比較できる。実際に iTRAQ 法にて 10  $\mu$ M 濃度で C8 と C9 それぞれが反応する酵素の解析を行った。その結果、両方に反応する酵素やそれぞれに選択的に反応する酵素の同定に成功した。現在解析を進めている。

##### ●反応性天然物のスクリーニング

標的タンパク質が判明していない反応性天然物 83 種を準備、スクリーニングを終了した。一つ一つの天然物を細胞抽出液と反応させ、プロテオーム中にある多数の酵素の活性を一気に判別する蛍光プローブを加えて反応させ、SDS-PAGE で分離し、酵素の蛍光バンドを検出した。その結果、天然物 A とその誘導体が特定のタンパク質 (分子量約 55KDa) に選択的に反応することが判明した。

##### ●天然物 A の標的決定

蛍光プローブをビオチンプローブに切り替えて、天然物 A が競合するバンドをゲルから切り出し、質量分析ペプチドシーケンシングによって標的酵素の同定を行った。解析の結果、タンパク質 B が同定された。他にも多くの天然物 - タンパク質のペアが見つかったが、選択性と生物学的な意義を吟味し、天然物 A とタンパク質 B に着目した。

タンパク質 B は転写抑制因子として知られている。骨免疫に関連し、免疫反応で刺激されるとシステインの一つがニトロトキシル化され、転写抑制因子としての機能が阻害される。このシステインに天然物 A が反応して、タンパク質 B の転写抑制作用を選択的に変調すると推測できる。

さらに、iTRAQ という手法でプロテオームレベルでの標的決定も行った。10  $\mu$ M 濃度で天然物 A が反応する酵素の網羅的解析を行った。その結果、選択的に反応する酵素群の同定に成功した。その中にはタンパク質 B も含まれていた。現在解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)  
なし

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) Yejin Jung, Motonari Uesugi. "Search for Covalent Chemical Probes That Label Specific Proteins." The 1<sup>st</sup> International Symposium on the Chemical Communications (ISCC2019). Tokyo, Japan. January 2019.
- 2) Uesugi, M. "Synthetic Small-Molecule Tools for Cell Biology." RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology The 6th Symposium." April 2017, Okinawa, Japan.

- 3) Uesugi, M. “*Synthetic Small-Molecule Tools for Cell Biology and Cell Therapy.*” AFPS2017 Integration, Improvement and Innovation toward Targeted Drug Discovery. November 2017, Xiamen, China.

〔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〕

ホームページ等: <https://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/ja/index.php>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。