

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14393

研究課題名(和文) タンパク質間相互作用の新規 in vivo 検出法

研究課題名(英文) Detection of protein-protein interactions in vivo

研究代表者

伊藤 進也 (ITO, Shinya)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号：00794439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分子シャペロンHsp47は小胞体でプロコラーゲンの3重らせん構造に結合することで、コラーゲンの生合成に必須の役割を担っており、Hsp47とコラーゲンの相互作用を阻害し、正常なプロコラーゲンの分泌を阻害することは線維化疾患治療の有効な戦略の一つとされている。3重らせんコラーゲンペプチドとHsp47との間で生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)を生じさせることで、小胞体内でHsp47とコラーゲンとの相互作用を検出する系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が同定したHsp47阻害低分子化合物が小胞体内でコラーゲンとHsp47の相互作用を阻害すること、これまでHsp47はコラーゲン3重らせん構造上のアルギニンを認識していると考えられてきたが、アルギニンがない位置のコラーゲン3重らせん構造にも弱いながら結合していること、Hsp47はSerpinaファミリーに属し、特徴的なループ領域を持つが、そのSerpinaループもコラーゲンとの相互作用に寄与していること、が分かった。これらのことは、分子シャペロンHsp47とコラーゲンの相互作用について新たな知見を与えるとともに、この系の阻害剤探索への有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：Molecular chaperones perform pivotal roles in proteostasis by engaging in protein-protein interactions (PPIs). The collagen-specific molecular chaperone heat shock protein 47 (Hsp47) interacts with procollagen in the endoplasmic reticulum (ER) and plays crucial roles in collagen synthesis. PPIs between Hsp47 and collagen could offer a therapeutic target for fibrosis, which is characterized by abnormal collagen accumulation in the extracellular matrix of fibrotic organs. Herein, we established a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system for assessing Hsp47-collagen interaction dynamics within the ER. We propose that the method developed can provide valuable information on PPIs between Hsp47 and collagen and on the effects of PPI inhibitors important for the management of fibrotic disorders.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質間相互作用 線維化疾患 Hsp47 コラーゲン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) Heat shock protein 47(Hsp47)は小胞体に局在するコラーゲンに特異的な分子シャペロンであり、コラーゲンの正常な合成と分泌には、小胞体においてプロコラーゲンと Hsp47 が相互作用することが必須である(文献 )。臓器の線維化に伴ってコラーゲンと Hsp47 は劇的に誘導され、コラーゲンの異常蓄積を引き起こす増悪因子として働いている。Hsp47 の発現を RNA 干渉によって抑えると、コラーゲンの蓄積が減少し、線維化が抑制される。我々は、Hsp47 の発現量を減らさなくとも、Hsp47 とプロコラーゲンの相互作用の阻害によって、コラーゲン分泌が抑えられることを証明した(文献 )。そのような作用を持った低分子化合物は、siRNA 法に比して遥かに大きな有効性を持つと考える。

(2) これまで、splitGFP を用いた系やクロスリンカーを用いた相互作用の検出が行われてきたが、生きた細胞内で結合解離を伴う Hsp47-コラーゲン間相互作用を捕らえることは困難であったため、Hsp47 阻害候補化合物が細胞内で相互作用を阻害しているか評価できなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、線維化疾患治療に向けた画期的な薬剤評価法を開発することを目的とし、次のステップとして、この方法を用いて有望な薬剤スクリーニングを行い、線維症治療に適用されるための基盤研究を目指す。

(2) タンパク質間相互作用は生命現象の基盤ネットワークを担う。今回の提案ではリアルな環境に近い状況におけるタンパク質間相互作用の検出と阻害を評価するものであり、構築を試みる Hsp47-コラーゲン間の相互作用阻害の評価法は、さらに普遍的に細胞内、組織内におけるタンパク質間相互作用の阻害活性の検出法として非常に有用であると考えている。

### 3. 研究の方法

(1) (Gly-Xaa-Yaa)の9回繰り返しからなるコラーゲンドメインを3量体を形成する foldon に付加し、3重らせんコラーゲンペプチドと Hsp47 との間で Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)を生じさせることで、生細胞内で Hsp47 とコラーゲンとの相互作用を検出する系を確立する。

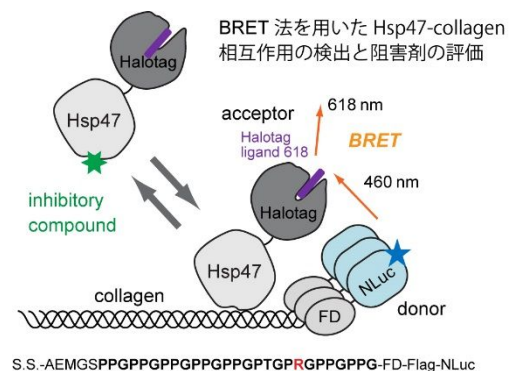
(2) 確立した BRET 法を用いて、小胞体における Hsp47-コラーゲンの相互作用を評価した。Hsp47 阻害化合物添加時、コラーゲンの配列を変化させたとき、Hsp47 の側鎖を変異させたとき、における BRET の値を比較することで、これまで分かっていた Hsp47-コラーゲン相互作用についての知見を得るとともに、より低濃度で相互作用を阻害する化合物を選別する。

### 4. 研究成果

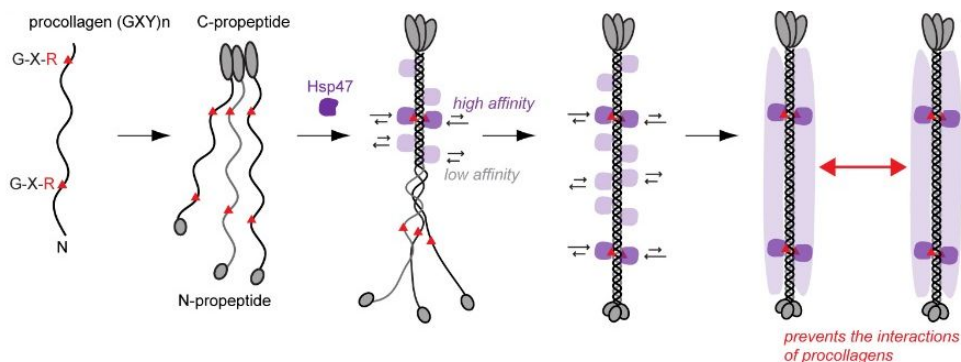
(1) (Gly-Xaa-Yaa)が繰り返し、アルギニンを含むコラーゲンドメイン(col)を3量体形成配列 foldon(FD)に付加し、そのC末端側に Nano Luciferase(NLuc)を付加した(下図)。一方、Hsp47 のC末端側に Halotag(HT)を付加した。HEK293細胞にトランスフェクションし、発現を確認した後、Halotag ligand 618とNLucの基質を添加し、エネルギーのドナーとなる colFD-NLucとそのアクセプターとなる Hsp47-HT の間で BRET を生じさせた。コラーゲンに結合しない Hsp47 の Y365A 変異体をネガティブコントロールとし、SN比が最もよい条件を決定した。さらに、免疫染色法により colFD-NLuc 及び Hsp47-HT が小胞体内に局在していることを確認した。このことから、BRET が生じる Hsp47-HT と colFD-NLuc 間のタンパク質間相互作用(PPI)は小胞体内で起こっていることが分かった。小胞体内の PPI を生きた細胞内で BRET によって観察した初めての事例である。

(2) HeLa 細胞でも BRET シグナルが観察されたが、HEK293 細胞と比較して SN 比が悪かった。これは、HeLa 細胞には内在性の Hsp47 とコラーゲンが存在し、それらが colFD-NLuc 及び Hsp47-HT と結合するために、BRET の値が変化してしまうと考えられた。また、Hsp47 はコラーゲン 3 重らせん構造上のアルギニン残基に強く結合するため、アルギニンの位置を FD の近傍から徐々に変化させ、BRET シグナルへの依存性を調べた。BRET の値が最も良かった条件を今後のアッセイに用いることとした。

(3) BRET 法を用いて、我々が同定していた Hsp47 阻害低分子化合物が小胞体内でコラーゲンと Hsp47 の相互作用を阻害することを確かめられた。阻害低分子化合物の濃度依存性から細胞における IC<sub>50</sub> 値を算出した。一方で、サイトゾルで相互作用する p53 と MDM2 のコントロールペアの BRET シグナルは Hsp47 阻害低分子化合物を添加しても変化しなかった。このことは、この化合物が Hsp47 とコラーゲンの相互作用を特異的に阻害していることを示している。線維化疾患の標的となっている Hsp47 とコラーゲンの PPI を細胞レベルで阻害する初めての化合物であることが分かった。さらに、東北大学薬学研究所土井隆行教授らと共同研究し、より低濃度で PPI 阻害を示す化合物を選び出した。



(4) コラーゲン 3 重らせん構造上にアルギニンがない coIFD-NLuc を作成し、BRET を用いて小胞体内の Hsp47 とコラーゲン間の PPI を調べた結果、Hsp47 はアルギニンがないコラーゲン 3 重らせん構造にも弱いながら結合していることが分かった。これまで、精製した Hsp47 とコラーゲンペプチドの結合実験から Hsp47 はコラーゲンのアルギニンの位置のみに結合し、コラーゲンの 3 重らせん構造の安定化に寄与していると考えられてきた。今回の BRET 法を用いた結果は、分子シャペロン Hsp47 が小胞体内でコラーゲン 3 重らせん構造全体を覆うように弱い結合解離を繰り返しているという新たな作用機構を提唱した。この弱い結合は、アルギニンへの強い結合と共に小胞体内でのコラーゲン間の相互作用に起因するコラーゲンの凝集体形成を抑制していると考えられる(下図)。



(5) Hsp47 は Serpin ファミリーに属し、特徴的なループ領域を持つが、その Serpin ループがコラーゲンとの相互作用に寄与している可能性について検討した。今回確立した BRET 法は再現性よく正確に PPI を比較できるため、Hsp47 の Serpin ループ上の側鎖の変異がコラーゲンとの結合に影響を与えるか調べることができる。Serpin ループ上の側鎖をアラニンに変異させた結果、BRET シグナルが減少し、Serpin ループ上の疎水性アミノ酸がコラーゲンとの結合に重要であることが分かった。これら側鎖の重要性は、精製した Hsp47 を用いた表面プラズモン共鳴及び産業技術総合研究所竹内恒博士との共同研究による NMR 法によっても確かめられた。

(6) 総合すると、分子シャペロン Hsp47 は小胞体でプロコラーゲンの 3 重らせん構造に結合することで、コラーゲンの生合成に必須の役割を担っており、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害し、正常なプロコラーゲンの分泌を阻害することは線維化疾患治療の有効な戦略の一つとされている。3 重らせんコラーゲンペプチドと Hsp47 との間で BRET を生じさせることで、小胞体内で Hsp47 とコラーゲンとの相互作用を検出する系を確立し、分子シャペロン Hsp47 とコラーゲンの相互作用について新たな知見を得るとともに、この系の阻害剤探索への有用性を示した(文献)。

#### < 引用文献 >

Ito S, Nagata K. Biology of Hsp47 (Serpin H1), a Collagen-Specific Molecular Chaperone *Semin Cell Dev Biol.*62:142-151. (2017)

Ito S. et al, A Small-Molecule Compound Inhibits a Collagen-Specific Molecular Chaperone and Could Represent a Potential Remedy for Fibrosis *J Biol Chem.* 292(49):20076-20085. (2017)

Ito S. et al, A BRET-based Assay Reveals collagen-Hsp47 Interaction Dynamics in the Endoplasmic Reticulum and Small-Molecule Inhibition of This Interaction *J Biol Chem.* 294(44):15962-15972. (2019)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ito Shinya, Saito Masazumi, Yoshida Masahito, Takeuchi Koh, Doi Takayuki, Nagata Kazuhiro	4. 巻 294
2. 論文標題 A BRET-based assay reveals collagen-Hsp47 interaction dynamics in the endoplasmic reticulum and small-molecule inhibition of this interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15962 ~ 15972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.010567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤進也 永田和宏
2. 発表標題 細胞におけるコラーゲンとその特異的分子シャペロンHsp47の相互作用の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤進也、永田和宏
2. 発表標題 コラーゲン特異的分子シャペロンHsp47の機能制御
3. 学会等名 第13回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinya Ito, Kazuhiro Nagata
2. 発表標題 Collagen-specific molecular chaperone Hsp47 would be a therapeutic target for fibrotic diseases
3. 学会等名 19th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤進也、永田和宏
2. 発表標題 小胞体内におけるコラーゲンとその特異的分子シャペロン間の相互作用の検出と阻害
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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