

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02839

研究課題名(和文) タンパク質間相互作用を誘導する有機小分子を用いた運動マシナリー研究

研究課題名(英文) Analysis of cellular machinery using PPI-inducing small molecules

研究代表者

北 将樹 (KITA, Masaki)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30335012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアクチンに作用する天然物リガンドに注目して、創薬標的となる新たなPPI機能作用点を特定し、細胞骨格が関連する運動マシナリーの解明を目指した。アクチンとチューブリン間のタンパク質間相互作用を誘導して微小管ダイナミクスを阻害する抗腫瘍性天然物アプリロニンA (ApA)を構造簡略化したアクチン結合性誘導体を合成し、細胞抽出液からアクチンを特異的に精製できる有用なツールを開発した。また、分子ドッキングシミュレーションと分子動力学計算により、ApAの活性発現に重要なC7位のTMSerエステルがチューブリンと相互作用する、アクチン-ApA-チューブリン三元複合体の妥当なモデルの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPIは生命現象を担うシグナル伝達系を調節し、重要な生理的效果を誘導する。近年、PPIを安定化もしくは阻害する化合物が多数見いだされ、疾患研究ツールや医薬リードとしても注目されている。本研究では動的で不安定な細胞骨格タンパク質を標的とする天然物に注目し、これまで未解明だった標的分子の同定、複合体の構造解析、および活性発現機構の解明に挑戦した点で学術的に高い意義があると考えられる。また、本研究で得られた成果は、副作用を低減した新たな医薬の創出や、複合的に機能する新たな薬理学ツールの開発といった学際的・分野融合的な研究へと展開できると期待されることから、社会的意義も高い成果と言える。

研究成果の概要(英文)：We focused on the natural ligands that interact with actin, and aimed to identify new protein-protein interaction (PPI) functional points that could become the targets for drug discovery, and to elucidate the moving machinery associated with the cytoskeleton. We synthesized structurally-simplified actin-binding derivatives of the antitumor natural product aprilonin A (ApA), which induces unique PPI between actin and tubulin to inhibit microtubule dynamics. Using this compounds, we successfully affinity-purified cytoskeletal actin from cell lysate. In addition, molecular docking simulation and molecular dynamics studies succeeded in constructing a possible model of the actin-ApA-tubulin ternary complex in which the C7 TMSer ester interacted with tubulin, which is important for the potent cytotoxicity of ApA.

研究分野：生物有機化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質間相互作用 天然物リガンド アクチン 標的分子同定 微小管阻害剤

1. 研究開始当初の背景

タンパク質間相互作用 (PPI) は生命現象を担うシグナル伝達系を調節し、重要な生理的効果を誘導する。近年、PPI を安定化もしくは阻害する化合物が多数見いだされ、疾患研究ツールや医薬リードとしても注目されている。中でも細胞骨格タンパク質は細胞内で様々な分子と相互作用して重合、脱重合を繰り返しており、その機構を理解することは重要である。また、細胞骨格タンパク質の一種である微小管は有糸分裂で重要な紡錘体を構成する主要タンパク質であり、この重合ダイナミクスを阻害する有機小分子は抗がん剤として広く用いられている。一方で、真核生物で高く保存され、また細胞内の含量が最も多いタンパク質の一つにアクチンが挙げられる。これまでに、100 種類以上の内在性アクチン結合性タンパク質が同定されているが、適切な抗体がない、細胞内での相互作用が弱い、あるいは特別なタイミングでしか PPI が見られないなどの理由で、未だアクチンに関わる様々な PPI が存在すると予想される。このような新たな PPI 制御機構を新たに見出すことで、細胞分裂や遊走など、アクチンダイナミクスが関与する新たな細胞骨格の運動マシナリーを解明し、さらには有機小分子を用いた人工制御も達成できるようになると期待される。これまで様々な生体分子を標的とする生物活性天然物が見出されているが、PPI 誘導リガンドを効率よく発見して、さらには未知のターゲットを同定してその作用機序を解明し、理論計算に基づいて PPI を安定化させるリード化合物を設計するといった研究は実現した例が少なく、方法論も十分には確立されていない。したがって、構造や機能の点多様なアクチン作用性天然物リガンドに特に注目して、それらの新型作用メカニズムの解明を目指す研究を推進する意義は極めて高いと言える。

2. 研究の目的

本課題では、特にアクチンに作用する有機小分子に注目して、創薬標的となる新たな PPI 機能作用点の特定および関連する運動マシナリーの解明を目指した。アクチン脱重合活性を示す抗腫瘍性天然物アプリロニン A (ApA) は、アクチン・チューブリン間のタンパク質間相互作用 (PPI) を誘導して微小管ダイナミクスを阻害するという、新しいメカニズムでがん細胞の増殖を抑制する。これまでに有機小分子-アクチン複合体がチューブリンに直接作用する、もしくは微小管阻害薬がアクチンの重合ダイナミクスにも影響するという報告はなく、本化合物の作用は非常にユニークであると言える。そこで本研究では、細胞形態の詳細な観察や、機能性分子プローブを用いたアフィニティー精製により、多様な機能を持つアクチン結合性天然物リガンドの新たな標的分子を同定し、さらには三元複合体の構造や活性発現に重要な構造を紐解くことを目指した。また、プローブの細胞内動態や *in vitro* 構築系でのダイナミクスへの影響など、幅広い視点からアクチン結合性リガンドの機能を調べることで、運動マシナリーに関連する重要な生物活性発現メカニズムの解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

これまでに報告されているアクチン・ApA 複合体の X 線結晶構造、光親和性プローブを用いた標的分子との結合位置解析、ならびにアクチン結合性側鎖部に関する構造活性相関研究などを参考に、PPI 誘導効果を示す人工分子を設計し、合成を進めた。機能の評価にはヒト大腸がん細胞 HCT116 の増殖阻害活性や、アクチンもしくはチューブリンの精製タンパク質の *in vitro* 重合阻害活性 (超遠心による重合体の量的変化の解析)、ローダミン標識したファロイジンをを用いた染色法による、アクチン繊維の蛍光顕微鏡による観察などを行なった。有望なアクチン作用性リガンドについては、PEG 鎖を介してビオチン基を連結して、*in vitro* での分子間相互作用 (BLITZ) ならびに Neutravidin アガロース樹脂を用いたプルダウン精製に供することで、アクチンに対する機能を定量的に解析した。また理論計算に関しては、統合化学計算ソフトウェア MOE や、分子動力学シミュレーションソフトウェア YASARA などを用いて、タンパク質同士あるいはリガンド・タンパク質間の相互作用を *in silico* で詳しく解析した。

4. 研究成果

アクチン結合性天然物リガンドの新たな PPI 制御の探索に関して、ApA のアクチン結合側鎖 (C24-C34 位) およびマクロラクトンの一部 (C1-C9 位) を連結した新規人工分子 4 種を設計・合成した (図 1)。いずれも天然物と同等の強力なアクチン結合活性を示したが、微小管への作用は

見られず細胞毒性も示さなかったことから、マクロラクトン上の置換基の位置をアクチンの上部で空間的に固定することが、PPIを誘導する活性発現には重要であるという知見を得た。

つぎに、アクチン結合性側鎖の構造簡略化したアナログとして、構造活性相関をもとに ApA の C23 アシルオキシ基、ジメチルアラニンエステル、N-メチルエナミド基を持つ最小構造をもつ誘導体を合成し、分子間相互作用解析とアクチン脱重合活性を評価した結果、元の天然物の機能を高く保持していることを見出した (図2)。さらに、様々なタンパク質を含む細胞抽出液から、アクチンを特異的にアフィニティー精製することに成功した。

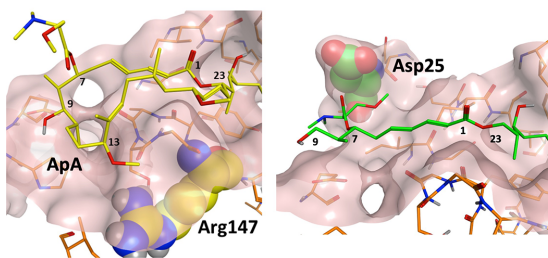
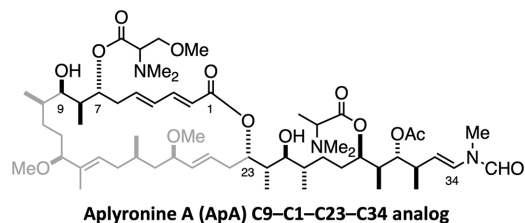


図1. ApA の C24-C34 位と C1-C9 位)を連結した類縁体とアクチンとのドッキングシミュレーション解析

また、これまでに得られた光ラベル化反応の知見に基づいてアクチン・ApA・チューブリンの三元複合体モデルを *in silico* で構築し、さらに上位 10 種について分子動力学計算を行うことで三元複合体の形成をシミュレーションした。その結果、微小管を構成するチューブリン分子の外側に、アプリーロニン A がアクチンとともに配位するという妥当なモデルが得られた。最適化したモデルを詳しく解析した結果、ApA の PPI 誘導作用と微小管ダイナミクスの障害に必須な C7 位トリメチルセリンエステルが直接 $\alpha \cdot \beta$ -チューブリンと直接相互作用するという、本化合物の強力な活性発現を説明できることがわかった。現在、*in vitro* で再構築した三元複合体について、クライオ電子顕微鏡による構造解明を目指して検討を進めている。

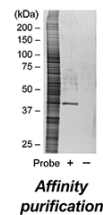
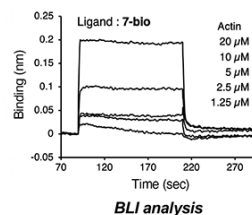
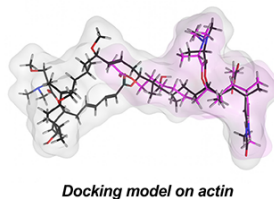
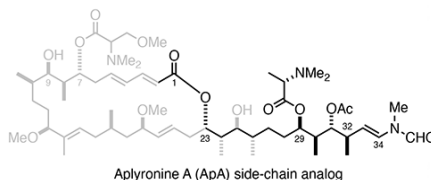


図2. ApA の構造活性相関で見出した新規アクチン結合性側鎖リガンドの構造および機能解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Arai Atsushi, Watanabe Rei, Hattori Atsunori, Iio Keita, Hu Yaping, Yoneda Kozo, Kigoshi Hideo, Kita Masaki	4. 巻 10
2. 論文標題 N,N-Dimethylaminopyrene as a fluorescent affinity mass tag for ligand-binding mode analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64321-9	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 -
1. 著者名 Hirukawa Minako, Zhang Menghua, Echenique Diaz Lazaro M., Mizota Koji, Ohdachi Satoshi D., Begu Quiala Gerardo, Delgado Laba Jorge L., Gomez Jorgelino, Alvarez Lemus Jos, Machado Leandro Galano, Nuez Miguel Suarez, Shibata Takahiro, Kigoshi Hideo, Kita Masaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Isolation and structure-activity relationship studies of jacaranones: Anti-inflammatory quinoids from the Cuban endemic plant Jacaranda arborea (Bignoniaceae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 152005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2020.152005	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
1. 著者名 Zhang Menghua, Sunaba Taiki, Sun Yiting, Shibata Takahiro, Sasaki Kazunori, Isoda Hiroko, Kigoshi Hideo, Kita Masaki	4. 巻 73
2. 論文標題 Acyl-CoA dehydrogenase long chain (ACADL) is a target protein of stylissatin A, an anti-inflammatory cyclic heptapeptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 589 ~ 592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-020-0322-5	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 Zhang Menghua, Sunaba Taiki, Sun Yiting, Sasaki Kazunori, Isoda Hiroko, Kigoshi Hideo, Kita Masaki	4. 巻 55
2. 論文標題 Anti-inflammatory marine cyclic peptide stylissatin A and its derivatives inhibit differentiation of murine preadipocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5471 ~ 5474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9CC02517K	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 Futaki Kentaro, Takahashi Momoko, Tanabe Kenta, Fujieda Akari, Kigoshi Hideo, Kita Masaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Synthesis and Biological Activities of Aplyronine A Analogues toward the Development of Antitumor Protein-Protein Interaction Inducers between Actin and Tubulin: Conjugation of the C1?C9 Macrolactone Part and the C24?C34 Side Chain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 8598 ~ 8613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b01099	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 -

1. 著者名 Sato Jun J., Bradford Tessa M., Armstrong Kyle N., Donnellan Stephen C., Echenique-Diaz Lazaro M., Begu?-Quiala Gerardo, G?mez-D?ez Jorgelino, Yamaguchi Nobuyuki, Nguyen Son Truong, Kita Masaki, Ohdachi Satoshi D.	4. 巻 141
2. 論文標題 Post K-Pg diversification of the mammalian order Eulipotyphla as suggested by phylogenomic analyses of ultra-conserved elements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Phylogenetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 106605 ~ 106605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ympev.2019.106605	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 北将樹	4. 巻 77
2. 論文標題 MyPR: 異分野融合型の天然物化学者を志す	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 有機合成化学協会誌	6. 最初と最後の頁 371 ~ 373
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 無
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 -

1. 著者名 北将樹	4. 巻 59
2. 論文標題 生理活性蛍光リガンドとLA-LDI MS ~ 標的生体分子の結合位置解析法の開発 ~	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生命化学研究レター	6. 最初と最後の頁 7 ~ 11
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 無
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 -

1. 著者名 北将樹	4. 巻 71
2. 論文標題 哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 73~78
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 無
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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 蛭川美奈子、Lazaro M. Echenique-Diaz、溝田浩二、大館智志、Gerardo Begue-Quiala、Jorge L. Delgado-Labanino、Jorgelino Gamez-Diez、柴田貴広、森田真布、北将樹
2. 発表標題 キューバ産植物由来の抗炎症物質 jacaranone に関する研究
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会 (ポスター発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蛭川美奈子、柴田貴広、森田真布、北将樹
2. 発表標題 キューバ産植物由来抗炎症物質 jacaranone の構造活性相関および標的分子同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (口頭発表)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷佳佑、Yiting Sun、張夢華、柴田貴広、森田真布、北将樹
2. 発表標題 ケミカルプローブを用いた stylissatin A の標的タンパク質の解明
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会 (口頭発表)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Didik H. Utomo, Akari Fujieda, Maho Morita, Hideo Kigoshi, and Masaki Kita
2. 発表標題 Revealing Binding Position of Aplyronine A as a Protein-Protein Interaction Inducer
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会（口頭発表）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北将樹
2. 発表標題 生理活性蛍光リガンドを用いた標的分子の結合様式解析
3. 学会等名 理研シンポジウム・第14回有機合成化学のフロンティア（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kita, M.
2. 発表標題 Bioorganic Studies on the Key Natural Products from Venomous Mammals and Marine Invertebrates.
3. 学会等名 8th International Conference of the Indonesian Chemical Society (ICICS 2019)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北将樹
2. 発表標題 切れ味のよい分子を自然界にもとめて
3. 学会等名 第3回函館セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北将樹
2. 発表標題 哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会・シンポジウム『トキシン』の織りなす多元的世界（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北将樹
2. 発表標題 タンパク質間相互作用を誘導する天然物の新展開
3. 学会等名 第100回日本化学会春季年会・中長期シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張夢華, 砂場大輝, Yiting Sun, 柴田貴広, 佐々木一憲, 磯田博子, 木越英夫, 北将樹
2. 発表標題 Styllissatin Aの抗炎症及び抗肥満活性に関する研究
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北将樹
2. 発表標題 切れ味のいい分子を自然界にもとめて
3. 学会等名 第1回名大・岐阜大農学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒井厚志, 小幡紘平, 服部篤紀, 渡邊礼, 胡亜萍, 飯尾啓太, 米田耕三, 木越英夫, 北将樹
2. 発表標題 リガンド解離型ピレンプローブを用いたリガンド結合様式の解析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張夢華, 砂場大輝, Yiting Sun, 柴田貴広, 佐々木一憲, 磯田博子, 木越英夫, 北将樹
2. 発表標題 Stylissatin Aの抗炎症および抗肥満活性の作用機序の解明
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田真布, 武仲敏子, 別所学, Maturana D. Andres, 木越英夫, 大館智志, 上村大輔, 北将樹
2. 発表標題 食虫動物トガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチドの構造と生物活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masaki Kita and Hideo Kigoshi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 The Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 26
3. 書名 Discovery and use of natural products and derivatives as chemical probes. in The Discovery and Utility of Chemical Probes in Target Discovery, Eds. P. Brennan & S. V. Rodriguez	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学 大学院生命農学研究科 天然物ケミカルバイオロジー研究室
<https://mkita64.wixsite.com/mysite>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------