

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21254

研究課題名（和文）反応性小分子を用いたケミカルプロテインノックダウン

研究課題名（英文）chemical protein knockdown using reactive small molecules

研究代表者

王子田 彰夫 (Ojida, Akio)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10343328

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、タンパク質を切断する新しい反応化学の開発を目指して検討を行った。その結果、システイン残基のホルミル化がタンパク質主鎖アミド結合の切断を引き起こす新たな現象を見出した。この反応は、タンパク質中に導入したタグ配列の部位特異的な切断や切断と同時に起こる機能性分子（蛍光分子など）の導入に有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回見出したタンパク質切断反応は、タンパク質の機能解析や機能阻害に有用な新しい化学的手法として将来的に発展する可能性を持つ。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a new chemical reaction that cleaves proteins. We found that formylation of cysteine residue induces cleavage of protein backbone amide bond. This reaction was useful for the site-selective cleavage of a tag sequence introduced in proteins and the concomitant introduction of a functional molecule (such as fluorescent molecule) during the cleavage reaction.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質切断 システイン ホルミル化 プロテインノックダウン

1. 研究開始当初の背景

小分子によるタンパク質の機能阻害は、通常、標的酵素との結合やタンパク質間相互作用の阻害により達成される。一方でタンパク質の機能阻害は、標的となるタンパク質そのものを分解排除することによっても実現可能である。このようなタンパク質の分解排除（ノックダウン）に基づく手法は **PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera)** 法と呼ばれ、近年、新しい創薬モダリティとして非常に大きな注目を集めている。しかしながら **PROTAC** 法は、細胞内で機能するタンパク質分解酵素系（ユビキチン-プロテオソーム系）を利用するため細胞外の膜たんぱく質には適用できないなど複数の問題点を有する。細胞で機能するタンパク質の約3割は細胞膜上に存在する膜タンパク質であり、また、それらの多くが創薬標的となっていることを考えると、**PROTAC** 法の適用には限界がある。したがって、これら **PROTAC** 法の欠点を克服する新しい化学アプローチの開発が重要である。しかしながら、タンパク質の切断を誘起できる反応化学の開発は極めて限られており現状において未熟な段階にある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、標的たんぱく質を特異的に切断分解できる反応性分子の開発と、それを用いたタンパク質の分解阻害法の開拓である。本申請研究では、**PROTAC** 法の欠点を克服する新しい化学アプローチとして、酵素反応に依存しない、反応性分子が誘起する新しいタンパク質分解法（ノックダウン法）の開発に挑む。これにより細胞内外の標的タンパク質を任意のタイミングと局在で分解阻害できる新しいケミカルバイオロジー研究のツールを提供するとともに、**undruggable** なタンパク質を標的とした将来のコバレントドラッグ（共有結合性阻害剤）開発につながる新しい創薬アプローチを提供する。

3. 研究成果

本研究では、まず初めにシステインを有するペプチドを設計し、ペプチド主鎖のアミド結合の切断反応を簡便に評価する蛍光アッセイ系を構築した（図1）。このアッセイ系を用いて複数のアシル化剤やシアノ化剤について切断反応を評価したところ、システイン残基のホルミル化が、効率よくタンパク質のアミド結合を切断することを見出した。本切断反応については、**HPLC** や **ESI-MS** を用いた解析によって、**Figure 4** に示す反応機構で切断が進行することを明らかにした。また、システインの隣に様々なアミノ酸残基（-X_{aa}C-）を有するモデルペプチドを用いて配列選択性を評価したところ、アスパラギン酸(**Asp**)やアスパラギン(**Asn**)を有する **DC** 配列、**NC** 配列で **S**-ホルミル化後の切断効率が大きく向上することを明らかにした。

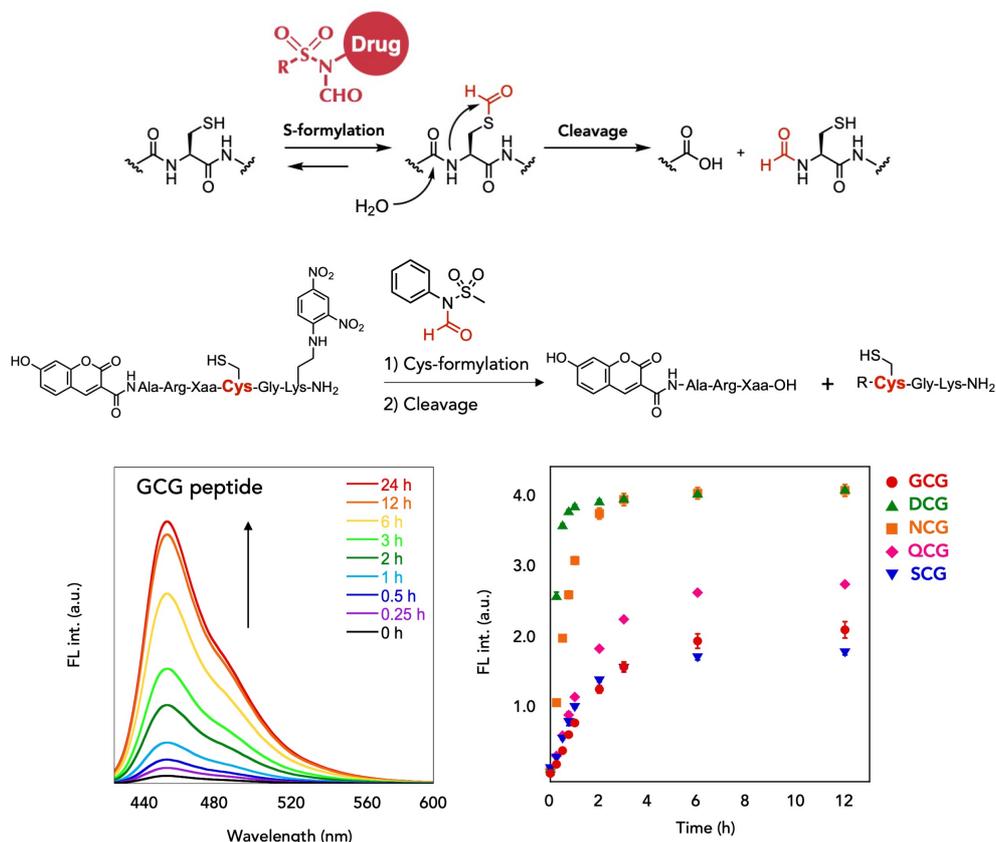
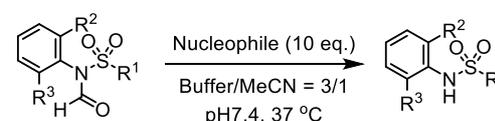


図1. システインホルミル化によるペプチド鎖の切断

次に S-ホルミル化分子の構造について検討を行った。その結果、ホルミル基周辺に嵩高い置換基を導入することで、高い水中安定性とシステイン選択性を示す S-ホルミル化分子を見出す事に成功した (Table 1)。Cys を有するペプチドタグを融合した MBP タンパク質に対して、S-ホルミル化分子を導入した亜鉛錯体プローブを用いて切断反応を検討した (図 2)。その結果、ペプチドタグと亜鉛錯体プローブとの相互作用に依存して、低濃度 (25 μM) のプローブ添加によって効率よくペプチドタグが切断されることを明らかとした。また、蛍光ペプチドを用いた場合と同様に、GC 配列よりも NC や DC 配列について高効率で切断反応が進行する結果を得ることができた。一方で S-ホルミル化後の切断反応時にチオール種を添加することで、切断効率が大きく向上することを明らかとした。HPLC や ESI-MS を用いた解析によって、この切断反応の加速は、チオール種のアミドカルボニル基への求核攻撃により引き起こされていることを明らかとした。この切断加速反応を利用することで、切断により生じたタンパク質の N 末端を蛍光色素などの人工分子によりラベル化できる事を明らかにした (図 3)。従来、タンパク質主鎖の切断反応は、過剰量のシアノ化剤やニッケル錯体を用いた報告があるのみであり、それらの生体適合性は極めて低いものであった。今回、本研究により見出したシステインホルミル化による切断反応は、触媒量の試薬、穏やかな中性、室温条件で進行する生体適合性の高い新たな反応である。後は、細胞膜に存在するタンパク質切断による機能制御に応用し、本反応の有用性を明らかにして行きたいと考えている。

Table 1. N-ホルミルスルホンアミドの水中安定とグルタチオン(GSH)との反応性



	Structure			Nucleophile: $t_{1/2}$ (h)	
	R ¹	R ²	R ³	GSH	Nu (-)
16	Me	H	H	< 0.10	1.02
19	Me	Me	H	0.31	1.68
20	Me	Me	Me	2.98	16.1
21	<i>i</i> Pr	H	H	0.16	4.01
22	<i>t</i> Bu	H	H	0.15	6.63
23	<i>t</i> Bu	Me	H	1.47	37.2
24	<i>t</i> Bu	Me	Me	20.9	> 48

Conditions: [S-formyl reagent] = 0.1 mM, [Nucleophile] = 1 mM, 100 mM sodium phosphate, 25% MeCN, pH 7.4, 37 °C.

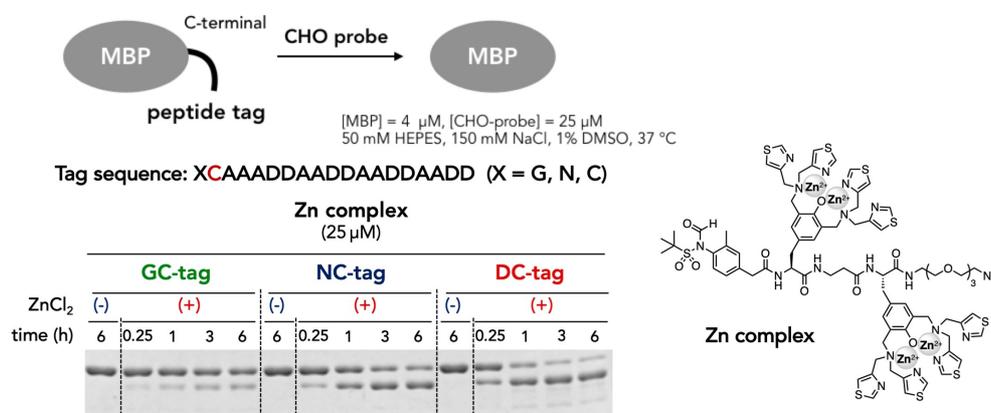


図 2. ホルミル化亜鉛錯体プローブによるタグ導入 MBP タンパク質の切断

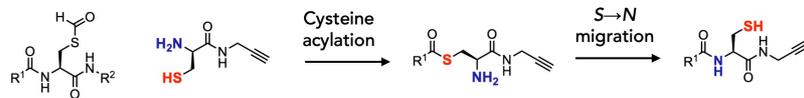
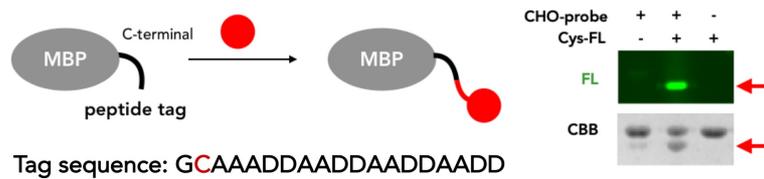


図3. S-ホルミル化を経由するタンパク質修飾法

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 王子田 彰夫
2. 発表標題 細胞夾雑環境での標的タンパク質の特異的化學修飾と化學切断
3. 学会等名 新學術領域「分子夾雑の生命化學」關西シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 善明直輝, 安田齊弘, 松本侑也, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 S-ホルミル化を利用した標的タンパク質の化學選択的切断法の開発
3. 学会等名 日本化學會第102春季年會
4. 発表年 2021年

〔圖書〕 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
---------------------------	-----------------------	----

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