

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月16日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22655055

研究課題名（和文） フシコクシン誘導体による14-3-3たんぱく質の細胞内可視化

研究課題名（英文） Fluorescent labeling of 14-3-3 proteins by fusicoccins

研究代表者

大神田 淳子 (OHKANDA JUNKO)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50233052

研究成果の概要（和文）：フシコクシン誘導体 ISIR-042 と蛍光タグを生体直交性反応基で連結した化学プローブにより、リン酸化リガンド依存的な遺伝子組換え型 14-3-3 たんぱく質および生細胞中の内在性 14-3-3 たんぱく質の His164 特異的蛍光ラベル化を達成した。本研究において、リン酸化リガンドの形状とラベル化効率の関係を詳細に明らかにするとともに、抗がん剤 ISIR-042 の細胞内標的の同定に初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：14-3-3 proteins play a critical role in serine/threonine kinase-dependent signaling pathways through protein-protein interactions with multiple phosphorylated ligands. A ligand-dependent 14-3-3 detection technique would facilitate elucidation of 14-3-3-related intracellular signaling networks. Here, we describe phosphopeptide-dependent fluorescent labeling of 14-3-3 ζ using cell penetrating probes derived from a diterpene natural product, fusicoccin. In vitro evaluations demonstrated that these compounds site-specifically attached a fluorescent tag onto the protein surface as a result of ternary complex formation with the 14-3-3 protein and a phosphopeptide ligand. The BODIPY-attached probe labeled human endogenous 14-3-3 in cancer cells under hyper-phosphorylation conditions, proving that 14-3-3 is a primary target of the fusicoccins in mammalian cells. This cell-penetrating labeling agent would be a useful tool to explore the mechanism of antitumor activity associated with fusicoccin-related agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究代表者の専門分野：生物有機化学・医薬品化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛍光プローブ、天然物、リン酸化ペプチド、14-3-3 たんぱく質、たんぱく質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 14-3-3 たんぱく質は標的たんぱく質中のリン酸化セリン/トレオニンを含むリン酸化ペプチド配列を認識して結合する。14-3-3 が介在するたんぱく質間相互作用は、セリン/トレオニンキナーゼ依存細胞内信号伝達系に代表されるように、重要な生理的役割を担っているが、その多岐に渡る機能の詳細は明らかではない。14-3-3 たんぱく質間相互作用を検出する低分子ツールの開発は、細胞内信号伝達ネットワークの解明に大きく寄与すると期待される。

(2) 真菌の代謝物であるジテルペン系天然物フシコクシン(FC)類は、14-3-3 のリン酸化ペプチド結合溝に隣接する疎水性間隙に結合して、14-3-3 とリン酸化リガンドと安定な 3 者会合体を形成する。かねてから強い植物ホルモン様生理活性が知られていた FC だが、近年加藤らにより、FC の半合成的構造展開から見出された誘導体 ISIR-042 が、白血病細胞に対する分化誘導活性を示すなど、有望な新規抗がん剤リードとなり得る可能性が報告された。ISIR-042 に基づくさらなる抗がん剤開発を推進する上で、その作用機序を解明することは重要な課題である。

2. 研究の目的

(1) 分子設計と合成

ISIR-042 の側鎖側鎖アミノ基への化学修飾により、14-3-3 たんぱく質表面へ位置選択的に蛍光タグを共有結合的に付与する化学プローブを、14-3-3 の結晶構造を基に理論設計し合成する。

(2) in vitro 標識化の評価

遺伝子組み換え型ヒト由来 14-3-3 を用い、合成したプローブによるリン酸化ペプチドリガンド依存的 14-3-3 の蛍光標識化を評価する。ペプチドリガンドの側鎖の形状が及ぼす影響も精査する。

(3) 標識化の詳細な検討

標識化の位置選択性および isoform 選択性、夾雑系での標識化など、より詳細に検討する。

(4) 細胞膜透過性の評価

プローブの細胞膜透過性を共焦点蛍光顕微鏡で検討する。

(5) 生細胞中の内在性 14-3-3 の標識化

がん細胞中の内在性ヒト 14-3-3 の蛍光標識化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 分子設計と合成

Phomopsis amygdali 菌の大量培養から得られた FC-A を出発原料として ISIR-042 を有機合成し、側鎖アミノ基へ生体直交型反応基ベンゼンスルホン酸エステルをスパーサーとして蛍光基 dansyl および BODIPY を連結したプローブを化学合成する。

(2) in vitro 標識化の評価

遺伝子組み換え型ヒト 14-3-3 たんぱく質を大腸菌から発現する。14-3-3 にプローブと PMA2 リン酸化ペプチドを添加してインキュベーションし、反応混合物を SDS-PAGE で分離し、蛍光イメージングと CBB 染色で可視化して、14-3-3 蛍光標識化を評価する。リン酸化ペプチドの i+1 位のアミノ酸残基を 20 種類全てのアミノ酸に置換したペプチドライブラリを用い、アミノ酸側鎖の形状が標識化に及ぼす影響を検討する。

(3) 標識化の詳細な検討

His164Ala 変異体を用いて標識化の位置選択性を確認する。またさらに、14-3-3 発現大腸菌のライセートを用いて、夾雑系での選択的標識化を評価する。

(4) 細胞膜透過性の評価

ヒト肺がん細胞に BODIPY 含有化学プローブを添加して培養し、共焦点蛍光顕微鏡でプローブの細胞内局在化を評価する。

(5) 生細胞中の内在性 14-3-3 の標識化

リン酸化刺激したヒト白血病細胞を化学プローブで処理して培養し、洗浄後ライセートを SDS-PAGE で分離、ゲルを蛍光イメージングおよび Western blot で可視化して、内在性ヒト 14-3-3 の蛍光標識化を検討する。

4. 研究成果

(1) 分子設計と合成

FC-A から 14 段階を経て ISIR-042 を有機合成した。ISIR-042 のアミノ基に反応性トシル含有スパーサーを介して dansyl もしくは BODIPY 基を連結したプローブを調製した。プローブを 14-3-3ζ の His164 に選択的に反応させるために、14-3-3、FC、およびリン酸化ペプチド(PMA2)の 3 者会合体 X 線結晶構造を用いたドッキング解析を行い、スパーサー長を約 7 Å に調節した。

(2) in vitro 標識化の評価

遺伝子組み換え型ヒト 14-3-3ζ, σ isoform を大腸菌から発現・精製し、HEPES 緩衝液中、プローブと PMA2 ペプチドを加えて 35 度で 12 時間インキュベーションした。反応混合物を SDS-PAGE 電気泳動で分離し、ゲルを蛍光イメージングおよび CBB 染色で可視化し、

14-3-3に相当するバンドを分析した。その結果、プローブとペプチドの両者を14-3-3ζに作用させたときのみ、14-3-3ζが蛍光標識化され、ペプチドが欠けると反応は進行しないことが分かった。したがって本標識化はリン酸化ペプチド依存的であり、14-3-3-ペプチド-プローブの3者会合体形成を経るものであることが明らかとなった。1:1 蛍光ラベル付与体14-3-3の生成は、MALDI-TOF質量分析で確認した。また、164位にAsnを持つσ-isoformには標識化が起らず、ζ-isoformの164Hisとの位置選択的な反応であることも示唆された。

i+1 番目のアミノ酸残基の形状が標識化に与える影響を検討するために、20種類のアミノ酸をX位に導入したRSHpSXPペプチドライブラリを用い、標識効率を比較した。その結果、Ile, Leu, Valなど分岐型疎水性側鎖を持つアミノ酸含有ペプチドが最も高い標識化効率を与え、Phe, Trp, Tyrなど嵩高い側鎖を持つ場合は効率が低下した。このことは、プローブとのVan der Waals相互作用に適した形状を持つアミノ酸が標識化反応に有利であることを示しており、プローブが3者会合体形成の際に隣接するペプチドの形状を厳密に認識することを示唆している。すなわち、FCを基盤とする本プローブを用いることで、リン酸化リガンドの配列選択的な14-3-3表面標識化が可能であることが分かった。

(3) 標識化の詳細な検討

His164位置選択性は、別途作成したζ-isoformのHis164Ala変異体を用いた実験において、標識化が明らかに抑制された結果により支持された。

14-3-3 ζ-isoformを発現する大腸菌ライセートを用了した標識化を検討したところ、14-3-3に高選択的に蛍光基が付与され、本反応は夾雑系においても高い選択性が保たれることが確認できた。

(4) 細胞膜透過性の評価

ヒト肺がん細胞A-549をBODIPY含有プローブとともにインキュベーションし、洗浄後、共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、蛍光プローブは細胞質内に均一に分布し、プローブが高い細胞膜透過性を持つことが分かった。

(5) 生細胞中の内在性14-3-3の標識化

最後に、細胞内の内在性14-3-3の標識化を検討した。ここでは分析に十分量のライセートを得るために、浮遊細胞であるヒト白血病細胞U937を用いた。まずU937をIBMX/forskolinで処理してPKAを刺激したのち、BODIPY含有プローブとともに3日間インキュベーションした。細胞を洗浄後、ライセートを取得し、SDS-PAGE電気泳動で分離、

蛍光可視化したのち、Western-blotにより14-3-3 ζ isoformを検出し、両者の画像を比較した。その結果、14-3-3の蛍光バンドがPKA刺激応答的に検出された。このことは、内在性14-3-3とリン酸化リガンドとプローブの3者会合体形成を経た標識化が、生細胞中でも進行し、3者会合体形成に関わったリガンドXが、ISIR-042の抗がん活性の作用機序に深く関わる可能性を示すものである。本実験結果から、FC誘導体のヒト細胞における結合たんぱく質が14-3-3であることを、初めて実験的に証明することに成功した。

以上より、天然物FCを基盤とすることで、リン酸化リガンドの形状を厳密に認識する14-3-3標識プローブの創製に成功した。本プローブを用いて、ヒトがん細胞中の内在性14-3-3の蛍光標識化にも成功し、本天然物の結合標的が14-3-3であることを証明することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① M. Takahashi, A. Kawamura, N. Kato, T. Nishi, I. Hamachi, J. Ohkanda
Phosphopeptide-dependent labeling of 14-3-3ζ proteins by fusicoccin-based fluorescent probes
Angewandte Chemie International Edition 査読有
51, **2012**, 509–512.
DOI: 10.1002/anie.201106995
- ② Y. Yamaguchi, N. Kato, H. Azuma, T. Nagasaki, J. Ohkanda,
Protein recognition of hetero-/homoleptic ruthenium (II) tris(bipyridine)s for alpha-chymotrypsin and cytochrome c
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 査読有,
22, **2012**, 2354-2358.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.12.087
- ③ K. Kawakami, M. Hattori, T. Inoue, Y. Maruyama, J. Ohkanda, N. Kato, M. Tongu, T. Yamada, M. Akimoto, K. Takenaga, T. Sassa, J. Suzumiya, Y. Honma
A novel fusicoccin derivative preferentially targets hypoxic tumor cells and inhibits tumor growth in xenografts
Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry 査読有
2012, in press.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22263802>

- ④ S. Machida, N. Kato, K. Harada, J. Ohkanda
Bivalent inhibitors for disrupting protein surface-substrate interactions and for dual inhibition of protein prenyltransferases
Journal of the American Chemical Society 査読有
133, 2011, 958-963.
DOI: 10.1021/ja1086112
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 大神田淳子、フシコクシン誘導体による14-3-3たんぱく質のリン酸化リガンド依存的細胞内標識化、日本化学会第92春季年会、2012年3月27日、慶応大学(神奈川)
- ② 大神田淳子、タンパク質間相互作用の制御を目指したグアニジル基含有ファルネシル転移酵素阻害剤の設計と機能、日本化学会第92春季年会、2012年3月27日、慶応大学(神奈川)
- ③ J. Ohkanda, Isoform Selective and Phosphopeptide-dependent 14-3-3 ζ labeling by Fusicoccin, 第15回産業科学研究所国際シンポジウム、2012年1月12-13日、大阪大学(大阪)
- ④ 大神田淳子、フシコクシン誘導体で14-3-3たんぱく質-たんぱく質相互作用を検出する、第14回生命化学研究会、2011年12月3-4日、白浜(和歌山)
- ⑤ 大神田淳子、細胞内たんぱく質間相互作用の制御を目指して:グアニジン含有アンカー型酵素阻害剤を創る、第14回生命化学研究会、2011年12月3-4日、白浜(和歌山)
- ⑥ 大神田淳子、フシコクシン誘導体による14-3-3たんぱく質の細胞内蛍光標識化、第67回産業科学研究所学術講演会、2011年11月22日、大阪大学(大阪)
- ⑦ Junko Ohkanda, Phosphopeptide-dependent fluorescence labeling of 14-3-3 zeta protein by fusicoccins, France-Japan Workshop, 2011/10/11-12, Bordeaux (France)
- ⑧ Junko Ohkanda, Bipyridine metal complexes for protein surface recognition, 14th Asian Chemical Congress, 2011/9/6, Bangkok (Thailand)
- ⑨ 大神田淳子、たんぱく質-たんぱく質間相互作用を制御する有機分子を創る-抗体医薬を補えるか? 低分子創薬の可能性を追って-、有機合成化学協会関西支部セミナー化学千一夜、2011年7月30日、花王(株)有田研修所(和歌山)
- ⑩ Junko Ohkanda, Phosphopeptide-dependent fluorescent labeling of 14-3-3 ζ protein by fusicoccins, Gordon Research Conference, Bioorganic Chemistry, 2011/6/13-18, Proctor Academy, New Hampshire (USA)
- ⑪ 大神田淳子、フシコクシン誘導体によるリン酸化ペプチド依存的14-3-3たんぱく質の蛍光標識化、日本ケミカルバイオロジー年会、2011年5月23-25日、東京工業大学(東京)
- ⑫ 大神田淳子、たんぱく質-たんぱく質間相互作用を制御し検出するための有機分子の創製、理研ケミカルバイオロジー研究領域勉強会、2011年4月27日、理研・和光研究所(埼玉)
- ⑬ 大神田淳子、フシコクシン誘導体によるisoform選択的14-3-3たんぱく質の蛍光標識化、日本化学会第91春季年会、2011年3月27日、神奈川大学(神奈川)
- ⑭ Junko Ohkanda, Assembling small molecules for disrupting and detecting protein-protein interactions, CBC Department Seminar, 2011/3/9, Nanyang Technological University, (Singapore)
- ⑮ Junko Ohkanda, Module assembly for disrupting protein-protein interactions and dual inhibition of prenyltransferases. Pacifichem2010, 2010/12/16, Hawaii, (USA)
- ⑯ Junko Ohkanda, Module assembly for disrupting protein-protein interactions, AIST Colloquium for Future-Pioneering 2010/12/10, NAIST (Nara)
- ⑰ 大神田淳子、たんぱく質間相互作用の制御・検出のための有機分子の創製、2010年10月8日、九州大学先端化学研究所講演会、九州大学先端化学研究所(福岡)
- ⑱ 大神田淳子、たんぱく質-たんぱく質間相互作用を制御する有機分子の設計、2010年8月3日、第43回若手ペプチド夏の勉強会、淡路島(兵庫)
- ⑲ Junko Ohkanda, Module assembly for disruption and detection of protein-protein interactions, Gordon Research Conference, Bioorganic Chemistry, 2010/6/13-18, Proctor Academy, Andover, New Hampshire (USA)
- [その他]
ホームページ等
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/~johkanda/index.htm>
6. 研究組織
(1)研究代表者
大神田 淳子 (OHKANDA JUNKO)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号: 50233052
- (2)研究分担者
該当者なし