

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288076

研究課題名(和文) アンカー型中分子によるたんぱく質間相互作用の制御と検出

研究課題名(英文) Rational design of synthetic mid-sized agents that disrupt protein-protein interactions

研究代表者

大神田 淳子 (Ohkanda, Junko)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：50233052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：たんぱく質間相互作用(protein-protein interactions; PPIs)は増殖、分化、細胞死などの多様な細胞機能を司る信号伝達系で要となる重要な役割を担っており、新薬の標的として常に注目されている。本研究では、広く平坦な作用面を選択的に認識し、細胞内PPIsの制御とPPI検出を可能とする合成中分子の創製を目的とした。成果として、難治性がんの原因因子であるK-Rasたんぱく質PPIs阻害剤ならびに14-3-3たんぱく質PPIsのリン酸化リガンド配列特異的な蛍光プローブの創成を達成した。

研究成果の概要(英文)：Protein-protein interactions (PPIs) play a central role in the signaling pathways that regulate many cellular functions including proliferation, differentiation, and cell death, and have emerged as a new potential clinical targets in the post-genome era. In this study, we aimed to develop a series of mid-sized molecules, of which the molecular size roughly ranges from 600 to 2,000, to recognize the large and flat interfaces and disrupt and detect intracellular PPIs. The cell-permeable bivalent inhibitors of K-Ras-PPIs and the natural product-based fluorescent probes that detect interactions of 14-3-3 and the phospholigands were designed and evaluated in vitro and in cells.

研究分野：生物有機化学

キーワード：たんぱく質間相互作用 阻害剤 化学プローブ 中分子 K-Ras フシコクシン

1. 研究開始当初の背景

- (1) 約 65 万以上のたんぱく質間相互作用 (PPIs) の約 8 割が、分化・増殖、細胞死、老化等多様な生体反応を司る細胞内信号伝達系の構築に関わっている。近年、PPs の異常とがんや神経変性疾患等の関連が解明され、PPIs はポストゲノム時代の新薬の標的として広く注目されている。
- (2) PPI ネットワークの解明ならびに PPI 創薬を推進するには、細胞透過型の分子プローブおよび PPI 阻害剤の開発が必要不可欠である。
- (3) PPI 作用面は広く浅いため、細胞透過性に優れた低分子創薬が極めて難しい。一方、従来の創薬においてその分子量を理由に敬遠された合成中分子 (分子量 600~2,000 程度) が、複数の相互作用点を備える必要のある PPI 阻害剤の構築に適しているとして近年注目を集めている。
- (4) 合成中分子薬については現在臨床試験中の例があるものの、一般的に細胞透過性が低いことが問題となっている。また中分子の化学構造は複雑であり、調製に煩雑な有機合成化学的なプロセスが必要となる。たんぱく質表面認識に必要な中分子のサイズを生かしつつ、細胞透過性の確保ならびに構造多様性の簡便な導入を可能にするには、分子サイズの最小化を含めた戦略が重要と考えられる。
- (5) (4) 項の課題に関し、我々は、表面の局所的な構造的特徴に相応してモジュール低分子を設計し、これらを組み上げて中分子を得る、モジュールアセンブリ法を検討してきた。これまでの研究で、活性ポケット等への結合モジュールと表面モジュールをスペーサーで連結したアンカー型分子を考案し、活性ポケットにアンカーされた分子が平坦な作用面に表面モジュールを配置する酵素基質間の PPI 阻害剤、モジュール分子の金属イオンへの配位を利用して金属錯体として集積したプロテアーゼ阻害剤、アンカー法を設計に応用した生細胞中の PPI 検出プローブ、を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞で機能する中分子 PPI 阻害剤、および PPI の選択的な検出プローブの開発を目的とした。具体的には、(1) 悪性腫瘍治療薬を指向した K-Ras たんぱく質 PPI 阻害剤の設計と細胞機能の評価、(2) 天然物フシコクシンを基盤とする PPI 検出蛍光プローブの設計と選択性の評価、(3) 中分子 PPI 阻害剤の細胞内合成と機能の評価、を計画した。

3. 研究の方法

(1) K-Ras の PPI 阻害剤の創製
K-Ras の翻訳後脂質修飾酵素であるファルネシル転移酵素 (FTase) ならびにゲラニルゲラ

ニル転移酵素 (GGTase-I) の結晶構造に基づいて、活性ポケットと K-Ras との PPI 作用面の認識モジュールを合理設計し、スペーサーで連結したアンカー型化合物を有機合成化学的に調製した。リコンビナント酵素を用いた *in vitro* 実験ならびに細胞実験により化合物の機能を評価した。

(2) 天然物を基盤とする 14-3-3 たんぱく質の相互作用検出プローブの創成
ジテルペン配糖体フシコクシンにスルホニルエステルを介して蛍光基を導入した反応性プローブを有機合成し、種々の配列を持つリン酸化ペプチドライブラリと 14-3-3 の相互作用を蛍光ゲルイメージングで評価した。

(3) 中分子 PPI 阻害剤の細胞内合成
植物 14-3-3・ジテルペン配糖体フシコクシン・リン酸化ペプチド 3 者会合体結晶構造に基づいて、フシコクシンとペプチドにアルデヒド基、アミノオキシ基をそれぞれ合成化学的に導入したモジュールを合成した。両者のオキシム生成反応に与える 14-3-3 の鑄型効果、細胞内オキシム生成反応の検証、ならびに細胞活性評価を行った。

4. 研究成果

(1) K-Ras の PPI 阻害剤の創製
FTase と GGTase-I の既知の阻害剤と両酵素の酸性表面認識モジュールをアルキル基で連結した化合物は、K-Ras ペプチドを基質として用いた両酵素の活性試験において、既知の阻害剤に比べて優れた阻害活性を示すことがわかり、表面モジュールを取り付けることにより、PPI 阻害剤として機能することを明らかにした。さらに、変異 K-Ras 安定発現株 NIH-3T3 細胞を用いた実験において、合成化合物が K-Ras の脂質修飾を選択的に阻害することを明らかにした。また、共焦点蛍光顕微鏡観察により、化合物が K-Ras の膜局在化を阻害することも確認された。これらの結果から、本研究で合成した化合物が細胞透過性を持ち、細胞内の K-Ras と修飾酵素間の PPI に対する阻害剤として機能することが明らかとなった。今後は K-Ras 変異がんを担持させた動物モデルと用い、抗腫瘍活性の評価を行う予定である。

(2) 天然物を基盤とする 14-3-3 たんぱく質の相互作用検出プローブの創成
多くの 14-3-3 の PPI パートナーたんぱく質は、i+2 位にプロリン残基を持つ mode-1 もしくは i+1 が C 末となる mode-3 配列を有する。フシコクシン J に反応性トシルスペーサーを介して蛍光基を付与した化合物は、12-位に水酸基を有し、明らかに mode-3 リン酸化配列選択的な認識能を示した。我々はこれまでの研究で、天然物の 12-位水酸基の有無が、がん細胞に対する天然物の増殖抑制活性を決定することを見出している。今回得られた結果は、

天然物の 12-位水酸基が mode-1 配列の i-2 ブロリン残基と立体反発を生じるため、mode-3 配列選択性を示す仮説を支持している。すなわち、フシコクシン誘導体の顕著な抗がん活性作用機序を説明する細胞内の標的は、mode-1 配列を持つたんぱく質であることが強く示唆された。

(3) 細胞内モジュールアセンブリによる中分子 PPI 阻害剤の細胞内合成

14-3-3・フシコクシン・ペプチド三者会合体結晶構造に基づいて、フシコクシン 12 位水酸基の化学修飾によりアルデヒドを導入したフシコクシンモジュール、mode-3 リン酸化ペプチドの C 末端にオキシアミノ基を導入したペプチドモジュールを設計・合成した。両者間のオキシム生成反応は、14-3-3 の添加によって著しく加速され、24 時間後の連結体の収率は 90% であった。また連結体は 14-3-3 に対し、nM レベルの親和性を持ち、1:1 複合体を形成することを確認した。細胞にふたつのモジュール作用させて培養し、細胞可溶化物を分析したところ、連結体の生成が確認され、収率はおよそ 40% であった。この結果は、両モジュール化合物が細胞を透過し、細胞内でオキシム生成反応が進行し、中分子サイズの連結体が生じたことを示している。興味深いことに、化学的に調製した連結体で処理した場合には細胞活性がほとんど観察されなかったのに対し、ふたつのモジュールの混合物で処理した場合に顕著な細胞増殖抑制活性を示した。この結果は、ふたつのモジュール分子が細胞内に透過して連結体を与え、14-3-3 阻害剤として機能したことを強く示唆するものである。免疫沈降実験の結果、連結体が細胞内の 14-3-3 たんぱく質の PPI を顕著に阻害することが明らかになった。以上より、モジュールアセンブリを細胞内合成に応用し、細胞内中分子 PPI 阻害剤の合成と信号伝達系の阻害に初めて成功した。本研究の成果は、PPI 阻害剤の新たなプロドラッグ法の提案に繋がる可能性が期待される。

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 10 件)

Prakash Parvatkar, Nobuo Kato, Motonari Uesugi, Shin-ichi Sato, Junko Ohkanda, Intracellular generation of a diterpene-peptide conjugate that inhibits 14-3-3-mediated interactions, *Journal of the American Chemical Society*, **2015**, *137*, 15624-15627. 査読有

DOI:10.1021/jacs.5b09817

Takayoshi Suzuki, Junko Ohkanda, Takashi Mori, Mitsue Nakashima, Motonari Uesugi, Manifesting chemical biology in Manila, *Biochemical Journal*, **2014**, *464*, 1-3. 査読

有

DOI:10.1042/BJ20140874

Kazuo Harada, Shoko Aoyama, Akimasa Matsugami, Penmetcha K. R. Kumar, Masato Katahira, Nobuo Kato, Junko Ohkanda, RNA-directed amino acid coupling as a model reaction for primitive coded translation, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 794-798. 査読有

DOI: 10.1002/cbic.201400029

Junko Ohkanda, Chemicals modulate protein interactions, *Research Activities* 2014, Kyoto University, **2014**, *29*. 査読無
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/about/public/issue/research_activities

大神田淳子、植物毒から得られる抗がん剤：その作用機序の解明に向けて、*黄檗*, 京都大学化学研究所, **2014**, *40*, 13. 査読無

<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/182889>

大神田淳子、タンパク質間相互作用を阻害・検出する合成分子の創製、*ファルマシア*, **2014**, *50*, 1101-1106. 査読有

Junko Ohkanda, Module assembly for designing multivalent mid-sized inhibitors of protein-protein interactions, *The Chemical Record*, **2013**, *13*, 561-575. 査読有

DOI: 10.1002/tcr.201300026

Manuela Molzan, Stefan Kasper, Lars Röglin, Malgorzata Skwarczynska, Takeshi Sassa, Takatsugu Inoue, Frank Breitenbuecher, Junko Ohkanda, Nobuo Kato, Martin Schuler, Christian Ottmann, Stabilization of Physical RAF/14-3-3 interaction by cotylenin A as treatment strategy for Ras mutant cancers, *ACS Chemical Biology*, **2013**, *8*, 1869-1875. 査読有

DOI: 10.1021/cb4003464

Carolin Anders, Yusuke Higuchi, Kristin Koschinsky, Maria Bartel, Benjamin Schumacher, Philipp Thiel, Hajime Nitta, Regina Preisig-Müller, Günter Schlichthörl, Vijay Renigunta, Junko Ohkanda, Jürgen Daut, Nobuo Kato, Christian Ottmann, A semi-synthetic fusicoccane stabilizes a protein-protein interaction and enhances the expression of K⁺ channels at the cell surface, *Chemistry and Biology*, **2013**, *20*, 583-593. 査読有

DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.03.015.

大神田淳子、抗がん活性を有するフシコクシン誘導体の細胞内標的たんぱく質の探索、文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究」天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御 *News Letter*, **2013**, *3*, 12. 査読無

<http://chembiochem.jp/wp-content/uploads/>

〔学会発表〕(計 35 件)

1. 大神田淳子、たんぱく質間相互作用を調節する合成分子を創る、香川大学 2015 年度学内講演会、2016 年 2 月 17 日、香川大学(香川・高松)招待講演
2. 大神田淳子、細胞内たんぱく質間相互作用を制御する中分子の創製、お茶の水女子大学化学科公開セミナー、2016 年 2 月 12 日、お茶の水女子大学(東京・文京区)招待講演
3. 大神田淳子、Module-assembly for intracellular generation of mid-sized agents, Asian Chemical Biology Initiative, 2016 年 1 月 30 日(ジャカルタ、インドネシア)招待講演
4. 大神田淳子、Structure-based Design of PPI Inhibitors that Disrupt Ras Prenylation, Pacificchem2015, 2015 年 12 月 15 日(ハワイ、アメリカ)招待講演
5. 大神田淳子、楠本純士、王辰宇、佐藤慎一、Prakash Parvatkar, 上杉志成、加藤修雄、Molecular mechanism of action of fusicoccin-based antitumor agents, Molecular Function of Natural Products: Advances towards Chemical Biology (#237), Pacificchem2015, 2015 年 12 月 17 日(ハワイ、アメリカ)
6. 大神田淳子、Rational Design of Peptide-based Agents that Control Intracellular Protein-protein Interactions, The Seventh Peptide Engineering Meeting PEM7, 2015 年 12 月 5 日, Indian Institute of Science Education and Research (プネ、インド)招待講演
7. 大神田淳子、Prakash Parvatkar, 上杉志成、加藤修雄、Intracellular Generation of Diterpene-Peptide Conjugate that Inhibits 14-3-3 Interactions, IKCOC-13, 2015 年 11 月 11 日, 京都リーガロイヤルホテル(京都市、京都)
8. 大神田淳子、細胞内たんぱく質間相互作用を制御する中分子の創製、中外製薬鎌倉研究所講演会、2015 年 10 月 7 日、中外製薬鎌倉研究所(鎌倉、神奈川)招待講演
9. 大神田淳子、たんぱく質間相互作用を標的とする中分子を創る、創薬懇話会、2015 年 7 月 2 日、グランドエクシブ鳴門ザ・ロッジ(鳴門、徳島)招待講演
10. 大神田淳子、結晶構造に基づくたんぱく質間相互作用阻害剤の設計、日本薬学会東海支部特別講演会、2015 年 5 月 22 日、岐阜薬科大学(岐阜市、岐阜)招待講演
11. 大神田淳子、モジュール法による中分子設計とたんぱく質間相互作用の制御、一般シンポジウム S53 中分子創薬のフロンティア、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸学院大学(神戸、兵庫)招待講演
12. 大神田淳子、たんぱく質間相互作用を制御する細胞透過性中分子を創る、天然物ケミカルバイオロジー地区ミニシンポジウム、2015 年 1 月 15 日、東北大学(仙台、宮城)招待講演
13. 鏑本麻衣、Prakash Parvatkar, Louvy Punzalan, Jiazhi Sun, 加藤修雄、上杉志成、大神田淳子、Assembled, mid-sized agents that modulate protein-protein interactions, Asian Chemical Biology Conference 2014 Singapore, 2014 年 12 月 16 日、シンガポール国立大学(シンガポール)
14. 大神田淳子、Module-assembled, Mid-sized Agents for Controlling Protein-protein Interactions, Department Seminar, 2014 年 12 月 12 日、Department of Chemistry, シンガポール国立大学(シンガポール)招待講演
15. 大神田淳子、Fusicoccins: Naturally-occurring Stabilizers of Protein-protein Interactions, The 4th Asian Chemical Biology Initiative, 2014 年 11 月 24 日(杭州、中国)招待講演
16. 大神田淳子、Fusicoccins: Naturally-occurring Stabilizers of Protein-protein Interactions The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, 2014 年 10 月 27 日 千里ライフサイエンスセンター(吹田、大阪)
17. 大神田淳子、Module assembly for mid-sized molecules that disrupt intracellular protein-protein interactions, Sino-Japan Workshop on Chemical Biology, 2014 年 10 月 12 日(北京、中国)招待講演
18. 大神田淳子、鏑本麻衣、加藤修雄、Jiazhi Sun, Prakash Parvatkar, 上杉志成、K-Ras Specific Inactivation by Inhibitors of Protein-protein Interactions, Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium 2014, 2014 年 10 月 2 日、ベルン大学(ベルン、スイス)
19. 大神田淳子、Design of Mid-sized Molecules that Disrupt Intracellular Protein-protein interactions, Recent Advances in Nano biotechnology and Chemical Biology 2014, 2014 年 8 月 21 日、ソウル国立大学(ソウル、韓国)招待講演
20. 大神田淳子、細胞内たんぱく質間相互作用(PPIs)を阻害する合成分子の設計、分子標的創薬研究会、2014 年 7 月 10 日、大阪大学(吹田、大阪)
21. 大神田淳子、フシコクシンの化学構造と抗がん活性の相関に関する考察、新学術領域研究天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御、公開シンポジ

- ウム、2014年5月28日、名古屋大学(名古屋、愛知)
22. 大神田淳子、たんぱく質間相互作用 (PPIs)を制御・検出する中分子を創る、日本化学会第94春季年会中長期企画ケミカルバイオロジーの新展開 - 有機化学から発信するライフサイエンス新戦略II、2014年3月27日、名古屋大学(名古屋、愛知)招待講演
 23. 楠本純土、大神田淳子、加藤修雄、フシコクシン含有蛍光標識剤の14-3-3たんぱく質・リン酸化リガンド会合体認識能、日本化学会第94春季年会、2014年3月30日名古屋大学(名古屋、愛知)
 24. 大神田淳子、Rational design of fusicoccin-based fluorescent probes for detecting 14-3-3 complexes, 2014 Queenstown Molecular Biology Meetings in Shanghai -Drug Discovery and International Collaboration, 2014年3月14日(上海、中国)招待講演
 25. 大神田淳子、Module Assembly for Designing Mid-sized Inhibitors of Protein-protein Interactions: Bivalent Dual Inhibitors of Protein Prenyltransferases for Selective Inactivation of K-Ras, The 3rd Asian Chemical Biology Initiative, 2014年1月25日(マニラ、フィリピン)招待講演
 26. 楠本純土、加藤修雄、大神田淳子、Design and Synthesis of Fusicoccin-J-based Chemical Probes for Elucidation of Structural Effects on Binding to 14-3-3/Phospholigand Complexes, The 17th SANKEN International Symposium 2014, 2014年1月21日、大阪大学(吹田、大阪)
 27. 大神田淳子、楠本純土、王辰宇、上杉志成、加藤修雄、フシコクシン誘導体の分化誘導活性作用機序を解明する、第16回生命化学研究会 in 熱海、2014年1月9日、KKRホテル熱海(熱海、静岡)
 28. 大神田淳子、たんぱく質間相互作用 (PPIs)を標的とする薬剤設計への挑戦 ~モジュールアセンブリによるPPIs阻害ならびに検出~、奈良先端科学技術大学院大学光ナノサイエンス特別講義、2013年11月7日、奈良先端科学技術大学院大学(生駒、奈良)招待講演
 29. 大神田淳子、Fusicoccin-based chemical probes for 14-3-3 proteins: Toward understanding the mechanism of action of the antitumor agents, The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, 2013年10月29日、Pacifico Yokohama(横浜、神奈川)招待講演
 30. 大神田淳子、Design and synthesis of fusicoccin-J-based chemical probes for

- elucidation of structural effects on 14-3-3 labeling, The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, 2013年10月28日、Pacifico Yokohama(横浜、神奈川)
31. 大神田淳子、高橋道子、河村明恵、楠本純土、王辰宇、室井誠、浜地格、上杉志成、加藤修雄フシコクシン含有蛍光標識剤による14-3-3-リン酸化リガンド相互作用の検出第55回天然有機化合物討論会、2013年9月18日、同志社大学(京都市、京都)
 32. 大神田淳子、Structure-based design of chemical probes for detecting interactions of phospholigands and 14-3-3 proteins mediated by antitumor natural products, fusicoccins 5th iCeMS Retreat, 2013年9月6日、彦根ビューホテル(彦根、滋賀)
 33. 大神田淳子、中分子によるたんぱく質間相互作用 (PPIs) の阻害と検出 ~K-Ras変異がんに対する薬剤開発ならびに14-3-3標識剤への展開~、日本薬学会九州支部主催特別講演会、2013年7月26日、長崎国際大学薬学部(佐世保、長崎)招待講演
 34. 大神田淳子、高橋道子、楠本純土、王辰宇、上杉志成、加藤修雄、Fusicoccin-based chemical probes for 14-3-3 proteins: Exploring the mode of action of antitumor agents derived from the natural product, Gordon Research Conference, Bioorganic Chemistry, 2013年6月12日(ニューハンプシャー、アメリカ)
 35. 大神田淳子、抗がん活性を有するフシコクシン誘導体の細胞内標的たんぱく質の探索、第4回天然物ケミカルバイオロジー公開シンポジウム、2013年5月28日、つくば国際会議場(筑波、茨城)

〔その他〕

アウトリーチ活動

大神田淳子、「海外修行」のススメ、吉祥女子中学校講演会、2014年11月29日、講演内容は「吉祥進学」第141号36-39に掲載。

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~johkanda/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大神田淳子 (OHKANDA, Junko)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号: 50233052