

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860050

研究課題名(和文)がん治療へむけた分子シャペロン補因子HOPの阻害剤の創出

研究課題名(英文)The creation of co-chaperone HOP inhibitor for cancer therapy.

## 研究代表者

山本 聡 (Yamamoto, Soh)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10588479

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)：分子シャペロン補因子HOP (HSP70/HSP90 Organizing Protein)は、HSP70とHSP90間の基質移行に關与する。本研究では、がん治療へむけて(1) HOPの生理機能の阻害する化合物の探索・同定することを目的とした。加えて機能評価のため、(2)新規生理機能であるATP加水分解の生化学的解析を行った。(1)一次スクリーニングによって、計142個の化合物を同定した。更に、二次スクリーニングを実行し、28個の化合物がHOPと結合することを明らかとした。(2) 生化学解析によって、HOPのATP加水分解の反応速度、結合定数、加水分解に伴う構造変化の詳細を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Co-chaperone HOP (HSP70/HSP90 Organizing Protein) assists protein transfer in the HSP70 and HSP90 dependent protein-folding pathway. HOP highly expresses and forms the complexes with HSP70 and HSP90 in cancer cells. In the present study, we investigated (1) identification the inhibitor of HOP for cancer therapy using chemical library and (2) biochemical analysis of ATPase activity of HOP. (1) We identified binding chemicals to HOP from thirty thousand drugs at first-screening step. We found the twenty-eight drugs that specifically bound to full-length HOP and TPR2A region at secondly-screening step. (2) We determined the ATP hydrolysis rate and dissociation constant, are  $3.8 \times 10^{-3}$  mol ATP/mol HOP/min and 350  $\mu$ M, respectively. 1-359 (TPR1-TPR2A) was required for ATP hydrolysis and interaction with ATP. We demonstrated the HOP changes its conformation by ATP hydrolysis using NMR analysis and protease sensitivity assay.

研究分野：生物系薬学

キーワード：分子シャペロン HSP70 HSP90 HOP タンパク質折りたたみ

## 1. 研究開始当初の背景

Heat Shock Protein (HSP)は、熱や酸化ストレスなどのストレスで誘導されるタンパク質である。また、ストレス時以外にも恒常的に発現しており、様々なタンパク質の機能発現及び調整(新規合成ポリペプチド鎖の折りたたみ、タンパク質の凝集抑制・修復、分解誘導、アポトーシス、タンパク質輸送等)に関わることから、近年では分子シャペロンとして総称されている[Hartl F. U., et al. Nature, 2011]。このような多彩な生理機能は分子シャペロンが単独で機能するのではなく、基質タンパク質の種類や細胞内環境に応じて補因子群を使い分けることで獲得している。近年、分子シャペロンと補因子との分子ネットワークは、がんや神経変性疾患といった病態の発症に深く関わっていることが明らかとなってきた。特にがんは、日本最大の死亡原因であり現在では約3人に1人、近い将来半数が死亡されると予想される。がん克服へ向けて、さまざまな基礎および臨床研究が進められているが、治療抵抗性、転移で再発を繰り返す難治性がんへの治療方法は確率されていない。がん抑制遺伝子産物 P53 タンパク質や成長因子タンパク質を含めた多くのがん関連タンパク質は、細胞内で機能するために分子シャペロン HSP70・HSP90 による折りたたみや構造安定化の作用をうけることが明らかとなってきた。

申請者の先行研究によって、分子シャペロンネットワークの機能破綻や異常が、腎排泄型薬剤の急性腎不全に関与すること [Soh Y., et al. FEBS Letters, 2010] や、ヒト大腸のがん化に関与していること [Hiroshi K., et al. Cell Stress and Chaperones, 2010]を明らかとした。特にヒト大腸がん組織において、(1) 分子シャペロン HSP70、HSP90 や両分子の補因子 HSP70/HSP90 Organizing Protein (HOP)の発現量が増加していることに加えて、がん組織では通常組織と異なり、これらの分子シャペロンが単独で存在せず複合体として存在することを明らかにした。このことから、がん細胞では正常細胞とは異なり HSP70・HSP90・HOP の三分子複合体が主体となった分子シャペロンネットワークが構築されていることが強く推測できる。従って、がん

細胞の HSP70・HSP90・HOP 複合体の分子ネットワークの機能を選択的に阻害することができれば、正常細胞への影響が少なくがん細胞の増殖を阻止できる可能性が高いと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 分子シャペロン HSP70・HSP90・HOP の中でも、HSP90 は多くのがん関連タンパク質の機能発現に関わることから、がんの標的分子として抗がん剤の開発が進められているが、正常細胞の HSP90 も阻害するため強い副作用がある。そこで申請者は、複合体の中でも補因子の HOP に着目し、がん治療向け HOP に結合する新規薬剤を創製することを目的とした。

(2) 目的(1)を実行するために、HOP の生理機能評価を試験管外で評価する必要がある。研究代表者は HOP の ATP 加水分解活性に着目した。分子シャペロンは ATP と結合し、加水分解することで自身の立体構造を変化させ、新規合成ポリペプチド鎖を折りたたむ。この活性は研究者が見いだしたもので、HOP の ATP 結合領域など、詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) HOP 結合新規薬剤の同定

#### 遺伝子組換えヒト HOP の発現と精製

全長、領域欠損、各領域の HOP 遺伝子を大腸菌発現用ベクターの pCold I に組み込み、発現用大腸菌 BL21 へ形質転換した。発現は、前培養した菌液を新しい LB 培地へ 100 倍希釈し、O.D.600 が 0.4 になるまで旋回培養した後、15 で 30 分間静置し、IPTG(終濃度 1mM)を添加し、更に 15 で 24 時間旋回培養した。菌体を遠心操作で回収し、タンパク質の精製を行った。精製には、菌体を超音波処理によって破碎後、再遠心し、その上清画分を用いた。Ni-NTA chromatography 後、更に gel filtration chromatography を行い、精製純度を高め、限外ろ過によって濃縮後、5% glycerol, 1 mM DTT を含む 25 mM HEPES-KOH(7.4)で-80 で凍結保存した。

HOP 結合化合物の探索 (一次スクリーニング)

一次スクリーニングには、全長 HOP (1-543 アミノ酸)及び TPR1, TPR2A 領域を ATP の存在下、非存在下の条件で使用した。化合物アレイは NPDepo Array Ver.2 を使用した。タンパク質の結合検出には、HOP の N 末端に付加しているヒスチジンタグに対する抗 His タグ抗体、Cy5 標識二次抗体を順次反応させ、Cy5 の蛍光強度を測定することで、化合物と HOP の結合を評価した。

HOP 結合化合物の探索 (二次スクリーニング)

二次スクリーニングには、thermal shift assay [Alexandrov A. I., et al. Structure, 2008] を用いた。この方法はタンパク質の熱安定性の変化から、タンパク質と化合物の結合の有無を確認できる。本測定では、蛍光試薬として SYPRO orange protein gel stain を使用した。タンパク質濃度は一反応 20  $\mu$ l につき、全長 HOP (1-543)を 4  $\mu$ g、TPR2A 領域を 2  $\mu$ g をそれぞれ使用した。対象となる化合物は DMSO に溶解し、終濃度 0.5 mg/ml で DMSO は 1%の条件下で測定した。測定機器は ABI 社 7900HT real time PCR を使用した。

(2) HOP 新規生理機能 ATP 加水分解の生化学的解析

ATP 加水分解能の測定

領域欠損変異体を含む精製 HOP(10  $\mu$ M) , ATP(0 から 2 mM)を 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 25 mM HEPES-KOH(7.4)に調整し、37 °C で最大 120 分間、静置保温した。その後、ATP 加水分解に伴う遊離リン酸を BIOMOL GREEN を用いて比色定量し、加水分解量を算出した。各 ATP 濃度における遊離リン酸量に対して非線形フィッティングを行い、加水分解速度を決定した。同様に、領域欠損変異体を用いて ATP 加水分解の遊離リン酸の量を測定し、活性中心領域を決定した。

NMR を用いた ATP との結合定数の算出

精製 HOP 全長(1-543)を 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MES (6.5)に溶解し、そこに ATP を滴定し、NMR にて <sup>1</sup>H 測定を行った。結合定数の

算出には、ATP のアデノシンの 2 位、8 位の <sup>1</sup>H の変化率を使用し、非曲線フィッティングによって算出した。NMR 測定装置は、600 MHz spectrometer (DRX-600)を使用した。

ATP 結合に伴う構造変化解析

HOP 全長(1-543)及び TPR1-TPR2A 領域を 10% D<sub>2</sub>O, 50 mM KCl, 5 mM KCl, 20 mM potassium phosphate (6.5)にそれぞれ溶解し、そこに ATP を 10 倍濃度添加し、NMR を用いて <sup>1</sup>H を測定した。

ATP 加水分解に伴う構造変化解析

HOP 全長(1-543)を、5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 25 mM HEPES-KOH (7.4)に溶解し、TPCK 処理トリプシン(終濃度 10 nM)もしくはプロテアーゼ K(終濃度 30 nM)を添加した。またヌクレオチドとして、ATP, ADP, ATP の非加水分解アナログ AMP-PNP を添加し、加水分解に伴う構造変化を、プロテアーゼに対する消化耐性の割合で評価した。また構造変化領域を決定するために、SDS-PAGE 電気泳動後のゲルから消化断片を切り出し、N 末端のアミノ酸配列を LC491 タンパク質シーケンサーにて決定した。

4 . 研究の成果

(1) HOP 結合化合物の創製

化合物の探索の結果 (一次スクリーニング)

化合物アレイを用いての一次スクリーニングの結果、全長 HOP ( 1-543 ) に対し ATP 非存在下では 5 個、ATP 存在下では 72 個結合する化合物を同定した。一方で TPR2A 領域には、計 77 個の結合する化合物を同定した。TPR1 領域では、結合する化合物を同定されなかった。全長 HOP において ATP の有無では計 4 個の化合物が共通であり、更に、全長 HOP(ATP 存在下)と TPR2A では 4 個の化合物が共通であった(図 1)。

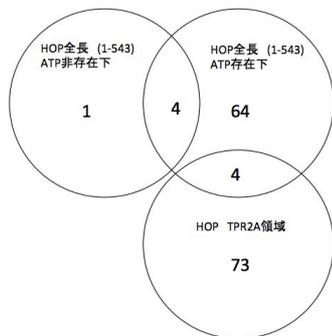


図1 HOP 結合化合物一次スクリーニングの結果

化合物の探索の結果（二次スクリーニング）

一次スクリーニングで同定した化合物を対象として、二次スクリーニングを実行した。二次スクリーニングには、thermal shift assay を使用し、熱変性過程での蛍光強度を一次微分して最大蛍光強度を示す温度点( $T_m$  値)を算出し、評価に用いた。その結果、HOP 全量 1-543 において計 19 個、TPR2A 領域において計 9 個の化合物が結合することを明らかとした。

(2) HOP 新規生理機能 ATP 加水分解の生化学的解析

ATP 加水分解活性及び結合能について

HOP の生理機能として ATP 加水分解活性を見いだした (図 2)。ATP 濃度依存的に ATP 加水分解の速度は増加した。、非線形フィッティングにより反応速度は、 $3.8 \times 10^{-3}$  mol ATP/mol HOP/min であった。更に ATP との解離定数を、ATP 滴定に伴うデノシン 2 位、8 位の  $^1\text{H}$  の変化量を NMR で測定し、算出した。その結果、ATP と HOP の解離定数  $K_d$  は 350  $\mu\text{M}$  であった。

ATP 加水分解活性中心領域の同定

HOP の ATP 加水分解の活性中心領域を決定するために、領域欠損変異体 (106-543, 352-543, 1-359, 1-224, 106-224, 225-359, 106-359) を精製し、各時間点における ATP 加水分解量を測定した (図 3)。120

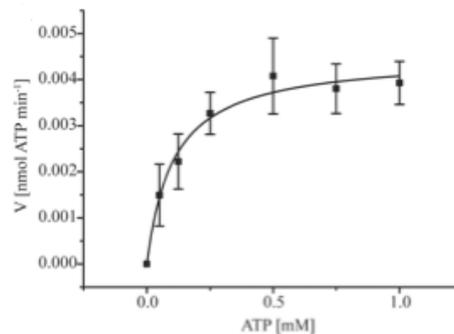


図2 HOP の ATP 加水分解能測定結果

分後における HOP 全長と ATP 加水分解量を比較すると、1-359 領域(TPR1-TPR2A)では 100%加水分解能が保持されていることに対して、1-224, 106-224, 225-539, 106-350 領域では活性の低下が認められた。更に 106-543, 352-543 領域においても活性の低下が認められた。以上の結果より、ATP 加水分解の活性中心は 1-359 領域であることを明らかとした。

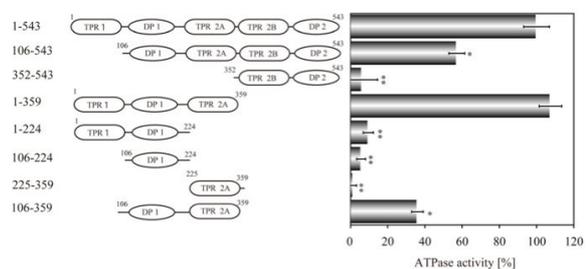


図3 領域欠損変異体の ATP 加水分解測定の結果

HOP の構造変化解析

ATP 結合に伴う構造変化を解析するために、ATP 有無における HOP 全長(1-543)及び 1-359 領域の  $^1\text{H}$  の変化を NMR にて測定した。その結果、ATP 添加によって両領域における  $^1\text{H}$  の変化が観察され、このことから構造が変化していることが推測された。さらに、プロテアーゼに対する消化効率の差から構造変化の有無を評価した(図 4)。HOP 全長(1-543)に ATP、ADP 及び ATP の非加水分解アナログである AMP-PNP の存在下、TPCK 処理トリプシンを添加し、37 で 30 分間保温した。その後、SDS-PAGE 電気泳動にてタンパク質を分離し、未切断の全長 HOP の割合を算出し評価した。その結果、ATP 非存在下では、80%の HOP の全長鎖がトリプシンによって消化されたのに対して、ATP

存在下では約 40%が消化された。ADP, AMP-PNP 存在下では約 70%が消化された。以上の結果から、HOP は ATP 加水分解過程において構造を変化させていることが明らかとなった。

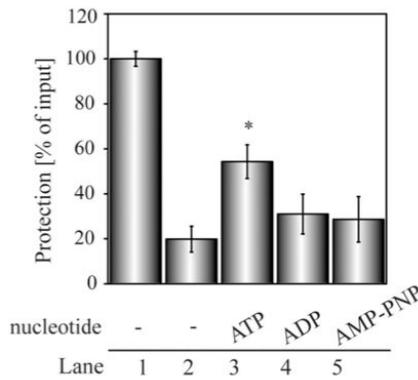


図 4 プロテアーゼ耐性実験結果

#### ATP 加水分解に伴う構造変化領域の同定

ATP 加水分解に伴う構造変化領域を同定するために、60 分後にトリプシンによって消化される断片を、SDS-PAGE 電気泳動によって分離し(図 5A)、その後断片を精製し、N 末端のアミノ酸を同定した(図 5B)。その結果、C 末端領域及び DP1 領域付近の構造が ATP 加水分解によって変化することが示唆された。

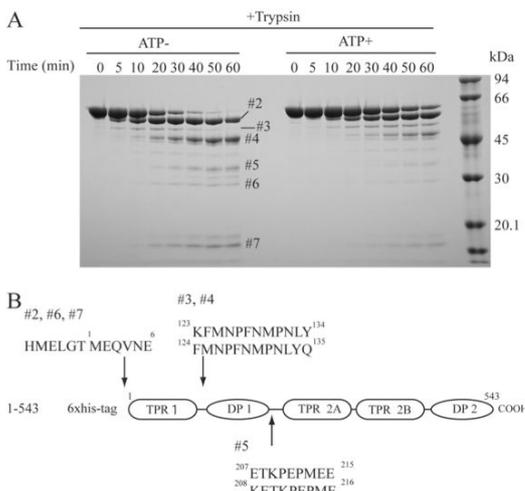


図 5 断片のアミノ酸シーケンス結果

#### HOP アミノ酸変異体の ATP 加水分解能

HOP の ATP 結合配列を同定するために、既知 ATP 結合配列である walker B モチーフの検索を行った。その結果、HOP の内部配列内に、4 つの walker B モチーフが存在することが明らかとなった。この内、活性中心領域内に存在する 186 番目のアスパラギン酸をアラニンに変異させた変異体を作製・精製し、活性を測定した。その結果、変異体の反応速度は野生型 HOP を変化がないことが明らかとなった。このことから、HOP の ATP 結合モチーフは新規のモチーフであることが推測される。

#### <引用文献>

F. Ulrich Hartl, Andreas Bracher and Manajit Hayer-Hartl, Molecular chaperones in protein folding and proteostasis., *Nature*, 475, 324-332, 2011

Soh Yamamoto, Shunsuke Nakano, Kensuke Owari, Kazuhiko Fuziwara, Nobuaki Ogawa, Michiro Otaka, Kumiko Tamaki, Sumio Watanabe, Atsushi Komatsuda, Hideki Wakui, Ken-ichi Sawada, Hiroshi Kubota and Hideaki Itoh Gentamicin inhibits HSP70-assisted protein folding by interfering with substrate recognition., *FEBS Letters*, 584, 645-651, 2010

Hiroshi Kubota, Soh Yamamoto, Eri Itoh, Yuki Abe, Asami Nakamura, Yukina Izumi, Hirotaka Okada, Masatake Iida, Hiroshi Nanjo, Hideaki Itoh and Yuzo Yamamoto., Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. *Cell Stress Chaperones*, 15, 1003-1011, 2010

Alexander I. Alexandrov, Mauro Mileni, Ellen Y.T. Chien, Michael A. Hanson, Raymond C. Stevens., Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins, *Structure*, 16, 351-359

## 5 . 主な論文発表

### [ 雑誌論文 ] ( 計 6 件 )

Shin-ichi Yokota , Mutsuko Konno , Shin-ichi Fujiwara , Nariaki Toita , Michiko Takahashi , Soh Yamamoto, Noriko Ogasawara ,and Tsukasa Shiraishi., Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intrasposal, Helicobacter pylori Infection in Japan Determined by Multilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. Helicobacter., 査読有り, 2015, In press

Sara Alvira, Jorge Cuéllar, Alina Röhl, Soh Yamamoto, Hideaki Itoh, Carlos B. Alfonso, Germán Rivas, Johannes Buchner, José M. Valpuesta., Structural characterization of the substrate transfer mechanism in Hsp70/Hsp90 folding machinery mediated by Hop., Nature Communications, 査読有り, 5, 5484, 2014, doi:10.1038/ncomms6484

Noriko Tsuji, Kana Fukuda, Yuhtaroh Nagata, Hirotaka Okada, Asami Haga, Shiori Hatakeyama, Shiho Yoshida, Tomoya Okamoto, Miki Hosaka, Kazuhiro Sekine, Kei Ohtaka, Soh Yamamoto, Michiro Otaka, Ewa Grave, and Hideaki Itoh., The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90. FEBS open bio, 査読有り, 4, 769-803, 2014, doi: 10.1016/j.fob.2014.09.003. eCollection 2014.

Soh Yamamoto, Hideki Wakui, Hiroshi Kubota, Hideaki Itoh, and Shin-ichi Yokota. Aminoglycosides suppress the protein folding activity of the molecular chaperone HSC70: implication of a structure-activity relationship., Chemotherapy, 査読有り, 60(1), 37-46, 2014, doi: 10.1159/000365880. Epub 2014 Oct 29.

Soh Yamamoto, Ganesh Prasad Subedi, Shinya Hanashima, Tadashi Satoh, Michiro Otaka, Hideki Wakui, Ken-ichi Sawada, Shin-ichi Yokota, Yoshiki Yamaguchi, Hiroshi Kubota and Hideaki Itoh, ATPase activity and ATP-dependent conformational change in the

co-chaperone HSP70/HSP90-organizing protein (HOP). J. Biol. Chem., 査読有り, 289, 9880-9886, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.553255. Epub 2014 Feb 17.

Shin-ichi Yokota, Nariaki Toita, Soh Yamamoto, Nobuhiro Fujii and Mutsuko Konno., Positive Relationship Between a Polymorphism in Helicobacter Pylori Neutrophil-Activating Protein A Gene and Iron-Deficiency Anemia., Helicobacter, 査読有り, 112-116, 2013, doi: 10.1111/hel.12011. Epub 2012 Oct 3.

### [ 学会発表 ] 計 2 件

The 28<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013, 横浜 (口頭発表及びポスター発表)  
第 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会, 2014, 福岡 (口頭発表)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 聡 (Yamamoto Soh)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 10588479

### (2) 研究協力者

伊藤英晃 (Hideaki Itoh)  
久保田広志 (Hiroshi Kubota)  
山口芳樹 (Yoshiki Yamaguchi)  
横田伸一 (Shin-ichi Yokota)