

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460142

研究課題名(和文)細胞内触媒反応によるタンパク質局在制御と機能制御

研究課題名(英文) Regulation of subcellular localization and functions of proteins by in-cell catalytic reactions

研究代表者

山次 健三 (Yamatsugu, Kenzo)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：30646807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新しいタンパク質機能制御法として、細胞内触媒的の化学修飾による標的タンパク質の細胞内局在制御とそれによる機能制御を実現することを目的とする。タンパク質選択的アシル化触媒の開発に成功し、それによって試験管内で脂肪酸修飾されたタンパク質が膜成分に濃縮されることを明らかにした。さらに、生細胞内において標的タンパク質の選択的なアシル化にも成功した。生細胞内におけるタンパク質の局在制御にまでは至らなかったが、本研究の成果は新規の機構によるタンパク質機能制御法の礎となったと考えている。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at regulating subcellular localization of proteins through their catalytic chemical modifications in living cells as a new method for functional regulations of the proteins. I succeeded in developing a novel catalyst system to enable protein-selective acylation, and I found that a protein modified by the catalyst system (fatty acylation) localized in liposomes. I, furthermore, succeeded in protein-selective acylation in living cells using the catalyst system. Although I, unfortunately, have not achieved subcellular localization control in living cells, I believe that this research achievement paved a way for a new method of regulating protein functions through a novel mechanism.

研究分野：organic chemistry

キーワード：in-cell reaction subcellular localization protein catalyst acylation

### 1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性はその構成成分である細胞とそれら細胞間ネットワークの恒常性によって維持されている。細胞の恒常性は細胞内生体分子が適切に生産され、それらの機能が時空間的に適切に制御されることによって成り立っている。これら機能性生体分子の中で中心的な役割を果たしているのがタンパク質であり、タンパク質の機能を適切に維持できなくなることによって細胞はその恒常性を損ない、それは疾病などの生体の機能異常というかたちで現れる。従って疾病の治療を目指すとき、その原因であるタンパク質の機能異常を回復することが求められる。

細胞は自身の持つタンパク質の機能を様々な形で制御している。代表的なものとして、1) 活性部位への結合小分子による制御、2) 活性部位以外に対する結合によりコンフォメーション変化などを誘起するアロステリック制御、3) 他のタンパク質と複合体を作ることによって新しい機能を付与するタンパク質-タンパク質間相互作用による制御、4) タンパク質の細胞内局在を変化させることによる制御、などがある。従来の医薬は、これらのうち主として1) や2) に焦点を当ててきた。しかし、受容体ないしは酵素サブタイプ間の選択性が不十分である場合や、機能を阻害するものがほとんどで活性化するものを得難いといった問題点も多い。最近になって、3) タンパク質-タンパク質間相互作用に焦点を当てた医薬品も誕生しつつあるが、相互作用面積の大きさ故に低分子医薬では標的にしづらいといった問題点や、やはり阻害剤がほとんどであるといった問題点がある。一方、4) タンパク質の細胞内局在を変化させることによる機能制御は未だ精力的に研究がされておらず、新しい可能性を残した未開拓分野であった。

### 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究は、疾病の治療を目標とした新しいタンパク質機能制御法の開発を目的とする。その新規方法論として、細胞内触媒的化学修飾による標的タンパク質の細胞内局在制御を実現し、低分子阻害剤に代表される既存のタンパク質機能制御法が抱える問題点を克服することを目指す。また、本研究計画の実現には細胞内でも機能する屈強な反応性と複雑な混合物中でも標的タンパク質のみを化学修飾する選択性が主な課題となる。この synthetic biology における普遍的な問題に対する解決策を提示することも本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

タンパク質の細胞内移行は、当該タンパク質と移行先の生体分子との親和性が駆動力となっている。従って標的タンパク質に目的移行先の生体分子に対する親和性部位を人工的に付与することで、標的タンパク質の細

胞内輸送とそれによる細胞内機能制御が可能になると考えた。そのための具体的な反応形式としてリジン残基の触媒的アシル化を設定した。標的タンパク質に結合する低分子化合物とアシル化触媒部位のハイブリッド分子を触媒、移行先生体分子との親和性部位(例えば長鎖脂肪酸誘導体)をアシルドナーとして用いて標的タンパク質の触媒的化学修飾を行うことで、その細胞内輸送制御を行うことを計画した。

### 4. 研究成果

(1) 標的タンパク質選択的アシル化を促進する触媒分子の開発

標的タンパク質選択的なアシル化を達成するためには、それだけでは夾雑物と反応しない低反応性のアシルドナー、その低反応性のアシルドナーを効率的に活性化できる触媒部位、の2つが必要である。そこで、細胞内の選択的アシル化触媒であるヒストンアセチル基転移酵素が用いているアシルドナーであるアセチル CoA のような脂肪族チオエステルをアシルドナーとして用いることとした。しかし、アセチル CoA に代表される脂肪族チオエステルを生理的条件下で活性化できる一般性の高い化学触媒は存在しなかった。種々検討を行った結果、代表的な求核触媒である 4-(dimethylamino)pyridine の2位にメルカプトメチル基を導入した分子(DMAP-SH:DSH)が、脂肪族チオエステルを効率的に活性化できることを明らかにした。アセチル化を例に、想定している触媒サイクルを図1に示す。

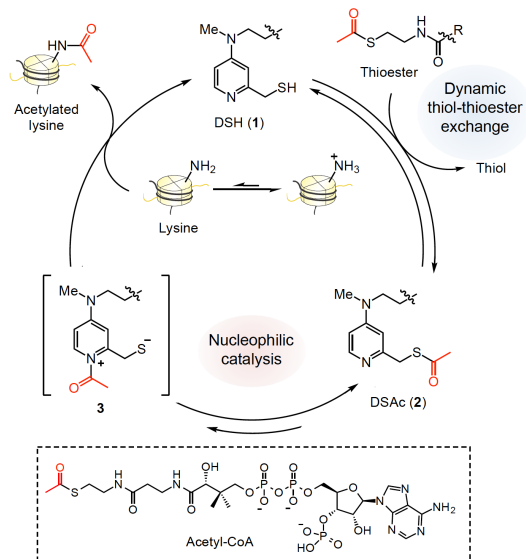


図1 DSHの想定触媒サイクル

まず DSH (1) のチオール基と脂肪族チオエステルが動的チオール・チオエステル交換反応を起こすことで、アセチル基を触媒分子内へと取り込み DSAc (2) を生じる。これにより分子間反応では活性化が困難であったアセチル基が、分子内求核触媒作用によって活性化され、アセチルピリジニウムイオン中間

体(3)を生じる。この際、触媒近傍にリジン残基が存在すれば、活性化されたアセチル基をリジン残基へと転移し、触媒が再生する。

次に、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素(eDHFR)をモデルタンパク質として用いて、標的タンパク質選択的なアシル化が開発した DSH により可能であるか検討した。eDHFR に選択的に結合する化合物であるトリメトプリム(TMP)に様々な長さのリンカーを介して DSH を結合させた化合物 TMP-DSH を触媒アセチルチオエステルをアシルドナー、リコンビナント eDHFR と HeLa 細胞の溶解液の混合物を基質として用いてアセチル化反応を行った(図2)。評価は抗アセチルリジン抗体によるウェスタンブロットングでタンパク質間選択性を、酵素消化後のペプチド断片を LC-MS/MS で解析することで収率決定を行った。その結果、様々なタンパク質の混合物の中で eDHFR が選択的にアセチル化されること、eDHFR に存在する6つのリジン残基のうち32番目のリジン残基が唯一アセチル化されること、そのアセチル化収率は56%であることがわかった。

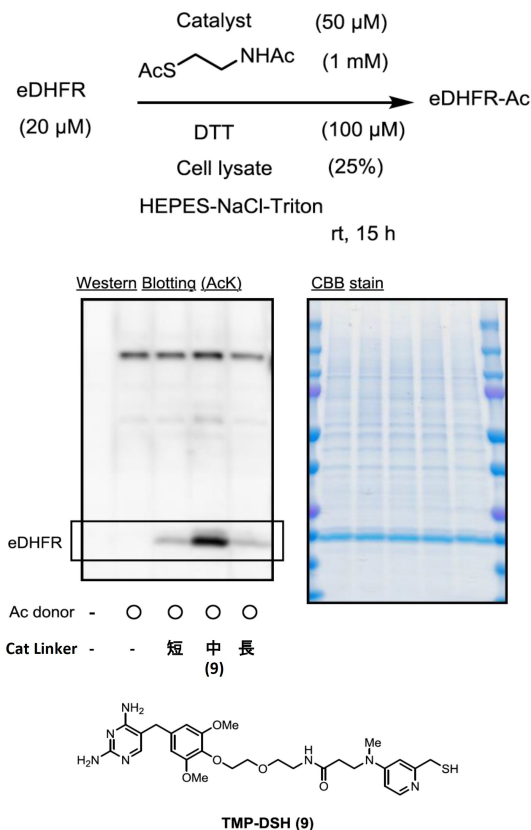


図2 TMP-DSH による eDHFR のアセチル化

### (2) in vitro における標的タンパク質の脂肪酸修飾と膜画分移行

標的タンパク質選択的なアセチル化が達成できたので、標的タンパク質の細胞膜輸送を狙って、脂肪酸修飾が可能であるかを検討した。その結果、アシルドナーを脂肪酸(ミリストイル酸)を持つものに代えるのみで脂肪酸修飾が67%収率で進行することを見出した。そこで、各種脂肪酸鎖を持つアシルドナー

によって eDHFR を脂肪酸修飾し、修飾後のタンパク質が膜画分へと局在するかどうかをリポソーム-緩衝液間分配実験によって確認した(図3)。検出はEGFP抗体を用いたウェスタンブロットングによって行った。その結果、脂肪酸鎖を1本持つものでは膜局在があまり変化しないが、2本持つものは優位に膜画分局在が増えることを明らかにした。

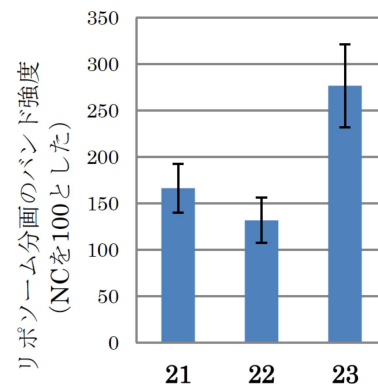
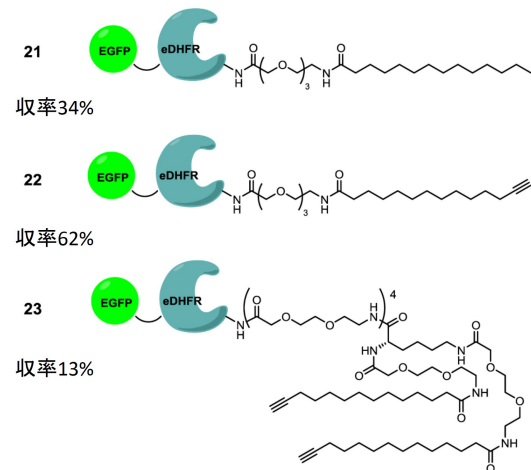


図3 脂肪酸修飾 eDHFR の膜画分局在

### (3) 生細胞内での標的タンパク質選択的なアシル化反応の達成

これまでの検討で、in vitro における標的タンパク質選択的なアシル化触媒システムの構築と、それによる脂肪酸修飾および修飾タンパク質の膜画分局在が達成できたので、次に本反応を生細胞内で行うことを目指して検討を行った。まずアセチル化反応で種々検討を行った結果、DSHの酸化的2量化による分子サイズの増大とそれによる膜透過低下を防ぐためにDSHをメタンチオールとのジスルフィド(DSSMe)としてプロドラッグ化すること、細胞膜透過型アセチルドナーを用いること、の二点が生細胞内反応には重要であり、eDHFRを発現させたHeLa細胞において人工化学触媒によるeDHFRアセチル化反応を達成した(図4)。

そこで次に、生細胞内での脂肪酸化を目指して各種脂肪酸ドナーの検討を行った。しかし、予想に反して脂肪酸ドナーの細胞毒性が高く、種々検討を行ったが、現在の触媒系で

は生細胞内での脂肪酸化反応は困難であると判断した。

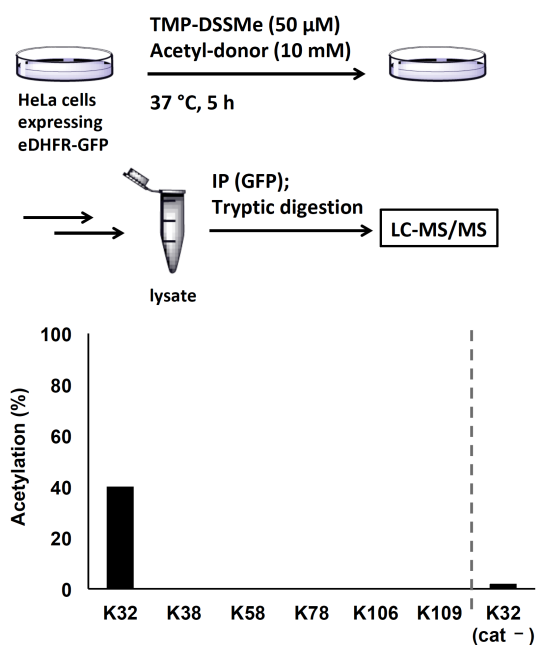


図4 生細胞内での eDHFR アセチル化反応

#### (4) 核移行化学修飾への展開

そこで、細胞膜局在から核局在へと局在目標を変え、触媒反応によって標的タンパク質に DNA 結合化合物を共役させる化学修飾を目指した。その結果、*in vitro* の反応において目的の化学修飾が可能であることを確認できた。現在は、この核局在型触媒反応を生細胞内で実現することを目指して検討を行っている。

#### (5) 病態関連タンパク質 KRas(G12C) 選択的アシル化触媒への展開

モデルタンパク質を用いた標的タンパク質の細胞内局在制御の検討と合わせて、病態関連タンパク質への本触媒系の適用も進めた。具体的には、多くのがんで変異が見られることからがん遺伝子の代表であるにも関わらず、30年以上創薬に至っていないタンパク質である K-Ras(G12C) を標的として検討を行った。現在までに K-Ras(G12C) を触媒依存的にアシル化することに成功しており、今後は生細胞内での反応の実現に向けて検討して行く予定である。

### 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0件)

[学会発表](計3件)

山次健三、ヒストアセチル化人工触媒の開発と触媒医療への取り組み、富士フイルム(招待講演)、2017年

濱島航、石黒伸茂、川島茂裕、山次健三、金井求、新規疾病治療法の確立を目標とした触媒的化學修飾による標的タンパク質の細胞内局在制御法の開発研究、日本薬学会第137年会、2017年

山次健三、川島茂裕、触媒医療の実現に向けて：人工触媒システムによるヒストンの合成的アシル化(2)、日本薬学会第137年会(招待講演)、2017年

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

山次 健三 (YAMATSUGU, Kenzo)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：30646807