

令和元年6月22日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13267

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスに基づいた多能性幹細胞の心筋分化機構の解明

研究課題名(英文) Study of myocardial differentiation mechanism of pluripotent stem cells by chemical genetics approach

研究代表者

竹本 靖 (Takemoto, Yasushi)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：50453543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：KY02111は、多能性幹細胞から心筋細胞への分化を強力に促進する小分子化合物である。その標的分子や作用機序は長らく不明であった。申請者は、ケミカルバイオロジー手法によりKY02111の結合タンパク質の同定に成功した。しかし、その結合タンパク質が心筋分化に関与するという報告はこれまでになかった。そこで、本研究では、ケミカルジェネティクスの概念に基づき、KY02111の作用機序を明らかにすることで、これまでに明らかにされていない多能性幹細胞の心筋分化機構の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞から分化させた心筋細胞を用いた細胞治療が、今後の心臓疾患の治療に大いに期待されている。そのためには、心筋分化機構の理解が非常に重要となる。KY02111は、高効率で多能性幹細胞から心筋細胞へ分化を誘導できる有用な化合物である。本研究課題で申請者は、KY02111をバイオプローブとして用い、その作用機序の解明を試みた。今回、申請者の研究で得られた知見により、多能性幹細胞から心筋細胞への分化機構の理解が深まり、また、本研究結果を基にして、より強力な心筋分化促進化合物の創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Heart diseases are the leading cause of death in the world. One of the reasons is that the regenerative ability of the mammalian heart is very limited. Cell therapy by transplantation of pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes is a very attractive approach to treating patients with cardiac conditions.

KY02111 is a small molecule that promotes cardiac differentiation of pluripotent stem cells. While the target protein of KY02111 had not long been identified, we succeeded in identifying the binding protein of KY02111 by applying a chemical biology approach. Yet, there has been no report indicating that this protein is involved in cardiac differentiation. In this study, we attempted to elucidate myocardial differentiation mechanism of pluripotent stem cells using KY02111 as a bio-probe. Our results suggested that KY02111 induced cardiac differentiation of pluripotent stem cells in a unique way. Based on our findings, more potent cardiac differentiation inducers will be developed.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー ケミカルジェネティクス 小分子化合物 多能性幹細胞 心筋分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞を用いた細胞治療は、今後の医療で大きな役割を果たすことが予想される。しかし、多能性幹細胞の作製、維持、及び特定細胞への分化誘導には、しばしば高価なサイトカインを用いるため、細胞治療のコストが高いことが問題である。そこで、細胞治療の生産性や効果を安価な化合物で効率化することができれば、細胞治療のコストを軽減できる。また、このような化合物を使用することで、血清使用時における病原菌の感染を回避することができ、安全である。

心臓疾患は、世界で死因第1位、日本でもがんに次いで死因第2位である。しかし、その高い死因にも関わらず、心臓疾患に対する主な取り組みは、血圧を低下させる等の発症のリスクの軽減に止まっている。その要因として、心筋梗塞などが重症化すると数億個もの大量の心筋細胞が失われるが、ヒトを含む哺乳類は失われた心筋細胞の自己再生能力が極めて低く、自己治癒が難しいことが挙げられる。そこで、多能性幹細胞から分化させた心筋細胞を用いた細胞治療が、今後の心臓疾患の治療に大いに期待されている。そのためには、多能性幹細胞から心筋細胞への分化機構の理解が非常に重要となる。

これまでに、申請者の所属する京都大学上杉研究室では、京都大学中辻憲夫教授との共同研究により、多能性幹細胞から心筋細胞へ分化を誘導する小分子化合物を、細胞の表現型を指標としたスクリーニング系により探索した。得られたヒット化合物から合成展開を行った結果、KY02111 (図1) が開発された (*Cell Rep.*, **2**, 1448-1460, 2012)。既知の心筋分化誘導剤として Wnt シグナルの阻害剤である IWP2 や XAV939 があるが、KY02111 はこれらの化合物に比べ高効率で心筋分化を促進した。さらに、KY02111 は ES 細胞、iPS 細胞の区別なく、またヒト、サル、マウスなどの種に関わらず心筋分化を強く促進した。KY02111 を用いて作製した心筋細胞は、従来の手法に比べて、より成熟した心筋細胞であった。このように、KY02111 を用いることで、安全・安価・高効率に臨床グレードの心筋細胞を多能性幹細胞から生産することが可能である。

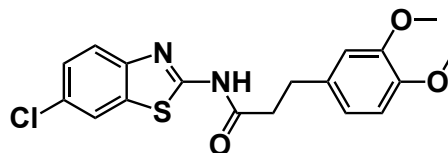


図1 KY02111の構造式

上述の通り、KY02111 は多能性幹細胞を心筋細胞へ高効率で分化を誘導する非常に有用な化合物である。しかし、その標的分子、及び作用機序については不明であった。そこで申請者等は、KY02111 の光反応性プローブを作製し、KY02111 の結合タンパク質の同定を行った。この光反応性プローブは、KY02111 の構造活性相関研究の結果を基に、KY02111 を骨格として、光反応基としてベンゾフェノン、また機能性官能基をクリックケミストリーで連結するためにアルキンを組み込んでいる。KY02111 の光反応性プローブを生細胞に添加した後、紫外線を照射し、光反応基と結合タンパク質間で共有結合を形成させた。回収した細胞からタンパク質を抽出した後、タンパク質に結合したプローブにローダミンをクリックケミストリーで連結し、SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、その蛍光を検出した。その結果、KY02111 の光反応性プローブと結合するタンパク質を検出することができた。さらに、過剰量の KY02111 を細胞にあらかじめ添加しておくことで、光反応性プローブとの結合の障害が認められるタンパク質を見出すことができた。すなわち、このタンパク質が KY02111 の結合タンパク質であることが推測された。そこで、ローダミンの代わりにビオチンを連結し、アビジンビーズを用いて結合タンパク質を精製し、SDS-PAGE 後、銀染色を行い、目的のバンドを切り出し、質量分析を行ったところ、タンパク質 X の同定に成功した。タンパク質 X に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、KY02111 がタンパク質 X に結合していることも確認できた。しかし、これまでにタンパク質 X が多能性幹細胞から心筋細胞への分化に関与するという報告はなかった。従って、KY02111 をバイオプローブとして用い、タンパク質 X の心筋分化における役割を明らかにすることができれば、これまでに知られていない多能性幹細胞の心筋分化機構を解明できることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋分化促進化合物 KY02111 をバイオプローブとして用い、ケミカルバイオロジー手法でその作用機序を明らかにすることにより、多能性幹細胞の心筋分化機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

KY02111 やその誘導体と、タンパク質 X との細胞内での結合能は、サーマルシフトアッセイにより評価した。KY02111 の結合サイトの同定は、細胞に発現させたタンパク質 X の欠損変異体に対し、KY02111 の光反応性プローブを用いたプルダウンアッセイにより行った。KY02111 のタンパク質 X に対する試験管内での酵素活性評価は、タンパク質 X のリコンビナントタンパク質を取得し、行った。KY02111 やその誘導体のタンパク質 X とタンパク質 Y の細胞内での結合に及ぼす影響は、免疫沈降法により検討した。TGFβシグナルに及ぼす影響は、TGFβ刺激により発現が誘導される N-カドヘリンの発現を指標に評価した。SMADs の発現に及ぼす影響は、各抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した。タンパク質 X 及びタンパク質 Y のノックダウンは、それぞれの siRNA を用いた RNAi 法により行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) KY02111 のタンパク質 X の機能に及ぼす影響

KY02111 が、その結合タンパク質として同定したタンパク質 X に対し、どのような影響を及ぼすか、まず検討した。

##### (1-1) KY02111 及びその誘導体とタンパク質 X との結合能の評価

まず、KY02111 とタンパク質 X との細胞内での結合能を、サーマルシフトアッセイにより評価した。タンパク質に熱処理を行うと、固有の温度で変性し、不溶化する。一方、タンパク質のリガンドが結合した場合には、タンパク質が安定化するため、熱変性する温度は上昇する。細胞を 55°C で処理すると、タンパク質 X は熱変性し、不溶化した。しかし、KY02111 を細胞にあらかじめ添加しておく、その濃度依存的にタンパク質 X が安定化し、熱変性が抑制された。従って、KY02111 が細胞内でタンパク質 X と結合していることがサーマルシフトアッセイによっても確認することができた。さらに、様々な KY02111 の誘導体とタンパク質 X との結合能をサーマルシフトアッセイにより評価した。その結果、タンパク質 X との結合能と心筋分化促進活性に非常に強い正の相関が認められた。このことから、KY02111 はタンパク質 X に結合し、タンパク質 X の機能に影響を及ぼすことで心筋分化を促進していることが強く示唆された。また、タンパク質 X の欠損変異体を細胞に過剰発現させた後、KY02111 の光反応性プローブを用いたプルダウンアッセイを行うことで、タンパク質 X における KY02111 の結合サイトの同定も行った。

##### (1-2) KY02111 のタンパク質 X の酵素活性に及ぼす影響

タンパク質 X は酵素活性を有することが知られている。そこで、試験管内で KY02111 が酵素活性を阻害するか検討した。6×His でタグしたタンパク質 X を大腸菌内で発現させ、ニッケルカラムを用いて精製し、タンパク質 X のリコンビナントタンパク質を取得した。取得したリコンビナントタンパク質を用いて、タンパク質 X の試験管内での酵素活性測定法を構築した。しかし、既存のタンパク質 X の酵素阻害剤とは異なり、KY02111 はタンパク質 X の酵素活性を全く阻害しなかった。また、細胞内でも KY02111 はタンパク質 X の酵素活性には影響を及ぼさなかった。従って、KY02111 はタンパク質 X の酵素活性以外の機能に影響を及ぼしていると考えられた。

##### (1-3) KY02111 のタンパク質間相互作用に及ぼす影響

KY02111 がタンパク質 X の酵素活性に影響を及ぼさなかったことから、次にタンパク質 X のタンパク質間相互作用に及ぼす影響について検討した。データベースに登録されているタンパク質 X の結合タンパク質の中で、タンパク質 Y に着目した。タンパク質 Y はタンパク質 X と同じ細胞内局在を示し、またタンパク質 Y に変異が生じると、正常な心筋分化が生じず、心臓の機能に異常が生じることが報告されており、タンパク質 Y も心筋分化において重要な役割を果たしていると考えられている。

3×FLAG でタグしたタンパク質 X と、3×Myc でタグしたタンパク質 Y を細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、細胞内でタンパク質 X とタンパク質 Y が結合していることが確認できた。また、この結合は KY02111 を添加することで阻害された。さらに、KY02111 の誘導体の中で、KY02111 と同様に心筋分化促進活性を有する化合物はタンパク質 X とタンパク質 Y の結合を阻害したのに対し、心筋分化促進活性を有さない誘導体はこの結合を阻害しなかったことから、心筋分化促進活性と、タンパク質 X とタンパク質 Y の結合阻害活性に相関が認められた。以上の結果より、KY02111 はタンパク質 X に結合し、タンパク質 X とタンパク質 Y の結合を阻害することで心筋分化を促進することが示唆された。

##### (2) KY02111 によるタンパク質 X を介した TGFβシグナルの制御

新学術領域「先端モデル動物支援プラットフォーム 分子プロファイリング支援活動」での KY02111 の生理活性評価により、KY02111 がトランスフォーミング増殖因子β (TGFβ) 刺激による N-カドヘリンの発現を抑制することが見出された。すなわち、KY02111 が TGFβシグナルに影響を及ぼすことが示唆された。RNAi 法によりタンパク質 X、あるいはタンパク質 Y をノックダウンしても、TGFβ刺激による N-カドヘリンの発現の抑制が認められた。また、興味深いことに、タンパク質 X をノックダウンするとタンパク質 Y の発現量が低下する一方、タンパク質 Y をノックダウンするとタンパク質 X の発現量が増加することを見出した。このことから、タンパク質 X はタンパク質 Y の安定化に寄与する一方、タンパク質 Y はタンパク質 X の不安定化に寄与しており、これらのタンパク質は互いを制御していることが明らかとなった。

TGFβ受容体には、1 型、及び 2 型のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体がある。TGFβが 2 型 TGFβ受容体に結合すると、1 型 TGFβ受容体が活性化され、R-SMAD (receptor-regulated SMAD) である SMAD2 及び SMAD3 がリン酸化される。リン酸化された SMAD2 及び SMAD3 は、Co-SMAD (common-mediator SMAD) である SMAD4 と複合体を形成し、核へ移行して、様々な遺伝子の発現を制御する。そこで、これらの SMAD の発現に及ぼす影響について検討したところ、KY02111 の添加、あるいはタンパク質 Y のノックダウンにより、SMAD4 の発現量の低下が認められた。

これに対し、SMAD2やSMAD3といった他のSMADの発現には、KY02111の添加、あるいはタンパク質Yのノックダウンは影響を及ぼさなかった。また、KY02111の誘導体についても検討したところ、TGFβシグナルの阻害活性と心筋分化促進活性に相関が認められた。TGFβシグナルが抑制されると、中胚葉系細胞から心筋細胞への分化が促進されることがこれまで報告されている。以上の結果より、KY02111はタンパク質Xに結合し、タンパク質Xとタンパク質Yの結合を阻害することでタンパク質Yを不活性化し、SMAD4の発現量を低下させることでTGFβシグナルを抑制し、心筋分化を促進することが示唆された(図2)。

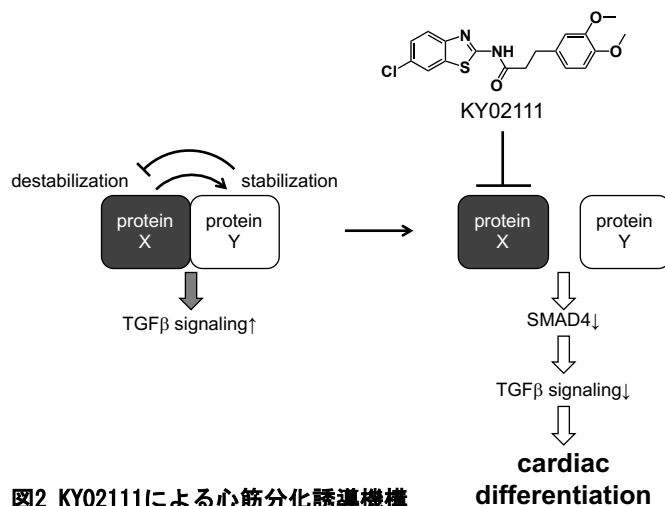


図2 KY02111による心筋分化誘導機構

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Di Mao, Watson Chung Xie Khim, Tomoko Andoh-Noda, Ying Qin, Shin-ichi Sato, Yasushi Takemoto, Wado Akamatsu, Hideyuki Okano, Motonari Uesugi; “Chemical Decontamination of iPS Cell-Derived Neural Cell Mixtures” *Chemical Communications* (査読有) Vol. 54, 2018, pp. 1355-1358

[学会発表] (計 2 件)

① 竹本 靖, Di Mao, Sebastian Gotze, 上杉 志成 “YM-53601 によるスクアレン合成酵素の光分解機構の解析” 日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

② Yasushi Takemoto, Di Mao, Louvy Punzalan, Sebastian Goetze, Motonari Uesugi “Discovery of “photo-degradation tag of protein” derived from squalene synthase” 10<sup>th</sup> International Peptide Symposium, 2018

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。