

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21138

研究課題名(和文) フシコクシン誘導体の細胞内標的の同定：低自由度リンカーによるアフィニティ精製

研究課題名(英文) Identification of intracellular targets of fusicocin derivatives ; infinity purification via rigid linker

研究代表者

樋口 雄介 (Higuchi, Yusuke)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：10723439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質間相互作用を安定化し、抗がん活性などを示す天然由来のジテルペン配糖体フシコクシン(FC)誘導体の細胞内における標的タンパク質をアフィニティ精製法で同定することを目的として本研究を行った。その結果、通常アフィニティ精製に用いられるポリエチレングリコール鎖のような柔らかいリンカーではなく、剛直な構造を有するリンカーを用いた分子でも、標的タンパク質を補足出来ることを示した。また、研究の過程で、分子動力学シミュレーションを駆使した分子設計を行うことにより、天然FCの30倍以上高活性なFC誘導体を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FCが標的とする14-3-3タンパク質は非常に多くのタンパク質と相互作用する。そのため、FCは、抗がん活性や神経細胞突起伸長作用を有することが知られているが、その作用基序は完全には解明されていない。本研究によって見出された手法は、FCが細胞内でどのタンパク質と14-3-3タンパク質との相互作用が安定化しているのかを知るためのツールとして利用できる。また、FCが単離されてから50年近く経つが、天然物の活性を上回る化合物はこれまで報告されておらず、この知見に基づく抗がん剤開発などの展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to identify the intracellular target of a class of diterpene glycosides, fusicocins (FCs), which stabilizes protein-protein interaction by affinity purification. As a result, it was shown that the target protein could be captured even by a molecule using a rigid linker instead of a soft linker such as polyethylene glycol chain usually used for affinity purification. In addition, by molecular design utilizing molecular dynamics simulation, we found an FC derivative that is more active than natural FC. It has been nearly 50 years since FC was isolated, however, no compound has ever been reported that exceeds the activity of natural products. This method provide a way to develop FC based bioactive agents such as anticancer drugs.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：フシコクシン ケミカルバイオロジー アフィニティ精製 タンパク質間相互作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命現象は膨大なタンパク質間相互作用(PPI)により維持、制御されている。これらの PPI を低分子化合物で制御する試みが近年盛んに研究されているが、その多くは PPI 阻害剤によるものである。ジテルペン配糖体・フシコキシシン (FC) 誘導体は、PPI の安定化に基づいた非常にユニークな抗がん作用を有することが示唆されているが、標的である 14-3-3 タンパク質は多数のリン酸化タンパク質と相互作用する多機能タンパク質であるため、その詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では FC 誘導体をリンカーの導入によるアフィニティーの低減を緩和するために低自由度リンカーを介してビーズに繋ぎ、アフィニティー精製法によって細胞内で形成される 14-3-3 / リン酸化タンパク質 / FC 誘導体の三者会合体を直接単離、同定する手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

まずは合成の容易な ISIR-005 の標的を単離することを目的として、ヘキサジン有する剛直なリンカー、及び、アフィニティー精製に頻用される PEG リンカー、既知のポリプロリンリンカーで ISIR-005 をビオチンにつないだプローブ分子を合成した (Fig 1)。これらのプローブはいずれも ISIR-005 と同程度の PPI 安定化効果を示し、アビジンビーズに固定し、精製タンパク質を用いたアフィニティー精製のモデル実験においてもどれも十分な三者会合体保持能力を示した。しかし、このビーズでアフィニティー精製実験を行うと、標的候補タンパク質は単離されるものの、14-3-3 タンパク質がサンプル中に確認できず、ISIR-005 が 14-3-3 の関わらない別の活性を有する可能性が高いことが判明した。そこで、より 14-3-3 への結合能の高い FC 誘導体を見出すため、既知の結晶構造を基に分子動力学計算を駆使して FC-NAC (Fig 1) を設計した。PPI 安定化効果の解析、結晶構造解析、細胞を用いた活性試験などを行い、期待通り FC-NAC が天然 FC の 30 倍以上の PPI 安定化効果を示した。FC-NAC を共有結合的に固定化したビーズを作成し、これを用いて細胞破碎液から三者会合体の単離に成功した。

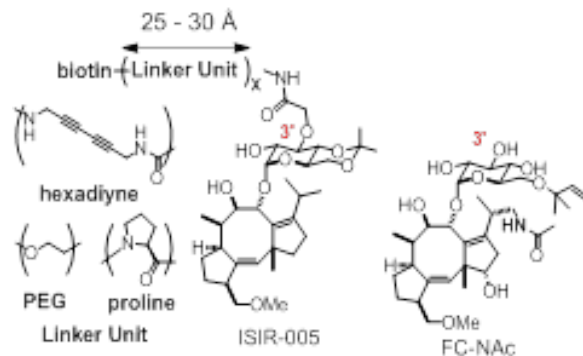


Fig 1. プローブ分子

4. 研究成果

1) 剛直な構造を有するヘキサジンリンカーを用いても PEG リンカーと遜色無く機能することを示した。当初の仮定では PEG リンカーを上回ることを期待したが、これは自由度の高い PEG リンカーを活性本体に繋ぐ際のエントロピー損失を低減する目的で導入した。しかし、PEG リンカーを有するプローブ分子自体が活性本体である ISIR-005 と同程度の PPI 安定化能を示しているため、本研究では当初の仮説が機能しているか否かの結論は出せなかったが、少なくとも PEG に劣らない性質を有していることは確認できた。

2) ISIR-005 が三者会合体のプルダウンに不向きであったため、当初の計画には無かったが、より高活性な FC 誘導体を探し、合理的な設計によって 19 位にアミドを導入した FC-NAC を見出した。FC が単離されてから 50 年近く経つが、天然物の活性を上回る化合物はこれまで報告されていなかった。この一つの原因に比較的構造の複雑な天然物であるため FC 誘導体を合成するのが難しいということが上げられる。本研究では、既知の結晶構造から分子動力学計算によって、相互作用を予測し、FC-NAC のアミドプロトンが標的の 14-3-3 タンパク質のアスパラギン酸残基と強い水素結合を形成することを示す結果を得た。実際に、これを合成すると FC-NAC は天然 FC の 30 倍以上の PPI 安定化効果を示すことが明らかとなった。がん細胞を用いた抗がん活性試験でも、天然 FC を上回る活性を示し、ツール化合物として、有用である他、創薬においても重要な発見となった。また、PPI 安定化剤の設計に分子動力学シミュレーションを用いた例は無く、計算化学を駆使することで、無駄な合成をすることなく活性の高い誘導体を見出せることで方法論としても有用性を示した。

3) 上記 FC-NAC をビーズ上に固定化し、アフィニティー精製実験を行ったところ、ISIR-005 の場合とは異なり、プルダウンサンプル中に 14-3-3 タンパク質が存在することを Western Blot 法に確認できた。FC-NAC を競合させると、ビーズでプルダウンされる 14-3-3 タンパク質が減少することから非特異的な吸着によるものではなく、標的とする三者会合体をプルダウン出来たことが示唆される。相手となる 14-3-3 クライアントタンパク質については現在解析中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) [査読 有] de Vink, P; Andrei, S; **Higuchi, Y**; Ottmann, C; Milroy, L-G; Brunsveld, L; *Chem. Sci.*, **2019**, 10, 2869-2874.
- 2) [査読 有] Ohkanda, J; Kusumoto, A; Punzalan, L; Masuda, R; Wang, C; Parvatkar, P; Akase, D; Aida, M; Uesugi, M; **Higuchi, Y**; Kato, N. *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24(60), 16066-16071.
- 3) [査読 有] Andrei, S; de Vink, P; Sijbesma, E; Han, L; Brunsveld, L; Kato, N; Ottmann, C; * **Higuchi, Y***; *Angew. Chem. Int. Ed.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57(41), 13470-13474.
*corresponding author
- 4) [査読 有] Inoue, T*; **Higuchi, Y*†**; Yoneyama, T; Lin, B; Nunomura, K; Honma, Y; Kato, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2018**, 28(4), 646-650. *equal contribution †corresponding author

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：フシコクシン化合物

発明者：樋口 雄介、加藤 修雄、韓 玲

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：PCT/JP2018/002825

出願年：平成 30 年

国内外の別：国内

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：大神田 淳子

ローマ字氏名：Junko Ohkanda

研究協力者氏名：クリスチャン オットマン

ローマ字氏名：Christian Ottmann

研究協力者氏名：マイケル カーン

ローマ字氏名：Michael Kahn

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。