

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19138

研究課題名（和文）ヒトミダシンタンパク質を標的とした新規低分子化合物の探索および解析

研究課題名（英文）Discovery and analysis of novel small molecules targeting human Midasin proteins

研究代表者

川島 茂裕（Kawashima, Shigehiro）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任講師

研究者番号：40508115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒトにおけるリボソーム生合成調節因子、特にAAA+タンパク質であるミダシンの阻害剤の同定を目標とし、そのために、昆虫細胞培養系を用いたヒトミダシン全長組換えタンパク質の発現精製法を確立した。さらに、精製したヒトミダシンのATPase活性の検出に成功した。また、分裂酵母ミダシンの全長タンパク質の組換えタンパク質の構造生物学的研究を行い、ミダシンの活性制御機構について新たな知見を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子化合物は安価で大量に合成できるという大きな利点があり、新たなdruggableな標的とその標的を阻害する低分子化合物を同定することは挑戦的であるものの、人類の健康にとって大事な研究である。増殖の盛んながん細胞ではリボソームの合成が亢進しているため、リボソーム生合成を標的とした低分子阻害剤は抗がん剤の候補として注目されている。本研究では、ATPase活性のあるヒトミダシン全長組換えタンパク質の発現精製法を確立したことにより、ヒトミダシンに対する新規阻害剤の探索が可能となった。さらに、分裂酵母ミダシンの活性制御機構について新たな知見を得たことによりミダシンの構造生物学的知見が深まった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to identify inhibitors of human ribosome biogenesis regulators, especially the AAA+ protein Midasin, and established a method for expression and purification of full-length recombinant human Midasin using an insect cell culture system. Furthermore, we succeeded in detecting the ATPase activity of purified human Midasin. In addition, we conducted a structural biology study of the recombinant full-length protein of fission yeast Midasin, and succeeded in obtaining new insights into the regulatory mechanism of Midasin activity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：リボソーム生合成 ミダシン 低分子阻害剤

1. 研究開始当初の背景

低分子化合物は安価で大量に合成できるという大きな利点があり、新たな druggable な標的とその標的を阻害する低分子化合物を同定することは挑戦的であるものの、人類の健康にとって大事な研究である。増殖の盛んながん細胞ではリボソームの合成が亢進しているため、リボソーム生合成を標的とした低分子阻害剤は抗がん剤の候補として注目されている。例えば、リボソーム RNA (rRNA) の転写を抑える低分子阻害剤 CX-5461 は、正常細胞にほとんど影響を与えずにがん細胞を選択的に死滅させる効果があることが示され、clinical trial での検討が進んでいる。rRNA 転写阻害剤が抗がん効果を示すことを説明できる有力な分子機構としては、rRNA の減少により核小体が崩壊し、放出されたりリボソームタンパク質 (特に RPL5 と RPL11) が MDM2 と直接結合することによりがん抑制タンパク質 p53 が安定化し、p53 依存的な細胞周期停止およびアポトーシスの誘導が起こることが挙げられる。一方で、rRNA のプロセッシング過程に関与する因子 (以下「調節因子」) をロックダウンするとやはり p53 の安定化が起こることから、調節因子の低分子阻害剤も同様の抗がん効果が期待できると考えられる。ヒトにおいては 200 以上の調節因子がリボソーム生合成に関与していることが知られている。しかしながら、これらの調節因子に対する選択的な低分子阻害剤は未だ報告がない。

我々は研究開始当初以前の研究において、分裂酵母ミダシンの ATPase 活性阻害剤 Rbin-1 を同定した (Kawashima SA et al. Cell 2016)。この研究において、分裂酵母ミダシンの全長タンパク質の組換えタンパク質の精製にも成功している。ミダシンは酵母からヒトまで真核生物において高度に保存されているタンパク質であり、特に ATPase 領域のアミノ酸配列は分裂酵母とヒトの間で約 70% の類似性がある。しかし、これまでにヒトを含む高等生物におけるミダシンの組換えタンパク質の精製は報告がなく、その ATPase 活性についても不明であったため、ヒトミダシンを標的とした低分子化合物の開発は困難であった。

2. 研究の目的

本研究ではヒトにおけるリボソーム生合成調節因子、特に AAA+ タンパク質であるミダシンの阻害剤の同定を目標とし、抗がん剤の新たなリード化合物の創製を目指す。そのために、ATPase 活性のあるヒトミダシン組換えタンパク質の精製法、及び ATPase 活性の測定系を確立することを目指した。また、以前に精製に成功していた分裂酵母ミダシンの全長タンパク質の組換えタンパク質の構造生物学的研究を行い、ミダシンの活性制御機構について新たな知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ミダシンのような AAA+ ATPase タンパク質は ATP 加水分解に伴って大きく構造変換することが知られているので、精製した分裂酵母ミダシンの全長タンパク質の組換えタンパク質に ATP アナログである AMPPNP を加えて、クライオ電子顕微鏡で単分子解析を行った。次に、精製した分裂酵母ミダシンの全長タンパク質の組換えタンパク質に ATP および Rbin-1 を加えて、クライオ電子顕微鏡で単分子解析を行った。Rbin-1 を加えたことによって、ATP 加水分解サイクルの中の特定のステップで止まることを想定した。

(2) ヒトミダシン全長遺伝子 (16,791bp) のクローニングし、昆虫細胞発現用のプラスミドにヒトミダシン全長遺伝子を導入した。昆虫細胞培養系の検討を行い、ヒトミダシン全長タンパク質の発現・精製方法の最適化を行った。さらに、精製したヒトミダシン全長タンパク質の ATPase 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母ミダシンは図 1A のようなドメインからなっているが、AMPPNP を加えた分裂酵母ミダシン全長タンパク質は図 1B のように見え、解析の結果、図 1C のような構造を取っていることがわかった。N 末のリング状のドメインは外径約 140 、内径約 30 、高さは約 65 であった。C 末の Tail 領域は 5 つの ヘリックスの塊から構成されていた。また、この構造において、D/E 領域と MIDAS 領域は見え、この二つのドメインの位置はフレキシブルで固定されていないことが示唆された。次に ATP+Rbin-1 を加えた分裂酵母ミダシン全長タンパク質は、図 2A のように見え、解析の結果、図 2B のような構造を取っていることがわかった。全体的な構造は AMPPNP を加えたものと似ていたが、N 末のリングドメインの中の、AAA2/3/4/5 の部分の構造が変化していた。この結果から、ATP 加水分解によってリングドメインが部分的に構造変化することが明らかとなった。さらに二つの構造を詳細に比較した結果、ATP+Rbin-1 を加えた場合には、AAA2 H2 insertion がリングドメインの中央に移動し、さらに C 末に存在する MIDAS ドメインがリングドメインに結合することが示唆された (図 3)。本研究結果は引用文献 において発表した。

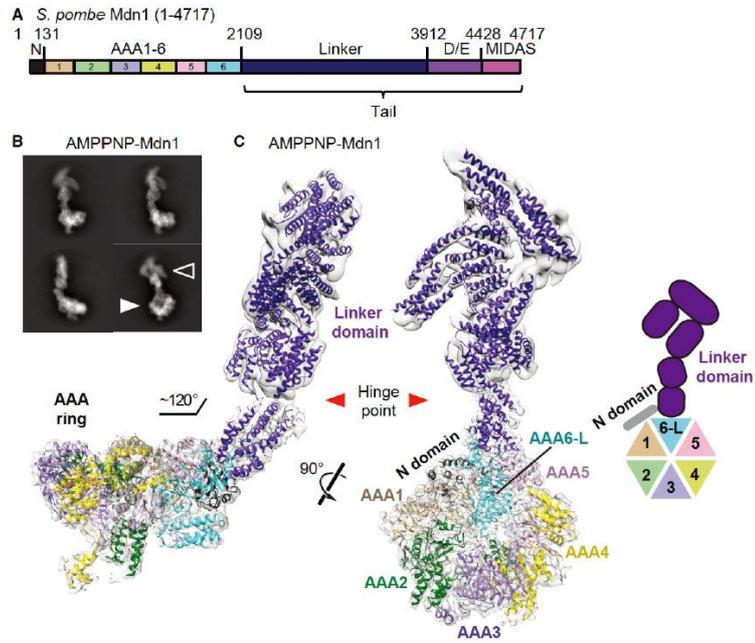


図1 分裂酵母ミダシンの全長組換えタンパク質のAMPPNP存在下における構造

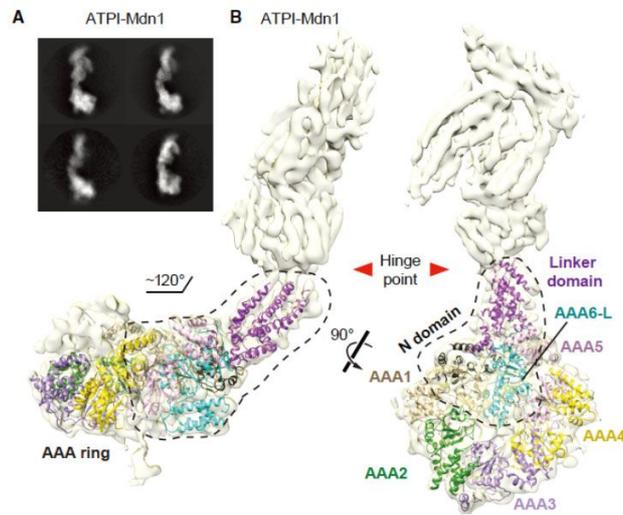


図2 分裂酵母ミダシンの全長組換えタンパク質のATP+Rbin-1存在下における構造

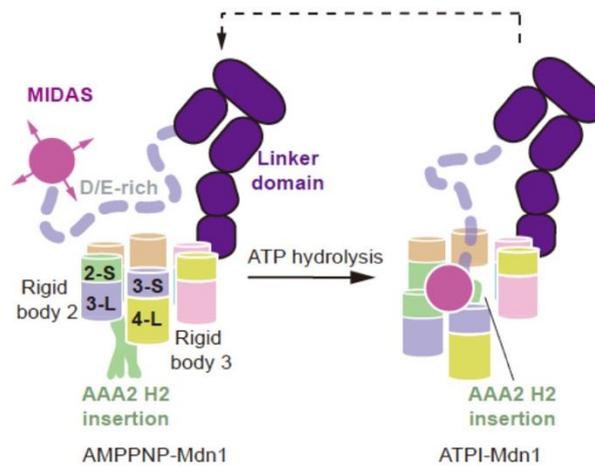


図3 分裂酵母ミダシンのATP加水分解による構造変換のモデル

(2) 昆虫細胞培養系を種々検討した結果、High five 細胞で大量発現系を確立した。非血清培地を使用することで細胞が安定となり、再現性のある発現系を確立することが出来た。次に、精製法を種々検討した結果、His-tag 精製 (ニッケルカラムによる精製)、イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q)、ゲル濾過クロマトグラフィーの順に精製することにより、目的のタンパク質を得ることに成功した。この精製過程において界面活性剤を入れない場合は、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて void 画分に溶出されてしまい、高度に凝集していることが示唆されたが、界面活性剤を適量加えた結果、ヒトミダシン全長タンパク質のモノマーと考えられる画分に溶出された (図4)。LC-MS/MS により、精製したタンパク質がヒトミダシンであることが確認された。さらに、精製したヒトミダシン全長タンパク質の ATPase 活性を測定した結果、活性があることが確認された。これまでに発芽酵母および分裂酵母のミダシンの構造情報が報告されているものの、ヒトを含めた高等生物のミダシンがどのような構造をとっているかは不明である。今後、今回精製したヒトミダシン全長タンパク質の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて解析していき、またヒトミダシンの活性を阻害する化合物の探索をおこなっていく予定である。

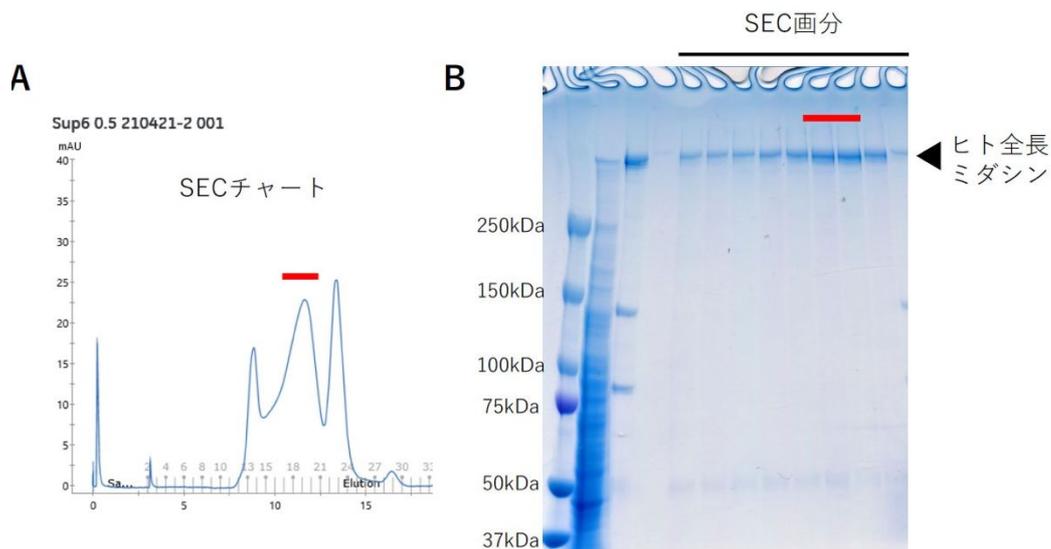


図4 ヒト全長ミダシンの精製

<引用文献>

Chen Z, Suzuki H, Kobayashi Y, Wang AC, DiMaio F, Kawashima SA, Walz T, & Kapoor TM. Structural Insights into Mdn1, an Essential AAA Protein Required for Ribosome Biogenesis. Cell, 175 巻、2018、822-834

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hamajima W, Fujimura A, Fujiwara Y, Yamatsugu K, Kawashima SA, Kanai M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Site-Selective Synthetic Acylation of a Target Protein in Living Cells Promoted by a Chemical Catalyst/Donor System.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1102-1109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.9b00102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Z, Suzuki H, Kobayashi Y, Wang AC, DiMaio F, Kawashima SA, Walz T, Kapoor TM.	4. 巻 175
2. 論文標題 Structural Insights into Mdn1, an Essential AAA Protein Required for Ribosome Biogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 822-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2018.09.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Y, Kawashima SA	4. 巻 9
2. 論文標題 Bub1 kinase- and H2A phosphorylation-independent regulation of Shugoshin proteins under glucose-restricted conditions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39479-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishiguro T, Tanabe K, Kobayashi Y, Mizumoto S, Kanai M, Kawashima SA.	4. 巻 8
2. 論文標題 Malonylation of histone H2A at lysine 119 inhibits Bub1-dependent H2A phosphorylation and chromosomal localization of shugoshin proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26114-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川島 茂裕、小林由紀
2. 発表標題 Bub1 および H2A リン酸化に依存しないシュゴシンの染色体局在化
3. 学会等名 第 36 回 染色体ワークショップ第 17 回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島 茂裕、石黒 伸茂、田辺 佳奈、小林 由紀、水本 真介、金井 求
2. 発表標題 ヒストンH2Aリジン119番のマロニル化はBub1によるH2Aリン酸化及びシュゴシントンパク質の染色体局在化を阻害する
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------