

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21262

研究課題名（和文）標的とする細胞表面タンパク質の生合成を特異的に阻害する革新的な低分子化合物の探索

研究課題名（英文）Screening for small molecule compounds that inhibit the biosynthesis of a specific cell-surface protein

研究代表者

門倉 広（Kadokura, Hiroshi）

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：70224558

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、疾病の原因になるヒト細胞表面タンパク質の生合成を阻害する化合物を探索するための実験系を作成した。そのためには、タンパク質の小胞体への局在化効率の低下を検出する鋭敏なレポーター（研究代表者らが開発）を利用した。パイロットレベルの探索および様々な角度の実験から、レポーターの感度を飛躍的に上昇させるとともに、レポーターの特質を明らかにすることに成功した。これら知見は大規模探索に向けて大きな進展である。更に本研究で作成した実験系を利用した解析から、変異によって脂質異常症の一つである高トリグリセリド血症を引き起こす小胞体膜タンパク質の分子機能の解明に役立つ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

疾病の原因になるヒト細胞表面タンパク質に結合し不活化する抗体は治療薬として有用だが、調製に多大なコストを要する。本研究では、抗体医薬に代わる廉価な低分子化合物を得るための第一歩として、疾病の原因となる細胞表面タンパク質の生合成を特異的に阻害する薬剤を探索するための系の構築を進めた。小規模の探索およびその後の解析から、実験系の効率化と、実験系の特質の解明に成功した。これは、今後の大規模探索に向けて大きな進展である。更に、作成した実験系を使って、変異によって脂質異常症を引き起こすタンパク質の分子機能の解明に役立つ知見を得た。よって、作成した実験系は基礎と応用の両面から有用であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Some human cell surface proteins can cause disease. Antibodies that bind to these proteins and inhibit their functions have been developed as medicines. However, they are extremely expensive because of their high production costs. To solve the problem, here we have developed in cell assays to screen small molecule compounds that specifically inhibit the biosynthesis of the disease-causing human cell surface proteins. Our pilot screen allowed us to obtain information that will facilitate the future large scale screen of these molecules. Furthermore, the new assays enabled us to elucidate the molecular function of an ER membrane protein, whose genetic variations can lead to severe hypertriglyceridemia. These findings reveal the usefulness of our assay system for both applied and basic sciences.

研究分野：応用生物化学

キーワード：分泌タンパク質 ジスルフィド結合 哺乳動物 小胞体 物質生産 低分子化合物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、疾病の原因になるヒト細胞表層タンパク質に結合し不活化する抗体が治療薬として次々と実用化されている。その中には、IL6R (自己免疫疾患の発症に関与) や PD-1 (がん細胞に対する免疫寛容に関与) に対する抗体が含まれる。しかし、抗体医薬は調製に多大なコストを要するため極めて高価である。よって、**抗体医薬に代わる廉価な低分子化合物の開発が望まれる**。近年、既知の抗ウイルス剤のなかに、標的タンパク質のシグナル配列に結合し、標的タンパク質の小胞体への局在化 (即ち生合成) を阻害するものが存在することが判明した (図 2A)。シグナル配列はタンパク質ごとに配列が異なるため、その阻害剤は特異性が高く有用な治療薬になる可能性を秘めているが、探索のための効率良い評価系が存在しなかった。

2. 研究の目的

研究代表者らは、最近、シグナル配列によるタンパク質の小胞体への局在化効率の低下を検出するレポーターの開発に成功した (図 1)。本研究では、本レポーターを利用することによって、**標的タンパク質 (上述の IL6R あるいは PD-1) のシグナル配列に結合し、その生合成を特異的に抑制する低分子化合物を探索**することを目的とした。また、更に、その過程で実験系に問題が見つかった場合には、内容を精査し、**より良い探索系の構築を進める**ことにした。

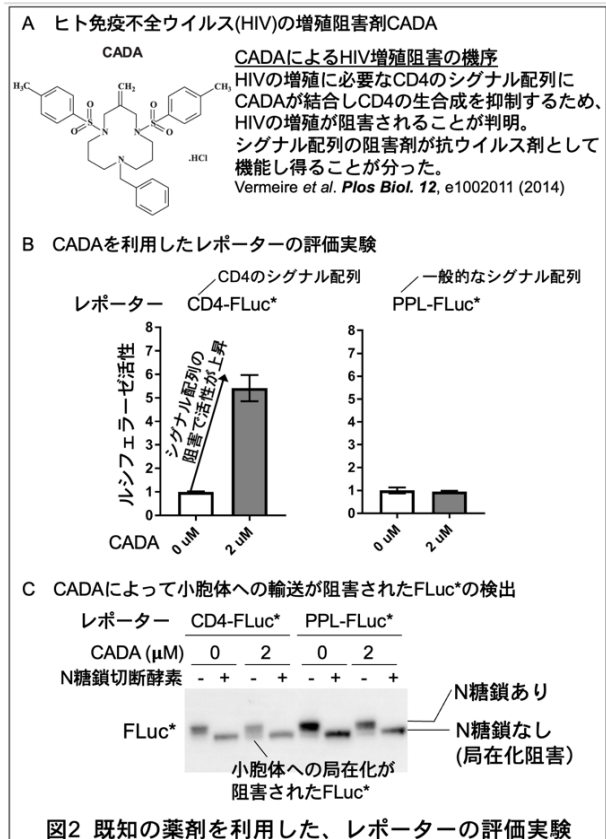
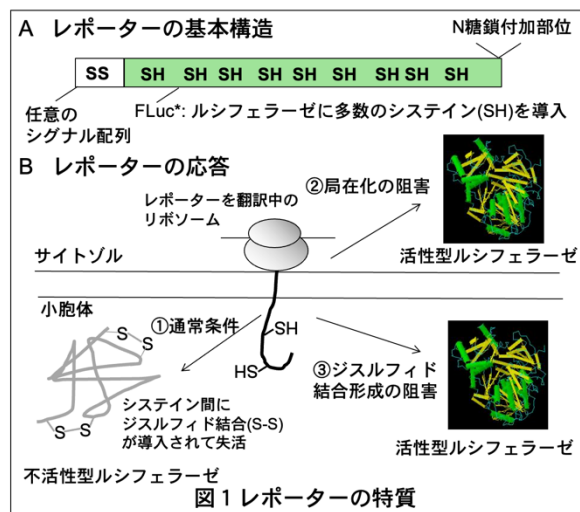
3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼ活性の上昇を利用した 1 次探索

研究代表者らは、蛍光ルシフェラーゼに多数のシステインを導入して作った FLuc* に、シグナル配列を付与したレポーターを作成した (図 1A)。シグナル配列を付与した FLuc* は、通常条件下小胞体に輸送されジスルフィド結合が導入されるため失活する (図 1B 左下①) が、局在化が阻害されるとサイトゾルで正しく折り畳まれて活性化する (図 1B 右上②)。よって、多数の化合物の効果を迅速に調べる必要がある 1 次探索では活性測定が容易なルシフェラーゼの活性上昇を指標に、IL6R あるいは PD-1 のシグナル配列を阻害する化合物を探索する。

(2) 2 次探索

上記の探索では、ジスルフィド結合形成を阻害する薬剤 (図 1B③) やタンパク質を小胞体へ輸送する装置の機能を阻害



する薬剤など、目的外の化合物も取れてくると予想される。よって、その中から特定のシグナル配列に対する阻害剤を探すためには、別のシグナル配列を付与した **FLuc***を用いた場合にはルシフェラーゼ活性の上昇が見られないことを確認する。もしくは、小胞体への局在化が阻害された場合には、小胞体内でおこる **N**糖鎖付加も阻害されるため、その分だけ（約 **5 kDa**）目的のシグナル配列を付与した **FLuc***の分子量だけが、低下することを利用する（図 **2 C: CD4** と **PPL** の比較実験を参照）。

以上の探索では、理化学研究所の天然化合物ライブラリー(**NPDepo**)のうち、高活性標準化合物ライブラリーで探索しヒット化合物を得た後、構造活性相関情報と活性向上に実績のある類縁化合物ライブラリーの探索を行うこととした。

なお、先述したように、本レポーターは、研究代表者らが独自に開発したもので、これまでに探索実験に使われた実績がない。そこで、探索系に問題点が見つかった場合には、内容を精査し、本レポーターを利用した実験系の改善に役立てることにした。

4. 研究成果

(1)がん細胞に対する免疫寛容の原因になる **PD-1** を標的とした薬剤の探索

PD-1 はがん細胞に対する免疫寛容の原因になるヒト細胞表層タンパク質である。まず、研究代表者らが開発した **FLuc***に **PD-1** のシグナル配列を付加したレポーターを作成した。本レポーターを使って、目的の薬剤を探索するためには、**PD-1** のシグナル配列によって **FLuc***が小胞体内に送り込まれ、ジスルフィド結合が分子内に導入されることによって **FLuc***が失活することが必要である。下記(2)で詳述した方法で解析したところ **PD-1** のシグナル配列は、**FLuc***を効率よく小胞体に輸送できないことが判明した。そこで、以後の探索研究は **IL6R** を対象に行うことにした。

(2)自己免疫疾患の原因となる **IL6R** を標的とした薬剤の探索

IL6R は自己免疫疾患の原因となるヒト細胞表層タンパク質である。**IL6R** を標的とした化合物を探索するために、**FLuc***に **IL6R** のシグナル配列を付加したレポーターを作成した後、様々な角度から検討をおこなった。先述したように、本レポーターを使って、目的の薬剤を探索するためには、**IL6R** のシグナル配列の働きにより **FLuc***が小胞体内に送り込まれ、ジスルフィド結合が分子内に導入されることによって **FLuc***が失活することが必要である。レポーターを発現する **HeLa** 細胞を還元剤存在下培養するとルシフェラーゼ活性は著しく上昇した。よって、**IL6R** のシグナル配列が効率よく機能していること判断した。阻害剤のライブラリーは貴重であり、探索は小さなスケールで行う必要があるが、実験のスケールを小さくするとデータのばらつきが大きくなる傾向がみられた。そこで、培養条件を最適化後、理化学研究所の高活性標準化合物ライブラリーで1次探索を行った。その結果、ルシフェラーゼ活性を再現性良く上昇させる化合物を2種類得ることに成功した。さて、1次探索では、ジスルフィド結合形成を阻害する薬剤やタンパク質を小胞体へ輸送する装置の機能を阻害する薬剤など、目的外の化合物も取れてくる。その中から特定のシグナル配列に対する阻害剤を探すためには、**IL6R** 以外のシグナル配列を付与したレポーターに対する化合物の影響をしらべた。その結果、1次探索の結果得られた化合物の存在下、他のシグナル配列を付与したレポーターでもルシフェラーゼ活性が上昇した。よって、得られた化合物は **IL6R** のシグナル配列の特異的ではないこと、即ち、目的の化合物ではなことが判明した。

(3)大規模探索に向けた実験系の改善

標的タンパク質のシグナル配列に結合することによって、標的タンパク質の生合成を特異的に阻害する化合物を得ることを目的に探索実験を進めたが、1次探索で得られた

複数のヒット化合物は、いずれも最終的には目的の化合物でないことが判明した。よって目的の化合物を得るためにはより大規模な探索が必要なが分かった。しかし、実際の探索ではレポーターの応答が予想外に小さく、化合物の絞り込みには複数回のアッセイが必要になった。レポーターの応答が小さくなる原因を探るため、細胞内で作られたレポータータンパク質を抗体を使って検出したところ、作られたルシフェラーゼの一部はサイトゾルに局在化していることが分かった。サイトゾルではレポータータンパク質にジスルフィド結合が導入されないため、ルシフェラーゼは正しく折り畳まれて活性化する。よって、小胞体内に局在化しなかったルシフェラーゼの存在は、レポーターの感度を低下させる。そこで、系の改善に向けた検討をおこなったところ、**ルシフェラーゼに連結する分泌タンパク質の N 末端配列(シグナル配列を含む)を長くすることによってレポーターの小胞体への局在化効率が上昇し、レポーターの感度が大きく改善することが判明した。**これは大規模な探索に向けて大きな進展である。

(4) レポーターの特質の解析

1 次探索で得られた複数の化合物がいずれも目的の化合物でなかったことから、レポーターがどのような細胞内環境の変化に応答しやすいのかという点も含めて、レポーターの特質をより深く理解することが効率良い探索実験に必要であることが判明した。

そこで、まず、本レポーターは、小胞体の酸化的環境の維持に重要な **Ero1 α** の活性変化に応答するかを検証した。**Ero1 α** は、ジスルフィド結合形成に必要な酸化力を、**PDI**と呼ばれるジスルフィド結合導入酵素に供給する。この過程を薬剤で阻害したところ、ルシフェラーゼ活性は有意に上昇した。逆に、恒常的に高い活性を示す **Ero1 α** の変異体を発現させたところルシフェラーゼ活性が有意に低下した。このことから、**本レポーターは小胞体内の酸化還元バランスの変化に鋭敏に応答することが判明した。**

更に、本レポーターを具体的な分子機能が分かっていない小胞体膜タンパク質の解析に利用した。**LMF1**は、小胞体に局在する膜タンパク質で、分子内に多数のシステインを持つ(図3A)。このタンパク質上に変異が生じると脂質異常症の一つである高トリグリセリド血症を発症する原因になることから、本タンパク質の分子機能を理解することは重要である。最近、**LMF1**は、

Lipoprotein lipaseと呼ばれる分泌タンパク質に間違って形成されたジスルフィド結合の修復に必要であることから、そのために必要な還元力を何らかの仕組みによって小胞体に供給する働きがあるのではないかとモデルが提出された(図3B)。しかし、その具体的な分子機能は不明である。また、報告が1報しかなく、内容の真偽も不明である。そこで、本レポーターを利用して、このモデルを検証することにした。もし、このモデルが正しい場合には、**LMF1**の過剰発現によって、より多く

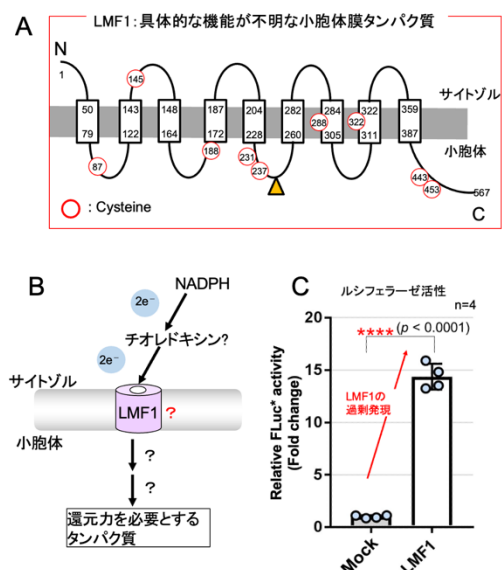


図3 レポーターを用いた、小胞体膜タンパク質の機能解析

の電子が小胞体内に供給される結果、ルシフェラーゼに導入されたジスルフィド結合が切断され、ルシフェラーゼ活性が上昇すると予想される。実際に、LMF 1 を過剰発現すると、ルシフェラーゼ活性が大きく上昇した。更に、LMF1 の過剰発現によってルシフェラーゼが還元型に変わることも判明した。よって、**LMF1 は小胞体内のタンパク質の還元に関わる**ことが強く示唆された。現在、これらの内容も含めて、本研究から得られた知見を論文にまとめている。

以上の知見は、大規模な探索を行う上で基礎になる重要な情報であり、今後の探索の効率化に役立てていく予定である。

更に、上記の実験を遂行するためには、小胞体内でタンパク質が生合成される仕組みを熟知している必要がある。この点に関する知見の一部をまとめ「生物と化学」誌で発表した。また、本研究の内容の一部を「日本応用酵素協会誌」で紹介した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 門倉 広	4. 巻 60
2. 論文標題 ヒト細胞内で翻訳途上のタンパク質にジスルフィド結合が形成される仕組み：タンパク質立体構造形成の新規メカニズムを発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 557-559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.60.557	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 門倉 広	4. 巻 57
2. 論文標題 ルシフェラーゼの改変体を利用した小胞体機能の解析と有用化合物の探索	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本応用酵素協会誌 2022	6. 最初と最後の頁 49-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 門倉 広	4. 巻 58
2. 論文標題 哺乳動物細胞PDIファミリー酵素の生理的な基質の同定：ヒト由来分泌タンパク質の効率良い生産系の開発にむけて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 441-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.58.441	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門倉 広
2. 発表標題 ヒトPDIファミリー酵素によって触媒される タンパク質のジスルフィド結合形成機構
3. 学会等名 第23回酵素応用シンポジウム 研究奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佃 竜介, 原田 楠子, 平井 直也, 東 晃太, 小林 大樹, 松本 雅記, 稲葉 謙次
2. 発表標題 ヒト小胞体膜タンパク質LMF1による膜を介した電子移動メカニズムの解析
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門倉 広
2. 発表標題 ヒト細胞の小胞体中における タンパク質の折り畳みを促進する仕組みの解析
3. 学会等名 第78回 東京工業大学細胞制御工学研究センターコロキウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田楠子, 八巻 聡, 平井直也, 中村大祐, 河野憲二, 稲葉謙次, 門倉 広
2. 発表標題 ヒト細胞小胞体関連機能の変化を検出するための鋭敏で簡便なレポーターの開発と機能評価
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(横浜、2021年12月2日)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門倉 広
2. 発表標題 ジスルフィド結合が形成される仕組み：独自のアプローチで迫る、ヒト分泌タンパク質の生細胞内における立体構造形成機構
3. 学会等名 第5回 有機・生命・計測科学研究交流セミナー
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院生命科学研究科/研究/研究者紹介/門倉 広
<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail---id-19734.html>

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
---------	---------