

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390031

研究課題名（和文） 触媒的タンパク質機能欠失法の開拓

研究課題名（英文） Development of methodologies for catalytic decomposition of proteins

研究代表者

大高 章 (OTAKA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスパイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20201973

研究成果の概要（和文）：生命現象の理解や創薬において、タンパク質機能の解明は必要不可欠な検討事項である。本研究では、特定タンパク質の選択的かつ触媒的分解を通じた新規タンパク質機能欠失法の開拓を研究目的とした。我々はペプチドの創薬展開を目指した研究の一環として、外部刺激応答型ペプチド機能変換法の開発、ペプチドミメティックの合成研究、ホスファターゼ抵抗性リン酸化ペプチドの創製研究に携わってきた。これら従来の研究を基盤として、タンパク質分解に必要なデグロン分子の合成を行った。さらに、標的タンパク質分子を釣り上げるために必要な釣竿分子のデザイン合成を行うとともに、新奇リガンド依存型タンパク質ラベル化試薬の開発を行った。

研究成果の概要（英文）： Analysis of protein functions has been indispensable for disclose of unknown cellular phenomena and drug development. Our purpose in this research is the development of methodologies for catalytic decomposition of proteins, which leads to the uncovering protein functions. We have developed a wide variety of chemical devise for elucidation of peptides- and proteins-associated events, including stimulus-responsive amino acids, peptide mimetics, and nonhydrolyzable phosphoamino acids. On the basis of these researches, we have developed several chemical means for the catalytic protein decomposition.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 5,700,000 | 1,710,000 | 7,410,000 |
| 2010 年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 2011 年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：ペプチド、ペプチドミメティック、外部刺激応答型アミノ酸、ペプチド結合切断、標的タンパク質、ホスファターゼ抵抗性リン酸化アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

タンパク質機能解明に向けた方策として、問題としているタンパク質の機能を欠失させ、これに伴う細胞などの表現型解析を通して、タンパク質の機能を解明する方法論がある。

このタンパク質機能欠失法は、3 種に分類できる。すなわち、タンパク質の存在を、DNA レベルで無くしてしまう手法、ここでは Knockout mice 法、Tissue-specific gene deletion 法などが利用されている。mRNA 分解により

タンパク質の存在を消す手法が第2番目に挙げられ、RNAiが利用されている。3番目として、タンパク質を機能不全に陥らせる手法があり、もっぱらある特定タンパク質に結合する阻害剤のような低分子有機化合物が利用されている。しかし、いずれの方法にも長所、短所があり、第4番目の新たな方法論の開発が望まれている。ここで期待されているのは、特定タンパク質の選択的な分解によるタンパク質機能欠失であるが、未だ研究例は少ないのが現状であった。

2. 研究の目的

生命現象の理解や創薬において、タンパク質機能の解明は必要不可欠な検討事項である。本研究（触媒的タンパク質機能欠失法の開拓）では、タンパク質機能解明に役立てるため、特定タンパク質の選択的かつ触媒的分解を通じた新規タンパク質機能欠失法の開拓を研究目的とした。すなわち、我々のペプチドの創薬展開を目指した研究の一環である外部刺激応答型ペプチド機能変換法の開発、ペプチドミメティックの合成研究、ホスファターゼ抵抗性リン酸化ペプチドの創製研究を基盤技術とし、タンパク質機能解明のためのタンパク質分解法の確立が可能と考えた。すなわち、タンパク質分解には細胞内に存在するプロテアソーム分解系を利用し、このプロテアソーム系に標的タンパク質を運搬するタグ分子の創製を通じて目的を達成する計画を立てた。タグ分子候補として、10アミノ酸残基程度からなるpSer/pThr（リン酸化セリン、スレオニン）を含有するホスホデグロンと呼ばれる配列を利用することとした。これは、ユビキチン(Ub)化酵素複合体認識配列であり、Ser/Thr残基がリン酸化されることにより、この配列を有するタンパク質は、ユビキチン(Ub)化を受けた後、プロテアソーム分解系に運ばれ、分解を受ける。したがって、この天然ホスホデグロン配列に標的タンパク質相互作用部位を結合させた分子は、標的タンパク質のUb化を促し、分解を誘起するタグ分子として機能する。しかし、ここで大きな問題がある。すなわち、天然ホスホデグロン配列自身がプロテアソーム系で分解されてしまい、ホスホデグロン分子は、常に分解させたい標的タンパク質以上の量が必要となる点である。そこで、標的タンパク質捕捉能力を有する非分解性ホスホデグロン分子の創製が“触媒的タンパク質機能欠失法の開拓”に必須と考え、その合成と関連技術開発、さらには生物学的展開を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題「触媒的タンパク質機能欠失法の開拓」では、標的タンパク質捕捉能を持つ外部刺激による機能調節可能な非分解性ホ

スホデグロン分子の創製が不可欠である。そこで、次の諸点(①~③)から化合物創製について検討し、次いで活性評価(④)を行う計画を立てた。

- ① 非分解性ホスホデグロン分子とし、リン酸化アミノ酸部位にはホスファターゼ抵抗性リン酸化アミノ酸を、ペプチド結合部位はプロテアターゼ抵抗性ペプチドミメティックを利用し、ホスホデグロン分子に非分解性を付与する。
- ② 外部刺激応答性については、ホスファターゼ抵抗性リン酸化アミノ酸部位をゲージド化し、外部からの光照射に伴ったリン酸化部位の再生による活性型ホスホデグロンへの変換を行う。
- ③ エストロゲンレセプター(ER)をモデル標的タンパク質とし、ER結合性分子タモキシフェン誘導体を合成し、これと非分解性ホスホデグロン分子とのハイブリッド分子を創製する。
- ④ ERは、転写因子として核内で作用する。そこで活性評価はER応答性レポーター遺伝子を利用することで、レポーター遺伝子の発現量低下を指標に評価する。また、上記の研究計画と並行して、本研究遂行中に刺激応答型アミノ酸およびチオエステル合成法に関する化学より、本研究推進に有用な方法論の着想を得た。そこで、⑤として、標的タンパク質探索分子の創製を研究課題に加えた。

4. 研究成果

研究期間内に、「2. 研究の目的」に示す①~③および⑤に成功した。以上の結果を基に現在、「④：活性評価モデル実験」について検討するとともに、これら成果をまとめた論文の投稿準備を進めているところである。なお成果の詳細については、「5. 主な発表論文等」をご覧ください。

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30件)

1. Ogura, K.; Shigenaga, A.; Ebisuno, K.; Hirakawa, H.; Otaka, A. “Fmoc-based solid phase synthesis of adenylylated peptides using diester-type adenylylated amino acid derivatives” *Tetrahedron Lett.* in press (doi: 10.1016/j.tetlet.2012.04.063) (査読有)。
2. Shigenaga, A.; Ogura, K.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ebisuno, K.; Miyamoto, L.; Ishizawa, K.; Tsuchiya, K.; Otaka, A. “Development of a reduction-responsive amino acid that induces peptide bond cleavage in hypoxic cells” *ChemBioChem*

- 2012, 13, 968-971 (doi:10.1002/cbic.201200141) (査読有).
3. Shigenaga, A.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ogura, K.; Denda, M.; Yamaguchi, K.; Otaka, A. "Caged ceramide which releases parent ceramide after UV-induced amide bond cleavage followed by intramolecular O-N acyl transfer" *Peptide Science 2011* **2012**, 385-386 (査読有).
 4. Ding, H.; Sato, K.; Morishita, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Double-kinetically controlled proline ligation" *Peptide Science 2011* **2012**, 133-134 (査読有).
 5. Sato, K.; Tsuda, S.; Sakamoto, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "N-Sulfanylethyl-anilide peptide: a peptide thioester equivalent which can directly participate in native chemical ligation" *Peptide Science 2011* **2012**, 13-14 (査読有).
 6. Shigenaga, A.; Morishita, K.; Yamaguchi, K.; Ding, H.; Ebisuno, K.; Sato, K.; Yamamoto, J.; Akaji, K.; Otaka, A. "Development of UV-responsive catch-and-release system of a cysteine protease model peptide" *Tetrahedron* **2011**, 67, 8879-8886 (doi:10.1016/j.tet.2011.09.062) (査読有).
 7. Shigenaga, A.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ogura, K.; Denda, M.; Yamaguchi, K.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. "Design and synthesis of caged ceramide: UV-responsive ceramide releasing system based on UV-induced amide bond cleavage followed by O-N acyl transfer" *Tetrahedron* **2011**, 67, 3984-3990 (doi:10.1016/j.tet.2011.04.048) (査読有).
 8. Ding, H.; Shigenaga, A.; Sato, K.; Morishita, K.; Otaka, A. "Dual kinetically-controlled native chemical ligation using a combination of sulfanylproline and sulfanylethyl-anilide peptide" *Org. Lett.* **2011**, 13, 5588-5591 (doi:10.1021/ol202316v) (査読有).
 9. Sato, K.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Tsuda, S.; Sumikawa, Y.; Sakamoto, K.; Otaka, A. "N-Sulfanylethyl-anilide peptide as a crypto-thioester peptide" *ChemBioChem* **2011**, 12, 1840-1844 (doi:10.1002/cbic.201100241) (査読有).
 10. Tsuji, K.; Shigenaga, A.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Sato, K.; Aihara, K.; Hara, T.; Otaka, A. "Application of N-C- or C-N-directed sequential native chemical ligation to the preparation of CXCL14 analogs and their biological evaluation" *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 4014-4020 (doi:10.1016/j.bmc.2011.05.018) (査読有).
 11. Sato, K.; Tsuda, S.; Tsuji, K.; Sakamoto, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "N-Sulfanylethyl-anilide derivative as a peptide thioester equivalent" *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium* **2011**, 72-73 (査読有).
 12. Tsuji, K.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Shigenaga, A.; Hara, T.; Otaka, A. "Synthesis of CXCL14 and its derivatives utilizing C to N or N to C directive sequential NCL protocol" *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium* **2011**, 74-75 (査読有).
 13. Otaka, A.; Shigenaga, A. "Development of amide bond cleavage device with application to chemical biology use" *Peptide Science 2010* **2011**, 49 (査読有).
 14. Tsuji, K.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Shigenaga, A.; Hara, T.; Otaka, A. "Synthesis and biological evaluation of CXCL14 and its derivatives" *Peptide Science 2010* **2011**, 182 (査読有).
 15. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Nishioka, N.; Denda, M.; Otaka, A. "Enantioselective synthesis of stimulus-responsive amino acid via pyrrolidinyl tetrazole catalyzed asymmetric α -amination of aldehyde" *Peptide Science 2010* **2011**, 202 (査読有).
 16. Sato, K.; Tsuda, S.; Maeda, N.; Denda, M.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Native chemical ligation using N-peptidyl anilide as crypto-thioester" *Peptide Science 2010* **2011**, 203 (査読有).
 17. Ogura, K.; Hirakawa, H.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Synthesis of nonhydrolyzable AMPylated amino acid analogues for uncovering the physiological role of AMPylation" *Peptide Science 2010* **2011**, 205 (査読有).
 18. Yamamoto, J.; Maeda, N.; Denda, M.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Development of recapturable cleavable linker for efficient enrichment and specific labeling of target proteins" *Peptide Science 2010* **2011**, 232 (査読有).
 19. Morishita, K.; Yamaguchi, K.; Ding, H.; Shigenaga, A.; Akaji, K.; Otaka, A. "Development of stimulus responsive thiol releasing system for controlling activity of cysteine protease" *Peptide Science 2010* **2011**, 290 (査読有).
 20. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Nishioka, N.; Otaka, A. "Enantioselective synthesis of stimulus-responsive amino acid via asymmetric α -amination of aldehyde" *Tetrahedron* **2010**, 66, 7367-7372 (doi:10.1016/j.tet.2010.07.033) (査読有).
 21. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Hirakawa,

- H.; Ogura, K.; Maeda, N.; Morishita, K.; Otaka, A. Development of thiol-responsive amide bond cleavage device and its application for peptide nucleic acid-based DNA releasing system. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2525-2528 (doi:10.1016/j.tetlet.2010.03.006) (査読有).
22. Shigenaga, A.; Sumikawa, Y.; Tsuda, S.; Sato, K.; Otaka, A. Sequential native chemical ligation utilizing peptide thioacids derived from newly developed Fmoc-based synthetic method. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3290-3296 (doi:10.1016/j.tet.2010.03.016) (査読有).
23. Shigenaga, A.; Sato, K.; Otaka, A. Recent Progress in the Synthetic Methodologies of Peptide Thioesters. *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan* **2010**, *68*, 911-919 (doi:10.5059/yukigoseikyokaishi.68.911) (査読有).
24. Nishikawa, Y.; Takahara, Y.; Asada, S.; Shigenaga, A.; Otaka, A.; Kitagawa, K.; Koide, T. A structure-activity relationship study elucidating the mechanism of sequence-specific collagen recognition by the chaperone HSP47. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3767-3775 (doi:10.1016/j.bmc.2010.04.054) (査読有).
25. Fujimoto, Y.; Shiraki, T.; Horiuchi, Y.; Waku, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A.; Ikura, T.; Igarashi, K.; Aimoto, S.; Tate, S.; Morikawa, K. Proline cis/trans-Isomerase Pin1 Regulates Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Activity through the Direct Binding to the Activation Function-1 Domain. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3126-3132 (doi:10.1074/jbc.M109.055095) (査読有).
26. Yun, S. M.; Moulaei, T.; Lim, D.; Bang, J. K.; Park, J. E.; Shenoy, S. R.; Liu, F.; Kang, Y. H.; Liao, C. Z.; Soung, N. K.; Lee, S.; Yoon, D. Y.; Lim, Y.; Lee, D. H.; Otaka, A.; Appella, E.; McMahon, J. B.; Nicklaus, M. C.; Burke, T. R.; Yaffe, M. B.; Wlodawer, A.; Lee, K. S. Structural and functional analyses of minimal phosphopeptides targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1. *Nature Structural & Molecular Biology* **2009**, *16*, 876-882 (doi:10.1038/nsmb.1628) (査読有).
27. Yamaki, Y.; Shigenaga, A.; Tomita, K.; Narumi, T.; Fujii, N.; Otaka, A. Synthesis of Fluoroalkene Dipeptide Isosteres by an Intramolecular Redox Reaction Utilizing N-Heterocyclic Carbenes (NHCs). *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3272-3277 (doi:10.1021/jo900134k) (査読有).
28. Yamaki, Y.; Shigenaga, A.; Li, J. L.; Shimohigashi, Y.; Otaka, A. Synthesis of Amide-Type Fluoroalkene Dipeptide Isosteres by an Intramolecular Redox Reaction. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3278-3285 (doi:10.1021/jo900135t) (査読有).
29. Tsuda, S.; Shigenaga, A.; Bando, K.; Otaka, A. N -> S Acyl-Transfer-Mediated Synthesis of Peptide Thioesters Using Anilide Derivatives. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 823-826 (doi:10.1021/ol8028093) (査読有).
30. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Hirakawa, H.; Yamaguchi, K.; Otaka, A. FRET-based assay of the processing reaction kinetics of stimulus-responsive peptides: influence of amino acid sequence on reaction kinetics. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2212-2216 (doi:10.1016/j.tet.2009.01.013) (査読有).

[学会発表] (計 62 件)

1. Otaka, A. N-Sulfanylethylanilides as a Versatile Chemical Device for the Protein Chemistry. 2012 SNU symposium on Medicinal Chemistry, Seoul, Korea 2012 年 5 月 14 日
2. Otaka, A.; Shigenaga, A. Development of amide bond cleavage device with application to chemical biology use. 5th International Peptide Symposium in conjunction with 47th Japanese Peptide Symposium, Kyoto, Japan 2010 年 12 月 5 日

[図書] (計 2 件)

1. 重永 章、山本 純、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への応用」遺伝子医学 MOOK 21 号 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 (木曾良明 編)、メディカルドゥ、168-172、**2012**.
2. 大高 章、重永 章「第 10 章 最近のペプチド・タンパク質の化学合成について」機能性タンパク質・ペプチドの生体利用 (岡達三、二川健、奥恒行 編)、建帛社、205-231、**2010**.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/otaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大高 章 (OTAKA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：20201973

(2) 研究分担者

重永 章 (SHIGENAGA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：10423394