

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02077

研究課題名(和文)天然変性たんぱく質を対象とする変調剤の創出と動植物細胞における制御

研究課題名(英文)Chemical regulation of intrinsically disordered proteins in animal and plant cells

研究代表者

大神田 淳子 (Ohkanda, Junko)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：50233052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：生理条件下において一定の構造を持たない天然変性たんぱく質(IDP)は、生体反応の担い手として極めて重要であり、種々の疾患に関わることから新たな創薬標的として注目されているが、実験的な困難さから合理的なIDP創薬戦略は存在しない。本研究では、親電子反応性ライブラリを調製し、概日時計転写因子BMAL1ならびにCLOCKの相互作用を有意に阻害する化合物を同定した。また、リン酸化IDPの制御蛋白質14-3-3に着目し、特定のシステイン残基に反応する14-3-3シグマ選択的な蛍光標識剤を創出した。さらに、植物孔辺細胞中のIDP相互作用を安定化させる化合物を用いて植物成長を促進させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然変性蛋白質(IDP)についてはその生物学的役割の重要性と多様な疾患との関りが明らかにされつつある一方で、構造情報が欠けまた実験的な扱いが難しいことから従来の創薬技術が適用できない創薬困難な標的として知られる。本研究の成果は、IDPの制御においては共有結合反応性の不可逆的阻害剤の有効性を示した点、IDPの制御因子側に着目した化学戦略によりIDP選択的な化学制御の可能性を示唆した点、さらに植物体内のIDP相互作用の安定化により個体成長を促進可能であることを証明した点において、創薬及び農学の見地から学術的意義および社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Naturally denatured proteins (IDPs), which do not have a fixed structure under physiological conditions, are extremely important players in biological reactions and have attracted attention as new drug targets because of their involvement in various diseases. However, there is no rational IDP drug discovery strategy due to experimental difficulties. In this study, we prepared a library of electrophilic small molecules and identified compounds that significantly inhibit the interaction between the circadian clock transcription factor BMAL1 and CLOCK. We also focused on 14-3-3, a regulatory protein of phosphorylated IDPs, and succeeded in creating 14-3-3 sigma-selective fluorescent labeling agents that react with specific cysteine residues. We also succeeded in promoting plant growth with a compound that stabilizes the 14-3-3/IDP interaction in plant guard cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：天然変性蛋白質 蛋白質間相互作用 リン酸化翻訳後修飾 概日時計転写因子 フシコクシン 不可逆的阻害剤 植物成長促進剤

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生理条件下において一定の構造を持たない天然変性たんぱく質(もしくは領域; 本報告書では IDP と総称する) は、真核生物の全たんぱく質配列のおよそ 40% を占め、総たんぱく質間相互作用(PPI) の約 50% に関与すると考えられ、翻訳後修飾や生体分子との相互作用を介して短寿命の過渡的な立体構造に遷移する。このように細胞内環境に応じて多様な構造変化を遂げる IDP は、生体反応の担い手として極めて重要であり、その分子機序の解明は生物の恒常性やストレス応答などの過渡的な生命現象を理解するうえで不可欠である。

(2) 近年の研究により、IDP の発現量や翻訳後修飾が異常をきたすと、神経変性疾患などの病気の原因となることが明らかにされつつあることから、特定の IDP を調節しうる有機化合物の開発が、研究ツールとしてのみならず新しい医療への突破口を拓く礎として期待されている。ところが IDP の構造変化には、弱い相互作用や翻訳後修飾に加え過渡的な集合体形成など複雑な要素が絡む。また、組換え IDP の取り扱いの難しさなど、現在の実験技術では対処困難な多くの課題があるため、合理的な IDP 創薬戦略は現在までに全く存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、特定の IDP の相互作用を制御するための阻害剤の創出と、細胞内の IDP 相互作用の化学操作による植物の成長促進効果の検証を目指し、概日時計転写因子に対する共有結合阻害剤の探索、リン酸化 IDP の制御蛋白質 14-3-3 のアイソフォーム選択的な化学操作を志向した 14-3-3 シグマ蛍光標識剤の創出、天然有機化合物による孔辺細胞中の 14-3-3 とリン酸化 IDP の相互作用の安定化と植物成長促進活性の検証、を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 芳香族系アクリルアミドおよびクロロアセチル誘導体から構成される親電子反応性化合物ライブラリを合成し、先行研究で確立した蛍光偏光変化を指標とする概日時計転写因子 BMAL1 と CLOCK のヘテロ 2 量体形成評価系を用いて阻害活性を評価した。活性を示した化合物について、エルマン試薬を用いてチオールとの 2 次反応速度定数を計測し、ヘテロ二量体形成に対する阻害活性とチオールとの反応性との相関関係を検証した。

(2) 14-3-3 σ アイソフォームの Cys38 との共有結合反応を期待して、ジテルペン配糖体天然物フシコクシン(FC)の糖鎖にアクリルアミドと蛍光基を導入した誘導体を設計した。化合物は、FC 生産菌の生産培養から得た天然物の半合成構造変換により調製した。合成した化合物は、種々のリン酸化 14-3-3 結合ペプチドの存在下で 14-3-3 σ との共有結合形成反応効率を蛍光グレイミングにより評価した。

(3) 遺伝子組換え植物 14-3-3 を用いた生化学実験、シロイヌナズナを用いた植物生理学実験により、気孔開口度、光合成活性、孔辺細胞中の 14-3-3/細胞膜プロトンポンプとの相互作用に与える FC の効果を定量的に評価した。また、シロイヌナズナの水分減少量や気孔開度に与える FC の効果の経時変化を検証し、FC の効果が永続的かもしくは一過的なものであるかについて考察した。さらに、FC の長期的投与によるシロイヌナズナやコマツナ、レタスなどの栽培作物の成長に与える効果を定量的に検証した。

4. 研究成果

(1) 合成した親電子反応性ライブラリの阻害試験の結果、5-ピストリフルオロメチルアニリンのクロロアセトアミド誘導体(15)が BMAL1/CLOCK の二量体形成を濃度依存的に阻害することが判った(図 1)。また 15 の阻害活性は、蛋白質の求核性アミノ酸側鎖を予め薬剤処理でマスクしておくことと完全に消失したことから、15 とシステイン等の残基との共有結合反応が進行することが強く示唆された。一方、15 の構造類縁体であるパラトリフルオロメチルアニリン誘導体(20)は不活性だったが、チオールに対する 15 と 20 の反応速度定数 k はほぼ同程度であった(15: $4.6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, 20: $4.5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)。この結果は、15 が何らかの構造依存的な作用機序を有することを示唆している。計算科学的な考察から、BMAL1 の PASB に 2 量体形成時に過渡的に生じる疎水性ポケット内の 373Cys と 15 が反応する作用機序が示唆された[1]。本研究の成果は、IDP の過渡的な構造特性を認識する共有結合性阻害剤の可能性を示していると考えられる。

(2) FC-J のグルコース 6' 位ヒドロ基を選択的にアミノ基へ官能基変換し、側鎖に蛍光色素とアクリルアミドを導入したリシン誘導体との縮合反応により目的化合物を合成した。化合物は、リン酸化ペプチド共存下で遺伝子組換え 14-3-3 σ を蛍光標識し、この標識反応は Cys38 を持たない 14-3-3 ζ と比べて高選択的に進行することが明らかになった(図 2)。また、化合物による蛍光標識化はリン酸化配列 $i+1$ 位の残基に高く依存することが判り、生細胞中でのリン酸化リガ

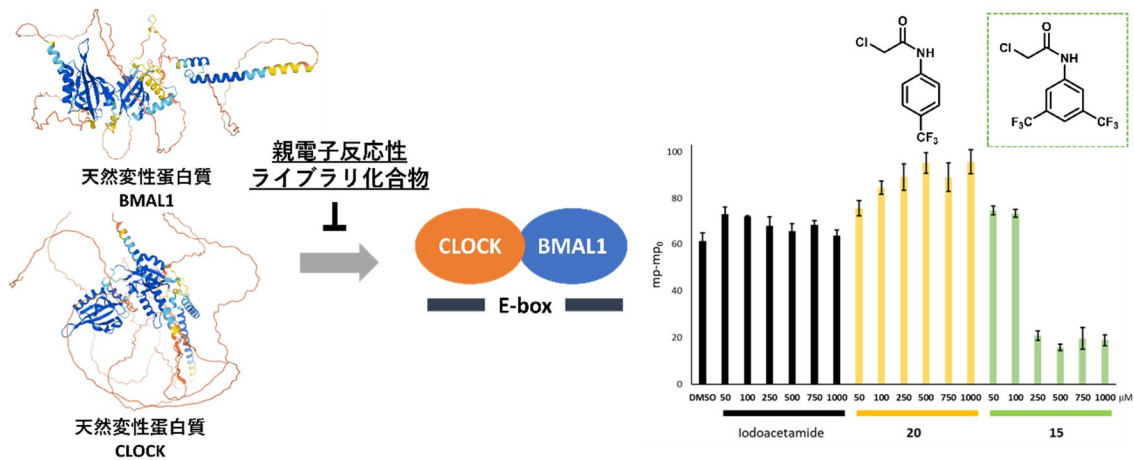


図1. 天然変性概日時計転写因子 BMAL1/CLOCK の相互作用を阻害するクロロアセチルアミド含有化合物の同定[1]

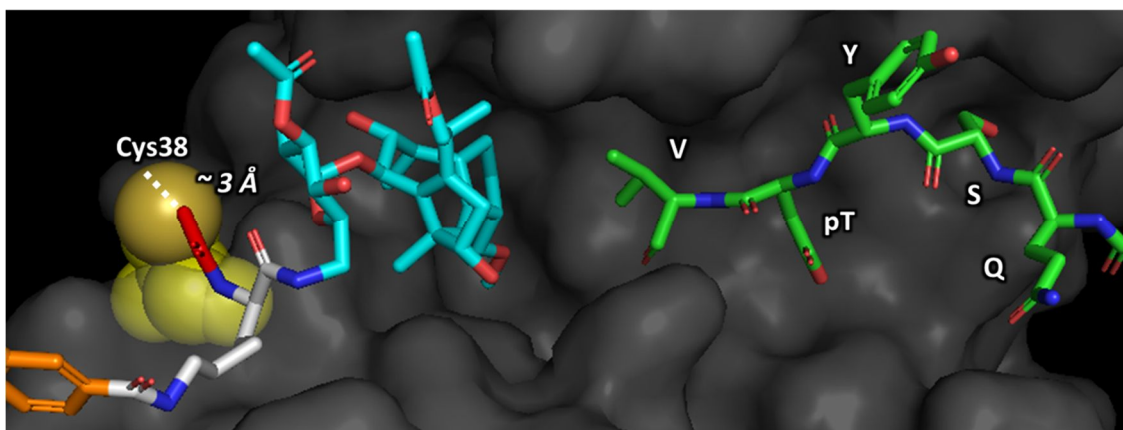


図2. 3者会合体依存的に 14-3-3 Cys38 に共有結合する蛍光標識剤の創出[2]

ンド選択的な 14-3-3σの検出が可能であることが示唆された。さらに HEK293T 細胞の溶解物を用いた実験から、化合物は夾雑環境下であっても 14-3-3 σ優先的な蛍光標識能を維持することが明らかとなった。本研究の成果は、細胞内の 14-3-3 アイソフォーム選択的な化学調節の可能性を示唆した意義を評価され、欧文雑誌の Hot Paper としてハイライトされた[2]。

(3) 天然型 FC-A と FC-A の生合成中間体 FC-J は、顕著な気孔開口促進効果を示し、一方、14-3-3 への結合力が劣る FC-H ではその活性が低下した。これらの結果から、FC 類縁体のプロトンポンプと 14-3-3 の PPI 安定化度に依存して気孔開口を促進することが示された。また、シロイヌナズナの葉に FC-A を塗布することにより、二酸化炭素吸収量と光合成活性が有意に亢進することが判った。実際、シロイヌナズナに各 FC 類縁体を長期間投与したところ、FC-A と FC-J の試験区では植物体の重量増加が確認された一方で、FC-H では効果が見られなかった。これらの結果は、FC 類縁体が気孔開口促進と PPI 安定化効果に相関して重量増加を亢進していることを示している。また、葉の重量変化、気孔開度、およびプロトンポンプのリン酸化に対する化合物の効果の経時変化から、FC-A の活性が永続的であると従来説に反して一過的であることが初めて明らかにされた。以上の結果から、FC の毒の通説と相反する新たな気孔開口による植物成長促進という新たな活性を見出した。真菌のバイオ生産により大量取得可能な FC は、食糧生産効率を改善する植物成長促進剤として農業利用が期待できる[3]。

<引用文献>

- [1] J. Ohkanda et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. **2024**, 98.
- [2] J. Ohkanda et al., Chem. Eur. J. **2023**, e20231059 (Hot Paper).
- [3] J. Ohkanda et al., JP Patent 2022-132203.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuya Yamanaka, Yoshihisa Inoue, Miki Imanishi, Junko Ohkanda	4. 巻 98
2. 論文標題 Functional evaluation of an electrophilic focused library to identify a covalent inhibitor against intrinsically disordered circadian clock transcription factors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 129588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2023.129588	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 Kenta Tanaka, Yoshiya Hatano, Junko Ohkanda	4. 巻 -
2. 論文標題 Isoform-selective fluorescent labeling of 14-3-sigma by acrylamide-containing fusicoccins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 e202301059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.202301059	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 Nanami Ogino, Ryoma Masuda, Louvy Lynn Punzalan, Emi Yamashita, Shota Igaue, Yoshihisa Inoue, Junko Ohkanda	4. 巻 73
2. 論文標題 Structure-activity-relationship study of semi-synthetically modified fusicoccins on their stabilization effect for 14-3-3-phospholigand interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2022.117020	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 Ninako Kimura, Kanako Saito, Takashi Niwa, Masato Yamakawa, Shota Igaue, Junko Ohkanda, Takamitsu Hosoya, Isao Kii	4. 巻 195-196
2. 論文標題 Expression and purification of DYRK1A kinase domain in complex with its folding intermediate-selective inhibitor FINDY	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2022.106089	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 Yosei Nagaoka, Prakash Parvatkar, Go Hirai, Junko Ohkanda	4. 巻 48
2. 論文標題 Design, synthesis, and in vitro evaluation of triazine-based bivalent agents that simultaneously targeting active site and hot spot of phosphatase Cdc25B	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.128265.	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 Yusuke Hosoya, Junko Ohkanda	4. 巻 26
2. 論文標題 Intrinsically disordered proteins as regulators of transient biological processes and as untapped drug targets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26082118	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 Junko Ohkanda	4. 巻 50
2. 論文標題 Fusicoccin: A Chemical modulator for 14-3-3 proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 57-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200670	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 -

〔学会発表〕 計29件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 荻野菜々美、大神田淳子
2. 発表標題 抗がん活性ジテルペン配糖体はリン酸化依存的な天然変性蛋白質間相互作用を安定化する
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山中和也、大神田淳子
2. 発表標題 親電子性低分子ライブラリによる天然変性概日時転写因子を標的としたコバレント阻害剤の探索
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大神田淳子
2. 発表標題 天然物による翻訳後修飾依存的な蛋白質間相互作用の操作
3. 学会等名 有機合成化学協会関西支部 2 月セミナー（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大神田淳子
2. 発表標題 過渡的蛋白質間相互作用を合成分子で操作する
3. 学会等名 第 23 回 フロンティア生命化学研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大神田淳子
2. 発表標題 天然植物毒によるリン酸化依存的な蛋白質間相互作用の操作
3. 学会等名 有機合成化学協会・ニューモダリティ研究部会勉強会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大神田淳子
2. 発表標題 過渡的蛋白質間相互作用の操作に向けた有機化学戦略
3. 学会等名 第2回分子生命反応創発討論会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大神田淳子
2. 発表標題 14-3-3と翻訳後リン酸化修飾が介在するたんぱく質間相互作用の解明に向けた分子戦略
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大神田 淳子、荻野 菜々美、増田 遼馬、伊賀上 祥汰、室井 誠、長田 裕之、松本 健、吉田 稔、喜井 勲
2. 発表標題 14-3-3 が介在するたんぱく質間相互作用は mRNA 翻訳抑制を調節する
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第16回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大神田淳子
2. 発表標題 Chemically “ Edited ” Phytotoxin Upregulates Translational Repression
3. 学会等名 The 19th Akabori Conference（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桐山寛生・大神田淳子
2. 発表標題 ジテルペン配糖体フシコクシンと14-3-3たんぱく質の直交性ペアの開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀内直己・大神田淳子
2. 発表標題 KRas超可変領域を模倣した中分子によるKRas脂質修飾の制御
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荻野 菜々美・室井 誠・長田 裕之・松本 健・吉田 稔・喜井 勲・大神田 淳子
2. 発表標題 Elucidation of the mRNA translational repression machinery by stabilizing 14-3-3-mediated protein-protein interactions
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中 和也・今西 未来・大神田 淳子
2. 発表標題 天然変性概日時計転写因子を標的とした親電子反応性コバレント阻害剤の創製と生物活性評価
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大神田 淳子
2. 発表標題 天然物によるタンパク質間相互作用の調整とmRNA翻訳抑制
3. 学会等名 大阪大学蛋白研セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junko Ohkanda
2. 発表標題 Fusicoccin:A tool for exploration of 14-3-3-mediated signaling pathways
3. 学会等名 ACBI 2023 Toba Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junko Ohkanda, Nanami Ogino, Ryoma Masuda, Shota Igaue, Makoto Muroi, Hiroyuki Osada, Ken Matsumoto, Minoru Yoshida, Isao Kii
2. 発表標題 Chemically modified phytotoxin enhances translational repression by stabilizing 14-3-3 interactions
3. 学会等名 ICBS2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大神田 淳子
2. 発表標題 フシコクシンによる14-3-3たんぱく質間相互作用の変調と医薬への応用
3. 学会等名 バイオメディカル研究所インタラクティブセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大神田 淳子
2. 発表標題 植物病原菌二次代謝産物は植物成長を促進する
3. 学会等名 日中大学フェアフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中和也・細谷侑佑・今西未来・大神田淳子
2. 発表標題 天然変性概日時計因子を標的としたコバレント阻害剤の創製
3. 学会等名 生体機能関連若手サマースクール
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻野 菜々美・伊賀上 祥汰・増田 遼馬・室井 誠・長田 裕之・松本 健・吉田 稔・喜井 勲
2. 発表標題 抗がん活性フシコクシン誘導体はmRNA翻訳抑制複合体を安定化する
3. 学会等名 ケミカルバイオロジー年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐山 寛生、木下 悟、林 優紀、木下 俊則、春日 重光、入枝 泰樹、大神田 淳子
2. 発表標題 植物病原菌二次代謝産物フシコクシンの気孔開口による成長促進効果の検証
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenta Tanaka, Junko Ohkanda
2. 発表標題 Development of fusicoccin-based selective fluorescent labeling for 14-3-3sigma-Cys38
3. 学会等名 Pacifichem2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naomi Horiuchi, Fumitoshi Sugino, Junko Ohkanda
2. 発表標題 Design, synthesis, and evaluation of non-thiol bivalent dual inhibitors for KRas lipid modification
3. 学会等名 Pacifichem2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Ohkanda
2. 発表標題 Fusicoccin-based reactive agents for controlling 14-3-3-mediated signaling pathways
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大神田 淳子
2. 発表標題 天然物誘導体による14-3-3たんぱく質の化学シグナルの解明
3. 学会等名 新学術化学コミュニケーションのフロンティア 第8回公開シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊賀上祥汰、増田遼馬、喜井 勲、大神田淳子
2. 発表標題 定量的プロテオミクス解析による抗がん活性フシコクシン誘導体の作用機序の解明
3. 学会等名 ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Ohkanda
2. 発表標題 Fusicoccin: A chemical modulator for 14-3-3 interactions
3. 学会等名 International Chemical Biology Society 2021 Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐山 寛生・木下 悟・林 優紀・木下 俊則・春日 重光・入枝 泰樹・大神田 淳子
2. 発表標題 植物病原菌二次代謝産物フシコクシンの気孔開口依存的成長促進効果の検証
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Ohkanda
2. 発表標題 Fusicoccin: A chemical modulator for 14-3-3 interactions
3. 学会等名 RIKEN CSRS Chemical Biology Luncheon Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Junko Ohkanda	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 20
3. 書名 "Chemical approach toward controlling of transient protein interactions" Middle Molecular Strategy, Fukase, K.; Doi, T. (Eds.)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 フシコクシンを含む植物生産増強剤	発明者 大神田淳子、桐山寛生、春日重光、入枝泰樹、木下俊則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-029413	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

The Ohkanda Research Lab http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/johkanda/index.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
---------	---------