

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14755

研究課題名(和文)アロステリック機構に基づく14-3-3アイソフォーム選択的阻害剤の開発

研究課題名(英文)Development of an isoform selective inhibitor of 14-3-3s through allosteric mechanism

研究代表者

西山 康太郎(Nishiyama, Kotaro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40803218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：14-3-3は、あらゆる真核生物が持つ「ハブ」であるが、構造が類似した複数のアイソフォームが存在するため、個々の機能を制御するための方法は確立されていない。本研究は、共有結合型アロステリック阻害剤を用いて、そのアイソフォーム選択性の評価や改良、および植物の機能制御への展開を目指した。その結果、系統的に区別される2種類のシロイヌナズナ14-3-3サブグループのうち、片方のサブグループに対して、より高い阻害効果を示すことを確かめた。さらに、阻害剤をシロイヌナズナの葉へ投与することで、14-3-3が正に作用する気孔の開閉作用を阻害し、強く気孔を閉鎖することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロイヌナズナ14-3-3の両サブグループが異なる生理的機能を示すことが示唆されているが、その詳細は分かっていない。本阻害剤は、これらを植物体内で区別して制御することが期待でき、植物を理解するための分子ツールとして有用である。また、気孔の開閉は、植物の成長や、乾燥地域での栽培など、実際の農業現場においても重要な生理応答である。本阻害剤で気孔を閉鎖できたことから、乾燥地域での栽培を助ける植物成長調整剤や、農作物や花を保存するための薬剤としての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：14-3-3 proteins are "hubs" of all eukaryotes. However, 14-3-3s have various isoforms with similar structures, thus methods for controlling individual functions have not been established. This study aimed to evaluate and improve an isoform selectivity of a covalent allosteric inhibitor, and to apply it to the regulation of plant functions. I confirmed that the inhibitor exhibited a higher selectivity on one of the two phylogenetically distinct Arabidopsis 14-3-3 subgroups. Furthermore, injection of the inhibitor to Arabidopsis leaves resulted in a strong stomatal closure via blocking the stomatal opening effect of 14-3-3.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：14-3-3 ケミカルバイオロジー 共有結合阻害剤 シロイヌナズナ 気孔

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

14-3-3 タンパク質は、すべての真核生物がもち、100 種類以上のタンパク質と相互作用することで多様な機能を示す。ヒトでは、がんやアルツハイマー病など多くの疾患に関わり、有望な創薬標的である。また植物では、花芽形成や気孔開閉、免疫などあらゆる生理応答に関与しており、農薬の一種である植物成長調整剤の標的となる。

また、14-3-3 は、ヒトでは 7 種類、シロイヌナズナでは 13 種類にもおよぶアイソフォームが存在し、機能が重複しながらも、特定の疾患や機能に関与している (e.g. Yu et al., Cancer Res. 2009; Ferl et al., Plant Physiol. 2007)。例えば、14-3-3zeta はがんで過剰発現しており、siRNA によりノックダウンすると抗腫瘍効果が得られる (Yu et al., Cancer Res. 2009)。生命維持に必須な 14-3-3 アイソフォームをすべて阻害することは重篤な副作用へとつながるため、アイソフォーム選択的阻害剤の開発が求められている。しかし、14-3-3 の阻害点であるタンパク質認識ポケットは、アミノ酸残基の保存性が非常に高いため、14-3-3 アイソフォーム選択的阻害方法は未だ存在しない。医農薬開発とは別に、14-3-3 アイソフォーム選択的阻害剤は、生物学的機能を解明するためのケミカルツールとしても有望である。遺伝学的な解析法では、単一アイソフォームを欠損させても他のアイソフォームが機能を補完し、表現型が見られない場合が多い。また、多重欠損では、膨大な組み合わせになる上に (シロイヌナズナ 14-3-3 の二重変異で 156 通り)、生育阻害や致死につながる。素早く一過的に作用する低分子化合物の特性を活かすことで、各アイソフォームがもつ未知の役割を解明することにつながる。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、(1)アロステリック機構に基づいた 14-3-3 アイソフォーム選択的阻害剤の設計と合成、(2) 14-3-3 アイソフォーム選択的阻害剤による植物機能の選択的制御、を本課題の目的とした。14-3-3 アイソフォームを選択的に阻害することで、医農薬開発や生物学分野に大きなインパクトを与えることができるが、その方法論は全く確立されていない。この課題に対して、新規なアロステリック阻害戦略で挑み、14-3-3 アイソフォーム選択的阻害剤の設計と合成を実現する。さらに、実際に 14-3-3 アイソフォーム選択的阻害により生命現象を精密に制御できることを検証するため、植物個体における効果を確かめる。

申請者はこれまでに、14-3-3 を標的とした植物の成長制御や機能解析に向け、新規な 14-3-3 阻害剤である CAF (Covalent and Allosteric Fourteen-three-three inhibitor) を家ミカルスクリーニングにより発見している。CAF は、タンパク質認識ポケットから離れた Cys 残基と共有結合することで、アロステリックな阻害作用を示すことを、MS/MS 解析と変異体アッセイから明らかにした。この結果から、これまで未知であった、14-3-3 のアロステリック阻害部位の同定に成功した。このアロステリック部位周辺のアミノ酸残基は、アイソフォーム間の保存性が低い。そのため、アロステリック阻害は、14-3-3 アイソフォームを選択的に阻害するための有効なアプローチであり、本研究を達成できると考えた。

### 3. 研究の方法

(1) CAF のアイソフォーム選択性と、そのメカニズムを解析するため、7 種類の 14-3-3 アイソフォームに対する阻害活性を評価した。各種 14-3-3 アイソフォームのリコンビナントタンパク質は、各 CDS 領域を導入した pET15b プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)株へ形質転換し、His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製して用いた。阻害活性の評価方法として、14-3-3 とリン酸化ペプチドとの相互作用を蛍光偏光法で検出できる方法を用いて、種々の濃度で CAF を滴下した際のリン酸化ペプチドの解離を定量的に評価し、 $IC_{50}$  値を算出した。また、速度論的な解析を行い、CAF が 14-3-3 と非共有結合的に相互作用する際の結合定数  $K_i$  と、CAF が 14-3-3 と共有結合を形成する際の速度定数  $k_{inact}$  を算出した。

(2) 阻害活性やアイソフォーム選択性の向上を目指し、CAF の分子骨格を系統的に変化させた

分子群を網羅的に合成した。合成した化合物群は、蛍光偏光法を用いて、阻害活性やアイソフォーム選択性を効率的に評価した。これと並行し、より合理的に 14-3-3 アイソフォーム選択的阻害剤の設計を可能にするため、X 線結晶構造解析による 14-3-3 と CAF との複合体構造の解析に挑戦した。結晶化では、複合体の濃度や、pH・塩・ポリマーなどの種類と濃度を検討するとともに、複合体を疎水カラムクロマトグラフィーにより高純度化し、結晶を試みた。

(3) CAF をシロイヌナズナへ投与した際の、花芽形成(花成)や気孔開閉への影響を調べた。シロイヌナズナを用いた花成評価は、一般的な手法である抽だい(花茎が伸びる現象)の時期や、ロゼット葉(地上近くに密集した葉)の枚数を比較することで行った。また、気孔に関しては、研究開始以前から気孔閉口作用を確かめていたが、より詳細な検討を行った。気孔を強力で開口する植物毒素フシコクシン存在下で、CAF の投与が気孔の開閉度に及ぼす影響を、顕微鏡を用いて定量的に評価した。

#### 4. 研究成果

(1)シロイヌナズナの各 14-3-3 アイソフォームに対する CAF の阻害結果を調べた結果、系統的に区別される 2 種類のサブグループのうち、片方のサブグループに対して、より高い阻害効果を示すことが示された(テーブル 1)。さらに、詳細な速度論解析の結果、そのアイソフォーム選択性は、主に CAF が 14-3-3 に対して共有結合を形成する速度が速いことに起因することが明らかになった。以上の結果は、アロステリックな阻害機構が、アイソフォーム選択的に 14-3-3 を阻害するために効果的であることを示しており、14-3-3 アイソフォーム選択的阻害剤を設計するための新たな指針を得ることに成功したと言える。

テーブル1

At14-3-3	IC <sub>50</sub> [μM]	k <sub>inact</sub> [10 <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> ]	K <sub>i</sub> [μM]	k <sub>inact</sub> /K <sub>i</sub> [10 <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> ]
Mu	0.14 ± 0.01	17.1 ± 1.2	5.8 ± 2.9	3.0 ± 1.5
Epsilon	0.31 ± 0.01	18.0 ± 2.4	5.1 ± 1.2	3.5 ± 1.0
Omicron	0.53 ± 0.04	11.8 ± 1.0	6.9 ± 1.4	1.7 ± 0.4
Lambda	1.21 ± 0.04	5.1 ± 0.7	8.6 ± 3.9	0.6 ± 0.3
Phi	2.8 ± 0.2	4.5 ± 0.4	12.4 ± 4.1	0.4 ± 0.1
Psi	1.9 ± 0.2	5.2 ± 0.5	13.5 ± 1.7	0.4 ± 0.5
Nu	4.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	6.5 ± 0.9	0.4 ± 0.1

(2) CAF は、システイン残基と共有結合を形成する反応基と、14-3-3 を非共有結合的に捉える認識部位からなる。これら 2 つの部位および両者を繋ぐリンカーを変えた種々の分子を合成し、阻害活性を評価した。特に、反応基の反応性が高く、生体内における安定性が低い可能性があったため、反応性を低下させるように設計した誘導体をデザインした。しかしながら、より高い安定性と阻害活性を合わせもつ阻害剤を得ることはできなかった。また、14-3-3 と CAF の複合体結晶についても、微結晶は得られたものの、構造解析が可能な良質な結晶を得ることができなかった。当初予定していた CAF の改良は達成できなかったものの、(1) に示した通り、CAF は優れた阻害活性とアイソフォーム選択性を示したことから、植物に対する活性評価を進めた。

(3) CAF をシロイヌナズナへ投与し、花成と気孔開閉に対する効果を調べた。14-3-3 は、各生理応答に重要な転写因子 FD やプロトン ATP アーゼと相互作用することで、それらの機能を正に制御している。そこで、CAF によって 14-3-3 を阻害することで、花成時期の遅延や、気孔の閉口が可能になると考えた。花成においては、CAF を含む寒天培地上でシロイヌナズナを生育させて評価した。しかし、花成に対する影響は見られなかった。CAF の安定性や投与方法に問題があり、花成が起こる茎頂へと到達しなかった可能性がある。また、気孔においては、CAF をシロイヌナズナの葉へ投与しておく、フシコクシンによる気孔の開口が見られなかったことから、CAF は強力な植物毒素にも打ち勝つ高い活性を有しており、植物体内でも有効な薬剤であることを実証した(図 1)。

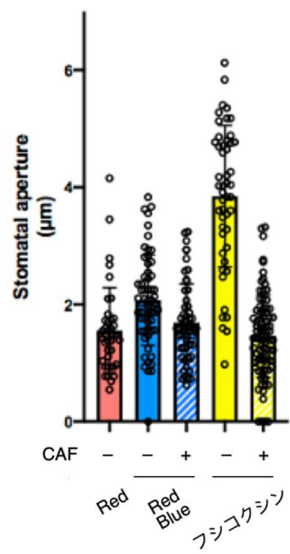


図1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山康太郎、相原悠介、中村咲耶、鈴木健裕、高橋宏二、木下俊則、堂前直、佐藤綾人、萩原伸也
2. 発表標題 14-3-3阻害剤の探索と気孔開閉の化学的制御
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------	---------