

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510320

研究課題名(和文) 14-3-3タンパク質のリン酸化依存性結合阻害物質の探索

研究課題名(英文) Screening of phosphorylation dependent 14-3-3 binding inhibitors

研究代表者

渡邊 信元 (WATANABE, Nobumoto)

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・ユニットリーダー

研究者番号：90221689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：14-3-3タンパク質結合を阻害する物質のハイスループット探索系を構築し理研天然化合物ライブラリーの探索を行った。一次スクリーニングでは7種の14-3-3タンパク質の結合のいくつかを阻害する物質が取得された。それらのヒット化合物から2次スクリーニングを行い、7種の14-3-3タンパク質の結合のうち全てを阻害出来る物質がひとつ取得出来た。この物質はがん細胞の増殖も阻害した。これまで得られている14-3-3阻害物質で全ての14-3-3タンパク質を阻害する物質は報告されていない。14-3-3タンパク質の阻害物質を取得することでがん細胞の増殖を阻害する物質を取得することが出来ることが示された。

研究成果の概要(英文)：A high-throughput screening (HTS) system was developed and employed to the chemical libraries of the RIKEN NPDepo to identify small molecule compounds with 14-3-3 protein-protein interaction inhibitory activity. We identified small molecule inhibitors of 14-3-3 dependent interaction. While most of these hit compounds inhibited some isoforms of 14-3-3 interaction but not those of other isoforms, one compound was found to inhibit all the 14-3-3 isoform dependent binding. This compound had modest growth inhibitory activity of human cancer cells. To our knowledge, small molecule inhibitor for all the 14-3-3 isoform interaction is not reported yet. Our study demonstrates a potential strategy of inhibiting 14-3-3 interaction in human cancers to induce their growth inhibition using small molecule inhibitors.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質間相互作用 小分子化合物 14-3-3タンパク質 タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖進行には MPF(サイクリン B/CDK 複合体)を初めとするタンパク質リン酸化酵素によるリン酸化が重要な役割を有する。例えば、Wee1 は細胞分裂期開始の準備ができるまで CDK の ATP 結合領域をリン酸化することによって CDK を不活性化するのに重要である(Watanabe et al EMBO J. 1995 など)。分裂期開始時には、CDK による Wee1 のリン酸化が Wee1 上にユビキチン化酵素認識部位を形成し、Wee1 はタンパク質分解へと誘導される(Watanabe et al, PNAS 2004, 2005)。しかし、このように分裂期リン酸化の作用機構が分子的に解明されている例はきわめて少なく、分裂期にリン酸化される多数のタンパク質に関しては、リン酸化による機能的変化がどのような分子機構によるのか明らかでない。Wee1 に関しても、C 末端のリン酸化が 14-3-3 タンパク質というリン酸化に依存して他のタンパク質に結合するタンパク質と結合することは知られているが、その役割は明確ではなかった。

14-3-3 タンパク質ファミリーはリン酸化セリンを中心とする配列 (mode-1; RSXpSXP と mode-2; RXF/YXpSXP)を認識して他のタンパク質に結合する。この結合により標的タンパク質の局在などを変えることが知られ、細胞周期進行、チェックポイント制御に重要である。ヒトには非常に似た構造をもつ 7 種のアイソフォーム(下図)が知られ基本的にはその至適結合配列は同じであるが、それぞれの役割の違いが指摘されている。7 種の中で特にシグマ(σ)は p53 によって誘導され DNA 損傷時の cdc25 の活性阻害に重要であり他のアイソフォームとは異なる標的をもつ可能性が指摘されている。

14-3-3 の阻害小分子はこれまで知られておらず、サブファミリーを区別出来る阻害小分子があればこれらの役割解明に利用可能である。逆に全ての 14-3-3 タンパク質の機能を抑えることは siRNA などのシステムでは困難であり、そのような作用を有する小分子化合物があれば 14-3-3 タンパク質の機能のケミカルバイオロジー的解析にも極めて有用である。14-3-3 タンパク質は、種々のがん細胞での発現の亢進も知られ、この阻害剤が開発できれば薬剤にはがん細胞の増殖抑制効果が期待できる。また、14-3-3 には DNA 修復機構における重要役割があり、これを阻害することができれば DNA 修復機構を応用する抗がん剤開発にも展開できることが期待されていた。

2. 研究の目的

我々は、リン酸化を介したタンパク質間相互作用のハイスループット阻害小分子探索系を開発した。この系を用いて分裂期リン酸化酵素 Plk1 のポロボックスドメイン

(PBD)に依存するリン酸化特異的結合を阻害する薬剤を見出し、PBD 依存結合の細胞分裂期進行における役割を明らかにした(Watanabe et al, JBC, 2009)。さらに引き続き、Pin1 というリン酸化依存プロリン異性化酵素活性を有するタンパク質のリン酸化依存結合測定系を構築した。Pin1 の N 端にある WW ドメインは他のタンパク質にリン酸化依存に結合するが、異性化酵素活性阻害剤の探索系に応用し、低濃度(IC50=約 0.3 μ M)で Pin1 活性を阻害できる小分子化合物を見出している。これらの結果が示すように、我々の開発したリン酸化を介したタンパク質間相互作用のハイスループット阻害小分子探索系は、興味深い化合物を次々に見出しており、今回、リン酸化に依存した結合を有するタンパク質としては古くから知られていたにもかかわらず、これまで強い活性をもつ特異的阻害物質が得られていなかった 14-3-3 タンパク質について、結合阻害小分子をハイスループットに探索する系を構築し小分子の単離を行うこと、さらにその物質を用いて 14-3-3 タンパク質の細胞増殖における役割を化学生物学的に解析することを目的とした本研究を計画した。

3. 研究の方法

本研究は、14-3-3 タンパク質と標的リン酸化ペプチドの結合の測定系を構築し、14-3-3 タンパク質依存結合阻害小分子探索を行った。14-3-3 タンパク質はヒトの 7 種のアイソフォーム全てについて探索した。系の構築後、実際に探索を行い、14-3-3 タンパク質依存結合活性を阻害する物質を得、得られる阻害剤により細胞周期進行における 14-3-3 タンパク質の役割を明らかにすることをめざした。

14-3-3 タンパク質とリン酸化ペプチドへの結合測定系の構築

14-3-3 タンパク質のリン酸化ペプチドへの結合測定系を構築した。蛍光タンパク質融合 14-3-3 タンパク質(7 種のアイソフォーム全て)と標的リン酸化ペプチドの結合は、これまでに他のタンパク質で確立した測定系、すなわち標的ペプチドを共有結合した 96 穴プレートに蛍光標識タンパク質をいれて結合する蛍光を測定する系を応用した。

1) 蛍光標識 14-3-3 タンパク質発現ベクターを構築し融合タンパク質を大腸菌で発現するヒト 14-3-3 タンパク質およびその変異体(アミノ酸点変異体およびドメイン欠失体)の N 端側に蛍光タンパク質(mVenus; EGFP をより明るくした Venus タンパク質に、二量体になりにくい変異を入れた monomeric Venus, Science 2002)を融合させたタンパク質を大腸菌で発現させるベクターを構築した。

2) 14-3-3 タンパク質結合配列リン酸化ペプチドを 96 ウェルプレートの各ウェルに共有結合させた。14-3-3 タンパク質結合配列リン酸化ペプチドは、セリン 642 をリン酸化したヒ

ト Wee1A 由来のペプチド配列 (CRTSRLIGKMMNRS VpSLTIY; pS はリン酸化セリン)を用いる。リン酸化していないスレオニンを有するペプチドも合成し、結合しない対照として用いた。

3)mVenus-14-3-3 タンパク質融合タンパク質発現大腸菌抽出液をリン酸化ペプチドを共有結合した 96 ウェルプレートに入れ、結合しなかったタンパク質を洗浄後、結合したタンパク質を mVenus の蛍光として定量する。種々のアミノ酸点変異体やドメイン欠失体を用いることによって、14-3-3 に依存した結合が測定可能であることを検証した。

4)結合配列リン酸化ペプチドは結合を阻害するはずであり、それを実際に確認し、リン酸化ペプチドへの 14-3-3 タンパク質結合を測定する系が、14-3-3 タンパク質結合の阻害物質探索系としての利用可能なことを証明した。

探索系を用いた 14-3-3 タンパク質阻害小分子の探索

探索系構築後、探索を開始した。阻害剤の候補化合物群は、研究室内にすでに保有済の数千種の精製化合物からなる化合物ライブラリーを利用し、再現性良く結合阻害能をもつ化合物を選び出した。選択された化合物については、他のアッセイ方法(GST 融合タンパク質プルダウンアッセイ法など)によっても 14-3-3 タンパク質を阻害できるかの検討を行った。

ヒット化合物のがん細胞増殖への影響解析

14-3-3 タンパク質結合活性を阻害する化合物について、その化合物を培養細胞系に投与することで 14-3-3 タンパク質の細胞周期進行における役割を解析した。

4. 研究成果

1) 14-3-3 タンパク質結合を阻害する物質のハイスループット探索系を構築し、理研天然化合物ライブラリーの約 20,000 化合物の探索を行った。一次スクリーニングでは7種の 14-3-3 タンパク質の結合の少なくとも1つを再現良く阻害する物質が 51 種、取得された。

2) それらのヒット化合物から GST プルダウン法により 2 次スクリーニングを行い、36 種の化合物が、7種の 14-3-3 タンパク質の結合の少なくとも1つを再現良く阻害した。この中で、7種の 14-3-3 タンパク質の結合のうち全てを阻害出来る物質がひとつ取得出来た(図1)。これまで得られている 14-3-3 阻害物質で全ての 14-3-3 タンパク質を阻害する物質は報告されていない。

3)この物質、およびその類縁体 2 種はヒトがん細胞(HeLa 細胞)の増殖も比較的低濃度で阻害した。14-3-3 タンパク質の阻害物質を取得することでがん細胞の増殖を阻害する物質を取得することが出来ることが示

された(図2)。

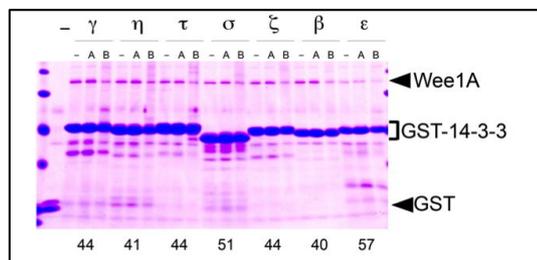


図1) 化合物Bは全ての14-3-3アイソフォームを阻害出来ることが示された。

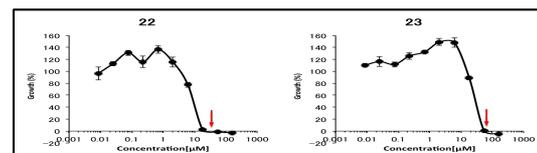


図2)化合物 B(22)とその類縁体(23)はヒトがん細胞の増殖を濃度依存的に阻害した

まとめ

14-3-3 タンパク質依存結合をそれぞれのアイソフォームのうち少なくとも1つを再現良く阻害する物質を 36 種単離でき、さらにそのひとつは、全てのアイソフォームの結合を阻害した。この物質はがん細胞の増殖を濃度依存的に阻害した。本研究で構築した 14-3-3 タンパク質依存結合を阻害する物質を探索する方法を用いて、がん細胞の増殖を阻害する物質を取得することが出来ることが示された。

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 10 件)

- Ikeda, T., Ong, E.B.B., Watanabe, N., Sakaguchi, N., Maeda, K., and Koito, A.: Creation of chimeric human/rabbit APOBEC1 with activities of HIV-1 restriction and DNA mutation. *Sci. Rep.* 6, 19035 doi: 10.1038/srep19035 (2016) 査読有
- Aretz, J., Kondoh, Y., Honda, K., Anumala, UR., Nazaré, M., Watanabe, N., Osada, H. and Rademacher, C.: Chemical fragment arrays for rapid druggability assessment. *Chem. Commun.*, DOI: 10.1039/c5cc10457b 印刷中(2016)査読有
- Ursu, A., Illich, D.J., Takemoto, Y., Porfetye, A.T., Zhang M., Brockmeyer, A, Janning, P., Watanabe, N., Osada, H., Vetter, I.R., Ziegler, S., Schöler, H.R., Waldmann, H.: Epiblastin A Induces Reprogramming of Epiblast Stem Cells Into Embryonic Stem Cells

- by Inhibition of Casein Kinase 1. **Cell Chem Biol.** 23, 494-507 (2016) 査読有
4. Subedi, A., Shimizu, T., Ryo, A., Sanada, E., Watanabe, N., Osada, H.: Discovery of novel selenium derivatives as Pin1 inhibitors by high-throughput screening. **Biochem Biophys Res Commun.** doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.124 印刷中 (2016) 査読有
 5. Watanabe N., Osada H.: Small molecules that target phosphorylation dependent protein-protein interaction. **Bioorg Med Chem.** doi: 10.1016/j.bmc.2016.03.023 印刷中 (2016) 査読有
 6. Hayase, H., Watanabe, N., Lim, CL., Nogawa, T., Komatsuya, K., Kita, K. and Osada, H. : Inhibition of malaria parasite growth by quinomycin A and its derivatives through DNA-intercalating activity. **Biosci., Biotech., Biochem.** 79, 633-635 (2015) 査読有
 7. Choi, SB.; Choong, YS., Saito, A., Wahab, H., Najimudin, N., Watanabe, N., Osada, H., and Ong, E.: In silico investigation of a HIV-1 Vpr inhibitor binding site: Potential for virtual screening and anti-HIV drug design. **Mol. Infomatics** 33, 742-748 (2014) 査読有
 8. Zimmermann, T.J., Bürger, M., Tashiro, E., Kondoh, Y., Martinez NE., Görmer, K., Rosin-Steiner, S., Shimizu, T., Ozaki, S., Mikoshiba, K., Watanabe, N., Hall, D., Vetter, IR., Osada, H., Hedberg, C., and Waldmann, H.: Boron Based Inhibitors of Acyl Protein Thioesterase 1 and 2. **ChemBioChem** 14, 115-122 (2013) 査読有
 9. Kasahara, K., Goto, H., Izawa, I., Kiyono, T., Watanabe, N., Elowe, S., Nigg EA., and Inagaki M. PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes its association with 14-3-3 γ and is required for metaphase-anaphase transition. **Nat. Commun.** 4, 1882 doi: 10.1038/ncomms2879 (2013) 査読有
 10. Ooi, L-C., Watanabe, N.*, Futamura, Y., Sulaiman, SF., Darah, I., and Osada, H.*: Identification of small molecule inhibitors of p27^{Kip1} ubiquitination by high-throughput screening. **Cancer Sci.** 104, 1461-1467 (2013) 査読有

[学会発表](計 20 件)

1. Watanabe, N. Osada, H.: "Discovery and analyses of 14-3-3 protein-protein interaction inhibitors identified by high throughput screening". Tenth

- AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, Maui, USA, Feb. 27(2016)
2. Watanabe, N.: "Cell cycle arrest with small molecule inhibitors of phosphorylation dependent protein-protein interaction." RIKEN Academia Sinica Joint Conference on Chemical Biology, Genomics Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Oct. 16 (2015)
 3. Watanabe, N.: "Cell cycle arrest by inhibitors of phosphorylation dependent protein-protein interaction." 第 74 回日本癌学会学術総会シンポジウム 名古屋国際会議場(愛知県名古屋), 10 月 9 日 (2015)
 4. Subedi, A., Watanabe, N., Nishi, M., Ryo, A., Osada, H.: "Discovery NP482 as selective tumorsphere inhibitor." 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋), 10 月 8 日(2015)
 5. 渡辺 信元、早瀬 大貴、Lim Chung Liang, 野川 俊彦、小松谷 啓介、北 潔、長田 裕之: "キノマイシン誘導体は DNA 挿入活性で抗マラリア効果を示す" 第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜, 11 月 26 日(2014)
 6. 渡辺信元: "タンパク質間相互作用の阻害により細胞周期を阻害する物質の探索", 埼玉大学理学部セミナー、埼玉大学(埼玉), 8 月 26 日(2014)
 7. Watanabe, N.: "High throughput screening for inhibitors of phosphorylation dependent protein-protein interaction.", RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology 3rd Annual Symposium. Schloss Ringberg, Kreuth, Germany, May 22 (2014)
 8. 早瀬 大貴, 渡邊 信元, ヴィエジバ コンスタンティ, 川谷 誠, 北 潔, 長田 裕之: "抗マラリア原虫薬の開発" 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸, 12 月 5 日(2013)
 9. 渡邊信元: "生物機能解析のためのケミカルバイオロジー基盤技術" 第 3 回 CSJ 化学フェスタ 理研特別企画「化学と生物学の融合によるグリーン未来の実現~資源の循環的な創出と利活用技術の開発~」, タワーホール船堀(東京都), 10 月 22 日(2013)
 10. 川谷 誠, 渡辺 信元, 谷口 直之, 長田 裕之: "Chemical array screening for matrix metalloproteinase-9 inhibitors

- (化合物アレイを用いた matrix metalloproteinase-9 阻害剤の探索)" 第 72 回 日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜, 10月5日 (2013)
11. 渡辺 信元, 新家 一男, 長田 裕之:
"Screening of inhibitors of p27^{Kip1} ubiquitination by SCF^{Skp2} (SCF^{Skp2} による p27^{Kip1} のユビキチン化阻害物質の探索)" 第 72 回 日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜, 10月4日 (2013)
 12. 川谷誠, 青野晴美, 野川俊彦, 二村友史, 室井誠, 渡辺信元, 長田裕之: "糸状菌由来新規抗がん活性物質 pyrrolizilactone の標的同一" 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、国立京都国際会館、京都府・京都、6月13日(2013)
 13. 渡辺信元: "細胞周期阻害物質のハイスクリーン探索と創薬への応用" 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会シンポジウム、国立京都国際会館(京都)、6月13日(2013)
 14. Ugata K., Futamura Y., Hayase H., Watanabe N., Osada H.: "Exploration of novel antimalarial compounds", KRIBB-RIKEN Chemical Biology Joint Symposium, Ochang, Korea, May 29 (2013)
 15. Tran, TTN, Schölermann, B., Kondoh, Y., Pascual Lopez-Alberca, M., Watanabe, N., Ziegler, S., Osada, H., Waldmann, H.: "Application of the Chemical Array Approach in the Quest for Inhibitors of the Mitotic Kinesin HSET" 2nd Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center RIKEN Wako, Saitama, Japan Apr. 16 (2013)
 16. Watanabe N., Ooi, L-C, Osada, H.: "Small Molecule Inhibitors of ubiquitin-proteasome dependent degradation of p27^{Kip1}" 2nd Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center RIKEN Wako, Saitama, Japan Apr. 16 (2013)
 17. Porfetye, AT., Zimmermann, TJ., Bürger, M., Tashiro, E., Stege, P., Kondoh, Y., Watanabe, N., Hedberg, C., Osada, H., Waldmann, H., Vetter, IR.: "Structural and Biochemical Investigation of Acyl Protein Thioesterase, a Ras-regulating Protein" 2nd Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center RIKEN Wako, Saitama, Japan Apr. 16 (2013)
 18. Kawatani M., Aono H., Nogawa N., Futamura Y., Muroi M., Watanabe N., Osada H.: "Target identification of pyrrolizilactone, a new cytotoxic fungal metabolite" 2nd Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center RIKEN Wako, Saitama, Japan Apr. 16 (2013)
 19. Hayase H., Watanabe N., Osada H.: "Development of high throughput screening system for antimalarial drugs" 2nd Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center RIKEN Wako, Saitama, Japan Apr. 16 (2013)
 20. Futamura Y., Kawatani M., Muroi M., Shimizu T., Watanabe N., Osada H.: "MorphoBase, an encyclopedia of cell morphology, and its use for drug target identification" 2nd Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center RIKEN Wako, Saitama, Japan Apr. 16(2013)
- 〔図書〕(計4件)
1. Watanabe N and Osada H.: Cell proliferation and differentiation. (2016) **Bioprobes (2nd edition) in press**
 2. 渡辺信元 "細胞周期を制御するリン酸化依存タンパク質間相互作用阻害剤の開発" 実験医学(羊土社) 31, 297-302 (2013)
 3. 長田裕之, 二村友史, 渡辺信元, 近藤恭光 "新たな抗がん剤探索を加速する新スクリーニング技術", 細胞工学(秀潤社) 32, 655-659 (2013)
 4. 渡辺信元, 長田裕之 "リン酸化依存性タンパク質間相互作用阻害物質の探索と抗がん剤への展開" 次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学-革新的シーズ育成に向けて-(清木元治 総編集) 南山堂(東京) 305-310 (2013)
- ホームページ等
http://www.riken.jp/research/labs/csrs/bioact_compound_discov/
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 渡邊 信元 (WATANABE Nobumoto)
 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・ユニットリーダー
 研究者番号: 90221689