

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750394

研究課題名(和文) In vivo鋳型誘起合成を利用した細胞内シグナル遮断分子の創製と細胞機能制御

研究課題名(英文) Synthesis and regulation of the phosphorylated signal in vivo template assisted synthesis

研究代表者

真鍋 良幸 (Manabe, Yoshiyuki)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00632093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Transforming growth factor- (TGF-) シグナルは、細胞の増殖やアポトーシスなど多くの生命現象に關与する。本研究では、新規なTGF- シグナル制御法の開発を目指して、(1) TGF- シグナルの下流のリン酸化タンパク質であるリン酸化Smad2認識分子の創製、および(2) TGF受容体の翻訳後修飾糖鎖に着目したTGF- シグナルの制御を検討した。(1)では、動的コンビナトリアルケミストリーの手法により、リン酸化Smad2認識分子を開発した。(2)では、コアフコース構造に着目し、その認識分子、および生合成酵素阻害剤の開発に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor- (TGF-) regulate various kinds of biological phenomena, such as cell growth, apoptosis and so on. The purpose of this study is developing the novel method to regulate this signal. We developed the phosphorylated Smad2 recognition peptide using dynamic combinatorial chemistry. We also investigated the regulation of TGF- signal by controlling the function of translational modification sugar on TGF receptor. For this purpose we developed the molecule which bind to core fucose and which inhibit the formation of core fucose.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：TGF- 翻訳後修飾糖鎖 コアフコース 動的コンビナトリアルケミストリー FUT8

1. 研究開始当初の背景

生命現象の多くはタンパク質-タンパク質相互作用によって調節されており、これを低分子化合物で制御することはケミカルバイオロジーにおける重要なテーマの一つである。しかし、タンパク質-タンパク質結合は、水素結合や疎水性相互作用など複数の弱い相互作用が合わさることで強い結合を生み出しており、これを低分子化合物で制御することは困難であり、その方法論は確立されておらず、ライブラリを用いた化合物探索に頼っているのが現状である。

細胞内でのリン酸化を介したシグナル伝達は成長、増殖、生死などを制御する極めて重要な経路で、癌細胞においては、このシグナルが過剰に伝達され、細胞増殖やアポトーシス抵抗性の獲得が引き起こされる。そのため、このリン酸化シグナル伝達の遮断は、抗癌作用に繋がると考えられ、実際、キナーゼ阻害剤であるゲフィチニブやイマチニブなどの抗癌剤が開発された。しかし、これらの薬剤に対する耐性が確認され、新たな分子標的薬が望まれている。このような状況で、リン酸化タンパク質とその認識タンパク質の結合を阻害することでシグナルを遮断する試みも多数行われてきた。しかし、その多くは、リン酸化タンパク質のミミックを用いるもので、これらは標的に加え、その他多くのリン酸基認識タンパク質とも相互作用し、選択性に問題があった。

TGF-βシグナルは、細胞の増殖やアポトーシスなど多くの生命現象に関与し、がんの抑制や転移、組織の繊維化など、疾病にも深く関わる。TGF-βシグナルの制御分子としてはTGF受容体キナーゼの阻害剤が報告されているが、何れも医薬品としての利用は検討されていない。これは、TGF-βシグナルが免疫や発生などの重要な生命現象に関わるために、キナーゼ阻害剤を用いた TGF-βシグナルの阻害が副作用につながるためであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではTGF-βシグナルに焦点を当て、新しい概念でのシグナル制御分子の開発を目指した。具体的には、(1) TGF-βシグナル下流のリン酸化タンパク質であるリン酸化 Smad2 認識分子の創製、および(2) TGF受容体の翻訳後修飾糖鎖に注目したシグナル制御法の開発を検討した。(1)の方法では、TGF-βの下流に複数存在するシグナル伝達経路のうち、Smad2を介する経路のみを選択的に阻害することが可能である。この際、動的コンビナトリアルケミストリーの手法を応用した鑄型有機合成を用いることで、リン酸化タンパク質のリン酸化部位周辺のアミノ酸配列まで認識して結合する分子の創製を検討した。本手法を確立することができれば、TGF-βシグナル制御分子として有用な化合物が得られるだけでなく、タンパク質-タンパク質相互作用を制御する分子の創製法を提唱できる。一方、(2)ではタンパク質の翻訳後修飾糖鎖に注目したタンパク質の機能制御というまったく新規な受容体キナーゼの制御法の開発を目指す。糖鎖は生

命機能の恒常性維持に重要な役割を担っている。ここで検討する手法は糖鎖構造を改変することで、生命機能の恒常性を緩やかに変化させ、従来の分子標的医薬とは全く異なった概念での生物機能制御を実現できると期待できる。

3. 研究の方法

(1) TGF-βシグナル下流のリン酸化タンパク質であるリン酸化 Smad2 認識分子の創製

申請者の研究室では、リン酸化タンパク質のリン酸化部位およびその周辺のアミノ酸配列を認識する低分子ペプチド(PR ペプチド)を開発する試みを行ってきた。本手法では、リン酸化タンパク質をリン酸基認識部位にイオン相互作用で緩やかに配位させた後、これを鑄型とし、相互作用するライブラリ分子との間に共有結合を形成させ、鑄型選択的なホスト分子を創製する(鑄型誘起合成)。本研究ではこの方法を発展させて、TGF-βシグナルの下流でリン酸化されるSmad2を高い親和性で認識し、かつ*in vivo*での利用可能な PR ペプチドの創製を目指した。鑄型として、リン酸化 Smad2 のリン酸化配列 SpSMpS を用い、鑄型の共存、非共存下で、アジド含有ライブラリおよびアルキン含有ライブラリを反応させ、鑄型により反応が加速した組み合わせを鑄型認識分子として得た。さらに、鑄型との親和性向上を狙い、得られたペプチドの環化による配座固定を検討した。

(2) TGF受容体の翻訳後修飾糖鎖に注目したシグナル制御法の開発

TGF-β受容体(TβRII)は糖鎖による翻訳後修飾を受けており、この糖鎖が“コアフコース”という構造を持たない場合、受容体の活性が大きく低下することが報告されている。そこで、新規TGF-βシグナル制御法を開発を目指し、コアフコース認識分子の創製とコアフコースの生合成酵素であるα1,6-fucosyltransferase (FUT8)の阻害剤を検討した。コアフコース認識分子の探索には、東京大学・菅教授が開発した“RaPID ディスプレイシステム”を用いた。一方、FUT8阻害剤の開発には、High-throughput screening を用いた阻害剤探索に加えて、基質であるGDP-fucoseのミミック分子の合成を検討した。

4. 研究成果

(1) TGF-βシグナル下流のリン酸化タンパク質であるリン酸化 Smad2 認識分子の創製

鑄型として SpSMpS を用いて、鑄型誘起合成を行い、この配列を認識するペプチドを得た。得られたペプチドと鑄型の親和性を ITC により調べたところ、解離定数は 10 μM 程度であり、エントロピー駆動の吸熱的な相互作用であることが分かった。さらに、鑄型との親和性向上を狙い、得られたペプチドの環化による配座固定を行った。現在得られた化合物とリン酸化 Smad2 の親和性を検証中である。

(2) TGF受容体の翻訳後修飾糖鎖に注目したシグナル制御法の開発

コアフコース認識分子の探索のために、ビオチン標識したコアフコース含有 8 糖を合成した。コ

アフコース非含有 7 糖を出発物質とし、FUT8 を用いてコアフコース構造を持つ糖鎖を合成し、これにリンカーを介してビオチンを導入した。また、コントロールとして用いるコアフコース非含有 7 糖にもビオチンを導入した。これらを用いて RaPID システムによるコアフコース構造認識ペプチドの探索を行った。その結果、目的のコアフコース認識ペプチドは得られなかったが、RaPID システムによる糖鎖認識ペプチドの探索には固相に担持する糖鎖の導入量を増やす、糖鎖のコンフォメーションを固定するなどの工夫が必要であるという指針を得た。

FUT8 阻害剤の開発においては、まず、High Throughput Screening による探索を試みた。まず、FUT8 による酵素反応を行い、生成する GDP を抗 GDP 抗体を用いた蛍光偏光により定量するアッセイ系を構築した。本アッセイ系は、良好な再現性を示し、本系を用いて、約 33000 化合物のライブラリに対してスクリーニングを行った。その結果、8 個の阻害剤が得られ、このうち、5 個の化合物には共通構造が含まれていた。そこで、その類縁体を用いて構造活性相関を行うことで、IC₅₀ が数 μM 程度の FUT8 阻害剤を見出した。また、阻害剤として、FUT8 の基質である GDP-Fucose のミミック分子のライブラリをアルキンとスルホンアジドから合成する計画を立てた。フコース構造含有アルキンとグアニン含有スルホンアジドを用いたカップリング反応を検討した。本反応は反応条件を変えることで、様々な生成物を与えることが報告されており、種々検討を行うことで、トリアゾール誘導体、スルホンアミド誘導体、アミジン誘導体の合成に成功した。このように、合成の最終段階で反応条件により複数の化合物を作り分けるといった新規な多様性指向型の合成戦略を提唱することができた。さらに得られた化合物は数十 μM 程度で FUT8 阻害活性を示した。これは、電荷を持たない GDP-Fucose 誘導体で fucosyltransferase 阻害活性を持つ初めての例である。

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 7 件)

1. Zhou, J.; Manabe, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K. Efficient synthesis of the disialylated tetrasaccharide motif in *N*-glycan via an amide protection strategy. *Chem. Asian. J. in press*.
2. Manabe, Y.; Chang, T.-C.; Li, H.-S.; Terao, N.; Takamatsu, S.; Tanemura, M.; Miyoshi, E.; Fukase, K. Synthesis of the Conjugates of Tumor Antigens with Adjuvants for the Efficient Cancer Immunotherapy. *Peptide Science* **2015**, 77-78.
3. Manabe, Y.; Kitawaki, Y.; Nagasaki, M.; Fukase, K. Matsubara, H.: Hino Y.; Fukuyama, T.; Ryu, I. Revisiting Bromination of C-H Bonds with Molecular Bromine Using a Photo-Microflow System. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 12750.
4. Salmasan, R. M.; Manabe, Y.; Kitawaki, Y.; Chang, T.-C.; Fukase, K. Efficient Glycosylation Using In(OTf)₃ as a Lewis Acid: Activation of *N*-Phenyltrifluoroacetimidate or Thioglycosides with Halogenated Reagents or PhIO. *Chem. Lett.* **2014**, 43, 956.
5. Uchinashi, Y.; Tanaka, K.; Manabe, Y.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. Practical and Efficient Method for α -Sialylation with an Azide Sialyl Donor Using a Microreactor. *J. Carbohydrate Chem.*, **2014**, 33, 55.

(学会発表)(計 47 件)

1. Development of New Generation Cancer Vaccines: Conjugation of Antigens with Adjuvants. Yoshiyuki Manabe, HaoSheng Li, Kento Tokunaga, Naoko Terao, Shinji Takamatsu, Masahiro Tanemura, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (Center for Learning and Innovation Takeda Pharmaceutical Company Ltd., Osaka), 2016.1.21-22.
2. Kinetically controlled Fischer glycosylation using acidic silica-gel under fluidic conditions. Seiji Masui, Yoshiyuki Manabe, Atsushi Shimoyama, Takahide Fukuyama, Ilhyong Ryu, Koichi Fukase, PACIFICHEM2015, Hawaii, the U.S., 2015.12.15-20.
3. A Novel Approach in Cancer Immunotherapy: Using Synthetic α -gal Epitope to Increase the Immunogenicity of Tumor Antigens. HaoSheng Li, Yoshiyuki Manabe, Kento Tokunaga, Naoko Terao, Shinji Takamatsu, Masahiro Tanemura, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, PACIFICHEM2015, Hawaii, the U.S., 2015.12.15-20.
4. Development of Novel Tumor Vaccine Using Synthetic α -Gal as an Adjuvant. Yoshiyuki Manabe, HaoSheng Li, Kento Tokunaga, Naoko Terao, Shinji Takamatsu, Masahiro Tanemura, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, the 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13), Kyoto, 2015.11.9-13.
5. Fully synthetic self-adjuvanting antitumor vaccine candidate consisting of N-modified TriSTn antigen combined with lipopeptide and T-helper-cell-epitope. CHANG, Tsung-che; MANABE, Yoshiyuki; FUJIMOTO, Yukari; FUKASE, Koichi, the 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13), Kyoto, 2015.11.9-13.
6. High throughput screening and synthetic study of Fut8 inhibitors. Satomi Kasahara,

- Yoshiyuki Manabe, Shinji Takamatsu, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) (SFG-JSCR 2014), Honolulu Hawaii, 2014.11.16-19.
7. Efficient Glycosylation Using In(OTf)₃ as an Acid Catalyst for The Activation of N-Phenyltrifluoroacetimidate or Thioglycosides, Yuriko Kitawaki, Yoshiyuki Manabe, Regina M. Salmasan, Tsung-Che Chang, Koichi Fukase, The Ninth International Symposium on Integrated Synthesis (ISIS9) , Hyogo, Japan, 2014.11.14-15.
 8. An Efficient Synthesis of α -Gal epitope. Kento Tokunaga, Yoshiyuki Manabe and Koichi Fukase, The Ninth International Symposium on Integrated Synthesis (ISIS9), Hyogo, Japan, 2014.11.14-15.
 9. Synthetic study of mono- and bi-sialylated saccharides motifs as molecular probes for biological evaluation using efficient alpha-sialylation. Jiazhou Zhou, Guangming Bao, Yoshiyuki Manabe and Katsunori Tanaka, Koichi Fukase, 27th International Carbohydrate Symposium (ICS27), Bangalore, India, 2014.1.12-17.
 10. Synthesis and Bio-imaging study of glycans towards immunoregulation. Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Yoshiyuki Manabe, and Katsunori Tanaka, First Osaka university-EPFL International Symposium, Osaka, 2013.12.2-4.
 11. Synthetic Study of N-glycans Using Efficient Glycosylation. Yoshiyuki Manabe, Jiazhou Zhou, Masahiro Nagasaki, Naoya Minamoto, Katsunori Tanaka, Koichi Fukase, First Osaka university-EPFL International Symposium, Osaka, 2013.12.2-4.
 12. Synthetic Study of N-Glycan Library Using Microflow Reactor, Yoshiyuki Manabe, Jiazhou Zhou, Masahiro Nagasaki, Naoya Minamoto, Katsunori Tanaka, Koichi Fukase, 5th Asia Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG), Khon Kaen, Thailand, 2013.10.16-18.
 13. Efficient Bromination of Benzylic Position Using Photo-Microflow System. Yoshiyuki Manabe, Yuriko Kitawaki, Takahide Fukuyama, Ilhyong Ryu, and Koichi Fukase, The Eighth International Symposium on Integrated Synthesis (ISIS-8), Nara, 2013.11.29-12.1.
 14. Synthesis of N-Glycan Containing Sialic Acid and Core Fucose, Utilizing Microfluidic Reactions, Masahiro Nagasaki, Yosuke Uchinashi, Yoshiyuki Manabe, Katsunori Tanaka and Koichi Fukase, The Eighth International Symposium on Integrated Synthesis (ISIS-8), Nara, 2013.11.29-12.1.
 15. Synthetic Study of Highly Complicated N-glycans, Yoshiyuki Manabe, Jiazhou Zhou, Masahiro Nagasaki, Naoya Minamoto, Katsunori Tanaka, Koichi Fukase, The 8th international conference on cutting-edge organic chemistry in Asia / The 4th new phase international conference on cutting-edge organic chemistry (ICCEOCA-8 / NICCEOCA-4), Osaka, 2013.11.25-28
 16. Synthetic Study of N-Glycan Library Using Microflow Reactor. Yoshiyuki Manabe, Jiazhou Zhou, Masahiro Nagasaki, Naoya Minamoto, Katsunori Tanaka, Koichi Fukase, 5th Asia Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) , Khon Kaen, Thailand, 2013.10.16-18.
 17. Study of N-glycan Using Efficient Glycosylation Under Microfluidic Condition, Yoshiyuki Manabe, Masahiro Nagasaki, Naoya Minamoto, Katsunori Tanaka, Koichi Fukase, 17th European Carbohydrate Symposium, Tel-Aviv, Israel, 2013.7.7-11.

6. 研究組織

(1)研究代表者

真鍋良幸 (MANABE, Yoshiyuki)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号:00632093