

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560445

研究課題名(和文) 転写因子Hes1の振動を制御する小分子化合物

研究課題名(英文) Small molecules that control Hes1 oscillation

研究代表者

上杉 志成 (Uesugi, Motonari)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：10402926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Hes1は細胞分化に重要な転写抑制因子である。Hes1を変調する化合物D8Cを化合物ライブラリーから発見。D8C類縁体176個を合成し、JI051と名づけた化合物がD8Cよりも5倍強い活性を持つことを見いだした。解析によると、JI051はHes1のコリプレッサーTLE1の制御因子であるBit1をミトコンドリアから放出させ、Hes1とTLE1を核外へ追い出すことが分かった。標的決定を行ったところ、ミトコンドリアタンパク質であるProhibitin 2が標的であることが示唆された。JI051はProhibitin 2に結合してHes1を核外へ追い出すことで、Hes1を阻害していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hes1 is a transcriptional repressor that plays an important role in cell differentiation. We previously isolated a potent Hes1 modulator (D8C) through high-throughput screening. A total of 176 D8C derivatives were synthesized and tested for their effects on Hes1-mediated repression. Out of these compounds, JI051 showed a 5-fold improvement in EC50 value as compared to D8C. Our mechanistic analysis revealed that JI051 induces the nuclear export of Hes1 and its corepressor TLE1 with concomitant mitochondrial release of the TLE1 protein regulator, Bit1. Target identification studies highlighted the mitochondrial protein Prohibitin 2 (PHB2) as a target for JI051. The interaction of JI051 with PHB2 appears to increase superoxide production associated with mitochondrial membrane depolarization. These results suggest that JI051 inhibits Hes1 through its PHB2-dependent nuclear export.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：化学プローブ ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

●幹細胞の不均一性

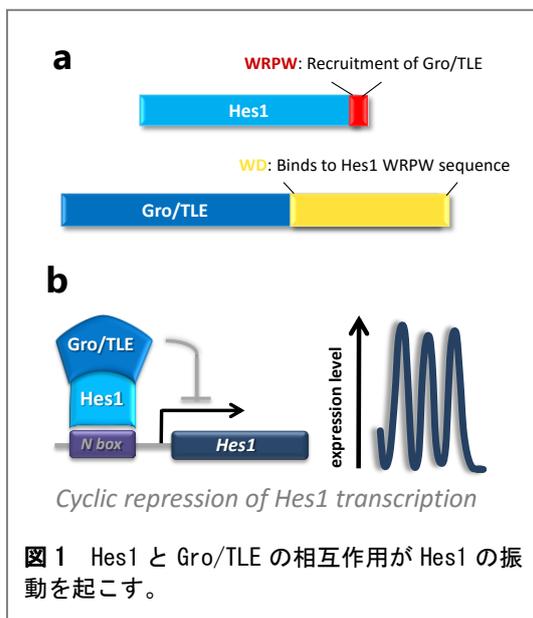
胚性幹(ES)細胞から様々な種類の細胞を分化誘導する方法が確立されている。しかし、いずれの方法においても、ES細胞は均一に分化するのではなく、個々の細胞がバラバラなタイミングで分化する。この様なES細胞分化の不均一性は長年観察されていたものの、そのメカニズムはほとんど分かっていなかった。

●転写因子 Hes1 の振動

連携研究者の影山教授ら(京都大学)は、bHLHファミリーに属する抑制型の転写因子 Hes1 に着目した。その結果、ES細胞や神経幹細胞において、Hes1 の発現量は同じ細胞コロニー内であっても細胞間でバラバラで、約3-5時間の周期で発現が振動(オシレーション)していた[*Genes & Dev.*, 2009; *Neuron*, 2008; *Science*, 2002]。また、Hes1 の発現振動は神経幹細胞の未分化維持に重要であり、振動を止めると分化することが分かった[*Science*, 2013]。Hes1 の発現振動は幹細胞の不均一性と未分化を説明する根本的現象であると考えられる。

●生命の根幹を化学で操作する

転写因子 Hes1 は DNA 結合部位と Trp-Arg-Pro-Trp(WRPW)ペプチド配列からなる転写抑制部位をもつ。この転写抑制部位は、Groucho/TLE という転写抑制タンパク質に結合し、Hes1 の自身の転写を抑制する。このフィードバック機構によって、Hes1 の発現レベルは振動する(図1)。本研究では、Hes1 による転写抑制を化合物で変調することを旨とする。



2. 研究の目的

本研究の目的は、転写因子 Hes1 の振動を制御する小分子化合物を創製し、細胞分化を操作することである。連携研究者の影山教授ら(京都大学)が行った最近の研究によると、抑制型転写因子 Hes1 の発現は幹細胞で振動しており、その振動が未分化状態と幹細胞の不均一性に重要である。その発現振動の原因は、Hes1 自身が Hes1 の転写を抑制していることにある。Hes1 の転写抑制機能を阻害する化合物があれば、Hes1 の振動発現を外部から自在に止めることができる。化合物の添加と洗浄によって Hes1 振動を変調し、幹細胞分化の方向を操作できる可能性もある。また、Hes1 は癌に関わる notch シグナルの最下流であり、癌治療に新しい考え方を提供すると期待できる。

●Hes1 の発現振動を止める化合物の創製

Hes1 の振動を化合物で任意に止める——この目的を達成するために私たちが選択した方法は、Hes1 の転写抑制機能を阻害する化合物を創製することである。私たちは影山らと連携して、化合物ライブラリーのスクリーニングから、Hes1 阻害化合物のプロトタイプをすでに発見した。今後、さらなる検証実験、標的の確定、化合物の最適化を行う。標的と化合物のX線構造解析も行う。

●化合物を利用した分化誘導

Hes1 の振動を化合物で任意に止めることができれば、幹細胞を均一に分化させることが可能だろう。また、化合物を適時添加・洗浄することで、Hes1 の振動を人工的に変調し、分化の方向を自在に制御することも可能かもしれない。

3. 研究の方法

これまでの予備研究により、D8C と名づけたプロトタイプ化合物を見つけ出した。この化合物は Hes1 によるレポーター遺伝子の抑制を解除する。レポーター遺伝子として Hes1 結合サイトを持った luciferase と GFP レポーター遺伝子の両方を用いたが、同様の効果がみられた。IC50 値は 2.5 μ M であり、Hes1 による抑制の約 60% を解除させた。さらに、予備実験によると、D8C は NIH3T3 細胞内で Hes1 プロモーターを持った luciferase と GFP レポーター遺伝子の振動を止めた。この化合物の標的は、Hes1 のコリプレッサーである TLE1 であると予想される。

まずは 26 年度に D8C の合成展開を行い、構造活性相関を得て、より低濃度(nM オーダー)で効果のある誘導体を見つける。その上で、

26年度 27年度に以下の実験を計画した。

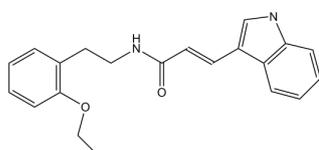
- D8C誘導体の標的確認
- 最適化化合物で幹細胞を分化させる
- Groucho/TLEと最適化化合物との複合体のX線結晶構造解析
- X線結晶構造解析を利用した化合物最適化
- Hes1を高発現している癌細胞への影響

これらの実験は当研究室に所属する博士研究員や企業からの受託研究員（国内留学）が行う。ケミカルバイオロジー、合成化学、細胞生物学、分子生物学の手段を組み合わせることを達成することを計画した。

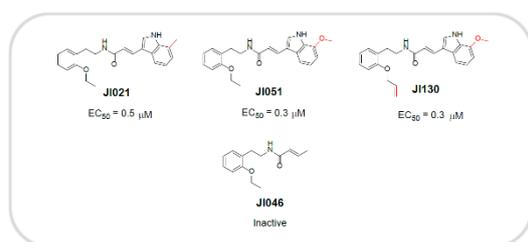
4. 研究成果

●JI051の発見

これまでの研究により、D8Cと名づけたプロトタイプ化合物を見つけ出した。26年度にD8Cの合成展開を行い、構造活性相関を得た。D8C類縁体176個を合成し、JI051と名づけた化合物がD8Cよりも5倍強い活性を持つことを見いだした。この化合物は、低濃度(nMオーダー)でHes1を阻害した。また、Hes転写因子の振動を細胞内で止めることも確認した。



D8Cの化学構造



JI051類縁体の化学構造

●JI051の標的確認

JI051はGroucho/TLEを標的としていると予想された。分子生物学的手法や生化学的手法を用いた実験によりGroucho/TLEとHes1の相互作用への影響を調べたところ、予想外なことに、JI051は総合作用に影響を与えなかった。標的はGroucho/TLEでないと考えられた。

JI051プロローブの合成に成功し、メカニズム

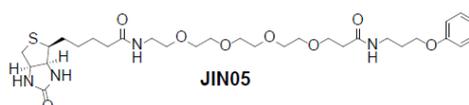
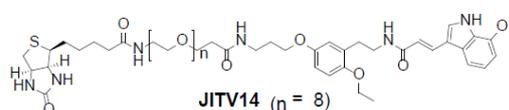
の確認を行った。JI051の構造の中で活性に影響を与えない部分にリンカーを介して光反応性官能基とビオチンを導入し、Groucho/TLEに実際に結合しているのかを調べた。この実験でも、JI051とGroucho/TLEとの相互作用は確認できなかった。予想外なことに、JI051の標的はGroucho/TLEではない可能性が出てきた。JI051の化学構造から考え、標的分子の一つがキナーゼであることが予想されたため、211個のキナーゼへの網羅的な影響を調べた。しかしながら、有望な標的分子を得ることはできなかった。

●予想外のメカニズム

共焦点顕微鏡観察の実験を行っているときにJI051の意外な効果をみいだした。JI051はHes1とそのコリプレッサーTLE1を核外に追い出すことが分かった。JI051のHes1阻害作用は、この核外移行が原因であると考えられる。TLE1の核外への移行はBit1というミトコンドリアタンパク質によって制御されていることが知られている。Bit1を調べたところ、JI051はBit1をミトコンドリアから放出させることがわかった。JI051の作用には、Bit1が関わっていると示唆された。

●標的タンパク質同定

JI051のビオチン化プロローブを利用して、JI051の標的タンパク質を解析した。プロローブに結合するタンパク質を精製し質量分析により解析した結果、ミトコンドリアタンパク質であるProhibitin 2 (PHB2)が標的であることが示唆された。Flag-PHB2を細胞に発現させると、光応答性JI051プロローブが細胞内でFlag-PHB2に反応することが示された。また、この反応は過剰のJI051によって競合阻害された。細胞内でJI051がPHB2に直接結合していると考えられる。また、JI051プロローブとPHB2は細胞内でCo-localizeしていることも共焦点顕微鏡で確認できた。



JI051 ビオチン化プロローブとコントロールプロローブの化学構造

●ミトコンドリアへの影響

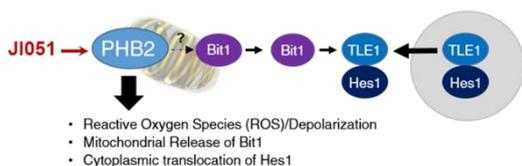
PHB2はミトコンドリアの恒常性に重要なタンパク質である。JI051のミトコンドリアへの影響を調べたところ、JI051はミトコンドリア

の膜を脱分極させることがわかった。

● siRNA ノックダウン実験

siRNAにより PHB2を60%ノックダウンした。PHB2をノックダウンすると、JI051によるHes1の核外追い出しが弱くなった。PHB2がJI051の標的である可能性が高い。

JI051はPHB2に結合してミトコンドリアの状態を変調させ、Bit1をミトコンドリアから放出させ、Hes1を核外へ追い出すことで、Hes1を阻害していると考えられる。



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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上杉 志成 (UESUGI, Motonari)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点
・教授

研究者番号: 10402926

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

影山 龍一郎 (KAGEYAMA, Ryoichiro)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号: 80224369