

## フシコッカンジテルペン誘導体による 14-3-3 タンパク質の機能変調:

## 14-3-3 タンパク質は創薬標的になり得るか?



研究ノート

樋口 雄介\*, 加藤 修雄\*\*

Modulation of 14-3-3 protein functions by fusicoccane diterpenoids

Key Words : 14-3-3 Proteins, Fusicoccane Diterpenoids, Protein-protein Interactions

## はじめに

バイオ医薬、核酸医薬の将来や再生医療への期待が語られる時代にあって、小分子医薬は旧来型の一言で切り捨てられつつある。しかし、多くのクライアントとタンパク質間相互作用 (PPI) している多機能タンパク質の特定の PPI だけを制御するには、やはり、小分子を用いるのが将来に亘って現実的選択であろう。そうした観点からの PPI 阻害剤開発が盛んに行われている。筆者の一人も、Wnt シグナルの最下流にあって増殖と分化のスイッチングに関与している p300 の特定の PPI に対する阻害剤を見出し、胚性幹細胞の多能性を維持することを報告した<sup>(1)</sup>。一方、ヒト細胞中において約 200 種のクライアントと PPI をもち、多様な細胞内信号伝達経路に関与している 14-3-3 タンパク質 (以下、14-3-3) に対する阻害剤開発の有用性も提唱されている<sup>(2)</sup>。

しかし、筆者らは 14-3-3 PPI 阻害剤の有用性には

疑念を持つ。p300 と 14-3-3 は共に多くの PPI に関与するが、両者には決定的な相違がある。前者がマルチドメイン-マルチクライアント型であるのに対して、後者はシングルドメイン-マルチクライアント型である点である。したがって、p300 の特定ドメインに対する阻害は選択性を持ち得るが、14-3-3 のドメイン阻害は、その全ての PPI を阻害することを意味し、選択性の付与は困難である。それでは、14-3-3 は創薬標的にはできないのだろうか? 筆者らは可能だと考える。PPI の変調には、阻害的と増強的の 2 つの方向性があるはずで、後者は如何なる PPI に対しても選択性を持ち得るからである。

本稿では、フシコッカンジテルペン誘導体を用いた 14-3-3 PPI の安定化について、筆者らが得た知見を中心に報告する。

## フシコッカンジテルペノイドの 14-3-3 PPI 安定化能

代表的なフシコッカンジテルペノイドであるフシコクシン (FC) とコチレニン (CN) は (図 1)、植物に対して、発芽誘起、気孔開孔などの活性を持つ。ス様な FC/CN の植物ホルモン様活性は植物細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の活性化に起因している。2003 年、その分子機構が X 線結晶構造解析 (図 2) によって明らかにされた<sup>(3)</sup>。H<sup>+</sup>-ATPase は C 端から 2 番目の Thr がリン酸化され 14-3-3 に捕捉されることで活性化する。FC/CN は、14-3-3/H<sup>+</sup>-ATPase が形成する空隙に嵌ることで会合状態を安定化し、H<sup>+</sup>-ATPase の持続的活性化をもたらしている。すなわち、FC/CN は H<sup>+</sup>-ATPase との 14-3-3 PPI に対する増強/安定化剤として機能している。

## フシコッカニ誘導体の抗腫瘍活性

14-3-3 は植物のみならず、酵母からヒトに至る真核細胞生物に普遍的に発現しており、生物種を越え



\*Yusuke HIGUCHI

1983年7月生  
大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻  
博士後期課程 (2011年)  
現在、大阪大学 産業科学研究所 助教  
博士(理学) 創薬化学、化学生物学  
TEL : 06-6879-8471  
FAX : 06-6879-8474  
E-mail : higuchi@sanken.osaka-u.ac.jp



\*\*Nobuo KATO

1951年6月生  
東北大学大学院 理学研究科 化学第二  
専攻 博士後期課程 (1979年)  
現在、大阪大学 産業科学研究所 教授  
理博 医薬品化学、天然物化学  
TEL : 06-6879-8470  
FAX : 06-6879-8474  
E-mail : kato-n@sanken.osaka-u.ac.jp

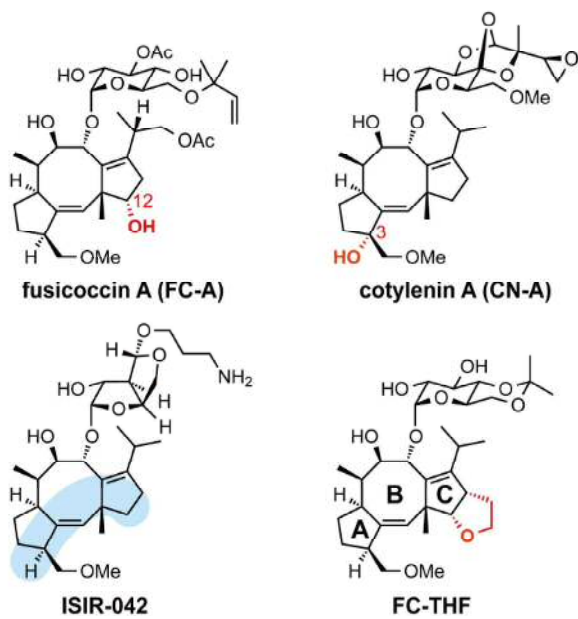


図1 天然フシコッカシテルペノイドおよび半合成化合物。ISIR-042の水色背景は図2のような会合状態においてリン酸化ペプチドと接触する領域を表す。

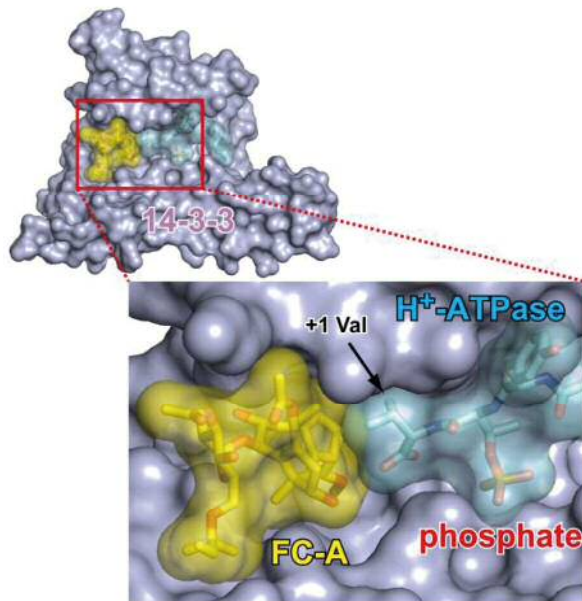


図2 14-3-3 / H<sup>+</sup>-ATPase の C 端リン酸化ペプチド / FC-A の 3 者会合体の結晶構造 (PDB ID: 109F)。左上図は全体構造。右下図はリン酸化ペプチドと FC-A のインターフェース領域。

て配列・構造が高度に保存されている。したがって、FC/CN には動物細胞に対しても 14-3-3 PPI の安定化に起因する活性が期待された。本間 (島根大医) らとの共同研究の結果、CN-A がインターフェロン  $\alpha$  との併用により、多くの固形癌にアポトーシス

を誘導し、ほぼ完璧に腫瘍増殖を抑制することを明らかにした<sup>(4)</sup>。FC-A も同様の活性を示すことが他研究グループによって確認されている<sup>(5)</sup>。さらに構造活性相関研究を展開した結果、ISIR-042 は、天然 FC/CN には見られないハイポキシア (低酸素濃度) 環境選択的な細胞毒性を持つことも明らかになった。ハイポキシアは成長した腫瘍内部特有の環境であり、したがって、ハイポキシア選択的細胞毒性を持つ ISIR-042 は腫瘍選択的抗癌剤としての医薬応用が期待できる<sup>(6)</sup>。

### 動物細胞中でのフシコッカシ誘導体の標的

FC/CN の抗癌作用機序を 14-3-3 PPI の安定化に帰結できるかは未だ確定できていない。ただ、確度の高い状況証拠はある。大神田 (現、京大化研) らは、ISIR-042 から求電子反応点を含む側鎖末端に蛍光基を配した 042-BODIPY を創製し、細胞内標的を蛍光標識化する手法を適用した<sup>(7)</sup>。まず、*in vitro* において、042-BODIPY が H<sup>+</sup>-ATPase の C 端ペプチド (ETIQQSY-pT-V-COOH) が共存する時のみ 14-3-3 を効率良く標識化することを確認した。この事実、図2類似の3者会合体形成が標識化に必要であることを示している。さらに、042-BODIPY を加えた培地中でヒト単球系細胞 (U937) を培養し、細胞中で 14-3-3 が選択的に標識化されることを明らかにした。リン酸化シグナルを亢進する forskolin 添加時に効率良い標識化が進行したことは、動物細胞中でもリン酸化依存的 14-3-3 PPI が FC/CN の標的であることを強く示唆する結果である。

### ペプチド配列に対する選択性

042-BODIPY による 14-3-3 の標識化は 3 者会合体が安定であるほど効率良く進行する。したがって、標識効率から FC 誘導体の 14-3-3 PPI に対するペプチド配列選択性を見積もることができる。+1 位 (X) が異なる 20 種類の RSH-pS-XP-COOH 配列を用いた結果、X=Ile, Val, Cys, Leu, Met, Lys, Thr, Arg の場合に効率良い標識化が進行し、ISIR-042 骨格が中程度の嵩高さを持つ +1 位残基選択性を持つことを明らかにした<sup>(7)</sup>。十分ではないが、FC 誘導体を用いることで、冒頭で述べたシングルドメインマルチクライアント型の 14-3-3 PPI の選択的変調が可能であることを示す結果である。

増殖シグナルである MAP キナーゼ経路に介在する c-Raf には、14-3-3 との会合でシグナルを活性化するリン酸化サイト ( $^{618}\text{RSA-pS-EPSSL}^{625}$ ) と、不活性化する2つのサイト ( $^{230}\text{HRY-pS-TPHA}^{237}$  および  $^{256}\text{RST-pS-TPNV}^{263}$ ) が存在する。CN-A が後者 PPI のいずれをも安定化する一方で、前者 PPI は安定化できないことも明らかにした<sup>(8)</sup>。すなわち、CN-A は MAP キナーゼ増殖シグナルには阻害的に働くことを意味し、抗癌活性との関連を示唆する。

### Mode III 型配列選択的安定化：FC-THF

14-3-3 が捕捉する代表的なペプチド配列には、c-Raf のように +2 Pro 以降にもペプチド鎖が伸長する internal 配列 (Mode I 型) と、 $\text{H}^+$ -ATPase のように +1 位が C 端になる terminal 配列 (Mode III 型) がある。ヒト細胞中には約 200 種の 14-3-3 クライアント配列が存在するが、Mode III 型の数は限られている。そこで、Mode III 選択的な 14-3-3 PPI 安定化能の発現を期待し、FC 骨格にさらに THF 環を縮環した FC-THF を創製した。FC-THF は予想通り完全な Mode III 選択性を示し、Mode I 型ペプチドとの 14-3-3 PPI は全く安定化しないことを確認した。

Mode III 型クライアントとして、膜電位の形成に重要な役割を担う漏洩  $\text{K}^+$ -チャネル・TASK1, 3 がある。14-3-3 はその膜移行を制御し、PPI 安定化により TASK1, 3 の膜への輸送が促進されることが期待される。実際に、FC-THF はアフリカツメガエル卵母細胞の TASK1, 3 強制発現系において、いずれの TASK に対しても膜発現量を 1.5 倍程度増加させた。

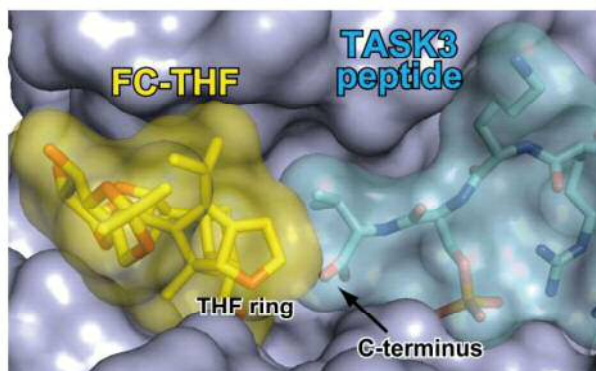


図3 14-3-3 / TASK3 の C 端リン酸化ペプチド / FC-THF の結晶構造 (PDB ID: 3SPR)。

特定の 14-3-3 PPI を意図的に安定化し、期待する表現型を得たという意味では初例である<sup>(9)</sup>。結晶構造解析 (図3) によっても、意図したように THF 環が +1 から +2 への伸長方向に張り出しており、FC-THF の Mode III 選択性を良く説明できる。

### おわりに

14-3-3 PPI の数は極めて多く、その全てを選択的に安定化することは困難であるが、CN-A は担癌マウスモデルにおいても極めて良好な結果を与えている。本稿に記載したモデルペプチドを用いた結果よりも選択的な PPI 安定化が生じているのかもしれない。そのことを明らかにするには、活性発現に参与している 14-3-3 PPI におけるクライアントを特定する必要がある。現在、14-3-3 は創薬標的になり得るとの信念を持って鋭意検討中である。

### 参考文献

- (1) Higuchi, Y.; Nguyen, C.; Yasuda, S. Y.; McMillan, M.; Hasegawa, K.; Kahn, M. *Curr. Mol. Pharmacol.*, **2015**, May 26 [Epub ahead of print].
- (2) Aghazadeh, Y.; Papadopoulos, V. *Drug Discov. Today*, **2016**, *21*, 278-287.
- (3) Würtele, M.; Jelich-Ottmann, C.; Wittinghofer, A.; Oecking, C. *EMBO J.*, **2003**, *22*, 987-994.
- (4) Honma, Y.; Kasukabe, T.; Yamori, T.; Kato, N.; Sassa, T. *Gynecol. Oncol.*, **2005**, *99*, 680-688.
- (5) de Vries-van Leeuwen, I. J. *et al. Cancer Lett.*, **2010**, *293*, 198-206.
- (6) Kawakami, K. *et al. Anticancer Agents Med. Chem.*, **2012**, *12*, 791-800.
- (7) Takahashi, M.; Kawamura, A.; Kato, N.; Nishi, T.; Hamachi, I.; Ohkanda, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2012**, *51*, 509-512.
- (8) Molzan, M.; Kasper, S.; Röglin, L.; Skwarczynska, M.; Sassa, T.; Inoue, T.; Breitenbuecher, F.; Ohkanda, J.; Kato, N.; Schuler, M.; Ottmann, C. *ACS Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 1869-1875.
- (9) Anders, C.; Higuchi, Y. *et al. Chem. Biol.*, **2013**, *20*, 583-593.