

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

# 標的タンパク質のリン酸化誘導分子

氏名 境 太希

### 【研究背景、目的】

タンパク質リン酸化は主に細胞内シグナル伝達において重要な役割を担う翻訳後修飾である。関連酵素であるキナーゼならびにホスファターゼは、それぞれ基質のリン酸化と脱リン酸化を触媒し、その機能や構造、局在などの特性の変化が、リン酸化シグナルの緻密な制御を可能にしている。リン酸化シグナル経路は、一つの外部刺激がキナーゼを含む種々の関連タンパク質群によって何倍にも増幅され、多種多様な生体応答を引き起こす。そのため、生体内キナーゼの下流基質タンパク質は、複数存在することが多い。現在までのリン酸化シグナル解析は、主にキナーゼやホスファターゼの遺伝子的な発現制御や選択的阻害剤を用いて行われてきた。しかしながら、前述した理由により特定のキナーゼを選択的に制御した場合においても下流の複数の基質タンパク質全てが影響を受けるために、単一のシグナル解析は困難である（図 1）。生細胞中において特定の基質タンパク質のリン酸化を選択的に誘導することのできる

化学的手法はこれまでに報告がなく、これがリン酸化シグナル解析における足枷となつてい  
ると考えられる。また、当該手法の開発は、リン酸化機構の破綻が原因とされる疾患を標的とした新規治療戦略への展開も期待できる。

筆者は、研究基盤とするキナーゼとして、生体内にて主に代謝系調節に関わっている AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) に着目した。AMPK はセリン/スレオニンキナーゼとして分

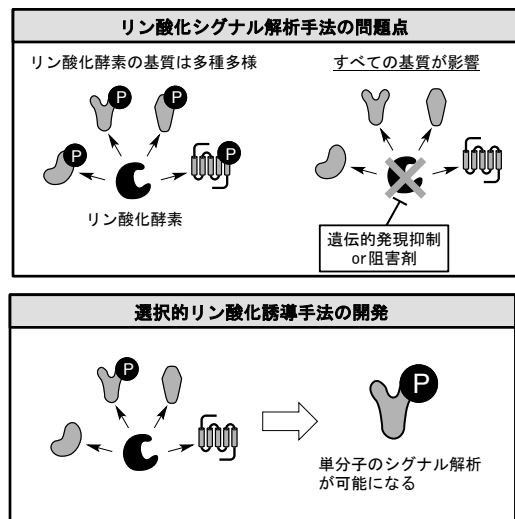


図 1. リン酸化シグナル制御

類され、エネルギー状態の変化に応じた種々のシグナルを受信し、下流基質タンパク質をリン酸化することで、生体内のエネルギー恒常性を維持している（図2）。AMPKは種々のシグナルを統合する“シグナリングハブ”として機能するキナーゼであり、数多くの下流基質をリン酸化制御する。筆者は今回、「キナーゼ下流基質の選択的なリン酸化を誘導する手法」の一端としてAMPKを題材として選び、個々のAMPK基質を選択的にリン酸化誘導可能な化学的手法の開発を目指した。

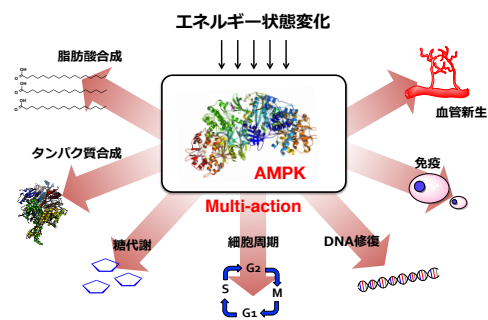


図2. AMPKの機能多様性

また、AMPKの活性化は、糖尿病、脂質異常症、がんなど種々の疾患治療につながる事が示唆されている。そのため、数多くのAMPK活性化剤がこれらの疾患治療を指向して研究開発されてきた。しかしながら、AMPK自体の活性化によっては、AMPK下流基質が非選択的にリン酸化されうするため、特定の基質タンパク質に基づく狙った治療効果を最大限に引き出す事はできないと予想される。また、AMPK活性化剤には多数の副作用が報告されており、これは治療効果に関わる基質以外の基質のリン酸化が原因である可能性がある。すなわち、AMPK下流の個々の基質の選択的リン酸化誘導は、AMPK活性化による狙いの治療効果を最大限に引き出すこと、またAMPK活性化に由来する副作用の軽減につながる事が期待される。

### 【作業仮説、分子設計】

私は、キナーゼと標的タンパク質との会合を促進することで、選択的なリン酸化が誘導されるのではないかと仮説を立てた。そのような機能を有する分子として、図に示すような分子を考案した。すなわち、AMPK親和性リガンドと標的タンパク質親和性リガンドとをリンカーにて連結させた分子を選択的リン酸化誘導分子として設計した。AMPKと標的タンパク質に対して親和性を示すこの分子は、両タンパク質同士の近接を促すアダプターとしての機能を示し、効率的にかつ標的タンパク質選択的なリン酸化を誘導することが期待される。標的タンパク質としては、脂質合成系に関わるAMPK下流基質であるアセチルCoAカルボキシラーゼ（ACC）とHMG-CoAリダクターゼ（HMGR）に着目し、これらのタンパク質に対するリン酸化を誘導する分子の創製に挑んだ。

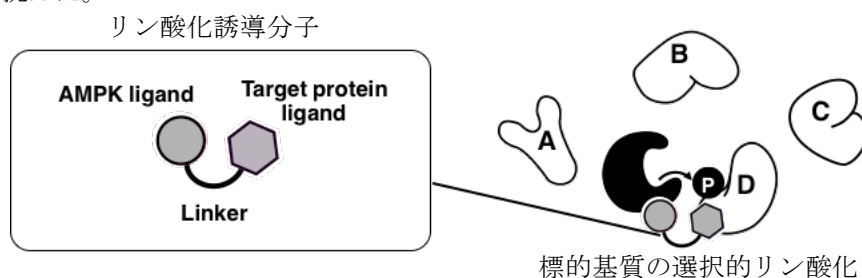


図2. リン酸化誘導分子のコンセプト

## 【結果】

具体的には、AMPKに直接結合し、そのキナーゼ活性を向上させる機能を有するリガンドと標的タンパク質 (ACC、HMGR) に対してそれぞれ高い親和性を示すリガンドをそれぞれ選択し、それらをポリエチレングリコールリンカーにて連結させた分子を設計した (図3)。

実際にリンカー長の異なる ACC リン酸化誘導分子 2 種 (AA3、AA5)、HMGR リン酸化誘導分子 3 種 (HA3、HA4、HA5) を合成し、その生物活性を評価した (表1)。

まず、各リン酸化誘導分子の AMPK、標的タンパク質に対する活性を評価した。その結果、合成したすべてのリン酸化誘導分子は AMPK に対し、活性化能を示した。

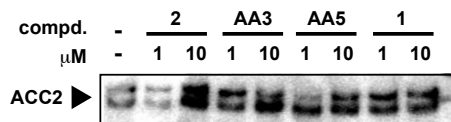
さらに、ACC リン酸化誘導分子は、ACC に対し、HMGR リン酸化誘導分子は HMGR に対しそれぞれ阻害活性を示した。これらの結果より、合成したリン酸化誘導分子は AMPK、標的タンパク質の双方に結合し、かつ AMPK の持つキナーゼ活性を向上させる機能を示すことが示唆された。

表 1. リン酸化誘導分子の対象タンパク質に対する活性

compound	n	AMPK( $\alpha1/\beta1/\gamma1$ ) EC <sub>200</sub> ( $\mu$ M)	AMPK( $\alpha2/\beta1/\gamma1$ ) EC <sub>200</sub> ( $\mu$ M)	ACC IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	HMGR IC <sub>50</sub> (nM)
AA3	2	0.21	11	6.5	-
AA5	4	0.55	48	3.0	-
HA3	2	5.4	8.9	-	2.5
HA4	3	6.6	1.3	-	2.3
HA5	4	8.9	4.1	-	2.8

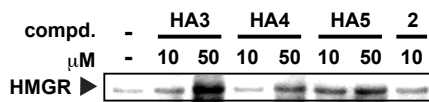
次にこれらリン酸化誘導分子の標的タンパク質に対するリン酸化誘導活性を評価した。精製タンパク質を利用した評価系を構築し、その活性を評価したところ、リン酸化誘導分子はコントロールと比較して効率的に各標的タンパク質に対するリン酸化を誘導した (図4)。

### ■ ACC リン酸化誘導活性評価



conditions: 8 ng/ $\mu$ L AMPK  $\alpha1/\beta1/\gamma1$ , 18 ng/ $\mu$ L ACC2,  
800  $\mu$ M ATP, 37 °C, 2 h reaction

### ■ HMGR リン酸化誘導活性評価



conditions: 8 ng/ $\mu$ L AMPK  $\alpha2/\beta1/\gamma1$ , 20 ng/ $\mu$ L HMGR,  
1 mM ATP, 37 °C, 2 h reaction

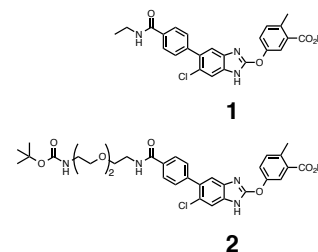
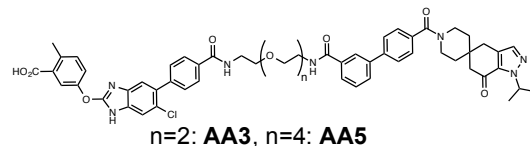


図 4. リン酸化誘導活性評価 (ACC、HMGR)

さらに、標的タンパク質選択的なリン酸化誘導活性を評価するため、精製タンパク質、また

### ACC リン酸化誘導分子



### HMGR リン酸化誘導分子

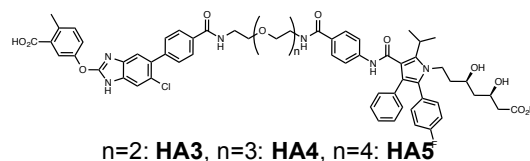


図 3. 合成したリン酸化誘導分子

は細胞破碎液を利用した評価系を構築した。まず、精製タンパク質系における標的選択性を評価したところ、リン酸化誘導分子 **AA3**、**HA3** はリガンド連結構造を持たない AMPK 活性化剤 **2** と比較して、選択的なリン酸化誘導活性を示した (図 4 左)。つづいて、さらなる高次の評価として細胞破碎液中におけるリン酸化誘導活性を評価した (図 4 右)。その結果リガンド連結構造を持たない AMPK 活性化剤 **1** は AMPK 下流基質 3 種 (ACC、FOXO3a、Raptor) のリン酸化を亢進させた。対して、ACC リン酸化誘導分子 **AA3** は FOXO3a、Raptor のリン酸化はほぼ亢進させず、ACC 選択的なリン酸化誘導活性を示した。この結果より、合成したリン酸化誘導分子は多種多様なタンパク質が混在する系においても標的タンパク質に対して選択的なリン酸化を誘導することが明らかとなった。

■ 基質選択性評価 (精製タンパク質系)

■ 基質選択性評価 (細胞破碎液系)

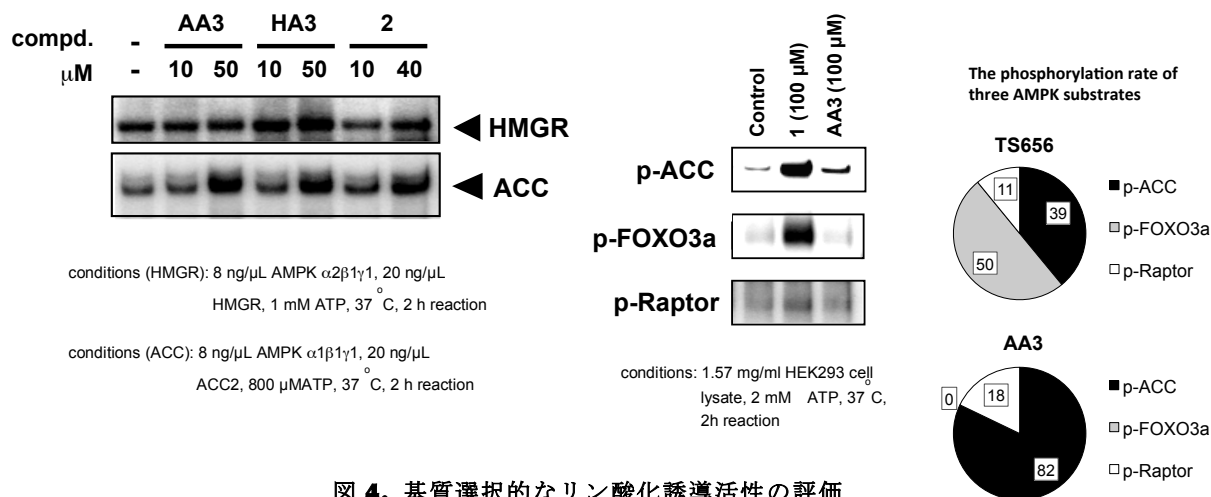


図 4. 基質選択的なリン酸化誘導活性の評価

【結論】

私は、標的タンパク質に対する選択的なリン酸化を誘導する化学的手法の開発を目指し、リガンド連結構造を有するリン酸化誘導分子を設計、合成した。合成したリン酸化誘導分子は、対象キナーゼと標的タンパク質に対して結合能を示す事、また標的タンパク質に対してリン酸化誘導活性を示すことを明らかとした。さらにその基質選択性について、精製タンパク質系、細胞破碎液系にて評価したところ、リン酸化誘導分子は標的基質選択的なリン酸化誘導活性を示した。すなわち、本研究によって「キナーゼと標的タンパク質との近接効果によりリン酸化が優先的に誘導される」というコンセプトの妥当性を証明することができたと考えている。

多数の下流基質を有するキナーゼの基質選択性を変化させうる化学的手法はこれまでに報告がなく、本手法はリン酸化シグナル解析を始めとする分子生物学研究やリン酸化シグナル制御を指向した創薬化学研究分野におけるブレークスルーとなる可能性がある。