

Title	14-3-3タンパク質が関与するタンパク質-タンパク質間相互作用に対するフシコクシン誘導体の安定化効果：3-アミノフシコクシンの創製とその機能評価
Author(s)	米山, 徹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59528
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (米山 徹)

論文題名

14-3-3タンパク質が関与するタンパク質-タンパク質間相互作用に対するフシコクシン誘導体の安定化効果：3-アミノフシコクシンの創製とその機能評価

論文内容の要旨

14-3-3タンパク質は、その標的タンパク質をリン酸化依存的に捕捉し複合体を形成(14-3-3 PPI)することで細胞内信号伝達系を制御している。ジテルペン配糖体・フシコクシン(FC)は、14-3-3 PPIを安定化することで種々の生理活性を発現すると考えられている。そして、FCアグリコン部のヒドロキシ基の置換パターンによって生理活性が異なるのは、パターンごとに、安定化できるリン酸化タンパク質中の14-3-3認識部位の配列が異なるため、との仮説が提唱されている。本論文では、アグリコン部のヒドロキシ基の置換パターン(構造)と14-3-3 PPIに対する安定化能(機能)との相関を明らかにするとともに、新奇なペプチド配列選択性を持つFC誘導体の創製を研究目的とした。

第2章では、糖鎖構造を統一し、アグリコン構造のみが異なる各種FC誘導体の14-3-3 PPIに対する安定化効果を、14-3-3認識配列の*i*+1位アミノ酸選択性、ならびに、*i*+2 Proを有するmode 1型と*i*+1位をC端とするmode 3型認識配列に対する選択性の観点から、蛍光偏光法(FP)により網羅的に評価した。その結果、FC類は、1) いずれも*i*+1位に疎水的かつ中程度の嵩高さを持つペプチド配列に高い安定化効果を示し、2) いずれもmode 3型をより安定化するが、3) アグリコン3位もしくは12位にヒドロキシ基を有する誘導体にその傾向が顕著であり、4) 特に**FC-THF**は完全なmode 3選択性を持つこと、などを明らかにした。

第3章では、上述1)のようなFC誘導体に共通して見られる*i*+1位選択性とは異なる選択性を期待し、3-アミノフシコクシン(**3NH₂**)を設計し、3位C-Hに対する直接アミノ化法の適用により、その効率的合成を達成した。しかし、14-3-3 PPIに対する安定化効果は著しく低下した。その原因を分子動力学(MD)シミュレーションによって解析した結果、いずれもプロトン化している14-3-3のFC結合部位近傍に存在するLys120の側鎖末端と3位アミノ基の電荷反撥が理由であることが示唆された。その電荷反撥を解消すべく、Lys120をGlnやGluに点変異導入した14-3-3と各種ペプチドに対する**3NH₂**の安定化効果を評価した。その結果、定性的ではあるが、電荷反撥さえ解消できれば、**3NH₂**は14-3-3 PPIに対する安定化能を持ち得ること、ならびに、そのペプチド選択性が従来のFC誘導体とは異なり得る可能性を明らかにした。さらに3位アミノ基を修飾した12種類の誘導体を合成し、3位に尿素基を持つ誘導体(**3urea**)が、弱いながら天然型FC誘導体と同様のペプチド配列選択性を持つことを見出した。

以上、FC類の生物活性の作用機序解明や標的探索に対して重要な基礎的情報を提供するとともに、今後の14-3-3 PPI安定化分子の設計に確度の高い予測手法を提案した。

論文内容の要旨 (英訳)

氏 名 (Toru Yoneyama)

論文題名

Stability effects of fusicoccin derivatives on protein-protein interactions between 14-3-3 protein and its client phosphoproteins: Synthesis of 3-amino-fusicoccin derivatives and evaluation of their functions on 14-3-3 PPI.

論文内容の要旨 (英訳)

14-3-3 proteins regulate intracellular signal transductions by forming the binary complex (14-3-3 PPI) with their client phosphoproteins. Fusicoccins (FCs), diterpene glycosides, possess a variety of biological activities through stabilization of 14-3-3 PPIs. It is plausible that the aglycone structure of FC can alter their stabilizing ability towards 14-3-3 recognition peptide sequences in phosphoproteins and, in fact, biological phenotypes vary according to the substituted pattern of FC aglycones. In this thesis, the author aimed to elucidate the structure-function-relationship between the substituted pattern of FC aglycones and their stabilizing effects on 14-3-3 PPI.

In Chapter 2, a series of FC derivatives having a unified sugar moiety and different aglycone structures were synthesized. Their stabilizing ability towards the binary complexes of 14-3-3 and phosphopeptides was evaluated by the fluorescence polarization method (FP) from the viewpoints of $i+1$ amino acid selectivity and selectivity of mode 1 type sequence that has Pro at $i+2$ versus mode 3 type sequence that ends at $i+1$. As a result, it has been clarified that 1) all FC derivatives show higher stabilizing effects when the $i+1$ position is occupied by medium-sized hydrophobic amino acid, 2) and show higher stabilizing effects on mode 3 peptides than on mode 1 peptides, 3) and this tendency is more significant in FCs having a hydroxy group at either 3-position or 12-position of aglycones, 4) and **FC-THF** is a perfect mode 3 selective stabilizer for 14-3-3 PPI.

In Chapter 3, 3-amino-fusicoccin (**3NH₂**), to which novel peptide sequence selectivity has been anticipated, was synthesized efficiently through a direct C-H amination at 3-position of FC aglycone. However, stabilizing ability of **3NH₂** on 14-3-3 PPIs was weakened remarkably. For this unanticipated result, molecular dynamics simulation was carried out, and it has been revealed that the weak stabilizing ability of **3NH₂** is explainable by a repulsive interaction between Lys120 in 14-3-3 and 3-amino group of FC aglycone, both of which are positively charged by protonation in physiological conditions. To confirm this explanation, the stabilization effect of **3NH₂** was evaluated similarly by use of 14-3-3•K120Q and 14-3-3•K120E. Although precise results could not be obtained because of the weakened association ability of mutated 14-3-3s towards phosphopeptides, it has been suggested that **3NH₂** could gain stabilizing ability on 14-3-3 PPI if the repulsive interaction can be avoided. In fact, a urea derivative of **3NH₂** showed weak stabilization effects on the binary complex of 14-3-3 with several phosphopeptides.

These results will contribute to the elucidation of the mechanism of action and target identification of biological activities of FCs.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (米 山 徹)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	加 藤 修 雄
	副 査	教授	深 瀬 浩 一
	副 査	教授	中 谷 和 彦
<p>本論文は、14-3-3 タンパク質とそのクライアントであるリン酸化タンパク質とのタンパク質間相互作用 (PPI) を安定化することで生物活性を発現するジテルペン配糖体・フシコクシン (FC) のアグリコン構造と PPI 安定化能との構造-機能相関の詳細を解析するとともに、新規化合物である 3-アミノフシコクシンの創製とその機能解明を目的として展開した研究成果を纏めたものである。</p> <p>まず、14-3-3/リン酸化タンパク質/FC 三者複合体構造を解析し、FC アグリコン部が 14-3-3 結合性リン酸化タンパク質のリン酸化部位から C 端側に 1~2 残基目 ($i+1$, $i+2$ 位) のアミノ酸と相互作用することに着目し、$i+1$, $i+2$ 位のアミノ酸配列と FC アグリコン部の置換パターンとの相関解析を遂行した。すなわち、$i+1$ 位を C 端とする mode 3 型およびその $i+2$ 位に Pro が連結した mode 1 型の 14-3-3 認識配列ペプチド 40 種と 14-3-3ζ の二者複合体に対する、アグリコン部の置換パターンのみが異なる FC 誘導体 12 種の PPI 安定化能を、蛍光偏光解消法によって網羅的に解析した。その結果、FC 類のアポ 14-3-3 に対する解離定数が従来報告されている値よりはるかに大きいことや、提唱されていた仮説の訂正を含め FC アグリコン部の置換パターンによって $i+1$ 位アミノ酸選択性や mode 1/mode 3 選択性が異なることを明らかにした。</p> <p>アグリコン部の置換パターンがリン酸化ペプチド選択性をもたらすという上記の結果を踏まえ、これまで知られている FC 誘導体とは異なるリン酸化ペプチドのアミノ酸配列選択性を持ち得ることを期待し、3-アミノフシコクシン ($3NH_2$) およびその誘導体の創製を行った。$3NH_2$ はアグリコン 3 位への C-H アミノ化、その生成物である環状スルファミデートのメトキシドによる S_N2 開環反応を鍵段階とする経路により、天然 FC から 9 段階、総収率 24% で合成することに成功した。しかし、期待に反し 14-3-3 PPI に対する $3NH_2$ の安定化能は著しく減弱することが明らかとなった。学位申請者は、その理由を明らかにすべく、分子動力学シミュレーション解析を行い、$3NH_2$ の 3 位アミノ基と 14-3-3ζ の Lys120 側鎖末端間の静電反発が要因であることを示した。電荷反発の解消を目的に、アミド型および尿素型の N-置換-$3NH_2$ 誘導体を合成し、その機能評価も行った。従来の FC 誘導体を示す安定化効果には劣るものの、唯一尿素型のウレア誘導体が、mode 3 型 $i+1 = Ile, Val, Cys, Met$ のリン酸化ペプチドに安定化効果を示すことを見出した。</p> <p>以上の研究成果は、14-3-3 の選択的機能制御を通じた細胞内信号伝達経路の解明・制御という研究展開に対して重要な知見を与えていると評価できる。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			