



2026年2月17日

報道関係者各位

慶應義塾大学

## 治療に新たな光：がん抑制因子が無力化される仕組みを解明 —がんを細胞死させる新規抗がん剤の創製に期待—

慶應義塾大学大学院薬学研究科・生命機能物理学講座の榎本翔太（修士課程2年）、大澤匡範教授、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター 千田俊哉センター長、藤田医科大学 腫瘍医学研究センター 佐谷秀行センター長らによる研究グループは、がん細胞の異常増殖に関する14-3-3 $\zeta$ タンパク質（以下14-3-3 $\zeta$ ）によるがん抑制因子FOXO3aの機能抑制メカニズムを解明しました。

がん細胞ではリン酸化シグナルが異常に亢進しており、細胞の異常増殖を引き起こしています。このリン酸化シグナルで制御される転写因子の一つがFOXO3aです。本来、FOXO3aはアポトーシス（細胞死）を誘導するがん抑制因子ですが、がん細胞では、リン酸化されて14-3-3 $\zeta$ タンパク質と結合し、DNAから強制的に解離させられて機能を失います。したがって、14-3-3 $\zeta$ 結合によるFOXO3aのDNAからの解離機構を解明し、この相互作用を特異的に阻害するような化合物を見出せば、FOXO3aによるアポトーシス誘導を回復させる新たな抗がん剤の創製につながります。

これまでに14-3-3 $\zeta$ とリン酸化FOXO3aの相互作用様式は解析されてきましたが、リン酸化部位に結合した14-3-3 $\zeta$ が、そこから空間的に離れたDNA結合領域からどのようにDNAを解離させるか、その分子機構は不明でした。本研究では、この「異なる結合部位を介した競合阻害メカニズム」を解明するために、FSEC<sup>※1</sup>によりDNAの解離を定量化するとともに、NMR<sup>※2</sup>によりリン酸化FOXO3aと14-3-3 $\zeta$ の相互作用様式を原子レベルで詳細に解析しました。その結果、14-3-3 $\zeta$ がFOXO3aのリン酸化部位だけでなくDNA結合領域とも直接相互作用し、競合的にFOXO3aをDNAから解離させることを明らかにしました。

本研究成果は2026年2月16日に国際学術誌『Nature Communications』に掲載されました。

### 1. 本研究のポイント

- FSECにより、14-3-3 $\zeta$ がリン酸化FOXO3aに結合すると、DNAが等量条件でも完全に解離することを定量的に実証した。
- NMR法により、14-3-3 $\zeta$ がリン酸化FOXO3aのリン酸化部位だけでなく、DNA結合領域(DBD<sup>※3</sup>)にも直接相互作用し、DNAと競合的に結合することを新たに明らかにした。
- 14-3-3 $\zeta$ がFOXO3aのリン酸化部位に「テザリング（繋ぎ止め）」されることによりDNA結合領域の近接に常に存在し、実効濃度が著しく向上する結果、結合力が弱くてもDNAを完全に解離させるという新しい分子メカニズムを提唱した。

## 2. 研究背景

がん細胞では、リン酸化シグナルが異常に亢進することで細胞の異常増殖を引き起こします。このリン酸化シグナルの制御において中心的な役割を担うタンパク質の一つが 14-3-3 $\zeta$  です。14-3-3 $\zeta$  は、リン酸化されたタンパク質のリン酸化モチーフに結合し、その機能や細胞内局在を制御することで、がん増殖シグナルを活性化（ON）し続けます。この 14-3-3 $\zeta$  の標的タンパク質の一つが、がん抑制因子である FOXO3a です。

通常、FOXO3a は核内で DNA に結合し、アポトーシス（細胞死）関連遺伝子の転写を活性化することでがん化を抑制します。しかし、がん細胞では、リン酸化されて 14-3-3 $\zeta$  と結合することで、DNA から引き剥がされ、アポトーシス誘導能を失ってしまいます。

ここで長年の謎となっていたのが、DNA 解離の分子メカニズムです。FOXO3a は DNA binding domain (DBD) を介して DNA と結合しますが、14-3-3 $\zeta$  が結合する 2 つのリン酸化部位は、DBD とは空間的に離れた位置に存在します。また、14-3-3 $\zeta$  は 2 量体として機能し、その結合溝 (groove) で FOXO3a のリン酸化部位を認識することは知られていましたが、それ以外の相互作用はこれまで報告されていませんでした。そのため、「結合部位が異なるにもかかわらず、14-3-3 $\zeta$  の結合がどのように FOXO3a を DNA から解離させるのか」という根本的な問題は未解明のままでした。そこで本研究では、この「異なる結合部位間でどのように競合が起こるのか」という分子メカニズムを明らかにすること目的としました。

## 3. 研究内容・成果

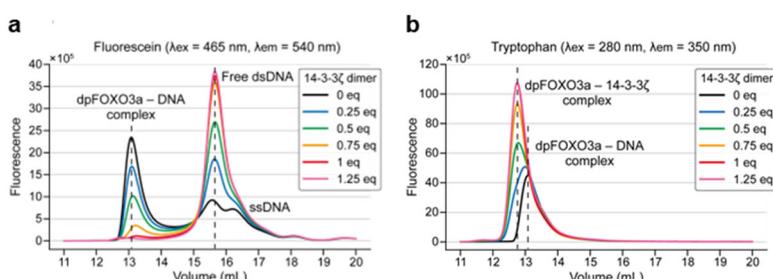
本研究では、リン酸化 FOXO3a（以下 dpFOXO3a）および全長 14-3-3 $\zeta$  を大腸菌発現系により調製し、精製タンパク質を用いて解析を行いました。

### ・14-3-3 $\zeta$ は DNA に対して圧倒的に有利に競合する

まず、14-3-3 $\zeta$  が DNA に対してどの程度競合的に有利であるかを定量的に評価するため、蛍光検出型サイズ排除クロマトグラフィー FSEC を用いて解析しました。フルオレセイン蛍光で標識した DNA を検出し（図 1a）、同時にトリプトファン蛍光によりタンパク質を区別して検出しました（図 1b）。

FSEC 解析の結果、dpFOXO3a-DNA 複合体に 14-3-3 $\zeta$  を段階的に加えると、複合体は減少し、非結合型 DNA が増加する一方で、14-3-3 $\zeta$  が dpFOXO3a に新たに結合することが確認されました。特に注目すべき点は、14-3-3 $\zeta$  をわずか 1 当量加えただけで、DNA がほぼ完全に解離したことです（図 1 赤線）。この結果は、競合条件下において 14-3-3 $\zeta$  が DNA に対して 100 倍以上優位であることを示しています。しかし、dpFOXO3a と DNA、dpFOXO3a と 14-3-3 $\zeta$  の解離定数 ( $K_d$ ) の差は約 2 倍程度に過ぎず、単純な結合親和性だけではこの圧倒的な競合優位性を説明できません。

そこで私たちは、「結合力に大差なくとも、競合させると 14-3-3 $\zeta$  が圧勝する特別な分子メカニズムがあるのではないか」と考えました。



## 図 1. 14-3-3 $\zeta$ は dpFOXO3a と結合し DNA を完全に解離させる

dpFOXO3a (10  $\mu$ M)、DNA (10  $\mu$ M)、そして 0~1.25 当量の 14-3-3 $\zeta$  dimer の混合溶液を解析した。

a フルオレセインの蛍光で標識 DNA を検出したプロファイル。

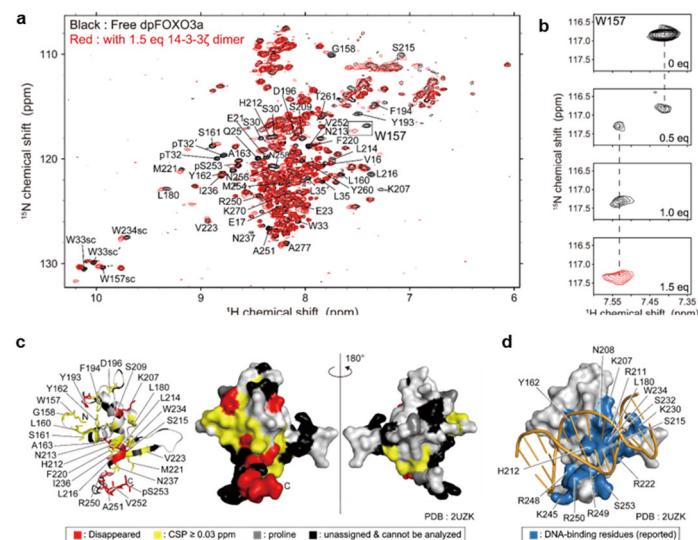
b トリプトファンの蛍光でタンパク質を検出したプロファイル。

### ・NMR により 14-3-3 $\zeta$ が DNA 結合部位と直接相互作用することを発見

次に、この競合優位性の分子基盤を明らかにするため、NMR を用いた相互作用解析を行いました。NMR は結晶化を必要とせず、dpFOXO3a のような天然変性領域<sup>※4</sup>を多く含むタンパク質であっても、アミノ酸残基レベルで相互作用を解析できるという大きな利点があります。

[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N]-dpFOXO3a に 14-3-3 $\zeta$  を添加した際の NMR スペクトルを解析したところ、リン酸化部位に加えて DNA binding domain (DBD) に属する残基でも明確なシグナル変化が観測されました (図 2a, b)。さらに、これらの残基は DBD の片側の面に集中しており、その位置は既知の DNA 結合界面と一致していました (図 2c, d)。

これらの結果から、14-3-3 $\zeta$  はリン酸化部位に結合するだけでなく、FOXO3a の DBD とも直接相互作用し、DNA と同じ部位で競合することが、本研究で初めて明らかになりました。



## 図 2. 14-3-3 $\zeta$ は dpFOXO3a のリン酸化部位だけでなく DBD とも相互作用して DNA と直接的に競合する

a [<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N]-dpFOXO3a 単独(黒)と 1.5 当量の 14-3-3 $\zeta$  dimer を添加した時(赤)のスペクトルの重ね合わせ。

b 14-3-3 $\zeta$  添加に伴う W157 シグナルの化学シフト変化。

c シグナル変化した残基の DBD の構造上へのマッピング。

d 既報の DBD と DNA の複合体結晶構造。

### ・14-3-3 $\zeta$ 側の DBD 結合界面の同定

次に、14-3-3 $\zeta$  側のどの領域が DBD と相互作用するのかを明らかにしました。FOXO3a の DBD と、その C 末端側の天然変性領域を含むコンストラクト (CTD) を作製し、これを [<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N]-14-3-3 $\zeta$  に添加して NMR 解析を行いました。

その結果、14-3-3 $\zeta$  のリン酸化モチーフ結合溝 (groove) の上部に位置する残基で顕著なシグナル変

化が観測されました（図 3a-c）。これは、DBD が 14-3-3 $\zeta$  の groove 上部と相互作用することを示唆しています。

さらに、CTD 添加量に対するシグナル変化をフィッティング解析した結果、DBD と 14-3-3 $\zeta$  の  $K_d$  は 10~20  $\mu\text{M}$  と求まり、DBD への結合では DNA よりも 14-3-3 $\zeta$  の親和性が一桁程度弱いことが明らかになりました（図 3b）。

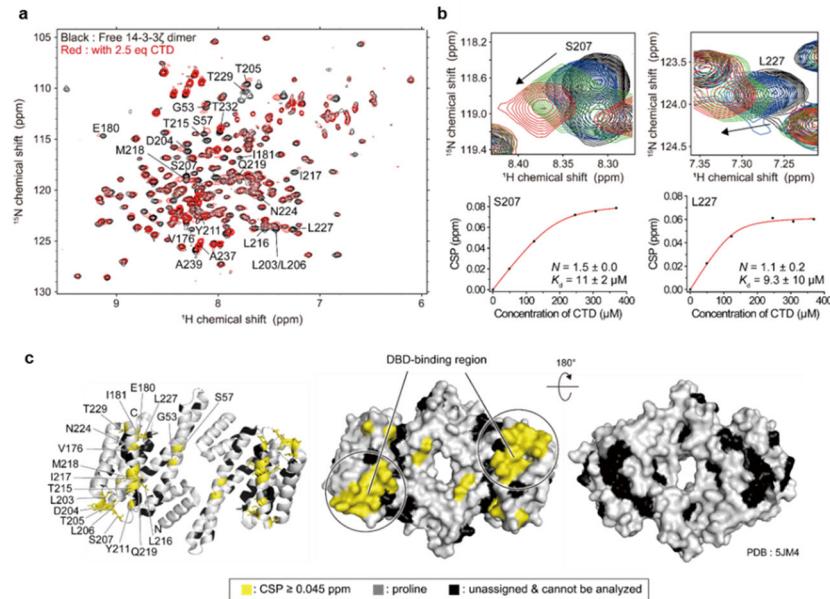


図 3. DBD は 14-3-3 $\zeta$  の groove 上部に結合する

**a**  $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]\text{-14-3-3}\zeta$  dimer 単独（黒）と 2.5 当量の CTD を添加した時（赤）のスペクトルの重ね合わせ。

**b** 14-3-3 $\zeta$  添加に伴う S207 と L227 の化学シフト変化とフィッティング曲線。

**c** シグナル変化した残基の 14-3-3 $\zeta$  dimer の構造上へのマッピング。

#### ・テザリング効果<sup>※5</sup>によるDNA競合解離モデルの提唱

以上の結果を踏まえ、私たちは 14-3-3 $\zeta$  による DNA の競合解離モデルを提唱します。NMR 解析から、14-3-3 $\zeta$  は dpFOXO3a のリン酸化部位に結合するだけでなく、DBD とも直接相互作用し、DNA と同じ部位で競合することが明らかになりました（図 4a, b）。

一方で、DBD と 14-3-3 $\zeta$  の結合自体は弱く、この相互作用だけでは FSEC で観測された DNA の完全な解離は説明できません。

そこで私たちは、14-3-3 $\zeta$  がリン酸化モチーフを介して FOXO3a に繋ぎ止められている点に着目しました。このテザリング効果により 14-3-3 $\zeta$  は常に DBD の近傍に高い実効濃度で存在し、頻繁に DBD へアクセス可能になります。その結果、個々の結合は弱くても、総合的には DNA を競合的かつ完全に解離させることができます（図 4a）。

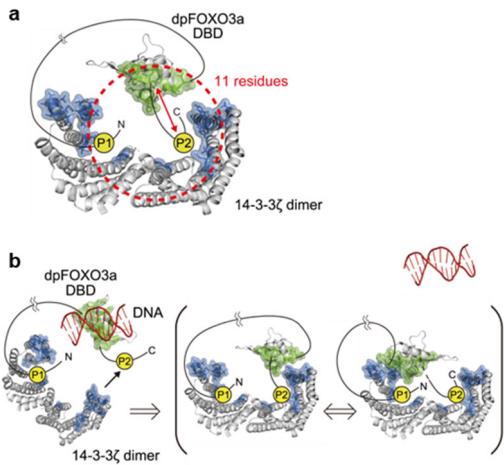


図 4. dpFOXO3a に対する 14-3-3 $\zeta$  の結合と DNA の競合的解離メカニズム

a リン酸化部位による 14-3-3 $\zeta$  のテザリング効果。

b 14-3-3 $\zeta$  結合による dpFOXO3a からの DNA 解離モデル。

#### 4. 今後の展開

本研究により、14-3-3 $\zeta$  が FOXO3a の 2 つのリン酸化部位だけでなく DNA 結合部位 (DBD) とも直接相互作用すること、そしてリン酸化部位を介したテザリング効果によって DNA 結合部位への実効濃度が著しく高められることで、14-3-3 $\zeta$  が DNA を完全に解離させることができました。これは、FOXO3a の機能抑制がリン酸化部位への 14-3-3 $\zeta$  結合だけでは説明できず、テザリングによって増強される 14-3-3 $\zeta$  の動的な競合作用に強く依存していることを示しています。

このような制御機構は、他の多くのタンパク質間相互作用とは異なります。タンパク質間相互作用の多くは、広い相互作用界面で強く結合しています。しかし、FOXO3a は 2 か所のリン酸化領域と DBD を介して多点で 14-3-3 $\zeta$  と結合します。さらに、各結合領域の  $K_d$  は数~数十  $\mu\text{M}$  と弱いことが分かっており、弱い相互作用が協調することで全体として高い結合親和性を実現しています。したがって、それぞれの結合領域での結合親和性は化合物による阻害が現実的に可能なレンジにあるという大きな利点があります。すなわち、14-3-3 $\zeta$  と FOXO3a のリン酸化モチーフとの相互作用を阻害し、テザリングを解除することができれば、14-3-3 $\zeta$  による DNA 結合部位への局所的な競合作用を低下させ、FOXO3a の DNA 結合能と転写活性を回復させることができると考えられます。

このように、本研究で明らかにした「テザリングによって成立する FOXO3a 特異的な機能抑制メカニズム」は、14-3-3 $\zeta$  とリン酸化モチーフとの相互作用を標的としたテザリング阻害型の新しい創薬コンセプトにつながるものであり、FOXO3a のがん抑制機能を再活性化する新規抗がん治療戦略への展開が期待されます。

#### 5. 論文情報

(タイトル) 14-3-3 $\zeta$  interacts with DNA-binding domain of FOXO3a and competitively dissociates DNA by dual-motif tethering

(著者名) Shota Enomoto, Tomoya Kuwayama, Shoichi Nakatsuka, Mariko Yokogawa, Kosaku Kawatsu,

Risa Nakamura, Tomomi Kimura, Mikio Tanabe, Toshiya Senda, Jun Saito, Hideyuki Saya, and Masanori Osawa\* (\*責任著者)

(雑誌) Nature Communications

(DOI) 10.1038/s41467-026-69203-8

<用語説明>

※1 **FSEC (Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography)** : 蛍光で検出するサイズ排除クロマトグラフィー。蛍光団ごとに励起波長と蛍光波長が異なるという蛍光の特徴を活かし、複数の成分を同時に区別して検出することができる。

※2 **NMR (Nuclear Magnetic Resonance)** : 強い磁場中で原子核の共鳴現象を観測することで、分子の化学構造や運動性といった情報を原子レベルで解析できる分光法。

※3 **DNA 結合ドメイン (DBD)** : 二本鎖または一本鎖 DNA を認識する少なくとも 1 つの構造モチーフを構造に含むタンパク質ドメイン。DBD (DNA binding domain) は特定の DNA 配列 (認識配列) への特異的結合または DNA 全体に対して親和性を持つ。一部の DNA 結合ドメインは、折り畳まれた構造の核酸も含む。

※4 **天然変性領域** : 構造非形成領域とも呼ばれ、タンパク質中の 2 次構造を形成していない領域を意味する。天然変性領域は運動性が高く X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) による解析が困難だが、溶液中で各アミノ酸の動的変化を検出できる NMR では解析可能である。

※5 **テザリング効果** : 分子間相互作用 (特にタンパク質と DNA、タンパク質とタンパク質など)において、二つの分子を柔軟な鎖 (テザー) で繋ぐことで、それらが出会う確率を高め、相互作用を効率化・特異化する現象のこと。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

<研究内容についてのお問い合わせ先>

慶應義塾大学薬学部 生命機能物理学講座

教授 大澤 匠範 (おおさわ まさのり)

TEL : 03-5400-2487

E-mail : osawa@keio.jp

<https://square.umin.ac.jp/keio-skb/index.html>

本発表資料のお問い合わせ先

慶應義塾広報室 (宮崎)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

Email : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>