

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05643

研究課題名(和文) ユビキチン化を標的とした難病CFの創薬研究

研究課題名(英文) Development of therapeutic approaches for cystic fibrosis targeting CFTR ubiquitination

研究代表者

沖米田 司 (Okiyoneda, Tsukasa)

関西学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：90398248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝病である嚢胞性線維症(CF)はCFTR変異体タンパク質が細胞内で分解されるため発病する。現在CF治療薬が開発されているが、CFTRの分解シグナルとなるユビキチン化を阻害できないため、治療効果が非常に弱い。本研究では、新規同定したCFTRユビキチン化酵素の作用機序を解明し、その作用機序を阻害する薬剤を探索する評価系の構築を行なった。その結果、CFTRユビキチン化酵素RFFLはアミノ末端の変性領域でCFTR変異体の立体構造が崩れた細胞質領域を直接認識して分解へ導くことがわかった。また、本研究により新規CF治療薬の探索に有用なRFFL-CFTR変異体相互作用評価法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Cystic fibrosis (CF) is a lethal genetic disease caused by mutation of CFTR. CF drug has been developed, but its efficacy remains insufficient because it fails to inhibit the CFTR mutant ubiquitination, which is a degradation signal. Recently, we have identified the novel ubiquitin (Ub) ligases for the CFTR mutant. In this project, we investigated the molecular mechanism of how the Ub ligases stimulate the degradation of CFTR mutant. We discovered that RFFL, a novel Ub ligase for the CFTR, directly and selectively binds to the cytoplasmic region of the CFTR mutant through its disordered regions. Moreover, we developed the assay system that can easily measure the direct interaction between RFFL and the CFTR mutant. This assay system may be useful to discover a novel class of CF drug.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：嚢胞性線維症 CFTR ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

嚢胞性線維症(Cystic Fibrosis; CF)は主に消化器系と呼吸器系を侵す外分泌腺の遺伝病で、世界に7万人の患者が存在し、日本では非常に稀(100人以下)であるが、難病に指定されている。今年9月には名古屋でアジア初のCF国際会議(代表者も招待講演者)が開催され、CFの認知度が日本でも高まっており、今後、新生児スクリーニングの実施などで、日本での患者数増加が予測される。

現在、CFの治療法は、抗生物質や抗炎症薬を用いた対症療法のみである。患者の平均寿命は未だ39歳と完治できないため、CFの新規治療薬開発は急務である。CFの原因は、形質膜の塩素イオンチャネルCFTRの遺伝子変異($\Delta F508$ 変異)である。 $\Delta F508$ CFTRの転写翻訳は正常であるが、フォールディング異常(高次構造形成異常)を起こす。その結果、細胞内品質管理機構により分解されるため、形質膜に発現しない。 $\Delta F508$ CFTRは塩素イオンチャネルとして機能することから、 $\Delta F508$ CFTRの分解を抑制し、形質膜発現を回復させることがCFの根本的な治療法になる。現在までに、 $\Delta F508$ CFTRのフォールディングを改善する化合物(CFTR corrector)が開発されているが、臨床での有効性が得られていないため、これまでにない全く新しい治療戦略が必要である。

代表者らは、CFTRフォールディングにおける $\Delta F508$ 変異の影響を解明し、 $\Delta F508$ CFTRフォールディング異常を改善するためには、CFTR NBD1ドメインとドメイン間相互作用の両方の安定化が必要であることを世界で初めて立証した(*Cell* 2012, Okiyoneda, *J Cell Biol* 2012)。また、代表者は、CFTR correctorの作用機序を世界で初めて解明し、NBD1ドメインを安定化する化合物と、CFTRドメイン間相互作用を安定化するcorrectorの併用により、 $\Delta F508$ CFTRのフォールディングがほぼ完全に改善されることを世界で初めて立証した(Okiyoneda, *Nat Chem Biol* 2013)。さらに、代表者はNBD1ドメイン特異的安定化薬の欠如がCF薬物療法実現の大きな障壁である事を提起した(Okiyoneda, *Nat Chem Biol* 2013)。NBD1ドメインは構造不安定で、細胞内で分解シグナルであるユビキチン化を受けるため、NBD1ドメインのユビキチン化阻害薬が、NBD1特異的安定化薬になると代表者は考えた。

代表者はこれまでに、形質膜での $\Delta F508$ CFTRユビキチン化機構を世界で初めて解明し(Okiyoneda, *Science* 2010)、代表者らが開発した世界唯一のCFTR膜簡便定量系を用いてCF患者由来気道上皮細胞でのユビキチンリガーゼsiRNA網羅的スクリーニングを行った結果、CFの強力な治療標的となり得る新規ユビキチンリガーゼ(4種類)を同定した。同定したユビキチンリガーゼは機能未知であり、我々の予備的な実験の結果、新規ユビキチンリガーゼは $\Delta F508$ 変異が存在するNBD1

の不安定化に關与する可能性が示唆された。実際に、ユビキチンリガーゼのノックダウンは、correctorの改善効果を劇的に増大することを確認している。従って、我々が同定した新規ユビキチンリガーゼの阻害薬はCF薬物療法の最大の難題であったNBD1安定化を克服し、臨床試験で使用されているcorrectorとの併用により、CF薬物併用療法の実現化に大きく貢献する可能性が高い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、「ユビキチンリガーゼ阻害によるCFTR NBD1の安定化」という独自の治療戦略に基づき、治療標的分子となる4種類の新規ユビキチンリガーゼの阻害薬スクリーニング評価系を確立し、既存薬ライブラリースクリーニングからCF治療薬を探索・同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規ユビキチンリガーゼと $\Delta F508$ CFTR の相互作用最小領域の決定

代表者は、CF患者由来気道上皮細胞を用いた網羅的siRNAスクリーニング(約600種類)により、CFの強力な治療標的分子になり得る4種類の新規ユビキチンリガーゼを同定した。まず、様々な変異体を用いた共免疫沈降法により、細胞内における $\Delta F508$ CFTRとユビキチンリガーゼRFFLの結合領域の決定を行った。また、BiFC(Biomolecular Fluorescent Complementation)法により、 $\Delta F508$ CFTRとRFFLが相互作用する細胞内局在を解析した。

(2) 新規ユビキチンリガーゼと $\Delta F508$ CFTR の相互作用評価系の確立

in vitroでの相互作用評価

(1)で得られたユビキチンリガーゼ、および、 $\Delta F508$ CFTRの最小結合領域を大腸菌から精製し、ハイスループットスクリーニングに適したAlpha(Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay)法により、in vitroでの分子間相互作用を96ウェルプレートで評価を行った。また、ユビキチンリガーゼが認識している可能性が高いCFTR NBD1ドメインとの相互作用も同様に評価した。

生細胞での相互作用評価

上記の評価法と並行して、ユビキチンリガーゼ、および、 $\Delta F508$ CFTRの最小結合単位に分割Venus蛍光タンパク質を融合し、96ウェルプレート上の生細胞における相互作用をBiFC(Biomolecular Fluorescent Complementation)法で評価した。

(3) 新規ユビキチンリガーゼ阻害によるCFTR表現系解析

RFFL阻害により嚢胞性線維症(CF)の原因となる $\Delta F508$ CFTRの形質膜安定性および膜発現機能を改善するか否かをcell surface ELISA法で解析した。さらに、現在

CF 治療薬として上市されている Orkambi の効果を RFFL 阻害が増強できるか否かを cell surface ELISA 法及び YFP quenching assay により評価した。

4. 研究成果

(1)新規ユビキチンリガーゼと Δ F508 CFTR の相互作用最小領域の決定

様々な変異体を用いた共免疫沈降法により、ユビキチンリガーゼ RFFL はアミノ末端領域に存在する膜局在決定領域及び disordered region が Δ F508 CFTR との相互作用に重要であることが明らかとなった。BiFC 法の結果、RFFL は Δ F508 CFTR と形質膜及びエンドソームで相互作用し、RFFL のアミノ末端領域が相互作用に必要なことが明らかとなった。

HECT 型ユビキチンリガーゼにおいて、変異体表現系解析から、 Δ F508 CFTR との相互作用にはアミノ末端領域が必要であることが明らかとなった。

(2)新規ユビキチンリガーゼと Δ F508 CFTR の相互作用評価系の確立

in vitro での相互作用評価

大腸菌から精製した RFFL と Δ F508 CFTR の細胞質領域である NBD1 との直接的タンパク質相互作用を定量する AlphaLISA を構築した。AlphaLISA の結果、RFFL は熱変性した NBD1 を選択的、かつ、直接的に結合することが明らかとなった。in vitro ユビキチン化実験を構築し、解析した結果、RFFL は熱変性した NBD1 を選択的、かつ、直接認識することで、そのユビキチン化を促進することが明らかとなった。

HECT 型ユビキチンリガーゼタンパク質精製を大腸菌および哺乳類動物細胞から試みたが活性がある十分量のタンパク質の精製が達成できなかった。しかしながら、共同研究による無細胞発現系により、HECT 型ユビキチンリガーゼタンパク質の精製に成功した。

生細胞での相互作用評価

確立した BiFC 法によるエンドソーム局在ユビキチンリガーゼと Δ F508 CFTR の相互作用の定量化を行ったが、検出感度が不十分であり、96 well plate を用いた定量解析が困難であった。そこで、細胞内での RFFL と Δ F508 CFTR 変異体 (全長) の相互作用評価系として、NanoBiT 法の構築を試み、評価系の確立に成功した。さらに、RFFL N 末領域を含む fragment が AlphaLISA 及び NanoBiT 法で、RFFL- Δ F508 CFTR 相互作用を阻害することを見出した。

(3)新規ユビキチンリガーゼ阻害による CFTR 表現系解析

siRNA による RFFL ノックダウンが嚢胞性線維症 (CF) の原因となる Δ F508 CFTR の形質膜安定性および膜発現機能を改善した。さ

らに、RFFL ノックダウンは Orkambi の治療効果を 2 倍以上増強したことから、RFFL を標的とした「嚢胞性線維症予防又は治療剤」の特許出願 (国内および PCT 出願) を行った。上記に示した結果等をまとめて、国際誌 Developmental Cell で論文発表を行った。

本研究では、当初予定していた化合物スクリーニングは実施できなかったが、本研究で確立した AlphaLISA 等の評価系を用いて、国内製薬企業との共同研究を実施することができた。

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 2 件)

1. Okuyoneda T, Veit G, Sakai R, Aki M, Fujihara T, Higashi M, Susuki-Miyata S, Miyata M, Fukuda N, Yoshida A, Xu H, Apaja PM, Lukacs GL. Chaperone-Independent Peripheral Quality Control of CFTR by RFFL E3 Ligase. *Dev Cell*. 2018 Mar 26;44(6):694-708.e7. 査読有り

2. Bagdany M, Veit G, Fukuda R, Avramescu RG, Okuyoneda T, Baaklini I, Singh J, Sovak G, Xu H, Apaja PM, Sattin S, Beitel LK, Roldan A, Colombo G, Balch W, Young JC, Lukacs GL. Chaperones rescue the energetic landscape of mutant CFTR at single molecule and in cell. *Nat Commun*. 2017 Aug 30;8(1):398. 査読有り

[学会発表](計 21 件)

1. 藤原健, 山西芳裕, 田中健一郎, 沖米田司. ドラッグリポジショニングによる CFTR コレクターの開発. 日本薬学会第 138 年会. 2018. 3/25-3/28 (ポスター発表)

2. 沖米田司. 異なる細胞内分解経路に関わる CFTR 変異体のポリユビキチン化修飾解析. ユビキチン研究会. 2018. 1/18-1/20 (ポスター発表)

3. 沖米田司. エンドソーム E3 リガーゼによるタンパク質品質管理. ユビキチン研究会. 2018. 1/18-1/20 (口頭発表)

4. 沖米田司, 酒井了平, 東桃子, 藤原健. 形質膜タンパク質品質管理に関わるエンドソーム局在ユビキチンリガーゼの機能解析. ConBio 2017. 2017. 12/6-12/9 (ポスター発表)

5. 加藤知希, 大西裕子, 沖米田司. 形質膜 CFTR の選択的単離法の確立と結合タンパク質の網羅的解析. ConBio 2017. 2017. 12/6-12/9 (ポスター

発表)

6. 藤原健, 山西芳裕, 田中健一郎, **沖米田司**. ドラッグリポジショニングによる CFTR コレクターの開発.

ConBio 2017. 2017. 12/6-12/9 (ポスター発表)

7. 原寛幸, 遠藤彬則, 寺川真奈, 加藤知希, 駒田雅之, **沖米田司**. 異なる細胞内分解経路に関わる CFTR 変異体のポリユビキチン化修飾解析. ConBio 2017. 2017. 12/6-12/9 (ポスター, 口頭発表)

8. **沖米田司** Ubiquitination mechanism as a novel drug target for cystic fibrosis, 第90回日本薬理学会年会 シンポジウム, 2017.3.15-17 長崎 (口答発表 英語)

9. 大西裕子, **沖米田司**. 形質膜タンパク質品質管理におけるプロテアソームの機能解析, BMB2016, ポスター発表, 2016.11.30-12.2 横浜

10. 原寛幸, 加藤知希, 大西裕子, **沖米田司** CFTR 変異体のポリユビキチン修飾解析, 新学術領域ユビキチン制御第三回班会議 ポスター発表, 2016.11.16-18 札幌

11. 大西裕子, **沖米田司** HECT 型ユビキチンリガーゼによる CFTR 膜発現制御機構の解明, 新学術領域ユビキチン制御第三回班会議 ポスター発表, 2016.11.16-18 札幌

12. 酒井了平, 安藝美咲, **沖米田司** エンドソーム膜タンパク質品質管理に関わる RING 型ユビキチンリガーゼの機能解析, 新学術領域ユビキチン制御第三回班会議 ポスター発表, 2016.11.16-18 札幌

13. **沖米田司** エンドソーム膜タンパク質品質管理における E3 リガーゼの役割, 新学術領域ユビキチン制御第三回班会議, 2016.11.16-18 札幌 (口答発表)

14. **Tsukasa Okiyoneda**, CFTR folding defects and therapeutic targets 2016 International Conference of Physiological Sciences, Physiological Society of Japan Symposia, Physiology and pathophysiology of CFTR in Asia: Asian CF and CFTR-mediated non-CF disease, 2016.9.26. 中国 北京

15. 宮田将徳, 宮田(薄)聖子, **沖米田司**, Li Jian-Dong. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 治療薬による相乗的分子制御機構の解明. 第89回日本薬理学会年会 2016.3.10. 横浜

16. Miyata M, **Okiyoneda T**, Li JD. Protein

Profiling of Cyldromatosis (CYLD) in bacteria-Infected Mammalian Cells by MALDI-TOF Mass Spectrometry 新学術領域ユビキチン制御第二回班会議, 2015.12.16-18. 千葉

17. **沖米田司**, エンドソーム膜タンパク質品質管理における E3 リガーゼの役割, 新学術領域ユビキチン制御第二回班会議, 2015.12.16-18. 千葉

18. 宮田将徳, 宮田(薄)聖子, **沖米田司**, Li Jian-Dong. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の治療薬に対する生体応答機構の解明. BMB2015. ワークショップ 2015.12.03. 神戸

19. **沖米田司**, タンパク質品質管理機構を標的とした嚢胞性線維症の新規治療戦略, BMB2015, ワークショップ, 2015.12.3. 神戸

20. 酒井了平, 安藝美咲, 鈴木真治, 宮田聖子, 宮田将徳, **沖米田司** エンドソーム膜タンパク質品質管理に関わる RING 型ユビキチンリガーゼの役割. BMB2015, 2015.12.1. 神戸

21. **沖米田司**, エンドソーム膜タンパク質品質管理における E3 リガーゼの役割, 新学術領域ユビキチン制御第一回班会議, 2015.7.2. 京都

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 嚢胞性線維症予防又は治療剤

発明者: **沖米田司**

権利者: 学校法人関西学院

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/009524

出願年月日: 2018.3.12

国内外の別: 国外

名称: CFTR ユビキチン化阻害薬のスクリーニング方法

発明者: **沖米田司**

権利者: 学校法人関西学院

種類: 特許

番号: 特願 2017-047626

出願年月日: 2017.3.13

国内外の別: 国内

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://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~okiyoneda/okilab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖米田 司 (OKIYONEDA, Tsukasa)
関西学院大学・理工学部・准教授
研究者番号：90398248

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

甲斐 広文 (KAI, Hirohumi)
熊本大学大学院・生命科学研究部・教授

LUKACS, Gergely
Department of Physiology, • McGill
University, Canada • Professor