

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18468

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素CYLDの特異的阻害剤の開発とケミカルプローブとしての応用

研究課題名(英文) Development of specific inhibitors targeting a deubiquitinating enzyme CYLD and application of these inhibitors for chemical probe.

研究代表者

高橋 宏隆 (Takahashi, Hirotaka)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：70432804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ B活性化経路において、様々な脱ユビキチン化酵素(DUB)が関与する。本研究ではDUBの一つであるCYLDの果たす役割を解明する目的で、CYLDの活性に特異的な低分子阻害剤の開発を目指した。

コムギ無細胞タンパク質合成系とAlphaScreenを組み合わせたハイスループットなユビキチン鎖切断アッセイを基盤に、9,600種類の低分子化合物から、阻害活性が強く、かつ細胞毒性が低い化合物を一種類見出した。この化合物は、培養細胞においてNF- κ Bシグナルを有意に阻害したが、CYLDノックアウト細胞では阻害が認められなかった。以上から、本研究においてCYLDを阻害する低分子化合物の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Many deubiquitinating enzymes (DUBs) are involved in NF- κ B signal transduction. To clarify the individual role of CYLD, which is one of a main negative regulators of the NF- κ B signal, we aimed to develop small chemical compounds specifically inhibited CYLD activity. Using a cleavage assay system based on wheat cell-free protein expression system and AlphaScreen technology, one chemical compound with high inhibitory activity to CYLD and low cytotoxicity was identified from 9,600 chemical compound library. This compound significantly inhibited NF- κ B signal transduction in cultured cell, but not in CYLD-knockout cells. These results indicated that we succeeded in development of small chemical compound inhibitor targeting the activity of CYLD.

研究分野：ユビキチン化経路

キーワード：CYLD 脱ユビキチン化酵素 NF- κ Bシグナル 低分子阻害剤探索 Subquinocin

1. 研究開始当初の背景

炎症や免疫応答などの様々な生命現象に関わる NF- κ B 活性化経路において、ポリユビキチン鎖を介したシグナル伝達が重要な役割を担っている^{1,2}。CYLD・OTULIN・A20 の3種類の脱ユビキチン化酵素 (DUB) は、これらのポリユビキチン鎖を切断することで、NF- κ B 活性化経路の負の制御因子として機能している。しかし、これら3つの DUB が細胞内でどのように使い分けられているかは不明である。そのため、細胞内での各々の DUB の役割を明らかにするために、それぞれの DUB に対する特異的な阻害剤をケミカルプローブとして用いる手法は非常に有効である。しかし、現在これらの DUB の特異的な阻害剤は実用化されていない。

申請者は先行研究において、前述の3つの DUB の中で、CYLD の活性型組換えタンパク質を合成し、東京大学創薬機構から分与頂いた 9,600 種類の低分子化合物ライブラリーより、AlphaScreen を用いた化合物スクリーニングを行なった (図1)。その結果、CYLD の脱ユビキチン化活性を特異的に阻害する8種類の候補化合物を得ている。

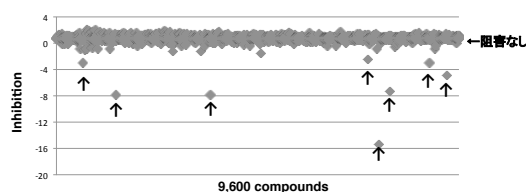


図1. 9,600種類の化合物ライブラリーを用いたCYLDの阻害剤探索結果。ヒット化合物を矢頭で示した。

2. 研究の目的

(1) 先行実験で見出された8種類の候補化合物について、AlphaScreen 以外の方法で CYLD への阻害効果を調べることで偽陽性の化合物を除き、CYLD に対する阻害効果を有する化合物を同定する。

(2) 1 で得られた CYLD 活性を阻害する化合物について、生化学的手法を用いて 50%阻害効果を示す化合物濃度を明らかにする。また他の DUB に対する阻害効果を調べ、CYLD に対する特異性を評価する。

(3) これらの化合物の中で、細胞内で NF- κ B 活性化経路を阻害するものを見出す。その化合物の DUB に対する特異性や細胞毒性などの性質を調べ、ケミカルプローブとして実用可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 生化学的手法を用いた化合物評価

コムギ無細胞タンパク質合成系 (コムギ無細胞系) を用いて合成した全長の CYLD 組換えタンパク質を用いて、切断されたユビキチン鎖を SDS-PAGE で分離後に、ゲル上で検出するアッセイ系 (ゲルアッセイ) を構築し、

8種類の化合物の阻害効果を調べる。また他の DUB についてもコムギ無細胞系を用いてタンパク質合成を行い、AlphaScreen やゲルアッセイによって化合物の特異性を検討する。

(2) 培養細胞系を用いた化合物評価

得られた化合物が細胞内において CYLD を阻害することで、NF- κ B 経路を活性化するかどうかを、培養細胞における NF- κ B 転写活性やポリユビキチン鎖量などを指標に検討する。また化合物の細胞毒性を調べ、ケミカルプローブとして実用可能かを評価する。

4. 研究成果

(1) 高次解析による CYLD 阻害剤の選抜

CYLD によって切断されたポリユビキチン鎖を SDS-PAGE によって分離・検出することで、脱ユビキチン化活性を検出できるゲルアッセイ系を構築した。当初は SDS-PAGE 後にウェスタンブロットを行なって全長や切断フォームのユビキチン鎖を検出する予定であったが、より誤差が少なく簡便に操作が行える Ruby 染色法を用いることとした。この方法は、SDS-PAGE でユビキチン鎖を分離した後に、高感度かつ定量性の高いタンパク質染色試薬である Ruby 染色試薬でゲル上のユビキチン鎖を可視化・定量できるため、PVDF 膜への転写や、抗体による検出の際に生じる誤差を回避することが可能である。このアッセイ系を用いて化合物の CYLD 阻害効果を調べた結果、基質として用いたテトラユビキチン鎖の増加と、切断されたフォームのユビキチン鎖の減少を示す化合物を1種類同定した (図2)。この化合物は 37 μ M の濃度において 50%活性阻害を示し、細胞毒性がほとんど認められないことから、この化合物を Subquinocin と命名し、その後の解析に用いた。

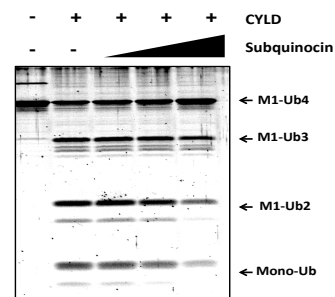


図2. Ruby染色によるCYLD活性阻害化合物の評価結果。化合物 (Subquinocin) の濃度依存的に基質として用いたユビキチン鎖 (M1-Ub4) の量の増加および切断フォームのユビキチン鎖 (Mono-Ub, M1-Ub2, M1-Ub3) の減少が認められた。

(2) Subquinocin の DUB に対する特異性評価

Subquinocin が CYLD の活性を特異的に阻害するかを、Subquinocin の他の DUB への阻害効果を指標に調べた。まず、CYLD の基質である直鎖型ポリユビキチン鎖を切

断する USP5, USP15, OTULIN の 3 つの DUB について Subquinocin の阻害効果を AlphaScreen によって調べた。その結果、CYLD と同じファミリーに属する DUB である USP5 および USP15 の活性を阻害する一方で、OTU ファミリーに属する OTULIN の活性阻害は認められなかった (図 3)。さらに、DUB のユビキチン鎖特異性に影響を受けずに切断活性が検出できるユビキチン- vinyl methyl ester を用いて、用いた 8 種類の USP ファミリーの DUB 全てにおいて顕著な阻害効果が認められた。以上から、Subquinocin は CYLD を含む USP ファミリーの DUB に特異的に阻害効果を有する可能性が強く示唆された。

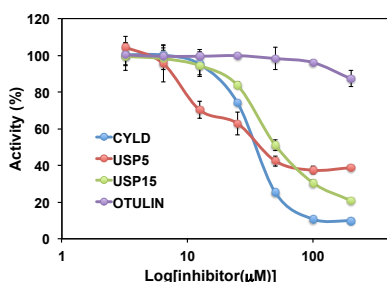


図3. CYLD, USP5, USP15, OTULINを用いたSubquinocinの特異性評価。Subquinocinによる各DUBの活性阻害率を示した。

(3) 細胞内における Subquinocin の NF-κB 活性化経路への影響

CYLD は NF-κB 活性化経路の負の制御因子であることから、Subquinocin は CYLD の活性阻害によって NF-κB 活性を上昇する可能性が強く示唆された。そこで、HEK293T 細胞を用いて、Subquinocin の存在下・非存在下において TNF-α や LUBAC などの NF-κB 活性化因子を処理し、それぞれにおける NF-κB シグナル伝達経路の活性化の程度を調べた。まず、細胞内における NF-κB 転写活性についてルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて調べた結果、Subquinocin は NF-κB 転写活性を有意に上昇することが明らかとなった (図 4A)。さらに、NF-κB が活性化した際に見られる NF-κB シグナル伝達関連タンパク質である RIP のポリユビキチン化が、Subquinocin 処理によって増加していた (図 4B)。

この Subquinocin による NF-κB 経路の活性化が、細胞内における CYLD の活性阻害に依存することを調べるために、CYLD を CRISPR-Cas9 でノックアウトした HEK293T 細胞 (CYLD-KO) を作製し、Subquinocin による NF-κB 活性化の有無について調べた。その結果、CYLD-KO 細胞では、野生型の細胞で見られた Subquinocin による NF-κB 活性化が認められなかったことから (図 4C)、Subquinocin は細胞内で CYLD を阻害することで、NF-κB 経路を活性化している可能性が強く示唆された。

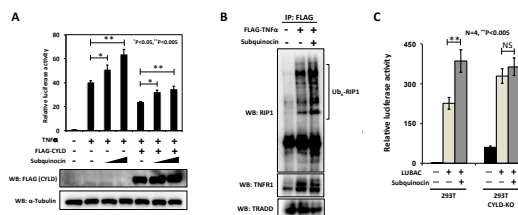


図4. 細胞内における Subquinocin のNF-κB活性化経路への影響。A. Subquinocin処理細胞における NF-κB 転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて調べた。B. ポリユビキチン化されたRIP量をウェスタンブロットにて定量した。C. CYLDノックアウト細胞を用いてAの実験を行った。

以上の結果より、申請者が同定した Subquinocin は、USP ファミリーに特異的な阻害剤であることから、当初予定した CYLD の活性のみを特異的に阻害する化合物の取得には至らなかった。しかし、背景で述べたように、NF-κB 活性化経路を制御する DUB は CYLD・OTULIN・A20 の 3 つであるが、OTULIN と A20 は USP ファミリーではないため、本研究で同定した Subquinocin は、CYLD を標的とした NF-κB 経路解析の有用なケミカルプローブとして実用可能であると考えられる。また、これまでに、様々な DUB 阻害剤が多くの研究グループから発表されており、その一部は市販化されているものの、そのほとんどは特異性が低く、ファミリー間を超えて阻害することが明らかとなっている³。そのため、USP ファミリーのみ阻害効果を示す Subquinocin は非常に有用な研究ツールであると言える。

<引用文献>

- ① Chen, Z. J. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol. Rev.* 2012, 246: 95-106.
- ② Tokunaga F et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol.* 2009, 11:123-32.
- ③ Ritorto MS et al. Screening of DUB activity and specificity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Communications.* 2014, 5:4763.

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 8 件)

1. Shibata Y, Tokunaga F, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nakano H, Tanaka Y, Iwai K, Inoue JI. HTLV-1 Tax induces formation of the active macromolecular IKK complex by generating lys63- and met1-linked hybrid polyubiquitin chains. *PLoS Pathogen.* 2017,

- 13(1):e1006162 [査読有]
2. Sakamaki K, Ishii TM, Sakata T, Takemoto K, Takagi C, Takeuchi A, Morishita R, Takahashi H, Nozawa A, Shinoda H, Chiba K, Sugimoto H, Saito A, Tamate S, Satou Y, Jung SK, Matsuoka S, Koyamada K, Sawasaki T, Nagai T, Ueno N. Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2016, 1863(11):2766-2783. [査読有]
 3. Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Communications.* 2016, 7:12547. [査読有]
 4. Santolini M, Sakakibara I, Gauthier M, Takahashi H, Sawasaki T, Mouly V, Concordet JP, Defosse PA, Hakim V, Maire P. Genome-wide enhancer analysis of the requirement of Six1 and Six4 homeoproteins for Myod reprogramming. *Nucleic Acids Research.* 2016, 44(18):8621-8640. [査読有]
 5. Takahashi H, Uematsu A, Yamanaka S, Imamura M, Nakajima T, Doi K, Yasuoka S, Takahashi C, Takeda H, Sawasaki T. Establishment of a wheat cell-free synthesized protein array containing 250 of human and mouse E3 ubiquitin ligases to identify novel interaction between E3 ligases and substrate proteins. *PLoS One.* 2016, 11(6):e0156718. [査読有]
 6. Yano T, Takeda H, Uematsu A, Yamanaka S, Nomura S, Nemoto K, Iwasaki T, Takahashi H, Sawasaki T. AGIA tag system based on a high affinity rabbit monoclonal antibody against human dopamine receptor D1 for protein analysis. *PLoS One.* 2016, 11(6):e0156716. [査読有]
 7. Suzuki Y, Chin WX, Han Q, Ichiyama K, Lee CH, Eyo ZW, Ebina H, Takahashi H, Takahashi C, Tan BH, Hishiki T, Ohba K, Matsuyama T, Koyanagi Y, Tan YJ, Sawasaki T, Chu1 JJ, Vasudevan SG, Sano K, Yamamoto N. Characterization of RyDEN (C19orf66) as an interferon-stimulated cellular inhibitor against dengue virus replication. *PLoS Pathogen.* 2016, 12(1):e1005357. [査読有]
 8. Ramadan A, Nemoto K, Seki M, Shinozaki K, Takahashi H, Sawasaki T. Wheat germ-based protein libraries for the functional characterisation of the Arabidopsis E2 ubiquitin conjugating enzymes and the RING-type E3 ubiquitin

ligase enzymes. *BMC plant biology.* 2015, 15:275. [査読有]

[学会発表] (計 8 件)

1. 高橋 宏隆, 他. 演題名:コムギ無細胞タンパク質アレイによって見出された、NF-κB を抑制する新規 DUB の機能解析. 学会名: 第 39 回日本分子生物学会年会. 日時: 2016 年 11 月 30-12 月 2 日. 場所: パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市). 国内学会・ポスター発表.
2. Takahashi H, 他. Sawasaki T. Regulation of the stability of Dengue virus non-structural protein 4B by ubiquitin-proteasome pathway. 演題名: Identification of HCV NS4B binding E3 ligases that involved in HCV replication using wheat cell-free protein production system. 学会名: 第 64 回ウイルス学会学術集会. 日時: 2016 年 10 月 23-25 日. 場所: 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市). 国内学会・ポスター発表.
3. 高橋 宏隆. 演題名: コムギ無細胞系を基盤としたプロテインアレイ技術の開発と応用. 学会名: AMED-創薬等支援技術基盤プラットフォーム解析拠点-領域間技術交流会. 日時: 2016 年 9 月 12 日. 場所: 名古屋大学・創薬科学研究館 (愛知県名古屋市). 国内・口頭発表・招待講演.
4. 高橋 宏隆. 演題名: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたフラビウイルスタンパク質の宿主相互作用タンパク質の探索. 学会名: 第 3 回関西ウイルスクラブ. 日時: 2016 年 7 月 30 日. 場所: 大阪大学微生物病研究所 (大阪府吹田市). 国内・口頭発表・招待講演.
5. Takahashi H, 他. 演題名: Establishment of deubiquitinating enzyme (DUB) protein array based on wheat cell-free system for a novel biochemical tool. 学会名: Ubiquitin signaling joint with the meeting on NF-κB and MAP kinase signaling in inflammation, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 日時: 2016 年 3 月 13-17 日. 場所: Whistler Conference Centre (Whistler, British Columbia, Canada). 国際学会・口頭およびポスター発表.
6. 高橋 宏隆, 他. 演題名: コムギ無細胞系を用いた 287 種類のヒトとマウスからなる E3 ユビキチンリガーゼプロテインアレイの作製と生化学的解析への応用. 学会名: 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会. 日時: 2015 年 12 月 1-4 日. 場所: 神戸ポートアイランド (神戸市中央区). 国内学会・口頭発表およびポスター発表.
7. Takahashi H, 他. 演題名: Regulation of the stability of dengue virus non-structural protein 4B by ubiquitin-proteasome pathway. 学会名: 第 63 回ウイルス学会学術集会.

日時：2015年11月22-24日。場所：福岡国際会議場（福岡県福岡市）。国内学会・口頭発表。

8. Takahashi H, 他. 演題名: Identification of novel E3 ligase that degrades HCV nonstructural protein 4B and inhibits viral replication in Huh7.5.1 cells using wheat cell-free protein production system. 学会名: 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 日時: 2015年10月9-13日, 場所: Strasbourg Convention and Exhibition Centre (Strasbourg, France). 国際学会・ポスター発表。

〔図書〕(計2件)

1. Takahashi H, Suzuki Y. 出版社: InTech. 題名: Cellular control of dengue virus replication - Role of interferon-inducible genes. in Dengue. 2017. 23頁.
2. Takahashi H, Nemoto K, Ramadan A, Sawasaki T. 出版社: Springer Japan. 題名: Technology of wheat cell-free based protein array for biochemical analyses of protein kinases and ubiquitin E3 ligases. In: Inoue J, Takekawa M (eds). Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. 2015. pp: 43-60.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宏隆 (TAKAHASHI, Hirotaka)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
講師
研究者番号: 70432804