

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05926

研究課題名(和文)リン酸化酵素フォールディング中間体を新規標的とした革新的創薬技術基盤の構築

研究課題名(英文)Drug Development Targeting a Folding Intermediate of Kinase

研究代表者

喜井 勲(Kii, Isao)

国立研究開発法人理化学研究所・科技ハブ産連本部・ユニットリーダー

研究者番号：80401561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：代表者(喜井)は、神経疾患に關与するリン酸化酵素DYRK1Aに対する阻害剤の作用機序の研究の過程で、DYRK1Aのフォールディング途中に、一過的に存在する「中間体構造」に対する特異的阻害剤の同定に成功し、FINDYと命名した(Kii et al. Nat Commun 2016)。本研究では、このFINDYの作用機序について研究を実施し、FINDYはフォールディング中間体のATPポケットへ作用することを明らかにした。さらにFINDYとは異なる化合物骨格を有する新規フォールディング中間体特異的阻害剤の同定に成功し、このリン酸化酵素フォールディング中間体特異的阻害の汎用性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

製薬企業やアカデミアにて研究開発が進められている医薬品候補化合物のうち、約10%はリン酸化酵素を標的としている。これらの酵素は、ガンや神経疾患など様々な病気に関係している。ヒトゲノムには全518種類のタンパク質リン酸化酵素がコードされている。阻害剤の研究開発では、これらリン酸化酵素群における選択性の高さが重要である。しかしながら、ATP結合ポケットがリン酸化酵素間で比較的保存されているため、阻害剤の選択性を上げることは非常に難しく、この結果として副作用が惹起される。本研究は、この副作用を低減するための高い選択性を有する阻害剤を同定する新しい創薬技術を提供すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein kinases represent an attractive target for drug development, because deregulation of protein kinase activity is implicated in several diseases. However, most of the currently available kinase inhibitors have low selectivity and sometimes cause adverse side effects by suppressing unintended kinases, which is a serious problem in drug development. In this study, we found an alternative strategy to develop a selective kinase inhibitor. We found a small molecule that selectively inhibits the kinase DYRK1A, which is related to the symptoms of Down syndrome. This inhibitor, called FINDY (folding intermediate-selective inhibitor of DYRK1A), suppresses transitional folding intermediate state of DYRK1A. Unlike other kinase inhibitors, FINDY does not inhibit the mature state of DYRK1A. These unique features of FINDY suggest that the strategy targeting the folding process has general validity, and can be applied not only to DYRK1A, but also to other kinases.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：リン酸化酵素 DYRK1A 分子内自己リン酸化 フォールディング中間体 阻害剤 化合物 ATP

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

製薬企業やアカデミアにて研究開発が進められている医薬品候補化合物のうち、約 10% はリン酸化酵素を標的としている。これらの酵素は、ガンや神経疾患など様々な病気に関係している。この重要な創薬標的であるリン酸化酵素に対する阻害剤は、酵素の活性中心である ATP 結合ポケットに結合することで、阻害効果を発揮する。

ヒトゲノムには全 518 種類のタンパク質リン酸化酵素がコードされている。阻害剤の研究開発では、これらリン酸化酵素群における選択性の高さが重要である。しかしながら、ATP 結合ポケットがリン酸化酵素間で比較的保存されているため、阻害剤の選択性を上げることは非常に難しく、この結果として副作用が惹起される。従って、阻害剤の選択性の低さと副作用は、創薬において解決すべき課題である。

代表者（喜井）は、神経疾患に関与するリン酸化酵素 DYRK1A に対する阻害剤の作用機序の研究の過程で、DYRK1A のフォールディング途中に、一過的に存在する「中間体構造」に対する特異的阻害剤の同定に成功し、FINDY と命名した (Kii et al. *Nat Commun* 2016) (図 1、図 2)。FINDY は、フォールディング中に起こる分子内自己リン酸化を特異的に阻害した。興味深いことに、FINDY は完成型 DYRK1A による基質リン酸化を阻害しなかった。この結果は、フォールディング中間体が完成型とは異なる特異な構造を有していることを示唆している。

さらに代表者（喜井）は、FINDY が極めて高い選択性を示すことを発見した。具体的には、近縁リン酸化酵素である DYRK1B や DYRK2 のフォールディングを阻害せず、その他の 370 種類の完成型リン酸化酵素に対して阻害活性を示さなかった。この結果はフォールディング中間体が選択性の高い阻害剤を得るための新規創薬標的となることを示している。



図 1：リン酸化酵素フォールディング中間体特異的阻害

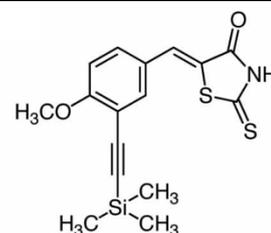


図 2：FINDY の化学構造

2. 研究の目的

本研究の目的は、FINDY とは異なる化合物構造を有する DYRK1A フォールディング中間体特異的阻害剤を化合物スクリーニングにより同定し、このフォールディング中間体特異的阻害の創薬概念をさらに発展させ、創薬の課題解決に取り組むことである。このため、本研究では以下の 3 つの項目の研究を実施した。

- 項目 (1)：DYRK1A フォールディング中間体阻害メカニズムの解明
- 項目 (2)：フォールディング中間体を標的とした化合物スクリーニング
- 項目 (3)：ヒット化合物の構造展開

3. 研究の方法

項目 (1)：DYRK1A フォールディング中間体阻害メカニズムの解明

遺伝子組換え実験により DYRK1A 遺伝子の部位欠損変異体を複数作製し、その分子内自己リン酸化活性と FINDY による阻害活性を培養細胞系を用いてウエスタンブロット法により解析した。

In vitro 翻訳（無細胞タンパク質合成系）に FINDY を加えることで、DYRK1A と FINDY の複合体を発現させ、アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーにより単離・精製し、結晶化実験を行なった（理化学研究所 梅原ユニットとの共同研究）。

項目 (2)：フォールディング中間体を標的とした化合物スクリーニング

遺伝子組換え実験により DYRK1A 必要最小領域と発光タンパク質 eKAZ を融合したタンパク質の in vitro 翻訳・自己リン酸化カップリング系を構築した。発現タンパク質は、リン酸化 Ser97 特異的抗体により捕捉し、発光タンパク質 eKAZ は発光基質セレンテラジンにより検出し、ルミノメーターによりその発光強度を計測した。本発光システムを用いた化合物スクリーニングを実施し、ヒット化合物については項目 (3) へと進めた。

項目 (3)：ヒット化合物の構造展開

ヒット化合物の構造類縁体を合成し、その活性を in vitro 翻訳・自己リン酸化カップリング系とウエスタンブロット法により検証した。

4. 研究成果

項目 (1)：DYRK1A フォールディング中間体阻害メカニズムの解明

FINDY による分子内自己リン酸化阻害に必要な DYRK1A 最小領域は、DYRK1A の Ser97 を含む N 末端周辺とリン酸化酵素活性ドメインのみであり、C 末端ドメインは必要ではないことがわかった。Ser97 を含む N 末端周辺は天然変性領域 (Intrinsically Disordered Region) であると予測されており、FINDY のような化合物が安定に結合する領域とは考

え難いため、FINDY はリン酸化酵素活性ドメインに直接作用すると考えられた。FINDY は ATP に対して競合阻害的に作用することがわかったため (Kii et al. *Nat Commun* 2016)、FINDY は DYRK1A リン酸化酵素活性ドメインの ATP ポケットのフォールディング中間状態へと結合すると予想された。

この予想を検証するため、FINDY と複合体を形成した DYRK1A リン酸化酵素活性ドメインを *in vitro* 翻訳により産生し、精製後に結晶化を試みたが、いずれの条件においても安定な結晶は得られなかった。これはフォールディング中間体が不安定な構造である可能性を示唆している。そこで、FINDY の構造類縁体のうち、トリメチルシリル基のような疎水性の嵩高い官能基のないものを選別・合成し、構造的に安定である完成型 DYRK1A リン酸化酵素活性ドメインとの複合体を形成させ、その結晶構造解析に取り組んだ。その結果、これらの FINDY 構造類縁体は完成型の ATP ポケットに結合することを明らかにした (論文投稿準備中)。この完成型の結合様式に対して FINDY を重ね合わせたシミュレーションを実施した結果、FINDY に対して立体障害を引き起こす完成型 ATP ポケット内のアミノ酸残基の同定に成功した (論文投稿準備中)。すなわち、このアミノ酸残基が FINDY に対して立体障害を起こすために、FINDY は完成型 DYRK1A に対して阻害活性を示さないと予想された。そして、このアミノ酸残基の位置は、フォールディング中間体では異なっており、そのため FINDY が作用できると予想された。これらの予想については、分子動力学シミュレーションにより検証を進めている。

項目 (2) : フォールディング中間体を標的とした化合物スクリーニング

これまでは DYRK1A Ser97 の分子内自己リン酸化をウエスタンブロット法により評価することで、化合物のフォールディング中間体への作用を解析していた (Kii et al. *Nat Commun* 2016)。しかし、この方法ではスループットが低い。そこで、DYRK1A 必要最小領域を活用した *in vitro* 翻訳・自己リン酸化カップリング系を構築した。具体的には、DYRK1A 必要最小領域に発光タンパク質を融合し、リン酸化された Ser97 を特異的抗体によりマルチウェルプレートに捕捉することで、分子内自己リン酸化された DYRK1A 必要最小領域のタンパク質量を発光により検出・定量する ELISA システムである。このシステムを用いた 1st スクリーニング、その後上記ウエスタンブロット法を用いた 2nd スクリーニングを実施した結果、いくつかの DYRK1A フォールディング中間体阻害剤を同定することに成功した (未発表)。これらの化合物のうち構造展開可能なものを選別し、項目 (3) へと進めた。

項目 (3) : ヒット化合物の構造展開

項目 (2) で得られた化合物について構造展開を実施し、ウエスタンブロット法による評価を行なった。その結果、植物アルカロイド骨格を有する新規化合物群の中から、FINDY と同程度のフォールディング中間体特異的阻害活性を有するものの同定に成功した (未発表)。この新規フォールディング中間体特異的阻害剤を項目 (1) にて得られた構造に対してシミュレーションにて結合させたところ、FINDY とほぼ同じ結合様式を有すること、完成型 ATP ポケット内での立体障害の様式もほぼ同じであることを確認した。これらの結果は、フォールディング中間体特異的阻害における共通性の発見へと繋がると思われる。この新規化合物についても項目 (1) の分子動力学シミュレーションによる検証を行うことで、DYRK1A フォールディング中間体特異的阻害の構造基盤を明らかにする予定である。これらの構造基盤を明らかにした後、このシミュレーション結果を他のリン酸化酵素へと応用する。これによって DYRK1A 以外のリン酸化酵素に対してもフォールディング中間体特異的阻害剤の探索を可能とする創薬基盤を構築する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

①Yoshida S, Kuribara T, Ito H, Meguro T, Nishiyama Y, Karaki F, Hatakeyama Y, Koike Y, **Kii I**, Hosoya T. A facile preparation of functional cycloalkynes via an azide-to-cycloalkyne switching approach. *Chem Commun (Camb)*. 2019 Mar 19;55(24):3556-3559. (査読有)
doi: 10.1039/c9cc01113g.

②Nishiyama T, Kobayashi T, Jirintai S, **Kii I**, Nagashima S, Prathiwi Primadharsini P, Nishizawa T, Okamoto H. Screening of novel drugs for inhibiting hepatitis E virus replication. *J Virol Methods*. 2019 Apr 17;270:1-11. (査読有)
doi: 10.1016/j.jviromet.2019.04.017.

③Komura H, Kakio S, Sasahara T, Arai Y, Takino N, Sato M, Satomura K, Ohnishi T, Nabeshima YI, Muramatsu SI, **Kii I**, Hoshi M. Alzheimer A β Assemblies Accumulate in

Excitatory Neurons upon Proteasome Inhibition and Kill Nearby NAK α 3 Neurons by Secretion. *iScience*. 2019 Mar 29;13:452-477. (査読有)
doi: 10.1016/j.isci.2019.01.018.

④Meguro T, Terashima N, Ito H, Koike Y, Kii I, Yoshida S, Hosoya T. Staudinger reaction using 2,6-dichlorophenyl azide derivatives for robust aza-ylide formation applicable to bioconjugation in living cells. *Chem Commun (Camb)*. 2018 Jul 12;54(57):7904-7907. (査読有)
doi: 10.1039/c8cc00179k.

⑤Kii I, Hirahara-Owada S, Yamaguchi M, Niwa T, Koike Y, Sonamoto R, Ito H, Takahashi K, Yokoyama C, Hayashi T, Hosoya T, Watanabe Y. Quantification of receptor activation by oxytocin and vasopressin in endocytosis-coupled bioluminescence reduction assay using nanoKAZ. *Anal Biochem*. 2018 May 15;549:174-183. (査読有)
doi: 10.1016/j.ab.2018.04.001.

⑥Nakano-Kobayashi A, Awaya T, Kii I, Sumida Y, Okuno Y, Yoshida S, Sumida T, Inoue H, Hosoya T, Hagiwara M. Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Sep 19;114(38):10268-10273. (査読有)
doi: 10.1073/pnas.1704143114.

⑦Abu Jhaisha S, Widowati EW, Kii I, Sonamoto R, Knapp S, Papadopoulos C, Becker W. DYRK1B mutations associated with metabolic syndrome impair the chaperone-dependent maturation of the kinase domain. *Sci Rep*. 2017 Jul 25;7(1):6420. (査読有)
doi: 10.1038/s41598-017-06874-w.

⑧Furubayashi T, Motohashi K, Wakao K, Matsuda T, Kii I, Hosoya T, Hayashi N, Sadaie M, Ishikawa F, Matsushita M, Fujiyoshi S. Three-Dimensional Localization of an Individual Fluorescent Molecule with Angstrom Precision. *J Am Chem Soc*. 2017 Jul 5;139(26):8990-8994. (査読有)
doi: 10.1021/jacs.7b03899.

⑨Sako Y, Ninomiya K, Okuno Y, Toyomoto M, Nishida A, Koike Y, Ohe K, Kii I, Yoshida S, Hashimoto N, Hosoya T, Matsuo M, Hagiwara M. Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep*. 2017 May 30;7:46126. (査読有)
doi: 10.1038/srep46126.

⑩Kii I, Sumida Y, Goto T, Sonamoto R, Okuno Y, Yoshida S, Kato-Sumida T, Koike Y, Abe M, Nonaka Y, Ikura T, Ito N, Shibuya H, Hosoya T, Hagiwara M. Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process. *Nat Commun*. 2016 Apr 22;7:11391. (査読有)
doi: 10.1038/ncomms11391.

[学会発表] (計6件)

①喜井 勲 「リン酸化酵素フォールディング中間体を標的とした創薬研究」
新学術領域「中分子戦略」「分子夾雑化学」ジョイントシンポジウム・第21回生命化学研究会 (招待講演) 2018年

②喜井 勲 「An alternative strategy to develop a selective kinase inhibitor」
京都大学特別学術セミナー (招待講演) 2018年

③喜井 勲 「リン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング中間体阻害メカニズムの解析」
日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会 2017年

④Isao Kii 「Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process」
RIKEN SAKURA symposium (招待講演) 2017年

⑤ Isao Kii 「Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process」

207th iCeMS Seminar 京都大学（招待講演） 2017年

⑥ 喜井 勲 「低分子化合物 FINDY によるリン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング阻害メカニズムの解析」

日本ケミカルバイオロジー学会 第11回年会 2016年

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：細谷 孝充

ローマ字氏名：HOSOYA, Takamitsu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。