

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08340

研究課題名(和文) 芳香族炭化水素受容体のユビキチンリガーゼ活性によるプロテインノックダウン法の開発

研究課題名(英文) Development of small molecule that recruit AhR E3 ligase to target proteins.

研究代表者

栗原 正明 (Kurihara, Masaaki)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：20205206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の目的とするタンパク質をユビキチン-プロテアソーム系によって意図的に分解する方法がプロテインノックダウン法である。疾病の原因タンパク質を特異的に分解できれば新しい治療法となる。本研究は芳香族炭化水素受容体(AhR)のユビキチンリガーゼ活性を利用した新規プロテインノックダウン法の開発を行うことが目的である。

ユビキチンリガーゼ活性を有する芳香族炭化水素受容体(AhR)に結合するリガンド分子(β-ナフトフラボン)と分解標的タンパク質(ERα)に結合するリガンド分子をPEGリンカーで結合した分子を設計した。合成した化合物を用いて分解活性を検討した結果、分解活性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の目的とするタンパク質をユビキチン-プロテアソーム系によって意図的に分解する方法がプロテインノックダウン法である。疾病の原因タンパク質を特異的に分解できれば新しい治療薬の開発が可能となる。今後、プロテインノックダウン法は新しい創薬の手法となるであろう。この研究では、ユビキチンリガーゼ活性を有する芳香族炭化水素受容体を利用したプロテインノックダウン法の開発を行った。ここで開発したプロテインノックダウン法分子は乳がんの新しい治療薬の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Targeted protein degradation using chimeric small molecules such as proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) and specific and nongenetic inhibitors of apoptosis protein [IAP]-dependent protein erasers (SNIPERs) is an emerging modality in drug discovery. We expand the repertoire of E3 ligases capable of ubiquitylating target proteins using this system. By incorporating β-naphthoflavone (β-NF) as a ligand, we developed a novel class of chimeric molecules that recruit the arylhydrocarbon receptor (AhR) E3 ligase complex.

研究分野：創薬化学

キーワード：プロテインノックダウン 芳香族炭化水素受容体

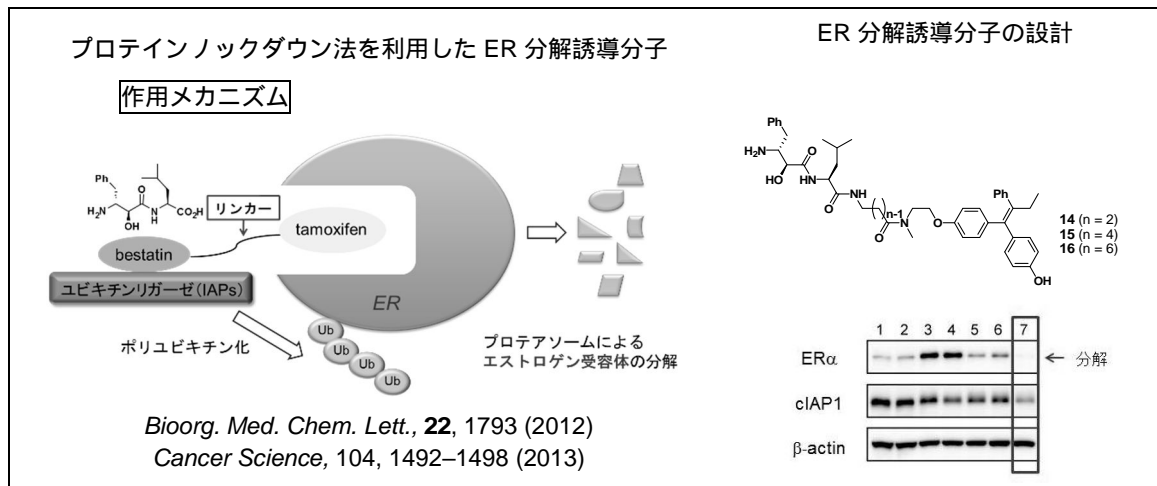
1. 研究開始当初の背景

低分子によるプロテインノックダウン法の開発の動向

(1) Crews らは 2008 年に低分子を使ったプロテインノックダウンを報告している (Bioorg. Med. Chem. Lett., 18, 5904-08(2008)) ユビキチンリガーゼとして MDM2 を用いて androgen receptor の分解を行った。

(2) 橋本らは、ユビキチンリガーゼとして cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) を用いて retinoic acid-binding protein II (CRABP- II) の分解を行った (J Am Chem Soc. 2010, 132,5820-26)。

(3) 申請者らは低分子を用いた核内レセプターエストロゲン受容体 (ER) のプロテインノックダウンの研究を行った (Bioorg. Med. Chem. Lett., 22, 1793-1796(2012), Cancer Science, 104, 1492-1498 (2013))。ユビキチンリガーゼとして cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) を用いてエストロゲン受容体(ER) の分解を行った。



プロテインノックダウン法によるエストロゲン受容体(ERα)の特異的分解誘導剤の開発

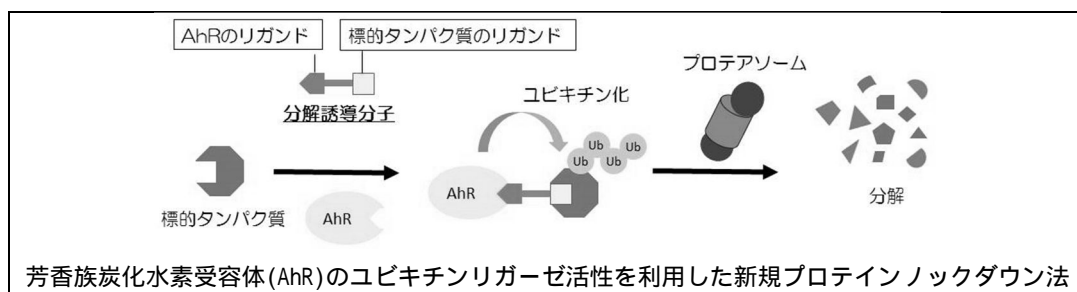
芳香族炭化水素受容体(AhR)のユビキチンリガーゼ活性の報告

2007 年に加藤らは芳香族炭化水素受容体(AhR)にユビキチンリガーゼ活性があることを報告した (Nature. 2007 Mar 29;446(7135):562-6)。

これまでに AhR を用いたプロテインノックダウンの報告はない。

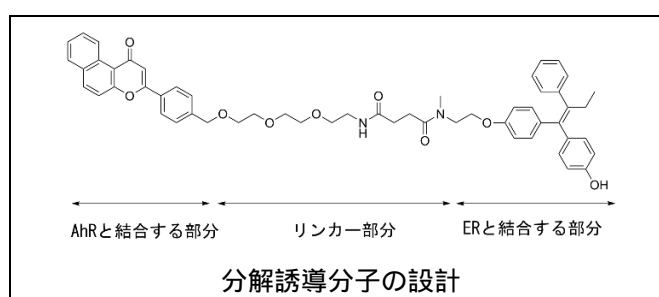
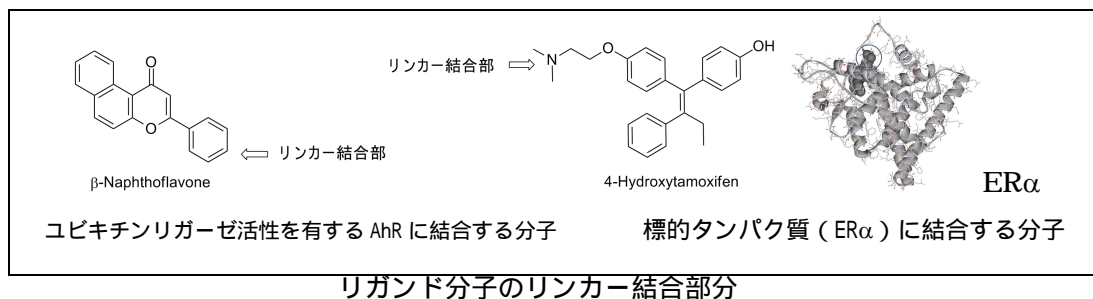
2. 研究の目的

細胞内の目的とするタンパク質をユビキチン - プロテアソーム系によって意図的に分解する方法がプロテインノックダウン法である。申請者はすでにいくつかのユビキチンリガーゼ活性を有するタンパク質を利用するプロテインノックダウン法の開発を行ってきた。疾病の原因タンパク質を特異的に分解できれば新しい治療法となる。しかし、プロテインノックダウン法に利用できるユビキチンリガーゼの種類が少なく、プロテインノックダウン法の適用拡大のボトルネックになっている。本研究は芳香族炭化水素受容体 (AhR) のユビキチンリガーゼ活性を利用した新規プロテインノックダウン法の開発を行うことが目的である。



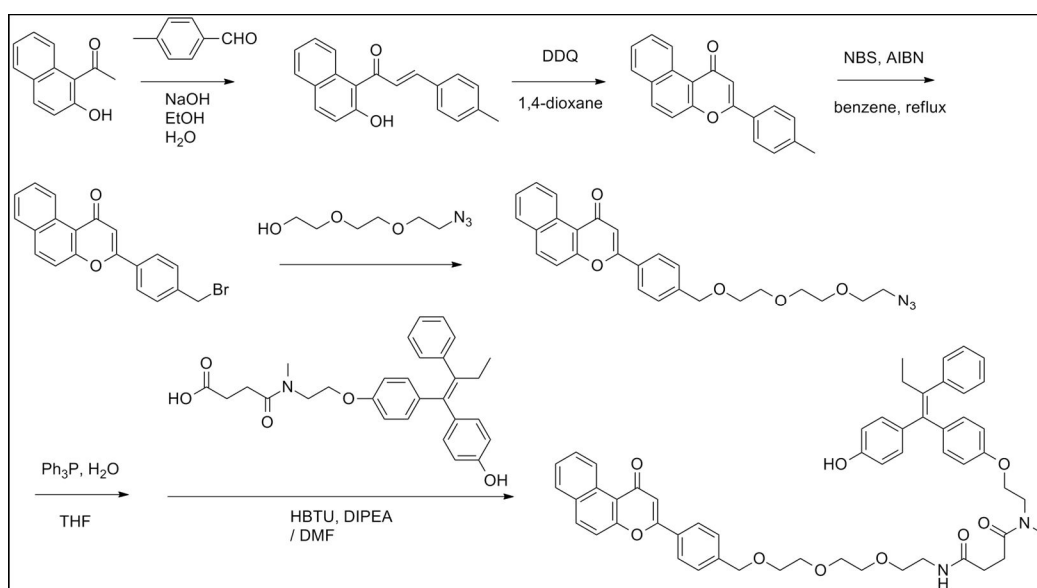
3. 研究の方法

芳香族炭化水素受容体 (AhR) は核内受容体の一つで、最近ユビキチンリガーゼ活性が確認されている。具体的には、ユビキチンリガーゼタンパク質と標的タンパク質とに結合する分解誘導分子を開発する。ユビキチンリガーゼ活性を有する芳香族炭化水素受容体 (AhR) に結合するリガンド分子 (β-ナフトフラボン) と分解標的タンパク質 (ER) に結合するリガンド分子 (4-ヒドロキシタモキシフェン) を PEG リンカーで結合した分子を設計した。それぞれのリガンド分子のリンカー結合部分はタンパク質との相互作用に影響しないと考えられる部分を選択した。



4. 研究成果

下図の方法で目的とした分子の合成に成功した。



設計・合成した化合物を用いて分解標的タンパク質 (ER) の分解活性を検討した。その結果、分解活性があることを明らかにした。

【発表論文】

Ohoka N, Tsuji G, Shoda T, Fujisato T, Kurihara M, Demizu Y, Naito M.

Development of Small Molecule Chimeras That Recruit AhR E3 Ligase to Target Proteins.

ACS Chem Biol. 2019, 14, 2822-2832.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Misawa T, Tsuji G, Takahashi T, Ochiai E, Takagi KI, Horie K, Kakuda S, Takimoto-Kamimura M, Kurihara M, Demizu Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Structural development of non-secosteroidal vitamin D receptor (VDR) ligands without any asymmetric carbon.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem.	6. 最初と最後の頁 6146-6152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.11.008. Epub 2018 Nov 9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuji G, Hattori T, Kato M, Hakamata W, Inoue H, Naito M, Kurihara M, Demizu Y, Shoda T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Design and synthesis of cell-permeable fluorescent nitrilotriacetic acid derivatives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem.	6. 最初と最後の頁 5494-5498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.09.028. Epub 2018 Sep 24.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eto R, Misawa T, Noguchi-Yachide T, Ohoka N, Kurihara M, Naito M, Tanaka M, Demizu Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Design and synthesis of estrogen receptor ligands with a 4-heterocycle-4-phenylheptane skeleton.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem.	6. 最初と最後の頁 1638-1642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.02.010. Epub 2018 Feb 9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Okuhira, T. Shoda, R. Omura, N. Ohoka, T. Hattori, N. Shibata, Y. Demizu, R. Sugihara, A. Ichino, H. Kawahara, Y. Itoh, M. Ishikawa, Y. Hashimoto, M. Kurihara, S. Itoh, H. Saito, M. Naito	4. 巻 91
2. 論文標題 Targeted Degradation of Proteins Localized in Subcellular Compartments by Hybrid Small Molecules	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 159-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.116.105569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okitsu K, Misawa T, Shoda T, Kurihara M, Demizu Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Development of an ON/OFF switchable fluorescent probe targeting His tag fused proteins in living cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 3417-3422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.05.087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohoka N, Misawa T, Kurihara M, Demizu Y, Naito M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Development of a peptide-based inducer of protein degradation targeting NOTCH1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 4985-4988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.10.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoda T, Kato M, Fujisato T, Demizu Y, Inoue H, Naito M, Kurihara M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Tamoxifen and fulvestrant hybrids showed potency as selective estrogen receptor down-regulators.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med Chem	6. 最初と最後の頁 206-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1573406412666160805101408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Okitsu, T. Hattori, T. Misawa, T. Shoda, M. Kurihara, M. Naito, Y. Demizu	4. 巻 61
2. 論文標題 Development of a small hybrid molecule that mediates degradation of His-tag fused proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Chem.	6. 最初と最後の頁 576-582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.7b00413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Demizu, Y., Ohoka, N., Nagakubo, T., Yamashita, H., Misawa, T., Okuhira, K., Naito, M., Kurihara, M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Development of a peptide-based inducer of nuclear receptors degradation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 2655-2658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2016.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Demizu Y, Shibata N, Hattori T, Ohoka N, Motoi H, Misawa T, Shoda T, Naito M, Kurihara M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 4865-4869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2016.09.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shoda, T., Kato, M., Fujisato, T., Misawa, T., Demizu, Y., Inoue, H., Naito, M., Kurihara, M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of raloxifene derivatives as a selective estrogen receptor down- regulator.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem.,	6. 最初と最後の頁 2914-2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2016.04.031.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三澤隆史, 大岡伸通, 大庭 誠, 田中正一, 内藤幹彦, 栗原正明, 出水庸介
2. 発表標題 親水性分子の細胞内導入を志向した細胞膜高透過性ペプチドの開発
3. 学会等名 第15回次世代を担う有機化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗原正明, 三澤隆史, 出水庸介
2. 発表標題 ジフェニルメタンを基本骨格とするリガンドの創製
3. 学会等名 第3回Neo Vitamin D Workshop学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 正田卓司, 奥平桂一郎, 内藤幹彦, 栗原正明
2. 発表標題 エストロゲン受容体分解誘導剤の分子デザイン
3. 学会等名 第20回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 正田卓司, 藤里卓磨, 三澤隆史, 出水庸介, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明
2. 発表標題 長鎖アルキル基を有する新規エストロゲン受容体分解誘導剤の合成と評価
3. 学会等名 第42回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤里卓磨, 正田卓司, 大岡伸通, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明
2. 発表標題 芳香族炭化水素受容体を利用したプロテインノックダウン法のメカニズム解析
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 正田卓司, 藤里卓磨, 三澤隆史, 出水庸介, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明
2. 発表標題 選択的エストロゲン受容体分解薬の分子設計
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----