

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15121

研究課題名(和文) タンパク質相互作用に基づくペプチドリガンドの設計とプロテインノックダウンへの応用

研究課題名(英文) Design of peptide ligands based on protein-protein interaction and their application to protein knockdown technology

研究代表者

内藤 幹彦(Naito, Mikihiko)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・部長

研究者番号：00198011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：標的タンパク質に結合するヘリカルペプチド(PERM3、SAHM1)をリガンドとしてSNIPERに導入し、エストロゲン受容体及びNotch1を分解するペプチド型SNIPERを開発した。これらのSNIPERはプロテアソームによる標的タンパク質の分解を誘導し、SNIPER(Notch)ではNotch下流のc-myc遺伝子発現を阻害した。これらの結果から、ヘリカルペプチドを標的リガンドとしても標的タンパク質を分解するSNIPERを開発できる事が示された。

研究成果の概要(英文)：We developed novel SNIPER compounds against estrogen receptor and Notch1 proteins by incorporating helical peptides, PERM3 and SAHM1, respectively, to SNIPERs as target ligands. These SNIPER compounds induced proteasomal degradation of the target proteins, and a SNIPER (Notch) suppressed the expression of c-myc, a downstream gene regulated by Notch signaling. These results indicate that functional SNIPER compounds can be developed by incorporating helical peptides as a target ligand.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：プロテインノックダウン SNIPER ヘリカルペプチド エストロゲン受容体 Notch

1. 研究開始当初の背景

病気の原因となっているタンパク質を選択的に分解する事ができれば、従来にない新しい薬剤を創製できると考えられるが、タンパク質の分解を選択的に制御する技術はほとんど研究されていない。申請者らは、SNIPER (Specific and Non-genetic IAP-dependent Protein Eraser) と名付けた化合物によって標的タンパク質を特異的に分解するプロテインノックダウン法の開発研究を行ってきた。SNIPER はユビキチンリガーゼ IAP に結合する化合物 (MeBS) と、標的タンパク質に結合するリガンド (X) をリンカーでつないだハイブリッド化合物 (BS-X) であり、細胞内で標的タンパク質と IAP をクロスリンクする事により標的タンパク質のユビキチン化とプロテアソームによる分解を誘導する。標的リガンド (X) を置換することにより様々なタンパク質を分解する事ができる汎用性の高い技術であり、標的リガンドとして ATRA、Tamoxifen、KHS108 等の小分子を導入する事により、CRABP2、エストロゲン受容体、TACC3 等のタンパク質をそれぞれ特異的に分解する SNIPER 化合物の開発に成功してきた (*J Am Chem Soc* 132, 5820-5826 (2010); *FEBS Lett* 585, 1147-1152 (2011); *Cancer Sci* 104, 1492-1498 (2013); *Cell death & disease* 5, e1513 (2014) 他)。しかし約 25,000 個のヒト全タンパク質の中で、小分子リガンドが結合できるポケット構造を持つものは約 3,000 個に過ぎず、従来の方法では残りの 20,000 個以上のタンパク質を標的とする SNIPER の開発はできない。そこで、タンパク質の表面に強く結合する架橋型ヘリカルペプチドを標的リガンド (X) として組み込んだペプチド型 SNIPER の開発を行う事を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘリカルペプチドを標的リガンドとして組み込んだ各種の SNIPER 化合物を開発し、これらの SNIPER が標的タンパク質を分解する事を実証する事である。

3. 研究の方法

エストロゲン受容体に対して強い親和性で結合するヘリカルペプチド (PERM3) 及び Notch1 に結合する SAHM1 を標的リガンドとして利用し、IAP antagonist と結合させたキメラ化合物をペプチド型 SNIPER として合成し、培養細胞における標的タンパク質の分解を Western ブロット法で調べる。分解活性を示した SNIPER については、プロテアソーム阻害剤等を用いて分解系路を確認すると共に、標的タンパク質の分解によって生じる下流遺伝子発現への影響等を調べる。

4. 研究成果

(1) エストロゲン受容体を標的とするペプチド型 SNIPER の開発

PERM3 はそれ自体で細胞内に蓄積するが、膜透過性を高めるために PERM3 の C 末に膜透過ペプチド (R7) を結合し、さらに N 末には各種リンカーを介して IAP リガンド (MV1) を結合したペプチド型 SNIPER を各種合成した。これらのペプチド型 SNIPER を *in vitro* で MCF7 ヒト乳がん細胞に 6 時間作用させてエストロゲン受容体の発現量の変化を調べた結果、PEG リンカー (n=2) を介して MV1 と PERM3-R7 を結合したペプチド型 SNIPER (peptide 4) 及び Ala リンカーを介して MV1 と PERM3-R7 を結合したペプチド型 SNIPER (peptide 5) がエストロゲン受容体の減少活性を示した。PERM3 はアンドロゲン受容体にも結合活性を示す事から、アンドロゲン受容体の減少活性を同様にして調べたところ、これらのペプチド型 SNIPER はアンドロゲン受容体の減少活性も示す事がわかった。またこれらの核内受容体減少活性は、プロテアソーム阻害剤である MG132 で抑制された事から、これらのペプチド型 SNIPER はユビキチン・プロテアソーム系による標的タンパク質の分解を誘導している事が示唆された。

(2) Notch を標的とするペプチド型 SNIPER の開発

Notch シグナルは細胞分化、細胞増殖、細胞死等に細胞の様々な機能に關与する重要なシグナル系であり、急性 T リンパ性白血病などのがん細胞では Notch シグナルの異常な活性化が報告されている。Notch 受容体にリガンドが結合すると、細胞表面の Notch 受容体はプロテアーゼによって切断され、細胞内ドメインが細胞質に遊離して転写因子 CSL 及び転写 Co-activator 因子 MAML1 と結合して転写活性化を起こす。MAML1 の N 末からデザインされたヘリカルペプチド SAHM1 は Notch1/CSL 複合体に結合する事が報告されているため、SAHM1 と MV1 (IAP antagonist) をリンカーで繋いだ SNIPER (Notch) を合成して、その標的タンパク質分解活性を調べた。その結果、SHAM1 ペプチドや PEG リンカーの短い SNIPER (Notch) では Notch タンパク質を分解しなかったが、PEG リンカーの長い SNIPER (Notch) は Notch1 タンパク質を分解する活性を示し、Notch 下流の c-Myc の発現を抑制した。また SNIPER (Notch) による Notch1 タンパク質の分解はプロテアソーム阻害剤 MG132 で阻害された。一方 CSL タンパク質はいずれの SNIPER (Notch) でも分解されなかった。これらの結果から、ヘリカルペプチドを標的リガンドとして組み込んだ SNIPER は、標的タンパク質 Notch1 の分解活性を示

す事が明らかになった。また標的タンパク質の分解にはリンカーの長さが重要であり、リンカー長を最適化する必要があることが示された。

これらの結果から、ヘリカルペプチドを標的リガンドとして利用したペプチド型 SNIPER によって標的タンパク質の分解を誘導できることが示された。

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17件)

Ohoka, N., Misawa, T., Kurihara, M., Demizu, Y. & Naito, M.: Development of a peptide-based inducer of protein degradation targeting NOTCH1. **Bioorg Med Chem Lett** 27, 4985-4988 (2017).

DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.011

Shibata, N., Nagai, K., Morita, Y., Ujikawa, O., Ohoka, N., Hattori, T., Koyama, R., Sano, O., Imaeda, Y., Nara, H., Cho, N. & Naito, M.: Development of Protein Degradation Inducers of Androgen Receptor by Conjugation of Androgen Receptor Ligands and Inhibitor of Apoptosis Protein Ligands. **J Med Chem** 61, 543-575 (2018).

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00168

Hattori, T., Okitsu, K., Yamazaki, N., Ohoka, N., Shibata, N., Misawa, T., Kurihara, M., Demizu, Y. & Naito, M.: Simple and efficient knockdown of His-tagged proteins by ternary molecules consisting of a His-tag ligand, a ubiquitin ligase ligand, and a cell-penetrating peptide. **Bioorg Med Chem Lett** (2017).

DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.08.001

Ohoka, N., Nagai, K., Shibata, N., Hattori, T., Nara, H., Cho, N. & Naito, M.: SNIPER(TACC3) induces cytoplasmic vacuolization and sensitizes cancer cells to Bortezomib. **Cancer Sci** 108, 1032-1041 (2017).

DOI: 10.1111/cas.13198

Shibata, N., Miyamoto, N., Nagai, K., Shimokawa, K., Sameshima, T., Ohoka, N., Hattori, T., Imaeda, Y., Nara, H., Cho, N. & Naito, M.: Development of protein degradation inducers of oncogenic BCR-ABL protein by conjugation of ABL kinase inhibitors and IAP ligands. **Cancer Sci** 108, 1657-1666 (2017).

DOI: 10.1111/cas.13284

Shimokawa, K., Shibata, N., Sameshima, T., Miyamoto, N., Ujikawa, O., Nara, H., Ohoka, N., Hattori, T., Cho, N. & Naito, M.: Targeting the Allosteric Site of Oncoprotein BCR-ABL as an Alternative Strategy for Effective Target Protein Degradation. **ACS Med Chem Lett** 8, 1042-1047 (2017).

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.7b00247

Okuhira, K., Shoda, T., Omura, R., Ohoka, N., Hattori, T., Shibata, N., Demizu, Y., Sugihara, R., Ichino, A., Kawahara, H., Itoh, Y., Ishikawa, M., Hashimoto, Y., Kurihara, M., Itoh, S., Saito, H. & Naito, M.: Targeted Degradation of Proteins Localized in Subcellular Compartments by Hybrid Small Molecules. **Mol Pharmacol** 91, 159-166 (2017).

DOI: 10.1124/mol.116.105569

Ohoka, N., Okuhira, K., Ito, M., Nagai, K., Shibata, N., Hattori, T., Ujikawa, O., Shimokawa, K., Sano, O., Koyama, R., Fujita, H., Teratani, M., Matsumoto, H., Imaeda, Y., Nara, H., Cho, N. & Naito, M.: In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). **J Biol Chem** 292, 4556-4570 (2017).

DOI: 10.1074/jbc.M116.768853

Demizu, Y., Ohoka, N., Nagakubo, T., Yamashita, H., Misawa, T., Okuhira, K., Naito, M. & Kurihara, M.: Development of a peptide-based inducer of nuclear receptors degradation. **Bioorg Med Chem Lett** 26, 2655-2658 (2016).

DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.04.013

Demizu, Y., Shibata, N., Hattori, T., Ohoka, N., Motoi, H., Misawa, T., Shoda, T., Naito, M. & Kurihara, M.: Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand. **Bioorg Med Chem Lett** 26, 4865-4869 (2016).

DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.09.041

〔学会発表〕(計 27 件)

内藤幹彦、大岡伸通、柴田識人、服部隆行：IAP を利用したプロテインノックダウン法の開発とがん原性タンパク質の分解．日本薬学会第 138 年会（2018 年）

Nobumichi Ohoka, Yoko Morita, Katsunori Nagai, Kenichiro Shimokawa, Osamu Ujikawa, Ikuo Fujimori, Masahiro Ito, Youji Hayase, Keiichiro Okuhira, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Tomoya Samejima, Osamu Sano, Ryokichi Koyama, Yasuhiro Imaeda, Hiroshi Nara, Nobuo Cho, Mikihiko Naito : In vivo protein knockdown by chimeric small-compound SNIPERs. 日本薬学会第 138 年会（2018 年）

Mikihiko Naito, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Takayuki Hattori : Degradation of target proteins by SNIPER compounds recruiting IAP ubiquitin ligases . EMBO conference Ubiquitin and SUMO (2017 年)

Mikihiko Naito : Protein knockdown by SNIPER compounds recruiting IAP ubiquitin ligases . 2017 Chinese Medicinal Chemistry Symposium, CPA-EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (2017 年)

大岡伸通、柴田識人、服部隆行、内藤幹彦：芳香族炭化水素受容体ユビキチンリガーゼをリクルートする新しいプロテインノックダウン化合物の開発 .第 76 回日本癌学会学術総会(2017 年)

Mikihiko Naito, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Takayuki Hattori : Degradation of oncogenic proteins by SNIPER compounds. 第 76 回日本癌学会学術総会（2017 年）

大岡伸通、永井克典、奥平桂一郎、柴田識人、服部隆行、長展生、内藤幹彦：ユビキチン・プロテアソーム経路を利用したプロテインノックダウン化合物の開発．日本薬学会第 137 年会（2017 年）

Mikihiko Naito : *In vivo* protein knockdown by SNIPER recruiting IAP ubiquitin ligases . The 21th 国際化学療法シンポジウム (JFCR-ISCC) (2016 年)

大岡伸通、奥平桂一郎、永井克典、伊東昌宏、柴田識人、服部隆行、宇治川治、佐野修、小山亮吉、今枝泰宏、奈良洋、長展生、内藤幹彦：低分子化合物 SNIPER による細胞内ユビキチ

ン化機能の制御と創薬への利用．第 39 回日本分子生物学会年会（2016 年）

大岡伸通、奥平桂一郎、永井克典、伊東昌宏、柴田識人、服部隆行、宇治川治、佐野修、小山亮吉、今枝泰宏、奈良洋、長展生、内藤幹彦：低分子化合物 SNIPER による *in vivo* プロテインノックダウン．第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会（2016 年）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/mtgt/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

内藤 幹彦 (NAITO, Mikihiko)

国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子医薬部・部長

研究者番号：00198011

(2)研究分担者

大岡 伸通 (OHOKA, Nobumichi)

国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子医薬部・室長

研究者番号：80568519

(3)連携研究者

出水 庸介 (DEMIZU, Yosuke)

国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部・部長

研究者番号：90389180