

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651092

研究課題名（和文）タンパク翻訳後ノックアウト法：標的タンパク質を特異的に分解するハイブリッド小分子

研究課題名（英文）Protein Knockdown Approach: Hybrid Small Molecules which Induce Proteasome Degradation of Target Proteins

研究代表者

橋本 祐一 (HASHIMOTO YUICHI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：90164798

研究成果の概要（和文）：標的とするタンパク質に対するリガンドと、ユビキチンリガーゼに対して親和性を持つ低分子化合物とのハイブリッド分子を活用することによって、プロテインノックダウン技術を開発することができる。ユビキチンリガーゼとして、メチルベスタチンに対して特異的親和性を有する cIAP1 を選択し、メチルベスタチンと各種リガンドとのハイブリッド分子を設計し、合成した。創製したハイブリッド分子は、それぞれのリガンドが標的とするタンパク質の分解を誘導し、プロテインノックダウン法の有用性と一般性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Protein knockdown can be achieved by the use of a small molecule that possesses affinity for both the target protein and ubiquitin ligase. As the ubiquitin ligase, we selected cIAP1 which specifically binds methylbestatin. Several hybrid molecules consisting of methylbestatin and a ligand for various proteins were designed and synthesized. These hybrid molecules induced selective decomposition of the target proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	0	700,000
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,900,000	270,000	3,170,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生物活性分子の設計・合成、タンパク質の自己分解

## 1. 研究開始当初の背景

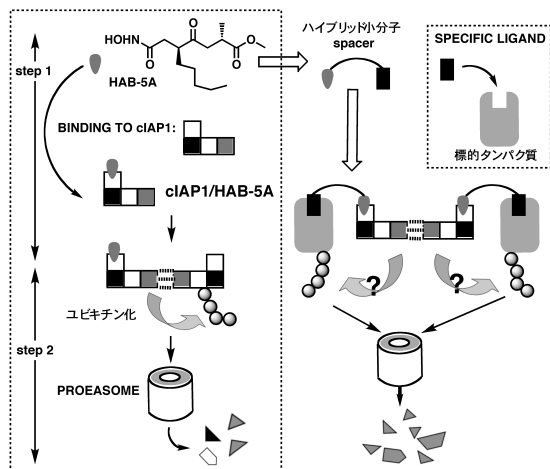
cIAP1 はアポトーシスの制御タンパクとして 1995 年に同定され、2008 年、内藤らによりメチルベスタチンによる活性化・自己分解現象が報告された。我々はメチルベスタチンが直接 cIAP1 の特異的部位に結合する活性化リガンドであることを化学生物学的に証明し、さらに構造展開によって強力な cIAP リガンドを創生するに至った。引き続き機構解明研究から、ユビキチン化は 2 量化の後に起

ることが示唆された。以上、ならびに本研究者らのこれまでの化学生物学的研究実績から、cIAP/プロテアソーム系を利用した、ハイブリッド小分子による「標的タンパク質分解法」を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

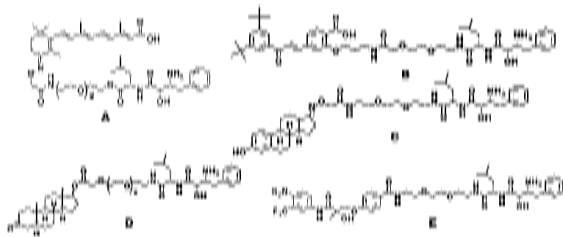
ヒト生細胞において、特定のタンパク質を特異的に分解させる手法を確立することを最終目標とした。タンパク質の分解装置には、

本来細胞が具備している cIAP1 の活性化による自己ユビキチン化 (下図 step1) とプロテアソームによるユビキチン化タンパク質の分解 (下図 step2) を利用することとした。



### 3. 研究の方法

cIAP リガンドと、標的タンパク質に特異的親和性を有する特異的リガンドをスペーサーを介して結合させたハイブリッド小分子を創生すれば、活性化 cIAP1 と標的タンパク質を近傍に配置してタンパク質のユビキチン化を惹起し、これをプロテアソームにて分解できるはずである。そのような分子をいくつか設計し合成した。cIAP リガンドとしてメチルベスタチンを、各種標的タンパク質/リガンドの組み合わせとして「CRABP/レチノイン酸 (下図 A に対応)、RAR/合成レチノイド (下図 B に対応)、ER/エストロゲン (下図 C に対応)、AR/アンドロゲン (下図 D に対応)、AR/合成抗アンドロゲン (下図 E に対応)」を選択した。メチルベスタチンと上記リガンドをスペーサーを介して結合させたハイブリッド分子を各種合成した (下図)。合成したハイブリッド分子をヒト培養細胞に処理し、標的とするタンパク質含量をウエスタン解析等により分析した。



### 4. 研究成果

上記第 3 項に記載の各合成ハイブリッド化合物は、培養細胞レベルでそれぞれ良好に、標的とするタンパク質を選択的にノックダウンした。特にメチルベスタチン-レチノイン酸ハイブリッドについては分子機構解析を進め、ハイブリッド分子-cIAP1-CRABP からなる 3 者複合体の生成 (プルダウンアッセイ

等)、CRABP のユビキチン化 (ウエスタン解析)、プロテアソーム依存性 (阻害剤試験) を示すことができ、観察したタンパク質ノックダウンが、上記第 2 項に示した図で想定した東理に生じていることを示唆することができた。

また、同じくメチルベスタチン-レチノイン酸ハイブリッドについて、スペーサー長の違いにより、CRABP サブタイプ (I と II) を区別して分解誘導し得ることも示した。

核内受容体リガンド (アゴニスト) を組み込んだハイブリッド分子は、活性としてはアンタゴニストとしての活性を示すことになり、その作用機序は標的とする核内受容体の消失に基づく。例えば、テストステロン誘導体とメチルベスタチンを利用して創製した対アンドロゲン受容体分解誘導剤は、フルタミド等のアンドロゲンアンタゴニストに耐性な変異を持ったアンドロゲン受容体を発現する細胞に対しても見かけ上、アンタゴニストとして作用することを示した。

### 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 4 件)

- ① Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 132: 5820-5826 (2010), DOI: 10.1021/ja100691p (査読有り)
- ② Y. Itoh, M. Ishikawa, R. Kitaguchi, S. Sato, M. Naito, Y. Hashimoto, Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 3229-3241 (2011), Doi: 10.1016/j.bmc.2011.03.057 (査読有り)
- ③ Y. Itoh, R. Kitaguchi, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers, *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 6768-6778 (2011), Doi: 10.1016/j.bmc.2011.09.041 (査読有り)
- ④ K. Okuhira, N. Ohoka, K. Sai, T. Nishimaki-Mogami, Y. Itoh, M. Ishikawa, Y. Hashimoto, M. Naito, Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein, *FEBS Lett.*, 585: 1147-1152 (2011), Doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.019 (査読有り)

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① 伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、

- プロテインノックダウン法の開発、第8回次世代を担う有機化学シンポジウム、2010.5.13、東京。
- ② 石川稔、伊藤幸裕、内藤幹彦、橋本祐一、細胞内レチノイド結合タンパク質の分解を誘導するレチノイン酸連結化合物の創製、日本ビタミン学会第62回大会、2010.6.11、盛岡。
- ③ 伊藤幸裕、石川稔、奥平桂一郎、内藤幹彦、橋本祐一、プロテインノックダウン法を利用した創薬指向型 CRABP 分解誘導剤の創製、第29回メディシナルケミストリーシンポジウム、2010.11.17、京都。
- ④ Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, Protein knockdown using ubiquitination activity of cIAP1: Discovery of CRABP degradation inducers. PACIFICHEM 2010, 2010. Dec. 15, Honolulu.
- ⑤ 北口梨沙、伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、プロテインノックダウン法を利用した核内受容体分解誘導低分子の創製、日本薬学会第131年会、2011.3.28、静岡。
- ⑥ 奥平桂一郎、大岡伸通、最上(西巻)知子、橋本祐一、内藤幹彦、細胞内に局在するタンパク質を標的としたプロテインノックダウン技術の検討、日本がん分子標的治療学会第15回学術集会、2011.6.22、東京。
- ⑦ 北口梨沙、伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、核内受容体を細胞内で選択的に分解誘導する分子の創製、日本レチノイド研究会第22回学術集会、2011.11.11、東京。
- ⑧ 橋本祐一、タンパク質の形と存在状態を狙う生理活性物質の創製、平成23年度後期(秋季)有機合成化学講習会、2011.11.17、東京。
- ⑨ M. Ishikawa, Y. Itoh, R. Kitaguchi, S. Sato, M. Naito, Y. Hashimoto, Protein knockdown: selective degradation of target proteins in cells using methyl bestatin-ligand hybrid molecules. AIMECS 2011, 2011. Nov. 29, Tokyo.
- ⑩ M. Naito, K. Okuhira, N. Ohoka, N. Shibata, T. Hattori, Y. Itoh, M. Ishikawa, Y. Hashimoto, Development of small molecules that induce IAP-mediated ubiquitylation and proteosomal degradation of target protein, The Sixth International Conference. SUMO, Ubiquitin, UBL Proteins, 2012, Feb. 8, Houston.
- ⑪ Y. Hashimoto, Retinoids as ligands for pharmaceutical chaperone and protein knockdown approach, The 1st International Symposium on Latent TGF- $\beta$  Activation

Reaction, 2012, Feb. 25, Kobe.

[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

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-8ken-HP/Index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 祐一 (HASHIMOTO YUICHI)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授  
研究者番号：90164798

### (2) 連携研究者

石川 稔 (ISHIKAWA MINORU)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：70526839