

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249006

研究課題名(和文)タンパク質動的状態(ドラマタイプ)のケミカルコントロール

研究課題名(英文)Chemical control of protein dramatype

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円、(間接経費) 10,350,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の機能や存在状態(細胞内での局在・分布や安定性・寿命)はその3次構造に依存している。したがって、特定のタンパク質の3次構造の制御は、その機能や存在状態の制御に直結する。また、特定のタンパク質の3次構造の異常に基づく多くの難治性疾患が存在する。本研究では、(1)タンパク質の3次構造を制御することによって作用を発揮する各種核内受容体リガンドの創製、(2)タンパク質の異常な3次構造に基づく細胞内局在異常を修正する化合物群の創製、ならびに(3)特定のタンパク質の生細胞内での分解を誘導する化合物群の創製、に成功するとともに、(4)関わる分子設計として共通骨格を利用する手法を提案した。

研究成果の概要(英文)：Function, expression, stability and cellular localization of proteins are determined by their three dimensional structure. Therefore, control of the conformation of proteins results on regulation of their function/stability/localization. Abnormal conformation of specific proteins results in various incurable diseases. This research projects resulted in creation of: (1) various nuclear receptor ligands which control the function of the receptors by regulating their conformation, (2) small molecules (pharmacological chaperons) which correct abnormal trafficking of mutated proteins (ex. mutated rhodopsin which causes retinitis pigmentosa, NPC1 which caused Niemann-Pick type 1 disease), and (3) small molecules (SNIPERS) which induce degradation of target proteins in living cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医薬分子機能学

キーワード：トランフィッキング フォールディング異常症 蛋白変性症 マルチテンプレート 核内受容体リガンド 生理活性物質 蛋白質相互作用 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生理活性物質の主たる標的はタンパク質である。機能性タンパク質の細胞内/膜局在や寿命(存在時期・時間や、蓄積・消失)の「異常」は多くの難治性疾患の原因となる。当該の異常の多くは、分子基盤的には、「タンパク質のフォールディング(3次元構造構築)の異常」に基づいている。当該タンパク質のフォールディング異常の正常化・修正や、特定のタンパク質を標的とした、その分解・排除機構の所望な制御が、当該疾病の治療戦略として成立するはずであるが、それらを達成する小分子あるいはそれを創製する手法は極めて限られていた。

2. 研究の目的

タンパク質のフォールディング制御ないしその異常の修正を作用機構とする小分子生理活性物質の創製、ならびにその手法の提案とその有用性の実験的実証、を目的とした。具体的には、

- (1) タンパク質のフォールディング異常(位置や機能の異常)を正常化・修正する小分子生理活性物質(ファーマコロジカルシャペロン)の創製、
- (2) タンパク質の細胞内分解を促進または遅延する小分子生理活性物質(時間的異常の修正)(SNIPER分子)の創製、
- (3) タンパク質のコンフォメーション制御により活性を発揮する各種核内受容体リガンドの創製、ならびにその分子設計に関わる、マルチテンプレート概念(共通の骨格の修飾展開により複数種の薬物受容体に対する作用化合物が創製するコンセプト)の有用性の実験的実証、

を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ファーマコロジカルシャペロン:

①網膜色素変性症:ある種のロドプシンの突然変異は、その細胞内局在の異常(トラフィッキング異常、小胞体への蓄積)を引き起こし、一部の網膜色素変性症の原因となっている。変異ロドプシン遺伝子を導入した細胞系を作成し、変異ロドプシンの示すトラフィッキング異常の修正効果(小胞体から細胞膜への移行)を指標として化合物の構造展開を遂行した。構造展開においては、ロドプシンの本来のリガンドである 11-シス-レチナールを母化合物とし、本研究者の過去の合成レチノイドの構造展開に用いたノウハウを主として活用した。

②ニーマン・ピック病C型:本疾病の主たる原因は NPC1 タンパク質の突然変異に基づくトラフィッキング異常である。変異 NPC1 遺伝子を導入した細胞系を作成し、変異 NPC1 の示すトラフィッキング異常の修正効果(小胞体からエンドソームへの移行)、ならびに細胞内コレステロール蓄積の軽減効果、を指標として化合物の探索・構造展開を遂行した。

ステロール誘導体群を探索し、ヒットしたオキシステロールを母化合物としての構造展開を遂行した。

③NPC1L1:本タンパク質は NPC1 の類縁タンパク質であり、ある種のコレステロール吸収阻害剤の薬物受容体でもある。トラフィッキング異常を示す NPC1L1 の人工変異体を作成し、これを導入した細胞系を構築した。本細胞系における変異 NPC1L1 のトラフィッキング異常の修正を指標に、コレステロール吸収阻害剤の創製研究を行った。

(2)SNIPER分子:

特定のタンパク質に対してユビキチン化を誘導し、そのことによって本来細胞に備わっているタンパク質排除機構(プロテアソーム分解)を利用して当該タンパク質を分解することを計画した。ユビキチンリガーゼ活性を持つ分子として、メチルベスタチンに親和性を有する cIAP-1(細胞内アポトーシス阻害タンパク-1)を選択した。標的とするタンパク質に親和性の有する骨格とメチルベスタチンとのハイブリッド分子を設計・合成し、標的タンパク質に対する分解誘導剤、SNIPER(Selective and Nongenetic IAP-dependent target Protein ERaser)分子を創製し、活性を評価した。

(3)核内受容体リガンド/マルチテンプレート概念:

サリドマイドないしフタルイミド骨格、ならびにジフェニルメタン骨格をマルチテンプレートに設定し、その構造展開と評価によって、各種核内受容体ならびに種々の酵素阻害剤等の創製研究を展開した。

4. 研究成果

(1)ファーマコロジカルシャペロン:

①網膜色素変性症:臨床例に見られる P23H 変異ロドプシンのトラフィッキング異常を良好に修正する芳香族ベンズアルデヒド誘導体群(CF35Es 等)の創製に成功した。



②ニーマン・ピック病C型:臨床例に見られる I1061T 変異 NPC1 のトラフィッキング異常を良好に修正するステロイド誘導体の創製に成功した。現時点で治療法が存在しないニーマン・ピック病C型に対して、新たな薬物治療戦略を提案するものである(下図:緑色が NPC1<sup>WT/I1061T</sup>、青く見えるのは核)。

オキシステロールによる変異体の局在異常修正と、構造展開による高活性化

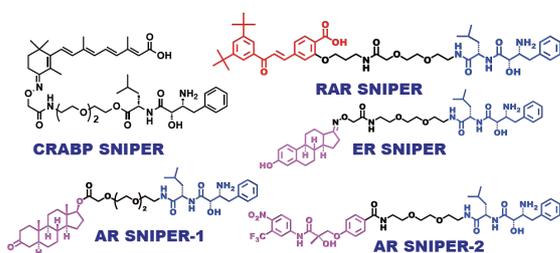
The figure shows fluorescence microscopy images of NPC1<sup>WT</sup> and NPC1<sup>I1061T</sup> cells treated with vehicle or 25HC (10 μM). The images show green fluorescence (NPC1<sup>WT/I1061T</sup>) and blue fluorescence (nucleus). Below the images, the chemical structures of 25HC (EC<sub>50</sub> 3.3 μM) and mo56CFA (EC<sub>50</sub> 0.086 μM) are shown, with an arrow indicating the structural expansion and high activation of mo56CFA.

同時に、細胞内におけるコレステロール輸送機構に関して、分子レベルでの解明に結びつく知見(NPC1上の新たなコレステロール結合部位の発見、等)を得た。

③NPC1L1:コレステロール輸送を担うNPC1L1の機能阻害を、人工的な変異NPC1L1の細胞内局在の変化で評価する系を確立した。本評価系を用いて、コレステロール吸収阻害活性を有するステロイド誘導体、ならびにフェナンスリジノン誘導体を創製した。新規なメカニズムを持つコレステロール吸収阻害剤のリードになり得ると考えている。

### (2)SNIPER分子:

細胞内レチノイン酸結合タンパク(CRABP)、核内アンドロゲン受容体(AR)、核内エストロゲン受容体(ER)に対する分解誘導剤(SNIPER分子)の創製に成功した。CRABPの機能解明や、新規なメカニズムに基づく核内受容体機能阻害剤の創製手法が提案できた。



### (3)核内受容体リガンド/マルチテンプレート概念:

核内受容体としては、肝臓X受容体(LXR)、ファルネソイドX受容体(FXR)、パーオキシゾーム増殖活性化剤応答性受容体(PPAR)、レチノイン酸受容体オーファン受容体(ROR)、アンドロゲン受容体(AR)、エストロゲン受容体(ER)等に対するリガンドをマルチテンプレート手法の活用により効率よく創製しうることを実証した。また、共通の骨格からLXRリガンド、PPARリガンド、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤、ジペプチジルペプチダーゼIV阻害剤、および、グリコーゲンホスホリラーゼa阻害剤、が創製できることを示し、さらに、適切な構造展開により、各々に選択的な活性化化合物が得られることを示した。ここで対象にした薬物受容体は、いずれもメタボリックシンドロームに関わるものであり、当該疾病に対する多重薬理療法(ポロファーマコロジー、ショットガン戦略)における医薬開発に対して、効率的な探索・リード創製法を提案するとともにマルチテンプレートライブラリーの有用性を示すものと考えている。

展開として、抗C型肝炎ウイルス活性化化合物、トリプターゼ阻害剤等の創製にも至った。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

① Y. Nishiyama, M. Nakamura, T. Misawa,

M. Nakagomi, M. Makishima, M. Ishikawa, Y. Hashimoto: Structure-activity relationship-guided development of retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ )-selective inverse agonists with a phenanthridin-6(5*H*)-one skeleton from a liver X receptor ligand. *Boorg. Med. Chem.*, 査読有、22: 2799-2808 (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.007>

② 大金賢司、唐木文霞、閻闡孝介、橋本祐二: タンパク質の折りたたみの異常を直すファーマコロジカルシャペロン~ニーマンピック病C型治療薬を目指した試み~ *現代化学*, 査読なし、No. 512, p48-54, 2013年, 11月号. <http://www.tkd-pbl.com/news/nc243.html>

③ F. Karaki, K. Ohgane, K. Dodo, Y. Hashimoto: Structure-activity relationship studies of Nieman-Pick type C1-like 1 (NPC1L1) ligands identified by screening assay monitoring pharmacological chaperone effect. *Boorg. Med. Chem.*, 査読有、21: 5297-5309 (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.06.022>

④ K. Maruyama, M. Nakamura, S. Tomoshige, K. Sugita, M. Makishima, Yuichi Hashimoto, M. Ishikawa: Structure-activity relationships of bisphenol A analogs at estrogen receptors (ERs): discovery of an ER $\alpha$ -selective antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、23: 4031-4036 (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.067>

⑤ K. Ohgane, F. Karaki, K. Dodo, Y. Hashimoto: Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC-1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chemistry & Biology*, 査読有、20: 391-402 (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.02.009>

⑥ A. Aoyama, K. Endo-Umeda, K. Kishida, K. Ohgane, T. Noguchi-Yachide, H. Aoyama, M. Ishikawa, H. Miyachi, M. Makishima, Y. Hashimoto: Design, synthesis, and biological evaluation of novel trans repression-selective liver X receptor (LXR) ligands with 5,11-dihydro-5-methyl-11-methylene-6*H*-dibenz[*b, e*]azepin-6-one skeleton. *J. Med. Chem.*, 査読有、55: 7360-7377 (2012). <http://dx.doi.org/10.1021/jm3002394>

⑦ Y. Itoh, M. Ishikawa, R. Kitaguchi, K. Okuhira, M. Naito, Y. Hashimoto: Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule

- consisting of ATRA and IAPs antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、22: 4453-4457 (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.134>
- ⑧ T. Misawa, H. Hayashi, M. Makishima, Y. Sugiyama, Y. Hashimoto: E297G Mutated bile salt export pump (BSEP) function enhancers derived from GW4064: Structural development study and separation from farnesoid X receptor-agonistic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、22: 3962-3966 (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.134>
- ⑨ 橋本祐一: フォールディング異常症に対する治療薬創製の可能性. *MEDCHEM NEWS*, 査読なし、22: 25-28 (2012). [http://medchem.pod.ne.jp/index.php?option=com\\_content&view=category&id=36&Itemid=56&lang=ja](http://medchem.pod.ne.jp/index.php?option=com_content&view=category&id=36&Itemid=56&lang=ja)
- ⑩ Y. Ito, R. Kitaguchi, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto: Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、19: 6768-6778 (2011). DOI:10.1016/j.bmc.2011.09.041
- ⑪ T. Noguchi-Yachide, K. Sugita, Y. Hashimoto: Estrogen receptor  $\alpha/\beta$  ligands derived from thalidomide. *Heterocycles*, 査読有、83: 2137-2147 (2011). DOI:10.3987/COM-11-12287
- ⑫ 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.*, 査読有、19: 3229-3241 (2011). DOI:10.1016/j.bmc.2011.03.057
- ⑬ K. Motoshima, M. Ishikawa, Y. Hashimoto, K. Sugita: Peroxisome proliferator-activated receptor agonists with phenethylphenyl-phthalimide skeleton derived from thalidomide-related liver X receptor antagonists: relationship between absolute configuration and subtype selectivity. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、19: 3156-3172 (2011). DOI: 10.1016/j.bmc.2011.03.065
- ⑭ K. Motoshima, K. Sugita, Y. Hashimoto, M. Ishikawa: Non-competitive and selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors with phenethylphenyl-phthalimide skeleton derived from thalidomide-related  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and liver X receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、21: 3041-3045 (2011). DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.03.026
- ⑮ H. Aoyama, K. Sugita, M. Nakamura, A. Aoyama, M. T. A. Salim, M. Okamoto, M. Baba, Y. Hashimoto: Fused heterocyclic amido compounds as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、19: 2675-2687 (2011). DOI: 10.1016/j.bmc.2011.03.002
- ⑯ K. Motoshima, T. Noguchi-Yachide, M. Ishikawa, Y. Hashimoto, K. Sugita: Further application of the multi-template approach for creation of biological response modifiers: discovery of a new class of multifunctional anti-diabetic agents. *Heterocycles*, 査読有、82: 1083-1101 (2011). DOI: 10.3987/REV-10-SR(E)7
- ⑰ 大金賢司, 闔闔孝介, 橋本祐一: フォールディング・トラフィッキング異常の修正作用を有するリガンドの創製～網膜色素変性症への応用を目指した、変異型ロドプシンのフォールディングを促進するロドプシンリガンドの創製研究～. *薬学雑誌*, 査読なし、131: 325-334 (2011). [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/yakushi/131/3/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/yakushi/131/3/_contents/-char/ja/)
- ⑱ K. Maruyama, T. Noguchi-Yachide, K. Sugita, Y. Hashimoto, M. Ishikawa: Novel selective anti-androgens with a diphenylpentane skeleton. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、20: 6661-6666 (2010). DOI:10.1016/j.bmcl.2010.09.011
- ⑲ K. Ohgane, K. Dodo, Y. Hashimoto: Retinobenzaldehydes as proper-trafficking inducers of folding-defective P23H rhodopsin mutant responsible for *Retinitis Pigmentosa*. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、18: 7022-7028 (2010). DOI:10.1016/j.bmc.2010.08.014
- ⑳ M. Nakamura, A. Aoyama, M. T. M. Salim, M. Okamoto, M. Baba, M. Baba, H. Miyachi, Y. Hashimoto, H. Aoyama: Structural development studies of anti-hepatitis virus C virus agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、18: 2402-2411 (2010). DOI:10.1016/j.bmc.2010.02.057

[学会発表] (計14件)

- ① 福田寛充、大金賢司、唐木文霞、闔闔孝介、橋本祐一: NPC1の局在異常を修正する非ステロイド性リガンドの創製研究. 日本薬学会第134年会(熊本)2014. 3. 27~30.
- ② 境太希、若井信彦、松本洋太郎、林寛敦、石川稔、杉田和幸、北尾彰朗、秋山徹、橋本祐一: 膠芽腫幹細胞を標的とした sirtuin2 阻害剤の創製研究. 日本薬学会第134年会(熊本)2014. 3. 27~30.

- ③ 小針孝夫、三澤隆史、橋本祐一：マルチテンプレート手法を用いた新規 TGR5 リガンドの創製研究. 日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014. 3. 27~30.
- ④ 友重秀介、北口梨沙、大金賢司、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一：神経変性疾患原因タンパク質分解誘導剤の創製研究. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013. 3. 27~30.
- ⑤ Y. Hashimoto: Pharmacological chaperones and protein knockdown inducers derived from nuclear receptor ligands. The 23<sup>rd</sup> Symposium of Retinoids, Oct. 19-20, 2012 (Yonago).
- ⑥ 青山惇、梅田 (遠藤) 香織、岸田健治、大金賢司、谷内出 (野口) 友美、青山洋史、石川稔、宮地弘幸、榎島誠、橋本祐一：疫調節作用選択的な肝臓 X 受容体 (LXR) リガンドの創製. 日本レチノイド研究会第 23 回学術集会, 2012. 10. 19-20, (米子)
- ⑦ 石川稔、どど孝介、伊藤幸裕、浅沼三和子、佐藤伸一、袖岡幹子、内藤幹彦、橋本祐一：タンパク質ノックダウン法を利用した新治療戦略と低分子の標的タンパク質同定法. 日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会, 2012. 6. 7-9 (京都)
- ⑧ 谷内出友美、杉田和幸、松本洋太郎、橋本祐一：サリドマイド由来エストロゲン受容体リガンドの創製. 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012. 3. 28~31.
- ⑨ 三澤隆史、林久允、杉山雄一、橋本祐一：PFIC2 の原因となる変位型 BSEP の機能を修正する新規小分子の発見と構造展開. 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012. 3. 28~31.
- ⑩ 大金賢司、唐木文霞、闔闔孝介、橋本祐一：NPC1 変異体のフォールディング効率低下を rescue するステロイド誘導体の発見、および NPC1 の第二のステロイド結合部位の存在. 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012. 3. 28~31.
- ⑪ K. Maruyama, M. Ishikawa, T. Noguchi-Yachide, Y. Hashimoto: Selective anti-androgens with a 3,3-diphenylpentane skeleton. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010. Dec. 15~20 (Honolulu, Hawaii, USA).
- ⑫ Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto: Protein knockdown using ubiquitination activity of cIAP1: Discovery of CRABP degradation inducers. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010. Dec. 15~20 (Honolulu, Hawaii, USA).
- ⑬ 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 AR 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講演要旨集 2010. 11. 17~19 (京都)

- ⑭ 大金賢司、闔闔孝介、橋本祐一：ニーマンピック病 C 型の原因となる NPC1 変異体のフォールディング・トラフィッキング異常を修正する低分子化合物の発見と構造活性相関. 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 2010. 11. 17~19 (京都)

[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：9 0 1 6 4 7 9 8

### (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・准教授  
 研究者番号：7 0 5 2 6 8 3 9

青山 洋史 (AOYAMA, Hiroshi)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：4 0 3 7 4 6 9 9  
 (平成 22 年度まで)

杉田 和幸 (SUGITA, Kazuyuki)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
 研究者番号：6 0 5 4 2 0 9 0  
 (平成 23 年度まで)

小林 久芳 (KOBAYASHI, Hisayoshi)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：8 0 2 2 5 5 3 1  
 (平成 24 年度まで)

谷内出 友美 (YACHIDE, Tomomi)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・技術職員  
 研究者番号：2 0 4 0 1 2 8 4  
 (平成 24 年度まで)

松本 洋太郎 (MATSUMOTO, Yotaro)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：9 0 4 2 0 0 4 1  
 (平成 23 年度より)

三澤 隆史 (MISAWA, Takashi)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：4 0 7 0 9 8 2 0  
 (平成 25 年度)