

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790125

研究課題名（和文） タンパク質の特異的分解手法が切り拓く創薬化学の新カテゴリー

研究課題名（英文） Novel strategy for medicinal chemistry utilizing protein knockdown

研究代表者

石川 稔（ISHIKAWA MINORU）

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：70526839

研究成果の概要（和文）：

申請者らが開発したタンパク質ノックダウン法は、ユビキチンリガーゼの1種cIAP1と標的タンパク質の双方に結合する低分子により、標的タンパク質の分解を人工的・特異的に誘導する方法である。本研究では、タンパク質ノックダウン法を応用して、低分子の標的タンパク質の同定法と、異常コンフォメーション特異的な神経変性疾患原因タンパク質の分解誘導の2テーマについて取り組んだ。前者については、標的タンパク質が既知な化合物とcIAP1リガンドを連結した化合物を用いてコンセプト確認を行った。具体的には、細胞株に化合物を処理した後、細胞溶解物を二次元電気泳動し、減少したスポットを質量分析したところ、実際に既知の標的タンパク質が同定できた。次に、標的タンパク質がほとんど未知である生理活性物質とcIAP1リガンドを連結させた化合物を3種合成し、標的タンパク質同定を検討している。一方後者については、異常凝集型タンパク質リガンドとcIAP1リガンドを連結した化合物を2種類合成した。この化合物が、異常凝集型タンパク質の特徴的構造であるポリグルタミンペプチドに結合することを確認した。更に、神経変性疾患患者由来の細胞にこれらの化合物を処理したところ、ポリグルタミン抗体で染色されるタンパク質の量が減少する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a method that induces selective degradation of target proteins by small molecules consisting of cIAP1 ligand linked to a ligand of the target protein (protein knockdown). In this study, protein knockdown was applied to target identification of bioactive small molecules, and degradation of misfolded proteins which would cause neurodegenerative disorders. As a proof of concept, a known target protein was identified with a proteome analysis using a linked molecule consisting of cIAP1 ligand and a small molecule which binds to a protein. On the other hand, molecules consisting of dyes bound to the misfolded proteins linked to cIAP1 ligand were designed and synthesized. The molecule was proved to bind a poly glutamine (polyQ) peptide, a major component of misfolded proteins, and decrease proteins which were immunostained with anti-polyQ antibody in living cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計、タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

申請者らが開発したタンパク質ノックダウン法は、標的タンパク質を特異的に分解する新しい方法である。この方法は、標的のタンパク質とユビキチンリガーゼの一種 cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) からなる複合体を生理的な条件下で人工的に形成できれば、標的タンパク質に特異的にユビキチンを付与し、標的タンパク質を分解できるとの考えに基づいている。そして、cIAP1 と標的タンパク質の複合体を形成させる為に、cIAP1 の低分子リガンド (メチルベスタチン) と標的タンパク質のリガンドを連結させた低分子を設計・合成した。そしてこの低分子が、生細胞中で標的タンパク質を期待通り特異的に減少させることを報告した [*J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5820.]。

創薬化学において、生理活性物質の薬物受容体が未知の場合はその探索・同定が重要である。アフィニティークロマトグラフィー法やビオチン-アビジンキャッチ法により、これまで多くの低分子に対する標的タンパク質が同定されてきた。しかしこれらの方法により標的タンパク質を同定できない場合も多く存在する。原因は多様と考えられるが、低分子が難溶性の場合は特異的な溶出が困難であること、標的タンパク質に対する低分子の結合能が弱いこと、操作中に標的タンパク質が低分子から乖離してしまうこと、等が挙げられる。以上より、従来法とは異なる原理で標

的タンパク質を同定する方法が求められている。

アルツハイマー病、プリオン病、パーキンソン病、ハンチントン病などは、 β アミロイドやプリオンなどの疾患原因タンパク質の折りたたみ不全に起因する神経変性疾患である。これら疾患原因タンパク質は共通して、折りたたみ不全状態では β シート構造を有し、高毒性のオリゴマーなどの可溶性凝集中間体を経て難溶性凝集体を形成する。これらの疾患の治療には、毒性の高い凝集中間体を減らすことが重要と考えられている。

2. 研究の目的

創薬化学の新しいカテゴリーを提案するために、タンパク質ノックダウン法を以下の2つの柱に応用する。[柱1] 標的タンパク質が未知の生物活性低分子と E3 リガンドを連結させた化合物を合成し、その標的タンパク質を同定する。[柱2] β シート構造の特異的リガンドと E3 リガンドを連結させたハイブリッド化合物が、タンパク質ノックダウン法により β シート構造を有する神経変性疾患関連タンパク質を分解できることを示す。

3. 研究の方法

標的タンパク質が既知である低分子リガンドを最初に用いて、仮説を立証する。即ち、タンパク質ノックダウンを誘導する化合物を処理した細胞溶解物のプロテオーム解析 (二次元電気泳動で分離したタンパク質 (MALDI-TOFMS を用いて解析する方法) によ

り、化合物未処理群に比べて減少したタンパク質を同定する。次に実際に標的タンパク質が未知である生理活性物質とcIAP1リガンドを連結した化合物を合成し、標的タンパク質の同定を試みる。[柱2] βシート構造に特異的に結合する試薬として、チオフラビンTなどの色素が知られている。これら色素をβシート構造の特異的リガンドとして本研究に利用し、チオフラビンT誘導体とベスタチンのハイブリッド化合物を設計する。合成化合物が、βシート構造に結合すること、また疾患原因タンパク質を生細胞中で減少することを確認する。

4. 研究成果

[柱1]については、タンパク質ノックダウン法の改良を行い、標的タンパク質を特異的に、または強く分解誘導する技術を開発して当研究の基盤を整えた。更に、標的タンパク質が既知な化合物とcIAP1リガンドを連結した化合物を用いてコンセプト確認を行った。具体的には、細胞株に化合物を処理した後、細胞溶解物を二次元電気泳動し、減少したスポットを質量分析したところ、実際に既知の標的タンパク質が同定できた。次に、標的タンパク質がほとんど未知である多重薬理を示す生理活性物質の標的タンパク質同定を検討している。具体的には、多重薬理を示す低分子とcIAP1リガンドを連結させた化合物を3種合成した。一方[柱2]については、異常凝集型タンパク質リガンドとcIAP1リガンドを連結した化合物を2種類合成した。この化合物が、異常凝集型タンパク質の特徴的構造であるポリグルタミンペプチドに結合することを確認した。更に、神経変性疾患患者由来の細胞にこれらの化合物を処理したところ、ポリグルタミン抗体で染色されるタンパク質の量が減少する結果が得られており、このメカニズムを解析している。

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3件)

- ① Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Risa Kitaguchi, Keiichiro Okuhira, Mikihiro Naito, Yuichi Hashimoto, Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 4453-4457. (査読有)
- ② Yukihiro Itoh, Risa Kitaguchi, Minoru Ishikawa, Mikihiro Naito, Yuichi Hashimoto, Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 6768-6778. (査読有)
- ③ Keiichiro Okuhira, Nobumichi Ohoka, Kimie Sai, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Mikihiro Naito, Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein, *FEBS Lett.* **2011**, 585, 1147-1152. (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① Mikihiro Naito, Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Tomoko Nishimaki-Mogami, Masaaki Kurihara, Yuichi Hashimoto, Development of Hybrid Small Molecules That Induce IAP-Mediated Ubiquitylation and Proteasomal Degradation of Target Proteins in a Specific Manner, Cell Symposia: Genetics and Chemistry Sharing a Language of Discovery, May 23-25,

(Cambridge, MA, United States of America)

- ② Mikihiko Naito, Keiichiro Okuhira, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Development of small molecules that induce IAP-mediated ubiquitylation and proteasomal degradation of target proteins, The Sixth International Conference SUMO, Ubiquitin, UBL Proteins: Implications for Human Diseases, February 8-11, 2012 (Houston, TX, United States of America)
- ③ 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年3月28日
- ④ 奥平桂一郎、大岡伸通、最上(西巻)知子、伊藤幸裕、石川稔、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評価、日本薬学会 第133年会(横浜) 2013年3月28日
- ⑤ 石川稔、タンパク質を特異的に分解する低分子の創製と応用、東京大学 分子細胞生物学研究所 第17回分生研シンポジウム(東京) 2012年10月29日
- ⑥ 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(京都) 2012年6月7日
- 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、第22回日本

レチノイド研究会 学術集会(東京) 2011年11月11日

[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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし