

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293027

研究課題名(和文)化合物が導くリバーズ翻訳後修飾プロテオミクス

研究課題名(英文)Reverse proteomics of post-translational modifications utilizing small molecules

研究代表者

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：70526839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の真の機能解明には、適切な翻訳後修飾を受けたタンパク質を調製することが益々重要になってきている。標的タンパク質の翻訳後修飾を人工的に亢進させる方法の提案を指向し、本申請ではユビキチン化、SUMO化、リン酸化などの翻訳後修飾を人工的に亢進する化合物の創出を目指した。検討の結果、凝集性の神経変性疾患の原因タンパク質を、ユビキチン化修飾を経て分解誘導する化合物を創出した。また、核内受容体のtransrepression作用に選択的な免疫調製作用を有する化合物や、タンパク質のリン酸化修飾を人工的に亢進する化合物も合成した。

研究成果の概要(英文)：There is increasing evidence that preparation of target proteins with their post-translational modifications is important to reveal protein functions. We aimed at development of small molecules that induce post-translational modifications including ubiquitination, SUMOylation, and phosphorylation. As results, small molecules that induce the degradation of aggregation-prone proteins were discovered. In addition, transrepression-selective ligands of nuclear receptors, and small molecules that induce phosphorylation of the target protein were also synthesized.

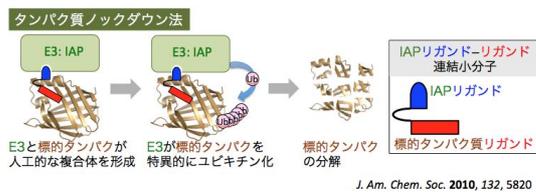
研究分野：創薬化学

キーワード：翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子導入や遺伝子ノックアウトにより、標的タンパク質を特異的に発現・消去することが可能になり、様々な標的タンパク質の機能が解明されてきた。しかし近年、タンパク質の機能発現にはリン酸化、糖鎖付加、ユビキチン化、SUMO化、アセチル化など様々な翻訳後修飾が関与している事例や、翻訳後修飾の異常によりそのタンパク質の機能が変化して、疾患を引き起こす事例も数多く報告されている。よって、タンパク質を人工的に発現・消去するだけの実験系ではその機能解明や疾患の原因解明に不十分である場合も危惧され、タンパク質の真の機能解明には翻訳後修飾も含めた解析が重要である。翻訳後修飾プロテオミクス等により翻訳後修飾の解析が進行しているが、本手法による翻訳後修飾されたタンパク質の機能解明は簡単とは言い難い。

我々は、生細胞内で翻訳後修飾を人工的に促進する技術として、標的タンパク質を人工的にポリユビキチン化する方法であるタンパク質ノックダウン法を開発してきた。この方法は、ユビキチンリガーゼの一種である IAP (inhibitor of apoptosis protein) と任意の標的タンパク質の複合体を人工的に形成できれば、標的タンパク質は IAP によりユビキチン化され、プロテアソームで分解されるとの概念を基盤としている。そして、IAP と標的タンパク質の複合体を形成させる為に、IAP 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・化学合成した。そして、この低分子が、生細胞中で幾つかの標的タンパク質を特異的に減少させることを確認している [J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 5820 etc].



## 2. 研究の目的

標的タンパク質の翻訳後修飾を人工的に亢進する化合物を創出し、この化合物創出の実績を積み重ねることによって、標的タンパク質の翻訳後修飾を人工的に亢進させる一般的方法を確立することを、本研究の最終目標に設定した。翻訳後修飾の人工的な亢進により、翻訳後修飾の機能が解明できる可能性、また新しい創薬戦略として活用される可能性があるかと期待した。本申請では具体的に、(1) 標的タンパク質のポリユビキチン化修飾を人工的に亢進する技術の適応範囲を拡大すること、(2) 核内受容体の SUMO 化を誘導する免疫調節作用選択的化合物を創製すること、(3) 標的タンパク質のリン酸化修

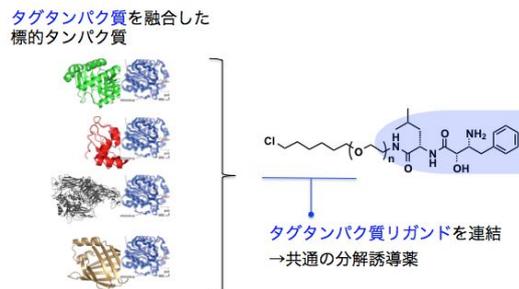
飾を人工的に亢進する化合物を創製すること、(4) 標的タンパク質のアセチル化修飾を人工的に亢進する化合物を創製すること、を検討した。

## 3. 研究の方法

(1)(3)(4) に関しては、申請者らが開発した低分子による人工的ユビキチン化法を参考にし、標的タンパク質のリガンドと翻訳後修飾を誘導するタンパク質に対するリガンドを連結した低分子を設計・合成することにした。タンパク質の翻訳後修飾量は、ウェスタンブロットなどを指標に評価することを計画した。(2) に関しては、申請者らが過去に創製した転写活性化作用を示さない LXR リガンドを、免疫調節作用を指標として評価し、構造活性相関を解析する計画を立案した。

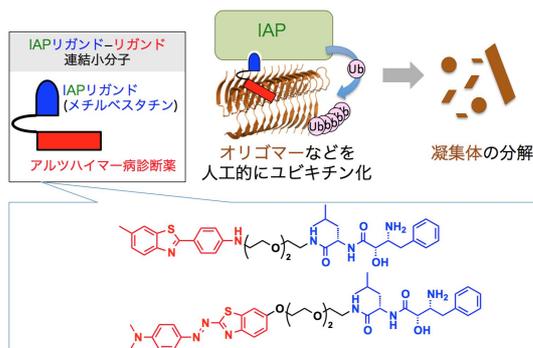
## 4. 研究成果

(1) 化合物によるユビキチン化の人工誘導  
タンパク質ノックダウン法の一般性を効率良く確認する目的から、タグタンパク質リガンドとユビキチンリガーゼリガンドを連結させた化合物を設計・合成した。この化合物を用いて、タグ融合タンパク質を汎用的に減少するシステムを構築することができた。このシステムを用いて、細胞核に局在するタンパク質を分解誘導できることなどを効果的に検証することができた。本成果を学会・論文発表した (論文 11, 12)。



アルツハイマー病・ハンチントン病などの神経変性疾患は、アミロイド・変異ハンチンチンなどの疾患原因タンパク質の異常凝集により発症すると考えられている。神経変性疾患の治療には、毒性の高い凝集タンパク質を減らすことが重要と考えられているが、神経変性疾患に対する根治療法は知られていない。この一因として、神経変性疾患原因タンパク質に対する低分子リガンドがほとんど知られていないこと、疾患原因タンパク質の機能ではなくその凝集が発症原因であることなどが挙げられる。即ち、タンパク質の機能を制御する古典的な「鍵と鍵穴創薬」では対応が困難な undruggable と認識されている。人工的なポリユビキチン化を介して神経変性疾患の原因タンパク質を分解誘導すべく、アルツハイマー病診断薬とユビキチン

リガーゼリガンドであるメチルベスタチンを連結させた化合物を設計・合成した。本連結低分子が、ハンチントン病原タンパク質を分解誘導し、細胞内の凝集体量も減少させることを見出した(論文3)。またハンチントン病以外のポリグルタミン病原タンパク質の分解誘導を引き起こすことも確認した。



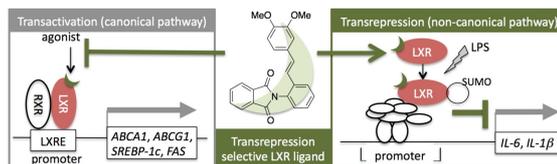
ユビキチン化された神経変性疾患原因タンパク質は凝集しやすいとの結果や神経変性疾患においてはユビキチン-プロテアソーム系が機能異常に陥っているとの結果が報告されている一方で、神経変性疾患原因タンパク質を基質とするユビキチンリガーゼを過剰発現させるとタンパク質凝集量を減少できるとの相反する結果も報告されている。今回、ユビキチン-プロテアソーム系を人工的に利用する低分子により、生細胞実験系にて神経変性疾患原因タンパク質の量やその凝集体量を減少させることができた。本結果により、化合物による翻訳後修飾の人工亢進によって、疾患の原因究明の一助になり得る事例を示すことができた。また、創薬の視点からは、タンパク質の機能を制御する古典的な「鍵と鍵穴創薬」では対応が困難な undruggable と認識されている疾患原因タンパク質に対して、分解誘導という新しい手法によって、治療法を提案できた意義は大きいと考えている。標的タンパク質を減少させる手法に着目すると、酵素・受容体・結合タンパク質に加えて、凝集性タンパク質も減少できることを示し、その適応範囲を広げることができた。

更に、メチルベスタチンの代わりに、IAPリガンドとしてIAPアンタゴニストを連結させた低分子も、ハンチントン病原タンパク質を減少できることを見出し、論文発表した(論文1)。次に、タンパク質の品質管理機構の人工誘導を指向して、疎水性タグとアアルツハイマー病診断薬を連結した低分子を設計・合成した。本化合物が生細胞評価系において、いくつかの神経変性疾患原因タンパク質を減少させることを見出した。共同研究において脱ユビキチン化酵素の構造生物学的解析を論文発表した(論文2)。

(2) 核内受容体の SUMO 化を誘導する免疫

調節作用選択的化合物の創製

核内受容体の作用として、アゴニストが引き起こす遺伝子応答配列依存的な transactivation 作用(古典的作用)に加えて、リガンドが引き起こす SUMO 化依存的な transrepression 作用(非古典的作用)が報告されている。この transrepression 作用により、免疫・炎症に関与するサイトカイン類の転写が抑制されることから、transrepression 作用を示す核内受容体リガンドは、新規抗炎症薬として期待される。我々は核内受容体の1種である肝臓X受容体(LXR)の transrepression 作用に着目し、サイトカイン抑制作用を指標としたスクリーニング系にて、研究室で過去に創製されたLXRリガンドを評価したところ、transrepression 作用を示すLXRリガンドを見出した。この化合物をリードとして構造展開を実施することにより、transactivation と transrepression を完全分離した化合物(LXRアゴニスト作用がなく、LXRアンタゴニスト作用とLXR transrepression 作用を示す化合物)を創出した。本化合物は、LXR 応答遺伝子の転写を活性化することなく、炎症性サイトカイン類の転写を抑制するため、抗炎症作用を示す新規シーズとして期待される。本成果を、学会発表、論文発表した(論文13)。



別核内受容体であるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR)にも、リガンド依存的な transrepression 作用が知られている。しかしこれまで、transactivation 作用と transrepression 作用の分離可能性や、transrepression を指標とした構造活性相関は報告されていなかった。そこで、PPARアゴニストをリード化合物に設定し、transactivation と transrepression を指標とした構造活性相関を解析した。その結果、PPARアゴニスト活性が弱く、transrepression 作用選択的な化合物を見出した(論文7)。更に、PPAR transrepression 評価系を見直し、既知PPARリガンドを新たに評価した結果、構造が異なる複数の化合物に transrepression 作用があることも見出した。

(3) 標的タンパク質のリン酸化修飾を人工的に亢進する化合物の創製

最初にコンセプト確認として、基質タンパク質のリン酸化を人工的に亢進すべく、AMPK(AMP活性化プロテインキナーゼ)活性化薬とその基質タンパク質2種類(HMGR:HMG-CoA還元酵素、ACC:アセチルCoAカルボキシラ

一ゼ)に対する阻害低分子をそれぞれ連結させた、2系統の化合物を設計・合成した。最初に、これら合成低分子が、標的とする HMGR もしくは ACC に対する阻害活性、そして AMPK 活性化能の両方を保持していることを確認した。次に in vitro で HMGR もしくは ACC に対するリン酸化誘導活性を評価したところ、標的タンパク質に対するリン酸化誘導活性が確認された。更に、複数の基質タンパク質が混在する in vitro 系において、標的タンパク質に対して選択的なリン酸化誘導活性を示唆するデータが得られた。本内容を学会発表した。

(4) 標的タンパク質のアセチル化修飾を人工的に亢進する化合物の創製

ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT2 阻害薬の構造展開を実施し、SIRT1 と SIRT3 には阻害活性を示さない SIRT2 選択的阻害薬を見出し、学会発表、論文発表した(論文 14)。

また、生体内条件でアセチル化を誘導可能な分子を検討し、当該分子と標的タンパク質リガンドを連結させた低分子を設計し、合成を検討した。

#### 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 22 件)

Degradation of huntingtin mediated by a hybrid molecule composed of IAP antagonist linked to phenyldiazanyl benzothiazole derivative. Shusuke Tomoshige, Sayaka Nomura, Kenji Ohgane, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 707-710. (査読有) DOI:10.1016/j.bmcl.2018.01.012

Structural basis for specific cleavage of Lys6-linked polyubiquitin chains by USP30. Yusuke Sato, Kei Okatsu, Yasushi Saeki, Koji Yamano, Noriyuki Matsuda, Ai Kaiho, Atsushi Yamagata, Sakurako Goto-Ito, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Keiji Tanaka, Shuya Fukai, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 911-919. (査読有) DOI: 10.1038/nsmb.3469

Discovery of small molecules that induce degradation of huntingtin. Shusuke Tomoshige, Sayaka Nomura, Kenji Ohgane, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11530-11533. (査読有) DOI: 10.1002/anie.201706529

Photo-enhanced aqueous solubilization of an azo-compound. Minoru Ishikawa\*, Takuya Ohzono, Takao Yamaguchi, Yasuo Norikane, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6909. (査読有) DOI: 10.1038/s41598-017-06947-w

1-Hydroxy derivatives of 7-dehydrocholesterol are selective liver X receptor modulators. Kaori Endo-Umeda, Atsushi Aoyama, Masato Shimizu, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Sachiko Yamada, Makoto Makishima, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *172*, 136-148. (査読有) DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.07.014

Specific fluorescence labeling of target protein by using ligand-4-azidophthalimide conjugate. Kosuke Chiba, Miwako Asanuma, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Takao Yamaguchi, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8751-8754. (査読有) DOI: 10.1039/C7CC03252H

Structure-activity relationships of rosiglitazone for peroxisome proliferator-activated receptor gamma transrepression. Yosuke Toyota, Sayaka Nomura, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2776-2780. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.04.061

Targeted degradation of proteins localized in subcellular compartments by hybrid small molecules. Keiichiro Okuhira, Takuji Shoda, Risa Omura, Nobumichi Ohoka, Takayuki Hattori, Norihito Shibata, Yosuke Demizu, Ryo Sugihara, Asato Ichino, Haruka Kawahara, Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Masaaki Kurihara, Susumu Itoh, Hiroyuki Saito and Mikihiro Naito, *Mol. Pharmacol.* **2017**, *91*, 159-166. (査読有) DOI: 10.1124/mol.116.105569

Development of tetrachlorophthalimides as liver X receptor (LXR)-selective agonists. Sayaka Nomura, Kaori Endo-Umeda, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 2347-2360. (査読有) DOI: 10.1002/cmdc.201600305

Improvement in aqueous solubility of retinoic acid receptor (RAR) agonists by bending the molecular structure. Michiaki Hiramatsu, Yuki Ichikawa, Shusuke Tomoshige, Makoto Makishima, Atsuya Muranaka, Masanobu Uchiyama, Takao Yamaguchi, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *Chem. an Asian J.* **2016**, *11*, 2210-2217. (査読有) DOI: 10.1002/asia.201600744

Efficient protein knockdown of HaloTag-fused proteins using hybrid molecules consisting of IAP antagonist

and HaloTag ligand. Shusuke Tomoshige, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3144-3148. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmc.2016.05.035

Degradation of HaloTag-fused nuclear proteins using bestatin-HaloTag ligand hybrid molecules, Shusuke Tomoshige, Mikihiro Naito, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9746-9750. (査読有) DOI: 10.1039/c5ob01395j

Styrylphenylphthalimides as novel transrepression-selective liver X receptor (LXR) modulators. Sayaka Nomura, Kaori Endo-Umeda, Atsushi Aoyama, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa\*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 902-907. (査読有) DOI: 10.1021/acsmedchemlett.5b00170

Design, synthesis and structure-activity relationship studies of novel sirtuin 2 (SIRT2) inhibitors with a benzamide skeleton. Taki Sakai, Yotaro Matsumoto, Minoru Ishikawa\*, Kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Nobuhiko Wakai, Akio Kitao, Era Morishita, Chikashi Toyoshima, Tomoatsu Hayashi, Tetsu Akiyama, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 328-339. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmc.2014.11.027

[学会発表](計 38 件)

ユビキチン化により標的タンパク質を分解する低分子(招待講演)石川 稔, 第 1 回ユビキチン研究会 2018

Chemical knockdown of aggregate-prone protein associated with Huntington's disease. Shusuke Tomoshige, Sayaka Nomura, Kenji Ohgane, Hiroko Yamashita, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa, 2018 International Symposium on Chemical Biology, 2018 神経変性疾患原因タンパク質のケミカルノックダウン. 友重 秀介、野村 さやか、山下 博子、大金 賢司、橋本 祐一、石川 稔, 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム 2017 (平成 29 年度日本薬学会医薬化学部会メディシナルケミストリーシンポジウム優秀賞)

神経変性疾患関連凝集タンパク質分解誘導剤の開発. 山下 博子、友重 秀介、野村 さやか、大金 賢司、橋本 祐一、石川 稔, 日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会 2017 (Royal Society of Chemistry Organic & Biomolecular Chemistry ポスター賞)

二置換ベンゼンの位置異性体に着目した水溶性向上策の提案. 市川 裕樹、平松 道晶、三田 裕介、増本 優衣、松本 洋太郎、村中 厚哉、内山 真伸、橋本 祐一、石川 稔, 日本薬学会 137 年会 2017 (学生優秀発表賞)

標的タンパク質のリン酸化を選択的に誘導する分子の創製. 境 太希、岡崎 翔吾、石川 稔、橋本 祐一、山口 卓男, 日本薬学会 137 年会 2017

「匠の化合物」で生命を操れるか?(招待講演)石川 稔, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016 テーマ企画 私たちの生活に欠かせない有機合成化学! ~ 「匠の技」で豊かな分子と社会を生み出そう! ~ 2016

Huntingtin タンパク質を減少させる SNIPER 化合物の創製. 友重 秀介、大金 賢司、内藤 幹彦、石川 稔、橋本 祐一, 日本薬学会 136 年会 2016 (学生優秀発表賞)

タンパク質を特異的に分解する低分子の新展開(招待講演)石川 稔, 第 30 回バイオテクノロジー懇談会 2016

Discovery and optimization of distinctive nuclear receptors modulators (I): Inhibitors of the interaction of VDR with coactivators, and nuclear receptors degradation inducers. Minoru Ishikawa, Yusuke Mita, Yukihiro Itoh, Risa Kitaguchi, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, The 3<sup>rd</sup> International Conference on Retinoids/レチノイド研究会第 26 回学術集会, 2015 (レチノイド研究会第 26 回学術集会奨励賞(首藤賞))

Discovery and optimization of distinctive nuclear receptors modulators (II): Transrepression selective LXR ligands, and LXR selective agonists. Minoru Ishikawa, Sayaka Nomura, Atsushi Aoyama, Kaori Endo-Umeda, Kazunori Motoshima, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, The 3<sup>rd</sup> International Conference on Retinoids/レチノイド研究会第 26 回学術集会, 2015 (レチノイド研究会第 26 回学術集会奨励賞(首藤賞))

Improvement in aqueous solubility of small molecules by disruption of molecular planarity and bending the molecular structure. Minoru Ishikawa, Yuji Fujita, Jun-ichi Kasuga, Michiaki Hiramatsu, Yuki Ichikawa, Shusuke Tomoshige, Mitsuhiro Yonehara, Takao Yamaguchi, and Yuichi Hashimoto, 10<sup>th</sup> AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2015),

2015

(10<sup>th</sup> AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2015) Poster Presentation Prize)

Transrepression 作用 選択 的な LXR(Liver X Receptor)リガンドの創製. 野村 さやか、石川 稔、青山 惇、榎島 誠、橋本 祐一、日本レチノイド研究会第 25 回学術集会 2014

( 学生優秀発表賞 )

タンパク質を特異的に分解誘導する低分子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 (招待講演) 石川 稔, 第 86 回日本生化学会大会 シンポジウム ケミカルライブラリースクリーニング再考 アカデミアで意味あるケミカルライブラリースクリーニングを実現するために 2013

細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (CRABP) を特異的に分解誘導する低分子の創製と新治療戦略 (招待講演) 石川 稔, 日本レチノイド研究会第 24 回学術集会 若手シンポジウム レチノイド研究温故知新 ~レチノイドの新たな作用点を求めて~ 2013

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

Improving the water-solubility of compounds by molecular modification to disrupt crystal packing . Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto ( 分担執筆 ) *The Practice of Medicinal Chemistry, 4<sup>th</sup> edition*, ed. by Camille Georges Wermuth, David Aldous, Pierre Raboisson and Didier Rognan, Academic Press: Massachusetts, 2015. pp 747-765.

[ その他 ]

ホームページ等

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

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-strategy-HP/Top.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・准教授

研究者番号 : 70526839