

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870495

研究課題名(和文) 酵素反応機構を基に設計したユビキチン活性化酵素阻害薬の創製

研究課題名(英文) Discovery of ubiquitin-activating enzyme inhibitors designed based on its catalytic mechanism

研究代表者

伊藤 幸裕 (Itoh, Yukihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30636402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン活性化酵素は白血病細胞に高発現しており、その阻害は白血病細胞の生育を阻害することが報告されている。そのため、ユビキチン活性化酵素は創薬ターゲットとして創薬化学的に興味深い。そこで、本研究では、ユビキチン活性化酵素阻害薬の創製研究に着手した。ユビキチン活性化酵素の触媒メカニズムを基に、酵素反応依存的に阻害活性を示す化合物の設計・合成を行ったところ、ユビキチン活性化酵素を阻害する化合物の創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that ubiquitin-activating enzyme is highly expressed in leukemic cells and that inhibition of the enzyme disturbs their proliferation. Therefore, ubiquitin-activating enzymes are interesting as a drug target. In this study, we attempted to discover ubiquitin-activating enzyme inhibitors. Based on the catalytic mechanism of ubiquitin-activating enzyme, we designed and synthesized several compounds which were expected to show inhibitory activity dependent on enzyme reaction. As a result of their biological evaluation, we succeeded in identification of a compound inhibiting ubiquitin-activating enzyme.

研究分野：創薬化学

キーワード：ドラッグデザイン 低分子薬物 触媒メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のユビキチン化は、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチン転移酵素(E3)の3種の酵素により行われ、この修飾系にてポリユビキチン化されたタンパク質はプロテアソーム依存的に分解される(図1:ユビキチン化)。これは1980年代中頃までには発見されていたが、その後の発展はしばらくなかった。しかし、2000年以降ユビキチンに関する研究が爆発的に展開され、生体におけるユビキチンの役割や機能が次第に明らかになってきた。現在では、ユビキチン修飾系はタンパク質分解のみならず、生体機能調節においても重要な役割を担うと理解されている。また、本修飾系の異常はがんや神経変性疾患に關与するとされ、医学・薬学において興味深い対象として現在もなお盛んに研究されている。特に近年では、タンパク質のユビキチン化異常ががんや神経変性疾患などに關与し、死や健康寿命低下の一因となっていることも多数報告されている。

しかし、創薬化学的側面からユビキチンを考察してみると、未だ研究が進展していない。ユビキチン修飾系を阻害する薬物は種々の疾患治療薬となる可能性が報告されているものの、その阻害薬の探索研究に関する報告はそれほど多くない。現在のところ、ユビキチン修飾系阻害薬は、一部のユビキチン転移酵素(E3)を除き、天然物やペプチド等が数例あるのみである。すなわち、創薬化学の立場から言えば、ユビキチン関連分野では解決すべき課題が山積している状態であった。

## 2. 研究の目的

研究開始当初の背景で記したことを受けて、本研究では、ユビキチン活性化酵素(E1)を標的とした阻害薬の創製研究に着手することとした。ユビキチン活性化酵素(E1)は、ATP依存的にユビキチンをユビキチン結合酵素(E2)へ付加する酵素であり、ユビキチン修飾系の最上流に位置する。そのため、ユビキチン活性化酵素(E1)阻害薬は高度にユビキチン化を阻害することが期待される。また、ユビキチン活性化酵素(E1)は白血病細胞に高発現しており、その阻害は白血病細胞の生育を阻害することが報告されている。そのため、ユビキチン活性化酵素(E1)は創薬ターゲットとなる可能性が示唆されている。しかし、ユビキチン活性化酵素(E1)阻害薬は、特に報告例が少なく、ユビキチン活性化酵素(E1)阻害薬を用いた詳細な生化学実験や動物実験の報告は殆どない。すなわち、ユビキチン活性化酵素(E1)阻害薬の開発は非常に興味深く、重要な研究課題であった。

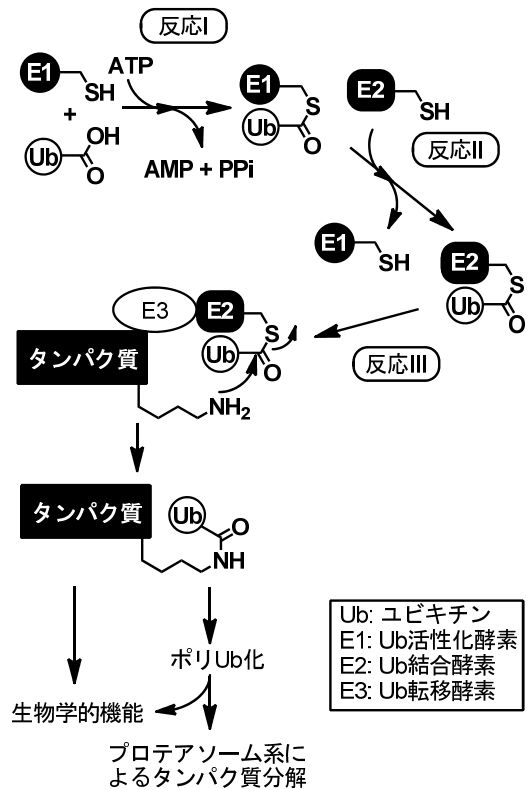


図1 ユビキチン修飾系。ユビキチンはATP依存的にE1により活性化され、E1の触媒システインとユビキチンのC末端の間でチオエステル結合を形成する(反応I)。その後、E2とチオエステル交換を行い(反応II)、E3と標的タンパク質の複合体と結合する。続いて標的タンパク質のリシン側鎖のアミノ基とユビキチンのC末端の間でアミド結合が形成される(反応III)。ユビキチン化タンパク質はさらに反応し、ポリユビキチン化され、分解されるか、生物学的な役割を果たす。

## 3. 研究の方法

### (1) 阻害薬の設計

これまでに、我々は標的誘導型合成(図2:標的酵素が持つ特有のポケットを使って酵素自身にin situで強力な阻害薬を合成させる創薬手法)という創薬手法を駆使して、様々な酵素阻害薬の創製に成功している。そこで、本研究では、ユビキチン活性化酵素(E1)の触媒機構に基づき、標的誘導型合成に基づいたユビキチン活性化酵素(E1)阻害薬の設計を行うこととした。

ユビキチン活性化酵素(E1)は、ユビキチン結合酵素(E2)へユビキチンを付加させる酵素であるが、その触媒メカニズムは次のようである。ユビキチンのC末端のカルボン酸アニオンがATPと反応し、Ub-AMP結合体となる。続いて、活性エステル部位でユビキチン活性化酵素(E1)の触媒システインと反応し、Ub-E1結合体になる。その後、ユビキチン結合酵素(E2)の触媒シ

ステインとチオエステル交換反応が起こることで反応が完結する。このユビキチン活性化酵素 (E1) の触媒機構 (図 3) を基に、標的誘導型合成を利用したユビキチン活性化酵素 (E1) 阻害薬として、ヒドロキシカルボン酸アミド化合物を設計した。ヒドロキシカルボン酸アミド化合物はユビキチンの C 末端部分におけるカルボン酸アニオンと同様に ATP と反応し、阻害薬 AMP 結合体 (酵素自身に合成させた阻害薬) となることが期待される。AMP は優れた脱離基となるため、ユビキチン活性化酵素 (E1) の触媒システインからの求核攻撃を受け、転移反応を経たのちに、阻害薬 E1 結合体を与える。この成した阻害薬 E1 結合体はメルカプトアミド結合 (比較的強固な N-S 結合) による連結のため、ユビキチン結合酵素 (E2) の触媒システインと反応しないと予想される。従って、ヒドロキシカルボン酸アミド化合物はユビキチン活性化酵素 (E1) の触媒システインと共有結合し、ユビキチン活性化酵素 (E1) を不可逆的に阻害することが期待された。この分子設計を基に、ヒドロキシカルボン酸アミド構造を有する種々の化合物の設計を行った。より詳細な分子設計については、化学計算ソフト Molegro Virtual Docker 5.0 を用いた結合モデル解析ならびに、ユビキチンの C 末端部位における構造結合活性相関研究を基に行った。化学計算ソフトを用いたモデル解析には、ユビキチンと E1 との複合体 X 線結晶構造 (PDB ID: 4II2) を利用した。実際にはペプチド性の化合物や低分子型の化合物を種々設計し、それらを固相ならびに液相にて合成した。合成した化合物については、以下に記した方法にて活性評価を行った。

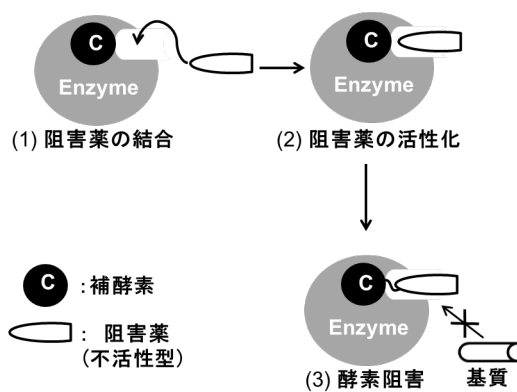


図 2 標的誘導型合成の一例。(1) 酵素と不活性型阻害薬の相互作用。(2) 酵素内での補酵素と阻害薬の反応し、共有結合を形成 (阻害薬の活性化) (3) 酵素阻害。

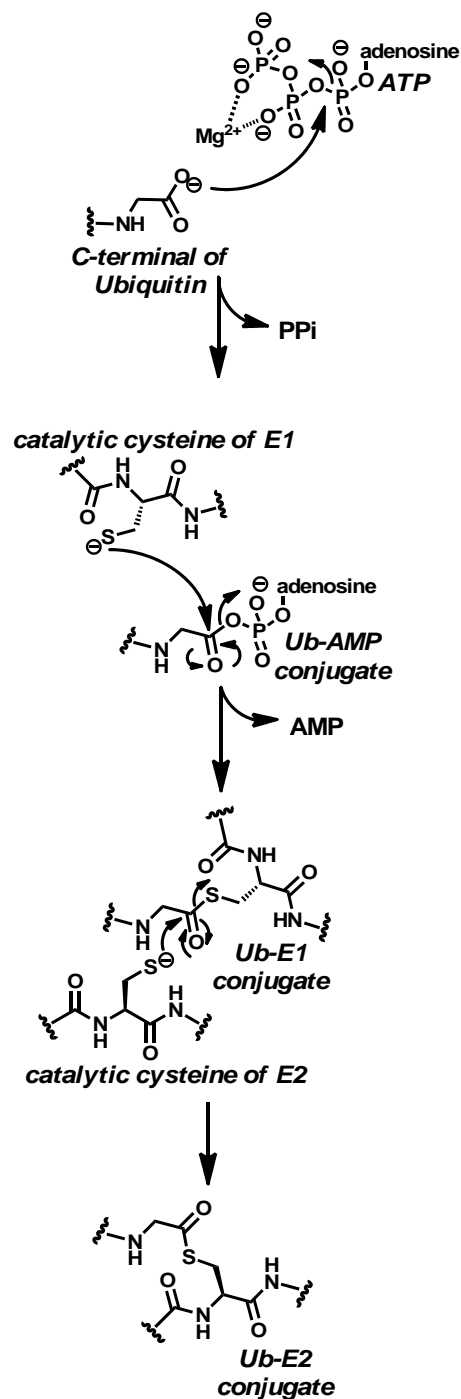


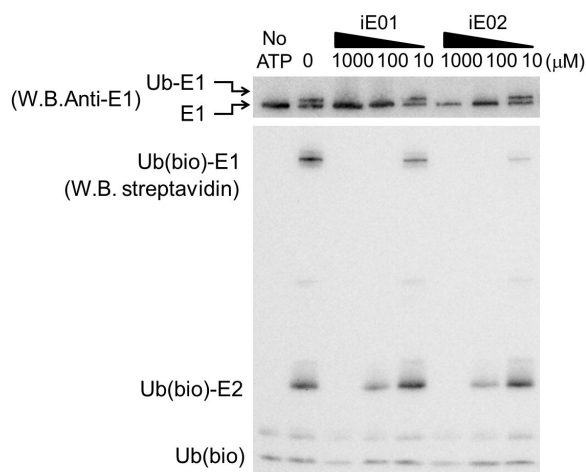
図 3 ユビキチン活性化酵素 (E1) の触媒メカニズム。

### (2) 活性評価方法

活性評価には、ビオチン化されたユビキチンを利用した。阻害薬存在下および非存在下において、ビオチン化ユビキチンとユビキチン活性化酵素 (E1) を混ぜ、酵素反応を行い、ビオチン化ユビキチンがユビキチン活性化酵素 (E1) に付加されるかをウエスタンブロッティング法にて検出した。また、上述の酵素反応に対して、ユビキチン結合酵素 (E2) も加え、ユビキチン結合酵素 (E2) にビオチン化ユビキチンが受け渡させるかについても検証した。

#### 4. 研究成果

研究の方法の(1)および(2)に示した方法で、阻害薬の設計・合成・活性評価を行ったところ、ペプチド性阻害薬 iE01 がユビキチン活性化酵素(E1)阻害能を有していることが分かった(図4)。特に iE01 は、Ub-E1 結合体形成を阻害するだけでなく、ユビキチン結合酵素(E2)存在下においても、Ub-E1 結合体形成ならびに Ub-E2 結合体形成を阻害することが分かった。しかし、ペプチド性の化合物は膜透過性ならびに代謝安定性に問題がある。そのため、より高度な試験(細胞・動物試験)での使用は難しい。そこで、低分子型の阻害薬の設計・合成を試みた。計算化学を利用したモデリング解析を通して、種々の阻害薬を設計・合成し、活性評価を行った。その結果、ユビキチン活性化酵素(E1)を阻害するための構造活性相関が得られるとともに、ユビキチン活性化酵素(E1)を強く阻害する iE02 を見出すことに成功した(図4)。



**図4** ユビキチン活性化酵素(E1)阻害活性評価。iE01 & iE02 : E1 阻害薬。  
Ub(bio) : ビオチン化ユビキチン。

現在、ユビキチンに関する研究は、現在世界中で盛んに行われており、急速な発展を遂げている研究分野の一つである。しかし、創薬化学的な立場から、本研究分野にアプローチしている報告例は未だ少ない。本研究では、ユビキチン研究分野に対し、化合物を用いた化学系薬学あるいは創薬化学的側面からアプローチするという点で、特色があり、独創性の高い研究であったと言える。また、E1 に対する有用な阻害薬が殆ど報告されていないという点でも新規性が高く、学術的な特色があった。さらに、今後は、E1 に対するケミカルバイオロジー研究の発展、およびE1 を標的とした医薬品開発における研究基盤の充実・強化が図れることを期待している。加えて、本研究では独創的な創薬手法である

標的誘導型合成による阻害薬創製を目指しており、本研究での成果は薬学をはじめ関連学術および製薬関連産業分野の発展に寄与するものとする。

#### 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2件)

1. 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, Hiroyuki Saito, Mikihiro Naito. Targeted degradation of proteins localized in subcellular compartments by hybrid small molecules. *Molecular pharmacology*, 査読有, 91, (2017) 159-166. DOI: 10.1124/mol.116.105569
2. Yukihiro Itoh and Takayoshi Suzuki. "Drug" Discovery with the Help of Organic Chemistry. *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 137 (2017) 283-292. DOI: 10.1248/yakushi.16-00231-1

[学会発表](計2件)

1. 伊藤幸裕 低分子化合物を用いたタンパク質化学修飾制御の分子技術 日本化学会 第97春季年会、2017年3月16日、神奈川県・横浜
2. 伊藤幸裕 鈴木孝禎 有機化学の力を借りた「薬」創り 日本薬学会第136年会 2017年3月27日、神奈川県・横浜

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 幸裕 (ITOHI Yukihiro)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号 : 30636402