

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08367

研究課題名(和文)人工ユビキチン化合物の創製とその応用

研究課題名(英文)Identification of artificial ubiquitin compounds and their application study

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)・准教授

研究者番号：30636402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のユビキチン化は生体機能を調節する重要な役割を担っている。しかし、どのタンパク質が、いつ、どの程度ユビキチン化を受けるかを分析することは非常に困難で細胞レベルでユビキチン化タンパク質を検出・定量するのは難しい。そこで、本研究では、細胞内のユビキチン化タンパク質を簡便かつ効率的に検出する手法の開発を究極的な目的とし、そのプローブ分子となることが期待される人工ユビキチン化合物の創製を目指した。その結果、ユビキチンのようにユビキチン活性化酵素に認識されることが示唆された化合物の創製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のユビキチン化異常はがんや神経変性疾患などに関与し、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。そのため、細胞レベルでユビキチン化タンパク質を検出・定量する方法が求められている。本研究では、タンパク質のユビキチン化を検出するための足掛かりとなる人工ユビキチン化合物の創製に着手した。その結果、ユビキチンのようにユビキチン活性化酵素に認識されることが示唆された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 protein ubiquitination plays an important role for regulation of biological functions. However, it is difficult to analyze protein ubiquitination in cell. In this study, we attempted to identify artificial ubiquitin compounds for development of the method to detect and to quantify cellular levels of protein ubiquitination. As a result, we identified compounds recognized as substrates by ubiquitin activating enzyme like a ubiquitin molecule.

研究分野：創薬化学

キーワード：創薬化学 分子設計 ケミカルバイオロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わずか 8.6 kDa の小さなタンパク質であるユビキチンは、様々なタンパク質に付加される。この付加反応は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) およびユビキチン転移酵素 (E3) の 3 種類の酵素によって行われる。E1、E2、E3 によるタンパク質へのユビキチンの付加 (ユビキチン化) は、そのタンパク質の機能制御に重要な役割を担っている。例えば、ユビキチン化はタンパク質分解の「目印」として利用されている。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、ユビキチン化に関する研究が急速に展開され、生体におけるユビキチン化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。特にユビキチン修飾系の異常は神経変性疾患等に関与するとされ、医学・薬学をはじめ様々な自然科学分野において興味深い対象として現在もお盛んに研究されている。また、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関与し、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。したがって、タンパク質の異常なユビキチン化状態を把握できれば、ユビキチン関連疾患のメカニズム解析やユビキチン化状態に応じた診断・治療が可能となると期待できる。しかし、現在のところ、どのタンパク質が、いつ、細胞内のどこで、どの程度ユビキチン化を受けるかを解析する技術やユビキチン化タンパク質の網羅的な解析法は確立されていない。現在、タンパク質のユビキチン化を検出する手法として良く使われているのが、目的のタンパク質とユビキチン化抗体を利用した免疫沈降法あるいは ELISA 法である。ただし、これらの方法は繁雑で、正確な解析を行うには熟練した生化学的な技術を必要とするほか、網羅的な解析には不向きである。一方、細胞抽出液に対して、トリプシン消化後に質量分析を行い、ユビキチン化を網羅的に検出する試みもなされている。しかし、ユビキチン化タンパク質が不安定であることやユビキチン類似タンパク質との識別が困難であるという理由から、適切な解析できないという問題を抱えている。

2. 研究の目的

上述した研究背景を受けて、我々は、細胞内のユビキチン化タンパク質を簡便かつ効率的に検出する手法を開発したいと考えた。そこで、本研究では、有機化学的にユビキチンとして振る舞う人工ユビキチン化合物の創製研究を行うこととした。なお、人工ユビキチン化合物とはユビキチンの C 末端部位に相当する構造を持ち、ユビキチン修飾酵素群に基質として認識され、タンパク質に付加される化合物のことを言う (図 1)。細胞膜透過性を有した人工ユビキチン化合物が創製できれば、(i) 調べたいタイミングで人工ユビキチン化合物を細胞に処理し、(ii) 人工ユビキチン化合物によるタンパク質修飾に着目して検出を行う (人工ユビキチン化合物修飾を「目印」として利用) ことで、細胞内のユビキチン化タンパク質を簡便かつ効率的に検出・定量することができる。また、(ii) の段階で分離・精製を行い、適切な処理後、質量分析等を利用すれば、ユビキチノーム解析が可能になると期待される。

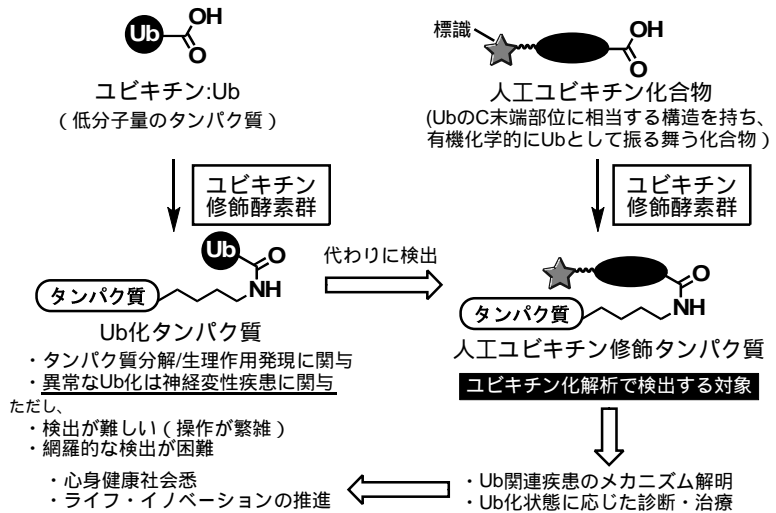
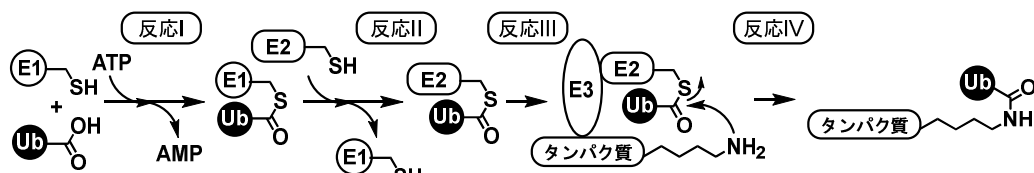


図 1. ユビキチンと人工ユビキチン化合物

3. 研究の方法

ユビキチン修飾を担う 3 種の酵素の役割は図 2A に記すようである。この修飾系において、ユビキチンを構造的に認識する酵素は ATP 依存的な反応を誘導するユビキチン活性化酵素 (E1) である。以後、ユビキチン結合酵素 (E2) およびユビキチン転移酵素 (E3) を経たタンパク質のユビキチン化はチオエステル交換反応あるいはチオエステル-アミド交換反応であり、大き



反応I: UbのC末端がATP依存的にE1と反応し、チオエステル化。反応III: E2-E3による基質タンパク質の認識。
 反応II: E1-E2間でのチオエステル交換反応。反応IV: E2-タンパク質間でのチオエステル-アミド交換反応。

図 2. E1, E2 および E3 によるタンパク質のユビキチン化。

な活性化エネルギーを必要としたり、コピキチン構造の高度な認識を必要とはしない。そこで、E1 によるコピキチンの認識と活性化が化学的には最も重要な反応と言える。したがって、コピキチンのように E1 に基質として認識される化合物が人工コピキチン化合物になりうると考えた。また、低分子人工コピキチン化合物はコピキチンのようにプロテアソームに認識されるとは考えられないため、コピキチン化タンパク質が細胞内で分解されることはない。したがって、人工コピキチン化合物を用いることで、細胞系においてコピキチン化タンパク質を検出することが可能になると考えられる。そこで、報告されているコピキチンと E1 との複合体 X 線結晶構造 (PDB code: 4II2) を基に人工コピキチン化合物の設計を試みた。複合体 X 線結晶構造から、コピキチンと E1 の結合に R72、L73 の側鎖および GG 間のアミド結合が必須であることが示唆された (図 3)。従って、この 2 点を考慮し、図 3 のように R72、L73 の側鎖を R3, R4 に対応させ、GG 間アミド結合に相当する構造を持つ化合物 **1** を人工コピキチン化合物として設計し、これに対応する一連の化合物の合成を行うこととした。

また、化合物の評価には、ATP 存在下 E1, E2 およびピオチン化コピキチンを用いて酵素反応を行い、ウエスタンプロテイング法で検出することで E1 および E2 のコピキチン化が阻害しうるか評価した(コピキチンの代わりに人工コピキチン化合物が導入された場合、E1, E2 のコピキチン化が阻害される)。

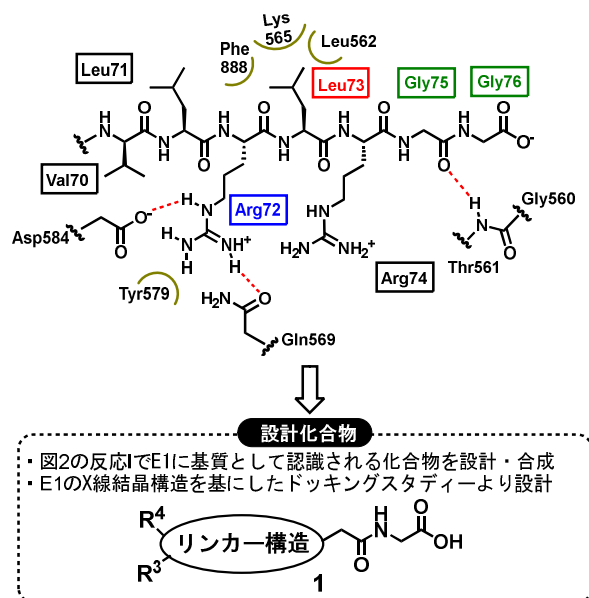


図 3.人工コピキチン化合物の設計 .

4 . 研究成果

研究方法で示した一連の化合物 **1** を合成し、活性評価を行った。その結果、E1 に基質して認識されうる数種類の化合物を見出すことに成功するとともに、E1 に基質として認識されるための構造活性相関を得ることができた。また、一連の化合物 **1** の中に、コピキチン分子と同様に E1 から E2 への転移することが示唆された化合物も存在した。これらの化合物は、プローブ化された人工コピキチン化合物の創製につながる可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itoh Yukihiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Drug Discovery Researches on Modulators of Lysine-Modifying Enzymes Based on Strategic Chemistry Approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 34 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1248/cpb.c19-00741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Yukihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Chemical Protein Degradation Approach and its Application to Epigenetic Targets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Chemical Record	6. 最初と最後の頁 1681 ~ 1700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tcr.201800032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Yukihiro, Suzuki Miki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Design, synthesis, and biological evaluation of novel ubiquitin-activating enzyme inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤幸裕、鈴木美紀
2. 発表標題 新規コピキチン活性化酵素阻害薬の創製
3. 学会等名 第36回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤幸裕
2. 発表標題 リシン 修飾酵素を制御する低分子化合物の 修飾酵素を制御する低分子化合物の 修飾酵素を制御する低分子化合物の 創製 ~化学 的発想を活かした創薬~
3. 学会等名 第4回近畿薬学シンポジウム：化学系の若い力（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤幸裕
2. 発表標題 合理的な分子設計と独特な創薬方法論が導くリシン修飾酵素制御化合物の創製
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考