

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16326

研究課題名（和文）特殊なユビキチン化を誘導する小分子の創製

研究課題名（英文）Small molecules that induce atypical ubiquitinations

研究代表者

友重 秀介（Tomoshige, Shusuke）

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：50822524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：翻訳後修飾の一つであるユビキチン化は、その修飾様式に多様性があることが知られている。本研究では、これまで着目されていたものとは異なる特殊なユビキチン化を誘導する化合物の創製を目指した。疎水性構造をタンパク質表面に提示する化合物を創製したところ、この化合物はmHttタンパク質をユビキチン-プロテアソーム系依存的に分解誘導した。本研究成果は国際学会で発表し、国際的学術誌に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた化合物は通常のユビキチン化経路とは異なる経路でユビキチン化を誘導しタンパク質を分解するため、特殊なユビキチン化を誘導している可能性が考えられる。本化合物についてさらなる解析が必要だが、特殊なユビキチン化に関する研究を支援するケミカルツールになりうる。また、化合物によって減少したmHttは神経変性疾患の原因となるタンパク質であり、この化合物は脳移行性も示したことから、神経変性疾患の新規治療戦略の提案につながった。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitination, a posttranslational modification, has been shown to have variety in its linkage type. Here I aimed to generate compounds able to induce atypical ubiquitinations. Compounds that can display hydrophobic structure on protein surface were synthesized and are found to mediate targeted degradation of mHtt via ubiquitin-proteasome system. The results were reported in an international conference and were published in an international academic journal.

研究分野：創薬化学

キーワード：疎水性タグ mHtt

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン (Ub) 化は、基質タンパク質および Ub 自身のリジン残基 (K) に Ub が共有結合し、ポリ Ub 鎖を形成する翻訳後修飾である。Ub は7つのリジン残基を有しており、ポリ Ub 鎖の機能はどのリジン残基で連結するかに依存する。最も一般的なのは48番目のリジン残基 (K48) で結合した K48 型 Ub 鎖であり、タンパク質の分解シグナルとして機能する。一方、それ以外の特殊な Ub 鎖は様々な生命現象や疾患に関与することが報告されている [Cell Res. 2016, 26, 399.] (図1)。

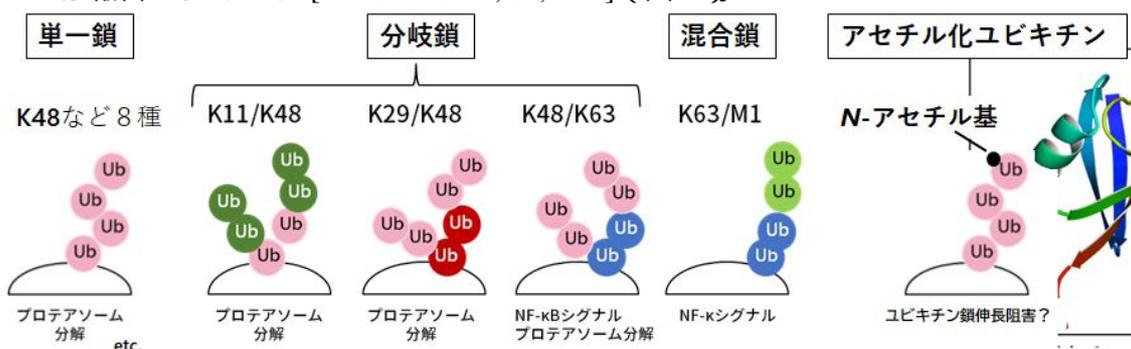


図1. 様々なユビキチン修飾.

しかし、特殊な Ub 化は K48 型に比べ生体内での発生頻度が低いうえに多様性に富むため機能解析が困難であり、不明な点も多い。この問題に対し研究代表者は、特殊な Ub 化を誘導する手法を開発すれば特殊な Ub 化に関する研究を支援することが可能になり、特殊な Ub 化の生物学および創薬の発展に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

特殊なユビキチン化の解析技術として、特殊なユビキチン化を誘導する化合物を開発することを目指した。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまで、化学的に K48 型 Ub 化を誘導する手法「プロテインノックダウン法」に関する研究を行ってきた [Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 53, 11530.]。本手法では、【標的タンパク質のリガンド】と【Ub 化酵素 (E3) のリガンド】からなる連結有機小分子によって E3 を標的タンパク質に接近させ、K48 型 Ub 化とプロテアソームによる分

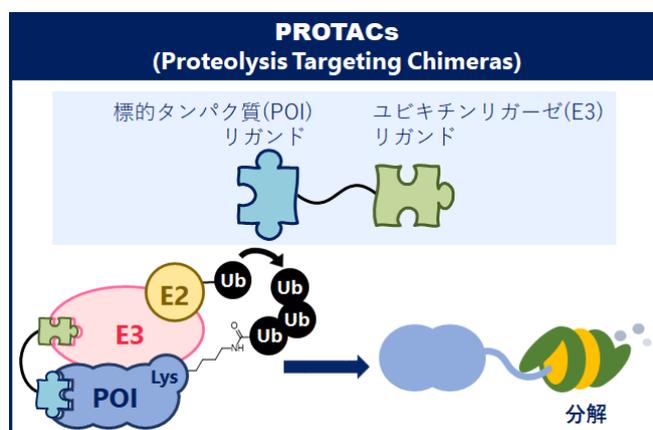


図2. プロテインノックダウン法 (PROTAC).

解を誘導する (図2)。これまで、研究代表者を含む国内外の研究者が様々なタンパク質のプロテインノックダウンを達成している。研究代表者は、プロテインノックダウン法の理論を特殊な Ub 化へと拡張すれば、特殊な Ub 化を誘導する小分子を創製できるのではないかと考えた。そこで本研究では、特殊な Ub 化を担う E3 を利用する連結小

分子を設計・合成し、その Ub 化活性を検討することにした。

4 . 研究成果

Ub リガーゼの一つである cIAP1 は、K11、K48、K63Ub 鎖を形成できることが知られている。まずは、cIAP1 を利用する連結小分子を合成することにした。また、標的タンパク質には、cIAP1 によって特殊な Ub 化を施されることが知られている RIP1 を選択した。すなわち、cIAP1 のリガンドである BE04 と、RIP1 の阻害剤である necrostatin を連結した小分子 BE04-Nec を設計した (図 3)

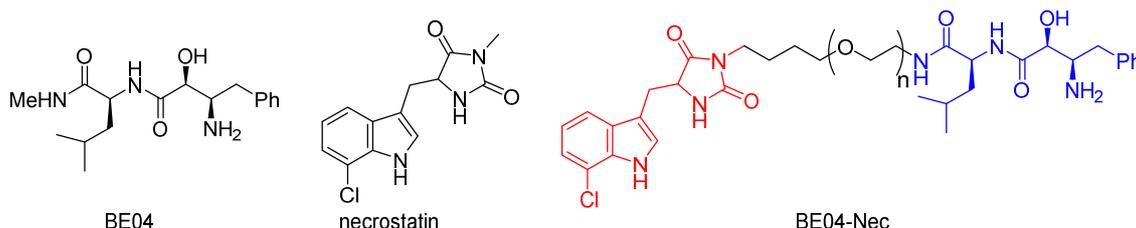


図 3 . 化合物設計 .

BE04-Nec は 8 工程の有機合成反応により合成し、化合物の活性評価に着手した。はじめに、RIP1 を発現する A549 細胞に化合物を処理した。その後細胞を溶解して得たライセートを用いて RIP1 のウェスタンブロッティングを行ったところ、RIP1 の発現量は変化が無く、K48 以外の Ub 化が起きていることが示唆された。さらなる解析のため、免疫沈降により濃縮した RIP1 に対する Ub 鎖を K48 あるいは K63 鎖特異的な抗体を用いて解析を行った。RIP1 の免疫沈降条件を決定でき、現在 Ub 鎖特異的な抗体を用いた解析を進めているところである。

上記検討に加え、タンパク質品質管理機構における特殊 Ub 化の精査を行った。タンパク質品質管理機構では、変性したタンパク質をシャペロン Hsp70 が認識し、これと相互作用する E3 である STUB1 によって Ub 化される。STUB1 もモノ Ub 化などの特殊な Ub 化を施すことが知られている。Hsp70 による変性タンパク質の認識は、フォールディング異常によって露出したタンパク質の疎水性領域を認識すると考えられており、これを利用した化合物として疎水性タグが報告されている。疎水性タグ (HyT) は標的タンパク質リガンドと疎水性構造からなる連結小分子であり、標的タンパク質表面に疎水性構造を提示することで Hsp70 による誤認識とそれに続く分解を引き起こす (図 4) 。したがって、HyT を利用することで標的タンパク質に対し STUB1 による特殊 Ub 化が誘導できると考えた。今回、標的タンパク質に mHtt を選択した。mHtt は神経変性疾患の一つであり根治法の無いハン

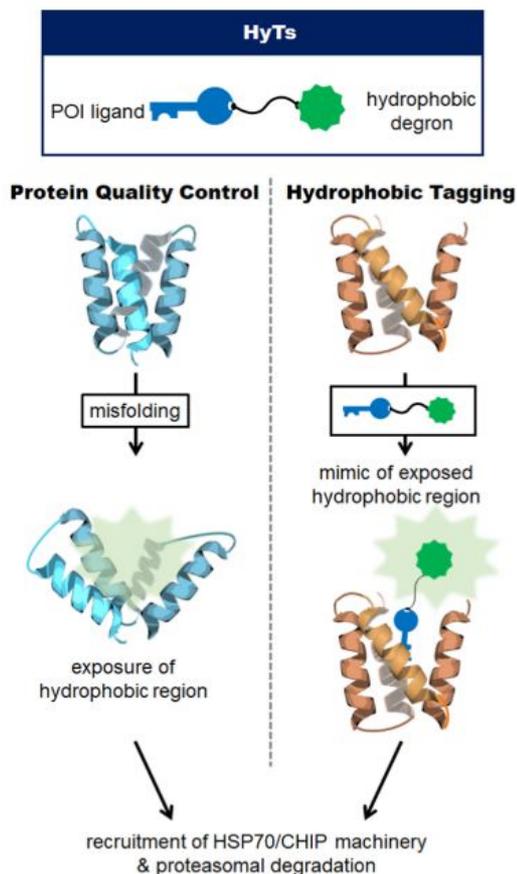


図 4 . 品質管理機構と疎水性タグ法 .

チントン病の原因タンパク質とされ、凝集性を示す。mHtt リガンドとして凝集体結合化合物を用い、これに各種疎水性構造を連結した化合物を6種類設計・合成した(図5)。これらはいずれの化合物も mHtt の存在量を顕著に減少させた。

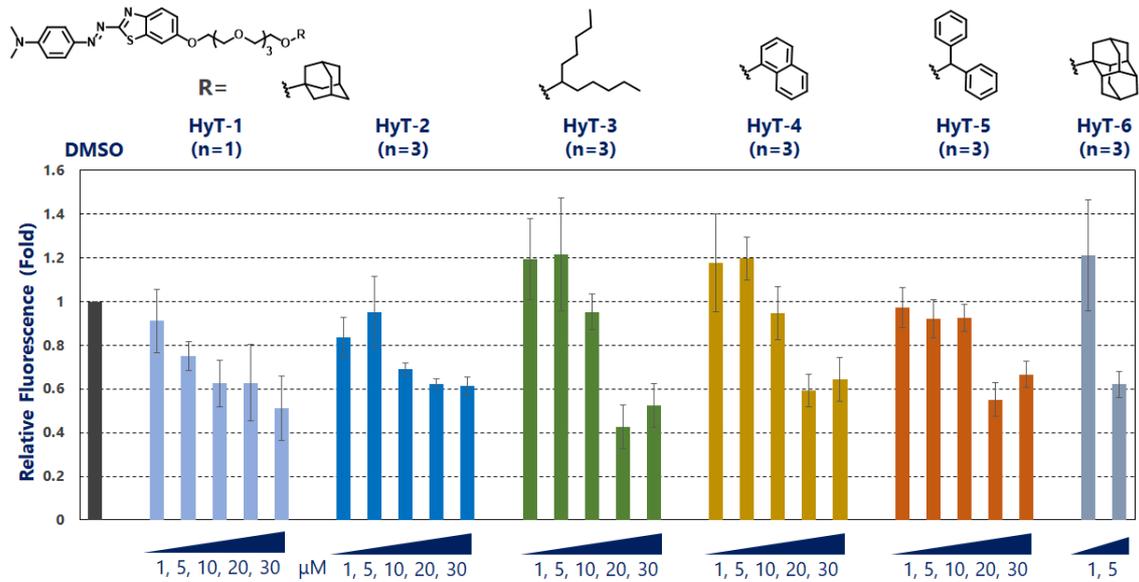


図5 . HyT の構造と mHtt 減少活性 .

近年、特殊 Ub 化が単なる K48 鎖よりもプロテアソームによる分解を促進することが報告されている。凝集性タンパク質は会合体を形成していることからプロテアソームによる分解が難しいと予想され、これを可能としていることから HyT による分解誘導は特殊 Ub 化を介している可能性がある。現在、STUB1 による特殊 Ub 鎖形成について検討しているところである。なお、これらの HyT のうちの一つはマウスを用いた実験において脳移行性を示した。ハンチントン病は脳を病巣とすることから、脳移行性を有する mHtt 分解誘導薬は、ハンチントン病治療に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tomoshige Shusuke, Ishikawa Minoru	4. 巻 41
2. 論文標題 In vivo synthetic chemistry of proteolysis targeting chimeras (PROTACs)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116221 ~ 116221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116221	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 Hirai Keigo, Yamashita Hiroko, Tomoshige Shusuke, Mishima Yugo, Niwa Tatsuya, Ohgane Kenji, Ishii Mayumi, Kanamitsu Kayoko, Ikemi Yui, Nakagawa Shinsaku, Taguchi Hideki, Sato Shinichi, Hashimoto Yuichi, Ishikawa Minoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Conversion of a PROTAC Mutant Huntingtin Degradation into Small-Molecule Hydrophobic Tags Focusing on Drug-like Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 396 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00500	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平井景梧, 山下博子, 友重秀介, 佐藤伸一, 橋本祐一, 石川稔
2. 発表標題 疎水性タグ法による凝集性タンパク質のケミカルノックダウン
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井景梧, 山下博子, 友重秀介, 三島祐悟, 佐藤伸一, 橋本祐一, 石川稔
2. 発表標題 疎水性タグ化合物による神経変性疾患関連タンパク質の分解誘導
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keigo Hirai, Hiroko Yamashita, Shusuke Tomoshige, Yugo Mishima, Kenji Ohgane, Shinichi Sato, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa
2. 発表標題 Conversion of A PROTAC Mutant Huntingtin Degradar into Small-molecule Hydrophobic Tags Focusing on Druglike Properties
3. 学会等名 AIMECS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友重秀介
2. 発表標題 タンパク質分解誘導薬の神経変性疾患治療への展開
3. 学会等名 第10回有機・生命・計測化学交流セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井景梧, 山下博子, 友重秀介, 三島祐悟, 佐藤伸一, 橋本祐一, 石川稔
2. 発表標題 脳移行性改善を指向したPROTACから疎水性タグへの構造展開
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kota Nishiuchi, Shusuke Tomoshige, Koichi Watashi, Kouji Kuramochi
2. 発表標題 Efficient Synthesis of Neoechinulin B and Its Derivatives
3. 学会等名 ICPAC Yangon (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Okabe, Takeshi Yokoyama, Shusuke Tomoshige, Tomohisa Ogawa, Minoru Ishikawa, Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Crystal structure analysis of BIR3 domain of ubiquitin ligase in complex with its specific ligand
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Okabe, Shinichi Sato, Takeshi Yokoyama, Shusuke Tomoshige, Minoru Ishikawa, Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Crystal structure analysis of BIR3 domain of ubiquitin ligase in complex with its specific ligand for designing potent ligand
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------