

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 5 月 31 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659048

研究課題名（和文）病原性タンパク質を分解するプロテインノックダウン法の開発

研究課題名（英文）Development of protein knockdown technology to degrade pathogenic proteins

研究代表者

内藤 幹彦 (NAITO MIKIHICO)

国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・部長

研究者番号：00198011

研究成果の概要（和文）：プロテインノックダウン法で最初に開発した SNIPER-2 は、標的タンパク質（CRABP2）だけでなくユビキチンリガーゼ（cIAP1）を減少させたが、構造を一部修飾する事により標的タンパク質を選択的に減少させる SNIPER-4 の開発に成功した。さらにエストロゲン受容体を標的とする SNIPER(ER) をデザイン・合成し、SNIPER(ER) が乳がん細胞のエストロゲン受容体を分解した後、速やかにネクローシスを誘導する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We initially developed SNIPER-2 that degrades the target protein CRABP2 and the ubiquitin ligase cIAP1. By chemical modification, we successfully developed SNIPER-4 that selectively degrades the target protein. We also developed SNIPER(ER) that target estrogen receptor- α (ER α) for degradation, and found that the SNIPER(ER) induces necrosis in breast cancer cells after the degradation of ER α .

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	2,900,000	0	2,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

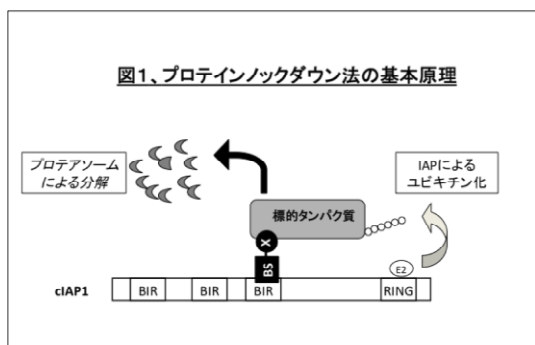
キーワード：ユビキチン、プロテアソーム、プロテインノックダウン、cIAP1、ネクローシス

1. 研究開始当初の背景

病気の原因となっているタンパク質を選択的に分解する事ができれば、従来にない新しい薬剤を創製できると考えられるが、タンパク質の分解を選択的に制御する技術はほとんど研究されていない。申請者らは、細胞死制御機構の研究の過程で、細胞死阻害タンパク質 cIAP1 を特異的に減少させる化合物 (MeBS) を発見した。詳しい解析の結果、MeBS は cIAP1 に結合し、RING ドメイン依存的自己ユビキチン化反応を引き起こす事、ユビキチン化された cIAP1 はプロテアソームで分解されること等を明らかにした (Sekine et al, JBC, 283, 8961-8 (2008))。MeBS の構造活性相関等の知見から、標的タンパク質に結合するリガンド (X) と MeBS

をリンカーで接合させたハイブリッド化合物 (BS-X) は、標的タンパク質を cIAP1 にリクルートし、cIAP1 による標的タンパク質のユビキチン化と、プロテアソームによる分解を引き起こすと考えた (図 1)。そして最初の実証実験として ATRA (All-trans retinoic acid) を MeBS と接合した BS-ATRA を合成し、予想通り BS-ATRA が ATRA 結合タンパク質 (CRABP2) をプロテアソームにより分解させる活性を示す事を明らかにした (Itoh et al, JACS, 132, 5820-6 (2010))。この BS-X をベースとしたプロテインノックダウン法は、原理的にはリガンド (X) を置換することにより様々なタンパク質を標的として特異的に分解することができる。我々はこれらの化合物を SNIPER (Specific and

Non-genetic IAP-dependent Protein Eraser と名付けた。



2. 研究の目的

これまでの研究で開発した SNIPER-2 は、標的タンパク質 (CRABP2) と共にユビキチンリガーゼである cIAP1 も分解してしまう。そこで本研究では SNIPER-2 の構造を修飾する事によりユビキチンリガーゼを分解しにくい化合物を開発し、標的タンパク質を特異的に分解するプロテインノックダウン法の基盤を確立する。さらに、Tamoxifen を標的リガンドとして利用して乳がんの治療標的となっているエストロゲン受容体 (ERα) を分解する SNIPER(ER) を合成し、そのプロテインノックダウン活性及び乳がん細胞に与える活性を調べる。

3. 研究の方法

(1) プロテインノックダウン法の基盤確立と標的タンパク質分解メカニズムの解析

申請者らがこれまでに開発した第1世代の SNIPER 化合物は MeBS と同様に Bestatin (BS) のエステル結合誘導体であり、ATRA 結合タンパク質 (CRABP2) だけでなく、ユビキチンリガーゼとして働く cIAP1 の分解も引き起こす (Itoh et al, JACS, 132, 5820-6 (2010))。標的タンパク質を効率良く分解するには、ユビキチンリガーゼ cIAP1 を分解しない化合物が望ましい。そこで第1世代 SNIPER の構造の一部を修飾することにより、標的タンパク質のみを分解する第2世代の SNIPER 化合物を開発する。MeBS の構造活性相関解析から、BS のエステル結合誘導体は cIAP1 の自己ユビキチン化を活性化するが、アミド結合誘導体ではその活性が著しく低下することがわかっている (Sekine et al, JBC, 283, 8961-8 (2008))。そこで SNIPER のアミド結合誘導体を合成し、cIAP1 の自己ユビキチン化を起こしにくい化合物を開発する。アミド型 SNIPER による CRABP2、cIAP1 のユビキチン化とプロテアソームによる分解を、エステル型 SNIPER と比較し、標的タンパク質に特異的なプロテインノックダウンを起こす化合物の基本構造を決定する。

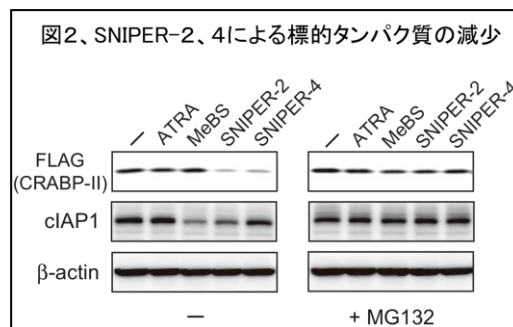
(2) エストロゲン受容体を標的としたプロテインノックダウン

エストロゲン受容体 (ERα) に結合する Tamoxifen を利用して、ERα を分解する SNIPER(ER) を合成し、ERα の分解活性、ERα 依存的転写活性及び ERα 陽性乳がん細胞に対する増殖阻害活性等を評価する。

4. 研究成果

(1) プロテインノックダウン法の基盤確立と標的タンパク質分解メカニズムの解析

SNIPER-2 の cIAP1 減少活性を低下させるために、アミド型の SNIPER-4 を合成した。SNIPER-4 は CRABP2 を減少させたが、cIAP1 をほとんど減少させなかった。プロテアソーム阻害剤 MG132 は、SNIPER-2 による CRABP2 と cIAP1 の減少、及び SNIPER-4 による CRABP2 減少を阻害したことから、これらタンパク質の減少はプロテアソームでの分解によるものと考えられた。(図2)



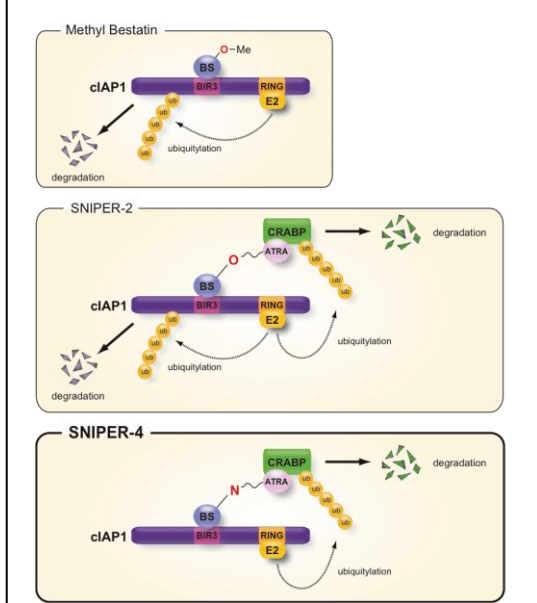
SNIPER-2 (エステル型) と SNIPER-4 (アミド型) のプロテインノックダウン活性を比較すると、短時間 (6 時間) での活性はほぼ同程度であったが、長時間 (24、48 時間) ではアミド型の SNIPER-4 のほうが優れたプロテインノックダウン活性を示した。これは、SNIPER-4 がユビキチンリガーゼ cIAP1 を減少させない事、及びアミド結合はエステル結合よりも水溶液中で安定であることによると考えられた。

作用機序解析として、SNIPER による CRABP2 ユビキチン化を調べた結果、SNIPER-2、SNIPER-4 とともに CRABP2 のユビキチン化を亢進させることが明らかになった。また、siRNA を用いて予め cIAP1 をノックダウンした細胞では、SNIPER による CRABP2 の減少が抑制された。これらの結果から、SNIPER は cIAP1 による CRABP2 のユビキチン化とプロテアソームによる分解を亢進する事により、CRABP2 を減少させる活性を示す事が明らかになった。

図3は MeBS、SNIPER-2 及び SNIPER-4 によるプロテインノックダウンのメカニズムをまとめたものである。MeBS は cIAP1 の BIR3 ドメインに結合して、RING 依存的 cIAP1 自己ユビキチン化を活性化しプロテアソームで

の分解を引き起こす。SNIPER-2 は CRABP2 タンパク質と cIAP1 を架橋し、両タンパク質の RING 依存的なユビキチン化を活性化する。その結果、cIAP1 と CRABP2 両方のタンパク質がプロテアソームで分解される。アミド型の SNIPER-4 は cIAP1 自己ユビキチン化活性化能が著しく低下したため、CRABP2 タンパク質を選択的にプロテアソームで分解することができる。

図3、SNIPERによるプロテインノックダウンのメカニズム



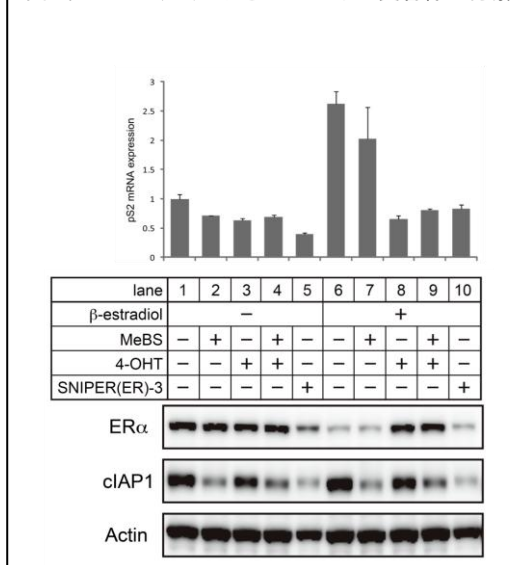
(2) エストロゲン受容体 (ER α) を標的としたプロテインノックダウン

乳がん細胞の多くは ER α を発現し、エストロゲン依存性の増殖を示す。また乳がんの治療薬として使われる Tamoxifen は、ER α に結合してその活性を制御する事により乳がん細胞の増殖を阻害する。そこで、Tamoxifen を標的リガンドとして組み込んだ SNIPER(ER) を合成し、そのプロテインノックダウン活性を乳がん細胞 MCF7 で評価した。

生理的条件下で ER α にエストロゲンが結合すると、核内に移行し転写を活性化し、その後ユビキチン化を受けてプロテアソームで分解される。また通常の培養条件でも、血清中に存在するエストロゲンが ER α の活性化と分解を誘導している事が知られている。SNIPER(ER) による ER α 分解と、エストロゲンによる活性化と共役した ER α 分解とを区別するために、エストロゲンを除去した血清中で MCF7 細胞を培養し、SNIPER(ER) によるプロテインノックダウン活性と ER α 標的遺伝子 pS2 の転写活性化能を調べた。その結果、エストロゲンは pS2 遺伝子発現と ER α 減少を引き起こしたが、SNIPER(ER) は pS2 遺伝子発現を誘導せずに ER α 分解を引き起こす事が

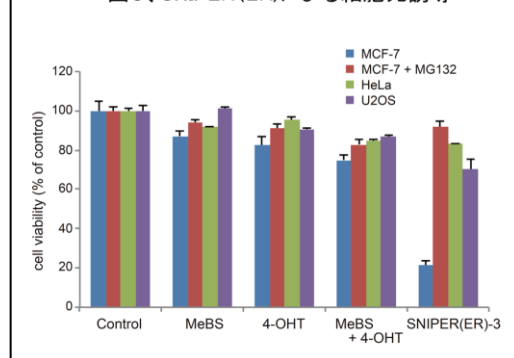
わかった (図 4)。

図4、SNIPER(ER)によるエストロゲン受容体の分解



また SNIPER-2, 4 と同様な方法で、ER α 分解のメカニズムを解析した結果、SNIPER(ER) は cIAP1 依存的な ER α のユビキチン化とプロテアソームによる分解を引き起こす事が示唆された。興味深い事に、SNIPER(ER) は ER α 分解のあと MCF7 細胞に速やかに細胞死を誘導する事、またこの細胞死はプロテアソーム阻害剤 MG132 で ER 分解を阻害すると抑制される事が明らかになった (図 5)。詳しい解析の結果、この細胞死はネクロシス様の細胞死であることがわかった。これらの結果から、ER α を分解する SNIPER(ER) は新しい乳がん治療薬のリード化合物となる可能性が示された。

図5、SNIPER(ER)による細胞死誘導



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 8 件)

- Demizu, Y., Okuhira, K., Motoi, H., Ohno, A., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., Naito, M. & Kurihara, M. :

- Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 1793-1796 (2012).
- 2, Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Okuhira, K., Naito, M. & Hashimoto, Y.: Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4453-4457 (2012).
 - 3, Okuhira, K., Ohoka, N., Sai, K., Nishimaki-Mogami, T., Itoh, Y., Ishikawa, M., Hashimoto, Y. & Naito, M.: Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein. *FEBS Lett* 585, 1147-1152 (2011).
 - 4, Itoh, Y., Kitaguchi, R., Ishikawa, M., Naito, M. & Hashimoto, Y.: Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg Med Chem* 19, 6768-6778 (2011).
 - 5, Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Sato, S., Naito, M. & Hashimoto, Y.: Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. *Bioorg Med Chem* 19, 3229-3241 (2011).

[学会発表] (計12件)

- 1, 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(2013年3月、横浜)
- 2, Okuhira, K., Demizu, Y., Ohoka, N., Shibata, N., Hattori, T., Nishimaki-Mogami, T., Kurihara, M., Okuda, H., Naito, M.: Development of SNIPER(ER) that induces estrogen receptor degradation followed by rapid cell death in breast cancer cells. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research (2013年2月、ラハイナ市、米国)
- 3, 奥平桂一郎, 出水庸介, 大岡伸通, 柴田識人, 服部隆行, 最上 (西巻) 知子, 奥田晴宏, 栗原正明, 内藤幹彦: 乳癌におけるエストロゲンレセプターの分解を誘導する分子 SNIPER(ER)の開発. 第

16回日本がん分子標的治療学会(2012年6月、北九州市)

- 4, Naito, M., Okuhira, K., Demizu, Y., Itoh, Y., Ishikawa, M., Ohoka, N., Shibata, N., Hattori, T., Nishimaki-Mogami, T., Kurihara, M., Hashimoto, Y.: Development of 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 (2012年5月、ボストン市、米国)
- 5, Naito, M., Okuhira, K., Ohoka, N., Shibata, N., Hattori, T., Itoh, Y., Ishikawa, M., Hashimoto, Y.: Development of small molecules that induce IAP-mediated ubiquitylation and proteasomal degradation of target proteins. The 6th International Conference SUMO, Ubiquitin, UBL Proteins: Implications for Human Diseases (2012年2月、ヒューストン市、米国)
- 6, Okuhira, K., Demizu, Y., Ohoka, N., Shibata, N., Hattori, T., Nishimaki-Mogami, T., Kurihara, M., Okuda, H., Naito, M.: Development of SNIPER(ER) that induces estrogen receptor degradation. The 6th International Conference SUMO, Ubiquitin, UBL Proteins: Implications for Human Diseases (2012年2月、ヒューストン市、米国)
- 7, 奥平桂一郎, 出水庸介, 大岡伸通, 柴田識人, 服部隆行, 最上 (西巻) 知子, 栗原正明, 奥田晴宏, 内藤幹彦: Degradation of estrogen receptor induced by a small hybrid molecule SNIPER(ER). The 16th JFCR-ISCC (2012年1月、東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/dfbg/frame.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 幹彦 (NAITO MIKIHICO)

国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・部長

研究者番号: 00198011