

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670154

研究課題名(和文)NF- $\kappa$ Bを制御する直鎖状ユビキチン鎖生成調節薬の開発研究課題名(英文)Development of small molecules inhibiting linear ubiquitin-mediated NF- $\kappa$ B activation

研究代表者

岩井 一宏 (Kazuhiro, wai)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60252459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：NF- $\kappa$ Bは種々の悪性腫瘍に関与する転写因子である。LUBACユビキチンリガーゼによって選択的に生成される直鎖状ユビキチン鎖はNF- $\kappa$ B活性化に選択性が高く、抗がん剤の優れたターゲットである。そこで、研究者らが樹立したPetit-SHARPIN、Petit-LUBAC、抗直鎖状ユビキチン鎖抗体を用いたスクリーニング系で2種のLUBAC阻害剤を得た。しかしながら、細胞レベルではNF- $\kappa$ B活性化の抑制が認められなかった。また、先行研究で同定した化合物Yは細胞レベルで直鎖状ユビキチン鎖生成を抑制し、予備的検討では個体レベルでもLUBACの活性を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：NF- $\kappa$ B is a family of transcription factor, which is involved in the pathogenesis of several malignant tumors. The linear ubiquitin chains, which is selectively generated by the LUBAC ubiquitin ligase discovered by us, is known to be selectively involved in the activation of NF- $\kappa$ B. Thus, LUBAC-mediated linear ubiquitination is a suitable target of anti-cancer drugs. We have generated high-throughput ELISA screening system of LUBAC inhibitors using petit-SHARPIN, petit-LUBAC and anti-linear ubiquitin antibody all of that were generated by us and identified two compounds that inhibited LUBAC-mediated generation of linear chains. However, none of them can inhibit linear ubiquitination in cells. We have identified another LUBAC inhibitory compound in other study and evaluated the compound in this study. The compound Y did inhibit NF- $\kappa$ B activation and linear ubiquitination in cells. Moreover preliminary analyses revealed that The compound Y appeared to suppress LUBAC in mice.

研究分野：病態医化学

キーワード：ユビキチン NF- $\kappa$ B LUBAC 直鎖状ユビキチン鎖

## 1. 研究開始当初の背景

NF- $\kappa$ B は慢性関節リウマチ、B 細胞リンパ腫等の悪性腫瘍をなどの種々の疾患に關与する転写因子である。申請者は自らが発見した新規ユビキチン修飾である直鎖状ユビキチン鎖が NF- $\kappa$ B 活性化を惹起する新規情報伝達系であることを示してきた (Nature Cell Biol 2009, Nature 2011)。

直鎖状ユビキチン鎖は LUBAC ユビキチンリガーゼによって特異的に生成される、NF- $\kappa$ B 活性化に選択性が高い翻訳後修飾系なので、LUBAC ユビキチンリガーゼは NF- $\kappa$ B の制御薬の優れたターゲットであると考えられる。そこで本研究では、NF- $\kappa$ B の活性亢進、活性抑制が關与する疾患治療薬開発を目指し、申請者が新たに樹立した抗直鎖状ポリユビキチン鎖抗体などの研究試料、新知見を利用した新スクリーニング系などを用いて LUBAC の直鎖状ポリユビキチン鎖形成を阻害する薬剤の開発を進めた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らが発見した LUBAC ユビキチンリガーゼ、直鎖状ユビキチン鎖は免疫疾患、癌に關与する NF- $\kappa$ B 活性化のみならず、種々の刺激依存的な細胞死抑制にも關与する。LUBAC は活性中心サブユニットである、HOIP と 2 つのアクセサリサブユニット、HOIL-1L、SHARPIN から構成される(図 1)。

LUBAC の活性を亢進させる HOIP の多型性が ABC タイプと呼ばれるびまん性 B 細胞リンパ腫 (ABC DLBCL) 患者に 14 倍程度濃縮しており、LUBAC のサブユニットの発現を抑制することによって、ABC DLBCL 由来細胞の増殖が抑制される (Cancer Discov. 2014)。また、HOIP または SHARPIN の発現亢進によるアポトーシスの抑制がシスプラチン耐性を惹起することも示されている (Cancer Res 2014)。

それゆえ、LUBAC の発現、機能亢進はある種の癌の発癌や、抗癌剤への耐性に關与するので、LUBAC は単独で抗癌剤として、あるいはシスプラチン併用薬剤として投与可能な抗癌剤の優れたターゲットであると考えられる。

そこで本研究では研究代表者がすでに LUBAC 阻害剤として単離していた化合物 X の検討と、研究代表者が新たに樹立した抗直鎖状ユビキチン鎖特異的なモノクローナル抗体を用いた LUBAC 阻害剤の新規スクリーニング系を用いて、新たに LUBAC を阻害する化合物の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

### A. 新規 LUBAC 阻害剤のハイスループットスクリーニング系の樹立

ユビキチン修飾系は E1、E2、E3 の 3 種から構成される複合酵素系であり、ATP 依存的に 76 アミノ酸からなる小球状タンパク質であるユビキチンを標的タンパク質またはユビキチンに結合させる。ユビキチンをユビキチンに結合させることでユビキチン鎖を形成するが、LUBAC はユビキチンの N 末端のメチオニンの  $\alpha$ -アミノ基に別のユビキチンの C 末端のカルボキシル基を結合させることで直鎖状ユビキチン鎖を生成する E3 である。それゆえ、直鎖状ユビキチン鎖の試験管内生成には E1、E2(UbcH7)、ユビキチンと LUBAC が必要である。

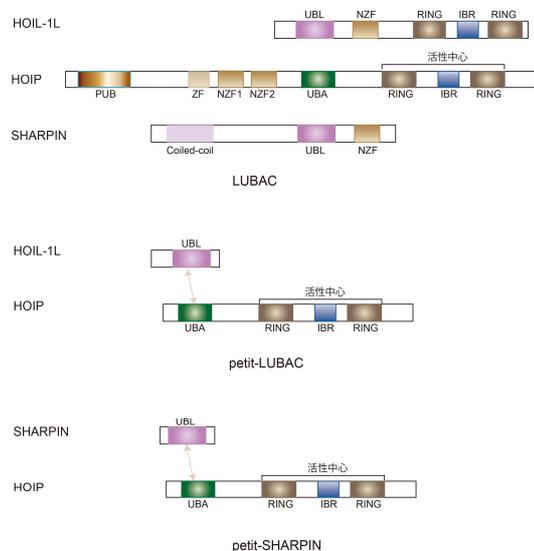


図 1 .LUBAC サブユニットとそのドメイン構造と petit-LUBAC、Petit-SHARPIN

図 1 に LUBAC のサブユニット構造を示す。LUBAC 複合体は約 600KD の高分子複合体であり、ハイスループットに必要な量を大量精製するのは困難である。そこで、直鎖状ユビキチン鎖生成能を有し、大腸菌発現系で大量精製が可能な petit-LUBAC、petit-SHARPIN (図 1、特許取得済)を LUBAC の代わりに E3 として用いて、生成した直鎖状ユビキチン鎖を研究代表者らが樹立した抗直鎖状ユビキチン鎖に対する抗体で検出する ELISA 系を用いて約 1 万種の化合物をスクリーニングした。

## B. LUBAC 特異的化合物の単離

本スクリーニング系では E1、E2(UbcH7)、E3(petit-LUBAC、petit-SHARPIN)とユビキチンを混合しているため、ヒット化合物には E1、E2 の阻害化合物が含まれる可能性がある。そこで、E1 と E2(UbcH7) は、共通であるが LUBAC とは異なる E3 を用いる試験管内ユビキチン化アッセイで LUBAC を特異的に阻害する化合物を選択する。

## C. 細胞レベルでの直鎖状ユビキチン鎖生成、NF- $\kappa$ B 活性化抑制能の検討

上記アッセイで選択された化合物に対し、  
a) TNF- $\alpha$ 等の刺激依存的な NF- $\kappa$ B 活性化抑制効果  
b) 刺激依存的な NEMO の直鎖状ポリユビキチン化の阻害活性

を検索誌、細胞レベルで LUBAC の直鎖状ユビキチン鎖生成活性を阻害する化合物を選択する。

## D. 個体レベルでの抗 LUBAC 作用の検討

研究代表者らは大阪大学在籍中に整形外科の吉川秀樹教授らと共同で LUBAC がマウスの骨肉腫細胞の肺転移に關与することを示してきた(Int. J. Oncol. 2012)。そこで、骨肉腫細胞の肺転移モデルを用いて、本研究で見出す LUBAC 阻害剤の個体レベルでの抗癌活性を検索する。

## 4. 研究成果

### A. 先行研究で同定していた LUBAC 阻害剤の検討

研究代表者らは日和見感染の原因となる真菌であるアスペルギルスの病原性因子である Gliotoxin が LUBAC を阻害することを見出していた。そこで、細胞レベルで Gliotoxin が LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成を抑制するかどうかを検討した。

その結果、Gliotoxin は細胞内で刺激依存的な NF- $\kappa$ B 活性化、直鎖状ユビキチン鎖生成を抑制することを見出したが、化学合成が困難なことから、関連化合物の合成を断念した。しかし、本成果は LUBAC 阻害が微生物の感染成立に關与すると考え、誌上発表した。

### B. LUBAC 阻害化合物の単離

研究方法の項の A で記載した新規スクリーニング法にてよって得られた数種の候補

の完全長の LUBAC に対する阻害活性を検討したところ、2 種で阻害が認められた。そこで、前項 C で示した細胞レベルでの検討を加えたところ、残念ながら、同定した 2 種の化合物ともに、細胞レベルでは直鎖状ユビキチン鎖生成、NF- $\kappa$ B 活性化を抑制しなかった。

### C. 先行研究で同定していた化合物の検討

本研究で新たに同定した 2 種の化合物ともに細胞レベルで LUBAC の活性を抑制しなかったのは、それらの化合物が細胞膜を透過しないためである可能性も想定される。細胞膜を透過する誘導体を作製すれば、それらの化合物の細胞レベルでの有効性を検討できる可能性もあるが、誘導体の作製には時間と高額な費用を要する。

本研究に先だった別の先行研究で別の化合物 Y を、LUBAC を阻害する化合物として同定していたので、化合物 Y の細胞レベルでの LUBAC 活性の抑制効果の有無を検討したところ、化合物 Y は細胞レベルで刺激依存的な NF- $\kappa$ B 活性化、直鎖状ユビキチン鎖生成を抑制することを見出した。

そこで、本研究で同定した化合物ではなく、化合物 Y の個体レベルでの検討に着手した。予備的検討の段階ではあるが、化合物 Y が骨肉腫細胞の肺転移を抑制する可能性を示唆する所見を得ている。

## 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 3 件)

1. Iwai, K., Fujita, H., and Sasaki, Y. Linear ubiquitin chains: NF- $\kappa$ B signalling, cell death, and beyond. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** 15(8):503-508, 2014.
2. Sakamoto, H., Egashira, S., Saito, N., Kirisako, T., Miller, S., Sasaki, Y., Matsumoto, T., Shimonishi, M., Komatsu, T., Terai, T., Ueno, T., Hanaoka, K., Kojima, H., Okabe, T., Wakatsuki, S., Iwai, K., (corresponding author) and Nagano, T. Gliotoxin suppresses NF- $\kappa$ B activation by selectively inhibiting linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). **ACS Chem. Biol.** 10:675-681, 2015.
3. Sasaki, K. and Iwai, K. Roles of

linear ubiquitinylation, a crucial regulator of NF- $\kappa$ B and cell death, in the immune system. **Immunol. Rev.** 266:175-189, 2015.

〔学会発表〕(計 3件)

1. Sakamoto, H., Egashira, S., Okabe, T., Nagano, T., and Iwai, K. Inhibition of LUBAC-mediated linear ubiquitination by a virulence factor of *Aspergillus*, gliotoxin. Cold Spring Harbor Laboratory meeting “The Ubiquitin Family”, April, 21-25, 2015, Cold Spring Harbor, NY, USA
2. Iwai, K. Linear ubiquitin chains: a new regulator of NF- $\kappa$ B activation and cell death signaling. 1<sup>st</sup> SPS International Symposium Xiamen University, June 13, 2015, Xiamen, China
3. Iwai, K. Linear ubiquitin chains: NF- $\kappa$ B activation, cell death, and cancer. International Symposium on Ubiquitin and Diseases. June 14-19, 2015, Dacheng Hotel, Zhangjiajie, China

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 1件)

名称：UBIQUITIN LIGASE HAVING LINEAR POLYUBIQUITINATIONACTIVITY AND USE THEREOF  
発明者：岩井 一宏  
権利者：岩井 一宏  
種類：イスラエル国特許  
番号：217972  
取得年月日：平成 27 年 12 月 25 日登録  
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mcp.med.kyoto-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩井 一宏 (IWAI Kazuhiro)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：6052459