

論文の内容の要旨

論文題目 プロテインノックダウン法の開発

氏名 伊藤 幸裕

【背景】

生命現象にとってタンパク質は非常に重要な役割を担っている。すなわち、タンパク質の発現制御や機能制御、プローブ化は生命現象の解明につながるだけでなく、時として疾患治療にも応用できる。これまでに、タンパク質の発現を制御する手法として遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックダウンが、タンパク質の機能を制御する分子として受容体アゴニストやアンタゴニスト、酵素阻害薬などが使われている。さらに最近では様々な標的タンパク質のラベル化法が開発されている。これらの手法はタンパク質の理解や疾患治療に対して多大に貢献している。しかしながら、タンパク質に関わる未知の現象や難治療疾患など、解決すべき問題が多く残されているのも現実であり、これらの手法だけではこと足りない。上述した手法に加えて、新たなタンパク質制御法があれば、タンパク質機能解明に更なる拍車がかかる。そこで、著者はタンパク質の寿命に着目し、特定のタンパク質の分解を促進する手法であるプロテインノックダウン法を開発を行うこととした。プロテインノックダウン法はタンパク質の機能解明に有用で、かつ、疾患関連タンパク質を標的とした場合には治療薬への応用も期待できる。ペプチドを利用した類例は存在するが、膜透過性や安定性に問題があり、応用研究はほとんどなされていない。そこで汎用性が高く、応用研究にも適応可能なプロテインノックダウン法を開発を行った。

【研究目的と研究目的達成のための戦略】

プロテインノックダウン法を開発するにあたり、inhibitor of apoptosis protein (IAP) に着目した。このタンパク質はユビキチンリガーゼ (E3) 活性を有し、生体内において、カスパーゼと結合してそのユビキチン化とプロテアソーム分解を誘導する (Fig. 1A)³。この過程を利用することで、プロテインノックダウン法を開発できると考えた。すなわち、IAP を認識する低分子化合物と、標的とするタンパク質の特異的リガンドをリンカーで結んだ化合物 (SNIPER; Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein-ERaser) を設計した。SNIPER は IAP と標的タンパク質の人工的な複合体を形成し、生体内のカスパーゼ分解機構を模倣するように、標的タンパク質のユビキチン化と分解を誘導する可能性がある (Fig. 1B)。以下、この作業仮説に基づき研究を遂行した。

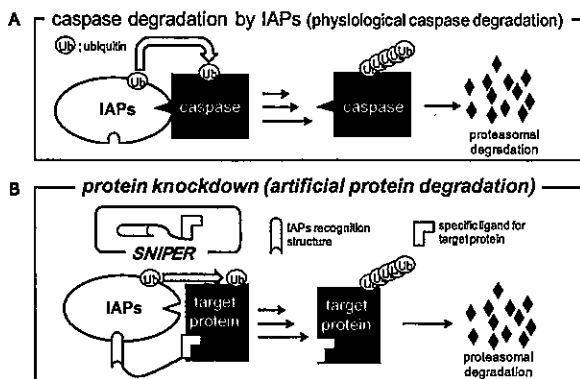


Figure 1. Physiological protein degradation and protein knockdown

【MeBS および MV-1 を利用した CRABP SNIPER の創製】

Bestatin methyl ester (MeBS, 2) は IAP ファミリータンパク質のひとつである cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) と結合し、その自己分解促進活性を有する。一方、MV-1 (5) は cIAP1 と同時に cellular inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) と結合し、それらの自己分解促進活性を有する。研究の第一段階として、膜透過性、安定性に優れたこれらの化合物を用いて SNIPER を設計し、プロテインノックダウン法の開発を目指した。そこで、標的タンパク質を cellular retinoic acid binding protein (CRABP) として作業仮説の実証実験を行うこととした。CRABP は細胞内レチノイド結合タンパク質の一つであり、ビタミン A の代謝活性化体である all-trans retinoic acid (ATRA, 7) などと結合し、その細胞内挙動に関わっている。CRABP には CRABP-I および CRABP-II の二つのタイプが存在する。CRABP-I は ATRA 耐性がん細胞や神経芽細胞腫において過剰発現していることが報告されて

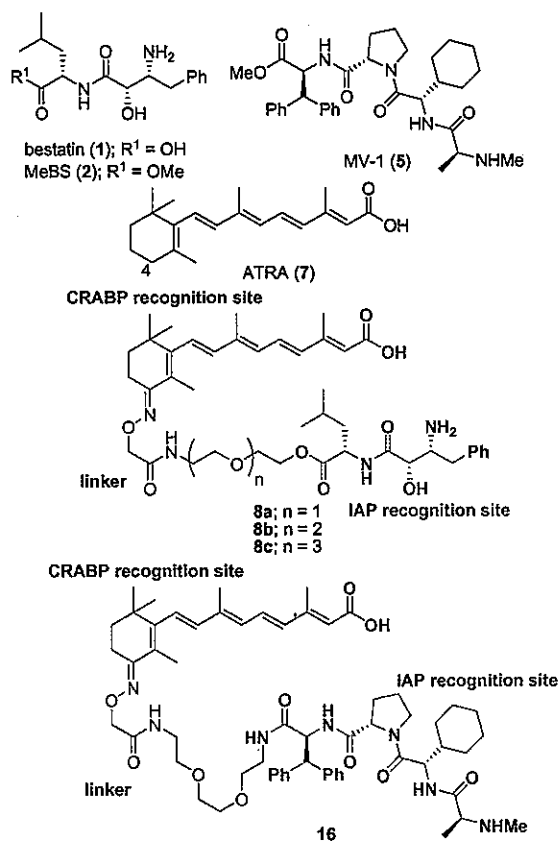


Figure 2. Structures of compound 2, 5, 7, 8 and 16.

いる。一方、CRABP-II は Wilms tumor および神経芽細胞腫の遊走に ATRA 非依存的に関与していることが報告されている。しかしながら、CRABP の機能の詳細は未だ不明な点が多い。CRABP 量を制御する低分子化合物はこれらの機能解明に有用であり、かつ神経芽腫などの治療薬としての応用も期待できる。そこで、私は上述したプロテインノックダウン法の戦略を基に CRABP SNIPER の創製を行った。ATRA (7) は retinoic acid receptor (RAR) のリガンドでもあるが、4 位への置換基導入は RAR の結合活性を消失させながらも CRABP のそれは維持できる。そこで、CRABP SNIPER として **8** および **16** を設計・合成した。次いで、FLAG-cIAP1 を恒常的に発現させた HT1080 細胞に **8** および **16** を作用させ、Western blotting 法により CRABP-II 量の変化を調べた。その結果、これらの化合物は濃度依存的に CRABP-II 量を減少させた (Fig. 3)。さらに、**8** による CRABP-II 量減少の詳細なメカニズム解析を行った。その結果、**8** は cIAP1 と CRABP-II の人工的な複合体を形成させることがわかった。また、**8** による CRABP-II の減少はプロテアソーム阻害薬を併用することで抑制され、**8** による CRABP-II の減少はプロテアソーム依存的な分解であることが示唆された。これらは上述した作業仮説を支持する結果であった。

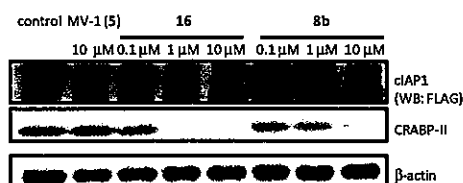


Figure 3. Western blotting detection of cIAP1 and CRABP-II levels in HT1080 cells expressing FLAG-tagged cIAP1 after 6 h treatment with compounds.

【標的タンパク質高選択的な SNIPER の創製】

上述した MeBS (**2**) を利用した SNIPER **8** や MV-1(**5**) を用いた SNIPER **16** は目的とする CRABP の分解を誘導することがわかった。しかしながら、同時に cIAP1 の自己分解も誘導する (Fig. 3)。そこで、IAP の自己分解を誘導しない SNIPER の創製を試みた。Bestatin 類縁体の cIAP1 自己分解促進活性における構造活性相関研究の再調査と更なる性質の検証を行ったところ、BE04 (**26**) が IAP に対して結合活性を有するが、IAP 自己分解促進活性、IAP 機能阻害活性および IAP ユビキチンリガーゼ活性阻害活性を持たないという性質があることを見出した。次いで、BE04 (**26**) を基に CRABP SNIPER として **39** (Fig. 4) を合成し、これまでと同様の方法で活性評価を行った結果、**39** は IAP を分解することなく、標的とする CRABP の分解を誘導した (Fig. 5)。また、**39** の活性メカニズム解析を行ったところ、**8b** と同様に作業仮説を支持する結果となった。さらに **39** を用いて CRABP-II の分解が神経芽細胞腫細胞の増殖を阻害することを見出した。

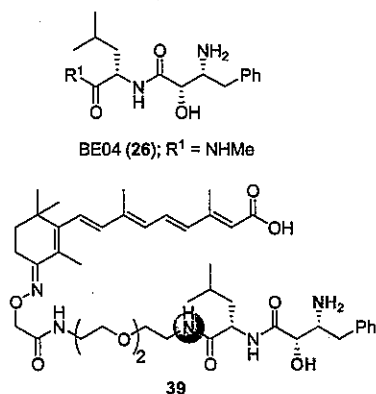


Figure 4. Structures of compounds **26** and **39**.
SNIPER which induces degradation of target protein but not cIAP1

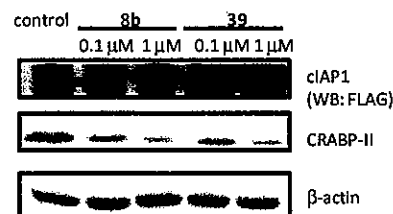
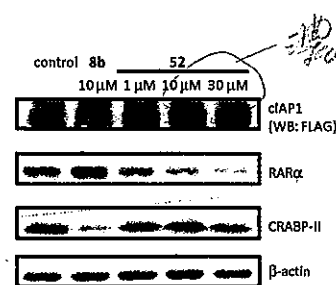
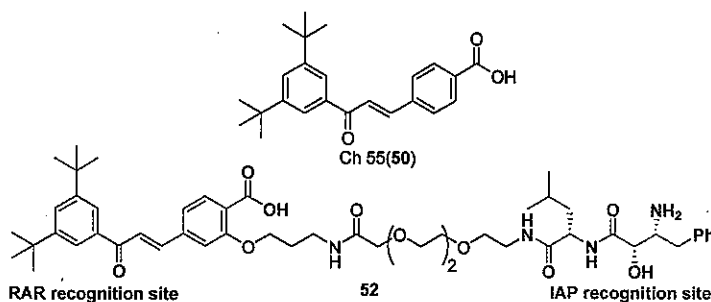


Figure 5. Western blotting detection of cIAP1 and CRABP-II levels in HT1080 cells expressing FLAG-tagged cIAP1 after 6 h treatment with compounds.

【RAR SNIPER の創製】

プロテインノックダウン法の一般性を検証するため、RAR を標的とした SNIPER を創製することとした。RAR はレチノイン酸をリガンドとする核内受容体の一種であり、特定の遺伝子発現を制御している。これまで

で RAR を標的とした創薬研究は盛んに行われてきており、多数の RAR アゴニストおよびアンタゴニストが報告されている。RAR アゴニストは、白血化した前骨髄球の分化を誘導する作用があり、急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬として臨床でも用いられている。一方、RAR アンタゴニストは RAR の機能解明に重要な役割を果たしてきた。RAR SNIPER は、RAR 消失による抗レチノイン酸活性 (RAR アンタゴニスト様活性) を有することが期待されるため、RAR の機能解明に役立つ可能性がある。そこで、BE04 (26) および Ch55 (50) の構造を基に RAR SNIPER 52 を設計した。Ch55 (50) は CRABP に対する結合活性がほとんどない RAR アゴニストであるため、52 は CRABP には作用せず、RAR に対して選択的な SNIPER になると考えられる。アゴニストを用いて SNIPER が創製できれば、アンタゴニストを見出すことなく、RAR 消失に伴う抗レチノイン酸活性 (アンタゴニスト様活性) を有する化合物を創製できる可能性がある。実際、化合物 52 を合成し、活性評価を行ったところ、52 は CRABP-II を分解することなく、RAR α 選択的な分解を誘導した (Fig. 7)。



【IAP 自身を標的とした SNIPER の開発】

最後に、SNIPER の設計に基づき、IAP 自身を標的とした分解誘導剤の開発研究を行った。その結果 BE04 (26) 二分子連結化合物 74 が cIAP1 の分解を促進することを見出した (Fig 9.)。

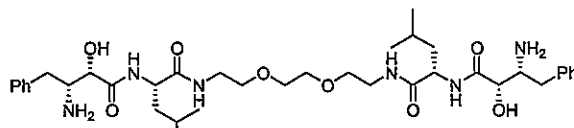


Figure 8. Structure of compound 74.

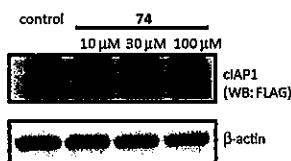


Figure 9. Western blotting detection of cIAP1 levels in HT1080 cells expressing FLAG-tagged cIAP1 after 48 h treatment with 74.

【まとめ】

以上のように SNIPER に基づくプロテインノックダウン法の開発研究を遂行した。膜透過性、安定性に優れた IAP 認識分子を用いることで、本法が細胞系での評価が可能であることを示した。本法は標的タンパク質認識部位を他の構造に変えることで様々なタンパク質を標的とできる可能性がある。また、新たなタンパク質量制御法として、ケミカルバイオロジー研究や創薬研究などの多方面への応用展開が期待できると考えられる。