

研究報告書

「代謝産物によるユビキチンリガーゼ制御工学の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 伊藤 拓水

1. 研究のねらい

近年、薬剤開発の進歩は目覚ましくキナーゼ阻害剤など分子標的薬が次々と生み出されている。核酸医薬の開発も努力されている。しかしながら、神経変性疾患など異常タンパク質が蓄積することにより引き起こされる疾患については、mRNA レベルの抑制よりもタンパク質レベルで分解を誘導することができればより効果的と考えられるが、「壊したいタンパク質を、自在に分解する薬剤」の開発は未だ進んでいないのが現状である。そんな中、本研究者が以前にサリドマイド結合因子として単離・同定したタンパク質であるセレブロン(CRBN)は、サリドマイドや代謝物などの結合リガンドに応じて基質が切り替わるユビキチンリガーゼとして機能することがわかってきた。セレブロンの C 末領域にはリガンド結合ポケットがあり、ウリジンおよび関連代謝産物が結合することも分かった。しかしながら、この結合およびその後の基質認識など下流が明らかにされているリガンドは人工のものがほとんどであり、セレブロンが本来どのような構造のリガンドの結合親和性が高く、それらを介していかなる生体内反応の変化・調節を担うのかについては未だ殆どが謎に包まれている。セレブロンはリガンドと結合することで新しい基質認識能を獲得できることから、その機能および生体内リガンド(代謝産物)の単離・解析研究は、疾患原因タンパク質を自在に分解する革新的医療法への応用につながる。本研究では、主にリガンド応答性ユビキチンリガーゼであるセレブロンの有する代謝物・関連化合物結合活性に焦点を当てる。本因子の代謝経路における生化学的役割および、セレブロンに結合するリガンド(代謝産物・関連化合物)の結合法則や基質切り替わりのルールを明らかにすることにより、最終的には代謝産物など化合物によるユビキチンリガーゼ制御工学の基盤確立を目指す。また本研究では既存のセレブロン結合薬剤(サリドマイドなど)の効果に対する代謝産物の影響も検証する。ユビキチンリガーゼ制御工学の確立は、タンパク質分解系を能動的に代謝産物・関連化合物でコントロールすることに基づき、様々な疾患に対する医療基盤導出に貢献することが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

サリドマイド標的因子であるセレブロンに結合する天然物・関連化合物リガンドの探索を行い、新たな結合化合物を発見した。また既知の結合化合物であるグルタルイミドについてフタルイミドやイソインドリノンなどの基質認識モイエティについてのリンカーの分析を行った。グルタルイミドの C3 カーボンがセレブロンとの結合に影響はないが、シクロヘキシミドなど C4 カーボンの場合、立体障害を起こすことが構造解析などの結果により判明した。またグルタルイミド含有化合物が結合したセレブロンが基質をどのように認識するのかの構造解析を行い、セレブロン結合化合物は接着剤として機能することで、基質とセレブロンの結合を仲介することを明らかにした。その際には、基質認識モイエティにおいてベンゼン環が必要であることが判明した。サリドマイドなどセレブロン結合リガンドの中には光学異性体を有する場合もあるが、こちらについて構造解析を行い、左手側(S体)がセレブロンとエネルギー的に安定に結合する一方で、右手側(R体)においては立体障害を防ぐために構造的に不安定な形でS体の 6-10 分の1程度の強さでセレブロンに結合することを明らかにした。また基質認識能についても生化学的に解析を行ったが、どの活性についてもS体の方が強く、R体の活性は弱いことが判明した。また天然物・関連化合物・薬剤など多数のセレブロン結合リガンド存在下における、セレブロン結合因子の網羅的探索を行い、新しい属

性を有する因子、また新基質群を発見した。さらに化合物によって解離する因子も明らかにすることができた。これらのセレブロン結合因子の解析から新たな薬剤開発および用途を見出すことも成功した。研究全体を通して、セレブロンユビキチンリガーゼの制御の理解は大幅に進み、現在開発が行われているセレブロン制御系薬剤(セレブロンモジュレーター・CRBN-based PROTACs)といった次世代タンパク質分解創薬において大きな貢献を果たせたと言える。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ウリジン類が誘導する基質群を Chemical Proteomics で単離・同定する」
 関連テーマ「化合物が結合したセレブロンによる基質認識の構造基盤の解明」

様々なウリジン誘導体とセレブロンの結合を試験し、UDP-Glucose や UDP-GlcNac が結合することを明らかにした。ただし、様々な細胞組織からセレブロンに結合する基質群の探索を行ったが、基質は発見されないという想定外の問題が生じた。代わりに、既にセレブロンに結合しているタンパク質 CY-1, CY-2 が発見され、こちらがウリジンなどの天然物やサリドマイドなど既知の化合物群によって解離することが判明した。ウリジン類がセレブロンに結合しながら基質をリクルートできない理由は当初は不明であったが、関連テーマとして米国セルジーン社との共同研究で進めていた AML (Acute Myeloid Leukemia, 急性骨髄性白血病) に効果のある新規セレブロン結合化合物(CC-885)とセレブロン、そして独自に明らかにした CC-885 が誘導する基質 GSPT1 (G1 to S phase transition 1) の構造解析を行ったところ、サリドマイドや CC-885 といったセレブロン化合物で基質をセレブロンにリクルートできる化合物は、グルタルイミド(セレブロン認識モイエティ)に加えて、ベンゼン環を持つ基質認識モイエティ(フタルイミドなど)を有していることが判明した。基質は特殊な surface-turn structure を形成しており、特定の Glycine を有することが判明した。Glycine をアラニンなど他のどのアミノ酸と置換してもセレブロンとの結合が失われることも明らかとなった。セレブロンは基質認識において化合物のベンゼン環を用いて達成するために、UDP-Glucose などのウリジン類は既存の結合因子の解離は促せても、基質をリクルートできるような活性が無いことが判明した。CC-885 の成果は Nature 誌の Article に本研究者を共同筆頭著者とする形で掲載され、本研究者が所属する東京医科大学よりプレスリリースも行った。また日経産業新聞にその成果が紹介された。また分子生物会で報告したがポスター賞をもらい、また東京医科大学における最優秀研究に送られる佐々記念賞も受賞した。ウリジン類についても成果について現在論文投稿準備を行っている。

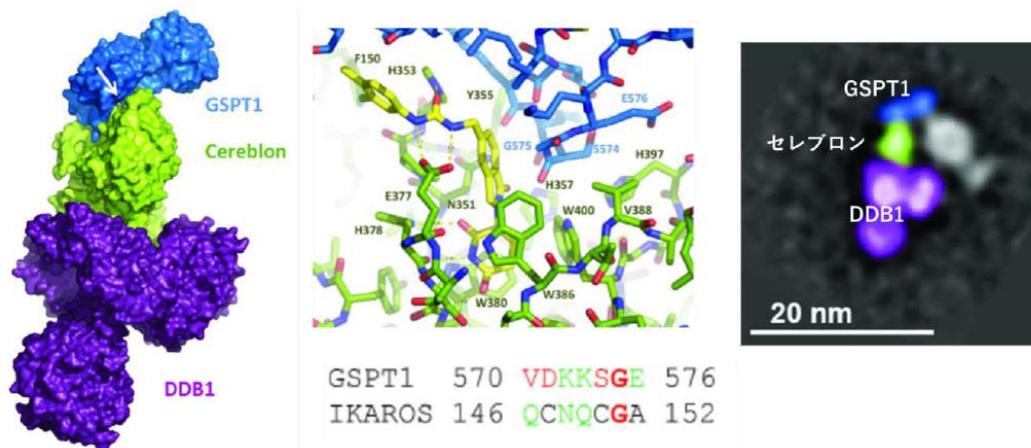


図1 セレブロン(Cereblon)と CC-885, GSPT1 との結合の構造基盤。

(左) X線結晶構造解析から明らかになった cereblon-CC-885-GSPT1 の構造。(中央)GSPT1 のような化合物で誘導される基質は surface-turn 構造をもっており、特定のグリシンを持つ。CC-885 におけるベンゼン環はセレブロンと GSPT1 の間で接着剤の役割を果たす。(右)ネガティブ染色電子顕微鏡によるセレブロン GSPT1 の結合の像。Nature 535:252-7 (2016)。

研究テーマ B 「セレブロン結合する新規代謝物の探索および標的基質の解析」

関連テーマ「サリドマイド光学異性体とセレブロン結合の構造基盤」

まず既知の知られているセレブロン結合の天然リガンド候補から解析を行った。シクロヘキシミドのようなグルタリミド包含天然化合物は、一見セレブロン結合可能に見えたが、全く結合が見られなかった。その理由は、並行して行っていた関連テーマである、奈良先端科学技術大学院大学の箱嶋敏雄教授と共同でおこなったサリドマイド光学異性体とセレブロン結合の X 線結晶解析から判明した。シクロヘキシミドはグルタリミドの C4 カーボンに結合しているが、その場合立体障害が生じることが判明した。サリドマイドやアミノグルテチイミドのような C3 カーボンに結合する化合物のみセレブロンとの結合が許容されることが判明した。また本研究からスクシンイミドが新たな結合化合物として得られた。加えてサリドマイドの二つの光学異性体のうち S 体の方がセレブロンに強く結合することや基質リクルート能が強い事などを解明した。ただし R 体にもセレブロン結合能は 6-10 分の一と弱いながら残っており催奇性も存在しており、光学分割しても有用な作用と副作用を分けることはできないという結論が得られた。それに加えて、化合物存在下でセレブロンに結合するタンパク質群を網羅的に解析した。そして新しい性質をもった因子群を得た。グルタリミドのリンカーおよびサリドマイド光学異性体に関わる本研究成果は Scientific Reports に掲載された(本研究者は共同筆頭著者)。

研究テーマ C 「代謝産物により誘導されるセレブロンの制御機構の一連の流れの解明」

研究テーマ A からセレブロン結合代謝物処理した際には CY-1, CY-2 が解離し、基質がリクルートされるわけではないことが判明し、CY-1, CY-2 が解離した場合の基質分解への影響を当初の予定のように解析することは叶わなかった。そこで研究テーマ B で明らかにした因子のいくつかを解析した。その結果新たに発見した NS-1 はサリドマイドなどのベンゼン環を持つ化合物によって結合が誘導されるが、分解されないことが判明した。また DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫) や血管新生阻害に効果のあるピリミジノ骨格を有する新化合物存在下では新たなセレブロン結合基質である ZNFX1, ZPOZ1 タンパク質が見つかったが、こちらの基質認識について新たなルールを見つけることができた。また血液がんにおいてこれらの因子は別のタンパク質と融合している場合もあるが、新化合物はこれらについてセレブロンを介して分解することを明らかにし、新たな治療薬としての用途を見出すことができた。成果については現在投稿準備中である。

研究テーマ D 「セレブロン結合代謝物および既知のリガンド(サリドマイドおよび誘導体)の間にある metabolite-drug relationship の検証」

関連テーマ「サリドマイド催奇形性に関係する新たな基質の発見」

ウリジンなど天然のセレブロン結合代謝物のセレブロンへの影響はかなり少ないことが判明した。一方で、肝臓などで代謝されるサリドマイド代謝物においてはサリドマイド原体より強いものも発見された。昔からの問題でサリドマイドは原体が起こすのか、または代謝物が起こすのかについて議論が生じていたが、並行して行っていたサリドマイド催奇性を担う新たな基質候補である LD1 においてはいずれも分解したので、催奇形性は原体・代謝物両方が引き起こすことが結論づけられた。LD1 については現在すでに論文を投稿中である。

研究テーマ E 「セレブロン結合化合物の一般則およびユビキチンリガーゼ制御の見出し」

本テーマは研究 A から D までの成果を全部総合して、制御モデルの構築を図り、またそれを応用することを目的としていた。こちらの成果を応用した、セレブロンベースの PROATCs (Proteolysis Targeting Chimeras) の合成を名古屋工業大学の柴田哲男教授と行い、壊したいタンパク質(POI)の分解を達成しつつ、オフターゲット因子である LD1 は既存の SALL4 などの分解を排除するような調整を行った。本成果は本さきがけ以後のプロジェクトに引き継がれ、知財や論文としての成果をまとめることを予定している。

(追加テーマ) NQO1によるTLRを介したIKBと分解によるサイトカイン産生制御

こちらの研究は国際医療センター木村彰宏博士との共同研究で、低分子化合物標的因子単離ツールである磁性アフィニティ微粒子を用いた天然化合物のターゲット探索を補助し、自然免疫における新たな機構を明らかにすることに貢献した。成果は *J Exp Med* (2018)に掲載された。

3. 今後の展開

本研究によりセレブロン、化合物、基質の相互作用の構造基盤が分かり、また薬剤開発において有用な情報をいくつも得られたことから、これらの知見に基づいて新たなセレブロン結合低分子薬剤の開発および、セレブロンをベースとした PROTACs (Proteolysis Targeting Chimera, タンパク質分解誘導キメラタンパク質)の開発も行う。また成果の部分で述べたように、新たな ZNFX1 および ZPOZ1 が融合遺伝子をつくり血液がんの癌化を促すが、これらの増悪を促す融合タンパク質の分解を新化合物で達成することが可能となっている。こちらについては臨床研究なども視野に入れて継続していきたい。また LD1 と既知の催奇性候補基質である SALL4 を除外するような化合物の構造を見出していきたいと考えている。先に述べた ZNFX1 を分解する新化合物はこれら催奇性基質の分解活性が弱いことからその化合物構造の解析を探求していきたい。

4. 自己評価

本さがけ研究によって本研究者は、化合物が結合したセレブロンが基質をどのように認識するのかについて構造基盤を解明し、その成果を共同筆頭著者として *Nature* の Article に掲載させた。この成果は日経産業新聞で取り上げられ、さらにはその成果が元で日経新聞の記者より取材を受け「次世代の先導者」としてこちらの日経産業新聞で取り上げられた。またセレブロン結合化合物であるグルタルイミドのリンカー部分の解析などを通して、サリドマイド光学異性体の長年の謎も明らかにして論文として *Scientific Reports* 誌に共同筆頭著者として報告した。現在、Google Scholar Citations によると本申請者の論文引用数は 2,000 を超えるに至った。一つ想定外だったのが当初の予定では代謝産物が基質をリクルートしてくるものと考えていたが、実際には既存の結合因子の解離に留まるという結果が得られたことである。とはいえ研究全体を通して、セレブロンユビキチンリガーゼ制御の理解は大幅に進み、POI(分解したいタンパク質)を壊す薬剤開発への大きな貢献が果たせた点は一定の評価を得られるものと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Matyskiela ME, Lu G, Ito T (co-1st author), Pagarigan B, Lu CC, Miller K, Fang W, Wang NY, Nguyen D, Houston J, Carmel G, Tran T, Riley M, Nosaka L, Lander GC, Gaidarova S, Xu S, Ruchelman AL, Handa H, Carmichael J, Daniel TO, Cathers BE, Lopez-Girona A and Chamberlain PP A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. *Nature* 535:252-257 (2016)

2. Mori T, Ito T (co-1st author), Liu S, Ando H, Sakamoto S, Yamaguchi Y, Tokunaga E, Shibata N, Handa H and Hakoshima T Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Sci Rep* 8:1294 (2018).

3. Kimura A, Kitajima M, Nishida K, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Fujii-Kuriyama Y, Sakamoto S, Ito T, Handa H, Tanaka T, Yoshimura A and Suzuki H NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting IkappaB-zeta degradation. *J Exp Med* 215:2197-2209 (2018).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 主要な学会発表

日本薬学会(招待講演)(2018.3)

2. 受賞

佐々記念賞(東京医科大学)(2017.6)

「A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4CRBN ubiquitin ligase」

ポスター賞(日本分子生物学会大会 2016.12)

「急性骨髄性白血病に効果を示す新規のセレブロンモジュレーター」

3. 著作物

伊藤拓水、半田宏「サリドマイドの標的ユビキチンリガーゼ“セレブロン”とその機能」医学のあゆみ Vol.256, No.8 医歯薬出版株式会社(2016) 891-895

伊藤拓水、山本淳一、半田宏「免疫調節薬[IMiDs (immunomodulatory drugs)]による抗骨髄腫効果の機序」日本臨牀, Vol 74, 増刊号 5 日本臨牀社(2016) p.152

伊藤拓水、半田宏「抗がん作用を持つ新たなセレブロンモジュレーターの開発」ファルマシア、Vol. 53, No. 4 公益社団法人日本薬学会(2017) p. 328-332

4. プレスリリース

「急性骨髄性白血病に効果の期待できる新しいタイプの薬の開発 およびその作用機構の解明」東京医科大学 HP より

<http://www.tokyo-med.ac.jp/160624nanoPress2.pdf>