

病原性タンパク質の特異的分解に基づく創薬科学研究

国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
内藤 幹彦

1. はじめに

近年、特異的キナーゼ阻害剤など病態と関連する分子の機能を阻害する分子標的治療薬の開発が盛んに行われている。病態関連タンパク質の発現を低下させる事ができれば、タンパク質の活性を阻害する分子標的治療薬と同様な治療効果を期待できる。実際、RNA干渉法を利用してOncogenic kinaseの生合成を止めてタンパク質量を特異的に低下させると、細胞レベルでは特異的キナーゼ阻害剤と同様な細胞増殖阻害が認められる。しかしながら、RNA干渉法を利用した薬剤開発は標的組織へのデリバリー等in vivoで応用するためには克服しなければならない技術的課題がまだ多く残されている。一方、既に発現しているタンパク質を特異的に分解してその量を低下させる薬剤は開発されていない。

我々はこれまでの研究で、メチルベスタチン (MeBS) がcIAP1に結合して自己ユビキチン化を活性化し、プロテアソームによるcIAP1の分解を引き起こす事を見出した。またMeBSの構造活性相関解析から、メチル基を他の残基に置換してもその活性は保持される事等を明らかにした。これらの知見を基に、All-trans retinoic acid (ATRA) とMeBSを結合した化合物 (SNIPER-2 : Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser-2) をデザインし、化学合成したSNIPER-2がATRA結合タンパク質であるCRABP-IIをユビキチン化して分解する事を見出した。しかしSNIPER-2はcIAP1自己ユビキチン化を活性化するので、CRABP-IIと共にcIAP1の量も減少させてしまう。本研究では、SNIPERの構造を一部改変してcIAP1自己ユビキチン化活性を低下させた化合物 (SNIPER-4) を開発した。またEstrogen受容体を特異的に分解する新しいSNIPER (ER) を開発した。

2. 方法

BSとATRAをエステル結合でリンクさせたSNIPER-2を基に、エステル結合をアミド結合に変えたSNIPER-4を合成した。またtamoxifenとBSをリンクしたSNIPER (ER) を合成した。これら化合物による標的タンパク質のユビキチン化と分解をWestern Blot 等の方法で検討した。

3. 結果 研究成果

エステル体のSNIPER-2はcIAP1とCRABP-IIを減少させたが、アミド体のSNIPER-4はcIAP1の量を減少させることなくCRABP-IIを減少させた。これらタンパク質の減少はプロテアソーム阻害剤 (MG132) 及びsiRNAによるcIAP1ノックダウンで阻害された。また、SNIPER処理によりCRABP-IIのユビキチン化が亢進した。これらの結果から、エステル体のSNIPER-2はcIAP1とCRABP-IIをユビキチン化して両タンパク質のプロテアソームによる分解を誘導するのに対し、アミド体のSNIPER-4は標的タンパク質であるCRABP-IIを特異的にユビキチン化し、プロテアソームで分解

する活性を示す事が明らかになった。(図を参照)

乳癌の治療標的として知られるEstrogen受容体を分解するSNIPER(ER)として、Tamoxifenをリガンドとして利用したSNIPER(ER)をデザインし、化合物を合成してその活性を調べた。ヒト乳がん細胞MCF7では、Estrogen処理によりEstrogen Receptor α (ER α) は核内に移行して転写活性化を引き起こした後にプロテアソームで分解される。TamoxifenはEstrogen受容体アンタゴニストとして作用するため、ER α による転写活性化とER α の分解を阻害した。一方、SNIPER (ER) はEstrogen依存性の転写活性化を引き起こさずにER α を減少させることがわかった。またSNIPER (ER) 処理により細胞質kinaseカスケードのリン酸化が阻害され、MCF7細胞は短時間でアポトーシスを起こす事が明らかになった。これらの結果からSNIPER(ER)はER α 陽性乳癌の治療に有効な薬剤となる可能性が示唆された。

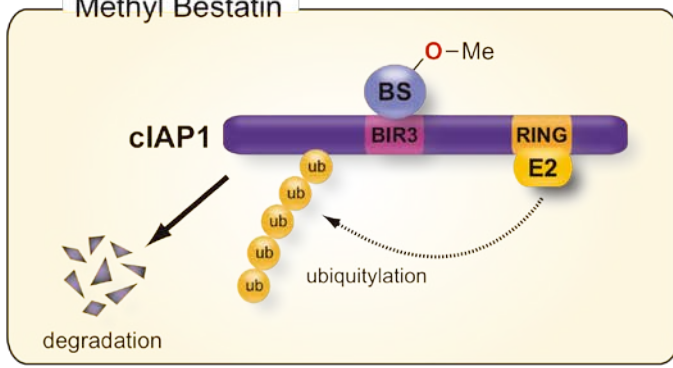
4. 考察 まとめ

IAP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作用機序として、SNIPERが標的タンパク質特異的なプロテインノックダウンを引き起こすことを示した。このシステムでは、リガンドを置換することにより様々なタンパク質を標的として分解するSNIPERを開発することができる。今後、病気の原因となっているタンパク質を分解する様々なSNIPERを開発し、プロテインノックダウンを基盤とする新しい分子標的治療薬の開発を目指したい。

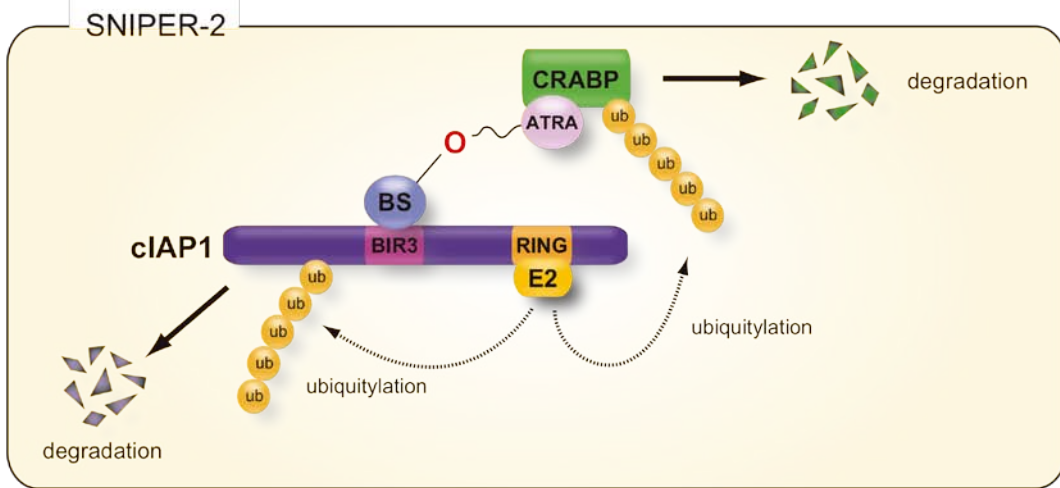
5. 発表論文、参考文献

1. Sekine K, Takubo K, Kikuchi R, Nishimoto M, Kitagawa M, Abe F, Nishikawa K, Tsuruo T, Naito M. Small Molecules Destabilize cIAP1 by Activating Auto-ubiquitylation. **J Biol Chem** (2008) 283: 8961-8.
2. Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, Hashimoto Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. **J Am Chem Soc** (2010) 132: 5820-6.
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** (2011) 585: 1147-52.
4. Yosuke D, 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.** In press

Methyl Bestatin



SNIPER-2



SNIPER-4

