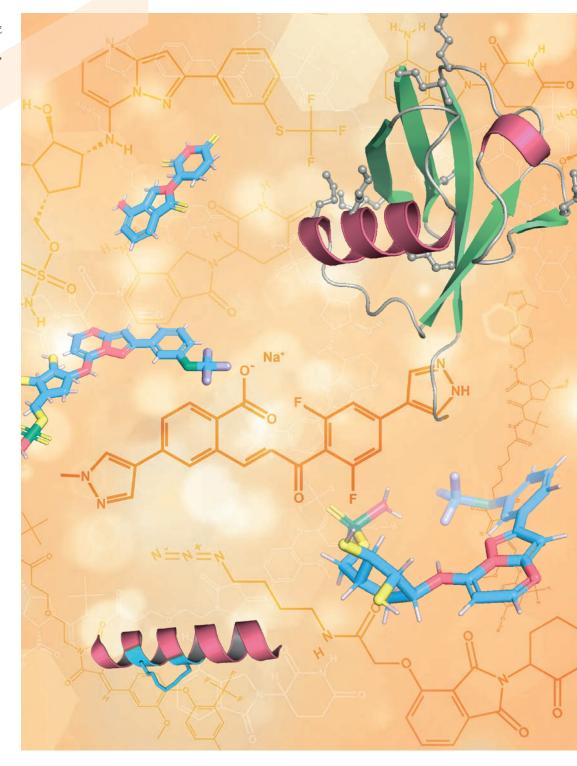
Ubiquitin new frontier driven by Chemo-technologies Newsletter

2018-2022年度 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 ケモテクノロジーが拓く ユビキチンニューフロンティア



3June 2021

Ubiquitin new frontier driven by Chemo-technologies Newsletter

2018-2022年度 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 ケモテクノロジーが拓く ユビキチンニューフロンティア

June 2021

02 領域代表挨拶

佐伯 泰

03 Essay

研究者って、幸せだよね。 内藤 幹彦

- 07 班員紹介
- 31 研究班員一覧

研究成果

- 32 ユビキチン結合タンパク質OPTNはATG9Aベシクルを損傷ミトコンドリア上に集積させる 山野 晃史
- 33 免疫応答と細胞死を制御するLUBACの制御機構の解明とその応用 伏屋 康寛
- **TRIP12はK29/K48分岐鎖を形成してPROTACによる標的タンパク質分解を促進する** 大竹 中明
- **37 ケミカルバイオロジーによる新たなミトコンドリア病創薬標的候補の発見** 小林 大貴、吉田 稔
- 39 コドンの最適度を監視する分子機構を支えるリボソームユビキチン化 稲田 利文

研究室紹介

- **43** 東北大学 大学院理学研究科化学専攻 有機化学第一研究室 高岡 洋輔
- 44 **愛媛大学・プロテオサイエンスセンター 無細胞生命科学部門** 高橋 宏隆
- 45 **大阪市立大学 大学院医学研究科 分子病態学** 及川 大輔
- 46 活動報告
- 48 関連ミーティング・シンポジウム情報
- 49 編集後記

代表挨拶

みなさまお元気のことと思います。早いもので新学術領域研究ケモユビキチンも4年目に入り後半戦に突入しました。まずご報告となりますが、昨年11月にございました中間評価にて本領域はA+という嬉しい評価を頂きました。これは110件以上もの領域内共同研究により世界的な競争に耐えうる研究組織の構築に成功したという点と、新たな疾患治療法開発のためのユビキチンの基礎研究に注力した点が高く評価されたためと考えられます。これもひとえに班員の先生方に、本領域のキーコンセプトである「ケミカルバイオロジーを導入したユビキチン研究グループの創成」にご賛同頂けたからでございまして、改めてではございますが深く感謝申し上げます。

さて最近、ユビキチンに関する論文数が急激に増加しております。実はユビキチン関連の論文数は2013年から毎年5000報程度とほぼ横這いの状態が続いており、一流誌での掲載数は体感として変わらないながらも、ユビキチン研究の将来性を少々危惧しておりました。しかし、この心配は全くの杞憂でして、2019年から再び増加に転じ、2020年は6349報と大きく増加しました(Pubmedサーチ)。これはユビキチン研究が新たな拡大のフェーズに入ったことを明確に示しております。申し上げるまでもなく、この拡大はPROTACに代表される標的タンパク質分解誘導剤の爆発的な進展とケミカルツール開発が牽引していることは明らかで、さらに質量分析やCRISPRスクリーニングによる大規模解析やクライオ電子顕微鏡による複合体解析などの先端研究が組み合わさることで、5年前や10年前には想像もできなかったスペクタクルなユビキチン研究を目にする機会が増えております。

本研究領域においても、実用化を見据えた新型PROTACやサリドマイド誘導体の副反応の分子機構解明などインパクトのある実践的な研究だけではなく、人工抗体や化学合成ユビキチン鎖など今後のユビキチン研究を開拓するようなケミカルツール開発も順調に進んでおります。また、本ニュースレターの研究成果の稿にもございますように、PROTACを基礎研究のツールとして上手く用いることで、新たなユビキチンコードの生成や解読機構を解明する研究も進展しており、これは本領域の開始時に思い描いた異分野融合による次世代型ユビキチン研究に一歩ずつ近づいていると考えております。

この4月から新しい公募研究が24件開始し、10名の先生が新たに本領域に加わりました。コロナ禍はまだ続きそうではございますが、本領域はこの新しい研究体制で今後、ケミカルツール開発の拡大と基礎研究へのさらなる実装を目指します。これは昨年惜しくも亡くなられましたHuib Ovaa博士が提唱したユビキチン・ケミカルツールのツールボックス化と同義となりますが、現在、転写制御などの他分野においても、即効性と選択性の高いケミカルツールを用いて複雑かつ動的な分子機構の因果関係を解き明かそうという動きがございます (Mol Cell 81, 1617-1680, 2021)。ユビキチン化は広範な細胞機能を制御することから、本領域の研究活動の重要性は今後さらに増してくるものと思われます。そこで、研究項目A01の先生方には是非多様なバイオロジー研究にケモテクノロジーを活用していただきケモユビキチン研究を世界に発信していただきたいと考えておりますし、また、さらなるアイディアの創出を期待しております。研究項目A02の先生方には、ユビキチン

のケミカルツール開発はまだまだブルーオーシャンであること、生命科学研究全般に 貢献できることをご理解いただき、是非、他の班員を巻き込んで、これぞ新学術!とい うような研究を展開していただきたいと思います。総括班評価者の先生方、学術調査 官の先生方、関係者の皆様、本年度もどうぞよろしくお願い申し上げます。



東京都医学総合研究所 佐伯 泰

研究者って、幸せだよね。

特任教授 内藤 幹彦(東京大学大学院薬学系研究科)



新型コロナウィルス感染症が日本でも流行りはじめた 2020年3月末、60歳になった私は国立医薬品食品衛生研究所の遺伝子医薬部長を役職定年で退いた。その後は公務員の再雇用制度を利用して短時間勤務となり、Sabbatical Leaveのような期間を半年ほど過ごした。大学院を卒業してから34年、長いようだがそれほどたいした研究業績があるわけでもない。それでも振り返ると、紆余曲折はあったがほとんどの期間で楽しく研究を行ってきた事に気付く。私の研究生活はこれで終わりではないが、これまでの私のささやかな経験が未来を担う若い人にとって参考になればと思い、このエッセイを書くことにした。

大学院からポスドク

私は東大薬学部を卒業後、そのまま大学院に進学して学位を取得した。大学院時代は研究よりも私生活やスポーツ大会のほうが大事で、決して将来有望な学生ではなかった。 大学院に進学した理由は、単純に研究者になって外国で研究したいと思ったからだが、深く考えていたわけでもなく無邪気なものであった。

学位取得後、大塚にあったがん研究会がん研究所化学 療法部でポスドクになったが、給料は悲惨なものであった。 先輩の研究員達から、論文を出せば研究員になれるよと言 われていたこともあり、研究に対するモチベーションは非常 に高かった。鶴尾隆部長の下で抗がん剤耐性の研究に取り 組んだのだが、当時は抗がん剤に対する多剤耐性にP糖タ ンパク質 (MDR1、ABCB1) と名付けられたタンパク質が 関与するといわれ始めた頃である。 研究を始めて 1ヶ月くら いで、細胞膜小胞を利用してP糖タンパク質による薬物輸 送を測定する新しいアッセイ系を構築した。この系を利用し て、構造も作用機序も異なるいろいろな薬物がP糖タンパ ク質によって輸送される事を明らかにし、8月にはもう論文 を書いていた。これでそのうち研究員になれると思うと嬉し かったが、それよりも研究の本当の楽しさに目覚めたことの 方が大きかった。自分であれこれ考えて、そのアイデアを実 験的に検証する。単純なことの繰り返しだが、ワクワクする

ような感覚と達成感を味わって、病みつきになった。ポスドクとして過ごした2年間は経済的には酷いものであったが、雑事に煩わされず自分の研究の事だけを考えていれば良いという意味で、研究者としてはとても幸せな時期であったと思う。

応用微生物研究所 (応微研)

大塚のがん研で2年間を過ごした後、東京大学応用微生 物研究所教授になった鶴尾部長と共に1989年に応微研に 移った。がん研の鶴尾研には何人もスタッフがいたが、応微 研に移ったのは私一人で、新しい研究室の立ち上げには随 分と苦労した。しかし毎年研究室に入ってくるフレッシュな 学生さん達と一緒に、抗がん剤耐性、抗がん剤による細胞 死アポトーシス等の研究に取り組み、主にCancer Res、 Oncogene、JBC等をターゲットジャーナルとして論文発 表していた。がんに興味があったので抗がん剤の研究は自 分にとって面白く、それなりに充実した研究生活であったと 思う。ただ自分で手を動かして実験する事は大幅に減って しまった。研究室の人数が増えてもスタッフは私一人の状況 が続いていたこともあり、なかなか留学することもできな かった。37歳の時にようやく留学の機会を得て、細胞死の 研究で有名になりつつあったSan Diegoの Burnham 医 学研究所 John Reed 博士の研究室に留学した。

Burnham 医学研究所

留学してまずJohnのハードワーキングとタフネスに驚かされた。Johnは毎日午前3時頃に研究室に来て午後6時頃に帰る。それだけでも驚きだが、彼は朝食前にジムでトレーニングする以外はほとんど休憩せずに頭を働かせ続ける。トイレで用を足している時も論文を読んでいるという話も聞いた。当時研究室にはポスドクが約30人いたが、Johnは全員の研究をほぼ完全に把握していた。その上、半数くらいの(従順な)ポスドクには毎朝メールで実験の指示を出して、細かいところまで研究指導していた。当時John

の研究室からは次から次へとトップジャーナルを含め有力 なジャーナルに論文が出ていたが、彼のバイタリティーと綿 密な研究指導がそれを支えていたことは間違いなかった。

John は研究室のポスドクから尊敬されていたが、John のようになりたいと言う人は一人もいなかった。John のようにハードに仕事をしていては、研究と人生を楽しむことができないと欧米出身のポスドク達がはっきり言っていたが、その通りだと思う。ただ、John はいつも生き生きとしていたので、彼にとってはこの生活が幸せだったのだろう。

自分がそれまで日本で所属してきた研究室では、大まかな研究指導はするが細かいことは各自が考えるのが基本であった。常に頭を働かせ強いリーダーシップで研究室を引っ張っていく John のスタイルは私にとって衝撃的であり、Principal Investigator のロールモデルとなった。

分子細胞生物学研究所 (分生研)

一年あまりの留学を終えて分生研(応微研から改称)に 戻った頃、大学での業績評価が始まった。その時の私の研究業績に対する評価コメントに「インパクトのある研究業績が乏しい」とあったのを記憶している。インパクトファクターの高いトップジャーナルに論文発表しないと研究業績としてほとんど評価されない事を思い知らされ、当時助教授だった私にとって大きなインパクトのあるコメントだった。

帰国後に細胞死阻害タンパク質(IAP、FLIP)の研究を本格的に始めたのだが、研究のスタイルをJohnのように細かいところまでコミットする形に改め、トップジャーナルを目指すことにした。といっても簡単には成果は出ない。数年かかってようやく姉妹紙のNature Cell BiologyにE2、E3活性を持つApollonの論文を掲載できたが、かなり消耗した。またCancer Cell誌に投稿したMeBSの論文は1年半かけてReviseしたが、半年以上ブロックされたあげくにRejectされ、その間に競合する論文がCell、Molecular Cell、Cancer Cell誌に相次いで掲載されるという憂き目に遭った。編集部で議論になったそうだが、ネゴシエーションする力もなくすごすごと引き下がり、結局JBCに論文発表した。

振り返って見ると、この頃は論文をまとめることに大きな プレッシャーを感じていて、研究を心からは楽しめなかった ように思う。インパクトファクターの高いジャーナルに論文 発表することに必要以上にこだわってしまい、研究の面白さ を見失いそうになっていた。

国立医薬品食品衛生研究所(国衛研)

2009年、国衛研への異動をきっかけとしてSNIPERの研究をはじめた。このあたりの事情はユビキチンネオバイオロジーのニュースレター No.1 に書いたので、興味がある方はそちらをご覧頂きたい。SNIPER研究で少しだけ自慢してもいいかなと思うことは、MeBSと同じような活性を示すIAPアンタゴニストがいくつもトップジャーナルに報告されたにもかかわらず、私以外は誰もSNIPERの開発に思い至らなかった事である。しかし何年も前にほとんど同じアイデアを論文発表していた研究者がいたのには驚かされた。Craig Crews博士のPROTACである。有機化学の論文を読んでいなかった私は全く知らなかったのだが、最初のSNIPERの論文をまとめていた時にファーストオーサーの伊藤幸裕先生がPROTACの論文を見つけてきた。それまでにも度々感じたことだが、自分が考える程度のことは他の人にも考えつくことであり、世界のどこかに競争相手は必ずいる。

国衛研に異動してもインパクトファクターの呪縛からすぐに解放されたわけではなかったが、少なくとも研究することに純粋な楽しさを再び感じられるようになった。国衛研から SNIPERの論文をいくつか生物系のジャーナルに発表した頃、米国化学会(ACS)から突然シンポジウム講演の招待メールが届いた。私自身はこれまで米国はおろか日本の化学会にも全く縁がなく、SNIPERの論文もたいしたところには発表していない。それにもかかわらず私のところに招待が来たことに大変驚くと共に、研究の評価は論文のインパクトファクターだけではないことを再認識する出来事となった。

2014年にSan Franciscoで行われたACS Meeting で、タンパク質分解技術をテーマにした世界初のシンポジウ

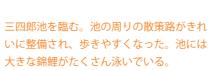


東大正門から銀杏並木を通して安田講堂入り口を臨む。新緑と黄葉の並木が美しい。

ムが行われた。Craig Crews博士と共にこのシンポジウムで講演した事は私の密かな誇りである。その後欧米中国でこのテーマを取り上げたシンポジウムが次々に開催されるようになり、"You are one of the first inventor of this technology." と持ち上げられ、海外で講演する機会を何度も頂いた。

日本ではケモユビキチンがスタートした2018年頃から講演を依頼される事が急激に増え、2019年12月までの2年足らずの間に40回以上の講演を行った。冒頭に書いたよう

に、新型コロナウィルス感染症のパンデミックと国立医薬品食品衛生研究所の定年退職で、一息ついて考える時間を持つことができた。もしパンデミックが1年前に始まっていたら、私も国衛研のメンバーもコロナ対策に否応なく巻き込まれていたはずであり、SNIPERの研究も少なからず影響を受けていただろう。パンデミックが退職の時期と重なったことは私にとって幸運な事であったと思う。





東京大学大学院薬学系研究科

もう一つ幸運なことに、2020年10月から東京大学大学 院薬学系研究科に新たに設置されたタンパク質分解創薬社 会連携講座を担当させて頂くことになった。社会連携講座 設置にご尽力下さった村田茂穂教授を始めとする関係者の 皆様と、この研究室を足場にSNIPER技術を基にした創薬 研究を共同で行うエーザイ株式会社に深謝する。研究室の セットアップはいつも大変だが、考える時間があったおかげ で新しい研究のアイデアもたまってきた。新しい研究室でこれからも研究を楽しみたいと思う。

終わりに

私の個人的な意見だが、研究者というのはプロのスポーツ選手と同じくらい幸せな人間だと思っている。自分の好きな研究 (スポーツ) をして、結果を出せば賞賛され、トップレベルになれば世界的な名声を得られる。また研究者でも

画期的な特許をとればスポーツ選手のように莫大な報酬を得ることも夢ではない。スポーツ選手と比べると研究者として頭角を現すまでに時間がかかるが、現役のプレーヤーとして活動できる期間はスポーツ選手よりも遙かに長い。大切なことは、長い研究生活の中で研究を楽しむ心を持ち続けることだと思う。

もちろん研究は楽しいことばかりではない。私自身もたくさん経験してきたが、実験に失敗したり、予想とは違う結果にがっかりしたりすることは日常茶飯である。でもそのおかげで、物事をいろいるな角度から見る習慣が自然に身についたし、予想外の結果から新しいことが見えてくることは研究の醍醐味でもある。子供たちからは「でた、お父さんのSuper Positive Thinking」と茶化されることもあったが、こういう多面的なものの見方考え方をできるようになったことは、私が研究者になって良かったと思うことの一つである。

これから研究者としてキャリアを重ねていく若い人たちが、 それぞれに研究の楽しさと醍醐味を味わいながら素晴らし い研究生活を送ることを願っている。



12年ぶりに戻った東大本郷キャンパスは、整備が進んで昔よりも格段にきれいになっていた。現在はCOVID-19の拡大で用のない人の立ち入りは制限されているが、機会があれば三四郎池の周り等を散策するのをお勧めします。

赤く染まった御殿下の紅葉

กร

研究代表者 松尾 芳隆

東京大学医科学研究所RNA制御学分野 准教授 http://www.inada-lab.ims.u-tokvo.ac.ip



TRIM 型ユビキチンリガーゼの 物性と動作原理の解析

TRIMファミリーはRING型E3ユビキチンリガーゼの一つのファミリー(ヒトでは約70種)であり、様々な機能(がん、免疫、発生、オートファジーなどの制御)に関与することが報告されています。本研究の目的は、TRIMタンパク質の「タンパク質」としての物理化学的な性質(物性)を解析することで機能との関連性を検討し、将来的には創薬研究への知見を集積することであります。

TRIMタンパク質の機能を解明するためにはまず、その基質タンパク質を同定することと、TRIMタンパク質の構造を決定することが必要です。それらの情報および疾患との関係をもとに、対象とするTRIMタンパク質を決定し、機能変化をもたらす化合物スクリーニングを遂行することは、臨床上、重要となります。そのために、特異性の高いTRIMタンパク質の基質タンパク質及びユビキチンデコーダーの同定法(TUBE-E3法)の樹立を進めます。また同時に、TRIMタンパク質の構造生物学的解析を進めることが必要となります。本計画で対象とするE3リガーゼ候補としては、「シグナル伝達」「選択的オートファジー」「DNA修復」「ERAD」等に関与すると考えられているTRIMタンパク質を中心に解析を進めます。

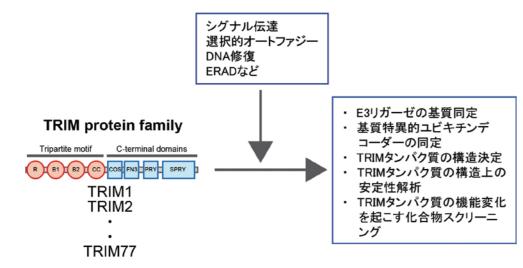
プロテオミクスや構造生物学、ケミカルバイオロジーの観点から、 以下の方法により、上記の対象E3の解析を進めることで「化学ツール開発」及び「創薬」に役立つ基盤的知見を集積します。 (1) E3リガーゼ基質同定:基質タンパク質を効果的に同定するプロテオミクス解析 (TUBE-E3法)を実用レベルまで完成させ、上記の対象E3リガーゼ (TRIMタンパク質)に関して、基質同定を進めます。

(2) 基質特異的ユビキチンデコーダーの同定: TUBE-E3法を応用することで、基質特異的ユビキチンデコーダーの同定を進めます。

(3) TRIMタンパク質の構造決定:まだ構造決定が報告されていない上記のTRIMタンパク質の構造決定を進めます。リコンビナントタンパク質を作製し、X線結晶構造解析、NMR、クライオ電子顕微鏡法 (cryo-EM) などを使用します。

(4) TRIMタンパク質の構造上の安定性解析:構造生物学的解析にも利用されるリコンビナントタンパク質を使い、サーマルシフトアッセイを遂行することで、タンパク質としての安定性のデータを得ます。

(5) TRIMタンパク質の機能変化を起こす化合物スクリーニング:ルシフェラーゼアッセイ等で機能調節化合物が同定できた場合は、ユビキチン関連創薬研究に利用します。



TRIM型ユビキチンリガーゼの物性と動作原理の解析

関連する代表的な論文

- Watanabe, M., Saeki, Y., Takahashi, H., Ohtake, F., Yoshida, Y., Kasuga, Y., Kondo, T., Yaguchi, H., Suzuki, M., Ishida, H., Tanaka, K. and *<u>Hatakeyama, S</u>.: TUBE-based approach coupled with ligase trapping for identification of E3 ubiquitin ligase substrates, *Commun. Biol.* 3, 592 (2020). doi: 10.1038/s42003-020-01328-y
- *Yanagi, T., Watanabe, M., Hata, M., Kitamura, S., Imafuku, K., Yanagi, H., Homma, MD, A., Wang, L., Takahashi, H., Shimizu, H. and *<u>Hatakeyama. S.</u> (2018) Loss of TRIM29 alters keratin distribution to promote cell invasion in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 78, 6795-6806. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1495
- Sang, Y., Li, Y., Song, L., Alvarez, A.A., Zhang, W., Lv, D., Tang, J., Liu, F., Chang, Z., <u>Hatakeyama, S.</u>, Hu, B., Cheng, S. and *Feng, H. (2018) TRIM59 promotes gliomagenesis by inhibiting TC45 dephosphorylation of STAT3. *Cancer Res.* 78, 1792-1804. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2774
- *Hatakeyama, S. (2017) TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity and Carcinogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 42, 297-311. doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.002.
- Masuda, Y., Takahashi, H., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Saraf, A., Washburn, W.P., Florens, L., Conaway, R.C., Conaway, J.W. and *<u>Hatakeyama, S.</u> (2015) TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin, *Nature Commun.* 6, 7299. doi: 10.1038/ncomms8299

ケモテクノロジーを活用した リボソームユビキチンコードの解読と制御

タンパク質の合成を司るリボソームの機能は、mRNAに示された 遺伝情報をタンパク質へ変換するという機械的なものとして認識されていましたが、近年、リボソーム自身のユビキチン化修飾によって 制御される様々な現象が明らかになってきています。

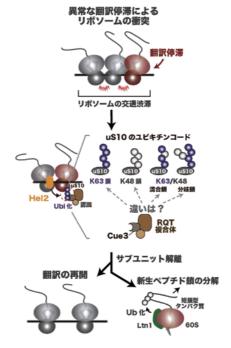
わたしたちは、異常な翻訳停滞を認識し、リボソームタンパク質 uS10をユビキチン化するセンサータンパク質 "Hel2" (E3) や、新生ペプチド鎖を分解する品質管理機構 (Ribosome-associated Quality Control: RQC)の誘導起点となるサブユニット解離に必須な"RQT複合体" (デコーダー)を発見しました。さらに、翻訳停滞からuS10のユビキチン化を介したサブユニット解離までの一連の反応を試験管内で再現することで、RQCが誘導される分子機構の詳細を明らかにしました(図:左)。

また、わたしたちは、コドンの最適化によって調整される"翻訳の伸長速度"を監視することで、mRNAの安定性を決定する因子として、"Ccr4-Not複合体"を見出しました。Ccr4-Not複合体は、構成因子であるNot5を介して非最適コドンを翻訳するリボソームに

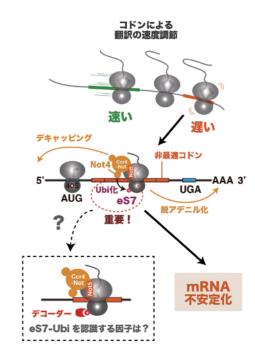
結合し、mRNAの不安定化を誘導します。また、この機構には、Ccr4-Not複合体の構成因子である"Not4"(E3)によるリボソームタンパク質eS7へのユビキチン化が必須であることも明らかになりました(図:右)。

このように、細胞内では、翻訳途中のリボソームの動体を監視し、その運命を決定する機構が複数存在しますが、いずれについてもリボソーム自身のユビキチン化が起点になっています。一方で、ユビキチン鎖の認識・作動機構の理解は不十分なままです。

本研究では、上述した2つの機構:【1】異常な翻訳停滞を解消する品質管理機構と【2】翻訳の伸長速度に依存したmRNAの安定性決定機構において重要な役割を果たすリボソームのユビキチン化に注目し、部位特異的、かつユビキチン鎖特異的な作動機構の解明を進めます。また、並行して、各ユビキチン鎖の認識を特異的に調節するケミカルツールを開発し、リボソームユビキチンコードの制御を目指します。



異常な翻訳停滞を解消する機構



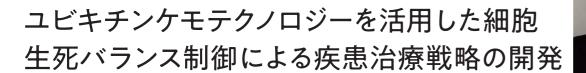
翻訳の伸長速度に依存した mRNA 安定性決定機構

関連する代表的な論文・

- *Matsuo Y and *Inada T. (2021) The ribosome collision sensor Hel2 functions as preventive quality control in the secretory pathway. *Cell Rep.* 34, 108877. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108877.
- #Buschauer R, #Matsuo Y. Sugiyama T, Chen YH, Alhusaini N, Sweet T, Ikeuchi K, Cheng J, Matsuki Y, Nobuta R, Gilmozzi A, Berninghausen O, Tesina P, Becker T, *Coller J, *Inada T, *Beckmann R. (2020) The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality. *Science*. 368, eaay6912. doi: 10.1126/science.aay6912.
- #Matsuo Y, #Tesina P, Nakajima S, Mizuno M, Endo A, Buschauer R, Cheng J, Shounai O, Ikeuchi K, Saeki Y, Becker T, *Beckmann R, *Inada T. (2020) RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1. Nat. Struct. Mol. Biol. 27, 323-332, doi: 10.1038/s41594-020-0393-9
- #Matsuo Y, #Ikeuchi K, Saeki Y, Iwasaki S, Schmidt C, Udagawa T, Sato F, Tsuchiya H, Becker T, Tanaka K, Ingolia NT, Beckmann R, *Inada T. (2017) Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nat. Commun.* 8, 159. doi: 10.1038/s41467-017-00188-1
- Matsuo Y, Granneman S, Thoms M, Manikas RG, Tollervey D, 'Hurt E. (2014) Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature*. 505, 112-116. doi: 10.1038/nature12731

公募研究

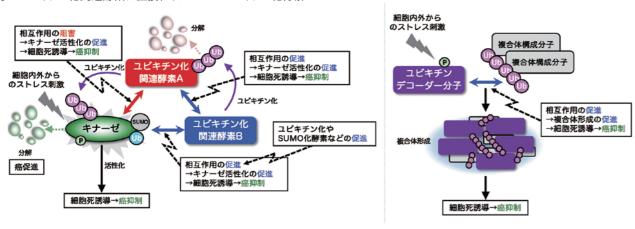
東北大学 大学院薬学研究科 衛生化学分野 教授 http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~eisei/eisei.HP/



細胞の生死などの生理応答は、細胞内外から入力される様々な 増殖・分化・細胞死などのシグナルのバランスによって決定されて います。最近我々は、細胞生死に関わるシグナル分子に対して複数 のユビキチン化関連酵素がクラスタリングして複合体を形成し、相 互に活性制御を行うこと、またストレス刺激依存的にユビキチンとユ ビキチンデコーダ分子で構成される特殊な複合体が形成されること を見出しました。これらの現象は、細胞の生死を決定するシグナル バランスの微調整に重要であり、ストレスの種類や強度に応じた適 切な細胞応答が誘導されるための普遍的な仕組みであることが分 かってきました。そのバランスが崩れると異常なシグナルが誘導され て過剰な細胞死や増殖が起こり、癌や自己免疫疾患に繋がります。 また我々は、複合体内の構成因子の相互作用には、ユビキチン化や SUMO化、リン酸化等の修飾が必須であることも明らかにしており、 従って、このような修飾や相互作用を制御できれば、過剰な細胞死 や増殖を抑制し、細胞生死シグナルのバランス破綻による癌や自己 免疫疾患等の疾患治療が可能となります。

例えば、細胞生死を調節する、あるキナーゼには、その活性制御を行う、異なるユビキチン化関連酵素が存在して複合体を形成し、 一方のユビキチン化関連酵素は直接、キナーゼのユビキチン化分解 に関わり、もう一方のユビキチン化関連酵素は一方のユビキチン化関連酵素のユビキチン化分解に寄与するという、シグナルの複雑な微調整の仕組みが存在します。またストレス刺激に応じて、ユビキチンとユビキチンデコーダ分子を構成因子とする複合体の形成が、特殊な細胞死誘導の制御に重要です(【図】参照)。これらの分子間の相互作用には、ユビキチン化等の修飾が必要であることも分かってきました。このような複合体形成メカニズムや細胞生死シグナルのバランス制御の仕組みを解明し、シグナル分子間相互作用やデコーダ分子による修飾認識が、細胞生死のシグナルバランスの決定に重要なポイント(作用点)であり、それらのポイントがケモテクノロジーによって人為的に調節制御可能であると考えています。

本研究では、我々が独自に見出した低分子プローブを基に、ケモテクノロジーを活用して、ユビキチン化関連酵素間の相互作用や、ユビキチン化関連修飾とユビキチン化関連酵素を含むシグナル分子との相互作用を正・負に適切に調節することで、細胞生死といった生理応答のシグナルバランス制御を介して過剰な細胞死・増殖等の現象を抑制し、癌や免疫疾患に対する、従来の方法とは異なる新たな疾患治療戦略の提言を目指したいと考えています。



【図】細胞の生死は、シグナル分子とユビキチン化関連酵素や、シグナル分子とユビキチン及びSUMO等の翻訳後修飾との相互作用で決定され、それらの相互作用をケミカルプローブで調節して、癌や自己免疫疾患等の創薬・疾患治療戦略の開発に繋げる。

あるキナーゼの活性化で細胞死が誘導されて癌が抑制されるシグナル伝達系において、ユビキチン化関連酵素Aはその基質のキナーゼを分解し、逆にキナーゼのSUMO 化等の就職を認識するユビキチン化関連酵素Bによってユビキチン化関連酵素Aは分解される場合、この3者複合体の相互作用の制御、例えば、キナーゼとユビキチン化 関連酵素Aの相互作用を阻害すれば、キナーゼの活性化が促進され、細胞死誘導によって癌が抑制できるし、ユビキチン化関連酵素Bとユビキチン及びSUMO等との相互 作用の促進や、それらの修飾酵素の促進も癌抑制に繋がる。また、特殊な複合体形成が細胞死誘導の重要な起点となることが分かっており、その複合体内のユビキチンと ユビキチンデコーダー分子との相互作用を促進すれば、複合体形成が促進され、細胞死誘導によって癌が抑制できる。このようにシグナル分子とユビキチン化関連酵素や、 ユビキチン及びSUMO等の修飾とシグナル分子との相互作用を微調整することで、細胞生死といった生理応答が制御でき、癌治療等の新たな創業様的となる。このよう な新たな創薬治療標的としての分子間相互作用について、独自に見出したケミカルプローブを用いて制御したい。

関連する代表的な論文

- Noguchi, T., Sekiguchi, Y., Kudoh, Y., Naganuma, R., Kagi, T., Nishidate, A., Maeda, K., Ishi, C., Toyama, T., Hirata, Y., Hwang, G. W., "<u>Matsuzawa, Δ</u> (2021) Gefitinib initiates sterile inflammation by promoting IL-1β and HMGB1 release via two distinct mechanisms. *Cell Death Dis.*, 12, 49. doi: 10.1038/s41419-020-03335-7
- Hirata, Y., Inoue, A., Suzuki, S., Takahashi, M., Matsui, R., Kono, N., Noguchi, T., *Matsuzawa, A. (2020) trans-Fatty acids facilitate DNA damage-induced apoptosis through the mitochondrial JNK-Sab-ROS positive feedback loop. Sci. Rep., 10, 2743. doi: 10.1038/s41598-020-59636-6
- Noguchi, T., Suzuki, M., Mutoh, N., Hirata, Y., Tsuchida, M., Miyagawa, S., Hwang, G. W., Aoki, J., and *Matsuzawa. A. (2018) Nuclear-accumulated SQSTM1/p62-based ALIS act as microdomains sensing cellular stresses and triggering oxidative stress-induced parthanatos. *Cell Death Dis.*, 9, 1193. doi: 10.1038/s41419-018-1245-y
- Hirata, Y., Katagiri, K., Nagaoka, K., Morishita, T., Kudoh, Y., Hatta, T., Naguro, I., Kano, K., Udagawa, T., Natsume, T., Aoki, J., Inada, T., Noguchi, T., Ichijo, H., and *Matsuzawa. A. (2017) TRIM48 promotes ASK1 activation and cell death through ubiquitination-dependent degradation of the ASK1 negative regulator PRMT1. Cell Rep., 21, 2447-2457. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.007
- Matsuzawa, A., Tseng, P. H., Vallabhapurapu, S., Luo, J. L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D. A., Gallagher, E., and "Karin, M. (2008) Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* (Research Article), 321, 663-668. doi: 10.1126/science.1157340

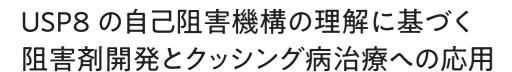
5-aza-dCTP による新たな DNA 維持メチル化制御機構の解明

DNAメチル化は、様々な生命現象に重要な役割を果たすエピジェネティクス修飾であり、その脱制御は様々な疾患の原因となります。ゲノム上のDNAメチル化パターンは、DNA複製時に維持型DNAメチル化酵素DNMT1によって、娘DNAに継承されます。近年、DNMT1のDNAメチル化部位への局在と活性化において、E3ユビキチンリガーゼUHRF1によって触媒されるマルチプルモノユビキチン化が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきました。5-aza-dCTPはDNA複製時にゲノムDNAに取り込まれると、DNAメチル酵素と不可逆的な架橋結合を形成することでDNA脱メチル化を誘導する核酸アナログであり、抗がん剤としても認可されている低分子化合物です。しかし、5-aza-dCTPとDNMTによって形成されるDNAータンパク質架橋が細胞内で、どのようなプロセスにより処理されていて、UHRF1によるユビキチンシグナルにどのような影響を与えるのかは明らかになっていません。本研究はDNA複製

に伴うDNAメチル化維持の過程を試験管内で再現可能なツメガエル卵抽出液を実験系に用いて、この問題に取り組みます。まず、私達は、試験管内系において、5-aza-dCTPがDNMT1やUHRF1の過剰なクロマチンへの集積を引き起こすとともに、UHRF1の下流で働くユビキチンシグナル経路を強く活性化すること、さらにDNMT1の高度なSUMO化を誘導することを見出しました。そこで、このような条件下で特異的にクロマチンに集積するタンパク質を同定するために、5-aza-dCTP処理に伴い、SUMO依存的に、あるいは非依存的にクロマチンに集積するタンパク質についてChromatin Mass spectrometry (CHROMASS)法を用いて解析し、約20種のタンパク質の同定に成功しました。これらのタンパク質はUHRF1の下流で働く未知のDNAメチル化制御因子、あるいはDNMT1-DNA架橋の制御因子として働く可能性があり、今後その作用機序と分子機能を明らかにしていく予定です。

本研究計画の概要 Q3: 未知の DNMT1-SUMO化を担う SUMO化基質タンパク質の E3-SUMOリガーゼとその制御 同定と機能解析 UHRF1 DNMT1の UHRF1E3リガーゼの 高度なSUMO化 恒常的活性化 DNMT 5-aza-dCTPによる Q2: UHRF1による DNMT1の阻害 DNMT1-SUMO化の 新規ユビキチン化基質及び Readerとその機能 Readerの探索

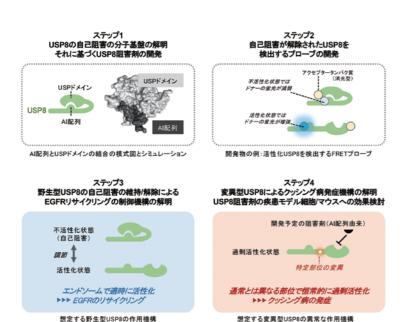
- *Nishiyama A, Mulholland CB, Bultmann S, Kori S, Endo A, Saeki Y, Qin W, Trummer C, Chiba Y, Yokoyama H, Kumamoto S, Kawakami T, Hojo H, Nagae G, Aburatani H, Tanaka K, *Arita K, *Leonhard H, *Nakanishi M. (2020) Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nat Commun.* 11 (1):1222. doi: 10.1038/s41467-020-15006-4.
- Ishiyama S, Nishiyama A, Saeki Y. Moritsugu K, Morimoto D, Yamaguchi L, Arai N, Matsumura R, Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, Shimamura S, Ishikawa F, Tajima S, Tanaka K, Ariyoshi M, Shirakawa M, Ikeguchi M, Kidera A, "Suetake I, "Arita K, "Nakanishi M. (2017) Structure of the Dnmt1 Reader Module Complexed with a Unique Two-Mono-Ubiquitin Mark on Histone H3 Reveals the Basis for DNA Methylation Maintenance. *Mol Cell* 68 (2):350-360.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.037.
- Yamaguchi L, *Nishiyama A, Misaki T, Johmura Y, Ueda J, Arita K, Nagao K, Obuse C, *Nakanishi M. (2017) Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation. *Sci Rep.* 7(1):55. doi: 10.1038/s41598-017-00136-5.
- Nishiyama A, Yamaguchi L, Nakanishi M. (2016)
 Regulation of maintenance DNA methylation via
 histone ubiquitylation. J Biochem. 159(1):9-15. doi:
 10.1093/jb/mvv113.
- *Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, *Nakanishi M. (2013) Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. Nature 502(7470):249-53. doi: 10.1038/nature12488.



脱ユビキチン化酵素は様々な細胞機能に関与し、種々の疾患とも 関係することから注目を集めています。私たちは、長年、USPファミ リーの脱ユビキチン化酵素の機能解析を進めてきました。その過程 で、USP8が、エンドサイトーシスにより細胞内にとり込まれた増殖 因子受容体をエンドソームで脱ユビキチン化し、これらの細胞膜へ のリサイクリングを促すことを明らかにしてきました。これは、増殖シ グナルの強度を調節し、細胞増殖をコントロールするための重要な しくみと考えられ、このしくみを制御する分子機構の解明は重要で す。一方、私たちは、USP8がクッシング病の原因遺伝子であること を発見しました。クッシング病は下垂体から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が過剰に分泌されて起こる難病で、特異的な治療薬は存 在しません。世界初のクッシング病治療薬を開発するために、 USP8の変異を出発点とする発症機構の解明は喫緊の課題である と言えます。

前回の公募研究の成果から、USP8には特殊な自己阻害機構が 備わっていて、分子中央部に存在する短いアミノ酸配列 (Auto-Inhibitory sequence: AI配列) が酵素ドメイン (USPドメ イン) に相互作用して活性を抑制することがわかりました。他の成 果も併せ、私たちは、『細胞内では自己阻害が適時適所で解除され ることによりUSP8が正しく機能して受容体リサイクリングが制御さ れている。一方、クッシング病ではこのしくみが破綻してUSP8が過 剰に活性化し、疾患発症をもたらしている。自己阻害機構に基づい てUSP8阻害剤を開発できる可能性があり、成功すれば世界初の クッシング病治療薬のシーズになる』と着想しました。

本研究では、まず、USP8の自己阻害の分子基盤を詳細に解明し、 それに基づいてUSP8阻害剤などの新しい解析ツールを開発します。 さらに、これを最大限に活用して、野生型USP8のエンドサイトーシ スにおける作用機構と変異型USP8のクッシング病発症における作 用機構を明らかにすることを目的としています。本研究によって、 USPファミリータンパク質の阻害剤開発の新しいストラテジーを提 案するとともに、新しい解析ツールを活用してこれまで遺伝学的解 析一辺倒だった脱ユビキチン化酵素研究に新展開をもたらしたいで す。さらに、開発したUSP8阻害剤がクッシング病治療に応用でき る可能性を示したいと考えています。



関連する代表的な論文

- Naito, S., *Fukushima, T., Endo, A., Denda, K., *Komada, M. (2020) Nik-related kinase is targeted for proteasomal degradation by the chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP. FEBS Lett. 594. 1778-1786. doi: 10.1002/1873-3468.13769.
- 2. Kawaguchi, K., Endo, A., *Fukushima, T., Madoka, Y., Tanaka, T., *Komada, M. (2018) Ubiquitin-specific protease 8 deubiquitinates Sec31A and decreases large COPII carriers and collagen IV secretion Biochem, Biophys. Res. Commun. 499, 635-641. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.202.
- 3. Xie, X., Matsumoto, S., Endo, A., *Fukushima, T. Kawahara, H., Saeki, Y., *Komada, M. (2018) Deubiquitylases USP5 and USP13 are recruited to and regulate heat-induced stress granules through their deubiquitylating activities. J. Cell. Sci. 131, ics210856, doi: 10.1242/ics.210856.
- 4. Furuta, H., Yoshihara, H., Eukushima, T., Yoneyama Y., Ito, A., Worrall, C., Girnita, A., Girnita, I., Yoshida, M., Asano, T., Komada, M., Kataoka, N., Chida, K., Hakuno, F., *Takahashi, SI, (2018) IRS-2 deubiquitination by USP9X maintains anchorage-independent cell growth via Erk1/2 activation in prostate carcinoma cell line. Oncotarget. 9, 33871-33883. doi: 10.18632/oncotarget.26049.
- 5. Fukushima, T., Yoshihara, H., Furuta, H., Hakuno, F., Luan, J., Duan, C., Saeki, Y., Tanaka, K., Iemura, Sl., Natsume, T., Chida, K., Nakatsu, Y., Kamata, H. Asano, T., *Takahashi, Sl. (2015) Nedd4-induced mono-ubiquitination of IRS-2 enhances IGF signaling and mitogenic activity. Nature Communications. 6. 6780. doi: 10.1038/ncomms7780.

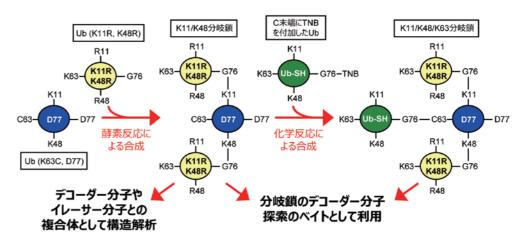
酵素反応と化学反応を駆使した 分岐鎖認識の構造生物学

公募研究

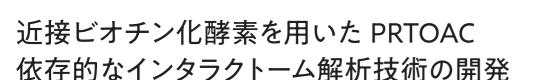
ユビキチン化は翻訳後修飾の一つですが、他の多くの翻訳後修飾 因子との大きな違いとしてユビキチン分子が数珠状に次々と連結す ることでユビキチン鎖が形成されるという点が挙げられます。このユ ビキチン間の結合は8種類の残基(K6, K11, K27, K29, K33, K48, K68, M1) が使われます。 ユビキチン鎖は連結に用いられた 残基によって異なる構造を持ち、異なるデコーダー分子に認識され るため、ユビキチンという同一の分子を使用しているにも関わらずユ ビキチン修飾は生体内において多様な生命現象を制御する事が可 能となります。これまでの構造研究により、デコーダー分子によるユ ビキチン鎖の特異的認識機構は数多く報告されてきました。一方、 途中でユビキチン鎖が枝分かれする『分岐鎖』については、細胞内 での機能が徐々に報告されはじめ、その重要性が指摘されているに も関わらず、デコーダー分子やイレーサー分子による分岐鎖特異的 認識機構は未だ解明されておりません。

本研究では、デコーダー分子やイレーサー分子による分岐鎖特 異的認識機構をX線結晶構造解析により解明するため、酵素反応 と化学的手法を組み合わせて分岐鎖を大量に合成する方法を確立 します。これまで、特定のユビキチン鎖だけを選択的に伸長する酵 素は多数発見されているため、これら酵素の組み合わせで分岐鎖を 合成することは可能です。しかし、野生型のユビキチンを用いると分 岐の位置やユビキチン鎖の長さを制御することは困難です。そこで、 望まないユビキチン鎖の伸長を防ぐため、いくつかのリジン残基に変 異を導入したユビキチンを使用することで、分岐鎖の制御を行う事 ができると考えています。一方、分岐に使用される残基の組み合わ せによっては、先に付加されたユビキチンが次のユビキチンの付加を 阻害するために、酵素による伸長反応が起こりづらい事が知られて います。そのような場合は、ジスルフィド結合を利用した化学的手法 によりユビキチンを連結し、擬似的なユビキチン鎖の合成を行う予 定です。この方法で合成される分岐鎖は変異を含んだものですが、 多くのデコーダー分子やイレーザー分子はリジン残基を認識しない 事が知られているため、構造研究を行う上では問題ないと考えてい ます。分岐鎖の大量調製が可能になれば、すでに分岐鎖に対する特 異性が報告されているデコーダー分子やイレーサー分子との複合 体として構造解析を行う他、分岐鎖のデコーダー分子探索のベイト としての利用など、様々な利用が可能になることが期待できます。

ユビキチン変異体を活用した分岐鎖の合成例



- 1. Sato Y. Hikaru T, Yamagata A, Okatsu K, Tanaka K Saeki Y, *Fukai S, (2019) Structural insights into ubiquitin recognition and Ufd1 interaction of NpI4. Nat. Commun. 10, 5708, doi: 10 1038/s41467-019-13697-v
- 2. Sato Y. Okatsu K, Saeki Y, Yamano K, Matsuda N, Kaiho A, Yamagata A, Goto-Ito S, Ishikawa M, Hashimoto Y. Tanaka K. *Fukai S. (2017) Structural basis for specific cleavage of Lvs6-linked polyubiquitin chains by USP30. Nat. Struct. Mol. Biol. 24, 911-919, doi: 10.1038/nsmb.3469.
- 3. Sato Y., Goto E, Shibata Y, Kubota Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Inoue J, Takekawa M, Tokunaga F, *Fukai S, (2015) Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin rev mechanisms for dual specificity. Nat. Struct. Mol. Biol. 22 222-229 doi: 10.1038/nsmb.2970
- 4. Sato Y., Fujita H., Yoshikawa A., Yamashita M., Yamagata A, Kaiser SE, *Iwai K, *Fukai S, (2011) Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by the HOIL-1L NZF domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 20520-20525, doi: 10.1073/pnas.1109088108
- Sato Y., Yoshikawa A, Yamagata A, Mimura H, Yamashita M, Ookata K, Nureki O, Iwai K, Komada M, *Fukai S, (2008) Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. Nature. 455, 358-362 doi: 10.1038/nature07254



愛媛大学プロテオサイエンスセンター 無細胞生命化学部門 特定研究員 http://www.pros.ehime-u.ac.jp/cell-free/

サリドマイドやサリドマイド誘導体 (Immunomodulatory Drugs/IMiDs)をはじめとする標的タンパク質の分解を誘導する低 分子化合物は、タンパク質分解誘導剤と呼ばれています。タンパク 質分解誘導剤は、標的タンパク質を徹底的に分解誘導するというそ の強力な作用から、標的タンパク質の機能解析および種々の疾患に 対する治療薬として注目されています。さらに、現在では、IMiDsの ようなE3ユビキチンリガーゼへ結合する化合物(E3 binder)と標的 タンパク質へ結合する化合物(Target binder)を繋ぎ合わせた PROTAC (Proteolysis targeting chimera) や SNIPER (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser) な どのキメラ化合物へと応用されています。PROTACやSNIPERに用 いるE3 binderやTarget binder依存的にE3ユビキチンリガーゼと 相互作用するタンパク質を網羅的に解析・同定することは、 PROTACやSNIPERの作用機序を理解する上で非常に重要です。

これまでに、私たちはタンパク質-タンパク質間の相互作用に有用 な新規近接ビオチン化酵素AirID (Ancestral BirA for proximitydependent biotin identification) を開発し、ビオチン化されたタ ンパク質を検出可能な質量分析法と組み合わせることで、相互作用 タンパク質の網羅的な解析が可能であることを報告しています。本 研究では、IMiDsと相互作用する複合体型E3ユビキチンリガーゼの 基質認識受容体であるCRBNへAirIDを融合したAirID-CRBNを用 いて、PROTAC依存的なインタラクトーム解析技術の開発を目指し ます(図A)。そのためにまず、AirID-CRBNによるPROTAC依存的 な標的タンパク質のビオチン化に最適な条件検討を行います。そし て、質量分析によってPROTAC依存的に相互作用するタンパク質の 網羅的な解析を行い(図B)、見出されたタンパク質がPROTAC依存 的にCRBNと相互作用するのかどうかや(図C)、細胞内において分 解される基質かどうかを評価します(図D)。 これらの解析を行うこと によって、PROTACの作用をより深く理解するためのPROTAC依存 的なインタラクトーム解析技術の開発を目指します。

C) コムギ無細胞系および AlphaScreen 法を用いた A) AirID-CRBN による PROTAC 依存的なネオ基質 および標的タンパク質のビオチン化の模式図 生化学的な相互作用解析 / ビオチン化 ③ビオチン AirID CRBN B) AirID-CRBN による PROTAC 依存的な PROTAC ビオチン化タンパク質の網羅的な解析 PROTAC 依存的に相互作用する 既知のタンパク質 D) 培養細胞を用いたタンパク質分解解析 新規相互作用タンパク質 **PROTAC** PROTAC 依存的に相互作用する 分解される 分解されない 基質 基質 PROTAC応答における解析

関連する代表的な論文

- Yamanaka, S., Murai, H., Saito, D., Abe, G., Tokunaga, E., Iwasaki, T., Takahashi, H., Takeda, H. Suzuki, T., Shibata, N., Tamura, K., and *Sawasaki, T. (2021) Thalidomide and its metabolite 5-hydroxythalidomide induce teratogenicity via the cereblon neosubstrate PLZE FMBO J 40, e105375. doi: 10.15252/embi.2020105375.
- 2. Furihata, H. #, Yamanaka, S. #, Honda, T., Miyauchi, Y., Asano, A., Shibata, N., *Tanokura, M., *Sawasaki T and *Mivakawa, T. (2020) Structural bases of IMiD selectivity that emerges by 5-hydroxythalidomide.
- 10.1038/s41467-020-18488-4 (# equally contributed).
- 3. Yamanaka, S., Shoya, Y., Matsuoka, S., Nishida-Fukuda, H., Shibata, N., and *Sawasaki, T. (2020) An IMiD-induced SALL4 degron system for selective degradation of target proteins. Commun. Biol. 3. 515. doi: 10.1038/s42003-020-01240-5.
- 4. Kido, K., Yamanaka, S., Nakano, S., Motani, K., Shinohara, S., Nozawa, A., Kosako, H., Ito, S., and *Sawasaki, T. (2020) AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions. eLife 9, e54983, doi: 10.7554/el ife.54983.
- 5. Yamanaka, S., Sato, Y., Oikawa, D., Goto, E., Fukai, S., Tokunaga, F., *Takahashi, H., and *Sawasaki, T. (2020) Subquinocin, a small molecule inhibitor of CYLD and USP-family deubiquitinating enzymes, promotes NF-kB signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 524 1-7 doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.049

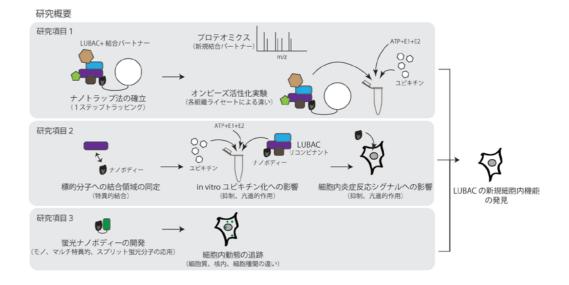
ナノボディーによる標的ユビキチンリガーゼ 複合体の細胞内動態の理解と応用



生化学的にも構造学的にもユニークな直鎖型ユビキチン鎖は、炎 症、選択的オートファジーや免疫制御に重要な役割を果たします。 この直鎖型ユビキチン鎖は、ユビキチンリガーゼ複合体LUBAC に より誘導され、OTULIN 脱ユビキチン化酵素により抑制されます。 さらに、7つの分子により特異的に認識されることにより、細胞内で のシグナル伝達に関与します。この様に、直鎖型ユビキチン鎖の作 製、抑制、認識を担う主要分子はすでに同定されています。しかし ながら、これらの分子の細胞内動態、組織や細胞種特異的なシグナ ルネットワークの形成とその生物学的効果については不明な部分も 多く残されています。例えば、LUBAC 構成因子の一つである HOIL-1L をコードする遺伝子は自己免疫疾患のみならず、ガンやミ オパチーとの相関も示唆されていますが、詳細なメカニズムは不明

公募研究

です。また、これらを解明するのに最適な抗体や分子ツールも存在 しないことから、本研究の目的は、申請者のチームが独自に取得し た単量体、単一ドメインの小分子であるナノボディーを基盤とした分 子ツールの開発とLUBAC の新規制御メカニズムの解明です。その ために、1) 各LUBAC 構成因子を抗原とするラマ由来ナノボディー クローンの生化学的特徴の解析と分子ツールの開発、2)ナノボ ディーによるLUBAC活性と生物学的効果への影響の解析、3)ナノ ボディーによるLUBAC構成因子の細胞内動態の探索、を行います。 究極的には、生体内でも組織浸潤性の高いナノボディーの特性を活 かして、LUBAC 依存的に引き起こされる疾患コントロールの手法 を確立することを目指します。



- 1. Fennell, L.M., Gomez Diaz, C., Deszcz, L., Kavirayani, A., Hoffmann, D., Yanagitani, K., Schleiffer, A., Mechtler, K., Hagelkruys, A., Penninger, J., and *Ikeda, F. (2020) Site-specific ubiquitination of the E3 ligase HOIP regulates apoptosis and immune signaling. EMBO J. 39 (24):e103303. doi: 10.15252/embi.2019103303
- 2. Ebner, P., Poetsch. I., Deszcz. I., Hoffmann T Zuber, J., and *Ikeda, F. (2018) The IAP family member BRUCE regulates autophagosome-lysosome fusion. Nat Commun. 9(1):599. doi: 10.1038/s41467-018-02823-x
- 3. *Rittinger, K., and *Ikeda, F. (2017) Linear ubiquitin chains: enzymes, mechanisms and biology. Open Biol. 7(4):170026. doi: 10.1098/rsob.170026.
- 4. Kumari, S., Redouane, Y., Lopez-Mosqueda, J., Shiraishi, R., Romanowska, M., Lutzmayer, S., Kuiper, J., Martinez, C., *Dikic, I., *Pasparakis, M., and * Ikeda, F. (2014) Sharpin prevents skin inflammation by inhibiting TNFR1-induced keratinocyte apoptosis. Elife, 3:e03422, doi: 10.7554/eLife.03422.
- 5. Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skånland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F. Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek B and *Dikic I (2011) SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kB activity and apoptosis. Nature. 471(7340):637-41. doi: 10.1038/nature09814.



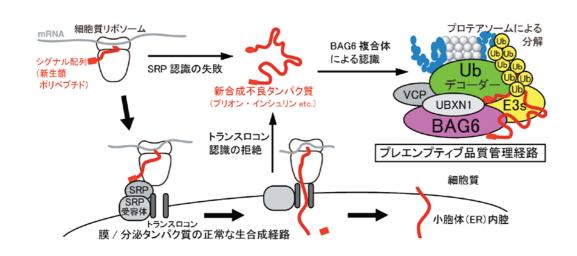
ケモテクノロジーを活用したプレエンプティヴ 経路特異的 Ub デコーダーの標的識別機構

タンパク質の新合成には厳密な品質管理が必要です。最近、このようなタンパク質品質管理の場に、新しいユビキチンバイオロジーの存在が浮かび上がってきました。特に、ストレス条件下ではシグナル配列の認識不良、およびトランスロコンからの拒絶などが誘起され、シグナル配列をN末端に持ったまま(正常な小胞体内プロセシングを受けないまま)の不良膜タンパク質が細胞質に蓄積します。凝集性の高い不良膜タンパク質の蓄積を防ぐため、新しい細胞質性ユビキチン依存的分解経路の存在が予見され、プレエンプティヴ(pre-emptive:予防的)なタンパク質品質管理と命名されました。しかし、ERADなどに代表される小胞体「内」膜タンパク質品質管理とは対照的に、その分子的実体とユビキチンコード作動機構は充分解明されていません。

私たちは、新生ポリペプチドの品質管理を担う新しいプロテアソーム会合因子としてBAG6を見出し、これが不良膜タンパク質のユビキチン化、低分子量GTPase群のユビキチン化などに必須であることを見いだしました。BAG6は、その結合ユビキチンデコーダー群と共に、リボソームから小胞体へのポリペプチド配送を監視する

プレエンプティブ品質管理を差配しています。この経路は、凝集性プリオン、あるいは1型糖尿病発症の原因となる変異インシュリン代謝の中核として機能することが、最近の研究から明らかにされました。プレエンプティブ品質管理を標的に、神経変性疾患および1型糖尿病の克服に向けたユビキチン創薬への応用が、現在の課題となっています。

そこで本研究では、ERADに比して研究の歴史が浅いプレエンプティブ品質管理を対象に、基質ユビキチン化の中核を成すBAG6複合体の作動機構を、ケモテクノロジーの手法を用いて解明していきます。最近、BAG6基質認識ドメインに関する研究成果を応用して、不良ポリペプチドを特異的に認識できる新プローブ群の開発に成功しました。今後これらを活用して、種々の病理的条件下で細胞内に蓄積する不良翻訳産物を分離し、不良タンパク質の蓄積ストレスが疾患を誘導するプロセス解明と防御機構提案を目指します。さらに、BAG6複合体の機能を調節することによって、プレエンプティヴ品質管理の支配下にある凝集性プリオン、あるいは変異インシュリンの毒性発現を防御する系を開発していきます。



関連する代表的な論文

- Matsuura, Y., Noguchi, A., Yokota, N., and *Kawahara, H. (2020) Nuclear accumulation of ZFP36L1 is cell cycle-dependent and determined by a C-terminal serine-rich cluster. J. Biochem. 168, 477-489. doi: 10.1093/ib/myaa072
- Takahashi, T., Minami, S., Tajima, K., Tsuchiya, Y., Sakai, N., Suga, K., Hisanaga, S., Obayashi, N., Fukuda, M., and *Kawahara, H. (2019) Cytoplasmic control of Rab-family small GTPases through BAG6. *EMBO Rep.* 20, e46794. doi: 10.15252/embr.201846794
- Suzuki, R., and "<u>Kawahara. H</u>, (2016) UBQLN4 recognizes mislocalized transmembrane domain proteins and targets these to proteasomal degradation. *EMBO Rep.* 17, 842–857. doi: 10.15252/embr.201541402.
- Minami, R., Hayakawa, A., Kagawa, H., Yanagi, Y., Yokosawa, H., and "<u>Kawahara, H.</u> (2010) BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *J. Cell Biol.* 190: 637-650. doi: 10.1083/icb.200908092
- Shimada, M., Kanematsu, K., Tanaka, K., Yokosawa, H., and *Kawahara, H. (2006) Proteasomal ubiquitin receptor RPN-10 controls sex determination in Caenorhabditis elegans. Mol. Biol. Cell 17: 5356-5371 doi: 10.1091/mbc.F06-05-0437

直鎖状ユビキチン代謝を制御する 新規ケモテクノロジーによる疾患病態の抑制

ユビキチンのN末端を介した特殊な連結様式により形成される「直鎖状ユビキチン鎖(M1鎖コード)」は、NF-図Bなどの炎症シグナルやアポトーシスなどの細胞死を制御し、近年では、タンパク質凝集体形成にも関与することが指摘され始めています。このM1鎖コードは、HOIL-1L、HOIP、SHARPINからなるユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex)により産生される一方、OTULINなどの脱ユビキチン化酵素により分解されることで、その代謝が制御されています。

公募研究

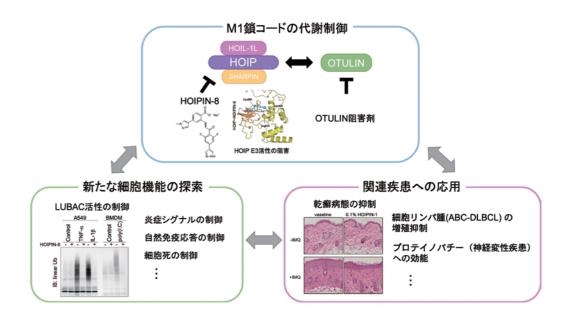
これまで私たちは、LUBACに対する特異的阻害剤として HOIPIN-8を見出し、in vitroでLUBAC活性を特異的に阻害し、細胞レベルにおいてLUBACによる炎症制御や細胞死制御をキャンセルすること、さらに、B細胞リンパ腫やマウス乾癬モデルに対して病態抑制効果を示すことを報告してきました。本研究では、HOIPIN-8に加え、OTULIN阻害剤の開発を通じて、M1鎖コードの代謝を「産生」と「分解」の両側面から制御し、M1鎖コードの新たな生理機能を探索するほか、関連する各種病態の発症・抑制メカニズムの解明を進めます。

1. OTULIN阻害剤の開発とケモテクノロジー解析

現在着手しているOTULIN阻害剤の開発を加速させ、特異性評価や構造基盤の解明を共同研究などにより進めると共に、各種シグナル経路に対する影響など、OTULIN-KO細胞との比較解析により細胞レベルでの機能性を評価します。さらに、HOIPIN-8と組み合わせた解析を行い、M1鎖コードの新たな生理機能を探索します。

2. HOIPIN-8を用いたケモテクノロジー解析と疾患モデル評価

これまでに報告されているB細胞リンパ腫や皮膚炎病態に加え、HOIPIN-8の病態抑制効果について広く検証を進めます。HOIPIN-8の動物個体内における代謝・物性を精査し、最適な投与方法を検討すると共に、タンパク質凝集体を伴う疾患群(プロテイノパチー)に対する解析にも着手します。これらの解析を通じて、ユビキチン創薬に向けた知見の取得を目指します。



- Miyashita H+, <u>Oikawa D</u>+, Terawaki S, Kabata D, Shintani A, *Tokunaga F. (2021) Crosstalk between NDP52 and LUBAC in innate immune responses, cell death, and xenophagy. *Front Immunol*. 12, 635475.
 (+) equally contributed. doi: 10.3389/firmmu. 2021 635475
- Oikawa D, Hatanaka N, Suzuki T, *Tokunaga F. (2020) Cellular and Mathematical Analyses of LUBAC Involvement in T Cell Receptor-mediated NF-κB Activation Pathway. Front Immunol. 11, 601926. doi: 10.3389/fimmu.2020.601926.
- <u>Qikawa D.</u>, Sato Y, Ito H, *Tokunaga F. (2020) Linear ubiquitin code: Its writer, erasers, decoders, inhibitors, and implications in disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3381. doi: 10.3390/ijms21093381.
- Oikawa D, Sato Y, Ohtake F, Komakura K, Hanada K, Sugawara K, Terawaki S, Mizukami Y, Phuong HT, Iio K, Obika S, Fukushi M, Irie T, Tsuruta D, Sakamoto S, Tanaka K, Saeki Y, Fukai S, *Tokunaga F. (2020) Molecular bases for HOIPINs-mediated inhibition of LUBAC and innate immune responses. *Commun Biol.* 3, 163. doi: 10.1038/s42003-020-0882-8.
- Nakazawa S+, <u>Oikawa D</u>+, Ishii R+, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Izumi T, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, *Ito H, *Nureki O, *Tokunaga F. (2016) Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun.* 7, 12547. (+) equally contributed. doi: 10.1038/ncomms12547

藤田医科大学総合医学研究所難病治療学講座 講師 http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/



ユビキチン化異常を起点とする 血管障害の統合的理解と創薬

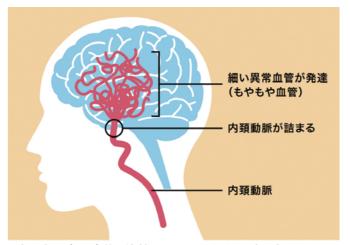
公募研究

ミステリン (別名RNF213, ALO17) は約600 kDaの巨大な細胞内タンパク質で、脳血管疾患もやもや病の発病に関わる因子として同定されました。私たちはミステリン遺伝子の初めての分子クローニングを行い、ミステリンタンパク質が運動性ATPアーゼ活性やユビキチンリガーゼ活性を持つこと、また、生理条件下で細胞内の脂肪貯蔵サイトである脂肪滴に局在して、脂肪代謝を制御する機能を持つこと、もやもや病責任変異によりこのような機能が失われることなどを世界にさきがけて解明してきました。

最近、国内外のグループより、私たちの見出したミステリンの運動性ATPアーゼ活性はモーター分子であるダイニンに類似した活性であること(ただしその意味は依然として不明)、ミステリンのユビキチンリガーゼ活性は従来知られていない非典型的な様式による可能性があること、もやもや病責任変異として同定されたミステリン遺伝

子変異はもやもや病のほかにもアテローム血栓性脳梗塞や肺高血圧など、はば広い血管病態と相関することなどが相次いで報告されています。その一方で、ミステリンの酵素活性、細胞内機能、血管障害形成機序のそれぞれの詳細および3者の関係はまだほとんど未知に近い状態です。言い換えれば、ミステリンがどのような酵素であり、生理的/病的条件においてどのような細胞内機能を持ち、それがどのように個体における血管障害の形成につながっていくのか、いまだ解明を待つ状態です。

本研究課題では特にミステリンのユビキチンリガーゼ活性に注目しながら、これら3者それぞれ(分子・細胞・個体レベルでのミステリンの挙動)の詳細解明および3者の関係の解明を進めるとともに、ミステリンの病態機能の理解およびケモユビキチンテクノロジーに基づいた創薬研究に取り組みます。



もやもや病の病態。体幹からの主要な血行路である内頚動脈が頭蓋内で狭窄し、脳血流の低下を招く。血液不足(低酸素)状態に応答して、健常者では見られない特異な毛細血管網(もやもや血管)が周辺に形成される。血流低下による脳梗塞に加えて、もやもや血管から出血する場合がある。ユビキチンリガーゼ・ミステリンの遺伝子変異単独もしくは他の要因と組み合わさることで発病にいたるが、その機序は明らかでない。

関連する代表的な論文

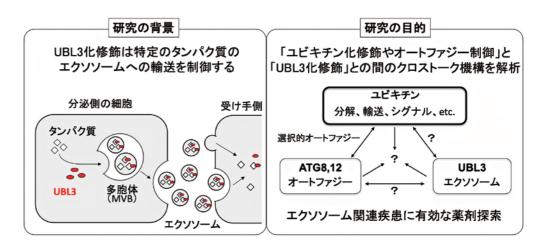
- . *<u>森戸大介</u>, ミステリン―もやもや病遺伝子の代謝制御 機能 (2019) 生化学, 第 91 巻第 6 号, pp.815-819 (2019)
- Sugihara M, *Morito D. Ainuki S, Hirano Y, Ogino K, Kitamura A, Hirata H, Nagata K. (2019) The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin stabilizes cytoplasmic lipid droplets. J Cell Biol. 218(3):949-960
- Kotani Y, *Morito D, Sakata K, Ainuki S, Sugihara M, Hatta T, Iemura SI, Takashima S, Natsume T, Nagata K. (2017) Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor. Sci Rep 7:44293
- Kotani Y, *Morito D, Yamazaki S, Ogino K, Kawakami K, Takashima S, *Hirata H, *Nagata K. (2015) Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. Sci Rep 5:16161
- Morito D, Nishikawa K, Hoseki J, Kitamura A, Kotani Y, Kiso K, Kinjo M, Fujiyoshi Y, Nagata K. (2014) Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its olicomeric state. Sci Rep 4:4442.

UBL3ケモテクノロジーによる、ユビキチン化と UBL3化のクロストーク機構の解析

エクソソームは、ほぼ全ての細胞種からMultivesicular Body (MVB)を介して細胞外へ放出される小胞であり、特定のタンパク質を内包し標的細胞に再び取り込まれます。がん転移や神経変性などの疾患においては、エクソソームを介した悪性タンパク質の伝搬が病変部位拡大の原因となっています。しかしながら、一部の分子はユビキチン化によりエクソソームへ輸送される可能性が報告されていたものの(Putz et al., Sci Signal 2012; Smith et al., J Immunol 2015)、特定のタンパク質のエクソソームへの輸送機構は完全には理解されていません。オートファジーに関しては、ユビキチン様タンパク質であるATG12は、Alixへ結合することでMVB形成を制御することが報告されています(Murrow L et al., Nat Cell Biol 2015)。また、オートファジーを止めるとエクソソームの放出が増え、逆にオートファジーを促進するとエクソソームの放出量が減ることがわかっていますが (Abdulrahman et al., JBC 2018, Minakaki et al., Autophagy 2018, Miranda et al., Nat Commun 2018)、

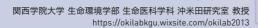
「エクソソーム放出」と「オートファジー活性」 のクロストーク機構は 不明でありました。

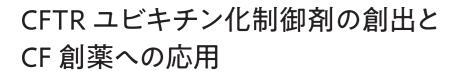
申請者は、ユビキチン様タンパク質UBL3が、新規翻訳後修飾因子として機能し、特定タンパク質をUBL3化修飾することでエクソソームへの輸送することを見出しました(Ageta et al., Nature Commun 2018)。さらに、GFPタグを付加させたユビキチン、SUMO、UBL3に対する、エクソソームへの輸送を比較したところ、ユビキチン化タンパク質もエクソソームへ輸送されていることを確認しました。以上の結果は、特定タンパク質の輸送はすべてUBL3化によって制御されるのではなく、部分的にはユビキチン化によって制御されていることを示しています。本研究では、前回の公募研究により確立したUBL3ケモテクノロジーを活用することで、「ユビキチン化修飾及びオートファジー制御」と「UBL3化修飾」との間のクロストーク機構を解析し、エクソソーム関連疾患に有効な薬剤探索に繋げることを目指します。



関連する代表的な論文・

- Ageta, H., Tsuchida, K., (2019) Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs. *Cell Mol Life Sci* 24, 4829-4848. doi: 10.1007/s00018-019-03246-7
- Ageta, H., Ageta-Ishihara, N., Hitachi, K., Karayel, O., Onouchi, T., Yamaguchi, H., Kahyo, T., Hatanaka, K., Ikegami, K., Yoshioka, Y., Nakamura, K., Kosaka, N., Nakatani, M., Uezumi, A., Ide, T., Tsutsumi, Y., Sugimura, H., Kinoshita, M., Ochiya, T., Mann, M., *Setou, M., and *Tsuchida, K. (2018) A novel UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. *Nat. Commun* 9, 3936. doi: 10.1038/s41467-018-06197-y.
- Ikeda, D., <u>Ageta, H.</u>, Tsuchida, K., and "Yamada, H. (2013) iTRAO-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis. *Biomarkers*. 18(7), 565-72. doi: 10.3109/1354750X.2013.810667.
- Ageta, H., Ikegami, S., Miura, M., Masuda, M., Migishima, R., Hino, T., Takashima, N., Murayama, A., Sugino, H., Setou, M., Kida, S., Yokoyama, M., Hasegawa, Y., Tsuchida, K., Aosaki, T., and *Inokuchi, K. (2010) Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. Learn Mem. 23, 17(4):176-85. doi: 10.1101/lm.16659010.
- Ageta, H., Kato, A., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Isojima, Y., and "Sugiyama, H. (2001) Regulation of the level of Vesl-15/Homer-1a proteins by ubiquitin-proteasome proteolytic systems. *J Biol Chem.* 11:276(19):15893-7.

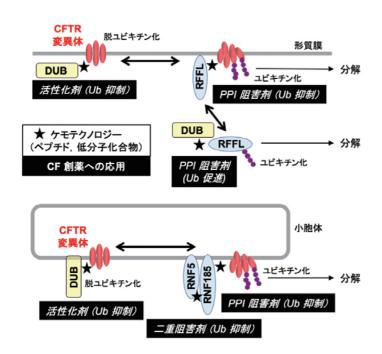




嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis; CF) は呼吸器系を侵す単一遺 伝病で、世界に8万人の患者が存在する指定難病です(平均寿命 40歳)。CF の原因は、形質膜の塩素イオンチャネル CFTR の遺伝 子変異 (ΔF508 変異) に起因した CFTR タンパク質の形質膜発 現低下です。近年、ΔF508-CFTR の形質膜移行を促進する CF 治 療薬が上市されましたが、その治療効果が弱く、有効な CF 薬物療 法の確立には形質膜で CFTR を安定化する CFTR スタビライ ザーの開発が望まれています。我々は形質膜からの ΔF508-CFTR 分解を促進するユビキチンリガーゼ (E3) RFFLがCFの新規治療 標的分子であること (Dev Cell 2018)、同定したRFFLリガンドが RFFL-CFTR 相互作用 (PPI) と ΔF508-CFTR 形質膜分解を阻 害することを発見しました。また、ΔF508-CFTR の小胞体関連分 解に関与するE3リガーゼ RNF5. RNF185ダブルノックダウン (KD) が ΔF508-CFTR小胞体関連分解を劇的に阻害し、CF治療

剤の有効性を増強すること、さらに、ケミカルアレイスクリーニング によりRNF5及びRNF185に結合するリガンド化合物を発見しまし た。そこで本研究では、CFTR 関連 E3 である RFFL, RNF5, RNF185リガンド化合物から特異的阻害剤を同定し、CF患者気道 上皮初代培養細胞 (CF-HBE, 前臨床最終評価系) 等における有 効性評価からCF治療剤の開発を進めます。

我々は脱ユビキチン化酵素 (DUB) 網羅的スクリーニングにより、 ΔF508-CFTR 形質膜発現を制御するDUBを見出しました。これ らのDUBは ΔF508-CFTRと結合するもの、CFTR 関連 E3 であ る RFFLと結合するものが含まれていました。そこで本研究では、 CFTR-DUB 及び RFFL-DUB 相互作用を低分子化合物等で制御 するケモテクノロジーを開発し、タンパク質品質管理における E3-DUB 複合体の機能解明と共に、DUB を標的とした新規CF治 療法の開発を目指します。

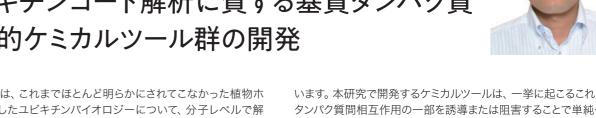


関連する代表的な論文

- 1. Fukuda R, *Okiyoneda T. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Ubiquitylation as a Novel Pharmaceutical Target for Cystic Fibrosis. Pharmaceuticals (Basel). 2020 Apr 22:13(4):75, doi: 10.3390/ph13040075, Review.
- 2. Sakai R, Fukuda R, Unida S, Aki M, Ono Y, Endo A Kusumi S, Koga D, Fukushima T, Komada M, *Okiyoneda T. The integral function of the endocytic recycling compartment is regulated by RFFL-mediated ubiquitylation of Rab11 effectors. J Cell Sci. 2019 Feb 7;132(3). doi: 10.1242/jcs.228007.
- 3. *Okiyoneda T, Veit G, Sakai R, Aki M, Fujihara T Higashi M, Susuki-Miyata S, Miyata M, Fukuda N, Yoshida A, Xu H, Apaja PM, Lukacs GL. Chaperone-Independent Peripheral Quality Control of CFTR by RFFL E3 Ligase. Dev Cell. 2018 Mar 26;44 (6):694-708 e7 doi: 10.1016/j.devcel.2018.02.001
- 4. Bagdany M, Veit G, Fukuda R, Avramescu RG, Okiyoneda T, Baaklini I, Singh J, Sovak G, Xu H, Apaia PM, Sattin S, Beitel LK, Roldan A, Colombo G Balch W. Young JC. *Lukacs GL. Chaperones rescue the energetic landscape of mutant CFTR at single molecule and in cell. Nat Commun. 2017 Aug 30:8 (1):398. doi: 10.1038/s41467-017-00444-4.
- Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, Roldan A, Verkman AS, Kurth M, Simon A, Hegedus T, Beekman JM, *Lukacs GL. Mechanism-based corrector combination restores Δ F508-CFTR folding and function. Nat Chem Biol. 2013 Jul-9(7):444-54 doi: 10.1038/nchembio.1253

公募研究

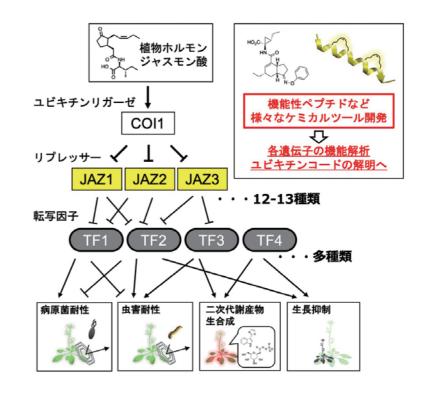
ユビキチンコード解析に資する基質タンパク質 選択的ケミカルツール群の開発



本研究では、これまでほとんど明らかにされてこなかった植物ホ ルモンを介したユビキチンバイオロジーについて、分子レベルで解 析・制御するための新規ケモテクノロジーを開発します。具体的に は、植物ホルモン受容体のユビキチンリガーゼと基質タンパク質で ある転写リプレッサー間、およびリプレッサーと転写因子間の相互 作用を制御する小分子・ペプチド型ケミカルツールを開発します。 例えば植物の生長と防御を司る植物ホルモンのジャスモン酸 (JA-IIe) は、ユビキチンリガーゼのF-boxタンパク質COI1と、転写 リプレッサー JAZとの相互作用を誘起するmolecular glueとして 機能します。JAZがJA-lleを介してユビキチン化を受け分解されると、 もともとJAZが抑制していた転写因子の抑制が解除されて、生長抑 制や防御応答などの様々な応答を引き起こします。高等植物では JAZには12種類以上、転写因子にはそれ以上の種類が発現してお り、その制御メカニズムは非常に複雑で、不明な点が多く残されて

います。本研究で開発するケミカルツールは、一挙に起こるこれらの タンパク質問相互作用の一部を誘導または阻害することで単純化さ せ、JAZのユビキチン化パターンの解析や、JAZが制御する転写因 子それぞれの機能の解析に繋げます。

これまでに我々は、COI1-JAZサブタイプ選択的リガンドの開発や、 COI1-JAZ共受容体とリガンドとの親和性を定量評価する方法論の 開発、及びJAZ-転写因子間の相互作用を制御するステープルペプ チドの開発などに成功し、実際にモデル植物体内でこれらのツール が機能することを実証してきました。今後はこれらのツールを拡充す ることで、JAZタンパク質の関わる生理現象(ユビキチンコード解析 や各種転写因子の活性制御など)の解明を目指し、植物ホルモンの ユビキチンバイオロジーと機能との相関関係を明らかにしたいと考 えています。



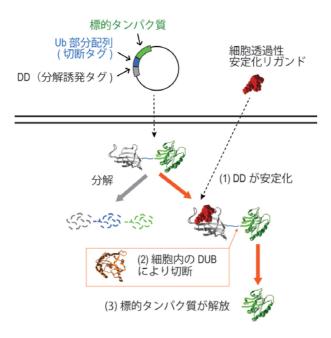
関連する代表的な論文・

- 1. Suzuki, K., Takaoka, Y.*, Ueda, M.* Rational design of a stapled JAZ9 peptide inhibiting protein-protein nteraction of a plant transcription factor. RSC Chem. Biol., 2, 499-502 (2021).
- 2. Takeuchi, J., Fukui, K., Seto, Y., Takaoka, Y.*, Okamoto, M.* Ligand-receptor interactions in plant hormone signaling, Plant J., 105, 290-306 (2021) (Review Article).
- Takaoka, Y.*, Nagumo, K., Azizah, I. N., Oura, S., Iwahashi, M., Kato, N., *Ueda, M., A Comprehensive in vitro fluorescence anisotropy assay system for screening ligands of the jasmonate COI1-JAZ co-receptor in plants. J. Biol. Chem. 294, 5075-5081
- 4. Takaoka, Y., Iwahashi, M., Chini, A., Saito, H., Ishimaru, Y., Egoshi, S., Kato, N., Tanaka, M., Bashir K., Seki, M., Solano, R., Ueda*, M., A rationally designed JAZ subtype-selective agonist of jasmonate perception. Nat. Commun. 9, 3654 (2018).
- 5. Takaoka, Y., Uchinomiya, S., Kobayashi, D., Endo, M., Hayashi, T., Fukuyama, Y., Hayasaka, H., Miyasaka, M., Ueda, T., Shimada, I., *Hamachi, I. Endogenous Membrane Receptor Labeling by Reactive Cytokines and Growth Factors to Chase Their Dynamics in Live Cells Chem 4 1451-1464

脱ユビキチン化酵素の切断機構を活用した 細胞内タンパク質発現制御法の開発

細胞内の標的タンパク質 (protein-of-interest: POI) の安定性 や機能を制御するための技術は、基礎生物学や医学における強力 な分子ツールです。近年POIをコードする遺伝子配列のいずれかの 末端部位に、分解を誘発するポリペプチド (degron: デグロン) を 遺伝子工学的に付加し、デグロンを融合したタンパク質の発現のオ ンオフを、化合物や光の照射により制御する化学的手法が開発され ています。これらの手法は、RNAiやCre/loxPシステムと異なり、翻 訳後レベルで制御できるため、刺激後30分から1時間以内に発現 の制御が可能な利点があります。しかし、現在までに報告されてい るデグロン法のほとんどが、POIに対してデグロンタグ(25~100 アミノ酸残基前後)を恒久的に融合させる必要があり、タンパク質 の種類によっては、本来有する分子機能を損ねる可能性が指摘され ていました。

本研究では、私たちが独自に見出した、脱ユビキチン化酵素 (deubiquitinase: DUB) の基質配列の改変による切断速度の調 節現象と、小分子化合物に応答するデグロン分子を組み合わせた 新たな方法論を構築し、次世代型のタンパク質発現制御ツールの 確立を目指します。具体的には、共同研究者であるWandlessらが 開発した小分子応答性デグロンであるdestabilizing domain (DD)のC末端とPOIのN末端の間に、DUBによる緩やかな切断を 受けるユビキチン (Ub) の部分配列を「切断タグ」として挿入した 融合タンパク質を用います。この融合タンパク質は、細胞内に発現さ せるとDDの不安定性により速やかに分解されます。一方、DDに結 合する安定化リガンドを添加することにより、DDの構造が安定化さ れた後、次いで細胞内のDUBによりPOIが切断タグのC末端から切 断され、タグから解放されます(図参照)。これにより、POIの発現 量を、細胞が本来有するありのままの姿で制御することが可能にな ると考えられます。本研究では、切断タグとしてのUb部分配列の最 適化を行った後、制御可能なタンパク質の種類等を検証し、標的タ ンパク質発現制御法としての基本的性能を明らかにします。さらに、 ゲノム編集技術を用いて内在性タンパク質制御への適用を目指すと ともに、キメラ抗原受容体の発現制御を試行し、免疫療法への応用 可能性を検証します。



本研究の概要

関連する代表的な論文

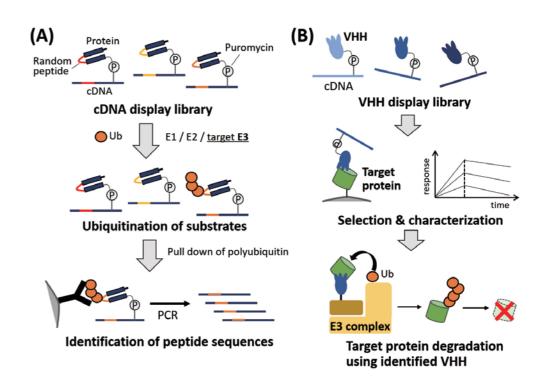
- Miyamae, Y., Chen, L.C., Utsugi, Y., Farrants, H. *Wandless, T. J. (2020) A method for conditional regulation of protein stability in native or near-native form. Cell Chem. Biol. 27, 1-9. doi: 10.1016/i.chembiol.2020.09.004.
- 2. Ohtera, A., *Miyamae, Y., Yoshida, K., Maejima, K., Akita, T., Kakizuka, A., Irie, K., Masuda, S., Kambe T., *Nagao, M. (2015) Identification of a new type of covalent PPARv agonist using a ligand-linking strategy. ACS Chem. Biol. 10, 2794-2804, doi: 10.1021/acschembio.5b00628.
- 3. *Miyamae, Y., Nishito, Y., Nakai, N., Nagumo, Y., Usui, T., Masuda, S., Kambe, T., *Nagao, M. (2016) Tetrandrine induces lipid accumulation through blockade of autophagy in a hepatic stellate cell line Biochem. Biophys. Res. Commun. 477, 40-46. doi 10 1016/i bbrc 2016 06 018
- 4. Utsugi, Y., Kobuchi, H., Kawamura, Y., Atito, A.S.A. Nagao, M., Isoda, H., *Miyamae, Y. (2019) Importance of the proximity and orientation of ligand-linkage to the design of cinnamate-GW9662 hybrid compounds as covalent PPARy agonists. Molecules 24, 2019, doi 10.3390/molecules24102019
- 5. Kurata, M., Fujiwara, N., Fujita, K., Yamanaka, Y. Seno, S., Kobayashi, H., Miyamae, Y.; Takahashi, N., Shibuva, M., *Masuda, S. (2019) Food-derived compounds apigenin and luteolin modulate mRNA splicing of introns with weak splice sites. iScience 22 336-352 doi: 10 1016/i isci 2019 11 033

進化分子工学によるユビキチン化酵素基質の 同定と選択的タンパク質分解法の開発

近年、ユビキチンによる細胞内タンパク質の修飾が想像以上に多 様性に富むことが明らかになりつつあります。しかしその多様性の源 泉である多種多様なユビキチンリガーゼ (E3) の基質特異性に関す る知見は未だ不十分です。そこで本研究では、研究代表者が近年取 り組んでいるペプチド進化分子工学、特にcDNA display法 (= ピューロマイシンDNAリンカーを介してペプチドとそれをコードする cDNAを1分子レベルで共有結合させる技術)を活用して、「特定の E3に選択的に認識・分解されるペプチド配列の網羅的探索」を目 指します。具体的にはランダム化したペプチド配列を含むモデルタン パク質を無細胞翻訳系によってcDNA displayへと変換し、標的と なるE3を含むユビキチン化酵素系中でインキュベーションします。そ の後、ユビキチン化されたcDNA display分子をアフィニティー精製 してPCRを行い、次世代シークエンサーで配列解析を実施する事で、 標的E3がどのペプチドを基質とするのかを網羅的に調べます(図1 左)。こうして得られたペプチドの情報は、内在性基質の同定や、条 件選択的なタンパク質分解技術の開発に繋がると考えられます。

本研究ではまた、「標的タンパク質に結合する新規VHH (=ラク ダ科動物に由来する単一ドメイン抗体) の獲得と、タンパク質分解 誘導への応用」にも取り組みます。PROTACやSNIPERなどの人工 分子を用いた標的タンパク質のユビキチン化と選択的分解(プロテ インノックダウン) は創薬の新たな方法論として注目を集めています が、標的に対する低分子リガンドが未知の場合には分解誘導が難し いという課題もあります。VHHは一般的な抗体よりサイズが小さく 細胞内でも利用できる上、cDNA displayを始めとする進化分子工 学やタンパク質工学の対象としても適しています。本研究ではまず、 VHHの大規模ライブラリーから試験管内淘汰によって細胞内標的 タンパク質に結合する分子を探索します。こうして得られた人工抗体 を認識部位として用いれば、任意のタンパク質に対するノックダウン ができるはずです(図1右)。さらに、VHHに光応答性や低分子応 答性を付与する研究と組み合わせることで、最終的には刺激に応答 して可逆的にタンパク質分解を制御することも可能になると期待さ れます。

研究代表者 寺井 琢也



関連する代表的な論文

- *Terai, T., Koike, T., and *Nemoto, N. (2020) Photocrosslinking of cDNA Display Molecules with Their Target Proteins as a New Strategy for Peptide Selection. Molecules 25, 1472. doi: 10.3390/molecules25061472
- 2. Jayathilake , C., Kumachi, S., Arai, H., Motohashi, M., Terai, T., Murakami, A., and *Nemoto, N. (2020) In vitro selection of anti-gliadin single-domain antibodies from a naïve library for cDNA-display mediated immuno-PCR. Anal. Biochem. 589, 113490, doi 10.1016/j.ab.2019.113490
- 3. *Terai, T., Anzai, H., and *Nemoto, N. (2019) Selection of Peptides that Associate with Dye-Conjugated Solid Surfaces in a pH-Dependent Manner Using cDNA Display. ACS Omega 4, 7378-7384. doi: 10.1021/acsomega.9b00631
- 4. Kobayashi, S., <u>Terai, T.</u>, Yoshikawa, Y., Ohkawa, R., Ebihara, M., Hayashi, M., Takiguchi, K., and *Nemoto, N. (2017) In vitro selection of random peptides against artificial lipid bilayers; a potential tool to immobilize molecules on membranes. Chem Commun. 53, 3458-3461. doi: 10.1039/C7CC00099E
- <u>寺井琢也</u>、熊地重文、*根本直人、cDNA display 法 ーーー によるペプチドスクリーニング技術 (2017)、**『ペプチド** 医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術』(技術 情報協会編)、pp. 40-49.

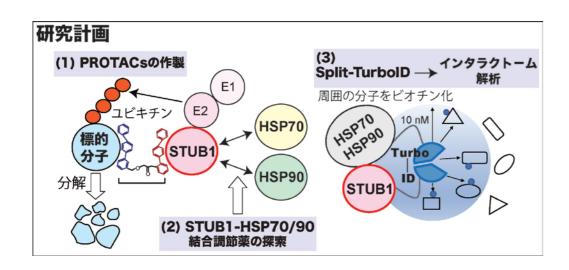
シャペロン介在型 E3 リガーゼ STUB1 を軸としたプロテオスタシス調節薬の開発

細胞内のプロテオスタシスは、タンパク質の合成、フォールディング、分解のバランスによって保たれています。HSP70やHSP90などの熱ショックタンパク質は、分子シャペロンとして様々なタンパク質のフォールディングを介助し、プロテオスタシスの維持に貢献しています。また、E3ユビキチンリガーゼSTUB1は、フォールディングに失敗したタンパク質をユビキチン化し、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解を誘導する役割を担っています。私達は以前に、造血系転写因子RUNX1をユビキチン化して分解するE3リガーゼとしてSTUB1を同定し、以後STUB1を軸とした創薬研究を進めてきました。これまでに、バーチャルスクリーニング及びサーマルシフトアッセイを行い、低濃度でSTUB1に結合する複数の化合物を同定しました。また、STUB1と熱ショックタンパク質との複雑な協調作用について解析を進めています。

公募研究

本研究では、これまでに同定したSTUB1 結合化合物を活用して、STUB1 による標的分子の分解を誘導するProteolysis Targeting

Chimera (PROTACs)の作製を目指します。PROTACsの作製には これまでE3リガーゼVHLやCRBNが使用されてきましたが、元々 様々なタンパク質の品質管理を請け負っているSTUB1を活用した PROTACsを開発できれば、より生理的かつ効果的に標的タンパク の分解を誘導できる可能性があります。また、STUB1とHSP70、 HSP90の結合を検出するコムギ無細胞AlphaScreenを確立し、 HSP70、HSP90との結合を阻害、もしくは増強する化合物を探索 します。このような化合物は、細胞内でSTUB1の機能を調節する 効果を持つことが期待されます。さらに、周囲の分子をビオチン化す るリガーゼTurbolDを分割し、2分子が相互作用した時のみ働く Split-TurbolDの手法を用いて、STUB1-HSP70 複合体および STUB1-HSP90複合体のインタラクト-ム解析を行います。これに より、それぞれの複合体が持つ機能の類似点および相違点を明らか にすることができます。以上の結果を統合して、シャペロン介在型 E3リガーゼSTUB1を軸とした新しいプロテオスタシス調節薬の開 発を目指したいと思います。



核酸高次構造を反応場とする ユビキチンプロテアソーム誘導分子の開発

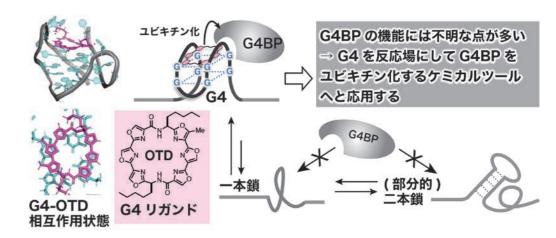
グアニン四重鎖 (G4) はグアニンリッチな配列モチーフで形成される核酸高次構造です。G4形成配列は染色体末端のテロメア、遺伝子プロモーター、RNAの非翻訳領域等で見出され、特にRNAG4は翻訳、スプライシング、細胞内局在等に関わることが示唆されています。生体内環境においてG4は動的な立体構造であり、一本鎖、部分的な二本鎖と共に平衡状態にあります。G4結合タンパク質 (G4 Binding Protein: G4BP) や低分子 (G4リガンド) との結合によってG4は形成へと平衡が移動することが知られています(図)。G4は核酸の配列ではなく「立体構造」に基づいて生物学的機能を発現するため、次世代型創薬標的や生命現象の新たな調節因子として注目を集めています。

公募研究

RNAは相補鎖がないのでG4が形成されやすいと考えられ、G4 ヘリカーゼDHX 9、スプライシングに関与するhnRNP、RNAの安定性と局在に関与するnucleolin等、これまでに約20種類のG4BPが同定されています。G4BPは動的なG4と協調して細胞機能をトランジェントに調節していると考えられますが、その報告の多くは無細胞系におけるG4オリゴRNAとの結合試験にとどまり、生細胞内で

G4と結合することにより発現される機能はほとんど未解明です。RNA-タンパク相互作用は細胞機能に大きな影響を及ぼしますが、タンパク質間相互作用と比べて研究手法が確立されていません。そこで、我々がこれまでに開発してきたG4リガンドを用いればG4-PROTACによるG4 BPのユビキチン化とそれに伴うプロテアソーム分解を基盤に、RNA-タンパク相互作用解析の新たな研究ツールを開発できると考えられます。

本研究ではまず、独自のG4リガンドであるOTD、LCO、BBR類の3種にアジド基を導入したアジドG4リガンドとE3リガンドを様々なリンカーを介して合成化学的に連結し、G4-PROTACsを合成します。次に、入手容易なG4BPとRNA G4との組み合わせによって、G4を反応場としたユビキチン化反応を検証します。最終的にはG4-PROTACsを培養細胞に作用させ、G4BPがG4上で実際にユビキチン化され、ケミカルノックアウトを受けるかを評価します。これにより、G4BPの機能解明ツールG4-PROTACの開発へとつなげる予定です。



G4リガンド (OTD) をG4-PROTACへと構造展開しG4BPをユビキチン化させるケミカルプローブの概念図

関連する代表的な論文

- . Hayashi Y, *Goyama S, Liu X, Tamura M, Asada S, Tanaka Y, Fukuyama T, Wunderlich M, O' Brien E, Mizukawa B, Yamazaki S, Matsumoto A, Yamasaki S, Shibata T, Matsuda K, Sashida G, Takizawa H, *Kitamura T. Antitumor immunity augments the therapeutic effects of p53 activation on acute myeloid leukemia. *Nature Communications* 10(1): 4869 (2019). doi: 10.1038/s41467-019-12555-1.
- Yonezawa T, Takahashi H, Shikata S, Liu X, Tamura M, Asada S, Fukushima T, Fukuyama T, Tanaka Y, Sawasaki T, Kitamura T, "Goyama S. The ubiquitin ligase STUB1 regulates stability and activity of RUNX1 and RUNX1-RUNX1T1. Journal of Biological Chemistry 292(30): 12528-12541 (2017). doi: 10.1074/ibc.M117.785675.
- Goyama S. Schibler J, Cunningham L, Zhang Y, Rao Y, Nishimoto N, Nakagawa M, Olsson A, Wunderlich M, Link KA, Mizukawa B, Grimes HL, Kurokawa M, Liu PP, Huang G, "Mulloy JC. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation* 123(9): 3876-88 (2013). doi: 10.1172/JCI68557.
- Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M, Sato T, Ichikawa M, Ogawa S, Chiba S, *Kurokawa M. Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell* 3(2): 207-220 (2008). doi: 10.1016/j.stem.2008.06.002.
- Goyama S., Wunderlich M, *Mulloy JC. Xenograft models for normal and malignant stem cells. *Blood* 125(17): 2630-2640 (2015). doi: 10.1182/blood-2014-11-570218.

関連する代表的な論文・

- Sasaki, S., Ma, Y., Ishizuka, T. Bao, H.L., Hirokawa, T., Xu, Y., <u>Tera. M.</u>, and *Nagasawa, K. (2020) Linear consecutive hexaoxazoles as G4 ligands inducing chair-type anti-parallel topology of a telomeric G-quadruplex. *RSC Adv.* 10, 43319–43323. doi: 10.1039/D0RA09413G
- Yasuda, M., Ma, Y., Okabe, S., Wakabayashi, Y., Dongdong, S., Young-Tae, C., Seimiya, H., *Tera, M., and *Nagasawa, K. (2020) Target identification of a macrocyclic hexaoxazole G-quadruplex ligand using a post-target-binding visualization. Chem. Commun., 58, 12905-12908. doi: 10.1039/D0CC04957C
- *<u>Tera. M.</u>, and Luedtke, N. W. (2020) Cross-Linking Cellular Nucleic Acids via a Target-Directing Double Click Reagent. *Meth. Enzymol.*, 641, 433–457. doi: 10.1016/bs.mie.2020.04.048
- Tera, M., and *Luedtke, N. W. (2019)
 Three-Component Bioorthogonal Reactions on Cellular DNA and RNA. *Bioconjug. Chem.*, 30, 2991-2997. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00630
- Tera, M., Harati-Taji, Z., and *Luedtke, N. W. (2018) Intercalation-Enhanced "Click" Crosslinking of DNA. Angew. Chem. Int. Ed., 57, 15405-15409. doi: 10.1002/anie.201808054

https://wwp.shizuoka.ac.jp/tenarumi/

http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioanal2/index.html

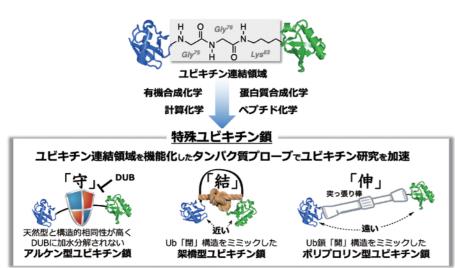
ユビキチン鎖の空間配向制御を指向した ケモテクノロジーの開発

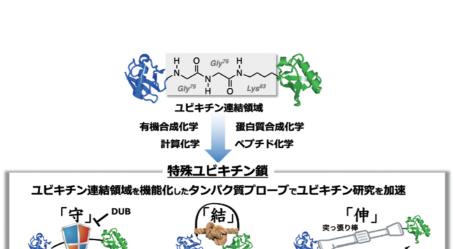
ユビキチンはC末端グリシン残基が、他のユビキチンのリジン側鎖 とイソペプチド結合を形成することでユビキチン鎖を形成し、多種多 様な生命現象に関与します。このイソペプチド結合を含む2つのグリ シン残基とリジン側鎖からなるユビキチン連結領域は、N末端連結 型を除く、全てのユビキチン鎖に含まれる共通構造であり、脱ユビキ チン化酵素の認識部位ともなることから、ユビキチン鎖の構造や機 能を制御する重要な構造因子です。

近年、化学合成したユビキチン鎖をタンパク質プローブとするユビ キチン研究が盛んに行われています。しかし、化学合成したユビキチ ン鎖の多くは、本来のユビキチン連結領域とは全く異なる構造であ るため、天然のユビキチン鎖が取りうる空間配向性やダイナミクス、 それらに起因するユビキチン認識を正確に解析することは容易では ありません。また、数種類の非天然型ユビキチン同士を比較した例 は皆無であり、ユビキチン連結領域の構造の違いがユビキチン認識 に与える影響は、ユビキチン化を起点とする生命現象に影響を及ぼ す可能性があります。

これまでに私たちは、タンパク質の普遍的な共通構造であるペプ チド結合に着目し、これらを有機化学的に改変した機能性分子を開 発し、アミノ酸やペプチドをモダリティとする創薬研究を進めてきま した。なかでも、酵素によって容易に加水分解されるペプチド結合 を、結合の長さと角度がよく似た炭素-炭素二重結合に置換したア ルケン型ペプチド結合等価体を中心に研究を進め、化学合成法を 確立するとともに、様々な生理活性ペプチドに応用することで、加水 分解耐性やアミド配座制御能を付与したペプチドミメティックを創 出してきました。最近では、これら分子技術をタンパク質の機能解 明に応用すべく、タンパク質化学合成との融合研究を進めています。

本研究では、ユビキチン鎖の構造や機能を制御するユビキチン連 結領域に着目して、有機化学的手法ならびに計算化学的手法をも とに高機能化したタンパク質プローブ「特殊ユビキチン鎖」を創製す ることで、ユビキチンの作動機構の理解を加速化するケモテクノロ ジーの創出を目指します。





タンパク質化学合成と進化分子工学を 活用したユビキチンケモテクノロジーの創出

タンパク質の作製は培養細胞を用いた遺伝子工学的手法でなさ れることが一般的ですが、近年は有機化学的にタンパク質を作製す る技術「タンパク質化学合成法」でも作れるようになってきました。 これは、固相担体上でアミノ酸を一つずつ伸長させて数十残基のペ プチドを作る「ペプチド固相合成」と、合成したペプチド同士を繋ぎ 合わせる「ペプチド連結反応」の発展による結果だと言えます。ペブ チド固相合成では、導入可能なアミノ酸の種類がとても多いため、 遺伝子工学法では作ることが困難なタンパク質(例えば、翻訳後修 飾を持つものや蛍光色素などの機能性分子が導入されたもの)を、 化学合成法では作ることができます。これまでに我々の研究グルー プでは、タンパク質化学合成法をより洗練された技術へと昇華させ るための分子技術の開発、および化学合成法を用いた修飾タンパク 質の作製とその機能解析を行ってきました。また、近年我々の研究 グループでは標的タンパク質に結合する人工抗体を取得する技術の 開発も行っており、ユビキチンやその他のユビキチン関連タンパク質 に結合する抗体クローンの取得に成功しています。

公募研究

本研究ではユビキチン生物学の発展に寄与するケモテクノロジー として、遺伝子工学的手法では作製困難なユビキチン化タンパク質 の化学合成を行います。さらに進化分子工学的手法を融合し、合成

タンパク質合成技術

したユビキチン化タンパク質やユビキチン関連因子に選択的に結合 する人工抗体の取得を行います。合成したユビキチン化タンパク質 や取得した人工抗体は領域内外の研究者に提供し、生化学解析や 構造解析、細胞生物学解析などを行うことで、本領域の発展に貢

1. ユビキチン化タンパク質の効率的合成法の開発

化学合成法では、標的とするタンパク質が大きいほどペプチド連 結反応の回数が増加し、それに伴って精製回数が増加するため、合 成収率および効率の低下が問題となります。そこで本研究では、私 たちがこれまでに開発してきた効率的one-potペプチド連結法をさ らに発展させ、標的とするユビキチン化タンパク質を高効率で合成 可能な系の開発を行います。

2. ユビキチン化タンパク質・ユビキチン関連因子に結合する人工

化学合成したユビキチン化タンパク質やプロテアソーム関連因子 に結合する人工抗体を「TRAPディスプレイ法」というin vitroセレク ション技術を用いて取得します。取得した人工抗体を用いて生化学 解析や細胞内解析を行うことでユビキチン関連因子の新たな機能 解明に役立てます。

ユビキチン関連因子の阻害

タンパク質化学合成 (有機化学) in vitro セレクション (進化分子工学)

化学合成したペプチド断片 ユビキチン ペプチド連結反応 人工抗体の取得 人工抗体 ユビキチン化タンパク質 ユビキチン化タンパク質の 人工抗体を用いた

構造解析や生化学解析

関連する代表的な論文

- 1. Kyan, R., Sato, K., Mase, N., and *Narumi, T. (2020) Pendant Alkoxy Groups on N - Aryl Substitutions Drive the Efficiency of Imidazolylidene Catalysts for Homoenolate Annulation from Enal and Aldehyde. Angew. Chem. Int. Ed. 59, 19031-19036, doi: 10 1002/anie 202008631
- 2. Takano, T., *Narumi, T., Nomura, W., Furuta, T., and *Tamamura, H. Utilization of the Heavy Atom Effect for the Development of a Photosensitive 8-Azacoumarin-Type Photolabile Protecting Group (2015) Org. Lett. 17, 5372-5375. doi: 10.1021/acs.orglett.5b02720.
- 3. Kobayakawa, T., *Narumi, T., and *Tamamura, H. Remote Stereoinduction in the Organocuprate-Mediated Allylic Alkylation of Allylic em-Dichlorides: Highly Diastereoselective Synthesis of (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres. (2015) Org. Lett. 17 2302-2305 doi: 10.1021/acs.orglett.5b00611.
- Narumi, T., Takano, H., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., and *Tamamura, H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-Type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. (2014) Org. Lett. 16, 1184-1187. doi: 10.1021/ol5000583.
- Narumi, T., Hayashi, R., Tomita, K., Kobayashi, K., Tanahara, N. Ohno, H., Naito, T., Kodama, E., Matsuoka, M. *Oishi, S. and *Fujii, S. Synthesis and biological evaluation of selective CXCR4 antagonists containing alkene dipeptide isosteres, (2009) Ora. Biomol. Chem. 8, 616-621, doi: 10.1039/B917236.I

- 1. Kamo, N., Kujirai, T., Kurumizaka, H., Murakami, H., *Hayashi, G., *Okamoto, A. Organoruthenium-Catalyzed Chemical Protein Synthesis to Elucidate the Functions of Epigenetic Modifications on Heterochromatin Factors. Chem. Sci. 2021 in press doi: 10.1039/d1sc00731a
- 2. Kondo, T., Iwatani, Y., Matsuoka, K., Fujino, T., Umemoto, S., Yokomaku, Y., Ishizaki, K., Kito, S., Sezaki, T., Hayashi, G., *Murakami, H. Antibody-like proteins that capture and neutralize SARS-CoV-2. Sci. Adv. 2020 6, eabd3916. doi:
- 3. Nakatsu, K.; *Hayashi, G. *Okamoto, A. Toolbox for Chemically Synthesized Histone Proteins, Curr. Op. Chem. Biol. 2020 58, 10-19. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.04.016.
- 4. Yanase, M.; Nakatsu, K.; Cardos, C. J.; Konda, Y.; *<u>Hayashi, G.</u> *Okamoto, A. Cysteinylprolyl imide (CPI) peptide: a highly reactive and easily accessible crypto-thioester for chemical protein synthesis Chem. Sci. 2019 10, 5967-5975, doi: 10.1039/c9sc00646i.
- 5. Kamo, N., Hayashi, G., *Okamoto, A. Triple Function of 4-Mercaptophenylacetic Acid Promotes One-Pot Multiple Peptide Ligation, Angew. Chem. Int. Ed. 2018 57, 16533-16537. doi: 10.1002/anie.201809765

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 細胞増殖腫瘍制御部門 講師 https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem2/



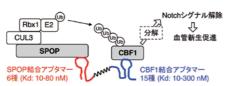
プロテインノックダウン法は、ユビキチン (Ub)-プロテアソーム経路やオートファジー経路を利用して標的タンパク質を特異的に分解する手法です。本手法は近年、細胞内タンパク質に対する分子標的創薬 (臨床応用)と標的タンパク質の機能解析ツール (基礎研究)の2つの側面から大きく注目され、加速的に研究開発が進んでいます。一方で、既存のUb-プロテアソーム経路によるプロテインノックダウン法では、利用可能なリガンドが限定的である事や特異性の低さ等が課題となっており、標的タンパク質を自由自在に強制的に分解に導くプロテインノックダウン法は未開発のままです。従って、自在なプロテインノックダウン法の確立には、Ubリガーゼと標的タンパク質のリガンドのレパートリーを飛躍的に拡充していく必要があります。

本研究において我々が利用するDNAアプタマーは、標的分子に結合する約30~70塩基の1本鎖DNAで、SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)法により開発できます。SELEX法の最大の特徴は、最初の配列ライブラリーが極めて膨大 (ランダム配列が30塩基の場合: 約10¹⁶)である点です。SELEX法を利用する事で、DNAアプタマーを高い親和性と特異性

で結合するリガンドとして短期間に高確率で取得する事ができます。即ち、標的タンパク質やUbリガーゼに結合するDNAアプタマー同士を架橋した『bivalent DNAアプタマー』は、標的タンパク質をUbリガーゼに近接させ、Ub化とその後の分解を促進し得るので、自在に標的タンパク質を分解できるプロテインノックダウン法の基盤ツールになり得ます(研究構想図)。

本研究では、我々が開発したNotchシグナル転写因子CBF1に結合するDNAアプタマーを標的タンパク質のリガンド、CUL3型Ubリガーゼ複合体の基質認識受容体であるSPOPに結合するDNAアプタマーをUbリガーゼのリガンドとし、両者を架橋したbivalent DNAアプタマーを合成します (図1)。本研究を通して、bivalent DNAアプタマーによるCBF1のUb化とタンパク質分解の促進をinvitroと細胞レベルで実証し、bivalent DNAアプタマーを新たなプロテインノックダウンの手法として確立します。更に、将来的な臨床応用を志向して、脂質ナノ粒子等を用いた高効率且つ、無毒なbivalent DNAアプタマーの細胞内導入方法を検討し、将来的な生体内へのdrug delivery systemの構築も同時に行います。





【図1】本研究の目的。CBF1を分解に導くbivalent DNAアプタマーを開発する。

本研究の学術的独自性と意義

① Ubリガーゼと標的タンパク質のリガンドを拡充でき、 既存のプロテインノックダウン法の弱点を補完。 ② 既存のリガンド(低分子化合物)と課程した 『ケミカルDNAアプタマー』への応用も可能。

脱ユビキチン化酵素を標的とした タンパク質量制御化合物の開発

公募研究

現在、キメラ化合物を用いて標的タンパク質をE3リガーゼ(E3)によって分解させるプロテインノックダウン技術として、PROTACやSNIPERの開発が精力的に行われています。しかし、これらの技術は標的タンパク質に特異的に結合する化合物の開発が難しいという問題点があり、対象となるタンパク質はまだ限定されています。そこで我々の研究で着目したのが脱ユビキチン化酵素(DUB)です。DUBはE3によってユビキチン化された標的タンパク質からユビキチンを除去する酵素で、多くのDUBが標的タンパク質をプロテアソーム分解から保護し、安定化させる役割を担っています。このDUBの活性を低分子化合物で制御することができれば、DUBによって保護されている標的タンパク質の分解誘導や、逆に更なる安定化を促進することが理論的には可能です。しかし、特定のDUBのみの活性を制御する化合物が実用化された例は非常に少ないのが現状です。その主たる要因は、DUBの酵素活性部位は構造的に保存性が高く、特異的なDUB阻害剤の開発が難しいことにあります。

我々は愛媛大学で開発したコムギ無細胞系を基盤に、in vitroで のハイスループットな薬剤探索技術を開発し、ヒトのDUBの半数を 占めるUSPファミリーのみを特異的に阻害する化合物 Subquinocinの取得に成功しています。そこで、Subquinocinを母 核に化合物展開を行い、USPファミリーに属するDUBのうち、特定 のUSPのみを選択的に機能制御できる化合物の取得を目指します。 この化合物を基盤に、DUBによるタンパク質ノックダウン技術(図 の①、②) や逆に安定化技術 (図の③) の開発が可能になると考え ました。本研究では、標的タンパク質が既に解明されており、がんや 神経変性疾患への関与が報告されているUSP15を中心に研究を 進めます。既に報告されているUSP15の結晶構造をもとに、in silico解析によるドッキングモデルと構造解析を駆使し、 SubquinocinのUSPへの特異性・結合力・阻害活性を自在に改変 した誘導体化合物をデザインし、それらを用いてUSP15やその他の USPが細胞内で標的とするタンパク質の量の制御を試みます。これ らをモデルとして、DUBを標的とした化合物によるタンパク質量制 御技術の開発を目指します。

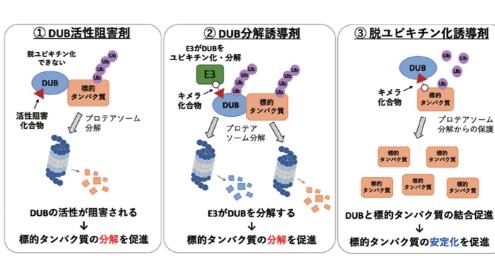


図. 本研究で目指す化合物の概要。DUBの活性阻害や、DUBのタンパク質分解を介して DUBの標的タンパク質分解を促進する化合物①,②、DUBと標的タンパク質の結合を強固にすることで、標的タンパク質を安定化する化合物③の取得を目指す。

関連する代表的な論文

- Tezuka-Kagajo, M., "Maekawa, M (co-first)., "Ogawa, A (co-first)., Hatta, Y., Ishii, E., Eguchi, M., and "Higashiyama, S. (2020) Development of human CBF1-targeting single-stranded DNA aptamers with anti-angiogenic activity in vitro. Nucleic Acid Ther. 30 (6): 365-378. doi: 10.1089/nat.2020.0875
- Watanabe, R., *Maekawa, M (co-first)., Hieda, M., Taguchi, T., Miura, N., Kikugawa, T., Saika, T., and *Higashiyama, S. (2020) SPOP is essential for DNA-protein crosslink repair in prostate cancer cells: SPOP-dependent removal of topoisomerase 2A from the topoisomerase 2A-DNA cleavage complex. *Mol. Biol. Cell.* 31 (6): 478-490. doi: 10.1091/mbc.E19-08-0456
- Murakami, A., *Maekawa, M (co-first)., Kawai, K., Nakayama, J., Araki, N., Semba, K., Taguchi, T., Kamei, Y., Takada, Y., and *Higashiyama, S. (2019) Cullin-3/KCTD10 E3 complex is essential for Rac1 activation through RhoB degradation in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci.* 110 (2): 650-661. doi: 10.1111/cas.13899
- Maekawa, M., and "Fairn, G.D. (2015)
 Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for proper transbilayer distribution of cholesterol. *J. Cell Sci.* 128 (7): 1422-1433. doi: 10.1242/jcs.164715
- Maekawa. M., Terasaka, S., Mochizuki, Y., Kawai, K., Ikeda, Y., Araki, N., Skolnik, E.Y., *Taguchi, T., and *Arai, H. (2014) Sequential breakdown of 3-phospholylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111; E978-E987. doi: 10.1073/onas.13110/29111

関連する代表的な論文・

- Yamanaka, S., Murai, H., Saito, D., Abe, G., Tokunaga, E., Iwasaki, T., <u>Takahashi, H.</u>, Takeda, H., Suzuki, T., Shibata, N., Tamura, K., Sawasaki, T. (2021) Thalidomide and its metabolite 5-hydroxythalidomide induce teratogenicity via the cereblon neo-substrate PLZF. *EMBO journal*, 40 (4):e105375. doi: 10.15252/embj.2020105375
- *<u>Takahashi, H.</u>, Yamanaka, S., Kuwada, S., Higaki, K., Kido, K., Sato, Y., Fukai, S., Tokunaga, F., and *Sawasaki, T. (2020) A human DUB protein array for clarification of linkage specificity of polyubiquitin chain and application to evaluation of its inhibitors. *Biomedicines*, 8(6): 152. doi: 10.3390/biomedicines8060152
- Yamanaka, Y., Sato, Y., Oikawa, D., Goto, E., Fukai, S., Tokunaga, F., *<u>Takahashi, H.</u>, *Sawasaki, T. (2020) Subquinocin, a small molecule inhibitor of CYLD and USP-family deubiquitinating enzymes, promotes NF-к B signaling. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2020, 524(1):1-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.049
- Uematsu, A., Kido, K., <u>Takahashi, H.</u>, Takahashi, C., Yanagihara, Y., Saeki, N., Yoshida, S., Maekawa, M., Honda, M., Kai, T., Shimizu, K., Higashiyama, S., Imai, Y., Tokunaga, F., Sawasaki, T. (2019) MIB2 E3 ubiquitin ligase enhances inflammation through degradation of the deubiquitinating enzyme CYLD. *J Biol Chem.*, 294(38) 14135–14148. doi: 10.1074/jbc.RA119.010119
- <u>Takahashi, H.</u>, Uematsu, A., Yamanaka, S., Imamura, M., Nakajima, T., Doi, K., Yasuoka, S., Takahashi, C., Takeda, H., Sawasaki, T. (2016) Establishment of a wheat cell-free synthesized protein array containing 250 of human and mouse E3 ubiquitin ligases to identify novel interaction between E3 ligases and substrate proteins. *PLoS ONE*, 11(6):e0156718. doi: 10.1371/journal.pone.0156718

名古屋市立大学大学院薬学研究科·薬化学研究室 講師

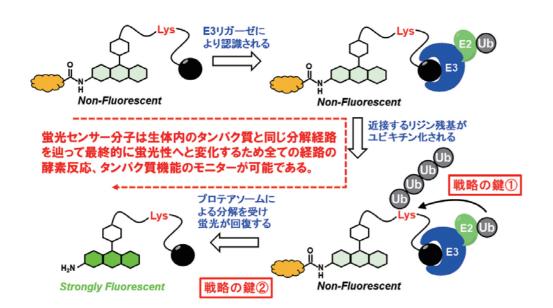
http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ykg/Yakka/index.html

プロテアソーム分解過程可視化蛍光プローブの 開発と新規プロテアソーム阻害剤の探索

プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブが抗がんとして開発・臨床応 用されて以来、プロテアソーム阻害剤の薬効、潜在性に注目が集 まっています。しかし、ボルテゾミブに耐性を示す症例も散見され るため新たな作用機序を持つプロテアソーム阻害剤の開発が切望 されています。ただ、従来のプロテアソーム阻害剤はプロテアーゼ 活性を示す20Sコア粒子中のβ1, 2, 5サブユニットを標的とするも のが多く、新たな標的タンパク質の創出が不可欠である一方で、そ れを制御する化合物を効率的に探索する術がありませんでした。

そこで、本研究では『プローブ分子自身をユビキチンープロテア ソーム経路の基質と見做し、i) ユビキチン化過程、ii) 26Sプロテア ソームへの取り込み過程、iii) プロテアソーム分解過程の全てが進 行した場合に限り蛍光性を示す』といった全く新しい検出戦略を考 案し、プロテアソーム分解過程の一部始終を一気通貫かつ生細胞 中にて観察できる「蛍光性小分子プローブ」の開発を目指します。 また、開発した蛍光プローブをin cellulo表現型スクリーニングに適 用し、これまでにない標的・作用機序を持つプロテアソーム阻害剤 を探索・開発し、抗がん剤リードとしての有効性を実証します。

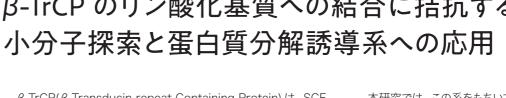
また、本研究のプローブ開発を行う中で鍵となる問いとして「ユ ビキチン化を受ける基質はタンパク質である必要があるか?」という 疑問があり、それに対する答えを得ることも目指します。即ち、従来 のユビキチン化基質はタンパク質が一般的ですが、リジン残基を持 つペプチド鎖、或いはリジン残基のみ、さらには脂肪族のアミノ基 でさえ基質として十分な可能性があります。本研究でその疑問を明 らかにすることで、ケミカルバイオロジー研究としてPROTACsを用 いた分解操作技術の応用の幅が広げられるだけでなく、生体内で ユビキチンープロテアソーム系により分解を受ける分子に関しても 視野を広げ、見直す必要性・機会を提示できる可能性があります。 さらに、これまでにない標的分子・制御小分子を明らかにできれば、 プロテアソーム創薬の幅を広げ将来的な創薬研究の成功確率を高 めることに繋がります。



関連する代表的な論文

- Nakajima, Y., *Kawaguchi, M., Ieda, N., *Nakagawa. H. (2021) A Set of Highly Sensitive Sirtuin Fluorescence Probes for Screening Small-Molecular Sirtuin Defatty-Acylase Inhibitors. ACS Med. Chem. Lett. 12 617-624 doi: 10 1021/acsmedchemlett 1c00010
- 2. *Kawaguchi, M., Okabe, T., Okudaira, S., Hama, K. Kano, K., Nishimasu, H., Nakagawa, H., Ishitani, R., Kojima, H., Nureki, O., Aoki, J. *Nagano, T. (2020) Identification of potent in vivo autotaxin inhibitors that bind to both hydrophobic pocket and channel in the catalytic domain. J. Med. Chem. 63, 3188-3204, doi 10.1021/acs.jmedchem.9b01967
- 3. Sakamoto, S., *Komatsu, T., *Watanabe, R., Zhang, Y., Inoue, T., Kawaguchi, M., Nakagawa, H., Honda, K., *Noii, H., *Urano, Y. (2020) Single enzyme activity-based protein profiling - multiplex single-molecule analysis for counting enzymes for functional identification, Sci. Adv. 6, eaav0888, doi: 10.1126/sciadv.aav0888.
- *Kawaguchi, M., Han, X., Hisada, T., Nishikawa, S., Kano, K., leda, N., Aoki, J., Toyama, T., *Nakagawa, H. (2019) Development of an ENPP1 fluorescence probe for inhibitor screening, cellular imaging and prognostic assessment of malignant breast cancer. J Med. Chem. 62, 9254-9269. doi 10.1021/acs.jmedchem.9b01213
- 5. Kawaguchi, M., leda, N., *Nakagawa, H. (2019) Development of peptide-based sirtuin defatty-acylase inhibitors identified by fluorescence probe, SFP3 that can efficiently measure defatty-acylase activity of sirtuin J. Med. Chem. 62 5434-5452 doi: 10 1021/acs imedchem 9b00315

β-TrCP のリン酸化基質への結合に拮抗する

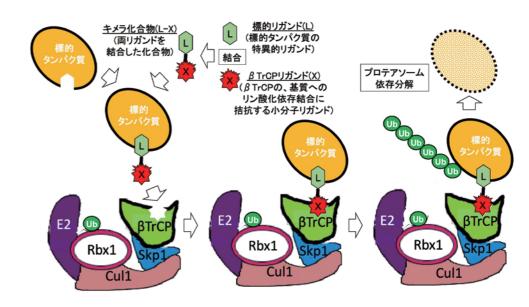


 β -TrCP(β -Transducin repeat Containing Protein) \sharp SCF 型E3ユビキチン化酵素の基質認識サブユニットF-BOXタンパク質 のひとつであり、基質のリン酸化を認識して結合します。本研究計 画では、β-TrCPの基質へのリン酸化依存結合に拮抗する小分子リ ガンドを見出し、細胞内の分解させたい標的タンパク質の特異的リ ガンドとの結合キメラ化合物を合成し、標的タンパク質をプロテア ソーム依存分解させるシステムを構築する研究を提案します。

私たちは、これまでに独自にリン酸化依存タンパク質間相互作用 阻害小分子探索系を構築し、科研費などの助成による研究で、 Plk1のPolo Boxドメイン依存結合阻害小分子、CDK阻害タンパク 質p27のSCF型E3ユビキチン化酵素SCFSKP2によるユビキチン 化を阻害する小分子、リン酸化依存にプロリンを異性化するPin1 の阻害小分子などを取得して成果を上げ、国際紙に発表すると共に ホームページなどに公表してきました。

本研究では、この系をもちいて、β-TrCPの基質へのリン酸化依存 結合に拮抗する小分子リガンドの獲得を目指します。得られるB -TrCPリガンドが特異的に β -TrCPに結合する事を検証した後、 β -TrCPリガンドと、細胞内の分解させたい標的タンパク質の特異的 リガンドを合成化学的に結合したキメラ化合物を作成します。さらに、 このキメラ化合物導入によって、分解させたい標的タンパク質が、実 際に細胞内でSCF^{β-TrCP}によってユビキチン化され、プロテアソーム 依存分解へ誘導されることを検証いたします。

本提案ではモデル系として、分解させたいタンパク質として、白血 病の原因遺伝子産物Bcr-Abl、その特異的リガンドとしてGleevec (imatinib)を選び、β-TrCPリガンドとGleevecの合成キメラ化合物 によってBcr-Ablがユビキチン化、分解されることを実証し、ユビキ チン化を利用した新たなケモテクノロジーとしてのβ-TrCPリガンド をもちいた細胞内タンパク質分解誘導系の有効性を証明します。ま た、分解させたいタンパク質としてc-Mycがん遺伝子産物にも着目 し、その特異的リガンド探索を行い、分解系への応用をめざします。



- 1. Suvarna, K., Honda, K., Muroi, M., Kondoh, Y., Osada, H., and *Watanabe, N. (2020) Measurement of ATPase activity of valosin-containing protein/p97. **Bio-protocol** 10, e3516. doi: 10 21769/BioProtoc 3516
- 2. Subedi, A., Muroi, M., Futamura, Y., Kawamura, T., Aono, H., Nishi, M., Ryo, A., *Watanabe, N., and *Osada. H. (2019) A novel inhibitor of tumorspheres revealed activation of serine biosynthetic pathway upon mitochondrial inhibition. FEBS Letters 593. . 763-776. doi: 10.1002/1873-3468.13361
- 3. Suvarna, K., Honda, K., Muroi, M., Kondoh, Y., Osada H., and *Watanabe, N. (2019) A small-molecule ligand of valosin-containing protein/p97 inhibits cancer cell-accelerated fibroblast migration. J Biol. Chem. 294 2988-2996 doi: 10 1074/jbc RA118 004741
- 4. Suvarna, K., Honda, K., Kondoh, Y., Osada H., and *Watanabe, N. (2018) Identification of a small molecule ligand of β-arrestin1 as an inhibitor of stromal fibroblast cell migration accelerated by cancer cells. Cancer Med. 7, 883-893. doi:
- *Watanabe, N, and Osada H. (2020) Small molecule inhibitors of E3 ubiquitin ligases. Drug Discovery Series No. 78 Protein-Protein Interaction Regulators (Roy, S. and Fu, H. eds.) Royal Society of Chemistry CHAPTER 5. pp.109-123. DOI 10 1039/9781788016544-00109

研究班員一覧

総括班

研究代表者

佐伯 泰 (東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野 プロジェクトリーダー) 吉田 稔 (理化学研究所・環境資源科学研究センター 副センター長)

研究分担者

内藤 幹彦 (東京大学・大学院薬学系研究科 特任教授)

岩井 一宏 (京都大学·大学院医学研究科 教授)

村田 茂穂 (東京大学・大学院薬学系研究科 教授)

出水 庸介 (国立医薬品食品衛生研究所·有機化学部 部長) 岡本 晃充 (東京大学・先端科学技術研究センター 教授)

深井 周也 (京都大学・大学院理学研究科化学専攻 教授)

研究協力者

石川 稔 (東北大学·大学院生命科学研究科 教授)

二木 中朗 (京都大学·化学研究所 教授)

山野 晃史 (東京都医学総合研究所·基礎医科学研究分野 主席研究員)

田中 啓二 (東京都医学総合研究所 理事長)

永田 和宏(川生命誌研究館 館長)

一條 秀憲 (東京大学·大学院薬学系研究科 教授)

長田 裕之 (理化学研究所・環境資源科学研究センター グループディレクター)

上杉 志成 (京都大学・化学研究所 教授)

計画研究班

A01 ケモテクノロジーによるユビキチンコードの解読と制御

ケモテクノロジーと質量分析計を活用したユビキチンコードの解読

代表 佐伯 泰 (東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野 プロジェクトリーダー) 分担 大竹 史明(星薬科大学·先端生命科学研究所 特任准教授)

ケモテクノロジーを利用したユビキチン鎖の機能解析と制御

代表 岩井 一宏 (京都大学・大学院医学研究科 教授)

分担 二木 史朗 (京都大学·化学研究所 教授)

ケモテクノロジーを利用したタンパク質分解制御

代表 村田 茂穂 (東京大学·大学院薬学系研究科 教授)

分担 山野 晃史 (東京都医学総合研究所·基礎医科学研究分野 主席研究員)

ケモテクノロジーの分子基盤を創出するユビキチン構造生物学

代表 深井 周也 (京都大学·大学院理学研究科化学専攻 教授)

A02 革新的ユビキチンケモテクノロジーの創出

ケミカルプロテインノックダウン技術の開発と細胞制御

出水 庸介 (国立医薬品食品衛生研究所·有機化学部 部長)

石川 稔 (東北大学·大学院生命科学研究科 教授)

吉田 稔 (理化学研究所・環境資源科学研究センター 副センター長) 近藤 恭光 (理化学研究所・環境資源科学研究センター 専任研究員) Pradipta Ambara (東京工業大学·物質理工学院応用化学系 助教)

代表 岡本 晃充 (東京大学・先端科学技術研究センター 教授)

公募研究班

A01 ケモテクノロジーによるユビキチンコードの解読と制御

TRIM型ユビキチンリガーゼの物性と動作原理の解析

代表 畠山 鎮次 (北海道大学·大学院医学研究院 教授)

ケモテクノロジーを活用したリボソームユビキチンコードの解読と制御

代表 松尾 芳隆 (東京大学·医科学研究所 准教授)

ユビキチンケモテクノロジーを活用した細胞生死バランス制御による疾患治療戦略の開発

代表 松沢 厚(東北大学·大学院薬学研究科 教授)

5-aza-dCTPによる新たなDNA維持メチル化制御機構の解明

代表 西山 敦哉 (東京大学·医科学研究所 准教授)

USP8の自己阻害機構の理解に基づく阻害剤開発とクッシング病治療への応用

代表 福嶋 俊明 (東京工業大学·科学技術創成研究院 助教)

酵素反応と化学反応を駆使した分岐鎖認識の構造生物学

代表 佐藤 裕介 (鳥取大学·大学院工学研究科 講師)

近接ビオチン化酵素を用いたPRTOAC依存的なインタラクトーム解析技術の開発

代表 山中 聡士 (愛媛大学・プロテオサイエンスセンター 特定研究員) ナノボディーによる標的ユビキチンリガーゼ複合体の細胞内動態の理解と応用

代表 池田 史代 (九州大学・生体防御医学研究所 教授)

ケモテクノロジーを活用したプレエンプティヴ経路特異的Ubデコーダーの標的識別機構

代表 川原 裕之(東京都立大学·理学部生命科学科 教授)

直鎖状ユビキチン代謝を制御する新規ケモテクノロジーによる疾患病態の抑制

代表 及川 大輔 (大阪市立大学・大学院医学研究科 准教授)

ユビキチン化異常を起点とする血管障害の統合的理解と創薬

代表 森戸 大介 (昭和大学·医学部 講師)

UBL3ケモテクノロジーによる、ユビキチン化とUBL3化のクロストーク機構の解析

代表 上田 洋司 (藤田医科大学·総合医学研究所 講師)

CFTR ユビキチン化制御剤の創出と CF 創薬への応用

代表 沖米田 司 (関西学院大学·生命環境学部生命医科学科 教授)

代表 内藤 幹彦 (東京大学·大学院薬学系研究科 特任教授)

伊藤 拓水 (東京医科大学·医学部 准教授)

ユビキチン機能制御のためのケミカルバイオロジー

ユビキチンコードのケミカル合成

A02 革新的ユビキチンケモテクノロジーの創出

ユビキチンコード解析に資する基質タンパク質選択的ケミカルツール群の開発 代表 高岡 洋輔 (東北大学・大学院理学研究科化学専攻 准教授)

脱ユビキチン化酵素の切断機構を活用した細胞内タンパク質発現制御法の開発 代表 宮前 友策 (筑波大学·生命環境系 准教授)

進化分子工学によるユビキチン化酵素基質の同定と選択的タンパク質分解法の開発 代表 寺井 琢也 (東京大学·大学院理学系研究科化学専攻 特任准教授)

シャペロン介在型E3リガーゼSTUB1を軸としたプロテオスタシス調節薬の開発

代表 合山 進(東京大学·新領域創成科学研究科 教授)

核酸高次構造を反応場とするユビキチンプロテアソーム誘導分子の開発 代表 寺 正行 (東京農工大学・大学院生命工学専攻 テニュアトラック准教授)

ユビキチン鎖の空間配向制御を指向したケモテクノロジーの開発 代表 鳴海 哲夫 (静岡大学·大学院総合科学技術研究科 准教授)

タンパク質化学合成と進化分子工学を活用したユビキチンケモテクノロジーの創出

代表 林 剛介 (名古屋大学·大学院工学研究科 生命分子工学専攻 准教授)

Bivalent DNAアプタマーによるプロテインノックダウン法の開発 代表 前川 大志 (愛媛大学・プロテオサイエンスセンター 講師)

脱ユビキチン化酵素を標的としたタンパク質量制御化合物の開発

代表 高橋 宏隆 (愛媛大学・プロテオサイエンスセンター 准教授)

プロテアソーム分解過程可視化蛍光プローブの開発と新規プロテアソーム阻害剤の探索

代表 川口 充康 (名古屋市立大学·大学院薬学研究科 講師) β-TrCPのリン酸化基質への結合に拮抗する小分子探索と蛋白質分解誘導系への応用

代表 渡邉 信元 (理化学研究所・環境資源科学研究センター ユニットリーダー)

ユビキチン結合タンパク質 OPTN は ATG9A ベシクルを損傷ミトコンドリア上に集積させる

山野 晃史((公財)東京都医学総合研究所主席研究員)

Critical Role of Mitochondrial Ubiquitination and the OPTN-ATG9A Axis in Mitophagy Koji Yamano, Reika Kikuchi, Waka Kojima, Ryota Hayashida, Fumika Koyano, Junko Kawawaki, Takuji

Shoda, Yosuke Demizu, Mikihiko Naito, Keiji Tanaka, Noriyuki Matsuda.

Journal of Cell Biology 219, e201912144 (2020)



背景

ミトコンドリアは真核牛物の必須オル ガネラであり、細胞のエネルギーである ATP合成を担っている。しかし、ATP合 成の代償として、ある一定の割合で活 性酸素種 (ROS) が産生される。過剰 なROSの攻撃を受けたミトコンドリア は損傷ミトコンドリアとなり、ATP合成 能の低下を招くだけでなく、更なる ROS産生を介して細胞自体の恒常性 を乱すことが知られている。マイトファ ジー(ミトコンドリア選択的オートファ ジー) はこのような損傷ミトコンドリア を選択的に分解するシステムである。 我々は、これまでPINK1とParkinが連 動して損傷ミトコンドリアの外膜にユビ キチン鎖を付加することで、マイトファ ジーを誘導することを明らかにしてき た。ユビキチンはマイトファジーのシグナ

ルとして機能し、哺乳類細胞では5種 類のオートファジーアダプター (OPTN、 NDP52、TAX1BP1、p62、NBR1)が そのシグナルをオートファジーに伝える デコーダー分子であると考えられてい る。しかし、オートファジーアダプターが どのような分子機序でオートファジー関 連因子を損傷ミトコンドリア近傍に集 積させるかは未解明な点が残されてい た。また、PINK1によって合成されるリ ン酸化ユビキチンがオートファジーシグ ナルとして直接機能する可能性も考え られていた。

結果

まず、構造的にK63鎖に類似した直 鎖状ユビキチン鎖を人為的にミトコンド リア外膜に形成させること、または SNIPER (Specific and Nongenetic

IAP-dependent Protein Eraser) で 特定のミトコンドリア外膜タンパク質に ユビキチン鎖を付加させることで、マイト ファジーが誘導できることを見出した。 これらの結果は、ミトコンドリア表面上 のユビキチン鎖がマイトファジーの必要 条件であること、PINK1によって産生さ れるリン酸化ユビキチンはParkinの活 性化に必要であるものの、オートファ ジーシグナルとして直接機能しないこと を示唆している。

次にマイトファジー誘導時における オートファジーアダプターの細胞内局在 を調べた結果、全てのオートファジーア ダプターが損傷ミトコンドリアに局在す ることがわかった。しかし、p62と NBR1 がミトコンドリア全体に局在する のに対し、OPTNとNDP52はオート ファジーの膜と損傷ミトコンドリアのコ

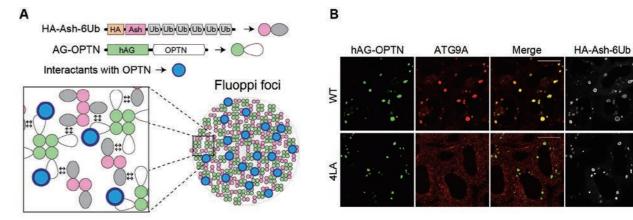


図1 Fluoppi (人工的液-液相分離) を用いた OPTN と ATG9A の相互作用解析

(A) Fluoppiシステムの概略。直鎖ユビキチン(6Ub)とOPTNの相互作用、Ashタグの多量体形成、アザミグリーン(AG)の四量体 形成が連鎖的に起こり、細胞内に液滴が形成される。

(B) OPTN-6Ubの液滴にATG9Aが集積する。OPTNのロイシンジッパー変異体(4LA)では、OPTN-6Ubの液滴は形成されるも のの、ATG9Aの集積は完全に阻害される。



図2 本研究成果はJCBに掲載されたが、2020年の全JCB論文から10報選出される「The Year in Cell Biology 2020」に選出された。また、その表紙を飾った。シアンはミトコンドリア、緑はOPTN-6Ubの液滴、オレンジはATG9Aベシクルを表している。

ンタクトサイトに集積した。

そこで、「OPTNやNDP52と相互作用 し、ユビキチン鎖をオートファジーシグナル

に変換する実態」に迫るため、タンパク質 間相互作用を蛍光輝点に変換できる Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions) システムを用いることにし た。Fluoppiは細胞内でタンパク質間相互 作用を検出する方法であり、2種類の異な るタンパク質にそれぞれ、四量体形成能を 有するアザミグリーンと多量体形成能を有 するAshタグを付加する。2種類が相互作 用する場合にのみ、細胞内で液-液相分離 による液滴が形成される。アザミグリーン をオートファジーアダプターに融合させ、 Ashタグをユビキチン鎖に融合させると、 (予想通り)細胞内で液滴が形成された。 そしてOPTNと相互作用し、OPTN液滴に 特異的に集積するオートファジー因子を探 索した結果、ATG9Aを同定することがで きた。さらに解析を進めることでOPTNの ロイシンジッパーがATG9Aとの相互作用 に必須であることがわかった。最後にマイ トファジーの活性を測定したところ、 ATG9Aと相互作用できないOPTN変異

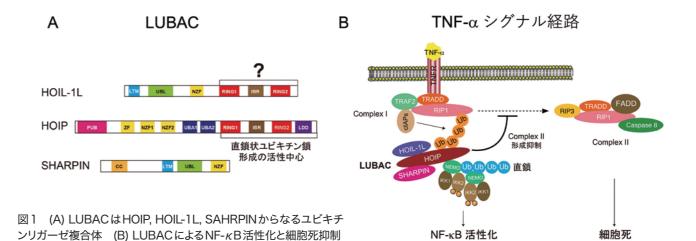
体ではマイトファジーをほとんど誘導できないことがわかった。

ATG9Aはオートファジー膜の初期形成に必須と考えられているため、本研究の結果は、マイトファジーの誘導でOPTNがATG9Aを損傷ミトコンドリア近傍に集積させ、そこで新規なオートファジー膜合成が起こっていることを示している。

今後の展望

本研究で利用したFluoppiはオートファジーアダプターの新規相互作用因子を同定するための強力なツールである。今後、他のオートファジーアダプターにもFluoppiを応用し、その相互作用因子を解析することで、多様なアダプター機能の理解を深めることができると考えている。

また、1) OPTNとATG9Aは直接相互 作用するのか、2) OPTNと直接相互作用 するキナーゼTBK1 はどのような分子機 序で活性化するのか。これらの疑問に対し てもケモユビキチンのツールをうまく活用 しながら、明らかにしていきたい。



疾患との関連も報告されており、LUBAC機能が完全に喪失したマウスは胎生致死となるが、ヒトではごく軽度LUBAC機能が残存している場合には免疫不全と自己炎症性疾患を合併した先天性疾患を発症する。それゆえ、LUBACの機能活性化は免疫不全や感染症制御薬のターゲットとなる可能性が想定されている。

図1Aに示すようにLUBACは直鎖状 ユビキチン鎖生成の活性中心を有する HOIPに加えて、HOIL-1LもE3活性を有 することが知られており、しかも進化上高 く保存されているが、その役割は不明で あった。筆者は1つのE3リガーゼ複合体 内に異なる2種のE3が存在する報告は 他になかったので興味を持ち、機能が不 明であるHOIL-1LのE3活性の機能解析 に着手した。

結 果

HOIL-1LのE3活性の機能解明をすすめるためにE3活性を消失したHOIL-1L変異体を細胞に導入したとこる、LUBACの活性中心であるHOIPによって生成される直鎖状ユビキチン鎖が著増し、細胞死抑制とNF-κB活性化機能が顕著に亢進した。よって、HOIL-1LのE3活性はLUBACの機能を抑制すると考えられた。次にその分子メカニズムの解明をすすめたとこる、HOIL-1LがLUBACのすべてのサブユニットに一つユビキチンを付け、HOIPがHOIL-1Lによって結合されたユビキチンを

認識して、LUBAC上に直鎖状ユビキチン鎖を形成することが判った。LUBACの各サブユニットが直鎖状ユビキチン化されればLUBACの機能が低下することは知られていたので、HOIL-1LのE3活性はHOIPがLUBACを直鎖状ユビキチン化する「きっかけ」を作ることでLUBACの直鎖状ユビキチン鎖生成を抑制することを明らかにした。したがって、HOIL-1LのE3活性が消失すれば、LUBACが直鎖状ユビキチン化されなくなり、LUBACの機能が活性化される。

LUBACは感染防御に関与している。 そこで、HOIL-1LのE3活性を消失してい る細胞に細胞内寄生菌であるサルモネラ菌の周囲を直鎖状ユビキチン鎖が取り囲むことで(図2A)、サルモネラ菌の増殖を抑制し(図2B)、結果HOIL-1LのE3活性の欠失は感染によって誘導される細胞死を抑制した。さらに、われわれが作製したHOIL-1LE3活性を欠損したマウスは、元気に生まれてきて発達発育も正常であるが、全身の臓器で直鎖状ユビキチン鎖が著明に増加しており、LPS/D-GalN投与で生じる急性の肝細胞死が顕著に抑制された(図2C)。またLUBACのサブユニットの1つであるSHARPINが欠損した

免疫応答と細胞死を制御する LUBAC の制御機構の解明とその応用

伏屋 康寛 (京都大学大学院医学研究科細胞機能制御学 特定助教)

発表論文:

The HOIL-1L ligase modulates immune signaling and cell death via mono-ubiquitination of LUBAC

<u>Yasuhiro Fuseya</u>, Hiroaki Fujita, Minsoo Kim, Fumiaki Ohtake, Akira Nishide, Katsuhiro Sasaki, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Ryosuke Takahashi, Kazuhiro Iwai

Nature Cell Biology 22, 663-673 (2020)



背景

直鎖状ユビキチン鎖を特異的に生成する唯一の複合体型E3リガーゼであるLUBACは直鎖状ユビキチン鎖生成の活性中心を有するHOIPと複合体の安定化に寄与するサブユニットHOIL-1L、

SHARPINから構成される(図1A)。 LUBACが生成する直鎖状ユビキチン鎖はTNF- α 等の種々の刺激依存的に、NF- κ Bの活性化や細胞死を抑制するといった細胞生存や恒常性維持に重要な役割を担っている(図1B)。近年LUBAC は赤痢菌やサルモネラ菌などの細菌感染症やウイルス感染症制御に深く関わることや、アスペルギルスは病原性因子であるグリオトキシンを分泌しLUBACを阻害することで感染を促進することも明らかとなっている。さらにLUBACの機能低下と

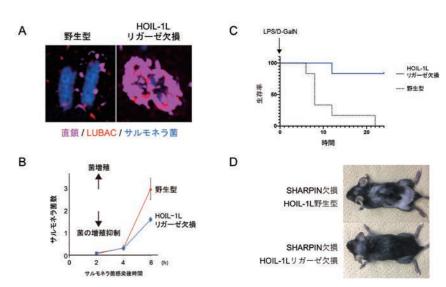


図2 (A) LUBACによるサルモネラ菌の感染制御。細胞にサルモネラ菌を感染させ、6時間後に免疫染色で評価。Structured illumination microscopy (SIM)を用いて検出 (B) サルモネラ菌感染後の細胞内でのサルモネラ菌の増殖を評価 (C) HOIL-1LのE3リガーゼ活性欠損マウスを作出し、LPS/D-GalNの腹腔内投与による生存率を評価 (D) 上段 SHARPIN欠損マウス、下段:SHARPIN欠損+HOIL-1L リガーゼ活性欠損マウス

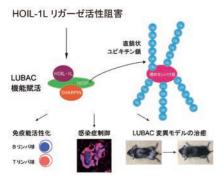


図3 HOIL-1LのE3活性阻害により、 LUBACの機能を活性化できる。

cpdmマウスはLUBACの機能低下により皮膚で細胞死が起こり、二次的に炎症が起こることで皮膚炎が生じるが、HOIL-1LのE3活性を欠失してLUBACの機能を活性化するとcpdmマウスの皮膚炎をほぼ完治できることも明らかにした(図2D)。

今後の展望

本研究によってHOIL-1LのE3活性を 欠失させれば、感染防御や免疫応答に重 要な役割を果たすLUBACの機能を活性化できることが明らかとなった(図3)。近年LUBACは赤痢菌やレジオネラ菌等の細菌に加え、種々のウイルスに対する感染抑制にも関わっていることも明らかになっている。今回のわれわれの結果をあわせるとHOIL-1LのE3活性を阻害することでLUBACの機能を活性化することができ、それは感染症や免疫不全症の治療につながる可能性もあると考え、HOIL-1LのE3活性阻害剤の開発に向けて着手している。

.....

TRIP12 は K29/K48 分岐鎖を形成して PROTAC による標的タンパク質分解を促進する

大竹 史明 (星薬科大学 先端生命科学研究所 特任准教授)

発表論文

TRIP12 promotes small molecule-induced degradation through K29/K48 branched ubiquitin chains Kaiho-Soma A, Akizuki Y, Igarashi K, Endo A, Shoda T, Kawase Y, Demizu Y, Naito M, Saeki Y, Tanaka K, Ohtake F*

Molecular Cell 81, 1-14 (2021)



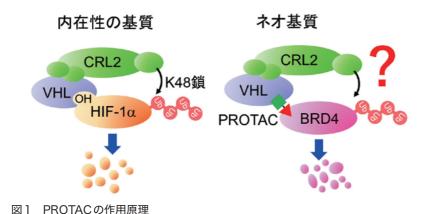
背景

近年、ユビキチン・プロテアソーム系を 利用した標的タンパク質分解 (Targeted Protein Degradation) が次世代の創薬 モダリティとして注目を集めている。標的 タンパク質分解の原理は、標的タンパク質 に対するリガンドとユビキチンリガーゼ (VHLなど) に対するリガンドとをリンカー でつないだ化合物(分解誘導剤、 PROTAC) あるいは標的タンパク質とユビ キチンリガーゼ (CRBNなど) の相互作用 を誘導する化合物(分子糊、Molecular Glue) によって両者を近接させ、標的タン パク質を強制的にユビキチン化することで 分解を誘導するものである。すなわち、細 胞が本来有しているユビキチン化機構を 「ハイジャック」すると一般には考えられて いる(図1)。これまで基礎研究レベルで

様々なPROTACによる標的タンパク質の分解誘導が報告されており、2019年には前立腺がん治療薬としてアンドロゲン受容体分解PROTACの臨床試験が開始された

しかしながら、標的タンパク質分解の詳 細なメカニズムは十分に解明されていな 基質とリガーゼの複合体形成だけでなく、多様な高次構造のポリユビキチン鎖 (ユビキチンコード)の形成、特定のポリユビキチン鎖を認識するデコーダータンパク質によるプロテアソームへの基質運搬など多段階で調節されている。そこで本研究はユ

い。ユビキチン依存的なタンパク質分解は



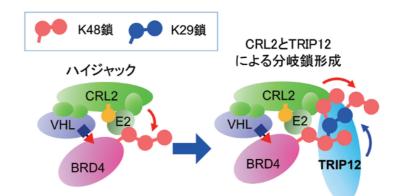


図2 TRIP12は分岐鎖を形成して標的タンパク質分解を促進する

ビキチンコードの観点から標的タンパク質 分解のメカニズム解明を試みた。

結果

標的タンパク質分解のメカニズムを解析するため、エピゲノム制御因子であるBRD4の分解誘導をモデルとして検討を行った。HT1080細胞にFLAG-BRD4を発現させ、VHL結合型PROTACであるMZ1を添加し、MZ1依存的なBRD4相互作用因子を質量分析で解析したとこる、VHLやCUL2などCRL2複合体構成因子に加えて、TRIP12を同定した。TRIP12はHECT型ユビキチンリガーゼであり、内在性BRD4とMZ1依存的に相互作用することを確認した。

そこでBRD4の標的分解への効果について検討したところ、TRIP12のノックダウンあるいはノックアウト細胞においてMZ1依存的なBRD4の分解が遅延することが判明した。一方、VHLの内在性基質であるHIF-1αの分解はTRIP12の影響を受けなかった。従って、化合物によるネオ基質の分解は、内在性基質の分解とメカニズムが異なることが示唆された。

次にTRIP12の酵素活性についてin vitro系で検討したところ、K29鎖を特異的に伸長することが判明した(なお、これまでにK29およびK48鎖選択的なE3としてUBE3Cが報告されているが、K29鎖のみに特異性を有するE3は現時点でTRIP12のみである)。そこで質量分析を用いたユビキチン鎖定量法(Ub-AQUA/

PRM)により細胞内でのユビキチン鎖形成を検討した。内在性BRD4はMZ1依存的にK48鎖とK29鎖で修飾され、TRIP12のノックダウンによってK29鎖形成は完全にキャンセルされた。興味深いことに、K48鎖の量もTRIP12のノックダウンによって減少したことから、K29鎖に依存してK48鎖が形成されていることが示唆された。脱ユビキチン化酵素によるユビキチン鎖の解析(Ubi-CRest法)からも、K29/K48混合鎖の形成が示唆された。

CRL2^{VHL}複合体は一般的にK48鎖を形成すると考えられる。そこでBRD4に対するユビキチン鎖の形成をin vitro系で解析したところ、CRL2^{VHL}複合体とTRIP12によって協調的にK29/K48混合鎖が形成されることが判明した。さらにミドルダウン質量分析の結果、CRL2^{VHL}複合体とTRIP12によって形成されるK29/K48混合鎖は分岐点を含み、K29/K48分岐鎖であることが明らかとなった。

最後に、BRD4の標的タンパク質分解によって引き起こされるがん細胞死におけるTRIP12の寄与を検討した。BRD4はアセチル化ヒストンに結合して転写を活性化するエピゲノム制御因子であり、BRD4の阻害あるいは分解ががん細胞のアポトーシスを誘導することが知られている。TRIP12を欠失するとMZ1依存的なアポトーシス誘導や細胞増殖抑制が部分的にキャンセルされることが判明した。以上の結果から、

TRIP12はPROTAC依存的にBRD4およびCRL2^{VHL}複合体にリクルートされ、K29 鎖を特異的に付加することで、CRL2^{VHL}複合体と協調的にK29/K48分岐鎖を形成し、BRD4の分解を促進するモデルが示唆された(図2)。

今後の展望

本研究により、標的タンパク質分解誘 導において形成されるユビキチンコード の一端が初めて明らかとなった。分岐鎖 はプロテアソーム依存性分解を促進する と考えられているため、PROTACによる 分岐鎖形成は分解に不利な標的基質の 分解に適していると考えられる。ただし分 岐鎖が分解を促進するメカニズムは現段 階で不明であり、今後は分岐鎖のデコー ダーを含め、分岐鎖の機能をより詳細に 解明する必要がある。またK29鎖はプロ テアソーム依存性分解への関与が示唆さ れているものの、役割は明確になっていな い。今回の知見は、K29鎖がK48鎖形成 を促進することを示唆しており、一般性の 検討は今後の課題である。

また本研究は標的タンパク質分解誘導 を特異的に促進する共役因子として TRIP12を同定した。この結果から、化合 物による標的タンパク質分解は当該ユビ キチンリガーゼが本来有しているメカニズ ムの単純なハイジャックではなく、ネオ基 質の性質によって異なる固有のメカニズ ムを有していることが示唆された。さらに、 TRIP12による標的タンパク質分解の促 進効果はCRBN結合型PROTACによる BRD4の分解や、VHL結合型PROTAC によるTRIM24の分解にも当てはまるこ とが判明した。今後は、TRIP12あるいは 未知の分岐鎖酵素が他の標的タンパク質 分解誘導剤の効果にも関与しているの か、一般性についての検討が必要である。 PROTACの作用に関与する共役因子や ユビキチンコードの解明は、将来的により 高活性な薬剤の開発に貢献することが期 待される。



ケミカルバイオロジーによる 新たなミトコンドリア病創薬標的候補の発見

小林 大貴 (東京薬科大学 助教)、 吉田 稔 (理化学研究所 グループディレクター)

Chemical reversal of abnormalities in cells carrying mitochondrial DNA mutations Hiroki Kobayashi, Hideyuki Hatakeyama, Haruna Nishimura, Mutsumi Yokota, Sadafumi Suzuki, Yuri Tomabechi, Mikako Shirouzu, Hiroyuki Osada, Masakazu Mimaki, Yu-ichi Goto, Minoru Yoshida

Nature Chemical Biology, 17, 335–343 (2021)



背景

ミトコンドリア病の病因は、核DNAト の遺伝子の変異の場合とミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常の場合がある。 mtDNAはマルチコピーであり、細胞内の 正常mtDNA / 変異mtDNAの量的変化 により機能異常が生じる。またミトコンドリ ア病患者の組織・細胞ごとに変異 mtDNAが存在する割合が異なることが明 らかになっており、ミトコンドリア病は多様 な遺伝子変異によって引き起こされる不均 一なミトコンドリア機能障害疾患の総称で

ミトコンドリア病におけるミトコンドリア 機能異常の主体は呼吸機能の低下であ り、主に筋肉や神経などエネルギーを多量 に必要とする組織で臨床症状が現れる。ま た解糖系へのエネルギー依存度が高くな るため、乳酸アシドーシスが引き起こされ る。そのため、対症療法としてミトコンドリ アでのエネルギー産生を補強する目的で、 水溶性ビタミン類 (ナイアシン、B1、B2、リ ポ酸、ビオチンなど) やカルニチン、コエン ザイムQ10等が用いられる。また遺伝子 変異による不完全な呼吸鎖から発生する 活性酸素種 (ROS) が細胞にダメージを与 えることも問題とされており、抗酸化作用 を持つ複数の治療薬候補の有効性や安全 性が臨床試験で試されている。しかし、残 念ながら根本的な治療法はまだ確立され ていない。そこでわれわれはケミカルバイ オロジーの手法により、ミトコンドリア病の 新たな治療標的を見いだすことを目的に 本研究を実施した。

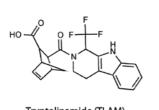
結 果

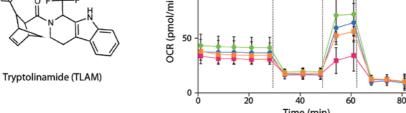
新規エネルギー代謝制御物質の探索・同定

ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ阻害剤 ジクロロ酢酸は、ピルビン酸脱水素酵素 の活性化を介し、低下したエネルギー (ATP) 生産性を回復させ、かつ解糖系の 最終産物であり、乳酸アシドーシスの原 因となる乳酸の生産量を減少させる。この ため、ミトコンドリア病のひとつである MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) の患者の治療に 使用されたが、毒性がみられたため現在 ではほとんど使用されない。われわれは毒 性が低く、ジクロロ酢酸のように解糖系へ のエネルギー依存度が高くなっている代 謝バランスを正常に近づける効果をもつ 物質がミトコンドリア病治療薬になりうる と考え、つぎのような戦略でそのような物 質を探索することにした。解糖系に依存し た細胞はエネルギー合成効率が低いた

め、低グルコース培地ではエネルギー不足 になり細胞死が誘導される。しかし、試験 化合物を加えてミトコンドリア呼吸優位に シフトできれば、エネルギー合成効率が高 まるため、低グルコース培地での細胞死が 抑制される。ミトコンドリア病患者由来の 細胞は増殖能が低く、ハイスループットス クリーニングに必要な量の細胞を調製す ることが難しかったので、同様の解糖系に 依存したエネルギー代謝である「ワールブ ルグ効果」を示すがん細胞を用いることと した。ジクロロ酢酸を陽性対照とし、低グ ルコース状態を誘起する2-デオキシグル コースによるがん細胞の細胞死を抑制す る化合物を理研NPDepo化合物ライブ ラリーから探索した結果、天然由来トリプ トリン誘導体の1つに活性を見出し、その 化合物を「Tryptolinamide (TLAM)」と 命名した。代謝解析の結果、TLAMは、が ん細胞の代謝バランスをミトコンドリア呼 吸にシフトさせることが確かめられた。さ

FCCP

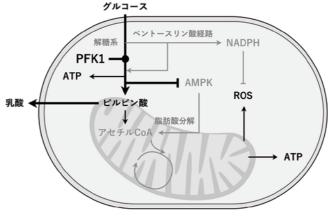


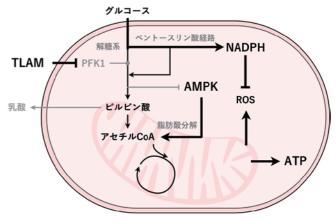


100

--- fibro-3243[0] DMSO

図1 TLAMは低下したミトコンドリア呼吸機能を回復させる。TLAMの構造(左)。TLAM の活性(右)。同じMELAS患者から樹立された正常mtDNAをもつiPS細胞株と変異 mtDNAをもつiPS細胞株からそれぞれ繊維芽細胞様の細胞を調製した(fibro-3243[0] およびfibro-3243[100])。fibro-3243[100]は最大呼吸速度および予備呼吸能が低下 していたが、TLAMの処理により一部回復した。





ミトコンドリア呼吸機能が低下した細胞のエネルギー代謝

TLAM を処理した細胞のエネルギー代謝

図2 TLAMによるエネルギー代謝変換。ミトコンドリア機能が低下した細胞は、解糖系に依存したエネルギー代謝になっている(左)。 TLAMを処理すると、PFK1が阻害され、乳酸の産生量低下が誘導される。また、AMPK活性化による脂肪酸分解とペントースリン酸経路の 亢進が誘導され、ミトコンドリア呼吸が増強する(右)。

らにMELASの患者由来の変異mtDNA (m.3243A>G、3243番目の塩基がAか らGに変異)を持つサイブリッド(細胞質 融合細胞)および別のMELAS患者 (m.3243A>G) 細胞由来のiPS細胞から 作製した分化細胞においても、ミトコンド リア呼吸機能の低下を回復させた(図1)。

TLAMの作用機序

生化学的な解析から、TLAMはAMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活 性化を介した脂肪酸分解により、ミトコン ドリア呼吸を増強することが示された。ま たメタボローム解析を行った結果、TLAM の添加によりGlucose 6-phosphate、 Fructose 6-phosphate が増加する一 方で、Fructose 1,6-bisphosphateが 減少することから、TLAMは解糖系律速 酵素ホスホフルクトキナーゼ (PFK1) の 活性に影響を与えることが示唆された。果 たして組換えPFK1タンパク質を用いた解 析により、TLAMがPFK1に直接作用す ることで、その酵素反応を阻害することが 明らかになった。さらにTLAMによる細胞 内エネルギー代謝シフトがPFK1 阻害に よりもたらされるのかを調べるため、 CRISPR/Cas9 技術を用いてPFK1ノッ クアウト細胞を作製した。その結果、 PFK1 ノックアウト細胞は、TLAMを与え た細胞と同様にミトコンドリア呼吸優位の

代謝を示し、またTLAMを与えても代謝 変化が誘導されなかった。これにより、 TLAMによる細胞内エネルギー代謝シフ トがPFK1阻害によりもたらされると結論 した。解糖系律速酵素であるPFK1を阻 害することで、ミトコンドリア呼吸機能が 増強する理由の一つは、AMPKの活性化 である。実際、TLAMを処理したPFK1野 生型の細胞と同様に、PFK1 ノックアウト 細胞は、PFK1野生型の細胞に比べて高 いAMPK活性を示すことが確認できた。 一方、PFK1は解糖系のゲートキーパーと なっており、PFK1を阻害すると、解糖系 の傍系であるペントースリン酸経路 (Pentose phosphate pathway; PPP) へ代謝フローが迂回、増大する。PPPは、 酸化ストレスに対抗するために重要な NADPH (還元型ニコチンアミドジヌクレ オチドリン酸)を産生する経路として知ら れる。PPPの律速酵素の一つ、G6PDの ノックダウンによりTLAMの効果が減弱 することから、AMPK活性化・脂肪酸分 解に加えて、PPPの亢進も、TLAMによる ミトコンドリア呼吸増強に必要であること

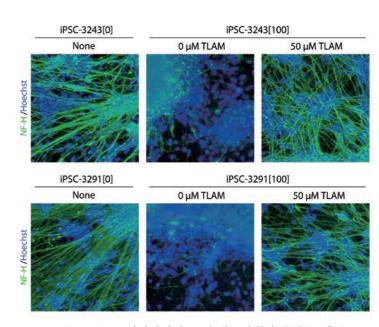


図3: TLAM はミトコンドリア病患者由来iPS細胞の病的表現型を回復させる。変異した mtDNAを高頻度で持つiPS細胞 (iPSC-3243[100]およびiPSC-3291[100]) は神経 細胞 (NF-H陽性細胞) へ分化できないが、TLAMの添加により分化が促進された。

が示された(図2)。

TLAMによるミトコンドリア病患者由来 iPS 細胞の病的表現型の回復

最後に、TLAMがミトコンドリア病患者から樹立されたiPS細胞の病的な表現型に与える影響を評価した。変異したmtDNAを高頻度で持つiPS細胞は、神経幹細胞までは分化できるものの、神経細胞にまでは分化できない。これはエネルギー消費の高い神経細胞では、ミトコンドリア機能障害により細胞死が起きるためと考えられる。実験の結果、TLAMはm.3243A>Gあるいはm.3291T>C(3291番目の塩基がTからCに変異)の

mtDNAを高頻度に持ったiPS細胞の分化障害を改善し、神経細胞(NF-H陽性細胞)へと効率よく分化させることが分かった(図3)。このことは、PFK1を阻害することで、mtDNAに起因するミトコンドリア病の病態を改善できる可能性を示している。

今後の展望

PFK1阻害は、①ミトコンドリア呼吸だけでなく乳酸アシドーシスを改善し、② PPPの亢進によるNADPH産生が不完全な呼吸マシナリーを活性化することで発生するROSによる細胞ダメージを緩和することが期待される。そのため、

PFK1 阻害はミトコンドリア病治療の観点から複数のメリットを持つ、これまでにない治療標的になりうる。またミトコンドリア機能低下は、ミトコンドリア病だけでなく、老化、がん、神経変性疾患を含むさまざまな疾患に関連している。とりわけ、ユビキチンとそのリン酸化の役割が明確となったパーキンソン病は、異常ミトコンドリアが原因となっている点でミトコンドリア病と共通性があり、ミトコンドリア病におけるユビキチン化の役割についても検討していきたいと考えている。本研究成果が足掛かりとなって、ヒトの健康寿命の延伸に資する新しい方法の開発につながることが期待される。

コドンの最適度を監視する分子機構を支える リボソームユビキチン化

稲田 利文 (東京大学 医科学研究所 教授)

発表論文:

The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality

Robert Buschauer, Yoshitaka Matsuo, Takato Sugiyama, Ying-Hsin Chen, Najwa Alhusaini, Thomas Sweet, Ken Ikeuchi, Jingdong Cheng, Yasuko Matsuki, Risa Nobuta, Andrea Gilmozzi, Otto Berninghausen, Petr Tesina, Thomas Becker, Jeff Coller, Toshifumi Inada, Roland Beckmann

Science 368, eaay6912 (2020)



背景

mRNAにコードされる遺伝情報は、リボソームによってタンパク質へと変換される。多くのアミノ酸は複数のコドンによってコードされており、同じアミノ酸に対応するそれぞれのコドンは同義コドンとよばれ、対応するtRNAの細胞内存在量には偏りがある。多く使われるコドンは最適コドンと呼ばれ、同義コドンが最適かどうかは、対応するtRNAの存在量に従って数値化され、tRNA量が高いほど最適度が高いと評価される。従って、最適度が高いコドンが多いmRNAを翻訳するときの伸

長速度は速くなり、合成されるタンパク質も多い。翻訳の伸長速度は発現量の調節だけでなく、合成されるペプチド鎖のフォールディングやターゲティングなどとも密接に連動しているため、コドンの選択は遺伝子発現において非常に重要な役割を担っている。

細胞はストレス応答や環境変応答における遺伝子発現を制御において、MRNA量の調節は重要な役割を果たしている。個々のmRNAがもつ固有の安定性は、コドンの最適度によって調節されることは以前より示唆されていた。近年、詳細な

解析が多くの生物種で実施され、最適度が高いコドンを持つmRNAほど安定であり、最適度が低いコドンを持つmRNAは不安定であるという一般則が確立された。最適度が高いコドンを持つmRNAほど翻訳の伸長速度が早いため、コドンの最適度によってmRNAの半減期が決定されることになる。一方で、コドンの最適度によって調節される翻訳の伸長速度を監視し、個々のmRNAがもつ固有の安定性を決定する機構は依然として不明なままであった。Ccr4-Not複合体はmRNAの転写・分解や翻訳抑制において中心的

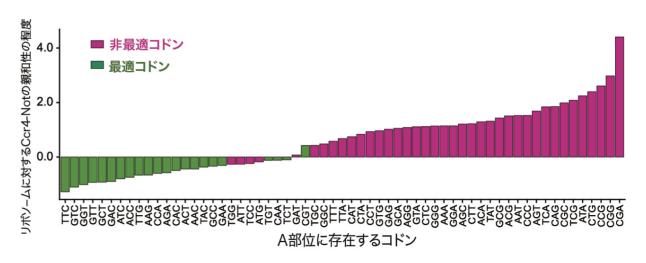


図1 Ccr4-Notとリボソームの親和性は最適コドンに強い逆相関を示す。 縦軸はリボソームに対するCcr4-Not複合体の親和性を、横軸はリボソームのA部位のコドンを示す。非最適コドン(赤)を含むリボソームはCcr4-Not複合体に高い親和性を示し、最適コドン(緑)を含むリボソームは低い親和性を示した。従って、Ccr4-Not複合体が結合するリボソームのA部位には、より最適度の低いコドンが存在することが明らかになった。

な役割を果たす複合体である。主に
3'UTRに結合するRNA結合タンパク質
を介して、標的mRNAに結合することで、
ポリA短鎖化によるmRNA分解や翻訳
抑制を担うことが広く知られている。我々は、Ccr4-Not複合体のNot4サブユニットがE3ユビキチンラーゲースとして機能
し、リボソームタンパク質eS7を標的とするユビキチン化が小胞体ストレス応答に
必須であることを見出した。これらの
Ccr4-Not複合体による翻訳とmRNA
安定性の制御機構におけるeS7ユビキチン化の機能を明らかにすることを目的に
研究を開始した。

結 果

Ccr 4 - Not 複合体は翻訳速度を 直接感知する

我々は、Ccr4-Not複合体が特異的に結合するリボソームによって翻訳されるmRNAの特徴を調べるために、選択的リボソームプロファイリングによる網羅的解析を行った。その結果、コドンレベルの解析では、Ccr4-Not複合体とリボソームの親和性がコドンの最適度と非常に強い逆相関を示した(図1)。つまりCcr4-Not複合体が、より遅い翻訳伸長反応状態のリボソームに結合し、mRNAを分解へと導く可能性が示唆されたため、次に

Ccr4-Not複合体の変異体を用いて、コドンの最適化によるmRNAの安定性制御について解析した。

Ccr4-Not はリボソームのE部位に結合する

次に、Ccr4-Not複合体による翻訳速度 感知のメカニズムを解明することを目的 に、リボソームに結合したCcr4-Not複合 体の構造解析を行なった。松尾博士が Ccr4-Not複合体とリボソームの巨大複合 体精製に成功し、共同研究者の Beckmann研究室のRobert Buschauer 君が数年をかけて、クライオ電子顕微鏡を 用いた単粒子解析を行った。Ccr4-Not複合体のリボソームに結合したサブユニットの構造は、驚くべき結果であった。Ccr4-Not複合体の構成タンパク質の1つであるNot5が、A部位にtRNAを含まないリボソームのE部位に結合していた(図2)。ペプチド鎖を転移した後のtRNAは、P部位からE部位に移行し、最終的にリボソームから解離する。E部位のtRNAが存在する頻度は、A部位へのアミノアシルtRNAの結合頻度に比例するため、翻訳速度とE部位が空になる可能性が高くなると予想される。従って、この構造解析の結果は、

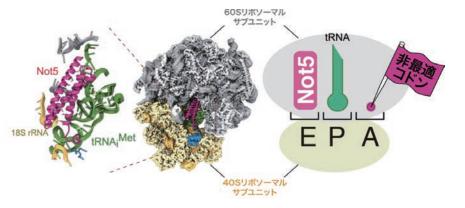


図2 Not5とリボソームの結合様式

左図: クライオ電子顕微鏡を用いた Ccr4-Not 複合体と A 部位にtRNA を含まないリボソームの単粒子解析。 Ccr4-Not 複合体の構成タンパク質の1つである Not5が、リボソームのE 部位に結合している。 ピンクは Not5のアミノ末端領域、 緑はtRNA、 黄色は 40S リボソーマルサブユニット、 灰色は 60S リボソーマルサブユニットを示す。

右図:リボソームのA部位に非最適コドンが存在する場合、Not5がE部位に結合することで mRNAの分解を引き起こす。

HIS3 レポーターmRNA (0/50/100%の最適コドン)の半減期

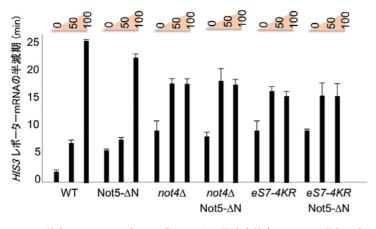


図3 Ccr4-Not依存のeS7のユビキチン化は、コドン最適度依存のmRNA分解に必要である 異なる割合で最適コドンを含むHIS3レポーター mRNAの安定性を各変異株で測定した結果 を示す。Galプロモーターの制御下に各HIS3 (0 / 50 / 100%の最適コドン) を挿入し、グル コース培地に交換することで転写を停止後の残存mRNAの定量により、半減期を測定した。

Ccr4-Not複合体がリボソームと相互作用 して翻訳速度を感知する可能性を強く示唆したため、次に機能解析を進めた。

eS7ユビキチン化がCcr4-Notの リボソーム結合に必要である

次に我々は、コドン最適度依存の mRNA安定性制御におけるCcr4-Not 複合体とリボソームと相互作用の機能を 検証した。大学院生の杉山君が、異なる 割合で最適コドンを含むHIS3レポー ター mRNAの半減期を測定した。その 結果、Ccr4-Not複合体の機能欠損に よって、最適コドンが多いmRNAでおこ る安定化や、最適コドンが少ないmRNA でおこる不安定化がみられなくなった(図 3)。Not5欠失株(not5Δ)や、リボソー ムのE部位への結合ドメインの欠失した Not5の変異株 (Not5-ΔN) では、コドン 最適度依存のmRNA分解に欠損がみら れた。Ccr4-Not複合体のNot5サブユ ニットが、コドンの最適度が低いmRNA を翻訳するリボソームに対して強い親和 性をもつことで、mRNAを分解に導くこと が明らかになった。

eS7のモノユビキチン化はCcr4-NOT 複合体内のNot4サブユニット依存であ り、Ccr4-Not複合体とリボソームと相互 作用に依存する。またeS7のモノユビキ

41

チン化は、小胞体ストレス時のmRNAと翻訳制御に重要であるため、我々は、コドン最適度依存のmRNA安定性制御におけるeS7のモノユビキチン化の役割を解析した(図3)。Not4欠損株(not4Δ)とeS7のNot4依存ユビキチン化部位の全リジン残基の変異体(eS7-4KR)では、コドン最適度依存のmRNA分解がほぼ観察されなくなり、Ccr4-Not複合体のリボソームへの結合も顕著に低下した。以上

の結果は、Ccr4-Not依存のeS7のユビ

キチン化は、コドン最適度依存のmRNA 分解に必要であることを示している。

コドンの最適度に依存した mRNA の分解制御機構モデル

以上の結果から、tRNAを含まないリ ボソームの「空の」E部位にCcr4-Not複 合体が結合することで、翻訳速度を感知 する以下のモデルを提唱している(図4)。 まず翻訳過程において、コドン-アンチコ ドンの認識はリボソームのA部位によっ て行われる。①非最適コドンを翻訳してい るリボソームでは、対応するtRNA の存 在量が少ないため、A部位にtRNAが結 合するまでに長い時間が必要となる。②A 部位にtRNAが結合しないため、E部位 からtRNAが解離する。③tRNAが解離 し空になったE部位にCcr4-Not複合体 が結合し、効率よくmRNAを分解に導く、 と考えている。以上の結果より、 Ccr4-Not複合体は、非最適コドンを翻 訳中のリボソームのE部位に効率よく結 合することで、コドンの最適度を監視し、 mRNAの安定性を制御する分子基盤が 初めて明らかになった。

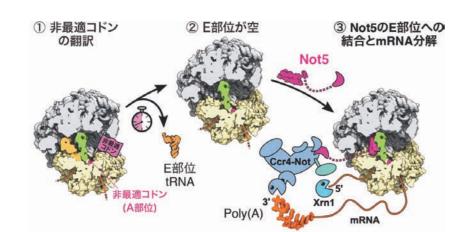


図4 コドンの最適度に依存した mRNA の分解制御機構モデル

①非最適コドンがA部位に位置したリボソーム。tRNAの存在量が少ないため、A部位にtRNAが結合するまでの時間が長い。②A部位にtRNAが結合しないため、E部位からtRNAが解離する。③Ccr4-Not複合体のNot5サブユニットのN末端領域がE部位に結合する。リボソームに結合したCcr4-Not複合体がポリAを短鎖化する。さらにキャップ構造の除去後にリボヌクレアーゼXrn1がmRNAを分解する。ピンクはNot5のアミノ末端領域、マジェンダはE部位に結合したtRNA、緑はP部位に結合したtRNA、黄色は40Sリボソーマルサブユニット、灰色は60Sリボソーマルサブユニット、オレンジはmRNAを示す。

今後の展望

細胞は、絶えずストレスや環境の変化に適応するため、細胞内のmRNA量を制御している。その制御は、mRNAの合成と分解によって行われており、それぞれが協調的に機能することが重要であることは言うまでもない。本研究により、コドンの最適化によるmRNAの分解制御機構の実態が明らかになり、長年不明であった遺伝情報における同義コドンの存在意義がより明確になった。

これまで我々は、異常翻訳を解消する 翻訳品質管理機構RQCと、機能欠損リ ボソームを認識し分解する品質管理機 NRDを解析してきた。その結果、異常翻 訳を認識する2つの品質管理(RQCとNRD)に共通する分子機構として、①ユビキチンWriterが翻訳停止したリボソームを認識し特異的部位をユビキチン化(RQCではuS1)、②RQT複合体がユビキチン化リボソームを認識し、サブユニット乖離をおこすことを明確にした。また、衝突リボソームによって誘起されるmRNAの分子内切断機構であるNGD(No-Go-Decay)にもeS7のユビキチン化が必須である。今回我々は、Ccr4-Not複合体が、非最適コドンを翻訳中のリボソームに効率よく結合することで、コドンの最適度を監視しmRNAの安定性を制御する分子基盤を初めて明らか

にした。一方で、eS7のユビキチン化の役割は不明であり、今後解明すべき大きな課題である。

タンパク質合成途中の翻訳速度調節の 異常は、タンパク質の機能に重大な欠陥 を引き起こし、タンパク質恒常性の破綻に つながることは広く知られている。タンパク質恒常性の破綻は、不良タンパク質の 蓄積やオルガネラの損傷、シグナル伝達 経路のかく乱など、広範な細胞機能の障 害を引き起こす。今回の研究成果が、翻 訳異常によって合成される機能欠損タン パク質が原因となる疾患の発症機構や老 化のメカニズムを理解するための基盤に なることを期待したい。

東北大学 大学院理学研究科化学専攻 有機化学第一研究室



高岡 洋輔

2020年4月より、化学専攻 有機化学第一研究室(主宰: 上田 実 教授)にて講師から准教授に昇進させていただきました。助教までは動物細胞内でのタンパク質化学修飾や活性を検出するケミカルプローブなどを開発してきましたが、現所属になってからはその技術・知識を活かして、植物ホルモンを介したケミカルバイオロジー研究に携わっています。まずはその内容について、簡単にご紹介させていただきます。

植物ホルモンとは、植物自身が作り出し、ごく微量で植物体内の生理応答・情報伝達を担う重要な天然有機小分子ですが、その多くはユビキチンリガーゼとその基質との複合体を形成させる分子糊として機能します。この基質には転写を制御する因子が複数存在するために、ごく微量でも様々な遺伝子の転写を調節することができますが、これら因子の種類は膨大で、それぞれの遺伝的冗長性の問題や、それぞれがクロストーク制御を受けているなどで、その作用機構は非常に複雑に制御されています。このような背景から植物ホルモン研究でも、一過的かつ選択的に標的タンパク質の機能を制御する「ケミカルツール」の重要性がますます高まっています。我々も植物ホルモンに関する転写を選択的に制御する機能性分子として、ユビキチンリガーゼと基質との選択性を改変する小分子や、転写調節因子・転写因子間の一部の

相互作用を選択的に阻害するステープルペプチドを開発して きました。これらのケミカルツールは、当研究室に所属する 学生さんそれぞれが中心になって、ともに悪戦苦闘しながら 合成・機能解析してくれたものです。上田研究室では、天然 物全合成・ペプチド合成・ケミカルバイオロジーを専門とす る教員とともに、機能性小分子を自ら合成し、実際に植物を 栽培して個体内における機能を遺伝子・タンパク質レベルで 機能解析する、まさに植物ケミカルバイオロジー研究を展開 しています(写真は研究室で活躍中のペプチド合成機と、植 物を栽培する人工気象器)。個々の技術は、自分の経験から 言っても植物・動物を問わず汎用的なもので、有機化学的 な視点でバイオロジーを制御・理解する人材の育成に通ず るものであると思います。僕自身も本領域会議などに参加さ せていただいて、ユビキチン領域研究の面白さ・奥深さを強 く実感していますが、あえてこれからも化学的な視点を大事 にしながら、これまでにない「植物個体で真に使えるケミカ ルツール」「多対多のタンパク質間相互作用ネットワークの 一部を選択的に制御する技術」の開発を目指して、これまで 以上に植物ケミカルバイオロジー研究に没頭したいと思って います。今後ともどうぞよろしくお願いします。





ペプチド合成機(左)と人工気象器(右)の写真

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター 無細胞生命科学部門



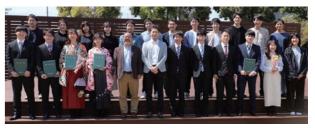
高橋 宏隆

私の所属する愛媛大学プロテオサイエンスセンター・無細胞生命科学部門は、澤崎達也教授が中心となって、コムギ無細胞タンパク質合成系 (コムギ無細胞系) による組換えタンパク質の合成と、それらを用いた生化学的解析の技術開発を行なってきました。私はこの研究室に2006年よりポスドクとして勤務したのが始まりでした。その後、シンガポール国立大での3年の留学を経て、2013年より同研究室の助教に赴任し、2021年4月より准教授に昇進させて頂きました。本領域の先生方をはじめ、多くの方々に支えられて今回の昇進となりました。この場をお借りしまして厚く御礼申し上げます。

私がユビキチン研究を始めたのは前述のポスドクの時で、コムギ無細胞系でE2やE3リガーゼを合成し、in vitroで活性を検出するのが最初のミッションでした。当時の研究室はユビキチン実験に関するノウハウに乏しく、文献を参考に手探りで実験系を組み上げていました。悪銭苦闘の末、E2タンパク質のユビキチン化を初めてウェスタンブロットで検出できた時の、Typhoonのパソコン画面に出現した猛烈なラダーバンドは今でも鮮明に覚えています(図)。当時の研究室ではリン酸化が主流な解析対象でしたが、私は一分子が8,600 Daの修飾因子が連なるド派手な翻訳後修飾に、完全に魅了されました。以降、炎症シグナルやウイルス感染におけるユビキチン化の役割の解明に向けて、コムギ無細胞系による生化学的手法を基盤に研究を進めています。



ポスドク時代にユビキチン化を始めて検出した時の、実際の実験ノートのコピー。 論文では何度も見ていましたが、実際に自分でやってみると感動もひとしおです。



2020年度の卒業式の写真(コロナ感染対策で、集合写真は屋外にて短時間で写真撮影を行いました)。撮影後の写真を見て、教授を差し置いて私がセンターに居座っていることに気付きました。ごめんなさい・・・。

私が所属する研究室ですが、解析対象が「タンパク質」であれば基本的に何をやっても良いという気風で、私の研究テーマ以外にも、澤崎教授とポスドクの山中聡士君(本領域・公募班)のグループは化合物によるタンパク質分解誘導の研究を、また植物を研究対象とするグループもあります。一つの研究室にしてはかなり幅広い研究テーマですが、これは好意的に捉えれば、コムギ無細胞系を武器に様々な研究分野に果敢に挑戦しているとも言えますし、悪く言えば節操がないとも言えます。学生は学部生・修士学生が20名近く在籍しており、研究室の雰囲気は非常に自由で明るく、学生は(教員も?)特にコアタイムなどは無く、土日の実験も完全に自己判断に任されています。そんな中でも、もともと真面目な学生が多い愛媛大学で、さらに澤崎教授の独特の人身掌握術も相まって、学生の多くは熱心に研究に取り組んでくれております。これまでの研究室の業績の多くは、熱心な学生の頑張りに支えられています。

また、コムギ無細胞系を用いた生化学的解析技術を基盤に、国内外の多くの先生方と共同研究を進めてさせて頂いております。そのため、本州から隔絶され、東京や大阪などの大都市から遠く離れた愛媛の地にあって、様々な分野の第一線で活躍されている著名な先生方や新進気鋭の若手研究者と密に交流させて頂いており、非常に恵まれた環境です。また2019年より本領域に参加させて頂き、ユビキチン研究の交流の輪が更に広がり、改めて領域研究の素晴らしさを実感しております。

この恵まれた研究環境で今後もユビキチン研究に邁進していく所存ですので、今後とも宜しくお願い申し上げます。最後に、このような素晴らしい環境を与えて頂き、好き勝手に研究をさせて下さっている澤崎教授には心より感謝申し上げます。

Information

大阪市立大学大学院医学研究科分子病態学 准教授に昇進しました



及川 大輔

2020年7月1日付けで、大阪市立大学大学院医学研究 科分子病態学(徳永文稔教授研究室)の准教授に昇進しま した。日々ご指導頂いている徳永文稔教授、また、本領域の 先生方に心より感謝いたします。

私がユビキチン研究に携わることになったのは、2013年4月に、次の所属先が決まらず焦りと不安で切迫していた折、徳永教授に特任助教として拾って頂いたことがきっかけです。研究室に所属してからしばらく、地道に実験を続け、オプチニューリン (OPTN) に出会うことが出来ました。周囲の先生方に解析手法を聞いて試行錯誤を繰り返し、培養細胞でのNF-κBシグナルや細胞死解析までは何とか進めることができましたが、生理的な重要性を明らかにできず、今一歩のところで伸び悩んでいました。

そんな中、和歌山県立医科大学脳神経内科の伊東秀文先生が前橋で講演する機会があると聞きつけ、徳永先生と二人で講演先のホテルに伺いました。幸運にも共同研究の話が進み、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者サンプルの解析から、直鎖状ユビキチン鎖とOPTN、ALSという新たな連関を見出し、2016年にやっと論文を発表することができました。リバイスの際には、愛媛大学の高橋宏隆先生にも大変お世話になりました。この実績を基に、小さいながらも研究グラントをいくつか獲得し、学会賞を頂くこともできました。指導してくださった先生方に心から感謝致します。

2016年に徳永研究室が現在の大阪市立大学に移ったのを機に、阻害剤の開発も加速しました。中でもLUBAC阻害剤は、JT医薬探索研究所の坂本信二所長との共同研究で、シード化合物としてのHOIPIN-1の同定や、誘導体解析の中



WBの検出で毎日使い倒しているLAS(左)とFUSION(右)。 FUSIONの導入により検出感度が上がり、ユビキチン化スメアバンドの検出が少しラクになりました。

で見出したHOIPIN-8、そしてHOIPIN-8の作用機序の解析と病態抑制効果などを報告することが出来ました。先方の都合もあり論文を細分化して発表することになり、インパクトとしては今一歩な感が否めませんが、ある程度「使える」化合物を見出すことが出来たと感じています。構造解析では、佐藤裕介先生、深井周也先生に大変お世話になりました。また、ユビキチン定量MS解析では、大竹史明先生、佐伯泰先生に助けて頂き、何とか論文を発表することが出来ました。この場を借りて深く感謝いたします。

この期間に、ユビキチン研究会に参加できたことも非常に 大きな刺激になりました。私個人として初めてのユビキチン の専門家の方々の前での発表で非常に緊張しましたし、質 疑応答含め、後から色々とご指摘頂くこともありました。領域 代表の佐伯先生と初めてお話させて頂いたのもユビキチン 研究会後の飲み会でしたし、後に徳永研究室に助教として 着任する清水先生とお会いしたのもこの会でした。また、切 磋琢磨し続ける同年代の研究者に会い、非常に熱い刺激を 受けたことは今でも良い財産です。

現在、研究室には徳永教授含め11名が所属しています。 スタッフは、徳永教授と准教授(私)1名、助教2名。医学部 という、自分の学生時代とは異なる環境での学生指導に困 惑する場面も多々ありますが、社会人博士課程を含め数名 の大学院生を受け入れています。ユビキチンコード、炎症、細 胞死という視点から、病態形成・疾患発症の分子機序の解 明を目指して研究を進めています。今後も、領域の進展に少 しでも貢献できればと思っています。



ラボスタッフ写真。左から寺脇助教、徳永教授、私、清水助教。本学 の白衣授与式スタイルで撮ってみました。

学会活動報告

第1回ケモユビキチン若手主体発表会

日時: 2020年7月30日

会場:オンライン

世話人: 山野 晃史(都医学研)、佐伯泰(都医学研)

講演者:伊藤 拓水(東京医科大·准教授)、大竹 史明(星 薬科大·准教授)、林 剛介(名古屋大·准教授)、山

野 晃史 (都医学研・主席研究員)

第93回日本生化学会大会

新学術ケモユビキチン共催シンポジウム

^rNew frontier for ubiquitin biology driven by chemo-technologies_J

日時: 2020年9月14日~16日

会場:オンライン

オーガナイザー:佐伯 泰(都医学研)、沖米田 司(関西

学院大)

講演者:佐伯泰(都医学研)、沖米田司(関西学院大)、 大竹史明(星薬科大)、山野晃史(都医学研)、伊藤 拓水(東京医科大)、大岡伸通(国立衛研)、及川大

輔(大阪市立大)、高橋宏隆(愛媛大)

第93回日本生化学会大会 プロテインキナーゼシグナリング研究の新たな挑戦

日時: 2020年9月14日~16日

会場:オンライン

オーガナイザー: 松沢厚(東北大)

第79回日本癌学会学術総会

日時: 2020年10月1日~3日

会場:オンライン

オーガナイザー:内藤 幹彦(東京大)、菅 裕明(東京大)

第43回日本分子生物学会年会

日時:2020年12月2日~4日

会場:オンライン

新学術ケモユビキチン共催ワークショップ

「多彩な生理機能を発揮するユビキチンコードのバイオロジー」

オーガナイザー:及川 大輔 (大阪市立大)、高橋 宏隆 (愛媛 +)

講演者: 高橋 宏隆(愛媛大)、秦 裕子(東京大)、Kim Minsoo(京都大)、佐藤 裕介(鳥取大)、安田 柊(東京大)、遠藤 彬則(都医学研)、伏屋 康寛(京都大)

産研テクノサロン

新学術ケモユビキチン共催ワークショップ 「タンパク質をぶっ壊せ!!:新しい創薬基盤技術研究」

日時: 2021年2月5日

会場:オンライン

オーガナイザー: 伊藤 幸裕(大阪大)、内藤 幹彦(東京大)

第2回ケモユビキチン若手主体発表会

日時:2020年2月22日

会場:オンライン

世話人: 山野 晃史(都医学研)、佐伯 泰(都医学研)

講演者: 冨田 拓哉(都医学研·主任研究員)、伏屋 康寛(京都大学·特定助教)、尾勝 圭(京都大学·助教)、渡部 昌(北海道大学·講師)、古畑 隆史(東京大学·助教)

新学術ケモユビキチン第4回班会議

日時:2020年2月23日~24日

会場:オンライン

世話人:佐伯泰(都医学研)

日本薬学会 第141年会

「多様なストレスに対する生体適応の仕組みと疾患制御」

日時: 2021年3月26日~29日

会場:オンライン

オーガナイザー:松沢厚(東北大)、今井浩孝(北里大薬)

第25回日本がん分子標的治療学会学術集会 TPDシンポジウム

「ユビキチン創薬」

日時: 2021年5月26日~28日

会場:オンライン

モデレーター: 出水庸介(国立衛研)、内藤幹彦(東大)

講演者: 内藤 幹彦 (東大)、冨成 祐介 (ファイメクス株式会社)、大竹 史明 (星薬科大)、伊藤 拓水 (東京医科大)、

笠原 広介 (三重大)

日本生化学会東北支部 第87回例会・シンポジウム

特別講演「プロテアソームの機能制御と病態」

日程:2021年5月29日(土)

会場:オンライン

講演者:村田茂穂(東京大)



アウトリーチ活動

2020年度東京工科大学バーチャルオープンキャンパス「応用生物学部研究紹介」「応用生物学部の広場」高校生対象 Web開催

世話人: 岡田 麻衣子(東京工科大)

京都大学オープンキャンパス【オンライン開催】 結晶化実験のライブ配信(高校生向け)

日程: 2020年8月7日 世話人: 深井 周也(京都大)

東京大学先端科学技術研究センター バーチャル 先端研公開 2020

研究室に行こう! 「生命分子の急所を狙撃する小さなスナイパーたち〜生命を知るための合成化学〜」、 学ぼう! 「紙でDNAを作ろう!」

世話人: 岡本 晃充(東京大)

高校生のための東京大学オープンキャンパス (一般向け講演)

日程: 2020年9月22日 世話人: 村田 茂穂(東京大)

2020年度東京工科大学 学部·大学院案内 「研究紹介」(高校生対象) Web開催

日程:2020年12月

世話人: 岡田 麻衣子(東京工科大)

ライフサイエンス Web 研究塾 (羊土社& MERCK) 第2回デザイナー細胞&プロテインノックダウン「プロテインノックダウン入門」

日程: 2021年1月20日 世話人: 内藤 幹彦 (東京大)

2020年度第5回都医学研都民講座(オンライン)「がんを「治す」への挑戦:悪いタンパク質を狙って壊す新戦略」(タンパク質を狙って壊す細胞内のしくみ)(がん細胞のタンパク質を壊す薬の開発)

日程:2021年2月12日

世話人:佐伯泰(都医学研)、内藤 幹彦(東京大)

京大化学教室オンラインセミナー「化学で未来を考えよう〜身近なものから感じる最先端の化学〜」第2回「タンパク質の形と生命の仕組み」(一般向け講義)

日程: 2021年2月19日 世話人: 深井周也 (京都大)

今後の関連ミーティング・シンポジウム情報

第94回日本生化学会大会

https://www2.aeplan.co.jp/jbs2021/ 日程: 2021年11月3日 (水)~5日 (金) 場所: パシフィコ横浜ノース (みなとみらい)

領域関連

大竹先生と深井先生が本新学術領域の共催ワークショップ 「躍動するユビキチンコード研究」をオーガナイズします。本 領域からは佐伯先生、西山先生、大竹先生、深井先生がケ モユビキチン研究を紹介します。

第44回日本分子生物学会年会

https://www2.aeplan.co.jp/mbsj2021/ 日程: 2021年12月1日(水)~3日(金)

場所:パシフィコ横浜

領域関連

佐伯先生と内藤先生が本新学術領域の共催シンポジウム 「躍進するユビキチンケモテクノロジー研究」をオーガナイズ します。本領域からは佐伯先生、内藤先生、伊藤拓水先生、 大竹先生、林先生、池田先生がケモユビキチン研究を紹介 します。

Pacifichem2021 "The Chemical Biology of Ubiquitination: Structures, Dynamics and Mechanisms"

https://pacifichem.org/

日程: December 16-21, 2021

場所: Honolulu, Hawai, USA (オンラインとのハイブリッド イベントとして開催)

領域関連

本領域からは深井先生が講演予定です。

ケモユビキチン国際会議延期のお知らせ

本新学術領域研究主催の国際会議 Ubiquitin New Frontier "from Neo-Biology to Targeted Protein Degradation" は新型コロナウイルスの感染拡大を受けまして、さらに1年間延期することに決定しました。

新しい開催日程は決定次第、ホームページなどを通じてお知らせする予定です。本領域関係者ならびに本国際会議に参加予定のみなさまには、多大なご迷惑をおかけいたしますが、何卒ご理解をご理解賜りますようお願いいたします。

ケモユビキチン国際会議組織委員一同

編集後記

「ケモユビキチン」のニュースレター第3号が完成しました。2021年4月から新たな公募班員を迎え、引き続きユビキチンと有機化学の融合による本領域の発展を期待したいと思います。本号でも、多くの班員の方や関係の先生方に、研究紹介や研究成果を執筆していただきました。ご協力をいただきました皆様、ありがとうございました。

お気付きの方もおられると思いますが、本号表紙の中央にある化合物構造式は、大阪市立大学の及川先生らによって見出されたLUBACの阻害剤「HOIPIN-8」です。ケモユビキチンも折り返し地点を過ぎ、ユビキチン反応を制御できる様々な化合物が取得されつつあると思います。研究成果欄のみならず、表紙にも反映させていきますので、「ぜひ表紙に!!」という新規化合物などがあればご連絡ください。また、皆様の研究に関連したミニレビュー、学会参加報告、本ニュースレターの誌面に活用できるお写真などのご寄稿は常時、お待ちしておりますので、ご提供よろしくお願いします。さて、話は大きく変わりますが…

漫画家の冨樫義博は「HUNTERxHUNTER」や「レベルE」、「幽遊白書」などを代表作とする漫画家で、いずれもテレビアニメ化されています。特に「幽遊白書」は累計発行部数5000万部を突破するヒット作で、40代なら詳しい方も多いのではないでしょうか。主人公の浦飯幽助は霊界探偵として、闇世界の武術会に参加します。決勝戦の相手、戸愚呂チームの先鋒「鴉(からす)」は火薬を操る爆弾使いですが、普段は鼻や口元を完全に隠してしまうマスクを着用しています。彼の場合、マスクは暴走する破壊力のリミッターとして機能しており、彼の素顔を見たものはほとんどいません。

私の所属する都医学研にも毎年、新しい仲間が加わります。このコロナ渦において、都医学研ではマスク着用を徹底しており、(冗談ではなく)新規参入メンバーの素顔を知りません。新聞やニュースでも毎日のように取り上げられている新型コロナウイルスですので、編集後記でコロナについて記述するのは憚られるところですが、それでも2020年の私生活から研究活動まで、あらゆる場面において影響を及ぼしたので、書いてしまいました。

一刻も早くコロナが終息し、素顔で研究活動が再開できる日を願うばかりです。

(山野)

2018-2022年度 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究

ケモテクノロジーが拓く ユビキチンニューフロンティア ニュースレター

第3号 2021年6月発行

編集人 山野 晃史(東京都医学総合研究所)

発行人 佐伯 泰(東京都医学総合研究所)

発行所新学術領域「ケモユビキチン」領域事務局

東京大学大学院薬学系研究科 蛋白質代謝学教室

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

TEL 03-5841-4800

E-MAIL ubiquitin@mol.f.u-tokyo.ac.jp

印刷所 株式会社トライス

領域ホームページ http://www.ubiquitin.jp/