

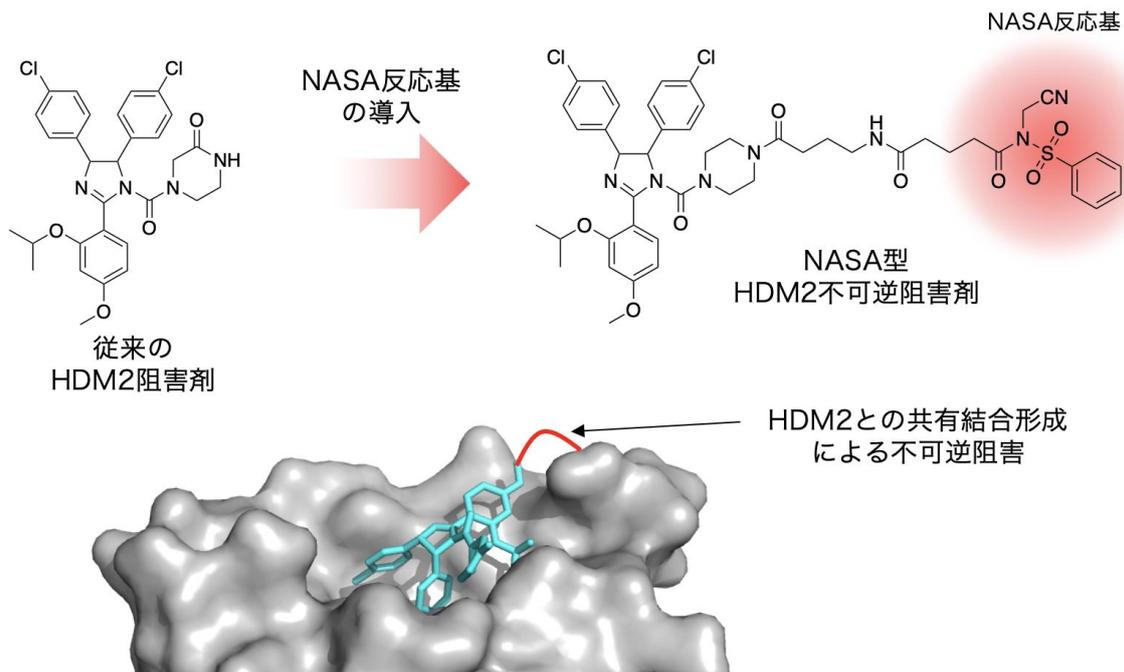
タンパク質間相互作用の不可逆阻害に成功 —抗ガン剤開発のための新しい戦略—

概要

京都大学大学院工学研究科の浜地 格 教授、田村 朋則 同講師、上田 毅 同博士課程学生(研究当時、現:協和キリン)らは、ガンの発生に関与するタンパク質間相互作用を強力に阻害する不可逆阻害剤を新たに開発しました。

タンパク質の多くは生体内で他のタンパク質と相互作用しながらその機能を発揮しており、タンパク質間相互作用(protein-protein interaction: PPI)を制御できる小分子阻害剤は生命現象の理解や疾病の治療に有用です。しかし、一般に広く浅い PPI 表面に小分子阻害剤は強く結合できないため開発が難しく、また薬効が低いという課題がありました。このような背景のもと、本研究グループは *N*-アシル-*N*-アルキルスルホンアミド(NASA)と呼ばれる反応基を阻害剤分子に組み込むことで、「一度くっついたら離れない」PPI 不可逆阻害剤の開発に成功しました。本研究では、ガン化に関与する PPI として重要な HDM2(human double minute2)-p53 相互作用を標的として NASA 型不可逆阻害剤を開発し、その薬効が従来の阻害剤よりも強力かつ長時間持続することを実証しました。NASA 反応基は他の様々な種類の阻害剤設計に適用可能であり、今後、PPI 不可逆阻害剤開発のための一般性の高い戦略として創薬研究を加速することが期待されます。

本成果は、2021年03月18日(現地時間)に米国の国際学術誌「Journal of the American Chemical Society」にオンライン掲載されました。



1. 背景

タンパク質は他のタンパク質と相互作用することで細胞機能を司っており、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) は小分子医薬品開発における魅力的な標的として広く注目されています。しかし、PPI の作用面は広く浅いため阻害剤開発自体が難しく、また小分子 PPI 阻害剤の親和性・薬効は一般的に低いという問題がありました。こうした課題を克服可能なアプローチとして、PPI の不可逆阻害が近年有望視されています。この戦略では、反応性官能基を導入した阻害剤 (不可逆阻害剤と呼ばれる) を用います。不可逆阻害剤が標的タンパク質に認識されると、導入した反応基がタンパク質上のアミノ酸と反応して共有結合を形成します。すると、この阻害剤は結合部位から二度と外れなくなり、タンパク質の活性を不可逆的に阻害します (図 1a)。こうした作用機序によって、不可逆阻害アプローチでは従来の小分子阻害剤の低い親和性を補うことができると期待されます。しかし、現時点では PPI に対する不可逆阻害剤は、ほとんど開発例がありません。これは、既存の不可逆阻害剤の多くが反応性の高いシステイン残基と反応するように設計されているのに対して、PPI 表面には多くの場合システイン残基が存在しないためです。

こうした背景のなか、本研究グループはごく最近、*N*-アシル-*N*-アルキルスルホンアミド (NASA) 反応基が不可逆阻害剤の反応基として適用可能であり、リジン側鎖のアミノ基と効率的に反応することを見いだしました (*Nature Communication* 9, 1870, (2018))。リジンは PPI 表面に豊富に存在することから、NASA 反応基は PPI 不可逆阻害剤の反応基として有望であると期待されます。そこで本研究では、NASA 反応基を用いた PPI の不可逆阻害剤を開発し、その有用性を検証しました。

2. 研究手法・成果

本研究では標的 PPI として HDM2-p53 相互作用を選択しました。HDM2 はユビキチン E3 ligase 活性を持つタンパク質であり、ガン抑制因子 p53 に結合することで p53 をユビキチン化しその分解を誘導します。HDM2-p53 相互作用を阻害すると、細胞内で p53 が蓄積しガンの増殖を抑制できるため、HDM2-p53 相互作用はガン治療の創薬ターゲットとして活発に研究されています。

本研究では、HDM2 の可逆阻害剤である (±)-Nutlin-3 を不可逆阻害剤の母骨格に採用し、リンカーを介して NASA 反応基を連結した化合物 **1** を化学合成しました (図 1b)。この化合物を試験管内で精製 HDM2 と混合し修飾反応を評価したところ、化合物 **1** は 2 時間以内にはほぼ 100% の反応率で HDM2 と反応することがわかりました (図 2a)。質量分析によって化合物 **1** の修飾部位を同定した結果、当初想定していたリジン残基ではなく、HDM2 の N 末端 α -アミノ基および 67 番目のチロシンと反応していることが明らかとなりました。このように N 末端 α -アミノ基やチロシンと反応する不可逆阻害剤はこれまでほとんど報告例がなく、NASA 反応基がユニークな反応特性を有していることが改めて実証されました (図 2b)。

次に、化合物 **1** が実際に HDM2-p53 相互作用を不可逆的に阻害するかを確かめました。ここでは、可逆阻害剤である (±)-Nutlin-3 または化合物 **1** を処置した HDM2 をサイズ排除クロマトグラフィーに通した後、蛍光色素修飾 p53 ペプチドを用いた蛍光異方性測定によって阻害活性を評価しました。その結果、(±)-Nutlin-3 は可逆的に HDM2 から解離するため、サイズ排除クロマトグラフィー後には阻害活性を示しませんでした。一方、化合物 **1** は HDM2 と共有結合しているため、サイズ排除クロマトグラフィー後も HDM2-p53 相互作用を強く阻害することがわかりました (図 2c)。この結果から、化合物 **1** は HDM2-p53 相互作用を不可逆的に阻害することが実証されました。

続いて化合物 **1** のアルキン誘導体を用いて、ガン由来細胞 (SJS1 細胞) 内に発現する内在性 HDM2 に対する不可逆阻害反応を評価しました。ウエスタンブロッティングおよびプロテオミクス解析の結果、細胞内環境下でも HDM2 に対して選択的な共有結合形成反応が進行することが示されました。

細胞内の HDM2-p53 相互作用が阻害されると、p53 が蓄積し、その転写産物である p21 や HDM2 の発現量が増加することが知られています。そこで、化合物 **1** が実際に p53 経路の活性化を誘導できるかを確認しました。具体的には、p53 を発現する SJS1 細胞に対して化合物 **1** または可逆阻害剤(±)-Nutlin-3 を短時間処置し培地を交換する操作を繰り返した後、p53、p21、HDM2 の発現量をウエスタンブロッティングによって解析しました。その結果、(±)-Nutlin-3 よりも化合物 **1** の方がより持続的な p53 経路活性化を誘起することが明らかとなりました(図 3a)。次に、同様の処置を行った後の細胞生存率を調べた結果、化合物 **1** は(±)-Nutlin-3 よりも強い細胞増殖阻害活性を示すことがわかりました(図 3b)。一方、この化合物 **1** による細胞増殖阻害活性は変異不活性型 p53 を発現する HeLa 細胞や A431 細胞では全く見られませんでした。以上の結果から、今回新たに開発した NASA 型 HDM2 不可逆阻害剤 **1** は従来の可逆的阻害剤よりも強く p53 経路依存的な細胞増殖阻害活性を示すことが明らかとなりました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で実証した NASA 反応基を基盤とした不可逆阻害戦略はリガンド部位の設計次第で様々な PPI へと展開可能であることから、PPI 不可逆阻害剤開発のための一般性の高い戦略として創薬研究を加速することが予想されます。また、本研究から NASA 反応基は、(i)寿命の短いタンパク質を標的にできること、(ii)リジン側鎖の ϵ -アミノ基に加えて、N 末端 α -アミノ基やチロシン側鎖のフェノール基とも反応できることが新たに明らかとなりました。こうした非システイン残基に対する NASA 反応基のユニークな反応特性は、不可逆阻害剤開発の対象となるタンパク質のバリエーションを大きく拡張することが期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 総括実施型 (ERATO)

研究領域：「浜地ニューロ分子技術」(研究総括：浜地 格 京都大学 教授)

文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究

研究領域：「分子夾雑の生命化学」(領域代表者：浜地 格 京都大学 教授)

研究課題名：「分子夾雑下での生命分子の直接修飾/機能解析を実現する有機化学」(研究代表者：浜地 格 京都大学 教授)

文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究

研究領域：「「生命金属科学」分野の創成による生体内金属動態の統合的研究」(領域代表者：津本 浩平 東京大学 教授)

関連研究機関

京都大学、リーズ大学

<用語解説>

1. タンパク質間相互作用: タンパク質分子間の相互作用の総称。生体のシグナル伝達を担う。
2. HDM2: ガン抑制因子である p53 の活動を抑制的に調節するタンパク質
3. p53: DNA 修復や細胞増殖停止、アポトーシスなどの細胞増殖サイクルの抑制を制御する機能を持つガン抑制因子
4. システイン: タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつ。側鎖に高反応性のチオール基を有する。
5. リジン: タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつ。側鎖にアミノ基を有する。
6. チロシン: タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつ。側鎖にフェノール基を有する。
7. サイズ排除クロマトグラフィー: 試料の分子サイズに基づくふるい分けを原理とするクロマトグラフィー
8. 蛍光異方性: 蛍光の示す特性のひとつで、ある分子の結合状態や運動の状態に依存して発する蛍光の角度などが異なる現象。蛍光標識した物質を用いて、相互作用の研究などが行われる。
9. ウェスタンブロッティング: SDS-PAGE を行った後、タンパク質を疎水性メンブレンに転写し、抗体を用いて特定のタンパク質を検出する方法。
10. プロテオミクス解析: 質量分析によって検体中のタンパク質を網羅的に解析する手法。
11. リガンド: 特定の受容体と結合する化学物質の総称。

<研究者のコメント>

本研究で標的とした HDM2 は試験管内でも細胞内でも非常にクセの強いタンパク質で、何度も配列を変更したりデータを取り直したりしてようやく論文に至りました（スペースが限られるのでここでは詳細には語れませんが論文をご覧くださいと我々の悪戦苦闘の一端が垣間見られるのではないかと思います）。生体個体への応用などクリアすべき課題はまだありますが、本成果は反応基のバリエーションの乏しさゆえに進んでいなかった PPI 不可逆阻害剤開発のブレークスルーにつながると期待されます。

<論文タイトルと著者>

タイトル: Enhanced suppression of a protein-protein interaction in cells using small-molecule covalent inhibitors based on *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide warhead(和訳: *N*-アシル-*N*-アルキルスルホンアミド基を有する小分子不可逆阻害剤を用いたタンパク質間相互作用の強力な阻害)

著者: 上田毅、田村朋則、河野正晴、塩野恵也、Fruzsina Hobor, Andrew Wilson, 浜地格

掲載誌: Journal of the American Chemical Society DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.1c00703>

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

氏名(ふりがな) 田村 朋則 (たむら ともりの)

所属・職位 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 講師

FAX: 075-383-2759

E-mail: tamura@sbchem.kyoto-u.ac.jp

<JST 事業に関すること>

氏名 (ふりがな) 加藤 豪 (かとう ごう)

所属・職位 科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 グリーンイノベーショングループ 調査役

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

TEL : 03-3512-3528

FAX : 03-3222-2068

E-mail : eratowww[at]jst.go.jp

<報道担当>

京都大学 総務部 広報課 国際広報室

TEL : 075-753-5729

FAX : 075-753-2094

E-mail : comms[at]mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町 5 番地 3

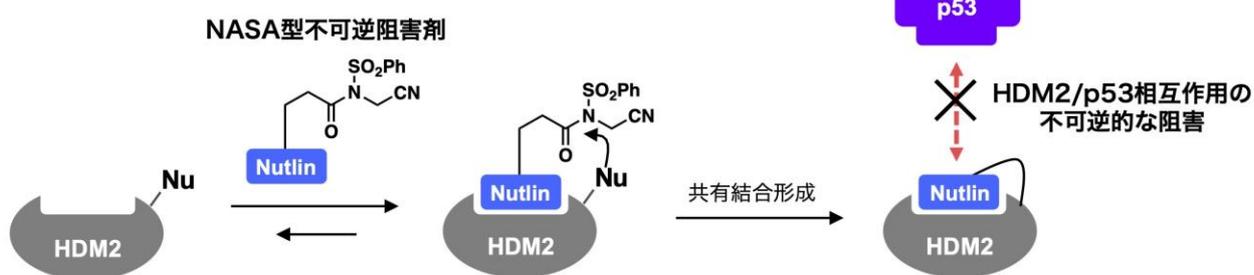
TEL : 03-5214-8404

FAX : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp

<参考図表>

a



b

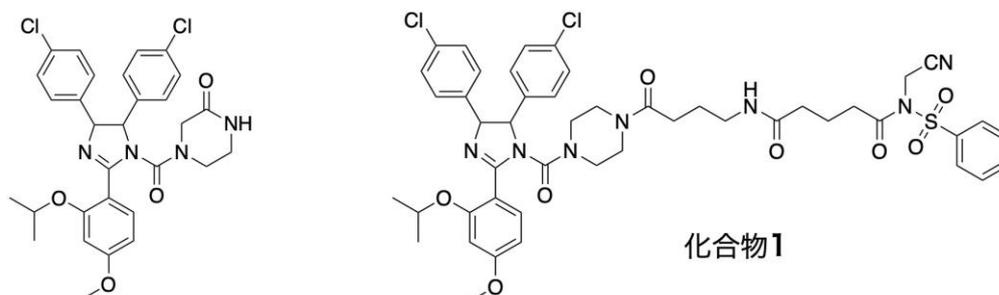


図 1 (a) 不可逆阻害反応の概略図 (b) (+)-Nutlin-3 と化合物 1 の分子構造

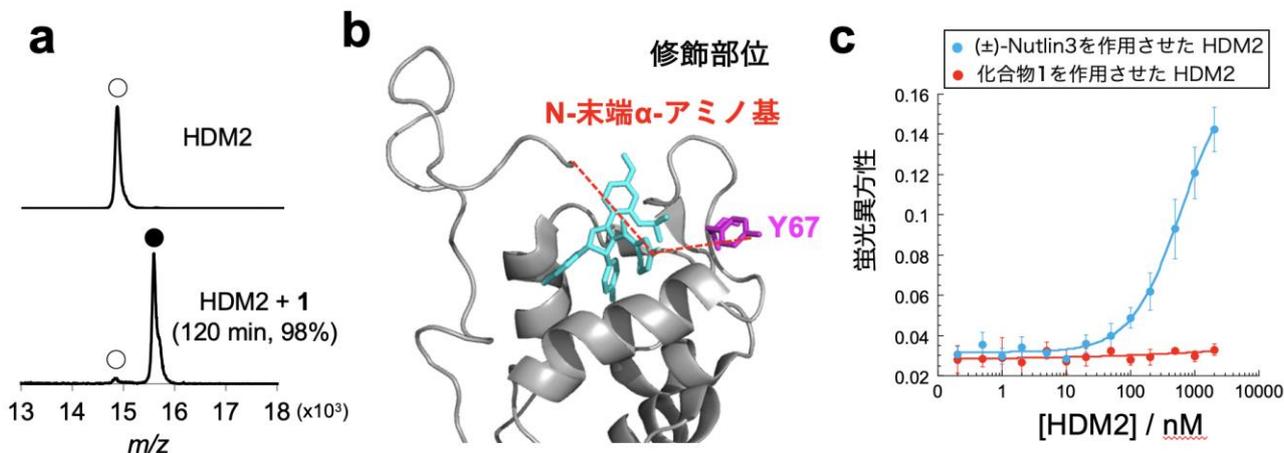


図2 (a) 修飾反応のMALDI-TOF MS解析。○: 未修飾HDM2のピーク、●: 化合物1が修飾されたHDM2のピーク。(b) 化合物1の修飾部位。(c) 蛍光異方性測定の結果。(±)-Nutlin-3を作用させた場合、サイズ排除クロマトグラフィーによって(±)-Nutlin-3はHDM2から解離するため、蛍光標識p53ペプチドはHDM2と相互作用することができ、その蛍光異方性はHDM2への結合に伴って増加する(青点)。一方、化合物1はHDM2と蛍光標識p53ペプチドとの相互作用を不可逆的に阻害しているため、蛍光異方性の値は変化しない(赤点)。

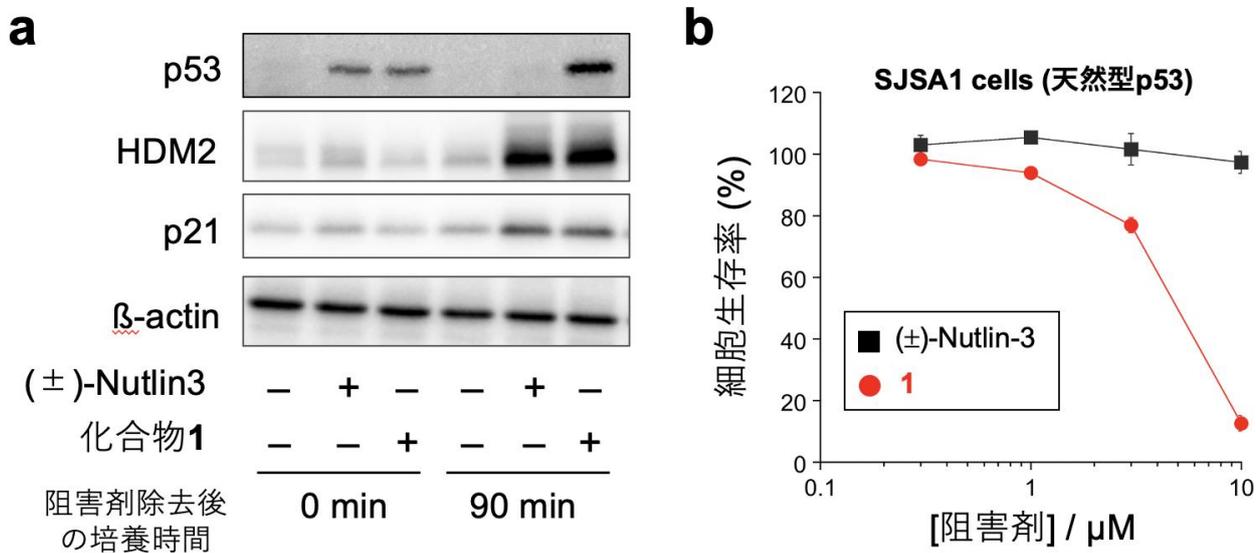


図3 (a) p53経路活性化のウエスタンブロッティング解析。(b) ガン由来細胞(SJS-A1細胞)に対する細胞増殖抑制評価。