

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 407

氏 名

磯部洋輔

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: カリフォルニア大学バークレー校 (国名: 米国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

反応性の高いアミノ酸を捉える機能性プロテオミクスを用いたがん創薬標的の包括的同定

3. 派遣期間: 平成 30 年 2 月 1 日 ~ 令和 2 年 1 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルニア大学バークレー校 栄養科学・毒物学部

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究は、受入研究者らが確立しているタンパク質の反応性に着目した新規機能性プロテオミクス手法(Reactivity-Based Protein Profiling: RBPP 法、現在は isoTOP-ABPP と呼称)を用い、トリプルネガティブ乳がん細胞(TNBC)の悪性化に寄与するタンパク質の同定・及びその機能解明を目的としている。これまでに抗がん活性が知られている天然化合物 Asukamycin に着目し、その TNBC における標的タンパク質の同定、及びその抗がん活性に与える影響について解析を行うことで目的の達成を目指した。

Asukamycin は、Streptomyces 属より単離されたポリケタイドで、抗がん活性が報告されているもののその作用機序は不明である(図 1)。Asukamycin は、分子内に α , β 不飽和ケトンやエポキシケトンといった反応性の高い官能基を複数有しており、タンパク質中のシステイン残基等に共有結合することが期待されることから、isoTOP-ABPP によって標的タンパク質の同定ができるものと考えられた。

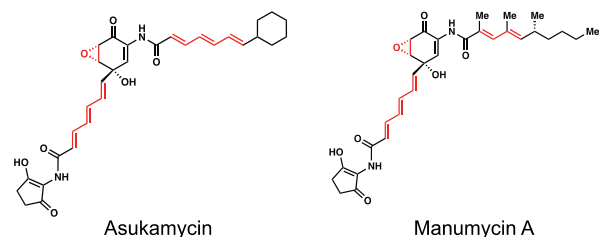


図 1 Asukamycin と Manumycin A の分子構造

231MFP 細胞をはじめとする様々な TNBC 細胞株に Asukamycin を処理し、その細胞増殖における影響について検討を行った結果、Asukamycin は 5-50 μ M の範囲で TNBC の増殖を有意に抑制した。そこで次に、isoTOP-ABPP を用いて Asukamycin の標的的同定を目指した。231MFP 細胞に Asukamycin あるいは対照として DMSO を 3 時間処理し、細胞ライセートを調整した。そこに、システイン反応性のケミカルプローブ IA-alkyne を処理し、細胞ライセート中のタンパク質における反応性の高いシステインをラベルした。この時、Asukamycin がターゲットしたシステインは IA-alkyne によってラベルされない。その後、システインをターゲットした IA-alkyne にクリック反応にてビオチン-TEV タグを付加した。この時付加したビオチン-TEV タグは、安定同位体アミノ酸標識により、DMSO 処理群と Asukamycin 処理群では同じ分子構造で異なる分子量となっている。その後、DMSO 処理群と Asukamycin 処理群を等量混合し、アビジンビーズに吸着後、トリプシン処理と TEV プロテアーゼ処理を行うことでタグが付加したペプチドを選択的に精製・濃縮し

た。その後、サンプルを LC-MS/MS にて分析し、タグが付加したペプチドを同定後、その light/heavy 比を求めることでターゲット候補の同定を行った。その結果、ケミカルプローブでラベルされたペプチドが 1000 種類以上同定された中で、UBR7 のシステイン 374 (C374) が Asukamycin の標的候補として浮かび上がってきた (図 2)。

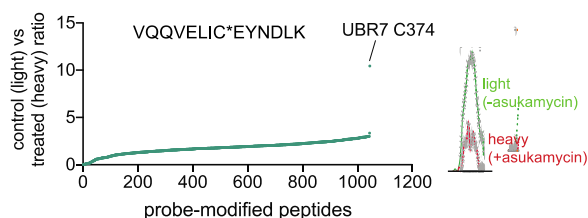


図 2 isoTOP-ABPPによるAsukamycinのターゲット同定

Asukamycin が実際に UBR7 をターゲットするか、UBR7 のリコンビナントタンパク質を用いた gel-based ABPP によってバリデーションを行った。UBR7 のリコンビナントタンパク質に DMSO あるいは Asukamycin を処理し、その後システイン反応性の IA-rhodamine を処理することで UBR7 のシステインを蛍光ラベルした。その後タンパク質を SDS-PAGE で分離し、ゲルの蛍光検出を行った。その結果、DMSO 処理群では UBR7 の蛍光バンドが検出されたが、それが Asukamycin 処理群では濃度依存的に阻害され、Asukamycin が実際に UBR7 をターゲットしていることが示された。

次に、UBR7、さらにはその C374 が Asukamycin の抗がん活性に寄与するか、遺伝学的にバリデーションを行った。231MFP 細胞に対し、shRNA を用いて UBR7 のノックダウンを行い、Asukamycin を処理してその抗がん活性の評価を行った。その結果、コントロール細胞においては Asukamycin がその細胞増殖を抑制した一方、UBR7 ノックダウン細胞ではそれが完全に抑制された。さらに、shUBR7 細胞に対し野生型の UBR7 を再構成した際には Asukamycin の抗がん活性が認められた一方、C374 をアラニンに置換した変異体 (C374A) の UBR7 を再構成した際には依然 Asukamycin の抗がん活性が認められず、UBR7 の C374 が Asukamycin の抗がん活性に必須であることが示唆された。さらに、231MFP 細胞に対し野生型の UBR7 を導入した際に、コントロール細胞と比較して Asukamycin の抗がん活性が増強したこと、さらに C374A の UBR7 を導入してもその増強は認められなかったことから、UBR7 の C374 に Asukamycin がターゲットした結果、gain-of-function により抗がん活性の発揮に至る可能性が支持された。

UBR7 は、アミノ酸配列上ユビキチン E3 リガーゼファミリーに属する分子である一方、その実際の機能についてはほとんど明らかになっていない。我々も、UBR7 のユビキチン E3 リガーゼ活性を in vitro で再構築するべく多くの実験を行なったが、その活性を確認するには至らなかった。そこで次に、Asukamycin が反応性の官能基を複数有することに着目し、この天然物が UBR7 に新たな基質タンパク質をリクルートする可能性を考え、pull-down 実験によってその基質の探索を試みた。231MFP 細胞に Flag-GFP、あるいは Flag-UBR7 を導入し、DMSO あるいは Asukamycin を処理後、細胞ライセートに対し抗 Flag アフィニティービーズを用いることで pull-down を行った。その結果、pull-down によって Flag-GFP あるいは Flag-UBR7 自身が濃縮されたのに加え、他にも複数のタンパク質の濃縮が認められ、UBR7 の相互作用分子が検出できているものと考えられた。そこで次に、pull-down 産物を還元・アルキル化・トリプシン処理し、LC-MS/MS で解析することで濃縮されたタンパク質の同定を行った。その結果、UBR7/Asukamycin 依存的に約 40 種類のタンパク質の濃縮が認められ、それらの中にはがん抑制遺伝子として知られる p53 をはじめ、がんに関連する分子が複数含まれていた。またそれらの分子の濃縮は、ウェスタンブロッティングによっても確認された。

それらの分子について、shRNA によるノックダウンによって Asukamycin の抗がん活性に対する寄与について解析を行った所、p53 をノックダウンした際に Asukamycin による 231MFP 細胞の細胞増殖抑制活性が完全に抑制された。また、gel-based ABPP によって Asukamycin が p53 もターゲットすることが示された。これらの結果から、p53 が UBR7-Asukamycin の抗がん活性に強く関与していると考え、さらに詳細な解析を行った。興味深いことに、pull-down 産物をウェスタンブロッティングによって解析した際、p53 や Flag-UBR7 のモノマーに加え、より高い分子量帯においても Asukamycin 依存的なバンドが認められた。これらのバンドは p53 と Flag-UBR7 の dual color blot を行った際に merge し、さらにその分子量帯のゲルを切り出してゲル中のタンパク質をショットガンプロテオミクスによって解析して際にも、Asukamycin 依存的に p53 や UBR7 が検出された。また、この Asukamycin 依存的に pull-down される高分子量のバンドは、C374A の Flag-UBR7 を導入した際には有意に減弱し、さらにそれぞれの高分子量バンド (p53 あるいは Flag-UBR7) は、UBR7 あるいは p53 をノックダウンした際にそれぞれ有意に減弱した。これらのことから、Asukamycin は UBR7 の C374 をターゲットすることで分子のり (Molecular Glue) として UBR7 と p53 を橋渡しし、UBR7-Asukamycin-p53 の複合体を形成している可能性が考えられた。

p53 は転写因子としてがん抑制遺伝子の発現制御に関わっているため、次に UBR7-Asukamycin-p53 の複合体形成が p53 の転写活性に与える影響について、p53 応答配列を用いたレポータージーンアッセイによって解析を行った。その結果、Asukamycin は濃度依存的に p53 レポーター活性を増強し、その増強は UBR7 ノックダウン細胞では有意に減弱した。さらに、UBR7 ノックダウン細

胞に野生型の UBR7 を再構成した際には Asukamycin による p53 レポーター活性の増強が認められたが、C374A の UBR7 を再構成した際にはその増強が認められず、Asukamycin が UBR7 の C374A を介し、p53 の転写活性を増強している可能性が示唆された (図 3)。

Asukamycin による p53 の転写活性化は、p53 の下流分子の発現によっても確認された。231MFP 細胞に Asukamycin を処理し、タンパク質の発現変化を TMT プロテオミクスによって網羅的に定量解析した。その結果、これまでに知られている複数の p53 下流分子の発現が Asukamycin の処理により有意に増加しており、さらにプロテオミクスデータの Gene Ontology 解析によっても p53 経路の有意な活性化が認められた。また、p53 によって制御される代表的な細胞増殖抑制因子である p21 が、TMT プロテオミクスによっては検出されなかった一方、ウエスタンブロッティングでは Asukamycin 処理によって有意に発現上昇することが見出され、さらにその発現上昇は UBR7 のノックダウンによって有意に減弱した。

Asukamycin が p53 に与える影響について、thermal shift assay 及び p53 応答配列への p53 の in vitro 結合アッセイにてさらに詳細な解析を行った。Thermal shift assay は、細胞ライセート等に温度グラジエントをかけ、対象のタンパク質の熱安定性を評価する実験である。231MFP 細胞の細胞ライセートに対し、DMSO あるいは Asukamycin を処理した後、温度グラジエントをかけ、p53 のウエスタンブロッティングを行った結果、Asukamycin 処理によって p53 の熱安定性が有意に増強することが明らかになった。また、細胞ライセートに対し Asukamycin を処理することによって、in vitro における p53 応答配列への p53 の結合が有意に増強した。さらに、これら 2 つの作用は UBR7 をノックダウンした際にはコントロールと比較していずれも有意に減弱したことから、Asukamycin が UBR7 をターゲットし、p53 を新たな基質としてリクルートした結果、p53 の安定性を増大させ、p53 応答配列への結合を促進し、p53 の転写活性を増強させている可能性が示唆された。

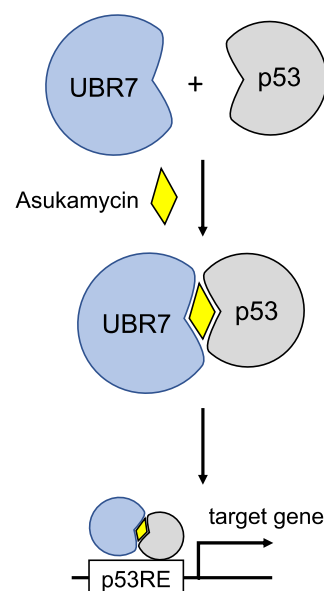


図 3 仮説

次に、p53 の活性化に重要な Asukamycin の分子構造について、その誘導体を用いることで詳細な解析を行った。Asukamycin は、市販されているものの非常に高額なため、Asukamycin と同様に α , β 不飽和ケトンとエポキシケトン分子中に有し、より安価な Manumycin A を用いた検討を行った所、231MFP 細胞の増殖抑制、UBR7 及び p53 への結合、UBR7 と p53 とを橋渡しする molecular glue 活性、p53 の転写活性化作用いずれにおいても、Manumycin A には Asukamycin と同様の作用が認められた。そこで次に Manumycin A を基に構造展開し、エポキシケトンを還元した誘導体 (Manumycin D) を用いて同様に活性の評価を行った。その結果、Manumycin D は UBR7 には依然ターゲットするものの p53 に結合する活性は顕著に減少しており、また molecular glue 活性、p53 の転写活性化作用、さらには 231MFP 細胞の増殖抑制作用いずれも Manumycin A と比較して顕著に減弱していた。これらのことから、Manumycin/Asukamycin のエポキシケトン部分が p53 へのターゲット、及びその下流の活性に重要である可能性が示唆された。

次に、Manumycin A の α , β 不飽和ケトン部分を還元した誘導体 (Manumycin II) も作成し、同様に活性の評価を行った。その結果、Manumycin II は gel-based ABPP によって UBR7 と p53 をいずれもターゲットすることが確認された。Molecular glue 活性についても同様に評価を行った所、興味深いことに Flag-UBR7 に対し p53 のモノマーをリクルートする活性は Manumycin A と II とでほとんど同じだったものの、UBR7 との複合体と考えられる高分子量帯のバンドが Manumycin II 処理では Manumycin A と比較して有意に減少しており、 α , β 不飽和ケトンが無くても UBR7 と p53 それぞれをターゲットすることは可能であるものの、この分子構造が UBR7 と p53 との複合体形成には重要である可能性が考えられた。さらに、Manumycin II は Manumycin A と比較して 231MFP の増殖抑制作用、p53 の転写活性化作用共に有意に減少しており、molecular glue として Manumycin/Asukamycin が介する UBR7 と p53 の複合体が p53 の転写活性化、及び TNBC に対する抗がん活性に重要であることが、UBR7 のノックダウンを用いた遺伝学的手法だけでなく、誘導体を用いた構造活性相関の見地からも支持された。

以上、私は海外特別研究員の研究テーマとして、TNBC に対する抗がん活性作用を有する Asukamycin/Manumycin 分子種に着目し、最先端のケミカルプロテオミクス手法によってその新たな標的分子として UBR7 を同定した。さらに Asukamycin/Manumycin が、molecular glue として UBR7 に p53 をリクルートし、p53 を活性化させることで抗がん活性を発揮している可能性を示した。さらに、Manumycin の誘導体を用い、これらの活性に重要な分子中の構造を明らかにした。これらの成果は、バイオアーカイブ上で現在公開中であると同時に、Nature Chemical Biology に投稿しており、現在 in revision となっている。