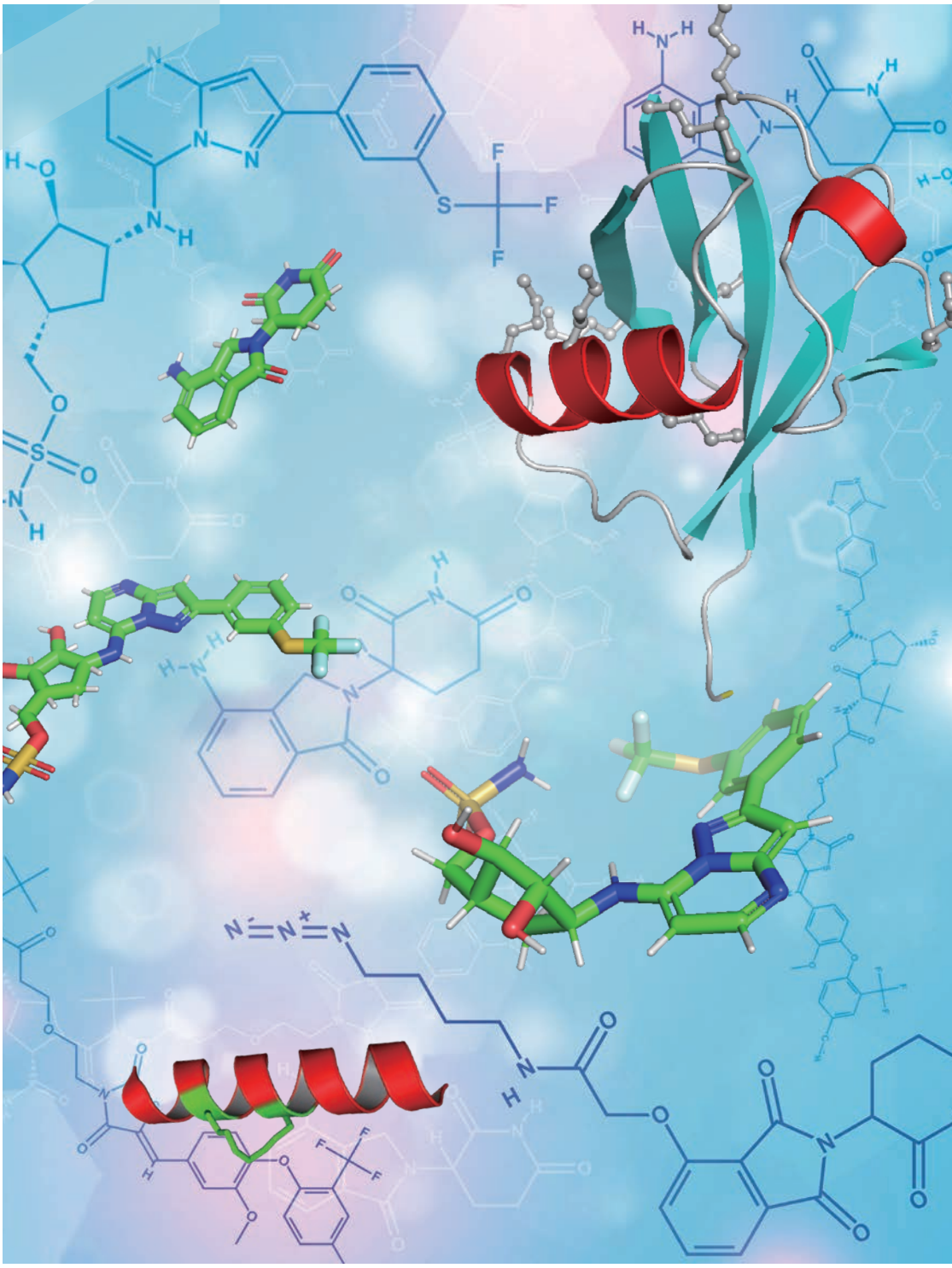
Ubiquitin new frontier driven by Chemo-technologies

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



1
June 2019

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 2019 1

02 領域代表挨拶
佐伯 泰

03 Essay
温故知新 ～ユビキチンとプロテアソーム～
田中 啓二

11 班員紹介

46 研究班員一覧

Meeting Reports
47 ケモユビキチン・キックオフシンポジウム
濱崎 純

49 分子生物学会「ユビキチン研究の新潮流：ユビキチンコードを識る・操る」に参加して
大竹 史明

50 新学術「ケモユビキチン」第1回班会議・第2回ユビキチン研究会合同会議に参加して
尾勝 圭

51 日本薬学会「選択的タンパク質分解医薬品開発の最前線」に参加して
柴田 識人

受賞コメント
53 2018年度持田記念学術賞を受賞
村田 茂穂

54 2018年度日本生化学会奨励賞を受賞
山野 晃史

55 活動報告

56 関連ミーティング・シンポジウム情報

57 編集後記

代表挨拶

平成30年度より、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」（略称：ケモユビキチン）が発足しました。現在、「ユビキチン＝タンパク質分解の指標」から「ユビキチン＝タンパク質の機能変換のための素子」へとパラダイムシフトが起きており、ユビキチンは生命科学研究全般に大きく拡大しております。さらに近年、ユビキチン関連分子の変異が、がんや免疫疾患、神経変性疾患だけではなく、自閉症などの発達障害からも次々と同定されており、ユビキチン研究のニーズがさらに高まっております。しかし、個々のユビキチン依存的経路を解析する手法や研究ツールは十分とは言い難く、今後のユビキチン研究の拡大を考慮すると、まさに今、ユビキチンに特化した解析拠点の整備が必要と考えられます。

本研究領域では、前新学術領域研究「ユビキチンネオバイロジー」で開発されたユビキチン解析ツールやプロテオミクス解析法に加え、様々な化学技術（ケモテクノロジー）を大胆に取り入れた次世代型ユビキチン研究を推進します。そのために、計画研究班には第一線のユビキチン研究者とケミカルバイオロジーや機能性ペプチド開発に造詣の深い有機化学者がユビキチンをキーワードとして集結しました。本領域の立ち上げにあたり10回以上もの討議を重ねてきましたが、その度に視点が異なる数多くの斬新なアイディアが生まれ、さらには低分子化合物や機能性ペプチド、化学合成タンパク質など様々な有機化学的手法の全てがユビキチン研究に有用であると確信しました。ケモテクノロジーによる新機軸のユビキチン解析ツールの開発は、個々のバイオロジーを駆動するユビキチンコードの動作原理の解明、ユビキチンが関与する新しいバイオロジーの発見、ユビキチン関連疾患の発症機構の理解に大きく貢献し、将来的には「ユビキチン創薬」への応用展開が期待されます。

また本研究領域では、アカデミアで世界初のユビキチン・ケモテクノロジー拠点の形成を目指しています。現在、ケミカルバイオロジーとユビキチン研究の融合研究は世界的な潮流となっておりますが、日本の新学術領域のような大規模なグループ研究は稀であり、本領域のようにユビキチンの基礎研究に特化した研究グループは存在しません。「ユビキチンバイオロジーを化学的手法で解き明かし制御する」ことを目標とする本領域は、世界の流れを先取りし、さらには世界をリードすることが十分に可能です。

日本のユビキチン研究をさらに大きく発展させ、さらに将来的にも持続可能な領域とするために、是非、多くの先生方、特に若手研究者に参加して頂きたいと思います。どうか宜しく申し上げます。

東京都医学総合研究所
佐伯　泰

温故知新 ～ユビキチンとプロテアソーム～

田中 啓二（東京都医学総合研究所）

はじめに

『論語』出典の「温故知新」：辞書を繙くと「昔のことを調べて、そこから新しい知識や道理を見つけ出すこと」とある。物事の源流を知ることは、科学の盛衰を知る意味でも重要である。生命科学における大きな発見は、偶然による一見些細な観察に始まることが多い。実際、我々の分野を鑑みても、ユビキチンの発見が ***BBRC*** (1978) に、そしてオートファジー遺伝子の発見が ***FEBS Lett*** (1993) という短報誌に発表されたことからも窺われるように、後にノーベル賞論文としての評価を甘受するような真に独創的な発見は、時代の常識を凌駕しているために、当時の識者たちにその重要性が理解されない場合が多いのである。という訳で、本エッセイでは、筆者が「ユビキチン・プロテアソームシステム（UPS）の発見の現場に居合わせた最初の日本人」という特権を行使して、往時を回想しながら、今日、拡大の一途を辿っているUPSがどのような経緯で発見されたかを概説する。

エネルギー依存性のタンパク質分解

リソソーム（1955）やオートファジー（1963）が発見された頃、UPS発見の糸口となるMV. Simpsonの“不思議な”論文が発表された（***JBC*** 1953）。当時Simpsonは1930年代においてR. Schoenheimer（“The Dynamic State of Body Constituents”の著書で有名）が開発した同位体を用いた生体内代謝を追跡する方法にならって、放射性アミノ酸を用い肝臓タンパク質の代謝回転（合成と分解）を調べていた。肝切片を用いたタンパク質分解は、予め標識しておいたタンパク質から放射性アミノ酸がリンゲル液中に遊離してくる量を測定することによって解析した。驚いたことにATP産生（解糖や酸化的リン酸化）系の阻害剤を液中に添加して細胞内のATPレベルを消失させると、タンパク質分解が瞬時に停止した。これは、“細胞内におけるタンパク質分解には代謝エネルギーが必要である”ことを示唆していた。しかし加水分解反応は発エルゴン反応（exergonic process）であり、生合成反応のような吸エルゴン反応（inergonic process）とは異なり、エネルギーは不要であるという熱力学の第二法則（タンパク質分解のようにエントロピー“無秩序”を拡大する化学反応にはエネルギーを要しないという法則）に反することから、この論文は図書館の奥底で深い眠りについた。四半世紀後に、この眠りを覚醒させたのは、若干30歳半ばの新進気鋭の生理学者AL. Goldberg（米国ハーバード大学教授）であった。彼は「網状赤血球の抽出液にATPを添加すると、タンパク質分解が激しく促進される！」ことを見出し、Simpsonの提案を追認した（***PNAS*** 1977）。Goldbergの慧眼は、「網状赤血球はタンパク質合成のみならずタンパク質分解も他の細胞より遙かに亢進しているのではないか」という素朴な発想であり、彼の推定は、物の見事に当たったのである。Goldbergの試験管内でのATP効果の再現実験は、そのメカニズム解明を可能にしたことで非常に大きな価値を持っていた。当然、その機構解明はGoldbergらの研究室で進められるはずであったが、この目論見は水泡に帰した。思わぬ強力な伏兵が不意に登場し、その後に受けるはずであった栄光をほぼ完璧に奪い取ってしまったからであった。

ユビキチンシステムの発見

米国フィラデルフィア・フォックス・チェイス癌センターのI.Roseは熟練した酵素学者で、イスラエル工科大学のA. Hershkoらと親密な関係にあった。彼らが注目したのは、件のGoldberg論文であった。実は、彼らはその前年の1976年に開催された国際会議でのGoldbergの発表に触発され、直ちにHershkoの大学院生であったA. Ciechanoverと一緒に、ATP依存性タンパク質分解の機構解明に取り組んだ。そして瞬く間にエネルギー要求性タンパク質分解機構の核心に迫った。1978年、彼らは網状赤血球抽出液からATP依存性のタンパク質分解機構のキー分子を見出したのである。ATP依存性のタンパク質分解活性がDEAE-celluloseを素通りする「分画I」と吸着して高塩濃度で溶出される「分画II」に分別できること、即ち「分画I」と「分画II」は単独では、ATPのタンパク質分解活性に対する促進効果はほとんど認められなかったが、両者を混合すると、抽出液で観察されたATP効果が再現できることを見出した。これは大量に含まれるヘモグロビン（DEAE-celluloseに吸着しない）を除去するための分別操作であったが、これが幸いした。そして「分画I」に存在する熱安定性分子の純化に成功し、ATP-dependent proteolysis factor 1（APF-1）と命名した。100℃の熱処理は、「分画I」に含まれるヘモグロビンや大部分のタンパク質を変性沈殿させたが、ATPによる促進活性は不変であり、この操作でAPF-1はSDS-PAGEで8～9kDaの主バンドとして明瞭に検出できた。この結果は1978年、速報誌BBRCに掲載された。APF-1は「分画II」に存在すると推定した未同定のタンパク質分解酵素の活性化因子と考え、^{125}Iで標識したAPF-1を抽出液に添加してその相互作用分子を探索した。その結果、驚くべきことに^{125}I標識したAPF-1は、基質タンパク質にATP依存的に共有結合し、高分子量側にラダー（複数のバンド）として出現したのである。これは現在ではポリユビキチン化修飾としてごく自然に観察されているが、このような修飾反応は過去に例のない稀有な現象であった。彼らはAPF-1が活性化因子として作用するのではなく基質タンパク質に鎖状結合することを見抜き、この修飾がATP依存性のタンパク質分解に必須であること、即ち、“APF-1の分解シグナル仮説”を提唱した。当時、多くの研究者たちは、これまでのプロテアーゼの常識を完全に覆した“ユビキチン仮説”を疑惑の眼差しをもって遠巻きに眺めているのみであった。しかしHershkoらの緻密な実験と冷静沈着な思索が、予想もしなかった新しい翻訳後修飾系の発見に辿り着いたのであった。このように（全く意味のわからないような）不思議な現象に遭遇した時の振る舞い（考察力）に、研究者の真価が問われるのである。

さてユビキチンは1975年、G. Goldsteinがあらゆる細胞に遍在（ubiquitous）することに因んで名付けたタンパク質であるが、その論文の趣旨は誤っており、目的として精製したタンパク質の混入物に過ぎなかった。本命は、1977年、ユビキチンがクロマチンのヒストン2Aにイソペプチド結合していることを報告したGoldknopfとBuschのPNAS論文にあった。この結合様式は、HershkoらのユビキチンAPF-1がユビキチンと同一分子（8.6kDaの進化的に保存されたタンパク質）であることが証明されると、ユビキチンの翻訳修飾分子としての機能は、動かし難いものになった（***JBC*** 1980）。

その後、1980年代前半（1978-1983）までにHershkoとCiechanoverらは、ユビキチン（Ub）が活性化酵素（E1）・結合酵素（E2）・リガーゼ（E3）から構成された複合酵素系（ユビキチンシステム）によって標的タンパク質に共有結合すること、即ちユビキチンのC末端のカルボキシル基と標的タンパク質中のリジン残基のε-アミノ基が縮合によってイソペプチド結合し、さらにこのE1-E2-E3のカスケード反応を繰り返すことによって、多数のユビキチン分子が鎖状に連結したポリマー（ポリユビキチン鎖）が形成されることを明らかにした。この反応系の珠玉の一つは、E1によるユビキチンの活性化にATPの加水分解が必要であることであった。ユビキチンシステムのような既存の概念にない斬新なコンセプトを、生化的手法のみで確立したことは、彼らの創造力の賜物であり、驚愕に値することであった（***Annu Rev Biochem*** 1992, 1996に詳述）。

ユビキチン活性化酵素E1の遺伝子発見には、A. Varshavskyの卓越した先見性があった。当時、日本（遺伝研のグループ）では、細胞周期における染色体の凝縮異常を示すマウス温度感受性変異株細胞ts85を分離していた（***FEBS Lett*** 1983）。この論文を見たVarshavskyはts85の原因遺伝子産物がユビキチン化反応を触媒するE1であることを直感で見抜き、細胞を入手、1984年、E1遺伝子の発見に導いた（***Cell*** 1984）。この研究が端緒になり、細胞周期制御におけるユビキチンシステムの研究は、拡大の一途を辿り、今日に至っている。この発見は、ユビキチンシステムが大きなバイオロジーに繋がった最初の例であった。

ユビキチンシステムが実際にin vivoで作動していることの解明に最も貢献したのは、Varshavskyとその門下生たち（D. Finley, M. Hochstrasser, S. Jentschら）であった。Varshavskyは1977年、旧ソ連邦から米国ボストンのMIT（マサチューセッツ工科大学）に異動し、ヒストンのユビキチン化に注目、染色体の研究を進めていたが、1983年頃から出芽酵母の遺伝学技法を駆使したユビキチンシステムの包括的研究を開始した。そしてHershkoらが生化学的に同定していたE1, E2, E3などの酵素について、該当する酵母遺伝子を網羅的に単離し、続々と一流誌に発表した（1984-1990）。彼らの一連の研究は凄まじく、破竹の勢いで、タンパク質分解の世界を席巻していった。この研究の過程で、1986年、Varshavskyはユビキチンシステムにおける“N-末端則”を発見した。その後の“N-末端則”に関する膨大な成果については、最近の優れた総説（***Annu Rev Biochem*** 2017, ***PNAS*** 2018）を参照していただき、詳細は割愛する。HershkoとVarshavskyの刮目すべき業績に対して、ガードナー賞（1999年）とラスカー賞（2000年）が授与され、彼らがノーベル賞を受賞することは、当該分野の殆どの研究者たちの一致した見解であった。ところが蓋を開けてみると、即ち、2004年のノーベル化学賞からVarshavskyが外され、その代わりにCiechanoverとRoseが選ばれたのである。Varshavskyの弟子たちを含め多くの同業者たちは激怒し、彼の功績を讃えるために、***Science***誌に「Varshavsky's Contributions」と題する記事（306:1290-1292, 2004）を掲載した。約30名の関連研究者たちが名前を連ねていた。筆者にも共同署名の誘いがあったが、HershkoやCiechanoverたちと懇意にしていたこともあり、無用な軋轢を避けるために丁重に辞退した。この背景には、I.Roseが受賞したことへの不満もあった。彼は、確かにHershkoたちを経済的にも技術的にも支援したが、それがノーベル賞に値するとは、誰も思わなかったからである。但し、彼はA. Haas, K. Wilkinson, C. Pickartらユビキチン研究の勃興期に活躍した面々を育成した功績は少なくないと筆者は思っている。後年、即ち2013年、Varshavskyはブレークスルー賞（賞金3百万ドル）を受賞して溜飲を下げ、名誉を回復したと思われる。

ユビキチンシステム：史上最大の翻訳後修飾系

前項で記載したユビキチンシステムのその後の30年余における未曾有の発展は、歴史的な快挙であると、筆者は考えるが、それらの全容は膨大であるので、ここでは未解決な課題についての概要を記述するに止めたい。

その1：ユビキチンの遺伝子の不思議

ユビキチンは二つの異なったタイプの遺伝子にコードされている。一つは、ユビキチンとリボソームタンパク質との融合遺伝子である。即ちリボソームの大小二つの40Sおよび60S粒子を構成する各々の必須サブユニットの一つとユビキチンは融合遺伝子として存在する。出芽酵母では多くのリボソームタンパク質遺伝子が重複しているために単独破壊では生存、そしてリボソームは不均一で多様性があるが、枯草菌の場合、リボソームサブユニットの約半分は非必須であるので、融合遺伝子としての発現は重要そうに思えるが、リボソームとユビキチン量の発現量を同じくしていることの意味は、依然として謎である。もう一つは数個〜10数個のユビキチンがタンデムに連なったポリユビキチン遺伝子である。ポリユビキチン遺伝子は、1回の転写・翻訳で多数のユビキチンを合成することができる点で秀逸であり、かつストレス応答遺伝子でもあることから、細胞は環境ストレスに曝されたとき、必要とするユビキチンを迅速に大量生成することができるよう合理的に設計されている。実際、ユビキチンの量は、多くても少なくても細胞は異常になり、常に適切に保たれる必要があるようである。

その2：ユビキチン修飾にかかわる分子群

ユビキチン修飾（ユビキチンコード）とその解読（デコーダー）にかかわる分子群は膨大である。実際、ヒトの遺伝子数を調べると、E1活性化酵素が2種類、E2結合酵素が〜50種類、E3リガーゼ酵素が〜600種類、脱ユビキチン化酵素（DUB）が〜100種類、ユビキチン結合ドメイン（UBD）タンパク質が〜300種類、ユビキチン様（UBL）タンパク質が〜100種類、などを合計すると、これらの遺伝子は、ヒトゲノム中に5%以上存在することになる。とくに大きなファミリーを形成するE3は、(1) HECTs型（NEDD、HERC、E6-APなど）、(2) RNF：RING fingers型（CRLs=Cul1/SCF, Cul2/ECS, Cul3/CUL3-BTB, Cul4A, Cul4B, Cul5, Cul7, Cul9やAPC/C、Trim、など）、(3) RBR：RING-HECT Hybrid型（Parkin, LUBACなど）、(4) その他、のグループに分類され、600種以上存在している。また、DUBは約100種（USP, UCH, Josephin, OTU, MINDY, JAB1/MPN/MOV34）存在する。UBLタンパク質は、I型モデファイヤー（ユビキチンと同様に翻訳後修飾系を構成するSUMO、NEDD8, ATG8/12など8種類）とII型ユビキチンドメインタンパク質（UDP）に大別され、I型には、独自のE1, E2, E3なども存在する。そしてこの大規模な酵素系が有する多彩な情報網はユビキチンコードと呼ばれ、ユビキチン結合ドメインを持ったタンパク質（デコーダー）を介して、内包された情報が下流に伝達される。ユビキチン系の登場以前には、タンパク質キナーゼ・ホスファターゼ系が最大の翻訳後修飾系と言われていた（ヒトゲノム中に500種類以上があり、全遺伝子の約2%を占める）が、ユビキチンシステムはそれらを遥かに凌駕する真核生物に存在する最大の翻訳後修飾系である。ユビキチンシステムが、なぜこのような大掛かりな装置を形成しているかの解明は、21世紀における生命科学の主要なテーマの一つである。

その3：ユビキチン鎖の多様性

ユビキチンはモノマー（単量体）としてばかりでなくポリマー（重鎖）を形成することなど、多彩な様式で標的タンパク質の（主として）リジン残基にATP依存的に共有（イソペプチド）結合する。このようにユビキチンは、多様性に富んだ鎖（ユビキチン分子内のK6、K11、K27、K29、K33、K48、K63、M1鎖や分岐鎖、混合鎖など）を形成することで複雑な情報を獲得している。またポリユビキチン鎖の長さやユビキチンの翻訳後修飾（アセチル化・リン酸化）など、ユビキチンによる修飾モードは多様であり、それらの機構についての全容解明は、大部分が不明である。本項については、本新学術領域のHP（http://www.ubiquitin.jp）に詳述されているので、そちらを参照して頂きたい。

その4：ユビキチンシステムの生理学と病理学

ユビキチンがその複雑な鎖を使い分けることによってプロテアソーム依存性のタンパク質分解の目印として機能するばかりでなく、オートファジー、エンドサイトーシス、シグナル伝達、転写制御、DNA修復、ストレス応答、タンパク質やオルガネラの品質管理など全ての生命活動に関係することが分かってきた。しかしユビキチンシステムを構成する分子群の大多数は、今日なお作動機構や生理的意義が不明である。またユビキチンシステムは、多くの病気の発症と密接に関係しており、今後、ユビキチンに関連した疾病は、確実に増加すると思われる。特に大きな遺伝子ファミリーを形成しているE3とDUBには、疾病に連鎖した遺伝子変異が集中している。E3は標的基質にユビキチンを連結するキー酵素であり、この酵素とその逆反応を触媒するDUBに多くの変異が存在することは、細胞内におけるユビキチン化のバランスが、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることを強く示唆していると思われる。従ってユビキチンシステムの生理病態学研究は、21世紀の健康科学の発展に大きく貢献することが期待される。

プロテアソーム研究

サイトゾルのタンパク質分解系

タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の研究は、酵素学として古い歴史があり、いわば日本における生化学研究の王道の一つであった。しかしそれらの多くは、細胞外酵素であり、細胞内プロテアーゼについては、研究の対象にはならなかった。1955年、C. de Duveは多様な加水分解酵素を含む細胞内小器官（オルガネラ）としてリソソームを同定、この発見によって1974年にノーベル生理学医学賞を受賞した。リソソームはカテプシンと呼ばれる一群のタンパク質分解酵素（10余の分子種が存在）を含んでいることから、細胞内におけるタンパク質分解の主要な装置、則ちタンパク質をアミノ酸にまで完全分解することができる焼却炉と考えられた。しかし、1970年代に入ると、生細胞でのリソソームの機能を抑制する薬剤（例えばpHを上げる試薬やカテプシンの阻害剤など）で処理しても恒常的に起こっているタンパク質分解は殆ど抑制されなかったことから、リソソームとは異なったタンパク質分解系の存在が示唆されていた。また細胞内の全てのタンパク質は、千差万別の寿命をもってダイナミックに代謝回転しており、この寿命の不均一性は、どのように考えてもリソソーム分解だけでは説明できないように思われた。その結果、サイトゾルに新しいタンパク質分解酵素が存在するのではないかという、野心的な考え方が多くの酵素学者を虜にした。その後暫くして、細胞質（サイトゾル）に至適pHが中性から弱アルカリ性領域に有する大きなプロテアーゼ（High Molecular Weight Protease）が存在するとの知見が集積し、当時、この新しいタンパク質分解系に対して、non-lysosomal pathway（非リソソーム系タンパク質分解経路）と呼ばれる用語が提案されていた。一方、既述のGoldbergらが発見した網状赤血球抽出液のタンパク質分解系は、ATPの加水分解依存的であるのみならず弱アルカリ性領域に至適pHを持っており、リソソームとは無関係な酵素であることは明白だった。その後この二つの研究の流れは、一つに収束してゆくのだが、ユビキチンシステムの登場もあり、多くの研究者の思惑が錯綜し、混迷を深めていた。

エネルギー依存性タンパク質分解系の二段階説

HershkoとCiechanoverたちは、1978年の最初の論文以後、面目躍如の活躍を続け、ユビキチン仮説に関する傑出した論文を立て続けに発表していた。筆者がGoldberg研究室にポスドクとして参加した時（1981年）、与えられた研究テーマは、意外なことに「ユビキチン仮説が誤りであることを証明せよ！」というものであった。ユビキチン仮説に耽溺していた筆者は、流石にこのテーマには驚いた。その理由を訊ねてみると、当時のGoldberg研ではユビキチン化反応が再現できなかったからであった。その原因は、友人から供与を受けたユビキチンが（C末端のGly残基が欠損していた）不良品だったことによるものであった。と同時に、彼らがユビキチン説に疑惑を抱いていた背景として、リソソームをもたない大腸菌のような原核生物のタンパク質分解系もエネルギー依存性であることが判明しており、その主役としてATP依存性プロテアーゼLonが発見されていたからである。LonはセリンプロテアーゼとATPaseのふたつのドメインを共有する、文字通りATP依存性プロテアーゼであった。当時のGoldberg研では、Lonプロテアーゼ研究の最盛期であり、L. Waxman, CH. Chung, SA. Goffなど主力の研究者たちは、米国NIHのS. Gottesman, MR .Maurizi らとの激しい競合もあって、この酵素の構造と機能の解明に邁進していた（現在、大腸菌には、Lonの他、ClpA/B/X、FtsH、HslUVなど複数のATP依存性プロテアーゼの存在が知られている）。彼らは魅力的なLonプロテアーゼに酔い痴れていたので、網状赤血球を含む真核生物にも同種のATP依存性酵素が存在することを信じて疑わなかったのである。それゆえにユビキチン仮説の登場は、晴天の霹靂であり、怯懦と不信感が混合し、緻密に検証をしなかったのである。

ユビキチンシステムの妥当性を検証するために、筆者はHershkoらの論文を忠実に辿ることにし、ユビキチンの精製を含めて全ての試薬を新しく調整、厳格な追試実験を行った。結果は明瞭であった。約二週間後、Goldbergに一つのオートラジオグラムを差し出した。そこには基質として加えたリゾチームに結合した ^{125}I 標識したユビキチンの鎖状ラダーが綺麗に現れていたのである。Goldberg研で初めてユビキチン修飾を観察したデータであった。彼は息を飲んでそのフィルムをマジマジと眺め、言葉もないといった調子で失望の色を隠さなかった。しかしGoldbergは依然として真核生物にもATP依存性プロテアーゼが存在する可能性に執着し続けた。暫くして筆者は、彼の願望を裏付ける結果を出すことができた。即ち、ユビキチン化修飾で分解シグナルを付与された基質タンパク質を網状赤血球抽出液に加えて分解を調べた結果、その分解も完全にエネルギー（ATP）依存的であることを明らかにしたのである（***JCB*** 1983）。真核生物におけるタンパク質分解の“二段階ATP要求性”仮説である。この結果は、Goldbergを歓喜させた。ATP依存性（ただしユビキチンには非依存性）のプロセスは、ATP依存性プロテアーゼの存在を強く示唆していたからである。しかし、その酵素の実態は深い闇に閉ざされており、その確信を得る（酵素の発見の）ためには、さらに5年以上の歳月を要することになった。

余談であるが、筆者がGoldberg研に加わった時、一週間も要して作製したウサギ網状赤血球の抽出液には大きな問題があり、研究者たちを悩まし続けていた。それは調整直後の抽出液は非常に高いATP依存性のタンパク質分解活性を示したが、その活性は、翌日には約1/2に、そして二日後には1/4に低下し、使い物にならなくなったのである（実際、Goldberg研では、5年以上に亘って延々と、ウサギの網状赤血球を作り続けていた）。筆者は、密かにこの難題に挑戦した（その理由は、網状赤血球の作製に疲労困憊し、このような無為な作業のために留学しているのではないという怒りが沸沸と湧いてきたからであっ

た)。よく調べてみると、ATP効果の喪失は、ATP非依存性の活性の上昇によるものであることが判明した。なにか不安定なプロテアーゼが抽出液にすると、時間依存的に活性化されると想定し、この活性化を阻止するために抽出液に20%のグリセリンを添加すると、驚いたことにATP依存性の活性は数ヶ月間、全く低下しなかったのである。この結果、動物室で飼育していたウサギは、100〜200羽から10羽程度に激減したのである。長年、苦労を重ねていた学生やテクニッシャンは狂喜し、その後、尊敬の眼差しが筆者に向けられた(その結果、筆者は優雅な留学生活を送ることができたのである)。同時に筆者は、このグリセリンで安定化される不安定な酵素の実態は何だろうかと思索した。その結果が、後年、プロテアソームの発見に辿り着くヒントになるのだが、当時、このことは全く予見できなかった。しかしこのことが途轍もなく大きな発見に結び付くに違いないという思いが湧き上がり、筆者の心は弾んでいた。

"20S プロテアソーム" の発見

筆者が留学していたGoldberg研では、網状赤血球抽出液のタンパク質分解系の研究と同時に中性領域に活性があり、分子篩クロマトグラフィーで数十万の分画に溶出する高分子量プロテアーゼについても細やかに研究していた。筆者はこの酵素の実態を明らかにすることを要請されたが、その分離・精製は困難を極めていた。当時、^{3}H-カゼイン(天然変性タンパク質)を基質としてその分解活性を測定していたが、例えば陽イオンクロマトグラフィーで分画すると、分離した全ての分画に活性が検出され、クロマト操作を繰り返すごとに、活性は消失してゆき、単一に分離することはできなかった。筆者はこの不安定性の挙動について思い悩んでいたとき、例の網状赤血球抽出液におけるグリセリンの安定化効果を思い出した。そこで、使用する全ての緩衝液に20%のグリセリンを添加して精製すると、極めて簡単に単一酵素として精製できることができたのである。筆者は帰国後この酵素を、複数の生物種から精製し、(トリプシン、キモトリプシン、カスパーゼ用の蛍光合成基質を分解する)多彩な基質特異性から(High molecular weight multicatalytic protease)高分子量多機能プロテアーゼと呼んだ。筆者はラット肝臓からこの酵素を大量に精製し、大阪大学蛋白質研究所の高木俊夫教授グループの協力を得てこの物理化学的性質を徹底的に調べた。その結果、本酵素が沈降係数20S、分子量75万、多数のサブユニットから構成された複合体であることが判明した。また高木研と交流のあった東京大学理学部(その後、東京工業大学に転任)猪飼篤教授に精製酵素を電子顕微鏡(酢酸ウランによる負染色)で撮影してもらった結果、リング型の構造であったので、20S ring-shaped particlesと記載した(***JBC*** 1986, 1988)。その後、紆余曲折があったが、1988年、筆者はGoldbergらと一緒にこの酵素を(20S)プロテアソーム(proteasome : protease活性を有した巨大粒子〜some)と命名した(***Nature*** 1988)しかし、精製した酵素には、ATP依存的に^{125}I標識したポリユビキチン化基質を分解する活性は、全く検出できなかった。

"26S プロテアソーム" の発見

1987年、GoldbergとM. Rechsteinerのグループは、独立にプロテアソームが二つの分子種からなること、一つは上述の20Sプロテアソームであり、もう一つはそれより大きな複合体で、ショ糖密度勾配遠心法での解析から、26S近辺に沈降していることを見出した(26Sプロテアソームと命名 : PNAS, JBC)。26Sプロテアソームは、20Sプロテアソームを含む大きな複合体でユビキチン化タンパク質をATP依存的に分解する活性を示した。D. Finleyは、後に出芽酵母から同じ酵素複合体を分離し、それらの成分が20S core particle (CP)と19S regulatory particle (RP)であることを提案した(***Cell*** 1998)。

筆者らも同様な酵素を安定化剤としてグリセリンとATPを使用してほぼ均一に分離し、高いATP依存性のオルニチン脱炭酸酵素の分解活性を示すことを見出した(***Nature*** 1992)。物理化学的性質を詳細に解析した結果、分子量250万、沈降係数30Sの多成分複合体であったので、筆者らは30Sプロテアソームと命名した(***J Struct Biol*** 1993)。またRPを密度勾配遠心法で解析すると、明らかに20S CPより重い分画に沈降したので、22S RPと名付けた。後日、30Sプロテアソームは RP-CP-RP複合体であり、26SプロテアソームはRP-CP複合体であることが判明した。しかし今日、ATP依存性プロテアーゼとしては、26Sプロテアソームの名称が定着しているので、通常、両者を区別せずにこの名称が使用されている。筆者らが推定した分子構成は、後年、CV. Robinsonらと共同で行ったNative MS(質量分析計)を駆使したトップダウン解析でほぼ正確であることが判明した(***Mol Cell*** 2011)。

プロテアソームの構造解析

a) cDNAクローニングによる一次構造の解明

プロテアソームの分子的実態を明らかにするためには、一次構造の解明が必須であったので、筆者はこの解析に執念を燃やした。当時、タンパク質の一次構造は、ペプチドのアミノ酸配列を化学的手法で決定するエドマン分解が主流であったが、この手法でのプロテアソームの一次構造の解析は、複雑な多成分複合体としての構造から考えると、極めて困難であった。しかし時が幸いした。20世紀後半に分子生物学が登場、洗練された遺伝子工学技術によるcDNAクローニングが一次構造の解析を飛躍的に早めた。当時、筆者らは20Sプロテアソームの各サブユニットを大量に分離・精製し、九州大学理学部岩永貞昭教授に各サブユニットの部分アミノ酸配列を決定していただいた。実際には、当時、大学院生であった徳永文徳(現)大阪市立大学教授に解析して頂いた。その頃、cDNAクローニングでは、最高峰の技術を有していた京都大学医学部の中西重忠教授に支援して頂き、次々と構造解析に成功していった。実際には、当時、大学院生であった垣塚彰(現)京大教授の助力に負うところが大きかった。1989年、最初の構造を決定した時は、感無量であった。プロテアソームの構造解析は世界初であったので、国内外からcDNA分与の依頼が殺到した。

20Sプロテアソームの全一次構造の決定に目鼻がつく頃、新たな苦難が浮上した。20Sプロテアソーム(20-30 kDa)以外に20本以上のRPサブユニット(35-110 kDa)の解析に取り組む必要が生じたのである。これは難作業であったが、いくつかの偶然が幸いし、構造解析は加速度的に遂行できた。一つは米国テキサス・サウスウェスタン・メディカルセンターのG. DeMartinoもRPサブユニットの構造解析を進めるために大量のペプチドの構造情報を持っていたが、彼らは、cDNAクローニングに悉く失敗した。彼らは、全ての部分配列情報を提供して、筆者らにcDNAによる構造解析を依頼してきたので、エドマン分解による解析の手間が大幅に省けた。これらの情報を合わせて、筆者らのグループは、次々と完全鎖cDNAの分離に成功、一次構造を決めていた。もう一つの幸運は、当時、酵母の遺伝学研究で有名であった東京大学理学部の東江昭夫教授のグループが細胞周期変異遺伝子nin1-1を分離していたが、彼の直感で、この分子がプロテアソームの構成サブユニットであったら、全ての実験結果が説明できると、共同研究を提案してきた。この推定は見事にあたり、さらにその変異のサプレッサーの多くがプロテアソームサブユニットをコードしていたので、芋づる式に構造解析が進んだのである。このようにして調節サブユニットの構造解析を進めてゆくと、ATPaseの活性ドメインを含んだサブユニットが単離でき、安堵したが、これには厄介な問題が浮上した。SA. Johnston(DeMartinoと同じ大学)らがSug1というATPaseドメインを持った遺伝子産物が転写因子であるとの一連の論文を一流誌に発表しており、それらをプロテアソームのサブユニットと頑強に認めなかったのである。しかし10年余の論争の果てに、彼らは筆者らの軍門に降り、彼らの転写因子としての活性は、プロテアソームよる分解を反映した間接的な作用であることで決着した。しかしこの論争は、プロテアソームが転写制御に重要な役割を果たしていることを明らかにしたので、無駄にはならなかった。このように紆余曲折がありながらも、10-15年の年月をかけ哺乳動物26Sプロテアソームを構成するほぼ全てのサブユニット群のcDNA構造を決定することに成功した。その結果、RP複合体の構成サブユニットは、ATPaseサブユニットRpt1-6(Regulatory particle triple-A ATPase)とRnp1-15(Regulatory particle non-ATPase)に分類され、今日に至っている。

b) 高次構造の解明

1997年、ドイツMax-Planck研究所のR. Huber(ノーベル化学賞1988年)のグループは、酵母の20Sプロテアソームの X線構造解析に成功した。一方、2007年、筆者らは蛋白質研究所の月原冨武教授のグループ(海野、水島ら)との共同研究としてウシ肝臓プロテアソームの立体構造を決定した(Structure)。足掛け10年の歳月を要した難題であった。これらのプロテアソームの四次構造の解明は多くの情報を提供してくれた。則ち、触媒粒子CPはαリングとβリング(各々7種のαとβのサブユニットから構成)が$\alpha_{1\text{-}7}\beta_{1\text{-}7}\beta_{1\text{-}7}\alpha_{1\text{-}7}$の順で会合した分子量75万の円筒型粒子であること、そしてCPはカスパーゼ型(β1)、トリプシン型(β2)，キモトリプシン型(β5)の触媒活性を有しており、これらの活性部位(N-末端のスレオニン残基)はβリングの内表面に露出していることが明らかとなった。このようにプロテアソームは、驚くべくことに既存のセリン・システイン・アスパラギン酸・金属プロテアーゼには分類されないスレオニン残基を活性中心とした新規のプロテアーゼ複合体であることが判明した。

しかし26SプロテアソームのX線結晶構造解析は、世界中で多く研究者たちが試みたが、誰も成功しなかった。筆者らは1991年、精製した26Sプロテアソームの負染色による電子顕微鏡像の撮影を最初に報告した(***FEBS Lett.*** 2001)。その後間も無く、ドイツMax-Planck研究所のW. Baumeisterとの共同研究を開始、以後、35年にも及ぶ親密な関係を保つことになった。この電子顕微鏡像から26Sプロテアソームは、樽状の触媒粒子であるCPの両端にV字様の調節粒子RPが会合した、ダンベル型の超分子複合体(RP-CP-RP)であることが判明した(***Annu Rev Biochem*** 1996, ***Cell*** 1998)。しかし全体形状は判明したものの解像度は悪く、詳細な分子構造は不明であった。その後、クライオ(極低温)電子顕微鏡(Cryo-EM)による単粒子解析と単独のサブユニットの立体構造解析を組み合わせるという手法で、全体の分子構造が提案されてきた。しかし近年、新しく開発された検出器(電子線直接検知型・超高速CMOSカメラ)を搭載したクライオ電子顕微鏡による解析から、その全体構造が相次いで解明されている。これらについては、W. Baumesiter, A. Martin(カルフォニア大学), Y. Mao(北京大学)らが凌ぎを削った研究を展開している(作動機構の項参照)。

プロテアソームの動作原理

触媒粒子CP($\alpha_{1\text{-}7}\beta_{1\text{-}7}\beta_{1\text{-}7}\alpha_{1\text{-}7}$)は、通常、$\alpha$リングが閉じているため細胞内では不活性型として存在している。RPはLid(蓋部)とBase(基底部)から構成されており、Lid複合体とBase複合体は、各々 10個と9個のサブユニットから構成されている。RPには三つのユビキチンレセプター Rpn1, Rpn10とRpn13やユビキチン鎖を解離し再利用するための脱ユビキチン化酵素Rpn11が同定されている(他に脱ユビキチン化酵素Uch13やUsp6/USP14も会合)。Baseは6種のAAA型ATPaseサブユニット(Rpt1〜Rpt6)を含んでおり、このATPaseリングは、ATP依存性プロテアーゼとしてのプロテアソームの動作原理の核心であり、CPのαリングと結合してその中央部のゲートを開き、基質タンパク質の通過を可能にさせる機能を有している他、ATPの加水分解エネルギーを利用してタンパク質の3次元構造を解きほぐす(アンフォールディングする)

アンチシャペロン作用を持っていることが分かった（詳細についてはGoldbergの総説参照 ***Cell*** 2018）。ごく最近、基質（ポリユビキチン化タンパク質）と結合したプロテアソームについて、複数のコンホメーションがCryo-EMで解析され、6つのATPase全てにおけるATPの加水分解が連続的・協調的に進行することによって、基質の脱ユビキチン化、トランスローケションの開始、立体構造の連続的なアンフォールディングを調節していることが判明した。即ち、基質がプロテアソームの細いトンネルを通過してゆく仕組みが解明されたのである（Martinのグループ ***Science*** 2018、Maoのグループ ***Nature*** 2019）。

近年、基質タンパク質の分解については興味深い知見が集積している。A. Matouschekらは、プロテアソームによるユビキチン化タンパク質の分解には、タンパク質内にintrinsically disordered region（IDR:天然変性領域）が必要であることを提案し、その役割を詳細に解析している（***Annu Rev Biophys*** 2017）。一方、A. Martinらは、unstructured initiation regionを持たないユビキチン化タンパク質の場合でもCDC48/p97 ATPaseのunfoldase作用によって基質が分解に先立ってアンフォールディングされることを見出している（***Commun Biol*** 2019）。一方、筆者らは、細胞内では、プロテアソームがユビキチン化タンパク質を直接、トラップして分解するのではなく、それらの大部分（90%以上）が複数のシャトル分子（ポリユビキチン鎖とプロテアソームを同時に結合するタンパク質）で捕捉された後、プロテアソームに輸送され、分解されること、そしてK48鎖の選択性は、CDC48のコファクターであるNpl4が決定していることなどを、出芽酵母で明らかにした。さらにプロテアソームの複数のサブユニットがリン酸化修飾を受け、それが活性に影響しているとの報告も集積しつつある（***Protein Cell*** 2017）。

プロテアソームの形成機構

最初に発見されたプロテアソーム形成シャペロンは、酵母のUmp1（哺乳類POMP）であり、ユビキチン依存性タンパク質分解（Ub-mediated proteolysis）に異常を示す変異株として1998年に偶然に発見された。その後の解析からUmp1は天然変性タンパク質であり、ハーフ・プロテアソーム（αリングとβリングが一つずつ会合した半分の20Sプロテアソーム）を重合させ、活性型20Sプロテアソームの形成を促進することが分かった（***Cell*** 1998）。筆者らは、高感度のプロテオミクス解析からプロテアソームの形成に関わる専門的なシャペロン分子を発見し、Proteasome Assembling Chaperone（PAC）1-4と名付けた（***Nature*** 2005, ***Mol Cell*** 2006）。PAC1/PAC2ヘテロ二量体はαリング同士の凝集体の形成を阻止する働きを示し、PAC3/PAC4ヘテロ二量体はαサブユニットの段階的な会合を促進して、迅速に正確なαリングを形成させる。またβサブユニット群は、逐次的にαリング上に会合してβリングを形成するが、この段階的な会合にはβ2やβ5のプロペプチド及びβ2のC末端伸長領域などが“分子内シャペロン”として作用することが判明している（***EMBO J*** 2007, ***Nat Rev Mol Cell Biol.*** 2009）。

一方、RPのbaseを構成するATPaseリングの分子集合に関与するシャペロン分子として、筆者らは四種を同定することに成功した（***Cell*** 2009）。これらは、それぞれ当初プロテアソームと一時的に結合するタンパク質（PIPs: proteasome-interacting proteins）として同定されていた分子群、即ちNas2/p27、Nas6/gankyrin（p28）、Rpn14/PAAF1、Hsm3/S5b（出芽酵母／ヒト）であった（***J Mol Biol*** 2017）。

興味深いことにこれらの分子集合シャペロンは、細胞質に局在することから、プロテアソーム（静止細胞では、主に細胞質に存在）は細胞質で形成された後、活発に増殖しているがん細胞などにおいて核に大量に集積すると考えられた（***Nat Commun*** 2014）。またプロテアソームの分子集合機構には、Hsp90やBag6のような一般的な分子シャペロンの関与やプロテアソームストレスで誘導されるAdc17と名付けられたATPaseリングの形成を促進するシャペロンなども見出されている（***EMBO J*** 2003, ***Nat Commun*** 2013, ***Nat Rev Mol Cell Biol.*** 2018）。

プロテアソームの分子多様性

調節因子にはRP/PA700以外にCPのペプチダーゼ活性を強く増強するPA28が存在する。PA28は、PA28α・PA28β・PA28γの3分子種がある。PA28αとPA28βは細胞質で$(PA28\alpha)_4$・$(PA28\beta)_3$のヘテロヘプタマーとして存在し、インターフェロンγなどのサイトカインで誘導される。一方、PA28γは$(PA28\gamma)_7$のホモヘプタマーとして核内に存在する。ノックアウトマウスの解析から、PA28α・PA28βが免疫応答（一部の内在性抗原のプロセシング）に、そしてPA28γが個体の成長に関与することが明らかになっている（***J. Biol. Chem.*** 1999, ***EMBO J.*** 2001）。その他の制御因子として、CPに直接結合するPA200, PI31, ECM29なども知られているが、それらの機能解析の結果は、錯綜している状況にあり、統一した見解には達していない。

筆者らは、偶然に二つの免疫型プロテアソーム（触媒サブユニットが変換した亜型酵素）を発見した。即ち1994年、内在性抗原のプロセシング酵素として“免疫プロテアソーム”を発見した（***Science***）。免疫プロテアソームは、細胞内に出現・侵入した“がん抗原やウイルス・寄生虫などの異物（非自己抗原）”を分解、クラスI MHC（主要組織適合遺伝子複合体）に結合する抗原ペプチド（エピトープ）を効率よく切り出して、キラーT細胞に提示する酵素であった。さらに2007年、胸腺の皮質に特異的に発現している酵素として“胸腺プロテアソーム”を発見した（***Science***）。胸腺は、T細胞受容体（TCR）の再構成で獲得したほぼ無限のリンパ球クローンを形成する組織である。T細胞の分化・増殖によるレパトア形成メカニズムは、正の選択（異物を破壊する有用なT細胞を生存させる機構）と負の選択（自己に反応する有害なT細胞を死滅させる機構）から構成されているが、胸腺プロテアソームは正の選択によるT細胞の分化・増殖に必須な酵素であることが判明した。これら有顎動物に特異的な二つの免疫型プロテアソームの発見は、進化的には適応免疫の獲得と呼応して遺伝子重複により誕生したと推定されており（***Immunogenetics*** 2019）、適応免疫の基本原理（バーネットが提唱したクローン選択説）の核心に迫る研究成果と考えられている（***Nat Immunol*** 2018）。

プロテアソームの動態と制御

小胞体にアンカーした転写因子Nrf1は、通常、UPSで恒常的に壊されている半減期の短いタンパク質であるが、プロテアソームの活性が低下すると、分解から免れて蓄積する。蓄積したNrf1は、DDI2というプロセシング酵素（Aspartyl protease）で限定分解されて転写活性化ドメインが核に移行、33種全てのプロテアソームの遺伝子を活性化して、細胞内でのプロテアソーム活性を量的に回復させるように作動する（***Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*** 2018）。他方、植物では、過剰なあるいは障害されたプロテアソームは、選択的なオートファジー（Proteaphagy）で分解されるが、動物細胞でのプロテアソームの分解機構は、殆ど分かっていない（***Autophagy.*** 2018）。

さてプロテアソームが細胞質と核に両局在し、活発に増殖している細胞では、核がプロテアソーム抗体によって濃染されることは、1990年頃から分かっていた（PNAS）。しかし核におけるプロテアソームが何をしているかの詳細は、殆ど不明であった。実際、活発に増殖中の酵母細胞では、プロテアソームは核と細胞質に各々1μMと200nMの濃度で均一に拡散して存在する（***Nat Commun*** 2014）。ところが定常状態に入って増殖が止まると、即ち細胞内のエネルギーが低下（ATPが枯渇）すると、大部分のプロテアソームが、分～時間単位に細胞質で集積し、多数のサイトゾル顆粒PSG（Proteasome Storage Granule）を形成する。このPSGはATPレベルが回復すると、細胞質に分散して再び機能するようになる。PSG中のプロテアソームは活性型であり、PSGの形成は、プロテアソームをストレスによる傷害から一時的に隔離する防御応答であると考えられる。また哺乳類細胞を低強度の高浸透圧に曝すと僅か数秒で、プロテアソームが核内に多数の微細顆粒（Proteasome Foci：P-Fociと命名）を形成し、このP-Fociが核内でのタンパク質分解のセンターになる。このP-Fociは、融合、円形度、流動性などの性質から、液滴（細胞内で特定の分子を一過的に濃縮させることで、生体反応を効率よく促進させる構造体）、即ち膜のないオルガネラ（membraneless organelles）あるいは凝縮体（condensates）であり、液-液相分離（脂質二重膜などの仕切りがなく熱力学的に相分離する現象：LLPS）で形成されると考えられている（安田・佐伯ら、論文改訂中）。プロテアソームが環境ストレスに応答して細胞質や核で離合集散する液滴現象は、タンパク質の五次構造とも言われており、興味深い。

おわりに

ユビキチンシステムとプロテアソームの発見により、1953年Simpsonが提唱したエネルギー依存性のタンパク質分解機構の謎が究極的に解かれ、その結果、ATP消費の機構が熱力学の第二法則に反するものではないことが明らかになった。一つの大きな謎の解明に半世紀の年月を要したが、その結果、これらの研究によって彩られたタンパク質分解の世界は、未曾有の発展を遂げ、このシステムの存在なしには生命の仕組みが語れないほどに飛躍的に成長した。

筆者は、平成の30年間を通してプロテアソームの基礎研究に邁進してきたが、最大の不覚は、応用研究に目を向けなかったことである。プロテアソーム研究で筆者の予想に反して大きな成功を収めたのは、創薬研究であった。当初Goldbergは、萎縮による筋タンパク質の崩壊がUPSによるものであり、プロテアソームの阻害剤がその筋萎縮の阻止に有効ではないかとの発想で、ベンチャー企業を立ち上げ、スクリーニングを開始した。この試みは失敗に終わったが、その後、分子標的薬としてBortezomib（商品名：Velcade）の開発に進展した。このプロテアソーム阻害剤は、多発性骨髄腫やマントル細胞リンパ腫に対する出色の抗がん剤として臨床的に頻用され、ブロックバスターに成長、世界100国以上で臨床応用されている（年間売上3000億円以上）。さらに第二世代の抗がん剤としてCarfilzomib（商品名Kyprolis）も開発され、プロテアソーム阻害剤は、市場で活況を呈している。このように酵素阻害剤は、創薬の王道であるが、酵素活性や明確な機能ドメインを持たないタンパク質に対しては、それを選択的に抑制する有効な手段がなかった。しかし最近、UPSを利用して細胞内の不必要なタンパク質を選択的にクリアランスする方法が開発され、国内外で注目されている。それは、R. DeshaiesとC. Crewsらが提案したPROTACs（Proteolysis-Targeting Chimeras：標的タンパク質を特異的にノックダウンできるハイブリッド型低分子化合物）技術（***PNAS*** 2001）を活用した創薬研究であり、UPSの医学的応用に拍車がかかっている。この技術の開発は、その大きな可能性により、製薬企業やアカデミアを巻き込んでの激しい競争となっている。本新学術「ケモユビキチン」班でもSNIPERやCereblon modulatorの研究など関連手法の開発は、中心課題の一つになっている。この研究班から、新たな創薬の1ページが開かれることを期待したい。

本稿では、筆者がプロテアソームをライフワークとしてきたことから、その話題に多くの紙面を費やしたが、今後に残された最大の課題は、プロテアソーム（即ちタンパク質分解）に依存しないユビキチン修飾系の総合的な解明にあると思われる。

「付記」スペースの都合から参考文献は割愛した。興味のある方は、著者名、キーワード、発表年度などからPubMedで検索すれば、該当論文に辿り着けると思われるので、諒とされたい。

研究代表者 佐伯 泰
東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野 蛋白質代謝研究室 室長
http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/

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

私たちはユビキチン鎖の連結様式に着目した高感度定量プロテオミクス解析を開発し、様々な鎖の機能を解析してきました。その過程でリン酸化やアセチル化などの化学修飾を受けたユビキチンを同定するなどユビキチンコードの拡大に貢献するとともに、ユビキチン鎖の「長さ」や「分岐」といった高次構造がユビキチンコードの機能において極めて重要な役割を果たす可能性を世界に先駆けて提唱してきました。しかし、ユビキチンコードの全体像は未だ不明であり、デコーダー分子の使い分けや機能連携も不明な点が数多く残されています。

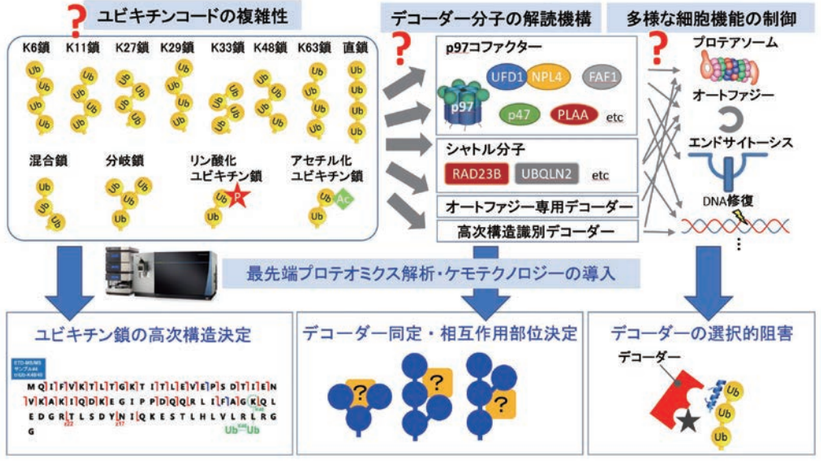
本研究では、ユビキチン解析に特化した様々な最先端プロテオミクス解析法を確立し、領域内で開発するケモテクノロジーを利用して、ユビキチンシグナルの根幹である「ユビキチン修飾の高次構造」の直接の解析と「デコーダー分子による識別・解読機構」の解明に挑戦します。

1. 最先端ユビキチン・プロテオミクス解析法の開発
最新鋭の超高感度高性能質量分析計を用いて世界最先端のプロテオミクス解析法をユビキチン研究に導入します。具体的には、ユビキチン化基質の網羅的変動解析、架橋剤を用いたタンパク質複合体相互作用部位決定、ユビキチン鎖のトップダウン解析、ユビキチン鎖の超高感度絶対定量解析などの研究手法を開発します。そして、新たなユビキチンコード、デコーダー分子を探索するとともに、領域内の全研究を支援します。

2. ユビキチンデコーダー分子のユビキチン鎖タイプ選択性の解析
さまざまなユビキチン依存的経路を制御するAAA型シャペロンp97のユビキチン結合コファクターを中心に、ユビキチン鎖タイプ選択性と基質タンパク質について解明します。

3. ケモテクノロジーを利用したユビキチンコードの解析
ユビキチン鎖の機能を喪失させるケミカルツールとユビキチン化基質の網羅的変動解析により、個々のユビキチン鎖の細胞機能を解明します。

4. ケモテクノロジーによるユビキチンデコーダー分子の解析
化学合成ユビキチン鎖を用いて、ユビキチン修飾の高次構造（鎖長や分岐）を識別する新規デコーダー分子を同定し、機能解析を進めます。一方、ユビキチン鎖との相互作用を破壊する阻害ペプチドや化合物を用いて、p97コファクターやプロテアソームのシャトル分子などのデコーダー分子の基質選択性や機能連携を解明します。



関連する代表的な論文

1. Tsuchiya, H., Burana, D., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Komada, M., *Tanaka, K., and *Saeki, Y. (2018) Ub-ProT reveals global length and composition of protein ubiquitylation in cells. ***Nat. Commun.*** 9, 524. doi: 10.1038/s41467-018-02869-x
2. Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S., *Tanaka, K., and *Saeki, Y. (2017) In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-linked Chain Specificity of the Proteasome. ***Mol. Cell*** 66, 488-502. doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.024
3. Pack, C.G., Yukii, H., Toh-e, A., Kudo, T., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Sakata, E., Murata, S., Sako, Y., Baumeister, W., Tanaka, K., and *Saeki., Y. (2014) Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. ***Nat. Commun.*** 5, 3396. doi: 10.1038/ncomms4396
4. Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., and *Tanaka, K. (2009) Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. ***Cell*** 137, 900-913. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.005
5. *Saeki, Y. (2017) Ubiquitin recognition by the proteasome. ***J. Biochem.*** 161, 113-124. doi: 10.1093/jb/mvw091

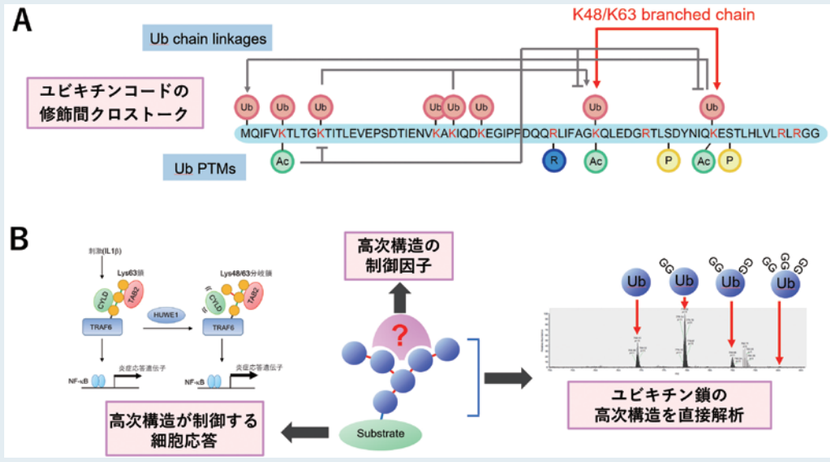
研究分担者 大竹 史明
東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野
主席研究員
http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/index.html

ユビキチンコードの修飾間クロストークと細胞応答

ユビキチンは多様な様式でタンパク質を修飾することで、プロテアソーム依存性のタンパク質分解だけではなく、シグナル伝達やDNA修復、選択的オートファジーなど様々な細胞機能を制御します。ユビキチンは鎖状に連なることで8種類の異なるユビキチン鎖を形成し、それぞれが異なる機能を発現します。このようなユビキチン鎖の多様性に内包された機能情報は「ユビキチンコード」と称されるに至っています。

私達はこれまでに、ユビキチンのアセチル化修飾やK48/K63分岐型ユビキチン鎖を発見し、これら新しいユビキチンコードの機能を解明してきました。K48/K63分岐型ユビキチン鎖を形成するユビキチンリガーゼとしてHUWE1、UBR5を同定し、分岐鎖が炎症シグナル伝達やプロテアソーム依存性分解を制御することを報告しました。これらの研究から、ユビキチン自身の翻訳後修飾やユビキチン鎖の枝分かれなどの高次構造が、ユビキチンコードの「修飾間クロストーク」を生み出していることが明らかとなりました（図A）。しかしながら、複雑なユビキチン修飾の高次構造の解析は技術的な障壁が高く、その機能発現機構については不明な点が数多く残されています。

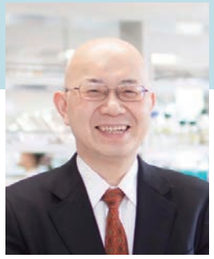
そこで本分担研究では、質量分析計を用いた定量プロテオミクス技術を駆使することで、ユビキチンコードの機能解明に取り組みます（図B）。ユビキチン鎖の「分岐」や「長さ」といった高次構造を測定する技術開発を試みるとともに、このような高次構造を制御する因子を同定し、ユビキチン鎖の高次構造によって制御される細胞応答を明らかにしていきます。さらに、化合物によるユビキチンリガーゼのハイジャックを利用して、細胞内で分岐鎖を形成させる技術にも取り組んでいきます。また、ユビキチン鎖の絶対定量解析やユビキチン化基質の網羅解析などのユビキチンに特化したプロテオミクス解析法を開発し、領域内の共同研究を推進します。



関連する代表的な論文

1. *Ohtake, F., Tsuchiya, H., Saeki, Y., and *Tanaka, K. (2018) K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 115, E1401-E1408, doi: 10.1073/pnas.1716673115
2. Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S., *Tanaka, K., and *Saeki, Y. (2017) In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 axis contributes to K48-linked chain specificity of the proteasome. ***Mol. Cell*** 66, 488-502, doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.024
3. *Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and *Tanaka, K. (2016) The K48-K63 branched ubiquitin chain regulates NF-κB signaling. ***Mol. Cell*** 64, 251-266, doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.014
4. *Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., Ohta, T., Tanaka, K., and Kanno, J. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. ***EMBO Rep.*** 16,192-201. doi: 10.15252/embr.201439152
5. Ohtake, F., Tsuchiya, H., Tanaka, K., and *Saeki, Y. (2019) Methods to measure ubiquitin chain length and linkage. ***Meth. Enzymol.*** in press

研究代表者 岩井 一宏
京都大学大学院医学研究科 細胞機能制御学 教授
http://www.mcp-kyoto-u.jp



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

ユビキチン修飾は、修飾酵素群によってタンパク質に結合し、特異的なデコーダー分子に認識されることで機能を発現し、そして、脱ユビキチン化酵素で切断されることでその機能が終焉します。生体内には多様なユビキチン修飾が存在し、認識するデコーダー分子の違いにより同一のユビキチン修飾が生命現象をONにもOFFにも制御しています。したがって、ユビキチン鎖の詳細な機能解析にはユビキチン鎖と個々のデコーダー分子との結合の選択的な阻害が不可欠ですが、既存の手法では解析は不可能であり新たな技術開発が必要です。研究代表者は自らが発見した直鎖状ユビキチン鎖(M1鎖)の研究中に、構造情報に基づいて作製した短鎖架橋ペプチド（ステープルペプチド）がタンパク質間相互作用を選択的にかつ効率的に阻害できることを見出しました。そこで本研究では、ペプチド工学に精通した研究分担者と共同してステープルペプチドを利用したユビキチン修飾と認識タンパク質の相互作用阻害手法を確立し、ユビキチン研究に有力な新解析ツールを導入します。そして、複数のユビキチン修飾が有機的に連携するTNF-αシグナル系（図参照）などをモデル系として、ケモテクノロジーを用いて以下の3点から研究を推進します。

1. ケモテクノロジーによるユビキチン鎖認識の選択的阻害

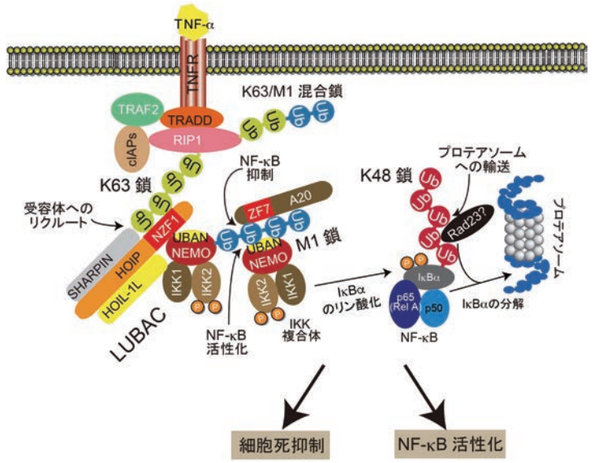
複数のユビキチン修飾が有機的に連携して機能するTNF-αシグナル系などをモデルとして解析します。

2. ユビキチン修飾の新機能のケモテクノロジー解析

ステープルペプチドを用いてM1鎖の新機能の解明に加え、TNF-αシグナル系で形成されるK63/M1混合鎖の機能解明を進めます。

3. ケモテクノロジーを用いたLUBACリガーゼの制御とその応用展開

LUBAC 複合体形成を阻害する低分子化合物の開発：すでに樹立しているTR-FRETを用いたスクリーニング系を用いて、低分子化合物阻害剤を開発します。LUBACの機能亢進が免疫チェックポイント、シスプラチン耐性に関与することが報告されており、抗がん剤のリード化合物となる可能性も大きいので精力的に解析します。



関連する代表的な論文

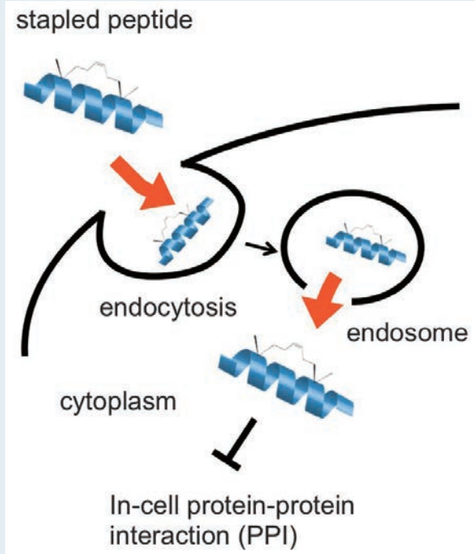
1. Fujita, H., Tokunaga, A., Shimizu, S., Whiting, A. L., Aguilar-Alonso, F., Takagi, K., Walinda, E., Sasaki, Y., Shimokawa, T., Mizushima, T., Ohki, I., Ariyoshi, M., Tochio, H., Bernal, F., Shirakawa, M., and *Iwai, K. (2018) Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization. ***Cell Rep.*** 23, 1192-1204. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.112
2. Yang, Y., Schmitz, R., Mitala, JJJr., Whiting, A., Xiao, W., Ceribelli, M., Wright, GW., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Rosenwald, A., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, JM., Rimsza, LM., Campo, E., Jaffe, ES., Delabie, J., Smeland, EB., Braziel, RM., Tubbs, RR., Cook, JR., Weisenburger, DD., Chan, WC., Wiestner, A., Kruhlak, MJ., Iwai, K., Bernal, F., and *Staudt, LM. (2014) Essential role of the linear ubiquitin chain assembly complex in lymphoma revealed by rare germline polymorphisms. ***Cancer Discov.*** 4, 480-493. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0915
3. *Iwai, K., Fujita, H., and Sasaki, Y. (2014) Linear ubiquitin chains: NF-κB signalling, cell death, and beyond. ***Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*** 15, 503-508. doi: 10.1038/nrm3836
4. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sataka, S.-I., Tanaka, K., Nakano, H., and *Iwai, K. (2011) SHARPIN is a component of the NF-κB activating linear ubiquitin chain assembly complex. ***Nature*** 471, 633-636. doi: 10.1038/nature09815
5. Tokunaga, F., Sakata, S.-I., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K. and *Iwai, K. (2009) Involvement of linear polyubiquitination of NEMO in NF-κB activation. ***Nat. Cell Biol.*** 11, 123-132. doi: 10.1038/ncb1821

研究分担者 二木 史朗
京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域
教授
http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html

ステープルペプチドの作出と細胞内導入

私達の研究室では機能性ペプチド、特に細胞膜と相互作用する機能性ペプチドの創出に取り組んできました。オリゴアルギニンペプチドを用いたペプチド・タンパク質の細胞内導入法の開発とその細胞内移行機序の解析（*Acc. Chem. Res.* 2017）に加え、最近では、エンドサイトーシスを活性化する新しいタイプの細胞内送達ペプチドの開発（*Nat. Chem.* 2017）やステープルペプチドの細胞内移行機序の解析（*Mol. Pharm.* 2018）に携わっています。

本研究では、ユビキチン修飾と認識タンパク質の相互作用阻害手法を確立し、ユビキチン研究に有力な新解析ツールを導入することを狙い、ステープルペプチドの作出を担当します。in vitroで高活性であっても、細胞移行性の低さから期待の細胞内効果が得られない場合があることがステープルペプチド開発の問題点の一つとなっています。私達の開発した細胞内導入法を応用してこの問題の解決を図るとともに、本領域で作出するケミカルツールによる細胞機能制御解析の実現を目指します。また、細胞内透過性を有するステープルペプチドの合理的作出法に関しても検討したく思っています。



関連する代表的な論文

1. Sakagami, K., Masuda, T., Kawano, K., and *Futaki, S. (2018) Importance of net hydrophobicity in the cellular uptake of all-hydrocarbon stapled peptides. ***Mol. Pharm.*** 15, 1332-1340. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01130.
2. Azuma, Y., Imai, H., Kawaguchi, Y., Nakase, I., Kimura, H., and *Futaki, S. (2018) Modular redesign of a cationic lytic peptide to promote the endosomal escape of biomacromolecules. ***Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*** 57, 12771-12774. doi: 10.1002/anie.201807534.
3. *Futaki, S. and Nakase, I. (2017) Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization. ***Acc. Chem. Res.*** 50, 2449-2456. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00221.
4. Akishiba, M., Takeuchi, T., Kawaguchi, Y., Sakamoto, K., Yu, H.H., Nakase, I., Takatani-Nakase, T., Madani, F., Gräslund, A., and *Futaki, S. (2017) Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. ***Nat. Chem.*** 9, 751-761. doi: 10.1038/nchem.2779.
5. Murayama, T., Masuda, T., Afonin, S., Kawano, K., Takatani-Nakase, T., Ida, H., Takahashi, Y., Fukuma, T., Ulrich. A.S., and *Futaki, S. (2017) Loosening of lipid packing promotes oligoarginine entry into cells. ***Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*** 56, 7644-7647. doi: 10.1002/anie.201703578.

研究代表者 村田 茂穂
東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室 教授
http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tanpaku/

ケモテクノロジーを利用したタンパク質分解制御

プロテアソームは真核細胞内の主たる分解系であり、生命活動を支えるタンパク質の動的な新陳代謝の中心を担っています。プロテアソームによるタンパク質分解は、高い基質選択性を持ったタンパク質分解であり、様々な生命活動の制御に必須の働きを担っています。また、その分解するターゲットの選択にユビキチン修飾とその受容体分子が重要な役割を果たしています。これまで、遺伝子改変や発現制御などの手法によりプロテアソームを介するタンパク質分解の分子機構と生理機能の解明が進められてきましたが、制御に関与する分子の多くが細胞の生存に必須であり、分解系以外での機能も有しているなどのため、多くの問題が未解明のまま残されています。

本研究ではユビキチンの主たる役割の一つであるプロテアソームを介したタンパク質分解に焦点を当て、特定のタンパク質間相互作用をタイムリーに喪失させることが可能な化合物や膜透過性ペプチドを利用し、遺伝子改変や発現制御実験では解決できなかった、基質選択性や分解系制御機構の新たな理解の解明を目指します。さらにその成果を活かして、プロテアソームと分解標的タンパク質を直接連結させるキメラ化合物を作出し、ユビキチン化を介さず直接的かつ選択的にタンパク質を分解誘導する方法論の確立を目指します。

1. プロテアソームユビキチン受容体の基質選別機構の解明

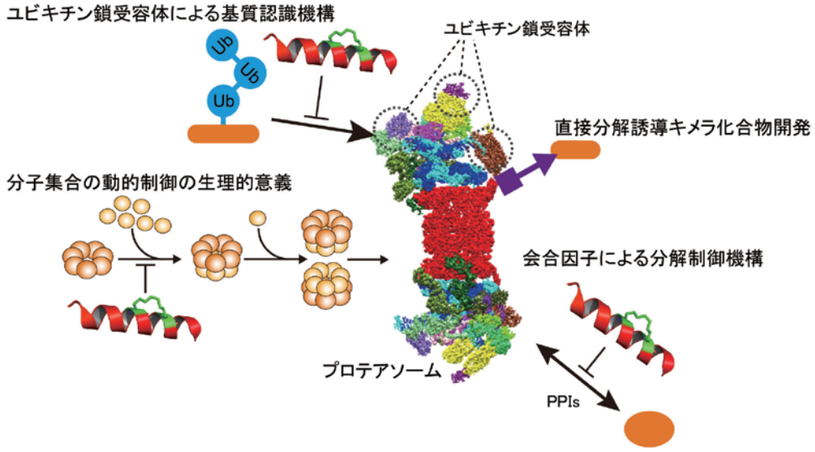
プロテアソーム上の3種類のユビキチン受容体サブユニット(RPN1, RPN10, RPN13)についてユビキチン鎖との相互作用を阻害するペプチド・化合物を取得し、各サブユニットの基質選択性とその生理作用を明らかにします。

2. プロテアソームのα -ヘリックスを標的とした相互作用分子機能解析

50種類以上にも及ぶプロテアソーム結合分子の相互作用阻害ペプチド・化合物を開発し、分解作用に対する役割を解明します。

3. 栄養環境に応答したプロテアソーム分子集合の動的制御の生理的意義の解明

栄養飢餓時にプロテアソームの形成が分単位で数倍に亢進することが知られています。そこで、隣接サブユニット間あるいはプロテアソーム形成シャペロンの相互作用を阻害するペプチドまたは化合物を開発し、プロテアソームの分子集合を阻害することにより、この動的制御の意義を解明します。



関連する代表的な論文

1. *Murata S, *Takahama Y, *Kasahara M, *Tanaka K. (2018) The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. ***Nat. Immunol.*** 19, 923-931. doi: 10.1038/s41590-018-0186-z.
2. Hirayama S, Sugihara M, Morito D, Iemura SI, Natsume T, Murata S, *Nagata K. (2018) Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 115, E4199-E4208. doi: 10.1073/pnas.
3. Uechi H, Kuranaga E, Iriki T, Takano K, Hirayama S, Miura M, Hamazaki J, *Murata S. (2018) Ubiquitin-Binding Protein CG5445 Suppresses Aggregation and Cytotoxicity of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked TDP-43 in Drosophila. ***Mol. Cell. Biol.*** 38, e00195-17. doi: 10.1128/MCB.00195-17.
4. Koizumi S, Irie T, Hirayama S, Sakurai Y, Yashiroda H, Naguro I, Ichijo H, Hamazaki J, *Murata S. (2016) The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. ***Elife*** 5, e18357. doi: 10.7554/eLife.18357.
5. Hamazaki J, Hirayama S, *Murata S. (2015) Redundant Roles of Rpn10 and Rpn13 in Recognition of Ubiquitinated Proteins and Cellular Homeostasis. ***PLoS Genet.*** 11, e1005401. doi: 10.1371/journal.pgen.1005401.

研究分担者 山野 晃史
東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野 ユビキチンプロジェクト
主席研究員
http://www.igakuken.or.jp/protein/

ケモテクノロジーを利用したユビキチン選択的オートファジーの制御

ユビキチン修飾はタンパク質分解のみならず、オートファジーを介したオルガネラ分解にも重要で、それらはユビキチン選択的オートファジーとして知られています。つまり、ユビキチン選択的オートファジーは、タンパク質凝集体や不良となった細胞内オルガネラを隔離膜で取り囲み、リソソームと融合させることにより、その内容物を選択的かつ大規模に分解することができます。そして、分解するオルガネラの選択性にユビキチン修飾とそのデコーダー分子群が重要な役割を果たしています。例えば、不良ミトコンドリアの選択的分解には、PINK1（ユビキチンをリン酸化するキナーゼ）やParkin（E3リガーゼ）が不良ミトコンドリアに対するユビキチン鎖修飾に、オートファジーアダプターと称される分子群がデコーダー（ユビキチン化オルガネラとオートファジーマシナリーを橋渡しする）に、重要であります。

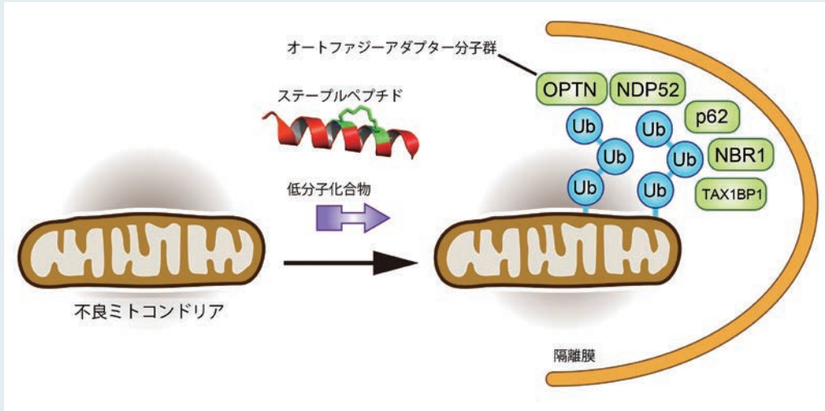
本研究ではユビキチン選択的オートファジーに焦点をあて、特定のタンパク質間相互作用をタイムリーに消失させることが可能な化合物や膜透過性ペプチドを利用し、遺伝子改変や発現制御実験では解決できなかった、オルガネラ分解制御の新たな理解を目指します。また、ケモテクノロジーを利用して特定のオルガネラの選択的分解を誘導できる手法の確立を目指します。

1. オートファジー専用デコーダー分子の基質選別機構の解明

ユビキチン修飾された不良ミトコンドリアをオートファジーマシナリーへ運ぶデコーダー分子群のユビキチン鎖特異性を、化学合成したユビキチンコードや構造解析を通じて明らかにする。

2. キメラ化合物やステープルペプチドによるオルガネラ選択的分解の誘導系の開発

不良ミトコンドリアの選択的分解誘導に焦点をあて、不良ミトコンドリア上のユビキチン修飾を誘導する、あるいは不良ミトコンドリアとオートファジーマシナリーを連結させるケモテクノロジーを開発し、検証する。



関連する代表的な論文

1. *Yamano, K., Wang, C., Sarraf, SA., Münch, C., Kikuchi, R., Noda, NN., Hizukuri, Y., Kanemaki, MT., Harper, W., Tanaka, K., *Matsuda, N., and *Youle, RJ. (2018) Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy. ***Elife*** 7, e31326. doi: 10.7554/eLife.31326.
2. *Yamano, K., Matsuda, N., and Tanaka, K. (2016) The Ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. ***EMBO Rep.*** 17, 300-316. doi: 10.15252/embr.201541486.
3. *Yamano, K., Queliconi, BB., Koyano, F., Saeki, Y., Hirokawa, T., Tanaka, K., and *Matsuda, N. (2015) Site-specific interaction mapping of phosphorylated ubiquitin to uncover Parkin activation. ***J. Biol. Chem.*** 290, 25199-25211. doi: 10.1074/jbc.M115.671446.
4. Kane, LA., Lazarou, M., Fogel, AI., Yan, L., Yamano, K., Sarraf, SA., Banerjee, S., and *Youle, RJ. (2014) PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. ***J. Cell Biol.*** 205, 143-153. doi: 10.1083/jcb.201402104.
5. Hasson, SA., Kane, LA., Yamano, K., Huang, CH., Sliter, DA., Buehler, E., Wang, C., Heman-Ackah, SM., Hessa, T., Guha, R., Martin, SE., and *Youle, RJ. (2013) High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. ***Nature*** 504, 291-295. doi: 10.1038/nature12748.

A01 4 計画研究

研究代表者 深井　周也
東京大学 定量生命科学研究所 先端定量生命科学研究部門 蛋白質複合体解析研究分野 准教授
http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/

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

ユビキチン修飾は、プロテアソームによるタンパク質分解のシグナルとしての役割にとどまらず、炎症シグナルやDNA修復などの多様な細胞機能の制御に必須な役割を担っています。ユビキチンは、数珠繋ぎになったユビキチン鎖として機能する例が多く知られていますが、繋がり方の多様性にリン酸化などの別の翻訳後修飾も加わって、ユビキチン修飾が持つ機能情報は想定を超えた複雑さを呈してきています。本研究では、ユビキチン結合タンパク質や脱ユビキチン化酵素とユビキチン鎖との複合体の立体構造を決定して、未解明のユビキチン鎖認識機構を原子レベルで明らかにします。また、本研究領域内で創出されるユビキチンシグナルを制御する機能性化合物の作用機構解明に必要な立体構造解析を行い、機能性化合物の高効率化・高機能化のための構造基盤を確立します。さらに、脱ユビキチン化酵素やユビキチン結合タンパク質を改変し、ユビキチン研究に有用な分子ツールの開発を目指します。

1. 立体構造解析による分子基盤の創出

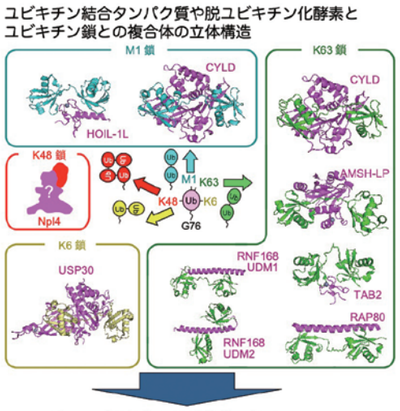
特定のユビキチン鎖に選択性のある既知の脱ユビキチン化酵素やユビキチン結合ドメイン、さらに領域内で見出される新規ユビキチン結合ドメインとユビキチン鎖との複合体やユビキチンが介する制御因子などの構造解析を通じて、鎖タイプ識別の新たな分子機構を解明し、他の計画研究に情報提供します。また、本領域研究で創出される機能性化合物との共結晶構造解析により機能性化合物の高効率化・高機能化のための構造基盤を確立します。

2. 鎖タイプ選択的ユビキチン結合分子の開発

K63鎖に選択的に結合するRAP80のタンデムUIMやRNF168のUDM1やUDM2などのα-ヘリックスを骨格とする構造情報を元に、ステープル化技術も活用して、鎖タイプ選択的なユビキチン鎖結合分子を設計・開発します。

3. 機能改変人工脱ユビキチン化酵素の開発

プロテアソームの脱ユビキチン化活性を担うRpn11-Rpn8複合体は、ユビキチン鎖をen blocにタンパク質から切断します。Rpn11-Rpn8複合体を改変することで、多様なユビキチン化基質からユビキチン鎖を切り出す人工酵素を創出し、ユビキチン鎖高次構造解析に有用な分子ツールを開発します。



- 鎖タイプ選択的な認識機構の解明
- 鎖タイプ選択的ユビキチン結合分子の開発
- 機能改変人工脱ユビキチン化酵素の開発

関連する代表的な論文

1. Takahashi, T. S., Hirade, Y., Toma, A., Sato, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Tomita, A. *Nakada, S., and *Fukai, S. (2018) Structural insights into two distinct binding modules for Lys63-linked polyubiquitin chains in RNF168. ***Nat. Commun.*** 9, 170. doi: 10.1038/s41467-017-02345-y.
2. Sato, Y., Okatsu, K., Saeki, Y., Yamano, K., Matsuda, N., Kaiho, A., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Ishikawa, M., Hashimoto, Y., Tanaka, K., and *Fukai, S. (2017) Structural basis for specific cleavage of Lys6-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., and *Fukai, S. (2015) Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal 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, S. E., *Iwai, K., and *Fukai, S. (2011) Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 108, 20520-20525. doi: 10.1073/pnas.1109088108.
5. Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and *Fukai, S. (2008) Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. ***Nature*** 455, 358-362. doi: 10.1038/nature07254.

A02 1 計画研究

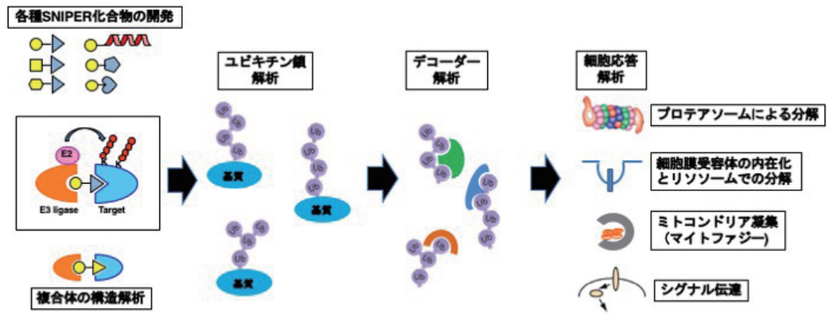
研究代表者 内藤　幹彦
国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 部長
http://www.nihs.go.jp/mtgt/index.html

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

ユビキチン・プロテアソーム系は選択的タンパク質分解経路の一つで、細胞内で不要になったタンパク質等はユビキチンリガーゼ（E3）によって認識され、ユビキチン修飾を受けた後プロテアソームで分解されます。またユビキチン修飾はタンパク質分解以外にも様々な細胞機能制御に関与し、これにはユビキチン鎖の連結様式、鎖長、分岐などの違いによる多様性（ユビキチンコード）が重要であると考えられていますが、その詳細はまだよくわかっていません。

私たちは、SNIPER（Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser）やセレブロン（CRBN）モジュレーター等の化合物を利用して細胞内の標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームで分解するケミカルプロテインノックダウン技術を開発してきました。SNIPERはIAPに結合するリガンド（IAPアンタゴニスト）と標的タンパク質に結合するリガンド（分子弾頭）を繋いだキメラ化合物で、標的タンパク質にE3活性を持つIAPをリクルートする事によって標的タンパク質ユビキチン化してプロテアソームで分解します。分子弾頭を置換することによって任意の標的タンパク質を狙って分解する事ができる汎用性の高い技術です。一方CRBNモジュレーターは複合体型E3の基質認識分子であるCRBNに結合して基質特異性を変化させる事ができます。最近これらの化合物が、細胞膜受容体の内在化を誘導するなど、ユビキチンが関与するタンパク質分解以外の様々な細胞応答を引き起こすことがわかってきました。

本研究では、これらの化合物を利用して様々な標的タンパク質をユビキチン化し、そのユビキチン鎖と細胞応答等を解析することによって、ユビキチンコードの作動機構の一端を明らかにすることを目的としています。また本研究で新たに開発する化合物は新しい分子標的薬のリードとなる可能性があり、将来的には創薬にも貢献する有意義な研究になると考えています。



SNIPER等を利用したユビキチンコードの作動機構解析

関連する代表的な論文

1. *Naito, M., Ohoka, N., Shibata, N. (2019) SNIPERs—Hijacking IAP activity to induce protein degradation. ***Drug Discov. Today: Technol.*** in press doi: https://doi.org/10.1016/j. ddtec.2018.12.002
2. Ohoka, N., Morita, Y., Nagai, K., Shimokawa, K., Ujikawa, O., Fujimori, I., Ito, M., Hayase, Y., Okuhira, K., Shibata, N., Hattori, T., Sameshima, T., Sano, O., Koyama, R., Imaeda, Y., Nara, H., Cho, N., and *Naito, M. (2018) Derivatization of inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands yields improved inducers of estrogen receptor alpha degradation. ***J. Biol. Chem.*** 293, 6776-6790. doi: 10.1074/jbc.RA117.001091
3. Shibata, N., Nagai, K., Morita, Y., Ujikawa, O., Ohoka, N., Hattori, T., Koyama, R., Sano, O., Imaeda, Y., Nara, H., Cho, N., and *Naito, M. (2018) Development of Protein Degradation Inducers of Androgen Receptor by Conjugation of Androgen Receptor Ligands and Inhibitor of Apoptosis Protein Ligands. ***J. Med. Chem.*** 61, 543-575. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00168
4. Ohoka, N., Okuhira, K., Ito, M., Nagai, K., Shibata, N., Hattori, T., Ujikawa, O., Shimokawa, K., Sano, O., Koyama, R., Fujita, H., Teratani, M., Matsumoto, H., Imaeda, Y., Nara, H., Cho, N., and *Naito, M. (2017) In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). ***J. Biol. Chem.*** 292, 4556-4570. doi: 10.1074/jbc.M116.768853
5. Itoh, Y., Ishikawa, M., Naito, M., and *Hashimoto, Y. (2010) Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. ***J. Am. Chem. Soc.*** 132, 5820-5826. doi: 10.1021/ja100691p

研究分担者　出水　庸介
国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部
部長
http://www.nihs.go.jp/doc/index.html

中分子化合物による細胞機能制御

タンパク質は精密な立体構造を形成することによって多種多様な機能を発現していますが、その立体構造の中でヘリカル構造はDNAや他のタンパク質を認識する重要な二次構造です。よってタンパク質の機能をペプチド単位で発現させるためには、タンパク質中と同じ安定なヘリカル構造を形成できるペプチド分子を設計することが重要です。私たちは、さまざまな非天然型アミノ酸や共有結合型のアミノ酸側鎖架橋（ステープル）を利用することで安定なヘリカル構造を形成できるペプチドの開発を行ってきました。

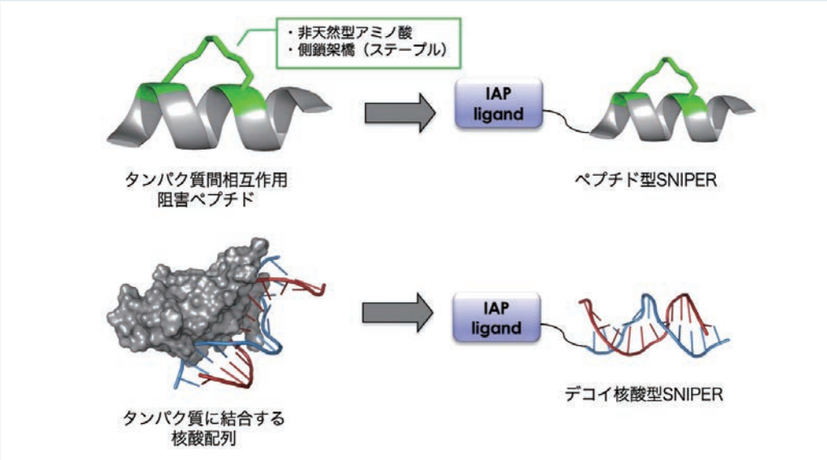
本研究では、これまでに開発してきたペプチド二次構造制御技術をケミカルプロテインノックダウンに応用することで中分子ペプチドによる細胞内タンパク質の精密制御を目指します。また、領域内のユビキチン研究を支援するために中分子ペプチド（ステープルペプチド）の供給を行います。さらに、中分子ペプチドと並び創薬モダリティのひとつであるオリゴ核酸を標的タンパク質のリガンドとして利用したケミカルプロテインノックダウン技術を開発します。

・二次構造制御ペプチドによる細胞制御

タンパク質間相互作用に基づいて安定な二次構造を形成できる高親和性ペプチド（ステープルペプチド等）を設計して、ペプチド型SNIPERの開発を行います。ペプチド型SNIPERは、低分子リガンドでは標的にすることが難しいタンパク質やリガンドが存在しないタンパク質をターゲットにすることができます。

・オリゴ核酸による細胞制御

c-Mycや核内受容体等の転写因子を標的とするために、それらに結合する核酸配列をリガンドとして利用したデコイ核酸型SNIPERを開発します。本手法により、低分子化合物やペプチドでは標的にすることが困難なタンパク質をノックダウンできます。



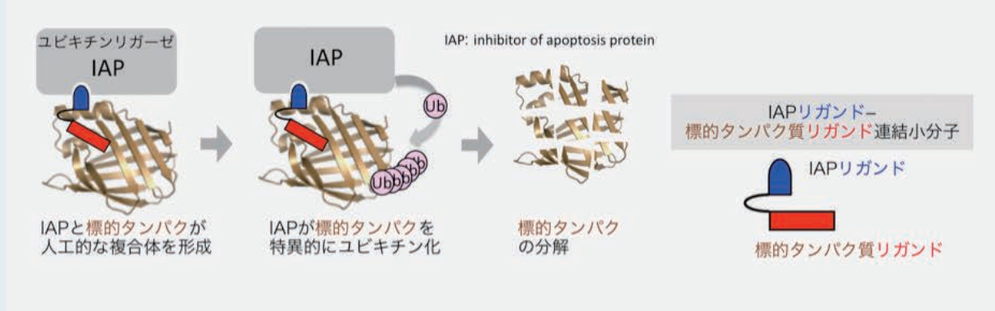
関連する代表的な論文

1. Okitsu, K., Hattori, T., Misawa, T., Shoda, T., Kurihara, M., *Naito, M., *Demizu, Y. (2018) Development of a small hybrid molecule that mediates degradation of His tag-fused proteins. ***J. Med. Chem.*** 61, 576-582. doi : 10.1021/acs.jmedchem.7b00413
2. *Misawa, T., Kanda, Y., *Demizu, Y. (2017) Rational design and synthesis of post-functionalizable peptide foldamers as helical templates. ***Bioconj. Chem.*** 28, 3029-3035. doi : 10.1021/acs.bioconjchem.7b00621
3. Kobayashi, H., Misawa, T., Matsuno, K., *Demizu, Y. (2017) Preorganized cyclic α, α-disubstituted α-amino acids bearing functionalized side chains that act as peptide-helix inducers. ***J. Org. Chem.*** 82, 10722-10726. doi : 10.1021/acs.joc.7b01946
4. Yamashita, H., Kato, T., Oba, M., Misawa, T., Hattori, T., Ohoka, N., Tanaka, M., Naito, M., *Kurihara, M., *Demizu, Y. (2016) Development of a cell-penetrating peptide that exhibits responsive changes in its secondary structure in the cellular environment. ***Sci. Rep.*** 6, 33003. doi :10.1038/srep33003
5. *出水庸介，三澤隆史，*栗原正明（2014）短鎖ペプチドのヘリカル構造制御と機能化，***有機合成化学協会誌***，72, 1336-1347. doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.72.1336

研究分担者　石川　稔
東北大学大学院 生命科学研究科 活性分子動態分野
教授

ケミカルプロテインノックダウンの新展開

低分子創薬の分子基盤は、阻害薬・拮抗薬など、疾患関連タンパク質の機能制御が主流であり、この関係は「鍵と鍵穴」に例えられます。「鍵と鍵穴創薬」の成功例が多い一方で、薬らしいリガンドが発見されていない疾患関連タンパク質については、創薬成功例が少ないのが課題です。私達はこの課題を克服すべく、低分子によって標的タンパク質の寿命を短縮する手法を開発しました。即ち、レチノイン酸結合タンパク質（CRABP）の基質とユビキチンリガーゼの1種cIAP1リガンド（ベスタチンメチルエステル）を連結した合成低分子が、CRABPの分解を誘導することを2010年に発表しました。CRABPは、神経芽腫の遊走に関与しているものの、その低分子阻害剤が知られていない基質結合タンパク質です。私達は、低分子によるCRABP減少により、神経芽腫の遊走を抑制できることも示しました。なお、cIAP1とベスタチンメチルエステルが結合することは、国立衛研の内藤先生らの発見で、本研究は内藤先生との共同研究です。次に私達は、別のIAPsリガンド（IAPパンアンタゴニスト）を連結させた方が、標的タンパク質の分解効率が良いことを2012年に発表しました。ところで神経変性疾患は、疾患原因タンパク質の異常凝集により発症し、根治療法が存在しない難病です。私達は、凝集タンパク質に特異的に結合する神経変性疾患診断薬とcIAP1リガンドの連結低分子が、凝集性タンパク質を減少させる結果を2017年に報告し、神経変性疾患に対する創薬手法を提案に至りました。2015年以降、より低濃度でタンパク質の寿命を短縮する低分子が続々と報告され、動物モデルで有効性を示す例も発表されています。私達は、低分子によるタンパク質分解を発表したこと、標的タンパク質の種類と細胞内局在の適用範囲を調べたこと、根治療法が存在しない難病に対して治療戦略の提案に至ったことにより、世界的に注目されている創薬手法の構築に貢献しました。



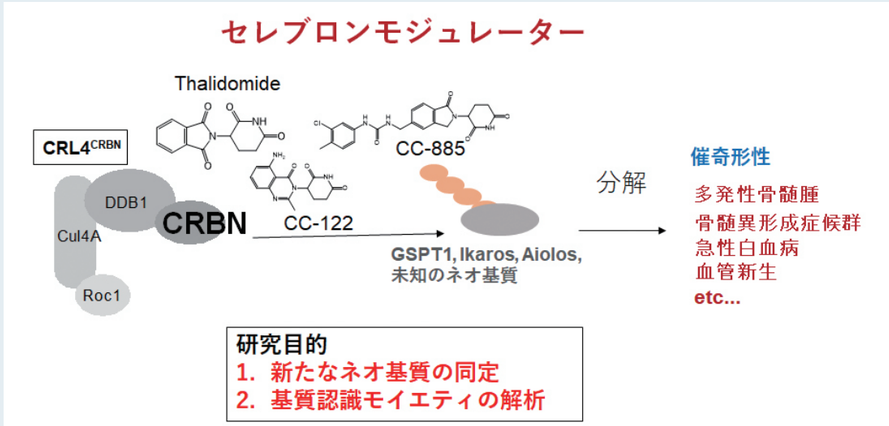
関連する代表的な論文

1. Tomoshige, S., Nomura, S., Ohgane, K., Hashimoto, Y. and *Ishikawa, M. (2017) Discovery of small molecules that induce degradation of huntingtin. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 56, 11530-11533. doi: 10.1002/anie.201706529
2. Aoyama, A., Endo-Umeda, K., Kishida, K., Ohgane, K., Noguchi-Yachide, T., Aoyama, H., Ishikawa, M., Miyachi, H., Makishima, M., and *Hashimoto, Y. (2012) Design, synthesis, and biological evaluation of novel transrepression-selective liver X receptor (LXR) ligands with 5,11-dihydro-5-methyl-11-methylene-6*H*-dibenz[*b*,*e*]azepin-6-one skeleton. ***J. Med. Chem.*** 55, 7360-7377. doi: 10.1021/jm3002394
3. Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Okuhira, K., Naito, M., and *Hashimoto, Y. (2012) Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist. ***Bioorg. Med. Chem. Lett.*** 22, 4453-4457. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.134
4. *Ishikawa, M., and Hashimoto, Y. (2011) Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry. ***J. Med. Chem.*** 54, 1539-1554. doi: 10.1021/jm101356p
5. Itoh, Y., Ishikawa, M., Naito, M., and *Hashimoto, Y. (2010) Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: Design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. ***J. Am. Chem.*** Soc. 132, 5820-5826. doi: 10.1021/ja100691p

研究分担者 伊藤 拓水
東京医科大学 ナノ粒子先端医学応用講座
准教授
http://www.tokyo-med.ac.jp/nanoparticle/

セレブロンモジュレーターが分解誘導する新基質探索および基質認識モイエティの解析

1950年代に開発されたサリドマイドは深刻な催奇性を有することで知られますが、現在においては抗がん作用など有用な作用を持つことがわかり再評価されています。我々が明らかにしましたサリドマイド標的因子セレブロン(CRBN)は現在ではリガンドの形状に応じて基質認識が変換されるユニークなユビキチンリガーゼCRL4^{CRBN}として機能することが判明しています(Ito *et al.* ***Science*** 2010)。現在、米国セルジーン社などによりサリドマイドを基にした新たな抗がん剤や抗炎症剤の開発が行われており、セレブロンに結合するこれら薬剤はセレブロンモジュレーターと呼ばれています。それらのうちレナリドミドやポマリドミドは既に臨床で認可されています。セレブロンモジュレーターの存在下でCRBNは新たな基質(ネオ基質)を分解誘導しますが、まだ未発見のネオ基質の多く、その全容は謎に包まれています。最近の我々の研究により、セレブロンモジュレーターにはセレブロン結合部分（グルタルイミド）と基質認識モイエティ（ベンゼン環含有）に分かれることが明らかになっていますが(Matyskiela *et al.* ***Nature*** 2016)、基質認識モイエティが具体的にどのようなルールに基づいて基質認識を変換させているかについては未だに不明です。本研究では新たなネオ基質探索・同定と基質認識モイエティの解析、また他の領域研究者とのコラボレーションにより新たなセレブロンモジュレーターの開発およびその分子機構についての理解を更に深めることを目的としています。



関連する代表的な論文

1. Mori, T., Ito, T. (co-1st author), Liu, S., Ando, H., Sakamoto, S., Yamaguchi, Y., Tokunaga, E., Shibata, N., *Handa, H., *Hakoshima, T. (2018) Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. ***Sci. Rep.*** 8, 1294. doi: 10.1038/s41598-018-19202-7.
2. Ito, T. and *Handa, H. (2016) Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. ***Int. J. Hematol.*** 104, 293-299. doi: 10.1007/s12185-016-2073-4.
3. Matyskiela, M. E., *Lu, G., Ito, T. (co-1st author), Pagarigan, B., Lu, C-C., Miller, K., Fang, W., Wang, N-Y., Nguyen, D., Houston, J., Carmel, G., Tran, T., Riley, M., Nosaka, L., Lander, G. C., Gaidarova, S., Xu, S., Ruchelman, A. L., Handa, H., Carmichael, J., Daniel, T. O., Cathers, B. E., Lopez-Girona, A., and *Chamberlain, P. P. (2016) A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4^{CRBN} ubiquitin ligase. ***Nature*** 535, 252-257. doi: 10.1038/nature18611
4. *Chamberlain, P., Lopez-Girona, A., Miller, K., Carmel, G., Pagarigan, B., Chie-Leon, B., Rychak, E., Corral, L., Ren, Y., Wang, M., Riley, M., Delker, S., Ito, T., Ando, H., Mori, T., Hirano, Y., Handa, H., Hakoshima, T., Daniel, T. and Cathers, B. (2014) Structure of the human cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. ***Nat. Struct. Mol. Biol.*** 21, 803-809. doi: 10.1038/nsmb.2874
5. Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y. and *Handa, H. (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. ***Science*** 327, 1345-1350. doi: 10.1126/science.1177319.

研究代表者 吉田 稔
理化学研究所環境資源科学研究センター ケミカルゲノミクス研究グループ グループディレクター
http://www.riken.jp/research/labs/csrs/chem_genom/

ユビキチン機能制御のためのケミカルバイオロジー

タンパク質ユビキチン化は、プロテアソームによるタンパク質分解のみならず、当初の想定を大きく超える多様なタンパク質機能制御機構であることがわかってきました。この多様な機能を生み出す基盤は、ユビキチン修飾の構造多様性と相互作用する分子（デコーダー）の多様性にあります。私たちは、ユビキチン修飾系を理解し、操作する新たな方法論を開拓することを目的として、UbTACs（ubiquitin-targeting chimeras）と名付けた新たなユビキチン化誘導キメラ分子の創製に挑戦します。具体的には、化合物アレイを用いて新規ユビキチンリガーゼ結合分子（E3リガンド）および標的ネオ基質に結合するリガンド化合物（分子弾頭）の探索・同定を行います。次いで、見出した各化合物にアジドおよびアルキン官能基を位置選択的に導入し、E3リガンドと分子弾頭の間のリンカー距離や分子配置を考慮しながらクリック反応によって両者を複合化してキメラ化合物UbTACsを開発します（図1）。得られた化合物の有効性は、領域内の他の班員と協力して解析し、より優れたものにするための化学構造の改良も計画しています。

また、ユビキチンデコーダーの機能解析のための化学的ツールを開発するため、さまざまなユビキチン修飾とその相互作用分子の間の結合を阻害する小分子の開発に挑戦します。そのためにまず、ユビキチンに特異的に結合するデコーダー分子のユビキチン結合ドメインを標的とし、ユビキチンとの相互作用を阻害する化合物の探索系を構築します。具体的には、私たち独自に最適化した二分子発光補完法（スプリットルシフェラーゼ）やTR-FRET等を用いたハイスループットスクリーニング系を開発します。次に理研天然化合物バンク（NPDepo）が保有する化合物ライブラリーを用いてユビキチンデコーダーの相互作用を阻害する化合物を探索します。得られた化合物が実際に細胞内で作用するかどうかを検証し、ケモユビキチン研究に資する優れた化合物を選択していきます。

さらに研究代表者の有するハイスループットスクリーニングシステムの利点を生かし、領域内の研究者と連携して新しいユビキチンリガーゼ阻害剤の探索にも取り組む予定です。

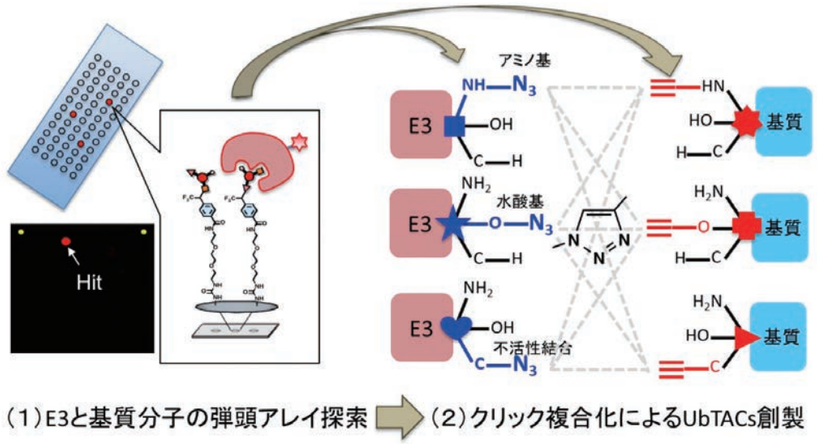
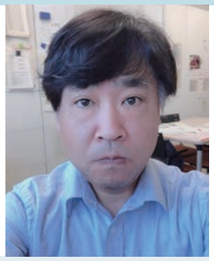


図1．化合物アレイによるリガンド探索とキメラ化合物合成

関連する代表的な論文

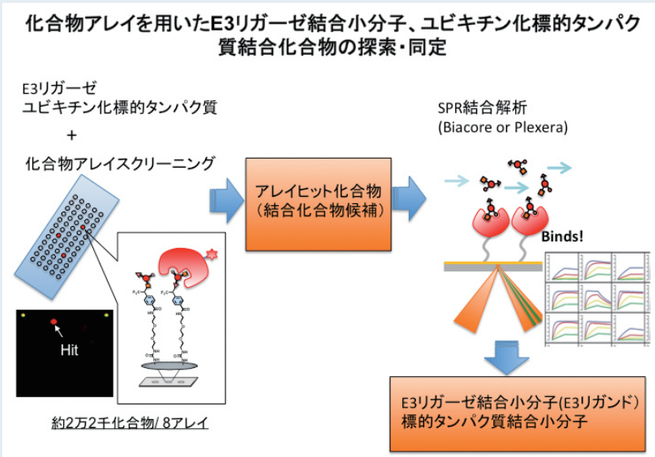
1. Tanei, T., Pradipta, A.R., Morimoto, K., Fujii, M., Arata, M., Ito, A., Yoshida, M., Saigitbatalova, E., Kurbangalieva, A., Ikeda, J.I., Morii, E., Noguchi, S., *Tanaka, K. (2018) Cascade reaction in human live tissue allows clinically applicable diagnosis of breast cancer morphology. ***Adv. Sci.*** 6, 1801479. doi: 10.1002/advs.201801479.
2. Piotrowski, J.S., Li, S.C., Deshpande, R., Simpkins, S.W., Nelson, J., Yashiroda, Y., Barber, J.M., Safizadeh, H., Wilson, E., Okada, H., Gebre, A.A., Kubo, K., Torres, N., Leblanc, M.B., Andrusiak, K., Okamoto, R., Yoshimura, M., van Leeuwen, J., Shirahige, K., Baryshnikova, A., Brown, G., Saito, T., Costanzo, M., Andrews, B., Ohya, Y., *Osada, H., *Yoshida, M., *Myers, C.L., *Boone, C. (2017) Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. ***Nat. Chem. Biol.*** 13, 982-993. doi: 10.1038/nchembio.2436.
3. Ito, A., Shimazu, T., Maeda, S., Shah, A. A., Tsunoda, T., Iemura, S.-I., Natsume, T., Suzuki, T., Motohashi, H., Yamamoto, M., *Yoshida, M. (2015) The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. ***Sci. Signal.*** 8, ra120. doi: 10.1126/scisignal.aad0667.
4. Nishimura, S., Arita, Y., Honda, M., Iwamoto, K., Matsuyama, A., Shirai, A., Kawasaki, H., Kakeya, H., Kobayashi, T., Matsunaga, S., *Yoshida, M. (2010) Marine antifungal theonellamides target 3β-hydroxysterol to activate Rho1 signaling. ***Nat. Chem. Biol.*** 6, 519-526. doi: 10.1038/nchembio.387.
5. Schneider-Poetsch, T., Usui, T., Kaida, D., *Yoshida, M. (2010) Garbled messages and corrupted translations. ***Nat. Chem. Biol.*** 6, 189-198. doi: 10.1038/nchembio.326.

研究分担者 近藤 恭光
理化学研究所環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループ
専任研究員
http://www.cbrg.riken.jp/csrs/ja/



新規 UbTACs のための リガンド化合物探索とキメラ化法開発

私たちは、化学的アプローチ（ケモテクノロジー）を駆使して、ユビキチン修飾系を理解し、操作する新たな方法論を開拓しようとしており、本研究はその基盤となるツール開発を目的とするものです。その中心となる技術は、UbTACsと名付けた新たなユビキチン化誘導キメラ分子です。SNIPERあるいはPROTACsと呼ばれるキメラ化合物は、ユビキチンリガーゼをハイジャックすることで本来の標的分子以外の基質タンパク質（ネオ基質）をユビキチン化して、分解誘導します。この技術を発展させて、単にネオ基質のノックダウンだけでなく、エンドサイトーシス、シグナル伝達、オートファジーなどを誘導できる新しいユビキチン化誘導キメラ分子の創出を目指します。これらを実現するために、新規なE3リガンドやネオ基質のリガンド化合物の探索やそれをキメラ化する技術が必要です。そのために、私たちが開発した迅速な多検体スクリーニングを可能とする化合物アレイ技術を用いて、新規なE3リガンドやネオ基質のリガンド化合物を探索していきます。化合物アレイは、理研天然化合物バンク（NPDepo）の約2万2千のライブラリー化合物をスライドガラス上に光親和型固定化法により固定化してあり、タンパク質との物理的相互作用を指標に結合する化合物を見いだすことが出来ます。化合物アレイにより見出したリガンド候補化合物は、2次元SPRまたはビアコアを用いて結合親和性の解析を行い、化合物の絞り込みを行っていきます（図1）。見出したリガンド化合物は、類縁化合物を用いた構造活性相関研究により、キメラ化するための官能基の同定を行い、UbTACsの開発へ繋げていきます。



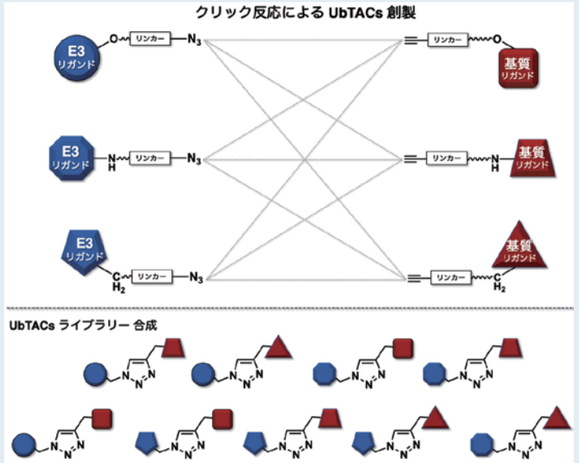
関連する代表的な論文

1. Kaneko, M., Futamura, Y., Tsukuda, S., Kondoh, Y., Sekine, T., Hirano, H., Fukano, K., Ohashi, H., Saso, W., Morishita, R., Matsunaga, S., Kawai, F., Ryo, A., Park, S.Y., Suzuki, R., Aizaki, H., Ohtani, N., Sureau, C., Wakita, T., Osada, H., and *Watashi, K. (2018) Chemical array system, a platform to identify novel hepatitis B virus entry inhibitors targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. ***Sci. Rep.*** 8, 2769. doi: 10.1038/s41598-018-20987-w
2. Maeda, K., Nakajima, Y., Motoyama, T., Kondoh, Y., Kawamura, T., Kanamaru, K., Ohsato, S., Nishiuchi, T., Yoshida, M., Osada, H., Kobayashi, T., and *Kimura M. (2017) Identification of a trichothecene production inhibitor by chemical array and library screening using trichodiene synthase as a target protein. ***Pestic. Biochem. Physiol.*** 138, 1-7. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.03.006
3. Kondoh, Y., Honda, K., Hiranuma, S., Hayashi, T., Shimizu, T., Watanabe, N., and *Osada, H. (2016) Comparative chemical array screening for p38γ/δ MAPK inhibitors using a single gatekeeper residue difference between p38α/β and p38γ/δ. ***Sci. Rep.*** 6, 29881. doi: 10.1038/srep29881
4. Kondoh, Y., Honda, K., and *Osada, H. (2015) Construction and application of a photo-cross-linked chemical array. ***Methods Mol. Biol.*** 1263, 29-41. doi: 10.1007/978-1-4939-2269-7_3
5. Soeda, Y., Yoshikawa, M., Almeida, O.F., Sumioka, A., Maeda, S., Osada, H., Kondoh, Y., Saito, A., Miyasaka, T., Kimura, T., Suzuki, M., Koyama, H., Yoshiike, Y., Sugimoto, H., Ihara, Y., and *Takashima A. (2015) Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. ***Nat. Commun.*** 6, 10216. doi: 10.1038/ncomms10216

研究分担者 Ambara R. Pradipta
理化学研究所開拓研究本部 田中生体機能合成化学研究室
基礎科学特別研究員
http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/

ユビキチン機能制御のためケミカルバイオロジー（クリック反応による UbTACs 創製）

Ubiquitin-targeting chimeras (UbTACs) is an approach to catalyze the ubiquitination of substrate proteins to trigger various cellular outcomes. The UbTACs comprise of a novel E3 ubiquitin ligase ligand conjugated via a linker to a neo-substrate protein ligand. To develop a potent UbTACs we need to examine the structure activity relationship of these bispecific molecules. Herein, we decide to utilize the copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction, which arguably is one of the most reliable bonds forming reaction, to couple azide-linker derivative of novel E3 ubiquitin ligase ligands and alkyne-linker derivative of neo-substrate protein ligands. The CuAAC reaction of azides and alkynes to form 1,2,3-triazole ring, which commonly referred to as “click chemistry” , is easy to use, high yielding, boasts excellent functional group compatibility, and can be performed under mild reaction condition. We will prepare the azide-linker and alkyne-linker derivatives, and then conjugate them by using “click chemistry” . This approach would allow for the parallel synthesis of UbTACs library.



関連する代表的な論文

1. Tanei, T., Pradipta, A. R., Morimoto, K., Fujii, M., Arata, M., Ito, A., Yoshida, M., Saigitbatalova, E., Kurbangalieva, A., Ikeda, J.-I., Morii, E., *Noguchi, S. and *Tanaka, K. (2019) Cascade reaction in human live tissue allows clinically applicable diagnosis of breast cancer morphology. ***Adv. Sci.*** 6, 1801479. doi: 10.1002/advs.201801479.
2. Nakamoto, Y., Pradipta, A. R., Mukai, H., Zouda, M., Watanabe, Y., Kurbangalieva, A., Ahmadi, P., Manabe, Y., Fukase, K. and *Tanaka, K. (2018) Expanding the applicability of the metal labeling of biomolecules by the RIKEN click reaction: A case study with Gallium-68 positron emission tomography. ***ChemBioChem*** 19, 2055-2060. doi: 10.1002/cbic.201800335.
3. Tsubokura, K., Vong, K. K. H., Pradipta, A. R., Ogura, A., Urano, S., Tahara, T., Nozaki, S., Onoe, H., Nakao, Y., Sibgatullina, R., Kurbangalieva, A., Watanabe, Y. and *Tanaka, K. (2017) In vivo gold complex catalysis within live mice. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 56, 3579-3584. doi: 10.1002/anie.201610273.
4. Pradipta, A. R., Taichi, M., *Nakase, I., Saigitbatalova, E., Kurbangalieva, A., Kitazume, S., Taniguchi, N. and *Tanaka, K. (2016) Uncatalyzed click reaction between phenyl azides and acrolein: 4-Formyl-1,2,3-triazolines as “clicked” markers for visualizations of extracellular acrolein released from oxidatively stressed cells. ***ACS Sens.*** 1, 623-632. doi: 10.1021/acssensors.6b00122.
5. Pradipta, A. R. and *Tanaka, K. (2016) Unexplored reactivity of *N*-alkyl unsaturated imines: A simple procedure for producing optically active 1,3-diamines via a stereocontrolled formal [4 + 2] and [4 + 2 + 2] iminocycloaddition. ***Bull. Chem. Soc. Jpn.*** 89, 337-345. doi: 10.1246/bcsj.20150358.

A02 3 計画研究

研究代表者 岡本 晃充
東京大学 先端科学技術研究センター 教授
http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/okamoto/

ユビキチンコードのケミカル合成

ユビキチンコードとスーパーユビキチンを創り、それらを利用することでユビキチンコードの作動機構を解明します。まず、ユビキチンの化学合成法を確立し、様々なユビキチン鎖と人工機能化ユビキチンの合成に展開します。続いて、合成ユビキチン鎖を用いて、デコーダー分子の機能解析やユビキチン鎖の構造・動態解析を実施します。

1. ユビキチンの化学合成法の確立

ユビキチンを2〜3のフラグメントに分割して、それらのフラグメントペプチドの合成、ケミカルライゲーションによるフラグメントの連結、ライゲーションに用いられたシステインの脱硫反応によってユビキチンを化学合成します。

2. 多様なユビキチン鎖のコンビナトリアル化学合成

特殊ε-Lys-Glyを適切に導入したフラグメントをあらかじめ用意しておくことによって、多様なポリユビキチン鎖をコンビナトリアルに化学合成します。次いで、リン酸化ユビキチン鎖やアセチル化ユビキチン鎖、複雑なユビキチンコードであるK48/K63分岐鎖やK63/M1混合鎖の合成に着手します。化学合成したユビキチン鎖をベイトとして特異的なデコーダー分子を捕捉して、最新型質量分析計を用いて同定します。

3. 人工機能化ユビキチン（スーパーユビキチン）の合成

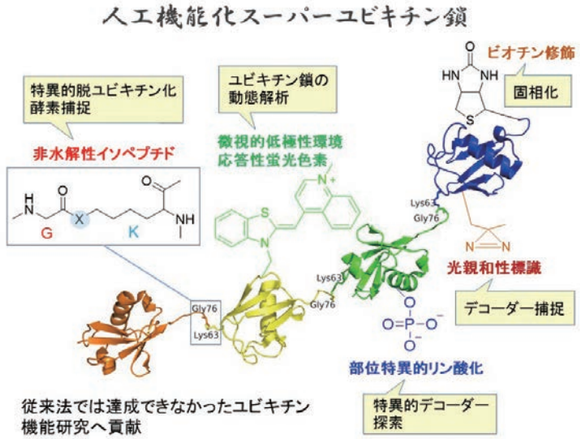
蛍光色素や光親和性標識などを部位特異的に導入したユビキチンを作製します。さらには、ビオチン修飾末端を有するユビキチンや脱ユビキチン化酵素耐性ユビキチンの合成などを検討します。作出したスーパーユビキチンを細胞に導入し、細胞内局在や細胞応答を解析します。

4. スーパーユビキチン鎖の物性解析ならびにユビキチンコードの形成解析

合成ポリユビキチン鎖の構造解析および結合力解析を進めるとともに、特異環境で蛍光発光するユビキチンを用いて、ユビキチンコード形成を蛍光でモニタリングする系を開発します。

5. ユビキチン1分子観察

ポリユビキチン鎖内・鎖間で2種類の異なる蛍光標識を導入して、蛍光相互相関分光法を用いることにより、試験管中ならびに細胞中での1分子レベルのユビキチンの動態および他分子との結合の様子をモニタリングします。



関連する代表的な論文

1. Kamo, N., Hayashi, G., and *Okamoto, A. (2018) Triple Function of 4-Mercaptophenylacetic Acid Promotes One-Pot Multiple Peptide Ligation. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 57, 16533-16537. doi: 10.1002/anie.201809765.
2. Sueoka, T., Koyama, K., Hayashi, G., and *Okamoto, A. (2018) Chemistry-driven Epigenetic Investigation of Histone and DNA Modifications. ***Chem. Rec.*** 18, 1727-1744. doi: 10.1002/tcr.201800040.
3. Kamo, N., Hayashi, G., and *Okamoto, A. (2018) Efficient peptide ligation between allyl-protected Asp and Cys followed by palladium-mediated deprotection. ***Chem. Commun.*** 54, 4337-4340. doi: 10.1039/c8cc01965g.
4. Matsushita, T., Moriyama, Y., Nagae, G., Aburatani, H., and *Okamoto, A. (2017) DNA-friendly Cu (II)/TEMPO-catalyzed 5-hydroxymethylcytosine-specific oxidation. ***Chem. Commun.*** 53, 5756-5759. doi: 10.1039/c7cc02814h.
5. Hayashi, G., Koyama, K., Shiota, H., Kamio, A., Umeda, T., Nagae, G., Aburatani, H., and *Okamoto, A. (2016) Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine by One-Pot Bisulfite-Free Chemical Conversion with Peroxotungstate. ***J. Am. Chem. Soc.*** 138, 14178-14181. doi: 10.1021/jacs.6b06428.

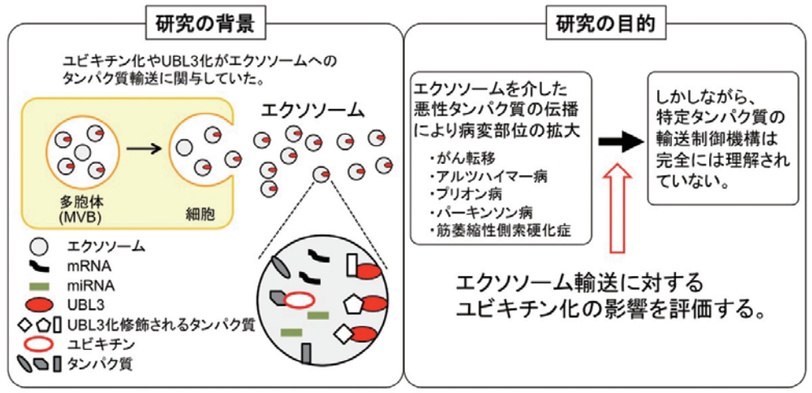
A01 1 公募研究

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

UBL3 ケモテクノロジーによる、エクソソーム輸送に対するユビキチン関連分子の解析

ナノサイズの分泌小胞であるエクソソームは、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、産生細胞に由来する特定のタンパク質やmiRNAを内包し標的細胞に再び取り込まれることで、新たな細胞間コミュニケーションとして働き、癌転移や神経変性などの疾患を含めた様々な生命現象に関与していることが知られています。その中でも、がん転移に対する研究が盛んで、例えば、グリオーマ細胞で発現している活性変異型EGFRがエクソソームを介して伝搬すること (Al-Nedawi et al., Nat Cell Biol 2008) などが知られています。更に、アルツハイマー病の主因子として考えられているアミロイドβ、パーキンソン病のα-シヌクレイン、プリオン病のプリオンもエクソソームへ取り込まれることが報告されています(Rajendan L. *et al.*, ***PNAS*** 2006; Lee *et al.*, ***Nat Rev Neurol*** 2014; Vella *et al.*, ***J. Pathol*** 2007)。しかしながら、一部の分子に対してはユビキチン化による関与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おりませんでした。

我々は、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。また、UBL3に対する網羅的プロテオミクス解析により、約50個のユビキチン関連分子をUBL3結合分子として同定しました。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。そこで本研究課題では、網羅的にエクソソーム輸送に対するユビキチン化の影響を調べることを目標とします。



関連する代表的な論文

1. 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.
2. Ikeda D., Ageta H., Tsuchida K., and *Yamada H. (2013) iTRAQ-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis. ***Biomarkers*** 18, 565-572. doi: 10.3109/1354750X.2013.810667.
3. Ageta H., and *Tsuchida K. (2011) Multifunctional roles of activins in the brain. ***Vitam. Horm.*** 85, 185-206. doi: 10.1016/B978-0-12-385961-7.00009-3.
4. 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.*** 17, 176-185. doi: 10.1101/lm.16659010.
5. Ageta, H., Kato, A., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Isojima, Y., and *Sugiyama, H. (2001) Regulation of the level of Vesl-1S/Homer-1a proteins by ubiquitin-proteasome proteolytic systems. ***J. Biol. Chem.*** 276, 15893-15897.

研究代表者 松沢 厚
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/index.html

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

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で、細胞の生死を決定するシグナルバランスが微調整され、最終的に適切な細胞応答が誘導される普遍的な仕組みがあることを見出しました。そのシグナル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ることが分かってきたわけです。また我々は、複合体内の複数のユビキチン化関連酵素同士の相互作用には、ユビキチン化やSUMO化などの修飾が必須であることも明らかにしており、従って、これらの修飾を制御できれば、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も存在します（【図】参照）。これらの分子間の相互作用には、ユビキチン化やSUMO化等が必要であることも分かってきました。すなわち、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分子レベルで解明し、シグナル分子間相互作用やシグナル分子によるユビキチンやSUMOの認識が、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分子レベルで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、ケモテクノロジーを活用して、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などを正・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・増殖などの現象を抑制し、癌や免疫疾患などに対する、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。

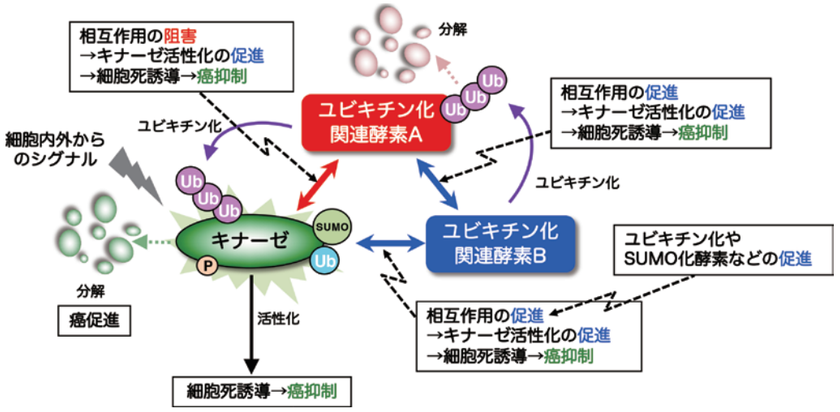


図1．細胞の生死は，シグナル分子とユビキチン化関連酵素や，シグナル分子とユビキチン及びSUMO等の翻訳後修飾との相互作用で決定され，それらの相互作用をケミカルプローブで調節して，癌や自己免疫疾患等の創薬・疾患治療戦略の開発に繋げる．

関連する代表的な論文

1. 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
2. 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
3. *Matsuzawa, A. (2017) Thioredoxin and redox signaling: Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. ***Arch. Biochem. Biophys.*** 617, 101-105. doi: 10.1016/j.abb.2016.09.011
4. Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A., and *Ichijo, H. (2014) Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses. ***Sci. Signal.*** 7, ra8. doi: 10.1126/scisignal.2004822
5. 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

研究代表者 福嶋 俊明
東京工業大学 駒田研究室 助教
http://www.rcb.iir.titech.ac.jp/lab/komada.html

ケモテクノロジーを活用した脱ユビキチン化酵素 USP8 の作用機構の解明

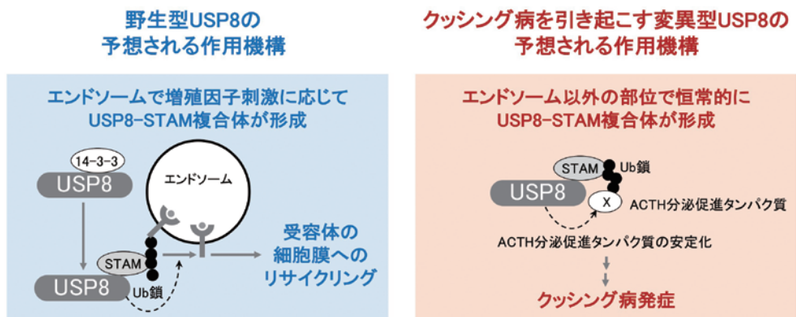
ユビキチン化がエンドサイトーシスの制御に関わることはよく知られています。私たちは、脱ユビキチン化酵素ubiquitin-specific protease 8（USP8）が、EGFRを含む数種の受容体をエンドソーム膜上で脱ユビキチン化し、それらの細胞膜へのリサイクリングを促すことを報告してきました。しかし、USP8を欠損するとエンドサイトーシス経路の機能不全や細胞死が起こるため解析が難しく、受容体エンドサイトーシス・リサイクリングにおけるUSP8の働きは研究分野内で一致した結論が得られていません。また、USP8がどのようなしくみを介してエンドソーム膜上の受容体を効率的に脱ユビキチン化するかは、依然不明です。

USP8は14-3-3結合モチーフとSTAM結合モチーフをもち、これらは互いに近接しています。私たちは、USP8と14-3-3との結合を抑制すると、USP8とSTAMの結合が強まることを最近見出しました。STAMはユビキチン結合タンパク質なので、USP8の基質認識サブユニットとして機能し、脱ユビキチン化反応を促進していると考えられます。私たちは、14-3-3やSTAMとの結合/乖離によってUSP8の活性や細胞内局在が緻密に制御され、エンドソームから細胞膜への受容体の適切なリサイクリングが可能となっていると予想しています。

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）が過剰に分泌されることにより、慢性的に副腎皮質ホルモンが高値となり、満月様顔貌・肥満・糖尿病・易感染性などの症状が出る難病で、治療薬はありません。私たちは、約半数のクッシング病患者の下垂体でUSP8遺伝子の特定の領域に体細胞変異が生じていることを見出し、この変異型USP8を発現する細胞は、分子機構は不明ですがACTHを過剰に分泌することを報告しています。

私たちは、クッシング病を引き起こす変異型USP8は14-3-3と結合できず、STAMとは強く結合するようになることを最近見出しました。予備実験の結果から、変異型USP8は恒常的にSTAMと複合体を形成してエンドソームとは異なる部位で活性化し、そこに存在するACTHの分泌を促進するタンパク質を脱ユビキチン化・安定化することにより、疾患の発症を引き起こすと予想しています。

本研究ではSTAMとUSP8の結合阻害物質を開発し、これを活用して適時かつ選択的にUSP8-STAM複合体を乖離することにより、野生型USP8のエンドソーム上での正常な作用機構と、クッシング病を引き起こす変異型USP8の異常な作用機構を明らかにしていきます。



目的：USP8とSTAMの結合阻害物質を開発し、野生型/変異型USP8の作用機構を解明する

関連する代表的な論文

1. 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.
2. 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, jcs210856. doi: 10.1242/jcs.210856.
3. Furuta, H., Yoshihara, H., Fukushima, T., Yoneyama, Y., Ito, A., Worrall, C., Girnita, A., Girnita, L., 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.
4. *Girnita, L., Takahashi, SI., Crudden, C., Fukushima, T., Worrall, C., Furuta, H., Yoshihara, H., Hakuno, F., Girnita, A. (2016) When Phosphorylation Encounters Ubiquitination: A Balanced Perspective on IGF-1R Signaling. ***Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*** 141, 277-311. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.04.001.
5. Fukushima, T., Yoshihara, H., Furuta, H., Hakuno, F., Luan, J., Duan, C., Saeki, Y., Tanaka, K., Iemura, SI., Natsume, T., Chida, K., Nakatsu, Y., Kamata, H., Asano, T., *Takahashi, SI. (2015) Nedd4-induced mono-ubiquitination of IRS-2 enhances IGF signaling and mitogenic activity. ***Nat. Commun.*** 6, 6780. doi: 10.1038/ncomms7780.

研究代表者 沖米田 司
関西学院大学 理工学部 生命医化学科 教授
https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~okiyoneda/okilab.html

RFFL による形質膜タンパク質品質管理作動機構の解明と CF 創薬への応用

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、近年、ΔF508 CFTRの形質膜移行を促進するCF治療薬（Orkambi®）が上市されましたが、その治療効果が非常に弱く、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。

私たちは網羅的siRNA表現型スクリーニングにより、ΔF508 CFTRの形質膜分解を促進するユビキチンリガーゼRFFLを同定し、RFFLノックダウン（KD）がCF治療薬Orkambi®の薬効を増強することを発見しました。RFFLは構造異常を持つCFTRと直接結合し、異常タンパク質選択的なユビキチン化を促進します。RFFLノックアウト（KO）マウスは健常であるため、RFFL-CFTR相互作用（PPI）阻害剤は、形質膜ΔF508 CFTRを安定化する革新的CF根本治療薬CFTRスタビライザーになる可能性があります（図1、PCT/ JP2018/009524出 願）。申 請 者 は、RFFLがE2酵 素UbcH5c選 択 的 に 変 性 したΔF508 CFTRの 細 胞 質 領 域（ΔF508-NBD1）をユビキチン化することを見出しました。従って、RFFL-UbcH5c PPI阻害はΔF508 CFTRのユビキチン化及び形質膜からの分解を阻害し、CF治療薬の有効性を改善することが期待されます。

本研究では、CFTR-RFFL及びUbcH5c-RFFL PPI機構を明らかにし、本PPIを人工ペプチド（ステープルペプチド等）で人為的に制御する手法を確立します。次に、CFTR-RFFL及び UbcH5c-RFFL PPI阻害ペプチドがCFの革新的根本治療薬 CFTRスタビライザーとして、CF治療効果を有するか否かを明らかにします。また、RFFL degrader等のRFFL機能阻害剤の開発も行い、CFTRスタビライザーとしての有効性を評価します。さらに、形質膜分解シグナルとなる異常CFTRのユビキチンコードを同定し、RFFL KO細胞インターラクトーム解析により、CFTRエンドサイトーシス及びリソソーム分解を制御するユビキチンデコーダー分子を明らかにします。

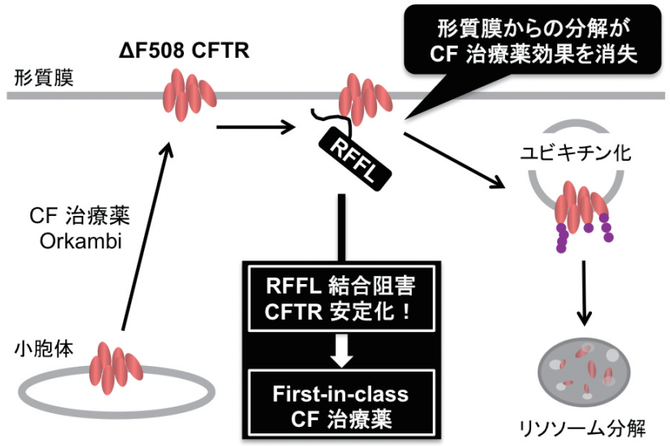


図1．RFFL PPI阻害剤は革新的CF根本治療薬CFTRスタビライザーになる

関連する代表的な論文

1. Sakai, R., Fukuda, R., Unida, S., Aki, M., Ono, Y., Endo, A., Kusumi, S., Koga, D., Fukushima, T., Komada, M., and *Okiyoneda, T. (2019) The integral function of the endocytic recycling compartment is regulated by RFFL-mediated ubiquitylation of Rab11 effectors. ***J. Cell Sci.*** 132. jcs228007. doi: 10.1242/jcs.228007.
2. Fukuda, R., and *Okiyoneda, T. (2018) Peripheral Protein Quality Control as a Novel Drug Target for CFTR Stabilizer. ***Front. Pharmacol.*** 9, 1100. doi: 10.3389/fphar.2018.01100. Review.
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., and Lukacs, GL. (2018) Chaperone-Independent Peripheral Quality Control of CFTR by RFFL E3 Ligase. ***Dev. Cell*** 44, 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., Apaja, PM., Sattin, S., Beitel, LK., Roldan, A., Colombo, G., Balch, W., Young, JC., and *Lukacs GL. (2017) Chaperones rescue the energetic landscape of mutant CFTR at single molecule and in cell. ***Nat. Commun.*** 8, 398. doi: 10.1038/s41467-017-00444-4.
5. Okiyoneda, T., Veit, G., Dekkers, JF., Bagdany, M., Soya, N., Xu, H., Roldan, A., Verkman, AS., Kurth, M., Simon, A., Hegedus, T., Beekman, JM., and *Lukacs GL. (2013) Mechanism-based corrector combination restores ΔF508-CFTR folding and function. ***Nat. Chem. Biol.*** 9, 444-454. doi: 10.1038/nchembio.1253.

研究代表者 畠山 鎮次
北海道大学大学院医学研究院医化学教室 教授
https://hokudai-ikagaku.jp

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。そのためには、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。

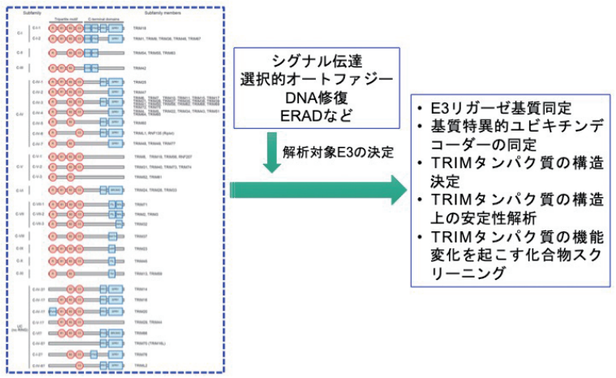


図1．TRIM型ユビキチンリガーゼの物性と動作原理の解析

関連する代表的な論文

1. *Yanagi, T., Watanabe, M., Hata, M., Kitamura, S., Imafuku, K., Yanagi, H., Homma, MD, A., Wang, L., Takahashi, H., Shimizu, H. and *Hatakeyama, S. (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.
2. Sang, Y., Li, Y., Song, L., Alvarez, A.A., Zhang, W., Lv, D., Tang, J., Liu, F., Chang, Z., Hatakeyama, S., 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.
3. *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.
4. Mizushima, W., Takahashi, H., Watanabe, M., Kinugawa, S., Matsushima, S., Takada, S., Yokota, T., Furihata, T., Matsumoto, J., Tsuda, M., Chiba, I., Nagashima, S., Yanagi, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Tsutsui, H. and *Hatakeyama, S. (2016) The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes, ***J. Mol. Cell. Cardiol.*** 100, 43-53. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.013.
5. Masuda, Y., Takahashi, H., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Saraf, A., Washburn, W.P., Florens, L., Conaway, R.C., Conaway, J.W. and *Hatakeyama, S. (2015) TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin, ***Nat. Commun.*** 6, 7299. doi: 10.1038/ncomms8299.

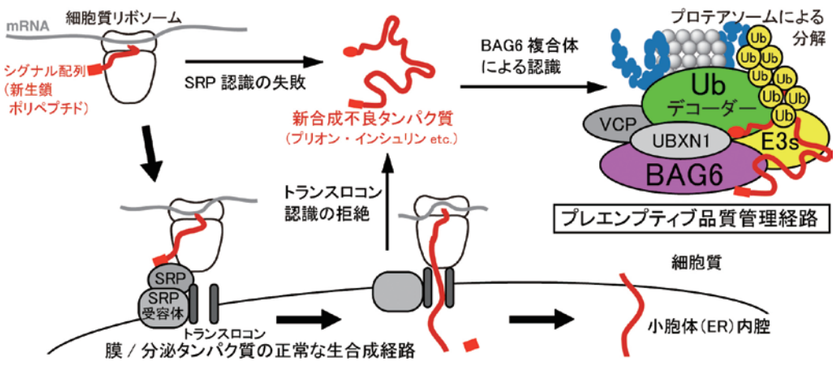
研究代表者 川原　裕之
首都大学東京 理学部生命科学科 細胞生化学研究室 教授
http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=celche

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 デコーダーの作動機構解明

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。特に、BAG6と会合するユビキチンデコーダー群、及びE3ユビキチンリガーゼ群を網羅的に同定し、これらとBAG6との相互作用を選択的に遮断／増強する化合物を同定することによって、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凝集／分解プロセスに与える影響を解明していくことを目指します。



関連する代表的な論文

1. 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
2. Suzuki, R., and *Kawahara, H. (2016) UBQLN4 recognizes mislocalized transmembrane domain proteins and targets these to proteasomal degradation. ***EMBO Rep.*** 17, 842–857. doi: 10.15252/embr.201541402.
3. *Kawahara, H., Minami, R., and Yokota, N. (2013) BAG6/BAT3: Emerging roles in quality control for nascent polypeptides. ***J. Biochem.*** 153, 147-160. doi: 10.1093/jb/mvs149
4. Minami, R., Hayakawa, A., Kagawa, H., Yanagi, Y., Yokosawa, H., and *Kawahara, H. (2010) BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. ***J. Cell Biol.*** 190, 637-650. doi: 10.1083/jcb.200908092
5. 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.E06-05-0437

研究代表者 及川　大輔
大阪市立大学大学院医学研究科分子病態学 講師
http://osaka-cu-1seika.umin.jp/

直鎖状ユビキチン鎖を標的としたケモテクノロジーによる病態解析

ユビキチン修飾はタンパク質の寿命、細胞内局在、相互作用を調節することで多彩な細胞機能を制御しています。これを可能にしているのがユビキチン修飾の構造多様性であり、その機能情報はユビキチンコードとも呼ばれます。中でも、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-κBなどの炎症シグナルや細胞死を制御するユニークかつ希少なユビキチンコードとして、近年、大きな注目を集めています。

私たちは、独自のスクリーニングによって直鎖状ユビキチン鎖の産生を特異的に抑制する新規化合物を同定し（***SLAS Discov.*** 2018）、さらに、当該化合物をベースにした合成展開を進め、より高い阻害効率を備えた化合物も見出しました（***BBRC.*** 2018）。本研究では、これらの研究ツール、あるいは新たに構築される解析技術を駆使し、直鎖状ユビキチンコード（M1鎖コード）を標的としたケモテクノロジー解析を進めます。

1. 直鎖状ユビキチン鎖産生阻害剤を利用したケモテクノロジー解析

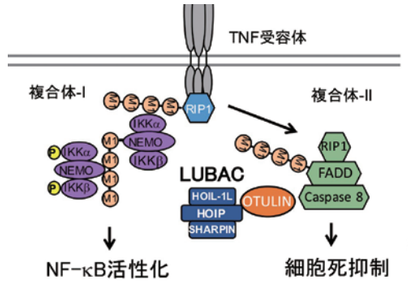
独自に取得した当該化合物を利用し、各種炎症性サイトカインや病原体関連分子パターン（PAMPs）で惹起されるNF-κB、細胞死、IFN-βシグナルに対するM1鎖コードの動作原理と新たな生理機能を、癌や乾癬、ALSなどの病態形成機構と関連して明らかにします。また、これまでに取得している化合物群の構造比較、既存の構造データ解析を基にしたモデル化などの解析を進め、より高い阻害活性を備えた阻害剤の開発を進めます。さらに、当該化合物のラベル化による新規可視化プローブなど、新たなケモテクノロジーの開発にも取り組みます。

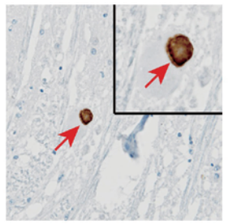
2. OTULIN阻害剤の開発とケモテクノロジー解析

直鎖状ユビキチン鎖の生成に拮抗的に働く脱ユビキチン酵素（DUB）であるOTULINに対する新規阻害剤の開発を進め、特異的分解阻害という観点からM1鎖コードの生理意義と動作原理にアプローチします。

3. M1鎖デコーダー機能を標的としたケモテクノロジーの開発と解析

化合物スクリーニングやステープルペプチドなどの技術を駆使して、M1鎖コードの認識を特異的に阻害する手法を開発します。また、得られた手法を利用し、特にALS発症と関連した炎症シグナルや細胞死制御に着目し解析を進め、M1鎖コードの認識異常に伴う疾患発症機序の解明を進めます。





筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者での直鎖状ユビキチン鎖陽性の封入体（***Nat Commun.*** 2016）

制御破綻

各種疾患の発症
（癌、乾癬、ALS、etc）

1. LUBAC阻害剤
2. DUB阻害剤
3. M1鎖デコーダー機能阻害
→ 発症機序の解明
→ 病態抑制手法の開発

関連する代表的な論文

1. Katsuya, K.+, Oikawa, D.+, Iio, K., Obika, S., Hori, Y., Urashima, T., Ayukawa, K., and *Tokunaga, F. (2019) Small-molecule inhibitors of linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), HOIPINs, suppress NF-κB signaling. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 509, 700-706. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.164 (+) equally contributed.
2. Kato, K., *Nishimasu, H., Oikawa, D., Hirano, S., Hirano, H., Ishitani, R., Tokunaga, F., Kasuya, G., and *Nureki, O. (2018) Structural insights into cGAMP degradation by Ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1. ***Nat. Commun.*** 9, 4424. doi: 10.1038/s41467-018-06922-7
3. *Katsuya, K., Hori, Y., Oikawa, D., Yamamoto, T., Umetani, K., Urashima, T., Kinoshita, T., Ayukawa, K., Tokunaga, F., and Tamaru, M. (2018) High-Throughput Screening for Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC) Selective Inhibitors using Homogeneous Time- Resolved Fluorescence (HTRF)-Based Assay System. ***SLAS Discov.*** 23, 1018-1029. doi: 10.1177/2472555218793066
4. Nakazawa, S.+, Oikawa, D.+, 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., and *Tokunaga, F. (2016) Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. ***Nat. Commun.*** 7, 12547. doi: 10.1038/ncomms12547 (+) equally contributed.
5. *Iwawaki, T., Akai, R., Oikawa, D., Toyoshima, T., Yoshino, M., Suzuki, M., Takeda, N., Ishikawa, T., Kataoka, Y., and Yamamura, K. (2015) Transgenic mouse model for imaging of interleukin-1β-related inflammation *in vivo*. ***Sci. Rep.*** 5, 17205. doi: 10.1038/srep17205

研究代表者 稲田 利文
東北大学大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野 教授
http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_lab_HP/

特異的ユビキチン鎖を標的とした RQC 制御の分子基盤の解明

正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。正確な翻訳伸長反応を保証するシステムとして、細胞は異常な翻訳伸長阻害を認識し排除する品質管理機構を保持しています。研究代表者は、翻訳伸長反応の異常停止が、新生鎖のユビキチン化とプロテアソームによる迅速な分解 (RQC: Ribosome-associated Quality Control) を引き起こすことを見出しました。その後、RQCの初期段階である翻訳伸長中に停滞したリボソームを認識し解離させる分子機構として、リボソームのユビキチン化が必須であることを見出しました。E3ユビキチンライゲースZNF598 (酵母HEL2) が翻訳伸長中に停滞したリボソームの特異的な構造を認識し、特定のリボソームタンパク質をユビキチン化することがRQCに必須であること、さらに停滞80Sリボソームをユビキチン化依的に各サブユニットに解離する新規複合体RQT2/3/4を同定しました。我々はuS10のユビキチン化としてK48鎖とK63鎖の両方を同定しましたが、それぞれのユビキチン鎖の機能は未だ不明です。最近我々は、RQCを抑制するE3ユビキチンライゲースを同定した。また、脱ユビキチン化酵素がRQC促進活性を持つことを発見しました。従って本公募研究では、ユビキチン化によるRQCの新規制御機構として、以下の3項目を解析します。

1. E3ユビキチンライゲースNOT4によるRQC抑制機構。
NOT4によるuS10のK48鎖のユビキチン化が、RQCに必須なK63鎖のユビキチン化を抑制する可能性を検証する。NOT4とHEL2の、2つのE3ユビキチンライゲースによるuS10のユビキチン化の鎖特異性と、RQT 複合体依存の解離反応を阻害する分子機構を検証します。

2. 脱ユビキチン化酵素によるRQC促進機構の解析。
項目1の解析結果を基盤として、E3依存に形成されたユビキチン鎖を基質とした脱ユビキチン化の効率と、ユビキチン鎖特異性を検証します。uS10に形成されたユビキチン鎖の実体とUBP2とUBP3によるユビキチン鎖長の制御機構を解明します。

3. ケモテクノロジーによるRQC制御。
RQCユビキチン修飾やデコーダー分子の特定の機能を瞬時に喪失させることが可能な低分子化合物やステープルペプチドの開発を試みたい。具体的には、①リボソームの鎖特異的ユビキチン化と脱ユビキチン化、②RQT2/3/4複合体による停滞したリボソームの解離反応、を阻害する低分子化合物やステープルペプチドを開発しRQC活性の操作を目指します。

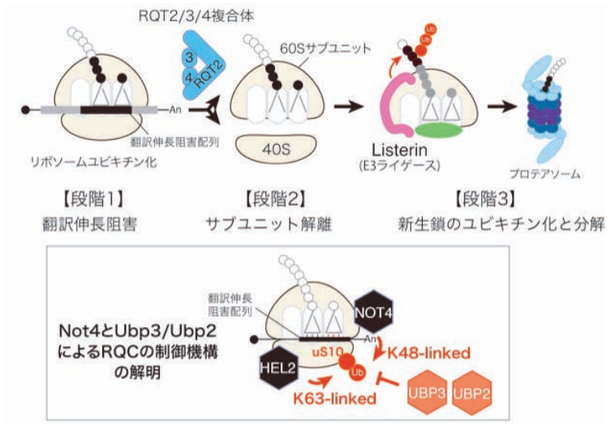


図1．翻訳停滞を認識する品質管理RQCの分子機構とその制御

関連する代表的な論文

1. Sugiyama, T., Li, S., Kato, M., Ikeuchi, K., Ichimura, A., Matsuo, Y. and *Inada, T. (2019) Sequential ubiquitination of ribosomal protein uS3 triggers the degradation of non-functional 18S rRNA. ***Cell Rep.*** 26, 3400-3415.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.067.
2. Ikeuchi, K., Tesina P, Matsuo Y, Sugiyama T, Cheng J, Saeki Y, Tanaka K, Becker T, *Beckmann R, *Inada, T. (2019) Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2 - driven quality control pathways. ***EMBO J.*** 38. e100276. doi: 10.15252/embj.2018100276.
3. *Inada, T. (2017) The ribosome as a platform for mRNA and nascent polypeptide quality control. ***Trends Biochem. Sci.*** 42, 5-15. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.005.
4. Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, NT., Beckmann, R. and *Inada, T. (2017) Ubiquitination of Stalled Ribosome Triggers Ribosome-associated Quality Control. ***Nat. Commun.*** 8, 159. doi: 10.1038/s41467-017-00188-1
5. Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I. and *Inada, T. (2012) Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality Control Systems by Dissociation of Stalled Ribosome at 3' End of Aberrant mRNA. ***Mol. Cell*** 26, 518-529. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.

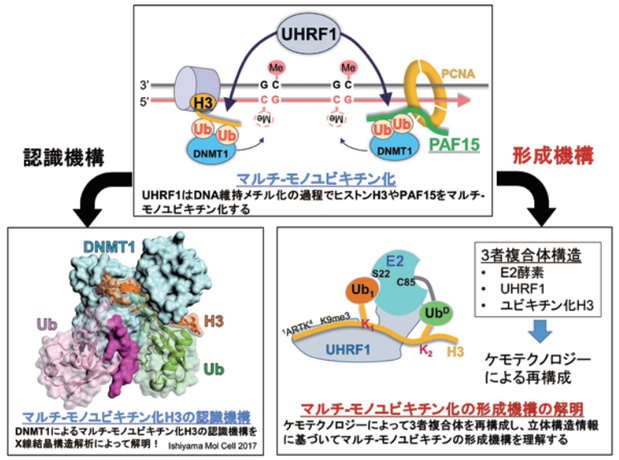
研究代表者 有田 恭平
横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 構造生物学研究室 准教授
http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/xtal-mls/members/kyouhei/index.html

UHRF1 によるマルチモノユビキチン化反応の構造基盤

ゲノムDNAのCG配列中のシトシンに起こるDNAメチル化は遺伝子の不活化に関与します。分化した細胞では、細胞の種類に応じて発現する遺伝子が異なりますが、これは各細胞に刻まれるDNAメチル化パターンの違いに起因します。従って、分化した細胞の形質を維持するために、我々の細胞のDNAメチル化は塩基配列と同様に複製され継承されていきます。これをDNA維持メチル化といいます。このDNA維持メチル化にはユビキチン化E3リガーゼ活性をもつUHRF1とDNAメチル化酵素DNMT1の2つのタンパク質が必須の働きをします。DNA維持メチル化は2つの異なる機構が働いていると考えられています。

1つ目はヒストンH3のユビキチン化を介した経路です。UHRF1はヌクレオソームを形成するヒストンH3のK14, K18, K23をマルチモノユビキチン化します。このマルチモノユビキチン化H3をDNMT1が認識することによって、DNMT1はヘミメチル化DNAに呼び込まれ、新生鎖をメチル化します。もう一つは、複製因子PAF15のユビキチン化を介した経路です。UHRF1は複製サイトに局在するPAF15をマルチモノユビキチン化し、DNMT1がヘミメチル化DNAに呼び込まれます。

興味深いことにDNA維持メチル化の過程でDNMT1を働く場所に呼び込むシグナルとなるヒストンH3やPAF15のユビキチン化は、これまでによく研究されてきたポリユビキチン化ではなく、複数のリジン残基がモノユビキチン化されるマルチモノユビキチン化でした。私たちはこれまでにDNMT1がどのようにマルチモノユビキチン化H3を認識するかを明らかにしました。しかし、UHRF1がどのような作用機序でH3やPAF15を段階的にマルチモノユビキチン化するかは全くわかっていません。そこで本研究では、UHRF1によるH3やPAF15のマルチモノユビキチン反応機構の構造基盤を解明するために、ケモテクノロジーを駆使してE2酵素：UHRF1 (E3)：基質(H3またはPAF15)の3者複合体を再構成します。その立体構造をX線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析によって明らかにし、立体構造情報に基づいてマルチモノユビキチン化の形成機構を明らかにします。



関連する代表的な論文

1. Kori, S., Ferry, L., Matano, S., Jimenji, T., Kodera, N., Tsusaka, T., Matsumura, R., Oda, T., Sato, M., Dohmae, N., Ando, T., Shinkai, Y., *Defossez, PA., and *Arita, K. (2019) Structure of the UHRF1 Tandem Tudor Domain Bound to a Methylated Non-histone Protein, LIG1, Reveals Rules for Binding and Regulation. ***Structure*** 27, 485-496. doi: 10.1016/j.str.2018.11.012.
2. 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., and *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, 350-360. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.037.
3. Ferry, L., Fournier, A., Tsusaka, T., Adelmant, G., Shimazu, T., Matano, S., Kirsh, O., Amouroux, R., Dohmae, N., Suzuki, T., Filion, GJ., Deng, W., de Dieuleveult, M., Fritsch, L., Kudithipudi, S., Jeltsch, A., Leonhardt, H., Hajkova, P., Marto, JA., Arita, K., *Shinkai, Y., and *Defossez PA. (2017) Methylation of DNA Ligase 1 by G9a/GLP recruits UHRF1 to replicating DNA and regulates DNA methylation. ***Mol. Cell*** 67, 550-565. doi: 10.1016/j.molcel.2017.07.012
4. Arita K, S. Isogai, T. Oda, M. Unoki, K. Sugita, N. Sekiyama, K. Kuwata, R. Hamamoto, H. Tochio, M. Sato, M. Ariyoshi, M. (2012) *Shirakawa. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** 109, 12950-12955. doi: 10.1073/pnas.1203701109
5. Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y., and *Shirakawa, M. (2008) Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. ***Nature*** 455, 818-821. doi: 10.1038/nature07249

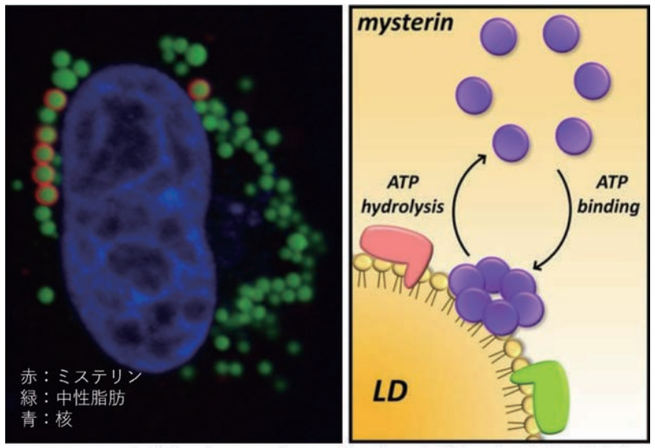
研究代表者 森戸 大介
昭和大学医学部生化学講座 講師
http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Biochem/Biochem_top.html

非典型的ユビキチン化の機能と破綻、その人工的制御

私たちは約10年前、ミステリンというユニークなユビキチンリガーゼをクローニングしました。ミステリンは脊索動物以上に保存され、ユビキタスな発現パターンを示します。分子量は約600 kDa（ヒトゲノムにコードされる中では21番目の大きさ）ですが、さらにp97やプロテアソームと類似のAAA+ ATPアーゼドメインを持つことにより、推定約3.5 mDaの巨大なドーナツ状複合体を形成します。機能について長らく不明でしたが、細胞内の脂肪貯蔵オルガネラ「脂肪滴」に局在して脂肪蓄積を正に制御する因子であることを最近、明らかにしました。

ミステリンはもともと脳血管疾患もやもや病の責任遺伝子として見つかりました。RING finger型ユビキチンリガーゼドメイン内の保存されたシステイン／ヒスチジンの変異により、メカニズムは不明ですが、脳底部の動脈が進行性に狭窄・閉塞し、脳虚血・脳梗塞、発病後期には脳出血を生じます。RING finger変異によりミステリンは脂肪滴から脱離し、凝集様構造を形成しますが、このようなミステリンの機能喪失と凝集形成のいずれがもやもや病の直接の引き金になるのか、またユビキタスに発現するミステリンの異常がなぜ脳底に限局された病態としてあらわれるのか、いまのところいずれも不明です。

私たちは、ミステリンのユビキチン化基質は何か、どのタイプのユビキチン鎖を付加しどのような機能制御を行うのか、また、その障害によりどのような細胞機能異常を生じるのかについて探索を進めています。研究タイトルに掲げたように、この探索を進める中で、非典型的ユビキチン化修飾の生理機能と重要性の解明、その制御につながるケモテクノロジーの開発に挑戦します。



ミステリンは脂肪滴の表面に局在する（左図）。脂肪滴局在の直接の駆動力はATPアーゼ活性により得られると考えられるが（右図）、正常な局在化にはユビキチンリガーゼ活性も重要である。

関連する代表的な論文

1. Sugihara, M., *Morito, D., Ainuki, S., Hirano, Y., Ogino, K., Kitamura, A., Hirata, H., and Nagata, K. (2019) The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin stabilizes cytoplasmic lipid droplets. ***J. Cell Biol.*** 218, 949-960.
2. * 森戸大介 , ミステリン―もやもや病の責任遺伝子産物 (2018) *医学のあゆみ第5土曜特集* , *蛋白質代謝医学*, vol.267, no.13, p.1105-1110
3. Kotani, Y., *Morito, D., Sakata, K., Ainuki, S., Sugihara, M., Hatta, T., Iemura, SI., Takashima, S., Natsume, T., and 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.
4. Kotani, Y., *Morito, D., Yamazaki, S., Ogino, K., Kawakami, K., Takashima, S., *Hirata, H., and *Nagata, K. (2015) Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. ***Sci. Rep.*** 5, 16161.
5. Morito, D., Nishikawa, K., Hoseki, J., Kitamura, A., Kotani, Y., Kiso, K., Kinjo, M., Fujiyoshi, Y., and Nagata, K. (2014) Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. ***Sci. Rep.*** 4, 4442.

研究代表者 鳴海 哲夫
静岡大学大学院総合科学技術研究科 生物有機化学研究室 准教授
https://wwp.shizuoka.ac.jp/tenarumi/

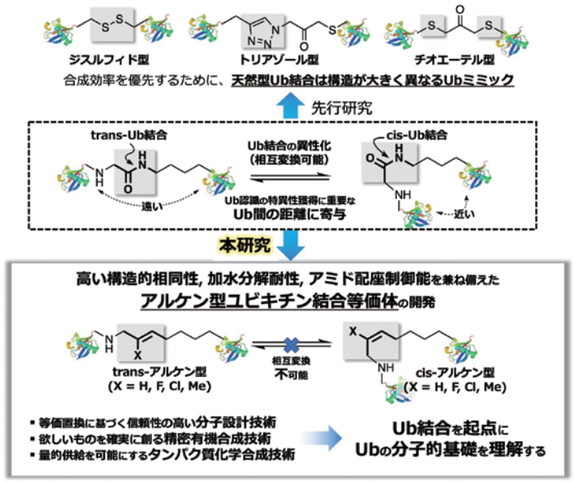
ユビキチン鎖の空間配向制御を指向した非水解性アルケン型ユビキチン結合等価体の創出

ユビキチン分子間をつなぐユビキチン結合は、ユビキチン鎖の立体構造や機能発現を支配する重要な部分構造であり、ユビキチン化を有機化学的に制御した機能性分子の開発はユビキチンの作動機構の理解を加速します。これまでにジスルフィド型やトリアゾール型など非天然型結合を介してユビキチン分子同士をつなげた機能性高分子を利用したユビキチン研究が報告されていますが、①本来のユビキチン結合（イソペプチド結合）とは全く異なる構造であること、②そのアミド配座を反映していない結合様式であること、③これらの非天然型ユビキチン分子を比較した例はないことから、ユビキチン結合やアミド配座の違いが、ユビキチン鎖の全体構造やユビキチン修飾系の多彩な生理機能に及ぼす影響を見積もることは困難でした。

これまでに私たちは生体分子の普遍的な共通構造であるペプチド結合の特性を利活用する機能性分子を開発し、アミノ酸やペプチドを基盤分子とする分子科学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する分子変換「ペプチド結合の等価置換」を中心に研究を進め、これら機能性分子（アルケン型ペプチド結合等価体）を立体選択的かつ化学選択的に与える化学合成法を確立するとともに、CXCR4アンタゴニストやHIV膜融合阻害剤をはじめとする種々の生理活性ペプチドに加水分解耐性やアミド配座制御能を付与したアルケン型ペプチドミメティックを創出してきました。

アルケン型ペプチド結合等価体の主な特徴として、①もとのペプチドと構造的によく似ていること、②プロテアーゼによる加水分解を受けないこと、③特定のペプチド結合のアミド配座が関わる機能を解析する化学プローブとなること、が挙げられます. これらの特徴を有するアルケン型ペプチド結合等価体は、イソペプチド結合であるユビキチン結合の機能解析にも極めて有用であり、領域内のユビキチン結合を用いる全ての研究と化合物ベースの連携を加速します。

本研究では、ペプチド結合から炭素-炭素二重結合への等価置換技術をユビキチン結合に応用することで (「ユビキチン結合の等価置換」)、ユビキチン化を有機化学的に制御した機能性分子として、高い構造的相同性、加水分解耐性、アミド配座制御能を兼ね備えた「アルケン型ユビキチン結合等価体」を開発し、それらをユビキチン鎖に応用して、ユビキチン鎖の構造や機能の分子的基礎の解明に挑戦します。



関連する代表的な論文

1. *Narumi, T., Nishizawa, T., Imai, T., Kyan, R., Taniguchi, H., Sato, K., and Mase, N. (2018) Improvement of chemical stability of conjugated dienes by chlorine substitution. ***Tetrahedron*** 74, 6257-6533. doi: 10.1016/j.tet.2018.09.030.
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 gem-Dichlorides: Highly Diastereoselective Synthesis of (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres. (2015) ***Org. Lett.*** 17, 2302-2305. doi: 10.1021/acs.orglett.5b00611.
4. 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.
5. 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) ***Org. Biomol. Chem.*** 8, 616-621. doi: 10.1039/B917236J.

研究代表者 林　剛介
名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻 生体分子応用化学研究室 准教授
http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioanal2/top.html

ポリユビキチン鎖およびユビキチン化タンパク質の高効率化学合成

ユビキチンなどのタンパク質はアミノ酸が精密に重合した生体高分子ですが、近年は生体のタンパク質合成システムを利用した遺伝子工学的な手法だけでなく、有機化学を駆使した「タンパク質化学合成法」でも作られるようになってきています。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。ペプチド固相合成では、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。これまでに私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。その例として、有機金属錯体やDNAを用いた新たなペプチド連結法の開発、また翻訳後修飾や蛍光修飾が施されたヒストンタンパク質の合成とその機能解析などが挙げられます。

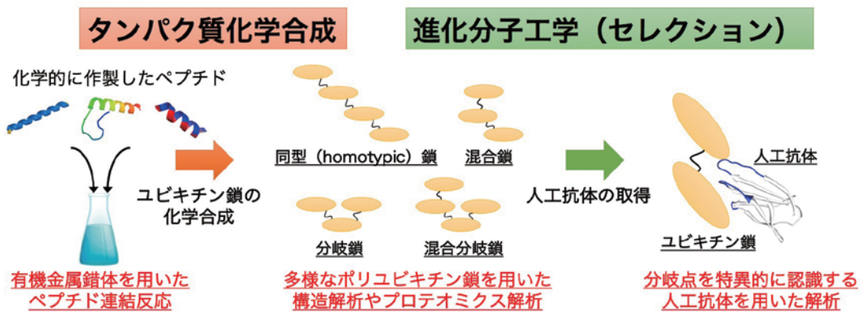
本研究では「ユビキチンコード」の解読に寄与するケモテクノロジーとして、既存の方法では作製困難なポリユビキチン鎖およびユビキチン化タンパク質の化学合成法の開発を行います。さらに進化分子工学的手法を融合し、合成したユビキチン鎖やユビキチン化タンパク質に選択的に結合するペプチドあるいは人工抗体の取得を試みます。また、合成したユビキチン鎖やユビキチン化タンパク質を領域内外の研究者に提供し、構造解析やプロテオミクス解析に応用することで、本領域の発展に貢献します。

1. 有機金属錯体を用いたポチユビキチン鎖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有機金属錯体を用いたone-potペプチド連結法をさらに発展させ、標的とするポリユビキチン鎖および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. ユビキチン鎖の分岐点を認識する人工抗体の取得

化学合成したユビキチン鎖に対して、鎖の分岐パターン特異的に結合する人工抗体（あるいはペプチドアプタマー）の取得を行います。取得した人工抗体は、阻害剤としての利用やプルダウン解析に応用するなどしてユビキチンコードの解読に役立てます。



関連する代表的な論文

1. Hayashi, G., Yanase, M., Nakatsuka, Y., and *Okamoto, A. (2019) Simultaneous and Traceless Ligation of Peptide Fragments on DNA Scaffold. ***Biomacromolecules*** 20, 1246-1253. doi: 10.1021/acs.biomac.8b01655.
2. Kamo, N., Hayashi, G., and *Okamoto, A. (2018) Triple Function of 4-Mercaptophenylacetic Acid Promotes One-Pot Multiple Peptide Ligation. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 57, 16533-16537. doi: 10.1002/anie.201809765.
3. Sueoka, T., Koyama, K., Hayashi, G., and *Okamoto, A. (2018) Chemistry-driven Epigenetic Investigation of Histone and DNA Modifications, ***Chem. Rec.*** 18, 1-19. doi: 10.1002/tcr.201800040.
4. Kamo, N., Hayashi, G., and *Okamoto, A. (2018) Efficient peptide ligation between allyl-protected Asp and Cys followed by palladium-mediated deprotection, ***Chem. Commun.*** 54, 4337-4340. doi: 10.1039/c8cc01965g.
5. Sueoka, T., Hayashi, G., and *Okamoto, A. (2017) Regulation of the Stability of the Histone H2A-H2B Dimer by H2A Tyr57 Phosphorylation, ***Biochemistry*** 56, 4767-4772. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00504.

研究代表者 渡邉　信元
理化学研究所 環境資源科学研究センター 理研-マックスプランク連携研究部門 バイオプローブ応用研究ユニット ユニットリーダー
http://www.riken.jp/research/labs/csrs/riken_max_planck/bioprobe_app/

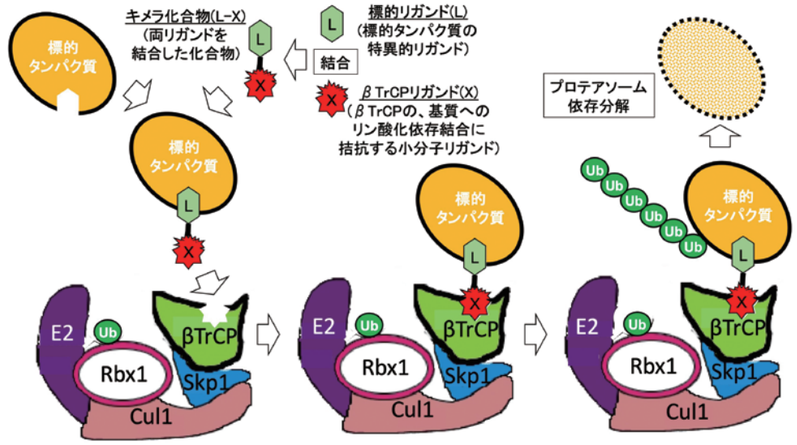
β-TrCP のリン酸化基質への結合に拮抗する小分子探索と蛋白質分解誘導系への応用

β-TrCP(β-Transducin repeat Containing Protein) は、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β-TrCPリガンドが特異的にβ-TrCPに結合する事を検証した後、研究協力者(理研・創薬化学基盤ユニット・長展生上級研究員)と共に、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$^{\beta\text{-TrCP}}$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。

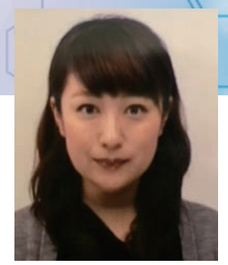
本提案ではモデル系として、分解させたいタンパク質として、白血病の原因遺伝子産物Bcr-Abl、その特異的リガンドとしてGleevec (imatinib)を選び、β-TrCPリガンドとGleevecの合成キメラ化合物によってBcr-Ablがユビキチン化、分解されることを実証し、ユビキチン化を利用した新たなケモテクノロジーとしてのβ-TrCPリガンドをもちいた細胞内タンパク質分解誘導系の有効性を証明します。



関連する代表的な論文

1. 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 Lett.*** in press doi: 10.1002/1873-3468.13361.
2. 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.
3. 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: 10.1002/cam4.1339.
4. Ooi, L-C., *Watanabe, N., Futamura, Y., Sulaiman, SF., Darah, I., and *Osada, H. (2013) Identification of small molecule inhibitors of p27^{Kip1} ubiquitination by high-throughput screening. ***Cancer Sci.*** 104, 1461-1467. doi: 10.1111/cas.12246.
5. *Watanabe, N., and Osada, H. (2016) Small molecules that target phosphorylation dependent protein-protein interaction. ***Bioorg. Med. Chem.*** 24, 3264-3254. doi: 10.1016/j.bmc.2016.03.023.

研究代表者 岡田 麻衣子
東京工科大学応用生物学部 応用生体科学研究室 助教
https://yano-lab.bs.teu.ac.jp



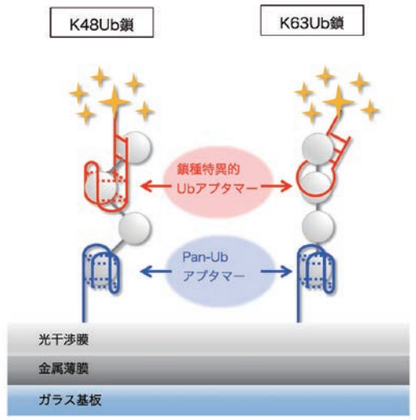
ユビキチン鎖種特異的な高感度アプタマーアレイの開発

2000年代初めに、生命現象の根幹をなすヒトのゲノム配列が決定され、実に多くの遺伝子の存在が明らかとなりました。これらの遺伝子群はタンパク質として発現して生体内で機能するわけですが、どのようにして複雑多岐に渡る生命現象を支えているのでしょうか？バイオテクノロジーが飛躍的に進んだ現在においても、その仕組みの多くは謎に包まれており、生命現象を紐解くことの魅力を物語っているようにも思えます。このように、タンパク質が緻密に制御されながらも多彩な機能を発揮できる仕組みとして、その1つにタンパク質の翻訳後修飾が考えられます。タンパク質に付加された修飾が、コードとなって別のタンパク質に読み取られ、適切な生命現象へと変換されていきます。このコードが幾重にも重なることで、緻密な生体反応が連なっていくとも考えられます。

ユビキチンは、自身もタンパク質でありながら、翻訳後修飾基として働く不思議なタンパク質です。ユビキチン修飾の形態も様々であり、単体として標的タンパク質に付加するモノユビキチン化に加え、8通りの様式で連結したポリユビキチン化が存在します。ポリユビキチン鎖の長さも多岐に渡り、ユビキチン修飾はその鎖の種類や長さを組み合わせて様々な生命現象へ変換されていくと考えられます。興味深いことに、近年の研究により、ユビキチン自身が翻訳後修飾を受けることが明らかになってきました。ユビキチン修飾の暗号は2重にコードされており、これまで想像していた以上により階層性を持って生命現象の根幹に関わっているのかもしれません。

このように、ユビキチン修飾の魅力的な多様性が次々と明らかになる一方で、各々がいかなる生命現象へと繋がっているのかは、まだまだ謎が多い現状です。これらの暗号を解読するには適切なツールが必要であり、「抗体」が長年その役目を務めてきました。そして、ユビキチン修飾の多様性が明らかになるたびに、新たな抗体の作出が精力的に行われてきました。想像以上の多様性により目覚ましい展開を広げるユビキチン修飾の意義を紐解くには、既存の抗体だけでなく新たな分子認識素子を積極的に取り入れていくことが必要かもしれません。

このような観点から、私は1本鎖核酸であるアプタマーに着目しました。アプタマーは固有の高次構造を形成することで、抗体にも代わる分子認識能を発揮することが知られています。その作出は試験管内の反応のみで行うことが可能であり、安価なだけでなく、修飾基の導入などの改変も容易に行うことが魅力の1つです。そこで本研究領域では、ユビキチン鎖種に特異的なアプタマーを獲得し、多様なユビキチン修飾形態を識別可能なアプタマーアレイを作製することを目的としています（概念図）。これにより、既存の抗体だけでは検出できなかったユビキチン修飾の意義を明らかにし、ユビキチン修飾を一連の暗号として生命現象を紐解くことを目指しています。



鎖種特異的ユビキチンアプタマーアレイの概念図

関連する代表的な論文

1. Tamura, S., Okada, M., Kato, S., Shinoda, N., Fukunaga, K., Ui-Tei, K., and *Ueda, M. (2018) Ouabagenin is a naturally occurring LXR ligand without causing hepatic steatosis as a side effect. ***Sci. Rep.*** 8, 2305. doi: 10.1038/s41598-018-20663-z.
2. Tsuruga, T., Kumai, T., and *Okada, M. (2017) UBE3B and UBE3C functionally regulate cell proliferation through the ubiquitin-proteasome system. ***J. St. Marianna Univ.*** 45, 149-159. doi: 10.14963/stmari.45.149
3. Nakajima, S., *Watashi, K., Ohashi, H., Kamisuki, S., Izaguirre-Carbonell, J., Kwon, AT., Suzuki, H., Kataoka, M., Tsukuda, S., Okada, M., Moi, M.,L., Takeuchi, T., Arita, M., Suzuki, R., Aizaki, H., Kato, T., Suzuki, T., Hasegawa, H., Takasaki, T., Sugawara, F., and Wakita, T. (2016) Fungus-derived neoechinulin B as a novel antagonist of liver X receptor, identified by chemical genetics using hepatitis C virus cell culture system. ***J. Virol.*** 90, 9058-9074. doi: 10.1128/JVI.00856-16
4. Okada, M., Ohtake, F., Nishikawa, H., Wu, W., Saeki, Y., Tanaka, K., and *Ohta, T. (2015) Liganded ERα stimulates the E3 ubiquitin ligase activity of UBE3C to facilitate cell proliferation. ***Mol. Endocrinol.*** 29, 1646-1657. doi: 10.1210/me.2015-1125.
5. Chen, S., T., Okada, M., Nakato, R., Izumi, K., Bando, M., and *Shirahige, K. (2015) The Deubiquitinating Enzyme USP7 regulates Androgen Receptor Activity by Modulating Its Binding to Chromatin. ***J. Biol. Chem.*** 290, 21713-21723. doi: 10.1074/jbc.M114.628255.

研究代表者 有井 潤
東京大学 医科学研究所 ウイルス病態制御分野 助教
http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Kawaguchi-lab/KawaguchiLabTop.html

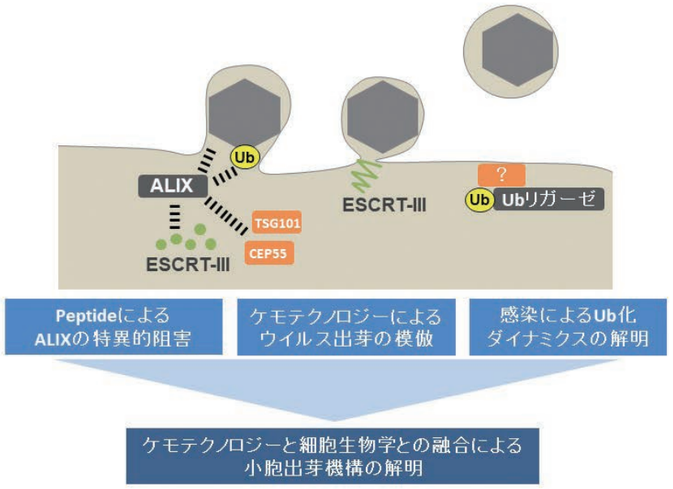
ユビキチンテクノロジーの創出によるウイルス出芽の解剖

膜タンパク質へのユビキチン（Ub）化は、ESCRT-III機構を活性化することで膜切断を引き起こし、小胞出芽を誘導すると考えられています。多くのエンベロープウイルスが細胞から脱出するときにも、このシステムを模倣し、ALIXなどのESCRTタンパク質を介して膜切断が引き起こされます。ALIXはUb鎖を認識することが知られていますが、小胞の積荷タンパク質を直接結合する例も多数存在します。さらにALIXは、細胞分裂を含めたさまざまな機能を司ることが知られています。このため、実際に積荷タンパク質自身に対するUb化が直接ESCRT-IIIによる膜切断を誘導している証拠はほとんどありません。

ヘルペスウイルスは、ヒトに脳炎を始めとした多彩な病態を引き起こす医学上極めて重要なウイルスです。このウイルスは、宿主に終生続く潜伏感染を成立させることができ、ストレスなどをきっかけとして再活性化を引き起こすため、度々病態を繰り返すことがあります。このため、人類のほぼ全てが、複数のヘルペスウイルスに感染していると推定されています。つまり、ほぼ全ての人間は、ヘルペスウイルスが引き起こす病態と無縁ではいられないといえます。Ub関連創薬が発展しつつある現在において、ヒトに常在するヘルペスウイルスとUbとの関係を再検討する必要があるのではないでしょうか？

またヘルペスウイルスは、核内膜と細胞質内小胞という、ユニークな場所で出芽を引き起こすことが知られています。さらにこのウイルスは、自らUbリガーゼと脱Ub化酵素をコードしてます。これらのことを鑑みると、ヘルペスウイルス感染細胞におけるUb化状態を包括的に理解しなければ、その出芽におけるUb化の意義を知ることができないと考えられます。

本研究では、ユビキチンテクノロジーを創出し、駆使することで、ヘルペスウイルスの出芽機構の理解と制御を目指します。また、本研究で注目するESCRT-IIIは、多くのウイルスの増殖に必須の宿主機構です。これらを対象としたケモテクノロジーの創出は、広範囲に効果のある抗ウイルス剤の開発にも貢献すると考えられます。



関連する代表的な論文

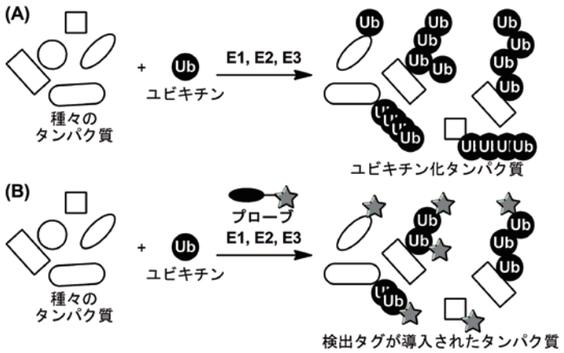
1. Arii, J., Watanabe, M., Maeda, F., Tokai-Nishizumi, N., Chihara, T., Miura, M., Maruzuru, Y., Koyanagi, N., Kato, A. and *Kawaguchi, Y. (2018) ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity. ***Nat. Commun.*** 9, 3379. doi: 10.1038/s41467-018-05889-9.
2. Arii, J., Shindo, K., Koyanagi, N., Kato, A., and *Kawaguchi Y. (2016) Multiple Roles of the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein D in Infected Cells. ***J. Virol.*** 90, 10170-10181. doi: 10.1128/JVI.01396-16.
3. Arii, J., Hirohata, Y., Kato, A., and *Kawaguchi Y. (2015) Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIB Mediates Herpes Simplex Virus 1 Entry. ***J. Virol.*** 89, 1879-1888. doi: 10.1128/JVI.03079-14.
4. Arii, J., Goto, H., Suenaga, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Imai, T., Minowa, A., Akashi, H., Arase, H., Kawaoka, Y., and *Kawaguchi Y. (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus 1. ***Nature*** 467, 859-862. doi: 10.1038/nature09420.
5. *Arii, J., and Kawaguchi, Y. (2018) The Role of HSV Glycoproteins in Mediating Cell Entry. ***Adv. Exp. Med. Biol.*** 1045, 3-21. doi: 10.1007/978-981-10-7230-7_1.

研究代表者 伊藤 幸裕
京都府立医科大学大学院医学研究科 医薬品化学 准教授
http://www.f.kpu-m.ac.jp/y/chemistry/index.html

ユビキチン化タンパク質ならびにその連結様式を解析するためのケミカルプローブ創製

細胞内におけるタンパク質のユビキチン化は、細胞周期の制御や細胞の分化など、多彩な細胞機能を司っています。このような多彩な機能調節は、複雑なユビキチン化様式によって達成されると考えられます。ユビキチン化には、モノユビキチン化と8 種類の異なる構造のポリユビキチン鎖修飾が知られており、その上、異なる種類のユビキチン鎖が連結した混合鎖修飾や一つのユビキチンに複数のユビキチン鎖が付加した分岐鎖修飾など複雑なユビキチン修飾も細胞内に存在すると考えられています。すなわち、この多様なユビキチン化様式が、多彩な細胞機能を高度に制御していると想定されます。そのため、タンパク質のユビキチン化とその修飾状態が、どのように細胞機能と関係しているかを明らかにすることで、ユビキチン化に関わる生物学の理解につながります。しかし、どのタンパク質のどのリシン残基で、いつ、どのようなユビキチン化修飾を受けるかを検出・定量するのは、通常困難が伴います。以上の背景から、本研究では、細胞内のユビキチン化タンパク質やその修飾状態を簡便かつ効率的に検出するための新たなユビキチン化検出プローブの開発を目指します。

これまでに、私たちは有機化学的アプローチにてユビキチン化を制御する様々な化合物を開発してきました。これらの知見を活かし、ユビキチン化されるタンパク質に対して、ユビキチンの代わりに検出タグを導入できるような化合物をユビキチン化検出プローブとして設計しました（図）。このプローブによって導入される検出タグを目印として利用することで、ユビキチン化タンパク質やそのユビキチン化様式を解析できると期待しています（図）。本研究では、ユビキチン化検出プローブの合成やその構造最適化、プローブとしての機能評価を行います。また、見出されたプローブを利用し、ユビキチン化タンパク質の検出ならびにそのユビキチン化様式の解析を行うことを目指します。



(A)　細胞内のタンパク質のユビキチン化。タンパク質のユビキチン化はE1、E2、E3の3種類の酵素群によって行われる。ユビキチン化タンパク質の検出は通常困難を伴う。
(B)　細胞内にユビキチン化検出プローブを処理した時に期待されるタンパク質の修飾。ユビキチン化検出プローブは、タンパク質に対してユビキチンの代わりに検出タグを導入できるように設計。検出タグはE1、E2、E3を介して導入される。検出タグに基づいて解析すれば、効率的にユビキチン化タンパク質とその連結様式を分析できると期待される。

関連する代表的な論文

1. *Itoh, Y. (2018) Chemical Protein Degradation Approach and its Application to Epigenetic Targets. ***Chem. Rec.*** 9, 1681-1700. doi: 10.1002/tcr.201800032.
2. *Itoh, Y. and Suzuki, M. (2018) Design, synthesis, and biological evaluation of novel ubiquitin-activating enzyme inhibitors. ***Bioorg. Med. Chem. Lett.*** 28, 2723-2727. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.03.004.
3. Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Okuhira, K., Naito, M., and *Hashimoto, Y. (2012) Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist. ***Bioorg. Med. Chem. Lett.*** 22, 4453-4457. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.134.
4. Itoh, Y., Ishikawa, M.; Kitaguchi, R., Sato, S., Naito, M., and *Hashimoto, Y. (2011) Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. ***Bioorg. Med. Chem.*** 19, 3229-3241. doi: 10.1016/j.bmc.2011.03.057.
5. Itoh, Y., Ishikawa, M., Naito, M., and *Hashimoto, Y. (2010) Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. ***J. Am. Chem. Soc.*** 132, 5820-5826. doi: 10.1021/ja100691p.

研究代表者 水上 進
東北大学多元物質科学研究所・細胞機能分子化学研究分野 教授
http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/mizukami/

光可逆的蛋白質ラベル化技術に基づく蛋白質分解の時空間制御

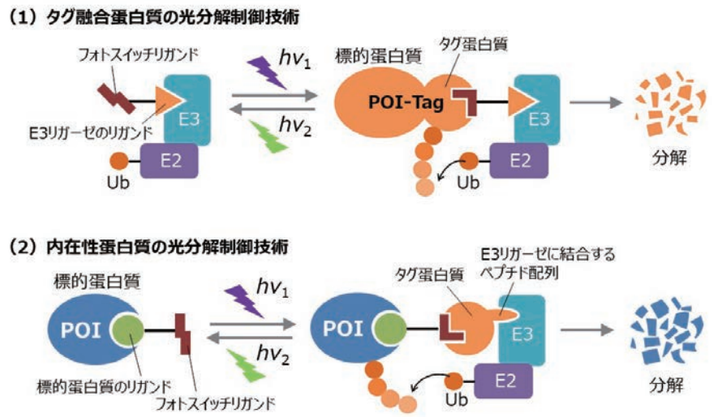
生命科学分野において、光で生命機能を制御する技術を用いた研究が盛んに行われています。もし、ユビキチンープロテアソームシステム（UPS）による蛋白質分解を光制御できれば、時空間分解能を持つ蛋白質の翻訳後レベルノックダウンが達成され、生命科学全体に波及する革新技術になると期待できます。私たちは、有機化学的手法と分子生物学的手法を融合させた「生体分子機能解析技術」を開発してきました。具体的には、①生体内・細胞内分子の可視化技術、②蛋白質ラベル化技術、③生体分子の光活性化技術を報告してきました。最近では、②と③の技術を融合させた光照射によってタグ蛋白質に機能性低分子をラベルする技術の開発を行っています。これまでにケージド化合物を利用した「非可逆的光ラベル化技術」、およびフォトスイッチ化合物を利用した「可逆的光ラベル化技術」の二種類を開発しています。

そこで、この光制御可能な蛋白質ラベル化技術を、低分子リガンドに基づいた蛋白質分解制御技術（PROTACs ／SNIPERs）と融合させることで、光照射によって生細胞内に発現する標的蛋白質を高い時空間分解能で分解する技術を開発します。光を用いることで、特定のタイミングで特定の細胞やオルガネラのみで標的蛋白質を分解できると期待されます。さらに、可逆的な光ラベル化技術は、照射光波長に応じてフォトスイッチリガンドの結合割合を制御できる為、定量的な蛋白質濃度制御に繋がる可能性があります。本研究では次の2つの技術を開発する予定です。

1. タグ融合蛋白質の光分解制御技術（図(1)）
開発した蛋白質光ラベル化技術のリガンドと、内在性E3リガーゼのリガンドを併せ持つ二官能性の光分解誘導剤を合成し、この分子存在下で光照射することで蛋白質タグ融合標的蛋白質を任意の場所・タイミングで選択的にポリユビキチン化し、分解を誘導します。

2. 内在性蛋白質の定量的光分解制御技術（図(2)）
光分解誘導剤として、光ラベル化リガンドと標的蛋白質のリガンドを併せ持つ分子を合成します。E3リガーゼに結合するペプチドを融合させたタグ蛋白質を細胞内に発現させ、光分解誘導剤の存在下、光照射による複合体形成を誘導し、内在性の標的蛋白質を光で分解するシステムを開発します。

本研究ではさらに、これらの蛋白質の光分解技術を通して、細胞内シグナル伝達関連蛋白質の細胞内濃度制御に取り組みますが、合わせて共同研究を通して様々な生命現象解明への貢献を目指します。



関連する代表的な論文

1. Mashita, T., Kowada, T., Takahashi, H., Matsui, T., and *Mizukami, S. (2019) Light-wavelength-based Quantitative Control of Dihydrofolate Reductase Activity Using Photochromic Isostere of Inhibitor. ***ChemBioChem*** in press. doi: 10.1002/cbic.201800816
2. Matsui, Y., Funato, Y., Imamura, H., Miki, H., *Mizukami, S., and *Kikuchi, K. (2017) Visualization of Long-term Mg^{2+} Dynamics in Apoptotic Cells with a Novel Targetable Fluorescent Probe. ***Chem. Sci.*** 8, 8255–8264. doi: 10.1039/c7sc03954a
3. Mizukami, S., Hori, Y., and *Kikuchi, K. (2014) Small-Molecule Based Protein-Labeling Technology in Live Cell Studies: Probe-Design Concepts and Applications. ***Acc. Chem. Res.*** 47, 247–256. doi: 10.1021/ar400135f
4. Mizukami, S., Watanabe, S., Akimoto, Y., and *Kikuchi, K. (2012) No-Wash Protein Labeling with Designed Fluorogenic Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis. ***J. Am. Chem. Soc.*** 134, 1623–1629. doi: 10.1021/ja208290f
5. Mizukami, S., Hosoda, M., Satake, T., Okada, S., Hori, Y., Furuta, T., and *Kikuchi, K. (2010) Photocontrolled Compound Release System Using Caged Antimicrobial Peptide. ***J. Am. Chem. Soc.*** 132, 9524–9525. doi: 10.1021/ja102167m

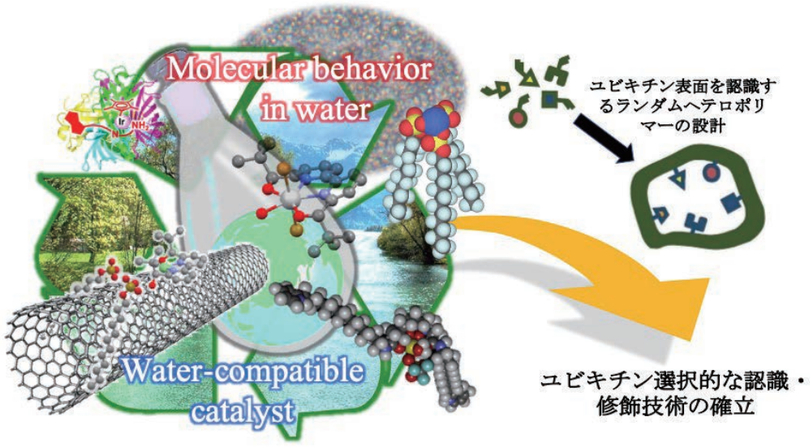
研究代表者 北之園 拓
東京大学理学系研究科化学専攻 有機合成化学研究室 助教
http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/synorg/index.html

高分子を活用するユビキチン選択的認識・標識法の開発

近年、分子認識化学や有機合成技術の高度化を背景に、天然タンパク質の化学修飾による機能化・標識化に向けて世界中で熾烈な技術開発競争が繰り広げられています。殊にタンパク質修飾技術についてはpH、温度、水中での機能性など生体条件適合性を満たすことが求められ、且つ低濃度でも反応が進行し、高い官能基選択性を実現する確実性もまた必須であるという難度の高さから、技術開発の基盤はより制御し易い小分子・均一系条件に限られていました。一方で小分子ではタンパク質のような巨大分子に対する分子認識に限界があるため、高いリガンド認識能と組み合わせることで近傍の化学修飾を狙うリガンド指向戦略が開発されています。

しかしながらユビキチン化タンパク質はプロテアソームによる分解や脱ユビキチン化酵素の影響を受けるため存在量は僅少であり、効率的にユビキチン化タンパク質を検出することは困難とされています。これまでにユビキチン高親和性結合タンパク質を活用するポリユビキチン鎖認識法が開発されていますが、普遍的に設計の柔軟性や効率性を確保することに課題がありました。一方、複数の官能基を導入した高分子は多点認識により広い表面を認識する潜在性を有しており、ユビキチンのように存在量が少なく小さいタンパク質に対しても有効であると考えられます。そこで本研究では、ユビキチンの表面特性を認識できるランダム共重合ポリマーを合成するアプローチを通じ、小分子を基盤とする従来法ではできなかったユビキチン選択的な分子認識、延いてはユビキチン表面選択的な化学修飾技術の確立を目指します。

私たちはこれまでに水中で機能する触媒開発を主テーマとして推進しており、酵素機能が水中でこそ発揮されるように、有機溶媒中では実現できない「水中ならでは」の有機化学を開拓・体系化すべく研究開発に取り組んでいます。タンパク質に関する知見はほぼ皆無ですが、水中での特異的な触媒作用、自己組織化などの分子挙動、分子認識に関する知見を多数有しており、これらの知見を総動員することで革新的なユビキチンケモテクノロジーの創出に貢献したいと考えています。



関連する代表的な論文

1. Kitanosono, T., Xu, P., and *Kobayashi, S (2018) Chiral Lewis acids integrated with single-walled carbon nanotubes for asymmetric catalysis in water. ***Science*** 362, 311-315. doi: 10.1126/science.aap7883.
2. Kitanosono, T., Masuda, K., Xu, P., and *Kobayashi, S. (2018) Catalytic Organic Reactions in Water toward Sustainable Society. ***Chem. Rev.*** 118, 679-746. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00417.
3. Kitanosono, T., Miyo, M., and *Kobayashi, S. (2016) Surfactant-aided chiral palladium(II) catalysis exerted exclusively in water for the C–H functionalization of indoles. ***ACS Sustainable Chem. Eng.*** 4, 6101-6106. doi: 10.1021/acssuschemeng.6b01519.
4. Liu, Z., Lebrun, V., Kitanosono, T., Mallin, H., Köhler, V., Häussinger, D., Hilvert, D. Kobayashi, S., and Ward, T. R. (2016) Upregulation of an Artificial Zymogen by Proteolysis. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 55, 11587-11590. doi: 10.1002/anie.201605010.
5. Kitanosono, T., Zhu, L., Liu, C., Xu, P., and *Kobayashi, S. (2015) An Insoluble Copper(II) Acetylacetonate–Chiral Bipyridine Complex that Catalyzes Asymmetric Silyl Conjugate Addition in Water. ***J. Am. Chem. Soc.*** 137, 15422-15425. doi: 10.1021/jacs.5b11418.

研究代表者 高岡 洋輔
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 講師
http://www.orgchem1.chem.tohoku.ac.jp/orgchem1/Home.html

ユビキチンコード解析のための二次構造に寄らないステープルペプチドの創製

本研究では、ユビキチンリガーゼと相互作用する基質タンパク質の三次元構造を、生体直交性有機反応によって固定化する新たなstaple peptide設計戦略を開発します。またこれを用いて、これまでほとんど未開の領域であった植物ホルモンを介したユビキチンバイオロジーを分子レベルで解析する手法へと展開します。

植物ホルモンの多くは、ユビキチンリガーゼ類と転写制御因子（リプレッサーなど）とを糊付けするmolecular glueとして機能します。通常リプレッサーは、転写因子と相互作用して転写を抑制していますが、植物ホルモン存在下ではユビキチンリガーゼと三者複合体を形成し、ユビキチン化および分解を受け、様々な応答を引き起こすとされています。ただし、この詳細な機構を調べた例は非常に限られており、不明な点が多く残されていました。

本研究で対象とするジャスモン酸（JA-Ile）の共受容体：ユビキチンリガーゼF-boxタンパク質COI1と転写リプレッサー JAZの組み合わせでは、JAZは通常状態で転写因子（MYC）と複合体を組んでおり、JA-Ileが産生されるとCOI1との三者複合体を形成し、分解されて転写が活性化されます。これら2状態の結晶構造解析の結果、JAZはdegronと呼ばれる不安定なドメインで、COI1/MYCそれぞれの相互作用相手によって大きく構造を変化させます（helixが一部ほどける：Fig. 1a）。さらに複雑なことに、JAZには13種類のサブタイプが存在しており、それぞれの遺伝的重複も高いことが解析を困難にしています。我々は世界に先駆けて、13種類のサブタイプのうち特定のサブタイプとCOI1との複合体形成のみを選択的に誘導する、サブタイプ選択的小分子リガンドの開発に成功してきました。また、私自身はこれまでに有機化学を基礎としてタンパク質やペプチドに対する化学修飾法の開発を手がけてきましたので、これらのノウハウと材料を生かし、本研究では、COI1とJAZとの結晶構造をもとに、COI1に選択的に結合するJAZペプチド型リガンドとして、ランダムループ構造を生体直交性反応によって固定化するLoop-staple peptide (LSP)を開発します（Fig. 1b）。また、これを基に全長タンパク質を半合成することで、in vitroにおける植物ホルモン受容体のユビキチンコード解析につなげます。

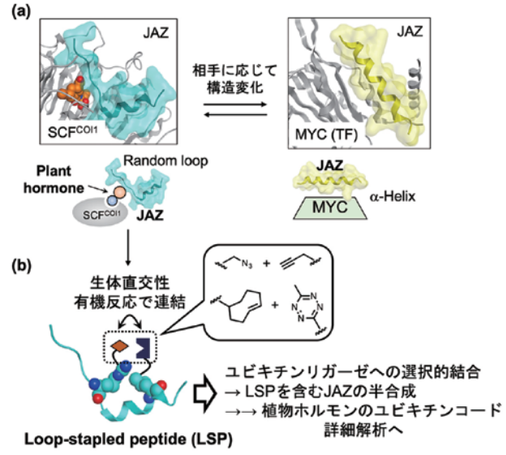


図1．(a) JAZの相互作用相手に応じた構造変化．(b) COI1特異的Loop-stapled peptide (LSP)の設計戦略．

関連する代表的な論文

1. Takaoka, Y., Iwahashi, M., Chini, A., Saito, H., Ishimaru, Y., Egoshi, S., Kato, N., Tanaka, M., Bashir, K., Seki, M., Solano, R., and *Ueda, M. (2018) A rationally designed JAZ subtype-selective agonist of jasmonate perception. ***Nat. Commun.*** 9, 3654.
2. *Takaoka, Y., Nagumo, K., Azizah, I. N., Oura, S., Iwahashi, M., Kato, N., and *Ueda, M. (2019) 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.
3. Takaoka, Y., Uchinomiya, S., Kobayashi, D., Endo, M., Hayashi, T., Fukuyama, Y., Hayasaka, H., Miyasaka, M., Ueda, T., Shimada, I., and *Hamachi, I. (2018) Endogenous Membrane Receptor Labeling by Reactive Cytokines and Growth Factors to Chase Their Dynamics in Live Cells. ***Chem***, 4, 1451-1464.
4. Yoshii, T., Mizusawa, K., *Takaoka, Y., and *Hamachi, I. (2014) Intracellular Protein-responsive Supramolecules; Protein Sensing and In-cell Construction of Inhibitor Assay System. ***J. Am. Chem. Soc.*** 136, 16635-16642.
5. Takaoka, Y., Ojida, A. and *Hamachi, I. (2013) Protein Organic Chemistry and Application for Labeling and Engineering in Live-Cell Systems. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 52, 4088-4106.

研究代表者 高橋 宏隆
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 講師
http://www.pros.ehime-u.ac.jp/cell-free/

USP ファミリーの脱ユビキチン化酵素を特異的に阻害する低分子化合物の開発

脱ユビキチン化酵素（DUB）は、ユビキチン化されたタンパク質からユビキチンを除去したり、ポリユビキチン鎖を切断するプロテアーゼです。DUBは標的タンパク質のプロテアソーム分解からの保護や、ユビキチン化修飾によるシグナル伝達の抑制などを介して、様々な細胞応答を制御する重要な因子です。近年、細胞内においてDUBが高発現することで、本来分解されるべきタンパク質の異常蓄積などを引き起こし、これが様々な疾患の原因となることが報告されており、DUBは創薬の新たなターゲットとして注目されています。

本研究では、愛媛大学プロテオサイエンスセンターが独自に開発したコムギ無細胞タンパク質合成系を駆使し、ハイスループットなDUBの阻害剤探索系と、40種類以上のDUB組換えタンパク質を用いたDUB阻害剤特異性の評価系の構築を行ってきました（図1）。これまでに我々はUSPファミリーのDUB（以下、USP）に高度に保存された酵素活性部位に結合し、USPのみを阻害するユニークな低分子化合物Subquinocinを見出しています。USPファミリーは約100種類と言われるDUBの半数以上を占めており、生理学的に重要なDUBが多く含まれております。

本研究ではこのSubquinocinをベース化合物として、*in silico*解析手法を基盤に、特定のUSPのみを特異的に阻害する誘導体化合物の取得を目指します。特に本研究では、タンパク質分解や炎症・免疫応答シグナルに重要な役割を担うUSP14, USP15, CYLDの3種のUSPに着目し、これらの特異的阻害剤の開発を目標とします（図2）。得られたUSP特異的阻害剤は、細胞内におけるUSPの機能や役割の解明において非常に有用なケミカルプローブとなるだけでなく、USPが関与する疾患への創薬のシーズとしても期待されます。また本研究を通じて、DUB特異的阻害剤を創出できるプラットフォームを構築し、国内外のDUB阻害剤開発への貢献を目指します。

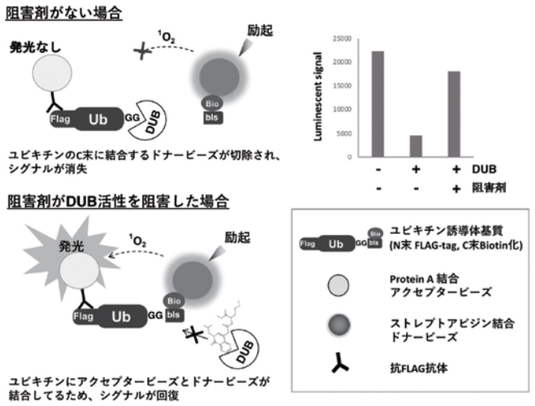


図1．AlphaScreen法を用いたDUB阻害剤評価系

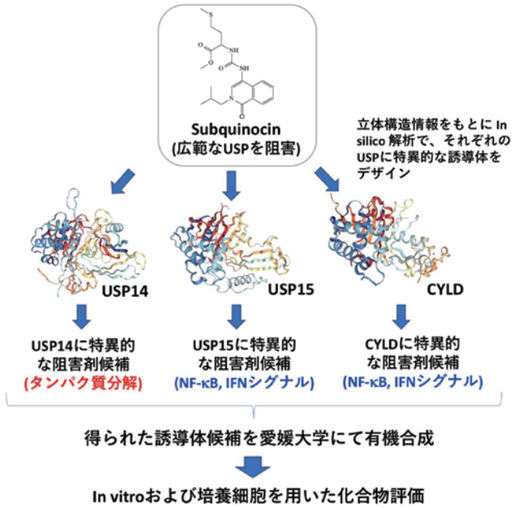


図2．本研究の概要

関連する代表的な論文

1. Takahashi, H., Uematsu, A., Yamanaka, S., Imamura, M., Nakajima, T., Doi, K., Yasuoka, S., Takahashi, C., Takeda, H., and *Sawasaki, T. (2016) Establishment of a Wheat Cell-Free Synthesized Protein Array Containing 250 Human and Mouse E3 Ubiquitin Ligases to Identify Novel Interaction between E3 Ligases and Substrate Proteins. ***PLoS ONE*** 11, e0156718. doi:10.1371/journal.pone.0156718
2. Takahashi, H., Nemoto K, Ramadan A, and *Sawasaki T. (2015) Technology of wheat cell-free based protein array for biochemical analyses of protein kinases and ubiquitin E3 ligases. In: Inoue J, Takekawa M (eds) ***Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling.*** Springer Japan, 43-60.
3. Takahashi, H., Takahashi, C., Moreland, N.J., Chang, Y.-T., Sawasaki, T., Ryo, A., Vasudevan, S.G., *Suzuki, Y., and *Yamamoto, N. (2012) Establishment of a robust dengue virus NS3-NS5 binding assay for identification of protein-protein interaction inhibitors. ***Antiviral Res.*** 96, 305-314. doi:10.1016/j.antiviral.2012.09.023
4. Takahashi, H., Ozawa, A., Nemoto, K., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Takeda, H., Endo, Y., and *Sawasaki, T. (2012) Genome-wide biochemical analysis of Arabidopsis protein phosphatase using a wheat cell-free system. ***FEBS Lett.*** 586, 3134-3141. doi:10.1016/j.febslet.2012.08.014
5. Takahashi, H., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Endo, Y., and *Sawasaki, T. (2009) A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. ***BMC Plant Biol.*** 9, 39. doi:10.1186/1471-2229-9-39

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・生体分子先端研究分野 室長）

研究分担者
内藤 幹彦（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部 部長）
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（東京大学・定量生命科学研究所 准教授）

研究協力者
吉田 稔（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）
石川 稔（東北大学・大学院生命科学研究科 教授）
二木 史朗（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・生体分子先端研究分野 主席研究員）

総括班評価者
田中 啓二（東京都医学総合研究所 理事長）
永田 和宏（京都産業大学・タンパク質動態研究所 所長）
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 副センター長）
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・生体分子先端研究分野 室長）
分担 大竹 史明（東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野 主席研究員）

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・生体分子先端研究分野 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（東京大学・定量生命科学研究所 准教授）

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
代表 内藤 幹彦（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部 部長）
分担 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）
伊藤 拓水（東京医科大学 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
代表 吉田 稔（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）
分担 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（理化学研究所・開拓研究本部 基礎科学特別研究員）

ユビキチンコードのケミカル合成
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

UBL3ケモテクノロジーによる、エクソソーム輸送に対するユビキチン関連分子の解析
代表 上田 洋司（藤田医科大学・総合医学研究所 助教）

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）

ケモテクノロジーを活用した脱ユビキチン化酵素USP8の作用機構の解明
代表 福嶋 俊明（東京工業大学・科学技術創成研究院 助教）

RFFL による形質膜タンパク質品質管理作動機構の解明と CF 創薬への応用
代表 沖米田 司（関西学院大学・理工学部 教授）

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プレエンプティヴ経路特異的Ubデコーダーの作動機構解明
代表 川原 裕之（首都大学東京・理学部生命科学科 教授）

直鎖状ユビキチン鎖を標的としたケモテクノロジーによる病態解析
代表 及川 大輔（大阪市立大学・大学院医学研究科 講師）

特異的ユビキチン鎖を標的としたRQC制御の分子基盤の解明
代表 稲田 利文（東北大学・大学院薬学研究科 教授）

UHRF1によるマルチモノユビキチン化反応の構造基盤
代表 有田 恭平（横浜市立大学大学院・生命医科学研究科 准教授）

非典型的ユビキチン化の機能と破綻、その人工的制御
代表 森戸 大介（昭和大学・医学部 講師）

A02 革新的ユビキチンケモテクノロジーの創出

ユビキチン鎖の空間配向制御を指向した非水解性アルケン型ユビキチン結合等価体の創出
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）

ポリユビキチン鎖およびユビキチン化タンパク質の高効率化学合成
代表 林 剛介（名古屋大学大学院・工学研究科 准教授）

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）

ユビキチン鎖種特異的な高感度アプタマーアレイの開発
代表 岡田 麻衣子（東京工科大学・応用生物学部 助教）

ユビキチンテクノロジーの創出によるウイルス出芽の解剖
代表 有井 潤（東京大学・医科学研究所 助教）

ユビキチン化タンパク質ならびにその連結様式を解析するためのケミカルプローブ創製
代表 伊藤 幸裕（京都府立医大学・大学院医学研究科 准教授）

光可逆的蛋白質ラベル化技術に基づく蛋白質分解の時空間制御
代表 水上 進（東北大学・多元物質科学研究所 教授）

高分子を活用するユビキチン選択的認識・標識法の開発
代表 北之園 拓（東京大学・理学系研究科化学専攻 助教）

ユビキチンコード解析のための二次構造に寄らないステープルペプチドの創製
代表 高岡 洋輔（東北大学・大学院理学研究科化学専攻 講師）

USPファミリーの脱ユビキチン化酵素を特異的に阻害する低分子化合物の開発
代表 高橋 宏隆（愛媛大学・プロテオサイエンスセンター 講師）

ケモユビキチン・キックオフシンポジウム

濱崎 純（東京大学大学院 薬学系研究科 蛋白質代謝学教室）

2018年9月18日、東京大学（本郷）内の伊藤謝恩ホールにて「ケモユビキチン」領域キックオフミーティングが行われた。今や一般的に知られるようになったユビキチンを介したタンパク質の機能制御機構を考える上で、シグナル分子として働くユビキチンそのものがタンパク質であることから、タンパク質間相互作用、立体構造をあらゆる場面で念頭に置く必要性である。また、細胞内でのユビキチン修飾は酵素学的な連続反応および可逆反応のバランスにより巧妙に調節されているものの、従来の生物系の研究で可能な介入実験は限定的であった。そこで本領域の売りであるステープルペプチドのようなケモテクノロジーを用いた次世代型の遺伝学・生化学解析によって、ユビキチンシグナルのより動的・生理的理解が可能になると期待されている。本レポートでは、本領域における生物と化学の邂逅が必然的かつ現実的なものであることを実感したミーティング当日の雰囲気だけでも紹介したい。

まず始めに、領域代表の佐伯先生（都医学研）は多様なユビキチン鎖が異なる細胞内シグナルとして働くことが明らかになりつつある現状を踏まえ、ユビキチン鎖の多様性とその受容体（デコーダー）を最新鋭MSにより網羅的・定量的に理解するための戦略を紹介した。既知のデコーダーの高精度評価、新規デコーダーの探索が期待されるが、本領域ではさらにそこから一歩踏み込んでステープルペプチドの利用によりユビキチンを介した細胞内シグナルへの介入実験および人為制御を目指すという展望であった。従来の阻害剤や遺伝学的な変異体などではタイムリーに標的シグナルのみに介入することは困難であったことから、この挑戦は領域の発展に寄与するだけでなく、より一般的な生物学的解析手法として広範な研究領域への展開が期待できる可能性を秘めていると感じた。大竹先生（都医学研）は分岐ユビキチン鎖の同定・定量からそのデコーダー同定までの一連の研究について最新のデータを交えて報告し、分岐鎖を代表とする生化学的な再構成が難しい複雑なユビキチン鎖における化学合成の必要性・有用性について言及した。岩井先生（京大）はLUBAC発動メカニズムについて詳細な最新データをもとに報告し、ステープルペプチドによるHOIL-1LとSHARPINの会合阻害について紹介した。本研究領域の先駆的成功例として非常に参考になるとともに、多くの参加者にとって各々の研究に導入するための具体的なイメージが明確になったのではないかと思う。二木先生（京大）はステープルペプチドの取り込み機構の検証について報告し、人工ペプチドを用いた細胞内への物質取り込み機構について、抗体も導入できるほど強力であることを紹介した。村田先生（東大）はプロテアソーム構造や会合因子に異常が生じるために実験的に介入することが長年困難であったプロテアソームにおける複数のデコーダーを介したユビキチン認識機構について、より選択的な阻害方法としてのステープルペプチドの可能性について展望を紹介した。また、そもそもユビキチン鎖はプロテアソームへの配送タグとして機能することから、化合物などのリガンドにより標的タンパク質を直接プロテアソームに認識させることで、任意のタンパク質をより直接的に分解誘導させる野心的な計画も紹介した。山野先生（都医学研）は近年一般的になりつつある選択的オートファジーについてもレセプター多様性の理解が必要であること、そのための戦略の一つとして定量的なマイトファジーモニター系を紹介された。深井先生（東大）はK63ユビキチンダイマー構造について詳細な構造解析を報告し、それぞれ特異性を持つE2, E3, 脱ユビキチン化酵素の組み合わせでin vitroにおけるK27以外のユビキチン鎖が自在に合成可能となったことを紹介した。内藤先生（国立衛研）は標的タンパク質をリガンド依存的にユビキチン化することで任意に分解を誘導できる注目の技術であるSNIPER, PROTACの総論をパイオニアの視点から紹介し、具体的なデータを示しながら領域全体の基幹技術とすべく技術的ネックや特性についてもわかりやすく解説した。吉田先生（理研）はこれまで取り組んでこられた様々なスクリーニング手法について紹介し、ルシフェラーゼアッセイの改変技術, 超ハイスループットなケミカルスクリーニングなどについて具体的な実施例を挙げつつ、本領域で実施予定の解析について今後の展望を報告した。岡本先生（東大）はユビキチン鎖化学合成の進捗についてOne pot法による収量改善の取り組みなど報告するとともに、現在熾烈な競争となってきている海外勢と国内の研究状況の比較を紹介し、すでに海外勢にかなり先行されていることから独自性と実用性を伴ったアプローチが重要であると述べた。本領域は生物と化学の融合を目指すものであることから、生物系のニーズを化学系がしっかり捉えて、合成された標品を生物系がしっかり実験的に評価するというサイクルをいかに効率よくスピーディーに回転させるかが重要であるか実感を持って伝わった。

このように、生物系の先生方も、本領域での「ケモ」の導入により各自が対象としている生物学的現象について新たな方法論で切り込む熱意が感じられた。化学系の先生方は、それぞれが得意とする実験系の紹介を行い、生物系の先生方が現実感を持ってそれらを取り入れることができるような発表であった。生物系、化学系どちらの研究者もそれぞれ突出した武器を持っていることと、それらを持ち寄って高いレベルでの融合を目指していることが伝わり、その意味では新学術領域研究における本領域が生物系ではなく複合領域での立ち上げというのは実にリーズナブルかつ領域の進むべき方向を如実に体現していると感じた。フロアの参加者には公募申請を検討されている先生方もいたようで、本領域の目的や性格について推し量るべく注意深く発表を聞いている印象を受けた。また、質疑応答は大変盛況であり、化学系の発表について生物系の研究者からも活発に質問が出ていた。なお、当日は天候がぐずつき、交流会の最中の豪雨により帰るに帰れなくなる先生もいたようであるが、「濃い」メンツが揃っていたことから大変盛況であったことは言うまでもない。

分子生物学会「ユビキチン研究の新潮流：ユビキチンコードを識る・操る」に参加して

大竹 史明（東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野）

2018年11月28～ 30日、横浜にて第41回日本分子生物学会が開催され、第3日目、**岩井一宏先生**（京都大学）、**佐伯泰先生**（都医学研）のオーガナイズによりワークショップ「ユビキチン研究の新潮流：ユビキチンコードを識る・操る」が開催されました。

今回のワークショップは、ケモテクノロジーとの融合によってユビキチン研究の新展開を図ることをテーマに、8名の演者が発表しました（写真）。ユビキチンコードの形成と解読機構に関する2演題、ユビキチンコードによる細胞応答機構（プロテアソーム分解およびNF-kBシグナル）に関する2演題、そして化合物によるユビキチンコードやタンパク質分解の制御（ステープルペプチド、SNIPER、セレブロンモジュレーターなど）に関する４演題が発表されました。ワークショップの冒頭に佐伯先生、また最後に岩井先生から総括があり、本ワークショップの意図や今後目指すべきユビキチン研究の方向についてお話がありました。佐伯先生はユビキチンコードの多様性について話された後、低分子化合物などを用いたケモテクノロジーによる次世代型ユビキチン研究の重要性について説明をされました。

最初の演題は**深井先生**（東大）の発表で、DNA修復に関与するユビキチンリガーゼRNF168によるK63連結型ポリユビキチン鎖の認識機構についての発表でした。RNF168はUDM1、UDM2という２つのK63鎖認識モジュールを有しており、今回それぞれのK63連結ジユビキチンとの共結晶構造を決定し、認識機構を詳細に解明しました。さらに点変異体を用い、RNF168によるK63鎖認識がDNA修復応答に重要であることを示されました。次に発表されたのは**村田先生**（東大）で、ユビキチン化基質が核外に排出される分子機構に関する発表でした。プロテアソーム機能阻害時にユビキチン化タンパク質が細胞質に蓄積することは古くより知られていましたが、そのメカニズムや意義についてはよくわかっていませんでした。今回村田先生は核内タンパク質の核外排出に関わるユビキチンアダプター分子を同定し、細胞レベルのスクリーニングからマウス遺伝学を用いての解析までクリアなデータを示されました。新規分子の同定の重要性を再認識させられる発表でした。次に**大竹**（都医学研）は、分岐型ユビキチン鎖がプロテアソーム依存性分解を制御すること、そして分岐鎖を形成する酵素としてITCHとUBR5という2種のリガーゼが協調的に働くことを報告しました。つづいての発表は**池田先生**（オーストリア、IMBA）で、直鎖ユビキチン形成酵素（LUBAC）の活性サブユニットであるHOIPのユビキチン化とその意義についての発表でした。最近OTULINによるHOIPの脱ユビキチン化がNatureに報告されるなど、ホットな研究分野です。今回池田先生はHOIPのユビキチン化サイトを同定し、さらにユビキチン化サイトに変異を導入したノックインマウスの解析によりその重要性を示されていました。

ここからは化合物を用いたユビキチンシグナルの解明や創薬を見据えての研究が4演題発表されました。まず**徳永先生**（京大）は、LUBACの構成分子であるHOIP、HOIL-1L、SHARPINの三者複合体の形成機構を発表されました。構造解析の結果、HOIL-1LとSHARPINの相互作用モチーフを発見し、このモチーフを標的としたステープルペプチドを設計することにより血球癌細胞の細胞死を誘導できることを示していました。次に**沖米田先生**（関西学院大学）は、嚢胞性線維症の原因タンパク質であるCFTR変異体の細胞膜からの分解機構について発表されました。変異型CFTRに対するユビキチンリガーゼとしてRFFLを同定し、両者の相互作用を阻害する化合物をスクリーニングによって同定しました。このような化合物はCFTRを安定化し、治療薬につながる可能性があるとのことで、ユビキチン創薬の可能性を感じる発表でした。**伊藤先生**（東京医科大学）は、低分子リガンド依存的なユビキチンリガーゼであるセレブロン（CRBN）について発表されました。Cullin型ユビキチンリガーゼCRL4の基質認識サブユニットであるCRBNはサリドマイドの標的分子であり、この分野は現在、サリドマイド誘導体が血球癌の治療薬になることから、ユビキチン創薬の一大トピックとなっています。今回の発表では、新規セレブロンモジュレーター CC-885の機能や、CRBNの新規基質の発見についてなど、膨大なデータを発表していました。そしてワークショップ最後の演題は、**内藤先生**（国衛研）によるSNIPER化合物についての発表でした。内藤先生はキメラ化合物（SNIPERあるいはPROTAC）によって任意の標的タンパク質をユビキチン化する技術にいち早く取り組み、現在この分野は創薬分野で脚光を浴びています。今回の発表ではSNIPERの開発から癌細胞の増殖抑制などの効果、さらにSNIPERがプロテアソーム依存性分解のみならず膜受容体の分解にも有効であることなど、SNIPER研究の全貌と今後の展開についてわかりやすく発表されていました。

このように、発表は基礎研究から疾患の機構、創薬まで多岐にわたるもので、この分野の幅広さや奥深さを実感できるものでした。会場は立ち見も出るほどの盛況であり、ユビキチン研究やケモテクノロジーへの関心の高まりが感じられました。

新学術「ケモユビキチン」第1回班会議・第2回ユビキチン研究会合同会議に参加して

尾勝 圭（東京大学）

2019年1月14日から16日まで、東京大学(浅野地区) 武田ホールで開催された新学術領域研究 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 (ケモユビキチン) 第1回班会議及び第2回ユビキチン研究会合同会議に参加しました。ユビキチンの研究はタンパク質分解に関する役割だけでなく、さまざまな生命現象への関与へと研究内容の幅が広がっています。今回の会議では、国内の多くのユビキチン研究者が集まり、ユビキチン研究の流れを一気に掴むことのできる内容の濃い会合であったと感じています。

1日目は、計画研究のメンバーによる発表が行われました。第１回の班会議であり、最先端の研究状況に加えて、少しずつ開始されている内容やこれからの研究に関するお話もあり、今後の研究展開が楽しみになるような発表ばかりでした。2日目は、ユビキチン研究会の発表とポスターセッションが行われました。ユビキチン研究会では、国内の著名な先生方による発表が行われ、初日に引き続き活発な議論が行われ、大変勉強になりました。ポスターは34演題の発表があり、軽食をいただきながら、終始和やかな雰囲気の中でのディスカッ

ションとなりました。私もこのポスターセッションで発表しました。もともとは培養細胞を使った実験をしてきましたが、今回は、最近行ったX線結晶構造解析や物理化学的手法による解析の結果などを中心に発表しました。領域内での構造解析の発表はあまり多くないですが、少しでも興味を持ってもらえたり、研究を進める足掛かりになれば良いかと思います。3日目は、若手の会が行われました。15演題の発表があり、どの発表もデータの量が多く、質も高く、聴き応えのある内容になっていました。また、構造解析から、細胞、個体レベルの解析まで幅広い発表があり、若手研究者中心の発表でもいろいろな解析に触れられる良い機会になりました。

今回の新学術領域研究では、ユビキチン関連の研究者にとってケモテクノロジーを専門とする先生方と一緒に研究を進めることで、解析ツールの開発や新たな生命現象の解明に挑める状況にあります。今回の会議のようにさまざまなアイディアに触れることは新しい発想と方向性を見出すきっかけになるように思えます。実際に私どもも共同研究をさせていただいており、この流れを一つのチャンスとして、これまで難しいと考えてなかなか実行に移せていなかった研究内容や新しい展開を模索することで、有意義な研究成果に繋げられるようにしていきたいと考えています。次回以降も多くの発表を見聞きできるのが楽しみでもあり、自分も他の方々に楽しんでもらえるような研究を行えるようにと、新たなモチベーションになったように思います。

日本薬学会「選択的タンパク質分解医薬品開発の最前線」に参加して

柴田 識人（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部）

2019年3月21~23日、幕張にて日本薬学会第139年会が開催され、第３日目、**大和隆志先生**（エーザイ）と**内藤幹彦先生**（国立衛研）のオーガナイザーによりシンポジウム「選択的タンパク質分解医薬品開発の最前線」が開催された。

まず内藤先生より、従来の創薬手法ではundruggableな標的タンパク質をdruggableにする手法として、選択的タンパク質分解医薬品の持つ重要性についてご説明があり、引き続いてE3 ligase モジュレーターに関して２題、ハイブリッド化合物タイプの分解誘導薬SNIPERに関して2題の発表が行われた。**半田宏先生**（東京医大）は、thalidomideの結合タンパク質としてE3 ligase CRBNを発見された経緯、thalidomide誘導体がCRBNモジュレーターとして働いて抗がん作用を発揮すること、さらにはthalidomide誘導体を利用した転写制御因子の選択的分解医薬品の持つ将来性を論じ、最後にthalidomideによる催奇形性の原因となるCRBN基質の同定についてご講演された。各々の成果がエポックメーキングと言えるほどのものばかりで、ただただ圧倒されると同時に、半田先生の科学者としての「静かなる情熱」を感じさせるご発表であった。大和先生は、まず抗がん剤として開発されたindisulamがE3 ligase複合体の基質認識タンパク質であるDCAF15と結合し、splicing factorの一つであるCAPERαを選択的に分解することをご発表された。次に他のsplicing factorに変異を持つ骨髄性白血病細胞ではCAPERα欠損で致死となることを見出し、indisulamがこうした白血病の治療に有効である可能性をご講演された。Indisulamはthalidomideと同様にE3 ligase モジュレーターとなるわけだが、これは「第３のE3 ligase モジュレーター」の存在を期待させる発見である。またindisulamが有望な白血病治療薬である点についても、今後の展開が期待される。内藤先生は、ハイブリッド化合物タイプの分解誘導薬SNIPERについてご講演された。SNIPERは、分解したい標的タンパク質のリガンドとE3 ligase IAPのリガンドのハイブリッド化合物である。内藤先生はIAP結合化合物メチルベスタチンを発見したことを契機に上述したハイブリッド化合物タイプの分解誘導薬を着想され、これまでに開発されてきたエストロゲン受容体やBCR-ABLなど様々な標的タンパク質に対するSNIPER化合物についてご発表された。さらにSNIPER化合物の持つ特徴、低分子阻害剤との比較や今後の展望についてもご講演された。**石川稔先生**（東大定量研）は「有機化学を基盤としたdruggable targetの拡大」をコンセプトにこれまでに開発されてきたSNIPER化合物のご発表をされた。RAR, CRABP-I, CRABP-IIのリガンドであるall trans retinoic acidを組み込んだSNIPERでは、リガンドの向きやリンカー長を変えることで、標的タンパク質の選択的な分解を可能にするなど、有機化学者ならではの発想と感じた。また従来の創薬技術ではundruggableな標的であった凝集タンパク質を分解するSNIPERの開発に成功するなど、まさにdruggable targetを拡大する大変興味深いご講演であった。

最後に総括として大和先生がご登壇され、選択的タンパク質分解医薬品の将来性についてご解説された上で、生物学と化学のコラボレーションが今後ますます必要になること、さらに本課題において薬学研究者が果たすべき役割の重要性を述べられて、このシンポジウムを締めくくられた。最近米国のArvinas社が開発中のアンドロゲン受容体に対するタンパク質分解薬が臨床試験に入ったことが報告されたが、2019年は選択的タンパク質分解医薬品開発のマイルストーンとなる可能性が高く、この分野で日本を代表する４人の先生（写真）のシンポジウムがこの時期に開催されたことは非常にタイムリーであった。

2018年度持田記念学術賞を受賞

村田 茂穂（東京大学大学院 薬学系研究科 教授）

このたび2018年度持田記念学術賞を賜りましたこと、身に余る光栄です。今回受賞対象となった研究は、諸先生、研究室のスタッフや学生、家族の多大なるご支援があってはじめてなしえたものであり、厚くお礼を申し上げます。

受賞研究テーマは「プロテアソームの分子多様性と生理機能の解明」です。細胞内で生じるタンパク質分解は、多様な生体反応を迅速に一方向に決定する手段として生命科学の様々な領域で中心的な役割を果たしています。ユビキチンを分解シグナルとして利用する分子量2.5MDaの巨大で複雑なタンパク質分解装置プロテアソームの重要性は広く知られていますが、その詳細な作動機構や制御機構、疾病との関連など、依然として多くの謎に包まれています。私は一貫して哺乳類におけるプロテアソームの動態や病態生理学的意義の解明について多面的な研究を行ってきました。私とプロテアソームとの出会いは、免疫性疾患を専門とする大学院生時代に東京都臨床研（現医学研）の田中啓二博士の講演を拝聴したときに遡ります。ウイルス感染に際して産生されるIFNγに応答して、触媒サブユニットを入れ替えた“免疫プロテアソーム”が形成され、キラー T細胞による異物排除のための目印となるMHC（主要組織適合抗原複合体）クラスI結合ペプチドを効率的に切り出すという仕組みに感銘し、田中先生に頼み込んで研究室に参加させてもらったのが始まりです。

その後、基礎研究の面白さにのめり込む一方、当初の目的であった免疫研究から遠ざかっていましたが、思いがけず再び免疫の根幹に関わる仕組みに遭遇することとなりました。それが、胸腺特異的に発現する新規なプロテアソームの触媒サブユニット（β5tと命名）を組み込んだ“胸腺プロテアソーム”の発見です。T細胞の膨大なレパトア形成は免疫系による自己と非自己の識別機構の核心です。胸腺では未熟なT細胞が「正の選択」と呼ばれる将来有益なT細胞を生存・増殖させる過程と、「負の選択」と呼ばれる自己反応性のT細胞を消去する過程が行われますが、胸腺プロテアソームは「正の選択」を実行する胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現し、特殊なペプチドを産生・提示させることにより、キラー T細胞の正の選択に必須の役割を果たすことを明らかにしました。この発見は、従来全く不明であった“正の選択”によるレパトア形成（自己と非自己の識別）の分子実体を世界で初めて示したものといえます。

プロテアソーム活性の制御機構の解明も重要な課題です。がん細胞は高いプロテアソーム活性を持つ（故にプロテアソーム阻害剤が血液系腫瘍に用いられています）一方、プロテアソーム活性の低下は神経変性、老化を惹起します。しかし、どのような仕組みで複雑なプロテアソームが形成されるのか大きな謎でした。私は、PAC1–4、p28, p27, S5b, Rpn14などの“プロテアソーム分子集合シャペロン”や、プロテアソーム転写因子Nrf1の活性化に必須なプロテアーゼDDI2、新しいユビキチン鎖受容体サブユニットRpn13などを相次いで発見し、この超分子複合体の形成機構の全容解明に成功しました。この成果は、最近相次いで発見されている「プロテアソーム形成機構の破綻」によるヒト自己炎症性症候群の発症機構解明に貢献するとともに、「専門シャペロン依存的な超分子複合体形成」という新しい概念を生むことになりました。

現在、加齢とともに低下するプロテアソーム機能を維持することにより健康寿命が延長することが有望視されています。このメカニズムを解明するとともに、プロテアソーム機能維持・亢進を実現する手段を見つけ出し、様々な疾患治療に役立てられるよう研究に邁進したいと考えています。

左から、村田、持田財団理事長、斎藤京大教授（同時受賞者）

2018年度日本生化学会奨励賞を受賞

山野 晃史（東京都医学総合研究所 ユビキチンプロジェクト 主席研究員）

このたび「損傷ミトコンドリア選択的分解の研究」という題名で2018年度日本生化学会奨励賞の栄誉を賜り、平成30年9月24日に国立京都国際会館で開催された第91回大会において受賞講演もさせていただきました。

（公財）東京都医学総合研究所の田中啓二理事長には、本賞申請時の推薦および受賞講演の座長を引き受けていただき、心より感謝申し上げます。また、本奨励賞に関連する研究にご協力いただきました（公財）東京都医学総合研究所ユビキチンプロジェクトの松田憲之リーダーとプロジェクトメンバーの皆様、共同研究をさせていただいた関係の諸先生方に御礼申し上げます。

損傷ミトコンドリアの選択的分解はParkin（E3リガーゼ）とPINK1（損傷ミトコンドリアに局在するキナーゼ）によって駆動されます。ParkinとPINK1は遺伝性潜性パーキンソン病の原因遺伝子として同定されており、損傷ミトコンドリアの適切な分解・排除に支障をきたすと、パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患に繋がるというモデルが提唱されています。したがって、損傷ミトコンドリアの選択的分解の分子機構は、パーキンソン病などの疾患治療を考える上でも重要であると思います。本奨励賞の主軸となった研究、つまり1) PINK1の迅速な分解機構、2) Parkinとリン酸化ユビキチンの結合様式、3) ミトコンドリア分解におけるエンドサイトーシスの関与などは、どれもユビキチンバイオロジーが深く関係しています。これらの研究については、本領域の前身である新学術領域「ユビキチンネオバイオロジー」に参画された多くの先生方からもご指導をいただきました。したがって、この度の受賞は、ユビキチンバイオロジーの先生方のサポート・ご指導の賜物であると考えております。

私が人生で初めて学会と称されるものに参加したのは、2004年横浜で開催された第77回日本生化学会だと記憶しております。それから14年後にその学会の奨励賞をいただけるとは思ってもおりませんでした. ご存知の通り、日本生化学会は歴史も古く、過去に奨励賞を受賞された先生方のお名前を拝見すると、蒼々たる研究者ばかりでただただ恐縮するばかりです。

今回の受賞研究をさらに発展させ、細胞の恒常性維持の本質に迫る研究ができるように努力したいと思います。そして、それがケモユビキチンの領域研究の一助となることを願って、受賞のコメントとさせていただきます。

田中啓二 都医学研理事長（左）と筆者（右）：
第91回日本生化学会大会での受賞式にて

学会活動報告

新学術ケモユビキチンキックオフシンポジウム
日時：2018年9月18日（火）
会場：東京大学 伊藤国際学術センター 伊藤謝恩ホール

第91回日本生化学会大会シンポジウム「ユビキチン様タンパク質修飾系の多様な機能：分解だけじゃない、真核生物だけじゃない」
日時：2018年9月25日（火）
会場：国立京都国際会館
オーガナイザー：水島 昇（東大医）、岩井 一宏（京大医）

第41回日本分子生物学会年会ワークショップ「ユビキチン研究の新潮流：ユビキチンコードを識る・操る」
日時：2018年11月30日（金）
会場：パシフィコ横浜
オーガナイザー：佐伯 泰（都医学研）、岩井一宏（京大医）

新学術ケモユビキチン第１回班会議および第２回ユビキチン研究会合同会議
日時：2019年1月14日（月）～16日（水）
会場：東京大学 武田先端知ビル
世話人：佐伯 泰（都医学研）、村田 茂穂（東大薬）、山野 晃史（都医学研）

HOPE Meeting with Nobel Laureates（日本学術振興会）
日時：2019年3月4日（月）～ 3月8日（金）
会場：沖縄科学技術大学院大学（沖縄県恩納村）
組織委員：吉田 稔（理研・東大）他（組織委員長　梶田 隆章）
招待講演者：アーロン・チカノーバー（2004年ノーベル化学賞）他

第41回日本薬学会第139年会シンポジウム「フォルダマーの魅力～新たな創薬への可能性～」
日時：2019年3月21日（木）
会場：幕張メッセ
オーガナイザー：渡邊 瑞貴（北大薬）、出水 庸介（国立衛研）、大庭 誠（長大医歯薬総合）

第41回日本薬学会第139年会シンポジウム「選択的タンパク質分解医薬品開発の最前線」
日時：2019年3月23日（土）
会場：幕張メッセ
オーガナイザー：大和 隆志（エーザイ）、内藤 幹彦（国立衛研）

10th International Peptide Symposium / 55th Japanese Peptide Symposium
日時：2018年12月3日（月）～7日（金）
会場：ロームシアター京都、京都市勧業館「みやこめっせ」
世話人：二木 史朗（京大化研）、松崎 勝巳（京大院薬）

International Mini-Symposium on Peptide-Membrane Interaction and Intracellular Delivery (The 24th Peptide Forum in Kyoto, 2018)
日時：2018年12月8日（土）
会場：京都大学化学研究所共同実験棟
世話人：二木 史朗（京大化研）、Jaehoon Yu（ソウル国立大）、中瀬 生彦（大阪府大理）

アウトリーチ活動

高校生のための東京大学オープンキャンパス
日時：2018年8月2日（木）～16日（水）
会場：東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室
世話人：村田 茂穂（東大薬）

修道高校東大見学ツアー
日時：2018年8月24日（金）
会場：東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室
世話人：村田 茂穂（東大薬）

今後の関連ミーティング・シンポジウム情報

ケミカルバイオロジー学会　第14回年会ミニシンポジウム「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」
日時：2019年6月11日（火）
会場：ウインクあいち
オーガナイザー：石川 稔（東北大）、佐伯 泰（都医学研）

第19回日本蛋白質科学会・第71回日本細胞生物学会合同年次大会新学術ケモユビキチン共催シンポジウム「ユビキチン研究の新展開ー相分離から分解誘導剤まで」
日時：2019年6月25日（火）
会場：神戸国際会議場
オーガナイザー：佐伯 泰（都医学研）

EMBO Workshop “The ubiquitin system: Biology, mechanisms and roles in disease”
日時：2019年9月13日（金）～17日（火）
会場：Hotel Croatia Cavtat, Cavtat, Croatia

第92回日本生化学会大会シンポジウム「液-液相分離によるタンパク質分解制御」
日時：2019年9月20日（金）
会場：パシフィコ横浜
オーガナイザー：野田 展生（微化研）、佐伯 泰（都医学研）

第78回日本癌学会学術総会シンポジウム新学術ケモユビキチン共催企画「Cancer Chemistry for Drugging Undruggable Targets」
日時：2019年9月26日（木）～28日（土）
会場：国立京都国際会館
オーガナイザー：内藤 幹彦（国立衛研）
外国人ゲスト講演者：Alessio Ciulli（Dundee大学）

2019 Cold Spring Harbor Asia Conference on Chemical Biology and Drug Discovery
日時：2019年10月28日（月）～11月1日（金）
会場：コールドスプリングハーバー アジア蘇州コンファレンスセンター（中国）
組織委員長：吉田 稔（理研・東大）

第14回臨床ストレス応答学会大会新学術ケモユビキチン共催シンポジウム「タンパク質分解とストレス応答」
日時：2019年11月2日（日）
会場：大阪市立大学阿倍野キャンパス
オーガナイザー：佐伯 泰（都医学研）

第42回日本分子生物学会年会ワークショップ新学術ケモユビキチン共催企画「化合物を用いたプロテインノックダウン技術の開発と応用」
日時：2019年12月5日（木）
会場：マリンメッセ福岡
オーガナイザー：内藤 幹彦（国立衛研）、佐伯 泰（都医学研）

Keystone Symposia on Ubiquitin Biology/Targeted Protein Degradation
日時：2020年3月29日（日）～4月1日（水）
会場：The Snowbird Resort in Snowbird, Utah, USA

新学術ケモユビキチン第２回班会議
日時：2019年6月22日（土）
会場：東京大学 情報学環・福武ホール　地下2階 福武ラーニングシアター
世話人：深井 周也（東大）

新学術ケモユビキチン第3回班会議
日時：2019年12月17日（火）～19日（木）
会場：南房総富浦ロイヤルホテル（予定）
世話人：内藤幹彦（国立衛研）

編集後記

「ケモユビキチン」のニュースレター第1号が完成しました。ご協力をいただきました皆様、ありがとうございました。

ケモユビキチンは、ご存知の通り、ユビキチンバイオロジーと有機化学の両分野が参画する複合領域です。そのため、ニュースレターでは両分野のスムーズな融合を促進させる企画を提案したいと思っています。本号では、その出発点として、（公財）東京都医学総合研究所・理事長の田中啓二先生に、ユビキチンとプロテアソームのエッセイを執筆していただきました。ユビキチン研究の推移とプロテアソームの発見を、ご自身の経験に基づいて執筆していただきました。ユビキチンに馴染みの薄い有機化学の先生方にも、ユビキチンシステムについてご理解いただけたことと思います。（若手のユビキチン研究者は、頭に叩き込んでおくべき内容ですね）。

今後もケモユビキチン研究を加速・促進できる企画を提案できればと考えています。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。。。

鳥山明・原作の「ドラゴンボール」は、7つの球を集めるとどんな願いでもかなえられるドラゴンボールを中心に、冒険とバトルが繰り広げられる人気漫画です。少年時代の孫悟空をはじめとする登場人物は修行によって、戦闘能力を高め、自分よりも強い敵に打ち勝ちます。しかし、後半では個の修行だけでは限界が生じ、「融合」、「フュージョン」、「吸収」といった方法で、圧倒的な戦闘力を獲得していきます。ピッコロはナメック星の戦士ネイルと「融合」し、フリーザに挑みます。人造人間セルは17号や18号を「吸収」して完全体となります。魔人ブウとの戦いでは、悟天とトランクスは「フュージョン」により合体戦士・ゴテンクスとなります。どの場合も、個々の鍛錬では成し得なかった能力と強さを「融合」により獲得します。

休日、5歳と8歳の息子と一緒にドラゴンボールを見ながら、ユビキチンバイオロジーと有機化学の「融合」が頭をよぎりました。

（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1号　2019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/