

創薬を指向した多機能ハブタンパク質の構造基盤の解明とその応用

原 幸大

Structural Basis of the Multifunctional Hub Protein and Identification of a Small-molecule Compound for Drug Discovery

Kodai Hara

Department of Physical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka; 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan.

(Received April 4, 2019)

Translesion DNA synthesis (TLS) is an emergency system activated to inhibit cell death caused by DNA damage-induced replication arrest. Thus, TLS enables cancer cells to acquire resistance to alkylate anticancer drugs. REV7 functions as the hub protein that interacts with both the inserter DNA polymerase REV1 and the extender DNA polymerase REV3 in TLS. REV7-mediated protein-protein interactions (PPIs) are essential for the activation of TLS, and are therefore attractive targets for anticancer drug development. To clarify the REV7-REV3 and REV7-REV1 PPIs, we determined the structures of REV7-REV3 and REV7-REV3-REV1 complexes. In the structures of REV7-REV3 and REV7-REV3-REV1 complexes, REV7 wraps around the REV3 fragment, and the REV1-binding interface is distinct from the REV3-binding site of REV7. We also identified a novel REV7 binding protein, transcription factor II-I (TFII-I), which is required for TLS. Of note, TFII-I binds the REV7-REV3-REV1 complex, suggesting that REV7-TFII-I PPIs are independent of other REV7-mediated PPIs. Furthermore, we found a small-molecule compound that inhibits TLS by targeting the REV7-REV3 PPIs. Lastly, we determined the structure of REV7 in complex with chromosome alignment maintaining phosphoprotein (CAMP), a known kinetochore-microtubule attachment protein. The overall structure of the REV7-CAMP complex is similar to that of the REV7-REV3 complex, but the REV7-CAMP PPIs are markedly different from the REV7-REV3 PPIs. These findings improve our understanding of multifunctional hub proteins, and are helpful for designing small-molecule compounds for novel anticancer drug development.

Key words—X-ray crystallography; translesion DNA synthesis; hub protein; protein-protein interaction; anticancer drug resistance

1. はじめに

これまでに様々な作用機序を持つ新薬が開発されてきたが、その多くはタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）やリン酸化酵素（キナーゼ）などの活性部位を有するタンパク質やヒスタミン受容体、セロトニン受容体などの細胞表面にある G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) を標的とした薬である。近年、細胞内の様々なタンパク質を介した情報伝達の異常が疾患の原因となることが明らかとなり、それらのタンパク質間相互作用 (protein-protein interactions; PPIs) を標的とした

創薬が注目されている。筆者は生体内で数多くある PPIs の中でもがん細胞が抗がん剤抵抗性を獲得する上で重要な経路である損傷乗越え DNA 合成 (translesion DNA synthesis; TLS) や染色体分配に関与する REV7 のハブタンパク質としての細胞内機能に着目し、立体構造解析による詳細な PPIs の解明¹⁻⁵⁾と新規 REV7 結合タンパク質の同定、⁶⁾ 抗がん剤開発に向けた REV7 を介した PPIs を標的とする阻害化合物の探索⁷⁾を行ってきた。本総説では、TLS や染色体分配において形成される REV7 をコアとするタンパク質複合体の構造と PPIs、ハイスループットスクリーニング (HTS) により得られた REV7 PPIs を標的とする阻害化合物について紹介する。

2. TLS を担う REV7 の分子メカニズムの解明

私たちの遺伝情報を担うゲノム DNA は、紫外線

静岡県立大学薬学部生命物理化学研究室 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

e-mail: khara@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、平成 30 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

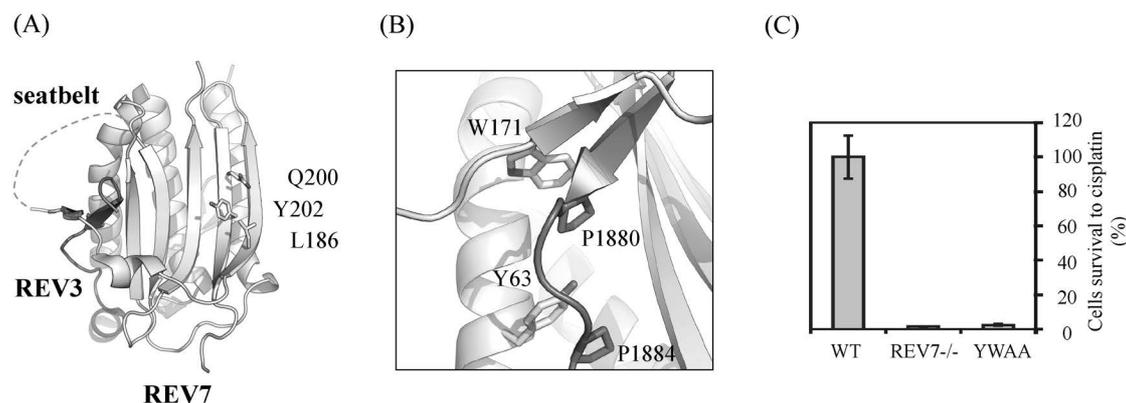


Fig. 1. Crystal Structure of the REV7-REV3 Complex and Sensitivity of REV7 Mutant Cells to an Alkylating Drug Cisplatin (A) Overall structure of the REV7-REV3 complex (PDB ID: 3ABD). (B) Structural details of the interaction between REV7 and REV3. (C) Sensitivity of REV7 mutant cells to cisplatin. The results of survival assays using wildtype (WT), REV7^{-/-}, and Y63A/W171A (YWAA) cells treated with cisplatin are presented.

などの放射線、食品・環境に含まれる化学物質、体内で産生される活性酸素などにより絶えず損傷を受けている。これらのDNA損傷はミスマッチ修復や塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復などの修復機構により元通りに直される。一方で、複製中に生じた損傷を修復せずにDNA合成を行う機構としてTLSがある。⁸⁾ TLSは損傷による複製停止を回避することで、細胞死などの細胞にとって好ましくない状況を防ぐ。TLSでは通常のDNAポリメラーゼ(複製型ポリメラーゼ)に代わり、2種類のTLSポリメラーゼ(インサーターとエクステンダー)が損傷塩基を鋳型としたDNA合成を協力して行うことで損傷による複製停止を回避する。また、TLSはアルキル化剤などのDNA損傷を起こす抗がん剤に対するがん細胞の薬剤抵抗性の原因となることから、TLSポリメラーゼの活性部位の構造基盤は新規の抗がん剤の開発に役立つ。近年の目まぐるしい構造研究の成果により、REV1などに代表されるインサーターが複製型ポリメラーゼよりも空間的に大きな活性部位を持つため、損傷塩基を鋳型とした塩基の挿入反応(インサージョン)を行うことができることが明らかとなった。⁹⁻¹³⁾ 一方で塩基の挿入後、数塩基の伸長反応(エクステンション)を担うエクステンダーの構造基盤は得られておらず、インサーターとエクステンダーがどのように協力してTLSを行うのかは不明であった。そこで筆者はエクステンダーとして働くPol ζ (REV7-REV3複合体)に着目し、その立体構造をX線結晶構造解析により明らかにした。^{1,2)} REV7-REV3複合体は、REV7の

C末端領域がシートベルトのようにREV3を包み込んで結合する特徴的な構造を形成していた[Fig. 1(A)]。PPIsを詳しくみるとREV7の2つの芳香族アミノ酸残基(Y63とW171)がREV3の2つのプロリン(P1884とP1880)とスタッキング相互作用を形成していた[Fig. 1(B)]。またREV7-REV3 PPIsを欠損させた細胞では、REV7ロックアウト細胞同様に、アルキル化抗がん剤シスプラチンによるDNA損傷に対して生存率が低下した[Fig. 1(C)]。REV7はREV3と複合体を形成することでエクステンダーとしての機能を発揮することから、REV7-REV3 PPIsは新規抗がん剤を開発するための魅力的な分子標的となり得ることを示した。さらに筆者はREV7がREV3だけでなく、REV1とも物理的に相互作用し、三者複合体を形成することを示した。REV7の分子表面に露出したアミノ酸残基をアラニンに変えた変異体を網羅的に作製し、REV7のREV1結合部位を調べた。その結果、REV7のL186、Q200、Y202がREV1との相互作用に重要であることを明らかとした[Fig. 1(A)]。これらの知見はのちのREV7-REV3-REV1複合体を構造解析することで証明された[Fig. 2(A)]。^{3,4)}



原 幸大

静岡県立大学薬学部・講師、博士(理学)。2010年横浜市立大学大学院修了。同年米国ミネソタ大学・博士研究員、2011年米国テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター・博士研究員、2014年静岡県立大学薬学部・助教を経て、2018年より現職。2018年日本薬学会東海支部学術奨励賞受賞。

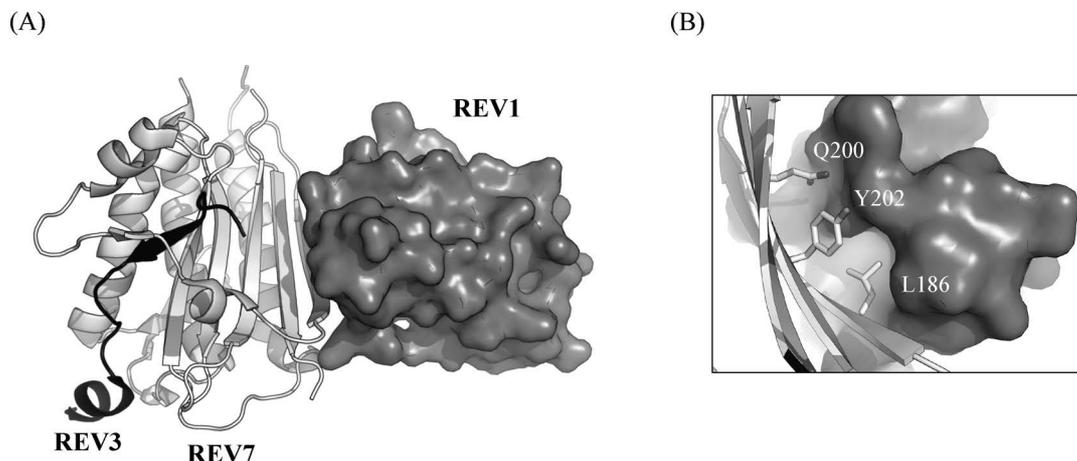


Fig. 2. Crystal Structure of the REV7-REV3-REV1 Ternary Complex

(A) Overall structure of the REV7-REV3-REV1 ternary complex (PDB ID: 3VU7). (B) Structural details of the interaction between REV7 and REV1.

すなわち、REV7のL186はREV1のL1203、Y1244、L1248からなる疎水性ポケットに結合することを明らかとした [Fig. 2(B)]. REV7のY202、Q200もREV1とそれぞれ疎水性相互作用と水素結合を形成していた。以上の結果から、REV7がハブタンパク質としてREV1（インサーター）とREV3（エクステンダー）をつなぎ止めることでTLSを行う分子メカニズムを解明した。

3. TLSを担う新規REV7結合タンパク質の同定

増殖細胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen; PCNA）は複製の際に複製型ポリメラーゼがDNA合成を行うための足場として機能するが、複製中に損傷が生じた際、モノユビキチン化修飾されることで複製からTLSの切り替え作業を行う。筆者はモノユビキチン化PCNAとREV7をつなぎ止めるタンパク質として、transcription factor II-I (TFII-I) をプルダウンアッセイ法と質量分析を組み合わせることで同定した。⁹⁾ TFII-Iは精神遅滞や心臓疾患を特徴とするウィリアムズ症候群に関与するタンパク質として知られる。¹⁴⁾ TFII-IはREV7とREV1、REV3結合部位とは異なる部位で相互作用することから全く新しいREV7のPPIsだが、その構造基盤やウィリアムズ症候群とTLSの関連性に関する知見は得られていない (Fig. 3)。

4. REV7-REV3 PPIsを標的とした新規抗がん剤の開発に向けた阻害化合物の探索

TLSはがん細胞が薬剤抵抗性を獲得する上で重要な経路である。したがって、TLSポリメラーゼ

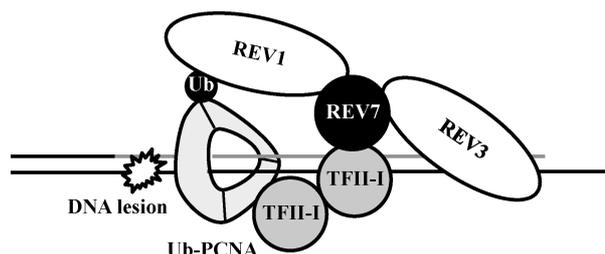


Fig. 3. REV7 Binds REV3, REV1, and TFII-I Simultaneously during TLS

Model for TFII-I-dependent recruitment of the REV7-REV3 complex to monoubiquitinated PCNA at DNA damage sites during TLS.

の活性部位だけでなく、TLSに係わるタンパク質のPPIsは新たな抗がん剤開発のための分子標的となる。8400化合物を用いたHTSにより、REV7-REV3 PPIsを標的とした阻害化合物が得られた [Fig. 4(A)].⁶⁾ さらに最適化を行った阻害化合物は、シスプラチンによるDNA損傷に対して細胞の生存率を低下させた (TLS阻害を引き起こした) [Fig. 4(B)]. 現在、阻害能をさらに強めた化合物の創出を目指している。

5. 染色体分配を担うCAMPとREV7の複合体の構造と相互作用機構の解明

染色体分配を行う際、キネトコアと微小管の適切な結合に必須のタンパク質として chromosome-alignment maintaining phosphoprotein (CAMP) が同定された。¹⁵⁾ またCAMPの結合タンパク質としてREV7が同定されたことから、REV7はTLSだけでなく染色体分配においても重要なタンパク質であることが示唆される。さらに最近、CAMPのナ

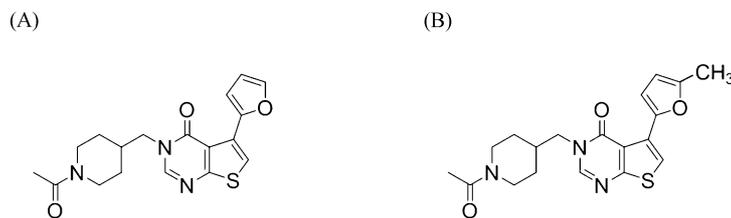


Fig. 4. Identification and Optimization of the REV7 Inhibitor

(A) The structure of the REV7 inhibitor obtained by HTS. (B) The structure of the optimized inhibitor. The IC_{50} of the compound is $78 \mu M$.

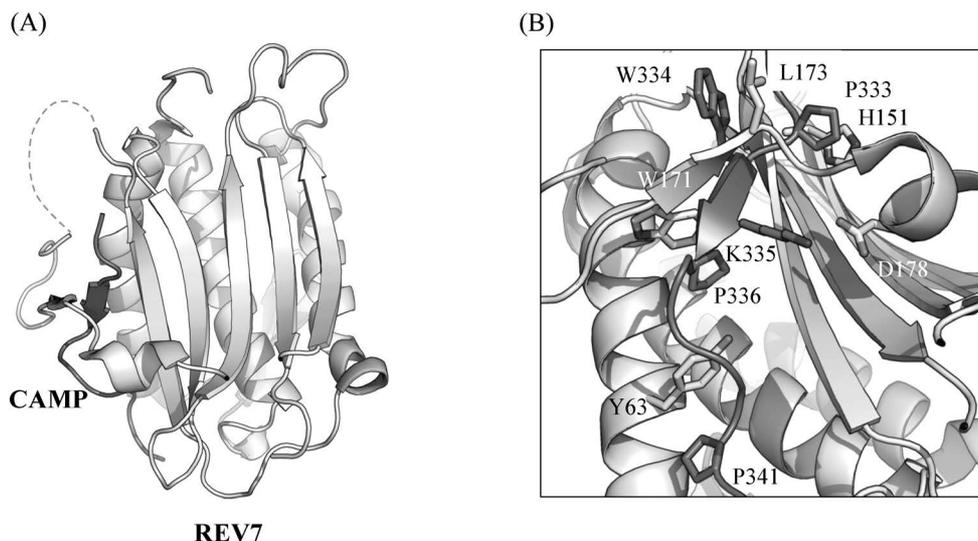


Fig. 5. Crystal Structure of the REV7-CAMP Complex

(A) Overall structure of the REV7-CAMP complex (PDB ID: 5XPT). (B) Structural details of the interaction between REV7 and CAMP.

ンセンス変異が言語障害を特徴とする発達障害を持つ患者の遺伝子から発見された.¹⁶⁾したがって、REV7-CAMP 複合体の立体構造は遺伝病の発症メカニズムの解明に役立つと期待できる。REV7-CAMP 複合体の全体構造は REV7-REV3 複合体とよく似たトポロジーを示していた [Fig. 5(A)].⁷⁾ REV7-CAMP PPIs を詳しくみると CAMP の 2 つのプロリン (P336, P341) が REV7 の 2 つの芳香族アミノ酸残基 (W171, Y63) とそれぞれスタッキング相互作用, T 型スタッキング相互作用を形成していた [Fig. 5(B)]. これらの疎水性相互作用は、REV7-REV3 PPIs でもみられる保存された相互作用である [Fig. 1(B)]. REV7-CAMP 複合体でのみみられる特徴的な PPIs として、CAMP の N 末端側に位置する P333 と REV7 の H151 のスタッキング相互作用, CAMP の W334 と REV7 の L173 のファンデルワールス力, CAMP の K335 と REV7 の D178 のイオン結合が挙げられる [Fig. 5(B)].

REV7-CAMP PPIs でみられたこれらの新たな相互作用は、REV7 を標的とした阻害化合物を設計する上で有用な構造情報となるだろう。

6. おわりに

本総説では、多機能ハブタンパク質 REV7 の構造と REV3, REV1, CAMP との相互作用, TLS における REV7 の分子メカニズムを紹介した。HTS により得られた REV7-REV3 PPIs を標的とした阻害化合物についても紹介した。一方で、新規結合タンパク質として同定した TFII-I と REV7 の複合体の構造や詳細な PPIs に関する知見は得られていない。REV7-TFII-I 複合体や、REV7 をコアとした TLS 超分子複合体の構造基盤を得るために、X 線結晶構造解析と X 線溶液散乱法, クライオ電子顕微鏡を組み合わせたハイブリッド構造解析が必要である。また、REV7-REV1 PPIs や REV7-TFII-I PPIs を標的とした新たな抗がん剤開発に向けた阻害化合物の探索も望まれる。最後に、染色体分配な

どに代表される REV7 の新たな細胞内機能を明らかにするために、構造細胞相関研究の更なる発展を期待したい。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご支援を賜りました静岡県立大学薬学部 橋本 博教授、ともに研究に取り組んできた学生の皆様に心より感謝申し上げます。また今日までご助言とご鞭撻を賜りました恩師、横浜市立大学大学院生命医科学研究科 佐藤 衛教授、東京大学大学院薬学系研究科 清水敏之教授、米国テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター Hongtao Yu 教授に感謝申し上げます。本研究は、東北大学加齢医学研究所 田中耕三教授、米国セントジュード小児研究病院 藤井直明博士との共同研究、及び高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 Photon Factory、大型放射光施設 SPring-8 との共同利用成果となります。本誌面をお借りして深く感謝を申し上げます。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (15K18491, 17K07314) の助成を受けて実施したものであり、ここに感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- Hara K., Shimizu T., Unzai S., Akashi S., Sato M., Hashimoto H., *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **65**, 1302–1305 (2009).
- Hara K., Hashimoto H., Murakumo Y., Kobayashi S., Kogame T., Unzai S., Akashi S., Takeda S., Shimizu T., Sato M., *J. Biol. Chem.*, **285**, 12299–12307 (2010).
- Kikuchi S., Hara K., Shimizu T., Sato M., Hashimoto H., *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68**, 962–964 (2012).
- Kikuchi S., Hara K., Shimizu T., Sato M., Hashimoto H., *J. Biol. Chem.*, **287**, 33847–33852 (2012).
- Fattah F. J., Hara K., Fattah K. R., Yang C., Wu N., Warrington R., Chen D. J., Zhou P., Boothman D. A., Yu H., *PLoS Genet.*, **10**, e1004419 (2014).
- Actis M. L., Ambaye N. D., Evison B. J., Shao Y., Vanarotti M., Inoue A., McDonald E. T., Kikuchi S., Heath R., Hara K., Hashimoto H., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 4339–4346 (2016).
- Hara K., Taharazako S., Ikeda M., Fujita H., Mikami Y., Kikuchi S., Hishiki A., Yokoyama H., Ishikawa Y., Kanno S., Tanaka K., Hashimoto H., *J. Biol. Chem.*, **292**, 17658–17667 (2017).
- Branzei D., Psakhye I., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **40**, 137–144 (2016).
- Nair D. T., Johnson R. E., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A. K., *Science*, **309**, 2219–2222 (2005).
- Uljon S. N., Johnson R. E., Edwards T. A., Prakash S., Prakash L., Aggarwal A. K., *Structure*, **12**, 1395–1404 (2004).
- Nair D. T., Johnson R. E., Prakash S., Prakash L., Aggarwal A. K., *Nature*, **430**, 377–380 (2004).
- Silverstein T. D., Johnson R. E., Jain R., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A. K., *Nature*, **465**, 1039–1043 (2010).
- Biertümpfel C., Zhao Y., Kondo Y., Ramón-Maiques S., Gregory M., Lee J. Y., Masutani C., Lehmann A. R., Hanaoka F., Yang W., *Nature*, **465**, 1044–1048 (2010).
- Lucena J., Pezzi S., Aso E., Valero M. C., Carreiro C., Dubus P., Sampaio A., Segura M., Barthelemy I., Zindel M. Y., Sousa N., Barbero J. L., Maldonado R., Pérez-Jurado L. A., Campuzano V., *BMC Med. Genet.*, **11**, 61 (2010).
- Itoh G., Kanno S., Uchida K. S., Chiba S., Sugino S., Watanabe K., Mizuno K., Yasui A., Hirota T., Tanaka K., *EMBO J.*, **30**, 130–144 (2011).
- Ishidor B., Küry S., Rosenfeld J. A., Besnard T., Schmitt S., Joss S., Davies S. J., Lebel R. R., Henderson A., Schaaf C. P., Streff H. E., Yang Y., Jain V., Chida N., Latypova X., Le Caignec C., Cogné B., Mercier S., Vincent M., Colin E., Bonneau D., Denommé A. S., Parent P., Gilbert-Dussardier B., Odent S., Toutain A., Piton A., Dina C., Donnart A., Lindenbaum P., Charpentier E., Redon R., Iemura K., Ikeda M., Tanaka K., Béziau S., *Hum. Mutat.*, **37**, 354–358 (2016).