

文部科学記者会・科学記者会 同時発表

2021年11月22日
横浜市立大学

がん治療薬の開発に向けた UHRF1 の機能阻害剤を発見

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 有田 恭平 教授、郡 聡実さん（博士後期課程3年）、同研究科 生命情報科学研究室 浴本 亨 助教、柴橋 佑希 特任助手、池口 満徳 教授らを中心とした研究グループは、がん治療薬開発の標的となるタンパク質 UHRF1^{*1} の機能阻害剤を、構造生物学と計算科学を組み合わせた手法で発見しました。本成果は UHRF1 を標的とした新たな作用点となるがんの薬剤開発の基盤となります。

本研究は、『Bioorganic & Medicinal Chemistry』（IF: 3.641）に掲載されました。（2021年11月10日オンライン）

研究成果のポイント

- 構造生物学と計算科学を組み合わせ、UHRF1 機能阻害剤となる化合物：5A-DMP を同定
- 5A-DMP と UHRF1 との複合体構造を決定し、5A-DMP が標的部位に結合することを解明
- 5A-DMP が UHRF1 と DNA リガーゼ 1 (LIG1^{*2}) の結合を阻害することを解明

研究背景

がんは、日本人の死因第一位です。細胞のがん化には加齢、生活習慣、紫外線など様々な要因が挙げられますが、そのうちの一つに DNA メチル化^{*3}異常があります。ヒトの体は数 10 兆個もの細胞で構成されていますが、細胞の種類としては筋肉細胞や神経細胞、血液細胞など約 270 に絞られています。たとえば、血液細胞のひとつである白血球としての構造と機能を個々の細胞に持たせるためには、それに相当する遺伝子の発現が必要になります。この遺伝子の発現を制御しているのが DNA メチル化であり、パターンによって、様々な細胞の種類が決まっています。DNA メチル化がヒトの生涯を通して維持されることで、細胞は正常に増殖することができます。これを DNA 維持メチル化といいます。

DNA 維持メチル化が正常に働かなくなると、がんの抑制に働く遺伝子が発現しなくなったり、ゲノム全体の不安定化が起こったりします。その結果、細胞ががん化します。DNA 維持メチル化には、DNA メチル化酵素 DNMT1 とその働きを補助する UHRF1 タンパク質が必ず作用していますが、様々ながん細胞においてこの UHRF1 タンパク質が過剰発現しており、がん細胞の異常増殖と関連することが報告されています。このことから、UHRF1 の機能阻害剤はがん治療薬になると期待されています。

UHRF1 は 5 つの機能ドメインで構成されています。我々は 2017 年に、UHRF1 の機能ドメインの一つである TTD ドメインが、リジン 126 がメチル化された LIG1 (LIG1K126me3) と結合し、これにより UHRF1 が DNA 複製の起こっている場所に呼び込まれることを報告しました ([2017年8月記者発表：細胞記憶の理解に新たな糸口](#))。

さらに、2019 年には UHRF1-TTD ドメインと LIG1K126me3 との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析で決定し、その詳細な分子機構を解明しました ([2019年1月記者発表：UHRF1](#)

と LIG1 の複合体構造解析)。この立体構造の解明から、TTD ドメインと LIG1 の結合には、TTD ドメインの「アルギニン結合溝」と名付けたポケットと LIG1 のアルギニン 121 の相互作用が重要であることが分かりました。

今回我々は、UHRF1 の機能を阻害するためにこのアルギニン結合溝に注目しました。UHRF1 は DNA 維持メチル化の初期の過程で LIG1 と相互作用します。従って、LIG1 との結合を阻害する化合物はがん細胞での UHRF1 の機能を阻害し、がん細胞で見られる異常な DNA メチル化の改善につながると期待されます。

研究内容

今回研究グループは、UHRF1-TTD ドメインのアルギニン結合溝に結合し、LIG1 との相互作用を阻害する UHRF1 機能阻害剤：5A-DMP の同定に成功しました。

【計算科学による化合物ライブラリからの候補化合物の選別】

以下のように複数の計算科学的な手法を用いて、約 20 万個の化合物ライブラリから UHRF1-TTD ドメインのアルギニン結合溝に結合する候補化合物を 130 個まで絞り込みました (図 1)。

- (1) 2019 年に報告した UHRF1-TTD ドメインと LIG1K126me3 の複合体の結晶構造を基に、ドッキングシミュレーションを実施
- (2) TTD ドメインのアルギニン結合溝に高い確率で結合すると予測された化合物に対しては、横浜市立大学が保有するスーパーコンピュータ上で分子動力学計算を行い、水分子やタンパク質の構造の揺らぎも指標に加えて評価
- (3) この分子動力学計算から TTD ドメインのアルギニン結合溝と化合物の間で形成された相互作用情報を抽出し、その種類や頻度を反映させた動的ファーマコフォアモデル⁴を作成、当該モデルに当てはまる化合物をライブラリの中からさらに選出

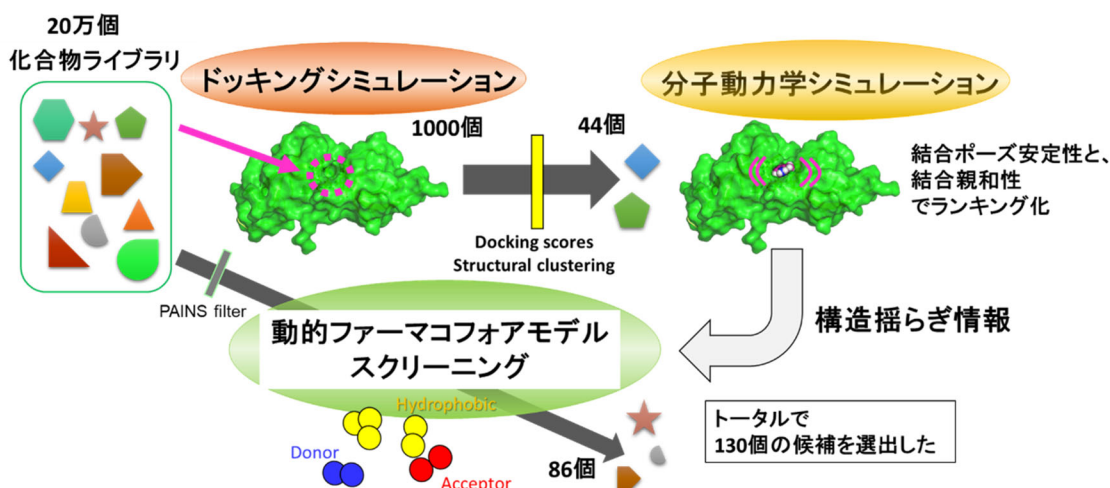


図 1 計算科学による候補化合物の選別の概略図

20 万個超の化合物を含む化合物ライブラリから、ドッキングシミュレーションと分子動力学シミュレーションを駆使して 44 個の候補化合物を選出した。分子動力学シミュレーションから得た構造揺らぎの情報から動的ファーマコフォアモデルを作成し、相互作用様式が似ている化合物を 86 個選出した。トータルで 130 個の化合物を計算科学的な手法で選出した。

【構造生物学による化合物の結合様式の解明と機能阻害の検証】

計算科学の研究方法で選別した 130 個の化合物が実際に TTD ドメインに結合するかを実験的に確認しました。一般的にタンパク質に低分子化合物が結合するとその熱安定性が向上することが知られています。TTD ドメインに 130 個の化合物をそれぞれ加えて熱安定性の変化を調べた結果、130 個の候補化合物の中から 2 個の化合物が TTD ドメインの熱安定性を向上させることを見出しました。また、2 個の候補のうち、TTD ドメインの熱安定性を最も向上させた化合物である 5-amino-2,4-dimethylpyridine (5A-DMP) が TTD ドメインに結合することを、生体分子間の相互作用を解析する等温滴定型カロリメトリーで明らかにしました。さらに、TTD ドメインと 5A-DMP の複合体を結晶化して、大型放射光施設 Photon Factory (PF) の BL-5A を用いて X 線回折実験を行い、その複合体構造を、世界最高水準の 1.45 Å 分解能で決定しました。これにより、5A-DMP が TTD ドメインのアルギニン結合溝に入りこんでおり、5A-DMP はその構造のほぼすべての部分を使って TTD ドメインに結合していることを明らかにしました (図 2)。

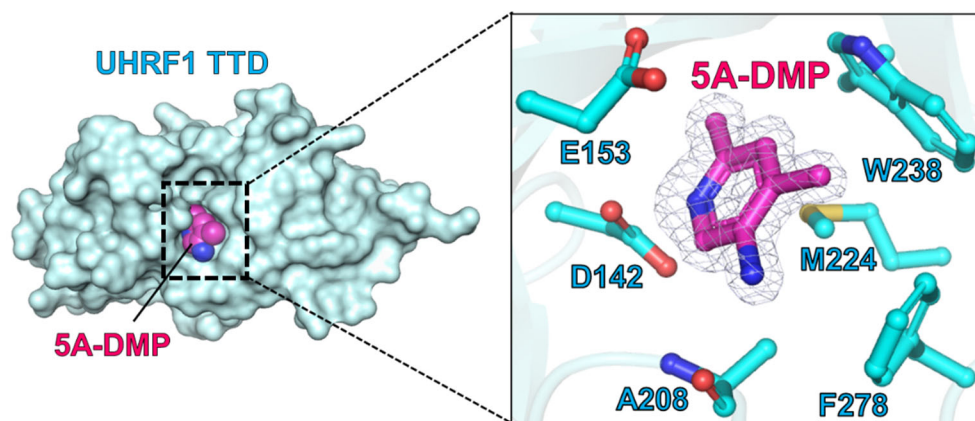


図 2 TTD ドメインと 5A-DMP の複合体の X 線結晶構造

TTD ドメインを水色、5A-DMP をマゼンタで示す。複合体の全体構造 (左図) とアルギニン結合溝の拡大図 (右図)。5A-DMP が TTD ドメインのアルギニン結合溝に入り込み、LIG1 との結合を阻害する。

さらに無細胞実験系を用い、5A-DMP が UHRF1 と LIG1 の結合を阻害できることも検証しました (東京大学 中西真 教授、西山敦哉 准教授との共同研究)。LIG1 を特異的に認識する抗体を用いて、免疫沈降させた画分に UHRF1 が含まれているかどうかで、UHRF1 と LIG1 の結合を評価しました。5A-DMP が存在しない時は、免疫沈降した画分に UHRF1 が含まれており、UHRF1 と LIG1 が結合することが示されていますが、5A-DMP を加えるとその濃度依存的に UHRF1 と LIG1 の結合が見られなくなることが分かりました。このことから、今回発見した 5A-DMP が UHRF1-TTD ドメインのアルギニン結合溝に結合して、LIG1 との結合を阻害する働きを持つことを明らかにしました。

今後の展開

本研究では、計算科学と構造生物学を組み合わせた融合研究により、UHRF1 の機能阻害剤の種となるリード化合物の探索に成功しました。特に分子動力学計算を組み合わせた探索は、膨大な数の化合物ライブラリ中から効率的に候補化合物の選別が行えることを実証し、今後の阻害剤探索研究における新たな方法論を提示できたものと考えています。

本研究では、5A-DMP が UHRF1 と LIG1 の結合を阻害することを示し、がん細胞で過剰発現した UHRF1 の機能を抑えられる可能性を見出しました。しかし、現段階では、細胞内で UHRF1 の機能を阻害するには 5A-DMP の UHRF1 への結合は十分に強くありません。今後、当研究チームでは 5A-DMP の構造を改変して、細胞内で十分な活性を持った UHRF1 機能阻害剤の開発に取り組んでいく予定です。

研究費

本研究は、JSPS 科研費(18H02392, 19H05294, 19H05741, 19H05285, 21H00272, 19H05740, 18H05426)、理化学研究所 動的構造生物学研究プロジェクト、科学技術振興機構 (JST) さきがけ、武田科学振興財団 (1871140003)、日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) (1614 and 1746, JP21am0101109 and JP20am0101094)、横浜市立大学 (学長裁量事業) 戦略的研究推進事業などの助成を受けて行われ、文部科学省「富岳」成果創出加速プログラム (JPMXP1020200101) と理化学研究所の支援により実施しました (hp200129, hp210172)。また、パリ・デイドロ大学の Pierre-Antoine Defossez 氏との日仏二国間交流事業 (JSPSBP120192913) による国際共同研究の成果です。

論文情報

タイトル : Structure-based screening combined with computational and biochemical analyses identified the inhibitor targeting the binding of DNA Ligase 1 to UHRF1

著者 : Satomi Kori, Yuki Shibahashi, Toru Ekimoto, Atsuya Nishiyama, Sae Yoshimi, Kosuke Yamaguchi, Satoru Nagatoishi, Masateru Ohta, Kouhei Tsumoto, Makoto Nakanishi, Pierre-Antoine Defossez, Mitsunori Ikeguchi, and Kyohei Arita

掲載雑誌 : Bioorganic & Medicinal Chemistry

DOI : [10.1016/j.bmc.2021.116500](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116500)

用語説明

*1 UHRF1 :

DNA メチル化維持に必須の役割をするタンパク質。片鎖メチル化 DNA に結合したり、9 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 に結合したり、ヒストン H3 や複製因子 PAF15 をユビキチン化するなど様々な機能を発揮することで、DNA メチル化パターンの複製を誘導する。がん細胞で過剰発現しており、異常な細胞増殖に関与する。

*2 LIG1 :

DNA 複製中にラギング鎖で生じる岡崎フラグメントを連結する酵素。複製が起きている場所に局在し、リジン 126 のメチル化依存的に UHRF1 を複製部位に呼び込む働きも持つ。

*3 DNA メチル化 :

DNA 中のシトシン塩基の 5 位の炭素にメチル基 (CH₃-) が付加される反応。ヒトでは主に CG 配列中のシトシン塩基がメチル化される。DNA メチル化により、遺伝子の発現が抑制されると考えられている。生物の体 (多細胞の形質) を形成するために必須であり、DNA

メチル化異常はがん化の原因の一つである。

*4 動的ファーマコフォアモデル：

タンパク質と結合した化合物を、水分子も含めた溶液系で全原子分子動力学シミュレーションを実施し、構造揺らぎを含んだ状態における化合物の安定な位置情報を取得する。その位置情報を基に、水素結合や疎水性相互作用等の相互作用をモデル化（ファーマコフォアモデル）する。ファーマコフォアモデルで表現される相互作用を、分子動力学シミュレーションから得たスナップショットで動的平均をとると、相互作用が形成された頻度の情報を付加した動的ファーマコフォアモデルを作成できる。

関連論文

Methylation of DNA Ligase 1 by G9a/GLP recruits UHRF1 to replicating DNA and regulates DNA methylation

Ferry et al., 2017, *Molecular Cell* 67, 550–565

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.012>

Structure of the UHRF1 Tandem Tudor Domain Bound to a Methylated Non-histone Protein, LIG1, Reveals Rules for Binding and Regulation

Kori et al., 2019, *Structure* 27, 485–496

<https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.012>

**SUSTAINABLE
DEVELOPMENT
GOALS** 横浜市立大学は、
様々な取り組みを
通じてSDGsの達
成を目指します。

