

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗 HPV 薬開発のための基盤研究

分担研究者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 ハイリスクグループのヒトパピローマウイルス(HPV)感染により子宮頸癌が発症する。HPV の E6, E7 蛋白質による癌抑制遺伝子 p53, pRb の分解誘導が発癌に必須であり、発癌の抑制にはこれらの経路を遮断することが重要である。HPV16 型の E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御することが報告されている。そこで、E6 遺伝子が組込まれた細胞から E6 蛋白質を特異的に排除する方法の開発を目指し、USP15 の脱ユビキチン化酵素活性を阻害する小分子のスクリーニングおよび特殊ペプチドの開発を試みた。DUB-Glo protease assay を用い、インヒビターライブラリー320 コンパウンドから 33 個の候補分子を同定した。さらに Di-Ub を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

A. 研究目的

子宮頸癌の発癌にハイリスク型のヒトパピローマウイルス(HPV)感染と E6, E7 蛋白質の組込みが関与し、癌抑制遺伝子 p53, pRb のユビキチン-プロテアソーム系による分解誘導が発癌に重要である。HPV ワクチンが近年、実用化され、若年女子の HPV 感染を予防し、将来的に子宮頸癌の発症が抑制されることが期待されているが、すでに HPV に感染している患者に対する特異的な抗パピローマウイルス薬は未だ存在しない。近年、E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御していることが明らかとなった。そこで、子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目的に、USP15, USP11 の特異的阻害剤の作製を目指し、阻害物質のスクリーニングと特殊ペプチドの作製を試みた。

B. 研究方法

(1) *in vitro* USP15 assay 系による阻害物質のスクリーニング

昨年、樹立した DUB-Glo protease assay (Promega)による *in vitro* USP15 assay 系を用いて inhibitor library(320 コンパウンド)から阻害活性物質をスクリーニングを行った。

(2) ヒット化合物の Di-Ub を基質とした USP15 活性阻害の評価

DUB-Glo protease assay で阻害活性の陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48)を基質にした USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析した。

(3) Avi-His₆-USP15 の発現と精製

Avi-His₆-USP15 UCH(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase)を大腸菌 DH5α で発現させ、HisTrap HP(GE

Healthcare)を用い、アフィニティ精製した。

(4)RaPID system による USP15 結合特殊ペプチドの作製

フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で USP15 の活性部位 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した(東京大学理学部、菅裕明教授との共同研究)。

(5)USP-11 を発現する組換えバキュロウイルスの作製

FLAG-USP 遺伝子を pVL1393 にサブクローニングし、Sf9 にトランスフェクトして組換えバキュロウイルスを作製した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

C. 研究結果

(1) *in vitro* USP15 assay 系による阻害物質のスクリーニング

DUB-Glo protease assay による *in vitro* USP15 assay 系を用いてインヒビターライブラリー(320 コンパウンド)から阻害活性物質をスクリーニングしたところ、DUB activity を阻害するコンパウンドが 33 個見つかった。

(2) ヒット化合物の Di-Ub を基質とした USP15 活性阻害の評価

陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48)を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析したところ、5 種類のコンパウンドで著明な USP15 阻害活性を確認した。

(3) 大腸菌における Avi-His₆-USP15 UCH の

発現と精製

Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質を大腸菌 DH5α で発現させ、HisTrap HP(GE Healthcare)を用い、アフィニティ精製した。CBB 染色にて Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質の精製蛋白質を確認した。これを用いて以下のスクリーニングを行った。

(4)RaPID system による USP15 結合特殊ペプチドの作製

RaPID system で USP15 の活性部位 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチドをスクリーニングし、5 種類の環状 N-メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得て、スケールアップして精製を行っている。

(5)USP-11 を発現する組換えバキュロウイルスの作製

バキュロゴールドを用いて組換えバキュロウイルス AcFLAG-USP11 を作製した。

D. 考察

HPV16E6 を排除する抗 HPV 薬開発のため、脱ユビキチン化酵素 USP15 に対する阻害剤開発を目指した。インヒビターライブラリーから 320 compound を DUB-Glo protease assay を用いてスクリーニングしたところ、DUB protease activity を阻害する compound が 33 個見つかった。さらに Di-Ub(K48)を基質にして USP15 阻害活性を解析し、5 種類の小分子化合物で著明な USP15 阻害活性を確認した。USP15 阻害活性を確認できた小分子については今後、細胞内での USP15 阻害活性と E6 への安定性への影響を解析していく予定である。また、USP15 活性を阻害する特殊ペプチドの開発を RaPID system により行った。USP15 の catalytic domain である UCH domain に結合する環状 N-メチルペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N-メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。現在、スケールアップして精製中であり、USP15 阻害活性を解析する予定である。USP11 についても FLAG-USP11 を発現する組換えバキュロウ

イルスを作製しており、同様な阻害剤候補物質のスクリーニングを行う予定である。

E. 結論

子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6 の安定化因子である USP15 の阻害剤作製を試みた。DUB-Glo protease assay を用い、インヒビターライブラリーから 33 個の候補分子を同定した。さらに Di-Ub を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (1): 1-16 (2014)
2. Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono, P, Shoji I, Deng, L, Hotta, H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., *PLoS One*, 9: e98877 (2014)
3. Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 58 (3): 188-94 (2014)

4. Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T, Lusida M, Soetjipto, S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta, H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, 58 (3): 180-7 (2014)

2. 学会発表

- 1) Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 2) Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 3) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 4) Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 5) Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 6) Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.

- 7) Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 8) 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 9) 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による TGF- β スーパーファミリーにおける Smad2/3 と Smad1/5/9 経路の脱制御とその分子機序の解明. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 10) 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 11) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 12) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene AGR3. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 13) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 14) 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白質の選択的分解機構の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月 25-27 日, 2014 年.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし