

**研究テーマ****プロテアソームの上流に位置するE2酵素を標的とする抗がん剤の開発**

## 1. 目的

ユビキチン依存的タンパク質分解系は、多くのステップから成り立っているが、その中でも、プロテアソームの働きを阻害する Velcade® が、2003年に米国で難治性多発性骨髄腫の治療薬として承認された。プロテアソーム阻害物質は、従来の抗がん剤とは異なった作用で抗がん作用を示す物質として注目されているが、最近、プロテアソームの上流に位置するユビキチン化の各ステップを標的とする低分子化合物の探索も活発に行われている。ユビキチン依存的に分解される標的タンパク質には、がんなどの各種疾病において重要な働きをするものが多いことが知られている。したがって、その分解を選択的に阻害する化合物は、従来の抗がん剤とは異なる作用機構で働く選択性の高い薬剤になると期待される。そして、最近の報告によると、Ubc13-Uev1A 複合体の形成を阻害する化合物は、がん抑制遺伝子産物 p53 のプロテアソームによる分解を阻害し、核内における p53 の濃度を高めることにより、抗がん作用を示すと期待されている (Laine, A. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8901, 2006)。そして、そのような薬剤は、従来の抗がん剤とは異なり、副作用の少ない薬剤になると期待されるが、開発例は未だ報告されていない。そこで、本研究課題では、Ubc13-Uev1A 複合体の形成を阻害することにより、p53 のプロテアソームによる分解を阻害するような物質を探索することを目的とする。

## 2. 方法

海洋生物は、低分子化合物を生体防御や情報伝達に巧みに用いて進化してきたので、多様な生物活性を有する化合物の宝庫である。しかも、それらの化合物は、海水中に分泌された後に作用するので、低濃度で強い生物活性を示す。そこで、海洋生物資源から、Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害物質の探索を

行う。Ubc13 は Uev1A とヘテロダイマーを形成することによって、E2 としての活性を発揮する。リボソーム上で生合成された p53 は四量体を形成し、細胞修復あるいはアポトーシスを誘導し、細胞のがん化を防ぐ。しかし、生合成中の p53 に Ubc13-Uev1A 複合体が結合すると K63-ユビキチン化が起こり、p53 のがん抑制作用が阻害され発がんに至る (Topisirovic, I. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 12676, 2009)。したがって、このヘテロダイマーの形成を阻害する化合物は、がん抑制作用を示すと考えられるので、複合体形成を阻害する化合物の探索を行う。

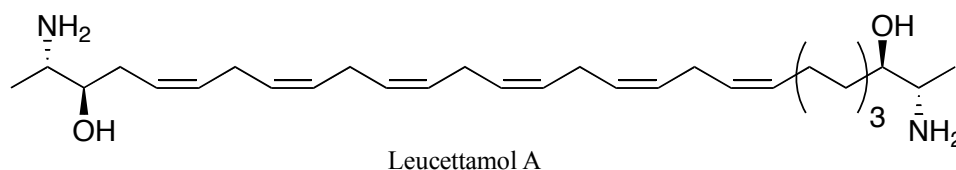
(1) スクリーニング：インドネシアで採集した 300 サンプルの海洋無脊椎動物、および、600 種類の海洋由来糸状菌を用いてスクリーニングを行う。Ubc13-Uev1A 複合体の結合は、大腸菌で発現・精製した Ubc13 と Flag-Uev1A を用いて、抗 FLAG 抗体による ELISA 法により評価する。

(2) 阻害物質の精製と構造決定：スクリーニングにおいて阻害作用を示したサンプルから阻害物質を精製し、NMR スペクトルなどの機器分析により構造決定を行う。

(3) 阻害物質の作用機序の解析：得られた化合物から種々の誘導体を調製し、構造-活性相関を調べることにより、活性発現に必要な部分構造を明らかにする。また、細胞を処理した際に、p53 レベルが変化するか否かを調べ、さらに、分子生物学的手法を用いて作用機序の解析を行なう。

### 3. 結果

スクリーニングの結果、インドネシアで採集した海綿に活性が認められたので、活性を指標にして阻害物質の精製を行った。その結果、以前、抗菌物質として報告されていた leucettamol A (Kong, F. *et al.*, *J. Org. Chem.* **58**, 970, 1993) を単離した。この化合物は、Ubc13 と Mms2 複合体の形成は阻害しなかったため、Uev1A に特異的な阻害物質であるといえる。次に、誘導体を調製し、活性を調べた。Leucettamol A は、Ubc13-Uev1A 複合体形成を  $IC_{50}$  50  $\mu\text{g/mL}$  で阻害したが、アセチル化すると



活性は消失したので、水酸基やアミノ基は活性発現に必須であると考えられる。また、還元すると活性はより強くなった ( $IC_{50}$  4  $\mu\text{g/mL}$ )。また、これらの化合物は、HeLa 細胞に対して細胞成長抑制作用を示した ( $IC_{50}$  4~30  $\mu\text{g/mL}$ )。

#### 4. まとめ

ユビキチン依存的タンパク質分解系の中でも、E2 酵素と E3 酵素については、それらの作用を阻害することにより、p53 の作用を増強しがん抑制作用を示すような化合物の探索を行うことが可能である。今後も、この分解系を標的とする化合物を探索することにより、抗がん剤などの医薬品、あるいは、本分解系に存在する未知の機構を解明するための分子プローブとなるような化合物を発見していきたい。

#### 5. 発表論文、参考文献

S. Tsukamoto, T. Takeuchi, H. Rotinsulu, R. E. P. Mangindaan, R. W. M. van Soest, K. Ukai, H. Kobayashi, M. Namikoshi, T. Ohta, and H. Yokosawa. Leucettamol A: A New Inhibitor of Ubc13-Uev1A Interaction Isolated from a Marine Sponge, *Leucetta* aff. *microrhaphis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (24), 6319–6320 (2008).