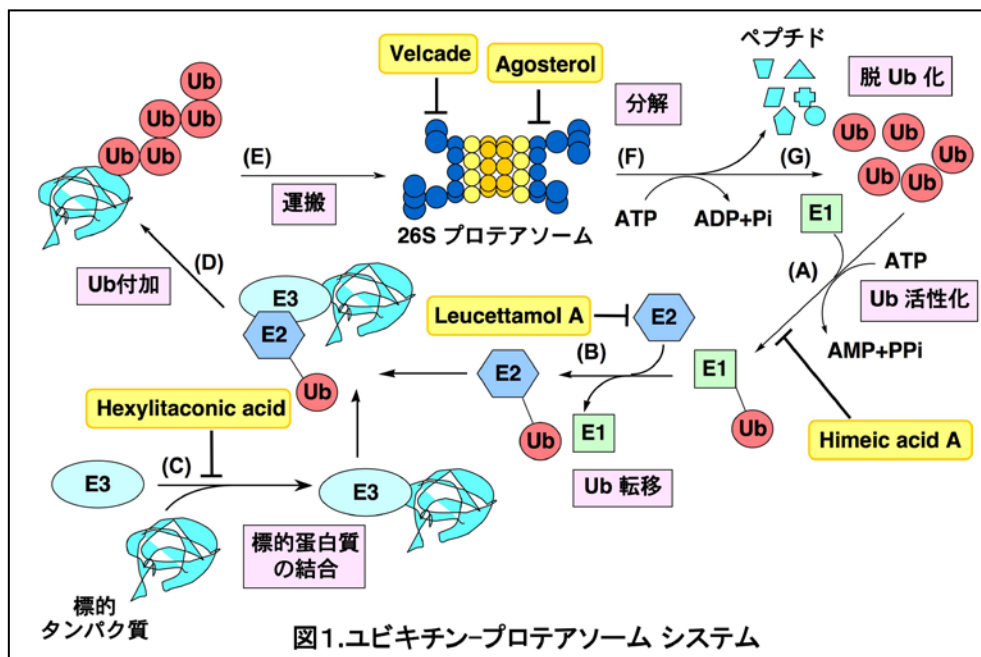


ユビキチン-プロテアソームシステムのリクルート過程を 標的とする新規抗がん剤の開発

熊本大学大学院 生命科学研究部（薬学系）天然薬物学分野
塚本 佐知子

1. 目的

ユビキチン-プロテアソームシステム（図1参照）により分解されるタンパク質の中には、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低分子化合物は、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ている。2003年には、合成プロテアソーム阻害物質 Velcade が多発性骨髄腫の治療薬としてアメリカで認可された [1]。そして最近、プロテアソームそのものに加えて、ユビキチンシステム（タンパク質が分解の目印としてユビキチン化される一連の過程：図1のステップA~D）の各ステップを阻害する化合物も、新規標的抗がん剤として注目されている。しかし、ユビキチン-プロテアソーム系に対する阻害物質について天然資源からの網羅的な探索はほとんど行われていないので、広く天然物からの探索が待たれているのが現状である。本申請者は、多様な生命現象に関与し、かつ、複雑で未解明な部分の多いユビキチン-プロテアソームシステムを標的とする鍵化合物物質を発見・開発することは、創薬に加えてライフサイエンス全般の発展に貢献すると考え、研究を展開している。本研究においては、これまでに研究室において独自に確立したアッセイ系（ステップA~C, Fに対する阻害）を用いて、より選択性の高い阻害物質の探索を継続するとともに、新たにリクルート（運搬）の過程（ステップE）ユビキチン結合酵素（研究業績2）を特異的に阻害する物質の探索を重点的に行う。

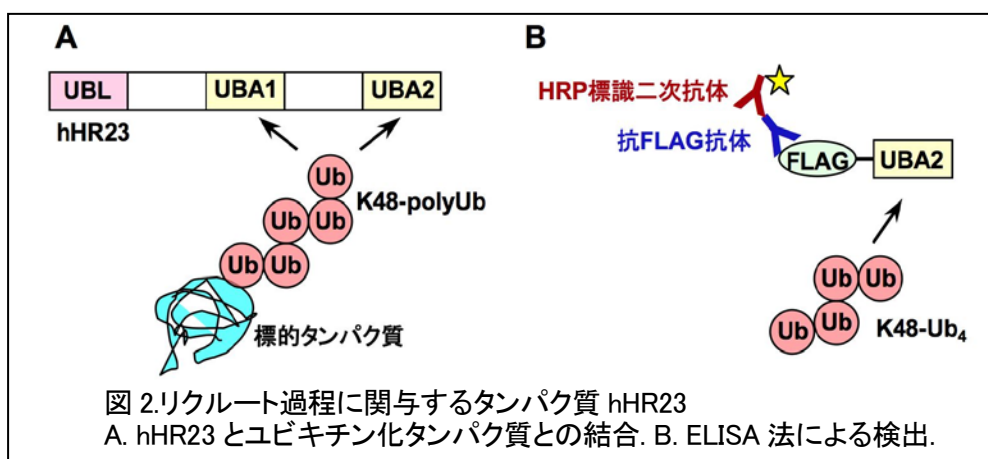


2. 方法

本研究で着目するリクルートの過程は、タンパク質がプロテアソームによって分解される直前の段階であるが、特に、ポリユビキチン化されたタンパク質がプロテアソームに運ばれる過程を中心として、未解明な部分が多く残されている。そこで、本研究においては、リクルートに関与するタンパク質とポリユビキチン鎖との結合を検出するアッセイ系を新たに構築し、新規結合を阻害する阻害物質の探索を重点的に行うとともに作用機構を明らかにする。

(1) アッセイ系の構築

ポリユビキチン化タンパク質のリクルートに関与する UBL-UBA タンパク質であるヒト Rad23 ホモログ hHR23A を取り上げる (図 2 参照)。hHR23 をノックダウンするとがん抑制遺伝子産物 p53 の蓄積が観察されると報告されている [2]、hHR23 はポリユビキチン化 p53 のリクルートに関与していると考えられ、このリクルート過程に対する阻害剤は新しいタイプの抗がん剤になりうる [3]。また、hHR23 に存在する 2 つのユビキチン結合ドメイン (UBA) のうち、C 末端側に存在する UBA2 が、Lys63-ユビキチン鎖よりも Lys48-ユビキチン鎖に対して高い選択性を示すことが明らかとなっている (図 2A) [4]。そこで、本研究では、アッセイ系を簡単にするために、Lys48-ユビキチン鎖を選択的に結合できる UBA2 ドメインを用いた ELISA 系を構築する (図 2B)。実験に用いるタンパク質は、大腸菌で発現させる。初めに、GST-FLAG-UBA2 融合タンパク質を作成し、次に、GST を外して FLAG-UBA2 を単離する。Lys48-ユビキチン鎖は市販の Lys48-テトラユビキチン (K48-Ub₄) を用いる。そして、ELISA 用プレートに K48-Ub₄ を吸着後、FLAG-UBA2 とサンプルを添加し、FLAG-UBA2 と K48-Ub₄ との複合体形成に対する阻害作用を、抗 FLAG 抗体を用いた ELISA 法で検出する。



(2) スクリーニングと化合物の精製・構造決定

本研究においては、研究室で独自に構築した海洋生物や海洋微生物の抽出物のライブラリーを用いてスクリーニングを行う。ライフサイエンス分野においては、テトロドトキシンなど多くの天然資源由来の低分子化合物が、新しい機構や生理機能を解明するツールとして用いられ、研究の発展に貢献してきた。特に、海洋生物資源からは、植物資源からは見いだされないような新規骨格あるいは強力な生物活性を示す化合物が数多く発見されている。実際、本申請者は、これまで、ユビキ

チン-プロテアソームシステムにおける他のステップに対する阻害物質の探索の際も、本ライブラリーから新規阻害剤を発見してきた。したがって、本ライブラリーは、新規生物活性物質の探索に適したライブラリーであるといえる。スクリーニングで活性を示した抽出物から、活性物質を精製し、NMRなどの機器スペクトルにより構造決定を行う。

(3) 阻害作用機構の解明・生理機能の解明

分子生物学的手法を用いて阻害物質の作用機構の解明を行う。

3. 結果

大腸菌でGST-FLAG-UBA2融合タンパク質の発現を試みているが、発現中に分解されやすいことが分かった。条件をいろいろと検討しているが、まだ十分な量の単離に成功していない。最近、UBA1とUBA2の両方を有する tandem UBA が市販されたので、今後、それを用いてスクリーニングを進める予定である。また、これまでに確立したアッセイ法を用いてスクリーニングを行ったところ、インドネシアで採集した海綿から、プロテアソームのキモトリプシン様作用を阻害する化合物として aaptamine、isooaptamine、demethylaaptamine を単離することができた。IC₅₀値は、それぞれ 1.6、2.1、2.1 µg/mL であった [5]。

4. 参考文献

- [1] Sánchez-Serrano I. Success in translational research: Lessons from the development of bortezomib. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 107–114
- [2] Glockzin S, Ogi FX, Hengstermann A, Scheffner M, Blattner C. Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8960–8969
- [3] Madsen L, Schulze A, Seeger M, Hartmann-Petersen R. Ubiquitin domain proteins in disease *BMC Biochemistry* 2007; 8(Suppl 1): S1
- [4] Raasi S, Varadan R, Fushman D, Pickart CM. Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 708–714
- [5] Tsukamoto S, Yamanokuchi R, Yoshitomi M, Sato K, Ikeda T, Rotinsulu H, Mangindaan REP, de Voogd NJ, van Soest RWM, Yokosawa H. Aaptamine, an alkaloid from the sponge *Aaptosuberitoides*, functions as a proteasome inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 3341–3343