

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16026

研究課題名（和文）培養細胞試験系を用いたユビキチン-プロテアソームシステムを阻害する天然物の探索

研究課題名（英文）Discovery of the ubiquitin-proteasome inhibitors from natural sources through cell-based assays

研究代表者

人羅 勇気 (Hitora, Yuki)

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・助教

研究者番号：00755308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ユビキチン-プロテアソームシステムによるタンパク質分解活性を検出できる細胞評価系を用いて、ユビキチン-プロテアソームシステムを阻害する天然物を探索した。微生物や海洋生物のエキスをスクリーニングした結果、タイで採取した植物から単離したRemotididymella属の真菌のエキ스가タンパク質分解を阻害した。生物活性物質を単離し、構造決定したところ、新規化合物であるmellain Aとmellain Bに加えて、既知化合物であるleptosphaerodione類を得た。また、単離した化合物がプロテアソームを阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン-プロテアソームを阻害し、細胞内のタンパク質分解を阻害する化合物は、抗がん剤シーズとしての利用が期待される。本研究では、細胞内のユビキチン-プロテアソームによるタンパク質分解活性を検出できるレポーターアッセイを構築し、天然物エキスをスクリーニングすることで、ユビキチン-プロテアソームシステムを阻害する新規天然物を見出すことに成功した。本研究によって構築した評価系を用いることで、抗がん剤シーズとなるユビキチン-プロテアソームシステムの阻害薬の発見につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we searched for natural products that inhibit ubiquitin-proteasome system by using reporter cell-based assay. We evaluated the ubiquitin-proteasome inhibitory activities of natural products and identified the extract of the fungus Remotididymella sp. isolated from a plant collected in Thailand that inhibit cellular proteolysis. Bioassay-guided isolation of the extract led to the identification of the new polyketides mellains A and B, together with leptosphaerodione and its derivative. Detailed analysis of the isolated compounds revealed that leptosphaerodione inhibits the 20S proteasome activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：ユビキチン-プロテアソームシステム 天然物 スクリーニング プロテアソーム阻害薬

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン - プロテアソームシステム (**UPS**) は、細胞内のタンパク質分解制御機構であり、不要となったタンパク質を選択的にポリユビキチン化し、プロテアソームによって分解する。がん細胞では、**UPS** によるタンパク質分解制御が亢進状態にあるので、**UPS** 阻害剤により **UPS** によるタンパク質分解を阻害すると細胞死が起こる。そのため、**UPS** は抗がん剤開発の創薬標的として注目されている。実際にボルテゾミブやカルフィルゾミブ、イキサゾミブなどのプロテアソーム阻害剤が多発性骨髄腫の治療薬として上市されている。また、タンパク質のユビキチン化に關与するユビキチン活性化酵素 **E1** やユビキチン結合酵素 **E2**、ユビキチンリガーゼ **E3** の阻害薬についても新たな抗がん剤シーズとして開発が進められている。

当研究室では、プロテアソームやユビキチン化関連酵素を用いた酵素阻害試験により、これまでに **UPS** 阻害作用を示す複数の天然物を見出してきた。本研究では、細胞レベルで **UPS** 阻害作用を示し、がん細胞の増殖を抑制する天然物を効率的に発見するために、**UPS** によるタンパク質分解活性を検出することができるプローブが導入された **HeLa** 細胞を用いたレポーターアッセイにより、**UPS** 阻害作用を示す天然物の探索を行った。

2. 研究の目的

本研究では、**UPS** を阻害しがん細胞の増殖を抑える新規天然物の発見とその作用メカニズムの解明を目的とした。天然資源から **UPS** 阻害作用を示す天然物を効率的に探索することができる評価系を構築し、当研究室が保有するオリジナルの天然物エキストラライブラリの大規模スクリーニングを実施することで、**UPS** 阻害作用を示すこれまでに報告例のない天然物の発見を目指した。

3. 研究の方法

(1) **UPS** 阻害作用を示す新規天然物の探索

本研究では、カリフォルニア工科大学の **Deshai** 教授らが作成したレポーター細胞を用いた。このレポーター細胞は、**UPS** によりポリユビキチン化され分解されるタンパク質である HIF1 α のドメイン (**ODD**) とルシフェラーゼの融合タンパク質 (**ODD-Luc**) を発現する。**UPS** が正常な状態では、**ODD-Luc** が **UPS** により分解されるので、細胞内にルシフェラーゼは蓄積しない。一方、**UPS** によるタンパク質分解が阻害されると、**ODD-Luc** が細胞内に蓄積するので、ルシフェリンを添加すると発光する。

本実験では、当研究室が保有する微生物や海洋生物のエキストラライブラリの内、約 **15000** サンプルについて **ODD-Luc** の細胞内蓄積量を化学発光量により定量する **ODD-Luc** 蓄積試験を実施した。コントロールに比べて発光量が増加するサンプルを選抜した結果、**176** サンプルをヒットサンプルとして選抜した。次に、再現性が確認できたエキスについて、**LCMS** で成分を分析し、新規化合物と思われる成分が含まれているエキスを選抜した。

(2) **UPS** 阻害物質の単離と構造決定

スクリーニングにより見出したエキスについて、溶媒分画や各種クロマトグラフィーを用いて活性成分を精製し、活性を示した画分から **4** 種類の化合物を単離した。また、単離した化合物の内、**2** 種類の化合物が新規化合物であったので、質量分析ならびに **NMR** スペクトルの解析により化学構造を決定した。

(3) **UPS** 阻害活性の評価

単離した化合物について、レポーター細胞を用いた生物活性の評価を実施した。また、化合物が **UPS** のユビキチン化あるいはプロテアソームによるタンパク質分解のどちらを阻害するか明らかにするために、ウエスタンブロッティングにより細胞内のポリユビキチン化タンパク質を検出した。さらに、構成型ならびに免疫型プロテアソームを用いた酵素阻害試験を実施し、プロテアソームに対する阻害作用を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 天然物エキスイブラリのスクリーニング結果

天然物エキスおよそ **15000** サンプルについて **ODD-Luc** 蓄積試験を行った。ポジティブコントロールである **MG132** (プロテアソーム阻害薬) を **1 μM** 添加したときの発光量を **1** とした際に、相対発光量が **0.5** 以上を示したサンプルは **176** 種類であった (図 1)。176 サンプルの内、**LCMS** を用いた成分分析の結果、新規化合物が含まれていると予想されたサンプルを選抜した。その結果、タイで採取したナンバンサイカチの葉から単離した **Remotididymella** 属の真菌を見出した。

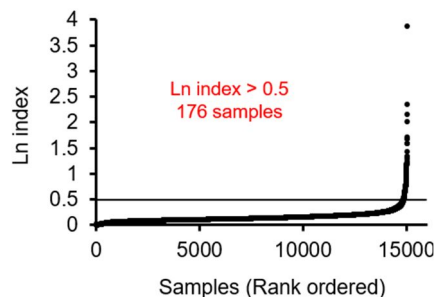


図 1. ODD-Luc 蓄積試験の結果

(2) Mellain 類および leptosphaerodione 類の単離と構造決定

Remotididymella 属の真菌の培養物について生物活性を指標に分画した結果、**2** 種類の新規化合物 **mellain A (1)** および **B (2)** と **2** 種類の既知化合物 **leptosphaerodione (3)** およびそのアセトン付加体 (**4**) を単離した。**Mellain** 類については、高分解能質量分析により分子式を決定し、**1** 次元ならびに **2** 次元 **NMR** スペクトルの解析により化学構造を決定した (図 2)。**Mellain A** については、これまでに報告例のない **benzo[glisoquinoline-8,10-dione]** 骨格を有することが明らかとなった。また、化学シフトの計算からも化学構造の妥当性が示された。

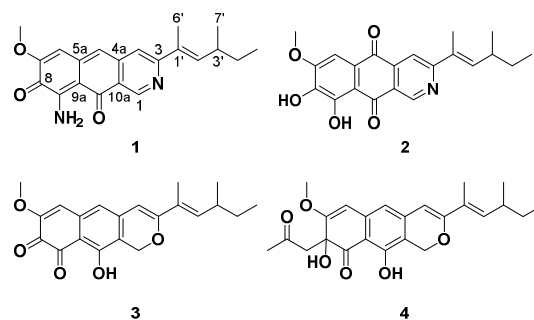


図 2. **Remotididymella** 属の真菌から単離した化合物の構造

(3) 単離化合物の UPS 阻害活性

単離した **4** 種類の化合物について **ODD-Luc** 蓄積試験を実施した。その結果、化合物 **1**、**3**、**4** を処理した細胞において発光量が増加したことから、これらの化合物は **UPS** を阻害し、細胞内のタンパク質蓄積を誘導することが示唆された (図 3)。

単離した化合物の中で、**3** は最も低濃度 (**2 μM**) においても発光量の増加が見られたので、**UPS** 阻害作用について詳細に検討した。**UPS** のユビキチン化あるいはプロテアソームによるタンパク質分解のどちらを阻害するか確認するために、化合物 **3** を処理した細胞のタンパク質抽出物を、ユビキチン抗体を用いてウエスタンブロッティングすることで、細胞内のポリユビキチン化タンパク質を検出した。その結果、**3** により細胞内のポリユビキチン化されたタンパク質が増加したことから、**3** は、ユビキチン化は阻害せず、プロテアソームによるポリユビキチン化タンパク質の分解を阻害する可能性が示唆された (図 4)。

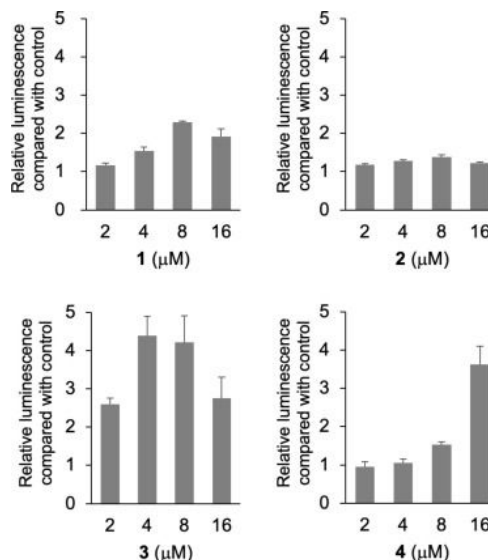


図 3. 化合物 **1-4** の **ODD-Luc** 蓄積アッセイの結果

そこで、単離した **4** 種類の化合物について **20S** プロテアソームを用いた酵素阻害試験を行った。化合物 **3** については、アッセイバッファーに対する溶解性が低く正確な阻害活性を評価することができなかったため、化合物 **1**、**2**、および **4** についてプロテアソーム阻害活性を評価した。なお、本実験では、構成型ならびに免疫型プロテアソームを用いて、トリプシン様、キモトリプシン様、カスパーゼ様の **3** 種類のサブユニットの酵素活性に対する阻害作用を評価した。酵素阻害試験の結果、化合物 **1** は $\beta 1i$ 以外のサブユニットの酵素活性を阻害することが明らかとなった。また、**2** および **4** については、**1** に比べて阻害作用は弱いものの、複数のサブユニットに対して

阻害作用を示した。以上の結果から、本研究で見出した **Mellain** 類ならびに **Leptosphaerodione** 類は、細胞内のプロテアソームによるタンパク質分解を阻害することが明らかとなった。

本研究では、細胞内の **UPS** によるタンパク質分解活性を評価することができるレポーターアッセイを用いることで、天然物エキストラライブラリの大規模スクリーニングを完遂し、**UPS** によるタンパク質分解を阻害する新規天然物の効率的な探索を実践した。また、本研究によって見出した天然物は、プロテアソームによるタンパク質分解を阻害することが分かった。本研究により構築した実験系を用いることで、今後より強力に **UPS** を阻害し、新規抗がん剤のシーズとなる天然物の発見につながることを期待される。

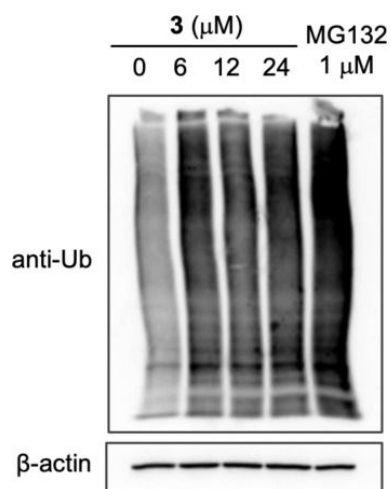


図 4 .ウエスタンブロッティングによるポリユビキチン化タンパク質の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koyanagi Yuhei, Hitora Yuki, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 102
2. 論文標題 Peniphilones A and B: Azaphilone Alkaloids from the Endophytic Fungus <i>Penicillium maximae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 325 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/com-20-14373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Soichiro, Hitora Yuki, Kawahara Teppei, Tanabe Mika, Ogata Eisuke, Kato Hikaru, Srikoon Pattaravadee, Watanabe Takashi, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Cell-based screening of extracts of natural sources to search for inhibitors of the ubiquitin-proteasome system and identification of proteasome inhibitors from the fungus <i>Remotididymella</i> sp.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128566 ~ 128566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村宗一郎、人羅勇氣、河原哲平、加藤光、Sirkoon Pattaravadee、渡邊高志、塚本佐知子
2. 発表標題 細胞評価系を用いた真菌由来コピキチン - プロテアソームシステム阻害物質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sachiko Tsukamoto, Soichiro Nishimura, Yuki Hitora
2. 発表標題 Bioactive fungal metabolites for drug discovery
3. 学会等名 PACIFICHEM (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村宗一郎, 人羅勇氣, 田邊美花, 小縣栄佐, 塚本佐知子
2. 発表標題 細胞評価系を用いたユピキチン-プロテアソームシステム阻害物質の探索と Remotididymella 属真菌から単離したプロテアソーム阻害物質に関する研究
3. 学会等名 第23回 天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田邊 美花, 西村 宗一郎, 人羅 勇氣, 塚本 佐知子
2. 発表標題 阿蘇の植物から単離した真菌が産生するユピキチン - プロテアソームシステム阻害物質に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関