

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月18日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310138

研究課題名（和文） がん抑制遺伝子産物の作用を増強させる天然低分子化合物の探索と作用機構の解明

研究課題名（英文） Search for Natural Products which Enhance the Function of Tumor Suppressor Protein and Study of the Mechanisms of Effects

研究代表者

塚本 佐知子 (TSUKAMOTO SACHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70324093

研究成果の概要（和文）：がん抑制遺伝子産物 p53 の作用を増強する化合物は、優れた抗がん剤になると期待できる。そこで我々は、生体内における p53 の作用を増強できる天然化合物を探索している。これまでに、標的タンパク質のポリユビキチン化に関与する酵素 E1、E2 および E3 に対する阻害物質の探索を行ってきた。本研究課題では新たに、ポリユビキチン化 p53 がプロテアソームにリクルート（運搬）される過程に着目し、その過程を阻害する全く新しいタイプの抗がん剤の探索を目指した。

研究成果の概要（英文）：Compounds, which enhance the function of tumor suppressor p53, are promising anti-cancer leads. We search for the compounds from natural sources. So far we reported the inhibitors of E1, E2, and E3, which function for the polyubiquitination of target proteins. In this project, we search for inhibitors of the recruitment of the polyubiquitinated p53 for the cancer treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：がん抑制遺伝子産物、天然低分子化合物、ユビキチン、プロテアソーム、抗がん剤、海洋生物

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子産物 p53 は変異を持った細胞の蓄積を抑え、その結果として細胞のがん化を抑えている。そこで、p53 の働きを増強しがんを治療するため、以下に示す2種類の研究が行われていた。

(1) 遺伝子治療：p53 遺伝子の変異は約 50% のヒトがんで見つかっている。そこで、変異

をもったがん細胞に野生型 p53 遺伝子を導入する遺伝子治療に関する研究が行われていた。しかし、すべてのがん細胞に遺伝子を組み込むことは不可能で、また転移した部位には遺伝子を導入できないために、臨床応用には至っていなかった。

(2) 変異型 p53 タンパク質を活性化して正常な働きをさせる低分子化合物：変異型 p53 タ

ンパク質に正常な働きをさせる方法は魅力的ではあるが、基礎研究 (Lain *et al.*, *Cancer Cell* **13**, 454, 2008) の段階にとどまっており、臨床応用可能な薬剤の開発には至っていない。

2. 研究の目的

我々は、p53 の作用を増強させることのできる治療薬として、「遺伝子治療」や「変異型 p53 を正常型にする方法」ではなく、p53 の分解を阻害することにより作用を増強する化合物を天然資源から探索することにした。生体内における選択的なタンパク質分解はユビキチン-プロテアソームシステムにより行われているが、我々は、プロテアソーム阻害剤である bortezomib が認可される以前からユビキチン-プロテアソームシステムが創薬の標的になりうると考え、次世代型がん治療薬の開発を目指して海洋生物資源からの探索を行ってきた。そして、ユビキチン-プロテアソームシステムにおいて、タンパク質分解装置であるプロテアソームに加えて、標的タンパク質のポリユビキチン化を司る酵素 E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) に着目し、それらの中でも特にがん抑制遺伝子産物 p53 の作用を増強する低分子化合物の探索を重点的に行ってきた。そこで本研究では新たに、ポリユビキチン化された p53 がプロテアソームにリクルート (運搬) される過程に着目し、その過程を阻害する全く新しいタイプの抗がん剤の探索に着手した。また、これまでに確立した E1、E2 および E3 に関するアッセイ系を用いて、より作用が強く特異性の高い阻害物質の探索を行うとともに、新たに脱ユビキチン化酵素 USP7 に対する阻害物質の探索を行い、p53 の作用を増強する化合物の発見を目指した。

3. 研究の方法

(1) 海洋生物の採集とスクリーニング用サンプルの調製

化合物の探索源として、天然資源のライブラリーと合成化合物のライブラリーの2種類が考えられるが、本研究においては、化合物の構造に関して大きな多様性を有する天然資源のライブラリーを用いる。そして、天然資源の中でも海洋資源を用いる。なぜならば、海洋生物は、海で生物が誕生した大昔から化学物質を生体防御や情報伝達に巧みに利用し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からである。本研究代表者は、平成 18 年度から、サムラトランギ大学 (インドネシア) のマンギンダーン教授の協力のもと、薬用海洋資源の調査・採集を行っている。本研究では、当研究室で独自に構築した『海洋生物の抽出物ライブラリ

ー』を用いてスクリーニングを行う。

(2) 活性試験の遂行

① リクルート過程に対する阻害活性

ポリユビキチン化 p53 のプロテアソームへ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 のノックダウンによる p53 の蓄積が報告されているので (Glockzin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8960, 2003)、hHR23A はポリユビキチン化 p53 のリクルートに関与していると推定される (図 1)。そして、このリクルート過程に対する阻害剤は、ポリユビキチン化 p53 のリクルート、引いてはその分解を阻害すると期待されるので、新しいタイプの抗がん剤になりうると考えられる。hHR23A 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-ユビキチン鎖に対する選択性を示す (図 1A) (Raasi *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 708, 2005)。そこで当初アッセイ系を簡便にするために、UBA2 ドメインを用いる ELISA 系の構築を試みた。しかし、大腸菌で発現・精製した FLAG-UBA2 は不安定で単離できなかったため、市販の HIS-hHR23A Tandem UBA を用いることにした。この HIS-hHR23A Tandem UBA は Lys48-ユビキチン鎖を結合できるので、市販の Lys48-テトラユビキチン (K48-Ub₄) を用いた ELISA 法 (図 1B) によりリクルート過程に対する阻害活性を評価することにした。

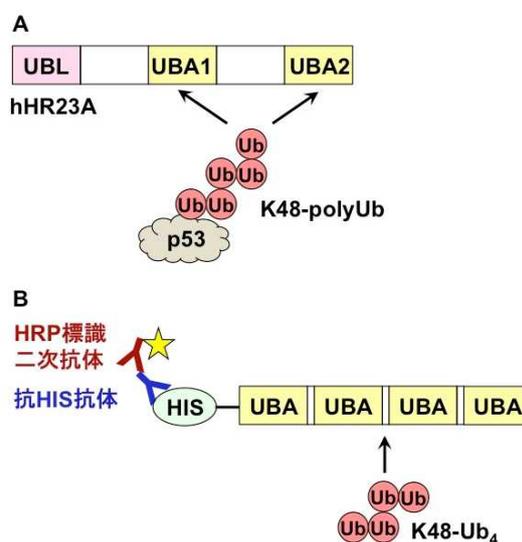


図 1. リクルート過程に関与する hHR23A. A. hHR23A と K48-ポリユビキチン化 p53 との結合 (UBL: ユビキチン様ドメイン). B. HIS-hHR23A Tandem UBA と K48-テトラユビキチン (K48-Ub₄) との結合の ELISA 法による検出。

② E1 に対する阻害活性

E1 とユビキチンのチオエステル結合形成に対する阻害作用はウエスタンブロット法

で検出した (雑誌論文⑧)。

③E2 に対する阻害活性

E2 は十数種類存在するが、その中で Ubc13 は Uev1A とヘテロダイマーを形成して E2 活性を示し、p53 の四量体化を阻害することによりがん抑制作用が阻害される。そこで、Ubc13 と Uev1A の複合体形成に対する阻害作用を、ELISA 法で検出した (雑誌論文⑦)。

④E3 に対する阻害活性

E3 は、ヒトでは約 600 種類からなり、膨大な数の標的タンパク質を認識する役割を担っている。p53 の負の調節因子 Hdm2 は、p53 に結合することにより、p53 が本来行うはずであった細胞修復やアポトーシスを阻害する。一方、p53 は E3 としての Hdm2 により認識され、ユビキチン化後にプロテアソームにより分解される。そこで、p53 と Mdm2 の複合体形成に対する阻害作用を ELISA 法で検出した (雑誌論文⑤)。

④脱ユビキチン化酵素 USP7 に対する阻害活性

Hdm2 は p53 の E3 で、p53 のポリユビキチン化を触媒する。一方、Hdm2 は自らをポリユビキチン化してプロテアソームにより分解される。この時、脱ユビキチン化酵素 USP7 は自己ユビキチン化された Hdm2 からユビキチンを除去する働きをしているので、結果として p53 の分解が起こる。したがって、USP7 に対する阻害物質は Hdm2 の分解を誘導することにより p53 を安定化させ、その結果として発がんの抑制につながると考えられる (Colland *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 137, 2010)。そこで、発蛍光基質として Ub-Rh110 を使い、USP7 による酵素作用で生成する Rh110 の蛍光強度を測定し、USP7 活性を評価した。

(3) 阻害物質の精製・構造決定・作用機構の解析

本研究で新たに確立したアッセイ系や既に確立したアッセイ系を用いてスクリーニングを行い、阻害活性を示した生物資源から阻害物質を精製し構造決定を行った。さらに、得られた阻害物質の作用機構の解析を行い、細胞内の p53 レベルが上昇するか否かを解析した。

4. 研究成果

(1) リクルート過程に対する阻害物質

大腸菌で発現させた FLAG-UBA2 が不安定だったので精製を断念した。その後、市販の HIS-hHR23A Tandem UBA (BostonBiochem) と Lys48-テトラユビキチン (K48-Ub₄, BostonBiochem) の結合を ELISA 法で検出する方法を用い、本研究室で保有している『海洋生物の抽出物ライブラリー』のスクリーニ

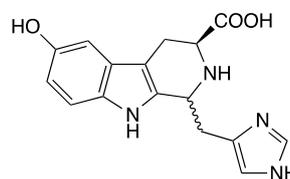
ングを行った。そして現在、強い阻害作用を示す生物サンプルを用いて、阻害物質の精製を行っている。

(2) E1 阻害物質

インドネシアで採集した海綿 *Hyrtios reticulatus* から E1 阻害物質として、新規物質 hyrtioreticulin A を単離した (IC₅₀ 値、2.4 μM) (雑誌論文⑧)。Hyrtioreticulin A とエビマーの関係に相当する hyrtioreticulin B も単離したが、阻害作用は hyrtioreticulin A の約 10 分の 1 であった (IC₅₀ 値、35 μM)。Hyrtioreticulin A は、これまでに天然資源から発見された E1 阻害物質の中で最も作用の強い阻害物質である。本研究代表者は、2005 年に真菌から E1 阻害物質として himeic acid A を単離した。E1 にユビキチンが結合する反応は 3 段階で進行するが、himeic acid A はユビキチンが E1 に疎水結合する初めの段階を阻害し、hyrtioreticulin A はその後の段階を阻害することが分かった。



海綿 *Hyrtios reticulatus*



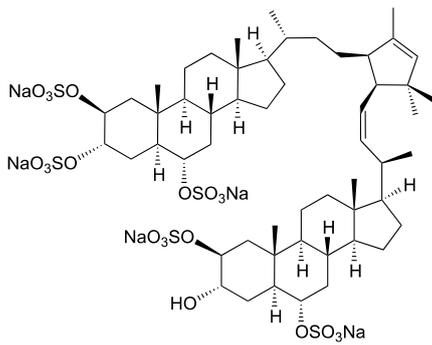
α: Hyrtioreticulin A
β: Hyrtioreticulin B

(3) E2 阻害物質

本研究代表者は、2008 年に世界初の Ubc13 (E2)-Uev1A 複合体形成阻害物質として海綿から leucettamol A を単離したが、最近、より阻害作用の強い新規物質 manadosterol A を海綿 *Lissodendryx fibrosa* から単離した (IC₅₀ 値、0.09 μM) (雑誌論文⑦)。



海綿 *Lissodendryx fibrosa*



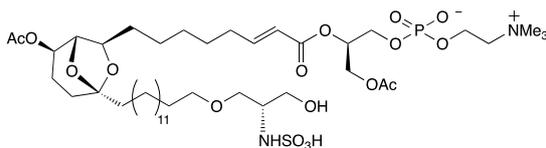
Manadosterol A

(4)E3 阻害物質

p53-Hdm2 (E3) 複合体形成阻害物質として、インドネシアで採集した Didemnidae 科の群体ボヤから新規物質 siladenoserinol 類を 12 個単離し、絶対立体配置を含む構造を決定した。Siladenoserinol A は IC_{50} 値が $2.0 \mu M$ と最も強い阻害作用を示した。類縁化合物の阻害活性には大きな差が認められたので、現在、ドッキングスタディにより活性-構造相関を解析している。



Didemnidae 科群体ボヤ



Siladenoserinol A

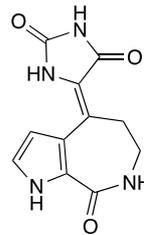
(5)USP7 阻害物質

インドネシアで採集した海綿 *Stylissa massa* から spongiacidin C を USP7 阻害物質として単離した (雑誌論文①)。Spongiacidin C は IC_{50} 値として $3.8 \mu M$ を示したが、同じ海綿から単離した debromohymenialdisine および hymenialdisine は $20 \mu M$ の濃度でも 20% しか阻害しなかった。Spongiacidin C は hydantoin 環を部分構造として有するのに対して、debromohymenialdisine および hymenialdisine では hydantoin 環が aminoimidazolinone 環に置き換わっている

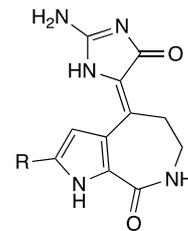
ので、両者の部分構造の違いが阻害作用の違いに反映していると考えられる。また spongiacidin C は、USP21 に対して弱い阻害作用 (IC_{50} 値、 $16.6 \mu M$) を示す一方で、USP2、USP8 および SENP1 (SUMO-specific peptidase 1) に対してはほとんど阻害作用を示さなかった。以上の結果から、spongiacidin C は USP7 に対して比較的強い特異性を示す阻害物質であるといえる。そこで、p53 が野生型で、かつ、USP7 が発現している HCT-116 細胞を用いて、spongiacidin C ($50 \mu M$) による細胞増殖への影響を調べたが、spongiacidin C は細胞増殖を阻害しなかったため、その細胞透過性が低いと考えられる。



海綿 *Stylissa massa*



Spongiacidin C



Debromohymenialdisine: R=H
Hymenialdisine: R=Br

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 32 件)

① H. Yokosawa, S. Tsukamoto (他 8 名、10 番目) . Spongiacidin C, a Bromopyrrole Alkaloid from the Marine Sponge *Stylissa massa*, Functions as a USP7 Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* in press. 査読有

② S. Tsukamoto (他 6 名、7 番目) . Aaptoline A, a New Quinoline Alkaloid from the Marine Sponge *Aaptos suberitoides*. *Heterocycles* in press. 査読有

③ S. Tsukamoto (他 10 名、11 番目) . Manzamine A, a Marine-Derived Alkaloid, Inhibits Accumulation of Cholesterol Ester in Macrophages and Suppresses Hyperlipidemia and Atherosclerosis *in vivo*. *Bioorg. Med. Chem.* in press. 査読有

有

④ H. Yokosawa, S. Tsukamoto (他 6 名、8 番目) . Variabines A and B, New β -Carboline Alkaloids from the Marine Sponge *Luffariella variabilis*. *J. Nat. Med.* in press. 査読有

⑤ H. Yokosawa, S. Tsukamoto (他 10 名、12 番目) . Siladenoserinols A-L: New Sulfonated Serinol Derivatives from a Tunicate as Inhibitors of p53-Hdm2 Interaction. *Org. Lett.* **15**, 322-325, 2013. 査読有

⑥ S. Tsukamoto (他 3 名、4 番目) . Himeic Acids E-G, New 4-Pyridone Derivatives from a Culture of *Aspergillus* sp. *Chem. Pharm. Bull.* **61**, 105-107, 2013. 査読有

⑦ H. Yokosawa, S. Tsukamoto (他 9 名、11 番目) . Manadosterols A and B, Sulfonated Sterol Dimers Inhibiting Ubc13-Uev1A Interaction, Isolated from the Marine Sponge *Lissodendryx fibrosa*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1495-1499, 2012. 査読有

⑧ H. Yokosawa, S. Tsukamoto (他 15 名、17 番目) . Hirtioreticulines A-E, Indole Alkaloids Inhibiting the Ubiquitin-activating Enzyme, from the Marine Sponge *Hyrtios reticulatus*. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 4437-4442, 2012. 査読有

⑨ 塚本佐知子、横沢英良. ユビキチン修飾系を標的とする創薬シーズの探索 (総説) . 実験医学・増刊「シグナル伝達 研究最前線 2012」、編集: 井上純一郎、他、羊土社、**30**、171-176、2012. 査読有

⑩ S. Tsukamoto (他 5 名、6 番目) . Spiroamidine, a New Spiroquinone-containing Alkaloid from the Marine Sponge *Leucetta microraphis*. *Tetrahedron Lett.* **52**, 5342-5344, 2011. 査読有

⑪ H. Yokosawa, S. Tsukamoto (他 11 名、13 番目) . Isolation of Salsolinol, a Tetrahydroisoquinoline Alkaloid, from the Marine Sponge *Xestospongia* cf. *vansoesti* as a Proteasome Inhibitor. *Chem. Pharm. Bull.* **59**, 287-290, 2011. 査読有

⑫ S. Tsukamoto (他 8 名、8 番目) . Triterpenes Isolated from *Zizyphus jujuba* Inhibit the Foam Cell Formation in Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 4544-4552, 2011. 査読有

⑬ S. Tsukamoto (他 8 名、8 番目) . Anti-obesity Compounds in Green Leaves of *Eucommia ulmoides*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 1786-1791, 2011. 査読有

⑭ 塚本佐知子、横沢英良. ユビキチン依存的タンパク質分解系を標的とする創薬 (総説) . 化学と生物、**49**, 745-754, 2011. 査読無

⑮ S. Tsukamoto, H. Yokosawa (他 8 名、1

番目) . Aaptamine, an Alkaloid from the Sponge *Aaptos suberitoides*, Functions as a Proteasome Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 3341-3343, 2010. 査読有

⑯ S. Tsukamoto, H. Yokosawa. Inhibition of the Ubiquitin-proteasome System by Natural Products for Cancer Therapy (Review). *Planta Med.* **76**, 1064-1074, 2010. 査読有

⑰ 塚本佐知子、横沢英良. タンパク質分解の不思議: ユビキチン-プロテアソームシステムの仕組みと創薬 (総説) . 愛知学院大学薬学会誌 **3**, 1-18, 2010. 査読無

[学会発表] (計 57 件)

① 古里あかね、海綿から単離した新規 manzamine 類縁体の構造、日本薬学会第 133 回年会、2013. 3. 29、パシフィコ横浜 (横浜)

② 塚本佐知子、ユビキチンシステムに対する新規阻害剤の海洋天然資源からの単離、第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 16、福岡国際会議場 (福岡)

③ 塚本佐知子、p53 の作用増強に着目した天然薬物探索、第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2012. 11. 1、大阪大学 (大阪)

④ 加藤光、海綿 *Hyrtios reticulatus* から得られた E1 阻害物質 hyrtioreticulins、第 54 回天然有機化合物討論会、2012. 9. 18、東京農業大学 (東京)

⑤ 今田久美子、海綿 *Hyrtios reticulatus* から得られた新規化合物 hyrtioreticulins A-E の E1 阻害活性、日本生薬学会第 59 回年会、2012. 9. 17、かずさアカデミアパーク (千葉)

⑥ S. Tsukamoto, The Search for Drug Leads Inhibiting the Ubiquitin-proteasome System from the Natural Sources (Invited), 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012. 7. 15, Kochi City Culture-Plaza Cul-Port (Kochi, Japan)

⑦ H. Kato, Hyrtioreticulins A-E, Indole Alkaloids Inhibiting the Ubiquitin-activating Enzyme from the Marine Sponge *Hyrtios reticulatus*, 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012. 7. 13, Kochi City Culture-Plaza Cul-Port (Kochi, Japan)

⑧ Y. Nakamura, Siladenoserinols A-L: New Serinolipids Inhibiting the p53-Hdm2 Interaction, Isolated from an Ascidian *Didemnum* sp., 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012. 7. 13, Kochi City Culture-Plaza Cul-Port (Kochi, Japan)

⑨ S. Tsukamoto, Biosynthetic study on notoamides. International Conference of Natural Products Biosynthesis (ICNPB). Enzymology, Structural Biology, Drug

Discovery and Genome Mining (8th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products), 2012. 6. 17, Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji, Japan)

⑩ 塚本佐知子、ユビキチン-プロテアソームシステムを標的とする創薬研究 (招待)、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 31、北海道大学 (札幌)

⑪ 長澤由美子、海綿 *Leucetta microraphis* から単離したスピロキノン骨格を有する新規アルカロイド spironaamidine の構造、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 30、北海道大学 (札幌)

⑫ S. Tsukamoto, Biosynthetic Study on Enantiomeric Prenylated Indole Alkaloids (Invited), VIIth Japan-U.S. Seminar on Bioorganic Marine Chemistry: Biological Origins, Functions and Applications, 2011. 12. 13, Laguna Garden Hotel (Naha, Japan)

⑬ 中村優一、インドネシア産群体ボヤ *Didemnum* sp. より得られた新規 serinolipids の構造決定、第 53 回天然有機化合物討論会、2011. 9. 27、大阪国際交流センター (大阪)

⑭ 牛山俊太郎、海綿 *Lissodendoryx fibrosa* より得られた Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害を示す新規ステロール二量体に関する研究、日本生薬学会第 58 回年会、2011. 9. 24、昭和大学 (東京)

⑮ 山之口瑠美、*Hyrtios* 属海綿に含まれるインドールアルカロイドの構造と生物活性、日本薬学会第 131 回年会、2011. 3. 29、ツインメッセ静岡 (静岡)

⑯ 山口道考、p53-Hdm2 複合体形成阻害活性を示す海綿成分について、日本薬学会第 131 回年会、2011. 3. 29、ツインメッセ静岡 (静岡)

⑰ S. Tsukamoto, Search for Inhibitors of the Ubiquitin-proteasome System from the Natural Sources for Drug Development (Invited), PACIFICHEM 2010, 2010. 12. 20, Convention Center (Honolulu, USA)

⑱ S. Tsukamoto, Biosynthesis of Notoamides (Invited), PACIFICHEM 2010, 2010. 12. 20, Convention Center (Honolulu, USA)

⑲ S. Tsukamoto, The Search for Inhibitors of the Ubiquitin-proteasome System for Drug Development (Invited), 2010 Chinese Academy of Engineering Forum in Frontiers of Medical Sciences and Workshop on "Discovery of Drug Leads from Special Environmental Microbes"; 2010. 12. 4, Jinan University (Guangzhou, China)

⑳ 塚本佐知子、ユビキチン-プロテアソーム

システムを標的とする生物活性物質の探索 (招待)、平成 22 年度有機合成化学講演会 合成有機化学のフロンティア、2010. 5. 21、九州大学 (福岡)

〔図書〕 (計 1 件)

① 塚本佐知子、シーエムシー出版、「マリンバイオテクノロジーの新展開」、2011、pp55-73

〔産業財産権〕

○出願状況

(計 3 件)

①名称：新規なユビキチン活性化酵素阻害剤及び該阻害剤を含む医薬品

発明者：塚本佐知子

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：特願 2012-110583

出願年月日：2012 年 5 月 14 日

国内外の別：国内

②名称：ステロール二量体

発明者：塚本佐知子、レミーマンギンダアン

権利者：熊本大学、Sam Ratulangi University

種類：特許

番号：特願 2011-189831

出願年月日：2011 年 8 月 31 日

国内外の別：国内

③名称：群体ボヤ由来の新規 Mdm2 拮抗剤およびその製造方法

発明者：塚本佐知子、レミーマンギンダアン

権利者：熊本大学、Sam Ratulangi University

種類：特許

番号：特願 2011-189870

出願年月日：2011 年 8 月 31 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/shoyaku/site/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 佐知子 (TSUKAMOTO SACHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70324093

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

横沢 英良 (YOKOSAWA HIDEYOSHI)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：90012765