

平成 22 年 4 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19310140
 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開発
 研究課題名（英文） Search for Natural Products Which Enhance the Effect of Tumor Suppressor Protein
 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である p53 タンパク質は、細胞のがん化を抑える重要な働きをしている。したがって p53 の働きを増強する薬剤は、がんを治療できると考えられる。本研究では、p53-Hdm2 複合体形成と Ubc13-Uev1A 複合体形成の阻害を指標として、海洋資源から p53 の作用を増強させる低分子化合物の探索を行った。さらに、当研究室において既に確立したアッセイ系を用いて、広くユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害物質の探索を行った。

研究成果の概要（英文）：p53 plays an important role on suppression of tumor, and the drugs which enhance the effect of p53 will treat a various cancer. In this study, we search for compounds, which inhibit the interactions of p53-Hdm2 and Ubc13-Uev1A from marine organisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：ユビキチン、プロテアソーム、がん抑制遺伝子産物、抗がん剤、p53、天然低分子化合物、海洋生物

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子産物である p53 タンパク質は、細胞のがん化を抑える働きをしている重要なタンパク質で「ゲノムの番人」とよばれている。最近、以下のように p53 の働きを増

強することにより、がんを治療することを目指した研究が行われている。(1) p53 遺伝子の変異は約 50%のヒトがんで見ついている。そこで、変異をもったがん細胞に野生型 p53 遺伝子をウイルスに組み込んで導入する遺伝子治療の研究が行われている。しかし、す

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、臨床応用には至っていない。(2) また、変異型 p53 を活性化して正常な働きをさせる低分子化合物の開発も行われている。しかし、臨床応用可能な薬剤の誕生には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、p53 の働きを増強する第 3 の方法として、p53 の負の調整因子である Mdm2 の作用を阻害することにより、がん抑制遺伝子産物である p53 の作用を増強させることのできる天然低分子化合物を開発し、がんをアポトーシスに導くことを目指した。ユビキチン-プロテアソームシステムを阻害する物質が、新しい機序で作用する抗がん剤として期待されている。そこで、新規抗がん剤の開発を目標として、このシステムを阻害することにより p53 の作用を増強させる化合物を天然資源から探索する。さらに、当研究室において既に確立したアッセイを用いて、広くユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害物質の探索を行う。

3. 研究の方法

本研究は、研究協力者である 北海道大学 大学院薬学研究科生体機能科学分野（現・愛知学院大学薬学部）の横沢英良 教授との緊密な連携のもと、以下の方法で行った。当初、p53 の作用を増強させる化合物を探索するため、ユビキチン-プロテアソームシステムの中でも分解すべき標的タンパク質を認識する E3 酵素である Hdm2 と COP1 を標的とすることを計画した。さらに本研究課題の遂行中、p53 の作用を増強させる別の標的として E2 酵素の一つである Ubc13-Uev1A 複合体形成を阻害する化合物の探索も行った。

(1) 海洋生物の採集とスクリーニング用サンプルの調製

本研究課題では、能登半島の海洋資源に加えて、インドネシアのサンゴ礁海域で採集した海綿やホヤなどの無脊椎動物の抽出物や、その海洋生物から当研究室で単離した海洋微生物の培養液を用いてスクリーニングを行った。インドネシアでの採集は、平成 18-20 年度文科省科学研究費（基盤研究(B)）の海外学術研究『北太平洋熱帯サンゴ礁海域に棲息する無脊椎動物の生理・生態に関する調査研究』および日本証券奨学財団平成 20 年度研究調査助成の支援によるものである。また、採集は、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との共同研究により行った。

(2) 活性試験の遂行

p53-Hdm2 複合体形成阻害活性
p53-Hdm2 複合体形成を、ELISA 法により検出した。p53 と Hdm2 は大腸菌で発現・精製し、両者の複合体形成に対する阻害作用を、抗 Mdm2 抗体を用いた ELISA 法により検出した。
p53-COP1 複合体形成阻害活性
p53 と GST タグを付加した COP1 を大腸菌で発現・精製し、両者の複合体形成に対する阻害作用を、抗 GST 抗体を用いた ELISA 法で検出した。

Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害活性

Ubc13 と Flag タグを付加した Uev1A を大腸菌で発現・精製し、両者の複合体形成に対する阻害作用を、抗 Flag 抗体を用いた ELISA 法で検出した。

(3) 阻害物質の精製・構造決定

(2) に示した活性試験を行い、活性を示したサンプルからカラムクロマトグラフィーおよび HPLC により阻害物質の精製を行った。得られた化合物の構造は、NMR などの機器スペクトルを用いて決定した。

(4) 構造-活性相関および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、阻害作用の発現に關与する部分構造を明らかにした。また、阻害機構についても解析を行った。

4. 研究成果

【研究の主な成果】

本研究課題においては、プロテアソームに対する阻害物質として salsolinol 類縁体と aaptamine 類縁体が得られた。Ubc13-Uev1A 複合体の形成を阻害する物質として leucettamol A を単離した。本化合物は、以前ラセミ体と報告されていたが、本研究で単離したことをきっかけとしてスクリプス研究所(アメリカ)の Molinski 教授によりラセミ体ではないことが示され絶対配置が決定された。また、当研究室において以前 p53-Hdm2 複合体形成阻害物質として発見した (-)-hexylitaconic acid については、絶対配置が決定されていなかったが、本研究で単離したことをきっかけとして、北海道大学の門出博士によりキラル炭素は R 配置であることが明らかとされた。これら成果の詳細は、以下の通りである。

(1) 海綿 *Xestospongia* cf. *vansoesti* から得た salsolinol 類縁体が示すプロテアソーム阻害活性について

2006年12月にインドネシア北スラウェシ島レンベで採集した海綿 *Xestospongia* cf. *vansoesti* (湿重量 400 g) の EtOH 抽出物が、HeLa 細胞に対して細胞毒性を示し、またプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害した。そこで、活性物質を精製した結果、4種類の化合物、salsolinol (1, 191.8 mg)、norsalsolinol (2, 4.96 mg)、*cis*-4-hydroxysalsolinol (3, 1.35 mg)、および *trans*-4-hydroxysalsolinol (4, 3.68 mg) を単離した。1は、ラセミ体であった。1は、ヒトデ、アメフラシ、バナナから単離されていることに加えて、アルコール依存症患者の尿からも検出されている。2は、ヒトの大脳基底核から検出されている。3と4は、合成例は報告されているが天然資源からの単離例は本研究が初めてである。1と2はともに、HeLa に対する細胞増殖抑制作用とプロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用を示したが、3と4はそれらの作用を示さなかった (Table 1) (論文 投稿中、学会発表 2)。

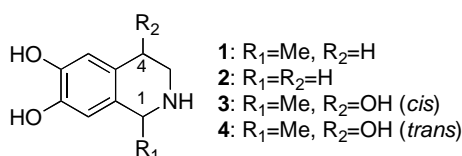


Table 1. Biological Activities of 1-4 (IC₅₀ (μg/mL)).

Compound	Proteasome inhibition	Cytotoxicity
1	50	17
2	32	7
3	<i>a</i>	>50
4	<i>a</i>	>50

^a Not inhibited even at 100 μg/mL.

(2) 海綿 *Leucetta* aff. *microrhaphis* から得た Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害物質 leucettamol A

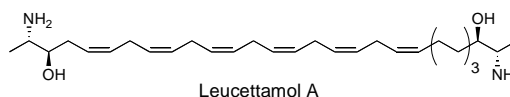
ユビキチン依存的タンパク質分解系において、E2 酵素の一つである Ubc13 は、Uev1A とヘテロ複合体を形成することにより、p53 の単量体化と核外輸送を誘起し、また一方、Ubc13 のノックダウンにより p53 の転写活性化が誘導される (Laine *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 8901, 2006)。したがって、Ubc13-Uev1A 複合体の形成を阻害する物質は、p53 の転写活性化を誘導でき、抗がん剤の候補になると考えられる。そこで、大腸菌で発現・精製した Ubc13 と Uev1A を用

いて ELISA 法により複合体の形成を阻害する化合物のスクリーニングを行った。その結果、2006年9月にインドネシアのマナドツアデウア島周辺で採集した海綿 *Leucetta* aff. *microrhaphis* の抽出物に、Ubc13-Uev1A 複合体の形成を阻害する活性が認められたので、化合物の精製を行った。そして、以前、抗菌物質として単離された (Kong *et al.*, *J. Org. Chem.*, **58**, 970, 1993) leucettamol A を得た。Leucettamol A の Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害作用は、IC₅₀ 値が 50 μg/mL であったが、アセチル化すると阻害活性が消失したので、leucettamol A に含まれるアミノ基と水酸基は、Ubc13-Uev1A 複合体形成の阻害に必要であると考えられる。また、leucettamol A を還元すると IC₅₀ 値は 4 μg/mL と強くなった。Ubc13 は、MMS2 とヘテロ複合体を形成するが、leucettamol A は、Ubc13-MMS2 複合体形成を阻害しなかったため、Uev1A に結合している可能性が考えられる (雑誌論文 8、学会発表 9、10)。

Leucettamol A は、単離された当初は、ラセミ体であると報告されていたが、deconvoluted exciton coupled CD 法により、絶対立体配置が 2*R*, 3*S*, 28*S*, 29*R* であることが明らかとなった (雑誌論文 5)。



Leucetta aff. *microrhaphis*



(3) 海綿 *Aptos* *suberitoides* から得られたプロテアソーム阻害物質

2006年12月にインドネシアのマテハゲ島で採集した海綿 *Aptos* *suberitoides* の EtOH 抽出液にプロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害活性と HeLa 細胞に対する細胞増殖阻害活性が認められた。そこで、抽出液を EtOAc さらに *n*-BuOH で抽出したところ、*n*-BuOH 画分と残りの水層に活性が認められた。そして *n*-BuOH 層と水層を精製したところ、活性成分として aaptamine, isoaptamine, demethylaaptamine が得られた。精製した化合物を用いて、プロテアソームのキモトリプシン様、トリプシン様、カスパーゼ様活性および細胞増殖阻害活性を調べた (Table 2)。プロテアソーム阻害作用については、各化合物の3種類の活性に対する阻害の程度に大きな差が認められなかった。

また、3種類の活性の中では、トリプシン様活性に対する阻害が他の2種類の活性に比べて弱かった。一方、細胞増殖阻害活性は3種類の化合物で差が認められた。以上のことから、細胞増殖阻害活性は、プロテアソーム阻害によるものではないことがわかる(論文1、学会発表3、7)。



Aaptos suberitoides

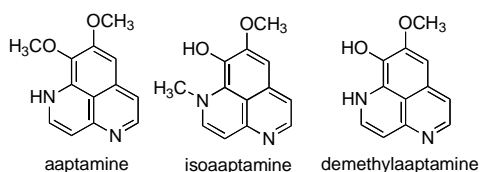


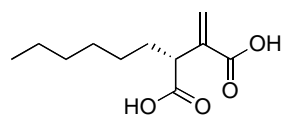
Table 2. Biological activities (IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)) of 1-3.

Compound	Proteasome inhibition			Cytotoxicity
	CT-L	T-L	C-L	
1	1.6	18	2.7	15
2	2.1	10	2.4	3.1
3	2.1	12	2.3	1.4

CT-L, chymotrypsin-like; T-L, trypsin-like; C-L, caspase-like.

(4) 海洋由来 *Arthrinium* 属真菌から得られた Hdm2 拮抗物質(-)-hexylitaconic acid について

以前 *Arthrinium* 属真菌の培養液から Hdm2 拮抗物質として単離した(-)-hexylitaconic acid (S. Tsukamoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 69-71 (2006)) は、p53-Hdm2 複合体形成を IC_{50} 値が 50 $\mu\text{g/mL}$ で阻害した。本化合物については、(+)-体のもも含めて植物や菌の培養液からの単離がこれまでに数例報告されているにもかかわらず、この不斉炭素の立体配置は決定されていなかった。そこで、本研究課題において化合物が単離されたのをきっかけとして、北海道大学の門出先生により、(-)-体は(R)-配置であることが VCD を用いた研究により明らかにされた。その研究の際に(+)-体のものが合成されたので、両者の p53-Hdm2 複合体形成阻害作用を比較したが、(+)-体と(-)-体は同程度の阻害作用を示した。したがって、p53 と Hdm2 の相互作用にはこの炭素の立体配置は影響を与えていないと考えられる(論文4、学会発表6、8)。



(R)-(-)-Hexylitaconic acid

本研究課題において、2種類の海綿からプロテアソーム阻害物質を単離した。海綿 *Xestospongia* cf. *vansoesti* からは salsolinol (1)、norsalsolinol (2)、*cis*-4-hydroxysalsolinol (3)、および *trans*-4-hydroxysalsolinol (4) を、海綿 *Aaptos suberitoides* からは、aaptamine, isoaptamine, demethylaaptamine を単離した。それぞれの化合物のプロテアソーム阻害活性はあまり強くはなかったが、現在も、阻害物質の探索を行っている。一方、海綿 *Leucetta* aff. *microrhaphis* からは、Ubc13-Uev1A 複合体 (E2 酵素) の形成を阻害する化合物として leucettamol A を得た。E2 酵素に対する阻害物質の発見は、本化合物が唯一の例であり発見の意義は大きい。また、以前 Hdm2 拮抗物質として単離した(-)-hexylitaconic acid については、今回、合成した(+)-体を用いて活性を比較したが、ほぼ同程度の活性を示したので絶対立体配置は活性とは関係がないことが分かった。

本研究課題において leucettamol A や (-)-hexylitaconic acid を単離したことをきっかけとして、他の研究者により絶対立体配置が決定された。このことは、天然物の発見が他の周辺分野に対して研究のシーズとなることを示している。

今後は、本研究課題において確立したアッセイ系を用いて、さらに特異性が高く活性の強い化合物の発見を目指すとともに、新たなアッセイ系の確立が課題である。

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7件)

1. S. Tsukamoto, H. Yokosawa (10名のうち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
2. S. Tsukamoto, H. Yokosawa. Inhibition of the Ubiquitin-proteasome System by Natural Products for Cancer Therapy (Review). *Planta Medica* in press (2010). 査読有
3. S. Tsukamoto, H. Yokosawa. Targeting

the Proteasome Pathway(Review). *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 605-621 (2009). 査読有

4. A. Nakahashi, N. Miura, K. Monde, S. Tsukamoto. Stereochemical Studies of Hexylitaconic Acid, an Inhibitor of p53-HDM2 Interaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3027-3030 (2009). 査読有
5. D. S. Dailisay, S. Tsukamoto, T. F. Molinski. Absolute Configuration of the α,ω -Bifunctionalized Sphingolipid Leucettamol A from *Leucetta* sp. by Deconvoluted Exciton Coupled CD. *J. Nat. Prod.* **72**, 353-359 (2009). 査読有
6. 塚本佐知子、横沢英良. 展開するプロテアソーム阻害剤研究(総説). 実験医学・増刊「細胞内の輪廻転生 タンパク質の分解機構」, 編集: 田中啓二、羊土社、**26**、122-127、2008. 査読有
7. 塚本佐知子. コピキチンリガーゼを分子標的とする新規抗がん剤の海洋生物からの探索(総説). 薬学研究所の進歩 **24**、45-51、2008. 査読有
8. S. Tsukamoto, T. Takeuchi, H. Yokosawa (10名のうち1番目). Leucettamol A: A New Inhibitor of Ubc13-Uev1A Interaction Isolated from a Marine Sponge, *Leucetta* aff. *microrhaphis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6319-6320 (2008). 査読有

[学会発表](計12件)

1. 塚本佐知子、創薬を指向した天然薬物学研究(日本薬学会学術振興賞受賞講演)(招待)、日本薬学会第130回年会、2010年3月28日、岡山(全日空ホテル)。
2. 長澤由美子、海綿 *Xestospongia* cf. *vansoesti* から得られたテトラヒドロイソキノリンアルカロイドの構造と生物活性、日本薬学会第130回年会、2010年3月28日、岡山(桃太郎アリーナ)。
3. 山之口瑠美、海綿 *Aptos suberitoides* より得られた aaptamine 類のプロテアソーム阻害作用、日本薬学会第130回年会、2010年3月28日、岡山(桃太郎アリーナ)。
4. 塚本佐知子、コピキチン-プロテアソームシステムを標的とする海洋由来低分子化合物の探索、第51回天然有機化合物討論会、2009年10月7日、名古屋(名古屋市公会堂)。
5. 塚本佐知子、海洋由来真菌から得られた新規 notoamides の構造と生合成経路に関する考察、日本生薬学会第56回年会、2009年10月3日、京都(京都薬科大学)。
6. Atsufumi Nakahashi, Stereochemical

studies of hexylitaconic acid, an inhibitor of p53-HDM2 interaction; Chirality 2009 (ISCD): 21st International Symposium and Exhibit on Chirality. 2009. 7. 12., Breckenridge (Colorado), USA.

7. 塚本佐知子、海綿 *Aptos aptos* から得られたプロテアソーム阻害物質、日本薬学会第129回年会、2009年3月26日、京都(国立京都国際会館)。
8. 中橋徳文、p53-Hdm2 複合体形成阻害物質ヘキシルイタコン酸の赤外円二色性による立体化学解析、日本化学会第89春季年会、2009年3月27日、船橋(日本大学船橋キャンパス)。
9. 塚本佐知子、コピキチン-プロテアソームシステムを阻害する leucettamol A とその誘導体の活性について、第12回がん分子標的治療研究会総会、2008年6月26日、東京(学術総合センター)。
10. 塚本佐知子、インドネシア産海綿 *Leucetta microrhaphis* から得られたプロテアソーム阻害物質、日本薬学会第128回年会、2008年3月26日、横浜(パシフィコ横浜)。
11. 塚本佐知子、コピキチンシステムを標的とする天然からの創薬リード化合物の探索、日本薬学会第128回年会、2008年3月26日、横浜(パシフィコ横浜)。
12. 塚本佐知子、コピキチン依存的分解系を標的とする海洋生物由来の低分子化合物の探索、大阪府立大学有機化学研究会第48回講演会(白鷺セミナー)、2007年10月24日、大阪(大阪府立大学)。

[図書](計1件)

1. 塚本佐知子、アイピーシー、天然物化学: 海洋生物編、2008、pp. 173-190.

[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