

21年6月12日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790092
 研究課題名 (和文) プロテアソームの機能制御に基づいた新規抗癌剤の作用に関する研究
 研究課題名 (英文) A study on a novel anticancer drug candidate regulating proteasome activity

研究代表者 長谷川 慎 (HASEGAWA MAKOTO)
 長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師
 研究者番号：10367899

研究成果の概要：

ベラクトシン A は、強いプロテアソーム阻害作用を持つ天然化合物である。当該化合物の結合するプロテアソーム内のサブユニットを同定するために、細胞膜透過性の高い蛍光標識誘導体を作成した。これを用いて *in vivo* と *in vitro* の薬剤の挙動を比較したところ、*in vitro* では、 $\beta 5$ サブユニットに優先的に結合し遅い結合解離速度を示すが、*in vivo* においては $\beta 1$ サブユニットに優先的に結合し速い結合解離速度を示すことがわかった。この違いは制御サブユニットである 19S 複合体の影響によるものと示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子機能学・プロテアソーム・翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

蛋白質分解は、遺伝子転写制御とは逆方向から蛋白質量の調節を行い、細胞内のさまざまなイベントに関わっている。蛋白質分解の主要経路のひとつがユビキチン-プロテアソーム系である (Baumeister, Cell, 92, 367, 1998)。プロテアソームはすべての細胞に存在する酵素複合体であり、ポリユビキチン化された蛋白質をすみやかに分解する。プロテアソームは数 10 の構成要素からなる複合体であるが、蛋白質分解を担うのが中心部に位置する $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ という 3 種類のサブユ

ニットである。これらは、異なる切断特異性を持つプロテアーゼであり、それぞれカスパーゼ・トリプシン・キモトリプシンに似た性質を持つ。1990 年代より、プロテアソームを阻害することにより、各種のがん細胞に由来する培養細胞株のアポトーシスを誘導することが知られていた。プロテアソーム阻害剤が新しい作用機序を持つ抗がん剤として応用できる可能性が示唆され、この仮説に基づき創薬探索がなされてきた。代表例としてボルテゾミブというプロテアソーム阻害剤は、2003年に米国、2006年には本邦でも認

可され、再発または難治性の多発性骨髄腫の治療に用いられている。ボルテゾミブはさらなる適用拡大が検討されており、また複数の抗がん剤候補プロテアソーム阻害剤が治験研究されている。

本研究において中心となるベラクトシン A は、協和発酵キリン (株) により放線菌の代謝物から単離同定された非天然アミノ酸を含む低分子化合物であり (Asai, *Biochem Pharmacol.*, 67, 227, 2004)、顕著な抗がん活性を有することが知られている (図 1)。作用機序解析の結果、ベラクトシン A がプロテアソームの阻害効果を持つことが見出され、抗がん活性のメカニズムがベルケードと同様に蛋白質分解機能の抑制にあることが示唆されている。ベルケードは、 $\text{I}\kappa\text{-B}$ のプロテアソームによる分解を抑制することにより、転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性を抑え、骨髄腫細胞の増殖因子の遺伝子発現を低下させることが、作用仮説として考えられている。またその後の研究により、抗がん効果のメカニズムには $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活性の抑制のみでなく、アポトーシス誘導も含まれていることが知られている。そのアポトーシス誘導は、カスパーゼ-8 とカスパーゼ-9 の両方の活性化により引き起こされる (Chauhan, *Mol. Cancer Ther.*, 4, 686, 2005)。その機序は完全には解明されていないが、通常は迅速に分解されるミスフォールド蛋白質が、プロテアソーム阻害により顕著に蓄積することが要因として挙げられる。さらに、細胞周期の進行に影響を与えるような蛋白質、例えばがん抑制因子 p53 などの分解が阻害されることにより、細胞増殖の停止が起こることも知られている。これら複合的な要因が増殖の盛んながん細胞に顕著に影響し、最終的にアポトーシスを引き起こすものと考えられる。しかし、同じ作用メカニズムを持つと考えられてきたプロテアソーム阻害剤も転写因子の活性化阻害やアポトーシス経路を詳細に解析すると様相が異なる点があることが報告されてきている。例えば、臨床第 I 相にある NPI-0052 という化合物は、ボルテゾミブと同じプロテアソーム阻害剤ながら、明らかにアポトーシス誘導経路が異なることが報告されている (Chauhan, *Cancer Cell*, 8, 407, 2005)。阻害剤には、酵素サブユニットへの選択性に違いがあり、それに加えてプロテアソーム内の結合の速さや結合後の安定性の違いにより、異なる薬効を示すことが考えられる。しかし、その詳細についてはわかっていない。

2. 研究の目的

他のプロテアソーム阻害剤にないユニークな構造 (非天然アミノ酸・トリペプチド型・ β ラクトン) を持つベラクトシン A の直

接的結合サブユニットを同定する。さらに標識ベラクトシン A 誘導体を作製し、これらをケミカルプローブとして用い、相互作用解析を行なう。これにより、プロテアソームの薬剤取り込みと排出のメカニズムを明らかにする。阻害剤の取り込み・排出メカニズムを解明することで、低分子薬剤と作用の特徴を詳細に明らかにし、プロテアソーム阻害を基盤とする新しい分子標的抗がん剤のデザインに資することができるものと考えられる。

3. 研究の方法

ベラクトシン A のビオチン標識誘導体、ベラクトシン A (図 1、化合物 1) にベンジル基を導入して細胞膜透過性を高めた KF33955 (同、化合物 3)、これを蛍光標識化した dansyl-KF33955 (同、化合物 3) といった誘導体を用いた。精製プロテアソームに結合した標識薬剤、あるいは細胞に添加した薬剤の挙動を解析した。

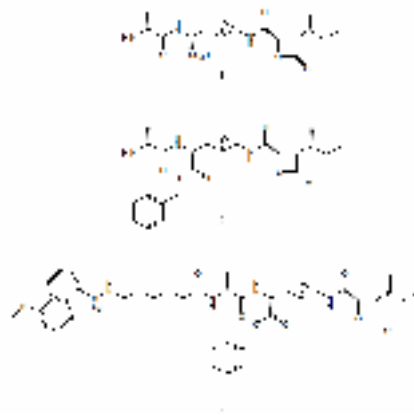


図 1 ベラクトシン A の分子構造

4. 研究成果

ベラクトシン A は、精製された 20S プロテアソームに対しては、蛋白質分解を担うサブユニットのうち $\beta 5$ サブユニットへの結合親和性が高いことが観察された。次いで、細胞内のプロテアソームへの作用を直接観察できる細胞膜透過性の高い標識ベラクトシン A 誘導体を開発した。これを用いて *in vivo* と *in vitro* の阻害作用を比較したところ、以下のような知見が得られた (図 2)。ベラクトシン A は *in vivo* においては $\beta 1 \rightarrow \beta 5 \rightarrow \beta 2$ サブユニットの順番に速く結合した後、非常に速く解離する (図 2 A) のに対し、*in vitro* では、経時的に $\beta 5 \rightarrow \beta 1 \rightarrow \beta 2$ サブユニットの順番にゆっくり結合した後、解離するが、その速度は遅い (図 2 C)。さらに、その詳細を 26S プロテアソーム再構成系で検討した (図 2 B)。検討の結果、この違いは細胞内

に存在する制御サブユニットである 19S 複合体の影響によるものと示唆された。一方、代表的なプロテアソーム阻害剤である MG132 においては、ベラクトシン A と全く異なる結合部位の経時変化を示した（未発表データ）。この知見において興味深い点として、阻害剤が結合するサブユニットが経時的に変化したことである。その理由の詳細は不明であるが、19S 複合体の調節とプロテアソーム中心部の高次構造の特殊性に起因している可能性がある。

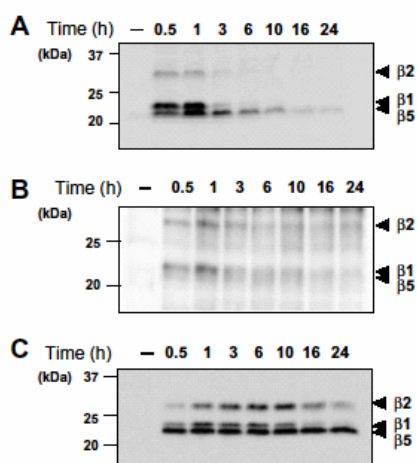


図2 ベラクトシン標識化合物 dansyl-KF33955 のプロテアソームへの結合動態の観察

近年、プロテアソームの基質取り込みのメカニズムが徐々に明らかにされつつある。プロテアソームは、その内部に基質を解いて取り込み、内面の触媒部位が分解を達成する点が特徴的である。調節蛋白質群は、通常閉じている樽型複合体の両端に結合することで、入り口を開口し、基質を内部に取り込めるようにする。この調節蛋白質群は、基底部構造と蓋部複合体からなり、ATP に依存した多段階の取り込みプロセスが提唱されている (Smith, Mol. Cell, 20, 687, 2005)。まず、①ATP の結合による樽状の中心部 (20S) 複合体の開口、次いで②ATP 加水分解から得たエネルギーにより分解基質の立体構造の解きほぐし、そして③20S 内腔への分解基質の移動である。この基質取り込みモデルは比較的単純な古細菌や酵母のプロテアソームについての解析結果から提唱されており、がん治療のターゲットとなるヒトなど高等動物のプロテアソームでは、まだほとんどわかって

いない。阻害剤の取り込みは、基質の場合と類似したメカニズムがあるものと考えられるが、上記①のプロセスのみで、拡散により 20S 内腔へ移動できることから、②以降のプロセスでは分解基質とは異なる挙動を取る可能性が高い (図3)。本研究の結果は、種々の阻害剤に固有のサブユニットへの作用選択性に関して、経時変化と *in vivo* と *in vitro* という観点から見直しをはかる必要があることを示唆する。今後、種々の阻害剤について検証することにより、この仮説を証明したい。

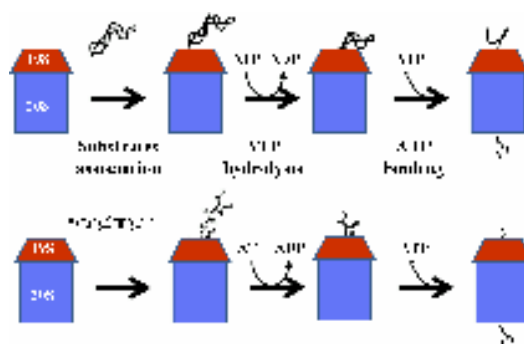


図3 26S プロテアソームの ATP 依存的タンパク質分解および阻害剤結合モデル (このモデルは、古細菌プロテアソーム解析に基づく (Smith DM et al. Molecular Cell, 2005, vol. 20, 687-698))

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 1 件)

Hasegawa, M., Kinoshita, K., Nishimura, C., Matsumura, U., Shionyu, M., Ikeda, S., and Mizukami, T. (2008) Affinity labeling of the proteasome by a belactosin A derived inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 5668-5671. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 木下和拓、西村千佳、池田俊一、長谷川慎、水上民夫「Belactosin A の細胞内プロテアソームへの結合動態解析」第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 26-27 日、東京
- ② 木下和拓、松村梅千代、西村千佳、園城倫子、橋本将宏、池田俊一、水上民夫、長谷川慎「プロテアソーム阻害化合物ベ

ラクトシンA誘導体による活性サブユニットの標識」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2005年12月11-14日、横浜

- ③ 長谷川慎、松村梅千代、西村千佳、池田俊一、水上民夫「ベラクトシンAの20Sプロテアソームへの結合特異性と酵素阻害作用の解析」第11回がん分子標的治療研究会総会、2005年7月5-6日、大阪

〔図書〕(計1件)

長谷川 慎、水上民夫「プロテアソーム阻害剤」がんの分子標的治療、p314-319、南山堂(2008)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：被験物質に対するプローブの結合親和性を測定する方法及びその利用

発明者：長谷川慎、川畑隆司、川瀬千晶、伊藤正恵、水上民夫

権利者：学校法人関西文理総合学園

種類：特許出願

番号：2007-089821

出願年月日：2007年3月29日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 慎 (HASEGAWA MAKOTO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：10367899

