

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710175  
 研究課題名（和文）  
 UBL-UBA型ユビキチンレセプターを標的とした新規抗癌剤の開発  
 研究課題名（英文）  
 Development of a novel anticancer drug targeting UBL-UBA family protein  
 研究代表者  
 川谷 誠 (Kawatani Makoto)  
 独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー評価研究チーム・研究員  
 研究者番号：50391925

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、UBL-UBA型ユビキチンレセプターに対する特異的阻害剤の開発を目的に行った。申請者は、抗腫瘍活性物質 GUT-70 が ubiquilin 1 と特異的に相互作用することを見出した。GUT-70 は細胞内ユビキチン化タンパク質を蓄積させ、さらに薬剤プロテオーム解析により、プロテアソーム阻害剤に似たタンパク質変動プロファイルを示すことが明らかとなった。以上より、GUT-70 は細胞内で ubiquilin 1 を標的にしてユビキチン・プロテアソームシステムを抑制することで、癌細胞の増殖を阻害していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to develop an anticancer agent targeting UBL-UBA family protein. I found that GUT-70, an antiproliferative compound, binds to ubiquilin 1. GUT-70 accumulated intercellular ubiquitinated proteins, and proteome analysis showed that GUT-70 is classified into the same cluster as a proteasome inhibitor. These results suggest that GUT-70 targets ubiquilin 1, thereby suppressing ubiquitin-proteasome system, resulting in the growth inhibition of cancer cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：UBL-UBA型ユビキチンレセプター、阻害剤、癌、

## 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は、細胞周期・アポトーシス・シグナル伝達・ストレス応答・DNA 修復などの様々な細胞活動制御において中心的な役割を担うタンパク質分解装置である。近年、癌、神経疾患、免疫疾患をはじめとする難治疾患の多くが、ユビキチンとプロテアソームから構成されるタンパク質分解装置の破綻が原因であると考えられるようになってきた。特に、癌治療においては、癌細胞内のプロテアソームの働きを阻害することにより異常タンパク質を蓄積させ、癌細胞を死滅させるという観点から、ユビキチン・プロテアソームシステムが有望な創薬ターゲットとして注目されている。

タンパク質へのユビキチン化反応には、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の 3 種類の酵素群が関与している。これまで、E3 の多様性が分解されるべき基質タンパク質の特異性を付与する最終ステップと考えられ、それ以降のステップ (ユビキチン鎖の認識、リフォールディング、脱ユビキチン化と分解) はいわば半自動的に進行していく過程と考えられてきた。しかし最近、ユビキチン鎖やプロテアソームと相互作用するタンパク質が次々と同定されたことにより、ユビキチン化修飾からその認識・分解へと至る間に、新たな基質タンパク質の受け渡し機構が存在する可能性が浮かび上がりつつある。

UBL-UBA 型ユビキチンレセプターは、C 末端領域に UBA (ubiquitin-associated) ドメイン、N 末端領域に UBL (ubiquitin-like) ドメインをもつユビキチン様タンパク質である。これまでに、UBA ドメインはポリユビキチン鎖に対して非常に高い親和性を示すこと、さらに UBL ドメインがプロテアソームと結合する性質を示すことなどが明らかになり、UBL-UBA 型ユビキチンレセプターは、ポリユビキチン化タンパク質を E3 からプロテアソームに運ぶシャトリングモデルが提唱されている (Madura, K., Trends Biochem. Sci., 29, 637-640, 2004)。しかし、ポリユビキチン鎖やプロテアソーム以外にも相互作用するタンパク質が知られていることや、ユビキチン・プロテアソームシステムを正に制御しているとも負に制御しているとも報告されていることなどから、その詳細な機能については未だ不明な点が多い。また最近の臨床研究で、染色体 9q22 上の ubiquilin1 の遺伝子異常がアルツハイマー病のリスクを大きく上昇させることが示され

た (Bertram, L. et al., N. Engl. J. Med., 352, 884-894, 2005)。すなわち、アルツハイマー病患者の脳標本から抽出した RNA において、選択的スプライシングを受けた ubiquilin 1 遺伝子 (エクソン 8 が欠損) の転写が有意に増加していた。

上記のような背景から、申請者は UBL-UBA 型ユビキチンレセプターに対する特異的阻害剤を開発できれば、それをツールとして UBL-UBA 型ユビキチンレセプターの生理機能を解明することができ、さらには癌やアルツハイマー病に対する有用な治療薬になるのではないかと考えた。現在、ユビキチン・プロテアソームシステムに作用する薬剤としては、1) プロテアソーム阻害剤 (Bortezomib, Lactacystin, Epoxomicin)、2) E1 阻害物質 (Panepophenanthrin)、3) E3 阻害物質 (Chlorofusin, Calcone C)、などが知られているが、UBL-UBA 型ユビキチンレセプター阻害作用を有する化合物は見つかっていない。また、Bortezomib は既に多発性骨髄腫に対する治療薬として米国 FDA に承認されているが、比較的副作用が強く問題となっており、副作用の少ない薬剤の開発が望まれている。UBL-UBA 型ユビキチンレセプター阻害剤を開発できれば、既存の薬剤とは作用点異なる新たな抗癌剤の創製に繋がる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、ケミカルバイオロジー的アプローチにより、UBL-UBA 型ユビキチンレセプターに対する特異的阻害剤を開発し、それをツールとして UBL-UBA 型ユビキチンレセプターのユビキチン・プロテアソームシステムにおける役割を明らかにする。さらに、UBL-UBA 型ユビキチンレセプター阻害剤が、ユビキチン・プロテアソームシステムを標的とした新たな抗癌剤になりうるか否かを疾患モデル動物で検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 化合物アレイを使った UBL-UBA 型ユビキチンレセプター阻害剤のスクリーニング

① ヒト ubiquilin 1、ubiquilin 2、HR23A 及び HR23B 遺伝子をクローニングして pRSET 発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させ、FPLC を用いてリコンビナントタンパク質を精製する。化合物アレイにそれぞれのリコンビナントタンパク質を反応させ、抗 His 抗体、蛍光標識 2 次抗体を処理した後、蛍光スキャナーでリコンビナントタンパク質に結合したヒット化合物を探索する。

② 候補化合物について、UBL-UBA 型ユビキチンレセプターとそれに相互作用するタンパク質 (ポ

リユビキチン鎖、プロテアソーム、p53 タンパク質、IκB タンパク質等)との結合を阻害するか否か検討する。候補化合物を細胞に添加し、ポリユビキチン化タンパク質の蓄積を Western Blot、免疫染色法で評価する。アガロースに候補化合物を固定化させたケミカルビーズを作製し、細胞抽出物を用いて、候補化合物の UBL-UBA 型ユビキチンレセプターに対する結合の特異性を検証する。

#### (2) 阻害剤を使った UBL-UBA 型ユビキチンレセプターの機能解析

①候補化合物処理細胞での基質タンパク質 (ポリユビキチン化タンパク質) のタンパク質分解性、プロテアソームとの親和性、細胞内局在などを検討する (RI 標識トレーサー試験、免疫染色等)。

②候補化合物処理細胞、UBL-UBA 型ユビキチンレセプターの過剰発現細胞あるいはノックダウン細胞を用いて、細胞周期、DNA 修復、染色体形成・分離、オートファジー、リソソーム分解における細胞表現型を比較評価する (FACS、免疫染色、Western Blot 等)。

#### (3) 阻害剤の抗腫瘍活性の評価

①候補化合物を様々なヒト癌細胞に処理し、増殖阻害活性 (MTT アッセイ) 及びアポトーシス誘導活性 (TUNNEL アッセイ) を評価する。

②候補化合物の in vivo における投与経路、投与量を検討する。候補化合物をマウスに静脈内、経口、皮下、腹腔内あるいは筋肉内投与し、血中濃度の経時変化を LC/MS/MS で測定する。多発性骨髄腫、固形癌等の癌細胞をヌードマウスに移植し、薬剤投与後の腫瘍の大きさ、血液パラメータ、延命効果について評価する。

#### 4. 研究成果

野生型 ubiquilin 1 タンパク質の化合物アレイによるリガンドスクリーニングを行った結果、およそ 7,000 化合物の中から ubiquilin 1 に相互作用している可能性のあるヒット化合物を数十種類見出した。

また、抗癌作用を有する植物由来低分子化合物 GUT-70 (Kimura, S., et al., *Int. J. Cancer*, 113, 158-165, 2005) に、ubiquilin 1 と相互作用する活性があることを見出した。

GUT-70 は、プロテアソーム活性を直接阻害することなく細胞内のユビキチン化タンパク質を蓄積させた。

HeLa 細胞を用いた薬剤プロテオーム解析を行った結果、GUT-70 はプロテアソーム阻害剤 (MG-132) や Hsp90 阻害剤

(Geldanamycin, Radicol) に似たタンパク質発現変動プロファイルを示した。

以上の結果より、GUT-70 は細胞内で ubiquilin 1 を標的にしてユビキチン・プロテアソームシステムを抑制することで、癌細胞の増殖を阻害していることが示唆された。

また、GUT-70 はユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導するだけでなく、Hsp90 クライアントタンパク質 (CDK4 など) の発現を低下させることがわかった。そこで、RNAi 法で HeLa 細胞の ubiquilin 1 をノックダウンしたところ、顕著な増殖阻害とともに CDK4 の発現低下が誘導された。これらのことから、ubiquilin 1 は Hsp90 クライアントタンパク質の発現制御に深く関わっていることが示唆された。

GUT-70 の in vivo における抗腫瘍活性を調べるために種々の検討をした結果、GUT-70 は難水溶性のため動物への投与実験が困難であることがわかった。そこで、分子モデリング手法によって選択したおよそ 150 種類の GUT-70 関連化合物について、細胞増殖阻害活性を評価した。その結果、GUT-70 よりも強い増殖阻害活性を示す化合物はなかったが、GUT-70 よりも疎水性が低く水に対する溶解度が高い計算値を示す化合物をいくつか見出すことに成功した。

#### 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 10 件)

- ① Kawatani M (16 名中 5 番目), Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in hypoxic environment. *Cell Death Diff.*, in press, 査読有
- ② Kawatani M and Osada H, Osteoclast-targeting small molecules for the treatment of neoplastic bone metastases. *Cancer Sci.*, 100, 1999-2005, 2009, 査読有
- ③ 川谷誠, グリオキサラーゼI, *Medical Tribune*, 42, 50, 2009, 査読無
- ④ 川谷誠, 奥村英夫, 長田裕之, レドックス制御に干渉する小分子のケミカルバイオロジー, *実験医学 (増刊)*, 27, 218-224, 2009, 査読無
- ⑤ 川谷誠, 長田裕之, 破骨細胞を標的とする天然低分子化合物のケミカルジェネティクス, *細胞工学*, 28, 338-344, 2009, 査読無
- ⑥ 川谷誠, 奥村英夫, 長田裕之, 破骨細胞の分化を阻害する小分子化合物, *バイオサイエンスとインダストリー*, 67, 24-28, 2009, 査読無
- ⑦ Kawatani M (7 名中 5 番目), Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-xL during pironetin-induced apoptosis. *Oncogene*, 28, 107-116, 2009, 査読有
- ⑧ Kawatani M (5 名中 4 番目), Robust and systematic drug screening method using

chemical arrays and the protein library: identification of novel inhibitors of carbonic anhydrase II. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 2739-2749, 2008, 査読有

- ⑨ Kawatani M (11名中1番目), The identification of an osteoclastogenesis inhibitor through the inhibition of glyoxalase I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 11691-11696, 2008, 査読有
- ⑩ Kawatani M (10名中4番目), Synthesis and biological activities of reveromycin A and spirofungin A derivatives. Bioorg. Med. Chem. Lett., 18, 3756-3760, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計7件)

- ① 川谷誠、Identification of a novel DNA topoisomerase II inhibitor by proteomic profiling、AACR-NCI-EORTC International Conference “Molecular Targets and Cancer Therapeutics”、2009年11月15-19日、ボストン
- ② 川谷誠、Methyl gerfelin, a small molecule inhibitor of osteoclastogenesis that acts via inhibition of glyoxalase I, The 26<sup>th</sup> Naito Conference —Osteobiology—、2009年11月4-7日、淡路島
- ③ 川谷誠、分化誘導活性物質NPD723の作用機構解析、第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、2009年6月24-26日、徳島
- ④ 川谷誠、Screening and target identification of bioprobes、第1回理研ケミカルバイオロジー研究領域国際シンポジウム、2008年9月26-27日、熱海
- ⑤ 川谷誠、抗腫瘍活性物質GUT-70の作用機構解析、第12回がん分子標的治療研究会総会、2008年6月26-27日、東京
- ⑥ 川谷誠、The identification of a novel inhibitor of osteoclastogenesis that acts via inhibition of glyoxalase I、第4回日韓合同シンポジウム、2008年5月21-23日、日光
- ⑦ 川谷誠、抗腫瘍活性物質BNS-22はDNA topoisomerase II活性を阻害する、日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会、2008年5月19-20日、東京

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：新規ユビキリン結合性小分子  
発明者：長田裕之、川谷誠、木村晋也、前川平、水戸潤  
権利者：理化学研究所、京都大学  
種類：特願  
番号：2008-120575  
出願年月日：2008年5月2日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川谷 誠 (Kawatani Makoto)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー  
評価研究チーム・研究員

研究者番号：50391925

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者