

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670047

研究課題名(和文) ユビキチン結合酵素E2に対する特異的阻害物質の探索と創薬戦略

研究課題名(英文) Search for specific inhibitors of the ubiquitin-conjugating enzyme E2

## 研究代表者

塚本 佐知子 (Tsukamoto, Sachiko)

熊本大学・生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：70324093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン修飾系は、多様な機構でタンパク質機能を調節することにより、多彩な生命現象の制御に中核的役割を果たす。そして、ユビキチン修飾系の多様な機能は、多様なE2やE3の働きにより形成されるポリユビキチン鎖の構造的多様性を分子基盤としている。本研究では、ユビキチン修飾系の多様な機能の解明を目指し、K11-ユビキチン鎖の形成に対する新規阻害物質を天然資源から探索した。初めに、K11-ユビキチン化に關与するE2であるUBE2Sの作用を検出するアッセイ系を確立し、当研究室で保有する薬用資源抽出物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、阻害物質の精製と構造決定に着手した。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin chain in different topologies related to distinct functional consequences, including protein degradation, NF- $\kappa$ B activation, and DNA repair. The ubiquitin chain assembly is mostly promoted by E2s, but the linkage specificity by E2s is hardly understood. In this study, we searched for UBE2S inhibitors from natural sources as bio-probes to study the mechanisms of K11-ubiquitin chain elongation. We established the in-house screening system for UBE2S inhibitors and found the several positive extracts from our library of extracts of natural sources. The isolation and structure determination of the inhibitors are in progress.

研究分野：天然物化学

キーワード：ユビキチン結合酵素E2 UBE2S Ubc13 ユビキチン修飾系

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系はE1/E2/E3の3種の酵素群から構成され、多数存在するE3(約600種類)が標的タンパク質を選択的に識別し、次々とユビキチンを付加してポリユビキチン鎖を生成する(図1)。当初、ユビキチン修飾系はタンパク質分解系の一部として発見されたが、現在では、分解も含め多様な機構でタンパク質機能を調節することにより、多彩な生命現象の制御において中核的役割を果たすことが次々と明らかにされている。ユビキチン修飾は、分子内に7個存在するLys(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63)あるいはN末端Met(M1)を介した8種のユビキチン間の結合を介して起こり、ポリユビキチン鎖としての構造的多様性を獲得する(図2)。そして、形成されたポリユビキチン鎖の種類によってタンパク質の制御機構が異なることから、ポリユビキチン鎖の構造的多様性はユビキチン修飾系が多様な機能を果たし得る分子基盤であると考えられる。ユビキチン修飾の多様性は、多様なE2(40種類)あるいはE3(600種類)の機能に基づくと考えられるが、E2に関する研究はあまり進んでいない。そのような状況の中で、E2酵素のUBE2SとUbc13がK11-ユビキチン鎖とK63-ユビキチン鎖の形成をそれぞれ規定することが構造生物学的に明らかにされた(Kulathu & Komander, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 508, 2012)。

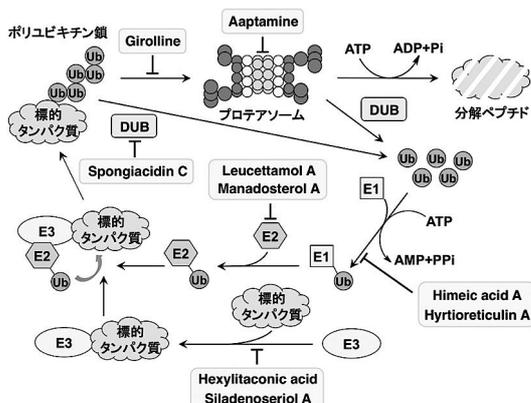


図1. UPSと本研究代表者らが発見したUPS阻害物質

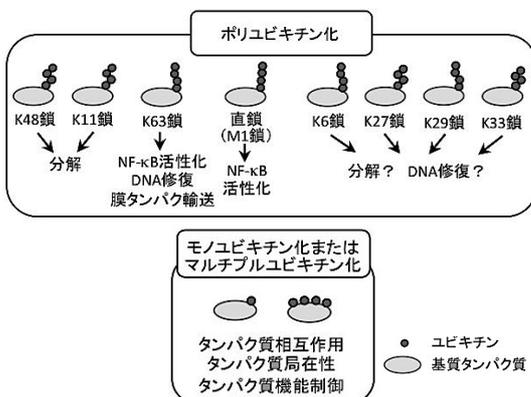


図2. 多様なユビキチン修飾と機能

2. 研究の目的

K63-ユビキチン鎖の形成に関しては、Ubc13とUev1Aが複合体を形成してE2として機能している(図3)。そして、生合成中のp53にUbc13-Uev1A複合体が結合するとK63-ユビキチン化が起こり、p53の四量化が阻害される(Laine *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8901, 2006; Topisirovic *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12676, 2009)。したがって、Ubc13-Uev1A複合体形成を阻害する化合物はがん抑制作用を示すと考え、複合体形成を検出するためのアッセイ系を構築した。そして、スクリーニングを行い、世界に先駆けてUbc13-Uev1A複合体形成阻害物質leucettamol Aを海綿から単離し(IC<sub>50</sub>, 105 μM; Tsukamoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6319, 2008)。その後、別の海綿からより阻害活性の強い新規物質manadosterol Aを単離した(IC<sub>50</sub>, 0.09 μM; Ushiyama *et al.*, *J. Nat. Prod.* **75**, 1495, 2012)。そこでさらにスクリーニングを継続して行い、より特異性の高い阻害物質の探索を行う。Ubc13はMms2とも複合体を形成するので、その形成を阻害するかどうかを調べることにより、阻害物質がUbc13とUev1Aのどちらに結合して阻害しているのかを判定することができる。

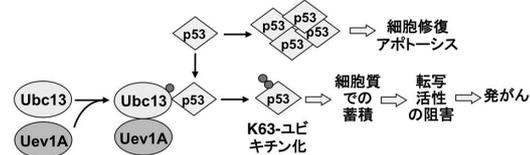


図3. Ubc13-Uev1A複合体の機能

一方、K11-ユビキチン鎖の形成を規定するUBE2Sは、ヒト由来培養細胞の分裂期におけるユビキチン依存的タンパク質に関与するので、UBE2S阻害物質はヒト由来培養細胞(あるいはがん細胞)の増殖を阻害すると期待できる。しかし、UBE2S阻害物質は未だ開発されていない。

そこで本研究では、(1)E2酵素の中でもK11-ユビキチン化に関与するUBE2SおよびK63-ユビキチン化に関与するUbc13に対する新規阻害物質を天然資源から探索し、(2)それら阻害物質を用いて両E2酵素によるユビキチン修飾の関与を解明するとともに、抗がん作用を明らかにすることを目的とした。UBE2SやUbc13などのE2酵素に対する新規阻害物質を発見することは、新規創薬戦略の提案や、ユビキチン修飾系の多様な機能の分子基盤の解明につながると考えられる。(3)また、E2酵素以外のE1あるいはE3もユビキチン修飾に関与している。さらに、ユビキチン化の逆反応を触媒する脱ユビキチン化酵素に対する特異的阻害物質も、最近、創薬シーズとして注目されている。そこで本研究では、UBE2SやUbc13などのE2に対する新規阻害物質の探索に加えて、E1、E3(Mdm2)および脱ユビキチン化酵素USP7に対する阻

害物質の探索も行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬用海洋資源の採集及び抽出液の調製

本研究代表者は、平成 18 年度からインドネシアにおいてスキューバダイビングにより薬用海洋資源の調査・採集を行っている。本研究では、本研究代表者が独自に構築した『薬用海洋資源ライブラリー』を用いてスクリーニングを行った。

#### (2) アッセイ法の構築と活性試験の遂行

##### (2-1) UBE2S に対する阻害物質の探索

UBE2S プラスミド( Addgene 社 )を用いて、UBE2S タンパク質を大腸菌で発現・精製して用いた。E1 については、既に酵母で発現・精製している。UBE2S 活性はジユピキチンの生成を指標にして測定した( 図 4 )。すなわち、ATP 存在下に、E1、UBE2S 及びユピキチン(Ub)を反応させると、ジユピキチンが生成する。反応物を用いて SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、生成したジユピキチンのバンドを銀染色により検出した。この時、阻害物質が存在すると、ジユピキチンのバンドが減少する( Wickliffe *et al.*, *Cell* **144**, 769, 2011 )。この UBE2S 活性阻害物質のスクリーニングを行った。

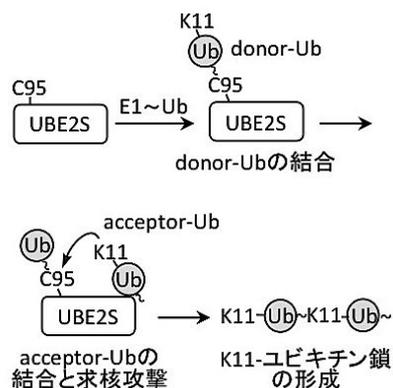


図 4. UBE2S による K11-ユピキチン鎖の形成

##### (2-2) Ubc13 に対する阻害物質の探索

本研究代表者らは、既に Ubc13 に対する阻害物質のアッセイ法を確立し、leucettamol A および manadosterol A を海綿から単離した。そこで、同様の方法を用いてスクリーニングを行った。

(2-3) E1, E3 (Mdm2) および USP7 に対する阻害作用を評価する方法は、既に本研究代表者らにより確立している。

### 4. 研究成果

#### (1) UBE2S に対する阻害物質の探索

上記 (2-1) に示すようなアッセイ系を確立し、当研究室で保有する薬用資源抽出物ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。現在、阻害物質の精製と構造決定を行っている。

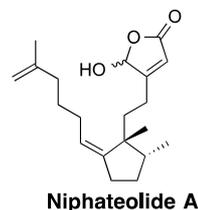
#### (2) Ubc13 に対する阻害物質の探索

海綿 *Luffariella variabilis* の抽出物がスクリーニングにより Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害活性を示したので、阻害物質の精製を行った。得られた化合物は  $\beta$ -carboline アルカロイドであることがわかり、新規物質だったので variabines A, B と命名した。Variabine B は、Ubc13-Uev1A の複合体形成を 20  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> 値で阻害したのに対して、variabine A は 20  $\mu$ M でも全く阻害しなかった( 発表論文 )。



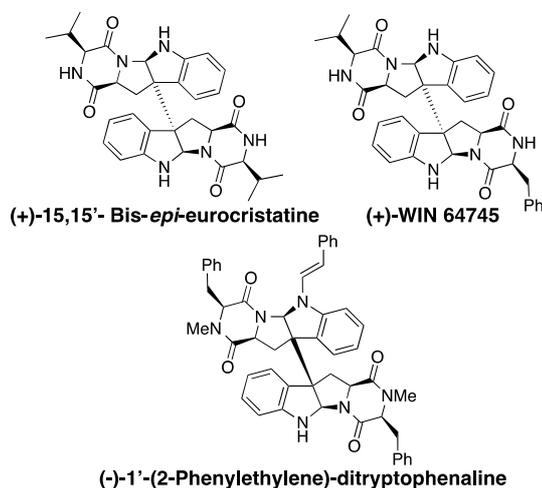
#### (3) Mdm2 (E3) に対する阻害物質の探索

海綿 *Niphates olemda* の抽出物がスクリーニングにより p53-Mdm2 複合体形成阻害活性を示したので、阻害物質の精製を行った。その結果、新規ジテルペン niphateolide A を単離した。この化合物は、p53-Mdm2 複合体形成を 16  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> 値で阻害した( 発表論文 )。



#### (4) USP7 に対する阻害物質の探索

トリプトファンを含むジケトピペラジンの二量体が、熊本大学大学院自然科学研究科の石川隼人博士らにより合成された。そして、18 個の化合物のうち、(+)-15,15'-bis-epi-eurocristatine, (+)-WIN 64745, (-)-1'- (2-phenylethylene)-ditryptophenaline が、10  $\mu$ M の濃度で USP7 を 54, 77, 90% 阻害した( 発表論文 )。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)(全て査読有)

S. Tadano, S. Tsukamoto(5人中4番目), H. Ishikawa. Collective synthesis and biological evaluation of tryptophan-based dimeric diketopiperazine alkaloids. *Chem. Eur. J.* **22**, 1277-1291 (2016). 10.1002/chem.201503417

H. Yokosawa, S. Tsukamoto(11人11番目) Niphateolide A: Isolation from the marine sponge *Niphates olemda* and determination of its absolute configuration by an ECD analysis. *Tetrahedron* **71**, 6956-6960 (2015). 10.1016/j.tet.2015.07.009

H. Yokosawa, S. Tsukamoto(8人中8番目) Variabines A and B, new  $\beta$ -carboline alkaloids from the marine sponge *Luffariella variabilis*. *J. Nat. Med.* **68**, 215-219 (2014). 10.1007/s11418-0130778-8

〔学会発表〕(計10件)

塚本佐知子, p53 を安定化させる脱ユビキチン化酵素 USP7 阻害物質の探索. 日本薬学会第 136 年会シンポジウム「創薬研究における天然物化学のミッションと新潮流」、パシフィコ横浜(横浜)、2016年3月26-29日. 橋元誠, 海生糸状菌 *Aspergillus* sp. MF275 由来 himeic acid の生合成研究, 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜(横浜)、2016. 3. 26-29.

Sachiko Tsukamoto, Drug discovery targeting the ubiquitin-proteasome system from marine organisms. PACIFICHEM 2015, Honolulu (USA), 2015. 12. 15-20.

久木田沙菜子, 海綿 *Petrosia alfiani* から得られた新規 xestoquinone 二量体の構造と生物活性, 日本生薬学会第 62 回年会, 長良川国際会議場(岐阜)、2015. 9. 11-12. 加藤光, 海綿 *Petrosia alfiani* から得られた新規 xestoquinone 類縁体の構造と生物活性, 日本生薬学会第 62 回年会, 長良川国際会議場(岐阜)、2015. 9. 11-12.

Sachiko Tsukamoto, Search for inhibitors of the ubiquitin-proteasome system from the natural sources for drug development, Organic Seminar in Colorado State University, Fort Collins (USA), 2015. 7. 24.

鳥井万純, *Didemnum* 属群体ボヤ由来新規 serinolipid の構造, 日本薬学会第 135 年会, 神戸学院大学・兵庫医療大学(神戸)、2015. 3. 25-28.

田之頭夏希, 海綿 *Petrosia alfiani* から得られた新規 xestoquinone 類縁体, 第 31 回日本薬学会九州支部大会, 第一薬科大学(福岡)、2014. 12. 6-7.

塚本佐知子, ユビキチン化を標的とする創薬, 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ企画「ケミストリーを戦略としたシグナル伝達研究」、パシフィコ横浜(横浜)、2014. 11. 25-27.

塚本佐知子, ユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害剤の開発, 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会 学術集会シンポジウム「ユビキチンとプロテアソーム研究の最前線」、千里ライフサイエンスセンター(大阪)、2014. 8. 9.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚本 佐知子 (TSUKAMOTO, Sachiko)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：70324093

### (2) 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