

## 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：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860067

研究課題名(和文) ユビキチン活性化酵素 E1 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 the inhibitors of the ubiquitin-activating enzyme (E1) as drug leads

## 研究代表者

川畑 哲郎 (Kawabata, Tetsuro)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：70624873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室では、ユビキチン-プロテアソームシステムを標的とすることで、抗がん剤のリード化合物となりうる天然低分子化合物の探索と創薬に向けた研究を行っている。本研究課題では、ユビキチン-プロテアソームシステムの中でもユビキチン活性化酵素E1に着目し研究を行った。そして、当研究室で以前海綿から単離したhyrtioreticulin Aの類縁体を合成し阻害活性を調べた。また、当研究室で単離した真菌が生産するhimeic acid Aの生合成経路について検討した。

研究成果の概要(英文)：We have been searching for natural products, which inhibit the ubiquitin-proteasome system, as drug leads for treatment of cancer. In this project, we studied on the inhibitors of the ubiquitin-activating enzyme (E1). We prepared several derivatives of hyrtioreticulin A, which was isolated from the marine sponge as the E1 inhibitor by us, and examined the inhibitory activities of E1. Furthermore, we studied the biosynthetic pathway of the E1 inhibitor, himeic acid A, which was isolated from the fungus *Aspergillus* sp. isolated from the mussel by us.

研究分野：天然物化学

キーワード：ユビキチン活性化酵素 (E1) ユビキチン - プロテアソームシステム 天然低分子化合物 抗がん剤

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 (UPS、図 1) は細胞内における選択的なタンパク質分解を行っており、細胞周期、ストレス応答、免疫応答、シグナル伝達などさまざまな生命現象を制御している。UPS において分解される運命にある標的タンパク質は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) およびユビキチン連結酵素 (E3) の 3 つの酵素の連続的作用によりユビキチン修飾され、プロテアソームによって分解される。

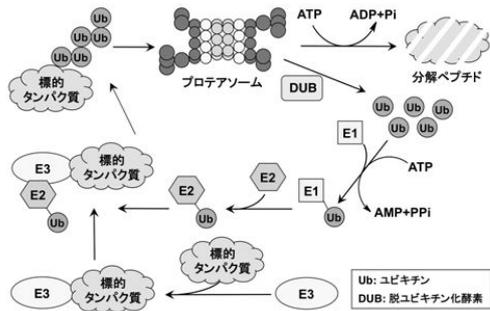


図 1. ユビキチン - プロテアソームシステム

近年、UPS の破綻が、ガンや自己免疫疾患、神経変性疾患などの原因となることが明らかになってきた。そのため、UPS を阻害する物質は、各種疾患の治療薬として期待できる。2003 年に多発性骨髄腫に対する治療薬として、プロテアソーム阻害剤である Bortezomib が FDA (アメリカ食品医薬品局) より認可された (Adams, *Drug Discov. Today* 8, 307, 2003)。その後、本治療薬が、重篤な副作用や薬剤耐性等を示すということが報告されたことから、現在、本治療薬とは異なる作用機序を示す新たなプロテアソーム阻害剤の開発が盛んに行われている。そして、2012 年にプロテアソーム阻害剤である Carfuzomib が認可された (Thompson, *Ann. Pharmacother.* 47, 56, 2013)。このようにプロテアソームをターゲットとした阻害剤はこれまでに数多く報告されているが、E1、E2 および E3 酵素をターゲットとした阻害剤の報告例はあまり多くはない (図 2)。

|        |                              |
|--------|------------------------------|
| E1 阻害剤 | Himeic acid A                |
|        | Hyrtioreticulin A and B      |
|        | Panepophenanthrin            |
|        | PYR-41                       |
|        | Largazole                    |
| E2 阻害剤 | MLN4924 (NEDO8 E1 阻害剤)       |
|        | Ginkgolic acid (SUMO E1 阻害剤) |
|        | Leucettamol A                |
|        | Manadosterol A               |
| E3 阻害剤 | Peptoid                      |
|        | Hexylitaconic acid           |
|        | Siladenoserinol A            |
|        | Chalcone                     |
|        | Syc-7                        |
|        | Nutlin 3                     |
|        | chlorofusin                  |
|        | SCF-12                       |
| SMER3  |                              |

図 2. ユビキチンシステムに対する阻害剤 (下線は当研究室で単離した阻害剤)

プロテアソームを阻害することで、抗ガン作用が認められるという事実は、プロテアソームによるタンパク質分解の上流過程を制御するユビキチンシステムを阻害することでも同様の効果が期待できる可能性を示している。このような背景から、プロテアソームシステムの阻害剤に加えて、翻訳後修飾としてのユビキチン化を制御するユビキチンシステムを阻害する低分子化合物は創薬の対象として注目され、世界中で研究が活発に行われている。

その中でも E1 阻害物質に関しては、2007 年に Yang らにより、E1 阻害物質である PYR-41 が NF- $\kappa$ B の転写活性を阻害することで、p53 (ガン抑制遺伝子産物) を活性化し抗腫瘍作用を示すと報告されているので、有望なガン治療薬になると期待される (Yang *et al.*, *Cancer Res.* 67, 9472, 2007)。この結果は PYR-41 が抗がん作用を有することを如実に示している。さらに、NEDD8 活性化酵素 E1 に対する阻害物質である MLN4924 も抗ガン作用を示すことから (Soucy *et al.*, *Nature* 458, 732, 2010)、現在、MLN4924 については、多発性骨髄腫およびホジキンリンパ腫の適応疾患としての第 II 相の臨床試験が行われている。しかし、PYR-41 および MLN4924 は、いずれも化合物ライブラリーのスクリーニングから発見された化合物で、構造的に多様性のある天然低分子化合物を対象とした E1 阻害物質の網羅的な探索はほとんど行われていないのが実情である。そこで、当研究室で構築したアッセイ系を用いて、E1 を特異的に阻害することにより p53 の作用を増強する天然低分子化合物を探索し、新たな分子標的薬を発見することを計画した。

2. 研究の目的

当研究室では、UPS の中でもタンパク質分解装置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である E1、E2、E3 およびポリユビキチン化されたタンパク質からユビキチンを除去する脱ユビキチン化酵素に着目し、それらの中でも特に p53 の作用を増強する低分子化合物の探索を行っている。そして、E1 阻害物質として海洋由来真菌から himeic acid A ( $IC_{50}$ , 50  $\mu$ M) (Tsukamoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 191, 2005)、海綿から hyrtioreticulin A (Yamanokuchi *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 20, 4437, 2012) を単離した (図 3)。なお、hyrtioreticulin A は、合成化合物も含めてこれまでに発見された E1 阻害物質の中で最も強い阻害物質である ( $IC_{50}$ , 2.4  $\mu$ M)。しかし、hyrtioreticulin A は水溶性で細胞内に浸透しないという欠点を有している。また、現在臨床に用いられているプロテアソーム阻害剤の  $IC_{50}$  と比較すると 100 から 1000 倍程度活性が弱い。そこで本研究において、hyrtioreticulin A の構造を変換し臨床可能な化合物に変換することを検討するとともに、さらに強力な E1

阻害剤を天然資源から発見することを目指す。

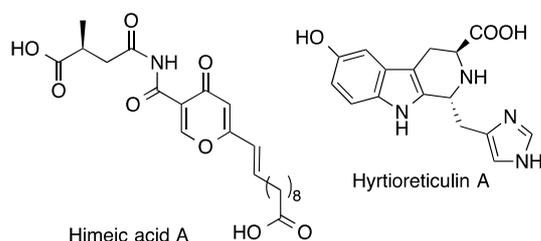


図 3. 当研究室で単離した E1 阻害物質

### 3. 研究の方法

#### (1) 『薬用海洋資源ライブラリー』を用いた E1 阻害物質の探索

E1 阻害剤の探索源として、天然資源の中でも海洋資源を用いた。海洋生物は、海洋という特殊な環境において、化学物質を生体防御や情報伝達に巧みに利用している。その結果、陸上生物とは異なる新奇構造を有する二次代謝産物が数多く報告されている。そして近年、医薬品シーズとなる例も報告されている。当研究室では、平成 18 年度からインドネシアにおいて薬用海洋資源の調査・採集を行っている。そしてこれまでに、海洋無脊椎動物と海洋微生物の抽出物から構成される研究室独自の『薬用海洋資源ライブラリー』を構築した。本研究では、このライブラリーを用いて E1 阻害剤の探索を行った。

E1 酵素の触媒部位に存在するシステイン残基のチオール基と、ユビキチンの C 末端グリシン残基のカルボキシ基との間でチオエステル結合が形成される。そこで、E1 に結合した FLAG を利用し、複合体形成をウェスタンブロット解析法により評価し、スクリーニングを行った (図 4)。

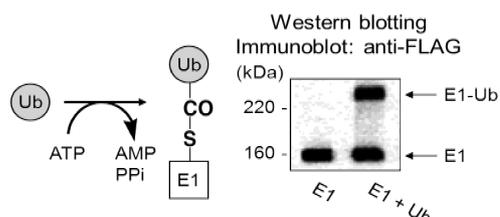


図 4. E1 の活性評価

スクリーニングにより E1 阻害活性が認められた海綿や微生物培養液から、溶媒分画やシリカゲル、ODS、ゲル濾過等の担体を用いたカラムクロマトグラフィーおよび HPLC を行い、E1 阻害物質を精製した。精製した化合物については、NMR 等の分光学的手法および化学的手法を用いて構造決定した。

#### (2) Hyrtioreticulin A の阻害機構の解明と構造活性相関の検討

初めに hyrtioreticulin A を合成した。そして、hyrtioreticulin A よりも極性の低い誘導体を合成し E1 阻害活性を調べた。

#### (3) Himeic acid A の生合成機構の解明

当研究室で真菌から単離した E1 阻害物質である himeic acid A は、E1 にユビキチンが結合する段階を阻害することを既に明らかにしている。本化合物の合成は以前試みられたが、困難であることが既に明らかとなっている。そこで、より E1 阻害活性の強い誘導体を取得するため、本化合物の生合成経路の解明を行った。また、himeic acid C (図 5) は himeic acid A から変換するということが予備実験により明らかになっているが、今回、himeic acid C の窒素源を解明するための実験を行った。

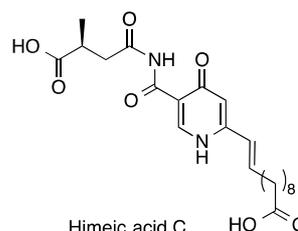


図 5. Himeic acid C の構造

### 4. 研究成果

#### (1) 『薬用海洋資源ライブラリー』を用いた E1 阻害物質の探索

スクリーニングを行い、現在、化合物の精製と構造決定を行っている。

#### (2) Hyrtioreticulin A の阻害機構の解明と構造活性相関の検討

既に、誘導体を数種類合成し、E1 阻害活性を評価した。

#### (3) Himeic acid A の生合成機構の解明

共同研究者である岩手医科大学薬学部の藤井教授および橋元博士により、生合成遺伝子の同定に成功した。現在、論文執筆中である。また、himeic acid A から himeic acid C へは非酵素的に変換していることを明らかとしたが、窒素源については検討中である。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)(全て査読有)

H. Kato, T. Nehira, K. Matsuo, T. Kawabata, Y. Kobashigawa, H. Morioka, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, H. Yokosawa, S. Tsukamoto. 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. Takamoto, K. Eguchi, T. Kawabata, Y. Fujiwara, M. Takeya, S. Tsukamoto. Inhibitors for cholesterol ester accumulation in macrophages from Chinese cabbage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1315-1319 (2015). 10.1080/09168451.2015.1023247  
M. Yamakuma, H. Kato, K. Matsuo, A. H. El-Desoky, T. Kawabata, F. Losung, R. E. P.

Mangindaan, N. J. de Voogd, H. Yokosawa, S. Tsukamoto. 1-Hydroxyethylhalenaquinone: a new proteasome inhibitor from the marine sponge *Xestospongia* sp. *Heterocycles* **89**, 2605-2610 (2014). 10.3987/COM-14-13087

S. Tsukamoto, T. Takeuchi, T. Kawabata, H. Kato, M. Yamakuma, K. Matsuo, A. H. El-Desoky, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, Y. Arata, H. Yokosawa. Halenaquinone inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 5315-5317 (2014). 10.1016/j.bmcl.2014.09.043

A. Furusato, H. Kato, T. Nehira, K. Eguchi, T. Kawabata, Y. Fujiwara, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, M. Takeya, H. Yokosawa, S. Tsukamoto. Acanthomanzamines A-E with new manzamine frameworks from the marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*. *Org. Lett.* **16**, 3888-3891 (2014). 10.1021/ol5015569

A. H. El-Desoky, H. Kato, K. Eguchi, T. Kawabata, Y. Fujiwara, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, M. Takeya, H. Yokosawa, S. Tsukamoto. Acantholactam and pre-*neo*-kaulamine, manzamine-related alkaloids, from the Indonesian marine sponges, *Acanthostrongylophora ingens*. *J. Nat. Prod.* **77**, 1536-1540 (2014). 10.1021/np500290a

[学会発表](計9件)

Ahmed H. El-Desoky, Four New Nitrogenous Spongian Diterpenes as Inhibitors of RANKL Induced Osteoclastogenesis from the Indonesian Marine Sponge *Spongia ceylonensis*, 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.

瀬邊 桃菜、*Aspergillus taichungensis* から得られた新規ジテルペンの構造と生物活性について、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.

川畑哲郎、*Xestospongia* 属海綿から得られた新規プロテアソーム阻害物質 1-hydroxyethylhalenaquinone について、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.

勝木理子、*Agelas* 属海綿から得られたスフィンゴ糖脂質の構造と破骨細胞分化抑制活性、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.

加藤光、海綿 *Petrosia corticata* に含まれるメロジテルペン strongylophorines の構造と活性、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.

Ahmed Hamed Eldesoky、海綿 *Acanthostrongylophora ingens* から得られた新規

manzamine 類縁体の構造と生物活性、第 56 回天然有機化合物討論会、高知県民文化ホール(高知) 2014. 10. 15-17.

松尾佳苗、*Xestospongia* 属海綿由来 halenaquinone 関連化合物によるプロテアソーム阻害活性について、日本生薬学会第 61 回年会、福岡大学薬学部(福岡) 2014. 9. 13-14.

野田愛、海綿 *Petrosia corticata* から得られた strongylophorines の生物活性、日本生薬学会第 61 回年会、福岡大学薬学部(福岡) 2014. 9. 13-14.

高本はるか、マクロファージ泡沫化阻害作用を示す白菜成分に関する研究、日本生薬学会第 61 回年会、福岡大学薬学部(福岡) 2014. 9. 13-14.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 哲郎 (KAWABATA, Tetsuro)  
熊本大学・生命科学研究部・助教  
研究者番号：70624873