ユビキチン-プロテアソームシステムをターゲットとする天然物化学・創薬化学の新しい展開

塚本佐知子*
横沢 英良

State of the Art: Targeting the Ubiquitin-proteasome System for Drug Discovery

Sachiko Tsukamoto* and Hideyoshi Yokosawa

The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway plays a major role in selective protein degradation and regulates various cellular events including cell cycle, signal transduction, stress response, antigen presentation, and protein quality control. Ubiquitin, a highly conserved small protein in eukaryotes, attaches to a target protein prior to degradation. The polyubiquitin chain tagged to the target protein is recognized by the 26 S proteasome, a high-molecular-mass protease subunit complex, and the protein portion is degraded by the proteolytic active sites in a cavity of the 26 S proteasome. The potential of specific proteasome inhibitors, which act as anti-cancer agents, is now under intensive investigation. In addition, various inhibitors of a ubiquitin-activating enzyme, ubiquitin ligases, and deubiquitinating enzymes have been isolated from natural resources. Recently, we found that girolline, an antitumor compound, inhibits the recruitment of polyubiquitinated proteins to the proteasome. In this review, we summarize the structures and biological activities of natural products that inhibit various factors involved in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway.

Key words: ubiquitin, proteasome, inhibitor, protein degradation, ubiquitin activating enzyme, ubiquitin ligase, deubiquitinating enzyme

はじめに

遺伝子から転写・翻訳されたタンパク質の働きによって生命活動が制御されている。そして、必要な量のタンパク質が必要な時に合成され必要な場所で機能することに加えて、必要でなくなったタンパク質がタイムリーに分解されることも生理的に重要である。細胞内の主要なタンパク質分解系には、リソソームシステムとユビキチン-プロテアソームシステムの2つがあるが、選択的タンパク質分解に重要な役割を果たしているのが、ここで紹介する後者のシステムである。なお、前者のシステムは非選択的タンパク質分解を司る。現在、ユビキチン-プロテアソームシステムは、細胞周期、シグナル伝達、ストレス応答、免疫応答、小胞体での品質管理などの多様な生命現象を制御することが明らかになり、多くの注目をあびている。そして、昨年、アメリカにおいて、プロテアソーム阻害物質 PS-341 (Velcade) が多発性骨髄腫の治療薬として FDA (食品医薬品局) により認可された。プロテアソームは細胞内に普遍的に存在して機能しているので、従来はプロテアソームを標的とする抗がん剤の

有効性はあまり考えられなかったが、PS-341 が承認されたことにより、プロテアソーム阻害物質が新しいタイプの抗がん剤として有効であることが証明されたと言える。さらに、現在、このシステムを阻害する物質が、がん、炎症、免疫疾患などの治療薬として期待されている。

本総説では、初めに、ユビキチン-プロテアソームシステムについて概説し、次に、これまでに天然から得られている、このシステムに対する阻害物質について紹介する。

1. ユビキチン-プロテアソームシステム¹⁻⁴⁾

生体内における加水分解反応は一般的にはエネルギーを必要とせず、例えば、プロテアーゼによるペプチド結合の加水分解反応も同様である。一方、1953 年、Simpson らは、エネルギー依存的なタンパク質分解反応が存在することを発見したが、当時、その論文は世間の注目を引かなかった。しかし、1977 年、Goldberg らが、ウサギ網状赤血球から調製した細胞質画分に ATP を添加すると、タンパク質分解が著しく亢進することを見出したことにより、Simpson らの研究成果が再現され、注目を引いた。そして、エネルギー依存的タンパク質分解の分子機構を解明したのが、Hershko と

* 金沢大学薬学部 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University ()

Ciechanoverである。Hershkoらは、酵母からヒトに至るまで真核生物に普遍的に存在(ubiquitous)する低分子量タンパク質が、ATP 依存的タンパク質分解を促進することを見出し、そのタンパク質をユビキチン(ubiquitin)と命名した。

ユビキチンは、76 アミノ酸からなるポリペプチドで、標的タンパク質に複数個付加(連結)し、“分解シグナル”として働く(図1)。この反応において、ユビキチン(Ub)は、初めに、ユビキチン活性化酵素(E1)により活性化される。この時、ATP のAMPとピロリン酸(PPi)への加水分解を伴う。ユビキチンは、C末端グリシン残基のカルボキシル基を介して、E1 酵素のシステイン残基にチオエステル結合し、E1-ユビキチン・チオエステル中間体(E1-Ub)が生成する(図1中のステップA)。次に、ユビキチンは、ユビキチン結合酵素(E2)のシステイン残基に渡されてチオエステル結合し、E2-ユビキチン・チオエステル中間体(E2-Ub)が生成する(図1中のステップB)。最後に、ユビキチンリガーゼ(E3)が標的タンパク質を識別・結合し(図1中のステップC)、かつ、E2-ユビキチン複合体を結合することによって、ユビキチンはC末端グリシン残基のカルボキシル基を介して標的タンパク質のリシン残基のεアミノ基にイソペプチド結合する(ユビキチン化反応)(図1中のステップD)。このユビキチン化反応が繰り返され、ユビキチン分子内の48番目のリシン残基と、遊離のユビキチンのC末端グリシン残基のカルボキシル基との間でのイソペプチド結

合の形成が繰り返し起こり、複数個のユビキチン分子が鎖状に結合し、ポリユビキチン鎖が形成される。すなわち、ポリユビキチン化された標的タンパク質が生成する。ユビキチン化反応を触媒する3種類の酵素のうち、E1 酵素は1種類しか存在しないが、E2 酵素は複数個(出芽酵母で11個)存在し、さらに、E3 酵素は多くのファミリーを形成し極めて多様性に富んでいる。

ポリユビキチン鎖が結合した標的タンパク質は、多数のサブユニットから構築される26Sプロテアソーム(分子量約200万の巨大プロテアーゼ複合体)へと運搬(リクルート)され(図1中のステップE)、ATP 依存的に分解される(図1中のステップF)。26Sプロテアソームは、触媒ユニット(CP: catalytic or core particle, 28個のサブユニットからなる複合体、その沈降係数から20Sプロテアソームと呼ばれる)の両端に制御ユニット(RP: regulatory particle, 20数個のサブユニットからなる制御サブユニット複合体)が会合して形成される。プロテアソームは、トリプシン様、キモトリプシン様およびカスパーゼ様の3種類の触媒活性部位を併せ持つという点に特徴がある。また、26Sプロテアソームがタンパク質を分解する際に複数の過程を経ると考えられている。すなわち、ターゲットであるポリユビキチン化タンパク質をRPが認識する過程、分解の目印であったポリユビキチン鎖を標的タンパク質からはずし、遊離のユビキチン分子を再生する脱ユビキチン化の過程(図1中のステップG)、そして、20Sプロテアソームの内部に標的

Fig. 1 The ubiquitin-proteasome system.
Ub, ubiquitin; E1, Ub-activating enzyme; E2, Ub-conjugating enzyme; E3, Ub ligase.

タンパク質を取り込む際に、RPがタンパク質のアンフォールディング(構造変化)を誘起する過程などである。

2. プロテアソーム阻害物質

2.1 プロテアソーム阻害物質の阻害機構

現在までに知られているプロテアソーム阻害物質の構造とプロテアソームに対する阻害機構を図2に示した。Lactacystin(1)は、北里大学の太田らにより、神経突起伸展物質として *Streptomyces* 属の培養液から単離された化合物であるが^{5,6)}、その後、ハーバード大学の Schreiber らにより、神経突起伸展作用はプロテアソーム阻害によることが明らかにされた⁷⁾。1は、プロテアソームに対する選択性が非常に高く、N-アセチルシステイン部分の脱離に伴って形成される β -ラクトン(omuralide, 2)が、プロテアソームの触媒残基であるN末端トレオニン残基の水酸基との間でエステル結合を形

成し、不可逆的にプロテアソームを阻害する。一方、抗がん物質として有名な epoxomicin (3)は、放線菌が生産する化合物であるが⁸⁾、プロテアソームの阻害物質として作用する⁹⁾。この化合物の場合、 α , β -エポキシケトン部分がプロテアソームのN末端トレオニン残基との間でモルフォリンを形成し、不可逆的にプロテアソームを阻害する。また、MG 132(4)のようなペプチド性アルデヒド型化合物は、プロテアソームのN末端トレオニン残基の水酸基と可逆的なヘミアセタール結合を形成することにより阻害作用を示す¹⁰⁾。ペプチド性アルデヒド型化合物の場合、プロテアソームに対する親和性が比較的低いことが欠点であると考えられ、その欠点を克服する化合物として、ホウ酸誘導体が開発された。ホウ素は酸素原子のローンペアを受容するため活性部位との親和性が強いと考えられる。また、ホウ酸誘導体は可逆的阻害物質であると当初推定されていたが、実際のところ、不可逆的阻害を示す。そして、前述したとおり、ホウ酸誘導体

Fig. 2 Proteasome inhibitors and their inhibition mechanisms.

である PS-341 (5)¹¹⁾は、Velcade という商品名で多発性骨髄腫の治療薬としてアメリカで認可された¹²⁾。なお、1 と 3 は、プロテアソーム以外の活性を指標にして単離された化合物であり、その後の研究から、プロテアソーム阻害活性を有することが見出された。

最近、プロテアソーム自身を標的として、天然資源からの阻害物質の探索が行われている。以下に、それら阻害物質の例を示す。

2.2 *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093 の培養液から得られた TMC-95A

田辺製薬のグループにより、真菌 *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093 の培養液から単離されたペプチド誘導体 TMC-95 A (6) (図 3) は、プロテアソームを選択的に阻害する^{13,14)}。そして、東北大学の平間らなどのグループにより、全合成が報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。また、Groll らは、酵母 20 S プロテアソームと 6 との複合体の結晶構造解析を行い、6 がプロテアソームの活性部位と多くの水素結合を介して複合体を形成していること、その複合体形成の様式は、3 の場合 (図 2 参照) と類似しているが、3 の場合と異なり、6 の N(26)H が N 末端スレオニン残基の水酸基と水素結合しており、共有結合していないことを明らかにした¹⁸⁾。また、プロテアソームの機能を阻害すると、PC-12 細胞が神経突起を伸長することが知られているが、最近、平間らは、6 が PC-12 細胞に対して神経突起伸長作用を示すことを報告している¹⁹⁾。

2.3 *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 の培養液から得られた tyropeptin A

微生物化学研究会の百瀬らは、プロテアソーム阻害物質として、C 末端にアルデヒド基を有するペプチド誘導体を単離し、tyropeptin A (7) (図 3) と命名した^{20,21)}。7 は、プロテアソームのキモトリプシン様活性を最も強く

阻害し、カスパーゼ様活性 (ペプチジルグルタミルペプチド加水分解活性) をほとんど阻害しなかった。一方、7 は、PC-12 細胞に対して神経突起伸長作用を示す²²⁾。

2.4 *Salinospora* 属細菌の培養液から得られた salinosporamide A

米国スクリプス研究所の Fenical らは、バハマ沖の深海の土壌から多くの微生物を単離した。その中で、16 S rRNA の解析に基づき新種の細菌と考えられる *Salinospora* 属の培養液から、新規プロテアソーム阻害物質を単離し、salinosporamide A (8) (図 3) と命名した²³⁾。8 の構造は、前述の omuralide (2) の構造 (図 2 参照) に類似しているが、2 のイソプロピル基とメチル基が、8 では、それぞれシクロヘキセニルカルビノール基とクロロエチル基になっており、20 S プロテアソームに対する阻害作用は、2 の IC₅₀ 値が 49 nM であるのに対して、8 の IC₅₀ 値が 1.3 nM であると報告されている。以前、Corey らの研究により、2 の C-5 位のイソプロピル基をフェニル基に変えたものはプロテアソーム阻害作用を示さなかったが²⁴⁾、8 が非常に強いプロテアソーム阻害活性を示したことから、プロテアソームに対する結合様式に興味を持たれる。

2.5 *Streptomyces* 属真菌の培養液から得られた belactosin A

協和発酵の浅井らは、*Xenopus* cyclin A 1 変異体 (プロテアソームによって分解されない変異体: cyclin A 1 の分解は細胞周期の進行に必須であり、cyclin A 1 が分解されないと細胞周期は停止する) を出芽酵母で発現させて cdc 28 キナーゼを恒常的に活性化させることにより、細胞周期を停止させる系を用いて、その細胞周期停止を回復させる活性を指標にしてスクリーニングを行い、*Streptomyces* 属の培養液から belactosin A (9) (図 3) を単離した。9 は、がん細胞の G2/M アレストを引

Fig. 3 Proteasome inhibitors isolated from natural resources.

き起こし、作用機構を解析した結果、プロテアソームを阻害することが明らかになった²⁵⁾。おそらく、9は、omuralide(2)の場合(図2参照)と類似の機構で阻害作用を示すと考えられる。さらに、強い阻害活性を有する細胞透過性の誘導体も合成されている。

2.6 *Acanthodendrilla* 属海綿由来のプロテアソーム阻害物質

筆者らも、プロテアソームを標的とした抗がん剤の開発を目指して、海洋生物を初めとする天然資源を対象としてプロテアソーム阻害物質のスクリーニングを行っている。そして、すでに、いくつかの粗抽出物にプロテアソーム阻害活性を見出している。*Acanthodendrilla* 属海綿のメタノール抽出液から、プロテアソーム阻害活性を指標として精製を行い、10個の化合物を単離した。構造解析の結果、それらの化合物は、大阪大学の小林らによりがん多剤耐性克服物質として単離された agosterol^{26,27)}の類縁化合物であることが明らかになった²⁸⁾。そして、10個の化合物は同じステロール骨格を有しているが、活性に差が認められ、キモトリプシン様活性に対する各化合物の阻害活性については、agosterol C(10)(図3)のIC₅₀値が10 µg/mLと、比較的強いことが明らかになった。なお、別の海綿抽出物から水溶性の阻害物質が検出されており、現在、精製を行っている。水溶性のプロテアソーム阻害物質はこれまでにほとんど知られていないタイプであることから、その構造とプロテアソームに対する阻害機構に興味をもたれる。一方、プロテアソームは3種類の触媒部位をもつので、キモトリプシン様活性以外の活性に対する特異的阻害物質の発見も期待される。

以上、紹介したプロテアソーム阻害物質は、阻害様式は異なっているが、プロテアソーム自身の働きを阻害するという点では共通している。一方、ユビキチン-プロテアソームシステムの破綻という点においては、プロテアソーム以外のどの構成因子を阻害した場合でも、システムの停止という点では同じ結果に至る。実際、プロテアソーム以外のユビキチン-プロテアソームシステム構成因子をターゲットとした阻害物質の探索研究も行われている。以下に、それらの例を示す。

3. ユビキチン活性化酵素 E1 の阻害物質

標的タンパク質がユビキチン化される際に、ユビキチンがユビキチン活性化酵素 E1 によって活性化されることが必要である(図1中のステップA)。この時、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は、ユビキチンのC末端グリシン残基のカルボキシル基とチオエステル結合を形成する。

微生物化学研究会の関沢らは、*Panus rudis* というキ

ノコから、E1 酵素を阻害する新規化合物を単離し、panepophenanthrin(11)(図4)と命名した²⁹⁾。スクリーニングは、リコンビナント E1 酵素とユビキチンとのチオエステル結合形成阻害をウエスタンブロット解析で調べることにより行い、検出は、ビオチン化ユビキチンとストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼを用い化学発光により行っている。11によるE1阻害活性は、IC₅₀値が17.0 µg/mLであった。

筆者らは、FLAG タグを付加した E1 酵素と GST-ユビキチン融合タンパク質を用い、抗 GST 抗体によるウエスタンブロット解析法を採用して、E1 酵素とユビキチンとのチオエステル結合形成阻害を指標に、海洋真菌の培養菌体から新規 E1 酵素阻害物質を単離した。構造解析の結果、その化合物は、11とは異なる骨格であることが明らかになった(論文投稿中)。

Panepophenanthrin (11)

Fig. 4 A ubiquitin-activating enzyme inhibitor.

4. ユビキチンリガーゼ E3 の阻害物質

標的タンパク質がユビキチン化される際、最後の過程(図1中のステップD)で働く E3 酵素は、膨大な数の標的タンパク質に対応して分子多様性に富んでいる。すなわち、ある特定の E3 酵素が特定の標的タンパク質を選別し(図1中のステップC)、そのタンパク質にユビキチン分子が付加されることにより、特定の標的タンパク質のユビキチン化修飾が、特異的、かつ、タイミングよく起こるわけである。出芽酵母において、ユビキチン化されるタンパク質は少なくとも1000種類以上におよび、全タンパク質の6分の1にあたると言われている。E3 酵素は、HECT 型、RING 型、U-box 型に大別され、単量体で存在するものから、複雑な複合体のかたちをとるものまで多数存在することが明らかになっている。そして、ヒトゲノムには約1000種類もの異なる E3 酵素の存在が推定されている。さらに、重要なことは、E3 酵素が各種疾病の原因遺伝子産物である例が次々に報告されていることであり、E3 酵素を標的とする創薬研究がすでに始まっている。そして、その開発研究では、特定の E3 酵素の機能を阻害することにより、特定の標的タンパク質の分解が抑制され、それによって疾病の治療に

つながるような E3 酵素がターゲットとして取り上げられている。

ここでは、多くの成果が報告されている MDM2 阻害物質の例について紹介する。がん抑制遺伝子産物 p53 は、DNA が損傷を受けると、細胞周期を停止させるか、あるいはアポトーシスを誘導する。そして、ヒトのがん細胞の 50% 以上に p53 遺伝子の変異が認められることが知られている。一方、MDM2 (murine double minute 2) は、当初、トランスフォームしたマウス細胞において観察される二重微小染色体 (double minute) から単離された遺伝子産物として発見された。その後、p53 は転写因子として働いて MDM2 の発現を誘導する一方で、誘導された MDM2 が p53 に結合することによって p53 自身の転写活性を抑制するという、フィードバックループの関係にあることが明らかになった³⁰⁾。そして、MDM2 は、p53 がユビキチン化されプロテアソームにより分解される際の E3 酵素そのものであることが明らかになった³¹⁾。また、p53-MDM2 複合体の結晶構造解析により、MDM2 の分子表面に疎水性ポケットが存在し、そこに p53 の側鎖であるフェニルアラニン、トリプトファンおよびロイシン残基が結合することが明らかにされている³²⁾。このような背景から、MDM2 阻害物質は、p53 と MDM2 の相互作用を阻害し、その結果、MDM2 による p53 のポリユビキチン化が阻害され分解が抑制されることにより、がん抑制タンパク質の機能を亢進させることが期待される新しいタイプのがん治療薬と考えられる。以下に、MDM2 阻害物質について、4 つの例を紹介する。

て、4 つの例を紹介する。

4.1 *Fusarium* 菌の培養液から得られた chlorofusin

微生物の培養液を用いて MDM2 阻害物質のスクリーニングが行われ、その結果、*Fusarium* 菌の培養液から単離された化合物が chlorofusin (12) (図 5) である。12 は、その名前が示す通り、塩素原子 1 個を含み異常アミノ酸を有する新規環状ペプチドである³³⁾。12 は、IC₅₀ 値が 4.6 μ M で、p53 と MDM2 の結合を阻害し、一方、4 μ M の濃度でも TNF α とそのレセプターとの結合を阻害しないことから、p53-MDM2 相互作用に対して特異的な阻害活性を有すると考えられる。また、4 μ M の濃度でも Hep G2 細胞に対して細胞毒性を示さなかった。

4.2 Chalcone 誘導体の開発

マックス・プランク研究所の Holak らは、chalcone 誘導体が抗がん活性を示すという報告が多いことに注目した³⁴⁾。そして、合成した chalcone 誘導体を用いて、MDM2 単独の場合と MDM2 に chalcone 誘導体 (例えば、chalcone C (13) (図 5)) を添加した場合との 2D ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを比較し、MDM2 に chalcone 誘導体が結合していると推論した。そして、p53-MDM2 複合体や DNA-p53-MDM2 複合体に chalcone B-1 (14) を加えると、複合体からの p53 の遊離が認められたことから、14 は p53 と MDM2 の相互作用を阻害していると考えられる。

4.3 非ペプチド性低分子阻害物質の開発

Liu らは、MDM2 阻害物質の構造をコンピューターを用いてデザインし、32 個の非ペプチド性低分子化合

Fig. 5 Ubiquitin ligase MDM2 inhibitors.

物を合成した³⁵⁾。そして、5 個の化合物が MDM2 に対して親和性を示し、例えば、syc-7(15) (図 5) は、がん細胞中の p53 量を増加させ、がん細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。

4.4 Nutlin の開発

ロシュ研究所のグループは、合成化合物のライブラリーから、MDM2 の活性部位に対して親和性を有する化合物のスクリーニングを行い、p53 結合ポケットに最もフィットする化合物として、Nutlin を見出すことに成功した³⁶⁾。そして、Nutlin-1(16) (図 5) で処理した細胞で実際に p53 量が増加すること、また、ヒトがん細胞をヌードマウスに移植し、Nutlin-3(17) を経口投与したところ、がんの増殖が抑制されることを示した。この開発研究は、Nutlin で MDM2 の作用を阻害して p53 を安定化させることにより *in vivo* で抗がん作用を示した例として、特筆に値する成果と言える。

今後、他の疾病に関連する各種 E3 酵素に対する阻害物質の開発が期待される。

5. 脱ユビキチン化酵素の阻害物質

脱ユビキチン化酵素は、ユビキチンのイソペプチド結合を切断する酵素である。標的タンパク質がプロテアソームにより分解される際に、鎖状に結合したポリユビキチン鎖が、この酵素の働きにより、標的タンパク質からはずされ、さらに、1 個ずつばらばらになり、再利用される (図 1 中のステップ G)。もし、脱ユビキチン化酵素が機能しない場合には、ユビキチン-プロテアソームシステムの機能が停止する結果になる。また、現在、多数の脱ユビキチン化酵素群が様々な生命現象に関与することが明らかになっている。

1997 年、Rossi らは、プロスタグランジンが NF- κ B の活性化を阻害すると報告した³⁷⁾。一方、2001 年、Fitzpatrick らは、プロスタグランジンの中でも特に、J シリーズに分類される Δ^{12} -prostaglandin J₂(18) (図 6) が、脱ユビキチン化酵素を阻害すると報告している³⁸⁾。そして、最近、Ireland らは、軟体サンゴ *Teleso riisei* に含まれる含塩素化合物 punaglandin 類 (例えば punaglandin 4(19) (図 6)) が、脱ユビキチン化酵素に対して 18 より強い阻害活性を有することを報告している³⁹⁾。

Fig. 6 Deubiquitinating enzyme inhibitors.

以上、ユビキチン-プロテアソームシステムを構成する各因子に対する阻害物質について紹介した。

最後に、ユビキチン化タンパク質のプロテアソームへの運搬 (リクルート) の過程 (図 1 中のステップ E) を阻害すると考えられる化合物について、筆者らの研究成果を紹介する。この過程を阻害する化合物は現在までに報告されていないので、ユビキチン-プロテアソームシステムに対する新しいタイプの阻害物質であると考えられる。

6. 抗がん物質 girolline の生体内標的: girolline はポリユビキチン化 p53 の運搬 (リクルート) を阻害しているのか?

筆者らは、細胞周期抑制物質のスクリーニングにより、愛媛県佐田岬で採集した海綿 *Axinella brevistyla* から、4 個の新規物質を含むプロモピロール誘導体と、既知の細胞毒性物質 girolline (20) (図 7) を単離した⁴⁰⁾。それらの中で、20 は、1988 年に、ニューカレドニアで採集された海綿 *Pseudoaxinyssa cantharella* から細胞毒性物質として単離されている⁴¹⁾。そして、20 は *in vivo* で抗がん作用を示し、かつ、動物実験で毒性を示さなかったため、フランスにおいて臨床試験が行われたが、ヒトに対しては抗がん作用を全く示さず、強い副作用を示す結果となった。当初、20 は抗がん剤としての実用化が強く期待されていたので、生体内における標的に関する研究が行われ、20 がタンパク質合成阻害作用を示すと報告された⁴²⁾。しかし、臨床試験の中断に伴い、その後の研究がほとんどなされていない。そこで、筆者らは、20 の単離を契機に、20 の生体内標的に関する解析を開始した。

Fig. 7 A compound inhibiting recruitment of polyubiquitinated p53 to the proteasome.

はじめに、細胞周期に対する 20 の影響を調べたところ、20 は細胞周期を G2/M 期で停止させた。p53 は G1 アレストを引き起こすとともに、G2 アレストにも関与する⁴³⁾。そこで、20 で処理した細胞の抽出物を用いて抗 p53 抗体によるウェスタンブロット解析を行い、細胞内に存在する p53 タンパク質の存在状態を調べたところ、p53 タンパク質に加えて、より高分子量領域に数本のバンドが検出された。高分子量のバンドは、分子量から推定してユビキチン化された p53 タンパク質であると考えられる。そこで、抗 p53 抗体ビーズを用

いて細胞内 p53 タンパク質を免疫沈降させた。次に、得られた免疫沈降物を用いて、抗 p53 抗体と抗ユビキチン抗体によるウエスタンブロット解析を行い、免疫沈降された p53 タンパク質にユビキチンが付加しているかを調べた。その結果、いずれの抗体を用いた場合でも、数本のバンドが同じ高分子量の位置に検出され(図 8A), p53 タンパク質がポリユビキチン化されていることが示された。また、これらのバンドは 20 の濃度に依存して濃くなることが明らかになった。以上の結果から、20 がポリユビキチン化 p53 タンパク質の蓄積を誘起すると推論した。

次に、20 がユビキチン-プロテアソームシステムのどの過程を阻害するかを調べた。転写因子として核内で機能する p53 は、核外に移行した後に細胞質に存在するプロテアソームによって分解される可能性が考えられるので、ポリユビキチン化 p53 タンパク質が蓄積する理由として、p53 タンパク質の核外移行が阻害される場合が考えられる。また、第2の可能性として、プロテアソームの活性が阻害される場合が考えられる。そこで、核外移行阻害剤 leptomycin B とプロテアソーム阻害剤 MG 132 で細胞を処理し、20 での処理の場合と比較した。その結果、leptomycin B 処理の場合ではポリユビキチン化 p53 タンパク質の蓄積は認められず、一方、MG 132 処理ではポリユビキチン化 p53 タンパク質の蓄積が認められた(図 8B)。そこで、プロテアソーム活性に対する 20 の阻害作用を調べたところ、MG 132 の場合と異なり、ほとんど阻害作用を示さなかった。すなわち、上記の2つの可能性は否定された。次に、20 がポリユビキチン化 p53 タンパク質のみの蓄積を誘起するのか、あるいは他のポリユビキチン化タンパク質の蓄積も誘起するのかを調べた。そのために、細胞を 20 あるいは MG 132 で処理し、ポリユビキチン鎖を特異的に認識する FK 1 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、MG 132 処理の場合には高分子量領域にポリユビキチン化タンパク質に由来するバンドが検

出されたが、20 の処理では対応するバンドは全く検出されなかった。この結果は、20 の効果が p53 タンパク質に特異的であることを示唆している。

以上の結果から、20 はポリユビキチン化 p53 タンパク質の蓄積を誘起するが、p53 タンパク質の分解を司るプロテアソームの活性を全く阻害しないことが明らかになった。図 1 で示したように、分解される運命にあるタンパク質はポリユビキチン化されプロテアソームにより分解される。最近、ポリユビキチン鎖とプロテアソームの両方に親和性を示すタンパク質の存在が明らかになり、そのようなタンパク質(図 1 中のステップ E で働くタンパク質 X)がポリユビキチン化タンパク質をプロテアソームに運搬しているのではないかと提案されている^{44,45)}(運搬の過程はリクルートあるいはシャトルという言葉で表現されているので、この説はリクルート(シャトル)モデルと呼ばれている)。筆者らは、20 のターゲットは p53 に特異的なタンパク質 X ではないかと推定している⁴⁶⁾。現在、このリクルートの過程に関してホットな研究が展開されており、今後、その詳細が明らかになるであろう。リクルートの過程に対する阻害物質は現在までに報告されていないので、20 は新しいタイプの阻害剤になると期待している。

ま と め

今日、ユビキチン-プロテアソームシステムに多くの注目が集まっている大きな理由として、このシステムが極めて多様な生命現象に深く関わっていることがあげられる。また、分解マシンであるプロテアソームの構造や触媒機構が従来のプロテアーゼの範疇に入らない新しいものであることも注目されている理由である。そして、分解されるべきタンパク質がユビキチン化される過程も単純ではなく、E1, E2, E3 と呼ばれる3つの酵素が関与していること、それらのユビキチン化酵素群、特にユビキチンリガーゼ E3 が極めて分子多様性に富んでいること、また、タンパク質を分解する過程も複数のステッ

プからなることなど、システム自体が非常に複雑である。さらに、分子多様性を示す E3 酵素の解明や、ポリユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに運搬する過程の解明など、このシステムにおいて詳細が未だ明らかにされていない部分が多く残されている。

以上のように、ユビキチン-プロテアソームシステムは、システム自身が複雑であり、未知の

Fig. 8 (A) Giroline-induced accumulation of polyubiquitinated p53. (B) The effects of giroline, MG 132, and leptomycin B on accumulation of polyubiquitinated p53. IP, immunoprecipitation. IB, immunoblotting.

部分が多く残されているということは、天然物化学・創薬化学の研究分野から考えると、ターゲットにできるポイントがたくさん存在することを意味しており、基礎研究・開発研究の対象として極めて魅力的であると言える。現在、抗がん剤、抗炎症剤としてのプロテアソーム阻害物質やユビキチンリガーゼ阻害物質の開発が待望されている。今後、ユビキチン-プロテアソームシステムの解明のための分子プローブの開発に役立つ化合物や、疾病の治療薬のための新しいリード化合物が、天然資源から発見されることを願ってやまない。

(2004年5月11日受理)

文 献

- 1) A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425 (1998)
- 2) D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 1015 (1999)
- 3) M. Pickart, *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 503 (2001)
- 4) M. H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.*, **82**, 373 (2002)
- 5) S. Ōmura, T. Fujimoto, K. Otoguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Tanaka, Y. Sasaki, *J. Antibiotics*, **40**, 113 (1991)
- 6) S. Ōmura, K. Matsuzaki, T. Fujimoto, K. Kosuge, T. Furuya, S. Fujita, A. Nakagawa, *J. Antibiotics*, **40**, 117 (1991)
- 7) G. Fenteany, R. F. Standaert, G. A. Reichard, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3358 (1994)
- 8) M. Hanada, K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiotics*, **45**, 1746 (1992)
- 9) L. Meng, R. Mohan, B. H. B. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10403 (1999)
- 10) K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, A. L. Goldberg, *Cell*, **78**, 761 (1994)
- 11) J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y.-T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 333 (1998)
- 12) J. Adams, *Drug Discov. Today*, **8**, 307 (2003)
- 13) Y. Koguchi, J. Kohno, M. Nishino, K. Takahashi, T. Okuda, T. Ohnuki, S. Komatsubara, *J. Antibiotics*, **53**, 105 (2000)
- 14) J. Kohno, Y. Koguchi, M. Nishino, K. Nakao, M. Kuroda, R. Shimizu, T. Ohnuki, S. Komatsubara, *J. Org. Chem.*, **65**, 990 (2000)
- 15) M. Inoue, H. Sakazaki, H. Fukuyama, M. Hirama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2654 (2003)
- 16) S. Lin, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 512 (2002)
- 17) K. Albrecht, R. M. Williams, *Org. Lett.*, **5**, 197 (2003)
- 18) M. Groll, Y. Koguchi, R. Huber, J. Kohno, *J. Mol. Biol.*, **311**, 543 (2001)
- 19) M. Inoue, H. Zhai, H. Sakazaki, H. Furuyama, Y. Fukuyama, M. Hirama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 663 (2004)
- 20) I. Momose, R. Sekizawa, H. Hashizume, N. Kinoshita, Y. Honma, M. Hamada, H. Iinuma, T. Takeuchi, *J. Antibiotics*, **54**, 997 (2001)
- 21) I. Momose, R. Sekizawa, S. Hirokawa, D. Ikeda, H. Naganawa, H. Iinuma, T. Takeuchi, *J. Antibiotics*, **54**, 1004 (2001)
- 22) I. Momose, R. Sekizawa, H. Iinuma, T. Takeuchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2256 (2002)
- 23) R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 355 (2003)
- 24) E. J. Corey, W.-D. Z. Li, T. Nagamitsu, G. Fenteany, *Tetrahedron*, **55**, 3305 (1999)
- 25) A. Asai, T. Tsujita, S. V. Sharma, Y. Yamashita, S. Akinaga, M. Funakoshi, H. Kobayashi, T. Mizukami, *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 227 (2004)
- 26) S. Aoki, Y. Yoshioka, Y. Miyamoto, K. Higuchi, A. Setiawan, N. Murakami, Z.-S. Chen, T. Sumizawa, S. Akiyama, M. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 6303 (1998)
- 27) S. Aoki, A. Setiawan, Y. Yoshioka, K. Higuchi, R. Fudetani, Z.-S. Chen, T. Sumizawa, S. Akiyama, M. Kobayashi, *Tetrahedron*, **55**, 13965 (1999)
- 28) S. Tsukamoto, M. Tatsuno, R. W. M. van Soest, H. Yokosawa, T. Ohta, *J. Nat. Prod.*, **66**, 1181 (2003)
- 29) R. Sekizawa, S. Ikeno, H. Nakamura, H. Naganawa, S. Matsui, H. Iinuma, T. Takeuchi, *J. Nat. Prod.*, **65**, 1491 (2002)
- 30) M. Ashcroft, K. H. Vousden, *Oncogene*, **18**, 7637 (1999)
- 31) R. Honda, H. Tanaka, H. Yasuda, *FEBS Lett.*, **420**, 25 (1997)
- 32) P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine, N. P. Pavletich, *Science*, **274**, 948 (1996)
- 33) S. J. Duncan, S. Gruschow, D. H. Williams, C. McNicholas, R. Purewal, M. Hajek, M. Gerliz, S. Marin, S. K. Wrigley, M. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 554 (2001)
- 34) R. Stoll, C. Renner, S. Hansen, S. Palme, C. Klein, A. Belling, W. Zeslawski, M. Kamionka, T. Rehm, P. Muhlhahn, R. Schumacher, F. Hesse, B. Kaluza, W. Voelter, R. A. Engh, T. A. Holak, *Biochemistry*, **40**, 336 (2001)
- 35) J. Zhao, M. Wang, J. Chen, A. Luo, X. Wang, M. Wu, D. Yin, Z. Liu, *Cancer Lett.*, **183**, 69 (2002)
- 36) L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science*, **303**, 844 (2004)
- 37) A. Rossi, G. Elia, M. G. Santoro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 746 (1997)
- 38) J. E. Mullally, P. J. Moos, K. Edes, F. A. Fitzpatrick, *J. Biol. Chem.*, **276**, 30366 (2001)
- 39) S. M. Verbitski, J. E. Mullally, F. A. Fitzpatrick, C. M. Ireland, *J. Med. Chem.*, **47**, 2062 (2004)
- 40) S. Tsukamoto, K. Tane, T. Ohta, S. Matsunaga, N. Fusetani, R. W. M. van Soest, *J. Nat. Prod.*, **64**, 1576 (2001)
- 41) A. Ahond, M. B. Zurita, M. Colin, C. Fizames, P. Laboute, F. Lavelle, D. Laurent, C. Poupat, J. Pusset, M. Pusset, O. Thoisson, P. Potier, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. II*, **307**, 145 (1988)
- 42) G. Colson, B. Rabault, F. Lavelle, A. Zerial, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1717 (1992)
- 43) W. R. Taylor, G. R. Stark, *Oncogene*, **20**, 1803 (2001)
- 44) Y. Saeki, A. Saitoh, A. Toh-e, H. Yokosawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 986 (2002)
- 45) R. Hartmann-Petersen, M. Seeger, C. Gordon, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 26 (2003)
- 46) S. Tsukamoto, K. Yamashita, K. Tane, R. Kizu, T. Ohta, S. Matsunaga, N. Fusetani, H. Kawahara, H. Yokosawa, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 699 (2004)

PROFILE

塚本佐知子 金沢大学薬学部・助教授

〔経歴〕1983年北海道大学薬学部製薬化学科卒業, 1985年北海道大学大学院薬学研究科修士課程修了, 1986年北海道大学大学院薬学研究科博士課程中退, 1986年北海道大学薬学部教務職員, (1988-90年米国ロードアイランド大学薬学部博士研究員(清水譲教授)), 1992年新技術事業団(現・科学技術振興事業団)創造科学推進事業伏谷着生機構プロジェクト研究員, 1996年海洋バイオテクノロジー研究所研究員, 1997年東京大学分子細胞生物学研究所リサーチアソシエート, 2000年金沢大学薬学部助教授。〔専門〕天然物化学。

横沢英良 北海道大学大学院薬学研究科・教授

〔経歴〕1967年東京大学理学部生物化学科卒業, 1969年東京大学大学院理学系研究科修士課程修了, 1972年東京大学大学院理学系研究科博士課程単位取得退学, 1972年東京大学医科学研究所助手, 1973年北海道大学薬学部助手(1977-79年米国バンダービルト大学医学部 Research Associate), 1979年北海道大学薬学部助教授, 1990年北海道大学薬学部教授, 1998年北海道大学大学院薬学研究科教授。〔専門〕生化学・細胞生物学。〔連絡先〕

書 評

ブラウ 生命系のためのX線解析入門

David Blow 著・平山令明 訳

化学同人 A5判・304頁 4,830円(税込)

有機合成で構造決定と言えばNMR, MS, IRを使うのが普通だが, 最近はX線構造解析も身近になってきた。装置と解析ソフトの進歩でX線の敷居が低くなってきたため, 専門家でない者がルーチン機器として使えるようになってきている。有機金属錯体の構造や立体化学の決定はX線のデータを示されると納得しやすい。ところが, 有機化学者がX線構造解析の中身をきちんと勉強しようとする手頃な本が無かった。結晶学の専門家向けの本は数式が嫌いな人には難解であり適当でない。本書はタンパク質のX線構造解析を解説したものであるが, 大部分は低分子の有機化合物と共通である。

本書はユニークなイラストをたくさん入れ, ビジュアルに分かるように工夫されている。本文は数式に頼らな

い説明をしており, 専門書に多い詳しい数式はBox記事で紹介することで, 苦手な人は飛ばして読める。基礎編では基本原理を説明し, 実践編では実験技術に関する説明を行っている。何がデータの質に影響するかが分かるため, 実際にX線解析を行う方は全体をきちんと理解しておく必要性を感じる。また, 解析結果を見るだけの方にはデータの質を表すパラメーターの着眼点が分かる。

著者はタンパク質構造解析の草分けである。訳者は著者の研究室に留学されていて, 啓蒙書を何冊も書かれている方であり, 訳文も自然で大変読みやすい。X線データを見たり, 身近に装置がある方にお薦めします。

(須山和晴)