

タンパク質分解の不思議： ユビキチン - プロテアソームシステムの仕組みと創薬

塚本佐知子^a、横沢英良^{*b}

Sachiko Tsukamoto^a, Hideyoshi Yokosawa^{*b}

^a熊本大学 大学院生命科学研究部 天然薬物学分野、

^b愛知学院大学 薬学部 生体機能化学講座

^a*Department of Natural Medicines, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan;*

^b*Laboratory of Medicinal Biochemistry, School of Pharmacy,
Aichi-Gakuin University, 1-100 Kusumoto, Chikusa, Nagoya 464-8650, Japan*

タンパク質は生命現象の最前線で働いている。個々のタンパク質には固有の寿命があり、タンパク質はリボソーム上で生合成されて細胞社会で役割を果たした後に、己の寿命に従って分解される。このタンパク質の寿命決定に重要な役割を果たしているのがユビキチン - プロテアソームシステムである。このシステムによってタンパク質はユビキチン化され分解される。したがって、このシステムの標的タンパク質が関与する生命現象はこのシステムによって制御されることになる。すなわち、ユビキチン - プロテアソームシステムは様々な生命現象に関与し、その破綻は病気につながる。タンパク質分解は細胞の正常な働きを制御しており、タンパク質が分解されなくなっても、あるいは、分解されすぎても、細胞の働きに異常が生じる。ここに、タンパク質分解の不思議さが如実に現れている。現在、このユビキチン - プロテアソームシステムに関する研究が爆発的に進展している。本総説では、このシステムの仕組みとこのシステムを標的とする創薬研究について概説する。

Keywords: ubiquitin; proteasome; post-translational modification; drug development

1. はじめに

2003年に、ヒトゲノムが解読され、遺伝子の数は22,000個であることが明らかになった。ヒトのからだは60兆個の細胞からできており、1個の細胞、すなわち、1個の受精卵から発生していろいろな細胞ができ、組織・器官が形成される。この時、遺伝子DNAからmRNAが転写され、タンパク質が生合成される。22,000個の遺伝子から5～7万個のタンパク質が生合成される。遺伝子とタンパク質が1:1に対応していないのは、1個のmRNA前駆体から数個の成熟mRNAができ、数個のタンパク質が生合成され、また、あるタンパク質は翻訳後修飾されるからである。細胞の働きを実際に担っているのがタンパク質であり、タンパク質は生命現象の最前線で働いている。

タンパク質は、リボソーム上で生合成されて細胞社会

の中で役割を果たしている。近年の研究から、タンパク質の生合成に加えて、タンパク質の分解が非常に重要であることが明らかになってきた。すなわち、個々のタンパク質には固有の寿命があり、生命現象はタンパク質の生合成と分解のバランスの上に成り立っていると言える。

タンパク質の分解を司る酵素系は、細胞外タンパク質分解系と細胞内タンパク質分解系に大別される。前者には、トリプシンやキモトリプシン等の消化酵素、トロンビン等の血液凝固系酵素、レニンやアンギオテンシン変換酵素等の昇圧酵素が含まれる。一方、後者には、ユビキチン - プロテアソームシステム、オートファゴソーム - リソソームシステム、カスパーゼ、カルパインが含まれるが、細胞内のタンパク質分解で主要な役割を果たすのは、ユビキチン - プロテアソームシステムとオートファゴソーム - リソソームシステムである。そして、ユビキ

Footnotes:

*Corresponding author.

Hideyoshi Yokosawa

Tel: +81 52 757 6782; fax: +81 52 757 6799.

E-mail address: yokosawa@dpc.agu.ac.jp

チン - プロテアソームシステムに関する爆発的な研究の進展により、タンパク質分解が生命現象の制御機構として極めて重要な役割を果たしていること、また、病気との関連が明らかになってきた。さらに、このシステムを標的とする創薬研究が新しい視点での薬の開発として注目されている。なお、オートファゴソーム - リソソームシステムに関する研究も、ユビキチン - プロテアソームシステムとの関連性が明らかになり、最近、爆発的な進展を見せている。

我々は、タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の生理的役割を解明する研究を進める中で、当時、新規プロテアーゼとして提唱されていたプロテアソームが受精（精子と卵の相互作用）・発生に関与することを発見した。そして、これを契機に、ユビキチン - プロテアソームシステムに関する研究を展開してきた。本総説では、ユビキチン - プロテアソームシステムの仕組みと創薬研究について、我々の最近の研究成果を中心に概説する。

2. ユビキチン - プロテアソームシステムの仕組み

(1) ユビキチン - プロテアソームシステムの概要

2004年に、ユビキチン依存的タンパク質分解の発見とメカニズムの解明に貢献した3名の研究者にノーベル化学賞が与えられた（紹介記事¹⁾参照）。この年の少し前から、ユビキチン - プロテアソームシステムに関する論文の発表が爆発的に増加している。ユビキチン依存的タンパク質分解とは、低分子量タンパク質ユビキチンとATPに依存してタンパク質が分解されることであり、これを司る酵素系をユビキチン - プロテアソームシステムと呼ぶ。ユビキチン - プロテアソームシステムは2つのサブシステムからなる。すなわち、翻訳後修飾ユビキチン化

を司るユビキチンシステムとユビキチン化されたタンパク質を分解する分解装置のプロテアソームである²⁻⁷⁾ (図1)。

(i) ユビキチンとユビキチンシステム

低分子量タンパク質ユビキチンは76個のアミノ酸からなり、コンパクトな球状構造をとる。そのアミノ酸配列は酵母からヒトまで良く保存されており、7個のリシン (Lys) 残基を有する。翻訳後修飾ユビキチン化とは、ユビキチン分子のC末端カルボキシル基が、標的タンパク質あるいは他のユビキチン分子のLys残基のε-アミノ基とイソペプチド結合で連結することである。このイソペプチド結合の形成を司る酵素系がユビキチンシステムである。

ユビキチンシステムは3種類の酵素から構成される (図1参照)。すなわち、ユビキチンを活性化するユビキチン活性化酵素E1、活性化されたユビキチンを結合するユビキチン結合酵素E2、そして、E2に結合したユビキチンを標的タンパク質あるいは他のユビキチン分子に渡し両者の間のイソペプチド結合の形成に関与するユビキチンリガーゼE3である。E1が触媒する反応では、E1分子上の2つの異なる結合部位にユビキチンとATPがそれぞれ結合し、ユビキチンのアデニル化がおり、ユビキチン-AMPが生成する。次に、活性化されたユビキチンが、E1分子の活性部位のシステイン (Cys) 残基に渡され、C末端カルボキシル基を介してチオエステル結合する。E1分子にチオエステル結合したユビキチンは、次に、E2分子に渡され、C末端カルボキシル基を介して活性部位のCys残基にチオエステル結合する。E3は、ユビキチンとチオエステル結合したE2を結合する部位を持ち、2つのファミリー (RING型E3とHECT型E3) に大別される。RING型E3は、E2にチオエステル結合したユビキチンを、直接、標的タンパク質 (あるいは他のユビキチン分子) のLys残基にC末端カルボキシル基を介してイソペプチド結合させる (この修飾がユビキチン化である)。一方、HECT型E3は、E2にチオエステル結合したユビキチンを、一旦、自らのCys残基にチオエステル結合させた後に、標的タンパク質 (あるいは他のユビキチン分子) のLys残基にイソペプチド結合させる (この修飾もユビキチン化である)。ユビキチンシステムの特徴は階層性があることである。すなわち、哺乳類の場合、主要なE1は1種類 (他に2種類のマイナーなE1が存在する)、E2はおよそ30種類、そして、E3の数はおよそ1000にも及び、それぞれのE3に対応するE2が決まっている。E3の数が多なのは、それぞれのE3が特定の標的タンパク質に対応しているためであり、E3は標的タンパク質を結合する部位を持っている。すなわち、個々のE3がどの標的タンパク質をユビキチン化するかを識別・決定

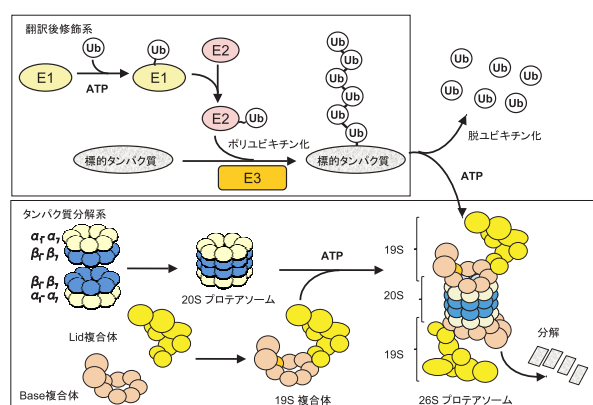


図1. ユビキチン - プロテアソームシステムのモデル

ユビキチン - プロテアソームシステムは翻訳後修飾系のユビキチンシステムとタンパク質分解系のプロテアソームからなる。Ub: ユビキチン; E1: ユビキチン活性化酵素; E2: ユビキチン結合酵素; E3: ユビキチンリガーゼ。

しており、E3の構造的特徴は、E2結合部位と標的タンパク質結合部位を合わせ持つことである。

(ii) ポリユビキチン化

ユビキチン化された標的タンパク質を分解する分解装置が26Sプロテアソームである。26Sプロテアソームによって標的タンパク質が認識されて分解されるためには、4個以上のユビキチンが鎖状に連結したポリユビキチン鎖の形成が必要である。このポリユビキチン鎖の形成は、上記のユビキチンシステムによって触媒される。すなわち、最初のユビキチンが標的タンパク質のLys残基に連結後、次に、標的タンパク質に結合した最初のユビキチンのLys残基（良く研究されているのがLys48残基とLys63残基）に、別のユビキチンがユビキチンシステムに触媒されて連結し、2個のユビキチンが連結した鎖ができる。さらに、2個のユビキチンからなる鎖にユビキチンが次々と連結し、複数のユビキチンが連結したポリユビキチン鎖が形成される（この修飾がポリユビキチン化である）。

(iii) プロテアソーム

26Sプロテアソームは、分子量2.5MDaの超高分子量複合体で、20Sプロテアソーム（コア粒子CPとも呼ばれる）と19S複合体（制御粒子RPとも呼ばれる）から構築され、20Sプロテアソームの両端に19S複合体が結合した構造（19S-20S-19S構造）をとる（図1参照）。

20Sプロテアソームは、7種類の α サブユニットからなる α リングと7種類の β サブユニットからなる β リングが、 $\alpha\beta\alpha$ の順に並んだ構造（ $\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_1$ 構造）をとり、 β サブユニットがタンパク質を分解する活性部位を有する。プロテアソームは、触媒残基としてトレオニン（Thr）を有するトレオニンプロテアーゼに分類され、その特性は多触媒能を示すことであり、複数の異なる性質の活性部位を有する。すなわち、プロテアソームは、カスパーゼ様、トリプシン様、及びキモトリプシン様活性を合わせ持ち、それぞれの活性部位は $\beta 1$ サブユニット、 $\beta 2$ サブユニット、及び $\beta 5$ サブユニットに存在する（活性部位は合計6個存在することになる）。また、一般的な酵素の活性部位は酵素分子表面の割れ目に存在するが、プロテアソームの活性部位はリング状構造の内部に存在するので、分解される標的タンパク質はリング構造の中に入っていって分解される。20Sプロテアソームの両端の α リングは閉じた構造をしているが、19S複合体が結合することによって、すなわち、26Sプロテアソームが構築されると、 α リングのゲートが開くので、標的タンパク質がリング状構造の中に入ることができ、 β リング内の活性部位で分解される。

一方、19S複合体は、およそ20種類の異なるサブユニット（Rpt ATPaseサブユニット群とRpn non-ATPaseサブユニット群に分類される）を含み、2つのサブ複合体（Lid複合体とBase複合体）から構成される。Lid複合体は少なくとも9つのRpn サブユニット（Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, Rpn12, Rpn15）からなり、Base複合体は6つのRpt サブユニット（Rpt1~Rpt6）と4つのRpn サブユニット（Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13）からなる。このうち、Rpn10とRpn13は標的タンパク質に連結したポリユビキチン鎖を認識するユビキチンレセプターとして働き、Rpn11は標的タンパク質とポリユビキチン鎖との間のイソペプチド結合を切断するメタロプロテアーゼ（脱ユビキチン化酵素）として働き、Rpt1~Rpt6からなるリング状のATPase 6量体は標的タンパク質のアンフォールディング（秩序正しい構造を無構造にすること）と20Sプロテアソームのゲートの開口に関与する。また、Rpn1とRpn2はユビキチン様ドメインを持つユビキチン様タンパク質のレセプターとして機能する。

以上の26Sプロテアソームの構造と各サブユニットの機能分担からわかるように、ユビキチン依存的タンパク質分解の仕組みは以下の様に考えられている。すなわち、ユビキチンシステムによってポリユビキチン化された標的タンパク質は、（1）プロテアソームのユビキチンレセプターによるポリユビキチン鎖の認識を介してプロテアソームに結合し、（2）プロテアソームの脱ユビキチン化酵素によってポリユビキチン鎖をはずされ、（3）ATPaseリングによるアンフォールディングを受けて20Sプロテアソームの中に入り、（4） β リング内の活性部位で分解される。なお、はずされたポリユビキチン鎖はプロテアソームと相互作用する他の脱ユビキチン化酵素（Ubp6/Uspl4やUch37）によって切断され、遊離型のユビキチン分子が再生し、再利用される。

プロテアソームの興味深い点の一つは多様性があること（少なくとも3つのアイソフォームの存在）である^{7,9)}。一般の細胞・組織に存在するプロテアソームは「普遍型プロテアソーム」と呼ばれる。その3種類の活性部位を構成する $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、及び $\beta 5$ サブユニットがそれぞれ、インターフェロン γ によって誘導される $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、及び $\beta 5i$ サブユニットに置き換わったアイソフォームは、「免疫プロテアソーム（immunoproteasome）」と呼ばれ、抗原提示に関与する。さらに、最近、 $\beta 5$ が $\beta 5t$ に置き換わったアイソフォーム（ $\beta 1$ と $\beta 2$ はそれぞれ $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ に置き換わっている）が発見された。胸腺のみで発現するので「胸腺プロテアソーム（thymoproteasome）」と呼ばれ、胸腺におけるT細胞クローンの「正の選択」に関与することが明らかになった。普遍型プロテアソームはカスパー

ゼ様、トリプシン様、及びキモトリプシン様活性を示すが、免疫プロテアソームでは、カスパーゼ様活性が低下し、トリプシン様及びキモトリプシン様活性が増加することによって、疎水性及び塩基性アミノ酸をC末端アミノ酸残基として持つペプチド（MHCクラスI抗原ペプチド）が産生される。一方、胸腺プロテアソームは普遍型及び免疫プロテアソームに比べてより低いキモトリプシン様活性を示す。以上のように、アイソフォームにおける基質特異性の違いが生まれ、そのことが上記のアイソフォームの機能を保証しているのである。

最近の研究から、プロテアソームの形成の仕組みが明らかになった^{7, 10, 11)}。20Sプロテアソームの形成では、2つのPAC複合体（PAC1-PAC2複合体とPAC3-PAC4複合体）とUMPIがシャペロンとして働き、7種類の α サブユニットと7種類の β サブユニットから成熟型20Sプロテアソームが構築される。一方、19S複合体の形成では、p28, Rpn14, S5b及びp27がシャペロンとして働いてBase複合体ができ、Lid複合体と会合する。なお、Lid複合体の形成の仕組みの詳細はまだ不明であり、また、20Sプロテアソームと19S複合体がATP依存的に会合することが明らかになっているが、その仕組みの詳細もまだ不明である^{10, 12-14)}。

（2）プロテアソームに関する研究

（i）プロテアソームとの出会い

我々は、生命現象におけるプロテアーゼの生理機能に興味を持ち、1980年代に、受精・発生現象におけるプロテアーゼの機能の解明を目指して研究を行った。初めに、各種プロテアーゼ阻害剤を駆使して受精・発生過程のどのステップでどのようなプロテアーゼが関与するかを推定した。次に、推定したプロテアーゼの実体を明らかにするために、精子と卵からの生化学的な純化を試みた。このために必要なことは、精子も卵も比較的大量に得られる生物を選ぶことであり、また、プロテアーゼ活性を特異的に測定できる基質や特異的阻害剤を開発することである。そして、生物としては、受精機構が哺乳類と類似している原索動物ホヤ類を用い、また、キモトリプシン様酵素の関与が推定されたので、特異的な発蛍光性ペプチド基質（Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA）の合成を会社に依頼し使用した¹⁵⁾（現在、プロテアソームのキモトリプシン様活性の測定に汎用されているのがこの基質である）。また、トリプシン様酵素の関与も考えられたので、合成した各種ロイペプチン誘導体（ロイペプチンはペプチド性アルデヒドで、トリプシンの特異的阻害剤である）も活用した¹⁶⁾。

受精に関与することが推定されたキモトリプシン様酵素について、上記の発蛍光性基質を用いて精子あるいは

卵からの純化を試みた。その活性は高分子量領域に検出されたので、いろいろな界面活性剤を用いて低分子化のための可溶化を試みた。当時のプロテアーゼの常識では、分子量が数10万を超えるプロテアーゼの存在はほとんど考えられなかったからである。結果はことごとく失敗であった。どのような可溶化の条件でも活性は消失してしまった。丁度その頃、新しいプロテアーゼとしてプロテアソーム（当初は多機能プロテアーゼ、あるいは高分子量プロテアーゼ複合体と呼ばれていた）の存在が明らかにされつつあった。翻って、我々が追っていたキモトリプシン様酵素の性質はまさしくプロテアソームの性質にそっくりであることに気付いた。そして、プロテアソームの概念を念頭に置いて、精子と卵からのプロテアソームの純化に成功したのである^{17, 18)}。

その後の研究から、精子が卵に出会った時に、精子からユビキチン、ATP、ユビキチンシステムのE1、E2、E3酵素が放出され、卵黄膜上の精子レセプターをユビキチン化し、同時に精子から放出されたプロテアソームがポリユビキチン化された精子レセプターを分解し、精子自らが通る穴をあけ、結果として精子は卵内に侵入できること、すなわち、精子のユビキチン-プロテアソームシステムは精子の卵黄膜通過に関与することが明らかになった^{19, 20)}（図2）。また、この発見は、ユビキチン-プロテアソームシステムが細胞外でも機能していることを示している。我々の研究成果は原索動物を用いて得られたが、我々の発見を受けて、他の研究者が、ユビキチン-プロテアソームシステムが哺乳類の受精にも関与することを明らかにしている。なお、その後、プロテアソームの標

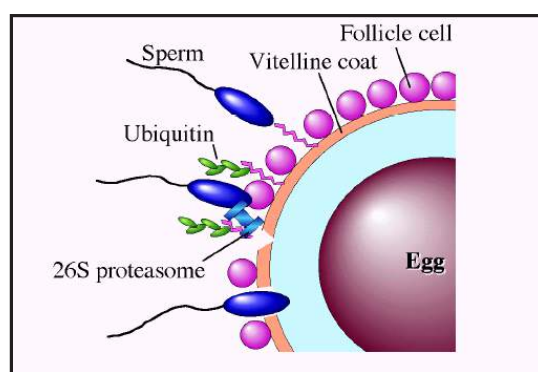


図2. 精子の卵黄膜通過のモデル

精子の卵黄膜（Vitelline coat）通過におけるユビキチン-プロテアソームシステムの働きに関する我々のモデルを示した。精子が卵黄膜上の精子レセプターに結合すると、ユビキチン、ATP、E1、E2、E3、及びプロテアソームが精子から放出され、精子レセプターのユビキチン化と分解が起こる。

的であるホヤ・精子レセプターがアロ認識分子であることが明らかになり^{21, 22)}、現在、アロ認識機構研究の新たな展開がなされている。また、卵のプロテアソームに関する研究では、卵割過程におけるプロテアソームの局在や活性の変化が明らかになり^{23, 24)}、細胞周期の進行に伴うプロテアソームの挙動の変化が初めて示された。

(ii) プロテアソームの新しいサブユニットの発見

我々は、プロテアソームの特性を明らかにするために、生殖細胞からのプロテアソームの単離に加え、哺乳類の赤血球、骨格筋や脳等の臓器、あるいは培養細胞からのプロテアソームの単離を試みた。いずれの場合も単離に成功しているが、26Sプロテアソームの精製・純化は操作時間との勝負であり、如何に短時間に安定な26Sプロテアソーム標品を得るかが課題であった。

そこで、我々は、遺伝子操作が容易な出芽酵母を用いてプロテアソームの簡易精製法の確立を目指した。すなわち、タグ（例えば、FLAGタグ）を融合したプロテアソームサブユニット遺伝子（例えば、Base複合体の*RPN1*遺伝子、Lid複合体の*RPN11*遺伝子、あるいは20Sプロテアソームの*PRE1* ($\beta 4$) 遺伝子) を、染色体上の元のプロテアソームサブユニット遺伝子と置換することによって、特定のサブユニットにタグが付いたプロテアソームを発現している酵母株を作成した。この酵母株を用いると、酵母破碎液からタグを利用して抗FLAG抗体カラムを用いた一回のアフィニティ精製により、26Sプロテアソームを単離することができた^{25, 26)}。また、酵母変異株を活用し、溶出の条件を変えることによって、Base複合体、Lid複合体、あるいは20Sプロテアソームも単離できた。

酵母から単離したプロテアソームを解析したところ、今迄報告されていないサブユニットが含まれていることに気付いた。質量分析の結果、新しいサブユニットはSem1であることが判明したので、それをRpn15と命名した²⁶⁾。そして、*SEM1*欠失変異株を用いた解析から、この変異株では、19S複合体が不安定であり、その不安定性は野生型*SEM1*の発現でレスキューされること、変異株では高温条件下でポリユビキチン化タンパク質の蓄積が検出されるが、野生株では検出されないこと、*in vitro*タンパク質分解系での解析で、変異株から調製した26Sプロテアソームではポリユビキチン化されたSic1タンパク質の分解が極めて遅いことが明らかになった。すなわち、Sem1 (Rpn15)はプロテアソームの新規サブユニットであり、ユビキチン依存的タンパク質分解に重要な役割を果たすと結論した。

酵母Sem1のヒトホモログがDSS1である。我々の結果でも、酵母の*SEM1*欠失変異株の増殖における温度感受

性がヒトDSS1の発現でレスキューされる。一方、DSS1はBRCA2（乳がん感受性遺伝子産物）と相互作用してDNA修復に関与すること、また、Sem1/DSS1がmRNAのスプライシングや核外輸送、あるいはヒストンのリモデリング等に関与する複合体に結合していることが明らかになっている²⁷⁾。我々は、プロテアソームがDSS1を介してBRCA2に結合することを明らかにしているが、上記のSem1/DSS1の多様な機能がプロテアソームを介して発揮されているのかに興味を持たれる。

(3) リクルートシステムに関する研究

既に述べたように、ユビキチン-プロテアソームシステムはユビキチンシステムとプロテアソームの2つのサブシステムからなる。さらに、最近、ユビキチンシステムとプロテアソームを結ぶ第3のシステムの存在が提唱されている。それは、ユビキチンシステムによってポリユビキチン化された標的タンパク質をプロテアソームに運搬するリクルートシステム（シャトルシステム、エスコートシステム等とも呼ばれる）である。

プロテアソームサブユニットRpn10はポリユビキチン化タンパク質のポリユビキチン鎖を認識するユビキチンレセプターとして機能する。ところが、酵母*RPN10*は非必須遺伝子で、その欠損株は表現系を示さない（ただし、哺乳類の場合、Rpn10には複数のアイソフォームがあり、Rpn10ノックアウトマウスは胎性致死である²⁸⁾）。また、最近見つかったユビキチンレセプター*RPN13*も非必須遺伝子である。さらに、その他のプロテアソームサブユニットはポリユビキチン鎖を結合できない。以上の事実は、プロテアソームサブユニット以外にユビキチンレセプターが存在することを示唆している。その候補分子が、プロテアソームともユビキチンとも結合できるRad23、Dsk2等のUbL-UBAタンパク質である。なお、UbL-UBAタンパク質は、プロテアソームとの結合部位であるUbLドメイン (ubiquitin-like domain)と、ユビキチンとの結合部位であるUBAドメイン (ubiquitin-associated domain)を合わせ持つタンパク質の総称である（図3参照）。

我々は、Rad23とDsk2がポリユビキチン鎖を結合でき、その結合にUBAドメインが必要であること、また、Rad23とDsk2のUbLドメインは26Sプロテアソームとの結合に必要であることを明らかにし、さらに、Rad23やDsk2の遺伝学的解析等から、Rad23、Dsk2、あるいはDdi1がポリユビキチン化タンパク質の26Sプロテアソームへの運搬に関与すると提唱した^{25, 29)}（図3）。時期を同じくして、同様の結果が多数報告され、現在、Rad23、Dsk2、Ddi1、あるいはCdc48-Ufd1-Npl4複合体等がリクルートシステムを構成し、外来性ユビキチンレセプター（Rpn10とRpn13は内在性ユビキチンレセプター）として

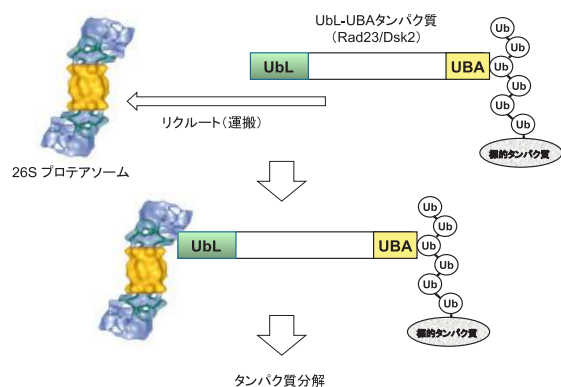


図3. リクルートシステムのモデル

ポリユビキチン化された標的タンパク質のプロテアソームへのリクルート（運搬）におけるUbL-UBAタンパク質の働きを示した。UbL：ubiquitin-like domain；UBA：ubiquitin-associated domain；Ub：ユビキチン。

機能していると推論されている^{6, 30, 31)}。しかし、内在性あるいは外来性ユビキチンレセプターも含めて、それぞれのユビキチンレセプターが個々の標的タンパク質をどのように識別しているかという問いかけに対しては包括的理解に至っていない³²⁾。今後の解明すべき重要な課題である。なお、この課題に関して、最近、我々は、UbLドメインを有するBAG6が、タンパク質がリボソーム上で生合成される時に誤って生成する翻訳欠陥産物（DRIP: defective ribosomal products）のユビキチン依存的分解に関与すること、また、BAG6のノックダウンによってMHCクラスIを介する抗原提示（MHCクラスI拘束性抗原提示で生成する抗原ペプチドはDRIP由来であることは既に明らかにされている）が抑制されることを明らかにした³³⁾。すなわち、BAG6がポリユビキチン化DRIPのプロテアソームへのリクルートに関与すると推定している。

上記のように、プロテアソームにはリクルートに関与するUbL-UBAタンパク質が結合できるが、それ以外にも多くのプロテアソーム結合タンパク質（proteasome-associated proteins/proteasome-interacting proteins (PIPs)）が報告されている^{6, 34)}。その中には、ユビキチンリガーゼE3（Hul5、Ufd4、Parkin等）や脱ユビキチン化酵素（Ubp6/Usp14、Uch37等）が含まれる。それらのタンパク質は、プロテアソーム上でポリユビキチン化タンパク質が分解される時に、プロテアソームの近傍でタンパク質分解の制御に働いていると推定されている。

（4）ユビキチン化に関する研究

タンパク質はそれぞれ固有の寿命を持っており、細胞内で固有の速度で代謝される。既に述べたように、細胞

内の主要タンパク質分解システムはユビキチン-プロテアソームシステムとオートファゴソーム-リソソームシステムであるので、プロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いて、タンパク合成阻害剤存在下でのタンパク質の分解がいずれの阻害剤で阻害されるかを調べることで、その分解がいずれのシステムによってなされるかを推定できる。その分解がプロテアソーム阻害剤によって阻害された時には、その阻害剤存在下にポリユビキチン化タンパク質が蓄積するかを調べることによって、ユビキチン依存的分解が否かを推定する。ほとんどの場合、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロッティングで、ポリユビキチン化タンパク質はラダー状のバンドとして検出される（例えば、我々の研究では、短寿命タンパク質の転写因子IRF-1³⁵⁾や増殖抑制因子BTG/Tobファミリー³⁶⁾は、ポリユビキチン化され、プロテアソームによって分解されることが明らかになっている）。

我々は、ポリユビキチン化タンパク質の特異的な検出や単離のために、ポリユビキチン鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成を試み、遊離のユビキチン分子を認識せず、ユビキチン鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体FK1とFK2の作成に成功した^{37, 38)}。2つの抗体のうち、FK2抗体はモノユビキチン化されたユビキチン分子も認識するが、FK1抗体はモノユビキチン化されたユビキチン分子を認識せず、2個以上のポリユビキチン鎖を認識する。我々は、ポリユビキチン鎖の解析^{39, 40)}、ストレス下のポリユビキチン化タンパク質の解析⁴¹⁾、あるいは、ヒト病理切片でのポリユビキチン化タンパク質の検出⁴²⁾等に、両抗体を活用した。現在、FK1抗体とFK2抗体は市販されており、多くの研究者により利用され、数多くの論文に登場している。

プロテアソームが認識するポリユビキチン鎖は、ユビキチン分子内のLys残基に他のユビキチン分子が結合することによって形成される。中でも、ユビキチン分子のLys48（K48）残基を介するポリユビキチン化（K48-ユビキチン化）が26Sプロテアソームによる分解のシグナルとして働き、一方、Lys63（K63）残基を介するポリユビキチン化（K63-ユビキチン化）は分解のシグナルでなく、DNA修復、シグナル伝達、エンドサイトーシス等のシグナルとして働くことが明らかにされている。なお、最近、標的タンパク質によってはK63-ユビキチン化もプロテアソームによる分解のシグナルとして働くことが明らかになった⁴³⁾。ユビキチン分子は7個のLys残基を有しているので、すべてのLys残基を介するポリユビキチン鎖の形成が考えられる。どのような組み合わせのポリユビキチン鎖が形成されているかを明らかにするために、ペプチドマスフィンガープリンティングによる解析法を考案した⁴⁴⁾（図4）。例として、図4に示したように、遊

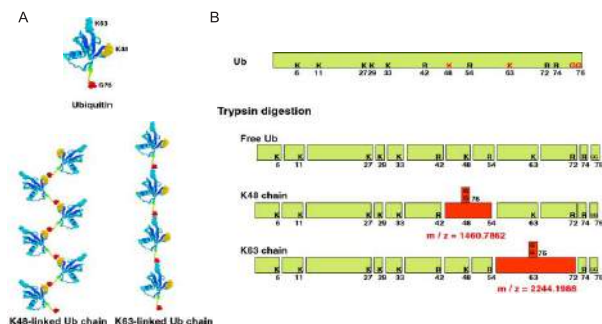


図4. ユビキチン鎖の解析

(A) ユビキチン、K48-ユビキチン鎖及びK63-ユビキチン鎖のモデルと(B) ユビキチン、K48-ユビキチン鎖及びK63-ユビキチン鎖のトリプシン消化ペプチド断片を示した。図中に、K48-ユビキチン鎖とK63-ユビキチン鎖から得られるT字形ペプチド断片のm/z値を示した。

離のユビキチン分子から得られるトリプシン消化ペプチド断片は12個であるが、K48-ユビキチン鎖の場合は11個で、その中にT字形のペプチド断片が含まれ、一方、K63-ユビキチン鎖の場合も11個であるが、その中にK48-ユビキチン鎖の場合とは異なるT字形のペプチド断片が含まれる。従って、それぞれのユビキチン鎖から特異的なT字形ペプチド断片が得られるので、それを質量分析で検出するという方法である。この方法によって、例えば、酵母のUFD (ubiquitin fusion degradation)過程におけるユビキチン化を解析し、Ufd2によるユビキチン鎖の形成はLys48残基を介することを証明した⁴⁴⁾。現在、質量分析を用いたユビキチン鎖の網羅的解析が行われており⁴⁵⁻⁴⁷⁾、ユビキチン分子のほとんどすべてのLys残基を介するユビキチン鎖の存在が明らかになりつつある。それらユビキチン鎖がどのような役割を果たしているのかに興味を持たれる。なお、我々が作成したFK1抗体とFK2抗体はK48-及びK63-ユビキチン鎖をほぼ同程度に認識するが、最近、K48-、K63-及びK11-ユビキチン鎖をそれぞれ特異的に認識する抗体が作成され、現在、K63-ユビキチン鎖特異的抗体は市販されている。

(5) ユビキチン様タンパク質に関する研究

ユビキチンと構造的に類似している分子をユビキチン様タンパク質と呼ぶ。それらはI型とII型に大別される。I型には、ユビキチンとのアミノ酸配列上の相同性があるもの (SUMO, NEDD8, ISG15等) と、アミノ酸配列上の相同性はないが立体構造が類似しているもの (URM1, UFM1, ATG8, ATG12等) が含まれるが、いずれも、ユビキチンシステムと類似の翻訳後修飾システム (図5参照: ユビキチンシステムとISG化システムの比較) によって標的タンパク質にイソペプチド結合するモディファイアー分子である^{48, 49)}。既に述べたように、ユビキ

チンは、K48-ユビキチン化ではタンパク質分解のシグナルとして、一方、K63-ユビキチン化では分解以外のシグナルとして、それぞれ機能する。他方、上記のユビキチン様タンパク質による翻訳後修飾は分解シグナル以外のシグナルとして機能する。例えば、SUMO化は核内輸送や核内因子の活性制御、細胞内局在の決定等に関与し、NEDD8化はユビキチンリガーゼE3の活性制御に関与する。また、ATG8化とATG12化はオートファジーに関与する。なお、II型ユビキチン様タンパク質は、タンパク質分子中にユビキチンドメインを有するもので、リクルートに関与するUbl-UBAタンパク質はこれに分類される。

既に述べたように、我々は、短寿命の転写因子IRF-1がユビキチン化されてプロテアソームによって分解されることやC末端ドメインがIRF-1の不安定性を規定していることを明らかにした³⁵⁾。そこで、次に、IRF-1の機能と安定性を制御する因子を探索する目的で、酵母2-ハイブリッドスクリーニングを行い、IRF-1結合タンパク質としてUbc9とPIAS3を同定した。SUMO結合酵素E2であるUbc9がIRF-1結合タンパク質として同定されたので、IRF-1がSUMO化される可能性を考えた。事実、IRF-1はPIAS3依存的にSUMO化されること (他のPIASファミリーも同様に作用する)、また、SUMO化されるとその転写活性が抑制されることが明らかになった⁵⁰⁾。PIASファミリーはIRF-1に対するSUMOリガーゼE3として働いていたのである。こうして、転写因子IRF-1は、ユビキチン化やSUMO化の翻訳後修飾を受け、安定性や活性が制御されていた。PIASファミリーがSUMOリガーゼE3であることが明らかになったので、次に、SUMO化されるタンパク質を同定するために、酵母2-ハイブリッドスクリーニングにより、PIAS結合タンパク質を探索し、候補タンパク質の同定を行った。

モディファイアー分子としてのユビキチン様タンパク

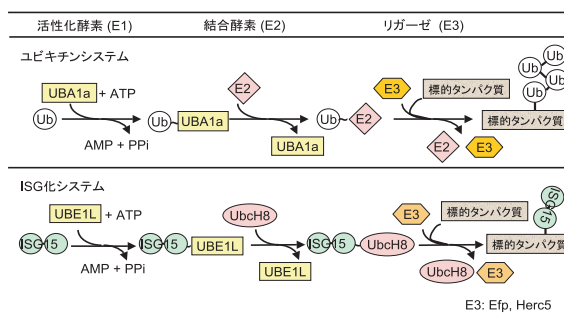


図5. ユビキチンシステムとISG化システムの比較
ISG15は、2個のユビキチン (Ub) がタンデムに連結した構造をとる。

質の中で、特に変わっているのがISG15 (interferon-stimulated gene 15)である。ISG15は2個のユビキチンがタンデムに連結した構造をとり、名前の通り、インターフェロンによって発現誘導される。さらに興味深いことに、ISG15と標的タンパク質との間のイソペプチド結合の形成（この翻訳後修飾をISG化と呼ぶ）を触媒する酵素系（ISG化システム：図5）もインターフェロンにより発現誘導される。我々は、ISG15がユビキチン様タンパク質の中で最もユビキチンとの類似性が高いので、ISG化システムのE2はインターフェロン誘導性のユビキチン結合酵素E2ではないかと考え、ISG化システムの解明を試みた。インターフェロン誘導性のUbcH5c、UbcH6及びUbcH8を含む6種のE2を用いて、ISG15及びISG15活性化酵素UBE1Lと共発現させたところ、UbcH6、UbcH8及びUbc13の場合、ISG化が観察された。前者の2つのE2の場合は、チオエステル結合したISG15も検出されたので、両者はISG化のE2であるとともに、ISG化も受けること、一方、Ubc13の場合はISG化のみを受けることが判明した^{51, 52)}。そして、ISG化サイトを同定し、ISG化によりE2活性が阻害されることを明らかにした。丁度同じ頃、UbcH8がISG化のE2であることが報告された。ISG化のレベルから考えて、UbcH8はISG化の主要なE2で、UbcH6はISG化のマイナーなE2であると考えられる。そこで、Flagタグを付加したISG15を、UBE1L、UbcH8、あるいはISG15リガーゼであるHerc5またはEfpと共発現させ、ISG化される標的タンパク質の網羅的解析をペプチドマスフィンガープリンティングにより行い、多くの候補タンパク質を同定した⁵³⁻⁵⁵⁾。それらの中で、プロテインホスファターゼPP2C β については、確かにISG化されること、ISG化で活性が抑制されることが明らかになった⁵³⁾。また、ISG化の標的として同定したUbc13については、Ubc13のISG化によってNF- κ Bの活性化が抑制されることも明らかになった⁵⁶⁾。以上のように、ISG化はその標的タンパク質の活性を抑制する作用を及ぼすと考えられる。最近のISG15の研究から、ISG15はISG化を介して抗ウイルス作用を及ぼすと推定されている⁵⁷⁾。ISG15は古くに発見されたユビキチン様タンパク質であるが⁵⁸⁾、生理的機能が解明され始めたのはごく最近である。この研究の終着点は何であるかが興味深い。

最後に、ユビキチン及びユビキチン様タンパク質の細胞外における機能について簡単に触れる。ユビキチンもユビキチン様タンパク質も細胞の増殖を促進するサイトカイン様作用を示すことが古くから明らかにされているが、その機構についてはほとんど未解決のままであった。しかし、最近、細胞外ユビキチンが結合するレセプターがケモカインレセプターCXCR4であることが明らかになった⁵⁹⁾。ISG15についてもサイトカイン様作用が古く

からわかっているが、この場合のレセプターは何であろうか。興味が尽きない。なお、最近、我々は、SUMOもサイトカイン様作用を示すことを明らかにしている⁶⁰⁾。

（6）ユビキチンワールドの提案

ユビキチン及びユビキチン様タンパク質はタンパク質の翻訳後修飾のモディファイアー分子として機能するが、これらの翻訳後修飾は可逆的である。すなわち、ユビキチン化も、SUMO化やISG化等のユビキチン様タンパク質の付加も可逆的で、それぞれのモディファイアー分子と標的タンパク質との間のイソペプチド結合を切断する酵素（脱ユビキチン化酵素、あるいは脱SUMO化酵素や脱ISG化酵素等と呼ばれる）が存在する。このユビキチン及びユビキチン様タンパク質による翻訳後修飾反応とその逆反応を包括的に捉え、1999年に、ユビキチン及びユビキチン様タンパク質が織り成す世界を「ユビキチンワールド」と提案した⁶¹⁾。当時、イソペプチド結合を切断する酵素の研究は始まったばかりであったが、現在、その数はおよそ100にも及び、それぞれの酵素の生理機能や細胞内局在性が明らかにされつつある^{62,63)}。脱ユビキチン化酵素ファミリーは、システインプロテアーゼとメタロプロテアーゼに大別され、前者の場合は、活性部位のドメイン構造からさらに5種類に分類される。これらの酵素はいわば古典的なシステインプロテアーゼあるいはメタロプロテアーゼに属するので、従来のプロテアーゼ研究の成果が活用できる。現在、生理機能解明や創薬研究も含めて、脱ユビキチン化酵素の研究が急速に進展している。

3. ユビキチン-プロテアソームシステムを標的とする創薬研究

（1）ユビキチン-プロテアソームシステムの生理機能と病気、そして、創薬研究のはじまり

ユビキチン-プロテアソームシステムの生理機能の最初の解明は、細胞周期制御機構の解析からもたらされた。細胞周期の制御機構として、リン酸化が重要な役割を果たしていることは既に明らかにされていたが、細胞周期に関与するサイクリンの発見、サイクリンのユビキチン依存的分解の発見、そして、サイクリンが分解されないと細胞周期が停止することが示され、ユビキチン依存的タンパク質分解が細胞周期制御機構として重要な役割を果たしていることが明らかになったのである。その後のユビキチン-プロテアソームシステムに関する爆発的な研究の展開によって、このシステムが、細胞周期の制御に加えて、遺伝子の転写制御、シグナル伝達の制御、タンパク質の品質管理、抗原提示、受精・発生等の様々な生命現象に関与している姿が浮かび上がってきた。すな

わち、ユビキチン依存的タンパク質分解が細胞の正常な働きを制御しているのである。この事実は、ユビキチン依存的タンパク質分解の破綻が病気の原因になることを暗示している。事実、ユビキチン-プロテアソームシステムに関する病気、特に、標的タンパク質の識別を行うユビキチンリガーゼE3と病気との関連が良くわかっている。例えば、E6-APはアンジェルマン症候群の責任遺伝子であり、ハイリスク型ヒトパピローマウイルスの感染では、E6-APはウイルスタンパク質E6と結合して、がん抑制因子p53のユビキチン化に関与し、p53の分解をもたらし、その結果、子宮頸がんが発症する。また、VHLは常染色体優性遺伝子疾患フォンヒッペルリンドウ病の責任遺伝子であり（VHLはがん抑制因子）、VHL複合体は転写因子HIF-1の分解に関与する。Parkinは常染色体劣性パーキンソニズムの責任遺伝子であり、最近、選択的ミトコンドリア分解に関与することが明らかになっている。

2003年に、プロテアソーム阻害剤Velcade（化学名：Bortezomib）が多発性骨髄腫に対する治療薬としてFDA（米国食品医薬品局）により認可された^{64, 65}。これを契機として、ユビキチン-プロテアソームシステムを標的とする創薬研究、特に抗がん剤の開発が盛んに行われるようになった。我々は、それ以前から、このシステムを標的とする創薬研究を立ち上げ、新しい視点での抗がん剤の天然資源からの探索を行っている⁶⁶⁻⁶⁹。図6に、我々が現在までに天然資源から単離したユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害剤をまとめた。

当初、プロテアソーム阻害剤が抗がん剤として認可されたことは驚きであった。なぜなら、ユビキチン-プロテアソームシステムは正常な生命現象を制御しているからである。現在では、がん細胞ではプロテアソームが高

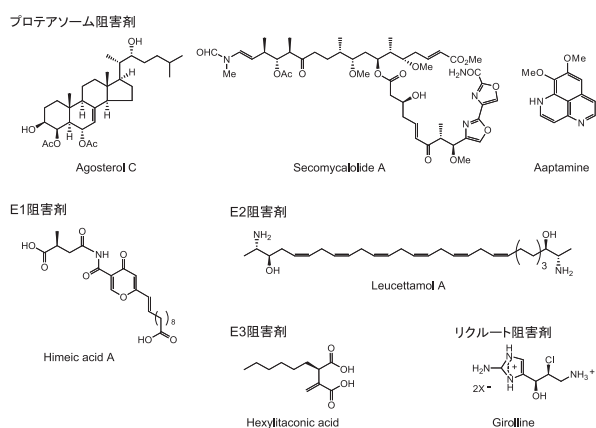


図6. 我々が単離したユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害剤の構造

天然資源から単離されたプロテアソーム阻害剤、E1阻害剤、E2阻害剤、E3阻害剤、及びリクルート阻害剤の構造を示した。

発現しているので、プロテアソーム阻害剤が抗がん作用を発揮すると理解されている。その後、Velcade/Bortezomibの治療で耐性となった症例や副作用が報告され、Bortezomibと他の薬剤との併用療法や、Bortezomibとは異なる機構で阻害する他のプロテアソーム阻害剤の開発が盛んに行われている。また、プロテアソームを阻害して抗がん作用が得られるのであれば、プロテアソームによるタンパク質分解の上位の過程を司る酵素系、すなわち、ユビキチンシステムを阻害しても同様の効果が期待できると容易に想像される。そのような背景から、ユビキチンシステム、特に、ユビキチンリガーゼE3に対する阻害剤の開発が盛んに行われている。

(2) プロテアソーム阻害剤の探索

これまでに報告されているプロテアソーム阻害剤として、MG132やBortezomib等のように有機合成により開発されたものと、LactacystinやSalinosporamide A等のように天然資源から探索・発見されたものが知られている。多様な化学構造を示すプロテアソーム阻害剤は、阻害機構に基づき、5つのグループ（ペプチド性アルデヒド、ホウ酸誘導体、 β -ラクトン、エポキシケトン、ビニルケトン）に大別される（表1）。なお、阻害機構がまだ未解明のプロテアソーム阻害剤が多数存在する。

表1. ユビキチン・プロテアソームシステムに対する阻害剤

I. プロテアソーム阻害剤

- | | |
|-----------------|---|
| • ペプチド性アルデヒド | MG132, Tyropeptin A, TP-104, Fellutamide B |
| • ホウ酸誘導体 | Bortezomib, CEP-18770, MLN9708 |
| • β -ラクトン | Lactacystin, Salinosporamide A, Belactosin A |
| • エポキシケトン | Epoxomicin, Carfilzomib, PR-957 |
| • ビニルケトン | Syringolin A, Glidobactin A |
| • 環状ペプチド | TMC-95A, Argyrin A |
| • その他 | Gliotoxin, EGCG, Agosterol C, Secomycalide A, Aaptamine |

II. ユビキチンシステムに対する阻害剤

- | | |
|---------|--|
| • E1阻害剤 | Panepophenanthrin, Himeic acid A, PYR-41, MLN4924 (NEDD8 E1阻害剤), Ginkgolic acid (SUMO E1阻害剤) |
| • E2阻害剤 | Leucettamol A, Peptoid |
| • E3阻害剤 | Chalcone, Syc-7, Nutlin 3, Chlorofusin, Hexylitaconic acid, SCF-12, SMER3 |

III. その他の阻害剤

- | | |
|----------------|--|
| • リクルート阻害剤 | Ubistatin, Girolline |
| • 脱ユビキチン化酵素阻害剤 | Δ^{12} - Prostaglandin J ₂ , Punaglandin 4, HBX 41, 108, IU1 |

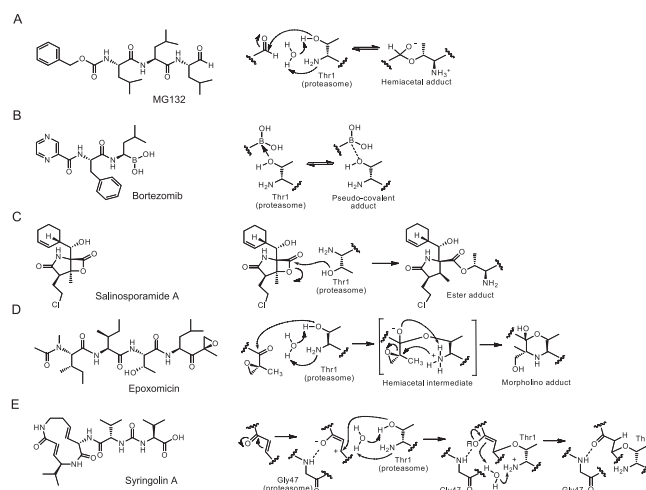


図7. プロテアソーム阻害剤の阻害機構

(A) ペプチド性アルデヒド、(B) ホウ酸誘導体、(C) β-ラクトン、(D) エポキシケトン、及び (E) ビニルケトンに属する代表的な阻害剤の構造と阻害機構を示した。

(i) プロテアソーム阻害剤：ペプチド性アルデヒド

ペプチド性アルデヒド型化合物は、セリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼに対する阻害剤として作用する。プロテアソームの場合、ペプチド性アルデヒドは、触媒残基であるN末端Thr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(図7A)。生理的条件下では、ペプチド性アルデヒドが酸化されてカルボン酸となり細胞外に排出される。代表的なプロテアソーム阻害剤として合成されたMG132⁷⁰⁾は、広く研究用試薬として使用されているが、臨床応用には適さない。Tyropeptin A は、放線菌の培養液から単離された化合物で、プロテアソームのキモトリプシン様活性とトリプシン様活性を強く阻害するが、カスパーゼ活性をほとんど阻害しない⁷¹⁾。さらに、TP-104の様なTyropeptin 誘導体が合成され、それらの阻害作用が調べられている。Fellutamide B は、当初、海洋由来真菌の培養液から細胞毒性物質として単離された化合物で、その構造がMG132に類似していることから、プロテアソーム阻害作用を調べられた。そして、キモトリプシン様活性を強く阻害し、トリプシン様及びカスパーゼ様活性に対する阻害作用は弱いことが明らかになった⁷²⁾。最近、天然資源由来の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングで、Fellutamide Bが結核菌プロテアソームに対する強い阻害剤であること、その阻害機構がヒトプロテアソームに対する阻害機構と異なることが明らかになっている⁷³⁾。

(ii) プロテアソーム阻害剤：ホウ酸誘導体

臨床応用が難しいMG132 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。古くから、ホウ酸はセリンプロテアーゼを阻害することが知られていた。ホ

ウ酸誘導体のホウ素は、プロテアソームの触媒Thr残基の水酸基の酸素原子のローンペアを受容し、安定な四面体中間体様構造をとり、プロテアソームを強く阻害する(図7B)。実際、ホウ酸誘導体は不可逆的阻害作用を示し、ペプチド性アルデヒドのように酸化されて不活性化され細胞外に排除されることもない。合成ホウ酸誘導体であるBortezomib (別名PS-341, 商品名Velcade)^{74, 75)}は、当初、抗炎症薬として開発されたが、2003年に、難治性の多発性骨髄腫の治療薬として米国で異例の早さで認可された後、2006年10月には日本でも認可された。Bortezomib は、プロテアソームを選択的に阻害し、がん細胞に対してNF-κBシグナリングを阻害することによりアポトーシスを誘導する。また、骨髄腫や卵巣腫瘍の臨床試験において、BortezomibとDNA障害性化学療法剤との併用療法で良好な臨床成果が得られている。一方、経口投与可能なホウ酸誘導体としてCEP-18770 が開発された。CEP-18770は、低濃度でプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害し、悪性骨髄腫に対する抗がん活性を示す一方で、正常細胞に対する細胞障害作用はBortezomibに比べて低い⁷⁶⁾。現在、第I相と第II相の臨床試験が行われている。最近、Bortezomibよりも広範な抗がん作用を示すホウ酸誘導体MLN9708が開発され、第I相の臨床試験が行われている。MLN9708は経口投与可能であり、血中で加水分解され、ほう酸を含む活性物質MLN2238に変換し、プロテアソームをBortezomibよりも強く阻害する⁷⁷⁾。

(iii) プロテアソーム阻害剤：β-ラクトン

Lactacystinは、天然資源から初めて発見されたプロテアソーム阻害剤である。Lactacystinは、当初、神経突起

伸展物質として*Streptomyces*属の培養液から単離されたが、その後、プロテアソームを阻害すること、Lactacystin の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 -ラクトン化合物Omuralideがプロテアソームの活性部位のThr残基と安定な共有結合を介して結合することが明らかになった(図7C)^{78, 79)}。一方、Salinosporamide A は、バハマ沖の深海の土壌から単離した放線菌から発見されたプロテアソーム阻害物質で⁸⁰⁾、2006年から多発性骨髄腫での臨床試験が米国で始まっている。Salinosporamide A は、当初、細胞毒性物質として発見されたが、Omuralideとの構造上の類似性からプロテアソーム阻害作用が調べられた。Salinosporamide A のキモトリプシン様活性に対する阻害作用はOmuralideよりも強い。その後、Salinosporamide A の各種誘導体が単離あるいは合成され、プロテアソーム阻害作用が調べられている。BortezomibとSalinosporamide A を比較すると、Bortezomibは、プロテアソームのキモトリプシン活性をより強く、次に、カスパーゼ様活性を阻害するが、Salinosporamide A はプロテアソームのキモトリプシン活性をより強く、次に、トリプシン様活性を阻害する⁸¹⁾。また、Salinosporamide A について注目すべき特徴として、Bortezomibの治療で耐性となった症例にも有効であること、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤との併用療法において、Bortezomibとの併用よりも良好な臨床成果を示していること、正常細胞に対する毒性がBortezomibより低いことがあげられる。さらに、Salinosporamide A とLenalidomideとの併用や、Salinosporamide A とBortezomibとの併用の効果が調べられている。Salinosporamide A は経口投与が可能であることから、Bortezomibよりも有効な治療薬になると期待されている。このSalinosporamide A の成功例は、天然資源からの探索が創薬研究にとって重要であることを示していると言える⁸²⁾。天然資源由来の β -ラクトン環を有するプロテアソーム阻害剤として、Belactosin Aが*Streptomyces*属の培養液から単離され、現在、より強い阻害作用を示す誘導体のデザインがなされている^{83, 84)}。

(iv) プロテアソーム阻害剤：エポキシケトン

放線菌が生産するEpoxomicin は、当初、B16メラノーマ細胞に対する抗がん物質として単離されたが、その後、Epoxomicin の α, β -エポキシケトン部分がプロテアソームの活性部位のThr残基との間でモルフォリン付加物を形成し、不可逆的にプロテアソームを阻害することが明らかになった(図7D)⁸⁵⁾。また、Epoxomicin誘導体であるCarfilzomib (別名PR-171) は、Epoxomicinに比較して、普遍型プロテアソーム及び免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性をより特異的に阻害し、Bortezomib耐性の多発性骨髄腫に対しても有効であることが明らかになっ

た⁸⁶⁾。現在、第I相と第II相の臨床試験が行われている。さらに、経口投与可能なCarfilzomib誘導体の開発も行われている。一方、プロテアソームは3種類の酵素活性を示すが、それぞれの活性部位に特異的に反応するエポキシケトン型阻害剤の開発が盛んに行われている。例えば、PR-957は、免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性の活性部位($\beta 5i$ サブユニット)に特異的に反応し、抗原提示やサイトカイン産生を阻害し、実験動物での慢性関節リウマチの進行を抑えると報告されている⁸⁷⁾。

(v) プロテアソーム阻害剤：ビニルケトン

Syringolin Aは、当初、植物病原菌の毒成分として発見されたが、その後、Syringolin Aで処理した細胞における遺伝子発現パターンがプロテアソーム阻害剤の場合と類似していることから、酵母プロテアソームとの複合体の結晶構造解析が行われた⁸⁸⁾。その結果、活性部位のThr残基の水酸基がSyringolin Aのビニルケトン部分に1,4-付加することにより、プロテアソームが阻害されることが明らかになった(図7E)。Syringolin Aはプロテアソームの3種類の活性すべてを不可逆的に阻害する。さらに、Syringolin A誘導体を用いた阻害実験も行われている。なお、Syringolin Aと類似の構造をもつGlidobactin Aも、Syringolin Aと同様の機構で、プロテアソームを阻害する⁸⁹⁾。

(vi) プロテアソーム阻害剤：環状ペプチド

環状ペプチド誘導体TMC-95Aは、プロテアソーム阻害を指標にしたスクリーニングにより、真菌の培養液から単離された。TMC-95Aと酵母20Sプロテアソームとの複合体の結晶構造解析により、TMC-95Aが、プロテアソームと特異的な水素結合を介して複合体を形成すること、プロテアソームの活性部位のThr残基の水酸基と水素結合を形成しプロテアソーム活性を阻害することが明らかになった⁸⁹⁾。一方、Argyrin Aは、当初、免疫抑制作用を示す環状ペプチドとして粘液細菌から単離されたが、その後、がん細胞を用いたハイスループットスクリーニングにより、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子p27^{kip1}(プロテアソームの標的タンパク質)の蓄積を促進する低分子化合物として同定された⁹⁰⁾。そして、Argyrin Aは、プロテアソームのキモトリプシン様活性を最も強く、カスパーゼ様活性を中程度に、トリプシン様活性を弱く阻害することが明らかになった。なお、がん抑制遺伝子産物であるp27^{kip1}はヒトがん細胞で減少していること、プロテアソームによる分解に抵抗性を示すp27^{kip1}変異タンパク質を発現すると、がん化が抑制されることが知られている。

(vii) その他のプロテアソーム阻害剤

上記のプロテアソーム阻害剤以外にも、天然資源から得られたプロテアソーム阻害剤が多数報告されている。例えば、ジスルフィド結合を有するGliotoxinは、当初、T細胞及びB細胞におけるNF- κ B 活性化の強い阻害剤として真菌から単離され、その後、プロテアソームのキモトリプシン様作用を阻害すること、その阻害作用の発現には2個の硫黄原子による架橋構造が必要であることが明らかになった⁹¹⁾。また、植物や食品からプロテアソーム阻害剤を探索する研究が活発に行われている。例えば、緑茶ポリフェノールの主成分である (-)-*epi*-Gallocatechin gallate (EGCG)、昔から南アジアで料理に用いられているターメリックの主成分であるCurcumin、ダイズに含まれるイソフラボンGenistein、マメ科植物の葉由来のセレブロシドSumatranoside、広く植物に含まれているフラボノイドApigenin、Kaempferol、Quercetin及びMyricetin、"Indian Winter Cherry"の名称で知られている薬用植物から単離されたラクトン環を有するステロイド化合物Withaferin A、"Thunder of God Vine"として知られている生薬タイワンクロヅルから単離されたトリテルペンCelastrol等が、プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害することが明らかになっている。

(viii) 天然資源からのプロテアソーム阻害剤の探索

我々は、抗がん剤の開発を目差し、海洋生物などの天然資源を用いてプロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害を指標にしたスクリーニングを行い、各種プロテアソーム阻害剤の単離に成功している (図6参照)。能登半島沿岸で採集した*Achanthodendrilla*属海綿のメタノール抽出液からは、プロテアソーム阻害物質としてAgosterolの類縁化合物を10個単離した⁹²⁾。なお、Agosterol類は、以前に英虞湾で採集した*Spongia*属海綿からがん多剤耐性克服物質として単離されている。我々が単離したAgosterol類は同じステロール骨格を有しているにもかかわらず活性に差が認められ、プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用では、Agosterol Cが最も強い阻害作用を示した。また、菅島 (三重県) で採集した*Mycale*属海綿からはプロテアソーム阻害剤として新規物質Secomycalolide Aを単離した⁹³⁾。さらに、インドネシアの北スラウェシ島で採集した海綿*Aaptos suberitoides*からはAaptamine、Isoaaptamine、Demethylaaptamineをプロテアソーム阻害剤として得ている⁹⁴⁾。現在、より選択性が高く阻害作用の強い化合物の探索を続けている。

(3) ユビキチンシステムに対する阻害剤の探索

現在、プロテアソーム阻害剤に加えて、ユビキチンシステムを構成する3種類の酵素E1、E2、E3に対する阻害

剤の開発も活発に行われている (表1参照)。

(i) E1阻害剤

ユビキチンシステムには階層性があり、哺乳類の場合、主要なE1は1種類である。そのE1活性を阻害すれば、ポリユビキチン化が阻害され、標的タンパク質の分解は回避されることになる。現在、E1は、がん治療薬の開発における新たな標的として期待されている。

天然資源から初めて単離されたE1阻害剤は、キノコから単離されたPanepophenanthrinで、E1-ユビキチンチオエステル中間体の形成を阻害する⁹⁵⁾。我々は、海洋無脊椎生物と海洋由来真菌を用いて、E1阻害剤のスクリーニングを行った。スクリーニングは、FLAGタグを付加したE1とGST-ユビキチン融合タンパク質を用い、両者から生成するチオエステル中間体の形成の阻害をウエスタンブロットングで解析することにより行った (図8A)。そして、能登半島で採集したイガイ *Mytilus edulis galloprovincialis* から単離した海洋由来真菌 *Aspergillus* 属の培養液に阻害活性を認められたので、化合物を精製し、新規物質Himeic acid A、B及びCを得た⁹⁶⁾ (図6参照)。3つの化合物の中で、Himeic acid AがGST-ユビキチンとE1との間のチオエステル結合の形成を最も強く阻害した。そして、免疫沈降実験の結果、Himeic acid Aは、ユビキチンがE1のユビキチン結合部位に結合する段階を阻害することが明らかになった。さらに、Himeic acid Aはユビキチン様モディファイアー分子であるSUMO-1やISG15のE1 (SUMO-1活性化酵素とISG15活性化酵素) に対しては阻害作用を示さないことから、Himeic acid Aはユビキチン活性化酵素E1を特異的に阻害すると考えられる。なお、Himeic acid Aは一週間培養した培養液から主成分として単離されたが、二週間培養した場合にはHimeic acid Cが主成分であった。したがって、生合成の過程において、Himeic acid AがHimeic acid Cに変換すると考えられる。現在までに、E1阻害剤として天

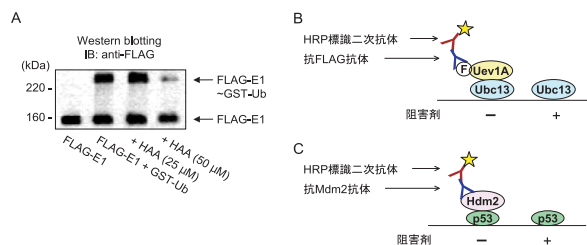


図8. ユビキチンシステムに対する阻害剤のスクリーニング
(A) E1阻害剤、(B) E2 (Ubc13) 阻害剤、及び(C) E3 (Hdm2) 阻害剤に関する我々のスクリーニング系を示した。IB: immunoblotting; HAA: Himeic acid A; HRP: horseradish peroxidase; F: FLAG。

然資源から単離されたのは上記のPanepophenanthrinとHimeic acid Aのみである。最近、合成化合物ライブラリーからE1阻害剤としてピラゾン誘導体PYR-41が発見された⁹⁷⁾。PYR-41は、タンパク分解とサイトカイン誘導性NF- κ B活性化を阻害し、p53を活性化させ、野生型p53で形質転換した細胞を選択的に殺することが明らかになった。この結果は、E1阻害剤が抗がん作用を有することを示している。さらに、PYR-41と類似の構造を有するE1阻害剤の開発が行われている。

モディファイアー分子としてのユビキチン様たんぱく質を活性化するE1を阻害する化合物が、最近、2つ報告された。アデノシンスルファメート誘導体MLN4924は、NEDD8活性化酵素E1を阻害し、抗がん作用を示すことから⁹⁸⁾、現在、第I相の臨床試験が行われている。NEDD8化はRING型E3の活性化（RING型E3複合体を構成するCullinがNEDD8化される）に必須であり、NEDD8化の阻害はユビキチンリガーゼE3の活性低下に結果する。MLN4924は、NEDD8と反応してNEDD8-MLN4924付加物を形成し、それがNEDD8-AMPと拮抗してE1活性を阻害する。一方、Ginkgolide acidとその誘導体は、SUMO活性化酵素E1の阻害剤として働く⁹⁹⁾。それらの化合物はE1-SUMOチオエステル中間体の形成を阻害する。SUMO化とがん化との関係について、SUMO化のE2であるUbc9が、がん細胞で高発現しており、がん細胞の増殖や浸潤を促進することが明らかになっているが、最近の研究では、その効果はSUMO化に依存しないという。一方、SUMO化はユビキチン化と拮抗する作用を及ぼし、ユビキチン化で不安定化するタンパク質がSUMO化によって安定化することが明らかになっている。ところが、ポリSUMO鎖がユビキチンリガーゼE3のリクルートに関与し、結果として、標的タンパク質のユビキチン化と分解が起こる例も明らかになっている。SUMO化システムに対する阻害剤の開発は、ユビキチン化やがん化との関連も含めて、SUMO化の生理的意義を解明するための重要なツールとなると期待される。

(ii) E2阻害剤

E2はおよそ30種類存在するが、その中でもUbc13はUev1Aとヘテロ複合体を形成してE2酵素活性を発揮する。そして、Ubc13をノックダウンするとp53の活性が亢進することから、Ubc13-Uev1Aヘテロ複合体の形成を阻害する化合物はがん抑制作用を示すと考えられる。そこで、我々は、この複合体の形成を阻害する化合物の探索をELISA法（図8B）により行い、インドネシアで採集した海綿*Leucetta aff. microrhaphis*から、E2阻害剤として初めて、Leucettamol Aを単離した¹⁰⁰⁾（図6参照）。Ubc13はUev1Aに加えて Mms2ともヘテロ複合体を形成するが、

Leucettamol Aは、Ubc13-Mms2複合体の形成は阻害しなかったもので、Uev1Aに特異的な阻害剤であると考えられる。なお、Ubc13の作用機構について、リボソーム上で生合成されたp53は四量体を形成し、細胞修復あるいはアポトーシスを誘導し細胞のがん化を防ぐが、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の四量体化が阻害され、その結果、p53のがん抑制作用が阻害されて発がんに至ることが明らかになっている。一方、最近、Ubc13とUev1Aの結合を酵母2-ハイブリッドスクリーニングで解析することにより、ペプトイド (Peptoid) ライブラリーから第2のUbc13阻害剤が発見された¹⁰¹⁾。この化合物はUbc13に結合し、NF- κ B活性化を阻害し、化学療法剤に対するがん細胞の感受性を高め、抗がん作用を示すことが明らかになった。

(iii) E3阻害剤

E3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が特定の標的タンパク質を識別し、そのタンパク質にユビキチン分子を付加する。ヒトゲノムには約1000種類もの異なるE3の存在が推定されている。また、ユビキチン依存的に分解される標的タンパク質には、がんなどの各種疾病に対して重要な働きをするものが多い。このことから、個々の標的タンパク質の分解を選択的に阻害する化合物は、従来の抗がん剤と異なる作用機構で働く選択性の高い薬剤になる可能性が高いと言える。したがって、E3を標的とする創薬研究において重要なことは、特定のE3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を標的とすることである。

現在、がん抑制因子p53とそのE3であるMdm2との結合を阻害する化合物の開発が活発に行われている。なお、Mdm2は、p53に結合することによって、p53の転写活性を抑制する作用とp53のユビキチン化のE3としての作用を有する。また、Mdm2は、がん細胞で発現が上昇していることが知られている。現在報告されているMdm2拮抗剤として、例えば、Chalcone誘導体について、この化合物が抗がん活性を示すことから、Mdm2との結合が $2D^1H-^{15}N$ HSQCにより解析され、Chalcone誘導体がMdm2のp53結合ポケットに結合することが明らかになった¹⁰²⁾。また、Mdm2拮抗剤の構造をコンピューターによりデザインし合成した非ペプチド性低分子化合物が、Mdm2に対して親和性を示すこと、それらの中で、Syc-7は、がん細胞における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が明らかになっている¹⁰³⁾。一方、Mdm2のp53結合ポケットに対して親和性を有する化合物のスクリーニングにより、合成化合物ライブラリー

からNutlin類が発見された¹⁰⁴⁾。そして、ヒトがん細胞をヌードマウスに移植し、Nutlin-3を経口投与すると、がんの増殖が抑制されることが明らかになった。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*での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。なお、最近、Nutlin-3とBortezomibの併用による抗がん作用の相乗効果が明らかになっている。

天然資源から初めて単離されたMdm2拮抗剤は、真菌の培養液から単離されたChlorofusinで、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¹⁰⁵⁾。我々は、天然資源からp53-Hdm2 (ヒトMdm2) 複合体の形成を阻害する化合物の探索をELISA法 (図8C) により行い、能登半島で採集した未同定の海綿から採取した*Arthrinium*属真菌の培養液から、Hexylitaconic acidを単離した¹⁰⁶⁾ (図6参照)。Hexylitaconic acidは、p53に対するHECT型E3であるCOP1とp53との複合体の形成を阻害しないので、Hdm2に結合して複合体形成を阻害していると考えられる。天然資源からのp53-Hdm2複合体形成を阻害する化合物の単離例として、Hexylitaconic acidは2例目となる。今後、天然資源からのMdm2拮抗剤のさらなる探索が望まれる。

上記のMdm2は単量体のRING型E3であるが、複合体のRING型E3であるSCF複合体 (アダプタータンパク質のSkp1、足場タンパク質のCullin、標的タンパク質を認識するF-boxタンパク質、E2結合部位を有するRINGドメインを有するRbx1からなる複合体) に対する阻害剤が、最近、2つ報告された。一つはジカルボン化合物SCF-12で、F-boxタンパク質であるCdc4に結合して標的タンパク質の認識を阻害することにより、SCF^{Cdc4}複合体によるユビキチン化を阻害する¹⁰⁷⁾。もう一つがSMER3 (small-molecule enhancer of Rapamycin 3)で、F-boxタンパク質であるMet30に結合してSCF複合体の形成を阻害することにより、SCF^{Met30}複合体によるユビキチン化を阻害する¹⁰⁸⁾ (なお、この化合物はSCF^{Cdc4}複合体によるユビキチン化を阻害しない)。SCF複合体を含む複合体型のE3は、Cullinファミリー (ヒトでは7種類)、多数のアダプタータンパク質、あるいは、標的タンパク質を認識するタンパク質 (F-boxタンパク質ファミリーやSOCSタンパク質ファミリー等) を交換することにより、多様なE3を形成し、多様な標的タンパク質に対応している。複合体型E3に対する阻害剤の探索は正に始まったばかりであるが、上記の2つの報告は、それが実りある成果を生み出してくれることを如実に示している。なお、SCF複合体が発ガンに関与する例がわかっている。

(4) その他の阻害剤の探索

ユビキチン-プロテアソームシステムはユビキチンシ

ステムとプロテアソームからなるが、両者を連結する第3のシステムがリクルートシステムである。また、ユビキチン化は可逆的で、ユビキチン化の逆反応を触媒する酵素が脱ユビキチン化酵素である。前者に対する阻害剤の開発はその緒についたばかりである。一方、後者の脱ユビキチン化酵素が従来のシステインプロテアーゼやメタロプロテアーゼに属し、ユビキチンシステムやプロテアソームに対する阻害剤の開発よりも容易であることから、最近、脱ユビキチン化酵素阻害剤の開発が盛んに行われている (表1参照)。

(i) リクルート阻害剤

Ubistatinは、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、デストラクションボックス依存性タンパク質分解の阻害剤として発見された¹⁰⁹⁾。Ubistatinは、ポリユビキチン化タンパク質のユビキチン鎖に結合し、ユビキチン依存的タンパク質分解を阻害する。一方、我々は、細胞周期抑制物質のスクリーニングを行い、愛媛県佐田岬で採集した海綿*Axinella brevistyla*から細胞毒性物質Girollineを単離した¹¹⁰⁾ (図6参照)。Girollineに関して報告されている初期の結果では、Girollineは*in vivo*で抗がん作用を示し、動物実験では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、強い副作用を示すこと、また、Girollineはタンパク質合成阻害作用を示すことが明らかになっていた。我々は、単離したGirollineを用いて、その生体内標的に関する解析を開始した。その結果、Girollineは、がん細胞において細胞周期のG2/Mアレストを誘起すること、ユビキチン化p53の蓄積を引き起こす (他のユビキチン化タンパク質の蓄積は検出されない) が、プロテアソーム活性を阻害しないことが明らかになった。これらの結果から、Girollineはユビキチン化p53のリクルート過程を阻害していると推論している。なお、Girollineの標的はまだ未同定である。現在、リクルートに関与するUbL-UBAタンパク質を標的とする阻害剤の探索を進めている。リクルートシステムを構成する各タンパク質はそれぞれ、特定のユビキチン化タンパク質を認識してプロテアソームに運搬すると考えられているので、より特異性の高い阻害剤の発見が期待される。

(ii) 脱ユビキチン化酵素阻害剤

プロスタグランジン (Prostaglandin, PG) の関連化合物が脱ユビキチン化酵素阻害剤として働く。Jシリーズに分類される Δ^2 -PGJ₂が脱ユビキチン化酵素を阻害するが、PGA₁、PGB₁、PGE₂、15-keto-PGE₂は阻害しないこと¹¹¹⁾、軟体サンゴに含まれる含塩素化合物Punaglandin類 (例えば、Punaglandin 4) が、脱ユビキチン化酵素に対

してPGJ類より強い阻害活性を示すこと¹¹²⁾が明らかになっている。最近、脱ユビキチン化酵素の一つであるUsp7/HAUSPに対する阻害物質として、HBX 41,108 (cyano-indenopyradine 誘導体)がハイスループットスクリーニングにより発見された¹¹³⁾。本化合物でがん細胞を処理すると、p53の蓄積や、がん細胞の増殖阻害とアポトーシスを誘起することが明らかにされている。この結果は、脱ユビキチン化酵素に対する特異的な阻害剤は新しいタイプのがん治療薬になることを示している。現在、HBX 41,108を用いた第I相の臨床試験が行われている。さらに、Usp7やUsp8/UBPYを特異的に阻害する各種化合物の開発が進んでいる。一方、プロテアソームと相互作用する脱ユビキチン化酵素Ubp6/Usp14は、プロテアソーム上のポリユビキチン化タンパク質のポリユビキチン鎖のトリミングを行うことで、タンパク質分解を阻害する。最近、このUsp14に対する特異的な阻害剤IU1がハイスループットスクリーニングにより発見された¹¹⁴⁾。この阻害剤は、プロテアソームによるタンパク質分解を促進するので、神経変性疾患で蓄積する異常タンパク質のクリアランスへの適用が期待される。脱ユビキチン化酵素は、その数がおおよそ100にも及び、多様性に富んでいること、また、それぞれの酵素が特異的な生理機能や細胞内局在性を示すことから、特定の機能に關与する脱ユビキチン化酵素を標的とする創薬研究の展開が期待される。

4. おわりに

ユビキチン-プロテアソームシステムは、巧妙かつ複雑な仕組みで、ほとんどあらゆるタンパク質の寿命決定に關与し、様々な生命現象において重要な役割を果たしている。2004年に、このシステムと仕組みの発見に対してノーベル化学賞が与えられた後も、このシステムに關する研究が進み、その仕組みがより深く、またより詳細に理解されるようになってきた。現在、まだ、未解明な部分がたくさん残されており、その解明が待たれる。このシステムの重要性から予見されるように、このシステムに關する創薬研究が、2003年のVelcadeの認可を皮切りに、始まった。現在、このシステムを標的とする阻害剤は、抗がん剤や抗炎症剤等として魅力的な創薬対象となっている。今後、天然資源や化合物ライブラリーからの阻害剤の探索あるいは有機合成により、新規阻害剤が発見され、それらを用いて複雑な本システムの全貌が解明され、かつ、有望な医薬品が開発されることが期待される。

細胞内におけるタンパク質分解を担う2大システムが、ユビキチン-プロテアソームシステムとオートファゴソーム-リソソームシステムである。後者のオートファジーの仕組みに關する研究も、ユビキチン-プロテアソームシステムとの関連性のもとに、現在、爆発的な進展を見

せている。また、オートファジーを標的とする創薬研究も始まっている。そして、ユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害剤とオートファジー阻害剤との併用療法も行われ、良好な成果が得られている。今後、両システムの緊密なクロストークの解明が待たれる。

本総説では、我々の最近の研究成果を中心にまとめており、限られた文献を記載したことをお断りする。最後に、魅力的なユビキチン-プロテアソームシステム研究の遂行に苦樂を共にしていただいた共同研究者、スタッフ、院生・学生諸君に深く感謝する。

文献

1. 横沢英良, 細胞工学, 23, 1406-1407 (2004).
2. Hershko A., Ciechanover A., *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 425-479 (1998).
3. Voges D., Zwickl P., Baumeister W., *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 1015-1068 (1999).
4. Pickart C.M., *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 503-533 (2001).
5. Glickman M.H., Ciechanover A., *Physiol. Rev.*, 82, 373-428 (2002).
6. Finley D., *Annu. Rev. Biochem.*, 78, 477-513 (2009).
7. Tanaka K., *Proc. Jpn. Acad. B: Phys. Biol. Sci.*, 85, 12-36 (2009).
8. Murata S., Takahama Y., Tanaka K., *Curr. Opin. Immunol.*, 20, 192-196 (2008).
9. Takahama Y., Tanaka K., Murata S., *Trends Immunol.*, 29, 251-255 (2008).
10. Murata S., Yashiroda H., Tanaka K., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 104-115 (2009).
11. Besche H.C., Peth A., Goldberg A.L., *Cell*, 138, 25-28 (2009).
12. Saeki Y., Toh-e A., Yokosawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 509-515 (2000).
13. Satoh K., Sasajima H., Nyomura K., Yokosawa H., Sawada H., *Biochemistry*, 40, 314-319 (2001).
14. Isono E., Saeki Y., Yokosawa H., Toh-e A., *J. Biol. Chem.*, 279, 27168-27176 (2004).
15. Sawada H., Yokosawa H., Hoshi M., Ishii S., *Experientia*, 39, 377-378 (1983).
16. Sawada H., Yokosawa H., Someno T., Saino T., Ishii S., *Dev. Biol.*, 105, 246-249 (1984).
17. Saitoh Y., Yokosawa H., Takahashi K., Ishii S., *J. Biochem.*, 105, 254-260 (1989).
18. Saitoh Y., Sawada H., Yokosawa H., *Dev. Biol.*, 158,

- 238-244 (1993).
19. Sawada H., Sakai N., Abe Y., Tanaka E., Takahashi Y., Fujino J., Kodama E., Takizawa S., Yokosawa H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 1223-1228 (2002).
20. Sakai N., Sawada H., Yokosawa H., *Dev. Biol.*, 264, 299-307 (2003).
21. Sawada H., Tanaka E., Ban S., Yamasaki C., Fujino J., Ooura K., Abe Y., Matsumoto K., Yokosawa H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15615-15620 (2004).
22. Ban S., Harada Y., Yokosawa H., Sawada H., *Dev. Biol.*, 286, 440-451 (2005).
23. Kawahara H., Yokosawa H., *Dev. Biol.*, 151, 27-33 (1992).
24. Kawahara H., Sawada H., Yokosawa H., *FEBS Lett.*, 310, 119-122 (1992).
25. Saeki Y., Sone T., Toh-e A., Yokosawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 813-819 (2002).
26. Sone T., Saeki Y., Toh-e A., Yokosawa H., *J. Biol. Chem.*, 279, 28807-28816 (2004).
27. Pick E., Hofmann K., Glickman M.H., *Mol. Cell*, 35, 260-264 (2009).
28. Kawahara H., Kasahara M., Nishiyama A., Ohsumi K., Goto T., Kishimoto T., Saeki Y., Yokosawa H., Shimbara N., Murata S., Chiba T., Suzuki K., Tanaka K., *EMBO J.*, 19, 4144-4153, (2000).
29. Saeki Y., Saitoh A., Toh-e A., Yokosawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 986-992 (2002).
30. Hartmann-Petersen R., Seeger M., Gordon C., *Trends Biochem. Sci.*, 28, 26-31 (2003).
31. Elsassner S., Finley D., *Nat. Cell Biol.*, 7, 742-749 (2005).
32. Verma R., Oania R., Graumann J., Deshaies R.J., *Cell*, 118, 99-110 (2004).
33. Minami R., Hayakawa A., Kagawa H., Yanagi Y., Yokosawa H., Kawahara H., *J. Cell Biol.*, 190, 637-650 (2010).
34. Schmidt M., Hanna J., Elsassner S., Finley D., *Biol. Chem.*, 386, 725-737 (2005).
35. Nakagawa K., Yokosawa H., *Eur. J. Biochem.*, 267, 1680-1686 (2000).
36. Sasajima H., Nakagawa K., Yokosawa H., *Eur. J. Biochem.*, 269, 3596-3604 (2002).
37. Fujimuro M., Sawada H., Yokosawa H., *FEBS Lett.*, 349, 173-180 (1994).
38. Fujimuro M., Yokosawa H., *Methods Enzymol.*, 399, 75-86 (2005).
39. Takada K., Nasu H., Hibi N., Tsukada Y., Ohkawa K., Fujimuro M., Sawada H., Yokosawa H., *Eur. J. Biochem.*, 233, 42-47 (1995).
40. Takada K., Nasu H., Hibi N., Tsukada Y., Shibasaki T., Fujimuro M., Sawada H., Yokosawa H., Ohkawa K., *Clin. Chem.*, 43, 1188-1195 (1997).
41. Fujimuro M., Sawada H., Yokosawa H., *Eur. J. Biochem.*, 249, 427-433 (1997).
42. Iwatsubo T., Yamaguchi H., Fujimuro M., Yokosawa H., Ihara Y., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y., *Amer. J. Pathol.*, 148, 1517-1529 (1996).
43. Saeki Y., Kudo T., Sone T., Kikuchi Y., Yokosawa H., Toh-e A., Tanaka K., *EMBO J.*, 28, 359-371 (2009).
44. Saeki Y., Tayama Y., Toh-e A., Yokosawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 840-845 (2004).
45. Peng J., Schwartz D., Elias J.E., Thoreen C.C., Cheng D., Marsischky G., Roelofs J., Finley D., Gygi S.P., *Nat. Biotechnol.*, 21, 921-926 (2003).
46. Kirkpatrick D.S., Denison C., Gygi S.P., *Nat. Cell Biol.*, 7, 750-757 (2005).
47. Kirkpatrick D.S., Hathaway N.A., Hanna J., Elsassner S., Rush J., Finley D., King R.W., Gygi S.P., *Nat. Cell Biol.*, 8, 700-710 (2006).
48. Kerscher O., Felberbaum R., Hochstrasser M., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 159-180 (2006).
49. Schulman B.A., Harper J.W., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 319-331 (2009).
50. Nakagawa K., Yokosawa H., *FEBS Lett.*, 530, 204-208 (2002).
51. Takeuchi T., Iwahara S., Saeki Y., Sasajima H., Yokosawa H., *J. Biochem.*, 138, 711-719 (2005).
52. Takeuchi T., Yokosawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336, 9-13 (2005).
53. Takeuchi T., Kobayashi T., Tamura S., Yokosawa H., *FEBS Lett.*, 580, 4521-4526 (2006).
54. Takeuchi T., Inoue S., Yokosawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348, 473-477 (2006).
55. Takeuchi T., Yokosawa H., *Methods Mol. Biol.*, 446, 139-149 (2008).
56. Minakawa M., Sone T., Takeuchi T., Yokosawa H., *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 2223-2227 (2008).
57. Skaug B., Chen Z.J., *Cell*, 143, 187-190 (2010).
58. Dao C.T., Zhang D.-E., *Front. Biosci.*, 10, 2701-2722 (2005).
59. Saini V., Marchese A., Majetschak M., *J. Biol. Chem.*, 285, 15566-15576 (2010).

60. Hosono H., Yokosawa H., *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 834-837 (2008).
61. 横沢英良, 蛋白質核酸酵素, 44, 732-736 (1999).
62. Komander D., Clague M.J., Urbe S., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 550-563 (2009).
63. Sowa M.E., Bennett E.J., Gygi S.P., Harper J.W., *Cell*, 138, 389-403 (2009).
64. Kane R.C., Bross P.F., Farrell A.T., Pazdur R., *Oncologist*, 8, 508-513 (2003).
65. Bross P.F., Kane R.C., Farrell A.T., Abraham S., Benson K., Brower M.E., Bradley S., Gobburu J.V., Goheer A., Lee S.-L., Leighton J., Liang C.Y., Lostritto R.T., McGuinn W.D., Morse D.E., Rahman A., Rosario L.A., Verbois S.L., Williams G., Wang Y.-C., Pazdur R., *Clin. Cancer Res.*, 10, 3954-3964 (2004).
66. 塚本佐知子, 横沢英良, 有機合成化学協会誌, 62, 968-976 (2004).
67. Tsukamoto S., Yokosawa H., *Curr. Med. Chem.*, 13, 745-754 (2006).
68. Tsukamoto S., Yokosawa H., *Expert Opin. Ther. Targets*, 13, 605-621 (2009).
69. Tsukamoto S., Yokosawa H., *Planta Med.*, 76, 1064-1074 (2010).
70. Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L., *Cell*, 78, 761-771 (1994).
71. Momose I., Sekizawa R., Hashizume H., Kinoshita N., Honma Y., Hamada M., Iinuma H., Takeuchi T., *J. Antibiotics*, 54, 997-1003 (2001).
72. Hines J., Groll M., Fahnestock M., Crews C.M., *Chem. Biol.*, 15, 501-512 (2008).
73. Lin G., Li D., Chidawanyika T., Nathan C., Li H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 501, 214-220 (2010).
74. Adams J., *Drug Discov. Today*, 8, 307-315 (2003).
75. Sanchez-Serrano I., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 107-114 (2006).
76. Piva R., Ruggeri B., Williams M., Costa G., Tamagno I., Ferrero D., Giai V., Coscia M., Peola S., Massaia M., Pezzoni G., Allievi C., Pescalli N., Cassin M., di Giovine S., Nicoli P., de Feudis P., Strepponi I., Roato I., Ferracini R., Bussolati B., Camussi G., Jones-Bolin S., Hunter K., Zhao H., Neri A., Palumbo A., Berkers C., Ovaa H., Bernareggi A., Inghirami G., *Blood*, 111, 2765-2775 (2008).
77. Kupperman E., Lee E.C., Cao Y., Bannerman B., Fitzgerald M., Berger A., Yu J., Yang Y., Hales P., Bruzzese F., Liu J., Blank J., Garcia K., Tsu C., Dick L., Fleming P., Yu L., Manfredi M., Rolfe M., Bolen J., *Cancer Res.*, 70, 1970-1980 (2010).
78. Fenteany G., Standaert R.F., Reichard G.A., Corey E.J., Schreiber S.L., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 3358-3362 (1994).
79. Fenteany G., Standaert R.F., Lane W.S., Choi S., Corey E.J., Schreiber S.L., *Science*, 268, 726-731 (1995).
80. Feling R.H., Buchanan G.O., Mincer T.J., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 355-357 (2003).
81. Chauhan D., Catley L., Li G., Podar K., Hideshima T., Velankar M., Mitsiades C., Mitsiades N., Yasui H., Letai A., Ovaa H., Berkers C., Nicholson B., Chao T.H., Neuteboom S.T., Richardson P., Palladino M.A., Anderson K.C., *Cancer Cell*, 8, 407-419 (2005).
82. Fenical W., Jensen P.R., Palladino M.A., Lam K.S., Lloyd G.K., Potts B.C., *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 2175-2180 (2009).
83. Yoshida K., Yamaguchi K., Sone T., Unno Y., Asai A., Yokosawa H., Matsuda A., Arisawa M., Shuto S., *Org. Lett.*, 10, 3571-3574 (2008).
84. Yoshida K., Yamaguchi K., Mizuno A., Unno Y., Asai A., Sone T., Yokosawa H., Matsuda A., Arisawa M., Shuto S., *Org. Biomol. Chem.*, 7, 1868-1877 (2009).
85. Groll M., Kim K.B., Kairies N., Huber R., Crews C.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 1237-1238 (2000).
86. Parlati F., Lee S.J., Aujay M., Suzuki E., Levitsky K., Lorens J.B., Micklem D.R., Ruurs P., Sylvain C., Lu Y., Shenk K.D., Bennett M.K., *Blood*, 114, 3439-3447 (2009).
87. Muchamuel T., Basler M., Aujay M.A., Suzuki E., Kalim K.W., Lauer C., Sylvain C., Ring E.R., Shields J., Jiang J., Shwonek P., Parlati F., Demo S.D., Bennett M.K., Kirk C.J., Groettrup M., *Nat. Med.*, 15, 781-787 (2009).
88. Groll M., Schellenberg B., Bachmann A.S., Archer C.R., Huber R., Powell T.K., Lindow S., Kaiser M., Dudler R., *Nature*, 452, 755-759 (2008).
89. Groll M., Koguchi Y., Huber R., Kohno J., *J. Mol. Biol.*, 311, 543-548 (2001).
90. Nickleleit I., Zender S., Sasse F., Geffers R., Brandes G., Sorensen I., Steinmetz H., Kubicka S., Carlomagno T., Menche D., Gutgemann I., Buer J., Gossler A., Manns M.P., Kalesse M., Frank R., Malek N.P., *Cancer Cell*, 14, 23-35 (2008).

91. Kroll M., Arenzana-Seisdedos F., Bachevalerie F., Thomas D., Friguet B., Conconi M., *Chem. Biol.*, 6, 689-698 (1999).
92. Tsukamoto S., Tatsuno M., van Soest R.W.M., Yokosawa H., Ohta T., *J. Nat. Prod.*, 66, 1181-1185 (2003).
93. Tsukamoto S., Koimaru K., Ohta T., *Mar. Drugs*, 3, 29-36 (2005).
94. Tsukamoto S., Yamanokuchi R., Yoshitomi M., Sato K., Ikeda T., Rotinsulu H., Mangindaan R.E.P., de Voogd N.J., van Soest R.W.M., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 3341-3343 (2010).
95. Sekizawa R., Ikeno S., Nakamura H., Naganawa H., Matsui S., Iinuma H., Takeuchi T., *J. Nat. Prod.*, 65, 1491-1493 (2002).
96. Tsukamoto S., Hirota H., Imachi M., Fujimuro M., Onuki H., Ohta T., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 191-194 (2005).
97. Yang Y., Kitagaki J., Dai R.M., Tsai Y.C., Lorick K.L., Ludwig R.L., Pierre S.A., Jensen J.P., Davydov I.V., Oberoi P., Li C.C., Kenten J.H., Beutler J.A., Vousden K.H., Weissman A.M., *Cancer Res.*, 67, 9472-9481 (2007).
98. Soucy T.A., Smith P.G., Milhollen M.A., Berger A.J., Gavin J.M., Adhikari S., Brownell J.E., Burke K.E., Cardin D.P., Critchley S., Cullis C.A., Doucette A., Garnsey J.J., Gaulin J.L., Gershman R.E., Lublinsky A.R., McDonald A., Mizutani H., Narayanan U., Olhava E.J., Peluso S., Rezaei M., Sintchak M.D., Talreja T., Thomas M.P., Traore T., Vyskocil S., Weatherhead G.S., Yu J., Zhang J., Dick L.R., Claiborne C.F., Rolfe M., Bolen J.B., Langston S.P., *Nature*, 458, 732-736 (2009).
99. Fukuda I., Ito A., Hirai G., Nishimura S., Kawasaki H., Saitoh H., Kimura K., Sodeoka M., Yoshida M., *Chem. Biol.*, 16, 133-140 (2009).
100. Tsukamoto S., Takeuchi T., Rotinsulu H., Mangindaan R.E.P., van Soes R.W.M., Ukai K., Kobayashi H., Namikoshi M., Ohta T., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 6319-6320 (2008).
101. Scheper J., Guerra-Rebollo M., Sanclimens G., Moure A., Masip I., Gonzalez-Ruiz D., Rubio N., Crosas B., Meca-Cortes O., Loukili N., Plans V., Morreale A., Blanco J., Ortiz A.R., Messeguer A., Thomson T.M., *PLoS One*, 5, e11403 (2010).
102. Stoll R., Renner C., Hansen S., Palme S., Klein C., Belling A., Zeslawski W., Kamionka M., Rehm T., Muhlhahn P., Schumacher R., Hesse F., Kaluza B., Voelter W., Engh R.A., Holak T.A., *Biochemistry*, 40, 336-344 (2001).
103. Zhao J., Wang M., Chen J., Luo A., Wang X., Wu M., Yin D., Liu Z., *Cancer Lett.*, 183, 69-77 (2002).
104. Vassilev L.T., Vu B.T., Graves B., Carvajal D., Podlaski F., Filipovic Z., Kong N., Kammlott U., Lukacs C., Klein C., Fotouhi N., Liu E.A., *Science*, 303, 844-848 (2004).
105. Duncan S.J., Gruschow S., Williams D.H., McNicholas C., Purewal R., Hajek M., Gerlitz M., Martin S., Wrigley S.K., Moore M., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 554-560 (2001).
106. Tsukamoto S., Yoshida T., Hosono H., Ohta T., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 69-71 (2006).
107. Orlicky S., Tang X., Neduva V., Elowe N., Brown E.D., Sicheri F., Tyers M., *Nat. Biotechnol.*, 28, 733-737 (2010).
108. Aghajani M., Jonai N., Flick K., Fu F., Luo M., Cai X., Ouni I., Pierce N., Tang X., Lomenick B., Damoiseaux R., Hao R., del Moral P.M., Verma R., Li Y., Li C., Houk K.N., Jung M.E., Zheng N., Huang L., Deshaies R.J., Kaiser P., Huang J., *Nat. Biotechnol.*, 28, 738-742 (2010).
109. Verma R., Peters N.R., D'Onofrio M., Tochtrop G.P., Sakamoto K.M., Varadan R., Zhang M., Coffino P., Fushman D., Deshaies R.J., King R.W., *Science*, 306, 117-120 (2004).
110. Tsukamoto S., Yamashita K., Tane K., Kizu R., Ohta T., Matsunaga S., Fusetani N., Kawahara H., Yokosawa H., *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 699-701 (2004).
111. Mullally J.E., Moos P.J., Edes K., Fitzpatrick F.A., *J. Biol. Chem.*, 276, 30366-30373 (2001).
112. Verbitski S.M., Mullally J.E., Fitzpatrick F.A., Ireland C.M., *J. Med. Chem.*, 47, 2062-2070 (2004).
113. Colland F., Formstecher E., Jacq X., Reverdy C., Planquette C., Conrath S., Trouplin V., Bianchi J., Aushev V.N., Camonis J., Calabrese A., Borg-Capra C., Sippl W., Collura V., Boissy G., Rain J.C., Guedat P., Delansorne R., Daviet L., *Mol. Cancer Ther.*, 8, 2286-2295 (2009).
114. Lee B.H., Lee M.J., Park S., Oh D.C., Elsasser S., Chen P.C., Gartner C., Dimova N., Hanna J., Gygi S.P., Wilson S.M., King R.W., Finley D., *Nature*, 467, 179-184 (2010).