

第1回日本医療研究開発大賞 受賞記念講演
東京国際交流会館(お台場)平成29年11月25日

プロテアソーム ～基礎研究が未来を拓く～

田中啓二
(公財)東京都医学総合研究所

タンパク質って？

三大栄養素の1つ。肉，魚，卵，乳製品、大豆などに多く含まれる
遺伝子を設計図としてつくられ、生命活動の主な担い手となる

他の生物のタン
パク質＝食品

分解して自分の
タンパク質の材
料とする！

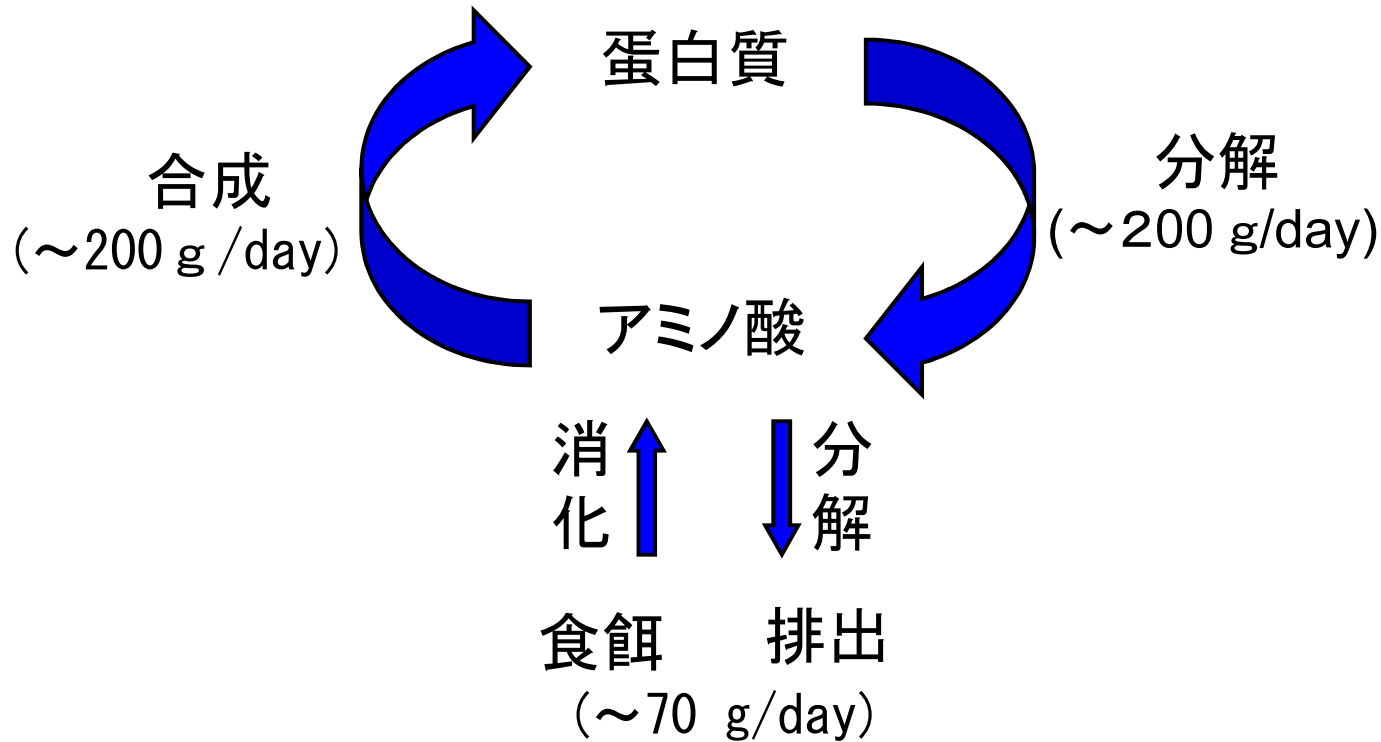


自分が組み立
てるタンパク質

生命活動を実
行する！

伊藤維昭

タンパク質のリサイクル(成人1日の代謝量)



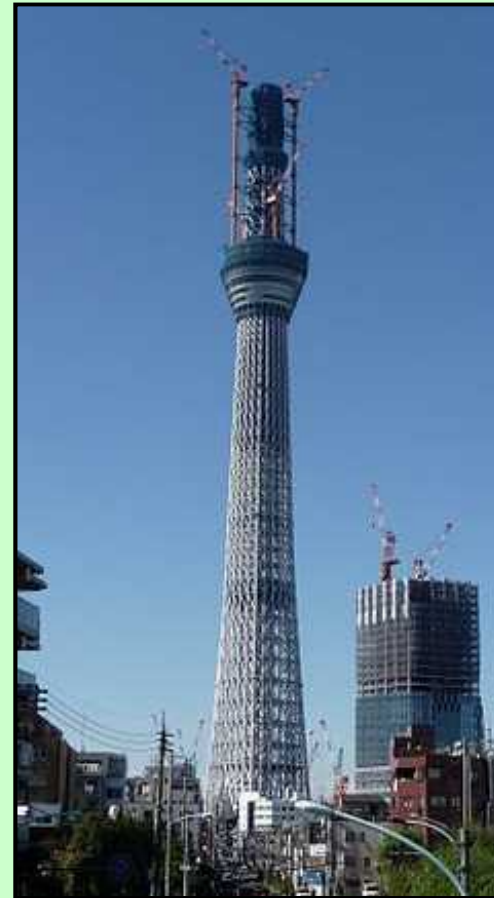
enigma

- ☹ われわれの体は2~3週間でほとんど全てが入れ替わる(新陳代謝)!
- ☹ 細胞内の全てのタンパク質(数万種)は固有の速度で代謝回転しており、その寿命は数分~数ヶ月と千差万別で1万倍以上の違いがある。

リサイクル: 不要なものを破壊して再生する



スクラップ アンド ビルド



建設中の東京スカイツリー
(高さ: 497m時点)



634 m

リサイクル: 不要でなくても破壊して再生する

「式年遷宮」

20年に一度行われる伊勢神宮の一大神事

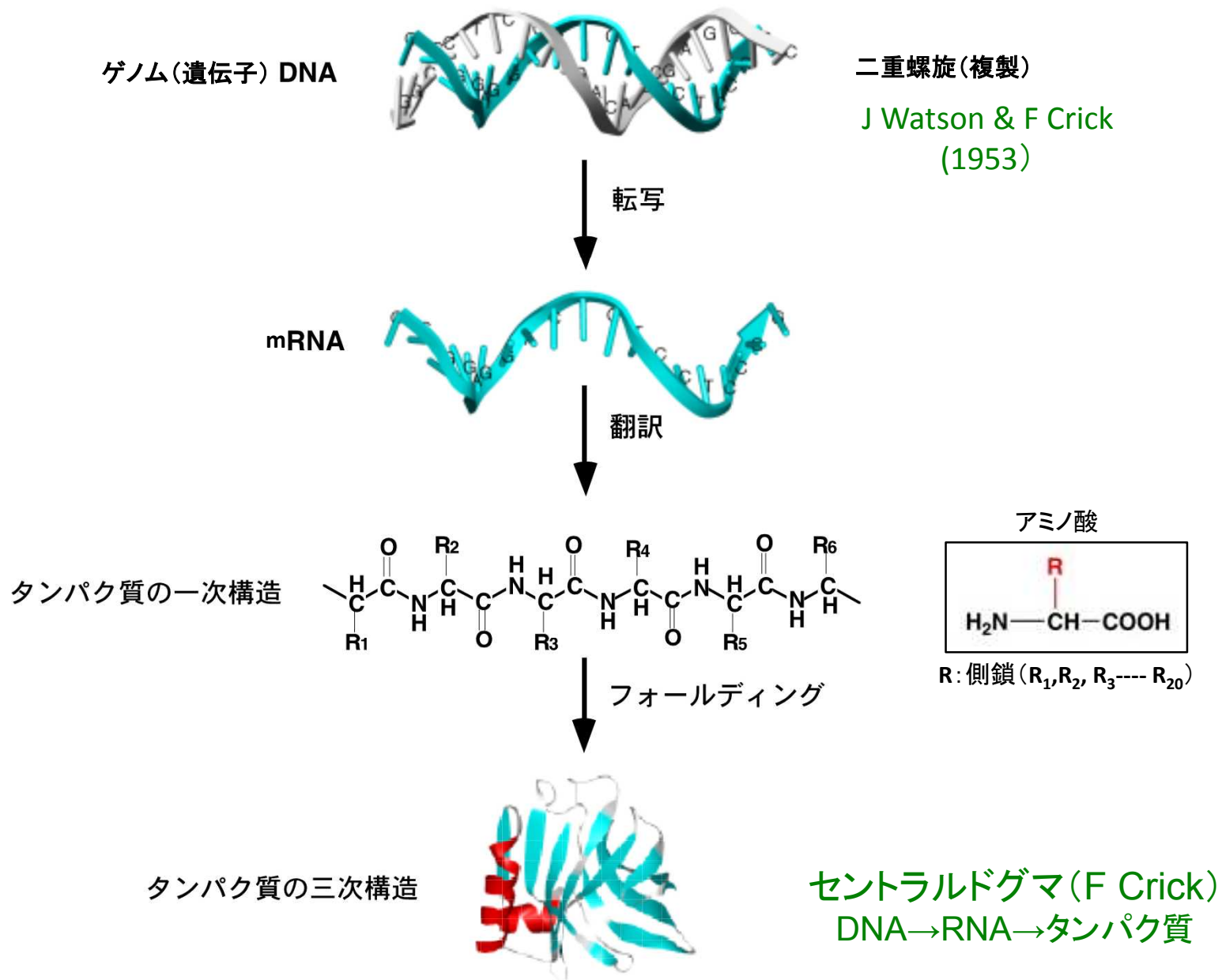


平成5年(61th)

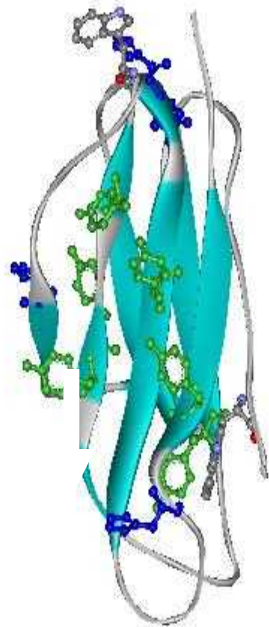


平成25年(62th)

タンパク質の合成



タンパク質の分解



機能的タンパク質
(立体構造を形成)

変性
→
巻き戻し



ポリペプチド
(ひも状のタンパク質)

タンパク質分解酵素
(プロテアーゼ)



▶
ペプチド
アミノ酸

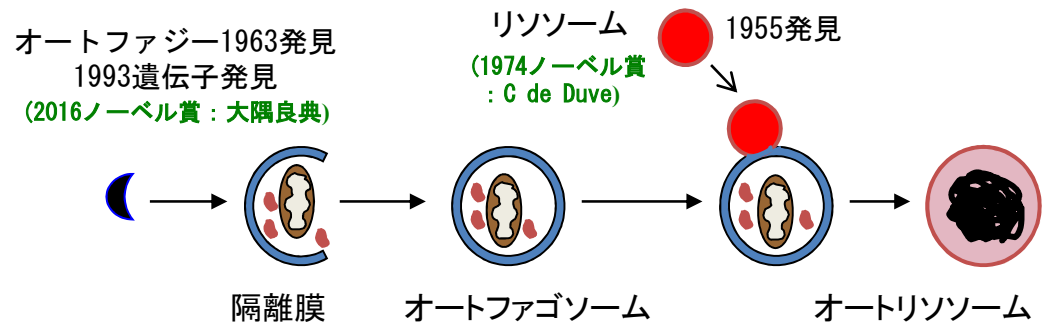
- ・トリプシン(酸性アミノ酸のC端側を切断)
- ・キモトリプシン(中性アミノ酸のC端側を切断)
- ・カスパーゼ(塩基性アミノ酸のC端側を切断)

タンパク質の立体構造は熱力学的に安定であるが、酸性には弱く、胃やリソソームのような酸性(pH 4~5)状態や加熱では変性して紐状になり、プロテアーゼで簡単に分解(消化)される!

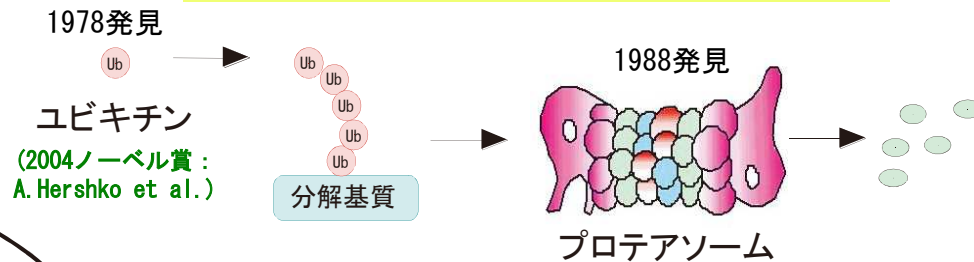
真核生物の二つのタンパク質分解システム

Autophagy= Greek for Self-Eating (自食作用)

オートファジー・リソソームシステム



ユビキチン・プロテアソームシステム



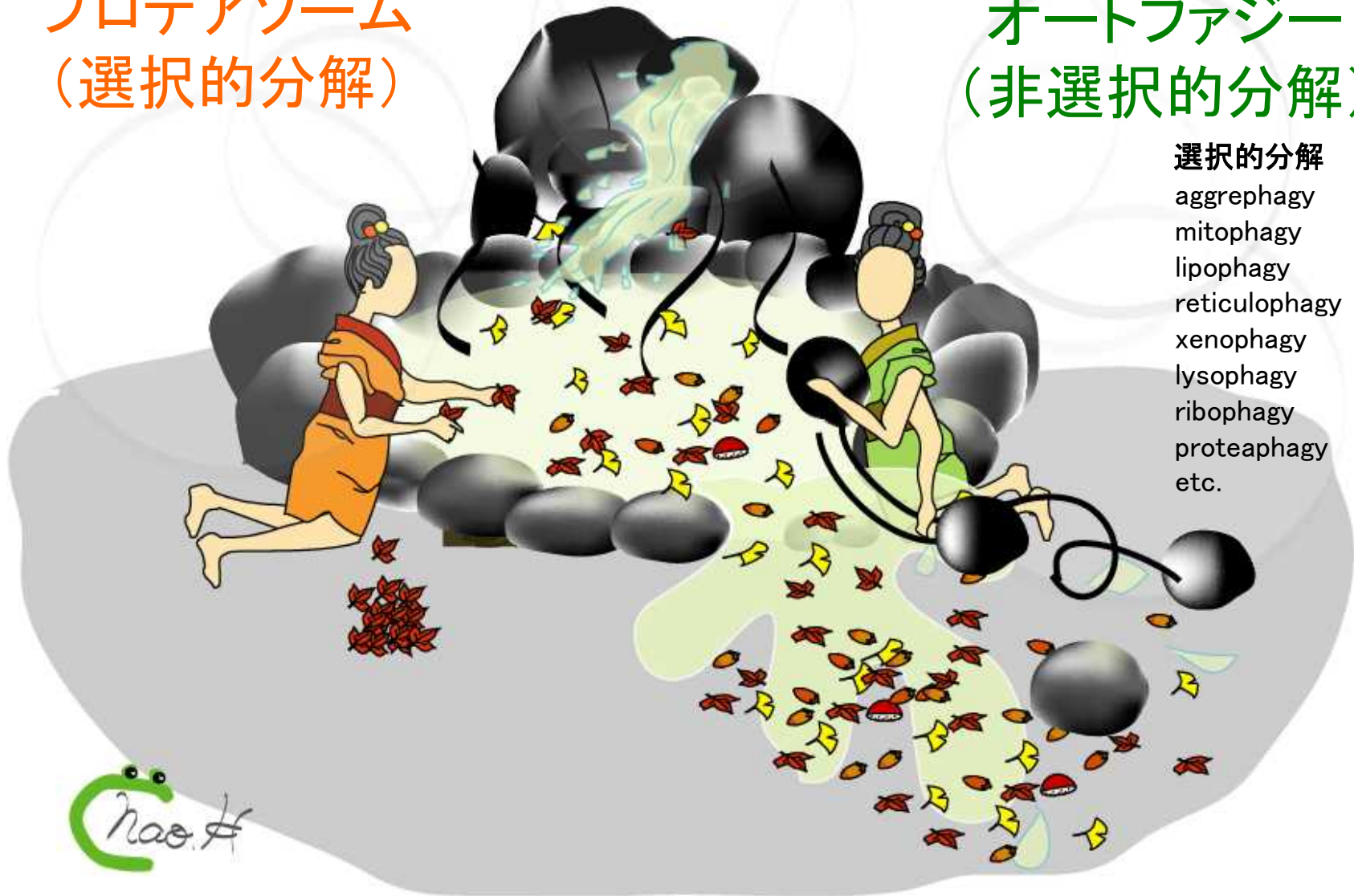
二つの細胞内の大規模なタンパク質分解システム

プロテアソーム
(選択的分解)

オートファジー
(非選択的分解)

選択的分解

aggrephagy
mitophagy
lipophagy
reticulophagy
xenophagy
lysophagy
ribophagy
proteaphagy
etc.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016



Autophagy – recycling in cells

The Nobel Prize in Physiology or Medicine is awarded to Yoshinori Ohsumi for his discoveries of mechanisms for autophagy.

Autophagy, or "self-eating", is taking place inside all cells. Autophagy is a fundamental process for degrading and recycling cellular components, and is used to eliminate damaged proteins and organelles. Autophagy can rapidly provide fuel to maintain the cellular energy supply and building blocks for renewal of cellular components. Autophagy is essential for the cellular response to starvation and other types of stress. Yoshinori Ohsumi identified essential genes and elucidated the underlying mechanisms for autophagy.



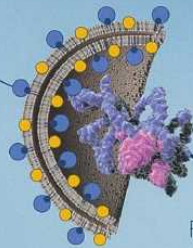
Initiation of autophagy

Stress signals initiate autophagy. A small vesicle expands to form a double-layered membrane.



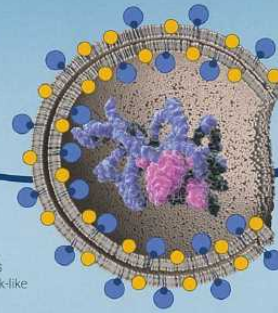
Formation of autophagosomes

Cellular content selected for destruction is enclosed in the membrane, forming a sack-like vesicle called "autophagosome".



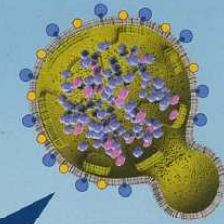
Transport to the lysosome

The autophagosome is transported to a recycling compartment, called the "lysosome". Lysosomes contain enzymes for degradation of biological material.



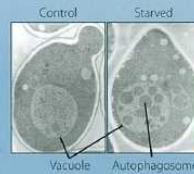
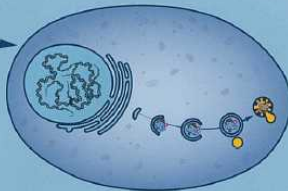
Degradation and recycling

After fusing with the lysosome, the cargo of the autophagosome is destroyed, and the degraded material becomes available for renewal of cellular components, or it can be used as fuel for energy derivation.



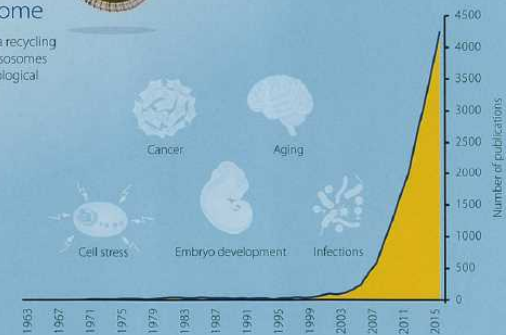
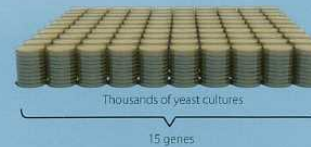
Autophagy is a central function inside cells

During the 1960s researchers first observed that the cell could destroy its own contents by enclosing it in vesicles that were transported to the lysosome for degradation. Little was known until Yoshinori Ohsumi in the early 1990s used baker's yeast to study autophagy.



Groundbreaking experiments

Yeast cells are relatively easy to study and are often used as a model for human cells. Ohsumi used yeast lacking degradation enzymes in the "vacuole", the yeast cells' lysosome. Autophagy was induced by starving the cells and when degradation was blocked, autophagosomes accumulated inside the vacuole (left images). This provided a simple way to study autophagy. Ohsumi then screened thousands of yeast mutants and identified 15 autophagy genes (right image). His further studies revealed the molecular machinery underlying autophagosome formation.



Autophagy in health and disease

Ohsumi's initial breakthrough was published in 1992. Since then, the research field has expanded dramatically. We now know that autophagy controls many physiological functions. For example, autophagy can eliminate invading intracellular bacteria and viruses. Cells use autophagy to degrade damaged proteins and organelles, a quality control mechanism that is critical for counteracting negative consequences of aging. Disrupted autophagy is associated with many diseases, including cancer, type 2 diabetes and age-associated neurodegeneration.

オートファジー研究はこの10年で爆発的に進展した



EMBO Meeting in Italy (2009)



酵母Atg遺伝子の同定
by 大隅良典博士



Nobel Reception in Stockholm (2016)

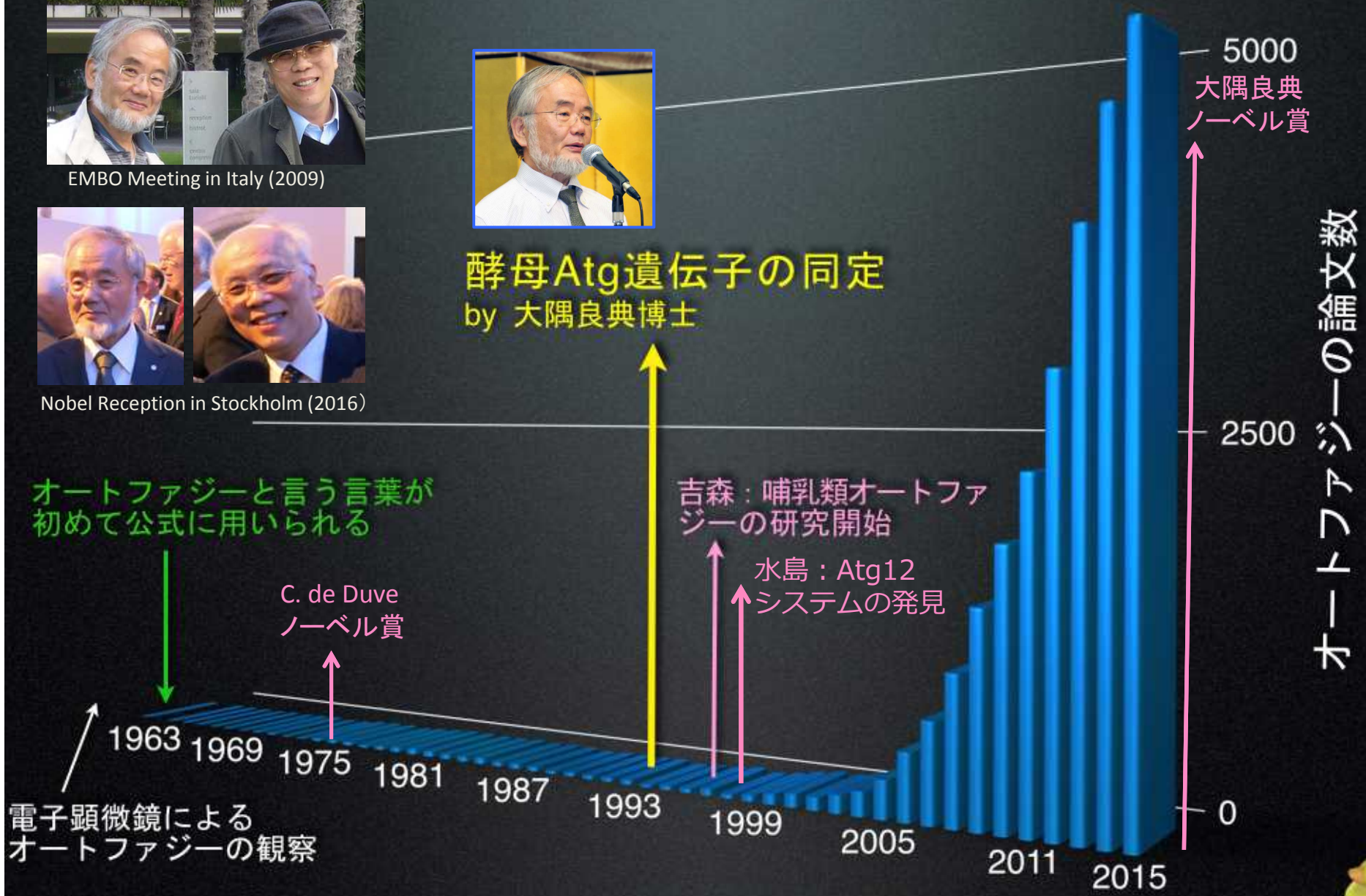
オートファジーという言葉が
初めて公式に用いられる

C. de Duve
ノーベル賞

吉森：哺乳類オートファ
ジーの研究開始

水島：Atg12
システムの発見

電子顕微鏡による
オートファジーの観察



オートファジーの論文数



プロテアソームは どのようにして発見されたか？

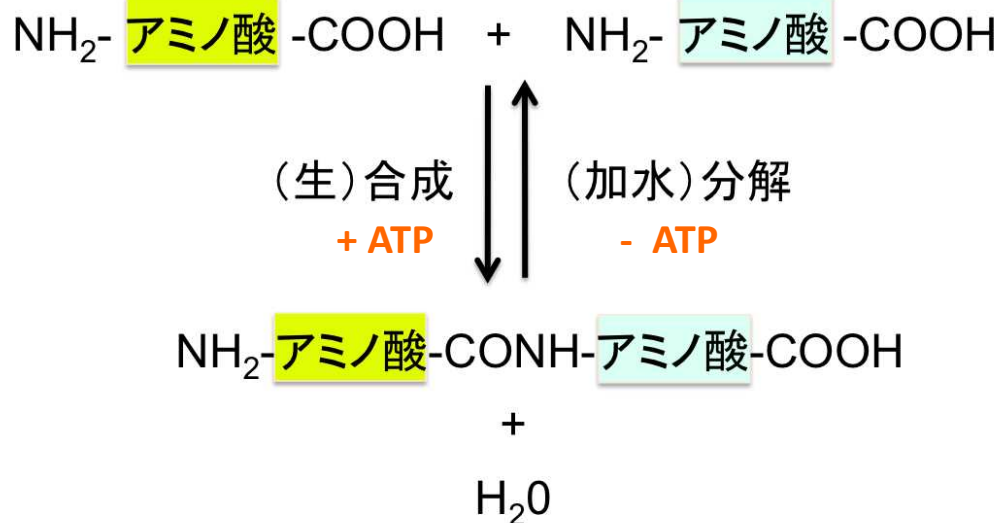
(新しい発見に科学の醍醐味がある)

- ⊖ 科学の発展にはセレンディピティ (serendipity)、即ち「偶然に予想外のものを発見すること」が重要である！
- ⊖ 科学において無から有が生じることはなく、新しい分子や原理の発見には、必然的な理由がある！
(多くの場合、謎の解明に迫る知的好奇心である)

生物個体のエネルギー収支

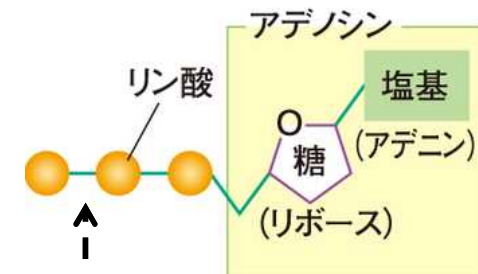
生物における生合成反応(自己組織化:秩序の拡充)は**吸エルゴン反応**(エネルギーが必要)であるが、加水分解反応(組織崩壊/死:無秩序の拡大)は**発エルゴン反応**(エネルギーが不要)である:熱力学の第二法則

タンパク質の合成と分解



ATP

(生物のエネルギー通貨)



高エネルギーリン酸結合
(7000cal/mol)

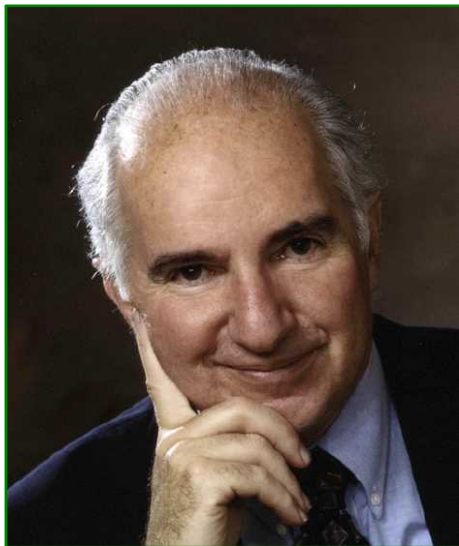
ヒトは1日に約100 kgのATPを消費

研究の源流

生細胞 (*in vivo*) におけるタンパク質分解
には代謝エネルギーが必要である
(J Biol Chem 1953) MV. Simpson

この論文は、熱力学の法則に反するために
四半世紀以上、図書館の奥底に眠り続ける！

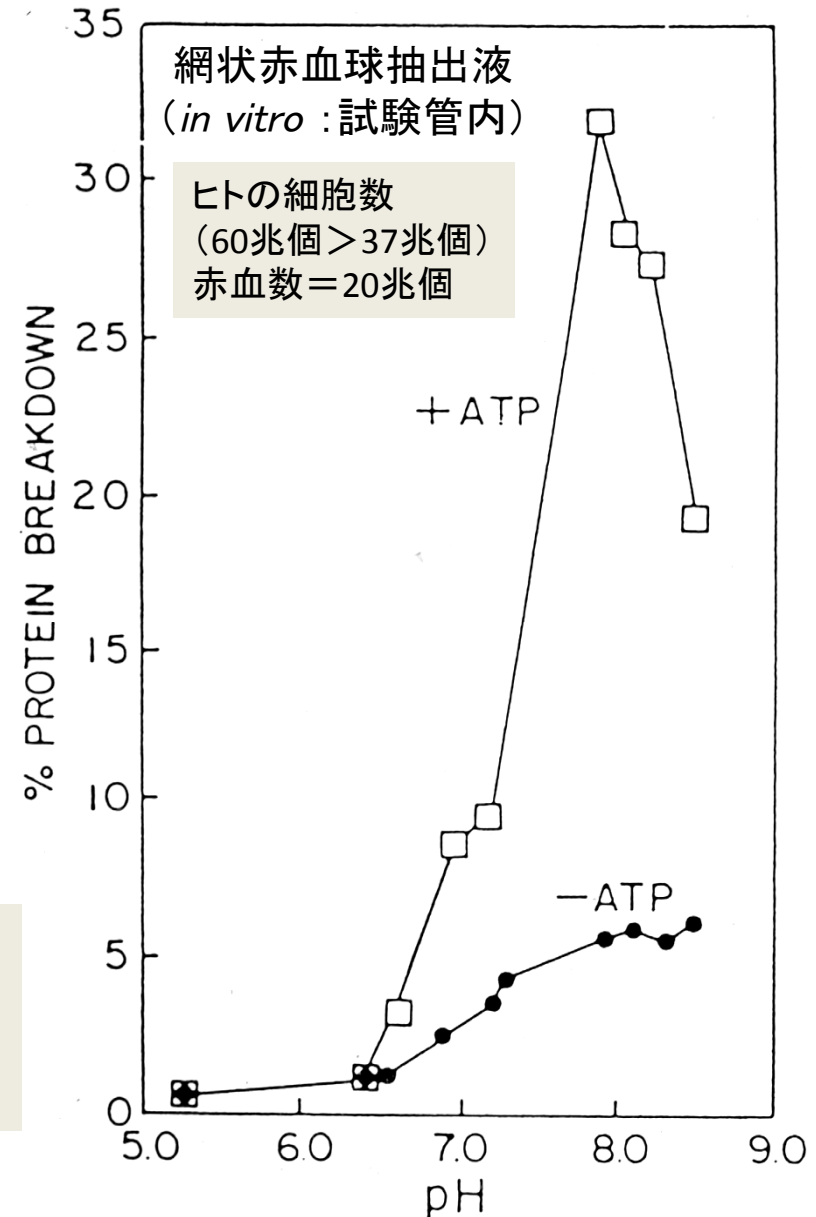
覚醒



Alfred L. Goldberg
(HMS, USA)

Pioneering work
to open a new
field of intracellular
protein degradation

ATP-依存性タンパク質分解



JD Etlinger and AL Goldberg : A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. PNAS 74, 54-58, 1977

ユビキチン 仮説 (~1980s)

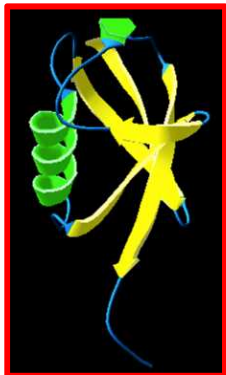


A Hershko

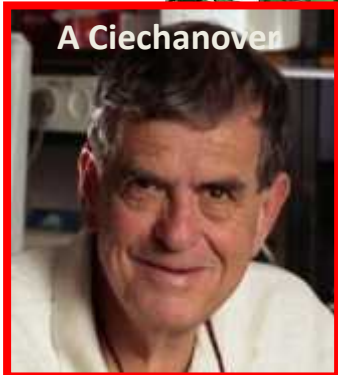
K Tanaka

May 10th, 2005 (Tokyo)

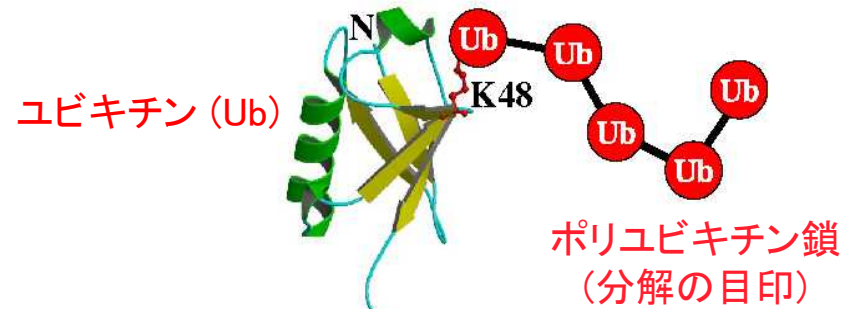
ユビキチン



A Ciechanover



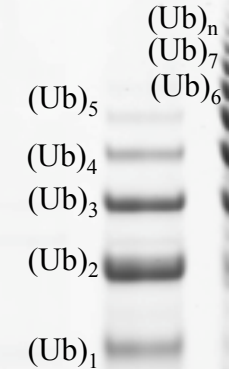
ATP-dependent Proteolysis
Factor-1 (APF-1) BBRC 1978



イソペプチド結合
CO
NH
K

ATP 加水分解

Poly-ubiquitylation



標的タンパク質

Nobel Prize in Chemistry 2004

The discovery of ubiquitin-mediated protein degradation

海外留学の恩恵...

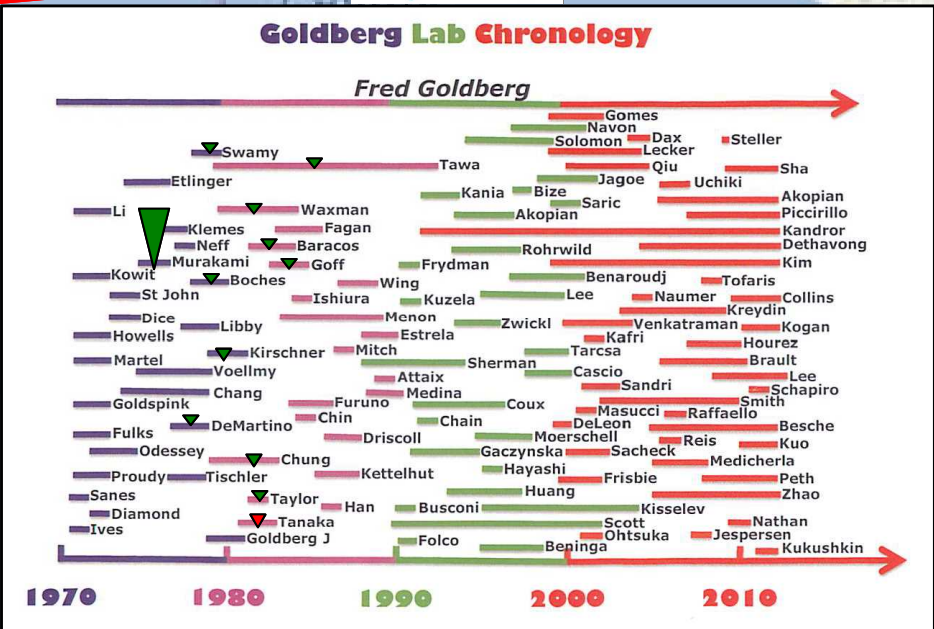
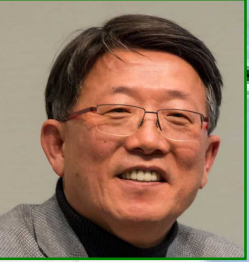
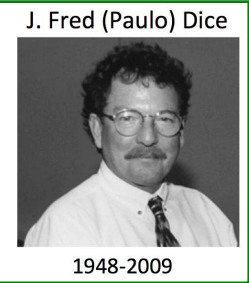
- ☹️ ライフワーク研究(プロテアソーム発見)のヒントを得た!
- ☹️ 多くの異邦の知己を得て、その交流が大きな財産となった!
- ☹️ 異文化に直接触れ合い、辺境から世界を学ぶことができた!

Alfred L Goldberg's Lab
(Harvard Medical School, USA)
1981~1983 (32~34才)

Canada **BOSTON**



Tokushima

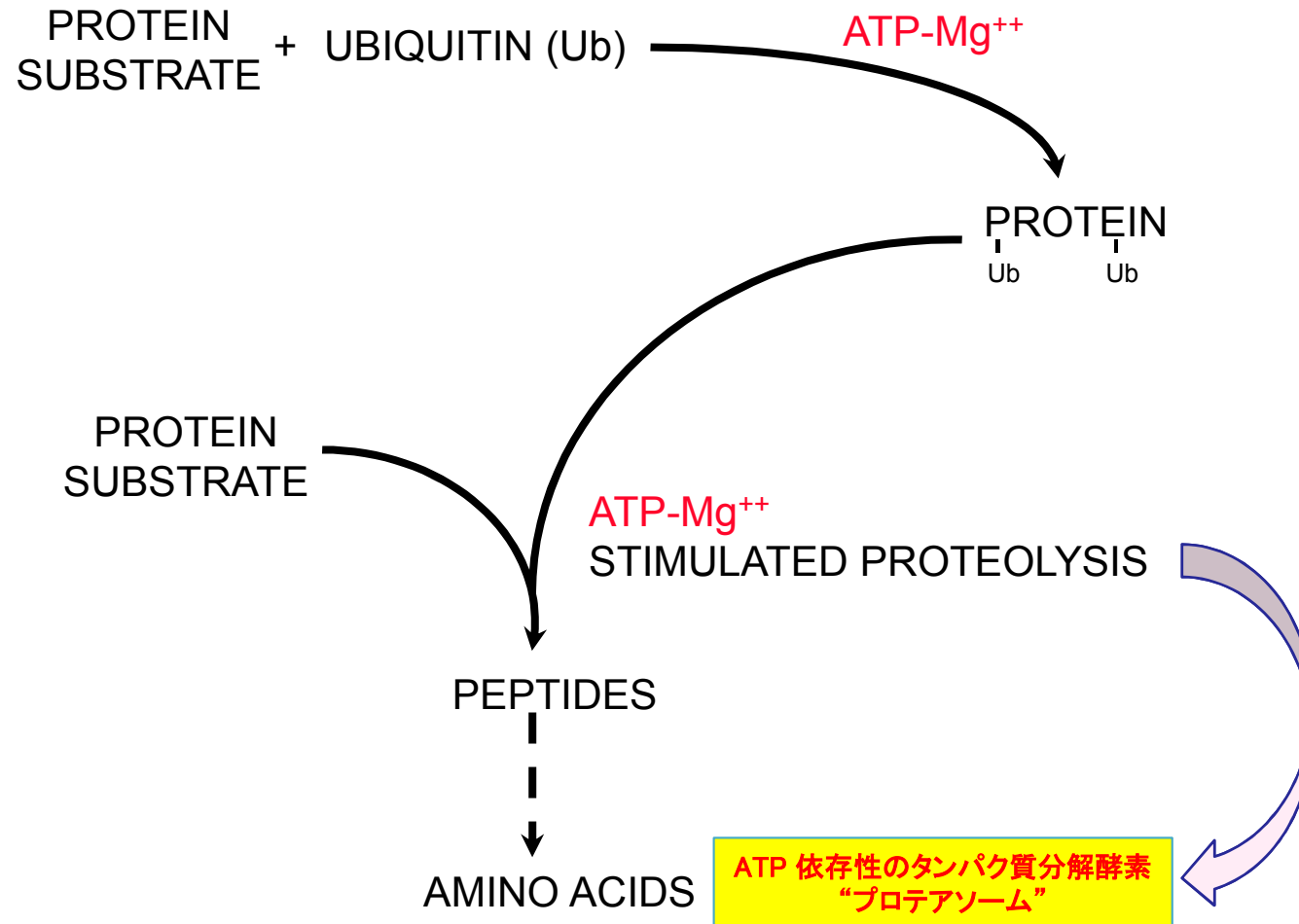


AL Goldberg
(1942~Present)

70's Anniversary Reunion Symposium (Sep 14th 2012)

タンパク質分解におけるエネルギー要求性の二段階仮説

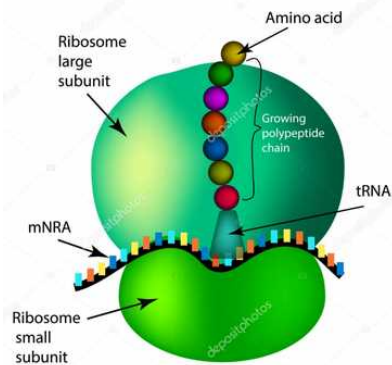
ATP Serves Two Distinct Roles in Protein Degradation, One Requiring and One Independent of Ubiquitin
[K. Tanaka, L. Waxman, and AL. Goldberg: Journal of Cell Biology 96, 1580-1585 1983](#)



プロテアソームの命名

Protease + ~some (Proteasome)
(プロテアーゼ機能を有した複合体粒子)
1988 Nature

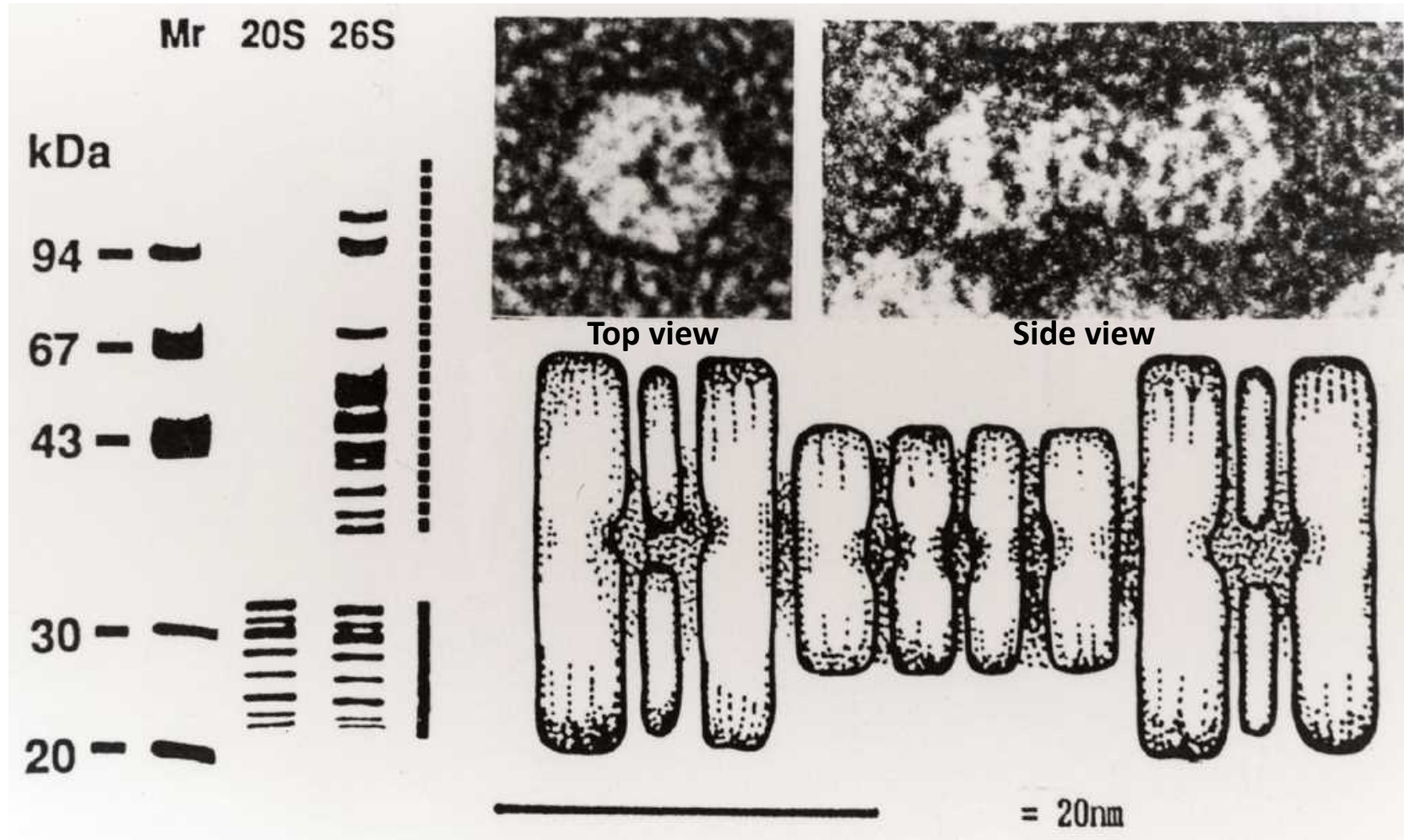
細胞内の不必要なタンパク質をエネルギー依存的に
分解する巨大で複雑なタンパク質分解酵素複合体
(タンパク質分解の舞台)



リボソームの命名 (G E Palade 1955/Nobel Prize 1974)
Ribonucleoprotein particle/~some (Ribosome)
(タンパク質合成の舞台)

哺乳類プロテアソームの分子形状

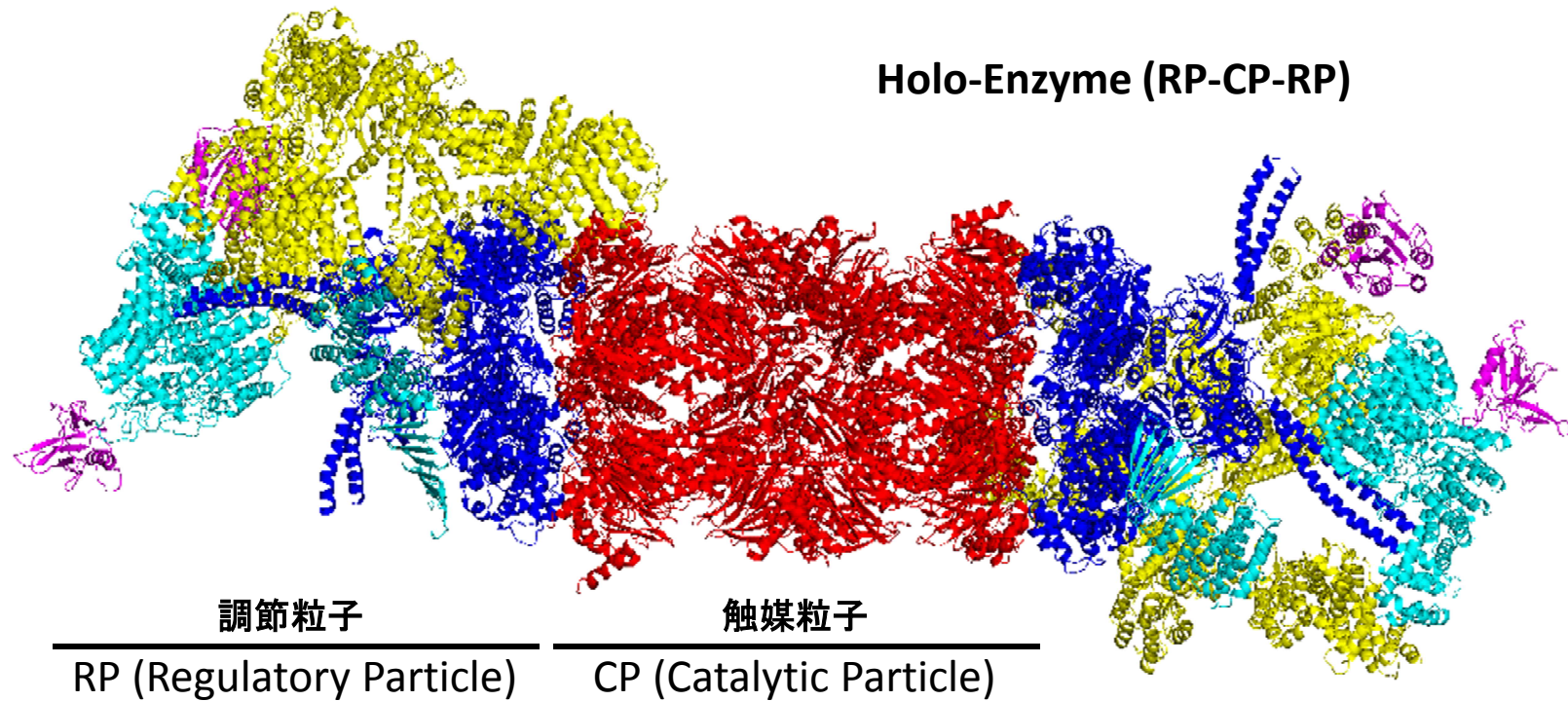
Negative staining by uranyl acetate



電気泳動写真

電子顕微鏡写真とそのモデル

クライオ(極低温)電子顕微鏡によるプロテアソームの原子構造



W. Baumeister (MPI) : Single Particle Analysis
by Cryo-EM and X-ray Crystallography

The 26S Proteasome (Cryo-EM)
Schweitzer A et al., 3.9 Å PNAS 2016
Huang X et al. 3.5 Å NSMB 2016
Ding Z et al., 4.2 Å Cell Res 2017



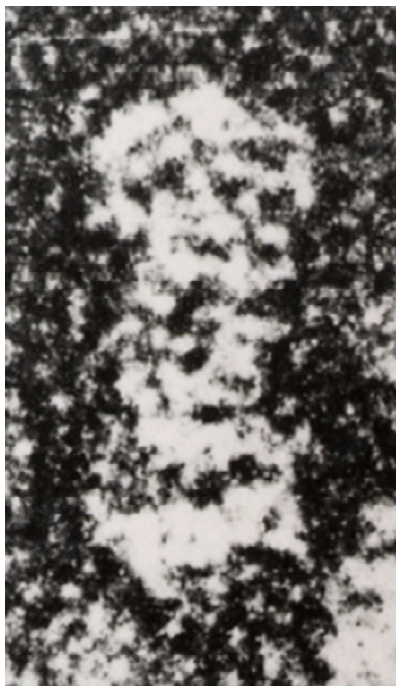
Titan Krios

クライオ(極低温)電子顕微鏡の開発(2017年ノーベル化学賞)

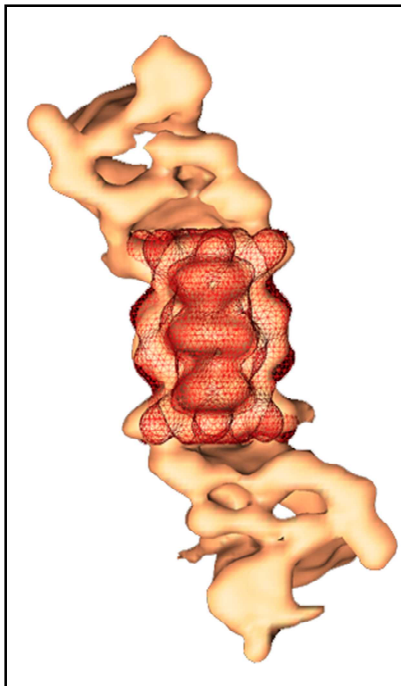


Negative-staining (TEM)
透過型電子顕微鏡(負染色: 醋酸ウラン)

Cryo-electron Microscopy (Cryo EM)
クライオ(極低温)電子顕微鏡



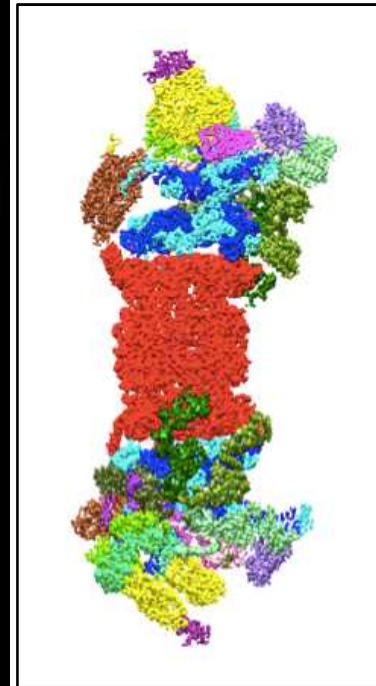
1991



1994



2012



2016



J Frank



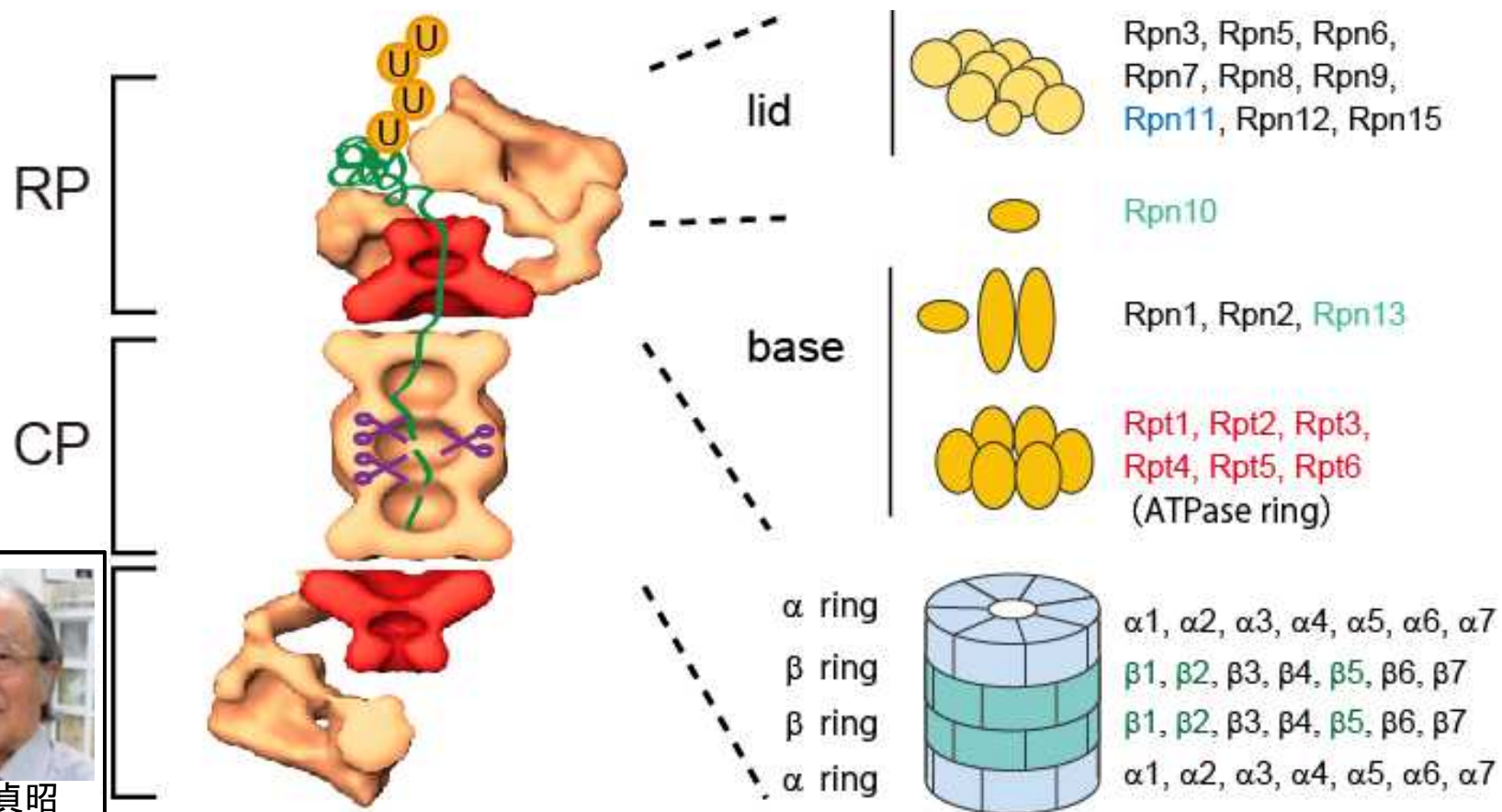
J Dubochet



R Henderson

プロテアソームの電子顕微鏡解析小史

プロテアソームのサブユニット構成と一次構造の解析



岩永貞昭



中西重忠

RP triple ATPase (Rpt) subunits 1-6
RP non-ATPase (Rpn) subunits 1-15

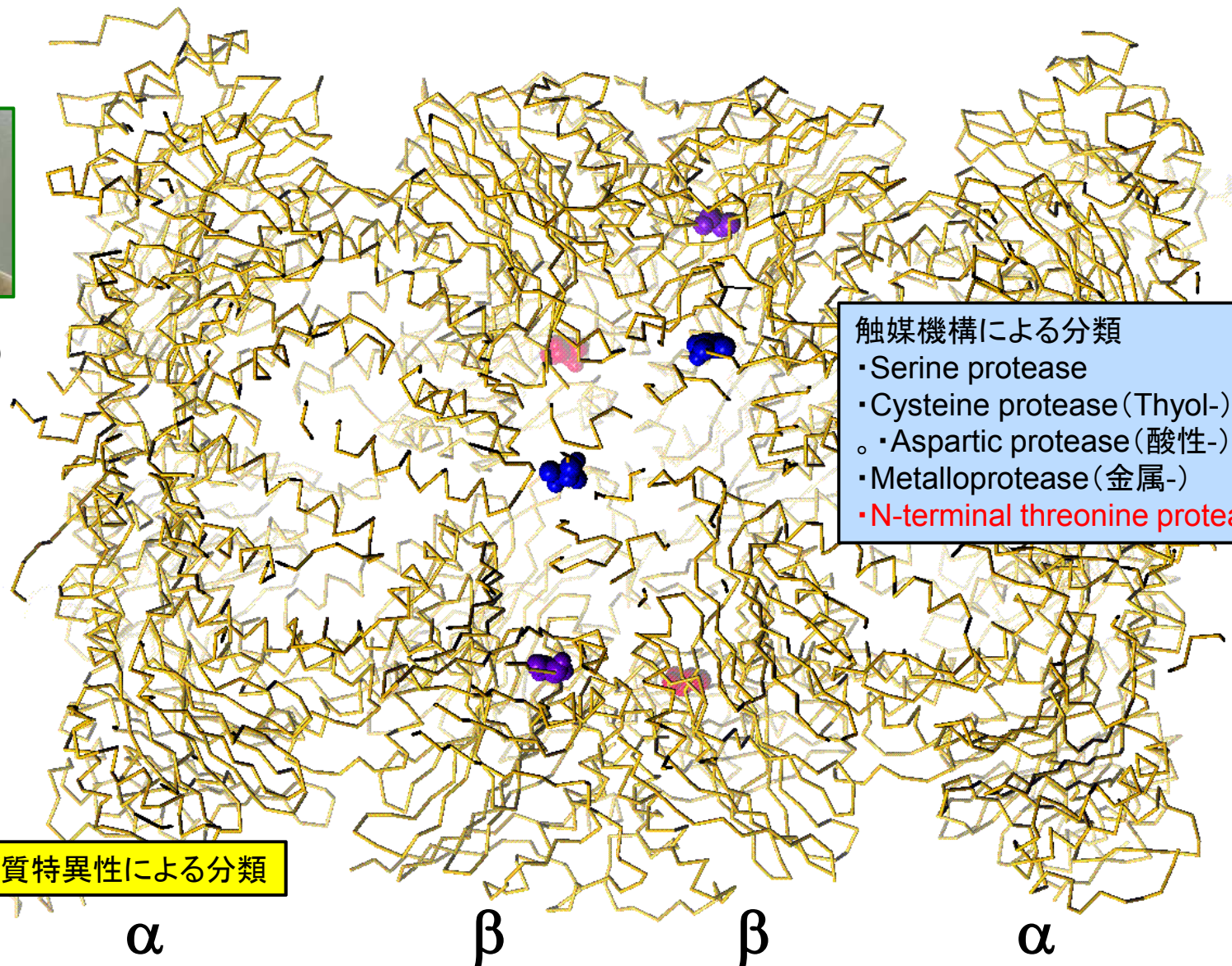
CP = $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$
(20S Proteasome)

cDNA cloning Era (1989 - 2005)

X線結晶解析によるプロテアソーム(触媒粒子)の立体構造



月原 富武
(阪大蛋白研)



- 触媒機構による分類
- Serine protease
 - Cysteine protease (Thiol-)
 - Aspartic protease (酸性-)
 - Metalloprotease (金属-)
 - **N-terminal threonine protease**

基質特異性による分類

α

β

β

α

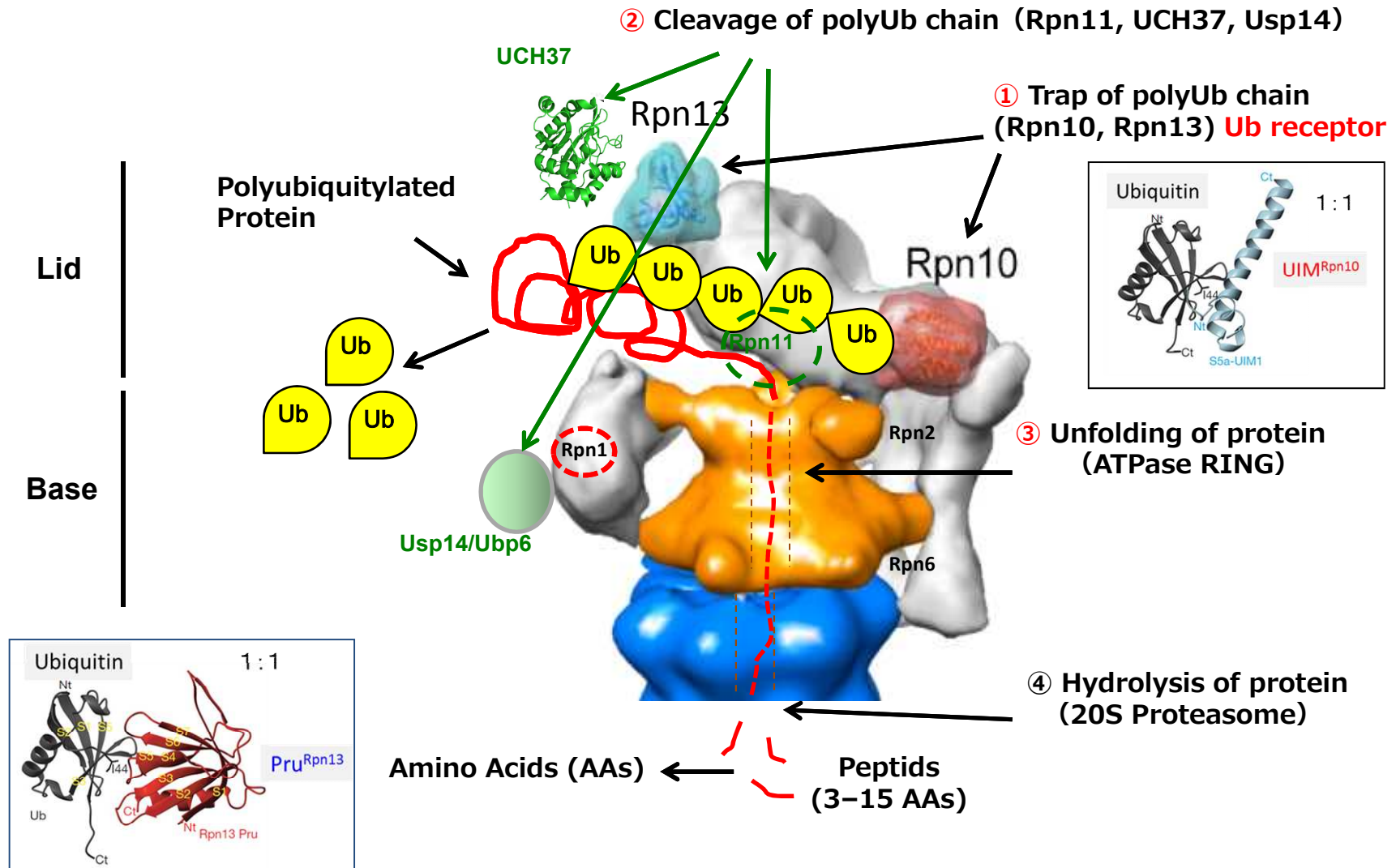
Blue: β 1 (Caspase-like) Purple: β 2 (Trypsin-like) Red: β 5 (Chymotrypsin-like)

酸性アミノ酸の

塩基性アミノ酸の

中性アミノ酸の C末端側を切断

プロテアソーム(調節粒子)の動作原理モデル



Redundant roles of Rpn10 and Rpn13 in recognition of ubiquitinated proteins and cellular homeostasis. Hamazaki J. et al., PLoS Genet. 2015 e1005401.

プロテアソームがタンパク質を破壊するイメージ

遺伝子数(H sapiens)

Ubiquitin System

E1 酵素 ~ 2

E2 酵素 ~ 50

E3 酵素 ~ 600

DUB酵素 ~ 90

Proteasome

Core : ~ 66

PIPs : ~ 50

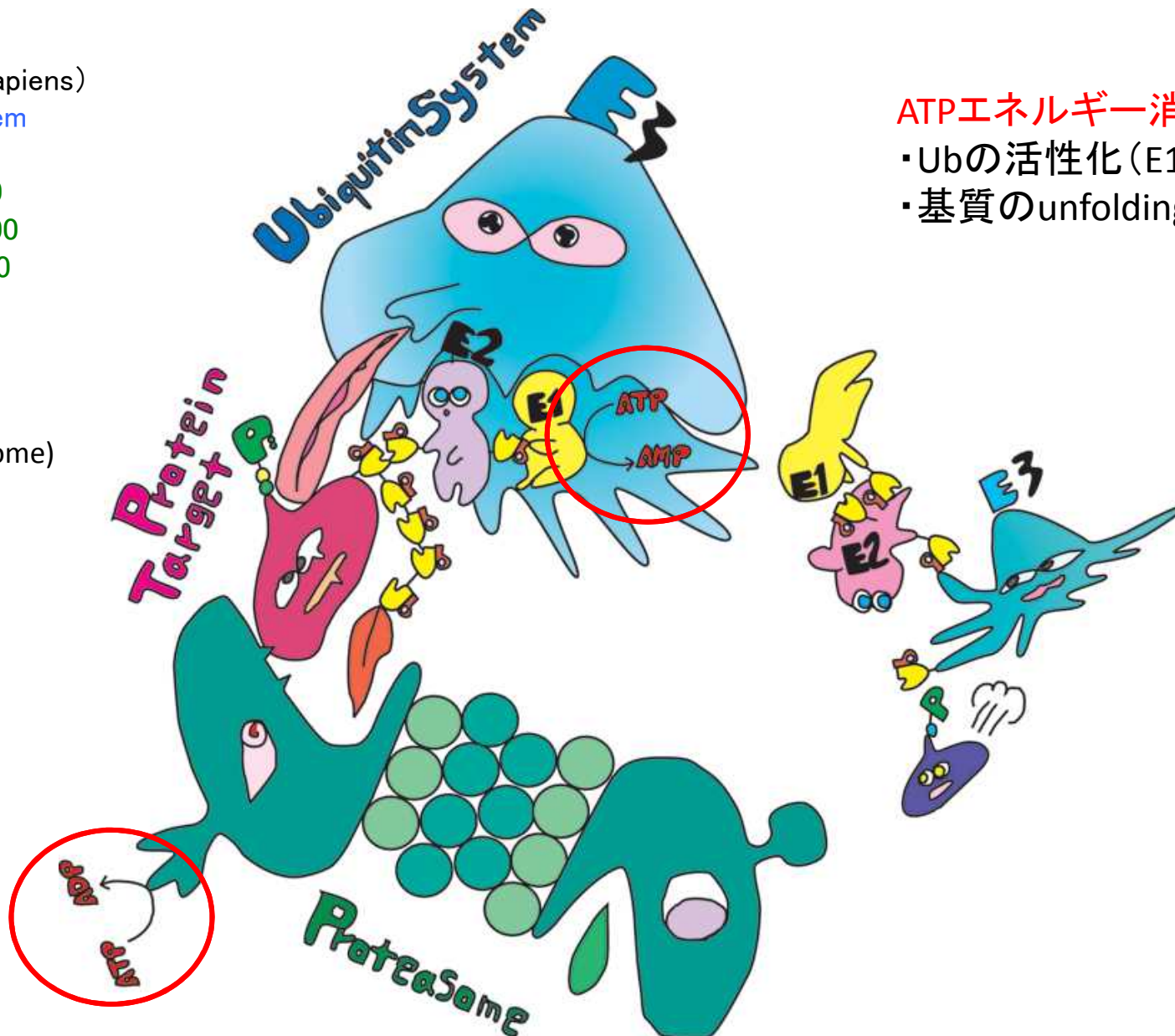
Total ~ 1000

(~4% in Genome)

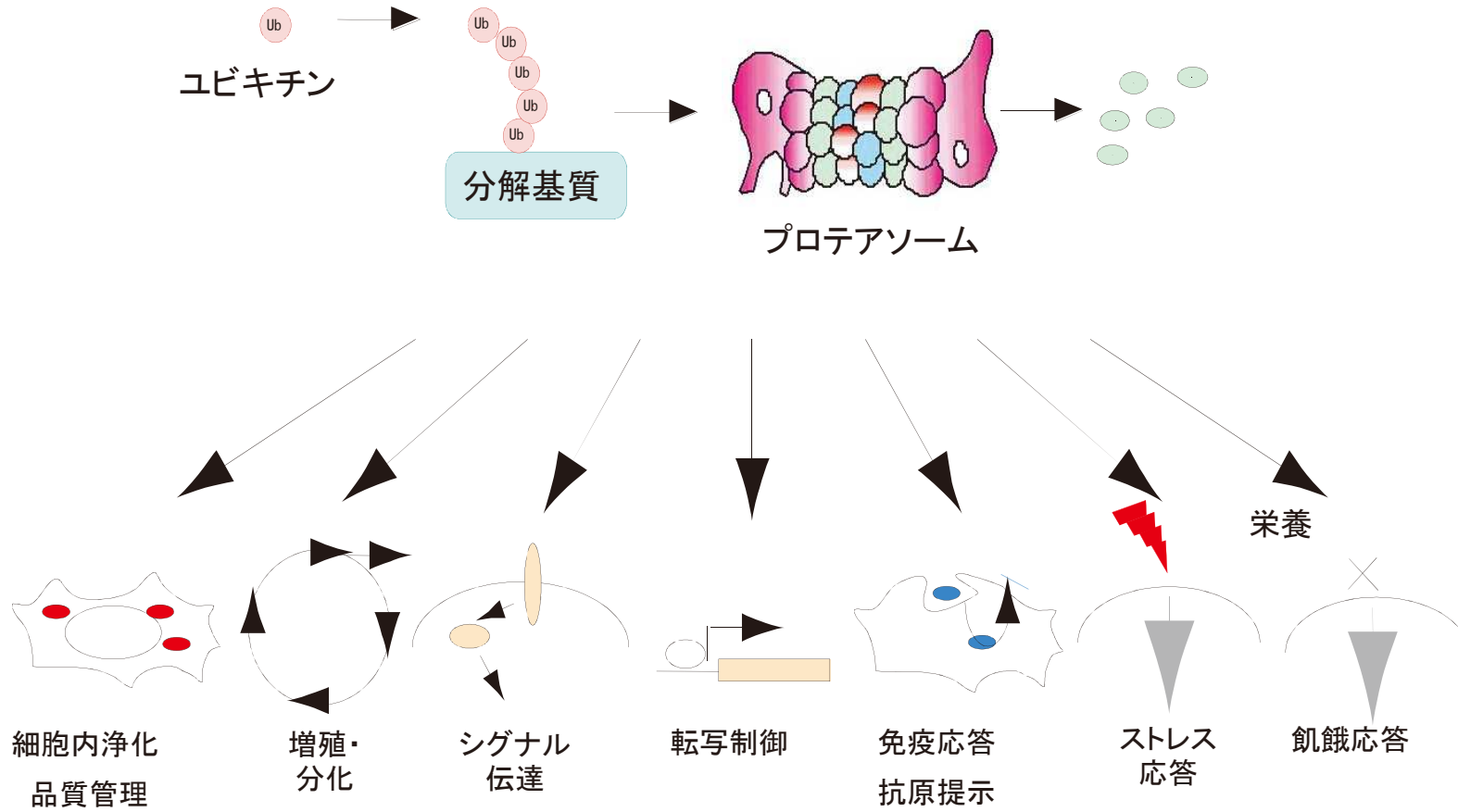
ATPエネルギー消費

・Ubの活性化(E1)

・基質のunfolding



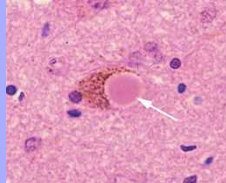
The Ubiquitin-Proteasome System



多彩な生理機能と病態

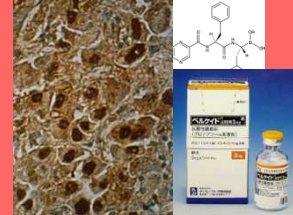
プロテアソーム機能の破綻と疾病

アルツハイマー病
パーキンソン病

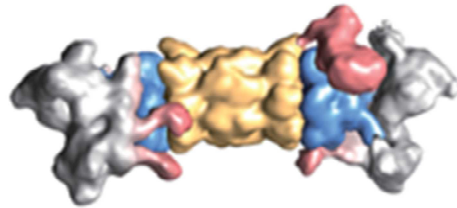


異常タンパク質の蓄積と
プロテアソーム機能低下

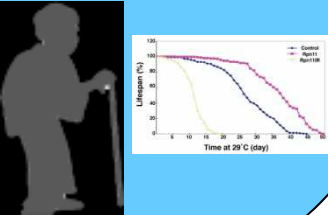
がん



プロテアソームの異常高発現
プロテアソーム阻害剤の臨床応用



老化・寿命



Time (day)	Control	Agg11	Agg16
0	100	100	100
10	100	100	100
20	100	100	100
30	100	100	100
40	100	100	100
50	100	100	100
60	100	100	100
70	100	100	100
80	100	100	100
90	100	100	100
100	100	100	100

プロテアソーム機能低下と
タンパク質代謝の低下
異常タンパク質の蓄積

自己免疫/
自己炎症性疾患



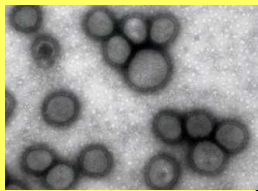
プロテアソーム機能異常に基づく過剰な炎症シグナル

心筋梗塞



プロテアソームのSNP(一塩基多型)が危険因子(機序不明)

感染防御

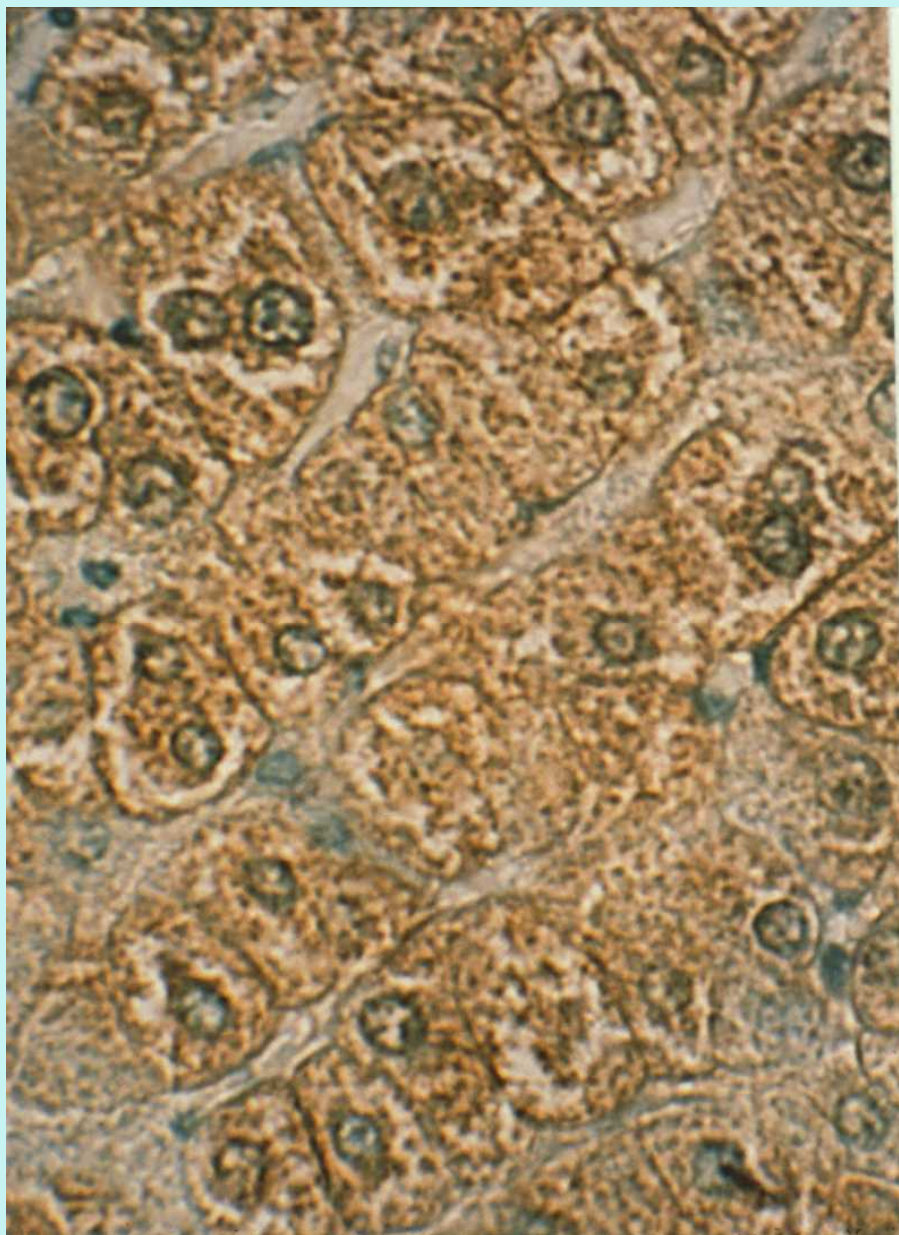


プロテアソームによる抗原提示機能の破綻

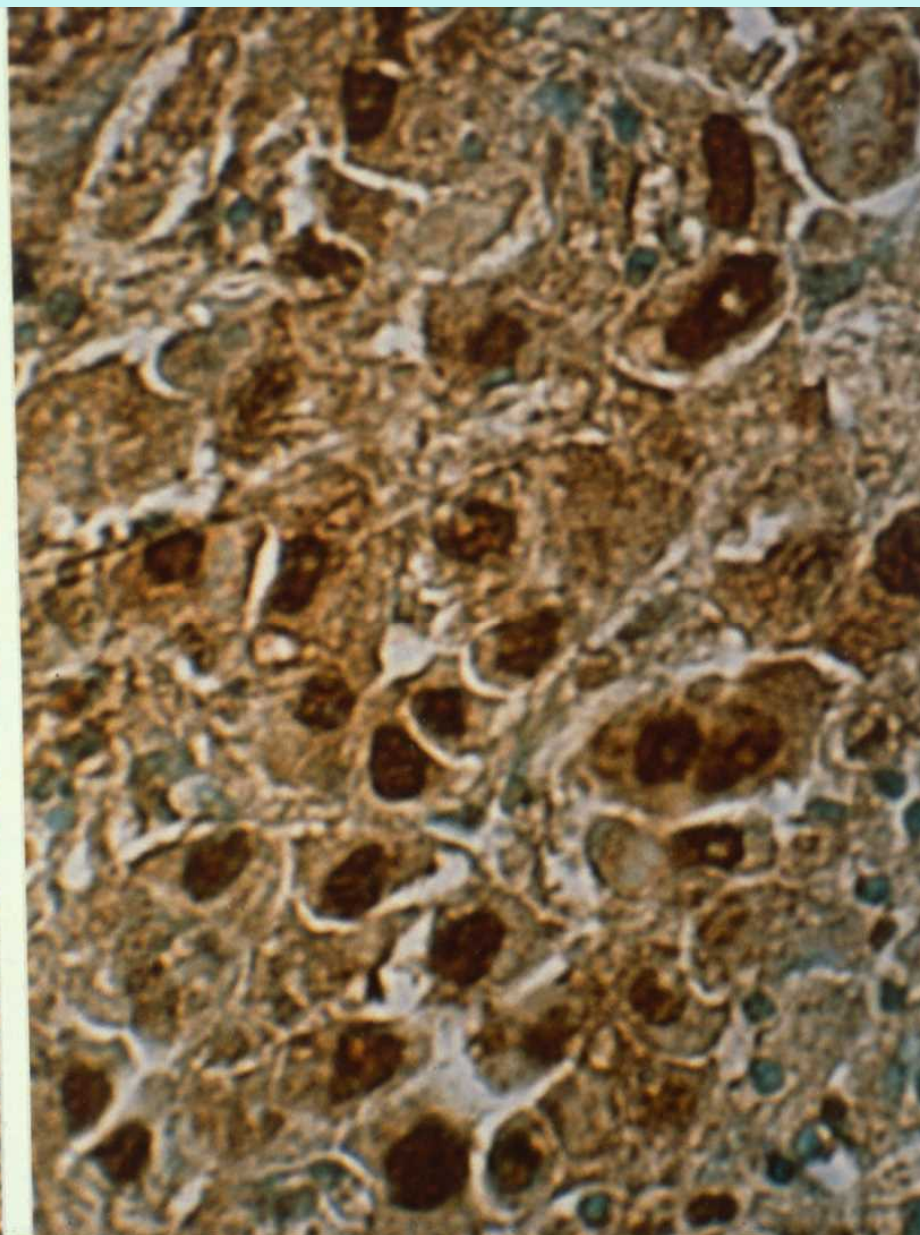
成人T細胞白血病 (Adult T-cell leukemia : ATL)

Kumatori, A., et al.: Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7071-7075 (1990)

正常ヒト肝臓組織

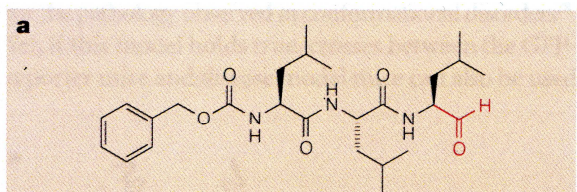


ヒト肝細胞癌組織



プロテアソームの阻害剤の発見と開発

活性阻害基

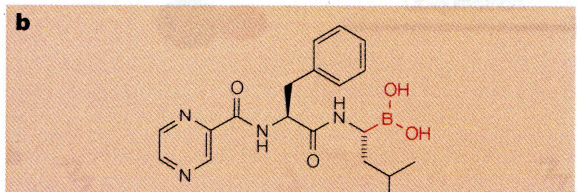


化学合成 Peptide aldehyde (MG132)

MG132 (Z-LLL-H)

Inhibits cysteine proteases, such as calpain and cathepsins, B, H, L, K, S etc
AL Goldberg et al., [1994](#)

aldehyde

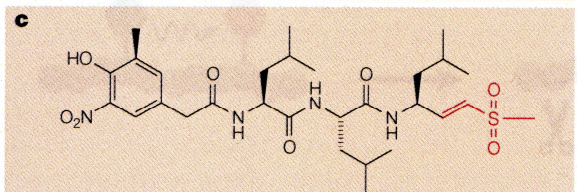


化学合成 Peptide boronic acid (PS341)

PS341

Bortezomib (**Velcade**) reversible
J Adams et al., [1995](#)

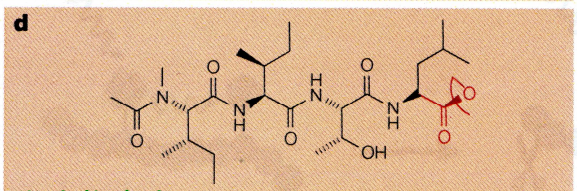
boronic acid



化学合成 Peptide vinyl sulfone (NLVS)

Irreversible binding to active threonines, but are less reactive than aldehydes
H Ploegh et al., [1997](#)

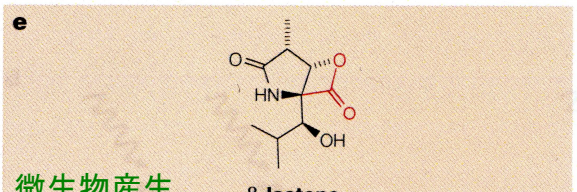
vinyl sulfone



微生物産生 Epoxomicin

α' , β' -epoxyketone peptide natural product
Unexpected morpholino formation with the N-terminal threonine ([1992](#)) M. Hanada

epoxyketone



微生物産生

β -lactone

clasto-lactastatin: active derivative of microbial metabolite **Lactacystin** (LC)
Formation of an ester bond with the N-terminal Threonine ([1991](#))

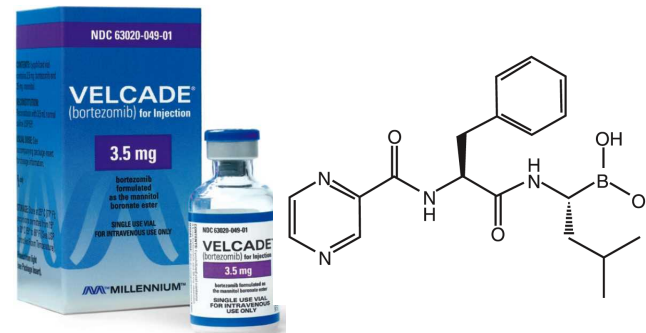
β -lactone

大村智北里大学特別荣誉教授(2015年ノーベル賞: Ivermectin)が発見!

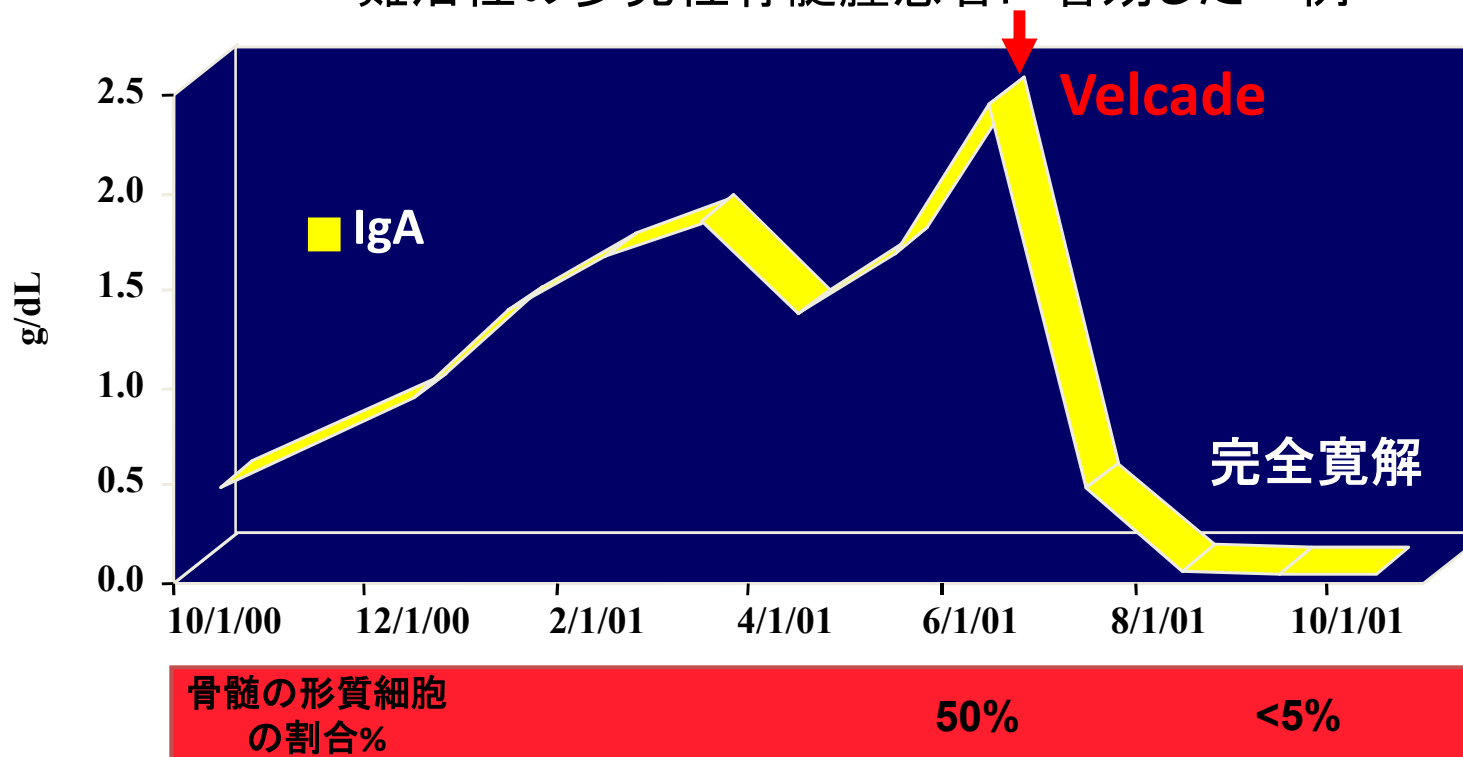
Bortezomib (Velcade™) プロテソーム阻害剤は出色の抗がん剤！

The drug has over two billion dollars (≥ 2000 億円) in annual sales in the preferred treatment for multiple myeloma (多発性骨髄腫)! AL Goldberg J Cell Biol 2012

ブロックバスター(医薬品産業用語): 従来の治療体系を覆す薬効を持ち、莫大な売り上げにより巨大な利益を生み出す新薬を指す言葉！



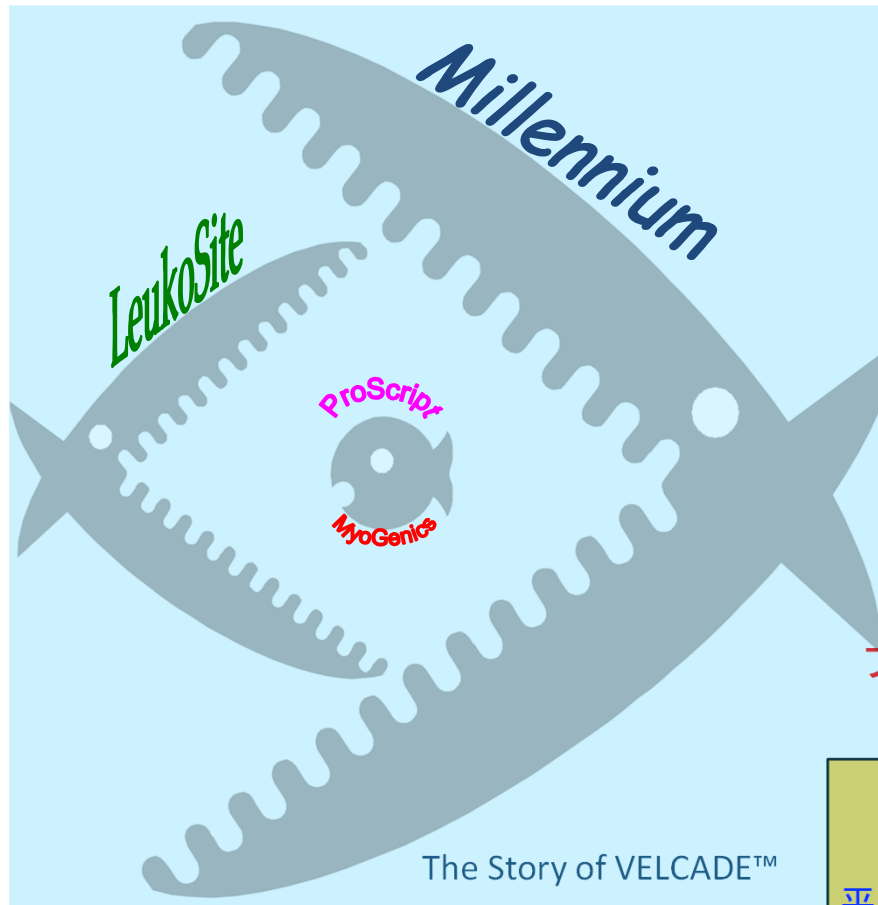
難治性の多発性骨髄腫患者に著効した一例



from A Ciechanover

- ・ Velcade™ (Bortezomib / PS341)
- ・ 現在、世界の100国で臨床応用 (FDA 2003, Japan 2006)
- ・ 開発: MyoGenetics (MG132) = ProScript / LeukoSite
- ・ Millennium Pharmaceuticalsが買収 (1999年)
- ・ 2008年、武田薬品工業が約1兆円で買収!

Takeda Oncology (Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.)



プロテアソーム
阻害剤

日経新聞

平成26年12月11日

武田

買収先の新薬稼ぎ頭に

武田薬品工業の2011年3月期は、自社開発ではない医薬品が稼ぎ頭になる見通しだ。08年に買収した米企業の血液がん治療薬「ベルケイド」の売上高が1400億円強と、製剤別で最大となる。

自社の主力薬の特許切れによる減収に対応し、海外買収を積極化してきたことが功を奏する。ベルケイドは米ミレニアム・ファーマシューティカルズが03年に発売した。武田のフランソワ・

血液がん治療薬など 特許切れの減収補う

ロジェ最高財務責任者が日本経済新聞に対し「今期の米売上高は10億ドル(約1200億円)を越えそう」と話した。前期は約950億円だった。

米国外のロイヤルティ収入を含む売上高は1400億円強と、前期に最大だった自社開発の「プロプレス」を上回る。

プロテアソームの阻害剤: 多発性骨髄腫の抗がん剤(分子標的薬)!

Bortezomib (ボルテゾミブ VELCADE[®], PS-341)

Reversible boronic acid inhibitor

FDA (2003), Japan (2006)

Ixazomib (イキサゾミブ NINLARO[®], MLN9708)

Oral analog of Bortezomib

FDA (2015), Japan (2016)

Carfizomib (カーフィルゾミブ Kyprolis[®]) → 次世代プロテアソーム阻害剤

Next-generation proteasome inhibitor of $\beta 5$

Irreversible epoxyketone inhibitor (modified form of Epoxomicin – YU101)

FDA (2012)

Oprozomib (ONX-0912): oral analog (clinical trial)

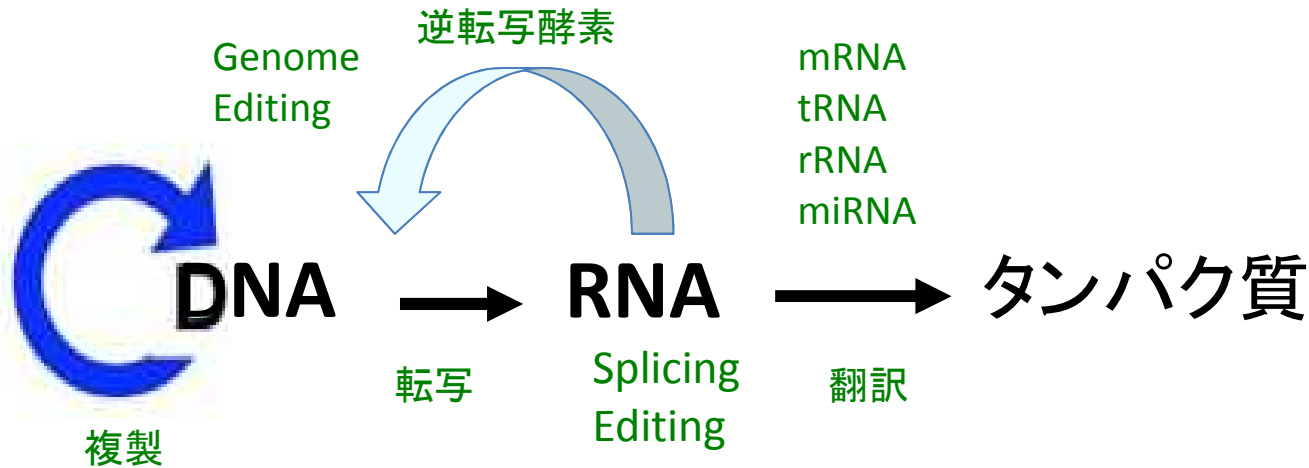
Combination Therapy (併用療法)

[Ixazomib](#) or [carfizomib](#) in combination with [lenalidomide](#) plus [dexamethasone](#)

- Lenalidomide レナリドミド (thalidomide derivative): 免疫調節薬 (IMiDs)
Cul4^{CBRN} E3 ubiquitin ligase^{regulator} targets: poly-ubiquitylation of IKZF1, IKZF3, CK1 α
- Dexamethasone: ステロイド系抗炎症薬

新しい時代の創薬の開発に向けて

病気は殆どの場合、遺伝子とタンパク質の破綻で発症する！



Gene Level

Knock-out (KO)
CRISPR-Cas9

遺伝子治療・ゲノム編集

mRNA Level

Knock-down (KD)
RNAi (siRNA, shRNA)

核酸医薬・RNA医薬

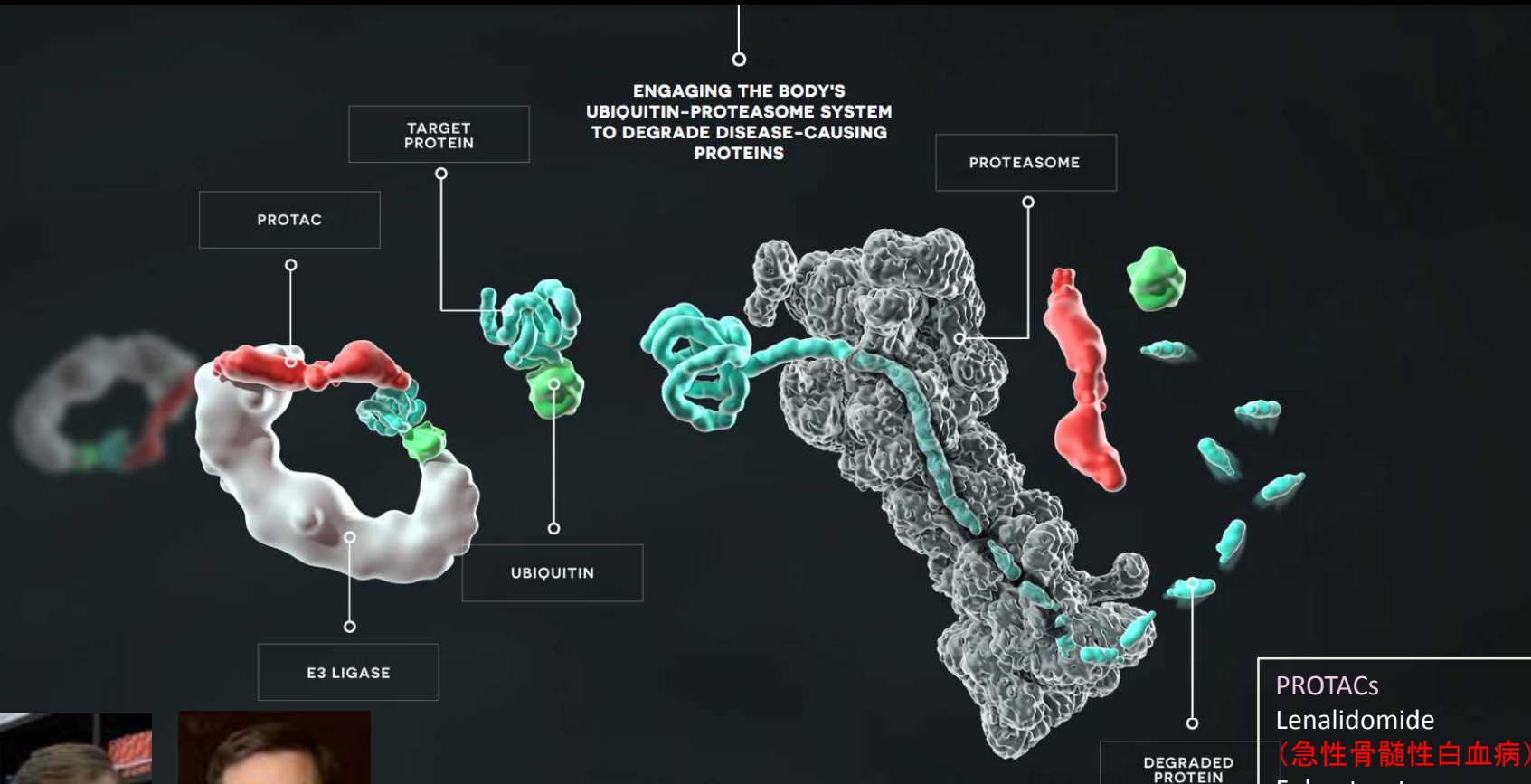
Protein Level

Proteasome !
Autophagy ?

阻害薬・抗体医薬

様々な病気の原因となる有害なタンパク質を選択的に分解し、それらが引き起こす疾病を治療する新戦略！

PROTACs (proteolysis targeting chimeras)



Raymond Deshaies
Caltech (Amgen)



Craig Crews
Yale (Arvinas)

PNAS 2001

PROTAC MECHANISM

The PROTAC works by recruiting an E3 ligase to tag the target protein for ubiquitination & degradation via the proteasome. After the protein is destroyed, the PROTAC continues its mission.

PROTACs

Lenalidomide

(急性骨髄性白血病)

Fulvestrant

(乳がん)

ARV-771

(前立腺がん)

dBET1

(急性骨髄性白血病)

ARV825

(バーキットリンパ腫)

from Arvinas, Inc (HP)

プロテアソーム研究から得た(私の)教訓！

一見、役に立たないような(基礎)研究でも、真に重要であれば、役に立つ(応用)研究に変貌し、その結果、社会に大きく貢献し、時には巨万の富に結びつく！



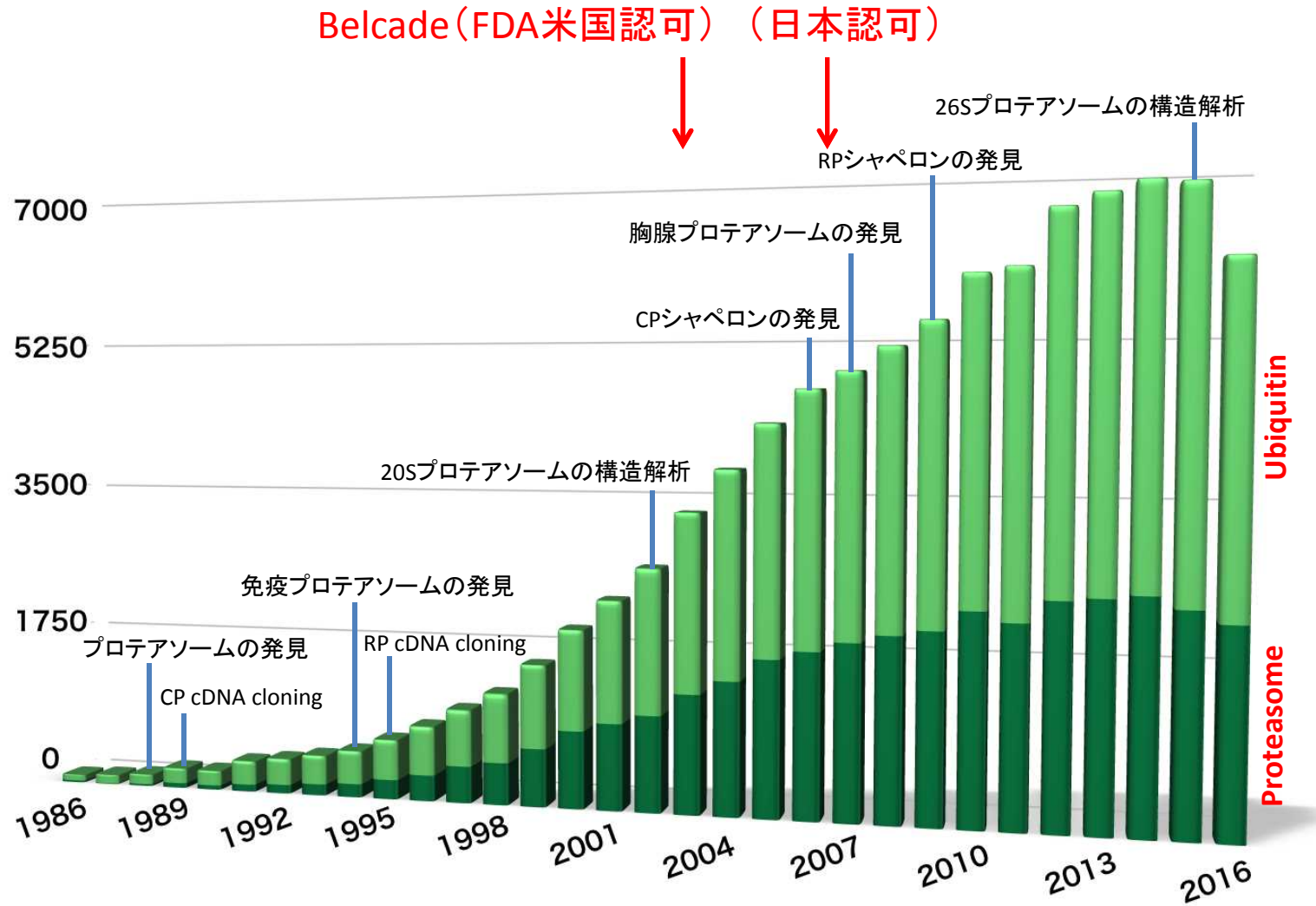
私の場合

プロテアソームの研究をA～Zまでライフワークとして推進、少しの学術的名声を得るも阻害剤開発の着想に至らず、一片の富も得ずして一敗地に塗れる(一生の不覚)！



論文数から見たユビキチンとプロテアソームの研究史

論文数 (PubMed Number / Year)



JT 生命誌研究館

大阪府高槻市にある生命科学に関連した展示と研究を行っている科学博物館。1993年設立。JT(日本たばこ産業)が運営。季刊「生命誌ジャーナル」を発行。館長:中村桂子 顧問:西川伸一

季刊「生命誌」 Scientist Library Special

大隅良典 **自分を食べて
生き続ける細胞に
魅せられて**
第62号



title **プロテアソームの発見から生命科学の中核へ**

いいね! 5 ツイート 2

Profile
プロフィール

<p>氏名 田中啓二 (公益財団法人東京都医学総合研究所 所長)</p> <p>name Keiji Tanaka</p>	<p>1949年 徳島県生まれ</p> <p>1968年 徳島県城北高等学校卒業</p> <p>1972年 徳島大学医学部栄養学科卒業</p> <p>1976年 徳島大学附属酵素研究施設・助手</p> <p>1980年 医学博士取得</p> <p>1981年 米国ハーバード大学医学部生理学部門 研究員(～1983年)</p> <p>1995年 徳島大学酵素科学研究センター・助教授</p> <p>1996年 (財)東京都医学研究機構東京臨床医学総合研究所分子腫瘍学研究部門・部長</p> <p>1998年 東京大学大学院新領域創成科学研究科連携講座教授</p> <p>2002年 (財)東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所・副所長</p> <p>2006年 (財)東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所・所長代行</p> <p>2011年 (財)東京都医学総合研究所・所長 / 日本学会連合会議員</p> <p>2012年 (公財)東京都医学総合研究所・所長</p>
---	---




(写真-大西成明)

1.一流を夢見て

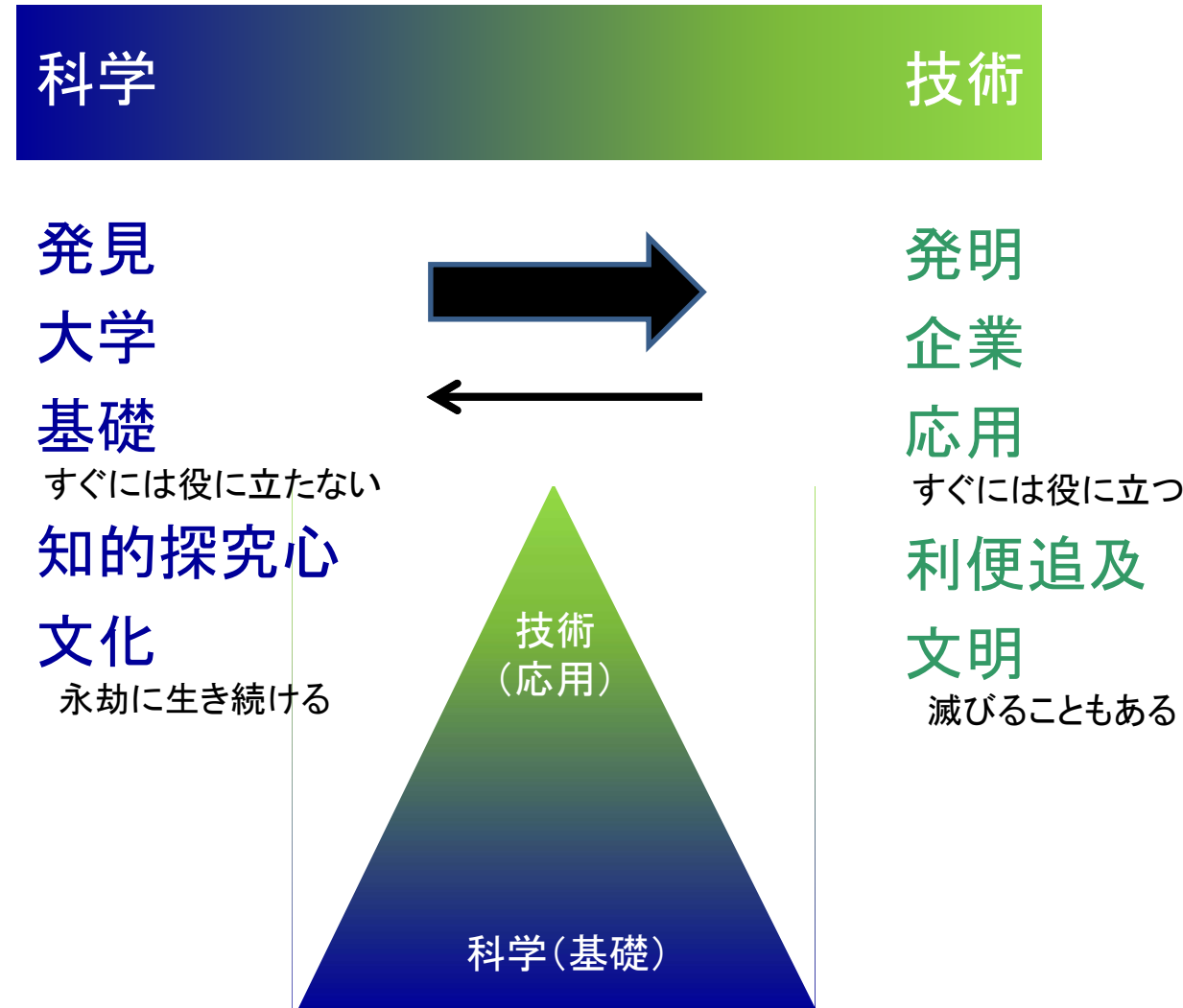
徳島の田舎で育ちました。父は後継ぎ問題の揉め事に嫌気がさし、生家を飛び出して職業軍人になったそうです。終戦の一年前にオーストラリア上空で乗務していた爆撃機が米軍機に撃たれて負傷しましたが、幸いその療養中に終戦となり、徳島へ帰ってくることができました。戦後間もなくは生きていくのに精一杯の時代でしたので、帰郷後は農業を始めました。非常に勤勉家で論理的に考える人でしたから、一定面積から上質の米をたくさん収穫する方法を試行錯誤で工夫し、近隣の人たちにも教えていましたね。父母の親戚の多くが校長先生や教頭先生という家だったので教育熱心でした。しかし、兄に厳しくしたのを反省したのか、私はかなり自由にさせてくれました。

子 季刊「生命誌」 普通の男の子でしたが、本を読むのは 81号 2014年 来る移動図書館で、毎回5～10冊程 借 5月30日 発行 中学校までは『アラビアンナイト』や 『グ 集や日本の歴史ものを好んで読みました。中学の先生をしていた従兄弟が読書家だったので、本をたく



① 生まれてすぐに母と。徳島の自然豊かな田舎で育ったが生きものに対しての興味はあまりなかった。

「科学技術」と「科学・技術」



吉田賢右

科学と技術は連続しているが別物である。科学は技術を生み出す原動力となる！

基礎研究は未来を拓く

☹️ なぜ生命科学・医学を研究するか？

殆どの病気は生命システムを構成する機能素子、即ち遺伝子とタンパク質の不具合で発症する！しかし私たちは、生命の動作原理について僅かしか知らない。従って、病気の発症機構を解明するためには、生命の謎を解く基礎研究が必須である！

☹️ 健康を守る戦略:創薬における日本の課題？

病気の治療には、様々な方法があるが、その主力である薬の開発は不可欠である。今日米国ではバイオ医薬品の6割以上がアカデミア・ベンチャー由来となっている！引き換え、日本では皆無の状況にある。新しく発足したAMED(日本医療研究開発機構)が期待される！

☹️ なぜ基礎研究が必要か？

基礎研究には知的好奇心に基づいた発見があり、そこには希望に満ちた未来への夢が散在する。それゆえ基礎研究は人材育成の原動力になる。その結果は、知の創出と社会発展(文明)の基盤となる！

Thank you for your attention!