

## 総括研究報告書

### 1. 研究開発課題名：

「がん関連遺伝子産物の転写後発現調節を標的とした治療法の開発」  
(リン酸化依存性タンパク質間相互作用阻害物質の探索と抗がん剤への展開)

### 2. 研究開発代表者：

渡邊信元 (国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・生理活性物質探索研究ユニット)

### 3. 研究開発の成果：

#### ①Skp2 タンパク質と p27Kip1 由来リン酸化ペプチドへの結合測定系の構築

Skp2 タンパク質のリン酸化ペプチドへの結合測定系を構築した。蛍光タンパク質融合 Skp2 と標的リン酸化ペプチド(ヒト p27Kip1 由来、Skp2 による認識部位 T187 がリン酸化されている)の結合を、蛍光タンパク質融合 Skp2 と Cks1 を昆虫細胞で発現し、標的ヒト p27Kip1 由来リン酸化ペプチドを共有結合したマルチウェルプレートに置いて結合する蛍光によって測定する系を確立した。

#### ②Skp2 タンパク質と p27Kip1 由来リン酸化ペプチドへの結合測定系の動作検証

①で構築した系が実際に探索に利用可能であることを検証した。mAG-Skp2 タンパク質融合タンパク質のペプチドへの結合が mAG の蛍光として定量できた。非リン酸化ペプチド、Cks1 非存在下などの条件では結合が検出できず、リン酸化、Cks1 存在に依存した特異的結合が測定できていることが確認できた。結合配列リン酸化ペプチドは結合を拮抗的に阻害できることも実際に確認できたので、リン酸化ペプチドへの Skp2 タンパク質結合を測定する系が、Skp2 タンパク質結合の阻害物質探索系として利用可能であることが証明できた。

#### ③Skp2タンパク質とp27Kip1由来リン酸化ペプチドへの結合阻害物質探索と検証

①で構築し、②で検証した探索系を用いて、Skp2タンパク質とp27Kip1由来リン酸化ペプチドへの結合阻害剤の探索をおこなった。理研NPDepo化合物ライブラリー、産総研化合物ライブラリー、東大化合物ライブラリーをスクリーニングした。理研NPDepo化合物ライブラリー約2万化合物からは、258種の一次ヒット化合物から、30種のヒット化合物を選抜した。さらにこの中から強い阻害活性を有する2種の阻害化合物(gentian violet, linichlorin A)を得た。これら2種の化合物の、リン酸化ペプチド結合ビーズによるプルダウンアッセイ法でのp27-Skp2結合阻害能、試験管内でのSkp2を含むSCF型ユビキチン化酵素複合体によるp27Kip1タンパク質ユビキチン化阻害能を確認した。また、がん細胞にこれらの化合物を処理した際に細胞内のp27タンパク質が安定化した。ヒトがん細胞(HeLa細胞)に対する増殖阻害効果(gentian violet: IC50=0.4  $\mu$ M, linichlorin A: IC50=3.2  $\mu$ M)も確認した。さらに興味深いことにこれらの化合物はマウス腫瘍細胞(tsFT210細胞)の増殖を、非腫瘍細胞であるNIH3T3細胞の増殖に比し、かなり強く阻害した。従って、本計画に沿って選択されてくる物質はがん細胞の増殖を選択的に阻害するはずであるという、当初の概念を証明することができた。さらにlinichlorin Aに関しては、がん治療薬への展開を目指し、薬物動態実験に進めるさらなる検証を行った。しかし、効果の見られる濃度域の検証からp27Kip1タンパク質の安定化により細胞増殖阻害を引き起こす濃度域がかなり狭く、濃度が少し高いと非特異的な細胞毒性を示すことが明らかになった。そこで、この物質についてはがん治療薬への展開は中止した。他の化合物ライブラリーからのスクリーニングに関しては、一次スクリーニングでのヒット化合物は複数種得られたが、その後の試験管内でのSkp2を含むSCF型ユビキチン化酵素複合体によるp27Kip1タンパク質ユビキチン化阻害能、がん細胞増殖阻害能などの評価で期待される効果を有する物質は得られなかった。Skp2タンパク質とp27Kip1タンパク質の各種がん細胞での発現評価を行い、この系から得られる物質に効果が期待出来るがん種を特定した。