

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	タンパク質のSUMO化を制御する化合物の探索とその科学生物学的研究
Title(English)	
著者(和文)	米山操
Author(English)	Misao Yoneyama
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9405号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,徳永 万喜洋,工藤 明,川上 厚志,立花 和則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9405号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

論 文 要 旨 (和文2000字程度)

(Summary)

報告番号	乙 第 号	氏 名	米山 操
(要 旨) ユビキチン様タンパク質であるSUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) は、標的タンパク質のリジン残基に結合し、そのタンパク質の機能を変化させることで、遺伝子の発現や細胞周期など、様々な生命現象を制御していることが知られている。ユビキチン化と同様にタンパク質SUMO化は可逆的であり、SUMO活性化酵素 (E1)、SUMO結合酵素 (E2)、およびSUMO転移酵素 (E3) により基質タンパク質にSUMOは転移され、システインプロテアーゼである脱SUMO化酵素SEN1により脱SUMO化される。最近、細胞内のSUMO化レベルの異常が癌や神経変性疾患などの疾患と密接に関わっていることが明らかになってきた。このことから、タンパク質のSUMO化を制御する化合物は、SUMO化の生理機能を解明するための有用なツールとなるだけでなく、新たな分子標的治療薬となる可能性がある。そこで本研究では、SUMO化酵素阻害剤、及び脱SUMO化酵素阻害剤を探索し、同定した阻害剤の阻害機構の解明及び、その抗がん活性等、細胞レベルでの薬理作用の評価を目的とした。 共同研究先である理化学研究所吉田化学遺伝学研究室において、in situ SUMO化アッセイ系を用いてハンカチノキの葉の抽出液中にSUMO化阻害活性が存在することが見出された。そこで、岩手大学農学部の木村賢一教授のグループと共同で活性物質を単離、同定したところ、エラジタンニン的一种であるdavidiin及び、エラジタンニンが加水分解することによって生じるellagic acidがSUMO化阻害活性を有していることを見出した。そこでこの2つの化合物のSUMO化阻害機構について検討したところ、davidiinはSUMO E1と直接結合し、E1-SUMO中間体の形成を阻害することでSUMO化反応を阻害することを明らかにした。また、そのIC₅₀値は0.15 μMであり、これまで同定されたSUMO化阻害剤の中でも最も強い阻害活性を示した。一方、ellagic acidは、E1-SUMO中間体形成に影響を及ぼすことはなく、SUMO E2に直接結合することでE2-SUMO中間体の形成を阻害し、SUMO化反応を阻害することが示唆された。さらに、エストロゲン依存的な乳がん細胞の増殖にSUMO E2が関与することが示されているが、ellagic acidはエストロゲン依存的なMCF7乳がん細胞の増殖を抑制した。SUMO E2を阻害する低分子化合物はホルモン依存的な乳がんの治療薬になり得ることが示された。 また、脱SUMO化酵素SEN1阻害剤の探索では、in situ SUMO化アッセイ系を応用したin situ 脱SUMO化アッセイ系を確立した。これをスクリーニング系として用いて、理化学研究所のNPDepo化合物ライブラリーに収容されている約18,000化合物からSEN1阻害活性を有する複数の候補化合物を得た。二次評価系として、ウエスタンブロット法によるin vitro脱SUMO化アッセイおよびCypet-SUMO-1-Ypetを基質としたin vitro FRET解析を行い、最終的にIC₅₀値が15 μM以下の化合物を7個得た。その中でもIC₅₀値が0.29 μMと最も阻害活性が強い化合物についてさらに解析を進めた。本化合物はpapain、trypsinなど他のシステインプロテアーゼを全く阻害せず、SEN1を選択的に阻害した。また、細胞内のSEN1阻害活性について、Flag-SUMOを過剰発現させた293T細胞を用いて検討したところ、本化合物はSEN1をノックダウンしたときと同様に細胞内のタンパク質SUMO化レベルを増加させた。さらに、転写因子であるHIF1α タンパク質は低酸素下で安定化され、がん細胞の生存、増殖に寄与するが、SEN1による脱SUMO化がHIF1αを安定化することが報告されている。本化合物は低酸素により誘導される内在性HIF1αの安定性を低下させ、HIF1αの転写活性化能を抑制した。以上の結果より、本化合物はSEN1の阻害を介して、低酸素微小環境下の癌細胞の生存に重要なHIF1αの働きを抑えることが示唆され、SEN1阻害活性を有する低分子化合物は新しい癌分子標的治療薬として有望であることが示された。 本研究では、davidiinおよびellagic acidという2つのSUMO化阻害剤ならびに多数の脱SUMO化酵素阻害剤を同定することに成功した。これらの化合物はいずれも既存の阻害剤よりも強い阻害活性を示したことから、タンパク質SUMO化が制御する生命現象を解明するためのバイオプローブのみでなく、タンパク質SUMO化を標的とした抗癌剤開発のためのリード化合物として今後の活用が期待できる。			

(論文博士)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

報告番号	乙 第	号	氏 名	米山 操
(要 旨) Protein modification by small ubiquitin-related modifier proteins (SUMOs) is one of important regulatory mechanisms for protein functions. SUMOylation is mediated by a multi-step enzymatic reaction that is reversibly catalyzed by SUMO-specific activating (E1), conjugating (E2), and ligating (E3) enzymes, and a family of SUMO-specific proteases (SENPs). Dysregulation of the reversible SUMOylation processes has been implicated in the development of cancer and neurodegenerative diseases. Therefore, it is important to find small-molecule inhibitors of protein SUMOylation/deSUMOylation for not only elucidating physiological roles in reversible protein SUMOylation but also a drug development. Here, we have identified two natural products, davidiin and ellagic acid, as novel SUMOylation inhibitors and a novel SENP1 inhibitor. Davidiin and ellagic acid inhibited in vitro SUMOylation of RanGAP1-C2 in a dose-dependent manner, and their IC₅₀ values were 0.15 μM and 0.96 μM, respectively. Furthermore, davidiin and ellagic acid inhibited protein SUMOylation in vivo without affecting in vivo ubiquitination. Mechanistically, davidiin inhibited the intermediate formation of E1-SUMO-1, while ellagic acid inhibited the intermediate formation of E2-SUMO-1 without inhibiting the E1-SUMO-1 intermediate. Moreover, davidiin and ellagic acid inhibited the proliferation of various cancer cells. Thus, we succeeded in identifying two natural SUMOylation inhibitors with a different target in the SUMOylation process. We developed an in situ deSUMOylation assay to screen for a SENP1 inhibitor. We confirmed NPD11715 as a novel SENP1 inhibitor using an in vitro deSUMOylation assay. NPD11715 inhibited SENP1 with an IC₅₀ value of 0.29 μM, but did not inhibit other proteases. NPD11715 also inhibited protein deSUMOylation in vivo. Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1alpha) is known to be involved in tumorigenesis and deSUMOylation of HIF1alpha by SENP1 leads to its stabilization and activation. Treatment with NPD11715 induced degradation of HIF1alpha and a decrease in its transcriptional activity. These results indicate that NPD11715 functions in inhibiting the SENP1 activity in cells. Thus, we identified novel small molecule inhibitors against both SUMOylation and deSUMOylation. These new compounds will be not only useful for investigating the roles of SUMO conjugations in a variety of pathways in cells, but also provides a basis for the development of drugs targeted against diseases involving aberrant SUMOylation.				