

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510288

研究課題名(和文) タンパク質SUMO化を標的としたケミカルバイオロジー研究

研究課題名(英文) Study on chemical biology for protein SUMOylation

研究代表者

伊藤 昭博 (Ito, Akihiro)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：40391859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のがん化におけるタンパク質SUMO化の役割を、ケミカルバイオロジー的手法を用いて明らかにすることを目的とした。これまでに複数のSUMO化阻害剤の同定に成功した。その中でもspectomycin B1のようなSUMO E2を阻害する低分子化合物は抗乳がん剤として有望であることを示した。さらに、SEN1阻害剤は低酸素微小環境下のがん細胞の生存に重要な転写因子HIF-1の活性を減少させることを見出した。加えて、スプリットルシフェラーゼの原理を応用したHTS可能なSUMOとSIMの結合を測定可能なアッセイ系の構築に成功し、SUMO-SIMの結合を阻害する世界初の小分子化合物の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate roles of protein SUMOylation in carcinogenesis using a chemical biology approach. Using an in situ cell-based SUMOylation assay system, we identified several small molecule inhibitors of SUMOylation including spectomycin B1 as SUMO E2 (Ubc9) inhibitor. Our findings suggested that Ubc9 inhibitors such as spectomycin B1 have a potential as a therapeutic agent against ERα-dependent breast cancers. Furthermore, we identified a novel deSUMOylation enzyme, SEN1, inhibitor by an in situ deSUMOylation assay. We found that SEN1 inhibitor reduced the activity of HIF-1α, an important transcriptional factor for cancer survival under hypoxia microenvironment. In addition, we succeeded in developing novel assay systems for detecting non-covalent interactions between SUMO and SIM using a split-luciferase complementation and identified first small molecules that inhibit SUMO-dependent protein-protein interactions.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学、ケミカルバイオロジー

キーワード：SUMO 阻害剤 抗がん剤 脱SUMO化酵素

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン類似タンパク質である SUMO は、ユビキチンとは異なり分解シグナルとはならないが、様々な標的タンパク質のリジン残基を修飾することにより、タンパク質の安定性、細胞内局在などに影響を与え、様々な生命現象に関わっていることが知られている。タンパク質の SUMO 化は複数の酵素が関与する可逆的な結合反応からなっている。ユビキチン化と同様に SUMO 化は、SUMO 活性化酵素である E1 (AOS1/Uba2) と ATP により活性化される第 1 段階と、E1 から SUMO 結合酵素 E2 (Ubc9) に SUMO が転移される第 2 段階を経て、最終的に標的分子のリジン残基のアミノ基とイソペプチド結合し SUMO 化反応は完了する。この標的分子の識別に SUMO 化促進因子 E3 が関与しており、*in vitro* において、様々な基質の SUMO 化には E1、E2 酵素反応で十分であるという結果が示されている一方で、*in vivo* においては SUMO と基質との反応に E3 の活性が必要であることが示されている。加えて、ユビキチン化と同様に SUMO 化は可逆的であり、脱 SUMO 化酵素 (SENP) によって負に制御されている。また、標的タンパク質上の SUMO は、SUMO-interacting motif (SIM) 含有タンパク質により認識され、この SUMO 依存的なタンパク質間結合が、SUMO 化に関わる多くの細胞内プロセスを媒介していると考えられている。

興味深いことに異常な SUMO 修飾は、癌や神経変性疾患と密接に関わっていることが示されており、SUMO 化を制御する上記酵素群は、創薬の標的分子になりうる可能性がある。したがって、タンパク質の SUMO 化を制御する小分子化合物は、SUMO 修飾の生理機能を解析する上で有用なプローブになるだけでなく、新たな分子標的治療薬になる可能性がある。我々は、それまで未同定であった SUMO 化阻害剤を探索する目的で、*in situ* SUMO 化アッセイ系を応用したスクリーニングシステムを開発し、植物抽出物ライブラリー、微生物抽出物ライブラリー、合成および天然物由来の化合物ライブラリーからタンパク質 SUMO 化阻害剤を探索した。その結果、ギンコール酸および Kerriamycin B が E1 活性を阻害することを見出し、世界で初めて SUMO 化阻害の同定に成功した。加えて、*in situ* SUMO 化アッセイ系をさらに発展させた、スループット性の高い *in situ* 脱 SUMO 化アッセイ系を既に確立しており、SENP 阻害剤の探索も可能であり、タンパク質 SUMO 化を標的とした化合物を同定し、得られた化合物を用いて細胞内における SUMO 化の役割を明らかにするケミカルバイオロジー研究を実施する環境が整った。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 現在までに同定した SUMO 化阻害剤 spectomycin B1 の作用機構の解明、(2) 新しい化合物ライブラリーから新規 SUMO 化

阻害剤の探索、(3) 新たに開発した *in situ* 脱 SUMO 化アッセイを用いた SENP 阻害剤の探索、(4) SUMO-SIM 結合阻害剤の探索、(5) 得られた化合物を用いて細胞のがん化におけるタンパク質 SUMO 化の役割を明らかにすることを目的とし、タンパク質 SUMO 化を標的とした創薬に向けた基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) E2 阻害剤としての spectomycin B1 の同定。我々は過去のスクリーニングによって、抗生物質である spectomycin B が SUMO E2 を阻害する活性を有していることを示唆する結果を得た。そこで、E2-SUMO 中間体形成における spectomycin B1 の効果、spectomycin B1 を固定したビーズを用いたプルダウン実験、SPR 解析により E2 との結合親和性等を検討し、spectomycin B1 の標的が E2 であることを明らかにする。次に、乳がん細胞における spectomycin B1 の抗がん活性を検討し、SUMO E2 を標的とした新しい乳がん治療法の確立を目指す。

(2) 新規 SUMO 化阻害剤の探索。

理化学研究所が所有する化合物ライブラリー (NPDepo)、植物抽出液ライブラリーから *in situ* SUMO 化アッセイによって、さらにインシリコスクリーニングによって、新規構造を有する SUMO 化阻害剤を探索する。ヒット化合物について、IC50 値の算出、標的の同定等を行い、より強い SUMO 化阻害剤の獲得を目指す。

(3) 脱 SUMO 化酵素 SENP 阻害剤の探索。我々は *in situ* SUMO 化アッセイ系を応用した SENP1,2 依存的な *in situ* 脱 SUMO 化アッセイ系の構築に成功した。そこで本アッセイ系を用いて、NPDepo が保有する約 20,000 種類の化合物ライブラリーから SENP を阻害するサンプルを探索する。SENP1, 2 とともに結晶構造が解かれていることから、インシリコスクリーニングによる SENP 阻害剤の同定も試みる。ヒット化合物について、細胞レベルでの脱 SUMO 化阻害効果を検討し、脱 SUMO 化阻害剤として有用であるかどうか明らかにし、SENP1 および SENP2 阻害剤の取得を目指す。得られた SENP 阻害剤の抗がん活性について検討する。

(4) SUMO-SIM 阻害剤の探索。Alpha テクノロジーおよびスプリットルシフェラーゼシステムの原理を応用したハイスループットスクリーニング可能な SUMO-SIM の結合活性を測定するアッセイ系を確立する。確立したアッセイ系およびインシリコスクリーニングにより世界初の SUMO-SIM 結合を阻害する小分子化合物の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) E2 阻害剤としての spectomycin B1 の同定。Spectomycin B1 の標的が SUMO E2 であることを明らかにするために、固定化ビーズを用いた pull down アッセイおよび SPR 解析

により、spectomycin B1 が SUMO E2 と直接結合することを確認した。さらに、E2-SUMO 中間体形成を選択的に阻害したことから、spectomycin B1 は SUMO E2 阻害剤であると結論づけた。加えて、spectomycin B1 処理あるいは SUMO E2 (Ubc9) ノックダウンはホルモン依存的な乳がん細胞の増殖を抑制することを明らかにし(図 1) spectomycin B1 のような SUMO E2 を阻害する小分子化合物は抗乳がん剤として有望であることを初めて示す事ができた。

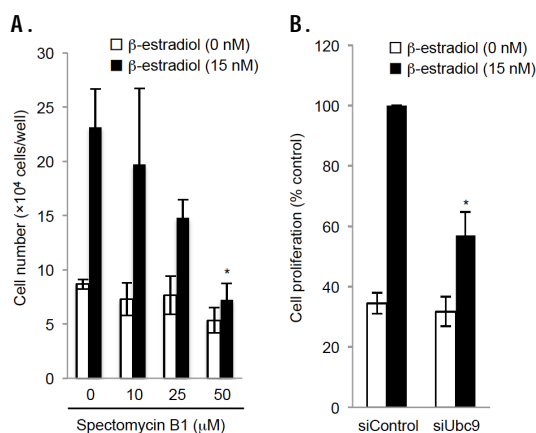


図 1 . Spectomycin B1 処理(A)、Ubc9 ノックダウン(B)による estradiol 依存的な乳がん MCF7 細胞の増殖抑制

(2) 新規 SUMO 化阻害剤の探索。ハンカチノキの葉の抽出物の SUMO 化阻害活性成分としてエラグ酸とダビジンとを同定した。中間体形成等の実験結果から、エラグ酸は E2 を、ダビジン E1 をそれぞれ阻害することを明らかにした。特に、ダビジンの *in vitro* SUMO 化に対する IC50 値は 0.15 μM であり、これまで同定されている最も強い SUMO 化阻害剤である。加えて、インシリコスクリーニングを用いて、新規構造を有する複数の SUMO E1 阻害剤の同定に成功した。

(3) 脱 SUMO 化酵素 SENP 阻害剤の探索。 *In situ* 脱 SUMO 化アッセイを用いて、SENP1 を選択的に阻害する複数の化合物の同定に成功した。そのうち、最も強い SENP1 阻害活性を示す化合物について詳細な解析を行った。本化合物は、細胞レベルでも脱 SUMO 化阻害活性を示し、さらに低酸素微小環境下のがん細胞の生存に重要な転写因子 HIF-1 の活性を減少させることを見出し、SENP1 を阻害する小分子化合物は抗がん剤として有望であることを示す事ができた。加えて、インシリコスクリーニングを用いて、SENP2 阻害剤の同定に成功した。

(4) SUMO-SIM 結合阻害剤の探索。インシリコスクリーニングを用いて、SUMO-SIM の結合を阻害する小分子化合物の同定に世界で初めて成功した。さらに、スプリットルシフェラ

ーゼの原理を応用した *in vitro* および *in vivo* で HTS 可能なアッセイ系の構築に成功し、化合物ライブラリーから SUMO-SIM 阻害剤の探索を可能にした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Voet A[#], Ito A[#], Hirohama M, Yoshida M, Zhang KY., Discovery of small molecule inhibitors targeting the SUMOSIM interaction using a protein interface consensus approach, *Medchemcomm.*, (2013) in press [#]equally contributed 査読有

Kumar A[#], Ito A[#], Takemoto M, Yoshida M, Zhang KY., Identification of 1, 2, 5-Oxadiazoles as a New Class of SENP2 Inhibitors Using Structure Based Virtual Screening, *J. Chem. Inf. Model.*, 54, 870-80. (2013) doi: 10.1021/ci4007134. [#]equally contributed 査読有

Takemoto M, Kawamura Y, Hirohama M, Yamaguchi Y, Handa H, Saitoh H, Nakao Y, Kawada M, Khalid K, Koshino H, Kimura K, Ito A[#], Minoru Yoshida M., Inhibition of protein SUMOylation by davidiin, an ellagitannin from *Davidia involucrate*, *J. Antibiot.*, 67, 335-8. (2013) doi: 10.1038/ja.2013.142. [#]corresponding author 査読有

Hirohama M, Voet AR, Ozawa T, Saitoh H, Nakao Y, Zhang KY, Ito A[#], Yoshida M., Assay methods for SUMO-SIM interactions *in vivo* and *in vitro* using a split-luciferase complementation system. *Anal. Biochem.*, 448, 92-4. (2013) doi: 10.1016/j.ab.2013.12.009. [#]corresponding author 査読有

Hirohama M, Kumar A, Fukuda I, Matsuoka S, Igarashi Y, Saitoh H, Takagi M, Shin-Ya K, Honda K, Kondoh Y, Saito T, Nakao Y, Osada H, Zhang KY, Yoshida M, Ito A[#], Spectomycin B1 as a Novel SUMOylation Inhibitor That Directly Binds to SUMO E2. *ACS Chem. Biol.*, 8, 2635-42. (2013) doi: 10.1021/cb400630z. [#]corresponding author 査読有

Kumar A, Ito A, Hirohama M, Yoshida M, Zhang KY., Identification of quinazolinylloxy biaryl urea as a new class of SUMO activating enzyme 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 5145-9. (2013) doi: 10.1016/j.bmcl.2013.07.022. 査読有

Kumar A, Ito A, Hirohama M, Yoshida M, Zhang KY., Identification of sumoylation activating enzyme 1 inhibitors by structure-based virtual screening. J Chem Inf Model., 53, 809-20. (2013) doi: 10.1021/ci300618e. 査読有

[学会発表](計 13 件)

伊藤昭博、「タンパク質 SUMO 化を標的とした化合物の同定とその抗がん活性」新学術領域 天然物ケミカルバイオロジー地区ミニシンポジウム「化学と生物学の打開策 次世代天然物ケミカルバイオロジー研究の開拓へ」2014年3月1日、和光

伊藤昭博、「タンパク質 SUMO 化を標的とした阻害剤の探索-タンパク質 SUMO 化酵素阻害剤および SUMO-SIM 結合阻害剤について-」第 11 回 SUMO 研究会、2014年1月10日、和光

伊藤昭博、吉田稔、「タンパク質 SUMO 化を標的とした化合物の探索」第 86 回日本生化学会大会、2013年9月11日、横浜

伊藤昭博、掛谷秀昭、吉田稔、「脱 SUMO 化酵素 SENP1 阻害剤の探索」第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013年6月13日、京都

伊藤昭博、「SUMO 化・脱 SUMO 化阻害剤の現状」第 10 回 SUMO 化研究会、2012年11月22日、熊本

伊藤昭博、木村賢一、吉田稔、「SUMO E2 阻害剤としてのエラグ酸の発見とがん治療薬としての可能性」第 71 回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、札幌

Akihiro Ito, Mikako Hirohama, Yasuhiro Igarashi, Yasumitsu Kondoh, Tamio Saito, Hiroyuki Osada, Minoru Yoshida, “ Spectomycin B1 suppresses Estrogen Receptor -Dependent Breast Cancer Cell Growth by inhibiting a SUMO E2 Activity”, 2nd SNU-RIKEN Joint Symposium on Chemical Biology, Chuncheon, May 18, 2012, Chuncheon, South Korea

米山操、広浜美香子、木村賢一、半田宏、

伊藤昭博、吉田稔、「エラグ酸によるタンパク質 SUMO 化阻害」日本農芸化学会 2012 年度大会 2012年3月23日、京都

Akihiro Ito, Mikako Hirohama, Yasuhiro Igarashi, Yasumitsu Kondoh, Tamio Saito, Hiroyuki Osada, Minoru Yoshida, “ Discovery of spectomycin B1 as a SUMO E2 inhibitor and its potential for anti-breast cancer therapy”, Riken-Max Planck Joint Research Center kick off symposium, 2012年3月6日、Dortmund, Germany

Akihiro Ito, Mikako Hirohama, Yasuhiro

Igarashi, Yasumitsu Kondoh, Tamio Saito, hiroyuki Osada, Minoru Yoshida, “ Discovery of Spectomycin B1 as a SUMO E2 Inhibitor”, The 6th Korean-Japan Chemical Biology Symposium, 2012年1月27日、札幌

伊藤昭博、「SUMO E2 阻害剤の発見」第 2 回京都大学 GCOE-理化学研究所 共同シンポジウム」2011年11月11日、京都

伊藤昭博 「タンパク質 SUMO 化を標的とした小分子化合物の探索」第 9 回 SUMO 研究会 2011年9月30日、出雲

伊藤昭博、吉田稔 「Spectomycin B1 は SUMO E2 を標的とする新規 SUMO 化阻害剤である」日本がん分子標的治療学会 第 15 回学術集会 2011年6月23日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 昭博 (Ito, Akihiro)

独立行政法人理化学研究所・

吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：40391859

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

平井 剛 (Hirai, Go)

独立行政法人理化学研究所・

袖岡有機合成化学研究室・専任研究員

研究者番号：50359551