

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20661

研究課題名(和文) PTENを標的とする健康長寿薬の開発

研究課題名(英文) Anti-aging drugs by targeting PTEN

研究代表者

鈴木 聡 (Suzuki, Akira)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：10311565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：PTENと結合し不安定化する分子として、SUMO化E3酵素2種類(X, Y)と脱ユビキチン化酵素Zを見出した。X, Yを抑制するとPTENが増加し、リン酸化AKTが減少して、細胞増殖が低下した。一方Zを抑制するとPTENが核局在して、PTEN蛋白質が増加した。その他 X, Yのホモ欠損マウスを作製し、現在長寿性を検討中である。

一方、既知PTEN E3リガーゼの内PTEN不安定化効果の高いものはWWP2であったため、PTEN-WWP2結合可視化系を樹立し、既報低分子化合物をスクリーニングし、6つの化合物を得たが、PTEN増加は得られなかったため、現在未報の低分子化合物をスクリーニング中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長寿薬の開発は古来からの人類の夢であり、その開発が待たれる。近年PTENを軽度増加せると寿命が延長することが示された。一方PTENは代表的な癌抑制ドライバー分子であるために、その制御機構の解明は癌治療につながる。本研究によって癌の発症抑制をも兼ねそなえた、PTENタンパク質安定性亢進を標的とする長寿薬の開発によって、健康寿命の延長と国民福祉の向上を狙うことが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Two E3 SUMOylating enzymes (X, Y) and the deubiquitinating enzyme Z were identified as PTEN binding and destabilising molecules. Knockdown of X and Y increased PTEN, decreased phosphorylated AKT and reduced cell proliferation, whereas knockdown of Z resulted in nuclear localisation of PTEN and increased PTEN protein. X and Y homozygous deletion mice have been generated and their longevity is currently being investigated. On the other hand, we found that WWP2, one of the 5 PTEN E3 ligases, has the highest PTEN destabilising effect, so a PTEN-WWP2 binding visualisation system was established and chemical compounds were screened. Six compounds were positive, but no PTEN increase was obtained. We are currently screening for unpublished small molecules.

研究分野：生化学、実験動物学、腫瘍学

キーワード：PTEN 長寿薬 がん抑制遺伝子

増強し Akt 活性が減少する細胞群をセルソーターにて分離した。ライブラリーには各 sgRNA に対応したバーコード配列を有しているため、分離細胞群のバーコード配列を PCR で増幅後、次世代シーケンサーを用いてリード数が多いものを順にリストアップした。3 回繰り返したスクリーニングにおいて共通して出現するトップ 15 種類の遺伝子で、これまで報告されている PTEN の E3 リガーゼ(WWP2, XIAP) を除く 13 種類の遺伝子について再度別の sgRNA で PTEN 蛋白質の発現量を解析し、11 種類の遺伝子で変異後 PTEN 蛋白質の増加を確認した(図 1 参照)。次にこれら 11 遺伝子のうち、PTEN と直接結合するものとして 2 種類の SUMO E3

新規不安定化因子の探索

sgRNAライブラリによる全ゲノムスクリーニング

- 1) EGFP-PTENの発現量増加
- 2) 内在性PTENの増加

13遺伝子

SUMO化	8 遺伝子
Lysメチル化	3 遺伝子
ユビキチン化	1 遺伝子
その他	1 遺伝子

- 3) PTENとの結合の検証

SUMO E3リガーゼ (X, Y)

脱ユビキチン化酵素(Z)

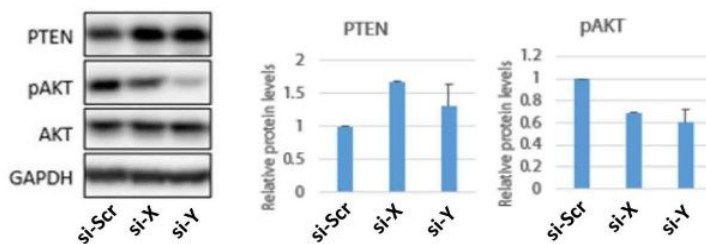
リガーゼ (X, Y) と 1 種類の脱ユビキチン化酵素(Z)とを得た(図 2)。

(2) 新規 PTEN 不安定化因子の作用

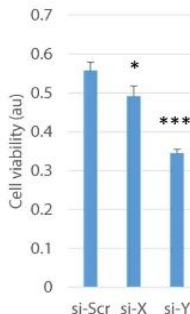
(a)SUMO E3 リガーゼである X,Y の発現抑制は PTEN 蛋白質を有意に増加させ、活性化 AKT の抑制をみることを確認し、X,Y とともに、細胞増殖の抑制を示した。また X と Y がそれぞれ PTEN と結合することも確認した(図 3)。

(b)脱ユビキチン化酵素 Z の発現抑制は PTEN の核移行を増強させ、PTEN 蛋白質を有意に増加させた。また Z の発現抑制は PTEN 増加依存性に細胞増殖を抑制した。また Z と PTEN が結合することも確認した(図 4)。

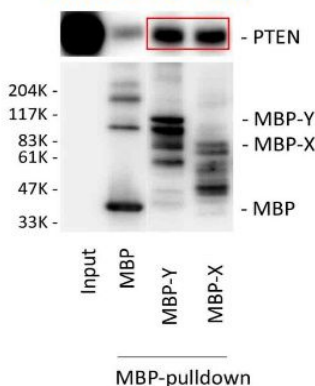
X, Y 阻害によるPTENタンパク質の増加、リン酸化AKTの減少



X, Y 阻害による細胞増殖の低下



PTENとY, Xとの結合

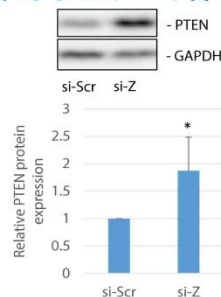


このように PTEN と結合して、その抑制によって PTEN を増加させる、PTEN 不安定化分子 X,Y, Z の 3 分子を新規に見出した。

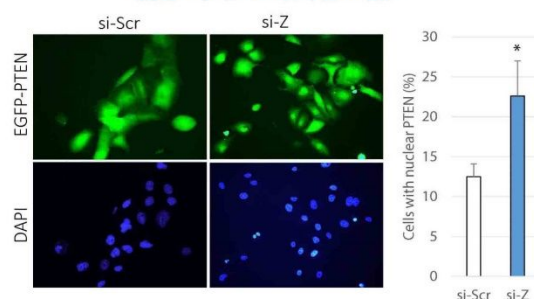
現在これら SUMO E3 リガーゼや脱ユビキチン化酵素が如何にして PTEN を不安定化するかの解析を検討している。

またこれらのうち X, Y の遺伝子欠損マウスの

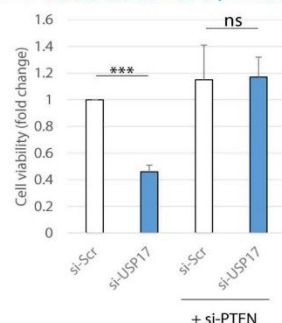
Z阻害によるPTENタンパク質の増加



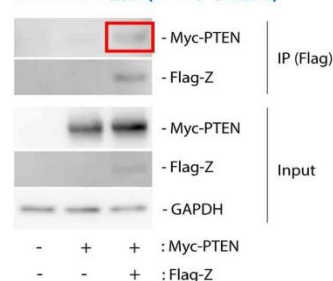
Z阻害によるPTEN核局在の増加



Z阻害による細胞増殖能の低下(PTEN依存性)



PTENとZの結合(co-IP、細胞内)

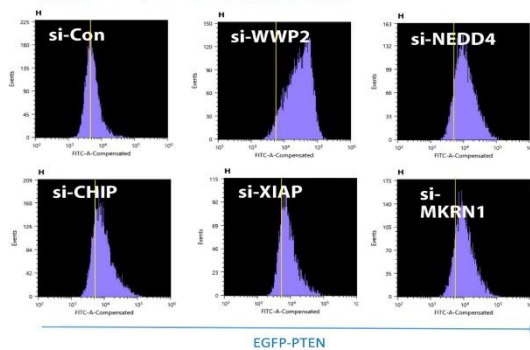


作製を完了した。現在生後半年が経過するが、特に異常を認めない。今後これらのマウスの長寿性を検討するとともに、このマウスにおける代謝変化を検討する。またこれら X,Y,Z を標的とする低分子化合物をスクリーニングして、PTEN 増加長寿薬を単離する。

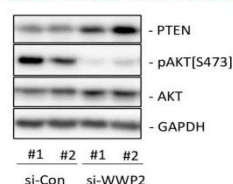
(3) 既知 PTEN 不安定化分子を標的とする PTEN 増加長寿薬の開発

PTEN 蛋白質崩壊に関わるユビキチンリガーゼには 5 種類(NEDD4-1, WWP2, CHIP, XIAP, MKRN1)が知られているが、これらの発現抑制時、最も外来性 PTEN 量を増加したものは WWP2 であった。また WWP2 の発現抑制に、内因性 PTEN の増加と活性化 AKT の抑制をみることを確認した(図 5)。次に PTEN と WWP の結合を可視化する系を Alpha Screen 法で樹立し、既報の化合物

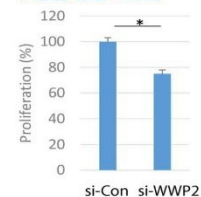
E3リガーゼのノックダウンによる
外来性PTEN (EGFP-PTEN) 発現量の変化



WWP2ノックダウンによる内
因性PTEN増加とAKT不活性化

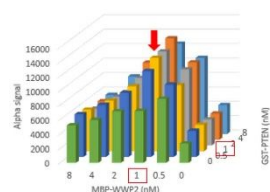


WWP2ノックダウンによる細胞増殖の抑制



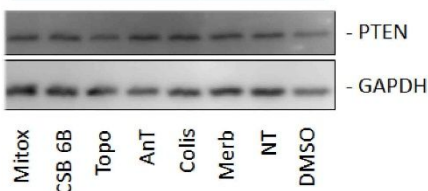
PTEN-WWP2結合検出系の開発

Alpha screen



Pilot screening hit compounds

Compound	Inhibition (%)
Mitoxantrone	107.4
Chicago Sky Blue 6B	106.2
Merbromin	101.7
Colistin	94.4
Topotecan	91.7
Anethole-trithione	90.6



1,800種類を1次スクリーニングし、6種類の化合物がヒットしたが、2次スクリーニングではいずれもPTENの増加が得られなかった(図6)。現在は、スクリーニング系をrefineして感度を高め、未報の30,000種類の低分子化合物の1次スクリーニングが進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morioka S, Nakanishi H, Yamamoto T, Hasegawa J, Tokuda E, Hikita T, Sakihara T, Kugii Y, Oneyama C, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 A mass spectrometric method for in-depth profiling of phosphoinositide regioisomers and their disease-associated regulation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27648-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatani K, Maehama T, Nishio N, Otani J, Yamaguchi K, Fukumoto M, Hikasa H, Hagiwara S, Nishina H, Mak TW, Honma T, Kondoh Y, Osada H, Yoshida M, Suzuki A	4. 巻 112(10)
2. 論文標題 Alantolactone is a natural product that potently inhibits YAP1/TAZ via promotion of ROS accumulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4303-4316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白石祐介, 前濱朝彦, 西尾美希, 藤沢正人, 鈴木聡
2. 発表標題 A carbazole compound affects Hippo signaling pathway and represses bladder cancer cell proliferation
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 池末信太郎, 前濱朝彦, 西尾美希, 大谷淳二, 鈴木聡
2. 発表標題 PTENの安定性を制御する新たな因子の同定
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木 聡、西尾美希、藤 庸子、大森博文、田代浩徳、前濱朝彦
2. 発表標題 がん抑制遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第19回日本産婦人科がん分子標的研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junji Otani, Keisuke Nakatani, Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Akira Suzuki
2. 発表標題 A natural product Alantolactone is a potent YAP1/TAZ inhibitor via ROS production
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前濱朝彦、池末信太郎、西尾美希、大谷淳二、鈴木聡
2. 発表標題 がん抑制因子PTENの制御に関わる新たな因子の同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	前濱 朝彦 (Maehama Tomohiko)	神戸大学・医学研究科・准教授	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西尾 美希 (Nishio Miki)	神戸大学・医学研究科・講師	
研究協力者	池末 信太郎 (Ikesue Shintaro)	神戸大学・医学研究科・学生	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関