

氏名	福田 勲
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 719 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	タンパク質の SUMO 化を制御する化合物の探索とその化学生物学的研究
論文審査委員	委員長 連携教授 吉田 稔 委員 教授 井上 金治 委員 連携教授 今本 尚子 委員 連携教授 長田 裕之

論文の内容の要旨

序論

翻訳後修飾はタンパク質の機能を制御する重要な調節機構であることが知られている。従って、タンパク質の翻訳後修飾を調節する化合物は、タンパク質の機能を制御できると考えられる。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、多くの制御因子を修飾することで多彩な生命現象に関与することが知られており、さらに癌や神経変性疾患にも密接に関与している可能性が示唆されている。タンパク質の SUMO 化を制御する化合物は、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りうる可能性があるが、現在そのような化合物は存在しない。そこで本研究は、SUMO 化阻害剤スクリーニング系を開発し、SUMO 化阻害剤の単離・同定を第一の目的とした。さらに、得られた SUMO 化阻害剤の作用機構を解明することを第二の研究目的とした。

結果

1. スクリーニング系の開発

従来、タンパク質の SUMO 化を検出する方法としてはウエスタンブロット法が主であったが、この方法は薬剤のスクリーニングという観点からは適していない。そこで、*in situ* SUMO 化アッセイ系を利用したスクリーニング系の開発を試みた。ジギトニンで細胞膜を半透過性にした後、リコンビナント SUMO 活性化酵素 (E1)、SUMO 結合酵素 (E2)、GFP-SUMO を添加し、ATP 存在下で反応させると、核膜周辺に GFP-SUMO が蓄積する。この GFP-SUMO の蓄積は SUMO 化依存的であり、タンパク質の SUMO 化を GFP の蛍光シグナルとして観察可能である。この方法を利用して、GFP の蛍光シグナルの強弱を指標とすることにより、簡便で迅速な SUMO 化阻害剤のスクリーニングが可能になった。本スクリーニング系を用いて、植物抽出物ライブラリー、微生物抽出物ライブラリー、化合物ライブラリーなどから、SUMO 化阻害剤の探索を行った。

2. ギンコール酸の SUMO 化阻害機構に関する研究

イチョウ葉抽出物中に SUMO 化阻害活性を見出し、その主要な活性成分としてギンコール酸を同定した。ギンコール酸および、その構造類縁体であるアナカルジン酸は、*in vitro* および *in vivo* SUMO 化を阻害した。一方、ユビキチン化反応には影響しなかった。ギンコール酸はアルキルフェノール誘導体で、サリチル酸に長鎖炭化水素が付加された構造をしている。ギンコール酸の構造活性相関を検討したところ、長鎖炭化水素とカルボキシル基が SUMO 化阻害に必要であることを見出した。蛍光ラベルしたギンコール酸を用いた結合実験により、ギンコール酸は E1 と結合することを明らかにした。さらに競合実験を行い、ギンコール酸と E1 の結合に、阻害活性に必要な長鎖炭化水素とカルボキシル基が重要であることを見出した。また、ギンコール酸が E1 酵素活性に影響を及ぼしているかどうか検討したところ、ギンコール酸は E1-SUMO 中間体形成を阻害することが明らかになった。以上の結果から、ギンコール酸はカルボキシル基を介して SUMO 活性化酵素である E1 と直接結合し、E1 酵素活性を抑制することにより SUMO 化反応を阻害することが示唆された。

3. その他の候補化合物による SUMO 化阻害

放線菌由来の抽出物中に SUMO 化阻害活性を見出し、各種クロマトグラフィーなどを用いて、活性物質を精製した。高分解能質量分析、各種二次元 NMR 解析、旋光度測定などにより活性物質の構造を決定し、抗グラム陽性菌活性を有するケリアマイシン B であると同定した。加えて、化合物ライブラリーから抗グラム陽性菌活性を有するスペクトマイシン B および、cdc25B チロシンフォスファターゼ阻害剤として知られているノカルディオニン A とその類縁体に SUMO 化阻害活性を見出した。これらの化合物は *in vitro* SUMO 化を阻害したが、*in vitro* ユビキチン化反応には影響しなかった。

まとめと考察

本研究において、スループット性の高いスクリーニングシステムを開発し、複数の SUMO 化阻害剤を同定することに世界に先駆けて成功した。さらに、ギンコール酸においては、その阻害機構の一端を明らかにした。

ギンコール酸は神経毒性活性を持つこと、さらにアナカルジン酸は、ヒストンアセチル化酵素阻害活性などの多くの生理活性を有していることが報告されている。これらの活性が SUMO 化阻害活性に起因しているかどうかは今のところ不明であり、今後明らかにする必要があるであろう。また、異常な SUMO 化制御は癌などの疾患に関わっていることから、SUMO 化阻害剤はそれら疾患の治療薬になりうる可能性がある。興味深いことに、今回 SUMO 化阻害剤として同定したケリアマイシン B は抗癌活性を示すことが報告されている。

本研究は低分子 SUMO 化阻害剤に関する世界で初めての研究である。今後、本研究成果を基にして、酵素-阻害剤相互作用を分子レベルで解明することによりさらなる SUMO 化阻害剤の開発、ひいては SUMO 化を標的とした治療薬の開発へ発展することが期待される。

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成21年2月18日(水)9:50～10:40に埼玉大学理学部3号館(2階)セミナー室で論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

ユビキチン様タンパク質である SUMO は、タンパク質のリシ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。加えて、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いる。したがって SUMO 化を制御する低分子化合物は、細胞内の SUMO 修飾の役割の解明に役立つだけでなく、疾患の治療薬となる可能性を秘めているが、現在までにそのような化合物は発見、報告されていなかった。本研究は、*in situ* SUMO 化アッセイ法を応用したスクリーニングシステムを用いることにより世界で初めて低分子 SUMO 化阻害剤を発見し、さらにその作用メカニズムを解明したものである。学位論文は以下の項目からなっている。

1. スクリーニング系の開発

本研究ではまず、SUMO 化阻害剤スクリーニング系の開発について述べている。タンパク質の SUMO 化はウェスタンブロット法により検出するのが主流であるが、ウェスタンブロット法は大量のサンプルのスクリーニングには適していない。そこで、*in situ* SUMO 化アッセイ法を応用したスクリーニング系の開発を試みた。ジギトニンで細胞膜を半透過性にした後、大腸菌で生産した SUMO 活性化酵素 (E1)、SUMO 結合酵素 (E2)、GFP-SUMO を添加し ATP 存在下で反応させると、核膜周辺に GFP-SUMO が蓄積する。この GFP-SUMO の蓄積は SUMO 化依存的であり、タンパク質の SUMO 化を GFP の蛍光シグナルとして観察可能である。この方法を利用して、GFP の蛍光シグナルの強弱を指標とすることにより、簡便で迅速な SUMO 化阻害剤のスクリーニングが可能になった。本スクリーニング系を用いて、植物抽出物ライブラリー、微生物抽出物ライブラリー、化合物ライブラリーなどから、SUMO 化阻害剤の探索を行った。

2. ギンコール酸の SUMO 化阻害機構に関する研究

イチョウ葉抽出物中に SUMO 化阻害活性を見出し、その主要な活性成分としてギンコール酸が同定された。ギンコール酸は *in vitro* 及び *in vivo* で SUMO 化阻害活性を示す一方、ユビキチン化反応には影響しなかった。ギンコール酸の構造活性相関を検討したところ、長鎖炭化水素とカルボキシル基が SUMO 化阻害に必要であることを見出した。蛍光ラベルしたギンコール酸を用いた結合実験により、ギンコール酸は E1 と結合することが明らかになった。さらに、ギンコール酸は E1-SUMO 中間体形成を阻害したことから、ギンコール酸は E1 と直接結合し SUMO-E1 中間体形成を抑制することにより、SUMO 化反応を阻害することが示唆された。ギンコール酸は神経毒性活性を持つこと、さらにアナカルジン酸は、ヒストンアセチル化酵素阻害活性などの多くの生理活性を有していることが報告されている。これらの活性が SUMO 化阻害活性に起因しているかどうかは今のところ不明であるが、少なくとも各種誘導体の細胞増殖阻害は、SUMO 化阻害活性に依存していることが明らかになり、SUMO 化が細胞増殖に必要である可能性が示唆された。

3. その他の候補化合物による SUMO 化阻物

放線菌由来の抽出物中に SUMO 化阻害活性が見いだされ、各種クロマトグラフィーなどを用いて、活性物質が精製された。高分解能質量分析、各種二次元 NMR 解析、旋光度測定などによる活性物質の構造解析の結果、SUMO 化阻害活性物質は抗グラム陽性菌活性および抗癌活性を有するケリアマイシン B であると

同定された。ケリアマイシン B は *in vitro* および *in vivo* で SUMO 化阻害活性を示す一方、*in vitro* のユビキチン化反応には影響しなかった。さらに、ケリアマイシン B は E1-SUMO 中間体形成を阻害することが示された。以上の結果から、ケリアマイシン B は E1 酵素活性を阻害することで SUMO 化を阻害している可能性が示唆された。

化合物ライブラリーから、cdc25B チロシンフォスファターゼ阻害剤として知られているノカルディオニン A とその類縁体に SUMO 化阻害活性が見出された。これらの化合物の SUMO 化阻害の IC₅₀ は約 0.1~1.5 μ M で、現在までに単離した SUMO 化阻害剤の中で最も強い阻害活性を示した。これらの化合物は、共通の構造としてオルトキノンを有していることから、キノンにより産生される活性酸素種 (ROS) が阻害機構に関与することが考えられた。実際、これらの化合物は E1 酵素のシステイン残基を酸化してジスルフィド結合を誘起、オリゴマー化することで SUMO 化反応を阻害していることが示唆された。さらに、化合物ライブラリーの中から E1-SUMO 中間体形成を阻害せず、E2 酵素を標的とする新しい SUMO 化阻害剤の候補化合物も得られている。

以上、本論文はスループット性の高いスクリーニングシステムを開発し、構造と作用機序の異なる複数の SUMO 化阻害剤を見出すことに成功したものである。SUMO 化制御は癌などの疾患に関わっていることから、SUMO 化阻害剤はそれら疾患の治療薬となる可能性があり、今後、この成果を基にして、酵素-阻害剤相互作用を分子レベルで解明することによりさらなる SUMO 化阻害剤の開発、ひいては SUMO 化を標的とした治療薬の開発へ発展することが期待される。本研究の結果は査読制のある 2 編の国際誌 (筆頭著者) に掲載 (決定) となった。よって本審査委員一同は、本論文が博士 (理学) の学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と認めた。