

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 薬 学 ）	氏名	宮城 徹
学位授与の要件	学位規則第4条第1・②項該当		
論 文 題 目			
DNA 結合タンパク質を標的とした抗がん剤の新規スクリーニング法の開発			
論文審査担当者			
主 査	教授 樋木 修		
審査委員	教授 小池 透		
審査委員	教授 嶋本 顕		
〔論文審査の要旨〕			
<p>DNA 結合タンパク質には転写因子などが含まれ、細胞の性質の決定に中心的な役割を果たすタンパク質である。転写因子の重要性は、例として iPS 細胞におけるリプログラミング因子である山中ファクターの4つすべてが転写因子であることから明らかである。多くのがんでは転写因子の発現亢進が報告されており、がんの発生・進展には多くの転写因子が関わっていると考えられている。抗がん剤開発では、がんのシグナル伝達における転写因子及びその活性化経路が標的として開発されており、<i>in vitro</i> あるいは動物モデルにおいてがん細胞の死滅あるいは増殖抑制効果を示す化合物が多数報告されている。がん細胞で発現亢進している転写因子を標的とする抗がん剤開発の戦略としては、転写因子に結合して直接的に阻害するものと、間接的に転写因子の上流シグナル経路を阻害するものがある。前者は、標的分子そのものを阻害するのであるから、より選択的な効果が期待されるが、核内受容体を除き、一般的には転写因子のように低分子リガンドの結合部位を持たないタンパク質を標的とした特異的阻害剤の開発は、スクリーニング系のスループットなどの問題から難しいと考えられてきた。</p> <p>本研究は、これまでの課題であった DNA とタンパク質の相互作用を簡便かつ定量的にアッセイできる方法の開発を目指している。がん細胞の発生・進展に重要な役割を果たす転写因子の代表である NF-<math>\kappa</math>B や AP-1 は、古くからその結合配列や結合様式について研究されていること、また、NF-<math>\kappa</math>B はがんや炎症の治療標的として注目されていることから、結合配列などのこれまでの基礎的知見をベースに新規アッセイ方法を開発することとした。近年、AP-1 を標的とした T-5224 や、NF-<math>\kappa</math>B を標的とした (-) -DHMEQ (Umezawa K., Biomed Pharmacother. 2011) のように、転写因子に対する特異的な阻害剤が見出されており、これらの阻害剤を用いたアッセイの評価にも適している。NF-<math>\kappa</math>B は、多くのがんで異常発現が認められる転写因子であり、がん細胞のアポトーシスを防ぐ働きをしていると考えられている (Rayet et al. Oncogene 1999, Dejardin E. Biochem Pharmacol. 2006)。このことから抗がん剤の分子標的として注目されており、精力的に研究されている (Gilmore and Herscovitch, Oncogene. 2006) が、未だ NF-<math>\kappa</math>B 特異的な阻害剤で抗がん剤として臨床応用されたものはない。</p> <p>DNA とタンパク質の結合を検出する方法として最も一般的なものは、EMSA (ゲルシフト) などの方法があるが、手間がかかるためにスループットが低く、大規模な化合物ライブラリーをスクリーニングする方法としては適していない。そこで我々はこれらの問題を解決する方法として、DNA 鎖交換反応 (DNA Strand Exchange; DSE) と蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) を組み合わせた方法 (DSE-FRET 法) を用いて、全く新しい原理に基づいた DNA-タンパク質結合阻害剤スクリーニング法の開発に着手した。</p> <p>まず基本技術の一つとして、一定条件下において自然に生じる DNA 二本鎖間での DSE が、タンパク質の結合によって抑制される現象を利用することとした。</p>			

DSE は、異なる二つの二本鎖 DNA 間で DNA 鎖の交換が行われる現象で、染色体の相同組換えにおいてみられる。Thompson らは *in vitro* において DSE が自発にかつ速やかに生じることを報告している。この *in vitro* での DSE は、ヒストン八量体や転写因子 p53、テロメア結合タンパク質 TRF1 および TRF2 などの DNA 結合タンパク質の結合によって停止することが報告されている。これらのタンパク質による DSE 停止現象は、タンパク質の *in vivo* での活性に起因するそれぞれ固有の作用であると考えられていたが、本研究では DSE が DNA 鎖間のミスマッチでも停止するという報告に注目し、一般的な転写因子の結合によっても DSE が停止するとの仮説を立てた。鎖交換の進行度の検出には FRET 現象を利用した。FRET は、蛍光物質（供与体）を励起した際に、近隣の物質（受容体）にエネルギーが転移する現象である。転移したエネルギーは、受容体が蛍光物質ならば蛍光（励起した蛍光物質の蛍光よりも長波長となる）となり、蛍光物質でなければ熱となり消光される。したがって、特異的な抗体を用いた検出方法と異なり、FRET を利用することで洗浄が不要となるため DSE-FRET は大規模スクリーニングに対応できる。

DSE-FRET が思惑通り機能することを確認するため、転写因子 NF- $\kappa$ B (p50)を用いて検討を行った。NF- $\kappa$ B は Rel ファミリーに属する転写因子で、NF- $\kappa$ B 結合配列 GGGACTTTC に結合する。NF- $\kappa$ B のコンポーネントには、p50、p52、p65 (RelA)、RelB などがあり、主にヘテロダイマーを形成して DNA に結合するが、ホモダイマーでも結合することができる。本実験では組換えヒト p50 ホモダイマー（分子量 94kDa）を用いた。NF- $\kappa$ B 結合配列を有するプローブを用いた DSE-FRET アッセイ系に p50 を添加したところ、p50 の量に依存した蛍光値低下を確認できた。S/B と Z'-factor はそれぞれ 2.2 と 0.93 であり、明確で安定した系であることが示された。また、NF- $\kappa$ B 結合部位に変異を導入したプローブでは p50 による蛍光値の低下は認められなかった。さらに、コンペティター DNA の添加により p50 による蛍光値の低下が認められず、さらにコンペティター DNA の NF- $\kappa$ B 結合部位への変異導入数に依存して、p50 による蛍光値の低下の回復が認められた。以上の結果から、本法が DNA 配列特異的な p50 の結合を検出していることが示された。また、NF- $\kappa$ B 阻害剤である Evans Blue および (-)-DHMEQ を用いて、p50 および p52 に対する IC<sub>50</sub> を算出した。Evans Blue は、p50 に対する IC<sub>50</sub> が 12.9  $\mu$ M で、p52 では 12.8  $\mu$ M であった。(-)-DHMEQ は、p50 に対して 8.8  $\mu$ M、p52 に対して 62.5  $\mu$ M であった。(-)-DHMEQ は p50 に選択的に結合することが報告されており、本法でも同様の傾向を確認することができた。プローブ配列および反応条件を変更することで、転写因子 AP-1 および Sp1 でも配列特異的な DNA 結合を検出することができ、DSE 停止が一般的な転写因子でも見られる現象であるという仮説が実証され、本法が汎用的なものであることが示された。

本研究で得られた知見は、DNA とタンパク質の結合機構の理解に重要であるだけでなく、DNA 結合タンパク質を標的とした治療薬開発に大きく貢献することが期待できるものである。よって、審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士（薬学）の学位を授与するのに十分な価値あるものと認めた。