

# 論文内容要旨

## DSE-FRET assay を用いた DNA 結合タンパク質の阻害剤探索

主指導教員：田原 栄俊教授  
(医系科学研究科 細胞分子生物学)

副指導教員：高野 幹久教授  
(医系科学研究科 医療薬剤学)

副指導教員：紙谷 浩之教授  
(医系科学研究科 核酸分析化学)

城間 喜智

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【序論】

DNA 結合タンパク質は細胞の性質決定に重要なタンパク質である。特に転写因子 NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B)はがん細胞の組織浸潤・転移や血管新生、増殖の促進、薬剤耐性獲得などに関与しており、抗がん剤の分子標的として注目されている。また、転写因子以外にも治療標的となる DNA 結合タンパク質がある。染色体末端であるテロメアに結合するタンパク質 TRF2 (telomeric repeat binding factor 2)は肺、肝臓、胃、子宮頸部のがん細胞で発現が上昇しており、TRF2 の過剰発現は発がん性を亢進させ、がんの悪性化に寄与している。これらのことから、我々は NF- $\kappa$ B および TRF2 の阻害剤を探索した。従来の DNA とタンパク質の結合を評価する方法はスループット性が低い、または操作が煩雑な実験系であったが、我々は迅速かつ簡便に多くのサンプルを評価出来る DSE-FRET (DNA strand exchange fluorescence resonance energy transfer) assay を開発している。

## 【研究目的】

本研究では、DSE-FRET assay を用いて、NF- $\kappa$ B および TRF2 の阻害剤を同定し、それら化合物の機能解析を行うことを目的とした。

## 【成果】

### 1. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B のサブユニットは RelA, RelB, cRel, p50, p52 が存在する。その中でも RelA は膵癌の薬剤耐性に関わっているという報告と、膵癌細胞株 PK8 の TNF- $\alpha$  感受性が RelA に依存するという我々の先行研究を基に、RelA の阻害剤を探索することとした。理化学研究所の所有する 32,914 化合物と、in silico により RelA と結合する可能性が高い top50 の内、入手可能であった 41 化合物について DSE-FRET を行った。その結果、A55 (2-(3-carbamoyl-6-hydroxy-4-methyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl) acetic acid)を RelA 阻害剤として同定した。次に A55 の阻害効果が RelA 以外の NF- $\kappa$ B タンパク質に対しても効果を示すか調べた。その結果、RelA の IC50 値は 9.31  $\mu$ M となったが、その他の NF- $\kappa$ B サブユニットの IC50 値は 100  $\mu$ M 以上であった。以上のことから、A55 は RelA 選択的に阻害していることが示された。次に、A55 と RelA がどのように結合しているか調べるため、ドッキング予測を行った。A55 のピリジン環の 2 位のカルボニル基が RelA の Arg41 側鎖と 2 つの水素結合を形成し、Arg41 の主鎖カルボニルは、カルバモイル窒素との水素結合を形成し、A55 のピリジン環のヒドロキシおよびアセテート置換基と RelA の Gln119 側鎖の間の水素結合は、A55 と RelA の結合をさらに安定化させていると予測された。

### 2. TRF2

TRF2 阻害剤を探索するため、産業技術総合研究所の 12,212 化合物を DSE-FRET にて評価した。その結果、#10 を TRF2 阻害剤として同定した。この化合物を基に、合成がより簡易で阻

害効果の高い化合物を見つけるために合成展開を行った。合成した 103 種の中から最も阻害効果の高い化合物として#198 を同定した。次に、#198 の子宮頸がん細胞株 HeLa1.2.11 に対する増殖抑制効果を調べるため、増殖曲線とコロニーフォーメーションアッセイを行った。その結果、増殖とコロニー形成の両方とも#198 濃度依存的に抑制されることが示された。さらに、HeLa1.2.11 細胞に化合物 20  $\mu$ M を 48 hr 処理し、FISH 法にてテロメアと DNA ダメージマーカーの 53BP1 を調べた。その結果、DMSO を処理したコントロールと比べてテロメアに集積する 53BP1 が多かった。また、ウェスタンブロット解析により細胞死マーカーである cleaved caspase3 や cleaved PARP の発現が上昇した。以上のことから#198 は、HeLa1.2.11 細胞に対してテロメアを損傷し、細胞死を誘導していることが示唆された。

#### 【総括】

NF- $\kappa$ B 阻害剤 A55 は他の NF- $\kappa$ B 阻害剤とは異なり、RelA 選択的な阻害効果を示した。また、TRF2 阻害剤も今までに報告がなく、TRF2 阻害剤として同定した#198 は、がん細胞のテロメアに損傷を与え、細胞死を誘導した。以上のように DSE-FRET は様々な DNA 結合タンパク質の阻害剤探索に非常に有用であり、今後も新しい阻害剤探索に活用可能であることを示した。今回同定した二種の新規阻害剤は詳細な解析は必要ではあるが、リード化合物として、それぞれの研究用ツールやがん治療にも活用される可能性がある。