

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)	氏名	城間 喜智
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論文題目			
DSE-FRET assay を用いた DNA 結合タンパク質の阻害剤探索			
論文審査担当者			
主査	教授 古武 弥一郎	印	
審査委員	教授 熊本 卓哉		
審査委員	准教授 河合 秀彦		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>転写因子 NF-κB (nuclear factor κB)や、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、がんの悪性化に関与していることが多数報告されている。本研究は、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 を用いて NF-κB および TRF2 の阻害剤の探索を目的とした。</p> <p>NF-κB のサブユニットは RelA, RelB, cRel, p50, p52 などがあるが、RelA は膀胱の薬剤耐性に関与していることに加えて、膀胱癌細胞株 PK8 の TNF-α 感受性が RelA に依存するというエビデンスがあることから、RelA の阻害剤にフォーカスしたスクリーニングを実施した。スクリーニングは、ナミキ商事の化合物データベースを用いた in silico 解析により RelA と結合する可能性が高い上位 41 化合物について、DSE-FRET assay を実施した。さらに、理化学研究所の所有する 32,914 化合物についても DSE-FRET assay を行った。その結果、化合物 A55 を RelA 阻害剤として同定した。A55 の RelA に対する IC₅₀ 値は 9.31 μM を示したが、その他の NF-κB サブユニットの IC₅₀ 値は 100 μM 以上であった。さらに核抽出物を用いた EMSA においても A55 は RelA 選択的に阻害していることが示された。また、A55 は RelA の Arg41 および Gln119 と水素結合することで RelA の DNA 結合能を阻害していることが予測された。</p> <p>TRF2 阻害剤に関しては、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、さら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、子宮頸がん細胞株 HeLa1.2.11 に対する増殖抑制効果を調べた結果、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 FISH 法にてテロメアと DNA ダメージマーカーの 53BP1 foci を調べた結果、DMSO を処理したコントロールと比べて#198 を処理した細胞はテロメアに集積する 53BP1 foci 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。</p> <p>以上の研究成果から、本論文は DSE-FRET assay を用いることによって、新規の NF-κB 阻害剤と TRF2 阻害剤を同定し、それぞれの機能を評価した研究であり、これら二つの阻害剤が新たな創薬シーズとなる可能性を示した研究成果である。</p> <p>よって審査委員会委員全員は、本論文が城間喜智に博士(薬学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。</p>			