

氏名	河合 香代子
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 712 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	細胞内ストレス応答に関与する情報伝達分子機構の解明と制御に関する研究
論文審査委員	委員長 連携教授 長田 裕之 委員 教授 松本 幸次 委員 連携教授 吉田 稔 委員 准教授 原 弘志

## 論文の内容の要旨

p38 MAP kinase は、種々の細胞外ストレスやサイトカインなどに応答して、増殖・分化やアポトーシス、免疫応答などの様々な細胞機能を制御している重要なシグナル伝達分子である。しかしその多様な機能の詳細な制御メカニズムは明らかにされていない。そこで、その生理機能の解明と制御に関する研究として、p38 と結合蛋白質との相互作用の解析と p38 シグナル伝達経路調節薬剤の探索を行った。

これまでに *in vitro* の p38 結合蛋白質探索系で p38 との結合が示され、p38 の活性を制御する可能性が示唆されている蛋白質 p62/sequestosome1 が、p38 MAP kinase シグナル伝達系に及ぼす影響を解析した。p62 は既に複数の蛋白質との結合が示され、シグナル伝達系におけるスカフォールド蛋白質であると考えられている。初めに、p62 の欠損変異体を作製し、免疫沈降法を用いて p38 との結合領域を検討した。その結果、C 末端側、N 末端側に少なくともあわせて二箇所、結合に重要な領域が存在することを明らかにした。さらに、詳細な結合様式を検討するために、多検体同時検出型 SPR を用いて、基板上に固定した p62 ペプチドと、精製した GST-human p38 との結合を解析した。その結果、N 末端側の領域が p38 と直接結合する可能性が示された。C 末端側の領域に関しては、結合に適した立体構造維持に重要であると推察している。

また p38 シグナル伝達系における p62 の機能を明らかとすることを目的とし、siRNA による p62 のノックダウン (KD) 実験を行った。p38 を活性化させる様々な刺激で処理し、p38 のリン酸化を p62 KD 細胞とコントロール細胞間で比較した。その結果、anisomycin、浸透圧刺激、UV 刺激では p62 の有無によって差異は観察されなかったが、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  など、p62 が構成因子である特異的レセプター複合体を介したサイトカイン刺激では、p62 KD 細胞における p38 のリン酸化は顕著に減弱していた。このことから、p62 がサイトカイン刺激特異的な p38 シグナル伝達を制御している可能性が示唆された。これまでに、サイトカイン刺激によって産生された特定の mRNA の安定性維持に p38 が関与していることが明らかとなっている。そこで、IL-1 $\beta$  刺激によって産生される IL-8 mRNA の安定性に対する p62 の機能を検討することとした。その結果、p62 KD 細胞におけるサイトカイン誘導性の IL-8 mRNA の安定性はコントロール細胞と比較して明らかに減少していた。これらのことから、p62 はサイトカイン刺激による p38 シグナル伝達系の特異的制御に、重要な役割を果たしているものと考えられる。

また、このような機能解析に有用な、p38 の機能を探るためのバイオプローブを得たいと考え、His-

human p38 (hp38) 発現大腸菌 BL21 を用いたスクリーニング系を構築し、p38 MAP kinase シグナル伝達経路調節薬剤を探索した。これまでに、薬剤誘導性 His-hp38 発現ベクターを形質転換した大腸菌は、増殖が著しく遅延することを見出していた。その原因が、薬剤誘導制御から『漏れて』発現してしまっている His-hp38 の活性にあるのではないかと考えた。そこでウエスタンブロッティングで His-hp38 が発現しており、リン酸化されていることを確認した。さらにこの遅延が、p38 活性阻害剤 SB202190 を処理することで解除されることから、この増殖速度の回復を p38 活性阻害の指標としたスクリーニング系を構築した。既存の各種阻害剤のセットを用いてこの系を評価したところ、この阻害剤セットに含まれる 4 種類の p38 阻害剤が増殖抑制を解除する一方で、他の蛋白質リン酸化酵素に対する阻害剤は増殖抑制を解除できなかった。このことから、このスクリーニング系が p38 調節薬剤の探索系として有効であることが示された。そこで理化学研究所 天然化合物バンク RIKEN NPDepo の化合物を用いスクリーニングを行い、6,907 化合物から 80 候補化合物を得た。これらの化合物に関して、in vitro kinase assay を行った所、20 化合物が p38 を直接阻害する可能性を示した。そしてこの 20 化合物から、HeLa 細胞において IL-1 $\beta$  による p38 の活性化を阻害しうる化合物を同定した。さらに化合物バンクより類似構造を有する化合物を検索し、p38 阻害活性を示す 2 化合物を同定した。これらの化合物は全て coumarin 誘導体であり、新たに合成を依頼し評価したところ、共通構造である 3-benzyl-7-hydroxy-4-methyl coumarin が p38 阻害活性を示す共通構造であることが明らかとなった。しかし、この構造を有していても p38 阻害活性を示さない化合物も存在することから、その周辺構造が活性の選択性および強さに関与するものと考えられ、さらなる構造活性相関の解析が必要である。

以上のことから、本研究では、p38 の複雑なシグナル伝達系制御機構の一端を解明し、さらなる解析に役立つバイオプローブのシードとなる化合物を発見することができた。この成果は今後の p38 シグナル伝達系の解析の礎となると期待される。

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査会は、平成 21 年 2 月 18 日(水)に埼玉大学理学部 3 号館にて公開の論文発表会を開催し、引き続き学位論文および発表内容について審議した。審査結果の概要は以下の通りである。

本論文は、動物細胞の情報伝達系に関与する MAP kinase である p38MAP kinase に関する研究である。p38 は様々な刺激によって活性化され、アポトーシスや細胞周期の制御、免疫応答や細胞の分化などの細胞応答に関与していることが明らかとされているが、この複雑な制御メカニズムの詳細は明らかにされていない。今回の学位論文で、河合氏はその刺激特異的な制御メカニズムの一端を、p38 とその結合蛋白質 p62 との関係から明らかとした。さらにそのような解析に有用なツールとなるバイオプローブとして、p38 情報伝達経路調節薬剤の必要性を感じ、新たな探索系を構築し、p38 活性阻害剤候補化合物と、それらに共通な p38 活性阻害に重要な共通構造を明らかとした。

学位論文は以下の項目からなっている。第一章では、序論として p38 をはじめとする MAP kinase の発見と、報告されているそれらの機能を論じ、MAP kinase 情報伝達系の細胞応答における重要性と、その複雑さが示され、その詳細な制御メカニズムを解明することの意義が説明された。

第二章では、刺激依存的な p38 情報伝達機構の解明のために、p38 結合蛋白質に注目し、p38 結合蛋白質 p62 と p38 との相互作用を解析した。まず、出芽酵母において明らかとされている例を示して、結合蛋白質が刺激特異的な情報伝達に重要であることを論じ、p38 の解析においても、結合蛋白質に注目した理由を示している。そして、p38 と結合する事が明らかとされていた p62 に注目し、まず p38 との結合領域を、免疫沈降法を用いて解析した。その得られた結果より、p62 の少なくとも 2 箇所の配列が p38 との結合に重要であることを明らかとした。さらに、SPR を用いた解析より、この 2 箇所のうち一方が p38 と直接結合する可能性が高いこと、もう一方は直接結合しない可能性が示唆された。この直接結合しない、という結果に関しては、その配列中に含まれる、3 残基連続したアスパラギン酸クラスターが特に重要であることを示し、さらに caspase 3 という別の蛋白質で、同じく 3 残基連続したアスパラギン酸クラスターが立体構造の制御に関与する機能ドメイン “safety catch” として報告されているという例を挙げ、p62 におけるこの領域の役割も、p38 との結合に適した立体構造の維持にあるのではないかと推測し報告している。

そして、次に p62 が p38 シグナル伝達系の中でどのような役割を担っているかを、細胞内の p62 を siRNA を用いてノックダウンすることで解析した。その結果、様々な p38 を活性化することが知られている刺激の中で、サイトカインである TNF  $\alpha$  と IL-1 $\beta$  で刺激した時に、p38 の活性化がコントロール細胞と比較して p62 ノックダウン細胞で減少することを示した。さらに、それが細胞応答にどのような影響を与えるかを検討するために、サイトカイン刺激に対する代表的な細胞応答として、下流のサイトカインの発現上昇に着目した。刺激に依存した急激な発現上昇を制御するメカニズムのひとつである mRNA の安定性の維持に p38 情報伝達系が関与していることを論じ、IL-1 $\beta$  で刺激した時に活性化される下流のサイトカイン IL-8 の mRNA の安定性を比較した。その結果、p62 ノックダウン細胞でその安定性が低下していることが示され、サイトカイン刺激特異的な細胞応答に関与する p38 シグナル伝達系の制御に、p62 が重要な役割を担っていることを明らかとした。

第三章では、p38 シグナル伝達系調節薬剤を得ることを目的として、大腸菌を用いた新たなスクリーニング系を構築し、理化学研究所化合物バンク NPDepo に収蔵された化合物ライブラリーより、p38 活性阻害剤

候補化合物を同定し、さらに活性阻害に重要な共通の構造を明らかとした。そもそも、His-p38 発現ベクターで形質転換した大腸菌の増殖速度が著しく遅くなるという現象に気づき、その原因が薬剤誘導制御から漏れて発現している His-p38 の活性にあることを示した。そして、この増殖速度の遅延と p38 活性阻害剤によるその回復が、薬剤の p38 阻害活性の指標としてスクリーニング系に生かせるのではないかと考え、新たなスクリーニング系を構築した。まず、標準阻害剤キットを使用し、このスクリーニング系が p38 の阻害剤の検出に有効であることを示した。そして、理化学研究所化合物バンク NPDepo に収蔵された化合物を用いたスクリーニングを実施し、3 種類の候補化合物を同定した。さらにこの 3 種類の候補化合物の共通構造に注目し、p38 活性阻害に重要な構造が 3-benzyl-7-hydroxy-4-methyl-coumarin であることを示した。

第四章では、全体の総括として、先ず、p62 における p38 結合領域を同定したことが述べられている。さらに、p38 シグナル伝達系における p62 の役割が、サイトカイン刺激特異的な情報伝達の制御であることを明らかとした。次に、日々の研究の中で疑問に感じた現象から、その原因を探索し、さらにそれを活用した新たなスクリーニング系の構築へと発展させた。その結果、新たな p38 阻害剤候補化合物を同定し、さらにそれらに共通する p38 阻害活性に重要な構造を明らかとしたことを考察した。

本論文の前半で述べられたことは、これまでに未解明であった複雑な p38 シグナル伝達系制御機構において重要な知見をもたらしたといえる。この内容は J Biochem 誌(筆頭著者)および Chemistry Asian Journal 誌(第二著者)に報告されている。論文後半の内容は、ユニークなスクリーニング系の構築であり、p38 活性阻害剤調節薬剤探索の有効性を証明した。本研究内容は Anal Biochem 誌(筆頭著者)に報告されている。

以上のことから、本審査委員会は河合氏の研究成果は、新規性に富んでおり学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格とした。