

氏 名	KHALID KHAN		
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 935 号		
学位授与年月日	平成 26 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	Chemical Biology of Splicing Inhibitors (スプライシング阻害剤に関する化学生物学的研究)		
論文審査委員	委員長	連携教授	吉田 稔
	委員	連携教授	眞貝 洋一
	委員	教授	小林 哲也
	委員	准教授	足立 明人

## 論文の内容の要旨

Splicing of primary transcripts (pre-mRNA) removes non-coding intronic sequences and joins exonic sequences to make a mature mRNA that can be transported from the nucleus into the cytoplasm and translated into protein. Thus, splicing is a key mechanism for regular gene expression and interference with splicing will affect gene expression. Recently, FR901464 and its methylated derivative spliceostatin A (SSA) were reported for the first time to inhibit pre-mRNA splicing by binding non-covalently to the SF3b sub-complex in the U2 snRNP. SSA is chemically more stable than its parent molecule FR901464, which was originally isolated from a *Pseudomonas* fermentation broth. During screening of microbial metabolites, FR901464 was found to activate viral promoters including those of the SV40 and the cytomegalovirus (CMV). Previous studies have shown that SSA leads to transcriptional repression of about 20% of expressed genes, while enhancing transcription of only a small subset. Among the most highly up-regulated genes was Interleukin-8 (IL-8). Since IL-8 and CMV promoters are activated by a similar set of transcription factors we used luciferase reporter constructs of each promoter for a comparative study.

IL-8 is a well-studied CXC family chemokine that activates, and recruits leukocytes to the site of inflammation. Interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) are well known inducers of IL-8. These inducers can enhance the transcriptional stimulatory activity of viral promoters (SV40 and CMV) as well and are also able to activate signaling kinases. Previous investigations suggested that IL-8 production is regulated by extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and transcription factor NF- $\kappa$ B in response to TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or PMA. To better understand the underlying mechanism we investigated both possible upstream signaling pathways as well as likely transcription factors responsible for IL-8 induction. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are important signaling kinases that activate a variety of transcription factors through phosphorylation. Here we report that SSA treatment induces ERK activation and that SSA treatment leads to enhance NF- $\kappa$ B activity.

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 26 年 2 月 4 日（火）10:00～11:00 に埼玉大学情報システム工学科棟 6 階セミナー室 3 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。

真核生物のセントラルドグマを構成する遺伝子発現機構の中心的プロセスである DNA 複製、転写、翻訳は、いずれも古くから抗生物質の標的としてもよく研究され、多くの阻害剤が開発されてきた。これらの一部は抗がん剤の開発につながり、化学療法の基礎としても重要な役割を果たしてきた。ところが、同様に真核生物における遺伝子発現機構に必須の反応であるスプライシングについては、これまで全く特異的阻害剤の存在が知られていなかった。本研究は、2007 年になって初めて同定されたスプライシング阻害剤である Spliceostatin A の作用機構、特に遺伝子発現活性化機構に関するものである。学位論文は序論の他、以下の項目からなっている。

### 1. Spliceostatin A によるサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター及び炎症性サイトカイン IL-8 プロモーターの活性化機構

Spliceostatin A (SSA) はウイルスプロモーターを活性化し、遺伝子発現に影響を与える抗がん物質として細菌の培養液から単離された天然生理活性物質 FR901464 の安定誘導体 (FR901464 メチルケタール誘導体) である。SSA の細胞内標的分子は、ビオチン化 SSA を用いた結合タンパク質の探索、各種生化学試験と RNA 干渉法によるノックダウン実験などにより、スプライシング因子 SF3b であることが明らかになっている (Kaida et al. Nat Chem Biol, 2007)。SF3b はスプライソソーム U2 snRNP の構成成分であり、イントロン中のブランチポイント配列を認識する重要な働きを持つ。そのため、SSA 処理により、U2 snRNP の機能が抑制され、スプライシングが阻害される。すなわち、SSA は世界初の特異的スプライシング阻害剤であった。さらにスプライシング阻害の結果として遺伝子発現全体への影響をトランスクリプトーム解析によって調べた結果、炎症性サイトカインである IL-8 をはじめ、全体の約 1 % の遺伝子において転写の活性化が見られた (Furumai et al. Cancer Sci, 2010)。そこでまず、SSA がこれらの遺伝子のプロモーター活性に与える影響を定量化するため、CMV プロモーターおよび IL-8 プロモーターにそれぞれルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを作成し、SSA の作用を解析した。その結果、SSA はそれぞれのプロモーター活性を容量依存的に増加させた。また、SSA と同様にスプライシングを阻害することが報告された別の天然生理活性物質である Pladienolide B (Plad B) もこれらのプロモーターを活性化した。一方、スプライシングを阻害しない不活性化型の SSA 誘導体であるアセチル化 SSA (Ac-SSA) は、プロモーター活性化作用が認められなかった。さらに SSA の標的である SF3b の構成タンパク質 SAP155、SAP145、SAP130 の siRNA によるノックダウンによってもプロモーターの活性化が見られたことから、SSA による CMV および IL-8 のプロモーター活性化作用は、スプライシング阻害の結果であることが明らかになった。

### 2. Spliceostatin A のプロモーター活性化における細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) の役割

細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) は様々な細胞外因子の受容体下流で機能する重要なシグナル伝達因子であり、増殖、分化や細胞死の抑制など多様な生理機能に関与する。すでに IL-8 などの炎症シグナルの下流やウイルス遺伝子の発現誘導においても機能することが知られていたため、SSA の作用と ERK との関係解析した。その結果、SSA 処理によって ERK のリン酸化が観察された。さらに構造の異なるスプ

ライシグ阻害剤 Plad B や SF3b のノックダウンでも ERK の活性化が見られた。一方、ERK をリン酸化する MEK の特異的阻害剤である PD98059 を処理した細胞では、SSA による ERK のリン酸化が阻害されるとともに CMV および IL-8 プロモーターの活性化も抑制された。以上の結果から、スプライシグ阻害の結果、ERK 経路が活性化されることによってウイルス遺伝子や IL-8 遺伝子のプロモーター活性の促進が起きることが示唆された。

### 3. Spliceostatin A による NF- $\kappa$ B 経路の活性化

次に ERK の下流でどのような転写因子が活性化され、CMV プロモーターの活性化につながるのかを解析するため、ルシフェラーゼレポータープラスミドを用い、そのプロモーター上流域の欠失変異を作成し、SSA 処理によるプロモーター活性化への影響を観察した。その結果、転写開始点上流 -98 pb の部位まで削り込むと、SSA による転写活性化が見られなくなることがわかった。この部位に存在する転写因子認識配列から関与する転写因子を絞り込み、それぞれの転写因子結合部位に変異を導入したレポータープラスミドを作成した。それらの転写活性化能を SSA の存在下で解析したところ、NF- $\kappa$ B 結合部位に変異を導入したプラスミドでは、SSA に対する応答性が消失することが判明した。同様の結果は、CMV プロモーターだけでなく、IL-8 プロモーターでも認められ、複数存在する NF- $\kappa$ B 結合部位の全てに変異を導入すると、SSA によるプロモーターの活性化が起きなくなった。そこで NF- $\kappa$ B の活性化機構をさらに詳細に解析したところ、SSA 存在下では NF- $\kappa$ B の阻害因子である I $\kappa$ B が時間とともに減少し、代わって活性サブユニットである p65 の核移行が観察された。また、NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤である Parthenolide を加えると、SSA によるプロモーター活性化も抑制された。さらに NF- $\kappa$ B の p65 サブユニットのノックダウンによっても SSA による転写活性化が有意に抑制された。以上の結果から、SSA によるプロモーター活性化機構に NF- $\kappa$ B 経路が関与することが示された。

### 4. Spliceostatin A と小胞体 (ER) ストレス

前述の結果から、スプライシグ阻害は、何らかのメカニズムを通じて ERK 経路とその下流の NF- $\kappa$ B 経路の活性化を引き起こし、それによって特定の遺伝子発現が活性化されることを示唆されたが、そのメカニズムは不明である。一方で未発表ながら、ビオチン化 SSA を用いた実験から、細胞質 (小胞体膜) に局在する酸化還元調節タンパク質 TMX に対しても SSA が結合することが示されていた。実際、SSA の結合によって TMX が阻害され、ER ストレス経路が活性化されることも明らかになっていた。そこで、SSA が TMX に結合するかどうかを確認した上で、ER ストレス経路の活性化が上述の NF- $\kappa$ B の活性化を通じた遺伝子発現制御に関わるかどうかを検証した。まず、ビオチン化誘導体を用いて、SSA がスプライシグ因子 SF3b だけでなく、TMX とも特異的に結合することを確認した。その結合は Plad B とも競合したことから、Plad B も TMX と結合することが示唆された。さらに不活性型の SSA 誘導体 Ac-SSA も TMX との結合を競合的に阻害したので、Ac-SSA も TMX に結合し、その機能を阻害できると考えられる。しかし、Ac-SSA は IL-8 プロモーターの活性化を誘導しないことから、TMX の阻害は IL-8 プロモーター活性化と関連がないものと考えられた。さらに TMX をノックダウンしても、IL-8 プロモーターの活性化は誘導されず、SSA によるプロモーター活性化にも影響は観察されなかった。以上の結果から、TMX は SSA の結合タンパク質のひとつとして ER ストレスの誘導には関与するものの、IL-8 遺伝子発現の活性化には関与しないことが明らかになった。

以上、本論文はスプライシグ阻害剤による特定の遺伝子の発現誘導機構を解析し、遺伝子プロモーターの活性化には ERK 経路と NF- $\kappa$ B 経路が関与することを明らかにした。また、トランスクリプトーム解析

で明らかになった SSA 応答遺伝子のいくつかが NF- $\kappa$ B によって制御される遺伝子であったこともこの結論を支持している。SSA、Plad B をはじめとするスプライシング阻害剤は、現在新しい抗がん剤として期待され、臨床試験も行われている。本研究の成果は、これらスプライシング阻害剤の抗がん活性の主作用、医薬品開発の際に問題となる可能性のある副作用の分子メカニズムを解明する一助となることが大いに期待される。

本研究の成果は査読制のある国際誌に論文（筆頭著者）として掲載決定されている。よって本審査員一同は、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。