

氏名	くわっ とう ふえい QUACH TU HUE
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第845号
学位授与の日付	平成29年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	Studies on biological activities of small molecules regulating the NF- κ B signaling pathway induced by inflammatory cytokines (炎症性サイトカインによって誘導されるNF- κ Bシグナル伝達経路を制御する小分子化合物の生物活性に関する研究)
審査委員	(主査)教授 片岡孝夫 教授 山口政光 准教授 井沢真吾

論文内容の要旨

転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B)は、炎症性サイトカイン等によって活性化される転写因子である。本申請論文は、炎症性サイトカインによって誘導されるNF- κ Bシグナル伝達経路を制御する3種類の小分子化合物の生物活性に関する研究を行ったものであり、「序論」、第一章「イルシニアスタチンAによって誘導される tumor necrosis factor (TNF)レセプター1のエクトドメインシェディングのメカニズム」、第二章「アラントピロンAはTNFレセプター1複合体の複数の構成因子に作用し、TNF- α で誘導されるシグナル伝達経路においてRIP1の修飾を阻害する」、第三章「オイデスマン型セスキテルペンラクトンはリンホトキシン β 刺激によるNF- κ BサブユニットRelBの核移行を阻害する」、「結論」から構成され、英文で記述されている。

序論では、まず本研究の背景が記述されている。NF- κ BファミリーはRelA (p65)、RelB、c-Rel、NF- κ B1 (p105)、NF- κ B2 (p100)の5つのメンバーから構成されている。NF- κ Bメンバーに共通のRelホモロジードメインは、核移行シグナルを含み、二量体化、核移行、DNA結合に関与している。p105とp100は、翻訳後、Relホモロジードメインを含むp50とp52にそれぞれ切断される。NF- κ Bシグナル経路には、古典的NF- κ B経路と非古典的NF- κ B経路がある。古典的NF- κ B経路は、TNF- α やインターロイキン1等によって活性化される経路である。NF- κ BヘテロダイマーRelA/p50は通常I κ B α と結合し、細胞質に存在している。TNFレセプター1やインターロイキン1レセプターの下流のシグナル伝達経路では、I κ BキナーゼによるI κ B α のリン酸化、それに続いてI κ B α のユビキチン化とプロテアソーム分解が誘導されると、遊離したRelA/p50が核へ移行し、 κ Bサイトをもつ標的遺伝子の転写を活性化する。一方、リンホトキシン β 等の刺激によって活性化される非古典的NF- κ B経路では、細胞質に存在するNF- κ BヘテロダイマーRelB/p100がRelB/p52にプロセッシングされる。RelB/p52は核に移行し、NF- κ B標的遺伝子を活性化する。さらに、これまでに報告されているNF- κ Bシグナル伝達経路に作用する小分子化合物の概要、及び本研究で用いる3つの小分子化合物についての背景を解説している。

第一章では、海綿 *Ircinia ramosa* や *Psammocinia* から発見されたペデリン系化合物イルシニ

アスタチン A の作用機序の解明について記述されている。イルシニアスタチン A は抗腫瘍活性や翻訳阻害活性を有することが報告されている。ヒト肺がん腫 A549 細胞では、イルシニアスタチン A が TNF レセプター1 のエクトドメインシェディングを誘導すること、並びに ERK の強力かつ持続的なリン酸化を誘導するが、p38 MAP キナーゼや JNK のリン酸化をほとんど誘導しないことを明らかにした。さらに、イルシニアスタチン A による TNF レセプター1 のエクトドメインシェディングが MAPK/ERK キナーゼ阻害剤 U0126 で抑制されるが、p38 MAP キナーゼ阻害剤や JNK 阻害剤では抑制されないことを見出した。以上の結果から、イルシニアスタチン A は、A549 細胞において ERK 経路のみを活性化することによって TNF レセプター1 のエクトドメインシェディングを誘導する翻訳阻害剤であると結論している。

第二章では、植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 から単離されたアラントピロン A の作用機序の解明について記述されている。アラントピロン A は、TNF- α によって活性化される NF- κ B シグナル伝達経路を I κ B キナーゼの上流で阻害することが明らかになっている。申請者は、A549 細胞において、アラントピロン A が TNF- α の TNF レセプター1 に対する結合を阻害しないが、TNF- α によって形成される TNF レセプター1 複合体に含まれる RIP1 の修飾を抑制することを見出した。さらに、アラントピロン A が TNF レセプター1 複合体の構成因子である TNF レセプター1、RIP1、TRAF2 をクロスリンクすること、グルタチオンがアラントピロン A による TNF レセプター1 や TRAF2 のクロスリンクを抑制すること、並びに TNF- α によって誘導される I κ B α 分解に対するアラントピロン A の阻害活性をグルタチオンが抑制することを明らかにした。以上の結果から、アラントピロン A が TNF レセプター1 複合体の複数の構成因子をクロスリンクすることによって、TNF- α による NF- κ B シグナル伝達経路を阻害すると結論している。

第三章では、santonin-related compound 2 (SRC2) を含む 8 種類のオイデスマン型セスキテルペンラクトンの作用機序の解明について記述されている。これらのオイデスマン型セスキテルペンラクトンは、TNF- α とインターロイキン 1 α によって活性化される古典的 NF- κ B シグナル伝達経路を複数のステップで阻害することが報告されている。そこで、申請者は、リンホトキシン β によって活性化される非古典的 NF- κ B シグナル伝達経路に着目した研究を行った。SRC2 は、A549 細胞において、リンホトキシン β による p100 の p52 へのプロセッシングを阻害せず、RelB と p52 の核移行を阻害した。さらに、オイデスマン型セスキテルペンラクトンの構造活性相関について検討し、 α -プロモケトン構造や α, β -不飽和ラクトン構造がリンホトキシン β による NF- κ B ルシフェラーゼレポーター活性の阻害に必要であるが、単一の α -メチレン- γ -ラクトン構造よりも α -プロモケトン構造をもつオイデスマン型セスキテルペンラクトンがリンホトキシン β による RelB の核移行を強く阻害することを明らかにした。以上の結果から、SRC2 が非古典的 NF- κ B シグナル伝達経路において RelB の核移行を阻害する有用な小分子化合物であると結論している。

結論では、本研究の結果についての総括と今後の展望について記述されている。

論文審査の結果の要旨

転写因子 NF- κ B のシグナル伝達経路は、炎症性サイトカイン等によって活性化され、免疫応

答、細胞増殖、細胞生存などに関与する様々な遺伝子を活性化する。慢性的な NF- κ B シグナル伝達経路の活性化と遺伝子発現は、炎症性疾患やがんの発症に関与している。したがって、NF- κ B シグナル伝達経路を制御する小分子化合物は、抗炎症剤や抗がん剤として有用であると考えられている。

申請者は、炎症性サイトカインによって活性化される NF- κ B シグナル伝達経路に作用する 3 種類の小分子化合物に着目し、分子レベルでの作用機序の解明を行った。海綿由来のペデリン系化合物イルシニアスタチン A は、抗腫瘍活性や翻訳阻害活性を有することが報告されている。ヒト肺がん腫 A549 細胞において、イルシニアスタチン A が ERK の強力かつ持続的な活性化を介して、TNF レセプター1 のエクドメインシェディングを誘導し、TNF- α による NF- κ B シグナル伝達経路の活性化を阻害することを明らかにした。

植物内生糸状菌より単離された α -ピロン系化合物アラントピロン A は、抗腫瘍活性を有することが報告されている。アラントピロン A は TNF- α による NF- κ B シグナル伝達経路を阻害する。申請者は、アラントピロン A が TNF- α の TNF レセプター1 への結合を阻害しないが、TNF- α によって誘導される TNF レセプター1 複合体中の RIP1 の翻訳後修飾を阻害することを見出した。さらに、アラントピロン A が TNF レセプター1、RIP1、TRAF2 のクロスリンクによる高分子量化を誘導すること、グルタチオンがアラントピロン A による TNF レセプター1 や TRAF2 のクロスリンクを抑制すること、TNF- α によって誘導される I κ B α 分解に対するアラントピロン A の阻害活性をグルタチオンが抑制することを明らかにした。

オイデスマン型セスキテルペンラクトンは、TNF- α とインターロイキン 1 α によって誘導される古典的 NF- κ B シグナル伝達経路を複数のステップで阻害する。申請者は、リンホトキシシン β によって誘導される非古典的 NF- κ B シグナル伝達経路に対する santonin-related compound 2 (SRC2) を含む 8 種類のオイデスマン型セスキテルペンラクトンの作用機序と構造活性相関の解明を行った。SRC2 は、NF- κ B サブユニット p100 の p52 へのプロセッシングを阻害せず、RelB と p52 の核移行を阻害することを見出した。さらに、オイデスマン型セスキテルペンラクトンによる RelB の核移行の阻害には分子内の α -ブロモケトン構造が重要であることを明らかにした。

これらの研究より、古典的 NF- κ B シグナル伝達経路及び非古典的 NF- κ B シグナル伝達経路における 3 種類の小分子化合物の新しい作用機序や標的タンパク質を明らかにしたことから、本研究の学術的な意義は高いと評価できる。さらに、これらの研究は、炎症性疾患やがんに対する予防薬や治療薬の開発に貢献することが期待されることから、社会的な意義も大きい。

学位論文は、申請者が筆頭著者である査読制度のある下記の国際科学雑誌に掲載済みの論文 2 編を基礎としている。

- 1) Hue Tu Quach*, Seiya Hirano*, Sayuri Fukuhara, Tsubasa Watanabe, Naoki Kanoh, Yoshiharu Iwabuchi, Takeo Usui, Takao Kataoka: Irciniastatin A, induces potent and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and thereby promotes ectodomain shedding of tumor necrosis factor receptor 1 in human lung carcinoma A549 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38 (6), 941–946, 2015. *These authors contributed equally to this work.
- 2) Hue Tu Quach, Riho Tanigaki, Junpei Yokoigawa, Yuriiko Yamada, Masamitsu Niwa, Seiya Hirano, Yoshihito Shiono, Ken-ichi Kimura, Takao Kataoka: Allantopyrone A interferes

with multiple components of the TNF receptor 1 complex and blocks RIP1 modifications in the TNF- α -induced signaling pathway. *The Journal of Antibiotics*, published on July 5, 2017, doi:10.1038/ja.2017.74.

これらの研究の成果は、参考論文として、申請者が筆頭著者である 1 編を含む国際科学雑誌 2 編に掲載済みもしくは印刷中である。

- 3) Hue Tu Quach, Tetsuya Kondo, Megumi Watanabe, Ryuichi Tamura, Yoshiki Yajima, Shinsei Sayama, Masayoshi Ando, Takao Kataka: Eudesmane-type sesquiterpene lactones inhibit nuclear translocation of the nuclear factor κ B subunit RelB in response to a lymphotoxin β stimulation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, accepted on July 7, 2017.
- 4) Seiya Hirano, Hue Tu Quach, Tsubasa Watanabe, Naoki Kanoh, Yoshiharu Iwabuchi, Takeo Usui, Takao Kataoka: Irciniastatin A, a pederin-type translation inhibitor, promotes ectodomain shedding of cell-surface tumor necrosis factor receptor 1. *The Journal of Antibiotics*, 68 (6) 417–420, 2015.