

氏 名	奥田 洗作
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬 科 学
学位記授与番号	博甲 第 5722 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 薬科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	エピゲノム制御酵素の S-ニトロシル化を介した活性調節機構
論 文 審 査 委 員	教 授 檜垣 和孝 (主査) 教 授 波多野 力 准教授 大河原 賢一

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

生体内で産生される一酸化窒素 (nitric oxide, NO) はガス状シグナル分子として、血圧調節や記憶形成など多様な生理活性を示す。その作用機構の一つとして、タンパク質システインチオール基の S-ニトロシル化 (SNO 化) を介した機能調節が提唱されている。翻訳後修飾の一つである SNO 化は可逆性であり、NO 適量産生下では生体恒常性に関わるシグナルとして機能する一方、NO 過剰量産生下や長期曝露ではがんや神経変性疾患などの病態形成に深く関与することが知られている。そこで、新規 SNO 化タンパク質を網羅的に探索するため、独自に開発したスクリーニングを行った結果、エピゲノム制御酵素を複数同定することに成功した。

最近、エピゲノムのパターン異常による遺伝子発現変動と、種々の病態形成との関係性が指摘されている。しかし、生体内でどのような分子機構によりエピゲノム異常が惹起されるのか、その活性調節機構についてはほとんど不明である。そこで、エピゲノム制御酵素の SNO 化を介した活性調節の可能性を推定した。本研究ではスクリーニングで得られた候補タンパク質のうち、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) と DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase, DNMT) に着目し、SNO 化による活性調節機構を明らかにすることを目的とした。また、これまでに開発されていない分子特異的 SNO 化制御薬の探索を試み、その特性を解析した。

タンパク質 SNO 化特異的検出法であるビオチンスイッチ法および各種酵素活性測定キットなどを用いて解析したところ、HDAC ファミリーの一つである HDAC6 は SNO 化により脱アセチル化活性が抑制され、 α -tubulin のアセチル化レベルを亢進させることが明らかとなった。また、DNMT3B はその活性中心の SNO 化による DNA メチル基転移活性の消失に伴い、標的遺伝子

CpG アイランドの脱メチル化を介した遺伝子発現レベルの制御を行う可能性が示唆された。そこで、DNMT3B の酵素活性に影響を与えず、SNO 化のみを特異的に阻害する化合物 (DBIC) をインシリコスクリーニングなどにより単離同定し、その薬理学的特性を解析した。その結果、DBIC は DNMT3B に結合し、SNO 化形成を阻害することで一連のエピジェネティック変化を抑制することがわかった。つぎに、NO が介在する病態形成、とくにがん化と SNO-DNMT3B 形成との相関性を調べるため、マウス線維肉腫 QR-32 細胞の NO 誘発性スフェロイド形成に対する DBIC の影響を検討したところ、DBIC はスフェロイド形成をほぼ完全に抑制した。また、動物モデルを用いた解析より、DBIC は NO に起因した炎症発がんの病態形成を抑制したことから、SNO-DNMT3B 形成によるエピジェネティック変化とがん病態形成には深い関わりがある可能性が示唆された。

本研究により、エピゲノム制御酵素の一部は NO によるレドックス制御を受ける可能性が新たに見出され、病態形成に寄与することが明らかにされた。

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

メチル転移酵素(DNMT3B)に着目し、その SNO 化の及ぼす酵素活性への影響を詳細に検討し、NO による SNO 化の確認とそれが直接それぞれの酵素活性の減弱に結びついており、その活性の減弱が実際に生細胞内でヒストンのアセチル化、DNA のメチル化に影響を及ぼしていることを明瞭に示すことに成功している。特に、DNMT3B に対する影響については、SNO 化されている Cys 残基の特定、SNO 化による DNA メチル化活性の低下の確認、更には生細胞を用いて、活性低下が実際ががん関連遺伝子とされる Ccnd2(CpG アイランド)のメチル化低下に結びついていること、そのことが Ccnd2 の転写活性亢進に関連している可能性を見出すことに成功している。更には、DNMT3B の SNO 化を特異的に阻害し得る化合物の探索を行い、有望な化合物 DBIC を見出している。DBIC は、直接的には DNMT3B 活性を著しく抑制することではなく、DNMT3B の SNO 化を阻害することで酵素活性抑制効果を発揮することが示されている。DBIC の作用は、生細胞(AGS 細胞)を用いた検討においても示され、Ccnd2(CpG アイランド)のメチル化低下、Ccnd2 の転写亢進が確認されている。また、DBIC は炎症性がん定着率を有意に抑制することも見出されており、その炎症に起因する疾患治療への応用の可能性の提示に成功している。

審査委員会では、論文の形式に関する指摘と共に、内容について詳細な議論を行った。特に、ヒストン、DNA の代謝の全貌を踏まえた上での記述、考察の必要性、DNA のメチル化低下と転写活性亢進の関連性や DBIC による DNMT3B の SNO 化阻害の機構等についての考察の必要性を指摘し、それらを反映し、また形式の変更を行った修正版の提出を求めた。後日、修正版が提出され、審査委員会での指摘を踏まえた適切な追加・修正がなされていることを確認した。以上より、本論文は、酵素の SNO 化を介したエピゲノム制御に関して、新知見を提示するとともにその創薬への可能性を提示することに成功しており、博士(薬科学)の学位に値するものと判断した。