

氏名	大塚 里美		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	統合科学		
学位授与番号	博甲第	6664	号
学位授与の日付	2022年 3月 25日		
学位授与の要件	ヘルスシステム統合科学研究科          ヘルスシステム統合科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Ca <sup>2+</sup> /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ活性化キナーゼの特異的阻害剤の開発と 阻害メカニズムに関する研究		
論文審査委員	教授 大槻 高史	教授 井出 徹	教授 徳光 浩
<b>学位論文内容の要旨</b>			
<p>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (CaM)依存性タンパク質リン酸化酵素活性化キナーゼ(CaMKK)は細胞内カルシウムシグナル経路において上流に位置する重要なリン酸化酵素であり、下流基質分子のリン酸化を介して神経発生や遺伝子発現、代謝調節など多岐にわたる生理機能を調節する。CaMKKの調節異常は双極性障害、統合失調症などの精神疾患や、前立腺がん、肝がんなどのがん細胞増殖に関与することが報告されている。本論文においては、細胞内におけるCaMKKの調節機構に関する研究、およびCaMKKの過剰活性化を原因とする疾患の治療薬開発を目的とした新規CaMKK阻害剤の開発と相互作用解析を行った。CaMKK調節機構の研究では、CaMKKのcAMP/PKAシグナル経路による調節機構を発見した。CaMKKには<math>\alpha</math>と<math>\beta</math>の二種類のアイソフォームが存在し、CaMKK<math>\beta</math>はCa<sup>2+</sup>/CaM結合に依存しない活性(自発活性)を持つ。先行研究によりCaMKK<math>\beta</math>(Thr144)がリン酸化されることによりCa<sup>2+</sup>/CaM依存性酵素に変換されることが明らかとなっている。本研究において、HeLa細胞をイソプロテレノール(<math>\beta</math>アドレナリン受容体作動薬)で刺激することによりCaMKK<math>\beta</math>(Thr144)のリン酸化が速やかに上昇し、このリン酸化上昇はPKA阻害剤H-89処理によって消失することを見出した。さらに、CaMKK<math>\beta</math>(Thr144)は<i>in vitro</i>において精製PKAによって直接リン酸化され、Ca<sup>2+</sup>/CaM依存性酵素に変換されることが確認できた。これらの結果より、CaMKK<math>\beta</math>のcAMP/PKAシグナル経路によるリン酸化調節が明らかとなった。また、新規CaMKK阻害剤の開発研究においては、CaMKK阻害剤STO-609をリード化合物として、新規CaMKK阻害剤TIM-063を見出した。TIM-063はCaMKK<math>\alpha</math>と<math>\beta</math>の両方に対して同等の阻害活性を示すpan-CaMKK阻害剤であり、反応速度論的な解析によりATP拮抗薬であることが示された。TIM-063は動物細胞内のCaMKKに対しても阻害活性を示し、膜透過性を有することが確認できたことから、CaMKKの生理機能解析および疾患治療薬としての有用性が示唆された。さらに、長鎖リンカーを介してTIM-063とセファロース担体を結合させたTIM-063結合セファロースを作製し、TIM-063/CaMKKの直接相互作用解析を行った。その結果、TIM-063はCa<sup>2+</sup>/CaM存在下、つまり活性化状態のCaMKK<math>\alpha</math>にのみ結合し、その結合はCa<sup>2+</sup>/CaM結合に伴うCaMKK<math>\alpha</math>の構造変化に依存して可逆的であることが明らかとなった。CaMKKの活性化/不活性化の分子構造変化に伴う阻害剤の結合/解離動態に関する本研究の結果は、今後さらに高阻害活性、高選択性を示すCaMKK阻害剤の開発において、重要な知見となることが期待される。</p>			

## 論文審査結果の要旨

タンパク質リン酸化反応は、その触媒酵素であるタンパク質リン酸化酵素遺伝子がヒトにおいても500種類以上存在することから、その生体における重要性は明らかであり、細胞内情報伝達機構の中心的な生化学反応の一つである。これらリン酸化酵素の先天的、後天的な機能破綻は様々ながんや生活習慣病を含めた多くの疾患を引き起こすことが知られている。そのため世界中でタンパク質リン酸化酵素を標的とする分子標的薬の開発が進んでいる。本学位論文のテーマである、細胞内カルシウムを細胞内情報伝達因子として活性化するタンパク質リン酸化酵素のひとつであるCaMKKにおいても、その過剰発現と前立腺がん、肝がん、肺がんや非アルコール性肝障害との関連が報告されている。本研究においては、第一にCaMKKの細胞内における制御機構の解明、特に細胞内カルシウム以外の情報伝達機構の一つであるcAMP（環状アデノシンーリン酸）を介したシグナル伝達経路による酵素制御機構を見出した。第二に本酵素の特異的阻害剤すなわち分子標的薬を新たに創製し、試験管内および細胞レベルにおいてその有用性を検証した。そして第三に独自に開発した阻害薬と標的リン酸化酵素(CaMKK)の相互作用について、分子レベルでその詳細を検証した結果、標的リン酸化酵素の構造変化に依存した阻害薬との相互作用を解明した。

本研究は、基礎生命科学研究から治療薬としての新たなCaMKK阻害薬の開発と、阻害反応機構の解明という応用研究まで広範囲に進めたものであると認められた。また、分子標的薬と標的酵素分子の詳細な相互作用機構の解明は、今後の創薬における副作用を評価する技術や既存薬の再評価法として有用であると認め、学位審査委員の全員が本論文を博士（統合科学）の学位にふさわしい論文であると評価した。