

氏名(本籍)	いわもと のりこ 岩本典子(東京都)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第5120号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Chemical Knockdown of Sensor Proteins by 1, 2-Naphthoquinone, an Atmospheric Electrophile</b> (大気中親電子物質1, 2-ナフトキノンによるセンサータンパク質のケミカルノックダウン機構)		
主査	筑波大学教授	薬学博士	金保安則
副査	筑波大学講師	博士(理学)	梶和子
副査	筑波大学講師	医学博士	石井幸雄
副査	筑波大学講師	博士(農学)	藤栄治

## 論文の内容の要旨

### (目的)

大気汚染成分である多環芳香族炭化水素キノン体1,2-ナフトキノン(1,2-NQ)が引き起こす生体応答の分子メカニズムを、1,2-NQのターゲット分子の修飾機構の詳細を知ることで解明する。

### (対象と方法)

これまでに1,2-NQが上皮成長因子受容体(EGFR)のリン酸化を介してモルモットの気管収縮を引き起こすことを明らかにした。本研究内容では、1,2-NQによるEGFRのリン酸化の分子機構を明らかにするため、マウス及び細胞を用いケミカルバイオロジーの概念を基盤とした実験を行っている。

方法は、マウスへの1,2-NQの気管内投与：1,2-NQをPBSで希釈したものをマウスの気管から肺へ空気と一緒に吸入させ、タンパク質の修飾について検討した。さらに細胞を用いることで、EGFRのリン酸化及び下流のシグナル伝達因子の活性化の詳細なメカニズムの解明を行った。負の制御因子であるPTPIBの活性阻害機構の詳細について精製酵素を用いて検討を行った。

### (結果)

1,2-NQをマウスに気管内投与すると、チロシンリン酸化が亢進した。さらに、EGFRの下流に存在する典型的なシグナル伝達因子MEK1/2及びERK1/2のリン酸化が検出された。1,2-NQによるEGFRを介したシグナル伝達経路の活性化を詳しく調べるため、ヒトの上皮細胞A549及びA431細胞に1,2-NQを暴露し、シグナル伝達因子の活性化を検討した。その結果、EGFRのリン酸化を介して下流のMEK1/2、ERK1/2さらに転写因子AP-1の活性化が検出された。以上の結果より、1,2-NQはEGFR/MEK/ERKのシグナル伝達経路を介してAP-1の活性化を引き起こすことが明らかとなった。

次に、1,2-NQによるEGFRのリン酸化の分子メカニズムについて検討した。その結果1,2-NQはリガンド非依存的にEGFRの活性化を引き起こし、これがEGFRなどのチロシンキナーゼを負に制御しているプロテインチロシンホスファターゼ(PTPs)活性の低下に依存することが示唆された。さらに、EGFRを基質

とする代表的なホスファターゼである PTP1B への 1,2-NQ の結合が検出され、PTP1B を高発現した細胞において、1,2-NQ による EGFR のリン酸化が抑制された。よって、1,2-NQ による EGFR のリン酸化が PTP1B の活性阻害に起因することが示唆された。

これまでの結果より、1,2-NQ が PTP1B の活性低下を介して EGFR のリン酸化を引き起こすことが明らかとなったため、PTP1B の精製酵素を用い、1,2-NQ による PTP1B の活性阻害機構を検討した。結果として、1,2-NQ は PTP1B の活性部位から約 8Å の位置にある Cys121 を介して共有結合し、本酵素活性を抑制することが明らかとなった。また、Cys121 への 1,2-NQ の結合は隣接した Lys120 によって制御されており、Cys121 への PTP1B の修飾が高次構造変化を引き起こすことが、本酵素活性阻害に起因することが示唆された。

(考察)

PTP1B は 1,2-NQ のような親電子物質に対するセンサータンパク質 (1,2-NQ によって直接修飾を受けるタンパク質) の 1 つであることが示され、1,2-NQ による PTP1B の活性阻害がリガンド非依存的な EGFR のリン酸化を引き起こし、シグナル伝達経路を攪乱することが明らかとなった。さらに、1,2-NQ によって修飾された PTP1B は高次構造変化を引き起こし、本酵素活性が阻害されることが考えられた。

(結論)

本研究において、1,2-NQ は PTP1B に対するアロステリック効果によって、EGFR の活性化を引き起こすエフェクター分子であることが明らかとなり、1,2-NQ による Cys121 の選択的な修飾が PTP1B の高次構造変化を引き起こし、活性を抑制するという新規の活性阻害メカニズムが示された。

## 審査の結果の要旨

本研究は、1,2-NQ による EGFR のシグナル伝達経路活性化機構を細胞レベルで明らかにしたものである。その結果、1,2-NQ は EGFR の負の制御因子である PTP1B の活性を阻害していることが明らかとなった。また、1,2-NQ の PTP1B 活性阻害機構を、精製酵素を用いることで詳細に検討した結果、PTP1B の新規の活性阻害メカニズムを明らかにしている。さらに、PTP1B の活性部位以外の反応性の求核基 (Cys121) が 1,2-NQ のみならず様々な親電子物質のターゲットとなる部位であることを示し、PTP1B の活性調節における新たな Cys121 の機能を示唆することができた。これらの知見は 1,2-NQ という親電子物質を用いることで、PTP1B の分子の機能解明にも貢献しており、新奇性の高い研究成果であると評価できる。また、著者の基礎学力や研究遂行能力は極めて優れたものであると評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。