

氏名(本籍)	横井晃(愛知県)
学位の種類	博士(生物工学)
学位記番号	博甲第6140号
学位授与年月日	平成24年3月23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	生命環境科学研究科
学位論文題目	Bioactive Natural Product Pladienolide Exerts Antitumor Effects by Targeting Splicing Factor SF3b (天然活性物質 Pladienolide はスプライシング因子 SF3b を標的とすることによって抗腫瘍効果を発揮する)
主査	筑波大学教授 農学博士 深水昭吉
副査	筑波大学教授 博士(薬学) 柳澤純
副査	筑波大学教授 博士(農学) 谷本啓司
副査	筑波大学講師 博士(学術) 加香孝一郎

論文の内容の要旨

プラジエノライドは放線菌 (*Streptomyces platensis*) から単離されたマクロライド化合物であり、低酸素刺激下でのヒト血管内皮増殖因子プロモーター活性を抑制する化合物として見出された。本化合物は、in vitro ならびに in vivo の癌細胞に対して強力な抗腫瘍活性を発揮することが確認されている。近年、光親和性ピオチンタグを導入したプラジエノライド修飾化合物を用いた研究より、本化合物がスプライシング因子複合体 SF3b の構成タンパク質である SF3B3 と結合することが示された。しかしながら、スプライシング機能を阻害することが本化合物の抗腫瘍活性の真の作用機序であるかは証明されきれていない。そこで著者は、プラジエノライドの抗腫瘍活性機序を明確にするために、本研究を遂行した。

まず著者は、大腸癌細胞株 WiDr ならびに DLD1 に対してプラジエノライドを継続的に処理することによって、プラジエノライドに耐性を示す株 WiDr-R と DLD1-R を樹立した。Deep sequencing 技術を用いた mRNA-seq differential 解析の結果、両耐性株は親株に対してそれぞれ4ならびに87の変異を持つことが明らかとなった。さらに両株に共通の変異として、SF3B1 遺伝子における R1074H 変異を見出した。Sanger sequence 解析による検証の結果、WiDr-R は野生型と変異型の双方の SF3B1 mRNA を、DLD1-R は変異型 mRNA のみを発現していることが確認された。SF3B1 は SF3b 複合体の構成因子であり、プラジエノライド結合タンパク質である SF3B3 と相互作用することが知られている。次に著者は、R1074H 変異を含む SF3B1 遺伝子を外来的に発現させた WiDr 細胞を作製した。本細胞に対して、プラジエノライドによる細胞増殖抑制ならびにスプライシング阻害を評価したところ、両阻害活性に対して明確に耐性が付与されることが明らかとなった。これらの遺伝学的手法により、スプライシング阻害がプラジエノライドの抗腫瘍活性に必須であることが示された。

次に著者は、SF3B1 遺伝子 R1074H 変異によるプラジエノライド耐性付与機構を解明した。本研究は、野生型 SF3B1 遺伝子を発現する DLD1 親株と変異型のみを発現する DLD1-R 耐性株を用いて進められた。両 DLD1 株における SF3b 複合体の構成因子 (SF3B1・SF3B2・SF3B3) の発現量を比較したところ、両株に

において発現量に差がないことが確認された。これにより、SF3B1 変異は、SF3b 複合体の各構成因子の量に影響を与えていないことが明らかとなった。次に著者は、両株におけるプラジエノライドの細胞内分布の差異を解析した。その結果、耐性株では核への局在が消失していることが示された。さらに筆者は、ラジオラベルされたプラジエノライドを用いて、SF3b 複合体へのプラジエノライドの結合量を測定し、耐性株より抽出した複合体においてはその結合量が顕著に減少していることを明らかにした。これらの結果より SF3B1 遺伝子の R1074H 変異は、プラジエノライドの SF3b への結合能を減弱させることによって、プラジエノライド耐性を付与していることが示された。

さらに著者は、本研究結果と SF3B3 がプラジエノライド結合タンパク質として同定されたという知見を合わせて考えることにより、本化合物は SF3B1 と SF3B3 から構成される両タンパク質の狭間様構造にはまり込むことによってスプライシング阻害活性が発揮されるというプラジエノライドと SF3b 複合体の新たな結合モデルを提唱した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、SF3b 複合体がプラジエノライドの抗腫瘍活性の直接の標的であることを検証した初めての報告であり、スプライシング機構が癌治療における有望な標的分子と成り得ることを示した革新的な知見である。また、本研究での SF3B1 変異がプラジエノライドの SF3B3 への結合を減弱させたという結果は、これまで研究が進められていなかった SF3b 複合体における SF3B1 と SF3B3 の結合様式に対して新たな知見を与えるものである。さらに本研究では、抗腫瘍性物質に対する複数の耐性株を取得し、続いて Deep sequencing 解析を行うことにより作用機序に直結する耐性原因遺伝子の同定に成功した。本手法は、生理活性物質の作用機序解析における新たな手法の提示であり、本解析法を他の生理活性物質にも応用することにより、今後の分子標的治療薬の潮流をさらに加速させる一助となる可能性を秘めているものである。

平成 24 年 2 月 2 日、学位論文審査委員会において、審査員全員の出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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