

氏名	廣實 万里子		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9053 号		
学位授与年月日	平成 31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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Enzymological Analysis of STAT6 Signaling Related Proteins and Its Application to the Drug Discovery and Development (STAT6シグナル関連タンパク質の酵素学的解析と新規薬剤開発への応用)		
主査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	稲垣 祐司
副査	筑波大学教授 (連携大学院)	博士 (医学)	永宗喜三郎

## 論 文 の 要 旨

生体では、サイトカインを産生する細胞からそのサイトカインを受け取る細胞へと情報伝達が行なわれることにより、免疫細胞の活性化や抑制が行われている。サイトカイン産生のシグナルにおいて重要な役割を担うのがSTAT (signal transducer and activator of transcription) というシグナル伝達転写活性化因子であり、7種類のタンパク質が同定されている。STAT6はその1つである。本論文の著者は、IL-4/IL-13により活性化されるSTAT6のシグナル経路に関わり、その異常がアレルギー性疾患の発症に関与すると考えられる PARP14 (poly(ADP-ribose) polymerases 14)、および骨髄樹状細胞でのウィルス感染によりSTAT6経路が活性化する際に関与する DDX41 (DEAD-box helicases 41)、の2つのタンパク質について、酵素学的解析によりそれらの性状を明らかにし、それら分子を阻害する低分子化合物を取得した。

第1章において著者は、PARP14の解析結果について述べている。著者はまず、自己リボシル化を受けることが予測されるマクロドメインと触媒ドメインを含む791-1801残基の酵素を精製した。次に、自己リボシル化の際に生成するニコチンアミドを high-throughput screening using mass spectrometry (HTMS) により定量する測定法を確立し、PARP14の時間・基質濃度依存的な活性を確認し、基質であるNADのKm値が1.2mMであることを示した。さらに、HTMS以外のアッセイ系としてNADのトリチウムラベル体を用いてPARP14の自己リボシル化を検出するRIのアッセイ系も構築した。これらに基づき、まずHTMSの系よりhigh-throughput screening (HTS) を実施し、PARP14に対して阻害活性を示す化合物を取得した。さらにRIの方法でも阻害活性の確認アッセイを実施し、複数の低分子化合物を取得した。各化合物のPARP14とPARP1に対する活性を測定した結果、どちらの化合物もPARP14に対しては、数100nMのIC<sub>50</sub>値を示

し、PARP1に対しては殆ど活性を示さず100倍以上の選択性を示すことが明らかとなった。また、取得した化合物とPARP14との共結晶解析を行い、リード化合物合成に向けた活性向上・選択性の維持に有用となる情報を取得した。

第2章において著者は、DDX41の解析結果について述べている。著者はまず、酵素の調整と基質の同定を行った。ヘリカーゼが活性を示す際には基質として添加するATPが加水分解されADPが生成されるため、そのADPを検出するADP-Gloという方法を用いて、DDX41の活性を測定した。また、遺伝性の骨髄性造血器腫瘍において見いだされるR525H変異体にも着目し、野生型と同時に変異体の酵素調製も行った。基質としてdsDNA、dsRNAを添加した結果、dsDNAであるpoly(dA-dT)、poly(dG-dC)と反応することが明らかになった。そこでATPとpoly(dG-dC)あるいはpoly(dA-dT)に対する野生型とR525H変異体の親和性を求めた。両dsDNAは共に、酵素に対して同程度の親和性を示したため、HTSではpoly(dG-dC)をdsDNA基質として選択した。野生型と変異体はいずれもATPに対しては、70 $\mu$ M、poly(dG-dC)に対して0.2 $\mu$ g/mLのKm値を示した。これらの結果よりHTSの活性測定条件を設定し、化合物ライブラリーに対してHTSによる低分子阻害剤の取得を試み、2つの化合物を取得した。これら化合物の、阻害様式を調べたところ、poly(dG-dC)と拮抗しながら阻害活性を示すことが明らかになった。

最後に著者は、General Discussionの章において、本論文の研究成果、すなわち、2つの酵素の性状や阻害剤などの情報を取得したことの意義について、STAT6シグナルの関与による免疫細胞の活性化や抑制のメカニズムの解明、2つの酵素をターゲットとするさらなる創薬研究の展開の両面から議論し、今後の課題を具体的に提示している。

## 審 査 の 要 旨

PARP14 および DDX41 がそれぞれ別々の経路によって STAT6 の活性化に関与することは、これまでに広く知られていたが、いずれについても酵素活性に関する報告はなく酵素機能の詳細も未知であった。本論文の著者は、これら2つの酵素の基本性状を生化学的に明らかにし、アッセイ系を構築し、阻害活性を示す化合物を取得するという一連の研究を行い、優れた成果をあげた。特定の酵素をターゲットとする創薬という目標を掲げて基礎研究を展開し、生物学的に有用な知見を得ると同時に、応用への具体的な道筋を示した点は高く評価できる。

平成31年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員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（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。