

氏名	藤原 侑哉		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博甲第	5737	号
学位授与の日付	平成30年 3月23日		
学位授与の要件	自然科学研究科 生命医用工学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Ca ²⁺ /カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素活性化酵素 (CaMKK) の分子薬理的解析と特異的基質認識機構の解明		
論文審査委員	教授 徳光 浩	教授 大槻 高史	教授 世良 貴史
学位論文内容の要旨			
<p>細胞内カルシウムイオン(Ca²⁺)はセカンドメッセンジャーとして筋収縮, 分泌反応, 神経伝達物質の放出, さらには遺伝子発現に至る様々な細胞機能を調節している。Ca²⁺/Calmodulin(CaM)を活性化因子とするCa²⁺/CaM-dependent protein Kinase Kinase (CaMKK)にはCaMKKαとCaMKKβの2種類のアイソフォームが存在し, CaM-Kinase I (CaMKI)やCaM-Kinase IV (CaMKIV), 5'-AMP Kinase (AMPK)の活性化ループに位置するThr残基をリン酸化することで, これら基質タンパク質リン酸化酵素を活性化し, 神経機能からエネルギー代謝に至る多様な生理機能を調節している。これまで, 私たちは独自にCaMKK選択的阻害剤(STO-609)を開発し, STO-609を用いた多くの分子薬理的解析により, 多様なCaMKKカスケードの生理的役割が明らかにされてきた。しかしながら, 多くの阻害剤と同様にSTO-609の使用には, 他の細胞内外の分子に影響を与える副作用(off-target 効果)の可能性を常に考えなければならない。本研究では細胞内において, STO-609抵抗性CaMKK変異体によりSTO-609の阻害効果を回復させることで, STO-609により得られた薬理的効果がCaMKKに依存することを担保する手法を確立した。はじめに, STO-609抵抗性CaMKK変異体(CaMKKα L233F, A292T及びCaMKKβ V269F, A328T)の作製を試みた。次いで, 得られた阻害剤(STO-609)抵抗性CaMKK変異体を安定的に発現するA549細胞(ヒト肺胞上皮基底腺がん細胞)を樹立し, STO-609により内因性CaMKKを阻害することで, 生きた細胞内において遺伝子導入したSTO-609抵抗性CaMKK変異体のみのCaMKK活性を検証することに成功した。その結果, 細胞内Ca²⁺濃度の上昇に伴うAMPKのリン酸化反応はCaMKKβのみが, CaMKIVのリン酸化反応はCaMKKα, CaMKKβの両アイソフォームが触媒できることが明らかとなった。細胞内においてCaMKKアイソフォーム間でAMPKをリン酸化する能力が異なる分子機構を明らかにするため, 様々なCaMKK変異体を用いて酵素学的解析を行なった。その結果, CaMKKα Ile³²²をCaMKKβにおいて相当するアミノ酸残基であるLeu残基(CaMKKβ Leu³⁵⁸)に置換したCaMKKα I322Lは試験管内・細胞内の両方においてAMPKリン酸化能を新たに獲得できたことから, 1アミノ酸残基(CaMKKα Ile³²²: CaMKKβ Leu³⁵⁸)の違いがCaMKKアイソフォーム間でのAMPKに対する基質認識の差を生み出している理由の一つであると結論づけた。これらの研究結果に基づき, CaMKK/AMPKシグナル伝達経路を標的とした新たな分子標的薬の創薬理論構築に結びつくことが期待される。</p>			

論文審査結果の要旨

細胞内における情報伝達機構の一つとしてタンパク質リン酸化反応は、触媒する酵素（タンパク質リン酸化酵素）遺伝子がヒトには500種類以上存在することからも、その重要性が明らかであり、これらの先天的、後天的機能破綻はがんや生活習慣病をはじめとする多くの疾患を引き起こすことが知られている。このことは、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につながっている。例えば慢性骨髄性白血病は、その原因遺伝子産物がタンパク質リン酸化酵素 BCR-Ab1 であり、有効な抗がん剤として BCR-Ab1 阻害剤(イマニチブ)が広く使用されている。一方、多くの酵素阻害剤同様に分子標的薬には副作用があり、薬理的効果の評価法が創薬の問題点となっている。本学位論文において、細胞内カルシウムを細胞内の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 とその特異的阻害剤である STO-609 をモデルとして、On-target と Off-target 効果を判別する方法として阻害剤 (STO-609) 抵抗性変異体を用いる方法を開発した。遺伝子変異により獲得した STO-609 抵抗性変異体 CaMKK を安定発現させたヒト肺基底上皮腺癌細胞 (A549 細胞) 株を樹立し、野生型細胞 (母細胞) における阻害剤 (STO-609) の薬理的効果がこれら阻害剤抵抗性変異体を保持させた細胞において回復することを確認した。またこの方法を確立する過程で、CaMKK アイソフォーム分子 (α 及び β) それぞれに対して阻害剤 (STO-609) 抵抗性変異を導入、安定発現細胞株を樹立し使用することで、CaMKK アイソフォーム分子特異的な細胞内情報伝達機構の同定が可能となった。この研究により、生細胞において CaMKK α 及び β はともにリン酸化基質分子である CaM-kinase IV をリン酸化できるが、5' AMP-kinase のリン酸化は CaMKK β のみが触媒することが見出され、阻害剤を分子プローブとする酵素の細胞機能解析法の有用性を高めることに成功した。さらに、この CaMKK α と CaMKK β による 5' AMP-kinase に対する基質認識機構の差が 1 アミノ酸残基 (CaMKK α Ile³²²: CaMKK β Leu³⁵⁸) の違いによることを初めて見出した。これらの研究成果は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と、さらには創薬における副作用を評価する技術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学位にふさわしい論文であると評価した。