氏名	黒木 春那		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	薬科学		
学位授与番号	博甲第 7262 号		
学位授与の日付	令和 7 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科薬科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	小胞体ストレスセンサー IRE1 α に対する S-ニトロシル化阻害薬の同定とその薬効評価		
論文審査委員	小野 敦 教授	谷口 陽祐 教授	表 弘志 准教授

学位論文内容の要旨

加齢は神経変性疾患発症に関わる最大のリスクとされ、その実行因子の一つとして加齢や炎症により産生が増加する一酸化窒素 (NO) が注目されてきた。所属研究室では、NO によるタンパク質の酸化修飾 (S-ニトロシル化) を介した活性阻害と疾患発症の因果関係を示し、中でも小胞体ストレスセンサーである inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) の S-ニトロシル化が神経細胞死に寄与することを見出した。IRE1 α は小胞体ストレスに応じて X-box binding protein 1 mRNA (*Xbp1u*) を *Xbp1s* へとスプライシング (=RNase 活性) する酵素であり、翻訳後の *Xbp1s* は機能的な転写因子 XBP1 として、小胞体ストレス緩和分子を誘導する。NO は IRE1 α を S-ニトロシル化し、RNase 活性を著しく減弱する。したがって、NO はストレス抵抗性を解除することで、細胞をより脆弱にすることが示唆された。こうした背景から、NO 依存的な小胞体ストレス感受性細胞死を回避するには、NO による IRE1 α の RNase 活性低下をコントロールすることが重要であると推定された。そこで、本研究では IRE1 α の S-ニトロシル化を標的とする阻害薬を同定し、その NO 誘導性細胞死に対する効果を評価することを目指した。

初めに、SiteMap および FTMap によって、IRE1 α の S-ニトロシル化部位近傍が化合物の標的となりうることを確認した。次に、*in silico* ドッキングシミュレーションによって、市販化合物ライブラリーから IRE1 α の S-ニトロシル化部位近傍への結合が予想される 11 化合物を選定した。これらの化合物を SH-SY5Y 細胞に処理し RT-PCR を行ったところ、compound 2 は NO 供与体による *Xbp1u* のスプライシング低下を抑制した。さらに、S-ニトロシル化タンパク質を検出する biotin switch assay から、compound 2 は IRE1 α の S-ニトロシル化形成を抑制することを示した。しかし、compound 2 は他の NO 標的タンパク質の S-ニトロシル化形成も一様に抑制する課題があった。より IRE1 α へ選択的に作用する化合物を見出すため、compound 2 に類似した化合物を市販化合物ライブラリーから選定し、これらをドッキングシミュレーションに供した。IRE1 α への結合が予想される 81 化合物を新たに選定し、細胞系で評価したところ、compound 2 よりも低濃度で NO 供与体による *Xbp1u* のスプライシング低下を抑制し、IRE1 α 選択的に S-ニトロシル化形成を阻害する 1ACTA を同定するに至った。興味深いことに、1ACTA の構造のうち α, β -不飽和カルボニル構造を欠失した不活性体は薬効を消失したことから、1ACTA は IRE1 α と共有結合を形成することで阻害効果を発揮する可能性が示唆された。また、NO 供与体によって増加した PI 陽性細胞 (=死細胞) 数は 1ACTA の濃度依存的に減少した。さらに、パーキンソン病様症状を呈する MPP⁺ は NO 合成酵素の活性化を介して細胞毒性を惹起するが、MPP⁺ によって増加した PI 陽性細胞数は 1ACTA の濃度依存的に減少した。

以上より、IRE1 α 選択的な S-ニトロシル化阻害薬として 1ACTA を同定し、1ACTA は NO 誘導性細胞死に対して抵抗性を示すことを明らかにした。

論文審査結果の要旨

本研究では、小胞体ストレスセンサーIRE1 α の S-ニトロシル化阻害薬の候補化合物として共同研究者らによる *in silico* ドッキングシミュレーションによって、市販化合物ライブラリーから選定された候補物質より、*in vitro* アッセイにより NO 供与体による Xbp1 α のスプライシング低下の抑制が示された。最も活性が強い compound 2 について、目的とする IRE1 α の S-ニトロシル化の阻害活性が示されたものの IRE1 α 選択性が低かったため、compound 2 類似物質から再度ドッキングシミュレーションにより選定された候補物質群より、IRE1 α 選択的に S-ニトロシル化形成を阻害する 1ACTA の同定に成功した。さらに、1ACTA は α , β -不飽和カルボニル構造を有しており、欠失により薬効を消失することから、IRE1 α と共有結合を形成することで阻害効果を発揮する可能性が示された。また、NO 供与体に細胞死や、パーキンソン病様症状を呈する MPP⁺ (NO 合成酵素の活性化を介して細胞毒性を惹起する) による細胞死を減少させたことから、NO 誘導性細胞死に対して抵抗性を示すことを明らかにした。

審査委員会では、結果の解釈や示し方等について議論を行い、緒言や考察等の一部修正、および方法など記載の不備や統一について指摘を行った。後日、修正版が提出され、審査委員会での指摘を踏まえた適切な追加・修正がなされていることを確認した。本研究で、得られた知見は新規性が高く、本論文は博士論文として十分な質と量を備えており、博士の学位に値するものと判断した。