

## 学位論文題名

グリア細胞における誘導型一酸化窒素合成酵素の  
発現機構に関する研究

## 学位論文内容の要旨

## 1. 序論

1987年にIgnarroら、Moncadaらにより一酸化窒素(NO)が内皮由来弛緩因子(EDRF)の本体であることが明らかにされて以来、NOは血管弛緩のみならず、神経伝達、生体防御、神経細胞死など広範な生体機能調節を担っていることが示されてきた。これに先立ち1977年Muradらは、NOがグアニル酸シクラーゼを直接活性化し、その情報はcGMPへと変換されることを示した。この点でNOはセカンドメッセンジャー的情報伝達分子であるとともに、生体においていくつかの化学反応を受けて反応性に富む物質(例、ONOO<sup>-</sup>)へと変化し、様々な機能分子に作用し、その活性を変化させることから、NOは新しいタイプの生理活性物質であると認識されている。NOのユニーク性は、その合成酵素(NOS)によってさらに特徴づけられる。NOSには、その発現および活性制御機構が全く異なる二つのタイプが存在する。一つは構成的に存在し、Ca<sup>2+</sup>濃度によって厳密に活性が制御される定常型NOS(cNOS)で、神経型(nNOS)と内皮型(eNOS)の二つが同定されている。もう一つは、通常発現しておらず、炎症性サイトカインや細菌内毒素(LPS)などによって刺激された細胞で発現誘導され、活性制御機構を有しない(常に活性型として存在する)誘導型NOS(iNOS)である。

このように、NOは全く性質の異なる酵素から産生されるため、局在や濃度によってその生理作用も大きく異なると考えられる。例えば、nNOSによる一過性のNO産生は神経伝達に関与し、eNOS由来のNOは血管機能の調節を担うことが示唆されている。一方、iNOSにより長時間に渡り過剰に産生されたNOは生体防御反応を担うとともに、逆に生体にとって障害因子として作用するという二面性を持つ。iNOSは全身の細胞で誘導されるが、脳組織においてもグリア細胞がiNOS産生機能を有することが当研究室から報告されている。神経系、とくに脳内におけるiNOSの役割については不明な部分が多く、まず第一にその発現機構の解明が重要と考えられている。

本研究では、ラットC6グリオーマ細胞を用いてlipopolysaccharide(LPS)とinterferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )の共刺激による顕著なiNOS誘導の細胞内機構を個々のシグナル伝達系ごとに解析を加え、LPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化とIFN- $\gamma$ によるJAK-Statシグナルの活性化がiNOS誘導に関与することを明らかにした。

## 2. iNOS誘導に対するherbimycin Aの影響

ラットC6グリオーマ細胞において、iNOSはLPS/IFN- $\gamma$ 共刺激により顕著に誘導されるが、各々単独の刺激では全く誘導されない。このLPS/IFN- $\gamma$ 共刺激によるiNOS誘導に関与する細胞内シグナルを同定するために、各種タンパク質作用薬によるiNOS誘導への影響を

調べた。その中で、チロシンキナーゼ阻害薬である herbimycin A が iNOS 誘導を強く抑制することが分かった。したがって、herbimycin A の作用点が iNOS 誘導に関与することが示唆された。

### 3. iNOS 誘導における NF- $\kappa$ B シグナリングの関与

LPS は、様々な細胞内シグナル因子を活性化することが知られている。その中で LPS による NF- $\kappa$ B の活性化は炎症性サイトカインの産生などを引き起こし、生体反応に密接に関与している。この LPS による NF- $\kappa$ B の活性化に対し、herbimycin A は濃度依存的な抑制を示した。したがって、NF- $\kappa$ B の活性化経路に herbimycin A の作用部位が存在する可能性が示唆された。NF- $\kappa$ B は通常 I $\kappa$ B $\alpha$  が結合した状態で細胞質内に留まっており、外的シグナルにより I $\kappa$ B $\alpha$  が分解されると核内移行が可能となる。I $\kappa$ B $\alpha$  上の二つのセリン残基 (Ser-32/36) をアラニンに置換した改変型 I $\kappa$ B $\alpha$  は分解を受けず、その過剰発現は効率よく NF- $\kappa$ B シグナルを遮断できる。そこで、改変型 I $\kappa$ B $\alpha$  を作製し、NF- $\kappa$ B シグナルを遮断することを試みた。その結果、改変型 I $\kappa$ B $\alpha$  の過剰発現は、iNOS 誘導を顕著に抑制した。したがって、LPS/IFN- $\gamma$  共刺激による iNOS 誘導に NF- $\kappa$ B が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

### 4. iNOS 誘導における JAK-Stat 系シグナリングの関与

IFN- $\gamma$  刺激によって、JAK1, JAK2 両チロシンキナーゼの活性化が誘発され、つづいて Stat1 のチロシンリン酸化と二量体形成および核内移行が起こる。このいわゆる JAK-Stat シグナルの活性化は、herbimycin A により濃度依存的に抑制された。したがって、JAK-Stat シグナルにもまた herbimycin A の作用部位が存在する可能性が示唆された。IFN- $\gamma$  は、JAK-Stat シグナル以外に ERK1 と ERK2 (p44/42 MAPK) を活性化することが知られている。ERK1 と ERK2 は、一般的に各種成長因子の刺激により低分子量 G タンパク質の Ras を介して活性化されることが知られている。Ras の N 末 17 番目のセリン残基をアスパラギンに置換した改変型 Ras はそれ以降のシグナルを効率よく遮断する。この改変型 Ras の過剰発現は IFN- $\gamma$  による ERK1 と ERK2 の活性化を抑制した。したがって、IFN- $\gamma$  は成長因子と同様に Ras を介して ERK1 と ERK2 を活性化することが分かった。また、改変型 Ras の過剰発現は iNOS 誘導を阻害しなかった。このことから、iNOS 誘導に Ras-MAPK 経路は必須ではなく、JAK-Stat シグナルが関わっていることが示唆された。

### 5. まとめ

本研究では、まずチロシンキナーゼ阻害薬の herbimycin A が顕著に LPS/IFN- $\gamma$  共刺激による iNOS 誘導を抑制することを示した。herbimycin A の作用部位を特定する過程で、LPS による NF- $\kappa$ B の核内移行と IFN- $\gamma$  による Stat1 の核内移行がともに herbimycin A によって抑制されることを示した。NF- $\kappa$ B の iNOS 誘導への関与を明確にするために、改変型 I $\kappa$ B $\alpha$  を過剰発現させて NF- $\kappa$ B シグナルを遮断することを試みたところ、iNOS 誘導は顕著に抑制された。したがって、LPS により活性化される複数のシグナルの中で NF- $\kappa$ B の活性化が iNOS 誘導に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、IFN- $\gamma$  が JAK-Stat シグナル以外に Ras-MAPK シグナルを活性化することを示した。さらに、改変型 Ras の過剰発現による Ras-MAPK シグナルの遮断によって iNOS 誘導が影響されなかったことから、Ras-MAPK シグナルは iNOS 誘導に必須ではなく、JAK-Stat シグナルが関与することが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

|    |     |      |
|----|-----|------|
| 主査 | 教授  | 野村靖幸 |
| 副査 | 教授  | 有賀寛芳 |
| 副査 | 助教授 | 大熊康修 |
| 副査 | 助教授 | 松本健一 |

## 学位論文題名

### グリア細胞における誘導型一酸化窒素合成酵素の 発現機構に関する研究

申請者は、グリア細胞における誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, NOS) の発現機構についての研究を進めてきたが、この度、ラットC6グリオーマ細胞においてherbimycin A (プロテインチロシンキナーゼ阻害薬) が細菌内毒素 (LPS) とIFN- $\gamma$ 共刺激によるiNOS発現を抑制するとともに、LPS刺激による転写因子NF- $\kappa$ Bの核内移行、ならびにIFN- $\gamma$ 刺激によるJak2キナーゼの活性化とそれに続く転写因子Stat1の核内移行を抑制すること、さらに、改変型IkB $\alpha$ を過剰発現させてNF- $\kappa$ Bシグナルを遮断するとiNOS誘導が抑制されることから、LPS/IFN- $\gamma$ によるIFN- $\gamma$ のiNOS誘導にLPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化およびIFN- $\gamma$ によるJak2-Stat1系の活性化が重要な役割を果たすという新知見を得、本学位論文として申請した。

シナプス可塑性や神経細胞死に関与することが知られている脳内NOは、定常型NOS(cNOS)とiNOSによって生成される。このうちiNOSは、グリア細胞においてLPSやサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ など) の刺激により誘導されるが、その発現機構は不明である。申請者は、脳グリア細胞のモデルとしてラットC6グリオーマ細胞を使用し、LPS/IFN- $\gamma$ 刺激でiNOSが誘導されること、またherbimycin Aがこれを強く抑制することを示した。つぎに、LPSはNF- $\kappa$ Bを活性化すること、この活性化をherbimycin Aが抑制することを示した。また、NF- $\kappa$ Bは通常IkB

シフトが協奏的に起こり、3位がカルボカチオンとなった中間体が生成すると考えられた。この中間体から、ジエン体およびシクロプロパン体が生成すると考えられた。一方、 $\alpha$ -4(20)-エポキシド体の場合、エポキシ環のC-O結合と平行な位置にあるC5-C6結合が、エポキシ環の開裂に伴いピナコール型の転位が誘起され、C環が5員環に縮環した化合物が得られると考えられた。従って、4(20)-エポキシド体とルイス酸の反応では、4(20)-エポキシド部分の立体化学が反映された転位反応が進行し、各々全く異なった生成物を与えることが示された。

次に、タキサン骨格の生合成中間体と考えられる6/12員環の二環性タキサン関連化合物の骨格構築を目的とし、タキサン骨格のB/C環の開環反応を検討した。そこでまず、C環3, 4位に二重結合を有する化合物を調製するために、Taxinine Aの5位水酸基の酸化反応を行った。Taxinine Aの5位水酸基を過ルテニウム酸イソプロピルアンモニウムで酸化して5-Oxotaxinine Aを調製したところ、室温でその一部が二量体へと変化し、さらに80℃に加熱することにより、定量的に二量体が単一生成物として得られることを見出した。その平面構造ならびに立体化学を、高分解能FABMS、2次元NMRおよびX線結晶解析により明らかにした。二量体は、2分子の5-Oxotaxinine AのC環エノン部分で、位置および立体特異的なDiels-Alder環化反応が進行して生成したものと推測された。この立体選択性は、タキサン骨格に特有のかご型構造、および19位メチル基による立体障害に起因するものと考えられた。

以上のように、Taxinineの誘導反応において、タキサン骨格の立体構造に起因する転位反応および立体選択性を伴った反応を見出した。また、立体化学が異なる4(20)-エポキシド体のルイス酸との反応や、Diels-Alder反応による二量化は、タキソイドの誘導反応としては最初であり、生成物も稀な構造を持つものが得られた。以上の結果から、これらの反応機構および構造に関して、タキソイドの化学的研究における新たな知見が得られた。

## 2. タキシニン誘導体の調製と抗癌剤蓄積増強作用

当研究室で天然のタキソイドを用いて行ったこれまでの研究結果から、多剤耐性癌細胞において抗癌剤蓄積増強作用を示すタキソイドの構造上の特徴として、5位にシンナモイル基を有していることを見出ししていた。そこで、これらの構造と活性の関係を詳細に調べる目的で、Taxinineの2位、9位、10位および13位にシンナモイル基、あるいは類するかさ高い官能基を導入した各種誘導体を調製した。

得られたTaxinine誘導体について、多剤耐性癌細胞を用いた抗癌剤ビンクリスチンの蓄積増強作用を調べた結果、2位、5位または13 $\alpha$ 位にかさ高い官能基を1つだけ持つ化合物にベラパミルと同程度から約1.5倍の蓄積増強作用が認められた。一方、2つ以上のベンゾイル基またはシンナモイル基をもつ誘導体や、かさ高い官能基を持たない誘導体では弱い活性であった。以上の結果から、タキサン化合物の抗癌剤蓄積増強作用の発現には、母核と側鎖、特にかさ高い官能基の組み合わせ、および相対的な位置関係が重要であると考えられ、Taxinineなどの非タキソール系タキソイドの抗癌剤蓄積増強作用の構造活性相関における新たな知見が得られた。