

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 崔 仁權

β -カテニンはもともと細胞間の接着に関与する細胞質性蛋白質として同定されていたが、近年 Wnt シグナル伝達系にも深く関与することが明らかになっている。Wnt シグナル伝達系の活性化による β -カテニンの安定化と核移行は癌化に直接的に関与することが明らかにされているが、 β -カテニンの核移行には importin が関与せず、特異的なメカニズムで核移行をすることが知られている。 β -カテニンの核外移行に関しても、APC の NES を利用した CRM1 依存的な核外移行だけではなく、 β -カテニン単独でも核外移行する活性を有する。現在タンパク質の核-細胞質間輸送には何種類もの異なる輸送経路が存在する可能性が示唆され、核-細胞質間の移行を阻害する薬剤のスクリーニングは、未知の輸送経路の同定や、輸送機構の解明につながる重要な研究課題になっている。従って、 β -カテニン特異的な核細胞質間輸送を制御する生理活性物質を単離、同定することは、その輸送機構の研究に有用であるばかりでなく、様々な癌の治療薬の開発としても極めて重要である。本論文は β -カテニンの核-細胞質間輸送に影響を与える新しい生理活性物質の探索と作用機構の解析について述べたものである。

(1) スクリーニング系の構築には、 β -カテニンの N 末端側に可視化のための EGFP を、また C 末端側に Rev NES を融合し、その発現制御は Tet ON システムが用いられた。本研究では β -カテニンに Rev NES を付加することで、LMB の添加により β -カテニンの局在変化を人工的に制御できることから、LMB 処理後の観察により β -カテニンの核内移行阻害物質を、さらに LMB 処理前の観察により LMB 様の CRM1 依存的な核外移行阻害物質の探索も併せて行った。微生物代謝産物の計 12196 サンプルを用いたスクリーニングの結果、カビ由来の代謝産物から既知物質である terrein、patulin、FF8181-A、FF8181-B、RES-1149-2 が新規活性として再発見された。

(2) terrein と patulin は β -カテニンの核外移行阻害活性または CRM1 依存的な核外移行阻害する新規活性物質として見出した。これらの物質の活性が β -カテニン特異的な核内移行の阻害か、あるいは CRM1 依存的核外移行の阻害であるかを調べるため、HeLa 細胞で NES 依存的に細胞質に局在する MEK1 の局在変化を観察したところ、terrein、patulin の両方とも MEK1 の核移行を促進したことから、 β -カテニンに特異的なものではなく、CRM1 依存的な核移行の阻害であることが明らかになった。CRM1 依存的な核移行を阻害する作用機構を調べるための分裂酵母を用いた実験から、terrein による CRM1 依存的核外移行の阻害は、LMB と同様に CRM1 の 529 番目のシステイン残基と共有結合することによって、CRM1 機能を阻害すると示唆された。一方 patulin は RevNES 活性を阻害しない濃度で親電子性物質のセンサーである Pap1 NES の活性を阻害することから、非選択的なシステイン修飾活性で CRM1 を阻害することが示唆された。

(3) FF8181-A、FF8181-B、RES-1149-2 は drimane sesquiterpene esters で β -カテニンの核移行阻害活性として見出され、主要な生産物として得られた FF8181-A を用いて、その作用機構の解析を行った。詳細な解析の結果、FF8181-A による核内 β -カテニンの低下は核移行の阻害ではなく、 β -カテニンの分解を促進することで見かけ上細胞質に蓄積させるようになることが明らかになった。FF8181-A による β -カテニンの分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 と ALLN、カルパインの阻害剤である calpeptin では阻害されなかったが、リソソームの阻害剤である chloroquine を処理することにより β -カテニンが安定化する様子が観察された。次いでリソソームを標識する試薬で細胞を染色したところ、無処理ではほとんど蛍光が見られなかったのに対し、FF8181-A 処理により多数のリソソームが形成されて、さらにオートファゴソームを標識する試薬で細胞を染色すると、FF8181-A 処理によりオートファゴソームが多数観察された。これらの結果より、FF8181-A は従来から知られている APC 依存的なプロテアソームによる β -カテニンの分解ではなく、リソソーム依存的な分解経路による β -カテニンの分解を促進するものと結論された。

本研究では蛍光タンパク質(EGFP)と Rev NES を融合した β -カテニンの細胞内局在変化を指標とする新たなスクリーニング系の構築を確立し、terrein、patulin、FF8181-A、FF8181-B、RES-1149-2 の新たな活性の同定に成功した。本スクリーニング系で得られた化合物の新しい生物活性は今後核-細胞質間輸送とタンパク質分解経路に置ける有用な材料として極めて利用価値の高いものになると考えられる。特に FF8181-A の活性はこれまで知られていない β -カテニンの分解経路の存在を示唆するものであり、本研究が今後の研究の 1 つの足がかりになると考えられる。よって審査委員一同は、本論文が、博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。