

論文審査の結果の要旨

氏名 **Awais, Muhammad**

本論文は5章より成る。第1章は序論であり、本論文の背景と化発した方法の原理について述べている。核内受容体(NR)のリガンド結合ドメイン(LBD)と、LXXLLモチーフを有するコアクチベーターペプチドとを、柔軟なリンカーで連結した。この融合タンパク質の両端に、シアン色蛍光タンパク質(CFP, ドナー)および黄色蛍光タンパク質(YFP, アクセプター)を連結した。CFPとYFPの励起および蛍光スペクトルは、CFPからYFPへの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に適したものである。アゴニストが結合することによってLBDの高次構造が変化し、コアクチベーターが受容体に結合する。続いてCFPがYFPに接近し、その結果FRETが増大する。一方、アンタゴニストが結合した場合にはLBDは先ほどとは異なる高次構造をとり、コアクチベーターは結合することができない。したがってFRETは起こらない。エストロゲン受容体(ER), アンドロゲン(AR), およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR γ)について可視化プローブをこのような原理に基づき生細胞内蛍光可視化プローブを開発し、SCCoR (Single Cell-Coactivator Recruitment)と命名し、このプローブを用いて行うアッセイ法を蛍光SCCoRアッセイ法と命名した。リガンド依存的な受容体LBDの高次構造変化とコアクチベーターの結合をFRET顕微鏡を用いてリアルタイムに観察することにより、これらの受容体に対する天然および合成リガンド(アゴニスト, アンタゴニスト)のスクリーニングを行っている。

第2章ではERのSCCoRプローブについて記述している。ER-SCCoRを作製するに当たり、ERのLBD(第305-550アミノ酸)とステロイド受容体コアクチベーター1のペプチド(HKILHRLQLQEG)とを連結した。この融合タンパク質の両端にCFPとYFPを連結している。このプローブをCHO-K1細胞に発現させて、エストロゲン様物質のスクリーニングを行っている。アゴニストである17 β -エストラジオール(E2)の添加によって、CFP/YFP蛍光強度比が減少(FRETが増大)することを見出している。一方、同様の条件下でアンタゴニストであるICI 182,780を添加したときには、何の変化も起きないことを見出した。内分泌かく乱物質(EDC)の多くはERに対して高い結合能を有している。E2およびいくつかのEDC(ジエチルstilbestrol[DES], ゲニステイン[Gen], ノニルフェノール[NP], ビスフェノールA[Bis-A])について、濃度依存的なFRET応答を測定してアッセイ・スクリーニングを行っている。この結果から、E2 > DES > Gen > NP > Bis-Aの順にコアクチベーターの結合能が低くなることを見出された。

乳がんの治療において、天然エストロゲンE2の活性を抑えるために抗エストロゲン剤(ERのアンタゴニスト)が用いられることがある。そこで、アンタゴニストであるICI 182,780および4-ヒドロキシタモキシフェン(OHT)のE2活性抑制能についても評価を行っている。ICI 182,780あるいはOHTの存在下では、

E2 活性は完全に抑えられている。また ICI 182,780 あるいは OHT を E2 で置換して活性を回復するためには、100 倍の濃度の E2 が必要であることが確かめられた。

第 3 章では AR の *SCCoR* プローブについて述べている。アンドロゲンは AR と結合して、生理学的には発生の段階における前立腺の形成に重要な役割を果たす一方、前立腺がんの発がんにも深く関与している。AR-*SCCoR* を作製するに当たり、AR の LBD と Tip-60 コアクチベーターのペプチドとを柔軟なリンカーで連結している。この融合タンパク質に CFP と YFP を連結し、顕微鏡下で FRET を観察した。DHT やテストステロンのようなアンドロゲン類の添加によってコアクチベーターは AR に結合し、FRET が誘起された。一方、抗アンドロゲン剤であるフルタミドやプロシミドンを添加した場合には FRET は起こらないことを見出している。FRET 応答はアンドロゲン濃度依存的であることが確かめられた。前立腺がんの治療において、天然アンドロゲンであるテストステロンを AR のリガンド結合部位から解離させるために、フルタミドのような抗アンドロゲン剤を投与することがある。テストステロンがフルタミドによって置換される様子もこの *SCCoR* プローブを正確に観測されている。

第 4 章では、PPAR γ の *SCCoR* プローブについて結果を述べている。PPAR γ は、がん、糖尿病、喘息、炎症性疾患などさまざまな病気を治療する上での分子標的となる。そこで、PPAR γ に対する *SCCoR* プローブを作製して、この受容体に対する内因性リガンドおよび外因性リガンド(□型糖尿病治療薬)のスクリーニングを行った。各種 PPAR γ リガンドについてプローブの濃度/応答曲線を記録し考察を行っている。

第 5 章では、本論文の結論を以下のようにまとめている。本研究では、生細胞内においてさまざまな NR に対する内因性、外因性リガンドのスクリーニングおよび特性評価を行うための、蛍光プローブを用いたアッセイ法の開発を行った。このプローブは、リガンド濃度依存性からアゴニストの強弱を高感度に識別することができた。また、アゴニストとアンタゴニストの識別を効率的に行うことができた。本アッセイ法は高スループットで各種リガンドを評価することができるため、未知のリガンドがアゴニスト、アンタゴニスト、あるいは部分アゴニスト/アンタゴニストのいずれであるかを識別するのに適しており、乳がん、前立腺がん、炎症性疾患、および糖尿病治療薬の候補物質の開発、スクリーニングへの応用が期待できる。

これらは理学の発展に寄与する成果であり、博士(理学)取得を目的とする研究として十分であると審査員一同が認めた。なお、本論文は各章の研究が複数の研究者との共同研究であるが、論文提出者の寄与は十分であると判断する。

従って、博士(理学)の学位を授与できると認める。