

## 審査の結果の要旨

氏名 大堀 誠

強力な抗炎症薬として臨床適用されるグルココルチコイドは、核内のグルココルチコイド受容体と複合体を形成し、サイトカイン産生に関わる転写因子 AP-1 を抑制することで抗炎症作用をもたらす。しかしながら、その複合体は転写制御領域に存在するグルココルチコイド応答配列に結合してエネルギー代謝などに関わる遺伝子発現を亢進させ、様々な副作用を惹起すると考えられている。グルココルチコイド応答配列を活性化せずに AP-1 を選択的に阻害する物質は、この副作用を回避し、強力な抗炎症作用を発揮する画期的な抗炎症薬になると期待される。「MAP キナーゼ系を標的とした抗炎症物質の探索」と題する本論文においては、抗炎症作用を有する AP-1 選択的阻害物質 FR148083 を見出し、本物質がシステインとの共有結合により ERK2、MEK1、MKK7 といった MAP キナーゼ系分子を標的とすることを明らかにしている。さらに、ERK を選択的に阻害する新規物質 FR180204 が抗炎症作用を有することを見出し、その標的認識機構について明らかにしている。

### 1. AP-1 阻害物質の探索及び抗炎症作用の評価

本論文では、先ず AP-1 及びグルココルチコイド応答配列制御レポータージーンアッセイを用いたハイスループットスクリーニングを実施し、AP-1 を選択的に阻害するカビ産生物質 FR148083 を見出した。本物質が慢性関節リウマチ (RA) モデルであるマウスコラーゲン関節炎 (CIA) を緩和すること、さらに抗 II 型コラーゲン (CII) 抗体産生や CII 誘導性遅延型過敏反応を抑制することを示した。これらの結果から、AP-1 選択的阻害物質 FR148083 が免疫抑制及び抗炎症作用をもつことを明らかにした。

### 2. AP-1 阻害物質 FR148083 標的分子の探索及び阻害機構の解析

次に、FR148083 の標的分子を探索し、FR148083 が ERK2、MEK1、及び MKK7 といった MAP キナーゼ系を標的とするキナーゼ阻害物質であることを明らかにした。また、分子進化系統樹解析から、FR148083 の標的選択性には蛋白質高次構造の類似性以外のファクターが大きく寄与していることを示した。FR148083 とその標的分子 ERK2 との複合体 X 線構造解析を実施し、FR148083 8'位炭素と ERK2 Cys166 S $\gamma$  との共有結合を特徴とする相互作用パターンを明らかにした。また、誘導體構造活性相関を検討し、FR148083 は ATP 結合サイトを認識して錯体構造を形成した後に ERK2 Cys166 と共有結合するという標的認識機構を示した。さらにアミノ酸配列アラインメント解析により、

FR148083 の標的分子は共通して上記 Cys166 を含む共通配列 KXCDFG を有することを示した。以上の結果から、FR148083 は ATP 結合サイトの構造を認識し、その後 KXCDFG 配列中のシステインと共有結合することで ERK2、MEK1、及び MKK7 といったキナーゼを阻害することを明らかにした。

### 3. ERK 阻害物質の探索及び抗炎症作用評価

次に、FR148083 標的分子の一つである ERK に対するハイスループットスクリーニングを実施し、ERK 選択的阻害作用を有する新規化合物 FR180204 を見出した。細胞内シグナル伝達経路を解析し、FR180204 が ERK 経路シグナル伝達を選択的に阻害し、AP-1 活性化を抑制することを明らかにした。マウス CIA の発症ならびに C II 反応性 T 細胞の活性化を FR180204 が抑制することを見出した。これらの結果から、ERK がマウス CIA の病態成立に重要な役割を果たすこと、さらに抗炎症薬や RA 薬物治療の標的として ERK が有望であることを示した。

### 4. ERK 選択的阻害物質の阻害機構の解析

FR180204 と ERK2 との複合体 X 線構造解析を実施し、FR180204 が ERK2 の ATP 結合サイトに結合することを明らかにした。また p38 $\alpha$  との配列アラインメント、複合体構造解析、及び 3 位誘導体の ERK 阻害活性測定を実施し、ERK の Gln105、Asp106 と 3 位アミン基との水素結合が活性並びに選択性発現に重要であることを示した。さらに、FR180204 誘導体である FR296110 と ERK2 との複合体結晶構造を解析し、ERK2 グリシンリッチループおよび Met108 主鎖カルボニル基が柔軟性に富む構造であること、それらの移動に伴って疎水性サブサイトが形成され、誘導体活性に影響を及ぼすことを示した。以上の結果より、FR180204 及びその誘導体を選択的に ERK を阻害する分子認識機構を明らかにした。

以上を要するに、本研究は MAP キナーゼ系を標的とした AP-1 阻害物質をスクリーニングにより見出し、マウスの関節リウマチモデルを用いてそれらが抗炎症作用を有すること、さらに X 線結晶構造解析によりそれら阻害物質が標的選択性をもつ機構を明らかにしている。特に、ERK を選択的に阻害する物質として、FR180204 が初めて見出している。以上の知見は、MAP キナーゼ系を標的とした抗炎症物質の探索に有益な情報を提供するだけでなく、関節リウマチを始めとする炎症性疾患治療の標的を考える上でも重要な手掛かりを与えており、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。