

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	金子 敦巳
学位	博士 (理学)
学位記番号	新大院博 (理) 第 465 号
学位授与の日付	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Development of Stimuli-responsive Anti-cancer Drug with Cell Penetrating Activity Using Ion-responsive DNA Aptamer (IRDAptamer) (イオン刺激応答性 DNA アプタマーを用いた細胞内移行性を有する刺激応答性抗がん剤の開発)
論文審査委員	主査 教授・古川 和広 副査 教授・俣野 善博 副査 教授・生駒 忠昭 副査 准教授・中馬 吉郎

博士論文の要旨

プロテインホスファターゼは Tyr ホスファターゼと Ser/Thr ホスファターゼに大別されている。Tyr ホスファターゼに関しては基質トラップ変異体を用いた基質同定法が見出されている一方、Ser/Thr ホスファターゼ一般に用いることのできる基質同定法はほとんど報告されていない。さらに、Ser/Thr ホスファターゼの結晶構造はほとんど解明しておらず構造情報が不足しており阻害剤や基質の探索が困難な状況にある。

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D はがん抑制 p53 経路を負に制御するホスファターゼであり、その過剰発現はがんの原因となることが知られている。一方、正常細胞において精子形成や免疫応答に関与していることが報告されている。そのため、PPM1D 特異的阻害剤は治療効果を示すのみならず深刻な副作用を示す可能性が示唆されている。よって、刺激応答性阻害剤は PPM1D の時空間的制御を行うための機能性分子として適しているといえる。本博士論文は以下に示す主要な第4章から形成されている。

第1章：Ser/Thr ホスファターゼ特に PPM1D に関する一般的事項を示した。PPM1D の性質や機能、細胞内局在、正常細胞における発現組織、PPM1D 阻害剤開発の状況について記述した。

第2章：イオン応答性 G-quadruplex DNA を母体としてデザインしたイオン応答性 DNA アプタマー (IRDAptamer) ライブラリを用いて PPM1D 特異的イオン応答性アプタマーの探索を行い、PPM1D 特異的阻害剤 M1D-Q5F を同定した。M1D-Q5F は一価イオンに応答し構造、結合能、阻害効果に変化することが明らかになった。さらに、PPM1D 過剰発現細胞 MCF7 細胞に対して抗がん活性を示した。これらの結果から、IRDAptamer ライブラリから同定した M1D-Q5F アプタマー-PPM1D を標的とした抗がん剤として機能することが示唆された。

第3章：PPM1D 特異的 DNA アプタマー M1D-Q5F の構造活性相関を行ったところ、低分子量の M1D-Q5M がイオン応答性を維持し、リード化合物である M1D-Q5F を上回る阻害効果を示すことが明らかとなった。M1D-Q5M は一価イオンに応答しヌクレアーゼ耐性、血清安定性を示し、G-quadruplex 構造を形成することにより分解耐性を示すことが明らかとなった。乳がん細胞中においてはがん抑制 p53 経路の活性化と細胞増殖抑制効果を示した。細胞内における機能を検証する過程で予期せず、M1D-Q5M は MCF7 細胞に対して細胞膜

透過性を持つことを見出した。共焦点顕微鏡を用いた局在解析の結果、蛍光色素 Cy3 を修飾した M1D-Q5M は細胞膜を透過し、MCF7 細胞の細胞質のみならず核内に到達することが明らかとなった。これらの結果から、IRDAptamer ライブラリはイオン応答性、細胞膜透過性を持つ新たな医薬品開発に応用できる可能性が示唆された。

第4章：FCP/SCP ファミリーの Ser/Thr phosphatase Scp1 に対する新規基質・阻害剤同定法の開発を行った。今回新たに BeF<sub>3</sub> を用いたリン酸化ミミックファージディスプレイを実施し、新たな Scp1 結合分子の探索を行った。ペプチド提示ファージをスクリーニングしたところ、BeM12-1 ペプチドを BeF<sub>3</sub> 依存的 Scp1 結合ペプチドとして同定した。BeM12-1 ペプチドは Scp1 の活性中心に結合する Scp1 特異的阻害剤として働くことが明らかとなり、PMPD 法は FCP/SCP ファミリーホスファターゼの基質・阻害剤探索に応用可能であることが示された。

#### 審査結果の要旨

タンパク質のリン酸化はプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼにより制御されており、その制御破綻はがんを含む様々な疾患の原因となる。プロテインホスファターゼは Tyr ホスファターゼと Ser/Thr ホスファターゼに大別されている。Tyr ホスファターゼに関しては基質トラップ変異体を用いた基質同定法が見出されている一方、Ser/Thr ホスファターゼ一般に用いることのできる基質同定法は未だに開発されていない。さらに、Ser/Thr ホスファターゼの結晶構造はほとんど解明しておらず構造情報が不足しており阻害剤や基質の探索が困難な状況にある。本論文では、独自にデザインしたイオン応答性 DNA アプタマー(IRDAptamer) library およびリン酸化ミミックファージディスプレイ法(PMPD 法) は標的タンパク質に対する新規基質、阻害剤を探索する強力なツールとして応用可能であることが示唆された。特に IRDAptamer library は細胞内タンパク質を含む任意の標的タンパク質に対し細胞膜透過性を有する刺激応答性阻害剤、機能制御分子の開発に応用可能であると考えられる。

これらの本博士論文に関連する参考論文として、以下に示す 2 点の原著論文にて研究成果を報告している。

1. 金子敦巳、亘美佑、水沼正昂、古川和広、中馬吉郎 他 1 名  
: Development of Specific Inhibitors for Oncogenic Phosphatase PPM1D by Using Ion-Responsive DNA Aptamer Library  
(イオン応答性 DNA アプタマーライブラリを用いた発がんホスファターゼ PPM1D 特異的阻害剤の開発)  
令和 2 年 10 月発行 Catalysts  
Vol. 10、no. 1153、pp 1~17 に発表

2. 吉田拓弥、山崎一樹、金子敦巳、古川和広、中馬吉郎 他 2 名  
: Identification of a Specific Inhibitor of Human Scp1 Phosphatase Using the Phosphorylation Mimic Phage Display Method  
(リン酸ミミックファージディスプレイを用いたヒト Scp1 ホスファターゼ特異的阻害剤の同定)  
令和 1 年 10 月発行 Catalysts  
Vol. 9、no. 842、pp 1~16 に発表  
よって、本論文は博士(理学)の博士論文として十分であると認定した。