

# 論文審査の結果の要旨

氏名 田代晋也

本論文およびそれに関連した研究は、DJ-1 機能阻害剤の開発をめざして行われたものである。

本論文は 5 章から構成されており、概要は以下のとおりである。

第 1 章では、序論として、機能未知蛋白質 DJ-1 が関与する疾患の特徴、DJ-1 の生化学的特徴、研究目的に関して述べられている。これまでの研究結果から DJ-1 は、パーキンソン病、癌など、多くの先進国で社会問題となっている慢性疾患への関与が示唆されており、分子生物学、生化学の重要な研究対象の一つとして現在も解析が進められている。これまでの分子生物学的な解析から、DJ-1 は細胞内の酸化ストレス、それによって誘起される細胞死を抑制することなどが明らかとなった。また生化学的解析からは、DJ-1 は二量体を形成することが明らかとなり、さらに Cys106、Glu18、His126 の三残基が、大腸菌等のホモログ内での保存性が高く、酸化ストレス抑制機構に重要な残基として同定された。しかし、これらの結果にもかかわらず、DJ-1 の生化学的機能については、現在多くの仮説が提案されているものの、いずれの機能が酸化ストレス抑制機構に重要であるかは特定されていない。またその帰結として、癌標的蛋白質としての DJ-1 の評価も進んでいない。本研究では、このような状況を打開するため、機能解析、癌標的評価の双方へと応用可能な DJ-1 の機能阻害剤の開発を目標とした。具体的には、DJ-1 の Cys106 周辺のポケットへ結合し、酸化ストレス抑制機構を阻害する小分子の同定を目指した。

第 2 章では、DJ-1 結合化合物探索のためになされた、小分子スクリーニングについて述べられている。スクリーニング手法としては、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いたフラグメントスクリーニング法を採用した。本手法は、ケミカルスペースの効率のよい探索を可能とするフラグメントライブラリと、DJ-1 と化合物の結合を高感度で検出する SPR を組み合わせたものである。本スクリーニングにより、DJ-1 結合化合物として生体内化合物 1 が選択された。等温滴定型熱量測定法(ITC)、共結晶構造解析などにより化合物 1 は DJ-1 に対して  $K_D=2.5 \mu\text{M}$  の親和性で結合すること、当初の目標通り Cys106 へと結合することが明らかとなった。結合は共有結合を介したものであった。分光光度計、SPR を用いた解析から、この共有結合が溶液中でも形成され、可逆的であることも明らかとなった。

続く第 3 章では、これまでに提案されていた DJ-1 の機能(プロテアーゼ活性・銅結合活性・グリオキシラーゼ活性)について追試およびより詳細な検証を行い、その中の一つ、グリオキシラーゼ活性を化合物 1 が阻害することを示した。上記 3 種の活性を検証した理由としては、これらの機能は DJ-1 の Cys106 および DJ-1 の酸化ストレス抑制機構と関連が深いと考えられたこと、データの信頼性が高いと考えられたこと、そしてこれらの機能に関して複数の研究グループが検証していることがある。検証の結果、DJ-1 のプ

ロテアーゼ活性・銅結合活性は本研究では確認されなかった。これは DJ-1 の Cys106 が環境の変化に非常に敏感で、これらの機能については再現性を得るのが難しいためと推測される。なお、銅結合については確認されなかったが、それと並行してなされた亜鉛との結合実験では、DJ-1 は亜鉛との結合を示した。ITC、結晶構造解析からこの結合の親和性は  $K_D=0.6 \mu\text{M}$  となり、Cys106、Glu18 と結合していた。グリオキシラーゼ活性については文献値に近い再現性が得られた。続いて行われた阻害実験では、化合物 1 は DJ-1 のグリオキシラーゼ活性を阻害し、 $IC_{50}=11.7 \mu\text{M}$  となった。

第 4 章では、第 2 章で得られた化合物 1 の伸長・親和性向上を試みている。化合物 1 と DJ-1 の共結晶構造解析に基づき、化合物 1 の中で親和性に特に強く寄与している箇所を、DJ-1 変異体を用いた ITC により解析、決定した。解析結果から示された、親和性へと大きく寄与していない二か所について伸長を行い、結果化合物 1 と比較して親和性が 30~40 倍程度強い阻害剤が得られた。これは本研究の目標であった、DJ-1 の機能解析、癌標的蛋白質としての評価に十分な親和性である ( $K_D \approx 100 \text{ nM}$ )。阻害活性も親和性向上に伴い向上していた。

第 5 章ではこれらのスクリーニング、機能解析、化合物伸長の結果を総括し、そこから得られた知見について考察を加えている。

本研究では、DJ-1 に結合する生体内化合物を取得、伸長し、最終的に得られた化合物が DJ-1 生化学的機能を阻害することまでを明らかにした。研究の新規な点は二点あり、①生体内化合物によって DJ-1 が制御されている可能性を示したこと、②DJ-1 の機能解析、癌標的蛋白質としての評価に十分な親和性の阻害剤を見出したことである。

これらの結果は、今後の DJ-1 関連研究、ひいてはパーキンソン病や癌研究を進めるうえで大きな助けとなることが期待され、高い新規性・完成度を備えている。

したがって博士(生命科学)の学位の授与を認める。

以上 2126 字