

# 博士學位論文

内容の要旨  
および  
審査の結果の要旨

薬学研究科

第38号

平成28年5月

徳島文理大学

## は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

## 目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
甲第43号	鈴木雅代	グアニン酸化損傷オキサゾロンに対するDNA ポリメラーゼ反応の解析	1
甲第44号	高岸照久	ウエルシュ菌 $\alpha$ 毒素の受容体探索と作用機構の解析	8
甲第45号	牧野宏章	大環状ビスビベンジル類アステレリンA及び カビクラリンの全合成	14
甲第46号	宮本和明	腸管病原性ウエルシュ菌F5603株中のバクテリオシン 遺伝子保有プラスミドについての検討	20

氏名	すずき まさよ 鈴木 雅代
本籍	大阪府
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第43号（課程博士）
学位授与年月日	平成28年3月15日
学位授与の要件	学位規定第4条第1項該当（課程博士）
学位論文の題目	グアニン酸化損傷オキサゾロンに対するDNAポリメラーゼ 反応の解析
指導教員	教授 宮澤 宏
論文審査委員	(主査) 教授 岩田 誠
	(副査) 教授 花岡 文雄
	(副査) 准教授 大岡 嘉治
	(副査) 准教授 大島 隆幸

# 論文の内容要旨

鈴木雅代

DNA は体内外からの様々な酸化ストレスに常に曝されており、特に DNA 塩基のうち、グアニンが最も酸化を受けやすい。そうして生成したグアニン酸化損傷に対するアデニンやグアニンの誤取り込みは、最終的にグアニンからチミンやシトシンへの点突然変異である G:C-T:A トランスバージョンおよび、G:C-C:G トランスバージョンの原因となる。これらの点突然変異は様々な遺伝子で検出されており、例として、がん抑制遺伝子である *p53* 遺伝子や、がん遺伝子である *K-ras* 遺伝子があげられる。特に、がん遺伝子である *K-ras* 遺伝子の活性型変異の原因となる codon 12 における G:C-C:G トランスバージョンや G:C-T:A トランスバージョンの発生は、大腸がんや膵がん、肺がんといった各種のがんで高頻度に検出されている。そのため、これらの点突然変異の発生メカニズムについて研究することは点突然変異により生じるがんの発症メカニズムの解明において重要である。

様々な条件下で生成する代表的なグアニン酸化損傷である 8 オキソグアニン (8-oxoG) は、最も研究が進んでおり、8-oxoG は G:C-T:A トランスバージョンを引き起こす損傷であると考えられている。一方、8-oxoG はグアニンとは塩基対を形成できず、相補鎖側にグアニンが挿入されない。つまり、G:C-C:G トランスバージョンは他のグアニン酸化損傷によって引き起こされると考えられる。

グアニンの酸化および 8-oxoG のさらなる酸化により生成するイミダゾロン (Iz) が加水分解されることでオキサゾロン (Oz) が生成する。これまでの研究から、Oz に対するグアニンの取り込みが DNA ポリメラーゼ (Pol)  $\alpha$  および Pol  $\beta$ 、Pol  $\gamma$ 、Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\eta$ 、Pol IV、Klenow Fragment exonuclease<sup>-</sup> (KF exo<sup>-</sup>) に共通することが明らかとなっており、Oz は G:C-C:G トランスバージョンの発生に関与するグアニン酸化損傷であると考えられる。

一方、Oz 以外にも G:C-C:G トランスバージョンの原因となる可能性があるグアニン酸化損傷として、8-oxoG のさらなる酸化の主生成物であるグアニジノヒダントイン (Gh) とその異性体のイミノアラントイン (Ia)、そしてスピロイミノジヒダントイン (Sp) が知られている。KF exo<sup>-</sup>はこれらの損傷に対してアデニンとグアニンを取り込み、

その取り込み効率は Gh/Ia の方が Sp よりも高いことが明らかとなっている。また、Oz に対するグアニンの取り込みや Oz を乗り越えた伸長効率は Gh/Ia の場合と比較すると良いことが明らかとなっており、Oz の方が Gh/Ia や Sp よりも G:C-C:G トランスバージョンを誘導しやすいことが示唆されている。

そこで、本研究では G:C-C:G トランスバージョンの発生機構の解明において重要な損傷として Oz に着目した。第 2 章と第 3 章では計算科学を用いて、Oz および Gh/Ia、Sp とグアニンの塩基対の安定性やこれらの塩基対を含む二本鎖 DNA の歪み度合いを算出し、DNA ポリメラーゼによるグアニンの取り込み効率や損傷乗り越え DNA 合成効率が Oz > Gh/Ia > Sp となった以前の実験結果について考察した。その結果、2 本の水素結合を有する Oz:G 塩基対は、3 本の水素結合を有する Ia:G や Sp:G 塩基対よりも不安定であることが示唆され、これは塩基対の安定性が水素結合の数に依存しているためであると考えられた。一方、 $sp^3$  炭素をもつ Gh/Ia や Sp に対して Oz は  $sp^3$  炭素をもたず、二本鎖 DNA を歪めにくく、天然の DNA の構造と似ていることが予測された。つまり、その結果 Gh/Ia や Sp を含む損傷 DNA に比べると、Oz を含む損傷 DNA における DNA ポリメラーゼのひっかかりが少なく、実際の DNA ポリメラーゼ反応における塩基の取り込みや損傷乗り越え DNA 合成の効率が良かったと考えられる。言い換えると、DNA 複製における Oz に対するグアニンの取り込みの影響は少なく、その結果誤った情報のまま複製が継続され、最終的に他の損傷に比べると G:C-C:G トランスバージョンを生じやすくなる。そのため、Oz を含む損傷 DNA がどのような複製過程を経るのかを明らかにすることが必要とされる。





前述したように、これまでに Pol  $\alpha$  および Pol  $\beta$ 、Pol  $\gamma$ 、Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\eta$ 、Pol IV、KF exo<sup>-</sup> が Oz に対して取り込む塩基については解析されてきた。しかし、Oz を含む損傷 DNA の複製機構や DNA 合成における Oz の影響については未解明な部分も多い。そこで、第 4 章から第 6 章では Oz を含む損傷 DNA に対する DNA ポリメラーゼ反応を解析した。第 4 章では、DNA 複製の中心的役割を担う DNA ポリメラーゼおよび損傷乗り越え DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼのうち、Oz に関して未解析であった Pol  $\delta$ 、Pol  $\zeta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 の Oz に対する損傷乗り越え反応および塩基取り込み反応を解析した。また、第 5 章では、これまでに Oz に対する塩基の取り込みを解析した DNA ポリメ

ラーゼのうち、REV1 以外の DNA ポリメラーゼが共通してグアニンを取り込むのは、Oz:G 塩基対の安定性に寄与していると考え、Oz:G および Oz:A、Oz:C、Oz:T 塩基対の塩基対の安定性を DNA ポリメラーゼ反応と熱変性実験により解析した。さらに、第 6 章では、グアニン連続配列がグアニン単体よりもさらに酸化されやすいことに着目し、KF exo<sup>-</sup> および Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$ 、Pol  $\zeta$ 、Pol  $\eta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 を用いて Oz 連続配列に対する DNA ポリメラーゼ反応を解析した。

その結果、第 4 章および第 6 章の研究結果および以前の研究報告から、Oz に対するグアニンの取り込みが、Oz が単体の場合は REV1 を除く全ての DNA ポリメラーゼに共通しており、Oz 連続配列の場合は REV1 と KF exo<sup>-</sup> を除く DNA ポリメラーゼに共通していることが明らかとなった。以上に加え、第 5 章では Oz がグアニンと最も安定な塩基対を形成できることを明らかにしており、DNA ポリメラーゼによる塩基の取り込み解析の結果とともに、Oz が G:C-C:G トランスバージョンの原因となるグアニン酸化損傷であることを強く示唆している。そして、グアニン酸化損傷である Oz に対してシトシンを優先的に取り込む DNA ポリメラーゼは REV1 のみであることから、DNA 複製過程において、Oz が非常に強い変異原性を有していることが明らかとなった。さらに、Oz が連続配列として生成した場合、多くの DNA ポリメラーゼによる DNA 合成が阻害する重篤な損傷となり得ることが明らかとなった。

一方、Pol  $\zeta$  は Oz 単体だけでなく他の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を阻害するような Oz 連続配列でさえ、効率良く乗り越えて DNA を合成できることが明らかとなった。この結果より、Oz 連続配列が生成した場合でも、Pol  $\zeta$  がリクルートされることで、Oz 連続配列による DNA 複製の停止を回避できる可能性があるのではないかと考えている。また、REV1 は Oz に対してシトシンを優先的に取り込む唯一の DNA ポリメラーゼであり、この REV1 による Oz に対するシトシンの優先的な取り込みにより、Oz から生じる G:C-C:G トランスバージョンの発生を回避できることが示唆された。

今後は、様々な細胞を用いて Oz から生じる突然変異のスペクトルを解析することで、生体内における Oz の突然変異誘発能について詳細に解析することが必要となるだろう。そうして得られた結果と、本研究をはじめとした *in vitro* での研究結果を総合すると最終的に Oz から生じる点突然変異の発生機構の解明につながると考えられる。

学位記号	甲 第 号	論文提出者	氏名 鈴木 雅代
学位論文題名 グアニン酸化損傷オキサゾロンに対する DNA ポリメラーゼ反応の解析			
学位の種類 博士 ( 薬学 )			
審査委員	専 攻 等	職 名	氏 名
	(主査) 生体防御学	教 授	岩田 誠 
	(副査) 学習院大学 大学院自然科学研究科 生命科学専攻・分子生 物学	教 授	花岡 文雄 
	(副査) 生体防御学	准教授	大岡 嘉治 
	(副査) 微生物学	准教授	大島 隆幸 

### 学位論文内容および審査の要旨

酸化ストレスによる DNA への点突然変異の誘導は、発がんの直接的な原因となりうる。DNA 塩基の中ではグアニンが最も酸化され易く、その酸化損傷は、アデニンやグアニンの誤った取り込みによる G:C-T:A トランスバージョンおよび G:C-C:G トランスバージョンの発生要因となる。グアニン酸化損傷産物のうち、これまで最も研究されてきた 8 オキソグアニン (8-oxoG) は G:C-T:A トランスバージョンを引き起こす。一方、GC-C:G トランスバージョンを引き起こすグアニン酸化損傷としては、オキサゾロン (Oz) が最も重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、その詳細については不明の点が多く残されていた。

本論文では、この G:C-C:G トランスバージョンを引き起こす要因としての Oz に着目し、Oz を含む DNA 二本鎖の歪みを解析した上で、さらに種々の DNA ポリメラーゼ反応の鋳型としてどのような塩基を重合させるかについて詳細に解析した。

第1章(序論)では、がん遺伝子である *K-ras* 遺伝子のコドン 12、13 で G:C-C:G トランスバージョンが高頻度に起きていることなどの例を挙げて、この変異の重要性をまず述べている。そして、G:C-C:G トランスバージョン発生機構における Oz の重要性と Oz の産生機序について解説し、さらに Oz を含む損傷 DNA に対する多種のポリメラーゼによる反応解析が重要であることを述べて、本論文の主旨を説明している。

第2章では計算科学の手法を用い、グアニンの各種酸化損傷とグアニンとの塩基対の安定化エネルギーを算出し、所属講座の Kino 等の数種の DNA ポリメラーゼを用いた実験結果の説明を試みた。その結果、イミノアラントイン(Ia)、グアニジノヒダントイン(Gh)、スピロイミノヒダントイン(Sp)、そして Oz の順にグアニンとの安定化エネルギーが低下する、すなわち Oz:G 塩基対は必ずしも安定ではないという結果となり、塩基対の安定性だけでは、Kino らの実験結果が説明できないことが明らかになった。

第3章では前章に引き続いて計算科学的な解析を行い、グアニンとグアニン酸化損傷との塩基対を中心に含む 3 塩基対の DNA 二本鎖モデルの不安定化エネルギーを算出した。その結果、当該塩基対だけでなく、その前後の塩基対の種類によって DNA 二本鎖の安定性が影響を受けること、そして 5'側が A:T で 3'側が G:C の場合をモデルとしてこの隣接する塩基対の両方を考慮すると、G:Oz を含む DNA 二本鎖の歪みは、G:Ia や G:Sp を含む DNA の歪みよりも小さいことが判明した。これは、過去の数種の DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え DNA 合成の効率についての Kino 等の実験結果と一致するものであった。

第4章では、幅広く各種の DNA ポリメラーゼを発現・精製し(一部は市販品を使用)、それらを用いて Oz に対する塩基の取り込みの特異性を調べ、さらに反応速度論的な解析を行った。その結果、REV1 と Pol  $\zeta$  が Oz を含む DNA の複製に重要であり、前者は Oz に対して C を重合し、遺伝情報の保持に働くことが分かった。一方、後者は Oz に対して G、A、T、C のいずれをも重合し、突然変異を誘発することが分かった。その他の DNA ポリメラーゼ、Pol  $\delta$  (p125 単体および full complex)、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$  はいずれも Oz に対して低い効率でしか塩基の取り込みを起こさないが、起こした際には、誤った塩基を重合した。

第5章では、Oz を含む塩基対の安定性が DNA の伸長反応にどのような影響を与えるかを、プライマー伸長反応と Oz を含む DNA 二本鎖の熱変性実験で調べた。その結果、DNA ポリメラーゼの種類(Pol  $\beta$ 、Klenow 断片、Pol  $\eta$ )によらず、Oz:G 塩基対を越えて伸長する効率が Oz:C、Oz:A、Oz:T 塩基対の場合よりも高いことが分かった。また熱力学的な安定性においても、Oz:G 塩基対は Oz:C、Oz:A、Oz:T 塩基対よりも有意に高いことが明らかとなった。

第6章では、鋳型 DNA に Oz が連続して存在する場合の各種 DNA ポリメラーゼのプライマー伸長反応への影響を調べた。その結果、Klenow 断片、Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$ 、Pol  $\iota$ 、REV1 は Oz 連続配列の 3'側の Oz に対して辛うじて一塩基を取り込むが、5'側の Oz に対する塩基の



取り込みは強く阻害されることが判明した。Pol  $\kappa$  は 3'側の Oz に対してでさえ塩基の取り込みが見られなかった。一方、Pol  $\eta$  は 3'または 5'側の Oz で停止し、Pol  $\zeta$  は誤りがちではあるが、Oz 連続配列を乗り越えた DNA 合成を行えることが分かった。

これらの結果を総合して、Oz が特に真核生物において G:C-C:G トランスバージョンの発生に強く関与していることが示唆された。

## 1) 論文審査結果の要旨

本論文は、計算科学と生化学・分子生物学を上手く組み合わせることで、グアニン酸化損傷オキサゾロンが、G:C-C:G トランスバージョンによる DNA 点突然変異の発生機序にきわめて重要な役割を果たすことを強く示唆した。また、オキサゾロンを含む DNA の複製には、Pol  $\zeta$  と REV1 が重要であること、そして前者が点突然変異を誘導するのに対し、後者は遺伝情報の保持に働くことが示唆され、酸化ストレスによる DNA 点突然変異誘導とその制御に新たな端緒を開く可能性があり、意義深い。これらの結論を導くためのデータは、質、量ともに十分であり、また、参考文献を適切に引用しており、理解しやすい論文といえる。

よって本論文は博士(薬学)の学位に相応しいものとする。

氏名	たかぎし てるひさ 高岸 照久
本籍	徳島県
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	甲第 44 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
学位授与の題目	ウエルシュ菌 $\alpha$ 毒素の受容体探索と作用機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 姫野 誠一郎 (副査) 教授 深田 俊幸 (副査) 教授 赤木 正明 (副査) 外部 小林 秀丈 (広島国際大学 薬学部)

## 論文の内容要旨

### ウエルシュ菌 $\alpha$ 毒素の受容体探索と作用機構の解析

高岸照久

(指導教員 永浜 政博)

ウエルシュ菌は創傷部位より侵入し、ガスの発生を伴う組織の破壊を主症状とするガス壊疽を発症する。近年では、中国四川省大地震の際、ガス壊疽によって多くの人々が亡くなったことから、本菌感染症に対する治療、及び、感染拡大の阻止が急務となっている。ウエルシュ菌が産生する  $\alpha$  毒素は、ガス壊疽の主要な病原因子として知られている。 $\alpha$  毒素の特徴は、毒素自身が酵素活性としてホスファチジルコリン (PC) を分解するホスホリパーゼ C (PLC) 活性を有することである。ウエルシュ菌感染の特徴的な所見としては、感染組織周辺の血管内で、好中球の集積と接着活性の亢進による異常な凝集体を形成することである。これまでに、 $\alpha$  毒素は好中球を活性化することが報告されている。そこで、ウエルシュ菌感染によって誘導される血管内での好中球の集積に、 $\alpha$  毒素がいかに関与しているかを詳細に解析した。

ケモカインである IL-8 は、好中球の遊走などに重要な因子であり、マウスでは、ヒト IL-8 のホモログとして Growth-related oncogene (GRO) と Keratinocyte-derived cytokine (KC) が知られている。そこで、マウスでの  $\alpha$  毒素による好中球の集積に GRO/KC が関与するかを検討したところ、 $\alpha$  毒素を投与したマウスでは、GRO/KC の遊離が増加した。さらに、 $\alpha$  毒素と抗 GRO/KC 抗体を同時に投与したマウスでは、 $\alpha$  毒素を単独投与したマウスと比較して、肺組織における好中球数が大きく減少した。以上の結果より、 $\alpha$  毒素は GRO/KC、すなわち、IL-8 の遊離を惹起し、肺での好中球集積を誘導すると考えられる。

次に、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いて、 $\alpha$  毒素による IL-8 の遊離を検討したところ、 $\alpha$  毒素は A549 細胞から IL-8 の遊離を促進した。所属する研究室では、 $\alpha$  毒素はチロシンキナーゼ関連受容体である TrkA に作用することを明らかにしている。そこで、 $\alpha$  毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離に、TrkA が関与するかどうかを検討したところ、TrkA 阻害剤や TrkA をノックダウンした A549 細胞では、 $\alpha$  毒素による IL-8 遊離が抑制された。次に、IL-8 の遊離に MAPK カスケードの活性化が密接に関与し、さらに、TrkA の下流シグナルに MAPK 系が存在することが報告されている。そこで、 $\alpha$  毒素による MAPK 系の活性化を種々の抗 MAPK リン酸化抗体を用いて検討した。その結果、 $\alpha$  毒素は ERK1/2 と p38 MAPK のリン酸化を誘導し、一方、これらの作用は TrkA 阻害剤で抑制された。次に、IL-8 の発現には転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化が関与することが知られている。そこで、 $\alpha$  毒素による IL-8 遊離における NF- $\kappa$ B の役割について検討すると、 $\alpha$  毒素は NF- $\kappa$ B を強くリン酸化し、さらに、NF- $\kappa$ B 阻害剤で  $\alpha$  毒素による IL-8 遊離が抑制された。NF- $\kappa$ B は、活性化により細胞核内に移動して遺伝子転写を誘導すると報告されている。本研究において、 $\alpha$  毒素は NF- $\kappa$ B の核内移行を強く誘導し、この核内移行に ERK1/2 が関与し、一方、

p38 MAPK は関与しないことが判明した。以上より、 $\alpha$  毒素は A549 細胞の TrkA に作用して、細胞内で ERK1/2 経路を介して IL-8 遊離を強力に惹起することが判明した。

他の細菌毒素では、糖脂質であるガングリオシドを特異的に認識して結合する例が報告されている。そこで、ガングリオシドに着目し、 $\alpha$  毒素の受容体の探索を行った。まず、ガングリオシドの生合成を阻害する PPMP とガングリオシドのシアル酸部位を特異的に切断するノイラミニダーゼで処理した A549 細胞における  $\alpha$  毒素の結合と IL-8 遊離を測定した。その結果、いずれも、処理濃度に依存して毒素の結合と IL-8 遊離を大きく抑制した。次に、 $\alpha$  毒素とガングリオシドとの結合について、種々のガングリオシドを固定化した糖脂質アレイを用いて網羅的に解析した。その結果、 $\alpha$  毒素は GM1a に特異的に結合することが明らかとなった。そこで、BODIPY-GM1a を A549 細胞に取り込ませ、擬似的に細胞膜上に GM1a を発現させた A549 細胞を用いて、 $\alpha$  毒素と GM1a との結合を観察すると、細胞膜表面で GM1a のクラスター化が多数観察され、このクラスター形成部位に  $\alpha$  毒素は局在していた。以上より、 $\alpha$  毒素は GM1a を特異的に認識して結合し、細胞膜上で GM1a のクラスター形成を誘導することが判明した。

次に、GM1a と本毒素の病原性との関係を解明するため、GM1a を含むガングリオシドが欠損した GalNacT<sup>-/-</sup>マウス (GM1a 欠損モデル) と GM1a 以外の数種のガングリオシドが欠損した ST<sup>-/-</sup>マウス (コントロールモデル) を用いて、 $\alpha$  毒素と GM1a との関係について *in vivo* レベルで解析した。その結果、野生型マウスや ST<sup>-/-</sup>マウスと比較して、GalNacT<sup>-/-</sup>マウスでは  $\alpha$  毒素の致死活性が著しく低下していた。この結果から、GM1a と  $\alpha$  毒素の結合が、本毒素の病原性に非常に重要な役割を演じていることが推察された。次に、 $\alpha$  毒素分子内で GM1a と結合する領域の同定を行った。ボツリヌス毒素は、特異的に GM1a に結合し、ガングリオシド結合領域 (H...SXWY...G) を有することが報告されている。そこで、 $\alpha$  毒素分子内で同様の配列を検索すると、N ドメイン (触媒ドメイン) と C ドメイン (結合ドメイン) を結ぶループ領域に、相同性を示す領域が認められた。そのループ領域内で、特に、W84A と Y85A の変異  $\alpha$  毒素は、GM1a との結合を示さなかった。以上の結果より、 $\alpha$  毒素のループ領域の 84 位 Trp と 85 位 Tyr が GM1a を認識後、GM1a のクラスター化に伴い、一連のシグナル伝達の活性化を惹起することが判明した。

これまでより、 $\alpha$  毒素による細胞膜上で GM1a のクラスター形成が引き金となり、IL-8 遊離を惹起することが明らかとなったが、GM1a のクラスター形成メカニズムは不明である。 $\alpha$  毒素は自身の PLC 活性により細胞での DAG 産生を誘導する。 $\alpha$  毒素の酵素活性欠損変異体 (H148G) では、毒素活性を示さないことから、毒素自身が有する PLC 活性が、細胞膜上でリン脂質を切断することで毒性発現を誘導すると考えられる。そこで、 $\alpha$  毒素が作用する初期のステップにおいて、毒素自身の PLC 活性が細胞膜上での GM1a のクラスター形成に関与するかどうかを検討した。その結果、 $\alpha$  毒素は細胞膜上で GM1a のクラスター形成を引き起こしたが、H148G では認められなかった。これまでに、本毒素は、内因性 PLC を活性化させることを報告している。そこで、 $\alpha$  毒素による GM1a クラスター化に内因性 PLC が関与するかを検討した。その結果、内因性 PLC 阻害剤 (U73122) を処理した細胞では、GM1a のクラスター化が阻害された。さらに、リン酸化 TrkA の局

在を観察したところ、本毒素処理により、細胞膜上でリン酸化 TrkA が多数観察され、これは、U73122 前処理で抑制された。また、本毒素により活性化される内因性 PLC の同定を試みたところ、TrkA の下流に存在する内因性の PLC $\gamma$ -1 を活性化することが判明した。次に、DAG は細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能し、細胞膜での生成は、細胞膜ダイナミクスに影響を与えることが報告されている。そこで、DAG を特異的に捕捉するプロテインキナーゼ C の C1 ドメインと蛍光タンパク質 EYFP をフュージョンしたベクター pEYFP-C1AB をトランスフェクトした A549 細胞を用いて検討した。その結果、毒素未処理では細胞内に局在していた EYFP-C1AB は、本毒素処理によって、特異的に細胞膜上に集積し、DAG 産生が細胞膜上で促進されていることが判明した。

以上の結果より、 $\alpha$  毒素は A549 細胞の細胞膜上に存在する GM1a に特異的に結合後、1 つ目のステップとして、毒素自身の PLC 活性によって細胞膜外層の PC を切断して DAG を産生し、細胞膜の流動性を亢進させ、GM1a のクラスター化に伴い TrkA 自己リン酸化を引き起こす。2 つ目のステップとして、活性化した TrkA は、その下流に存在する内因性 PLC $\gamma$ -1 を活性化して、さらなる DAG 産生を亢進させ、細胞膜上で過剰に生じた DAG は、TrkA をより一層強力に活性化し、細胞膜上で TrkA-GM1a の強力なクラスター化を惹起する。その後、その下流シグナル分子の ERK1/2 の活性化を誘導する。ERK1/2 経路を介して、IL-8 遺伝子の転写因子である NF- $\kappa$ B の核内移行を促進し、IL-8 mRNA の転写を誘発し、IL-8 の生成、及び、細胞外への遊離を惹起することが明らかとなった。すなわち、ウエルシュ菌の感染による臓器への好中球の集積は、 $\alpha$  毒素による一連のメカニズムを介して上皮細胞から IL-8 の遊離を強力に誘導することが引き金となることが判明した。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、ウエルシュ菌感染症による好中球の異常な活性化機構の解明を目的として行われた研究成果について論じている。すなわち、本菌が産生する主要な病原因子である $\alpha$ 毒素が作用する受容体やシグナル伝達の活性化など多面的な解析を行い、ウエルシュ菌感染症の治療に対する新たな知見を含めた論文構成となっている。

まず初めに、ウエルシュ菌感染によって誘導される肺組織での好中球の集積に、 $\alpha$ 毒素がいかに関与しているかを詳細に解析している。その結果、 $\alpha$ 毒素はヒト肺腺癌由来 A549 細胞の細胞膜上に存在するチロシンキナーゼ関連受容体 (TrkA) に作用し、その下流シグナル分子の ERK1/2 経路、及び、p38MAPK 経路を活性化し、転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移行を誘導し、最終的に好中球の走化性亢進に関与するインターロイキン-8 (IL-8) の遊離を惹起し、肺組織における好中球集積を引き起こすことを明らかにした。

次に著者は、 $\alpha$ 毒素が特異的に結合する細胞膜受容体の探索研究を行っている。毒素の受容体候補として、近年、様々な細菌毒素が結合することで知られている糖脂質であるガングリオシドに着目し検討している。24 種類の糖脂質糖鎖を固定化した糖脂質アレイを用いて網羅的に毒素結合受容体を探索した結果、 $\alpha$ 毒素はガングリオシド GM1a を特異的に認識して結合することを新規に見出した。さらに、GM1a のノックアウトマウスを用いた解析では、生体内での $\alpha$ 毒素の毒性発現に GM1a が非常に重要な役割を演じていることが示唆された。また、 $\alpha$ 毒素と GM1a との結合様式についてドッキングシミュレーション解析とアミノ酸置換体を用いた検討から、 $\alpha$ 毒素分子内のループ領域における 84 位のトリプトファン残基と 85 位のチロシン残基が GM1a と相互作用し、より安定な結合様式をとることを明らかにした。すなわち、 $\alpha$ 毒素に対する治療ターゲット分子として、GM1a の可能性が大いに期待できる。

これまでの検討結果より、 $\alpha$ 毒素は細胞膜上で GM1a のクラスター形成を誘導することを明らかにした。次に、著者は細胞膜上での GM1a クラスター化と IL-8 遊離機構との関係について検討している。その結果、 $\alpha$ 毒素は細胞膜上に存在する GM1a に結合後、毒素自身のホスホリパーゼ C (PLC) 活性によって細胞膜外層のリン脂質を切断してジアシルグリセロール (DAG) を産生し、初期の GM1a のクラスター化を引き起こす。この GM1a のクラスター化が TrkA の自己リン酸化を誘導し、その下流分子として PLC- $\gamma$ 1 を活性化して、さらに DAG 産生を亢進させ、この両経路を介

して細胞膜で大量に生じた DAG がより強力に GM1a のクラスター形成、及び、TrkA の活性化を誘導することで、A549 細胞からの IL-8 遊離を惹起することを見出した。すなわち、新たな研究視点からアプローチした結果、 $\alpha$  毒素が GM1a に結合後、種々のシグナル伝達系を活性化したことによるメンブランダイナミクスの変化が IL-8 遊離に関与するという重要な知見が得られた。

以上、これらの研究結果は、ウエルシュ菌感染症における新たな病態発症メカニズムの解明に繋がり、今後、本菌感染症に対する治療薬開発への応用が非常に期待できる。著者の研究は、今後の微生物学の研究分野において大いに貢献できると考えられる。よって、本論文は博士(薬学)の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査 (教授)	姫野 誠一郎	印
	副査 (教授)	赤木 正明	印
	副査 (教授)	深田 俊幸	印
	副査 (外部)	小林 秀丈	印

(広島国際大学 薬学部)

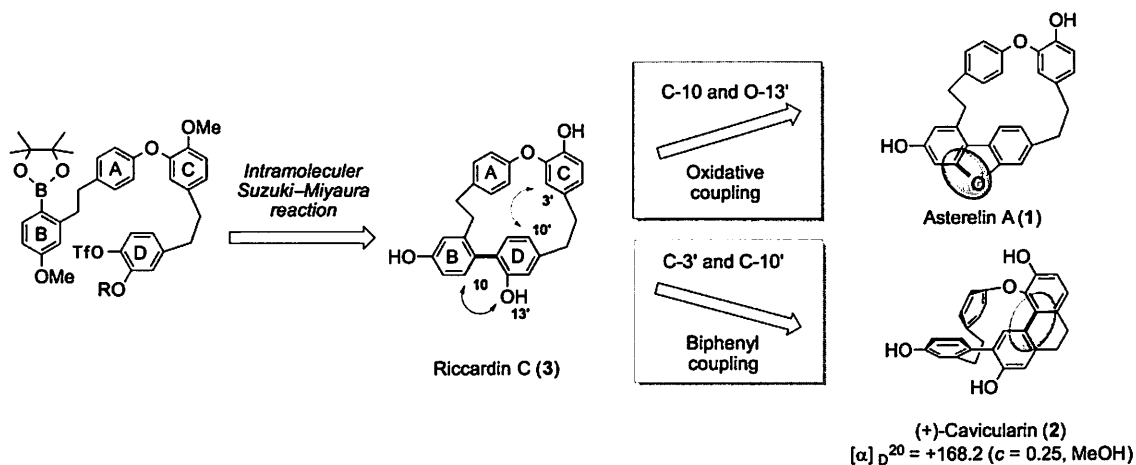
氏名	まきの こうしょう 牧野 宏章
本籍	兵庫県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第45号（課程博士）
学位授与年月日	平成28年3月15日
学位授与の要件	学位規定第4条第1項該当（課程博士）
学位論文の題目	大環状ビスビベンジル類アステレリン A 及びカビクラリンの 全合成
指導教員	教授 福山 愛保
論文審査委員	(主査) 教授 今川 洋 (副査) 教授 浅川 義範 (副査) 教授 張 功幸 (副査) 教授 小槻 日吉三



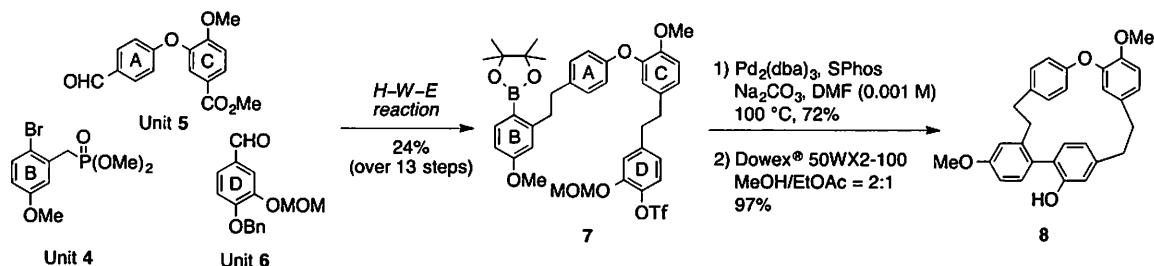
## 論文の内容要旨

牧野 宏章

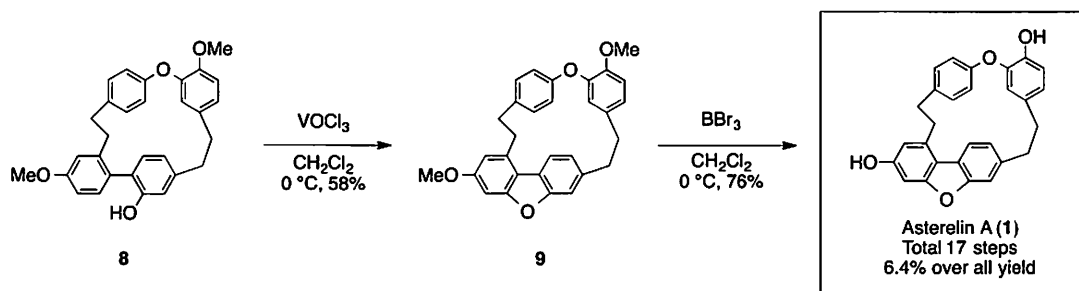
苔類特有の成分である大環状ビスビベンジル類は、二つのビベンジル構造が二量化し大員環を形成している興味深い構造をしている天然物である。さらに、その特異な構造に加え、有用な生物活性を有するものも多く、生物活性物質としても注目されている。当研究室では大環状ビスビベンジル類の生合成経路に着目し、Pd 触媒を使用したビフェニル結合形成反応をビスビベンジル類の大員環構築に適用する独自の戦略で合成研究を行ってきた。著者はリカルディン C (3) の分子内酸化カップリングにより生合成されるアステレリン A (1) および (+)-カビクラリン (2) に着目し、3 を中間体としたビフェニル結合形成反応による 1 および (+)-2 の合成研究を行った。すなわち、Pd 触媒反応を活用する我々の戦略を適用し大員環を構築後、13' 位の水酸基からジベンゾフラン骨格を、10' 位の炭素からはジヒドロフェナントレン骨格をそれぞれ構築する生合成に則した合成法を検討した。



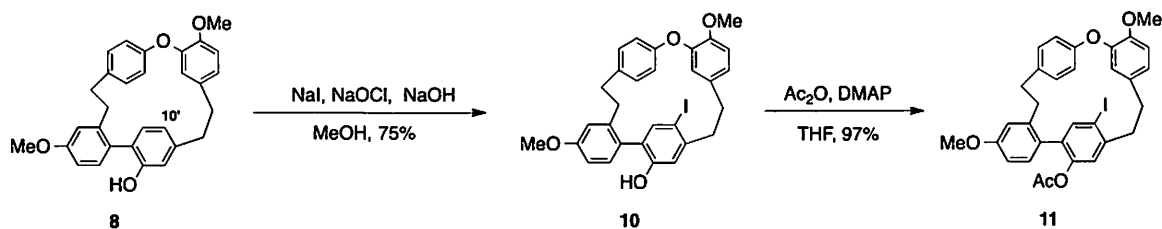
まず、1 の合成では、各ユニットを 2 度の Horner–Wadsworth–Emmons (HWE) 反応で連結することで全 13 段階、24%の収率で調製した環化前駆体であるボロン酸エステル 7 に対し、分子内鈴木–宮浦反応を検討した。その結果、DMF 溶媒中触媒として  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、配位子に SPhos、塩基として無水炭酸ナトリウムを使用したとき、72%の収率で大員環形成に成功した。次に大員環化合物の MOM 基を除去することでフェノール体 8 を調製した。



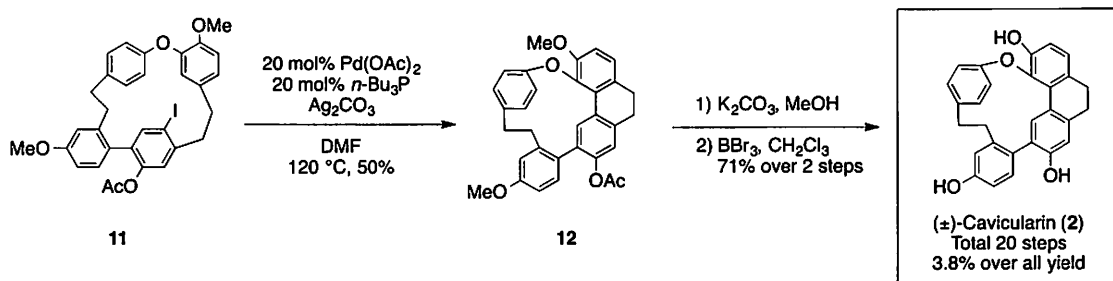
こうして調製したフェノール体 **8** に対し、鍵反応である分子内酸化カップリングによるジベンゾフランの構築反応を検討した結果、酸化剤としてオキシ塩化バナジウム (V) を用いた場合、目的のジベンゾフラン骨格を有する **9** を 58% の収率で得ることに成功した。最後に、酸化カップリングにより得られた **9** の脱保護を行い、全 17 段階 6.4% の総収率で **1** の全合成を達成した。



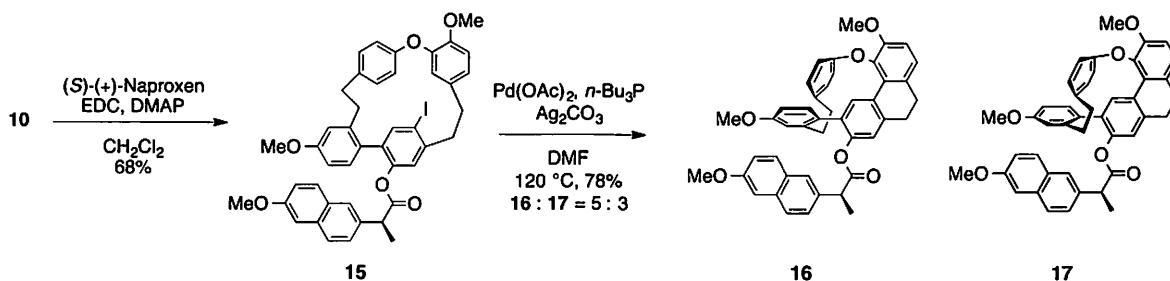
もう一つの合成ターゲットである **2** の合成研究では、ラセミ体 ( $\pm$ )-**2** および光学活性体 (+)-**2** の合成について順次検討した。アステレリン合成における中間体 **8** に対して、10'位を位置選択的にヨウ素化することによりヨード体 **10** へ誘導後、ヨード体 **10** のフェノール性水酸基をアセチル化し、**11** に導いた。



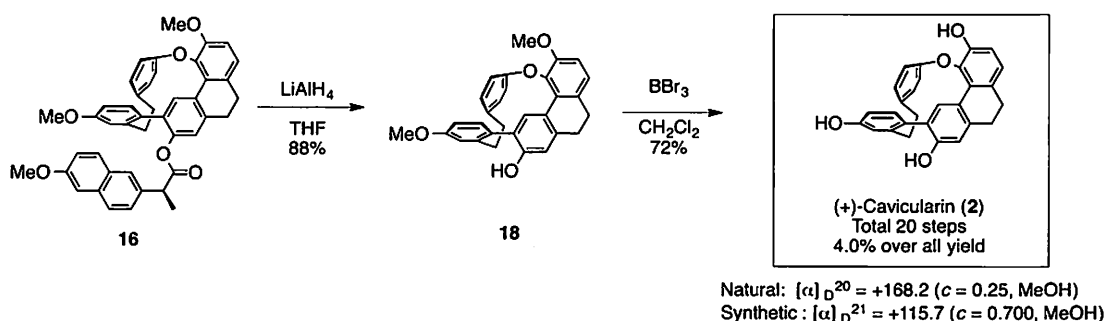
次に鍵反応となる Pd 触媒 Ar-Ar カップリング反応を検討した。DMF 溶媒中、触媒として  $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-}n\text{Bu}_3\text{P}$ 、塩基として炭酸銀を使用した時、カビクラリン骨格を有する **12** を 50% の収率で得ることに成功した。最後に得られた **12** の脱保護を行い、全 20 段階 3.8% の総収率で **2** のラセミ体合成を達成した。



続いて (+)-**2** の不斉合成では、不斉補助基を利用するジアステレオ選択的な不斉構築法を検討した。すなわち、D 環上の 13'位水酸基に容易に脱着可能な不斉補助基を導入し、これまでに確立した Pd 触媒 Ar-Ar カップリング反応を検討した。不斉補助基の導入にあたり、計算化学を利用し最適な不斉補助基を選択し (S)-(+)-ナプロキセンを用いることにした。まず、ヨード体 **10** に対して不斉補助基である (S)-(+)-ナプロキセンを縮合させ **15** を得たのち、Pd 触媒 Ar-Ar カップリング反応によるジヒドロフェナントレン構築を検討した。その結果、収率 78%、約 5 : 3 の生成比でジヒドロフェナントレン **16** と **17** の混合物を得ることに成功した。



得られた **16** を二段階で脱保護し、(+)-**2** の合成を完了した。合成した **2** は天然物の旋光度と比較することにより、天然物と同じ絶対立体配置を有する (+)-**2** であることを確認し、さらに、キラル HPLC 分析によりこれまでの他グループの合成では達成できていない 97.9%ee と高いエナンチオ純度で天然型絶対立体配置を有する (+)-**2** の全合成を達成した。



## 論文審査結果の要旨

本論文は、苔類特有の成分である大環状ビスビベンジル類の中でも今まで余り合成研究が成されていないタイプIVに属するアステレリン A 及び (+)-カビクラリンの全合成に関する有機合成化学研究成果からなる。

パラジウム触媒反応は有機合成化学に幅広く応用されており、多くの天然物合成の鍵段階を担っている。本論文は、アステレリン A 及び (+)-カビクラリンの合成研究における重要な大環状形成に対してパラジウム触媒反応を積極的に組み込み、生合成に類似するピアリール結合を経由する特徴的な合成ルートにより両化合物の全合成に成功している。

まず、ジベンゾフラン環が縮環した環状ビスビベンジル類アステレリン A の大員環形成に対してパラジウム触媒鈴木-宮浦反応を適用した。その結果 DMF 溶媒中触媒として  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、配位子に SPhos、塩基として無水炭酸ナトリウムを使用したとき、72%の収率で大員環形成に成功した。続いて、分子内酸化カップリングによるジベンゾフランの構築反応を検討した結果、酸化剤としてオキシ塩化バナジウム (V) を用いて、目的のジベンゾフラン骨格を 58%の収率で構築できた。最後に、全ての脱保護を行い、全 17 段階 6.4%の総収率でアステレリン A の全合成を達成した。

次に、非常に歪みが大きなカビクラリンのラセミ体および光学活性体の合成について順次検討した。ジメチルリカルデインの 10'位を位置選択的にヨウ素化後、フェノール性水酸基をアセチル化した合成中間体の分子内ジヒドロフェナントレン骨格構築に対して Pd 触媒 Ar-Ar カップリング反応を検討した。DMF 溶媒中、触媒として  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -*n*Bu<sub>3</sub>P、塩基として炭酸銀を使用した時、ジヒドロフェナントレン骨格を 50%の収率で得ることに成功した。最後に脱保護を行い、全 20 段階 3.8%の総収率でカビクラリンのラセミ体合成を達成した。続いて光学活性体 (+)-カビクラリンの合成戦略として、不斉補助基を利用するジアステレオ選択的な不斉構築法を採用した。すなわち、D 環上の 13'位水酸基に容易に脱着可能な不斉補助基を導入し、これまでに確立した Pd 触媒 Ar-Ar カップリング反応を適用した。ラセミ体合成に用いたヨード体のフェノール性水酸基に、計算化学結果に基づき選択した最適な不斉補助基 (S)-(+)-ナプロキセンを縮合させた中間体に対し Pd 触媒 Ar-Ar カップリング反応によるジヒドロフェナントレン構築を検討した。その結果、収率 78%、約 5:3 の生成比でジヒドロフェナントレン体の混合物を得ることに成功した。得られた (+)-体を二段階で脱保護し、(+)-カビクラリンの合成を完了した。合成した (+)-カビクラリンは天然物の旋光度と比較することにより、天然物と同じ絶対立体配置を有することを確認し、さらに、キラル HPLC 分析によりこれまでの他グループの合成では達成できていない 97.9%ee と高いエナンチオ純度で天然型絶対立体配置を有する (+)-カビクラリン

の全合成を達成した。

以上、本論文は、パラジウム触媒反応と酸化カップリングを重要な骨格形成合成に組み込んだアステレリン A の短段階合成法の開発、パラジウム触媒 Ar-Ar カップリング反応の活用による非常に歪みが大きなカビクラリンのラセミ体合成及び不斉補助基 (S)-(+)-ナブロキセンを用いたジアステレオ選択的な光学活性体 (+)-カビクラリンの不斉合成に関する研究であり、その高い独創性は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	(主査)教授	今川 洋
	(副査)教授	浅川 義範
	(副査)教授	張 功幸
	(副査)教授	小槻 日吉三

氏名	<sup>みやもと</sup> 宮本 <sup>かずあき</sup> 和明
本籍	和歌山県
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	甲第 46 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
学位授与の題目	腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株中のバクテリオシン遺伝子 保有プラスミドについての検討
論文審査委員	(主査) 教授 葛原 隆 (副査) 教授 井上 正久 (副査) 教授 鈴木 真也 (副査) 外部 山中 浩泰 (広島国際大学 薬学部)

ウエルシュ菌は、病原性の高い細菌の一つで、4種類の主要毒素の産生能が病原性に深く関与し、特有の疾患をヒトや動物に起こす。主要毒素の一つであるα毒素の遺伝子は染色体上に存在するが、残り3種類の主要毒素遺伝子やエンテロトキシンなどの病原性に不可欠な毒素遺伝子の多くは、比較的大きく、コピー数の少ないプラスミドに存在する。しかし、毒素産生能を有していても必ずしも病原性を発現するとは限らない。たとえば、健康なヒトの腸管内にエンテロトキシン産性能を持つ株が検出されるが、感染症を発症しないことが知られている。

多くの毒素産生能を持つウエルシュ菌は、毒素遺伝子保有プラスミドに加えて、別のプラスミドも保有している。本研究では、ヒト下痢症患者から分離されたエンテロトキシンを産生するウエルシュ菌 F5603 株について、エンテロトキシン遺伝子保有プラスミド (pCPF5603) と共存するプラスミド (pBCNF5603) が病原性発現に関連性があるかどうかを検討した。pCPF5603 は既に全塩基配列が決定されているので、今回は、pBCNF5603 の全塩基配列を決定した (図1)。

図1. pBCNF5603 プラスミドの主要な遺伝子

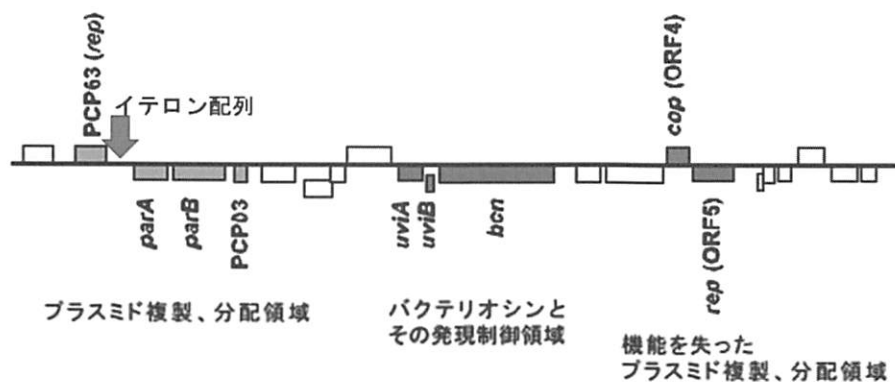


図1に示すように、このプラスミドは、病原性発現に寄与している可能性があるバクテリオシン遺伝子 (*bcn*) を保有していた。バクテリオシン (BCN) は、他の菌や同じ菌種の他の株に殺菌的に働く因子で、種々の細菌が産生することが知られている。今回検討した腸管病原性株も BCN 遺伝子を有することから、

感染時にバクテリオシン (BCN5603) を産生している可能性が考えられた。pBCNF5603 の遺伝情報の解析から DNA 損傷を起こすようなストレスを加えることによりバクテリオシン発現を促進すると考えられる BCN 産生調節遺伝子群 (*uviA*、*uviB*) が BCN 遺伝子の upstream に認められた (図 1)。実際に、対数増殖期の F5603 株培養液に紫外線を照射することでバクテリオシンの産生量が増加した。また、マイトマイシン C 添加により産生される BCN5603 mRNA の産生量が増加することも確認した。すなわち、本菌は、外からのストレスによりバクテリオシン産生量が多くなることが判明した。

次に、pBCNF5603 とこれまで報告されている毒素遺伝子保有プラスミドなどのプラスミドとの関連性を明らかにするため、プラスミドの複製や分配などプラスミドの維持に重要な制御領域 (Central Control Region) の同定を行った。遺伝情報から、このプラスミドには、PBCN16-*parA-parB-parS* 領域 (*par*: 分配に関与する遺伝子群) とウエルシュ菌のプラスミド pIP404 の制御領域に類似した領域である *rep-cop* 領域 (*rep*: 複製開始タンパク質の遺伝子、*cop*: プラスミドの細胞内での数を決定するタンパク質の遺伝子) の 2ヶ所のプラスミド制御領域が存在する可能性が考えられた (図 1)。そこで、これら 2ヶ所それぞれの領域を有するベクタープラスミドを作成し、ウエルシュ菌内で実際に複製するかどうかを検討した。PBCN16-*parA-parB-parS* 領域を保有するベクタープラスミドは、ウエルシュ菌内での複製が認められ、この領域に存在する PBCN16 がプラスミド複製開始タンパク質 (Rep) として機能していると考えられる。一方、*rep-cop* 領域を有するプラスミドベクターは、ウエルシュ菌内で、複製能を有していなかった。pBCNF5603 では、*rep-cop* 領域の Rep 遺伝子の途中にストップコドンが生じる変異が認められ、複製能を有する類似の Rep タンパク質と異なり C 末端部分が欠損していた。このことが Rep タンパク質としての機能しない理由と考えられる。

プラスミドは、2つの類似のプラスミドがひとつの細胞内では共存できない不和合性と共存できる和合性といういずれかの性質を有している。プラスミド和合性には、様々な遺伝子群が関与している。代表例には、Rep 遺伝子の upstream



に存在する繰り返し配列（イテロン：この部分には Rep が結合すると考えられている）がある（図 1）。GenBank で検索すると、5 種類のウエルシュ菌プラスミドが pBCNF5603 の Rep 遺伝子（PBCN16）と相同性を持つ Rep 遺伝子を保有し、その上流には類似するイテロン配列を持つことが判明した（図 1）。その中には、全塩基配列が決定された Strain13 株の pCP13 も含まれていた。そこで、PBCN16-*parA-parB-parS* を挿入したクロラムフェニコール（CP）耐性遺伝子を持つベクター pKZ200 と PBCN16 のみを挿入した CP 耐性遺伝子を持つベクター pKZ210 を作成した。これらを Strain13 に導入し、CP 耐性を示すコロニー（pKZ200 又は pKZ210 が導入されたコロニー）について pCP13 との和合性の有無を検討した。その結果、全てのコロニーで pCP13 が消失し、同じイテロン配列を持つ pCP13 と pBCNF5603 は不和合性であることが判明した。つまり、ウエルシュ菌の比較的大きいプラスミドには、pBCNF5603 の PBCN16 遺伝子と相同性を持つ Rep 遺伝子を持つグループと PBCNF5603 と和合性で代表的な毒素遺伝子と異なる Rep 遺伝子を持つ pCPF5603 が属するグループの 2 種類が存在することが判明した。

プラスミドの娘細胞への正確な分配機能に関係しているプラスミド分配遺伝子群（*parA*、*parB*）と特有の塩基配列をもつ領域（*parS*）は、類似の Rep 遺伝子を持つ前述の 5 種類のプラスミド全てに認められた。このことから、pBCNF5603 プラスミドのグループは、Type I のプラスミド分配システムを持つプラスミドであると考えられた（多くの毒素遺伝子保有プラスミドは Type II のプラスミド分配システムを持つ）。そこで、細胞分裂の際に娘細胞に正確にプラスミドが分配されるかどうかについて、前述の分配領域の遺伝子を持つ組換えベクター（pKZ200）を保有するウエルシュ菌株を 60 世代継代培養（1 世代は 2 分裂が終わるまで）し、コロニーの CP 耐性を指標としてプラスミドの安定性を検討した。その結果、pKZ200 は、60 世代継代後には 40% のコロニーにしか存在せず、pCP13 や pBCNF5603 が極めて安定して受け継がれること（60 世代継代後も 100% のコロニーに存在）と比較すると娘細胞への受け継ぎが不安定であり、プラスミド分配領域（*parA*、*parB*、*parS*）のプラスミド安定性へ

の寄与は限定的のものであると考えられた。

今回の研究から、ウエルシュ菌の腸管病原性株中の毒素遺伝子保有プラスミドと共存する pBCNF5603 プラスミドは、他の菌を排除して、感染した病原菌の増殖を助ける因子であるバクテリオシン産生に重要で、感染菌の病原性発現に関与することが明らかとなった。また、プラスミドの性質を理解するために重要な領域である制御領域は、プラスミドの和合性や安定性と関連することを明らかにした。以上より、これまでほとんど研究が進んでいない病原性を示すウエルシュ菌株の共存プラスミドの性状について重要な知見を得ることができた。

## 論文審査結果の要旨

本研究では、プラスミドにヒト腸管病原性に必須の毒素であるエンテロトキシンの遺伝子を保有する腸管病原性ウエルシュ菌株が嫌気状態（食品中や腸管内）で非病原性のウエルシュ菌や近縁菌種の細菌にうち勝って増殖するために有用であるバクテリオシンを産生することを明らかにし、また、その産生はウエルシュ菌がストレス（加熱など）を受けると増加することを初めて明らかにした。

今回、発見したバクテリオシン遺伝子が非常に安定してプラスミド上に存在するので、そのプラスミドの基本的特徴について検討することを目的にプラスミド複製、分配に重要な領域を同定した。その結果、バクテリオシン遺伝子を保有するプラスミドは、今までに基本的領域が明らかにされている毒素遺伝子保有プラスミドや大腸菌とのシャトルベクターに応用されているプラスミドなどとは異なることやイテロン配列を持つイテロン保有プラスミド（ICP : iteron-containing plasmid）であることを明らかにした。さらに、比較ゲノム学的検討から、このプラスミドの基本的領域は、一部の毒素遺伝子（ $\beta 2$ 毒素遺伝子や腸管病原性を有する $\iota$ 毒素遺伝子）を保有するものと同じであることを明らかにした。

さらに、プラスミド上の基本的領域の生物学的な働きについて検討を行い、類似の基本的領域を持つプラスミドと不和合性であることを明らかにした。さらに、類似の基本的領域を持つプラスミドが同じ複製機構を有していること、そして、不和合性に基づくウエルシュ菌のプラスミド分類（Inc分類）を初めて行った。

バクテリオシン遺伝子を持つプラスミドは、エンテロトキシン遺伝子保有プラスミドと同様に安定して存在していた。このことは、腸管病原性を持つ研究対象株が大量に増殖してもエンテロトキシンと同様にバクテリオシン産生能を維持することを示唆し、バクテリオシン遺伝子を持つプラスミドが安定して存在することを明らかにした。これに加え、プラスミドの基本的領域（複製、分配領域）がプラスミド安定性へ寄与するかどうかを検討し、プラスミドの安定性には既に多くのプラスミドで述べられている基本的領域だけでなく、ウエル

シユ菌のプラスミドのプラスミド上の未知の因子や宿主の因子の関与を示唆する結果を初めて報告した。

以上、これらの結果からウエルシユ菌プラスミドの病原性への関与やプラスミド自身の基本構造が明らかになった。本研究により、病原性に関与するプラスミドを消失させる薬物の開発への手がかりが得られた。さらなる研究により、今後、ウエルシユ菌による疾患の新規な治療法開発が期待できる。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員 主査（教授） 葛原 隆 印

副査（教授） 井上 正久 印

副査（教授） 鈴木 真也 印

副査（外部） 山中 浩泰 印  
(広島国際大学 薬学部)