

学位論文 博士(理学)

分子デザインされた NF- $\kappa$ B 阻害剤の新規作用機構

平成 23 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

竹入 雅敏

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	竹入 雅敏
主 論 文 題 目 :				
分子デザインされた NF- $\kappa$ B 阻害剤の新規作用機構				
(内容の要旨)				
<p>NF-<math>\kappa</math>B は免疫応答や組織形成の制御にとって重要である一方、過剰な活性化は炎症性疾患や癌の原因となる。NF-<math>\kappa</math>B は p65、RelB、c-Rel、p50、p52 からなる Rel family タンパク質の homo- または heterodimer によって構成される。NF-<math>\kappa</math>B 活性化経路には、p65/p50 を主たる構成因子とし、即時的免疫応答や炎症を活性化する canonical 経路と、RelB/p52 を主たる構成因子とし、B 細胞成熟や自己免疫疾患、一部の癌に關与する noncanonical 経路がある。本論文では、分子デザインされた 2 つの NF-<math>\kappa</math>B 阻害剤(-)-DHMEQ と DTCM-glutarimide の新しい作用機構について記述している。</p> <p>序論では、NF-<math>\kappa</math>B 活性化経路と炎症、癌への寄与、および本論文で用いた NF-<math>\kappa</math>B 阻害剤の知見をまとめ、本研究の意義を示した。</p> <p>第 1 章では、NF-<math>\kappa</math>B 阻害剤(-)-DHMEQ の noncanonical NF-<math>\kappa</math>B 活性化経路に対する抑制効果を調べ、標的分子の特定を行った。その結果、(-)-DHMEQ は RelB の 144Cys に共有結合し、DNA 結合および活性化を阻害することを見出した。</p> <p>第 2 章では、(-)-DHMEQ による成人 T 細胞白血病(ATL)細胞で活性化している noncanonical NF-<math>\kappa</math>B の阻害機構を調べた。その結果、(-)-DHMEQ が noncanonical NF-<math>\kappa</math>B の DNA 結合と核局在を顕著に阻害することが分かった。さらに、(-)-DHMEQ が noncanonical NF-<math>\kappa</math>B のタンパク質レベルでの不安定化を誘導していることが分かった。次に、RelB の mutant タンパク質を培養細胞に導入し、(-)-DHMEQ の機構解析と noncanonical NF-<math>\kappa</math>B 活性化の抑制機構解析を行った。その結果、(-)-DHMEQ 処理、または mutant タンパク質発現 によって noncanonical NF-<math>\kappa</math>B の DNA 結合能を欠損させると、核局在が抑制されること、および、タンパク質レベルでの不安定化が誘導されることが分かった。さらに、核へ移行できない noncanonical NF-<math>\kappa</math>B mutant もタンパク質レベルで不安定になった。この結果から、DNA 結合能が noncanonical NF-<math>\kappa</math>B の細胞内局在を制御し、安定性に大きく寄与していることが分かった。また、DNA に結合出来ない RelB の構造は importin-<math>\alpha</math>にも結合しにくくなっている知見も得られた。</p> <p>第 3 章では、NF-<math>\kappa</math>B 阻害剤 9-methylstreptimidone 類似体の構造活性相関および、NF-<math>\kappa</math>B 活性化に与える効果の検討を行った。その結果、9-methylstreptimidone の活性には不飽和疎水性部位の構造が重要であることが分かり、また、新たな抗癌剤リード候補化合物も得られた。さらに、9-methylstreptimidone 誘導体、DTCM-glutarimide が細胞毒素 lipopolysaccharide (LPS)短時間刺激で活性化する NF-<math>\kappa</math>B には影響を与えないのに対し、LPS 長時間刺激によって活性化する RelB を含んだ NF-<math>\kappa</math>B の活性化を抑制することが分かった。この結果から、LPS による iNOS の発現には、LPS 長時間刺激によって活性化する NF-<math>\kappa</math>B が大きく寄与していることが示唆された。</p> <p>本研究によって解明された、分子デザインされた NF-<math>\kappa</math>B 阻害剤の新規阻害機構と NF-<math>\kappa</math>B の制御機構は、今後の自己免疫疾患や癌治療の発展に大きく貢献するものであると考えられる。</p>				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number 80947559	SURNAME, First name TAKEIRI, Masatoshi
Title  Novel inhibitory mechanisms of designed NF- $\kappa$ B inhibitors		
Abstract <p>NF-<math>\kappa</math>B contributes to the immune response and tissue stability. In one hand, excess activation of NF-<math>\kappa</math>B often causes inflammatory diseases and progression of cancer. Structurally NF-<math>\kappa</math>B is a homo- or heterodimers of Rel family proteins, including p65, RelB, c-Rel, p50 and p52. NF-<math>\kappa</math>B is activated by two different pathways, canonical and noncanonical pathway. Activation of the canonical NF-<math>\kappa</math>B consisting of p65 and p50 is important for the immediate immune responses and inflammation. Noncanonical NF-<math>\kappa</math>B consisting of RelB and p52 is important for B-cell maturation, the autoimmune diseases, and neoplastic diseases. In this thesis, novel inhibitory mechanisms of molecular designed two NF-<math>\kappa</math>B inhibitors, (-)-DHMEQ and DTCM-glutarimide, are described.</p> <p>In introduction, the mechanism of NF-<math>\kappa</math>B activation, its involvement on inflammation and malignant diseases, and characters of NF-<math>\kappa</math>B inhibitors used are described.</p> <p>In the 1<sup>st</sup> chapter, I have examined the effect of (-)-DHMEQ on noncanonical NF-<math>\kappa</math>B activation. As a result, (-)-DHMEQ covalently bound to 144Cys of RelB and inhibited DNA binding and its activity.</p> <p>In the 2<sup>nd</sup> chapter, I focused on the effect of (-)-DHMEQ on noncanonical NF-<math>\kappa</math>B. Noncanonical NF-<math>\kappa</math>B is constitutively activated in adult T-cell leukemia (ATL) cells. As a result, (-)-DHMEQ inhibited DNA binding and reduced nuclear accumulation of noncanonical NF-<math>\kappa</math>B. Interestingly, I also found that (-)-DHMEQ induced instability of noncanonical NF-<math>\kappa</math>B in ATL cells. Next, I have prepared mutant RelB that can not bind to DNA. As a result, I found that DNA binding activity of noncanonical NF-<math>\kappa</math>B is a crucial role for its intracellular localization and stability. NLS-inactivated mutant also became unstable. I also found that the structure of mutant with loss of DNA binding activity had lower affinity to importin-<math>\alpha</math>.</p> <p>In the 3<sup>rd</sup> chapter, I have studied the structure-activity relationship of NF-<math>\kappa</math>B inhibitor 9-methylstreptimidone using its analogs. As a result, I found that the specific unsaturated hydrophobic moiety of 9-methylstreptimidone is essential for its activity. A new candidate compound for anticancer agent was also found among the analogs. Moreover, I also found that DTCM-glutarimide, a 9-methylstreptimidone derivative, selectively inhibited long term LPS stimulation induced-NF-<math>\kappa</math>B activation.</p> <p>In conclusion, these novel inhibitory mechanisms of NF-<math>\kappa</math>B inhibitors would contribute to the progress of new therapy for auto-immune diseases and cancer.</p>		

# 目次

## Introduction

<b>1. 炎症と癌</b>	<b>1</b>
1.1 炎症と癌の歴史	1
1.2 免疫応答	2
(a) 自然免疫	2
(b) TLR による自然免疫応答	3
(c) RIG-I による自然免疫応答	5
(d) 炎症性メディエータ：一酸化窒素(NO)と COX-2 産生物質	6
(e) 獲得免疫系	8
1.3 炎症性疾患と免疫系	9
<b>2. NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>10</b>
2.1 NF- $\kappa$ B 構成因子 Rel family タンパク質と阻害因子 I $\kappa$ B family タンパク質	10
2.2 Canonical NF- $\kappa$ B と noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路	12
(a) Canonical NF- $\kappa$ B 活性化経路	13
(b) Noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路	14
2.3 Nuclear-cytoplasmic shuttling system による NF- $\kappa$ B の活性化機構	16
2.4 Canonical-noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路の相互作用	18
<b>3. 成人 T 細胞白血病(adult T-cell leukemia; ATL)</b>	<b>19</b>
3.1 Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)	19
3.2 Tax	19
<b>4. NF-<math>\kappa</math>B 阻害剤</b>	<b>21</b>
4.1 NF- $\kappa$ B 阻害剤(-)-DHMEQ	21
4.2 NF- $\kappa$ B 阻害剤 9-methylstreptimidone 誘導体 DTCM-glutarimide	24
<b>5. 本研究の意義</b>	<b>25</b>



## 第1章 (-)DHMEQによる noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化への影響と標的分子の解析

第1節 序論	27
第2節 実験方法	28
2.1 Materials	28
2.2 Cell culture	29
2.3 Total タンパク質の抽出	30
2.4 核内タンパク質の抽出	31
2.5 Western blotting	32
2.6 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	34
2.7 Vector construction、recombinant タンパク質の精製	36
2.8 Site direct mutagenesis	43
2.9 pCMV-RelB(WT)、pCMV-RelB(C144S) vector の大量精製	44
2.10 Lipofection による pCMV vector の導入	45
2.11 MALDI-TOF/MS	46
第3節 結果	47
3.1 Noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子と(-)DHMEQ の結合解析	47
3.2 (-)DHMEQ の noncanonical NF- $\kappa$ B における標的部位の同定	53
3.3 (-)DHMEQ の細胞内 noncanonical NF- $\kappa$ B に対する抑制効果と標的分子	56
第4節 考察	63

## 第2章 (-)-DHMEQによる noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化阻害の新規作用機構

第1節 序論	67
第2節 実験方法	69
2.1 Materials	69
2.2 Cell culture	70
2.3 細胞質/核内タンパク分画	71
2.4 Semi-quantitative RT-PCR	72
2.5 Vector construction	75
2.6 GST-puulldown	76
2.7 Western blotting	77
2.4 EMSA	77
第3節 実験結果	78
3.1 MT-1 細胞における(-)-DHMEQによる noncanonical NF- $\kappa$ B 抑制効果	78
3.2 MT-1 細胞における(-)-DHMEQによる noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の不安定化誘導	81
3.3 Noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合能の安定性への寄与	88
3.4 細胞質局在が noncanonical NF- $\kappa$ B の安定性へ与える影響	95
3.5 (-)-DHMEQによる構造変化が細胞内局在に与える効果	98
3.6 (-)-DHMEQによる NIK の制御機構	108
第4節 考察	110

### 第3章 NF- $\kappa$ B 阻害剤 9-methylstreptimidone 類似体の構造活性相関および NF- $\kappa$ B 活性化に与える効果

第1節 序論	113
第2節 実験方法	114
2.1 Materials	114
2.2 Cell culture	115
2.3 NO assay、MTT assay	116
2.4 Trypan blue dye exclusion assay	117
2.5 Hoechst 33258 染色によるアポトーシス細胞の検出	117
2.6 <i>In vitro</i> kinase assay	117
2.7 EMSA	117
2.8 Western blotting	117
2.9 RT-PCR	118
2.10 Recombinant JNK1 の精製	118
2.11 MALDI-TOF/MS	118
第3節 実験結果	119
3.1 9-methylstreptimidone 類似体の構造活性相関	119
3.2 DTCM-glutarimide の NO 産生の抑制機構解析	126
3.3 DTCM-glutarimide の NF- $\kappa$ B 活性化阻害の機構解析	130
第4節 考察	140

第4章 総括	143
参考文献	145
謝辞	166

## 略語一覧

AP-1: activator protein-1  
ARM: armadillo motif  
ATL: adult T-cell leukemia  
BAFF: B cell-activating factor belonging to the TNF family  
BSA: bovine serum albumin  
CARD: caspase recruitment domain  
cIAP: cellular inhibitors of apoptosis  
COX: cyclooxygenase  
CTD: C-terminal domain  
DD: dimerization domain  
DHMEQ: dehydroxymethylepoxyquinomycin  
EMSA: electrophoresis mobility shift assay  
FBS: fetal bovine serum  
GST: glutathione S-transferase  
HOIP: HOIL-1L interacting protein  
HAM: HTLV-1-associated myelopathy  
HTLV: human T-cell leukemia  
HU: HTLV-1 uveitis  
I $\kappa$ B: inhibitor of NF- $\kappa$ B  
IKK: I $\kappa$ B kinase  
IL: interleukin  
IL-1R: interleukin-1 receptor  
IPS-1: IFN- $\beta$  promoter stimulator-1  
IRAK: IL-1R associated kinase  
ISG: IFN-stimulated gene  
JNK: c-Jun N-terminal kinase  
LDL: low density lipoprotein cholesterol  
LRR: leucine rich repeat  
LPS: lipopolysaccharide  
LT: lymphotoxin  
LUBAC: linear ubiquitin chain assembly complex  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MAPKK: MAPK kinase  
MHC: major histocompatibility complex

NEMO: NF- $\kappa$ B essential modulator  
NES: nuclear export signal  
NF- $\kappa$ B: nuclear factor- $\kappa$ B  
NIK: NF- $\kappa$ B-inducing kinase  
NK: natural killer  
NLS: nuclear localization signal  
NO: nitric oxide  
NOS: nitric oxide synthase  
NZF: NPL4 zinc finger  
PBS: phosphate buffered saline  
PCR: polymerase chain reaction  
RD: repressor domain  
RHD: Rel homology domain  
RIG-I: retinoic acid inducible gene-I  
SCF: Skp/Cdc53/F-box protein  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
STAT: signal transducers and activator of transcription  
TAX1BP1: Tax1 binding protein1  
TAK: TGF- $\beta$  activated kinase  
TBK-1: TANK-binding kinase-1  
TIR: Toll/IR-1R receptor  
TLR: Toll like receptor  
TNF: tumor necrosis factor  
TRAF: TNF receptor-associated factor  
Ub: ubiquitin  
UBA: ubiquitin associated  
UBL: ubiquitin like  
ZF: zinc finger

# Introduction





## Introduction

### 1. 炎症と癌

#### 1.1 炎症と癌の歴史

癌は、1981 年以來、日本人の死亡原因第 1 位を占め、癌で死亡する確率は男性では 4 人に 1 人、女性では 6 人に 1 人である(1)。その要因としては平均寿命の延長や感染性疾患による死亡率の低下、環境および生活習慣の変化、医療の発達による診断精度の向上などが挙げられる。そのため、癌研究は非常に重要であり、旧文部省、旧厚生省、旧科学技術庁の 3 省庁合同事業である「対癌 10 ヶ年総合戦略事業」に代表されるように科学研究費等によって厚く支援されてきた。また、癌は古くから炎症との関わりが知られている。

炎症と癌の関連は近代病理学の発展に大きく貢献した **Rudolf Virchow** による癌刺激説に端を発する。炎症とは、自然免疫系免疫担当細胞や T 細胞が組織に集積して血管拡張や血管透過性の亢進を行うことによって引き起こされる腫脹や疼痛を誘起した、全身性には発熱を引き起こした状態である。1863 年、**Virchow** は腫瘍組織に白血球が蓄積していることを報告し、慢性的な刺激が癌を引き起こすといった癌刺激説を提唱した。19 世紀当時は **Johannes Andreas Grib Fibiger** の癌寄生虫説と対立していたが、**Virchow** は **Fibiger** の「癌は寄生虫の感染によって起こる」という考えに対し、「癌の原因は全て細胞にある」と考え、慢性刺激下で起こるリンパ節への浸潤が癌の起源となることを示唆した。20 世紀前半には **Virchow** 研究室に留学し、病理学を学んだ山極勝三郎・市川厚一らがウサギの耳の内側にコールタールを塗布し続けることによって癌が発生することを示し、人工癌を初めて作製した。その後、コールタールの中から発癌性物質としてジベンゾアントラセン、ベンゾピレンが分離された。1940 年代になると、**Peyton Rous**、**Isaac Berenblum** らの研究を通し、発癌過程は細胞に不可逆的変異が起きることで腫瘍前駆細胞が形成される“initiation”と腫瘍前駆細胞がクローナルに増殖能を獲得し、悪性化や腫瘍形成を誘導する“promotion”の段階からなることが示された。山極は、胃癌に関する研究を行う中、「慢性的な胃潰瘍が胃癌の進行において重要な役割を果たす」といった考えを導き出した。1980 年代には、**Barry Marshall**、**Robin Warren** によって *Helicobacter pylori* が胃潰瘍を引き起こすことが報告された。現在では、*Helicobacter pylori* による胃炎や胃潰瘍の慢性化が胃癌を誘導すること、炎症が癌を引き起こすことが知られている(2)。

以上のように、**Virchow** による癌刺激説に端を発するような炎症と癌が強く関連していることは古くから示唆されていたが、炎症と癌の関連性の機構を証明するには至らなかった。しかし、転写因子 nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)が炎症と癌にとって非常に重要な役割を果たすことが発見されたことによって、炎症と癌の関連性の機構が明らかになった。

## 1.2 免疫応答

免疫とは微生物感染などの異物感染に対する生体防御反応である。免疫応答には自己免疫と獲得免疫があり、Fig. 1に示したように、各免疫応答の反応過程で様々な細胞が働く(3, 4)。自然免疫系と獲得免疫系は協調的に働くことによって生体防御反応の制御を行っている。免疫応答は通常は生体防御にとって重要であるが、過剰な活性化は組織障害や自己免疫疾患、癌の原因となる。

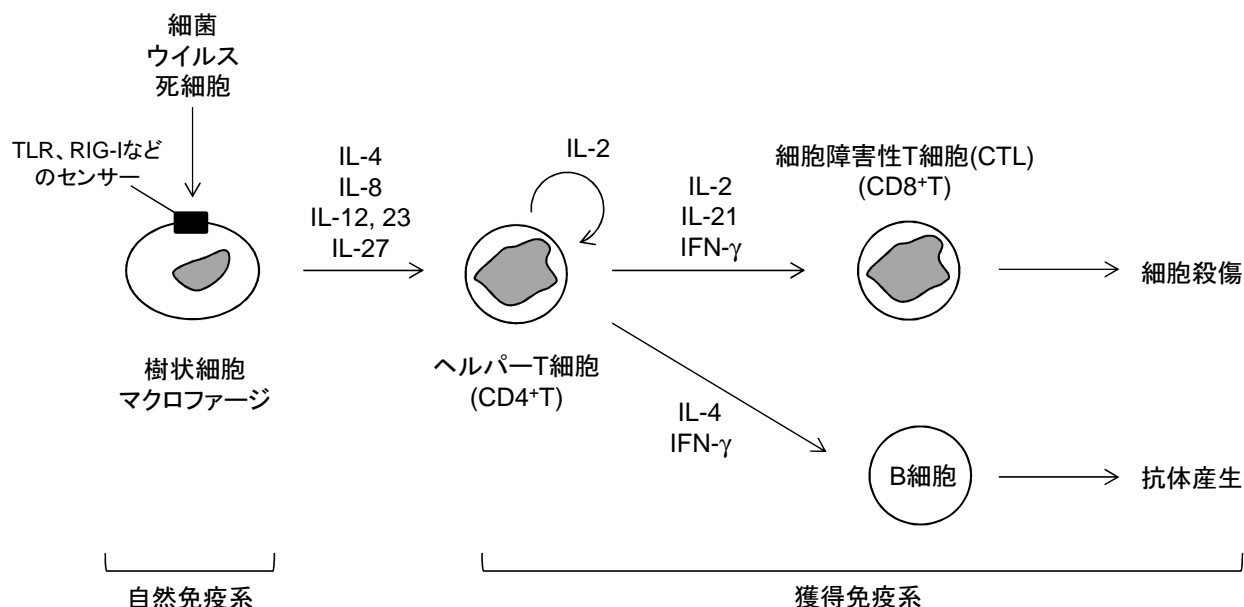


Fig. 1 Innate and acquired immunity

### (a) 自然免疫

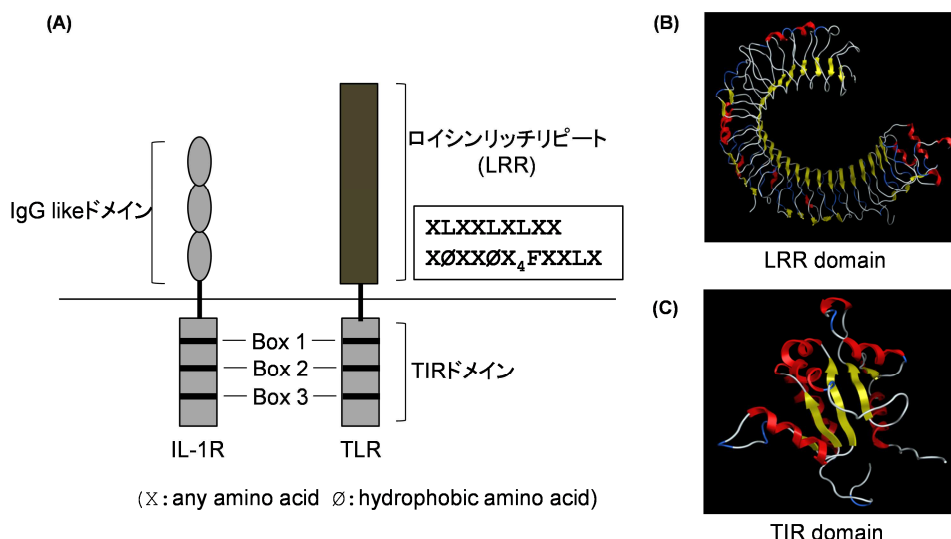
自然免疫は主に、ウイルス感染などの異物感染に対して感染初期に即時的な炎症応答を示し、マクロファージによる食作用、サイトカインの産生を介した炎症の誘導、獲得免疫系の活性化に重要であるリンパ球の活性化と動員を行う。自然免疫において重要な働きをする細胞は好中球、好酸球、マクロファージ、NK(natural killer)細胞、マスト細胞である。自然免疫細胞は Toll-like receptor (TLR) や retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)を介した異物認識機構によって活性化される。

かつては、自然免疫系は獲得免疫系が活性化するまでに炎症反応を誘導して防御反応を行う非特異で一時的なものであると考えられていた。しかし、B細胞やT細胞を持たず、獲得免疫系を有さない、キイロショウジョウバエにおいて真菌感染による防御機構が Toll と呼ばれる受容体を介して活性化されることが明らかになった(6)。Toll は、キイロショウジョウバエの初期胚において背腹軸の形成に重要である遺伝子の一つとして同定された(7, 8)。また、Toll と同様に初期胚の背腹軸形成に重要な役割を果たす遺伝子として、Toll のリガンドとなる

Spatzle、Toll のアダプタータンパクの Tube、protein kinase の Pelle、NF- $\kappa$ B の family タンパク質の Dorsal、哺乳類の I $\kappa$ B に相当する Cactus も同定された(9)。さらに、Toll とヒトの interleukin-1 receptor (IL-1R)が類似の機能を有することが分かった(8, 9)。また、細菌感染によって炎症を引き起こしたショウジョウバエで免疫応答の結果、抗菌ペプチドである Cecropin が発現していることが分かった(10)。プロモータ解析の結果、Cecropin のプロモータ領域に NF- $\kappa$ B のコンセンサス配列があることが同定され、Toll による自己免疫応答に NF- $\kappa$ B が関与していることが明らかとなった(11)。その後、哺乳類の細胞においても Toll 様レセプターの発現が発見され、哺乳類においても自然免疫系が TLR を介して制御されることが示された(12)。TLR は発見当初は細菌の菌体成分をリガンドとすると考えられていたが、ウイルス由来のメチル化された DNA をリガンドとする TLR も同定され、TLR がウイルス感染に対する防御機構をも制御していることが明らかとなった(13-16)。

### (b) TLR による自然免疫応答

TLR はマクロファージや樹状細胞など、主に自然免疫系細胞の細胞表面に存在するレセプタータンパク質である。TLR は、Fig. 2 に示したように、細胞外領域にタンパク質との相互作用に関与するロイシンリッチリピート(LRR)を持ち、細胞内領域には interleukin-1 receptor (IL-1R)の細胞内領域と約 200 アミノ酸の相同性を有する構造(Toll/IL-1R; TIR)をもつ(17)。これまでに TLR は 13 種類が報告され、特異的なリガンドを認識してシグナル伝達を活性化させることが示されてきた。



**Fig. 2 Structure of TLR.** (A) Structural homology of IL-1R and TLR. (B) X-ray structure of LRR domain of TLR3 (PDB: 3ciy). (C) X-ray structure of TIR domain of TLR1 (PDB: 1fyv).

**Table 1** Toll-like receptors and their ligands

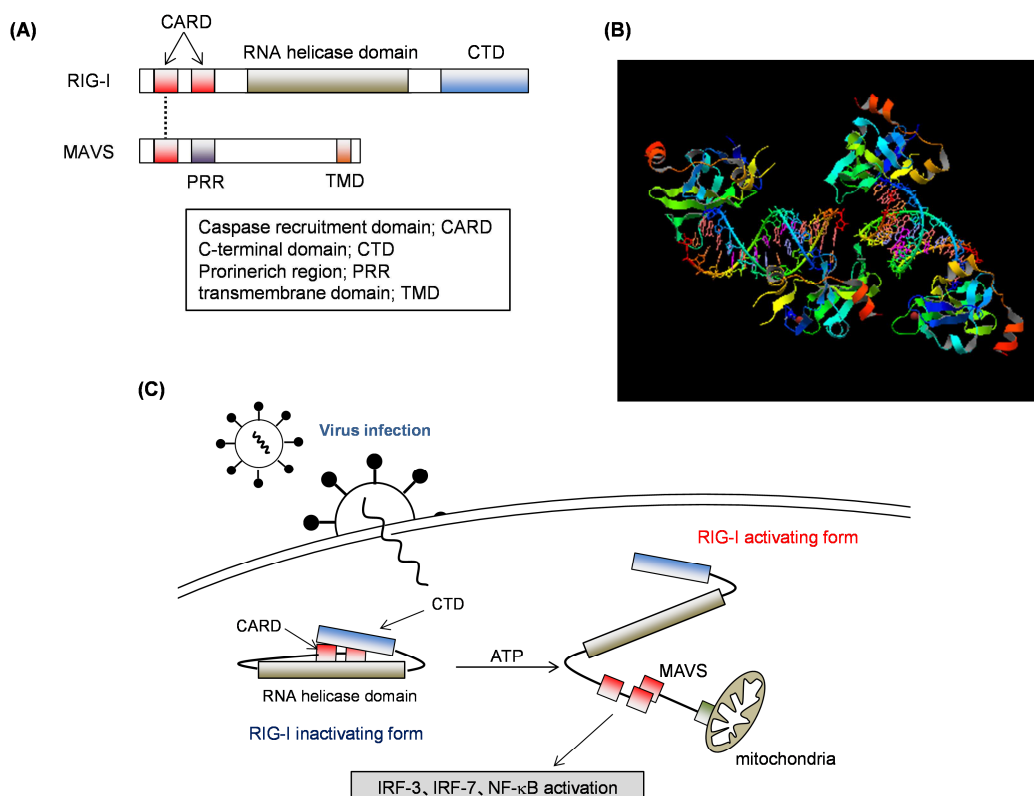
Receptor	Ligand	Origin of ligand	reference
TLR1/2/6	ペプチドグリカン	gram-positive bacreria; グラム陽性菌	18, 19
	19kDa リポタンパク質	mycobacteria	20
	zymosan	Fungi; 酵母	21
	GPIアンカー	Trypanosoma cruzi; クルーズ・トリパノソーマ	22
	phenol-soluble modulin	Neisseria meningitis; 髄膜炎菌	23
TLR3	double stranad RNA	Viruses	24
TLR4	lipopolysaccharide	gram-negative bacteria; グラム陰性菌	25
	Fusion protein	Respiratory syncytial virus; 呼吸器合胞体ウイルス	26
	タキソール	Plants	27
	Hsp60 Hsp70	Host	28-30
TLR5	Flagellin; 細菌の鞭毛構成タンパク	Bacretia	31
TLR7	イミダゾキノリン	Synthetic compounds	32
	single strand RNA	Viruses	33-34
TLR8	R-848; イミダゾキノリンの一種	Synthetic compounds	35
	single strand RNA	Viruses	33
TLR9	CpG-containing DNA	Bacretia and Viruses	36
TLR10	N.D.	N.D.	-
TLR11	N.D.	Uropathogenic bacteria; 尿路疾患性細菌	37

TLR の LRR ドメインは、Fig. 2A に示したようなアミノ酸配列の特徴を有し、Fig. 2B のような 3 次元構造を持つ(38)。LRR は Fig. 2B のように  $\beta$ -sheet と  $\alpha$ -herix 構造がループ状につながった U 字型の構造を有し、U 字型の domain 部分にリガンドが嵌り込むことによってシグナル伝達を活性化させる(38)。LRR ドメインは、Table. 1 に示したようそれぞれの TLR 特異的なリガンドの認識を制御する。中でも、TLR4 は TLR family の中で最初に同定された TLR で、グラム陰性菌の細胞膜の構成成分である lipopolysaccharide (LPS) をリガンドとする。また、TLR2 は TLR1 または TLR6 とヘテロダイマーを形成して細菌由来のリポペプチドの微細な構造の違いを認識する特徴を有している。さらに、TLR3、7、8 のようにウイルス由来の RNA をリガンドとするものや、TLR9 のように細菌由来のメチル化された DNA をリガンドとする TLR も同定されている。一方、TLR の TIR ドメインは細胞内に存在し、Fig. 2A のような保存された 3 つの box ドメインを持ち、TLR が活性化するシグナル伝達の制御にとって中心的な役割を担っている(39)。また、TIR ドメインは、Fig. 2C のように、5 つの  $\beta$ -sheet 構造を 5 つの  $\alpha$ -herix 構造が覆うような 3 次元構造をとっている。さらに、TLR は以上に述べたようなリガンドの選択性に加え、細胞内局在にも特徴がある。具体的には、TLR1、2、

4は細胞表面に存在するのに対し、TLR3、7、8、9はエンドソーム内に存在していることが知られている(40-42)。TLRによる自然免疫応答は当初、非特異的に微生物等を貪食する機構であると考えられていたが、研究が進み、その制御機構が明らかになるにつれて獲得免疫系が活性化するまでの橋渡しの役割を担っていることが明らかになった。

### (c) RIG-Iによる自然免疫応答

RIG-Iは、前述のTLRと同様に自然免疫を制御するタンパク質として知られている。TLRはマクロファージや樹状細胞などに特異的に発現し、細菌感染に対して免疫応答を示すが、TLRが発現していない細胞においてもウイルス感染の成立と自然免疫応答が見られ、RNAヘリカーゼの機能を持つRIG-Iが、TLR以外の自然免疫応答を制御する因子として同定された(43)。ウイルス感染の際、宿主細胞にはウイルスのゲノムが注入され、宿主細胞内でゲノムが複製されることによってdsRNAが蓄積する。RIG-Iは、蓄積したdsRNAを認識し、インターフェロン(interferon; IFN)の発現を誘導することによって防御反応を制御している(43)。



**Fig. 3 Innate immune reaction by RIG-I.** (A) 1<sup>st</sup> structure of RIG-1 and its adppter protein MAVS. (B) X-ray structure of RIG-I CTD binding with dsRNA (PDB: 4a2x). (C) Innate reaction of RIG-I against virus infection.

RIG-I は Fig. 3A に示したような構造を持ち、N 末端に caspase recruitment domain (CARD)を2つ持ち、中間には DExD/H ボックス型 RNA ヘリカーゼドメイン、C 末端側(C terminal domain; CTD)に Repressor domain (RD)を持つ(44)。CARD のみを過剰発現させることによって IFN の発現が見られたことから、CARD が RIG-I のエフェクタードメインとして機能していることが報告されている(44)。また、RIG-I の CTD は CARD およびヘリカーゼドメインのリンカー部分と分子内会合し、エフェクタードメインである CARD を閉構造にすることで RIG-I の活性化を抑制している。CTD 内には basic cleft と呼ばれる領域が存在し、Fig. 3B に示したように dsRNA を認識する(45)。dsRNA が結合した RIG-I は Fig. 3C に示したような ATP 依存的構造変化をとることで CARD が解放される。解放された CARD はミトコンドリアに局在するアダプター分子である IFN- $\beta$  promoter stimulator-1 (IPS-1; MAVS)と互いの CARD を介して相互作用し、TANK-Binding Kinase 1 (TBK-1)、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、IKK $\gamma$ などをリクルートし、IRF-3、7、NF- $\kappa$ Bなどを活性化させることによって IFN の発現を誘導する(46, 47)。このようにして発現し、分泌された IFN は周囲の細胞の受容体に結合し、JAK-STAT 経路を活性化させることによって IFN 誘導遺伝子(IFN-stimulated genes; ISGs)を発現させ、抗ウイルス効果を誘導する(48)。RIG-I も ISG の一つであるため、dsRNA による RIG-I の活性化はポジティブフィードバックをかけることによって非常に効果的にウイルス感染に対する防御反応を活性化している。

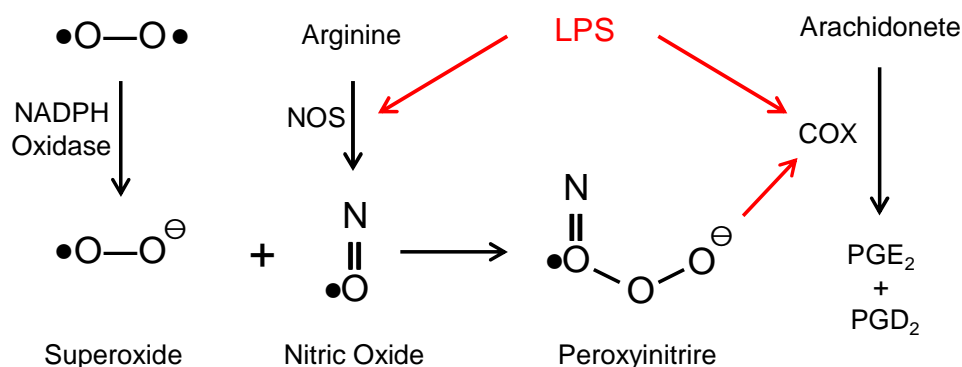
以上のように、TLR と同様、RIG-I によるシグナル伝達も自然免疫応答において重要な機構である。自然免疫は、細菌やウイルス感染の際の防御機構として非常に重要であるが、過剰に活性化すると炎症性疾患、自己免疫疾患、さらには癌の原因となるため、免疫反応の制御はこれら疾患の治療において非常に重要である。

#### (d) 炎症性メディエータ：一酸化窒素(NO)と COX-2 産生物質

前述したように、炎症や自然免疫においてマクロファージは重要な役割を果たすが、マクロファージによって産生される炎症性メディエータとして一酸化窒素(nitric oxide; NO)が知られている(49)。NO は、一酸化窒素合成酵素 (NOS; nitric oxide synthase) の働きにより、L-アルギニンのグアニジン基が水酸化されることにより生合成され、多くの生理学的、病理学的な炎症応答に対してきわめて重要な役割を果たしている(50, 51)。NOS は constitutively NOS (cNOS)と inducible NOS (iNOS)2つのグループに分類される。cNOS は、細胞特異的に恒常的に存在していることが知られ、その発現箇所によって神経型 NOS(neuronal NOS; nNOS)と血管内皮型 NOS(endothelial NOS; eNOS)に細分される(52, 53)。また、cNOS の発現量は  $Ca^{2+}$ 依存的なカルモジュリンの活性によって転写後制御を

受けることが報告されている(54)。一方、iNOS の発現は、マクロファージ、肝細胞、星状細胞などの様々な細胞において炎症性サイトカインや LPS によって誘導される(55-57)。これら NOS は 50-60%のアミノ酸配列の相同性がある(58)。炎症性サイトカインや LPS に誘導される iNOS の活性化による NO 産生は、細菌感染に対する防御機構や異物の排除にとって重要であるが、過剰な NO 産生は敗血症性ショックや細胞障害の原因となる(59)。マクロファージにおいて LPS によって誘導される iNOS の発現には転写因子 NF- $\kappa$ B、AP-1 の関与が報告されており、星状細胞では、LPS による NF- $\kappa$ B の活性化が iNOS の発現を中心的に制御することも報告されている(60)。LPS による NF- $\kappa$ B の活性化は NIK(NF- $\kappa$ B inducing kinase)や IKK(inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase)のリン酸化を誘導するタンパク質を介しておこる (61, 62)。また、LPS 刺激によって、ミトコンドリアの活性化が起こり、ミトコンドリアの電子伝達系から活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)が産生されたことで、細胞内の酸化還元ホメオスタシスが崩れ、NF- $\kappa$ B、AP-1 などの細胞内の酸化還元状態に応答する転写因子が活性化するといった機構も報告されている(63-65)。

COX-2 (cyclooxygenase-2)はアラキドン酸からプロスタグランジン合成するタンパク質であり、合成されたプロスタグランジンは、リンパ球の働きを弱め、炎症を引き起こすことによって慢性的な代謝疾患や自己免疫疾患の原因、または大腸癌など癌の原因となる(66-68)。



**Fig. 4 Relation of NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and prostaglandin (PG) biosynthesis in inflammatory cells (71).**

COX はアラキドン酸からプロスタグランジンへの生合成を行う酵素としての機能を有し、COX-1、COX-2、COX-3 からなる family を形成している(69)。さらに、COX-1 は様々な細胞で恒常的に発現しているのに対し、COX-2 は炎症性サイトカインなどの炎症性刺激によってマクロファージや単球、繊維芽細胞などにおいて発現誘導される特徴を有する(70)。また、COX-3 は 2002 年に構造の決



定が報告された COX-1 の変異体である(71)。COX-2 によるプロスタグランジンの生合成は、Fig. 4 に示したような NO と superoxide から生成する peroxynitrite を介して iNOS による NO 産生の経路とクロストークすることが報告されている(71)。

### (e) 獲得免疫系

獲得免疫系は T 細胞、B 細胞が主に働き、抗原特異的な応答を示す。T 細胞や B 細胞は自然免疫系の細胞から抗原を受け取り、抗原特異的な細胞のみが増殖する。T 細胞には CD4<sup>+</sup>のヘルパーT 細胞と CD8<sup>+</sup>の細胞障害性 T 細胞(CTL)が存在し、ヘルパーT 細胞は各種サイトカインを放出して、抗体産生細胞の B 細胞、直接異物の排除を行う CTL や自然免疫系のマクロファージを活性化させる役割を担っている。このように、獲得免疫の過剰活性化は自然免疫を活性化して炎症に結びつくこともある。

異物が生体内に入ると、抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞による貪食、引き続きリソソームによる分解を受け、10–15 アミノ酸の断片に分解する。分解されたペプチドは抗原提示細胞表面の、major histocompatibility complex II (MHC II)に結合し、ヘルパーT 細胞の T 細胞抗原受容体(TCR)によって認識される。Fig. 5 に示したように、ヘルパーT 細胞上に発現している CD4 は MHC と結合し、TCR 依存的なシグナルを活性化させて IL-2 や IFN などの炎症性サイトカインの産生を行うことで B 細胞や CTL を活性化させ、生体防御反応を示す(72)。また、TCR はα鎖とβ鎖、CD3、CD4 が非共有結合で結合することによって構成されている。

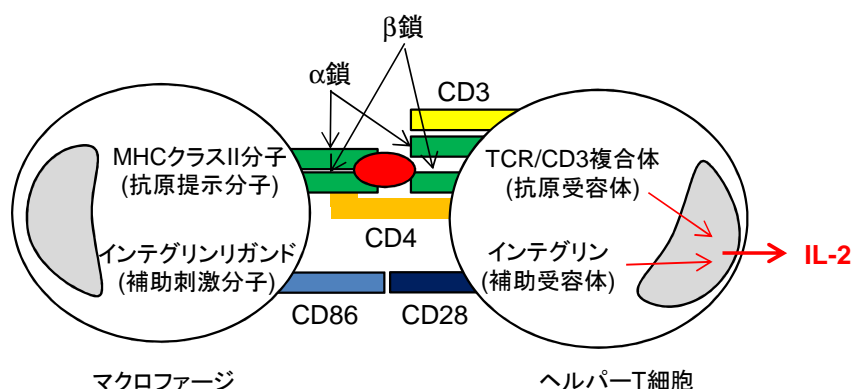


Fig. 5 Adaptive immune response activated by macrophages.

また、獲得免疫系は MHC I を介して、自己と非自己を認識する機構を有しているのに対し、自然免疫には自己/非自己を認識し分ける機能はないため、免疫系の制御にとって獲得免疫系が重要な役割を担っている。



### 1.3 炎症性疾患と免疫系

以上述べたように、炎症は細菌や病原体の排除にとって必須の反応であるが、獲得免疫系による自己の認識が甘くなったり、免疫反応が過剰に活性化すると、身体にとって有害な炎症性疾患や癌を引き起こすことになる。

免疫系の関与する炎症性疾患の一つにアテローム性動脈硬化がある。Fig. 6 に示したように、動脈は内膜、中膜、外膜からなる3層構造をとっている。また、血液中には全身の細胞にコレステロールを輸送する low density lipoprotein cholesterol (LDL; 悪玉コレステロール)が存在している。血管は血圧の上昇や喫煙などで、血管内膜が傷つけられると、血管拡張が起こり、その隙間から LDL が内膜から中膜へと入り込み、その結果、マクロファージの集積が促進される。血管内膜に入り込んだ LDL は ROS による酸化を受けて不要な物質になり、集積したマクロファージに貪食される。酸化 LDL を取り込んだマクロファージは炎症を起こし、濾胞化することでアテローム(粥状)プラークが発生する。そして、アテロームプラークによって血管内径が狭くなり、さらに重篤になり血管がふさがれることでアテローム性動脈硬化は発生する(73)。動脈硬化が進行する際には、脂質の一部が TLR のリガンドとして働き、マクロファージとそれに伴うヘルパーT 細胞の活性化を行うことでマクロファージの集積をさらに活性化させることも報告されている(73)。

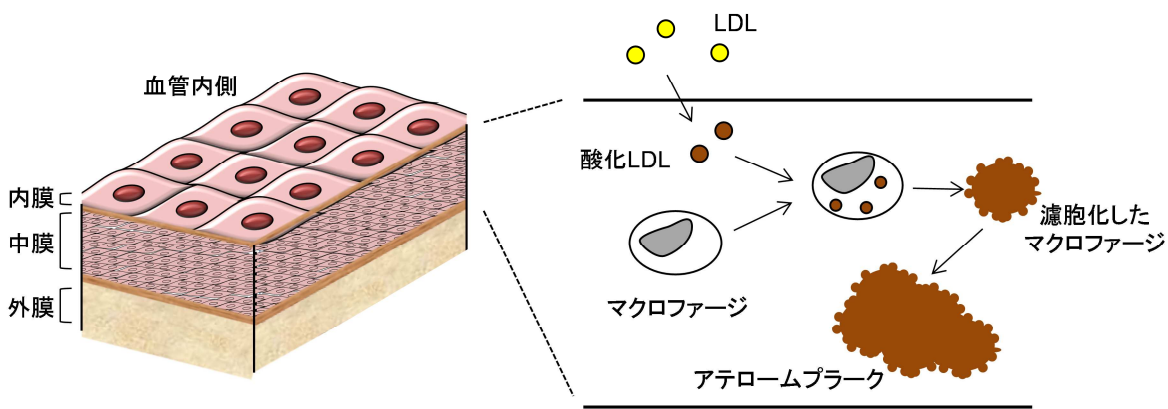


Fig. 6 The mechanism of atherosclerosis.

また、最近では、脂肪細胞においてもマクロファージの浸潤が見られ、炎症反応を起こすことで、炎症が糖尿病を引き起こすことも知られている。さらに、これまでは破骨細胞特異的な lysosomal protease と考えられていた cathepsin K が樹状細胞でも発現しており、TLR9 の下流に存在し、関節リュウマチの悪性化に大きく寄与していることも報告された(74)。

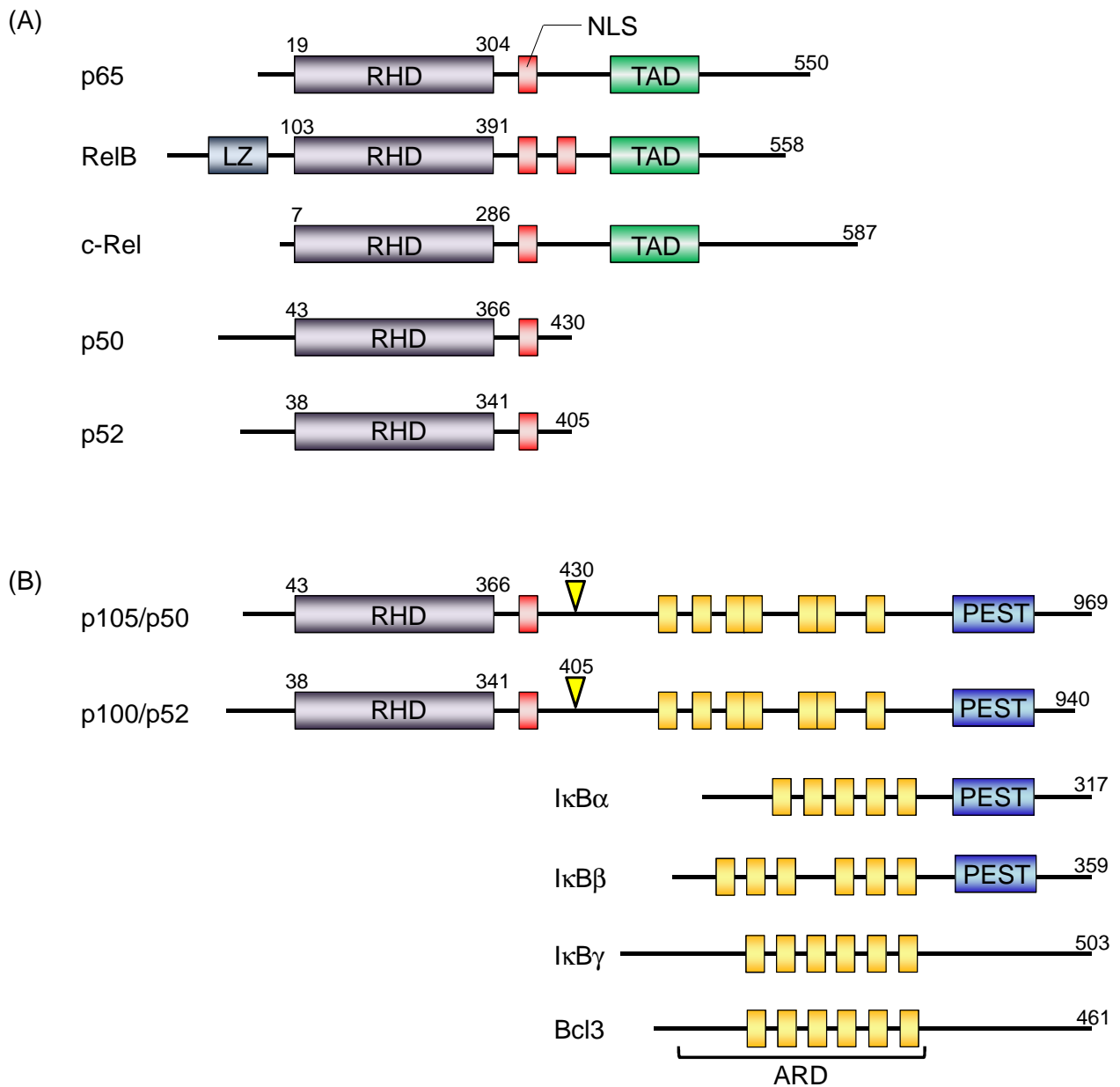
## 2. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B は免疫・炎症応答に関して重要な役割を担うタンパク質であり、1986年に David Baltimore らによって B 細胞の免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する核タンパク質として同定された(75)。エンハンサー鎖の B 断片の  $\kappa$  領域に結合することから、nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) と名付けられた(76)。その後、その構成因子は分子量 65kDa と 50kDa のタンパク質である、p65 と p50 からなるヘテロダイマーであることが明らかにされ、さらに、p65 と p50 と相同性を有するタンパク質である p52、RelB、c-Rel などが次々に同定された。一方、それとは別に脾臓に B 細胞性腫瘍を誘発するレトロウイルスから *rel* と呼ばれる癌遺伝子が同定され、NF- $\kappa$ B と *rel* タンパク質の構造上の類似性が明らかになり、Rel/NF- $\kappa$ B family が誕生した(77, 78)。更に、B 細胞以外の多くの細胞でも NF- $\kappa$ B の存在が確認され、LPS 刺激などによっても活性化されることが報告された(79)。

### 2.1 NF- $\kappa$ B 構成因子 Rel family タンパク質と阻害因子 I $\kappa$ B family タンパク質

NF- $\kappa$ B は上述したように、Rel family タンパク質の homodimer または heterodimer から構成されている(80)。Rel family タンパク質は Fig. 7 に示したように、共通して N 末端側に Rel homology domain (RHD) を有し、この RHD には、核局在シグナル(nuclear localization signal; NLS)、dimerization domain、DNA binding domain、NF- $\kappa$ B 不活性化因子である I $\kappa$ B family (Inhibitor of NF- $\kappa$ B family) タンパク質と結合する domain がある(77)。また、p65、RelB、c-Rel は p52 や p50 と異なり、C 末端側に trans activation domain (TAD) を持つといった特徴を有する。NF- $\kappa$ B は、Rel family タンパク質の homodimer または heterodimer から構成されることが報告されているが、RelB のみ RelB 同士の homodimer および、p65、c-Rel との heterodimer は形成しない(81)。また、p50、p52 の homodimer または heterodimer は TAD を持たないことから p65、RelB、c-Rel を含んだ転写活性を持つ NF- $\kappa$ B と競争的にコンセンサス配列に結合することで repressor としての機能を発揮する。

一方、I $\kappa$ B family タンパク質(I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 、I $\kappa$ B $\gamma$ 、I $\kappa$ B $\epsilon$ 、Bcl-3)はアンキリンリピートドメイン(ARD)と呼ばれる特徴的な配列を持っている。アンキリンリピートは転写因子や細胞周期・分化を制御するタンパク質に存在することが報告されている(77)。I $\kappa$ B タンパク質はアンキリンリピートドメインを介して Rel family タンパク質の RHD に結合し、Fig. 8 のように、Rel family タンパク質の NLS をマスクしている。また、p50、p52 の前駆体である p105 (NF- $\kappa$ B1)、p100 (NF- $\kappa$ B2) は C 末端側にアンキリンリピートを有し、I $\kappa$ B と類似の構造を持っている。特に p100 は RelB/p100、p65/p100 の dimer 形成によって NF- $\kappa$ B の NLS をマスクし、NF- $\kappa$ B の細胞質局在を活性化させるため、I $\kappa$ B family に分類されている(77)。

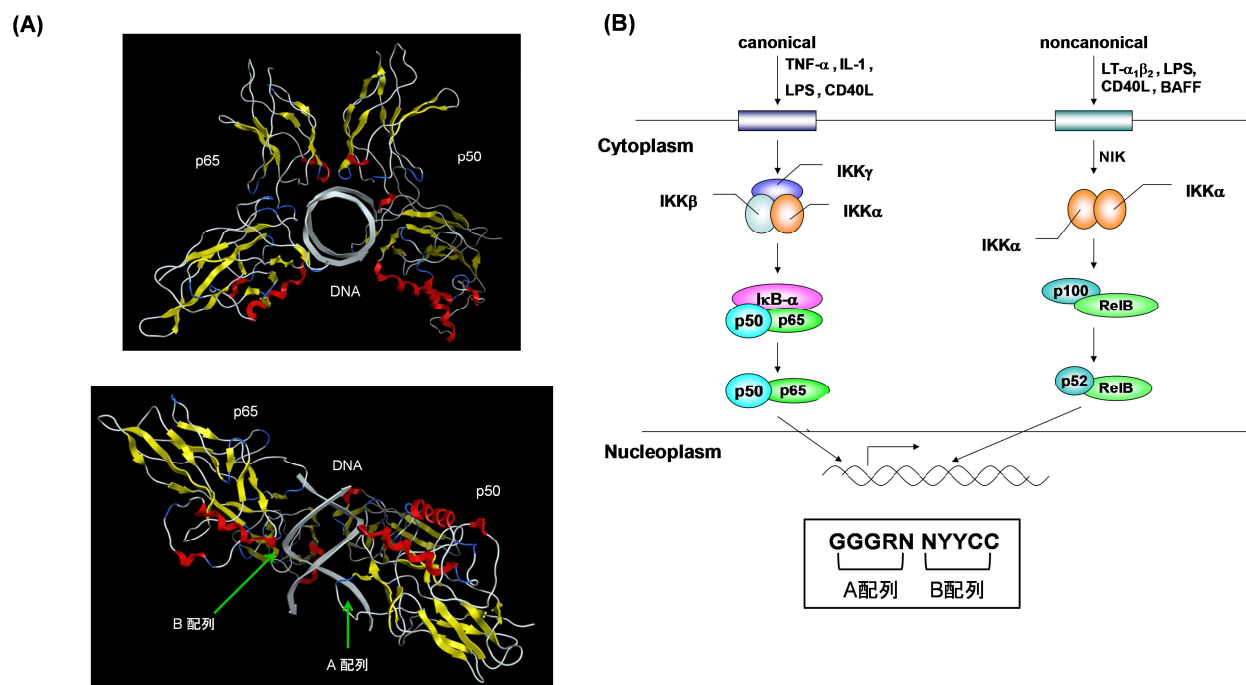


**Fig. 7 Members of Rel/NF- $\kappa$ B family (A) and I $\kappa$ B family (B).** The yellow arrows mean the point of endo-proteolytic sites of NF- $\kappa$ B1 (p105/p50) and NF- $\kappa$ B2 (p100/p52). RHD; rel homology domain (purple), NLS; nuclear location signal (red), TAD; transactivation domain (green), LZ; leucine zipper domain of RelB (dark blue), PEST; proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) rich domain (blue), ARD; ankyrin repeat domain (yellow).

また、Bcl-3 は p50/p52 を構成因子とする repressor として機能する NF- $\kappa$ B に結合することによって p50/p52 の DNA 結合能を失わせ、転写活性をもつ NF- $\kappa$ B の DNA 結合を促進させる機能を持つ(82-84)。

## 2.2 Canonical NF- $\kappa$ B と noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路

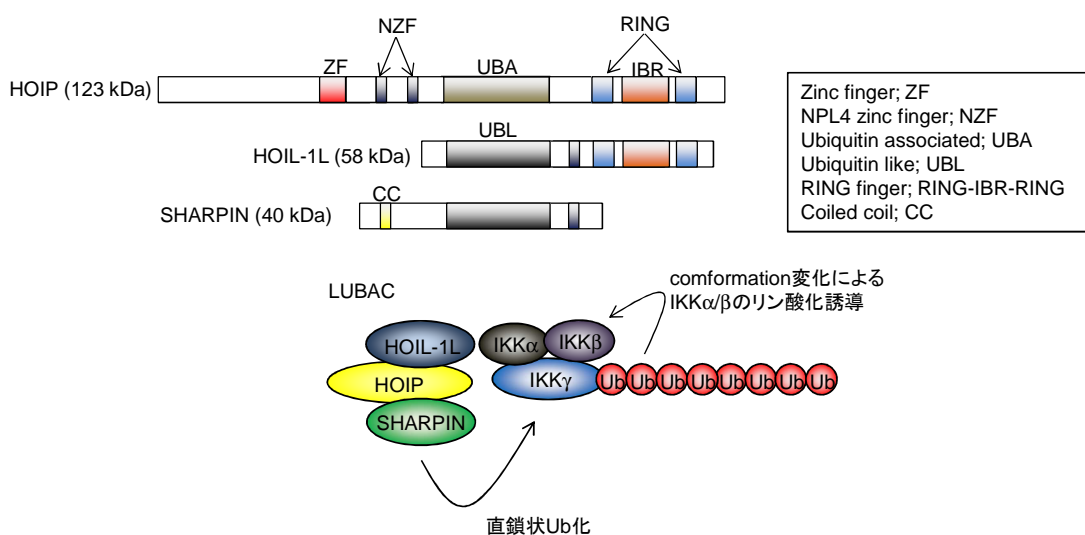
前述したように、NF- $\kappa$ B は Rel family タンパク質の homodimer または heterodimer によって構成され、Fig. 8A に示したように  $\kappa$ B 配列(GGGRNNYYCC; R: purine bases, Y: pyrimidine bases, N: any bases)の A 配列と B 配列を dimer の各構成因子が認識することによって結合している。p65/p50 の heterodimer では p50 が A 配列、p65 が B 配列を認識する。さらに、Fig. 8B に示したように、NF- $\kappa$ B は p65/p50 を主な構成因子とする canonical NF- $\kappa$ B と RelB/p52 を主な構成因子とする noncanonical NF- $\kappa$ B がある(85)。Canonical NF- $\kappa$ B 経路が TNF $\alpha$ や IL-1、LPS、CD40L などの刺激によって IKK $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ の heterotrimer の活性化を経て誘導される。一方、noncanonical 経路は LT $\alpha_1$ / $\beta_2$ 、BAFF 刺激によって NIK の活性化を経た IKK $\alpha$  の homodimer の活性化を介する。引き続き、プロテアソームにおける p100 の p52 へ限定分解の誘導を介して活性化される(85)。また、canonical NF- $\kappa$ B は即時的な免疫応答に関与するのに対し、noncanonical NF- $\kappa$ B は B 細胞の成熟や自己免疫疾患に関与することが知られている(85)。



**Fig. 8 X-ray structure of NF- $\kappa$ B.** (A) Canonical NF- $\kappa$ B/DNA complex (PDB: 1VKX). A-sequence recognized by p50 and B-sequence recognized by p65 were described. (B) Canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways.

### (a) Canonical NF- $\kappa$ B 活性化経路

Canonical NF- $\kappa$ B 経路の NF- $\kappa$ B サブユニット構成因子は主として p65/p50 と p50/c-Rel であり、この heterodimer は通常 I $\kappa$ B と結合することによって、NLS がマスクされ、核移行が阻害された不活性な状態で細胞質に存在している。そして、canonical な NF- $\kappa$ B 経路では Fig. 8B にも示したように、TNF $\alpha$  や IL-1、LPS、CD40L などのサイトカインによって刺激を受けると、I $\kappa$ B をリン酸化する kinase である IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、IKK $\gamma$  (NEMO) から成る三量体が活性化される。その後、IKK サブユニットが I $\kappa$ B の 32 番目と 36 番目のセリン残基を直接リン酸化して、次いでユビキチン化に参与する SCF (Skp/Cdc53/F-box protein) 複合体が結合する。そして、SCF 複合体に結合している E2 ユビキチン転移酵素によって I $\kappa$ B $\alpha$  にユビキチン付加が行われ、ユビキチン化を受けた I $\kappa$ B $\alpha$  は 26S プロテアソームで分解される (86, 87)。Canonical NF- $\kappa$ B の活性化において、IKK $\gamma$  は IKK 複合体の調節ドメインとして機能するが、noncanonical NF- $\kappa$ B は IKK $\gamma$  非依存的に活性化する (88) ことが知られているように、canonical NF- $\kappa$ B の活性化において IKK $\gamma$  が重要な役割を果たす。IKK $\gamma$  の活性化にはユビキチン化が関与していることが知られていたが、その制御機構は長く未解明であった。しかし、最近、IKK $\gamma$  のユビキチン化において、Fig. 9 に示した 2 種の RING-finger タンパク質、HOIP と HOIL-1L、HOIL-1L と高い相同性を持つ SHARPIN からなる LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体の関与が示され、LUBAC が IKK $\gamma$  に直鎖状のポリユビキチン鎖を付加し、IKK $\gamma$  の構造変化を誘導することで IKK $\gamma$  の活性化を制御していることが報告された (89-91)。



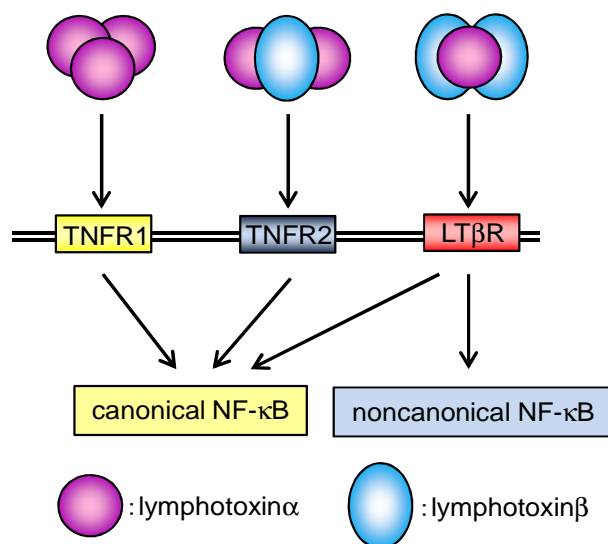
**Fig. 9 Structure of HOIP/HOIL-1L/SHARPIN complex; LUBAC**

LUBAC は発見当初 HOIP/HOIL-1L の複合体と考えられたが、SHARPIN 欠損マウスが IKK $\gamma$ の不活性化変異によって起こる X連鎖 IgM 症候群や低汗性外胚形成不全症などの遺伝病に類似した症状を示したことから、SHARPIN と IKK $\gamma$ の関連が注目され、解析が進められた。その後、SHARPIN が HOIP/HOIL-1L の安定化タンパク質として同定された(90-91)。IKK $\gamma$ と同様に IKK complex を構成する IKK $\beta$ が UV 刺激によって活性化する NF- $\kappa$ B の核内でのアダプタータンパク質として機能し活性化制御を行うことも報告されている(92)。

以上のように、即時的な免疫応答の経路として古くから研究が進められて来ている canonical NF- $\kappa$ B であるが、その活性化経路の中には未だ未解明な部分もあり、IKK の制御機構の解明をはじめ新たな制御機構が明らかにされ続けている。

### (b) Noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路

Noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路は、IKK $\gamma$ 非依存的に活性化する経路である(88)。Noncanonical NF- $\kappa$ B は活性化する際に、プロテアソームによって p100 から p52 への限定分解を受ける。また、noncanonical NF- $\kappa$ B 経路は canonical NF- $\kappa$ B 経路が TNF $\alpha$ レセプターを介して活性化されるのに対して、lymphotoxin- $\beta$  (LT- $\beta$ )レセプターを介して活性化される。

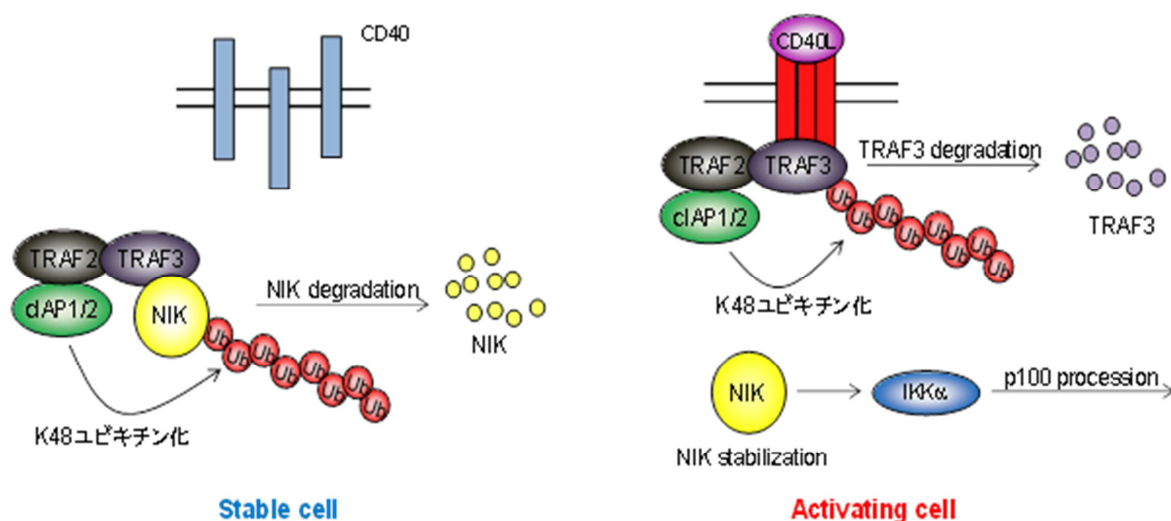


**Fig. 10 Components dependent receptor recognition and signal activation by lymphotoxin homo or heterotrimers.**

Lymphotoxin は 1968 年に活性化リンパ球が産生する細胞障害因子として発見され、lymphotoxin には lymphotoxin  $\alpha$  と lymphotoxin  $\beta$  の 2 種が存在する(94)。LT- $\beta$  レセプターのリガンドは、この 2 種類の lymphotoxin の homo- または heterotrimer



によって構成されていて、 $LT\alpha_3$ 、 $LT\alpha_1\beta_2$ 、 $LT\alpha_2\beta_1$ のサブユニットが存在し、 $LT\alpha$ はヒトでは 205 個、マウスでは 202 個のアミノ酸から構成される分子量25 kDaのタンパク質である。一方、 $LT\beta$ はヒトでは 244 個、マウスでは 306 個のアミノ酸から構成されるタンパク質である。また、canonical、noncanonical NF- $\kappa$ B 経路を制御するレセプターには TNF レセプター1(TNFR1)、2(TNFR2)と lymphotoxin  $\beta$  レセプター(LT- $\beta$ R)の3つが存在することが知られ、それぞれのレセプターは Fig. 10 に示したようなシグナル伝達によって NF- $\kappa$ B の活性化を行う(94)。そして、この lymphotoxin  $\alpha$ と lymphotoxin  $\beta$ からなるサブユニットは Fig. 10 に示したように、 $LT\alpha_3$ は TNFR1 に、 $LT\alpha_1\beta_2$ は LT- $\beta$ R に、 $LT\alpha_2\beta_1$ は TNFR2 に結合する。



**Fig. 11 Regulation of NIK stabilization by cIAP1/cIAP2/TRAF2/TRAF3 complexes via K48 polyubiquitination.**

2001年に、Shao-Cong Sunらによって、p100のp52へのプロセッシングにおいて、NIKの発現が関与していることが明らかにされた(95)。NIKはMAPKKと相同性を持つkinase domainを有しており、NIKを過剰発現させた繊維芽細胞で、p100からp52へのプロセッシングの際に、IKK $\alpha$ の発現が必要であることが報告された(96)。これによってnoncanonical NF- $\kappa$ B経路においてIKK $\alpha$ がNIKの下流に存在し、NIKによるp100のリン酸化がp100のプロセッシングを誘導することが示された(97)。さらに、2008年、noncanonical NF- $\kappa$ Bの活性化が Fig. 11 に示したように、cIAP1/2、TRAF2/3によるNIKのユビキチン化によって制御されていることが示され、noncanonical NF- $\kappa$ Bの活性化機構の研究が大きく進んだ(98, 99)。ユビキチン化には様々な種類があり、ユビキチン化のパターンによって、ユビキチン化タンパクのその後の挙動は変化する。中でもK48のポリユビキチン化はタンパク質分解経路へとユビキチン化タンパクを誘導する(100)。一

方、前述の LUBAC による直鎖状のユビキチン化はユビキチン化タンパク質に構造変化を引き起こすのみで、タンパク質分解は誘導しない。noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化には NIK の活性化が必須であるが、NIK は通常状態では Fig. 10 のように cIAP1/cIAP2/TRAF2/TRAF3 複合体によって K48 ポリユビキチン化を受け、プロテアソームによって分解されている。CD40L などのサイトカイン刺激を受けると、cIAP1/cIAP2/TRAF2/TRAF3 複合体は TRAF を介してレセプターにリクルートされる。レセプターにリクルートされた cIAP1/cIAP2/TRAF2/TRAF3 複合体中の TRAF3 が cIAP1/2 によって K48 ポリユビキチン化を受けるようになり、TRAF3 のプロテアソームによる分解が誘導される。cIAP1/cIAP2/TRAF2/TRAF3 複合体と NIK は TRAF3 を介して結合するため、TRAF3 を失った cIAP1/cIAP2/TRAF2 複合体は NIK に結合できなくなり、結果として NIK は K48 ポリユビキチン化されなくなり、NIK が安定化する。安定化した NIK は IKK $\alpha$  の homodimer を活性化し、下流の noncanonical NF- $\kappa$ B 経路を活性化する(98, 99)。

noncanonical NF- $\kappa$ B は自己免疫疾患に関与する経路として知られているが、最近では一部の乳癌においても悪性化への寄与が報告され、NIK がエピジェネティックな制御を受けていることも報告された(101)。

### 2.3 Nuclear-cytoplasmic shuttling system による NF- $\kappa$ B の活性化機構

NF- $\kappa$ B の活性化制御において核局在と細胞質局在の制御は非常に重要である。真核細胞では、NF- $\kappa$ B の核内の輸送は importin family タンパク質によって制御されている(102)。importin は NLS が解明されてから 10 年後に同定され、標的タンパク質の NLS を認識する importin- $\alpha$  と核への輸送を行う importin- $\beta$  があることが報告された(103-107)。importin- $\alpha$  はアルマジロモチーフ(Armadillo motif; ARM motif)と呼ばれる疎水性アミノ酸に富んだ領域を持ち、I $\kappa$ B family タンパク質の分解によって立体構造的に表面に出たアルギニン/リジンに富んだアミノ酸配列の NLS を認識して結合する。

**Table 2 Affinity of importin- $\alpha$  with Rel family proteins.**

	$\alpha$ 1	$\alpha$ 3	$\alpha$ 4	$\alpha$ 5	$\alpha$ 6	$\alpha$ 7
p65		○	○	○		○
RelB	○		○	○		○
c-Rel			○	○	○	○
p50		○	○	○	○	○
p52	○	○	○	○	○	○



Importin- $\alpha$ はこれまでに $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ の6種類が報告されている。NF- $\kappa$ Bにimportin- $\alpha$ が結合するとimportin- $\alpha$ のN末側にあるimportin- $\beta$  binding domain (IBB)にimportin- $\beta$ が結合し、NF- $\kappa$ Bは細胞質から核へと輸送される(108)。最近の研究によって、importin- $\alpha$ がNF- $\kappa$ BのNLSを認識する際、Table 2に示したようにdimerの構成因子特異性があることが報告された(109)。また、RelB/p52からなるNF- $\kappa$ BのRelB側のNLSを機能させなくするとRelB/p52が核へと移行できなくなるのに対し、p52側のNLSを機能させなくしてもRelB/p52は核へ移行できることが報告されている。このことから、RelB/p52のdimerの核移行はRelBのNLSが制御していることが示された(109)。一方、p65/p52からなるNF- $\kappa$ Bでも同様の検討が行われ、p52のNLSがp65/p52からなるNF- $\kappa$ Bの核移行を制御することが明らかとなった(109, 110)。

NF- $\kappa$ Bの核外排出にはCRM1依存的な経路が最もよく知られている(111)。CRM1はexportin-1とも呼ばれ、転写因子等が核内に蓄積すると、核外移行シグナル(nuclear export signal; NES)を認識して結合し、標的タンパク質を核外へと輸送するタンパク質である。Canonical NF- $\kappa$ Bの核外輸送にはI $\kappa$ B $\alpha$ が重要な役割を果たす。I $\kappa$ B $\alpha$ はNF- $\kappa$ Bの活性化の過程で前述のように分解を受けるが、速やかに再合成される。I $\kappa$ B $\alpha$ にはNLSは存在しないが、未同定のタンパク質と結合することで核へと移行することが報告されている(112)。核へと移行したI $\kappa$ B $\alpha$ はcanonical NF- $\kappa$ Bと結合し、DNA結合能を失わせ、NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 複合体はCRM1によってI $\kappa$ B $\alpha$ のNESが認識され、核外へと排出される。一方、noncanonical NF- $\kappa$ Bは、I $\kappa$ B $\alpha$ との親和性が弱いため、noncanonical NF- $\kappa$ Bの核外排出におけるI $\kappa$ B $\alpha$ のNESの寄与は少ないことが報告されている(113)。

また、CRM1以外にもNF- $\kappa$ Bの核外排出を行うタンパク質が同定されている。例えば、14-3-3はI $\kappa$ B $\alpha$ /p65複合体に結合し、核外排出を行うことが報告されている(114)。核内受容体としての機能を有し、糖尿病において重要な役割を担うPPAR $\gamma$ はp65のCRM1非依存的な排出を行い、NF- $\kappa$ Bに加え、p65とheterodimerを形成するC/EBP $\beta$ の活性化も抑制する(115, 116)。I $\kappa$ B $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの核外排出は、NF- $\kappa$ Bがアセチル化されると、I $\kappa$ B $\alpha$ が結合出来なくなるため抑制される。これまで、一部の乳癌細胞などで恒常的に活性しているcanonical NF- $\kappa$ Bの活性化制御の機構は未解明であったが、NF- $\kappa$ Bと並んで主要なシグナル伝達経路として知られるSTAT3が、核内でNF- $\kappa$ Bがアセチル化されることを促進し、恒常的なNF- $\kappa$ Bの活性制御を行うことが最近報告された(117)。

## 2.4 Canonical-noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路の相互作用

最近、canonical NF- $\kappa$ B 経路と noncanonical NF- $\kappa$ B 経路は互いにクロストークし、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化が canonical NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する知見も得られている(118)。これまでに、IKK $\alpha$ を欠損させたマウスでは炎症応答が増強することが報告されていたが、その機構は未解明であった(119)。

前述したように、noncanonical NF- $\kappa$ B が活性化する際には IKK $\alpha$ の活性化が必須である。Noula Shembade らは、IKK $\alpha$ が TAX1BP1 (Tax1 binding protein 1)と呼ばれるタンパク質をリン酸化することを見出した。TAX1BP1 は human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)由来のタンパク質である Tax-1 に結合するタンパク質として yeast 2 hybrid (Y2H)法で同定された(120)。TAX1BP1 はリン酸化されるとユビキチンリガーゼ A20 と複合体を形成し、A20 が脱ユビキチン活性を發揮する際の足場タンパク質として機能する。Fig. 12 のように、A20 は canonical NF- $\kappa$ B が活性化される際にユビキチン化されるタンパク質である TRAF6 を脱ユビキチン化し、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害する(121)。

以上のような現象から、canonical と noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路は互いを抑制し、どちらか一方が選択的に活性化した状態に至るのではないかと考えられる。後述するが、成人 T 細胞白血病(Adult T-cell leukemia; ATL)細胞では noncanonical NF- $\kappa$ B が恒常的に強く活性化しているが、canonical NF- $\kappa$ B の活性化は見られない。ATL は、発症率は低い難治性疾患であるため、効果的な治療法の発見が求められている。

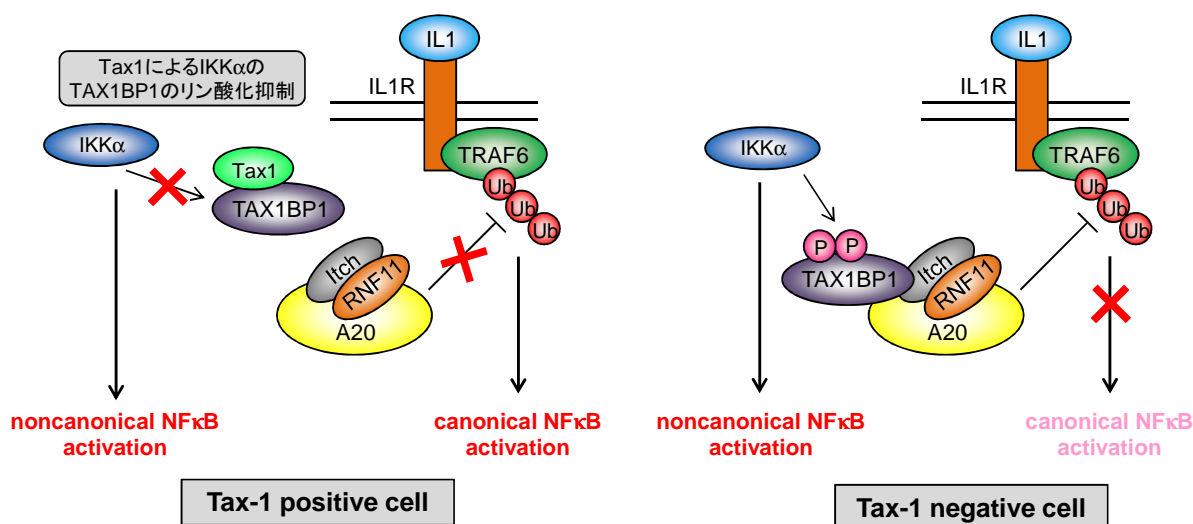


Fig. 12 Regulation of canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B activation by Tax1 and TAX1BP1.

### 3. 成人 T 細胞白血病(adult T-cell leukemia; ATL)

ATLはレトロウイルスの一種である human T-cell leukemia virus type-1(HTLV-1)の感染によって引き起こされる予後不良のリンパ系腫瘍である(122, 123)。ATLは極めて悪性度が高く、既存の多くの抗癌剤に対して抵抗性を示す。そのため、一度発症すると患者は1年程度で死亡する。

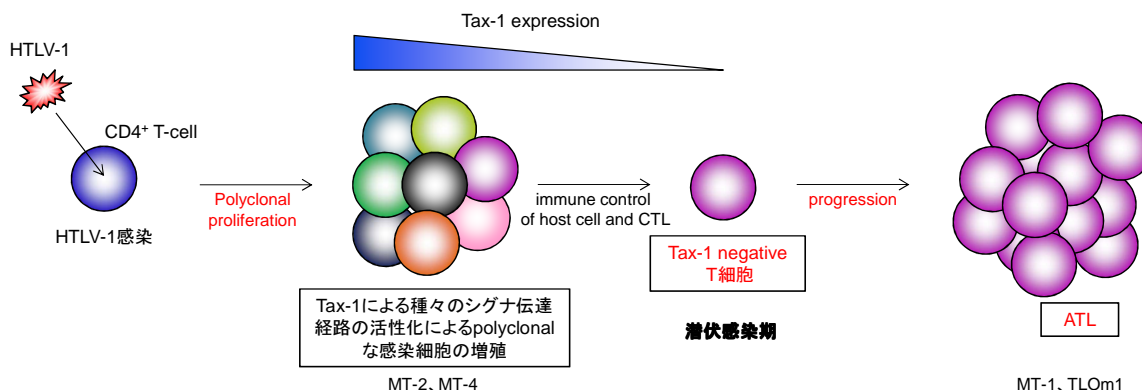
#### 3.1 Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)

ATLの原因ウイルスである HTLV-1 は CD4<sup>+</sup>の T 細胞選択的に感染し、その感染様式は母乳を介した母子感染が主な感染ルートとなっている。HTLV-1 キャリアは世界で 1,000~2,000 万人いるとされているが、日本においては北九州に HTLV-1 のキャリアが多いなど、地域偏在性があるのが特徴である(123)。HTLV-1 は約 60 年の潜伏期間を経て発症し、生存期間中央値(Median Survival Time; MST)は約 13 ヶ月である(123)。HTLV-1 は、ATL 以外にも HTLV-1 関連脊髄症(HTLV1-Associated Myelopathy; HAM)や HTLV-1 ぶどう膜炎(HTLV-1 uveitis, HU)の原因になる(123)。HTLV-1 は感染細胞に転写制御因子である Tax を発現させる(124, 125)。Tax はウイルス由来の遺伝子の転写制御を行うと共に、感染細胞の増殖因子のシグナル伝達経路も活性化することで ATL の悪性化に大きく寄与する。ATL は発症までに長い潜伏期間を有するが、HTLV-1 感染後に、推定 5 つ以上の遺伝子異常が段階的に起こることによって ATL の発症につながると考えられている(126)。ATL のこのような性質は、ATL の病理解明が多段階性発癌機構の解明にも大きく貢献できることを裏付けている。

#### 3.2 Tax

レトロウイルス HTLV-1 はウイルスの構造遺伝子に加えてウイルスの潜伏感染に重要となる Tax や Rex 遺伝子もコードしている(127)。Tax はウイルス遺伝子の転写活性化因子であり、Rex は転写後に RNA レベルでタンパク質発現を制御する調節因子である。また、Tax と Rex は 2 回スプライシングを受ける特徴を有している。ウイルスが感染すると、*tax* と *rex* が選択的に発現する。細胞内に蓄積した Tax はウイルス遺伝子の発現を転写レベルで増強し、それに伴い、Rex タンパク質が細胞内に蓄積する。また、Tax は宿主細胞内の様々なシグナル伝達経路を活性化し、結果的に、Fig. 13 に示したような polyclonal な感染細胞の増殖を誘導する。蓄積した Rex タンパク質はウイルス由来の mRNA を選択的に認識してスプライシングの制御を行うことで、2 回スプライシングによって転写後制御を受ける Tax および Rex の発現を抑制する。一方、Rex は、ウイルスの構造遺伝子で 1 回のスプライシングを受ける *env* やスプライシングを受けない *gag*、*pro*、*pol*、の mRNA を増加させ、宿主細胞からウイルスを放出させる。以上の

ような機構によって、次第に Tax の発現は Rex によって抑制され、Rex の発現も Rex 自身によって抑制されるようになる。そのため、Fig. 13 のように、HTLV-1 の潜伏感染期では、Tax と Rex とともに発現量の弱い状態になり、感染細胞内でウイルスの構造遺伝子がほとんど発現していない状態(潜伏感染期)に至る(128, 129)。



**Fig. 13 Schematic representative of the natural course from HTLV-1 infection to the monoclonal ATL.**

HTLV-1 がウイルス遺伝子を発現せずに宿主細胞内に存在し続けることは、感染細胞が宿主免疫応答を避けることを可能にする。また、Tax の発現が抑制された状態になることは、Tax 発現細胞を標的とする CTL による攻撃を回避することを可能にし、感染細胞の生存に大きく貢献している(130)。また、Tax は、宿主細胞内のシグナル伝達系にも影響を与え、IL-2 依存的な CD4<sup>+</sup> の T 細胞に IL-2 非依存的増殖性を獲得させて不死化を誘導する(131)。

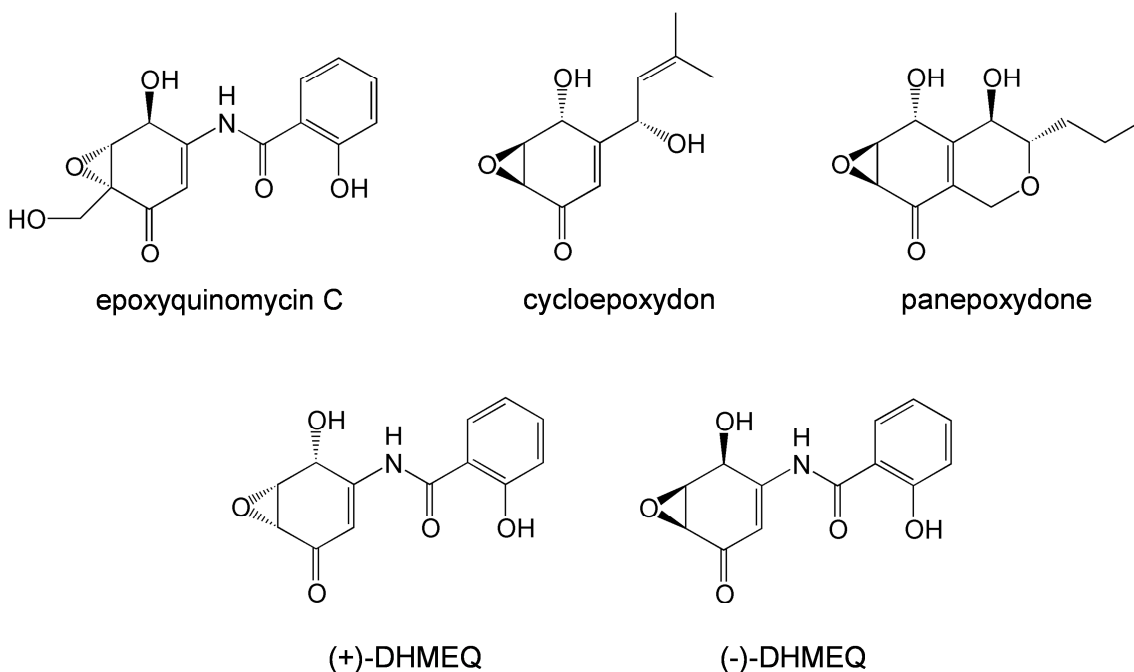
Tax によって活性化され、ATL の発症に関与するシグナル伝達経路として、NF- $\kappa$ B が非常に重要な役割を果たす(132)。Tax は IKK $\gamma$ に直接結合して IKK $\alpha/\beta/\gamma$  複合体を活性化させることで、canonical NF- $\kappa$ B と canonical NF- $\kappa$ B によって誘導される noncanonical NF- $\kappa$ B を活性化させる(133)。しかし、上述したように、Tax は HTLV-1 の感染初期のみ宿主細胞に存在し、次第にその発現は減少していく。その結果 IKK $\gamma$ の活性化が減少し、canonical NF- $\kappa$ B の活性化は抑制され、noncanonical NF- $\kappa$ B のみが選択的に活性化した状態に至る(134)。

HTLV-1 と核酸レベルで 70%の相同性を有するレトロウイルスとして HTLV-2 が知られているが、HTLV-2 は canonical NF- $\kappa$ B のみを活性化することが報告されている(135)。HTLV-1、HTLV-2 がそれぞれ感染細胞に発現させる Tax-1 と Tax-2 はアミノ酸レベルで 70%以上の相同性を有しているが、HTLV-2 感染者において ATL は発症しない(136)。このことから、ATL の発症には noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化が必須であると考えられ、ATL 治療において noncanonical NF- $\kappa$ B を標的とすることは非常に効果的である。

## 4. NF- $\kappa$ B 阻害剤

### 4.1 NF- $\kappa$ B 阻害剤(-)-DHMEQ

Fig. 14 に示したような分子構造を持つ(-)-DHMEQ は弱い抗菌活性を有する epoxyquinomycin C の骨格を基に当研究室で分子デザインされた新規 epoxydone 化合物である。

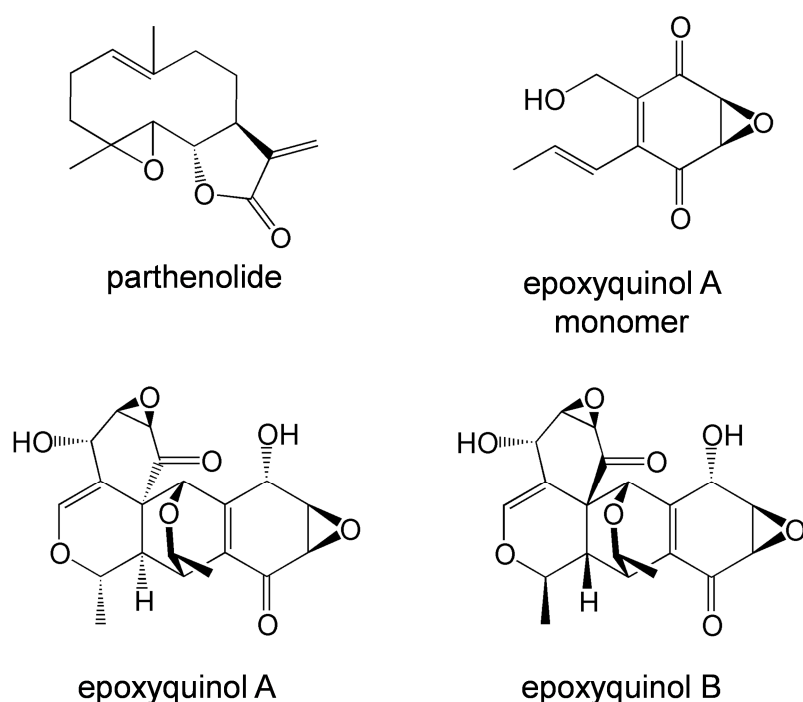


**Fig. 14 Structure of epoxyquinomycin C, cycloepoxydon, panepoxydone, (+)-DHMEQ and (-)-DHMEQ.**

epoxyquinomycin A と B は 1996 年に *Amycolatopsis* に属する菌株の培養液から弱い抗菌活性を有する物質として単離され、次いで、epoxyquinomycin A と B の精製過程で類縁体の epoxyquinomycin C と D が単離された(137, 138)。epoxyquinomycin C と D には epoxyquinomycin A, B のような抗菌活性はなく、100  $\mu$ g/ml においても細胞毒性は観察されなかった。epoxyquinomycin A, B, C, D はサリチル酸骨格を有することからタイプ II コラーゲンにより誘発されるマウスの関節炎モデルを用いての抗炎症作用の検討が行われ、その結果、4 つの epoxyquinomycin は全て低用量で抗炎症作用を示すことが分かった(138)。その後、panepoxydone(139)や cycloepoxydon(140)などの epoxydone 骨格を有する化合物が NF- $\kappa$ B の阻害作用を示すことが報告され、これらの化合物が epoxyquinomycin C と類似の構造を有していたため、epoxyquinomycin C にも NF- $\kappa$ B 阻害作用が期待されたが、epoxyquinomycin C は NF- $\kappa$ B を阻害しなかった。しかし、当研究室に

において、epoxyquinomycin を panepoxydone や cycloepoxydon の構造に近付けるために 5 位のヒドロキシメチル基を除去した化合物 DHMEQ が分子デザイン合成された。その結果、(-)-DHMEQ は、マウスのコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて epoxyquinomycin 類よりも強い抗炎症作用を示した(141)。

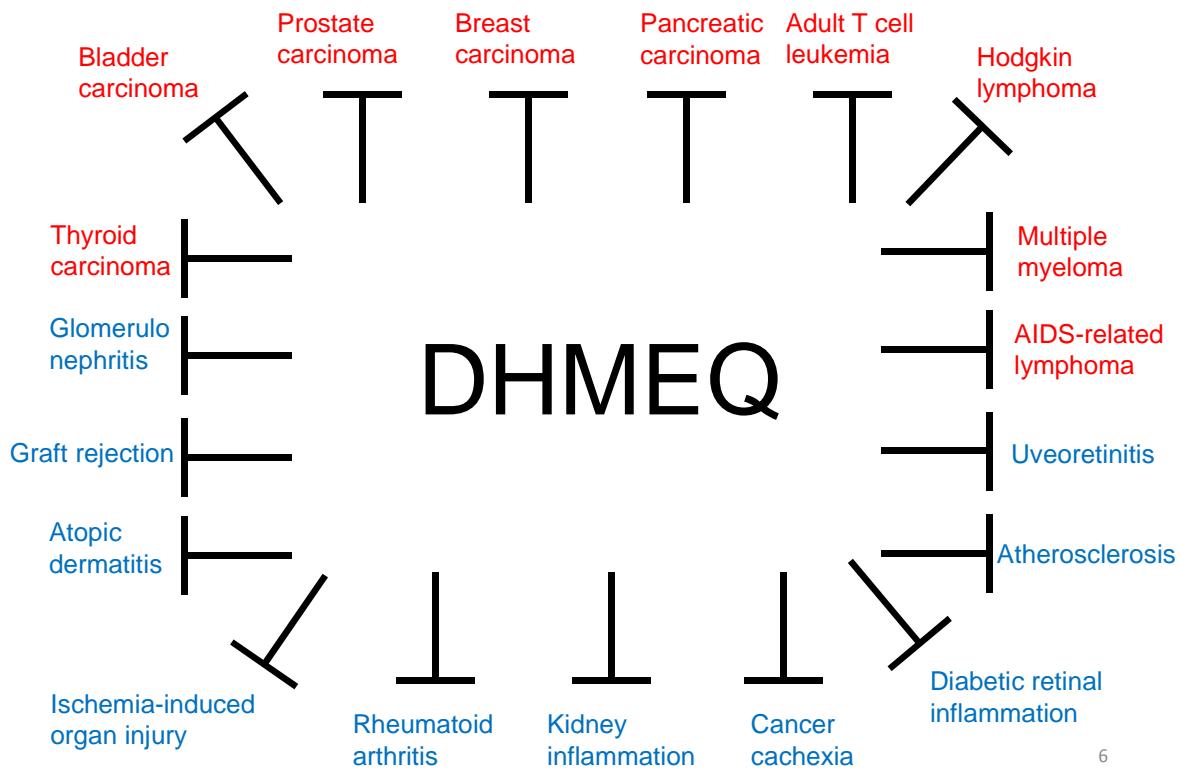
また、DHMEQ には(-)体、(+ )体が存在し、(-)-DHMEQ は(+)-DHMEQ の 10 倍の活性をもつことも報告されている(142)。当研究室において、(-)-DHMEQ が p65 の 38Cys を認識して共有結合することが示された(143)。また、(-)-DHMEQ 類似のエポキシ環構造を有する NF- $\kappa$ B の阻害剤は NF- $\kappa$ B の構成因子や IKK の特異的 Cys を標的とすることが報告されている。



**Fig. 15 Structure of the NF- $\kappa$ B inhibitors which target specific Cys residue of NF- $\kappa$ B or IKK $\beta$  component.**

Fig. 15 に示した parthenolide は p65 の 38Cys に結合し p65 の DNA 結合を阻害することで直接的に canonical NF- $\kappa$ B を阻害するのに加え、IKK $\beta$  の 179Cys に結合して酵素活性を阻害することで間接的にも canonical NF- $\kappa$ B の抑制効果を示す(144-146)。epoxyquinol A と epoxyquinol B は真菌代謝産物より単離精製された化合物である(147, 148)。epoxyquinol A、B 共に、TNF- $\alpha$ による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する(149,150)。epoxyquinol A の標的分子は未解明であるが、epoxyquinol B は TAK1 を標的とし、機能阻害を行うことで、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害する(150)。一方、epoxyquinol A の構造をもとに合成された epoxyquinol A monomer は p65 の

38Cys と IKK $\beta$  の 179Cys に結合し NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することも報告されている(151-154)。



**Fig. 16 Anti-inflammatory and anticancer effect of DHMEQ in animal experiments. (inflammation; blue and cancer; red)**

(-)-DHMEQ は NF- $\kappa$ B に対して特異的かつ強力な阻害効果を示すだけでなく、Fig. 16 に示したように、多くの炎症や癌モデルにおいて毒性を示さず、治療効果を示すことが報告されている(155-164)。

#### 4.2 NF- $\kappa$ B 阻害剤 9-methylstreptimidone 誘導體 DTCM-glutarimide

9-methylstreptimidone は NF- $\kappa$ B 阻害剤として *Streptomyces* より単離された(165)。これまでに、インフルエンザ感染およびカンジダ感染のマウスに対し、インターフェロンを発現させることで、抗ウイルス活性をもつことがわかっている(166, 167)。さらに、当研究室において、9-methylstreptimidone はマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞において、LPS によって誘導される iNOS および NO 産生を抑制すること、T 細胞白血病 Jurkat 細胞には細胞死を誘導せず、ATL 細胞である MT-1 細胞に選択的にアポトーシスを誘導することが報告された(165)。しかし、9-methylstreptimidone は天然からの収量が少なく、合成も困難であったため、誘導體展開が行われ、RAW264.7 細胞における LPS に誘導される NO 産生抑制物質として、Fig. 17 に示した構造を有する新規ピペリジン化合物、3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]glutarimide (DTCM-glutarimide)が得られた(168)。

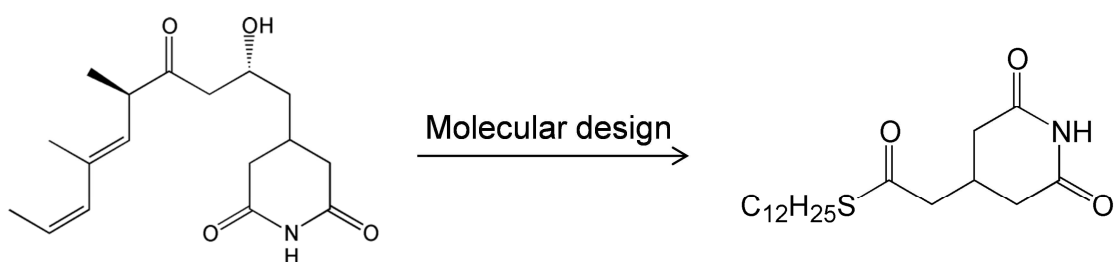


Fig. 17 Molecular design of DTCM-glutarimide.

DTCM-glutarimide は RAW264.7 細胞において、LPS によって誘導される NO 産生を阻害すること、LPS 短時間処理では c-Jun、c-Fos の核移行を阻害することを示した。さらに、当研究室において、マウスメラノーマ細胞 B16F10 に足場依存性的アポトーシスである anoikis を誘導することも示されている。また、*in vivo* の作用として、混合リンパ球反応を抑制することや、マウス心移植モデルにおいて、CD4<sup>+</sup>または CD8<sup>+</sup>の T 細胞増加を減少させ、移植拒絶反応を抑制し graft 生存を増加させることも示された。



## 5. 本研究の意義

NF- $\kappa$ B は炎症性疾患や癌の悪性化に大きく寄与している。したがって、NF- $\kappa$ B を阻害することは、これら疾患の治療にとって非常に有用である。また、NF- $\kappa$ B の新規制御機構の解明は NF- $\kappa$ B による炎症性疾患や癌の悪性化の機構の解明につながるため、炎症性疾患や癌の治療に大きく貢献するものであると考えられる。そこで、分子デザインされた NF- $\kappa$ B 阻害剤の阻害機構解明を通して、NF- $\kappa$ B の新規制御機構の解明を目的とし、本研究を行った。



## 第 1 章

(-)-DHMEQ による noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化への影響と

標的分子の解析



## 第1節 序論

Introduction 4 節に示したように(-)-DHMEQ と同様、エポキシ環を有する NF- $\kappa$ B 阻害剤は NF- $\kappa$ B 構成因子 p65 の 38Cys や IKK $\beta$  の 179Cys を標的とするが、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化は IKK $\alpha$  によって活性化されるため、parthenolide や epoxyquinol 類は noncanonical NF- $\kappa$ B に対しては抑制効果は示せないと考えられる。

```
p65(RelA) KQRGMRFRYKCEGRSAGSIPG
RelB      KQRGMRFRYECEGRSAGSILG
c-Rel     RQRGMRFRYKCEGRSAGSIPG
p50       KQRGFRFRYVCEGPSHGGLPG
p52       KQRGFRFRYGCEGPSHGGLPG
          :***:****  *** * * . : *
```

p65: Cys38, RelB: Cys144, c-Rel: Cys27 p50: Cys62, p52: Cys57

**Fig. 18 Sequence homology of Rel family proteins.** Sequence homology was analyzed by ClustalW. \* means conserving amino-acid sequence completely in all proteins, : highly, . moderately, blank means having no homology.

(-)-DHMEQ は p65 の 38Cys に加え、p65 と同様に canonical NF- $\kappa$ B の構成因子である p50 の 62Cys、c-Rel の 27Cys にも結合し、DNA 結合を阻害することが報告された(143)。これら 3 つの Cys は Rel homology domain 内に存在し、DNA 結合にとって重要である。さらに、相同性を持つ Cys は Fig. 18 に示したように全ての Rel family において保存されている。

本研究では、(-)-DHMEQ が noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化に与える効果の検討を行い、(-)-DHMEQ の標的分子の解析を行った。

## 第2節 実験方法

### 2.1 Materials

#### (1) 薬剂

Dehydroxymethlepoxyquinomycin; (-)-DHMEQ

当研究室にて合成。DMSO にて 10 mg/ml で溶解し、-20°Cで保存した。使用時に、MeOH または DMSO によって希釈した。

#### (2) Vector

pCMV-Tag-2B

Stratagene (Santa Clara, CA, USA)より購入

pGEX-6P-1

GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, England)より購入

#### (3) 大腸菌株

E.coli HB101 competent cell

Promega (Madison, WI, USA)より購入

E.coli BL21 competent cells

Promega より購入

E.coli Rosetta-gamiB competent cells

Novagen (Madison, WI, USA)より購入

#### (4) 抗体

Mouse 由来抗 FLAG (M2)抗体

Sigma (St. Louis, MO, USA)より購入

Mouse 由来抗 Tubulin (B-5-1-2)抗体

Sigma より購入

Rabbit 由来抗 RelB (C1E4)抗体

CST (Beverly, MA, USA)より購入

Rabbit 由来抗 p100/p52(18D10)抗体

CST より購入

HRP 標識 mouse IgG 抗体

GE Healthcare より購入

HRP 標識 rabbit IgG 抗体

GE Healthcare より購入

#### (5) 細胞株

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞

Riken Cell Bank より購入

## 2.2 Cell culture

### [buffer 組成]

- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含リン酸緩衝液 (PBS<sup>-</sup>)

8.0 g/l	NaCl
0.2 g/l	KCl
0.916 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
0.2 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

- Trypsin-EDTA 溶液

8.0 g/l	NaCl
0.4 g/l	KCl
0.0475 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
1.0 g/l	glucose
0.002% (w/v)	phenol red
0.035% (w/v)	$\text{NaHCO}_3$
0.002% (w/v)	EDTA

上記の試薬を蒸留水に溶かし、pH を 8.0 に合わせた後に trypsin を 0.075% になるように加えた。

### HeLa 細胞の培養

培養培地としては、10% の calf serum (CS, JRH Biosciences, Inc. Lenexa, Kansas)、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin, 100 units/ml penicillin G, 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-glutamine, and 2.25 g/l  $\text{NaHCO}_3$  を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Nissui, Tokyo, Japan) を用いた。細胞は 37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下のインキュベーター内で培養し、2~3 日以内に一回、培地交換をすることによって継代した。その際の培地の交換は、まず、培地を除去し、5 ml の PBS<sup>-</sup> で 2 回洗浄した後、2 ml の trypsin-EDTA 溶液を加えて 37°C で 5 min インキュベートした後、細胞がはがれたことをフラスコを軽くゆすることによって確認し、8 ml の新しい培養液を加えて trypsin を失活させ、懸濁後に新しい培地を入れたフラスコに細胞懸濁液を全体量の 20~40% を移すことによって行った。

## 2.3 total タンパク質の抽出

### [buffer 組成]

- Lysis buffer (RIPA buffer)

25 mM	Tris-HCl (pH 7.6)
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0.1% (w/v)	SDS
1% (v/v)	NP-40
1% (w/v)	sodium deoxycholate
1 mM	PMSF*
0.3 μM	aprotinin*

\* 要時添加

- 6×SDS loading buffer (100 ml 用)

350 mM	Tris-HCl pH 6.8
36% (v/v)	glycerol
12 mg	bromophenol blue
6% (w/v)	SDS
5 ml	2-mercaptoethanol

細胞を 37°C の 5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で 70% ~80% confluent になるまで培養し、薬剤処理などを行った後、培地を除去し、細胞を 750 μl の PBS で 2 回洗浄後、ラバーポリスマンを用いて細胞を剥がして 1.5 ml マイクロテストチューブに回収した。その後、3,500 rpm で遠心沈降して上清を除去することで細胞ペレットを得た。

得られた細胞ペレットに lysis buffer を加えて細胞を 10 秒間超音波破碎し、5 分間 on ice で静置した。再び 10 秒間超音波破碎して細胞の可溶化を行った。その後、14,000 rpm で 10 分間遠心沈降し、上清を total cell lysate としてマイクロテストチューブに回収した。この上清中のタンパク質濃度を Bradford 色素結合法により測定し、各 sample の濃度を lysis buffer で揃えた。6×sample buffer を加え、98°C のヒートブロックで 5 分間煮沸することで変性処理を行い、total タンパク質検出用の Western blotting sample とした。



## 2.4 核内タンパク質の抽出

### [buffer 組成]

#### ● Buffer A

10 mM	HEPES-KOH (pH 7.9)
10 mM	KCl
1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.5 mM	DTT*
0.2 mM	PMSF*

\*要時添加

#### ● Buffer C

20 mM	HEPES-KOH (pH 7.9)
25%	glycerol
420 mM	NaCl
1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.2 mM	EDTA
0.5 mM	DTT*
0.2 mM	PMSF*

\*要時添加

解析に用いる細胞を 70% ~80% confluent になるまで 37°C の 5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で培養し、薬剤を添加するなどして実験に用いた。培地を除去し、細胞を 750  $\mu$ l の PBS で 2 回洗浄し、ラバーポリスマンを用いて細胞を剥がし、1.5 ml マイクロテストチューブに回収後、3,500 rpm で遠心沈降して上清を除去することで細胞ペレットを得た。

EMSA に用いる核抽出物は Andrews、Faller らの方法の基づき、以下のように調製した(169, 170)。まず、細胞ペレットに対して、氷中で 400  $\mu$ l の buffer A を加えてピペティングによって細胞をほぐして 15 分間氷上に静置した。その後、500 $\times$ g で 5 分間遠心沈降し、上清を除去した後、再度 400  $\mu$ l の buffer A を加えて細胞ペレットを浮かべ、タッピングによって細胞ペレットを buffer 中に懸濁して 15 分間氷上に静置した。15 分経過後、500 $\times$ g で 5 分間遠心沈降し、上清を除去し、核ペレットを得た。この核ペレットに対して、30~50  $\mu$ l の buffer C を加えて核ペレットを浮かべ、タッピングによって核ペレットを buffer 中に懸濁して 20 分間氷上に静置した。この時、核タンパク質の抽出効率を上げるために 5 分おきにタッピングした。20 分経過後、14,000 rpm で 5 分間遠心沈降し、上清を新しいマイクロテストチューブに回収し、核抽出物を得た。核抽出物の濃度を Bradford 色素結合法により測定し、濃度を buffer C で揃えて実験に用いた。

## **2.5 Western blotting**

### **[buffer 組成]**

- Solution 1 (40% acrylamide)
  - 39% (w/v) acrylamide
  - 1% (w/v) N, N'-methylenebisacrylamide
  - 20% (v/v) glycerol
  
- Solution 2
  - 2.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
  - 0.4% (w/v) SDS
  
- Solution B
  - 1 M Tris-HCl (pH6.8)
  
- Solution C (30% acrylamide)
  - 30% (w/v) acrylamide
  - 0.8% (w/v) N, N'-methylenebisacrylamide
  
- Solution D
  - 10% (w/v) SDS
  
- Running buffer
  - 0.5 mM Tris
  - 192 mM glycine
  
- Transfer buffer
  - 25 mM Tris
  - 192 mM glycine
  - 20% (v/v) MeOH
  
- TBS-Tween
  - 2.4 g/l Tris-HCl (pH 7.6)
  - 8.0 g/l NaCl
  - 0.1% (v/v) Tween-20

まず、スぺーサー付きのミニスラブゲル泳動用ガラス板(日本エイドー, Tokyo, Japan) をテフロンストップ(日本エイドー) でパッキングし、切込型ミニスラブゲル泳動用ガラス板(日本エイドー) を乗せてクリップで固定した。このゲル板の間に 10% polyacrylamide gel (4 ml 蒸留水; 2 ml solution 1; 2 ml solution 2; 2 mg APS; 5  $\mu$ l TEMED)を流し込み、気泡の流入を防ぐために蒸留水を流し込み下層を作製した。ゲルが固まったら蒸留水を捨て、ペーパータオルで水分を十分に取り除き、上層 (0.65 ml solution B; 0.85 ml solution C, 0.05 ml solution D; 3.45 ml 蒸留水; 2 mg APS; 10  $\mu$ l TEMED) を流し込み、sample 数に応じたテフロンコームを差し込んだ。ゲルが固まったら、コーム→ストラップ→クリップの順に外し、下層に running buffer を入れたミニスラブゲル用の泳動層にゲルをクリップで固定し、上層にも running buffer を入れた。マイクロシリンジを用いてウェルを洗浄した後、ウェルに 5  $\mu$ l の分子量マーカーと 1 lane あたり 10~20  $\mu$ g のタンパクが泳動されるように sample をアプライしてゲル 1 枚当たり 23 mA の定電流で泳動を行った。

電気泳動終了後、ゲルを回収し、あらかじめ MeOH に浸して平衡化した後に transfer buffer で 30 分間以上振とうした PVDF 膜(GE Healthcare)に 200 mA で 1 時間転写した。転写終了後、PVDF 膜を 5% skim milk を含む TBS-Tween (TBST) で 30 分間振とうしてブロッキングを行った。その後、検出するタンパク質の抗体を下表の比率、処理時間で反応させた。その後、5 分ごとに合計 6 回 TBST で PVDF 膜を洗浄して、TBST による洗浄が終わったのちに 1 次抗体に対応する 2 次抗体を Table 3 の比率で反応させた。抗原-抗体反応後、5 分ごとに TBST で PVDF 膜を洗い、ECL 法によって発色させ、RX-U フィルム(Fuji film, Tokyo, Japan) に感光させて検出を行った。

**Table 3 Conditions for antibody-antigen reaction**

	species	型番		1st antibody	条件	2nd antibody	条件
iNOS	mouse-monoclonal	Sigma	F3165	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
RelB	rabbit-polyclonal	CST	#4922	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
p52	rabbit-polyclonal	Santa Cruz	sc-7386	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
$\alpha$ -tubulin	mouse-monoclonal	Sigma	T9026	1:10000 in 5% milk	室温 1 h	1:5000 in 3% milk	室温 1 h

## 2.6 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

### [buffer 組成]

- TE buffer

10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA

- 5×binding buffer

375 mM	NaCl
75 mM	Tris-HCl (pH 7.0)
7.5 mM	EDTA
37.5% (v/v)	glycerol
1.5% (v/v)	NP-40
1.25 mg/ml	BSA
0.5 mM	DTT*

\* 要時添加

- 10×TBE buffer (500 ml 分)

0.9 M	Tris
27.5 g	boric acid
20 mM	EDTA

- Acrylamide

30% (v/v)	acrylamide
2% (v/v)	N, N'-methylenebisacrylamide

### (1) <sup>32</sup>P-labeled probe の作製

8 μl の 1.75 pmol/μl NF-κB oligonucleotide (Promega, Madison, MA, USA)、4 μl の 10×T4 PNK buffer、20 μl の nucleotide free water を混ぜ、さらに 4 μl の [γ-<sup>32</sup>P]-adenosine 5'-triphosphate (GE Healthcare)、4 μl の T4PNK (Takara, Shiga, Japan)を加え、37°C で 15 分間インキュベート後、60 μl の TE buffer を加えて反応を停止させた。蒸留水 1 ml を 3 回通すことで平衡化した Nick column (GE Healthcare)に 100 μl のラベル化した DNA 溶液をカラムの壁に伝わらないようにしてカラムにアプライし、カラムの下に 1.5 ml マイクロテストチューブを用意し、滴下が止まるまで流出液の回収を行った。カラムにアプライした溶液がカラム内に入り、滴下が停止したことを確認したら、下に新しい 1.5 ml マイクロテストチューブドルフチューブを準備して 400 μl の蒸留水をカラムにアプライ

し、出てきた溶液を fraction 1 として回収した。滴下が止まったら、カラムの下に新しいマイクロテストチューブを用意し、さらに 400  $\mu$ l の蒸留水をカラムにアプライし、出てきた溶液を fraction 2 として回収した。滴下が終わったらカラムのキャップを閉め、ガイガーカウンターで放射線強度を確認し、強度が fraction 2>カラム>fraction 1 の順になっていることを確かめた。Fraction 2 を標識されたプローブとして Mini Poly-G<sup>M</sup>Vial (Beckman, California, CA, USA) にアトムライト (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) を 3 ml を入れ、2  $\mu$ l のプローブを加えてボルテックスにかけてよく混合した後に、液体シンチレーションカウンターで放射性を測定した。

## (2) Electrophoresis

以下の組成で調製した泳動用 sample 17  $\mu$ l に、 radiation 強度が 3,000 cpm/ $\mu$ l のプローブを 3  $\mu$ l 加え、室温で 20 分間静置することで binding 反応を行った。

5×binding buffer	4 $\mu$ l
dIdC (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	40 $\mu$ l
核抽出物	<u>5 <math>\mu</math>l</u>
蒸留水	up to 17 $\mu$ l

その後、150 V の定電圧で 1~1.5 時間プレランしておいた 4% polyacrylamide gel (6.7 mM acrylamide、1.25 ml 10×TBE、42 ml 蒸留水、2 mg APS、50  $\mu$ l TEMED) にアプライし、約 1 時間の泳動を行った。泳動終了後、ゲルをろ紙に移してゲルドライヤーで 80°C、1 時間乾燥させた後に、RX-U フィルム(Fuji film)に感光させて検出を行った。

## (3) Transcription factor-DNA binding assay

以下に示したような組成で sample を調製し、(-)-DHMEQ 含/不含の DMSO 1  $\mu$ l を加えて、4°C で 1 時間インキュベートした。

5×binding buffer	4 $\mu$ l
核抽出物	5 $\mu$ g
<u>(-)-DHMEQ or DMSO</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>
蒸留水	up to 20 $\mu$ l

1 時間経過後、1  $\mu$ g/ $\mu$ l poly-dI/dC を 1  $\mu$ l 加え、 radiation 強度が 3,000 cpm/ $\mu$ l になるように希釈したプローブを 3  $\mu$ l 入れて室温で 20 分間静置することで泳動用 sample として(2)の項の方法に準じて泳動・検出を行った。

## **2.7 Vector construction、recombinant タンパク質の精製**

以下の方法に従って pGEX-RelB(WT)、pGEX-p52(WT)、pGEX-p65(WT)、pCMV-RelB(WT)、pCMV-p52(WT)の作製を行った。

### **[buffer 組成]**

- 10×loading dye

65% (w/v)	sucrose
10 mM	Tris-HCl (pH 6.8)
10 mM	EDTA
0.3 % (w/v)	bromophenol blue

- Sonication buffer

PBS	
1 μM	DTT*
1% (v/v)	protease inhibitor*

\* 要時添加

### **(1) Total RNA の抽出**

Total RNA の抽出、cDNA プールの作製は手袋を着用し、チップ、試薬などを含めて RNase free の環境で行った。

まず、RNA 抽出する細胞を 60-ml dish (Corning, Corning, NY, USA) に 70~80% confluent になるまで 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養し、500 μl の Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加え、dish 上になじませてから 1.5 ml マイクロテストチューブに入れた。この操作を 2 回繰り返して 1 ml の Trizol 溶液を得た。この Trizol 溶液を 2~3 分静置した後、200 μl のクロロホルムを加え、15 分間室温で静置した。静置後、4°C、13,000×g で 15 分間遠心沈降し、上清 400 μl を別のマイクロテストチューブに移し、400 μl のイソプロパノールを加えてよく混合して 10 分間室温に静置した。その後、4°C、13,000×g で 10 分間遠心沈降した後に上清を除去し、直ちに 70% エタノール 180 μl を加え、すぐに 4°C、7,500×g で 5 分間遠心沈降して上清を除去した。その後適量の DEPC 水を加えて RNA を溶解させ、この RNA 溶液の一部を 100 倍希釈して 260 nm の吸光度から、以下の式によって RNA 濃度(μg/μl)を算出した。

$$(\text{RNA 濃度}) = \{ (260 \text{ nm 吸光度}) \times 40 (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times (\text{希釈倍率}) \} / 1000$$

続いて High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits RT (Applied Biochemistry,

Carlsbad, CA, USA)により、逆転写反応を行った。まず、以下の組成の RT 反応溶液を調製した。

10× RT buffer	2 $\mu$ l
25× dNTPs	0.8 $\mu$ l
oligo dT	2 $\mu$ l
mRNA (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
RT 酵素	1 $\mu$ l
<u>DEPC 水</u>	<u>4.2 <math>\mu</math>l</u>
total	20 $\mu$ l

続いて、調製した逆転写反応溶液を以下の条件でサーマルサイクラーにかけ、逆転写反応を行い cDNA を得た。

25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 sec

## (2) RelB(WT)、p52、p65(WT) insert DNA の調製

続いて合成した cDNA を template として PCR を行った。PCR には KOD-plus (Toyobo, Osaka, Japan)を用いた。まず、以下のような割合で PCR 溶液を調製した。

10×PCR buffer for KOD -plus	5 $\mu$ l
2 mM dNTPs	5 $\mu$ l
25mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l
primer (forward)	1.5 $\mu$ l
primer (reverse)	1.5 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
DMSO	1 $\mu$ l
KOD -plus-	1 $\mu$ l
<u>DEPC 水</u>	<u>32 <math>\mu</math>l</u>
total	50 $\mu$ l

調製した PCR 溶液をサーマルサイクラーにセットし、以下の反応条件で PCR を行い、insert DNA を得た。

First Denature	94°C	2 min	← 40 cycles
Denature	94°C	15 sec	
Annealing	(Tm-5) °C	30 sec	
Extension	68°C	1 min/kb	

上記の PCR には Table 4 に示した primer を用いた。

**Table 4 Primer sequence for indicated cDNA cloning**

cDNA			restriction enzyme
RelB(WT)	forward	5'-TTTT <b>AGA TCT</b> <u>ATG</u> CTT CGG TCT GGG CCA GCC	Bgl II
	reverse	5'-TTTT <b>CTC GAG</b> <u>TTA</u> CTC GCT GCA GAC CCC ATC	Xho I
p52(WT)	forward	5'-TTTTTT <b>GGA TCC</b> <u>ATG</u> GAG AGT TGC TAC AAC CCA GG	Bam HI
	reverse	5'-TTTTTT <b>CTC GAG</b> <u>TTA</u> CGC CCC GCC CCC GCC TCC CG	Xho I
p65(WT)	forward	5'-TTTT <b>GGA TCC</b> <u>ATG</u> GAC GAA CTG TTC CCC CTC ATC	Bam HI
	reverse	5'-TTTT <b>CTC GAG</b> <u>TTA</u> GGA GCT GAT CTG ACT CAG CAG	Xho I
Restriction enzyme sites are in bold faces and initiation/stop codons are underlined.			

### (3) Insert DNA のゲル精製

PCRによって増幅した cDNA を臭化エチジウム含有 1% アガロースで電気泳動し、Gel Extention Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いてゲルからの精製を行った。まず、50 V の定電圧で PCR 産物を泳動し、UV を照射しながらバンドを切り出した。

続いて、切り出したゲルをマイクロテストチューブに入れ、600 µl の buffer QG を入れ、50°C のヒートブロックで 10 分間過熱してゲルの溶解を行った。ゲルの溶解を完全に行うために、2 分おきにタッピングを行った。ゲルの溶解を確認したら、200 µl のイソプロパノールを加えてタッピングによって混合した後に、スピンカラムにアプライした。14,000 rpm で遠心にかけることで、insert DNA をカラムに吸着させ、フロースローを捨てた。その後、非特異的な吸着物の除去を行うために、500 µl の buffer QG をアプライし、14,000 rpm で 1 分間遠心沈降した。更に、500 µl の buffer PE をカラムにアプライし、14,000 rpm で遠心してカラムの洗浄を行った。buffer PE による洗浄は 2 回繰り返す、2 回目は残留エタノールを完全に除去するために、フロースローを捨てた後に、もう一度 14,000 rpm で遠心した。カラムの洗浄が完了したら、蓋を切った新しいマイクロテストチューブにカラムをセットして、20 µl の elution buffer をアプライして 14,000 rpm



で遠心し、フロースローとして insert DNA 溶液を得た。この作業を 2 回繰り返して、合計で 40  $\mu$ l の insert DNA 溶液を得た。精製した DNA は 2、3 日以内に使用する場合は 4°C で、長期保存する場合は -20°C で保存するようにした。

#### (4) Insert DNA の vector への組み込み

まず、精製した insert DNA を pGEX-6P-1 vector (GE Healthcare) または pCMV-Tag-2B (Stratagene) に組み込むために insert DNA、vector にそれぞれ制限酵素処理をして、両 DNA に付着末端を作った。Insert DNA および vector の制限酵素処理は以下の組成の溶液を調製し、37°C で insert DNA は 1 時間、vector は 2 時間インキュベートすることによって行った。

10× 制限酵素 buffer	5 $\mu$ l	} insert DNA
insert DNA 溶液	40 $\mu$ l	
DEPC 水	3 $\mu$ l	
制限酵素(each)	1 $\mu$ l	
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	

10× 制限酵素 buffer	5 $\mu$ l	} vector
vector (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
DEPC 水	42 $\mu$ l	
制限酵素(each)	1 $\mu$ l	
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	

インキュベート後、EtOH 沈殿による DNA の精製と濃縮を行った。まず、125  $\mu$ l の特級 EtOH、5  $\mu$ l の 3M NaOAc 水溶液 (EtOH 0.1% [v/v]、NaOAc 2.5% [v/v]) を入れて -20°C で 20 分間静置した。20 分静置後、14,000rpm で 15 分間遠心沈降して上清を除去した。上清除去後、すぐに 70% エタノールをマイクロテストチューブの壁を伝わらせるようにそっと入れ、再び 14,000rpm で 10 分間遠心沈降して、上清を除去、10 分間風乾した。風乾後、insert DNA は 5  $\mu$ l の DEPC 水、vector は 10  $\mu$ l の DEPC 水を加えて溶解した。

(pGEX-6P vector への導入をすぐに行わないときは、DEPC 水での elute を行わず、ペレットのまま -20°C で保存した。)

次に、制限酵素処理した insert、vector 溶液 1  $\mu$ l を 10 倍に薄め、10 $\times$  loading dye を入れ、1%アガロースゲルで泳動した。泳動後、Molecular Image FXTM Pro(Bio Rad)でゲルのイメージングを行った。この結果をもとに、vector と insert の比率がモル比で 1:10 になるように insert/vector 混合溶液 5  $\mu$ l を PCR チューブに調製し、5  $\mu$ l の ligation high (Toyobo)を加えた後、16 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、insert と vector の ligation を行い、insert を導入した pGEX vector を作製した。

#### (5) HB101 への形質転換

まず、HB101 の凍結チューブを on ice で解凍し、ligation の終了した plasmid の PCR チューブを on ice で用意した。HB101 の解凍が完了したら HB101 溶液 100  $\mu$ l を PCR チューブに入れ、plasmid 溶液 10  $\mu$ l (10~50 ng)を加えて混合し、混合溶液を on ice で 15 分間静置した。

次に、42 $^{\circ}$ C の湯浴に PCR チューブを 45 秒間液面までつけ、すぐに on ice にして 2 分以上静置し、LB 寒天培地(Amp)に大腸菌全量を移して、滅菌したスプレッターを用いて濃淡をつけながらプレート上に塗り広げた。この寒天培地を 30 $^{\circ}$ C で培養し、24~48 時間後にコロニーが 10~数百個形成されていることを確認し、コロニーが確認されたら、滅菌処理した爪楊枝でコロニーを pick し、2 ml の LB 培地(Amp)の入った試験管に落とす。このような sample を 6 個作り、一晚 30 $^{\circ}$ C で振盪培養して液体培地を confluent にした。

#### (6) Mini-plep 法による plasmid DNA の精製

Confluent に達したそれぞれの sample 1 ml を 1.5 ml マイクロテストチューブにとり、4 $^{\circ}$ C、6,000 rpm で 1 分間遠心沈降した。上清を除去して大腸菌ペレットを得た後、suspension buffer 250  $\mu$ l を加えてよくピペティングしてペレットを懸濁し、lysis buffer 250  $\mu$ l を加えて転倒混和し、室温で 5 分間静置した。5 分静置後、on ice にしておいた binding buffer 350  $\mu$ l を加えて転倒混和した後、5 分間 on ice で静置した。5 分経過後、4 $^{\circ}$ C、13,000 rpm で 10 分間遠心沈降して上清を kit に付属の collection tube にアプライして 4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 1 分間遠心沈降した。その後、wash buffer I を 500  $\mu$ l 入れて 4 $^{\circ}$ C、13,000rpm で 1 分間遠心沈降し、フローズローを捨て、wash buffer II を 700  $\mu$ l 入れて 4 $^{\circ}$ C、13,000 rpm で 1 分間遠心沈降した。フローズローを除去した後、wash buffer の残りを完全に除去するために、もう一度 4 $^{\circ}$ C、13,000 rpm で 1 分間遠心沈降した。次に、collection tube の蓋を切った 1.5 ml マイクロテストチューブに換えて、elution buffer を 100  $\mu$ l を入れて 4 $^{\circ}$ C、13,000 rpm で 1 分間遠心沈降して、フローズローを回収することによって plasmid 溶液を得た。

(plasmid 溶液を保存する場合には 4 $^{\circ}$ C、長期保存は-20 $^{\circ}$ Cで保存した。)

続いて、精製した plasmid に目的の insert が導入されていることを確かめるために、カットチェックを行った。まず、マイクロテストチューブに plasmid 溶液 17  $\mu$ l、10 $\times$ 制限酵素 buffer 2  $\mu$ l、カットチェックに適した制限酵素 2 種をそれぞれ 0.5  $\mu$ l 入れ、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、反応溶液を 1% エチジウムブロマイド入りアガロースゲルで泳動して Molecular Image FXTM Pro (Bio Rad) でゲルのイメージングを行い、DNA 断片から、目的の insert の導入の有無の確認を行った。

### (7) BL21、Rosetta-gamiB への形質転換、IPTG check

カットチェックによって insert の導入が確認された plasmid のシーケンスを行い、その結果、insert に error、gap がないことが分かったら、タンパク発現用の BL21、Rosetta-gami B 大腸菌株への形質転換を行った。

まず、BL21(または Rosetta-gamiB)の凍結チューブを on ice で解凍し、精製した plasmid 溶液、PCR チューブを on ice で用意した。大腸菌が解凍したら大腸菌 100  $\mu$ l を PCR チューブに入れ、plasmid 溶液 5-10  $\mu$ l を加えてピペッティングにより混合した。その後、plasmid と大腸菌の混合溶液を 15 分間 on ice で静置した。

次に、42 $^{\circ}$ C の湯浴に PCR チューブを 45 秒間液面までつけ、45 秒経過後すぐに on ice にして 2 分以上静置し、LB 寒天培地(Amp)に大腸菌全量を移して、滅菌したスプレッダーを用いて濃淡をつけながらプレート上に塗り拡げた。

この寒天培地を 30 $^{\circ}$ C で培養し、24~48 時間後にコロニーが 10~数百個形成されていることを確認し、コロニーが確認されたら、滅菌処理した爪楊枝でコロニーの pick を行い、2 ml の LB 培地(Amp)の入った試験管に落とした。このような sample を 5 個作り、一晩 30 $^{\circ}$ C で振とうして confluent になることを確かめた。

Confluent になったことが確認されたら、2 ml の LB 培地(Amp)を入れた試験管を 11 本用意し、5 つの sample を 20  $\mu$ l ずつ各 2 本の LB 培地に入れた。このとき、どれか一つの sample を吸光度測定用に用意した。その後、振盪機にセットして培養液の 600 nm の吸光度が 0.3 に達するまで培養した。培養完了後、0.1 M の IPTG を 2  $\mu$ l (終濃度 100  $\mu$ M)打ち、さらに 3 時間培養した。培養完了後、培養液 1 ml を 4 $^{\circ}$ C、6,000 rpm で遠心沈降し、上清を除去した後に 50  $\mu$ l の sonication buffer を入れ、10 秒間超音波破碎し、5 分間 on ice で静置した。5 分経過後、再び 10 秒間超音波破碎し、すぐに 4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 10 分間遠心沈降した。遠心沈降終了後、上清 50  $\mu$ l をマイクロテストチューブにとり、10  $\mu$ l の 6 $\times$  sample buffer を加えて 98 $^{\circ}$ C のヒートブロックにより 5 分間煮沸することで変性処理を行い、泳動用の sample を得た。

続いて、IPTG によって目的の GST-fusion タンパク質が発現しているか否かを CBB 染色によって確認した。SDS-PAGE 後、ゲルを CBB 染色液に浸し、溶液が沸騰するまでレンジで温めることでゲルの染色を行った。ゲルの染色ができたなら、染色液を水道水に交換し、沸騰するまでレンジで温め、ゲルの脱色を行った。ゲルの脱色ができたなら、目的のタンパク質のバンドがあることを確認し、最もよく発現する大量精製に用いるための大腸菌株を決定した。

### (8) GST-fusion タンパクの大量精製

発現チェックによって決定した、大量精製に用いる大腸菌を用いて目的タンパク質の大量精製を行った。

まず、大量精製の前日に 5 ml の LB 培地(Amp)を入れた 15 ml 遠心に 10  $\mu$ l の大腸菌を入れて振盪機にセットして 30°C で pre-culture した。pre-culture した大腸菌が confluent に達したことを確認したら 4°C、3,500 rpm で大腸菌を遠心沈降し、上清を除去した後、約 1 ml の LB 培地(Amp)で懸濁してすべての大腸菌を 200 ml の LB 培地(Amp)に移した。その後、振とう機にセットし、600 nm の吸光度が 0.3~0.6 になるまで 37°C で培養し、600 nm の吸光度が 0.3~0.6 に達したら、200  $\mu$ l の 0.1 M IPTG (終濃度 100  $\mu$ M)を添加し、培養温度を 25°C に変えて 3~4 時間振盪培養することによって GST-fusion タンパク質の発現誘導を行った。

培養完了後、培養液を 50 ml 遠心チューブに移し、超遠心機を用いて 8,500 rpm で 15 分間遠心沈降した。その後、上清をデカンテーションで捨て、ペレットに 5 ml の sonication buffer を入れて大腸菌を超音波破碎した。破碎の際には、超音波の熱によって目的タンパクが分解されるのを防ぐために、on ice ですべての操作を行い、超音波も 10 秒かけたら 10 秒 on ice で静置して、15 分間この操作を繰り返した。15 分後、大腸菌の懸濁液を 1.5 ml マイクロテストチューブに 1.5 ml ずつ分注し、4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心沈降した。遠心沈降後、上清を 15 ml 遠心に移し、800  $\mu$ l の PBS (ろ過滅菌したもの)での洗浄を 3 回繰り返して平衡化した Glutathione Sepharose 4B ビーズ(GE Healthcare)をビーズ 500  $\mu$ l 分(原液は 80%スラリー)加えた。その後、この大腸菌の可溶画分とビーズの混合溶液を 4°C、1 時間 rotate することによって GST-fusion タンパクのビーズへの吸着を行った。

続いて、吸着の完了した溶液を 4°C、1,000 rpm で 10 分間遠心沈降し、上清を除去し、1.5 ml マイクロテストチューブにビーズの回収を行い、sonication buffer を 1 ml ずつ加えてタッピングによるビーズの洗浄を 5 回を行い、ビーズに非特異的に吸着しているタンパクの除去を行った。その後、1 mM DTT を含む PBS 200  $\mu$ l をビーズに加え、PreScissionProtease (GE Healthcare) 20  $\mu$ l を加え、4°C で 16 時間 rotate することによって GST タグを切り離し、目的のタンパクの精製を行った。

16 時間経過後、ビーズ溶液を卓上遠心機で遠心沈降し、上清を 1.5 ml マイクロテストチューブに回収した。回収した上清をさらに 14,000 rpm で 10 分間遠心沈降し上清を回収し、ビーズを完全に除去した。その後、精製したタンパクの濃度を測定し、CBB 染色による精製チェックを行った。(精製チェックのために、大量精製の過程で以下の 5 つのフラクションを 5  $\mu$ l ずつ 50  $\mu$ l の 1 $\times$ sample buffer に回収しておいた)

- fr1 超音波破碎後の sample を遠心沈降した時の不溶画分
- fr2 超音波破碎後の sample を遠心沈降した時の可溶画分
- fr3 ビーズに吸着させ、遠心沈降した時のビーズ上清
- fr4 precision protease によって GST タグを切り離す前のビーズ
- fr5 精製したタンパク溶液(2  $\mu$ g のタンパクが泳動されるように調製)

(精製したタンパクは 10~20 $\mu$ l ずつ分注して-80 $^{\circ}$ C に保存し、凍結融解は繰り返ししないことにした。)

## 2.8 Site direct mutagenesis

pGEX-RelB(C144S)および、pCMV-RelB(C144S)、p52(G556V)は inverse PCR を用いて作製した。Table 5 に示した primer を用い、KOD-plus を用いて以下の条件で PCR をかけた。

**Table 5** Primer sequence for indicated cDNA cloning

cDNA		restriction enzyme
RelB(C144S)	forward	5'- <b>CC</b> GAG GGC CGC TCG GCC GGC AGC ATC
	reverse	5'-A CTC GTA GCG GAA GCG CAT GCC GCG CTG
RelB(C144A)	forward	GC GGC ATG CGC TTC CGC TAC GAG <b>GCC</b> GAG GGC CGC
	reverse	GCC GGC CGA GCG GCC CTC <b>GGC</b> CTC GTA GCG GAA GC
p52(G556V)	forward	5'- <b>TC</b> TGT GAA GGC CCC TCC CAT GGA GGA CTG CCC GG
	reverse	5'-C ATA TCG AAA TCG GAA GCC TCT CTG CTT AGG CTG
Mutation sites are in bold face		

First Denature	94 $^{\circ}$ C	2 min	
Denature	94 $^{\circ}$ C	15 sec	← 20 cycles
Annealing	(Tm-5) $^{\circ}$ C	30 sec	
Extension	68 $^{\circ}$ C	7 min	

PCR が終了した PCR 溶液 50  $\mu$ l に Dpn I (TOYOBO) 1  $\mu$ l を入れて 37°C で 2 時間 インキュベートすることによって、大腸菌の中でメチル化された鑄型 plasmid の分解を行った。続いて、Dpn I 処理が完了した DNA を 1% のエチジウムブロマイド入りアガロースゲルで泳動し、目的バンドを切り出し、Gel Extention Kit (QIAGEN) を用いて ethidium bromide アガロースゲルからの精製を行った。最後の elute は 20  $\mu$ l の elution buffer で 1 回行った。

また、pCMV-RelB(C144A) vector は overlap 伸長法によって Table 5 に示した primer を用いた PCR によって insert を作製し、ゲル精製を行った。

次に、ゲル精製した DNA に対して以下の組成の溶液を PCR チューブにつくり、37°C、1 時間 インキュベートすることで 5' 末端のリン酸化を行った。

10×T4PNK buffer	2 $\mu$ l
DNA	15 $\mu$ l
20 mM ATP	1 $\mu$ l
<u>T4PNK</u>	<u>2 <math>\mu</math>l</u>
Total	20 $\mu$ l

インキュベート完了後、20  $\mu$ l の T4PNK 溶液に ligation high を 10  $\mu$ l 加えて 16°C で 1 時間 ligation を行った。

Ligation 完了後、HB101 への形質転換をヒートショックにより行い、High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) による plasmid 精製、カットチェック、シーケンスにより、目的の mutation が入っていることの確認をした。その後、BL21 への形質転換を行い、IPTG による発現チェック、大量精製を行った。

以上のようにして作製した pGEX-RelB(C144S) から insert の RelB(C144S) を引き抜き、pCMV-Tag-2B に subcloning するよって pCMV-RelB(C144S) を得た。

## **2.9 pCMV-RelB(WT)、pCMV-RelB(C144S) vector の大量精製**

pCMV vector の精製を Endo Free Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いて行った。

まず、作製した pCMV vector を導入した HB101 を 250 ml の LB 培地 (Km) に 50  $\mu$ l 入れ、37°C で約 18 時間振盪培養した。培養完了後、HB101 溶液を 50 ml 遠心に分注し、超遠心機によって 8,500 rpm で 15 分間遠心沈降し、上清を捨てて大腸菌のペレットを得た。

(ここで中断する場合には大腸菌のペレットを -80°C に凍結して保存した。)

次に、大腸菌のペレットに 10 ml の buffer P1 を加えてペレットを再懸濁し、

10 ml の buffer P2 を添加後、4~6 回激しく転倒混和して溶液の色が青く変わることを確認してから 5 分間室温に放置した。5 分経過後、冷却した 10 ml の buffer P3 をライセートに添加し、激しく 4~6 回転倒混和して溶液の色が消え、白色沈殿を生じたことを確認したらすぐに QIAfilter Cartridge にライセートを注ぎ、室温で 10 分間インキュベートした。このとき、プランジャーを挿入しないように注意した。

続いて、QIAfilter Cartridge の出口ノズルからキャップを取り除き、静かにプランジャーを QIAfilter Maxi Cartridge に入れてライセートを 50 ml 遠心チューブにろ過した。続いて、2.5 ml の buffer ER をろ過したライセートに注ぎ、10 回ほど転倒混和して氷上で 10 分間インキュベートした。

次に、QIAGEN-tip 500 に 10 ml の buffer QBT を加え、カラムが空になるまで自然滴下してカラムの平衡化をした。平衡化終了後、ライセートを QIAGEN-tip に注ぎ、自然落下によってカラムへ浸透させ、浸透が完了したら 30 ml の buffer QC で洗浄した。また、この洗浄操作は 2 回繰り返した。続いて、下を新しい 50 ml 遠心チューブに変えて、buffer QN 15 ml をカラムに通して DNA の溶出を行った。DNA の溶出液に 10.5 ml(0.7 培養量)のイソプロパノールを添加して DNA を沈殿させ、混和した後に、直ちに 4°C、8,500 rpm で 1 時間遠心し、上清を慎重にデカンテーションした。デカンテーション後はすぐに 70%エタノールを加えて 8,500 rpm で 1 時間遠心沈降し、ペレットが移動しないように注意深く上清をデカンテーションした後、50 ml 遠心を一晚室温に静置してペレットを乾燥させた。乾燥後は 50 µl の DEPC 水に溶解し、吸光度を測定して以下の式によって DNA 濃度を測定し、1 µg/µl になるように希釈した。

$$(\text{DNA 濃度}) = \{ (260\text{nm 吸光度}) \times 50 (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times (\text{希釈倍率}) \} / 1000$$

以上のようにして得た pCMV vector は分注して -20°C で保存した。

## **2.10 Lipofection による pCMV vector の導入**

大量精製した pCMV vector を lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen) を用いて HeLa 細胞への transfect を行った。

まず、HeLa 細胞を 60-mm dish で 60-70% confluent になるまで培養した。1 dish につき、Opti-MEM 500 µl、lipofectamine LTX 4 µl、pCMV vector 1.25 µl を転倒混和によって混合し、20 分間室温でインキュベートした。20 分のインキュベート中に 60-mm dish の培地を除去し、新しい培地 2 ml に交換した。インキュベート後、dish 上に lipofectamine 混合溶液を 1 滴ずつ滴下することによって加え、24 時間のインキュベート後に種々のアッセイに用いた。

## 2.11 MALDI-TOF/MS

### [buffer 組成]

- Matrix 溶液 (in milliQ)

sinapinic acid	飽和
50% (v/v)	アセトニトリル
0.1% (v/v)	TFA

まず、精製した recombinant タンパク質を必要に応じて0.1%の DTT 入りの PBS によって希釈し、タンパク質低吸着チューブである、スミロンプロテオセーブ SS マイクロチューブ(住友ベークライト, Tokyo, Japan)に 19  $\mu$ l 移した。次に、(-)-DHMEQ 含/不含の DMSO を 1  $\mu$ l 入れ、4°C、1 時間インキュベートして反応させた。反応終了後、新しいスミロンプロテオセーブ SS マイクロチューブで、2  $\mu$ l の反応溶液と 8  $\mu$ l のマトリックスを混合し、Targeting plate (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)に 2  $\mu$ l ずつ plating し、真空ポンプで 20~30 分間乾固することによってタンパクの結晶化を行った。このとき、calibration 用の sample として、Calibration Standard II (Bruker Daltonics)を 1:1 でマトリックスと混合したのものも plating した。

続いて、タンパク質の分子量測定をおこなった。まず、flex cont のプログラムを起動し、LP3-20 kDa. Par のプロトコルを選択して測定用のプログラムの起動を行った。プレートを Targeting plate frame III (Bruker Daltonics)にセットして挿入し、レーザーの準備が出来るのを待った。測定の準備ができたなら、Detection を 20,000~70,000 Da、検量線の設定を Calibration Protein II にセットして検量線用サンプルに、出力 60%レーザーを照射し、測定の誤差の補正をした。補正終了後、sample のスポットにレーザーを照射し、分子量ピークの検出を行った。レーザーは結晶の縁を狙って照射した。測定終了後、flex analysis のプログラムを起動して各分子量ピークの解析を行った。



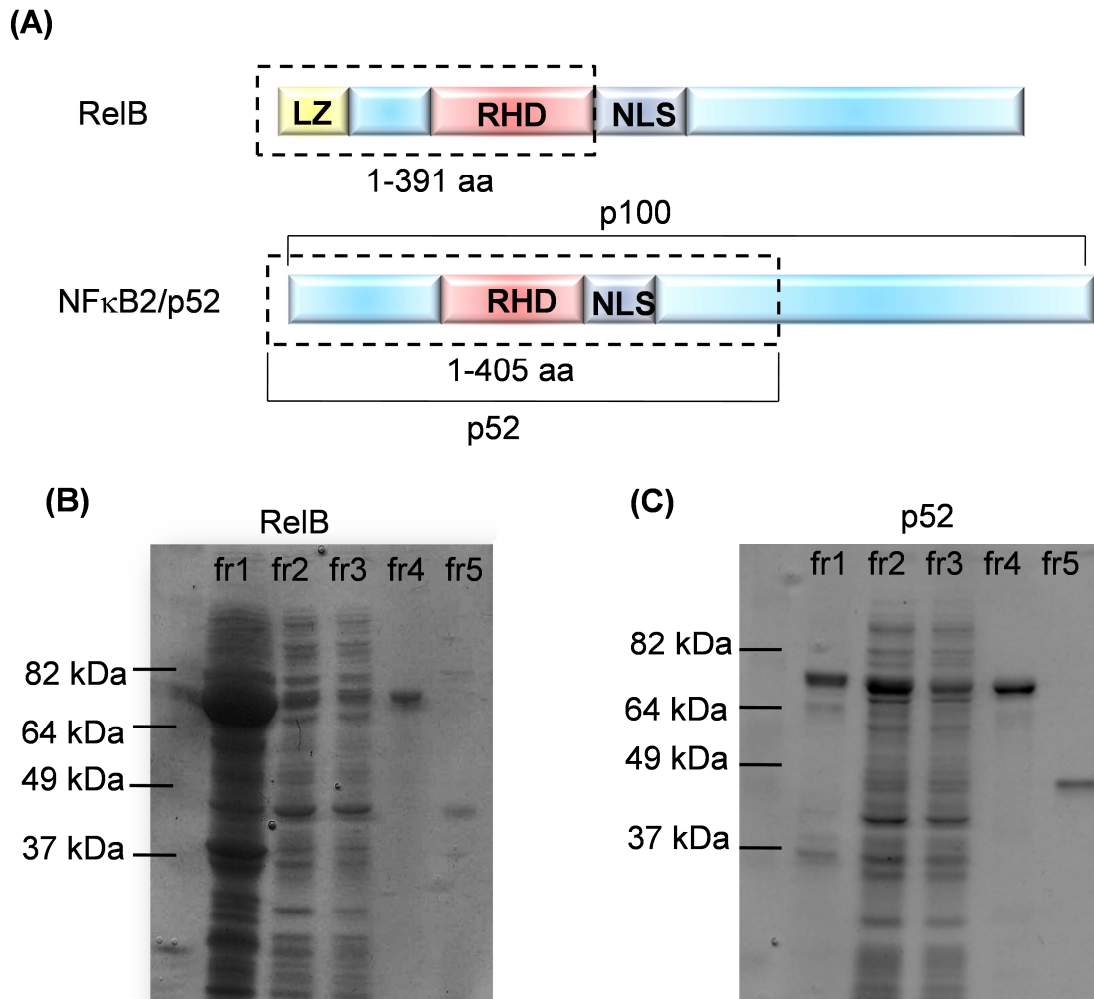
## 第3節 結果

### 3.1 Noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子と(-)-DHMEQ の結合解析

(-)-DHMEQ と noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子との結合解析を行うために、recombinant RelB と recombinant p52 を大腸菌発現系により精製した。全長の RelB は大腸菌で発現しなかったため、Fig. 19A に示したような RHD を含んだ、1-391 アミノ酸を精製した(Fig. 19B)。また、p52 は p100 の 1-405 アミノ酸に相当する full length のものをクローニングし、精製した(Fig. 19C)。

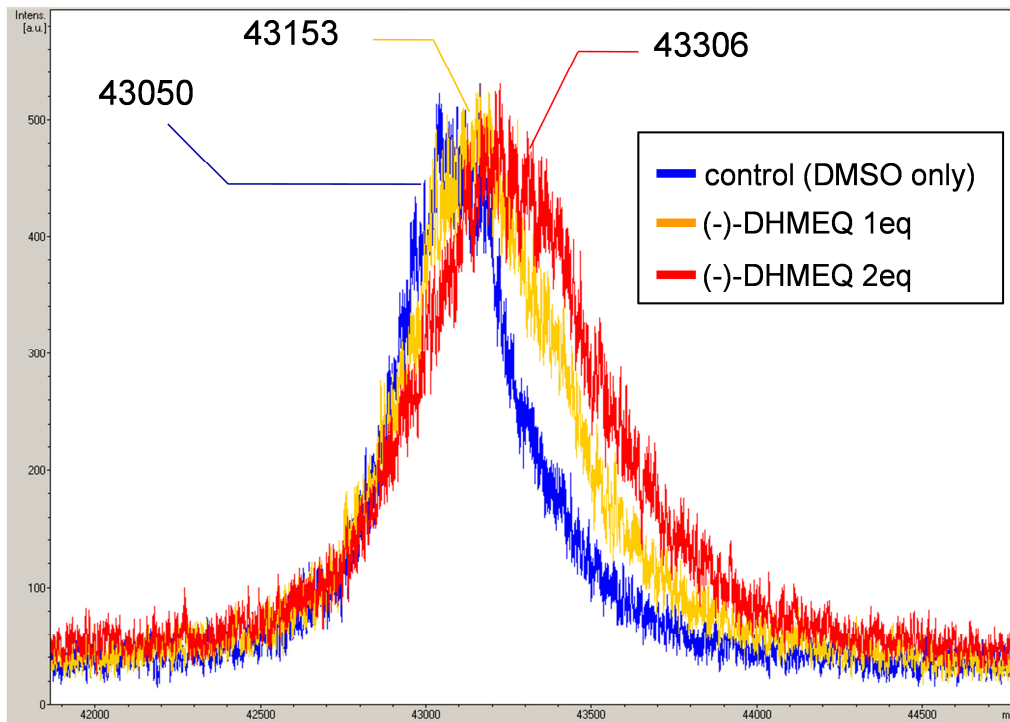
精製した recombinant RelB と (-)-DHMEQ の結合解析を MALDI-TOF/MS による分子量測定により行った。その結果、recombinant RelB(1-391)に対して(-)-DHMEQ を処理すると、1 当量処理では、RelB の分子量ピークが広がり、(-)-DHMEQ の分子量の約 1/2 分だけ増加したところに分子量ピークの頂点が移動した。したがって、(-)-DHMEQ 1 当量処理では、(-)-DHMEQ が結合した RelB と未結合の RelB が約 1 : 1 で存在していることが示唆された。さらに、(-)-DHMEQ を RelB に対して 2 当量処理すると、RelB の分子量が(-)-DHMEQ の分子量である 260 増加する結果が得られた(Fig. 20)。以上の結果から、(-)-DHMEQ は RelB に直接共有結合することが分かった。RelB は homodimer を形成しないため、(-)-DHMEQ が RelB の DNA 結合能に与える効果の検出はできなかった。

一方、興味深いことに、RelB と共に、noncanonical NF- $\kappa$ B を構成する p52 に対しては(-)-DHMEQ を 8 当量まで処理しても p52 の分子量の完全なシフトは検出されなかった(Fig. 21)。さらに、(-)-DHMEQ は p52 の DNA 結合能にも抑制効果は示さなかった(Fig. 22)。さらに、Rel family 以外のタンパク質として Bovine Serum Albumin(BSA)に(-)-DHMEQ を 8 当量まで処理しても BSA の分子量に顕著な変化はなかった(Fig. 23)。したがって、(-)-DHMEQ は Rel family タンパク質を特異的に認識して共有結合していると考えられる。

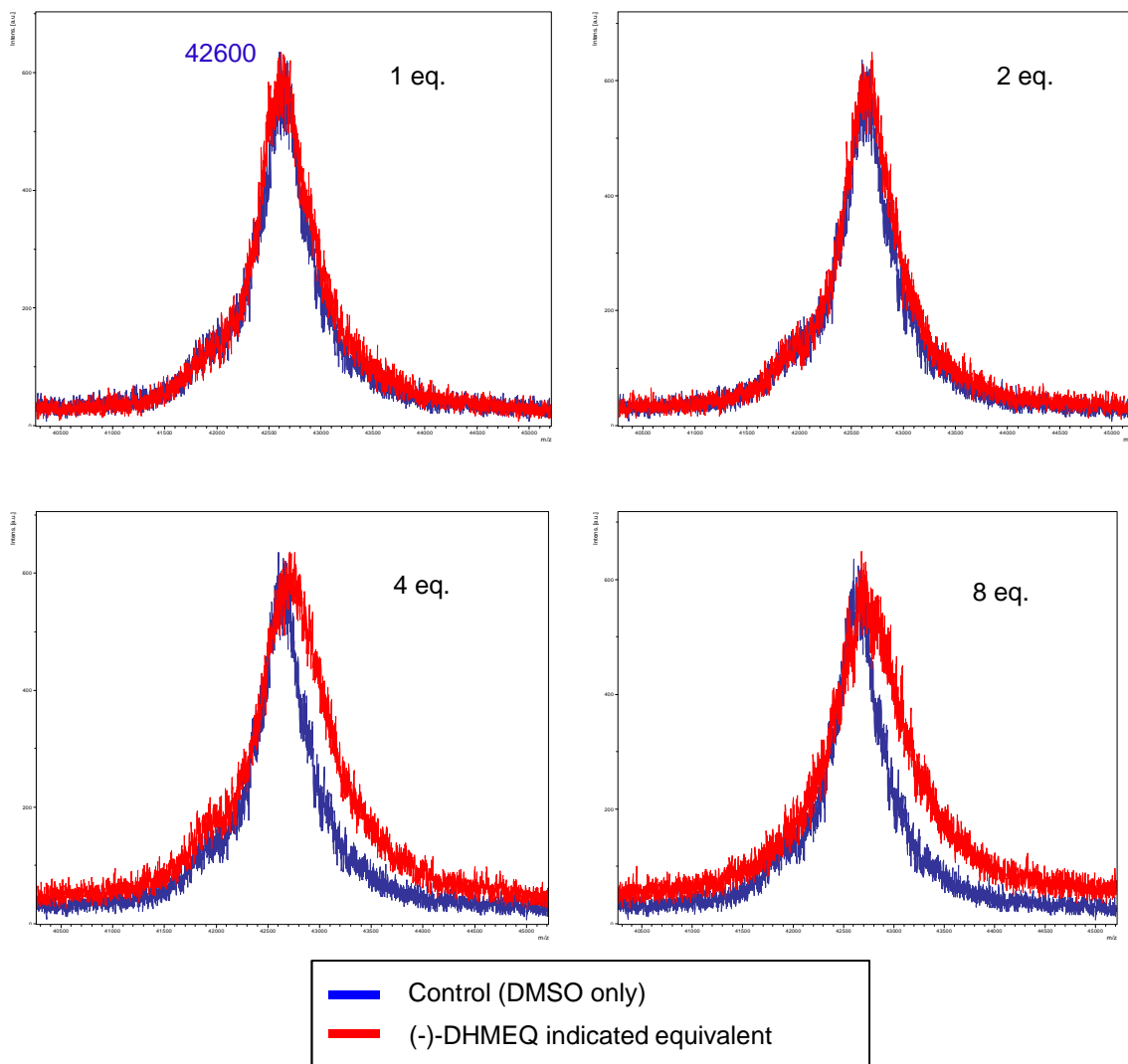


**Fig. 19 Preparation and purification of recombinant RelB and p52.**

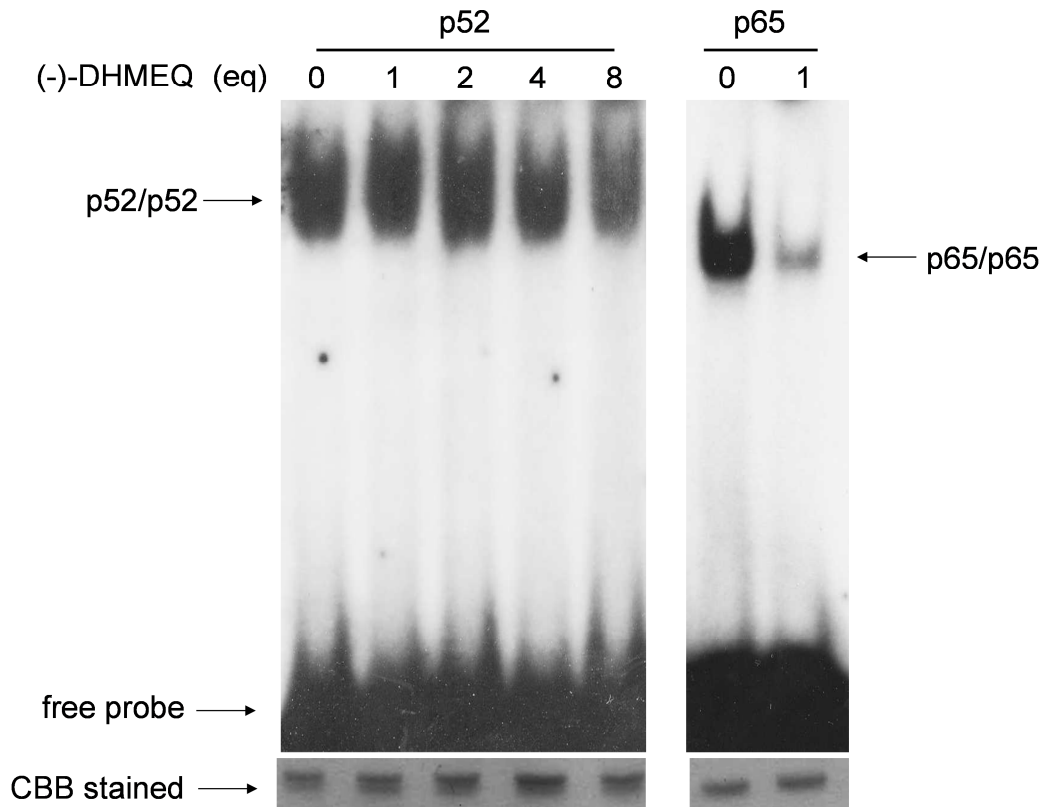
(A) Domain structure of RelB and p52. Leucine zipper; LZ, Rel homology domain; RHD, Nuclear localization signal; NLS. (B) Result of recombinant RelB(1-391) purification. Recombinant RelB(1-391) was purified and prepared for indicated fractions from BL-21 and subjected by CBB-staining. (C) Result of recombinant p52 purification. Recombinant p52 was purified and prepared for indicated fractions from BL-21 and subjected by CBB-staining. Insoluble fraction in PBS: fr1, soluble fraction in PBS: fr2, supernatant of beads: fr3, boiled recombinant protein immobilized glutathione-sepharose beads: fr4, purified recombinant proteins: fr5.



**Fig. 20 Molecular weight analysis of (-)-DHMEQ/RelB(1-391) adduct.** Recombinant RelB(WT) was treated with or without 1 or 2 equivalent (-)-DHMEQ at 4°C for 1 h. Samples were mixed with sinapinic acid in 50% acetonitrile, 0.1% TFA and plating 2  $\mu$ l on the target plate and then measured molecular weight by using MALDI-TOF/MS.

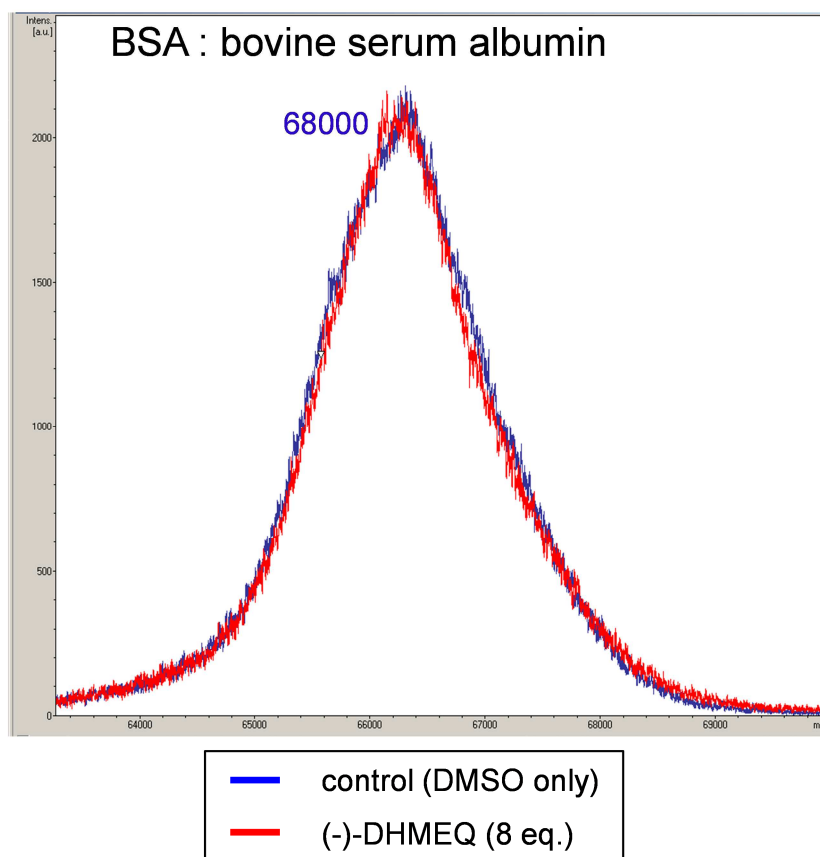


**Fig. 21 (-)-DHMEQ does not bind to p52.** Recombinant p52 was treated with indicated equivalent (-)-DHMEQ at 4°C for 1 h. Samples were mixed with sinapinic acid in 50% acetonitrile, 0.1% TFA and plating 2  $\mu$ l on the target plate and then measured molecular weight by using MALDI-TOF/MS.



**Fig. 22 (-)-DHMEQ does not inhibit p52-κB DNA binding activity.**

The 20 μM recombinant p52 or p65 in PBS was treated with the indicated equivalent of (-)-DHMEQ at 4°C for 1 h, and then *in vitro* DNA binding activity was detected by using EMSA. The left panel shows effect of (-)-DHMEQ on p52-κB DNA binding activity; right panel, the result when a positive-control, p65-κB, was used.



**Fig. 23 Molecular weight analysis of BSA with (-)-DHMEQ.**

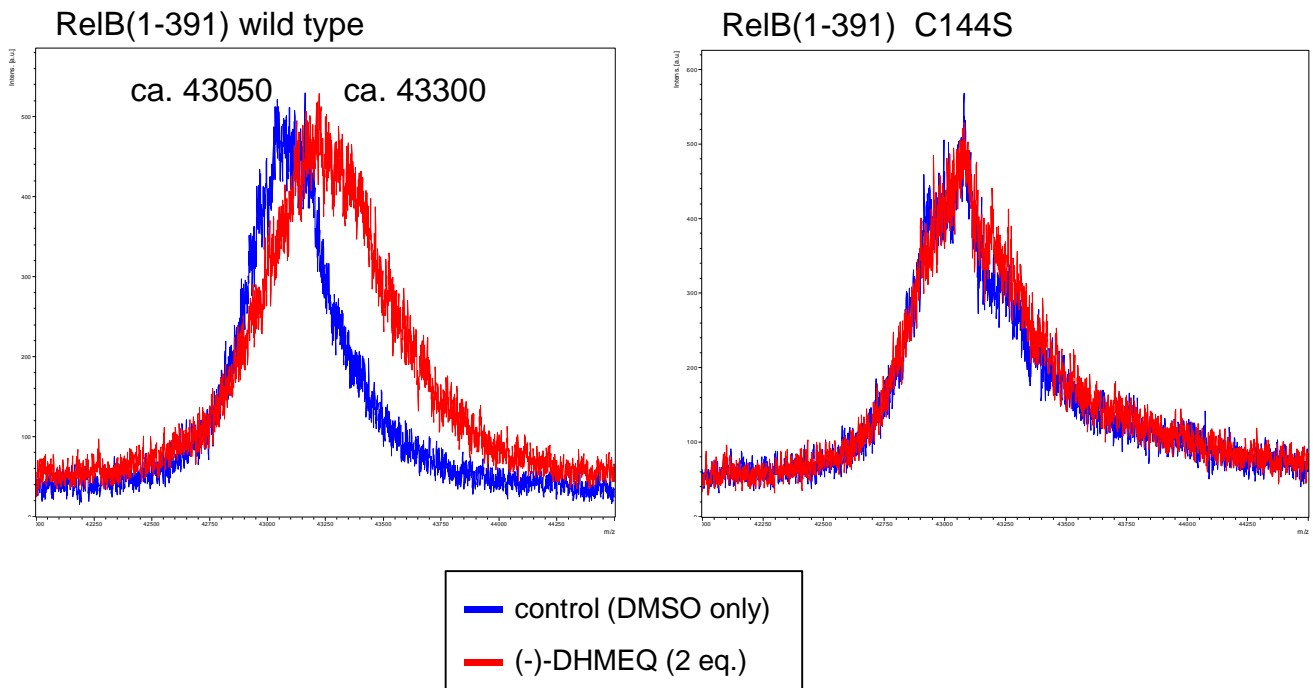
BSA was treated with 8 equivalent (-)-DHMEQ at 4°C for 1 h. Samples were mixed with sinapinic acid in 50% acetonitrile 0.1% TFA and plating 2 µl on the plate and then measured molecular weight by using MALDI-TOF/MS.

### **3.2 (-)-DHMEQ の noncanonical NF- $\kappa$ B における標的部位の同定**

続いて、(-)-DHMEQ の RelB における結合部位の特定を行った。p65 の 38Cys と相同性を持つ RelB の 144Cys を Ser へ置換し、MALDI-TOF/MS による結合解析を行った。その結果、(-)-DHMEQ 処理によって RelB(WT)で見られる RelB の分子量の変化が RelB Cys144Ser mutant; RelB(C144S)では起こらなかった(Fig. 24)。したがって、(-)-DHMEQ は RelB の 144Cys に結合することが分かった。さらに、その結合様式は、MALDI-TOF/MS が共有結合のみを検出でき、RelB の分子量が (-)-DHMEQ 1 分子分増加することから、(-)-DHMEQ が RelB に 1:1 で特異的に共有結合することが分かった。

p50 と p52 は Fig. 25A のように、非常に高い相同性を持つ。これまでに (-)-DHMEQ は p50 の 62Cys に共有結合して p50 の homodimer の DNA 結合を阻害することが報告されている(143)。p65、RelB、c-Rel、p50 における(-)-DHMEQ の結合サイトである Cys と相同性を持つ p52 の 57Cys 周辺のアミノ酸配列の比較を ClustalW により行った(Fig. 18, 25A)。その結果、p52 の 56Gly が他の Rel family タンパク質と相同性がないことが分かった(Fig. 25A)。そこで、p52 のアミノ酸配列を p50 に近づけるために、Gly56Val mutant p52; p52(G56V)を作製し(Fig. 25B)、MALDI-TOF/MS による結合解析を行った。その結果、p52(G56V)にも (-)-DHMEQ は結合しなかった(Fig. 25C)。

したがって、(-)-DHMEQ は Rel family タンパク質に結合する際、特定の Cys の 1 次構造上近くに存在するアミノ酸配列だけでなく、Cys 近傍の 3 次元構造の差異も認識して結合していることが示唆された。この結果は、(-)-DHMEQ の Rel family に対する高い選択性を裏付けるものである。

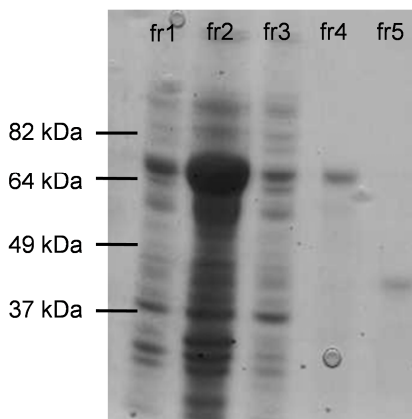


**Fig. 24 (-)-DHMEQ does not bind to RelB(C144S).** Recombinant RelB(WT) or RelB(C144S) was treated with 2 equivalent (-)-DHMEQ at 4°C for 1 h. Samples were mixed with sinapinic acid in 50% acetonitrile, 0.1% TFA and plating 2  $\mu$ l on the target plate and then measured molecular weight by using MALDI-TOF/MS.

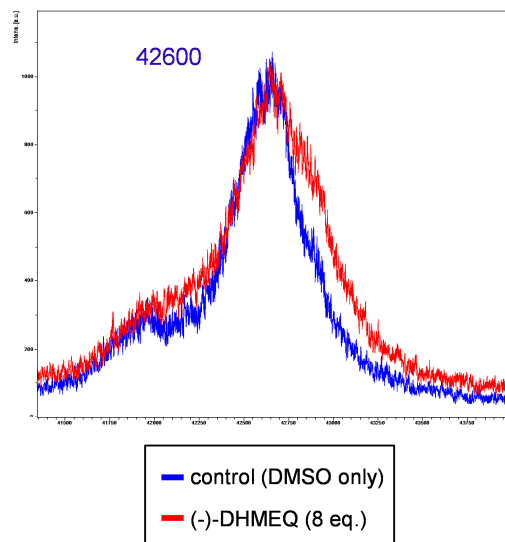




(B)



(C)



**Fig. 25 (-)-DHMEQ does not bind to p52.** (A) Sequence homology of p50 and p52. Sequence homology was analyzed by ClustalW. \* means conserving amino-acid sequence completely in 2 proteins, : highly. (B) Result of recombinant p52(G56V) purification. Recombinant p52(G56V) was purified and prepared for indicated fractions from BL-21 and subjected by CBB-staining, insoluble fraction in PBS: fr1, soluble fraction in PBS: fr2, supernatant of beads: fr3, boiled recombinant protein immobilized glutathione-sepharose beads: fr4, purified recombinant proteins: fr5. (C) Molecular weight analysis of p52(G57V) treated with or without (-)-DHMEQ.

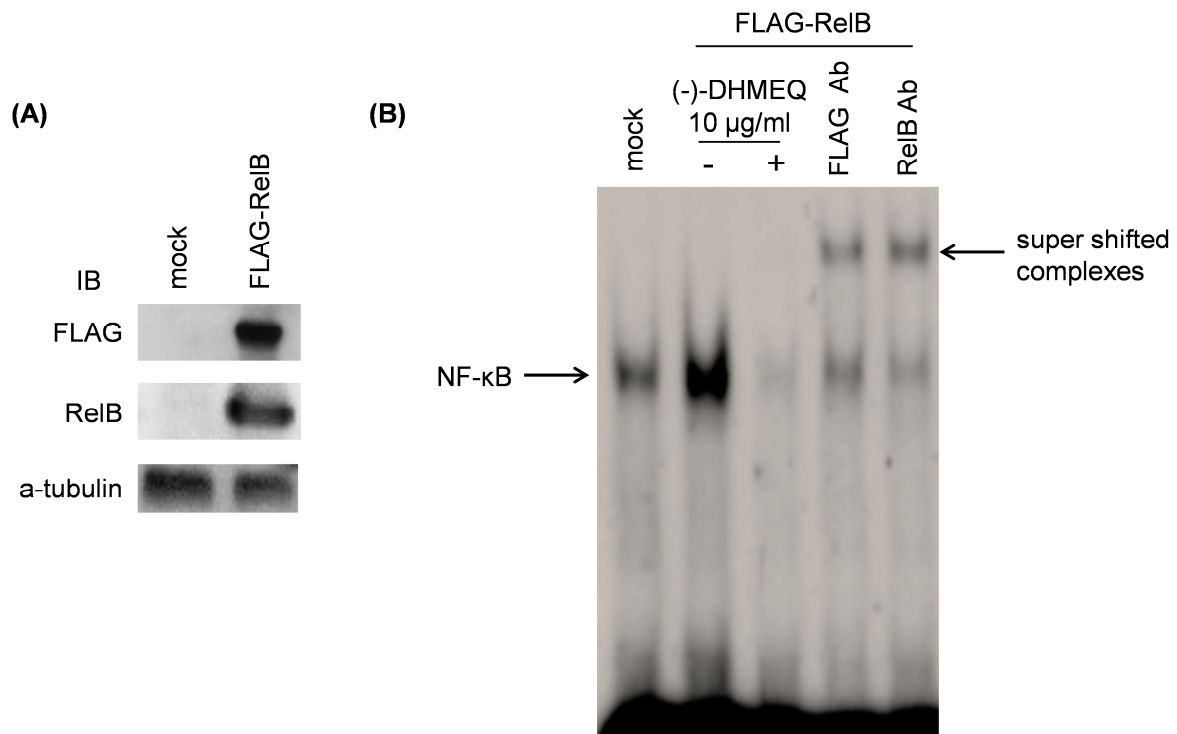
### **3.3 (-)-DHMEQ の細胞内 noncanonical NF- $\kappa$ B に対する抑制効果と標的分子**

(-)-DHMEQ が RelB の 144Cys に共有結合することが分かったため、(-)-DHMEQ が細胞内で noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化に与える効果の検討を行った。

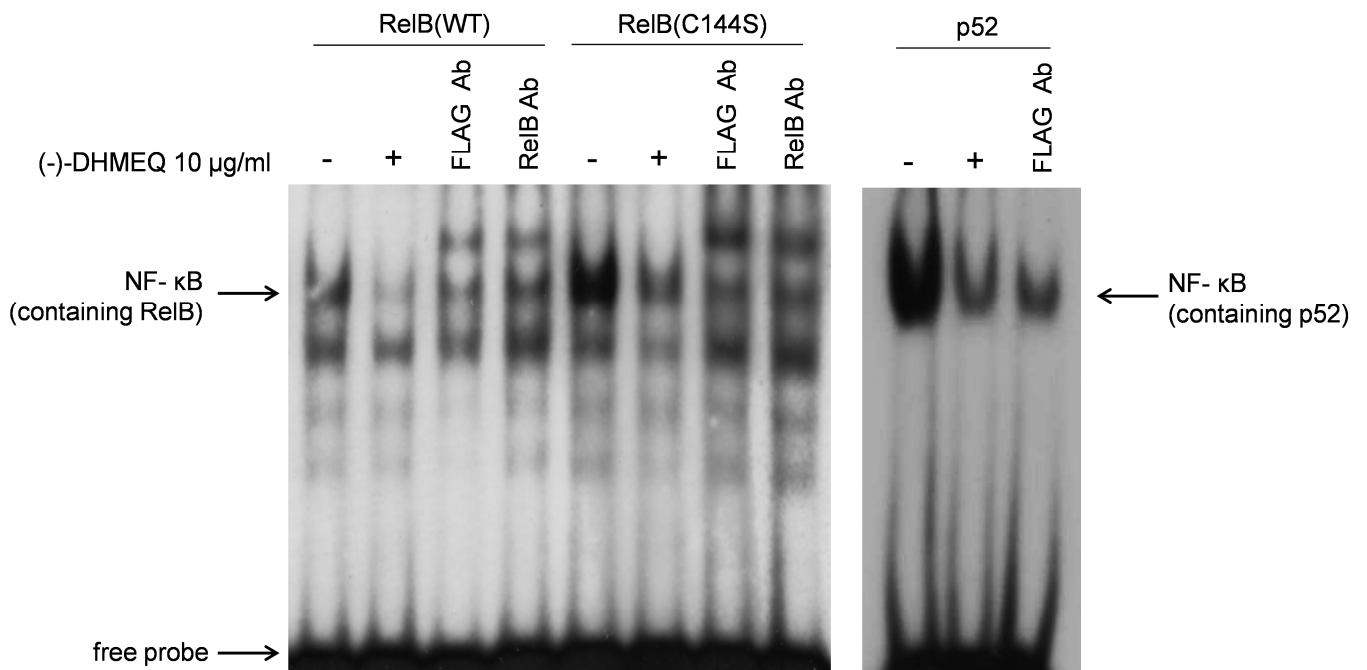
HeLa 細胞に RelB wild type; RelB(WT)を過剰発現させ、EMSA による解析を行った(Fig. 26A)。その結果、RelB(WT)を HeLa 細胞に過剰発現させることによって RelB を含んだ NF- $\kappa$ B の活性化が検出され、(-)-DHMEQ 処理によってその活性化が抑制された(Fig. 26B)。

続いて、RelB(C144S)、p52 を HeLa 細胞に過剰発現させて同様の解析を行った。その結果、RelB(WT)に比べ、RelB(C144S)を過剰発現させると(-)-DHMEQ による RelB を含んだ NF- $\kappa$ B の活性化抑制作用は弱くなったが、(-)-DHMEQ による NF- $\kappa$ B 抑制効果の完全な回復には至らなかった(Fig. 27)。また、(-)-DHMEQ が結合しない p52 においても、(-)-DHMEQ による NF- $\kappa$ B の抑制効果は見られた(Fig. 27)。Fig. 27 に示したように、RelB(C144S)を過剰発現させると、NF- $\kappa$ B の DNA 結合力の増強が見られたため、RelB の 144Cys の DNA 結合能への寄与の検討を行った。RelB(WT)、RelB(C144S)、RelB(C144A)を HeLa 細胞に過剰発現させて EMSA による解析を行った(Fig. 28A)。その結果、RelB(C144S)および RelB(C144A)過剰発現細胞で NF- $\kappa$ B の DNA 結合力の増強が見られた(Fig. 28B)。したがって、RelB の 144Cys の mutation による僅かな conformation 変化が noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合力に影響を与えることが分かった。このことから、RelB の Cys144 は RelB を含む NF- $\kappa$ B の DNA 結合制御において中心的な役割を担うことが示唆された。

RelB は homodimer を形成しないため、培養細胞に単独で過剰発現させると細胞内で p52 以外にも p50 や p100、p105 などの他の Rel family タンパク質をはじめ、様々なタンパク質と heterodimer を形成すると考えられる。同様に、p52 も細胞内で様々な Rel family タンパク質と heterodimer を形成し、Fig. 29A に示したように、RelB(C144S)または p52 と結合した(-)-DHMEQ が結合可能な Rel family タンパク質に(-)-DHMEQ が結合し、Fig. 27 のような結果になったと考えられる。そこで、RelB/p52 の heterodimer を細胞内で形成させるために RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52 を共発現させることによって解析を行った (Fig. 29B)。EMSA の結果、(-)-DHMEQ は RelB(WT)/p52 の活性化を顕著に抑制するのに対し、RelB(C144S)/p52 の活性化には抑制効果を示さなかった(Fig. 29B)。さらに、RelB(WT)/p52 を過剰発現させた HeLa 細胞の核抽出物に(-)-DHMEQ を処理すると処理濃度依存的な DNA 結合の阻害が見られた(Fig. 30)。したがって、(-)-DHMEQ は細胞内においても RelB の Cys144 を標的とし、noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害することで、活性化抑制をすることが分かった(Fig. 31)。



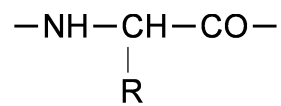
**Fig. 26 Activation of noncanonical NF-κB in HeLa cells by overexpression of ReiB.** (A) HeLa cells were transiently over-expressed with FLAG-tagged ReiB(WT). The expression of ReiB was detected by Western blotting. (B) Transfected cells were incubated with or without 10 µg/ml (-)-DHMEQ for 1 h, and nuclear proteins were then extracted and used for EMSA.



**Fig. 27 Effect of (-)-DHMEQ on NF- $\kappa$ B activation in HeLa cells over-expressing RelB(WT), RelB(C144S), or p52.** HeLa cells were transiently over-expressed with FLAG-tagged RelB(WT), RelB(C144S), or p52. Transfected cells were incubated with or without 10  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for 1 h, and nuclear proteins were then extracted and used for EMSA.

(A)

RelB(WT) **FRYE**<sup>144</sup>**CEGRS**  
RelB(C144S) **FRYE****SEGRS**  
RelB(C144A) **FRYE****A****EGRS**

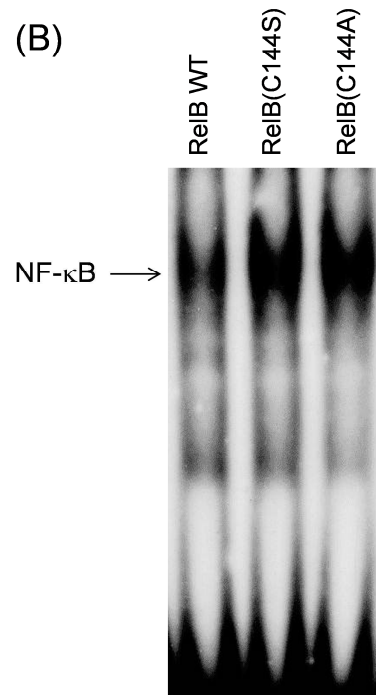


Cys: —CH<sub>2</sub>—SH

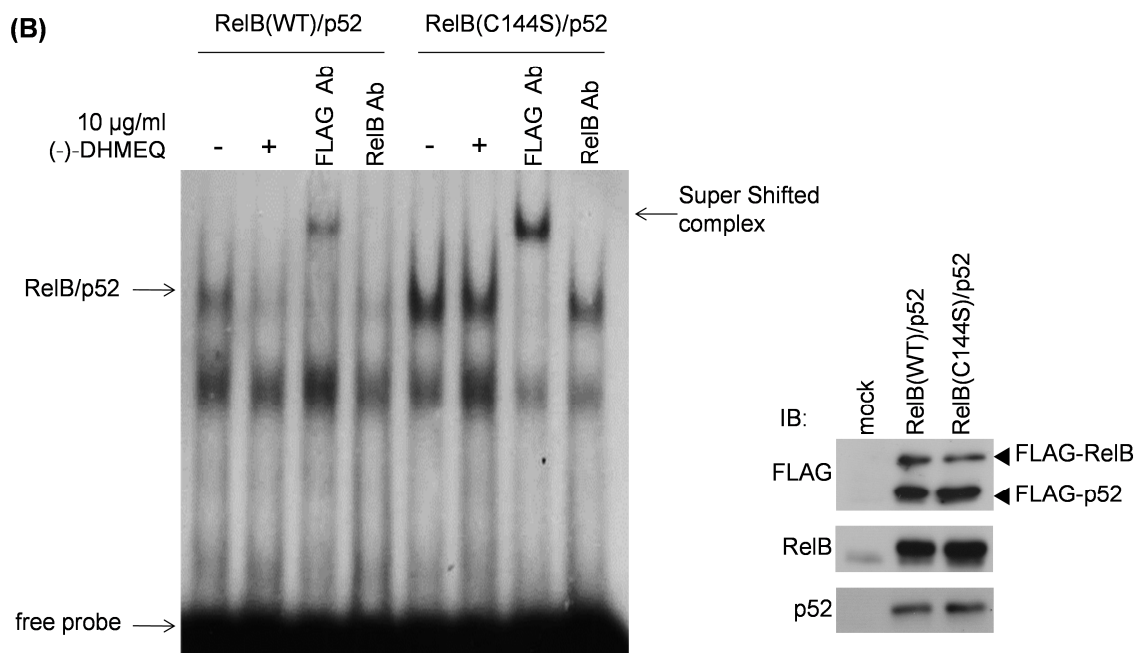
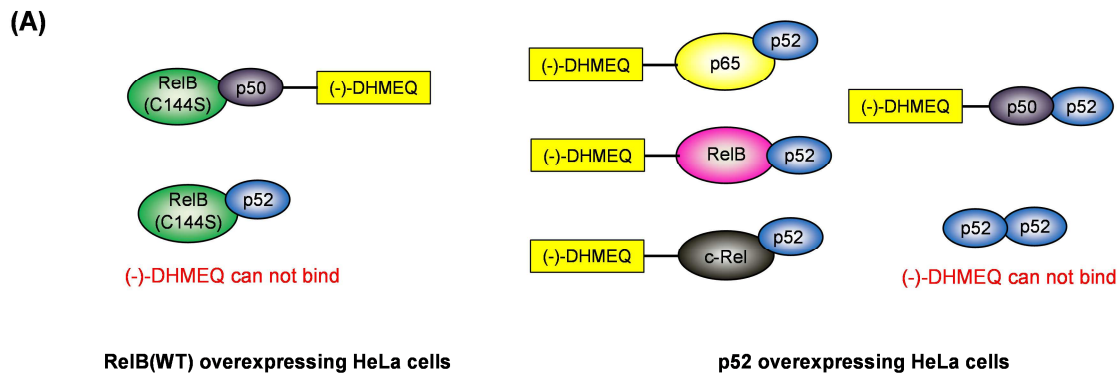
Ser: —CH<sub>2</sub>—OH

Ala: —CH<sub>3</sub>

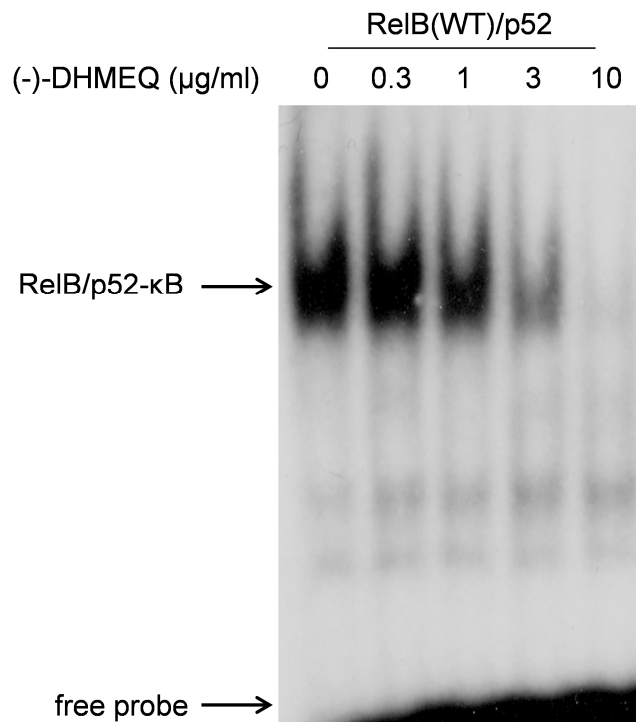
(B)



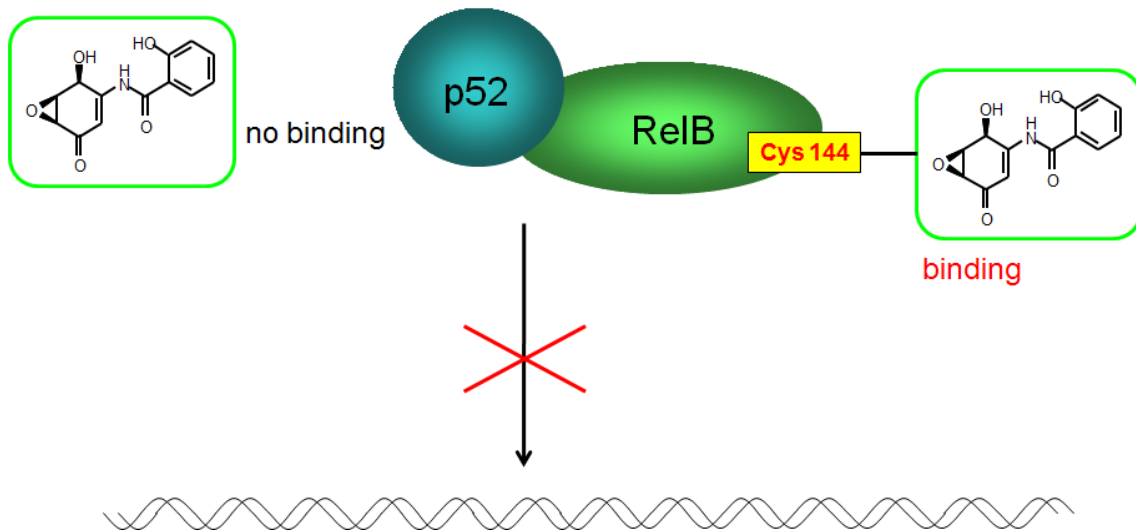
**Fig. 28 Cys144 of RelB is essential for noncanonical NF-κB DNA binding activity.** (A) Sequence of RelB(WT), RelB(C144S), and RelB(C144A). (B) HeLa cells were transiently over-expressed with FLAG-tagged RelB(WT), RelB(C144S), or RelB(C144A). The nuclear proteins were extracted and used for EMSA.



**Fig. 29 RelB Cys144 is essential for (-)-DHMEQ-inhibited NF- $\kappa$ B in RelB/p52 overexpressing HeLa cells.** (A) Possible dimers in RelB(WT) or p52 overexpressing HeLa cells. (B) (-)-DHMEQ inhibits RelB/p52- $\kappa$ B activation though the binding to Cys144. HeLa cells were transiently over-expressed with either FLAG-tagged wild-type or C144S mutant RelB together with FLAG-tagged wild-type p52. Transfected cells were incubated with or without 10  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for 1 h, and nuclear proteins were then extracted and used for EMSA (left). The expression of each protein was detected by Western blotting (right).



**Fig. 30 (-)-DHMEQ inhibited RelB/p52- $\kappa\text{B}$  DNA binding activity.** (-)-DHMEQ inhibits RelB/p52- $\kappa\text{B}$  DNA binding activity. HeLa cells were transiently over-expressed with FLAG-tagged wild-type RelB together with FLAG-tagged wild-type p52. Nuclear proteins were extracted and treated with the indicated concentrations of (-)-DHMEQ for 1 h, and the *in vitro* DNA binding activity was then detected by using EMSA.



**Fig. 31 Inhibitory mechanism of (-)-DHMEQ on noncanonical NF-κB.** (-)-DHMEQ bound to 144Cys of RelB and inhibited noncanonical NF-κB DNA binding activity.

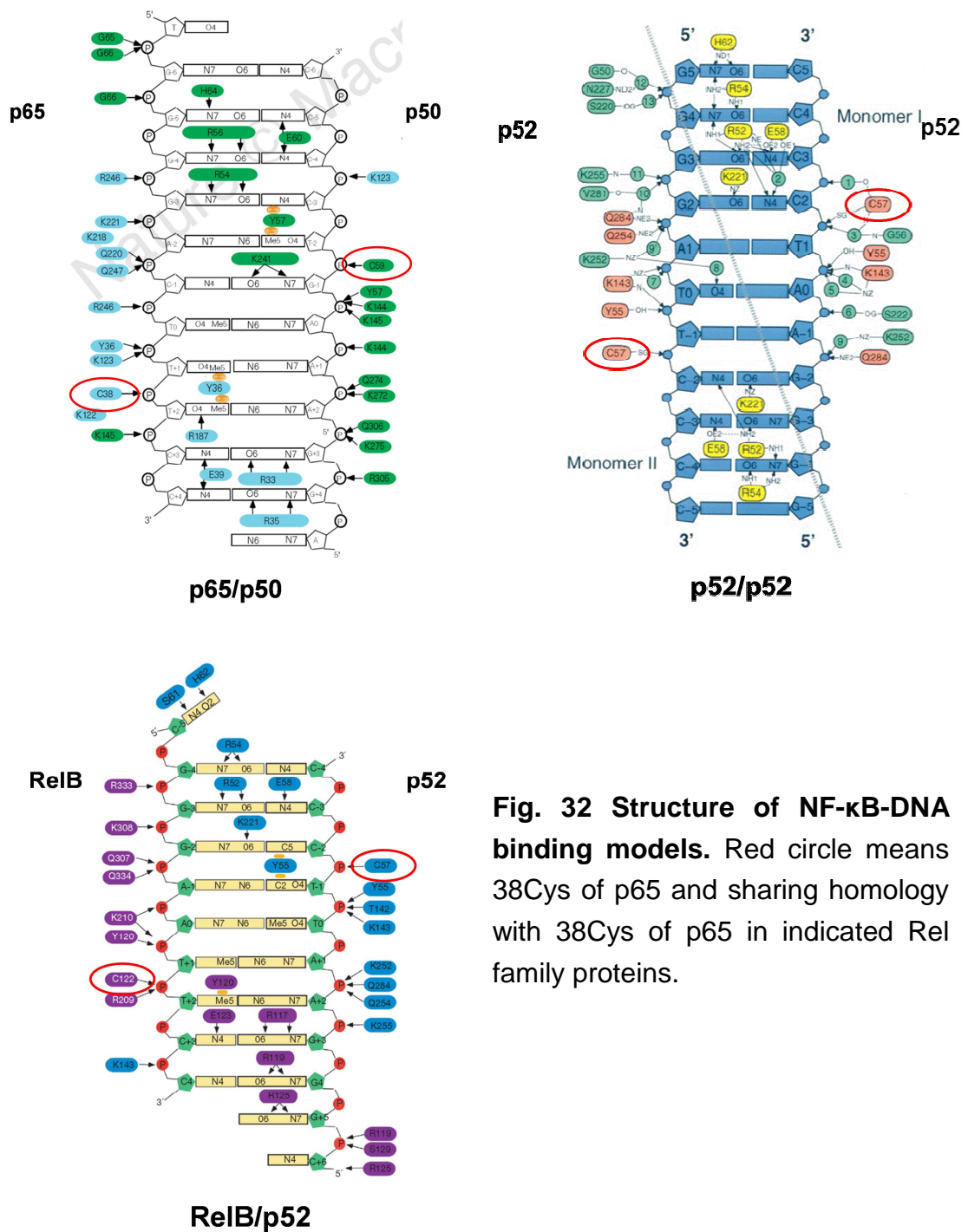


#### 4. 考察

これまでに当研究室において、(-)-DHMEQ と p52 の 38Cys を介した直接的な共有結合とそれによる DNA 結合の抑制が示されてきた(143)。本研究によって、新たに、(-)-DHMEQ が noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子である RelB と 144Cys を介して共有結合することが明らかになった(Fig. 24)。更に、HeLa 細胞に RelB (WT)、RelB(C144S)、p52 を単独で過剰発現させた際、RelB(C144S)または p52 を含んだ NF- $\kappa$ B の活性化も抑制した。MALDI-TOF/MS の結果から、RelB(C144S)と p52 には(-)-DHMEQ は結合できないため、この結果は、(-)-DHMEQ が NF- $\kappa$ B dimer のどちらか一方の Rel family タンパク質に結合しただけで DNA 結合を抑制することが出来ることを示唆している。したがって、(-)-DHMEQ は p52 の homodimer 以外の全ての NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することができると考えられる。

また、RelB の 144Cys をはじめ、(-)-DHMEQ の結合サイトである Rel family タンパク質の Cys は DNA と水素結合を形成している(Fig. 32; 171, 172, 173)。(-)-DHMEQ が RelB の 144Cys に共有結合することで、RelB の 144Cys は DNA との水素結合を形成出来なくなると考えられる。さらに、Fig. 27, 28, 29 の結果から、144Cys の Ser および Ala への mutation が RelB を含む NF- $\kappa$ B の DNA 結合力を増強させていることから、RelB の 144Cys が DNA 結合力の強さを制御していることが明らかとなった。この結果から、(-)-DHMEQ が RelB の 144Cys に結合することは、noncanonical NF- $\kappa$ B の抑制に非常に効果的であると考えられる。また、(-)-DHMEQ が 144Cys に結合することによって DNA 結合が阻害されることや、C144S、C144A mutation で RelB の DNA 結合力が増強することは、RelB の 144Cys の変化が周辺アミノ酸残基に影響を与え、RelB と DNA の結合にとって中心的な役割を果たしていることを示すものでもあり、NF- $\kappa$ B と DNA の結合様式の詳細な解明に大きく貢献するものであると考えられる。

さらに、結合興味深いことに、(-)-DHMEQ は p52 には結合しなかった(Fig. 21)。Rel family に属するタンパク質はその 1 次構造に非常に高い相同性を有しているだけでなく、3 次構造にも高い類似性を示している。また、Fig. 25 に示したように(-)-DHMEQ は p52 の 56Gly を Val へ置換することで p50 型に近づけた p52 にも結合しなかった。したがって、(-)-DHMEQ は Rel family タンパク質の Cys に結合する際に、標的箇所の Cys を含めた全体構造を認識していると考えられ、本結果は(-)-DHMEQ の NF- $\kappa$ B に対する高い選択性を裏付けるものであると考えられる。



**Fig. 32 Structure of NF- $\kappa$ B-DNA binding models. Red circle means 38Cys of p65 and sharing homology with 38Cys of p55 in indicated Rel family proteins.**

(-)-DHMEQ と同様に、エポキシ環を持つ NF- $\kappa$ B 阻害剤は p65 の 38Cys や IKK $\beta$  の 179Cys を標的とすることが報告されているが (144-148)、本研究で注目した noncanonical NF- $\kappa$ B 経路は IKK $\alpha$ の活性化を経て活性化される経路であるため IKK $\beta$ を阻害したとしても、活性化は失われない。本研究によって、(-)-DHMEQ

は noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の RelB に結合し、DNA 結合を抑制することが明らかとなった。この結果は、(-)-DHMEQ が canonical NF- $\kappa$ B 経路だけでなく、noncanonical NF- $\kappa$ B 経路も抑制することを示すものであり、(-)-DHMEQ の非常に優れた NF- $\kappa$ B 阻害作用を証明するものである。Noncanonical NF- $\kappa$ B の異常はしばしば自己免疫疾患の原因として知られていることから、(-)-DHMEQ が noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路の抑制効果を示すことは、(-)-DHMEQ が自己免疫疾患に対しても優れた治療効果を示すことを示唆するものである。



## 第 2 章

# (-)-DHMEQ による noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化阻害の 新規作用機構



## 第1節 序論

Noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路は B 細胞の成熟や自己免疫疾患にとって重要であるが、ATL においてもその重要性が報告されている(174)。ATL は、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化によって非常に悪性度が高い疾患になっている。さらに、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化因子である NIK は一部の乳癌でも活性化しており、乳癌の悪性化にも寄与することが報告されている(101)。したがって、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化制御の解析は ATL、乳癌治療に大きく貢献できると考えられる。そこで、本研究では、NF- $\kappa$ B 阻害剤(-)-DHMEQ を用いて、ATL で活性化している noncanonical NF- $\kappa$ B に(-)-DHMEQ が与える効果の検討を行い、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化機構の解析を行った。

NF- $\kappa$ B 活性化経路は、古くから炎症や癌の悪性化への寄与が報告され、治療ターゲットとなっているシグナル伝達経路である。NF- $\kappa$ B 活性化経路に関与する様々なタンパク質が報告されてきているが、特に最近では canonical NF- $\kappa$ B 活性化経路では HOIP/HIOL1L/SHARPIN からなる linear ubiquitin assembly complex; LUBAC による IKK $\gamma$ のユビキチン化制御の機構が解明され、IKK $\gamma$ の制御機構が詳細に解明された(89-91)。LUBAC の機能解明によって、LUBAC の阻害剤が新たな NF- $\kappa$ B 阻害剤となりうることが示唆された。また、ウイルス感染などで働く自然免疫は positive feedback と negative feedback を受けることで厳密に制御される必要があるが、最近の研究によって、LUBAC はウイルス感染の際の自然免疫応答として重要な RIG-I の活性化を負に制御し、自然免疫応答の制御を行うことが明らかにされた(175)。一方、noncanonical NF- $\kappa$ B 経路においては、B-cell activating factor receptor; BAFFR が IKK $\gamma$ 非依存的に NIK を介して noncanonical NF- $\kappa$ B を活性化することが示され、canonical NF- $\kappa$ B と noncanonical NF- $\kappa$ B が別々の制御機構による独立した経路であることが示唆されるようになってきた(88)。さらに、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化制御として、cIAP1/cIAP2/TRAF2/TRF3 による NIK の制御機構が明らかになったことで、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化経路において NIK が中心的な役割を果たすことが示された(98, 99)。最近では、染色体転座によって生じ、リンパ腫で 30~40%存在する API2-MALT1 の融合タンパク質が NIK を切断し、cIAP1/cIAP2 による切断を受けなくさせることで NIK を安定化させていることが示され noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化機構がより詳細に示された(176)。NIK、API-MALT1 の機能の解明によって、MALT1 阻害剤が noncanonical NF- $\kappa$ B の阻害を効果的に行えることが示唆された。

以上のように、NF- $\kappa$ B の新規制御機構の解明は、NF- $\kappa$ B の関与する疾患の治療に貢献するだけでなく、新たな創薬ターゲットの発見に貢献できるものであると考えられる。そこで、本項では、(-)-DHMEQ による ATL 細胞における

noncanonical NF- $\kappa$ B の阻害機構の解析と noncanonical NF- $\kappa$ B の新規制御機構の解明を目指して研究を行った。



## 第2節 実験方法

### 2.1 Materials

#### (1) 薬剂

Dehydroxymethlepoxyquinomycin; (-)-DHMEQ	当研究室にて合成
Cycloheximide	Calbiochem (San Diego, CA, USA)より購入
pepstatin A	Calbiochem より購入
MG-132	Calbiochem より購入
Leptomycin B	Alexis biochemical (San Diego, CA, USA)より購入

#### (2) vector

pCMV-Tag-2B	Stratagene より購入
pGEX-6P-1	GE Healthcare より購入
pCI-neo	Promega より購入

#### (3) 大腸菌株

E.coli HB101 competent cell	Promega より購入
E.coli BL21 competent cells	Promega より購入

#### (4) 抗体

Mouse 由来抗 FLAG(M2)抗体 F3165	Sigma より購入
Mouse 由来抗 Tubulin(B5-1-2)抗体 T9026	Sigma より購入
Mouse 由来抗 p65(F-6)抗体 sc-8008	Santa Cruz より購入
Mouse 由来抗 p50(E-10)抗体 sc-8141	Santa Cruz より購入
Mouse 由来抗 c-rel(B-6)抗体 sc-6955	Santa Cruz より購入
Mouse 由来抗 RelB X(D-4)抗体 sc-48366X	Santa Cruz より購入
Mouse 由来抗 GST(B-14)抗体 sc-138	Santa Cruz より購入
Rabbit 由来抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体(C-15) sc-203	CST より購入
Rabbit 由来抗 RelB(C1E4)抗体 #4922	CST より購入
Rabbit 由来抗 p52(18D10)抗体 #3017	CST より購入
Rabbit 由来抗 Lamin A/C 抗体 #2032	CST より購入
HRP 標識 mouse IgG 抗体	GE Healthcare より購入
HRP 標識 rabbit IgG 抗体	GE Healthcare より購入

#### (5) 細胞株

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞 :	Riken Cell Bank より購入
成人 T 細胞白血病 MT-1 細胞 :	東京大学医科研より供与

## **2.2 Cell culture**

### **[buffer 組成]**

- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含リン酸緩衝液 (PBS<sup>-</sup>)

8.0 g/l	NaCl
0.2 g/l	KCl
0.916 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
0.2 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

- Trypsin-EDTA 溶液

8.0 g/l	NaCl
0.4 g/l	KCl
0.0475 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
1.0 g/l	glucose
0.002% (v/v)	phenol red
0.035% (v/v)	$\text{NaHCO}_3$
0.002% (v/v)	EDTA

上記の試薬を蒸留水に溶かし、pH を 8.0 に合わせた後に trypsin を 0.075% (v/v) になるように加えた。

### **HeLa 細胞の培養**

第 1 章、第 1 節 2.3 項を参照。

### **MT-1 細胞の培養**

培養培地としては、10% 非働化 fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences, Lenexa, KS)、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin, 100 units/ml penicillin G, 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-glutamine, and 2.25 g/l  $\text{NaHCO}_3$  を含む Rosewell Park Memorial Institute 1640 培地(RPMI, Nissui)を用いた。細胞は 37°C の 5%  $\text{CO}_2$  条件下のインキュベーター内で培養し、2~3 日以内に一回、培地の交換をすることによって継代した。

## 2.3 細胞質/核タンパク質分画

### [buffer 組成]

#### ● Buffer A

10 mM	HEPES-KOH (pH 7.9)
10 mM	KCl
1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.5 mM	DTT*
0.2 mM	PMSF*

\*要時添加

#### ● Buffer C

20 mM	HEPES-KOH (pH 7.9)
25% (v/v)	glycerol
420 mM	NaCl
1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.2 mM	EDTA
0.5 mM	DTT*
0.2 mM	PMSF*

\*要時添加

解析に用いる細胞を 70% ~80% confluent になるまで 37°C の 5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で培養し、薬剤を添加するなどして実験に用いた。培地を除去し、細胞を 750  $\mu$ l の PBS で 2 回洗浄し、ラバーポリスマンを用いて細胞を剥がし、1.5 ml マイクロテストチューブに回収後、3,500 rpm で遠心沈降して上清を除去することで細胞ペレットを得た。

細胞質/核タンパク質分画は Andrews、Faller らの方法の基づき、以下のように調製した(169, 170)。まず、細胞ペレットに対して、氷中で 200  $\mu$ l の buffer A を加えてピペティングによって細胞をほぐして 15 分間氷上に静置した。その後、500 $\times$ g で 5 分間遠心沈降し、上清を回収し、細胞質画分とした。再度 400  $\mu$ l の buffer A を加えて細胞ペレットを浮かべ、タッピングによって細胞ペレットを buffer 中に懸濁して 15 分間氷上に静置した。15 分経過後、500 $\times$ g で 5 分間遠心沈降し、上清を除去した。上清を除去し、再度 400  $\mu$ l の buffer A を加えて細胞ペレットを浮かべ、タッピングによって細胞ペレットを buffer 中に懸濁して 15 分間氷上に静置した。15 分経過後、500 $\times$ g で 5 分間遠心沈降した後、核ペレットを得た。この核ペレットに対して、30~50  $\mu$ l の buffer C を加えて核ペレットを浮かべ、タッピングによって核ペレットを buffer 中に懸濁して 20 分間氷上に静置した。この時、核タンパクの抽出効率を上げるために 5 分おきにタッピン

グした。20分経過後、14,000 rpm で5分間遠心沈降し、上清を新しいマイクロテストチューブに回収し、核抽出物を得た。細胞質画分、核画分のタンパク質濃度を Bradford 色素結合法により測定し、濃度を buffer C で揃えて実験に用いた。

## **2.4 Semi-quantitative RT-PCR**

### **[buffer 組成]**

- 10×loading dye
  - 65% sucrose
  - 10 mM Tris-HCl (pH 6.8)
  - 10 mM EDTA
  - 0.3 % (w/v) bromophenol blue

### **(1) total RNA の抽出**

Total RNA の抽出、cDNA プールの作製は手袋を着用し、チップ、試薬などを含めて RNase free の環境で行った。

まず、RNA 抽出する細胞を 60-ml dish (Corning) に 70~80% confluent になるまで 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養し、500 μl の Trizol (Invitrogen) を加え、dish 上になじませてから 1.5 ml マイクロテストチューブに入れた。この操作を 2 回繰り返して 1 ml の Trizol 溶液を得た。この Trizol 溶液を 2~3 分静置した後、200 μl のクロロホルムを加え、15 分間室温で静置した。静置後、4°C、13,000×g で 15 分間遠心沈降し、上清 400 μl を別のエッペンドルフチューブに移し、400 μl のイソプロパノールを加えてよく混合して 10 分間室温に静置した。その後、4°C、13,000×g で 10 分間遠心沈降した後に上清を除去し、直ちに 70% エタノール 180 μl を加え、すぐに 4°C、7,500×g で 5 分間遠心沈降して上清を除去した。その後適量の DEPC 水を加えて RNA を溶解させ、この RNA 溶液の一部を 100 倍希釈して 260 nm の吸光度から、以下の式によって RNA 濃度(μg/μl)を算出した。

$$(\text{RNA 濃度}) = \{ (260 \text{ nm 吸光度}) \times 40 (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times (\text{希釈倍率}) \} / 1000$$

続いて High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits RT (Applied Biochemistry) により、逆転写反応を行った。まず、以下の組成の逆転写反応溶液を調製した。

10×RT buffer	2 μl
25× dNTPs	0.8 μl
Random primer	2 μl
mRNA (0.1 μg/μl)	10 μl
RT 酵素	1 μl
<u>DEPC 水</u>	<u>4.2 μl</u>
total	20μl

続いて、調製した逆転写反応溶液を以下の条件でサーマルサイクラーにかけ、逆転写反応を行い cDNA を得た。

25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 sec

## (2) PCR

PCR には TaKaRa Taq (TaKaRa, Otsu, Japan)を用いた。

まず、以下の組成の反応溶液を調製し、サーマルサイクラーにセットした。

10×PCR buffer	2 μl
2.5 mM dNTPs	1.6 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1.2 μl
primer (forward)	1.2 μl
primer (reverse)	1.2 μl
cDNA	2 μl
rTaq	0.1 μl
<u>DEPC 水</u>	<u>10.7 μl</u>
total	20 μl

次に、以下の条件で PCR をかけた。また、反応には Table 6 の primer を使い、サイクル数 x は増幅産物がプラトーに達する前の条件をあらかじめ検討した。

Denature	94°C	30 sec	← x cycles
Annealing	(T <sub>m</sub> -5) °C	30 sec	
Extension	72°C	1 min/kb	

**Table 6 Primer sequence used for PCR**

cDNA			cycle
total-human RelB	forward	5'-AGATTGAGGCTGCCATTGAG	25
	reverse	5'-CGCAGCTCTGATGTGTTTGT	
total-human p52	forward	5'-CAGTCATCTCCCAGCCCATC	25
	reverse	5'-CTGGCTTGCGTTTCAGTTGC	
exo-human RelB	forward	5'-TACAAGGATGACGACGATAAGGCC	20
	reverse	5'-AGGGTGACCGTGCTCAGGGA	
exo-human p52	forward	5'-GCTAGCCTCGAGAATTCATG	20
	reverse	5'-ATTGCTTGCCCACCAGACTG	
total-human p65	forward	5'-CAGGCTCCTGTGCGTGTCTC	25
	reverse	5'-CTGGCTGATCTGCCAGAAG	
total-human p50	forward	5'-CCATGGTGGACTACCTGGTG	25
	reverse	5'-CGGATTAGCTCTTTTCCCG	
human NIK	forward	5'-GCCCCAAAAGTGGAGACAAC	25
	reverse	5'-CAGGAGCACGTTGTCAGCTT	
human cIAP1	forward	5'-CTATGTCAGAACACCGGAGG	20
	reverse	5'-GGGTCAGCATTTTCTTCTCC	
human cIAP2	forward	5'-GGCCATTGACTTTTCTGTCCG	20
	reverse	5'-ACTTGGCATGTTGAACCCAT	
β-actin	forward	5'-CTTCGAGCAAGAGATGGCCA	20
	reverse	5'-CCAGACAGCACTGTGTTGGC	

## 2.5 Vector construction

### [buffer 組成]

- 10×loading dye
 

65% (w/v)	sucrose
10 mM	Tris-HCl (pH 6.8)
10 mM	EDTA
0.3 % (w/v)	bromophenol blue

Table 7 に示した vector は第 1 章 2.7 の方法に準じて作製した。また、各 mutant タンパク質の発現 vector は overlap 伸長法によって Table 7 に示した primer を用いた PCR によって insert を作製し、第 1 章 2.7 の項目と同様の方法で vector に組み込み cloning を行った。作製した vector は第 1 章 2.9 に示した方法に準じて大量精製を行った。

**Table 7 Primer sequence for indicated cDNA cloning**

cDNA	vector		restriction enzyme	remarks	
importin- $\alpha$ 5	pGEX-6P-1	forward	5'-TTTT <b>GGA TCC</b> <u>ATG</u> ACC ACC CCA GGA AAA GAG AAC	Bam HI	
		reverse	5'-TTTT <b>CTC GAG</b> <u>TCA</u> AAG CTG GAA ACC TTC CAT AGG	Xho I	
RelB(R141A, Y142A)	pCMV-Tag-2B	forward	5'-GC ATG CGC TTC <b>GCC GCC</b> GAG TGC GAG GGC C	/	
		reverse	5'-G AGC GGC CCT CGC ACT <b>CGG CGG</b> CGA AGC GC		
RelB(NLS1'/NLS2')	pCMV-Tag-2B	forward	5'-GAC AAG <b>GCG GCG</b> GCA CGG GGG ATG CCC GAC		for NLS1 mutant
		reverse	5'- CCC CCG <b>TGC CGC</b> CGC CTT GTC CAC GCC GTA		
		forward	5'-AAA <b>GCA GCT</b> <b>GCG GCA</b> AAG CCG GCC ATC CTG		for NLS2 mutant
		reverse	5'-CTT <b>TGC CGC</b> <b>AGC TGC</b> TTT GCT CTC GAT GCC		
p52(WT)	pCI-p52(WT)	forward	5'-TTTT <b>GAA TTC</b> <u>ATG</u> GAG AGT TGC TAC AAC CCA GGTC		Eco RI
		reverse	5'-TTTTTT <b>CTC GAG</b> <u>TTA</u> CGC CCC GCC CCC GCC TCC CG		Xho I

Restriction enzyme sites and mutation sites are in bold face and initiation/stop codons are underlined

## 2.6 GST-pulldown assay

### [buffer 組成]

- L-buffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1 % (w/v)	Triton-X100
1% (v/v)	Protease inhibitor*

\* 要時添加

### (1) GST-importin- $\alpha$ 5 ビーズの作製

Table 8 に示した primer を用いて第一章 2.7 の項の方法に準じて pGEX-importin- $\alpha$ 5 発現 vector を作製し、GST-importin- $\alpha$ 5 の大量精製を行った。

**Table 8 Primer sequences for indicated cDNA cloning**

cDNA			restriction enzyme
importin- $\alpha$ 5	forward	5'-TTTT <b>GGA TCC</b> <u>ATG ACC ACC CCA GGA AAA GAG AAC</u>	Bam HI
	reverse	5'-TTTT <b>CTC GAG</b> <u>TCA AAG CTG GAA ACC TTC CAT AGG</u>	Xho I
restriction enzyme site in bold face and initiation/stop codon underlined			

### (2) 細胞抽出物の調製

解析に用いる細胞を 70% ~80% confluent になるまで 37°C の 5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で培養し、薬剤を添加するなどして実験に用いた。培地を除去し、細胞を 750  $\mu$ l の PBS で 2 回洗浄し、接着細胞は、ラバーポリスマンを用いて細胞を剥がし、1.5 ml マイクロテストチューブに回収後、3,500 rpm で遠心沈降して上清を除去することで細胞ペレットを得た。浮遊細胞は細胞培養液を 15 ml 遠心チューブに入れ、1,000 $\times$ g で 5 分間遠心沈降して細胞ペレットを得た。

細胞ペレットに 300  $\mu$ l の L-buffer を入れ 30 min on ice で incubate することで可溶化を行った。溶解に用いる L-buffer の量はあらかじめ検討した。30 min 経過後、14,000 rpm で 5 min 遠心沈降し、上清を回収して細胞抽出物を得た。細胞抽出物の濃度を Bradford 色素結合法により測定し、L-buffer で 1 mg/ml に合わせた。



### (3) pulldown assay

まず、(1)の項で調製した GST-importin- $\alpha$ 5 ビーズを L-buffer で 3 回 wash することでビーズの平衡化を行い、最後にビーズ当量の L-buffer を入れて 50% スラリーのビーズを作製した。

次に、(2)の項で調製した細胞抽出物 200  $\mu$ l に 50% スラリーの GST-importin- $\alpha$ 5 を 100  $\mu$ l を入れ、4°C で 2 時間 rotate しながらインキュベートした。インキュベート終了後、ビーズを遠心沈降し、上清を除去し、L-buffer で 3 回ビーズの wash を行った。

最後に、60  $\mu$ l の 2 $\times$ sample buffer を入れて 98°C のヒートブロックで 5 分間煮沸することで変性処理を行い、ビーズに結合したタンパク質を elute し、Western blotting sample とした。

## 2.7 Western blotting

第 1 章、第 2 節 2.4、2.5、2.6 の項参照。

検出に用いた抗体は Table 9 の条件で行った。

**Table. 9 Conditions for antibody-antigen reaction**

	species	型番		1st antibody	条件	2nd antibody	条件
FLAG	mouse-monoclonal	Sigma	F3165	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
p65	mouse-monoclonal	Santa Cruz	sc-8008	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
RelB	rabbit-monoclonal	CST	#4922	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
p50	mouse-monoclonal	Santa Cruz	sc-8141	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
p52	rabbit-monoclonal (human specific)	CST	#3017	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
I $\kappa$ B $\alpha$	rabbit-polyclonal	Santa Cruz	sc-203	1:10000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
GST	mouse-monoclonal	Santa Cruz	sc-138	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
Lamin A/C	rabbit-polyclonal	CST	#2032	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
$\alpha$ -tubulin	mouse-monoclonal	Sigma	T9026	1:10000 in 5% milk	室温 1 h	1:5000 in 3% milk	室温 1 h

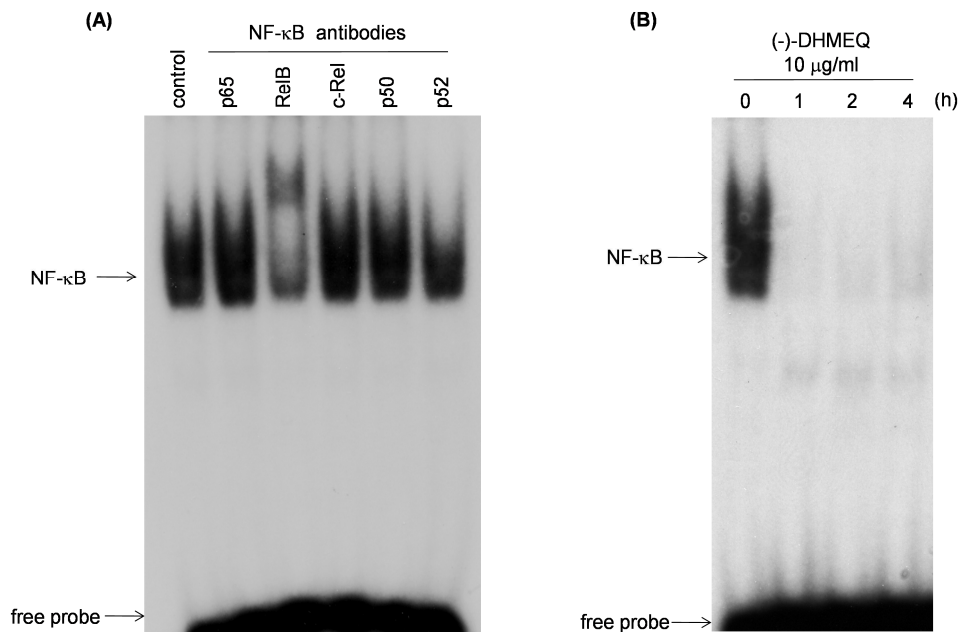
## 2.8 EMSA

第 1 章、第 2 節 2.5、2.7 の項参照。

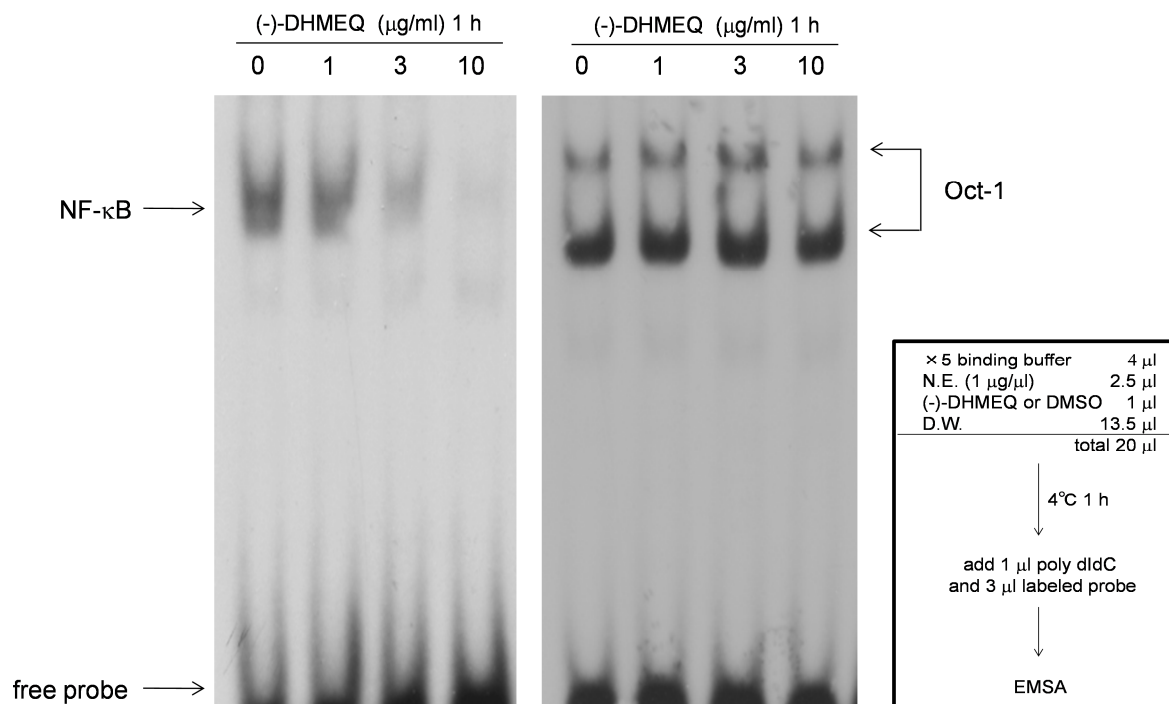
### 第3節 実験結果

#### 3.1 MT-1 細胞における(-)-DHMEQ の noncanonical NF- $\kappa$ B 抑制効果

ATL 細胞である MT-1 細胞は HTLV-1 感染によって白血病化した細胞で、Tax negative の細胞である。ATL では恒常的な NF- $\kappa$ B の活性化が報告されている。Supershift assay によって MT-1 細胞における NF- $\kappa$ B の構成因子の解析を行った。各 NF- $\kappa$ B の抗体を処理することで、NF- $\kappa$ B の DNA 結合の変化を測定した結果、RelB 抗体添加では supershift が見られ、p52 抗体添加では NF- $\kappa$ B の DNA 結合力の低下が見られた(Fig. 33A)。したがって、MT-1 細胞で活性化している NF- $\kappa$ B は RelB/p52 を構成因子とする noncanonical NF- $\kappa$ B であることが確認された。また、(-)-DHMEQ は MT-1 細胞で活性化している noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化を 1 時間の処理時間から顕著に阻害した(Fig. 33B)。続いて、MT-1 細胞の核抽出物に (-)-DHMEQ を処理し、(-)-DHMEQ が noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合に与える効果の検討を行った。その結果、(-)-DHMEQ は処理濃度依存的に noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害した(Fig. 34)。この時、(-)-DHMEQ は NF- $\kappa$ B とは別の転写因子である Oct-1 の DNA 結合には影響を与えなかったことから、(-)-DHMEQ が noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を選択的に阻害していることが分かった(Fig. 34)。



**Fig. 33 Inhibition of noncanonical NF-κB activity by (-)-DHMEQ in MT-1 cells.** (A) Analysis of NF-κB components activating in MT-1 cells. NF-κB components of MT-1 cells were analyzed by performing a supershift assay using the indicated NF-κB antibodies. (B) Inhibition of cellular noncanonical NF-κB activity in MT-1 cells. Cells were treated with 10 μg/ml (-)-DHMEQ for the indicated periods, and thereafter the nuclear proteins were extracted and used for EMSA.



**Fig. 34 Inhibition by (-)-DHMEQ of *in vitro* RelB/p52 DNA binding.** Nuclear extracts from MT-1 cells were treated with the indicated concentrations of (-)-DHMEQ for 1 h, and the *in vitro* DNA binding activity was then detected by using EMSA. The left panel shows inhibition of noncanonical NF-κB DNA binding activity by (-)-DHMEQ; and the right panel, the result when a control probe, Oct-1, was used.

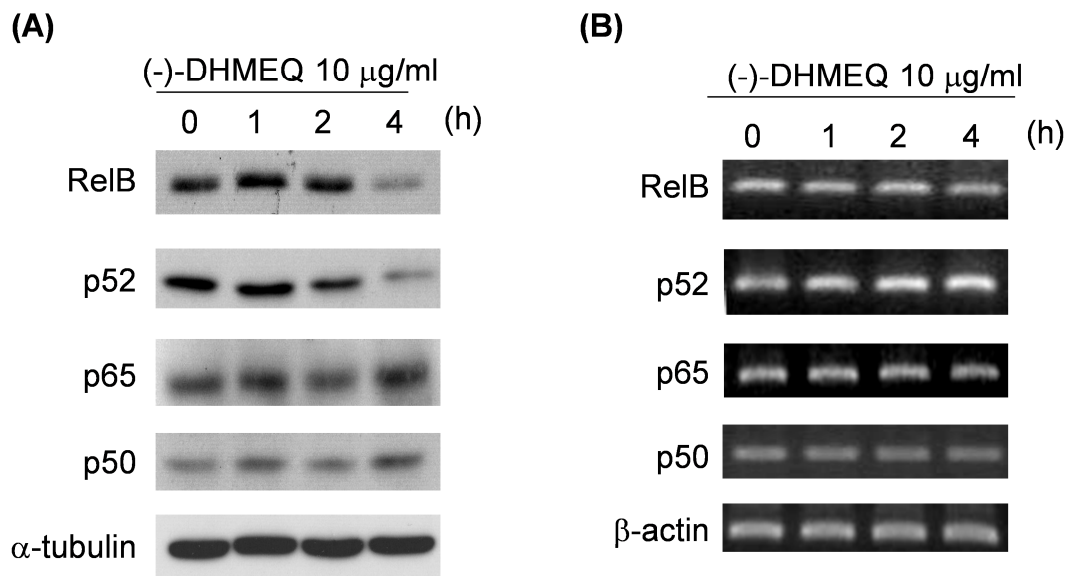
### 3.2 MT-1 細胞における(-)-DHMEQ による noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の不安定化

(-)-DHMEQ は Fig. 33, 34 のような noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害する 1 時間処理では細胞内の total RelB 量には変化を与えないが、(-)-DHMEQ を 4 時間処理することによって noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の RelB と p52 のタンパク質レベルでの発現低下が見られた(Fig. 35A)。一方で、canonical NF- $\kappa$ B 構成因子 p65、p50 ではタンパク質レベルでの発現量は低下しなかった(Fig. 35A)。semi-quantitative RT-PCR の結果から、(-)-DHMEQ は全ての処理時間で RelB、p52、p65、p50 の mRNA 量には影響を与えなかった(Fig. 35B)。さらに、(-)-DHMEQ は 4 時間処理で処理濃度依存的に RelB と p52 のタンパク質レベルの発現量を低下させた(Fig. 36A)。この時、semi-quantitative RT-PCR の結果から、(-)-DHMEQ は RelB、p52、p65、p50 の mRNA 量には影響を与えなかった(Fig. 36B)。

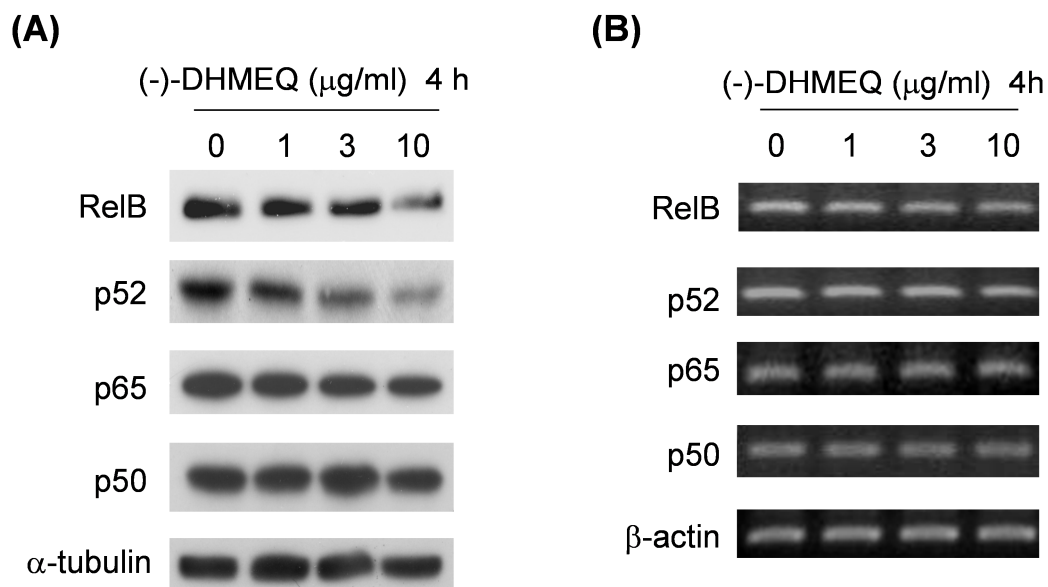
以上の結果から、(-)-DHMEQ が RelB と p52 を不安定化していると考え、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide(CHX)を用いて CHX-chase assay を行った。CHX 処理によって新生タンパク質の合成を止め、タンパク質の分解系のみが働く状態にすることで、RelB、p52 とともにタンパク質量が減少し、(-)-DHMEQ を処理することによって RelB、p52 のタンパク質量の減少速度が加速する結果が得られた。このことから、(-)-DHMEQ が RelB、p52 のタンパク質分解を促進させることが分かった(Fig. 37)。一方、(-)-DHMEQ 処理でタンパク質レベルでの発現が減少しなかった p65 と p50 は、(-)-DHMEQ によるタンパク質分解の促進は見られなかった(Fig. 38)。

不安定化したタンパク質の分解経路としては主にプロテアソーム経路とリソソーム経路が知られている。そこで、(-)-DHMEQ による RelB、p52 の分解がプロテアソームまたはリソソームを介しているかの検討を行った。その結果、プロテアソーム阻害剤 MG-132、リソソーム阻害剤 pepstatin A とともに(-)-DHMEQ による RelB と p52 の不安定化を回復させなかった(Fig. 39)。したがって、(-)-DHMEQ による RelB、p52 の分解はプロテアソーム、リソソーム非依存的に起こっていることが分かった。

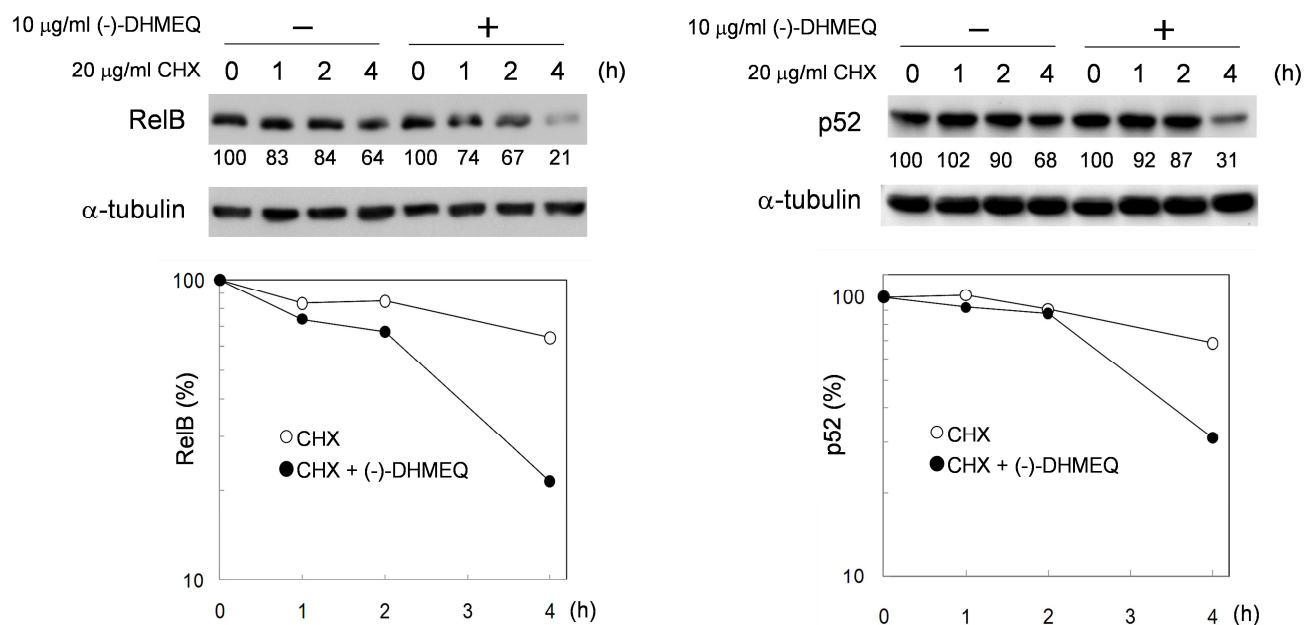
以上の結果から、(-)-DHMEQ は MT-1 細胞に対し、noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害するだけでなく、RelB と p52 の不安定化を誘導することによって、効果的に noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化抑制を行うことが分かった。この結果は、(-)-DHMEQ が ATL に対する非常に効果的な治療薬になりうることを示唆するものである(Fig. 40)。



**Fig. 35 Destabilization of RelB and p52 induced by (-)-DHMEQ (time-course experiments).** (A) MT-1 cells were incubated with 10  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for the times indicated, and the total cell extracts were then subjected to Western blotting. (B) MT-1 cells were incubated with (-)-DHMEQ, as described in “A;” and the corresponding mRNA expression of each protein was measured by semi-quantitative RT-PCR.

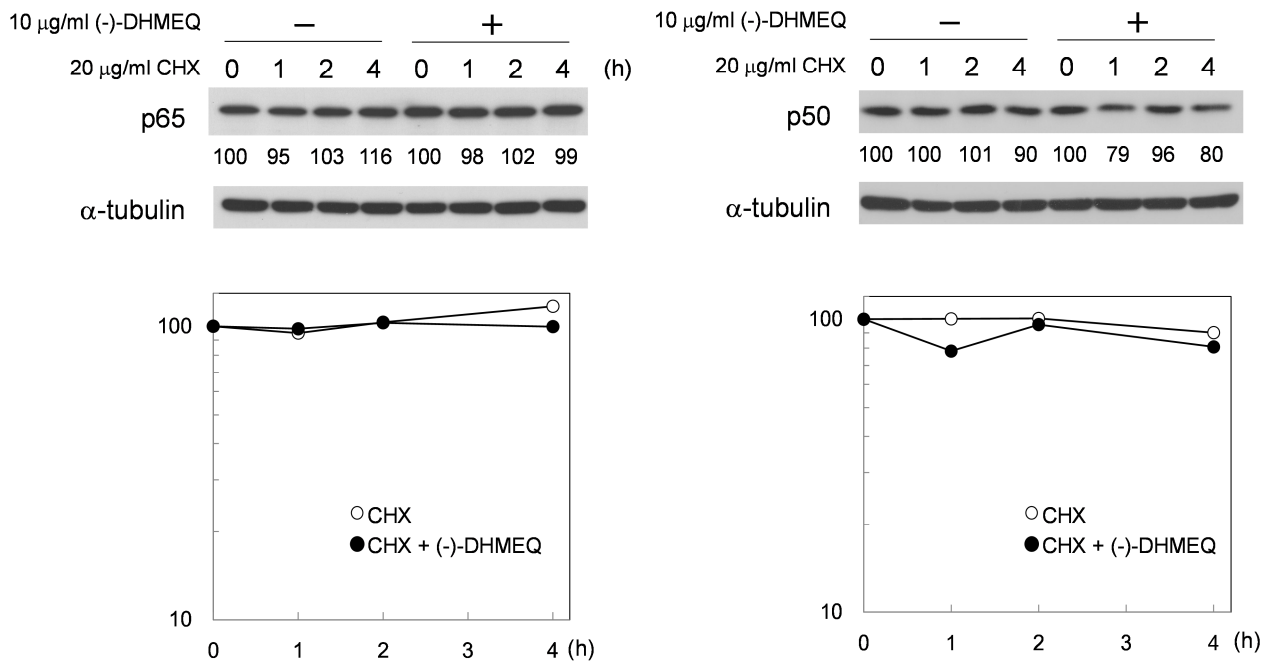


**Fig. 36 Destabilization of RelB and p52 induced by (-)-DHMEQ (dose-dependency).** (A) MT-1 cells were incubated with indicated concentrations of (-)-DHMEQ for 4 h and the total cell extracts were then subjected to Western blotting. (B) MT-1 cells were incubated with (-)-DHMEQ, as described in "A;" and the corresponding mRNA expression of each protein was measured by semi-quantitative RT-PCR.

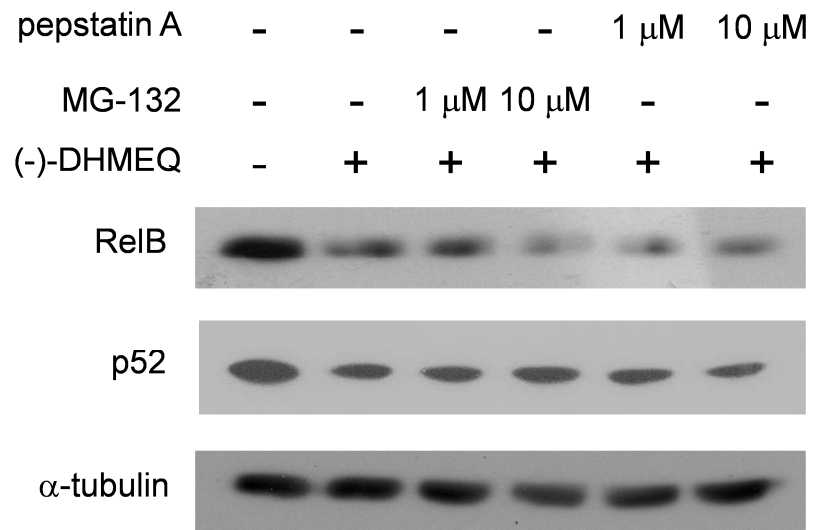


**Fig. 37 Destabilization of RelB and p52 induced by (-)-DHMEQ (cycloheximide chase assay).** MT-1 cells were treated with 20  $\mu\text{g/ml}$  cycloheximide (CHX) and 10  $\mu\text{g/ml}$  (-)-DHMEQ for the indicated periods. Total cell extracts were subsequently subjected to Western blotting and detected indicated proteins. Protein amounts were quantified by using Image J. Open circles indicate CHX treatment, and closed circles denote CHX and (-)-DHMEQ treatment.

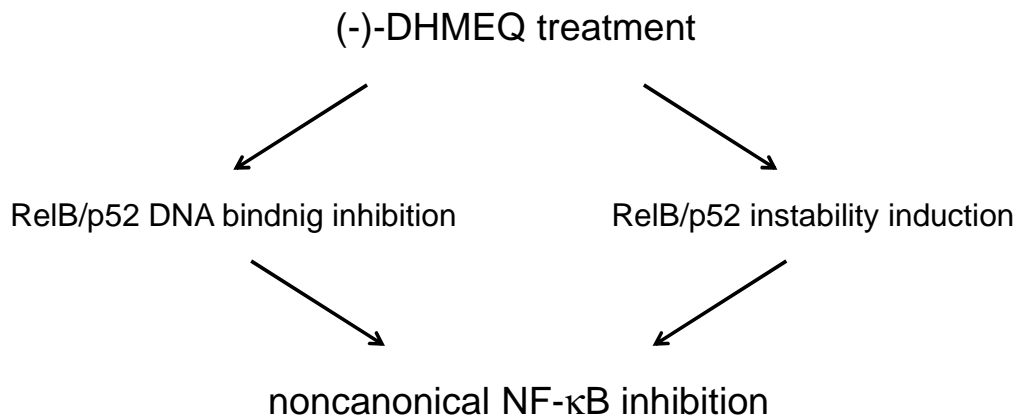




**Fig. 38 Effect of (-)-DHMEQ on p65 and p50 stability (cycloheximide-chase assay).** MT-1 cells were treated with 20  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) and 10  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for the indicated periods. Total cell extracts were subsequently subjected to Western blotting and detected indicated proteins. Protein amounts were quantified by using Image J. Open circles indicate CHX treatment, and closed circles denote CHX and (-)-DHMEQ treatment.



**Fig. 39 (-)-DHMEQ-induced RelB/p52 degradation does not mediate lysosome or proteasome.** MT-1 cells were pretreated with indicated concentrations of acid protease inhibitor, pepstatin A, or proteasome inhibitor, MG-132 for 1 h and then 10  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for 4 h. Total cell extracts were subsequently subjected to Western blotting and detected indicated proteins.



**(-)-DHMEQ may be a novel chemotherapeutic agent for ATL**

**Fig. 40 Inhibitory mechanism of noncanonical NF-κB by (-)-DHMEQ in MT-1 cells.**

### 3.3 noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合能の安定性への寄与

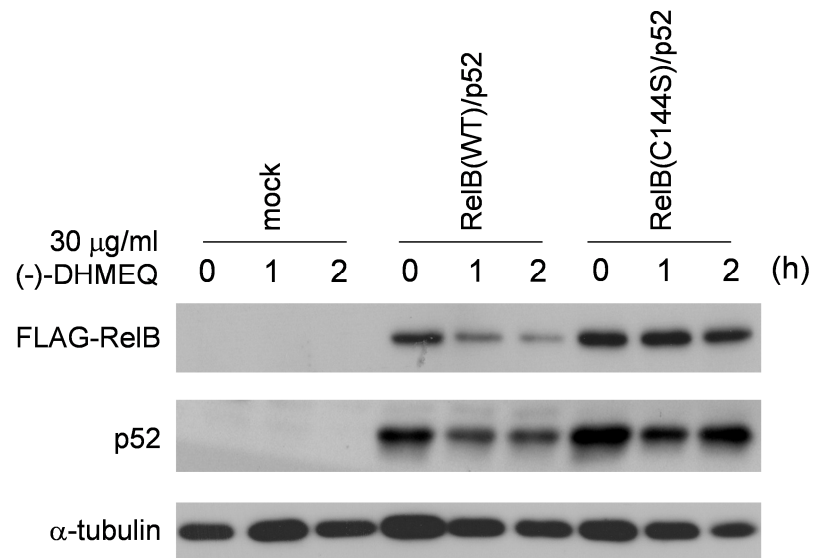
3.2 項で示した(-)-DHMEQ による noncanonical NF- $\kappa$ B の不安定化の誘導が、(-)-DHMEQ が RelB に結合したことに起因しているか否かの検討を行うために、HeLa 細胞に RelB(WT)または RelB(C144S)を p52 と共発現させて(-)-DHMEQ の効果の検討を行った。その結果、RelB(WT)/p52 を共発現させた HeLa 細胞では (-)-DHMEQ 処理によって RelB と p52 の分解が誘導されるのに対し、RelB(C144S)/p52 過剰発現細胞では、(-)-DHMEQ による RelB と p52 の分解は起こらなかった(Fig. 41)。したがって、RelB と p52 の分解は(-)-DHMEQ が RelB に結合することによって誘導されていることが明らかとなった。

Fig. 30, 34 に示したように、(-)-DHMEQ が結合した noncanonical NF- $\kappa$ B は DNA 結合能を失う。そこで、noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合阻害が RelB と p52 の不安定化の原因となっているかを検討した。Rel family の DNA 結合 domain は RHD の中に存在し、高い相同性を持ち、(-)-DHMEQ の結合する Cys に隣接するアミノ酸は Rel family タンパク質内で高度に保存されている(Fig. 42A)。また、p52 の 54Arg と 55Tyr の Ala への変異体 p52(R54A, Y55A)および、p65 の 35Arg と 36Tyr の Ala への変異体 p65(R35A, Y36A)は DNA 結合能を失うことが報告されており(177, 178)、これら 2 つの Arg と Tyr は全ての Rel family で保存されている(Fig. 42A)。また、Fig. 42B に示したように RelB が DNA に結合する際には 141Arg と 142Tyr は 144Cys と共に DNA の近傍に存在し、水素結合を形成している。このことから 141Arg と 142Tyr が DNA 結合にとって重要であると考えられる。そこで、RelB の 141Arg と 142Tyr を Ala へ変異させた RelB(R141A, Y142A)を HeLa 細胞に p52 と共発現させて RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52、RelB(R141A, Y142A)/p52 の DNA 結合能の比較を行った。EMSA の結果、RelB(WT)/p52 に比べ、RelB(C144S)/p52 では DNA 結合力の増強が見られ、RelB(R141A, Y142A)/p52 では DNA 結合力が完全になくなった(Fig. 43)。

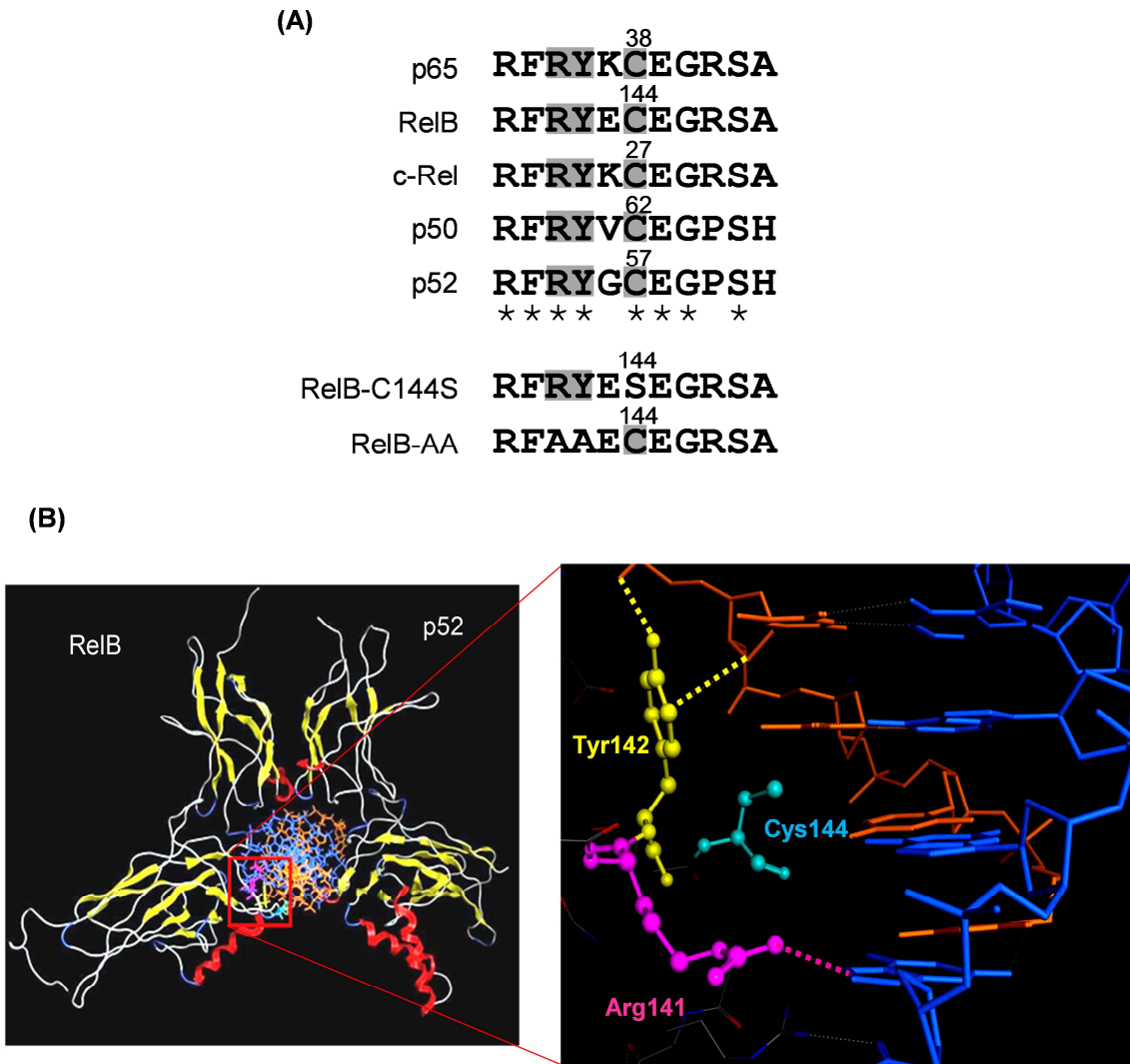
続いて、RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52、RelB(R141A, Y142A)/p52 を HeLa 細胞に共発現させて各 RelB/p52 heterodimer の挙動の解析を行った。その結果、RelB(R141A, Y142A)/p52 を HeLa 細胞に共発現させた際に、RelB、p52 ともにタンパク質レベルでの発現量が少なくなっていた(Fig. 44A)。この時、semi-quantitative RT-PCR の結果から mRNA 量レベルでの発現量の差は見られなかった(Fig. 44B)。そこで、RelB(R141A, Y142A)/p52 のタンパク質レベルでの減少がタンパク質の不安定化に起因するかの検討を CHX-chase assay により行った。その結果、RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52 に比べて、RelB(R141A, Y142A)/p52 を共発現させると、RelB、p52 共にタンパク質の半減期が短くなり、不安定化が促進されていた(Fig. 45)。さらに興味深いことに、RelB(WT)/p52 に比べて DNA 結合力の強い RelB(C144S)/p52 を過剰発現させると、RelB、p52 ともに安定性が

向上していることが分かった(Fig. 45)。したがって、DNA 結合能と RelB と p52 の安定性には相関性があることが分かった。

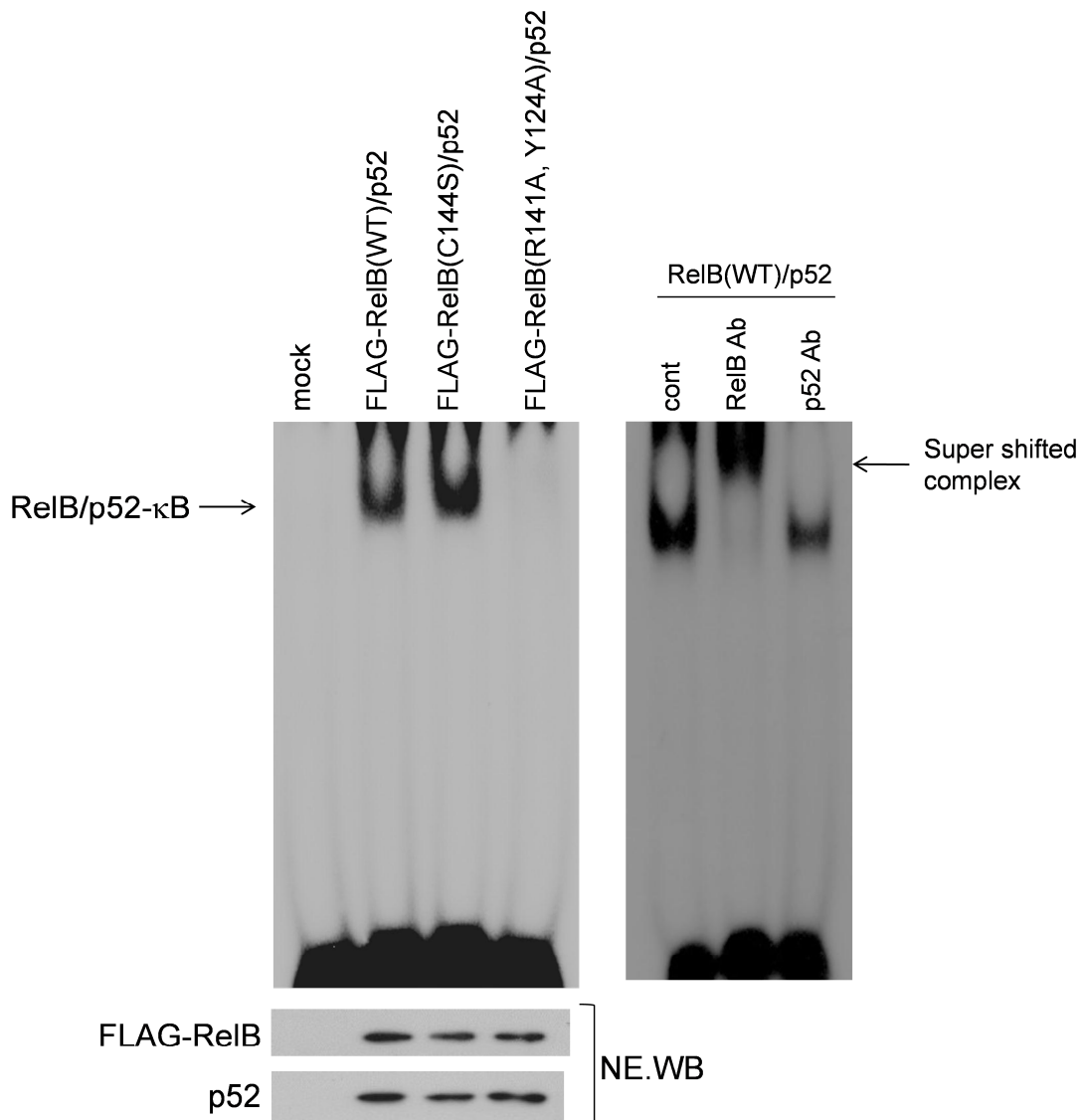
以上の結果から、DNA 結合能を失った RelB と p52 は不安定化されることが明らかとなった。



**Fig. 41 Involvement of 144Cys of RelB in RelB/p52 instability induced by (-)-DHMEQ.** HeLa cells were transiently over-expressed FLAG-tagged versions of RelB (WT) or RelB(C144S) together with wild-type p52. The cells were treated with 30  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for the indicated times, and the total cell extracts were thereafter subjected to Western blotting.

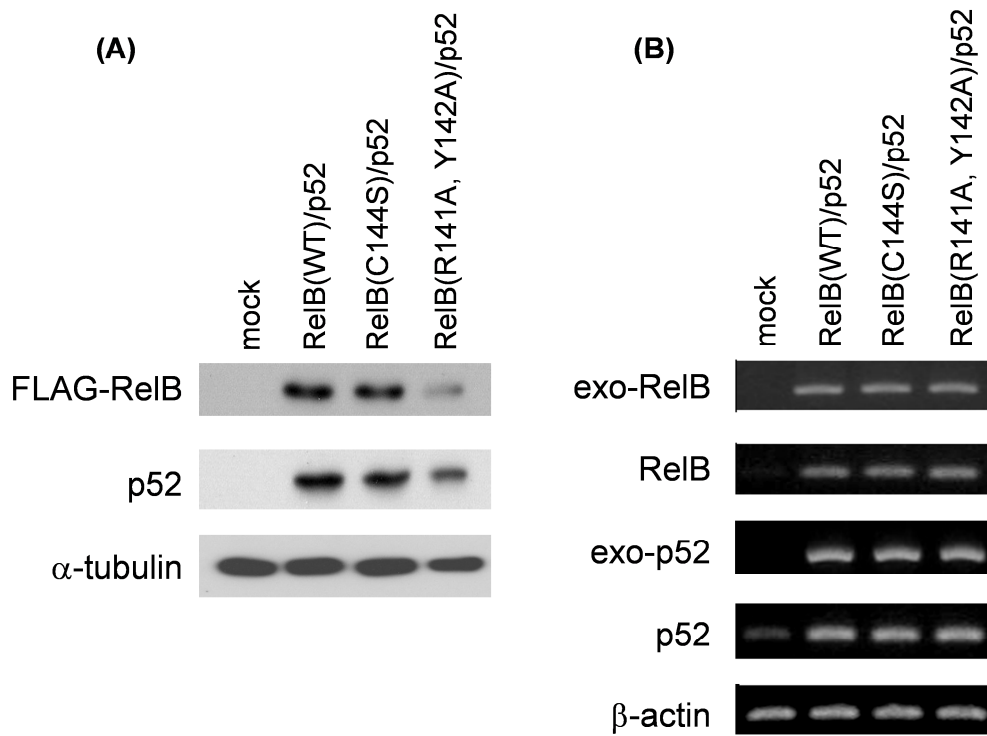


**Fig. 42 Involvement of 141Arg and 142Tyr of RelB for DNA binding.** (A) Sequence alignment of Rel family proteins, RelB(C144S), and RelB(R141A, Y142A). Sequence homology was analyzed by ClustalW. \* means conserving amino-acid sequence completely in all proteins. (B) Three-dimensional structure drawn by MOE of RelB/p52/DNA complex (PDB: 3do7, left) and hydrogen-bond interaction of Arg141 and Tyr142 with DNA (right). Detected hydrogen-bonds were described as dotted-lines.

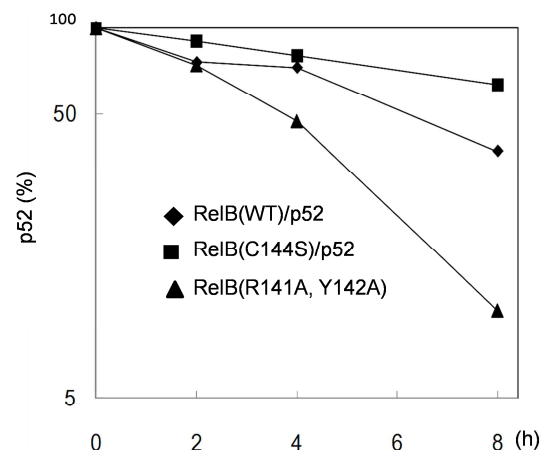
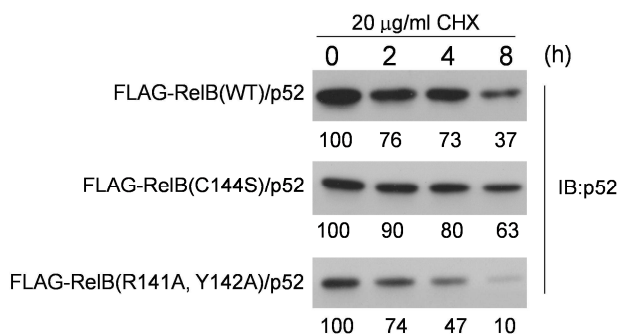
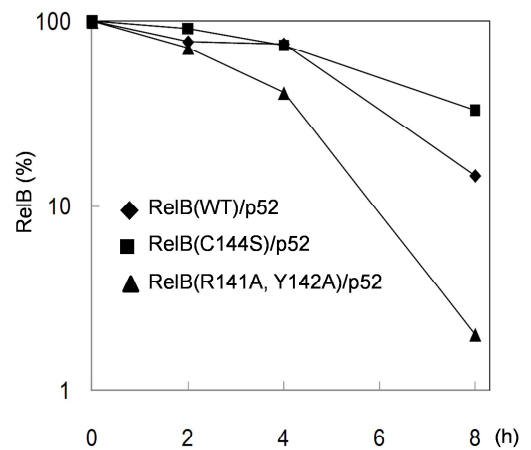
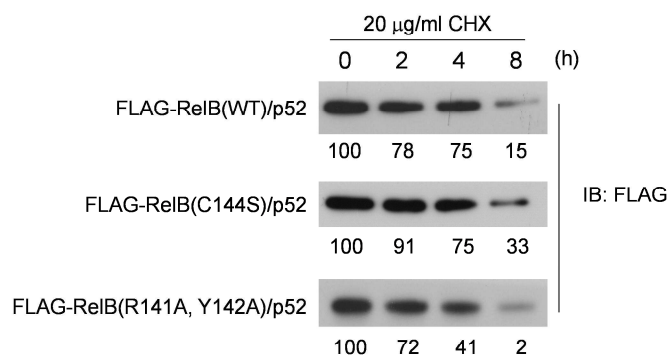


**Fig. 43 141Arg and 142Tyr of RelB are essential for RelB/p52-κB DNA binding.** RelB(R141A, Y142A) does not bind to DNA. HeLa cells transiently over-expressed FLAG-tagged RelB(WT), RelB(C144S) or RelB(R141A, Y142A) together with wild-type p52. Nuclear proteins of the transfected cells were extracted and assessed by EMSA (tops). The expression of each protein was detected by nuclear extracts (NE) Western blotting (bottom left).





**Fig. 44 Involvement of DNA binding activity for RelB/p52 stabilization.** Decreased RelB(R141A, Y142A) stability in cultured cells. HeLa cells were transiently over-expressed FLAG-tagged forms of RelB(WT), RelB(C144S) or RelB(R141A, Y142A) together with wild-type p52. The proteins (A) and mRNA (B) levels were detected by Western blotting and semi-quantitative RT-PCR, respectively. The exo-RelB and exo-p52 mRNA was detected by using specific primer which only recognized exogenous mRNA.



**Fig. 45 Involvement of DNA binding activity in ReIB/p52 stabilization (cycloheximide-chase assay).** HeLa cells were transiently over-expressed FLAG-tagged versions of ReIB (WT, closed diamonds), ReIB(C144S, closed squares) or ReIB(R141A, Y142A, closed triangles) together with wild-type p52. The cells were treated with 20 μg/ml CHX for the indicated times, and the total cell extracts were thereafter subjected to Western blotting. The protein amount of ReIB (top) and p52 (bottom) was determined by ImageJ.

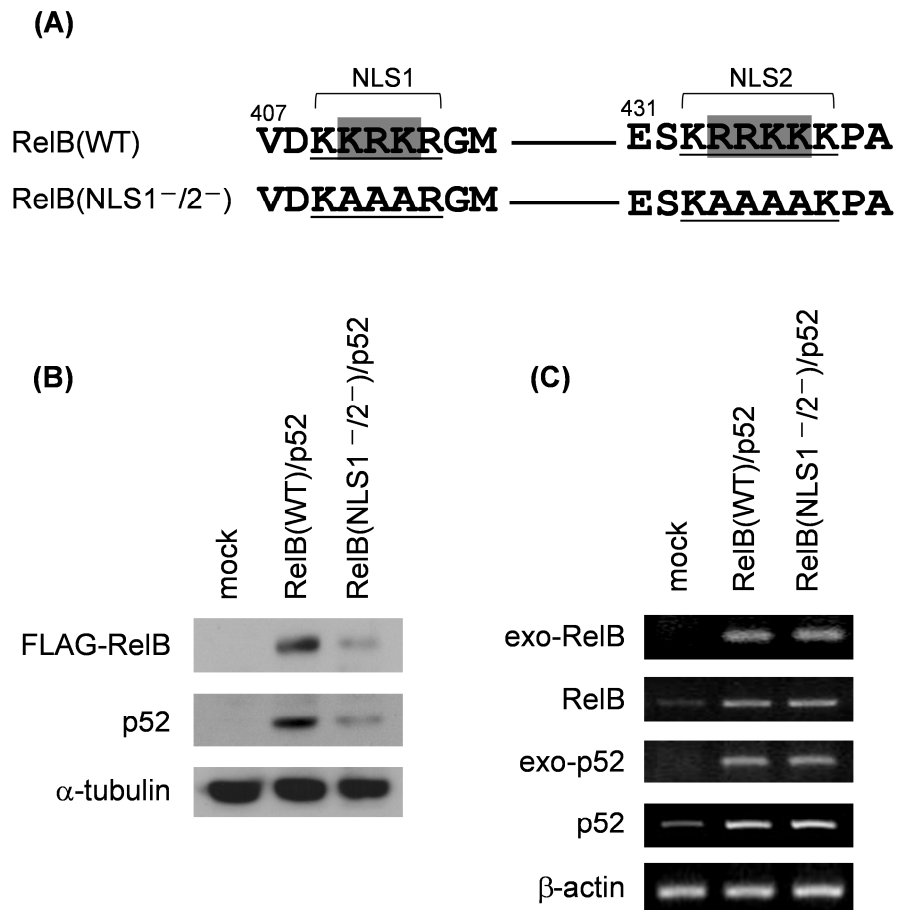
### 3.4 細胞質局在が noncanonical NF- $\kappa$ B の安定性へ与える影響

NF- $\kappa$ B の活性化制御において核への蓄積は非常に重要である。そこで、細胞内での局在が noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化制御に与える効果の検討を行った。

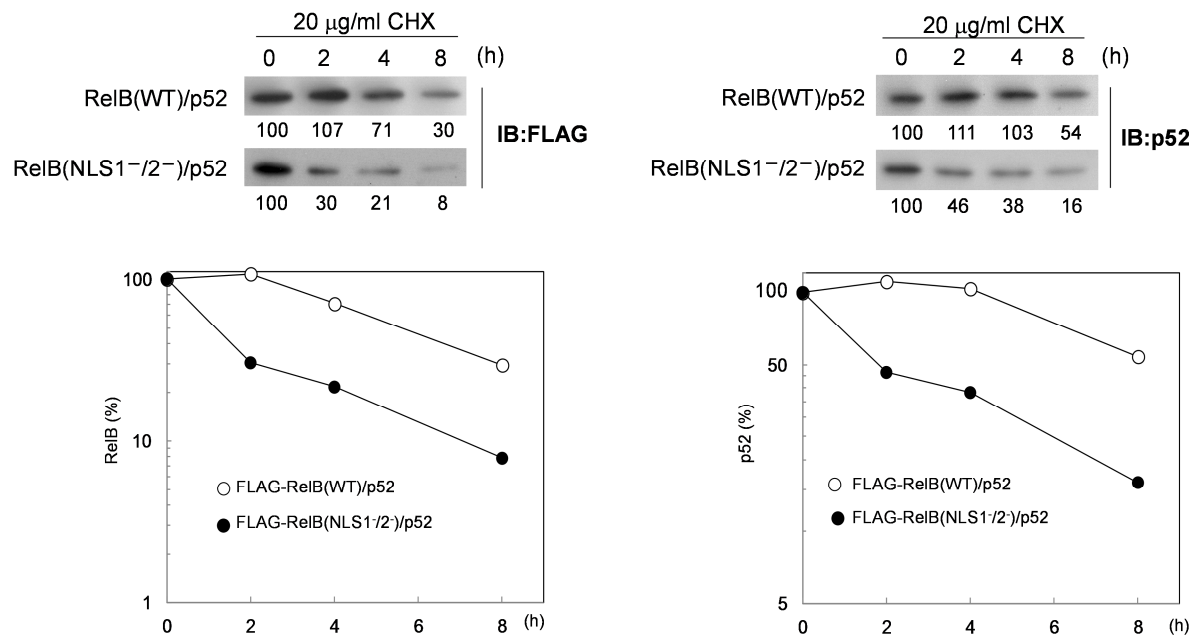
RelB/p52 からなる noncanonical NF- $\kappa$ B の核移行は importin- $\alpha$ 5 が RelB の 2 つの NLS を認識することに依存することが報告されている(109, 110)。また、RelB の 2 つの NLS は Fig. 46A のような変異を導入することで機能させなくすることができることも示されている(109, 110)。そこで、RelB(NLS1<sup>-</sup>/NLS2<sup>-</sup>; K410A, R411A, K412A/ R434A, R435A, K436A, K437A)/p52 を HeLa 細胞に共発現させて解析を行った。その結果、RelB(NLS1<sup>-</sup>/NLS2<sup>-</sup>)/p52 を共発現させると RelB、p52 ともにタンパク質レベルでの発現量の低下した(Fig. 46B)。この時、RelB、p52 ともに mRNA レベルでの発現量に差はなかった(Fig. 46C)。

続いて、RelB と p52 のタンパク質レベルでの発現量の低下がタンパク質の不安定化によるものであるかを CHX-chase assay によって検討した。その結果、RelB(NLS1<sup>-</sup>/NLS2<sup>-</sup>)/p52 を共発現させた際には RelB、p52 ともにタンパク質の半減期が短くなり、不安定化が誘導されていることが分かった(Fig. 47)。

以上の結果から、核へ移行できない RelB/p52 はタンパク質レベルで不安定になることが明らかとなった。



**Fig. 46 Effect of NLS inactivation of RelB on RelB and p52 stabilities.** (A) Sequence alignment of RelB(WT) and RelB(NLS1<sup>-/-2-</sup>). NLSs of RelB are underlined and mutated residues are shaded. (B) Decreased RelB(NLS1<sup>-/-2-</sup>/NLS2<sup>-</sup>) stability in cultured cells. HeLa cells were transiently over-expressed FLAG-tagged forms of RelB(WT), RelB(NLS1<sup>-/-2-</sup>/NLS<sup>-</sup>) together with wild-type p52. The proteins (A) and mRNA (B) levels were detected by Western blotting and semi-quantitative RT-PCR, respectively. The exo-RelB and exo-p52 mRNA were detected by using specific primer which only recognized exogenous mRNA.



**Fig. 47 Inhibition of nuclear accumulation induced RelB/p52 destabilization (cycloheximide-chase assay).** HeLa cells were made to transiently over-express FLAG-tagged versions of RelB(WT) (open circles) or RelB(NLS1<sup>-/-</sup>) (closed circles) together with wild-type p52. The cells were then treated with 20  $\mu$ g/ml CHX for the indicated periods, after which total cell extracts were prepared and then subjected to Western blotting. The protein amount of RelB and p52 were determined by ImageJ.

### 3.5 (-)-DHMEQ による構造変化が細胞内局在に与える効果

ここまでの結果により、タンパク質レベルで

- 1) DNA 結合しない noncanonical NF- $\kappa$ B が不安定になる。
- 2) 核移行しない noncanonical NF- $\kappa$ B が不安定になる。

ことを明らかにしたが、DNA 結合に重要な 144Cys と核移行を制御する NLS は 1 次構造的、3 次構造的ともに離れた位置に存在している(Fig. 48)。そこで、DNA 結合が細胞内局在に与える効果の検討を行った。

まず、HeLa 細胞に RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52、を共発現させ、(-)-DHMEQ を処理したのちに核内 Western blotting により、(-)-DHMEQ 処理による RelB、p52 の核内量の変化を解析した。その結果、(-)-DHMEQ 処理によって RelB(WT)/p52 発現細胞では RelB と p52 の核局在が阻害されたのに対し、(-)-DHMEQ が結合できない RelB(C144S)/p52 発現細胞では(-)-DHMEQ は RelB と p52 の核局在を阻害しなかった (Fig. 49)。RelB(C144S)/p52 発現細胞での p52 の(-)-DHMEQ による弱い核局在阻害は RelB(C144S)以外と dimer を形成している p52 の影響であると考えられる。

RelB/p52 の核移行には importin- $\alpha$ 5 との結合が重要である(Fig. 50A; 109)。そこで、(-)-DHMEQ が RelB/p52 と importin- $\alpha$ 5 との結合に与える効果の検討を行った。HeLa 細胞に RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52、を共発現させ、(-)-DHMEQ を処理したのちに GST-pulldown assay により解析を行った。その結果、(-)-DHMEQ 処理によって RelB、p52 とともに importin- $\alpha$ 5 との結合量が減少した(Fig. 50B)。

NF- $\kappa$ B の細胞質/核内局在には importin による核移行経路に加え CRM1/exportin1 による核外排出経路も報告されている(111)。そこで、(-)-DHMEQ による RelB、p52 の核局在阻害が CRM1 による核外排出経路に影響を与えているか検討を行った。CRM1 阻害剤 leptomycin B (LMB)を前処理し、(-)-DHMEQ 処理した後に核抽出を行い、核内 Western blotting を行った。その結果、CRM1 による核外排出が報告されている I $\kappa$ B $\alpha$ が LMB 処理によって核へ蓄積し、RelB と p52 の核内量も若干増加した(Fig. 51)。しかし、LMB は、(-)-DHMEQ による RelB と p52 の核局在阻害効果には影響を与えなかった(Fig. 51)。したがって、(-)-DHMEQ による RelB と p52 の核局在阻害には CRM1 による核外排出経路の活性化は関与していないことが明らかとなった。

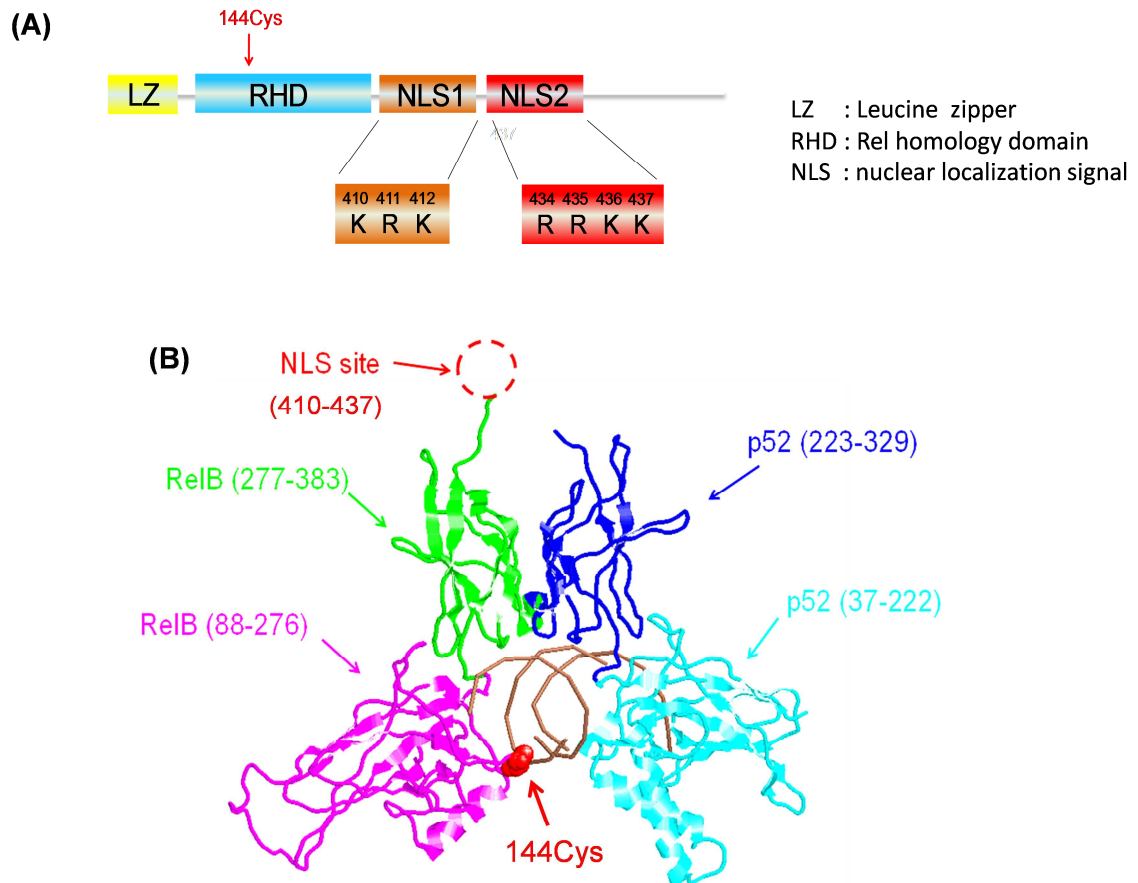
続いて、HeLa 細胞に RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52、RelB(R141A, Y142A)/p52 を共発現させ、細胞質 fraction と核内 fraction に細胞分画を行った後に Western blotting により細胞内局在の解析を行った。その結果、RelB(WT)/p52 に比べて DNA 結合力の強くなる RelB(C144S)/p52 では RelB、p52 とともに核への局在割合が増加していた(Fig. 52)。一方で、DNA 結合力を持たない RelB(R141A,

Y142A)/p52 は RelB、p52 とともに RelB(WT)/p52 に比べて核への局在量が減少していた(Fig. 52)。

次に、RelB(WT)/p52、RelB(R141A, Y142A)/p52 を過剰発現させた HeLa 細胞の lysate を用い、GST-pulldown により RelB(WT)/p52、RelB(C144S)/p52、RelB(R141A, Y142A)/p52 の importin- $\alpha$ 5 との結合量の比較を行った。その結果、RelB(WT)/p52 に比べ、DNA に結合できない RelB(R141A, Y142A)/p52 は importin- $\alpha$ 5 との結合量が低下していることが分かった(Fig. 53)。

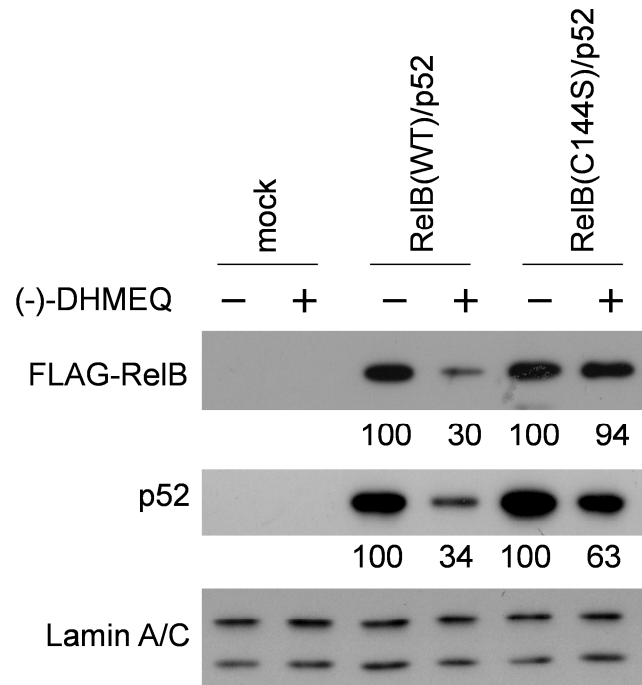
以上の HeLa 細胞を用いた過剰発現の結果から、RelB の DNA 結合能が noncanonical NF- $\kappa$ B の核局在と importin- $\alpha$ 5 との結合を制御していることが明らかになった。最後に、細胞内で恒常的に活性化している noncanonical NF- $\kappa$ B においても、DNA 結合能が noncanonical NF- $\kappa$ B の細胞内局在と importin- $\alpha$ 5 との結合を制御しているかの検討を行った。Fig. 33, 34 ですでに示したように、MT-1 細胞では noncanonical NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化しており、(-)-DHMEQ 処理によって noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合は阻害される。そこで、MT-1 細胞に (-)-DHMEQ を処理し、分画 Western blotting および GST-pulldown assay を行った。その結果、(-)-DHMEQ を 1 時間処理することで、RelB、p52 とともに処理濃度依存的に核局在が阻害され、細胞質局在が促進された(Fig. 54A)。また、GST-pulldown assay の結果、(-)-DHMEQ は importin- $\alpha$ 5 への RelB、p52 の結合量を減少させた(Fig. 54B、C)。したがって、DNA 結合能による noncanonical NF- $\kappa$ B の細胞内局在制御と importin- $\alpha$ 5 との結合制御機構は 細胞内で恒常的に活性化している noncanonical NF- $\kappa$ B でも成立することが示された。

以上、3.1-3.5 に示した結果により、RelB の DNA binding domain が noncanonical NF- $\kappa$ B の細胞質/核内の存在の平衡および importin- $\alpha$ 5 との affinity を制御することで、noncanonical NF- $\kappa$ B の安定性を制御するという新たな noncanonical NF- $\kappa$ B の制御機構が明らかとなった(Fig. 55)。さらに、RelB の Arg141Ala, Tyr142Ala 変異によって noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合が完全に失われたことから、noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化制御には 144Cys および、141Arg、142Tyr が特に重要であることが明らかになった。

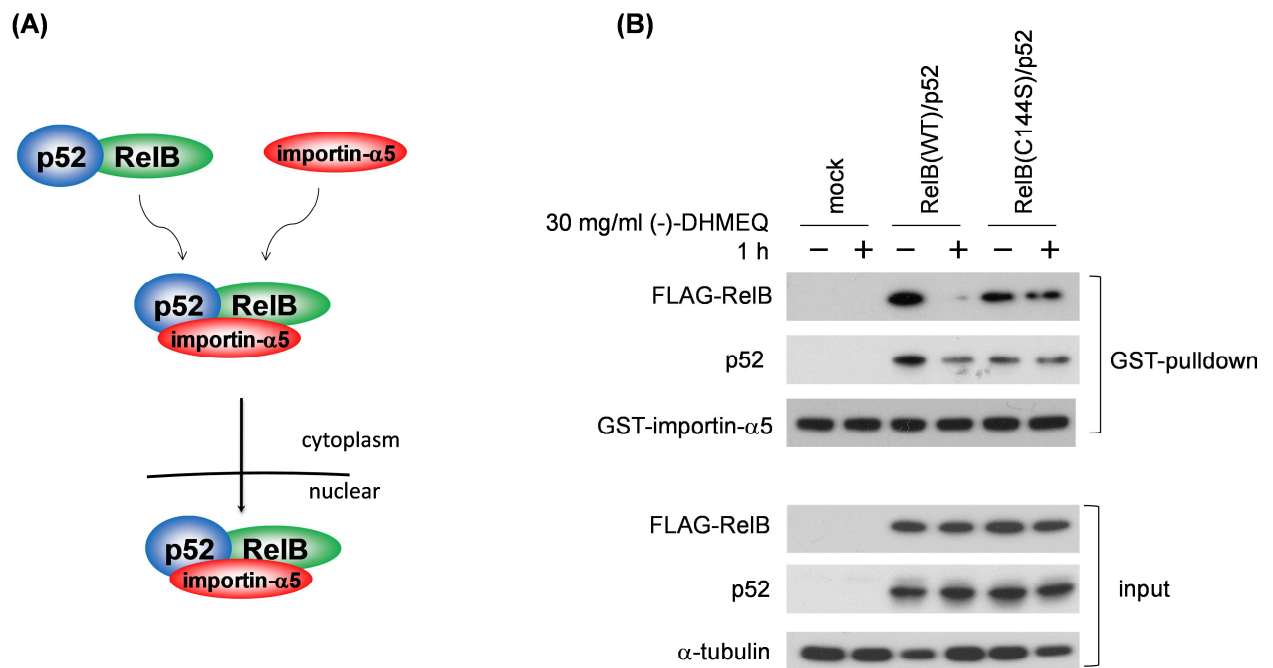


**Fig. 48 144Cys and NLS of RelB does not exist near.** (A) Primary structure of RelB. (B) Three-dimensional structure of RelB/p52/DNA (PDB: 3do7). NLS site (red) may locate RelB (277-383; green) neighboring domain.

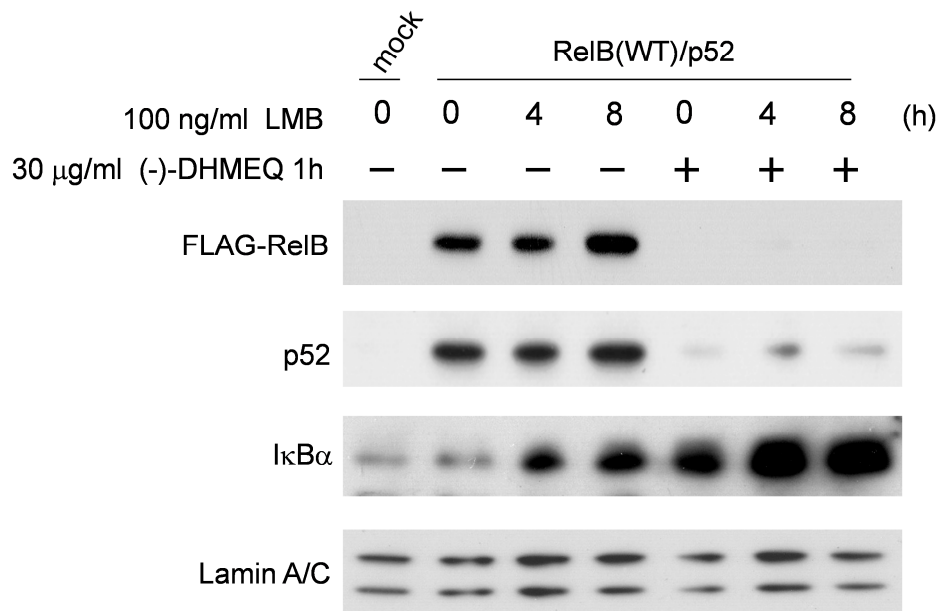




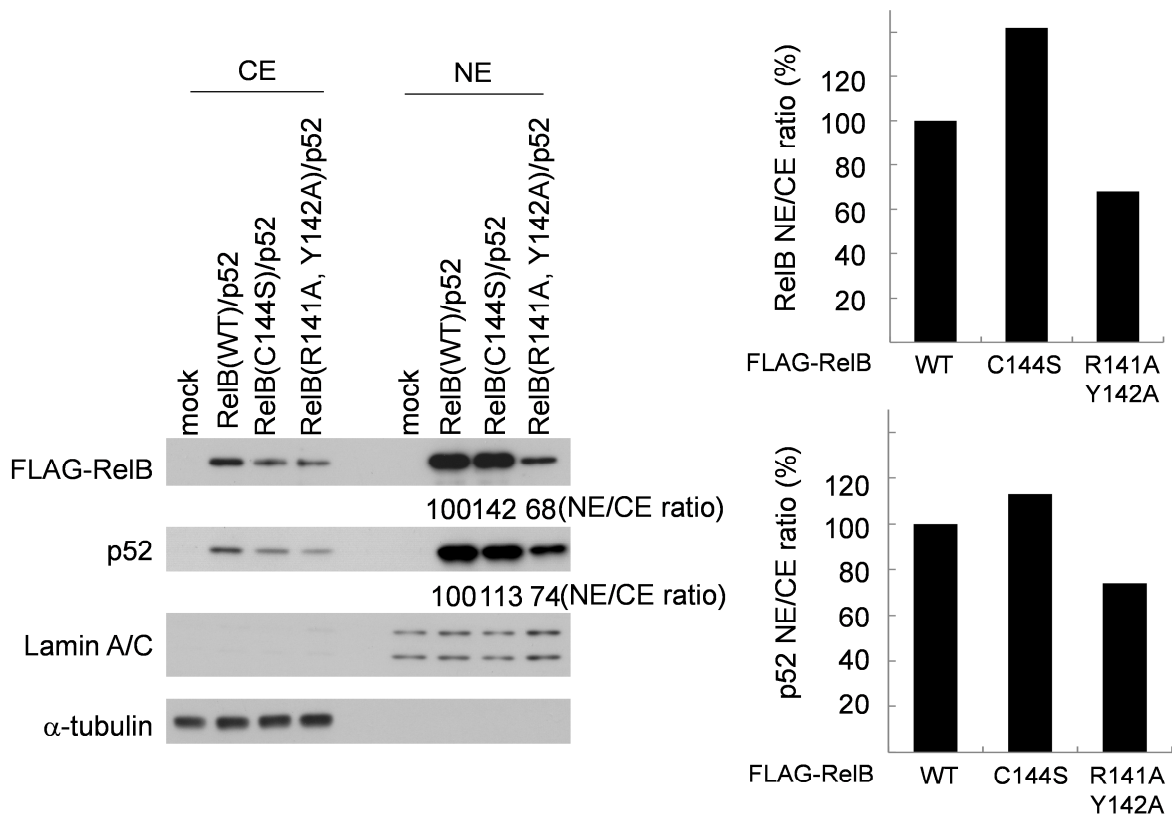
**Fig. 49 Inhibition of RelB/p52- $\kappa$ B nuclear accumulation by (-)-DHMEQ.** HeLa cells were made to transiently over-express with FLAG-tagged forms of RelB(WT), RelB(C144S) or RelB(R141A, Y142A) together with wild-type p52. The transfected cells were incubated with or without 30  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for 1 h, and the nuclear proteins were then extracted and used for Western blotting.



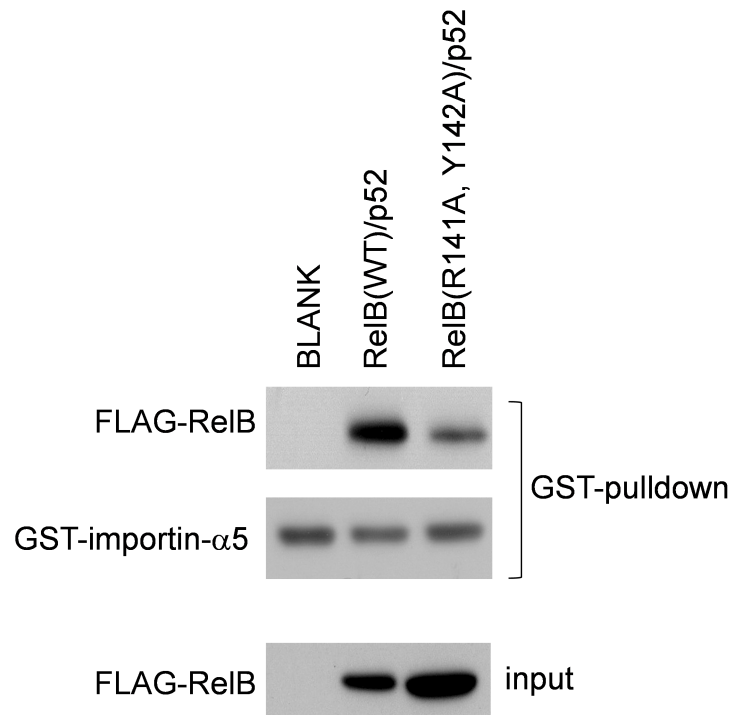
**Fig. 50 (-)-DHMEQ decreases the affinity of RelB/p52-κB to importin-α5.** HeLa cells were made to transiently over-express with FLAG-tagged forms of RelB(WT) or RelB(C144S) together with wild-type p52. The transfected cells were incubated with or without 30 μg/ml (-)-DHMEQ for 1 h, and total proteins were extracted. The extracts were incubated with glutathione sepharose-bound GST-importin-α5 for 2 h at 4°C. Glutathione sepharose-bound proteins were dissolved into 2x sample buffer and analyzed by Western blotting.



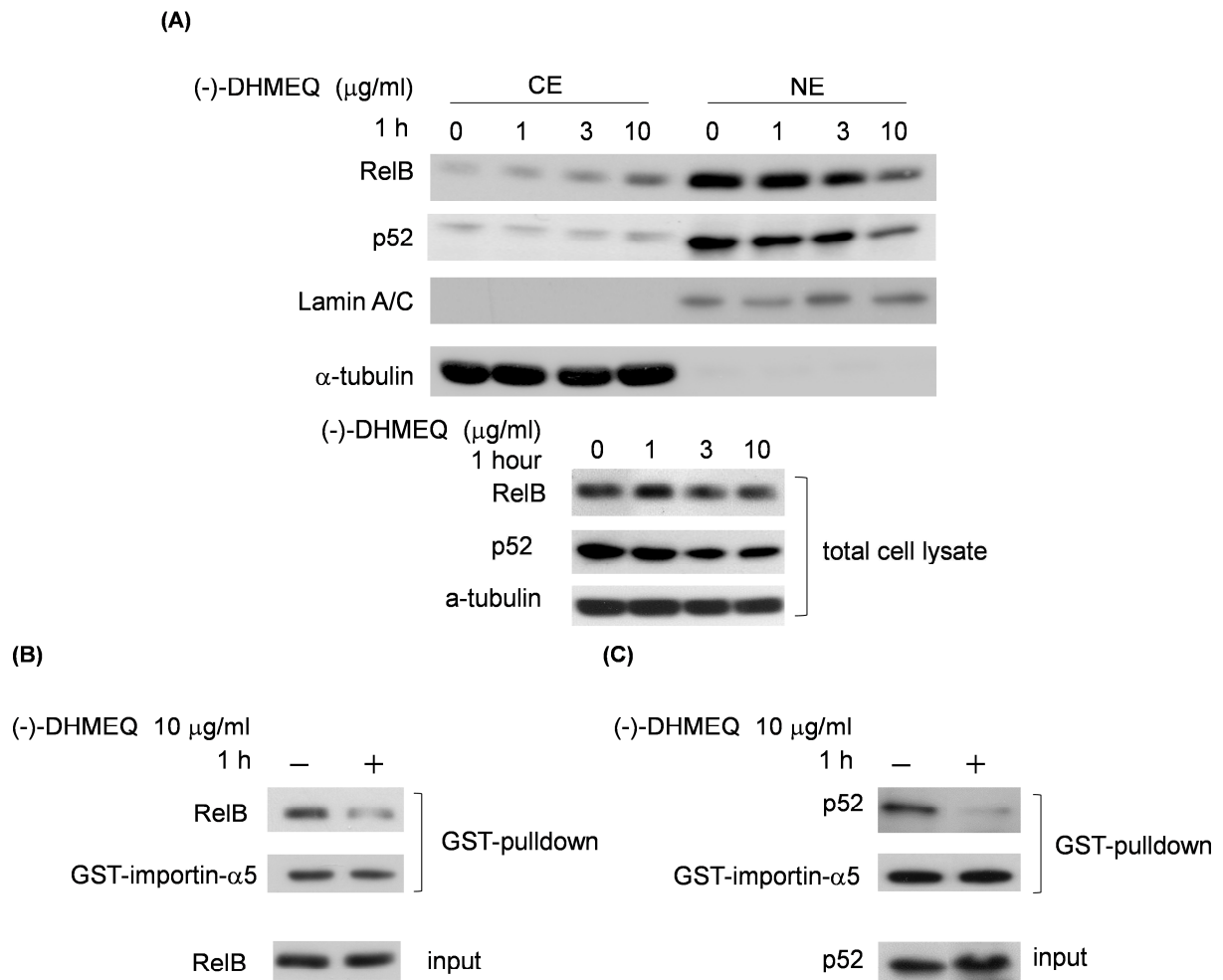
**Fig. 51 Inhibition of ReIB/p52 nuclear accumulation by (-)-DHMEQ does not depend on CRM1/exportin nuclear export system.** HeLa cells were transiently over-expressed FLAG-tagged ReIB(WT) together with wild-type p52, pretreated with or without 100 ng/ml LMB for the indicated times and then incubated with 30  $\mu$ g/ml (-)-DHMEQ for 1 h. Nuclear proteins were used for Western blotting.



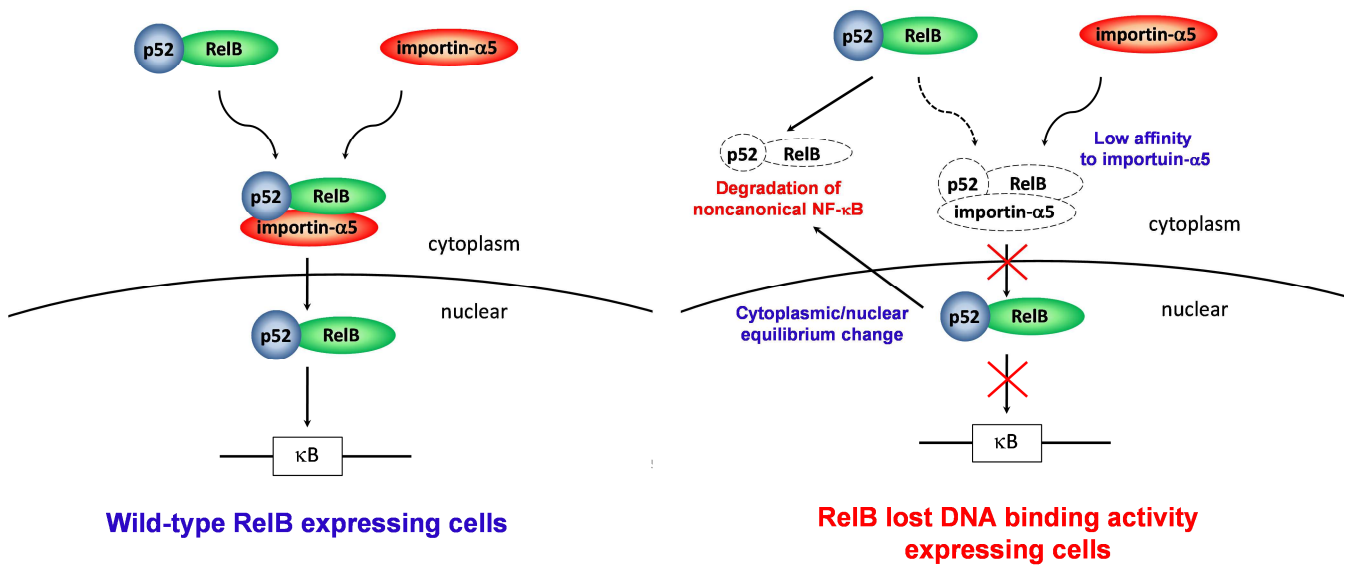
**Fig. 52 R141A, Y142A mutation of RelB decreases nuclear localization of RelB/p52.** HeLa cells were made to transiently over-express with FLAG-tagged forms of RelB(WT), RelB(C144S) or RelB(R141A, Y142A) together with wild-type p52, and thereafter fractionated into cytoplasmic and nuclear fractions. The nuclear/cytoplasmic ratio was determined by ImageJ and show as bar graphs.



**Fig. 53 R141A/Y142A mutation of RelB decreases the affinity to importin- $\alpha$ 5.** HeLa cells were made to transiently over-express with FLAG-tagged forms of RelB(WT) or RelB(R141A, Y142A) together with wild-type p52, and thereafter extracted total cell lysate. The total cell extracts were incubated with glutathione sepharose-bound GST-importin- $\alpha$ 5 for 2 h at 4°C . Glutathione sepharose-bound proteins were dissolved into 2x sample buffer and analyzed by Western blotting.



**Fig. 54 Inhibition of RelB/p52 nuclear translocation and induction of low affinity to importin- $\alpha$ 5 by (-)-DHMEQ in MT-1 cells.** (A) Inhibition of noncanonical NF- $\kappa$ B nuclear accumulation by (-)-DHMEQ. MT-1 cells were incubated with (-)-DHMEQ for 1 h, and thereafter separated into cytoplasmic extract (CE) and nuclear extract (NE) fractions. Each fraction was used for Western blotting. Expression of each protein in total cell lysates was also detected. (B) (-)-DHMEQ reduced the amount of RelB binding to importin- $\alpha$ 5. MT-1 cells were treated with or without 10  $\mu\text{g/ml}$  (-)-DHMEQ for 1 h and then the total cell extracts were incubated with glutathione sepharose-bound GST-importin- $\alpha$ 5 for 2 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ . Glutathione sepharose-bound proteins were dissolved into 2x sample buffer and analyzed by Western blotting. (C) (-)-DHMEQ also reduced the amount of p52 binding to importin- $\alpha$ 5. MT-1 cells were incubated with (-)-DHMEQ and analyzed, as described in “B”.

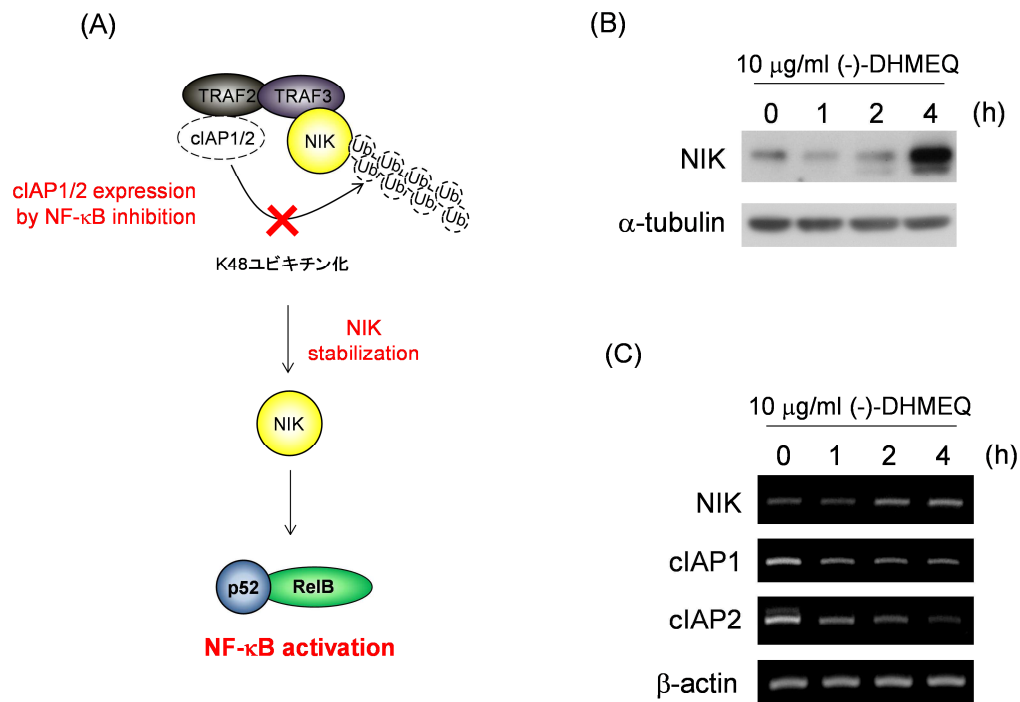


**Fig. 55 A novel regulatory system of noncanonical NF-κB activation.** Conformation change of RelB decreasing DNA binding activity results in degradation of noncanonical NF-κB by specific protease via the cytoplasmic translocation by the cytoplasmic/nuclear equilibrium change and low affinity to importin-α5.

### 3.6 (-)-DHMEQ による NIK の制御機構

noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化には NIK が重要であるが、NIK は Fig. 11 のように cIAP1/2 による分解を受けるといった特徴がある。しかし、cIAP1、cIAP2 は共に NF- $\kappa$ B の target gene であるため、NF- $\kappa$ B を抑制することは cIAP1、cIAP2 の発現を低下させ、結果として NIK を安定化可能性があり、Fig. 56A のような positive feedback の存在が示唆される。そこで、MT-1 細胞において NF- $\kappa$ B 阻害による cIAP1、cIAP2 の発現低下とそれに付随した NIK の安定化という positive feedback があるか検証を行った。その結果、Fig. 56B に示したように、(-)-DHMEQ 処理によって cIAP1、cIAP2 とともに mRNA レベルで発現が抑制された。また、興味深いことに、NIK の mRNA レベルでの発現も増強した。NIK の蓄積に伴って、NIK の mRNA 発現が誘導されることは NIK 自体が NIK の発現を誘導する、positive feedback 機構を有している可能性を示唆するものである。さらに、Fig. 56C のように、(-)-DHMEQ 処理によって NIK の蓄積が確認された。したがって、Fig. 56A の positive feedback の存在が示唆された。

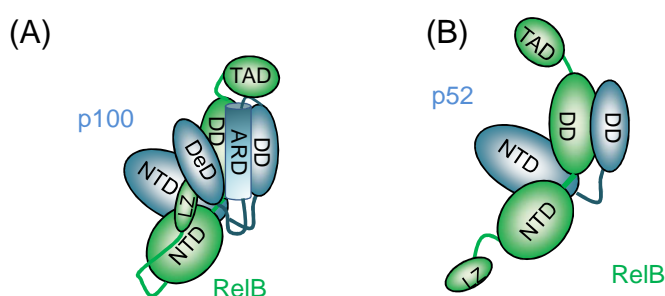




**Fig. 56 Possible positive feedback mechanism of noncanonical NF-κB via NIK stabilization.** (A) Possible positive feedback loop of noncanonical NF-κB. (B) (-)-DHMEQ induced NIK stabilization. MT-1 cells were incubated with (-)-DHMEQ, as described in “B”, and the total cell extracts were then subjected to Western blotting. (C) (-)-DHMEQ inhibited cIAP1 and cIAP2 mRNA expression. MT-1 cells were treated 10 μg/ml (-)-DHMEQ for indicated times and the corresponding mRNA expression of each protein was measured by RT-PCR.

## 第4節 考察

本研究によって、(-)-DHMEQは noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害するだけでなく、noncanonical NF- $\kappa$ B の不安定化を誘導することが明らかになった。さらに、Fig. 39 に示したように(-)-DHMEQ による noncanonical NF- $\kappa$ B の分解はプロテアソーム、リソソーム非依存的に起こっていることを示した。また、Fig. 47 に示したように、核へ移行できない noncanonical NF- $\kappa$ B が分解されることから、noncanonical NF- $\kappa$ B の分解は細胞質で主に起こっていると考えられる。Fig. 57A に示したように、RelB は細胞質で p100 と様々な domain で interaction することによって dimer を形成している。RelB の N 末端側のアミノ酸は p100 の C 末や RelB の leucine zipper によって閉じられた構造をとることで安定化しているが、p100 が p52 へプロテアソームによる限定分解を受けるとその構造は Fig. 57B のような開かれたものになる。通常、Fig. 57B のような RelB/p52 からなる dimer は速やかに核に移行して DNA に結合することで安定化すると考えられるが、細胞質では DNA のような安定化因子がないため不安定化し、分解されると考えられる。さらに、MT-1 細胞では p100 はほとんど検出されず、p52 の形で存在しており、(-)-DHMEQ が MT-1 細胞において優位に RelB の不安定化を誘導していることから、(-)-DHMEQ による RelB と p52 の不安定化は RelB/p52 の形になった noncanonical NF- $\kappa$ B の heterodimer 選択的に結合することで起こっていると考えられる。これまでに、NF- $\kappa$ B の阻害に伴う RelB のタンパク質レベルでの低下や RelB の分解酵素として最近 MALT1 の関与が報告された(179)が、どのような状態の RelB を分解しているかなどの詳細な機構は解明されていない。本研究により、(-)-DHMEQ 処理、または mutation によって DNA 結合阻害や核局在の阻害を誘導させると RelB の分解が誘導されるという知見は、未だ未解明な点が多い RelB の分解機構の解析に大きく貢献できるものであると考えられる。



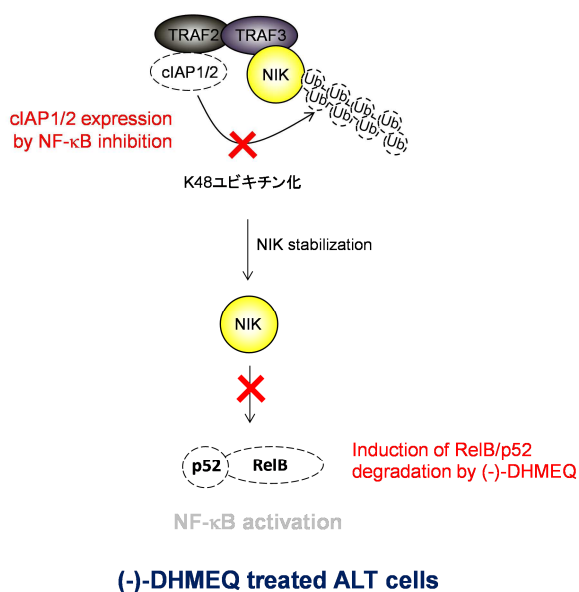
**Fig. 57 Multiple domain interaction of RelB with p100 or p52.** (A) Multiple domain interaction of RelB and p100. LZ; leucine zipper, DD; dimerization domain, NTD; N-terminal domain, ARD; Ankyrin repeat domain, DeD; Death domain. (C) Structure of RelB/p52 heterodimer.

Noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化には NIK の蓄積が重要であるが、Fig. 56 に示したように、MT-1 細胞において(-)-DHMEQ 処理による NIK の蓄積が見られ、Fig. 56A のような noncanonical NF- $\kappa$ B の positive feedback 機構の存在が示唆された。Introduction の項でも述べたように、既存の NF- $\kappa$ B 阻害薬は IKK $\beta$ の阻害や TAK の阻害などによるものが多い。このような薬剤は、Fig. 56A のような positive feedback が働く環境下では、再活性化する NF- $\kappa$ B によって、次第に阻害効果を失い、NF- $\kappa$ B に対する完全な抑制効果は示せないと考えられる。これが、ATL が予後不良の疾患になっている原因と考えられる。一方、(-)-DHMEQ は ATL 細胞において noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害するだけでなく、核局在の阻害、さらに noncanonical NF- $\kappa$ B のタンパク質レベルで不安定化する。(-)-DHMEQ は noncanonical NF- $\kappa$ B の不安定化誘導効果によって、Fig. 56A のような positive feedback の存在下で、NIK の蓄積が起こり、IKK $\alpha$ の活性化が起こったとしても、IKK $\alpha$ によって活性化される noncanonical NF- $\kappa$ B 分子自体を分解へ誘導するため、NF- $\kappa$ B 経路の再活性化を阻害できると考えられる(Fig. 58)。

以上のような観点から、(-)-DHMEQ が noncanonical NF- $\kappa$ B の不安定化を誘導することは、(-)-DHMEQ が ATL や自己免疫疾患などの noncanonical NF- $\kappa$ B が強く関与する疾患に対して、即時的に NF- $\kappa$ B を阻害するだけでなく、再活性化する NF- $\kappa$ B 阻害を含め、長期的に見ても効果的に NF- $\kappa$ B を阻害することを可能にすると考えられる。(-)-DHMEQ のこのような効果は、ATL や自己免疫疾患に対して(-)-DHMEQ が効果的な治療薬になりうることを強く示唆するものである。

また、NIK の制御機構はまだ未解明な点が多く、Fig. 56A に示した positive feedback の機構の解明も含め、NIK の制御機構解析にも(-)-DHMEQ は大きく貢献できる化合物であると考えられる。

本研究によって明らかになった、RelB の DNA 結合 domain が noncanonical NF- $\kappa$ B の細胞内局在と安定性を制御するという noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化の新規制御機構は、ATL や自己免疫疾患などの難治性疾患の悪性化機構解析に対し、大きく貢献出来るものであると考えられる。



**Fig. 58 Possible inhibitory mechanism of noncanonical NF- $\kappa$ B positive feedback loop by (-)-DHMEQ.**



## 第 3 章

NF- $\kappa$ B 阻害剤 9-methylstreptimidone 類似体の  
構造活性相関および NF- $\kappa$ B 活性化に与える効果



## 第1節 序論

微生物 2 次代謝産物から単離精製された NF- $\kappa$ B 阻害剤 9-methylstreptimidone は、当研究室において、LPS によって誘導される NO 産生を抑制することで、マクロファージの活性化を阻害すること、また、ATL 細胞に選択的にアポトーシスを誘導することが報告されている(165)。9-methylstreptimidone のこのような活性は、9-methylstreptimidone がすぐれた抗炎症剤、抗癌剤になりうることを示唆している。しかし、9-methylstreptimidone は天然からの収量が非常に少なく、合成も困難であったため、NO 産生を指標としたスクリーニングの結果、新規ペリジン化合物 DTCM-glutarimide が得られた。

DTCM-glutarimide はマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞において LPS に誘導される NO 産生を優位に抑制し、LPS 短時間処理では、c-Jun のリン酸化を抑制することで転写因子 AP-1 の核蓄積を抑制する。

また、DTCM-glutarimide は NO 産生抑制のほか、T 細胞増殖を阻害することや混合リンパ球反応、動物実験においてマウス心移植モデルにおける免疫拒絶反応を阻害し、graft 生存を向上させることを報告した。以上のように、DTCM-glutarimide は優れた抗炎症活性を持っているが、その阻害機構および標的分子は明らかにされていない。また、DTCM-glutarimide は疎水性が強く、水溶性に問題点がある。

本研究では、9-methylstreptimidone 類似体の NO 産生阻害を指標に構造活性相関および NF- $\kappa$ B 活性化に与える効果の検討を行うと共に、抗炎症物質 DTCM-glutarimide の新規作用機構の解析を行った。

## 第2節 実験方法

### 2.1 Materials

#### (1) 薬剤

Dehydroxymethlepoxyquinomycin; (-)-DHMEQ	当研究室にて合成
DTCM-glutarimide	慶應義塾大学化学科西山研究室にて合成
9-methylstreptimidone (epimeric mixture)	慶應義塾大学化学科西山研究室にて合成
EO-347, 348, 349, 350	慶應義塾大学化学科西山研究室にて合成
(±)-streptovitamin A	東北大学大学院農学研究科清田洋正准教授らにより合成
(±)-4,α-diepi-streptovitamin A	東北大学大学院農学研究科清田洋正准教授らにより合成
AP-01, 02, 03	東北大学大学院農学研究科清田洋正准教授らにより合成
AK-01, 02	東北大学大学院農学研究科清田洋正准教授らにより合成

#### (4) 抗体

Mouse 由来抗 Tubulin(B5-1-2)抗体 T9026	Sigma より購入
Mouse 由来抗 p65(F-6)抗体 sc-8008	Santa Cruz より購入
Mouse 由来抗 RelB X(D-4)抗体 sc-48366X	Santa Cruz より購入
Rabbit 由来抗 RelB(C1E4)抗体 #4922	CST より購入
Rabbit 由来抗 p52(C-5)抗体 sc-7386	Santa Cruz より購入
HRP 標識 mouse IgG 抗体	GE Healthcare より購入
HRP 標識 rabbit IgG 抗体	GE Healthcare より購入

#### (5) 細胞株

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞	Riken Cell Bank より購入
ヒト T 細胞白血病細胞株 Jurkat 細胞	Riken Cell Bank より購入
成人 T 細胞白血病 MT-1 細胞	東京大学医科学研究所より供与



## **2.2 Cell culture**

### **[buffer 組成]**

- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含リン酸緩衝液 (PBS<sup>-</sup>)

8.0 g/l	NaCl
0.2 g/l	KCl
0.916 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
0.2 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

- Trypsin-EDTA 溶液

8.0 g/l	NaCl
0.4 g/l	KCl
0.0475 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
1.0 g/l	glucose
0.002% (v/v)	phenol red
0.035% (v/v)	$\text{NaHCO}_3$
0.002% (v/v)	EDTA

上記の試薬を distilled water に溶かし、pH を 8.0 に合わせた後に trypsin を 0.075% になるように加えた。

### **RAW 細胞の培養**

培養培地としては、10% の fetal bovine serum (FBS, JRH Biosciences, Inc. Lenexa, Kansas)、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin, 100 units/ml penicillin G, 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-glutamine, and 2.25 g/l  $\text{NaHCO}_3$  を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Nissui, Tokyo, Japan)を用いた。細胞は 37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下のインキュベーター内で培養し、2~3 日以内に一回、培地交換をすることによって継代した。その際の培地の交換は、まず、培地を除去し、細胞面に培地をかけて細胞をはがし、新しい培地を入れたフラスコに細胞懸濁液の 10~20% を移すことによって行った。

### **MT-1 細胞、Jurkat 細胞の培養**

培養培地としては、10% 非働化 fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences, Lenexa, KS)、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin, 100 units/ml penicillin G, 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-glutamine, and 2.25 g/l  $\text{NaHCO}_3$  を含む Rosewell Park Memorial Institute 1640 培地(RPMI, Nissui)を用いた。細胞は 37°C の 5%  $\text{CO}_2$  条件下のインキュベーター内で培養し、2~3 日以内に一回、培地の交換をすることによって継代した。

### 2.3 NO assay (Grease 法)、MTT assay

#### [buffer 組成]

- Griess 試薬

10 g/l	sulfanilamide
1 g/l	N-1-naphthylethylene-diamine-2HCl
2.5% (v/v)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

- MTT 溶液

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)  
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

96 well プレート(Corning)に細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ml の濃度で 200  $\mu$ l ずつまき、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で培養した。翌日、薬剤を添加し、2 時間後に LPS 3  $\mu$ g/ml を処理して、同条件下のインキュベーター内で 20 時間培養した。その後、細胞の上清 100  $\mu$ l を別の 96 well プレートにとり、Griess 試薬を 100  $\mu$ l 添加して約 10 分間反応させ、マイクロプレートリーダーにより、波長 570 nm における吸光度を測定した(180)。NO assay のために上清 100  $\mu$ l を取り分けた残りの各 well に 5 mg/ml MTT 水溶液を 10  $\mu$ l を加え、37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 4 時間静置した。上清を sucker で除去してから DMSO 200  $\mu$ l を加えてホルマザン沈殿を溶解させ、マイクロプレートリーダーにより、570 nm における吸光度を測定した(181)。

### 2.4 Trypan blue dye exclusion assay

#### [buffer 組成]

- trypan blue 溶液 (5 $\times$ )

4 mg/ml	trypan blue
9 mg/ml	NaCl

48 well プレート(Corning)に Jurkat 細胞または MT-1 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/ml の濃度で 500  $\mu$ l ずつまき、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で培養した。翌日、薬剤を添加した時間を 0 時間とし、48 時間後に細胞懸濁液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、3,500 rpm で 5 分間遠心沈降させ、上清を sucker で除去し、細胞の量に合わせて PBS を添加した。PBS 量の 1/4 量の trypan blue 溶液 (5 $\times$ ) を加えてよくピペッティングし、そこから 10  $\mu$ l を血球計算板 (エルマ, Tokyo, Japan)に乗せ、全細胞数および青く染色された死細胞数を測定した。細胞

生存率(%)は、 $100 \times \frac{\{(\text{全細胞数}) - (\text{死細胞数})\}}{(\text{全細胞数})}$ により算出した。

## **2.5 Hoechst 33258 染色によるアポトーシス細胞の検出**

48 well プレート(Corning)に Jurkat 細胞または MT-1 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/ml の濃度で 500  $\mu$ l ずつまき、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で培養した。翌日、薬剤を添加した時間を 0 時間とし、24 時間後に細胞懸濁液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、1,000 $\times$ g で 5 分間遠心沈降させ細胞をカバーガラスに接着させた。4% para-formaldehyde (PFA)に 30 分間浸漬し、細胞の固定化を行った。PBS で 3 回 wash した後、10  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 溶液に 10 分間浸漬して核染色を行った。その後、PBS で 3 回 wash し、蛍光顕微鏡(ECLIPSE E600; NIKON, Tokyo, Japan)によってアポトーシス細胞の検出を行った。

## **2.6 In vitro kinase assay**

### **[buffer 組成]**

#### ● Kinase assay buffer

20 mM	HEPES-KOH (pH 7.5)
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT
1% (v/v)	phosphatase inhibitor cocktail2 (Sigma)

Recombinant human JNK1 (Millipore, Billerica, MA, USA) 20 ng、10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3,000 Ci/mmol; GE Healthcare)、2  $\mu$ g recombinant human c-Jun (Sigma) を 30  $\mu$ l の kinase buffer にとかし、30°C、1 時間インキュベートすることで酵素反応を行った。1 時間経過後に 6 $\times$ sample buffer を 6  $\mu$ l 入れ、98°C のヒートブロックで 5 分間煮沸することで変性処理を行い、泳動用の sample とした。10% の 10% polyacrylamide gel で泳動した後、ゲルをゲルドライヤーで 1 時間乾燥させ、BAS2000 (Fuji film)によりバンドの検出を行った。

## **2.7 EMSA**

第 1 章、第 2 節 2.5、2.7 の項参照

## **2.8 Western blotting**

第 1 章、第 2 節 2.4、2.5、2.6 の項参照。抗体抗原反応は Table 10 の条件に従って行った。

**Table 10 Conditions for antibody-antigen reaction**

	species	型番		1st antibody	条件	2nd antibody	条件
iNOS	mouse-monoclonal	Sigma	F3165	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
RelB	rabbit-polyclonal	CST	#4922	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
p52	rabbit-polyclonal	Santa Cruz	sc-7386	1:1000 in 5% milk	4°C overnight	1:5000 in 3% milk	室温 1 h
$\alpha$ -tubulin	mouse-monoclonal	Sigma	T9026	1:10000 in 5% milk	室温 1 h	1:5000 in 3% milk	室温 1 h

## 2.9 RT-PCR

第 2 章、第 2 節 2.2 の項参照。Primer は Table 11 のものを用いた。

**Table 11 Primer sequence used for PCR**

cDNA			cycle
mouse iNOS	forward	5'-TTTGACCAGAGGACCCAGAG	25
	reverse	5'-ATGGCCGACCTGATGTTGCC	
mouse p52	forward	5'-GAAGGGCCGGAAGACCTATC	25
	reverse	5'-GCTGGGAGATCACAGGCTTC	
mouse TNF- $\alpha$	forward	5'-CTCATTCCTGCTTGTGGCAG	20
	reverse	5'-ACGGCAGAGAGGAGGTTGAC	
mouse IFN- $\beta$	forward	5'-CCTACAGGGCGGACTTCAAG	25
	reverse	5'-TCCTGAAGATCTCTGCTCGG	
mouse RelB	forward	5'-CATCACAGAGCAGCCAAAGC	25
	reverse	5'-CGACATTCATGTCGACCTCC	
$\beta$ -actin	forward	5'-CTTCGAGCAAGAGATGGCCA	20
	reverse	5'-CCAGACAGCACTGTGTTGGC	

## 2.10 Recombinant JNK の精製

Table 12 に示した primer を用いて第一章 2.7 の項の方法に準じて pGEX-JNK1 発現 vector を作製し、recombinant JNK1 の大量精製を行った。

**Table 12 Primer sequence used for PCR**

cDNA			restriction enzyme
JNK1	forward	5'-TTTT <b>GGA TCC</b> <u>ATG</u> ACT GCA AAG ATG GAA ACG ACC T	Bam HI
	reverse	5'-TTTT <b>CTC GAG</b> <u>TCA</u> CTG CTG CAC CTG TGC TAA AGG A	Xho I
restriction enzyme site in bold face and initiation/stop codon underlined			

## 2.11 MALDI-TOF/MS

第 1 章、第 2 節 2.11 の項参照。

### 第3節 実験結果

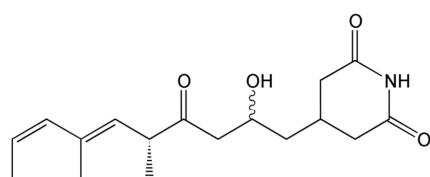
#### 3.1 9-methylstreptimidone 類似体の構造活性相関

9-methylstreptimidone 類似物質の構造活性相関を行うに当たり、Fig. 59 に示した 14 種の化合物を用いた。

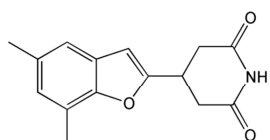
まず、本構造活性相関を行うに当たり、9-methylstreptimidone (epimeric mixture) が positive control として用いることが出来るか検討を行った。LPS 刺激によって誘導される NO 産生の抑制効果の検討を行った結果、9-methylstreptimidone (epimeric mixture) は処理濃度依存的に有意に NO 産生を抑制した (Fig. 60A)。さらに、9-methylstreptimidone (epimeric mixture) は LPS に誘導される iNOS の発現を抑制した (Fig. 60B)。以上の結果より、9-methylstreptimidone (epimeric mixture) を positive control として用い、Fig. 59 に示した化合物の NO 産生阻害能の比較を行った。その結果、Table 13 に示した結果が得られ、(±)-4,α-diepi-streptovitamin A に 9-methylstreptimidone と類似の活性があることが分かった (Table 13, Fig. 61A)。また、興味深いことに、(±)-1,4-diepi-streptovitamin A のジアステレオマーである (±)-streptovitamin A はタンパク合成阻害剤 cycloheximide と近い活性があることが分かった (Fig. 61B, C)。

9-methylstreptimidone には上記の NO 産生阻害に加えて ATL 細胞である MT-1 細胞に選択的にアポトーシスを誘導することが報告されている (165)。9-methylstreptimidone と (±)-4,α-diepi-streptovitamin A の MT-1 細胞への細胞死誘導作用の検討を行った。その結果、9-methylstreptimidone と (±)-4,α-diepi-streptovitamin A は共に MT-1 細胞に細胞死を誘導した (Fig. 62A)。一方で、T 細胞白血病である Jurkat 細胞には細胞死を誘導しなかった (Fig. 62B)。さらに、Hoechst 33258 による核染色の結果、9-methylstreptimidone と (±)-4,α-diepi-streptovitamin A 処理によって核の凝集が観察され、9-methylstreptimidone と (±)-4,α-diepi-streptovitamin A に誘導される細胞死がアポトーシスであることが示唆された (Fig. 62C)。以上の結果から、(±)-4,α-diepi-streptovitamin A は ATL 細胞選択的にアポトーシスを誘導することが分かった。

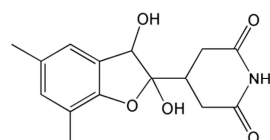
9-methylstreptimidone は NF-κB 阻害作用が報告されている (165)。そこで、(±)-4,α-diepi-streptovitamin A の NF-κB に対する効果の検討を行った。その結果、9-methylstreptimidone と (±)-4,α-diepi-streptovitamin A が MT-1 細胞において NF-κB を阻害することが明らかとなった (Fig. 63)。9-methylstreptimidone 類似物質の構造活性相関研究によって、(±)-4,α-diepi-streptovitamin A に 9-methylstreptimidone と同様の作用があることを見出した。



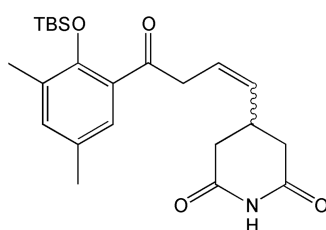
9-methylstreptimidone  
(epimeric mixture)



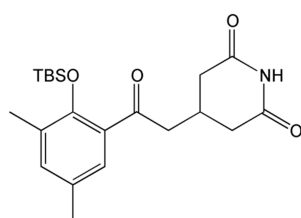
AK-01



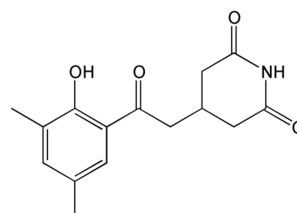
AK-02



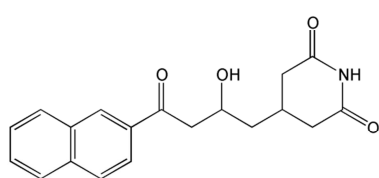
AP-01



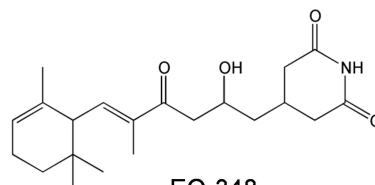
AP-02



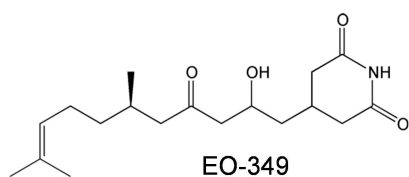
AP-03



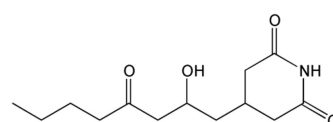
EO-347



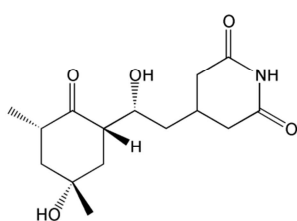
EO-348



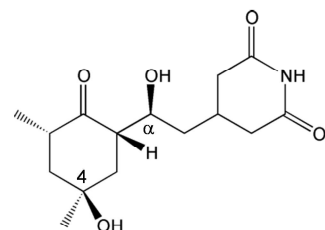
EO-349



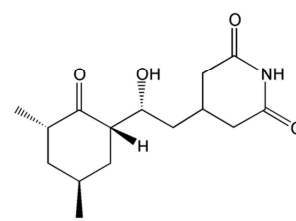
EO-350



(±)-streptovitamin A

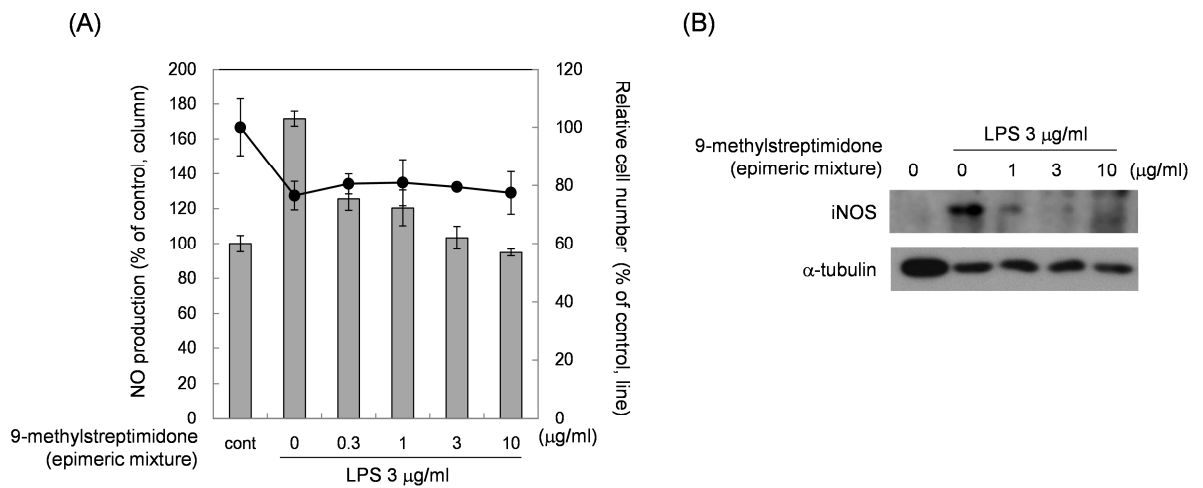


(±)-4,α-diepi-Streptovitamin A



cycloheximide

**Fig. 59 Structure of 9-methylstreptimidone analogs**



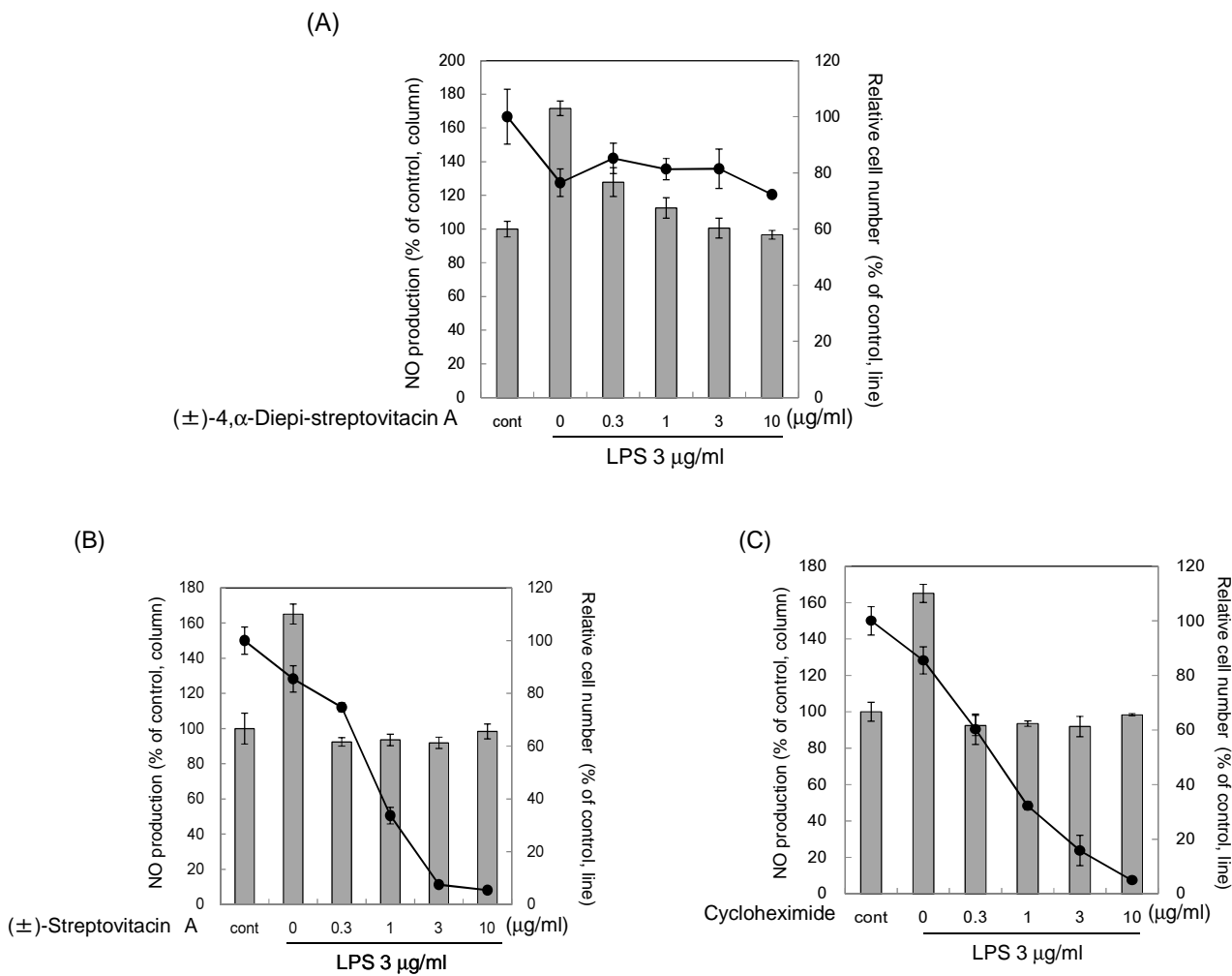
**Fig. 60 Inhibition of LPS-induced NO production by 9-methylstreptimidone epimeric mixture.** (A) Inhibition of NO production. RAW264.7 cells were treated with the chemical for 2 h, and then stimulated with 3  $\mu$ g/ml LPS for 24 h. NO production (bar graph) was measured as described in Methods. The cell viability (line graph) in the presence of LPS was measured by use of the MTT assay. The data are the means  $\pm$  SD of 3 determinations. (B) Inhibition of iNOS induction. RAW264.7 cells were incubated with the indicated concentrations of 9-methylstreptimidone epimeric mixture for 2 h, and then stimulated 3  $\mu$ g/ml LPS for 24 h. Thereafter, total cell extracts were prepared and subjected to Western blotting.

**Table 13 Inhibition of NO production (IC<sub>50</sub>) and decrease of viability (ED<sub>50</sub>) of 9-methylstreptimidone related compounds**

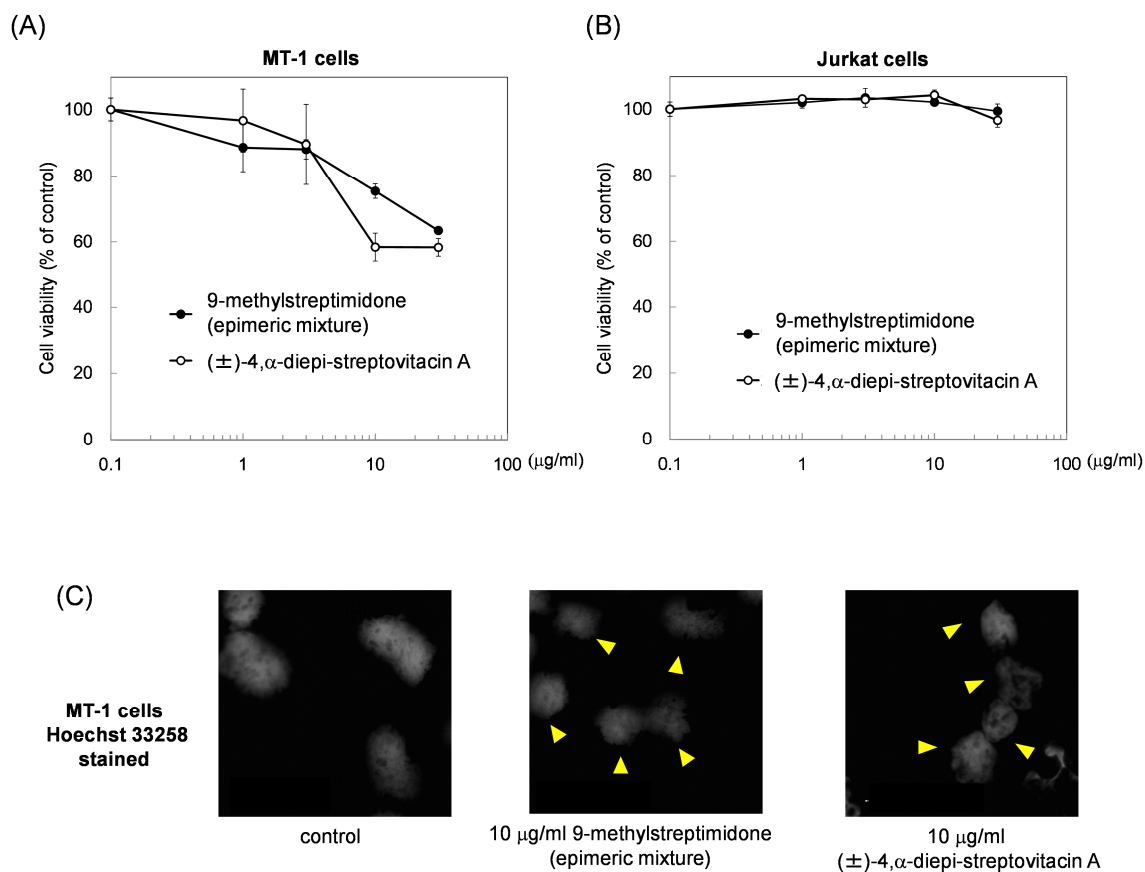
Compound	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	ED <sub>50</sub> (µg/ml)
9-methylstreptimidone (epimeric mixture)	0.3	>30
AK01	3	10
AK02	>30	>30
AP01	>10*	>10
AP02	3	>10
AP03	3	>30
EO-347	>30	>30
EO-348	>30	>30
EO-349	>30	>30
EO-350	>30	>30
(±)-streptovitacin A	0.01	0.4
(±)-4,α-diepi-streptovitacin A	0.3	>30
cycloheximide	0.01	0.4

\* Compound insoluble above 10 µg/ml

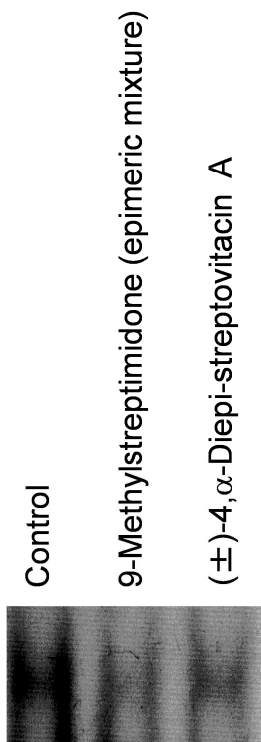




**Fig. 61 Effect of (±)-4,α-diepi-streptovitamin A, (±)-streptovitamin A, and cycloheximide on LPS-induced NO production.** RAW264.7 cells were treated with (±)-4,α-diepi-streptovitamin A, (±)-streptovitamin A or cycloheximide for 2 h, and then stimulated with 3 μg/ml LPS for 24 h. NO production and cell viability were measured as in Fig. 58. The data are the means ± SD of 3 determinations.



**Fig. 62 Induction of apoptosis by (±)-4,α-diepi-streptovitamin A selectively in adult T-cell leukemia MT-1 cells.** (A, B) Effect of (±)-4,α-diepi-streptovitamin A on cell viability. MT-1 (A) or Jurkat (B) cells were incubated with the indicated chemicals for 48 h, and then cell viability was assessed by performing the trypan blue dye exclusion assay. The data are the means  $\pm$  SD of 4 determinations. The solvent control did not affect the cellular viability. (C) Induction of apoptosis by (±)-4,α-diepi-streptovitamin A. MT-1 cells were incubated with 10 µg/ml of the indicated chemicals for 24 h and then stained with Hoechst 33258 to visualize their nuclei. Apoptosis-induced cells were indicated by yellow arrows.

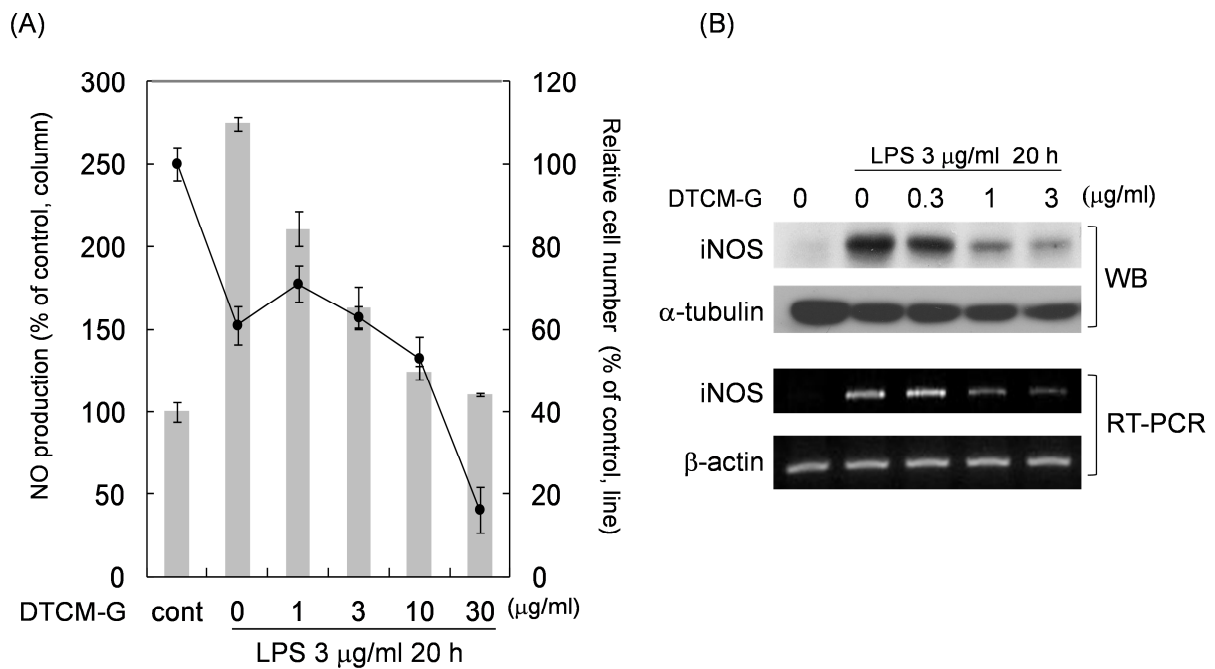


**Fig. 63 Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by (±)-4,α-diepi-streptovitacin A in adult T-cell leukemia MT-1 cells.** MT-1 cells were treated with incubated with 10  $\mu$ g/ml of the indicated chemicals for 24 h and thereafter the nuclear proteins were extracted and used for EMSA.

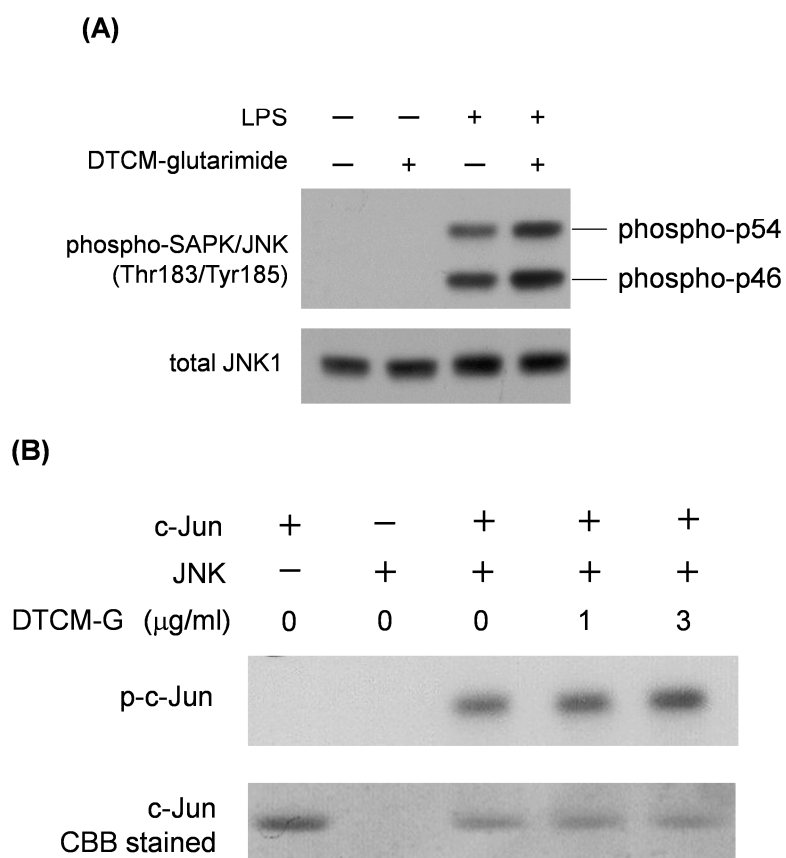
### 3.2 DTCM-glutarimide の NO 産生阻害の機構解析

9-methylstreptimidone 誘導体 DTCM-glutarimide には LPS によって誘導される NO 産生を阻害する作用が示されている(168)。NO 産生には、iNOS の寄与が重要であるが、Fig. 64A に示したように、DTCM-glutarimide は LPS によって誘導される NO 産生を処理濃度依存的に阻害し、iNOS のタンパク質発現を抑制することが確認された。さらに、RT-PCR の結果から、DTCM-glutarimide による iNOS の発現抑制は mRNA レベルで起こっていることが分かった(Fig. 64B)。

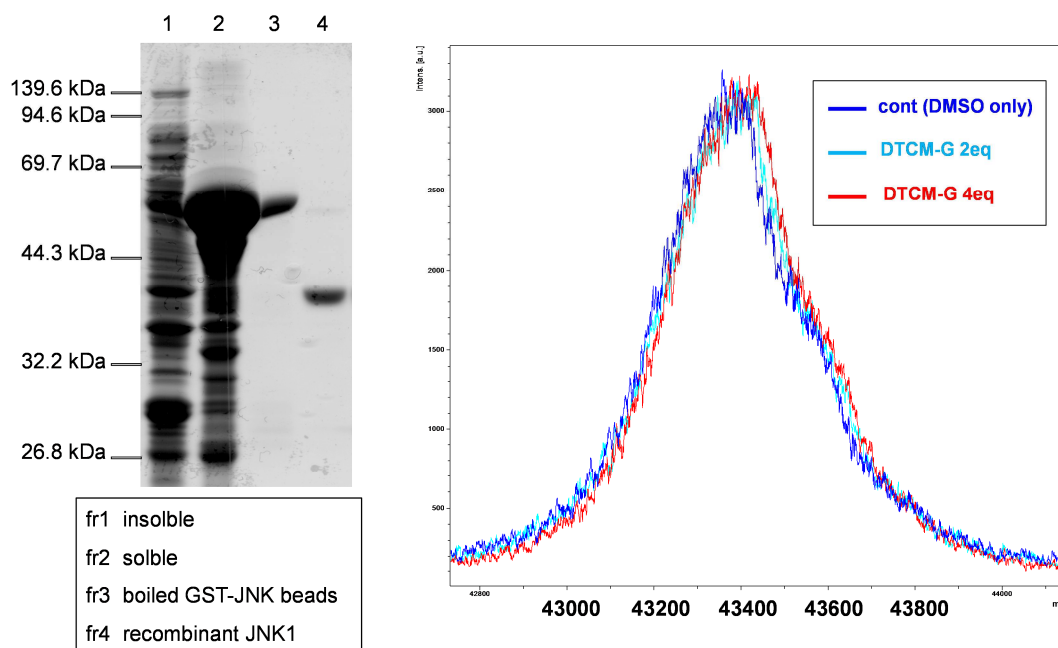
DTCM-glutarimide は AP-1 構成因子 c-Jun のリン酸化を抑制し、AP-1 の核蓄積を阻害することを報告した。c-Jun のリン酸化は JNK によって誘導される。そこで、DTCM-glutarimide の JNK の活性化に与える効果に注目し、検討を行った。その結果、DTCM-glutarimide は LPS に誘導される JNK のリン酸化には影響を与えなかった(Fig. 65A)。さらに、*in vitro* kinase assay により DTCM-glutarimide の JNK 酵素活性に与える効果の検討を行った。その結果、DTCM-glutarimide は *in vitro* では JNK の酵素活性を抑制しなかった(Fig. 65B)。また、MALDI-TOF/MS 解析の結果からも、DTCM-glutarimide と JNK1 の結合は確認されなかった(Fig. 66)。以上の結果から、DTCM-glutarimide は JNK による c-Jun のリン酸化反応の足場タンパク質や co-factor などの活性化を阻害していることが示唆された。



**Fig. 64 Inhibition of LPS-induced NO production by DTCM-glutarimide.** (A) Inhibition of NO production. RAW264.7 cells were treated with indicated concentrations of DTCM-glutarimide for 2 h, and then stimulated with 3 µg/ml LPS for 20 h. NO production (bar graph) was measured as described in Methods. The cell viability (line graph) in the presence of LPS was measured by use of the MTT assay. The data are the means  $\pm$  SD of 3 determinations. (B) Inhibition of iNOS induction. RAW264.7 cells were incubated with the indicated concentrations of DTCM-glutarimide for 2 h, and then stimulated 3 µg/ml LPS for 20 h. Thereafter, the iNOS protein (upper) and mRNA (bottom) was detected by Western blotting and RT-PCR respectively.



**Fig. 65 Inhibition of c-Jun phosphorylation by DTCM-glutarimide.** (A) Effect of DTCM-glutarimide on LPS-induced JNK phosphorylation. RAW264.7 cells were incubated with DTCM-glutarimide for 2 h and then stimulated with 3  $\mu\text{g/ml}$  LPS for 0.5 h. Total cell extracts were used for Western blotting. (B) Effect of DTCM-glutarimide on JNK activity *in vitro*. Recombinant JNK1 and c-Jun were incubated with radioactive ATP for 1 h with indicated concentration of DTCM-glutarimide. Proteins were separated by SDS-PAGE, and phosphorylated c-Jun was visualized by autoradiography.



**Fig. 66 DTCM-glutarimide does not covalently bind to JNK1.** (A) Result of recombinant JNK1 purification. Recombinant JNK1 was purified and prepared for indicated fractions from BL-21 and subjected by CBB-staining, insoluble fraction in PBS: fr1, Soluble fraction in PBS: fr2, boiled recombinant protein immobilized glutathione-Sepharose beads: fr3, purified recombinant proteins: fr4. (B) Molecular weight analysis of JNK1 with DTCM-glutarimide.

### 3.3 DTCM-glutarimide の NF- $\kappa$ B 活性化阻害の機構解析

DTCM-glutarimide の更なる阻害機構解析を行った。LPS 刺激によって誘導される NF- $\kappa$ B target gene の発現に DTCM-glutarimide が与える効果の検討を行った結果、DTCM-glutarimide が LPS によって即時的に発現誘導される TNF- $\alpha$  の発現には影響を与えなかったのに対し、LPS 刺激長時間によって発現誘導のかかる iNOS や IFN- $\beta$  の発現を抑制した(Fig. 67)。この結果が LPS によって活性化される NF- $\kappa$ B の subtype の違いに起因しているのではないかと考え、LPS 刺激によって活性化する NF- $\kappa$ B の経時変化を EMSA によって解析した。その結果、LPS 刺激 30 分後に NF- $\kappa$ B は活性化し、LPS 刺激 8~16 時間ではさらに強い NF- $\kappa$ B の活性が起こっていた(Fig. 68A)。また、興味深いことに、supershift assay の結果、LPS 刺激 30 分で活性化している NF- $\kappa$ B は抗 p65 抗体処理で supershift が観測され、LPS 16 時間刺激で活性化する NF- $\kappa$ B は抗 RelB 抗体処理で DNA 結合が弱くなる結果が得られた。したがって、LPS 刺激 30 分で活性化している NF- $\kappa$ B は p65 を主たる構成因子とする canonical NF- $\kappa$ B であるのに対し、LPS 刺激 16 時間で活性化する NF- $\kappa$ B は RelB を含んだ noncanonical NF- $\kappa$ B ものであった(Fig. 68B)。続いて、LPS 刺激 30 分および 16 時間で活性化する NF- $\kappa$ B に対する DTCM-glutarimide の効果の検討を行った。その結果、DTCM-glutarimide は LPS 刺激 30 分で活性化する NF- $\kappa$ B の活性化は抑制せず(Fig. 69A)、LPS 刺激 16 時間で活性化する noncanonical NF- $\kappa$ B を選択的に阻害した(Fig. 69B)。次に、DTCM-glutarimide が LPS 刺激 16 時間で活性化する noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害しているか検討を行った。その結果、DTCM-glutarimide は LPS 刺激 16 時間で活性化する NF- $\kappa$ B の DNA 結合には影響を与えなかった(Fig. 70)。

以上の結果から、DTCM-glutarimide が LPS 長時間刺激で活性化する noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが明らかとなり、DTCM-glutarimide が noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路に阻害効果を示すことが示唆された。RelB を含む noncanonical NF- $\kappa$ B は canonical NF- $\kappa$ B の活性化によって RelB をはじめその構成因子が作られることによって活性化する(182)。したがって、DTCM-glutarimide が noncanonical NF- $\kappa$ B を阻害する機構には Fig. 71 に示したものが考えられる。

- ① noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の mRNA 発現の阻害
- ② noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の mRNA の不安定化誘導
- ③ noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路に関与するタンパク質の阻害

そこで、これらの阻害機構の検討を行った。

まず、①と②における阻害の可能性を検証するために、RT-PCR により、DTCM-glutarimide が noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の発現に与える効果の検討を行った。その結果、DTCM-glutarimide は noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子 RelB、



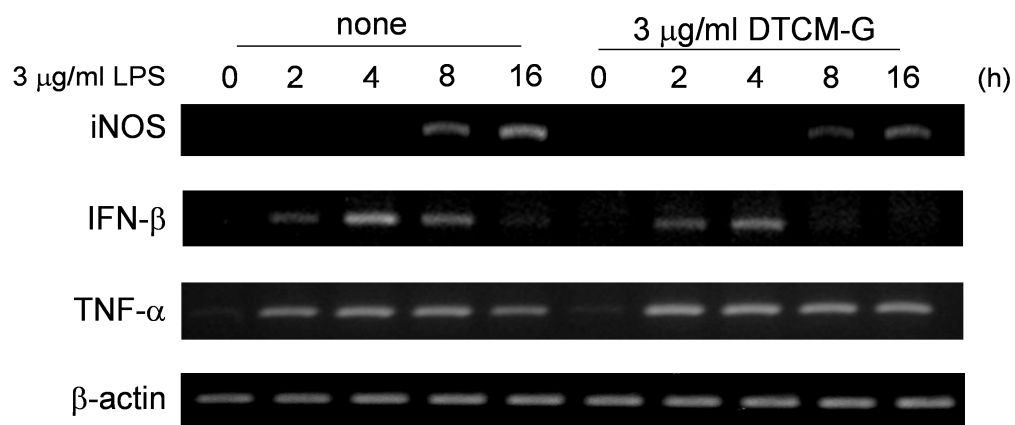
p100/p52 の mRNA 発現量には影響を与えなかった(Fig. 72A)。したがって、DTCM-glutarimide は noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の発現および mRNA の安定性には影響を与えないことが分かった。

続いて、noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子のタンパク質レベルでの挙動を調べることで③の検討を行った。最近、当研究室で、ATL 細胞を用いた実験により、DTCM-glutarimide が RelB の切断を誘導するという知見が得られたため、RAW264.7 細胞でも同様の DTCM-glutarimide 処理による RelB の切断が起こるかの検討を行った。その結果、DTCM-glutarimide 処理によって RelB の切断断片が検出され、RelB の不安定化の誘導が示唆された(Fig. 72B)。さらに、p100 のタンパク質量も減少するといった結果が得られた(Fig. 72B)。したがって、DTCM-glutarimide は RelB の不安定化誘導を介した NF- $\kappa$ B の阻害を行っていることが示唆された。

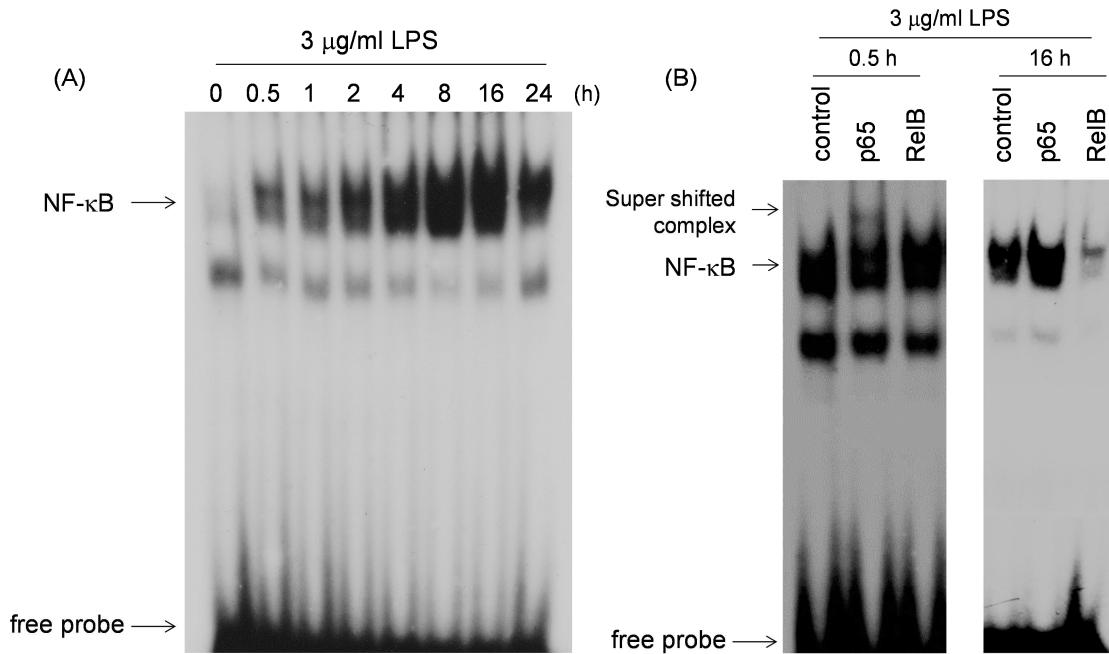
本研究によって、DTCM-glutarimide は LPS 短時間処理において AP-1 を阻害することに加え、LPS 長時間処理によって活性化する NF- $\kappa$ B を阻害することが明らかになった(Fig. 73)。さらに、NF- $\kappa$ B の阻害機構としては ATL 細胞に見られるように RelB の不安定性の誘導が関与していることが示唆された。また、DTCM-glutarimide は LPS 短時間刺激の NF- $\kappa$ B は阻害しないことから、iNOS の発現には LPS 長時間刺激によって活性化する NF- $\kappa$ B の活性化が重要であることが示唆された。

以上の結果から、DTCM-glutarimide による NF- $\kappa$ B 阻害作用が明らかになったため、別の細胞でも NF- $\kappa$ B の阻害が見られるかの検討を行った。その結果、マウスメラノーマ細胞 B16F10 細胞においても DTCM-glutarimide は 6 時間の処理時間から NF- $\kappa$ B 阻害効果を示した(Fig. 74)。

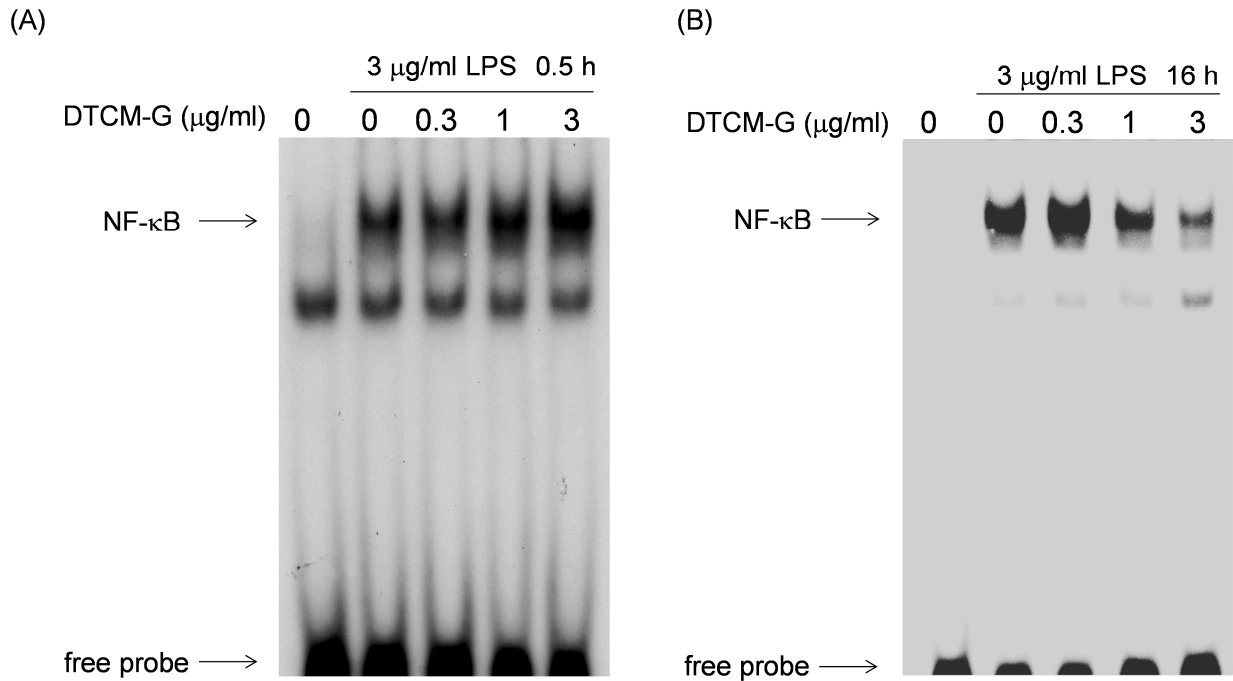
本研究によって DTCM-glutarimide の新規作用機構として、RelB の不安定性を介して NF- $\kappa$ B 阻害機構が明らかになった。



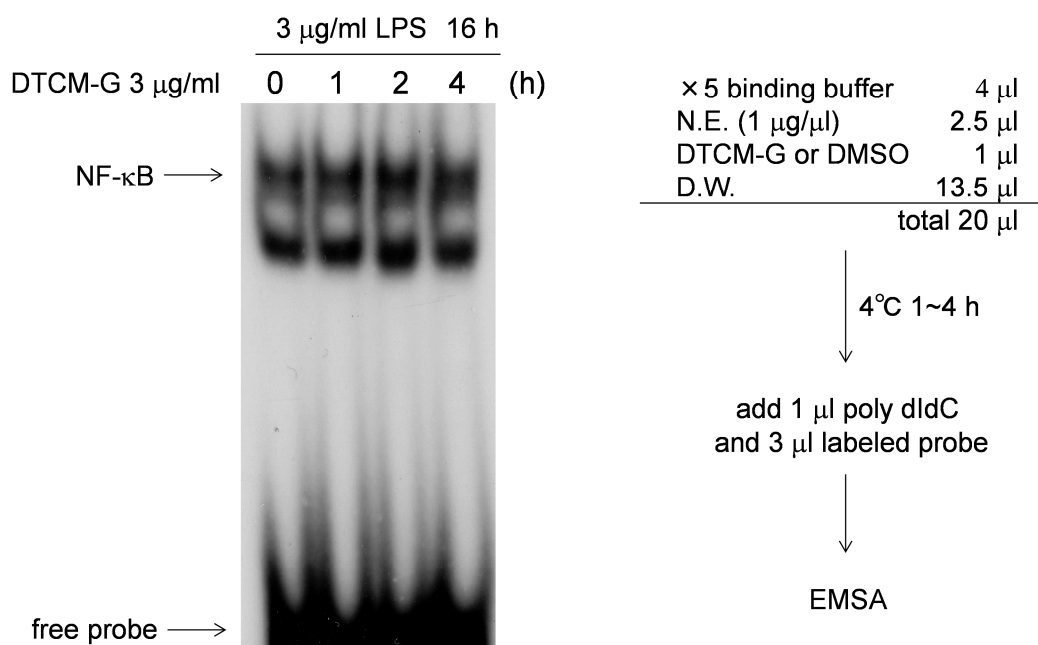
**Fig. 68 Effect of DTCM-glutarimide on NF- $\kappa$ B target gene expression in RAW264.7 cells.** Cells were treated with 3  $\mu$ g/ml DCTM-glutarimide for 2 h and then stimulated with 3  $\mu$ g/ml LPS for indicated hours. Thereafter, the indicated mRNA of NF- $\kappa$ B target genes were detected by RT-PCR.



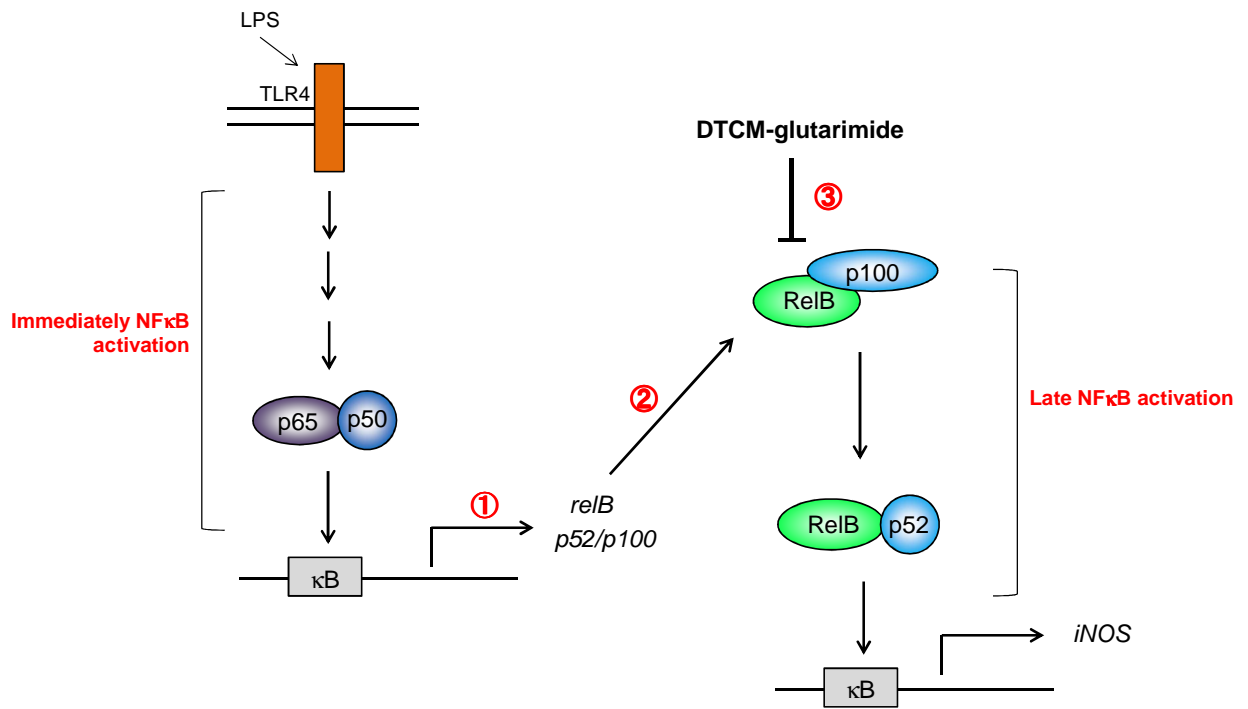
**Fig. 69 Short or long term stimulation with LPS induces different component of NF-κB activation.** (A) Cells were stimulated with 3 μg/ml LPS for indicated times. Thereafter, the nuclear proteins were extracted and used for EMSA. (B) Analysis of NF-κB components with 0.5 h or 16 h LPS-stimulation by supershift assay.



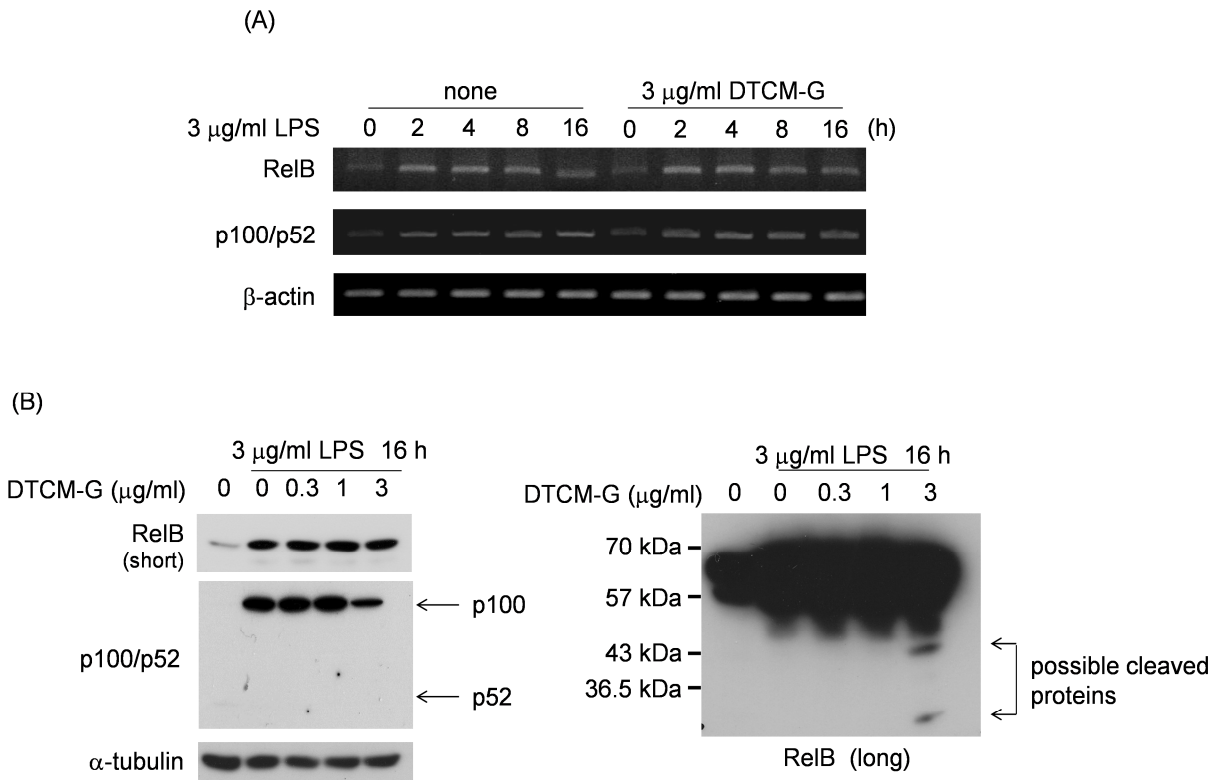
**Fig. 70 DTCM-glutarimide selectively inhibited NF- $\kappa$ B activation induced by long-term LPS stimulation in RAW264.7 cells.** RAW264.7 cells were treated with the indicated concentrations of DTCM-glutarimide for 2 h and then stimulated with 3  $\mu\text{g/ml}$  LPS for 0.5 h (A) or 16 h (B). Thereafter, the nuclear proteins were extracted and used for EMSA.



**Fig. 71 DTCM-glutarimide does not inhibit DNA binding of NF- $\kappa$ B induced by long-term LPS stimulation.** RAW264.7 cells were stimulated with 3  $\mu\text{g/ml}$  LPS for 16 h and then nuclear proteins were extracted. Thereafter, extracts were treated with 3  $\mu\text{g/ml}$  DTCM-glutarimide for indicated hours and the *in vitro* DNA binding activity was then detected by using EMSA.



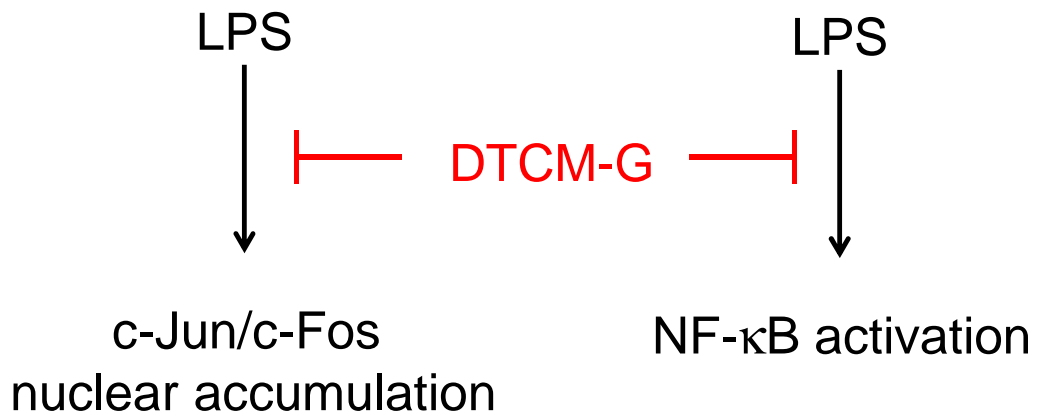
**Fig. 72 Possible inhibitory point of DTCM-glutarimide.** Inhibitory point indicated 1~3. 1: RelB and p52/p100 mRNA expression, 2: RelB and p52 mRNA stability, 3: destabilization of noncanonical NF-κB by DTCM-glutarimide.



**Fig. 73 Effect of DTCM-glutarimide on LPS induced-noncanonical NF- $\kappa$ B component expression in RAW264.7 cells.** (A) Cells were treated with 3  $\mu\text{g/ml}$  DTCM-glutarimide for 2 h and then stimulated with 3  $\mu\text{g/ml}$  LPS for indicated hours. Thereafter, the indicated mRNA was detected by RT-PCR. (B) Cells were treated with 3  $\mu\text{g/ml}$  DTCM-glutarimide for 2 h and then stimulated with 3  $\mu\text{g/ml}$  LPS for 16 h. Thereafter, the proteins were detected by Western blotting (left panel). The detection of RelB cleavage by long exposing film (right panel).

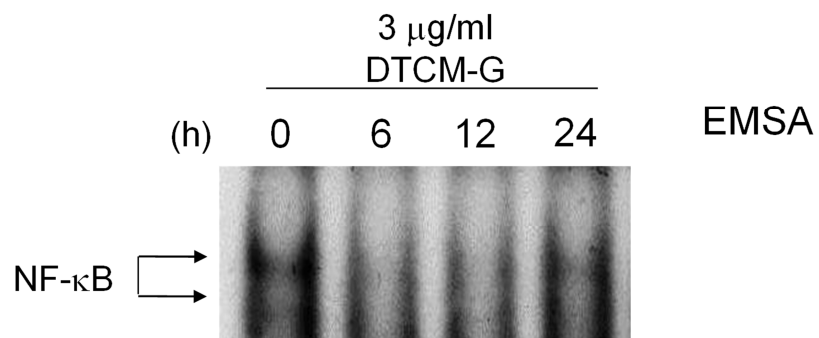
Short term effect

Long term effect



**Fig. 74 Dual effects of DTCM-glutarimide.** DTCM-glutarimide inhibited AP-1 nuclear accumulation by inhibiting c-Jun phosphorylation in short-term LPS stimulation (left). In long-term LPS stimulated cells, DTCM-glutarimide inhibited NF-κB activation (right).





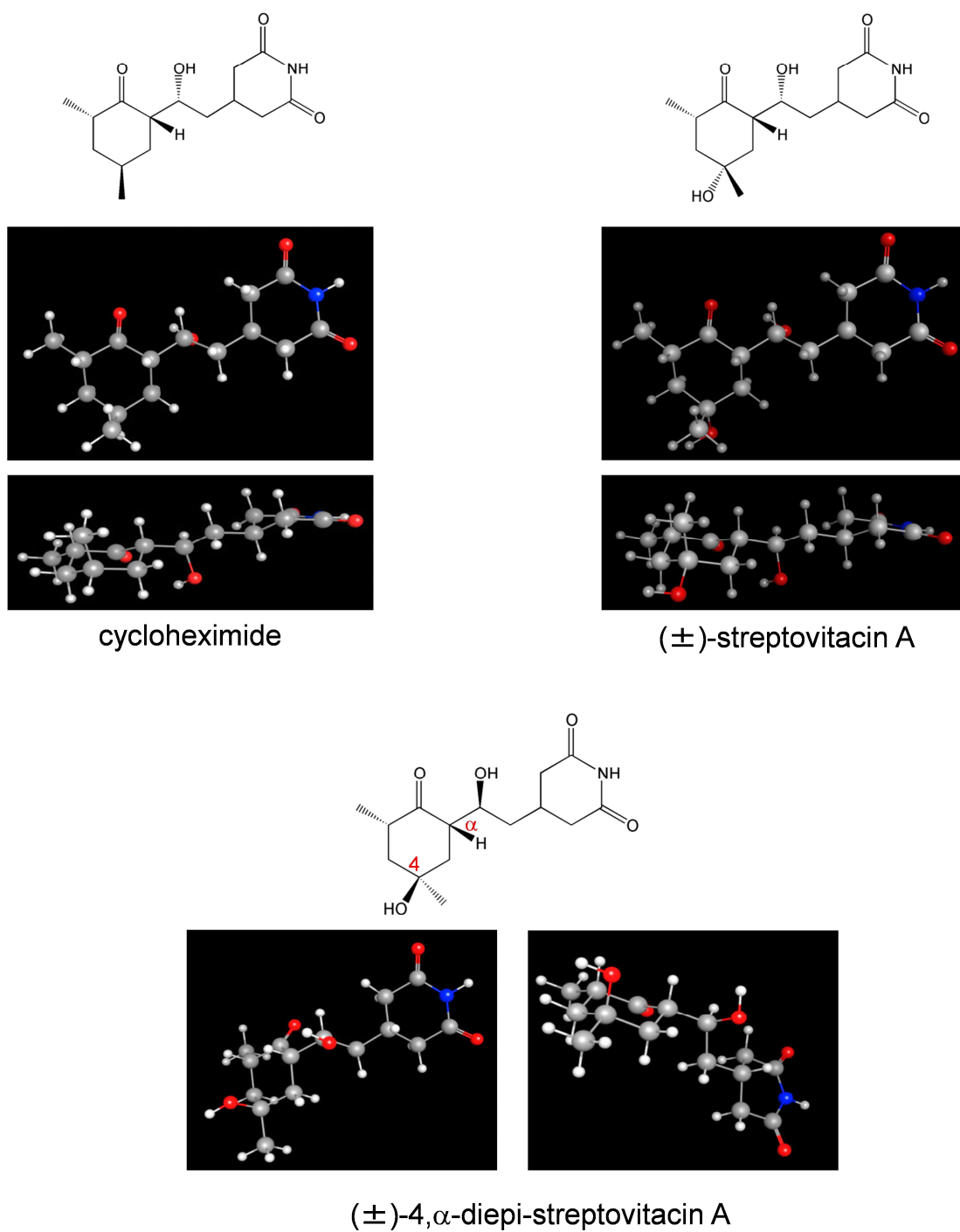
**Fig. 75 Inhibition of NF- $\kappa$ B by DTCM-glutarimide in B16F10 cells.** Cells were treated with 3  $\mu$ g/ml DTCM-glutarimide for indicated time and thereafter the nuclear proteins were extracted and used for EMSA.

#### 第4節 考察

微生物 2 次代謝産物より得られた NF- $\kappa$ B 阻害剤 9-methylstreptimidone の類似体を用いた構造活性相関実験によって、マクロファージにおける NO 産生抑制効果および、ATL 細胞にアポトーシスを誘導する作用を持つ化合物として、(±)-4,α-diepi-streptovitacin A を得た。(±)-4,α-diepi-streptovitacin A は (±)-streptovitacin A、cycloheximide と近い構造であるにもかかわらず、(±)-streptovitacin A、cycloheximide とは異なる活性を示した。このことから、9-methylstreptimidone を含め、glutarimide 環を有する化合物の活性には glutarimide 環以外の不飽和疎水性部分の立体を含めた構造が重要であることが示唆された。構造活性相関の結果、EO-349 や EO-350 は 9-methylstreptimidone と近い構造を持つにも関わらず、NO 産生抑制効果を示さなかったことも、9-methylstreptimidone の不飽和部位の構造及び立体の重要性を裏付けている。

(±)-4,α-diepi-streptovitacin A、(±)-streptovitacin A、cycloheximide の分子構造は類似しているが、水酸基の有無、または置換基の立体構造に違いがある。そこで、水酸基および、置換基の立体構造の違いによって、分子全体にどのような立体構造の違いが表れるかを分子シミュレーションによって検討した。分子内水素結合が最も弱く、水中に最も近い力場(Born)における最安定配座を求めた結果、(±)-streptovitacin A、cycloheximide は水酸基の有無にかかわらず、平面構造をとるのに対し、(±)-4,α-diepi-streptovitacin A は折れ曲がった 3 次元的な構造をとっていた (Fig. 76)。非常に構造が似ている (±)-4,α-diepi-streptovitacin A、(±)-streptovitacin A、cycloheximide の間で最安定配座に差があることは、glutarimide 環以外の部分の立体を含めた構造が分子全体の構造を大きく変え、生体内での標的分子の認識を制御していると考えられる。

また、(±)-4,α-diepi-streptovitacin A の活性を調べた結果、マクロファージにおいて LPS によって誘導される NO 産生を抑制するだけでなく、ATL 細胞に選択的にアポトーシスを誘導できることが分かった。(±)-4,α-diepi-streptovitacin A のこの作用は、難治性疾患の ATL に対して (±)-4,α-diepi-streptovitacin A が有効な治療薬になりうることを示唆すると共に、(±)-4,α-diepi-streptovitacin A の構造をもとに更なる誘導體展開などを行うことで、炎症性疾患、白血病などの治療に効果的な薬剤の開発に大きく貢献できると考えられる。また、9-methylstreptimidone は 8-9 位の二重結合部位での 9 位のメチル基の cis-trans の異性化が起りやすく、骨格的に不安定であるため、(±)-4,α-diepi-streptovitacin A は新たな抗癌剤リード化合物になると考えられる。



**Fig. 76 Most stable conformation of cycloheximide, (±)-streptovitamin A, and (±)-4,α-diepi-streptovitamin A in Born.**

また、DTCM-glutarimide が LPS 長時間刺激で活性化する NF- $\kappa$ B の活性化を選択的に抑制することが分かった。さらに、Fig. 73 に示したように、その阻 RelB の不安定化を介していることが示唆された。以上の結果から、DTCM-glutarimide による NF- $\kappa$ B の阻害機構は以下の 2 種類のものであると考えられる。

- 1) DTCM-glutarimide が RelB を安定化するタンパク質の機能を阻害し、RelB を不安定にする。
- 2) DTCM-glutarimide が RelB を不安定化するタンパク質の不活化因子の機能を阻害する(= RelB の分解を活性化する)。

したがって、DTCM-glutarimide は RelB の安定化または分解に関与するタンパク質を標的としている可能性が高い。さらに、DTCM-glutarimide が LPS 短時間処理では AP-1 を阻害することを踏まえて考えると、DTCM-glutarimide の標的タンパク質は、RelB の安定化制御と AP-1 活性化制御の共通因子であると考えられる。したがって、DTCM-glutarimide の標的タンパク質の同定が達成されれば、即時的免疫応答、長期的免疫応答の両方を制御する因子の特定にもつながると考えられる。

また、DTCM-glutarimide が RelB を構成因子とする noncanonical NF- $\kappa$ B を阻害することは、DTCM-glutarimide が noncanonical NF- $\kappa$ B が強く関与する、自己免疫疾患や ATL においても効果的な治療薬になることを示唆するものである。

以上のことから、DTCM-glutarimide は AP-1、NF- $\kappa$ B の阻害作用によって炎症性疾患、自己免疫疾患の治療薬としての有用性に加え、炎症や免疫応答の中心的なタンパク質の同定、新たなシグナル伝達経路の解明にも大きく貢献できるものであると考えられる。

## 第 4 章

### 総括



## 総括

本論文では、分子デザインされた NF- $\kappa$ B 阻害剤を用い、NF- $\kappa$ B 阻害剤の新規作用機構の解明を行うと共に、NF- $\kappa$ B の新規制御機構の解明を行った。

第 1 章では、NF- $\kappa$ B 阻害剤(-)-DHMEQ が B 細胞の成熟や自己免疫疾患に重要な noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路に与える効果の検討と標的分子の特定を行った。その結果、(-)-DHMEQ が RelB の 144Cys に共有結合し、noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害することを示した。

第 2 章では、noncanonical NF- $\kappa$ B が強く活性化している ATL 細胞(MT-1 細胞)を用いて ATL に対する(-)-DHMEQ の効果の検討を行った。その結果、(-)-DHMEQ は MT-1 細胞の noncanonical NF- $\kappa$ B の DNA 結合を阻害することを明らかにした。さらに、(-)-DHMEQ が noncanonical NF- $\kappa$ B 構成因子の RelB と p52 のタンパク質レベルでの不安定化を誘導していることを見出した。HeLa 細胞を用いた過剰発現の実験から、DNA に結合出来ない noncanonical NF- $\kappa$ B と核移行出来ない noncanonical NF- $\kappa$ B がタンパク質レベルで不安定になることが分かった。noncanonical NF- $\kappa$ B の活性化制御には核内への蓄積が重要となるが、(-)-DHMEQ は noncanonical NF- $\kappa$ B の核への蓄積を阻害し、核移行に重要である importin- $\alpha$ 5 と noncanonical NF- $\kappa$ B の結合を阻害した。以上の結果から、DNA に結合できない conformation 変化は、noncanonical NF- $\kappa$ B の核内と細胞質内局在の平衡を細胞質側に偏らせ、さらに、noncanonical NF- $\kappa$ B と importin との結合抑制を誘導することで、noncanonical NF- $\kappa$ B の不安定化を誘導するという新たな noncanonical NF- $\kappa$ B の制御機構を明らかにした。

第 3 章では NF- $\kappa$ B 阻害剤 9-methylstreptimidone 類似体の構造活性相関と DTCM-glutarimide の NO 産生抑制機構の解析を行った。その結果、9-methylstreptimidone の活性には glutarimide 環以外の不飽和部位の構造と立体が重要であることが分かった。さらに、新たな抗癌剤シード化合物として(±)-4, $\alpha$ -diepi-strptovitacin A を得た。また、DTCM-glutarimide が LPS 長時間刺激で活性化する NF- $\kappa$ B の活性化を RelB の不安定化を介して抑制することが分かり、DTCM-glutarimide が noncanonical NF- $\kappa$ B に対して抑制効果を示すことが示唆された。

本研究によって、noncanonical NF- $\kappa$ B が白血病や炎症性疾患において効果的な治療ターゲットになりうることが強く示唆された。これまで報告されている知見から、canonical NF- $\kappa$ B は I $\kappa$ B $\alpha$ の分解再誘導によって即座に negative feedback が掛かることが示されているが、noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路の feedback 機構についてはまだ未解明な点が多く残っている。また、本実験で用いた ATL 細胞を初め、悪性度の高い乳癌でも NIK の蓄積が報告されるなど、noncanonical

NF- $\kappa$ B の活性化が難治性疾患に関与している多くの知見がある。これは、canonical NF- $\kappa$ B が炎症性刺激によって数分で活性化する即時的な活性化機構をとるのに対し、noncanonical NF- $\kappa$ B が炎症性刺激後数時間後に活性化する遅延型の応答をすることに原因があると考えられる。即時的な過剰な NF- $\kappa$ B の活性化は細胞の自然免疫によって抑えこまれたり、細胞の防衛機能によってアポトーシスを起こしたりするが、noncanonical NF- $\kappa$ B のように即時な応答を示さない NF- $\kappa$ B は細胞の自然免疫をかいくぐり、ATL や自己免疫疾患の悪性化の最も大きな原因をなっていると考えられる。したがって、難治性疾患の治療において、noncanonical NF- $\kappa$ B 経路を標的とした治療薬の開発が予後不良の疾患に対して効果的な治療となると考えられる。分子標的薬の開発には、シグナル伝達経路の詳細な理解が重要となり、本研究のような分子デザインされた阻害剤の作用機構解析およびそれに伴うシグナル伝達の新規制御機構の解明が大きく貢献できる。

NF- $\kappa$ B は 1986 年に David Baltimore らによって報告されて以来、炎症や癌の治療ターゲットとして研究が進められてきた。特に最近では、NIK の安定化機構の解明や IKK $\alpha$ による NIK の negative feedback 機構の解明(183)など、noncanonical NF- $\kappa$ B 経路に関する制御機構の知見が多く報告されている。これらは、今後の炎症性疾患、自己免疫疾患、癌治療において noncanonical NF- $\kappa$ B の理解が必要不可欠であることを示唆している。今後さらに研究が進み、本研究で明らかにした RelB の 144Cys を中心とした DNA 結合 domain による noncanonical NF- $\kappa$ B の細胞内局在制御と安定性制御機構および、RelB の不安定化を介した NF- $\kappa$ B の阻害機構が、今後の noncanonical NF- $\kappa$ B 活性化経路の詳細な機構解明に大きく貢献できることを期待する。



## 第5章 参考文献

- (1) 国立がんセンター統計: <http://ganjoho.jp/public/statistics/pub/statistics01.html>
- (2) 小川佳宏、真鍋一郎、大島正伸、竹田潔 (編)、実験医学増刊 Vol. 29. No.10. 2011. pp62-67.
- (3) 吉村昭彦、上坂等、村上正晃、善本隆之 (編)、実験医学増刊 Vol. 28. No. 12. 2010. pp29-70.
- (4) 江角浩安、高倉伸幸、宮園浩平、森正樹 (編)、実験医学増刊 Vol. 27. No. 2. 2009. pp85-90.
- (5) 中山俊憲、清野宏、笹月健彦 (編)、実験医学増刊 Vol. 22. No. 5. 2011. pp114-132
- (6) Lemaitre B.; Nicolas E.; Michaut L.; Reichhart J. M.; Hoffmann, J. A.; The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults., *Cell.*, 86, 973-83, 1996.
- (7) Belvin M. P.; Anderson K. V., A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway., *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 12, 393-416, 1996.
- (8) Hashimoto C.; Hudson K. L.; Anderson K. V., The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein., *Cell.*, 52, 269-79, 1988.
- (9) Anderson K. V., Toll signaling pathways in the innate immune response., *Curr Opin Immunol.*, 12, 13-9, 2000.
- (10) Kylsten P.; Samakovlis C.; Hultmark D., The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection., *EMBO J.*, 9, 217-24, 1990.
- (11) Engström Y.; Kadalayil L.; Sun S. C.; Samakovlis C.; Hultmark D.; Faye I.,  $\kappa$ B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*., *J Mol Biol.*, 232,

327-33, 1993.

- (12) Medzhitov R.; Preston-Hurlburt P.; Janeway C. A. Jr., A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity., *Nature.*, 394-7, 388, 1997.
- (13) Alexopoulou L.; Holt A. C.; Medzhitov R.; Flavell R. A., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3., *Nature.*, 732-8, 413, 2001.
- (14) Heil F.; Hemmi H.; Hochrein H.; Ampenberger F.; Kirschning C.; Akira S.; Lipford G.; Wagner H.; Bauer S., Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8., *Science.*, 303, 1526-9, 2004.
- (15) Diebold, S. S.; Kaisho T.; Hemmi H.; Akira S.; Reis e Sousa C., Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA., *Science.*, 303, 1529-31, 2004.
- (16) Hemmi H.; Takeuchi O.; Kawai T.; Kaisho T.; Sato S.; Sanjo H.; Matsumoto M.; Hoshino K.; Wagner H.; Takeda K.; Akira S., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA., *Nature.*, 408, 740-5, 2000.
- (17) Slack J. L.; Schooley K.; Bonnert T. P.; Mitcham J. L.; Qwarnstrom E. E.; Sims J. E.; Dower S. K., Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways., *J. Biol. Chem.*, 275, 4670-8, 2000.
- (18) Takeuchi O.; Hoshino K.; Kawai T.; Sanjo H.; Takada H.; Ogawa T.; Takeda K.; Akira S., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components., *Immunity.*, 11, 443-51, 1999.
- (19) Schwandner R.; Dziarski R.; Wesche H.; Rothe M.; Kirschning C. J., Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2., *J. Biol. Chem.*, 274, 17406-9, 1999.
- (20) Takeuchi O.; Sato S.; Horiuchi T.; Hoshino K.; Takeda K.; Dong Z.; Modlin R. L.; Akira S., Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to

microbial lipoproteins., *J. Immunol.*, 169, 10-4, 2002.

- (21) Underhill D. M.; Ozinsky A.; Hajjar A. M.; Stevens A.; Wilson C. B.; Bassetti M.; Aderem A., The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens., *Nature.*, 401, 211-5, 1999.
- (22) Coelho P. S.; Klein A.; Talvani A.; Coutinho S. F.; Takeuchi O.; Akira S.; Silva J. S.; Canizzaro H.; Gazzinelli R. T.; Teixeira M. M., Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages., *J. Leukoc. Biol.*, 71, 837-44, 2002.
- (23) Wyllie D. H.; Kiss-Toth E.; Visintin A.; Smith S. C.; Boussouf S.; Segal D. M.; Duff G. W.; Dower S. K., Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses., *J. Immunol.*, 165, 7125-32, 2000.
- (24) Alexopoulou L.; Holt A. C.; Medzhitov R.; Flavell R. A., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3., *Nature.*, 413, 732-8, 2001.
- (25) Poltorak A.; He X.; Smirnova I.; Liu M. Y.; Van Huffel C.; Du X.; Birdwell D.; Alejos E.; Silva M.; Galanos C.; Freudenberg M.; Ricciardi-Castagnoli P.; Layton B.; Beutler B., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene., *Science.*, 282, 2085-8, 1998.
- (26) Kurt-Jones E. A.; Popova L.; Kwinn L.; Haynes L. M.; Jones L. P.; Tripp R. A.; Walsh E. E.; Freeman M. W.; Golenbock D. T.; Anderson L. J.; Finberg R. W., Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus., *Nat Immunol.*, 1, 398-401, 2000.
- (27) Kawasaki K.; Akashi S.; Shimazu R.; Yoshida T.; Miyake K.; Nishijima M., Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol., *J. Biol. Chem.*, 275, 2251-4, 2000.
- (28) Bulut Y.; Faure E.; Thomas L.; Karahashi H.; Michelsen K. S.; Equils O.; Morrison S. G.; Morrison R. P.; Arditi M., Chlamydial heat shock protein 60 activates

macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway., *J. Immunol.*, 168, 1435-40, 2002.

- (29) Ohashi K.; Burkart V.; Flohé S.; Kolb H., Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex., *J. Immunol.*, 164, 558-61, 2000.
- (30) Vabulas R. M.; Ahmad-Nejad P.; Ghose S.; Kirschning C. J.; Issels R. D.; Wagner H., HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway., *J. Biol. Chem.*, 277, 15107-12, 2002.
- (31) Hayashi F.; Smith K. D.; Ozinsky A.; Hawn T. R.; Yi E. C.; Goodlett D. R.; Eng J. K.; Akira S.; Underhill D. M.; Aderem A., The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5., *Nature.*, 410, 1099-103, 2001.
- (32) Hemmi H.; Kaisho T.; Takeuchi O.; Sato S.; Sanjo H.; Hoshino K.; Horiuchi T.; Tomizawa H.; Takeda K.; Akira S., Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway., *Nat Immunol.*, 3, 196-200, 2002.
- (33) Heil F.; Hemmi H.; Hochrein H.; Ampenberger F.; Kirschning C.; Akira S.; Lipford G.; Wagner H.; Bauer S., Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8., *Science.*, 303, 1526-9, 2004.
- (34) Diebold S. S.; Kaisho T.; Hemmi H.; Akira S.; Reis e Sousa C., Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA., *Science.*, 303, 1529-31, 2004.
- (35) Jurk M.; Heil F.; Vollmer J.; Schetter C.; Krieg A. M.; Wagner H.; Lipford G.; Bauer S., Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848., *Nat Immunol.*, 3, 499., 2002.
- (36) Hemmi H.; Takeuchi O.; Kawai T.; Kaisho T.; Sato S.; Sanjo H.; Matsumoto M.; Hoshino K.; Wagner H.; Takeda K.; Akira S., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA., *Nature.*, 408, 740-5, 2000.

- (37) Zhang D.; Zhang G.; Hayden M. S.; Greenblatt M. B.; Bussey C.; Flavell R. A.; Ghosh S., A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria., *Science*, 303, 1522-6, 2004.
- (38) Liu L.; Botos I.; Wang, Y.; Leonard J. N.; Shiloach J.; Segal D. M.; Davies D. R., Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA., *Science*, 320, 379-81, 2008.
- (39) Slack J. L.; Schooley K.; Bonnert T. P.; Mitcham J. L.; Qwarnstrom E. E.; Sims J. E.; Dower S. K., Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways., *J. Biol. Chem.*, 275, 4670-8, 2000.
- (40) Ahmad-Nejad P.; Häcker H.; Rutz M.; Bauer S.; Vabulas R. M.; Wagner H., Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments., *Eur. J. Immunol.*, 32, 1958-68, 2002.
- (41) Heil F.; Ahmad-Nejad P.; Hemmi H.; Hochrein H.; Ampenberger F.; Gellert T.; Dietrich H.; Lipford G.; Takeda K.; Akira S.; Wagner H.; Bauer S., The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily., *Eur. J. Immunol.*, 33, 2987-97, 2003.
- (42) Matsumoto M.; Funami K.; Tanabe M.; Oshiumi H.; Shingai M.; Seto Y.; Yamamoto A.; Seya T., Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells., *J. Immunol.*, 171, 3154-62, 2003.
- (43) Yoneyama M.; Kikuchi M.; Natsukawa T.; Shinobu N.; Imaizumi T.; Miyagishi M.; Taira K.; Akira S.; Fujita T., The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses., *Nat. Immunol.*, 5, 730-7, 2004.
- (44) Saito T.; Hirai R.; Loo Y. M.; Owen D.; Johnson C. L.; Sinha S. C.; Akira S.; Fujita T.; Gale M. Jr., Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor

domain in RIG-I and LGP2., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 582-7, 104, 2007.

- (45) Kowalinski E.; Lunardi T.; Mccarthy A. A.; Loubser J.; Brunel J.; Grigorov B.; Gerlier D.; Cusack S., Structural Basis for the Activation of Innate Immune Pattern Recognition Receptor RIG-I by Viral RNA., *Cell.*, 147, 423-35, 2011.
- (46) Kawai T.; Takahashi K.; Sato S.; Coban C.; Kumar H.; Kato H.; Ishii K. J.; Takeuchi O.; Akira S., IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction., *Nat. Immunol.*, 6, 981-8, 2005.
- (47) Seth R. B.; Sun L.; Ea C. K.; Chen Z. J., Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF 3., *Cell.*, 122, 669-82, 2005.
- (48) Liu P.; Jamaluddin M.; Li K.; Garofalo R. P.; Casola A.; Brasier A. R., Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells., *J. Virol.*, 81, 1401-11, 2007.
- (49) Ramana K. V.; Fadl A. A.; Tammali R.; Reddy A. B.; Chopra A. K.; Srivastava S. K.; Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J. Biol. Chem.*, 281, 33019-29, 2006.
- (50) Kim M. S.; Park S. B.; Suk K.; Kim I. K.; Kim S. Y.; Kim J. A.; Lee S. H.; Kim S. H.; Gallotannin isolated from Euphorbia species, 1,2,6-tri-O-galloyl-beta-D-allose, decreases nitric oxide production through inhibition of nuclear factor-kappa B and downstream inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1053-1056, 2009.
- (51) Bogle R. G.; Baydoun A. R.; Pearson J. D.; Moncada S.; Mann G. E., L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide., *Biochem. J.*, 284, 15-18, 1992.
- (52) MacMicking J. D.; Nathan C.; Hom G.; Chartrain N.; Fletcher D. S.; Trumbauer M.; Stevens K.; Xie Q. W.; Sokol K.; Hutchinson N.; Chen H.; Mudgett J. S.,

Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase., *Cell.*, 81, 641-50, 1995.

- (53) Wei X. Q.; Charles I. G.; Smith A.; Ure J.; Feng G. J.; Huang F. P.; Xu D.; Muller W.; Moncada S.; Liew F. Y., Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase., *Nature.*, 375, 408-11, 1995.
- (54) Xie Q. W.; Kashiwabara Y.; and Nathan C., Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase., *J. Biol. Chem.*, 269, 4705-4708, 1994.
- (55) Crane B. R.; Arvai A. S.; Ghosh D. K.; Wu C.; Getzoff E. D.; Stuehr D. J.; Tainer J. A., Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate., *Science.*, 279, 2121-6, 1998.
- (56) Raman C. S.; Li H.; Martásek P.; Král V.; Masters B. S.; Poulos T. L., Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center., *Cell.*, 95, 939-50, 1998.
- (57) Zhang J.; Martásek P.; Paschke R.; Shea T.; Siler Masters B. S.; Kim J. J., Crystal structure of the FAD/NADPH-binding domain of rat neuronal nitric-oxide synthase. Comparisons with NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase., *J. Biol. Chem.*, 276, 37506-13, 2001.
- (58) Alderton W. K.; Cooper C. E.; Knowles R. G., Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition., *Biochem. J.*, 357, 593-615, 2001.
- (59) Titheradge M. A., Nitric oxide in septic shock., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1411, 437-55, 1999.
- (60) Feinstein D. L.; Galea E.; Aquino D. A.; Li G. C.; Xu H.; Reis D. J.; Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitricoxide synthase expression by decreasing NFkB activation., *J. Biol. Chem.*, 271, 17724-32, 1996.
- (61) Chio C. C.; Chang Y. H.; Hsu Y. W.; Chi K. H.; Lin W. W., PKA dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP., *Cell.*

Signal., 16, 565-75, 2004.

- (62) Kim J. M.; Oh Y. K.; Lee J. H.; Im D. Y.; Kim Y. J.; Youn J.; Lee C. H.; Son H.; Lee Y. S.; Park J. Y.; Choi I. H., Induction of proinflammatory mediators requires activation of the TRAF, NIK, IKK and NF- $\kappa$ B signal transduction pathway in astrocytes infected with *Escherichia coli*. *Clin. Exp. Immunol.*, 140, 450-60, 2005.
- (63) Woo C. H.; Lim J. H.; Kim J. H., Lipopolysaccharide induces matrixmetalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in RAW264.7 cells., *J. Immunol.*, 173, 6973-6980, 2004.
- (64) Liu S. F.; Malik A. B. NF- B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 290, 622-645, 2006.
- (65) Su Y. W.; Chiou W. F.; Chao S. H.; Lee M. H.; Chen C. C.; Tsai Y. C. Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- B and AP-1 signaling pathways., *Int. Immunopharmacol.*, 11, 1166-72, 2011.
- (66) Vane J. R., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs., *Nat. New. Biol.*, 231, 232-235, 1971.
- (67) Smith W. L.; Marnett L. J., Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1083, 1-17, 1991.
- (68) Kang Y. J.; Wingerd B. A.; Arakawa T.; Smith W. L., Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation., *J. Immunol.*, 177, 8111-8122, 2006.
- (69) Willoughby D. A.; Moore A. R.; Colville-Nash P. R., COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease., *Lancet*, 355, 646-648, 2000.
- (70) Subbaramaiah K.; Dannenberg A. J., Cyclooxygenase 2: a molecular target for



cancer prevention and treatment., Trends. Pharmacol. Sci., 24, 96-102, 2003.

- (71) Landino L. M.; Crews B. C.; Timmons M. D.; Morrow J. D.; Marnett L. J., Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93., 15069-74, 1996.
- (72) Watts C.; Powis S., Pathways of antigen processing and presentation., Rev. Immunogenet., 1, 60-74, 1999.
- (73) Ley K.; Miller Y. I.; Hedrick C. C., Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 31, 1506-16, 2011.
- (74) Asagiri M.; Hirai T.; Kunigami T.; Kamano S.; Gober H. J.; Okamoto K.; Nishikawa K.; Latz E.; Golenbock D. T.; Aoki K.; Ohya K.; Imai Y.; Morishita Y.; Miyazono K.; Kato S.; Saftig P.; Takayanagi H., Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis., Science., 319, 624-7, 2008.
- (75) Sen R.; Baltimore D., Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences., Cell., 46, 705-716, 1986.
- (76) Baeurele P. A.; Baltimore, D., Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- $\kappa$ B transcription factor., Cell., 53, 211-217, 1986.
- (77) Baldwin A. S. Jr., The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights., Annu Rev Immunol., 14, 649-83, 1996.
- (78) Häcker H.; and Karin M., Regulation and function of IKK and IKK-related kinases., Science. Signaling., 357, 3, 2006.
- (79) Sören B.; Sten C., Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology., Biochem. J., 382, 393-409, 2004.
- (80) Rolf-Peter R.; Juri N.; Roderigo B., Characterization of Elements Determining the Dimerization Properties of RelB and p50., Mol. Cell. Biol., 15, 3100-3109, 1995.

- (81) Rolf-Peter R.; Juri N.; Rodorigo B., Characterization of Elements Determining the Dimerization Properties of RelB and p50., *Mol. Cell. Biol.*, 15, 3100-3109, 1995.
- (82) Bours V.; Franzoso G.; Azarenko V.; Park S.; Kanno T.; Brown K.; Siebenlist U., The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates Tyrough B motif via association with DNA-binding p50κB homodimers. *Cell.*, 72, 729-739, 1993.
- (83) Franzo G.; Bours V.; Park S.; Tomita-Yamaguchi M.; Kelly K.; Siebenlist U., The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-κB-mediated inhibition., *Nature.*, 359, 339-342, 1992.
- (84) Fujita T.; Nolan G. P.; Liou H.-C.; Scott M. L.; Baltimore D., The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates Tyrough p50 homodimers., *Genes. Dev.*, 7, 1354-1363, 1993.
- (85) Pomerantz J. L.; Baltimore D., Two pathways to NF-κB. *Mol. Cell.*, 10, 693-701, 2002.
- (86) Shirane M.; Hatakeyama S.; Hattori K.; Nakayama K.; Nakayama K., Common pathway for the ubiquitination of IκBα, IκBβ, and IκBγ mediated by the F-box protein FWD1., *J. Biol. Chem.*, 274, 28169-28176, 1999.
- (87) Treaencker E. B.; Wilk S.; Baeuerle P. A., A proteasome inhibitor prevents activation of NF-κB and stabilizes a newly phosphorylated form of IκBα that is still bound to NF-κB. *EMBO. J.*, 13, 5433-5441, 1994.
- (88) Claudio E.; Brown K.; Park S.; Wang H.; Siebenlist U., BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-κB2 in maturing B cells., *Nat. Immunol.*, 3, 958-65, 2002.
- (89) Tokunaga F.; Sakata S.; Saeki Y.; Satomi Y.; Kirisako T.; Kamei K.; Nakagawa T.; Kato M.; Murata S.; Yamaoka S.; Yamamoto M.; Akira S.; Takao T.; Tanaka K.; Iwai K., Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-κB activation., *Nat. Cell. Biol.*, 11, 123-32, 2009.
- (90) Tokunaga F.; Nakagawa T.; Nakahara M.; Saeki Y.; Taniguchi M.; Sakata S.; Tanaka

K.; Nakano H.; Iwai K., SHARPIN is a component of the NF- $\kappa$ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex., *Nature.*, 471, 633-6, 2011.

- (91) Gerlach B.; Cordier S. M.; Schmukle A. C.; Emmerich C. H.; Rieser E.; Haas T. L.; Webb A. I.; Rickard J. A.; Anderton H.; Wong W. W.; Nachbur U.; Gangoda L.; Warnken U.; Purcell A. W.; Silke J.; Walczak H., Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling., *Nature.*, 471, 591-6, 2011.
- (92) Tsuchiya Y.; Asano T.; Nakayama K.; Kato T. Jr.; Karin M.; Kamata H., Nuclear IKK $\beta$  is an adaptor protein for I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination and degradation in UV-induced NF- $\kappa$ B activation., *Mol. Cell.*, 39, 570-82, 2010.
- (93) Kolb W. P.; Granger G. A., Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 61, 1250-5, 1968.
- (94) Ware C. F.; Vanarsdale T. L.; Crowe P. D.; Browning J. L.; The Ligands and Receptors of the Lymphotoxin System., *Curr. Top. Microbol. Immunol.*, 198, 175-218, 1995.
- (95) Senftleben U.; Cao Y.; Xiao G.; Greten F. R.; Krahn G.; Chen Y.; Hu Y.; Fong A.; Sun S.-C.; Karin M., Activation by IKK $\alpha$  of a second evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway., *Science*, 293, 1495-1499, 2001.
- (96) Senftleben U.; Cao Y.; Xiao G.; Chen Y.; Hu Y.; Fong A.; Sun S.-C.; Karin, M., Activation by IKK $\alpha$  of a second evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science*, 293, 1495-1499, 2001.
- (97) Kaisho T.; Takeda K.; Tsujimura T.; Kawai T.; Nomura F.; Terade N; Akira S., I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  is essential for mature B cell development and function., *J. Exp. Med*, 193, 417-426, 2001.
- (98) Zarnegar B. J.; Wang Y.; Mahoney D. J.; Dempsey P. W.; Cheung H. H.; He J.; Shiba T.; Yang X.; Yeh W. C.; Mak T. W.; Korneluk R. G.; Cheng G., Noncanonical NF- $\kappa$ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK., *Nat Immunol.*, 9, 1371-8, 2008.

- (99) Vallabhapurapu S.; Matsuzawa A.; Zhang W.; Tseng P. H.; Keats J. J.; Wang H.; Vignali D. A.; Bergsagel P. L.; Karin M., Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- $\kappa$ B signaling., *Nat. Immunol.*, 9, 1364-70, 2008.
- (100) Pickart C. M., Targeting of substrates to the 26S proteasome., *FASEB. J.*, 1055-66, 1997.
- (101) Yamamoto M.; Ito T.; Shimizu T.; Ishida T.; Semba K.; Watanabe S.; Yamaguchi N.; Inoue J., Epigenetic alteration of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer., *Cancer Sci.*, 101, 2391-7, 2010.
- (102) Fagerlund R.; Kinnunen L.; Köhler M.; Julkunen I.; Melén K., NF- $\kappa$ B is transported into the nucleus by importin  $\alpha$ 3 and importin  $\alpha$ 4., *J. Biol. Chem.*, 280, 15942-51, 2005.
- (103) Adam S. A.; Gerace L., Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import., *Cell.*, 66, 837-47, 1991.
- (104) Adam E. J.; Adam S. A., Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope., *J. Cell. Biol.*, 125, 547-55, 1994.
- (105) Görlich D.; Prehn S.; Laskey R. A.; Hartmann E., Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import., *Cell.*, 79, 767-78, 1994.
- (106) Görlich D.; Kostka S.; Kraft R.; Dingwall C.; Laskey R. A.; Hartmann E.; Prehn S., Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope., *Curr. Biol.*, 5, 383-92, 1995.
- (107) Imamoto N.; Shimamoto T.; Takao T.; Tachibana T.; Kose S.; Matsubae M.; Sekimoto T.; Shimonishi Y.; Yoneda Y., In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import., *EMBO. J.*, 14, 3617-26, 1995.

- (108) Macara I. G., Transport into and out of the nucleus., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 570-94, 2001.
- (109) Fagerlund R.; Melén K.; Cao X.; Julkunen I., NF- $\kappa$ B p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin  $\alpha$  molecules., *Cell. Signal.*, 20, 1442-51, 2008.
- (110) Fagerlund R.; Kinnunen L.; Köhler M.; Julkunen I.; Melén K., NF- $\kappa$ B is transported into the nucleus by importin  $\alpha$ 3 and importin  $\alpha$ 4., *J. Biol. Chem.*, 280, 15942-51, 2005.
- (111) Lee S. H.; Hannink M., The N-terminal nuclear export sequence of I $\kappa$ B $\alpha$  is required for Ran GTP-dependent binding to CRM1., *J. Biol. Chem.*, 276, 23599-606., 2001.
- (112) Weil R.; Sirma H.; Giannini C.; Kremsdorf D.; Bessia C.; Dargemont C.; Bréchet C.; Israël A., Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ ., *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6345-54, 1999.
- (113) Solan N. J.; Miyoshi H.; Carmona E. M.; Bren G. D.; Paya C. V., RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100., *J. Biol. Chem.*, 277, 1405-18, 2002.
- (114) Aguilera C.; Fernández-Majada V.; Inglés-Esteve J.; Rodilla V.; Bigas A.; Espinosa L., Efficient nuclear export of p65-I $\kappa$ B $\alpha$  complexes requires 14-3-3 proteins., *J. Cell. Sci.*, 119, 3695-704, 2006.
- (115) Kelly D.; Campbell J. I.; King T. P.; Grant G.; Jansson E. A.; Coutts A. G.; Pettersson S.; Conway S., Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA., *Nat. Immunol.*, 5, 104-12, 2004.
- (116) Wang L. H.; Yang X. Y.; Zhang X.; Farrar W. L., Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPAR $\gamma$  cross talk with NF- $\kappa$ B and C/EBP., *Blood.*, 110, 4373-84, 2007.

- (117) Lee H.; Herrmann A.; Deng J. H.; Kujawski M.; Niu G.; Li Z.; Forman S.; Jove R.; Pardoll D. M.; Yu H., Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF- $\kappa$ B activity in tumors., *Cancer Cell.*, 15, 283-93, 2009.
- (118) Shembade N.; Pujari R.; Harhaj N. S.; Abbott D. W.; Harhaj E. W., The kinase IKK $\alpha$  inhibits activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1., *Nat Immunol.*, 12, 834-43, 2011.
- (119) Lawrence T.; Bebien M.; Liu G. Y.; Nizet V.; Karin M., IKK $\alpha$  limits macrophage NF- $\kappa$ B activation and contributes to the resolution of inflammation., *Nature.*, 434, 1138-43, 2005.
- (120) Jin D. Y.; Teramoto H.; Giam C. Z.; Chun R. F.; Gutkind J. S.; Jeang K. T., A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor  $\alpha$ ., *J. Biol. Chem.*, 272, 25816-23, 1997.
- (121) Shembade N.; Ma A.; Harhaj E. W., Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes., *Science.*, 327, 1135-9, 2010.
- (122) Yamaguchi K.; Watanabe T., Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan., *Int. J. Hematol.*, 76, 240-5, 2002.
- (123) Watanabe T., HTLV-1-associated diseases., *Int. J. Hematol.*, 66, 257-78, 1997.
- (124) Yoshida M.; Suzuki T.; Fujisawa J.; Hirai H., HTLV-1 oncoprotein tax and cellular transcription factors., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 193, 79-89, 1995.
- (125) Bex F.; Gaynor R. B., Regulation of gene expression by HTLV-I Tax protein., *Methods.*, 16, 83-94, 1998.
- (126) Okamoto T.; Ohno Y.; Tsugane S.; Watanabe S.; Shimoyama M.; Tajima K.; Miwa M.; Shimotohno K., Multi-step carcinogenesis model for adult T-cell leukemia., *Jpn. J. Cancer. Res.*, 80, 191-5, 1989.
- (127) Inoue J.; Yoshida M.; Seiki M., Transcriptional (p40x) and post-transcriptional

- (p27x-III) regulators are required for the expression and replication of human T-cell leukemia virus type I genes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 84, 3653-7, 1987.
- (128) Tamiya S.; Matsuoka M.; Etoh K.; Watanabe T.; Kamihira S.; Yamaguchi K.; Takatsuki K., Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia., *Blood.*, 88, 3065-73, 1996.
- (129) Furukawa Y.; Kubota R.; Tara M.; Izumo S.; Osame M., Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia., *Blood.*, 97, 987-93, 2001.
- (130) Kannagi M.; Harada S.; Maruyama I.; Inoko H.; Igarashi H.; Kuwashima G.; Sato S.; Morita M.; Kidokoro M.; Sugimoto M, et al., Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells., *Int. Immunol.*, 3, 761-7, 1991.
- (131) Akagi T.; Ono H.; Sasaki T.; Shimotohno K., Increased protein tyrosine-phosphorylation in primary T-cells transduced with Tax1 of human T-cell leukemia virus type I., *FEBS. Lett.*, 358, 1995.
- (132) Mori N.; Fujii M.; Ikeda S.; Yamada Y.; Tomonaga M.; Ballard D. W.; Yamamoto N., Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells., *Blood.*, 93, 2360-8, 1999.
- (133) Yamaoka S.; Courtois G.; Bessia C.; Whiteside S. T.; Weil R.; Agou F.; Kirk H. E.; Kay R. J.; Israël A., Complementation cloning of NEMO, a component of the IκB kinase complex essential for NF-κB activation., *Cell.*, 93, 1231-40.
- (134) Watanabe M.; Ohsugi T.; Shoda M.; Ishida T.; Aizawa S.; Maruyama-Nagai M.; Utsunomiya A.; Koga S.; Yamada Y.; Kamihira S.; Okayama A.; Kikuchi H.; Uozumi K.; Yamaguchi K.; Higashihara M.; Umezawa K.; Watanabe T.; Horie R., Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-κB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia., *Blood.*, 106, 2462-71, 2005.
- (135) Shoji T.; Higuchi M.; Kondo R.; Takahashi M.; Oie M.; Tanaka Y.; Aoyagi Y.; Fujii

- M., Identification of a novel motif responsible for the distinctive transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1 protein from HTLV-2 Tax2., *Retrovirology.*, 6, 83, 2009.
- (136) Aoyagi T.; Takahashi M.; Higuchi M.; Oie M.; Tanaka Y.; Kiyono T.; Aoyagi Y.; Fujii M., The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation., *Virus Genes.*, 40, 193-9, 2010.
- (137) Tsuchida T.; Umekita M.; Kinoshita N.; Iimura H.; Nakamura H.; Nakamura K.; Nakagawa H.; Sawa T.; Hamada M.; Takenchi T., epoxyquinomycins A and B, new antibiotics from *Amycolatopsis*, *J. Antibiot.*, 49, 326-328, 1996.
- (138) Matsumoto N.; Iinuma H.; Sawa T.; Takeuchi T.; Hirano S.; Yoshioka T.; Ishizuka M., Epoxyquinomicins A, B, C and D, new antibiotics from *Amycolatopsis*. II. Effect on type II collagen-induced arthritis in mice., *J. Antibiot.*, 50, 906-11, 1997.
- (139) Erkel G.; Anke T.; Sterner O., Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by panepoxydone., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 214-221, 1996.
- (140) Gehrt A.; Erkel T.; Sterner O., Cycloepoxydon, 1-hydroxy-2-hydroxyl-3-pent-1-enylbenzene and 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-pent-1,3-dienylbenzene, new inhibitors of eukaryonic signal transduction., *J. Antibiot.*, 51, 455-463, 1998.
- (141) Matsumoto N.; Ariga A.; To-e S.; Nakamura H.; Agata N.; Hirano S.; Inoue J.; Umezawa K., Synthesis of NF- $\kappa$ B activation inhibitors derived from epoxyquinomycin C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 865-869, 2000.
- (142) Matsumoto G.; Namekawa J.; Muta M.; Nakamura T.; Bando H.; Tohyama K.; Toi M.; Umezawa K., Targeting of nuclear factor kappaB Pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo., *Clin. Cancer. Res.*, 11, 1287-93, 2005.
- (143) Yamamoto M.; Horie R.; Takeiri M.; Kozawa I.; Umezawa K., Inactivation of



- NF-kappaB components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues., *J. Med. Chem.*, 51, 5780-8, 2008.
- (144) García-Piñeres A. J.; Castro V.; Mora G.; Schmidt T. J.; Strunck E.; Pahl H. L.; Merfort I., Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones., *J. Biol. Chem.*, 276, 39713-20, 2001.
- (145) Hehner S. P.; Heinrich M.; Bork P. M.; Vogt M.; Ratter F.; Lehmann V.; Schulze-Osthoff. K.; Dröge W.; Schmitz M. L., Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF- $\kappa$ B by preventing the degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$ ., *J. Biol. Chem.*, 273, 1288-97, 1998.
- (146) Hehner S. P.; Hofmann T. G.; Dröge W.; Schmitz M. L., The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- $\kappa$ B by targeting the I $\kappa$ B kinase complex., *J. Immunol.*, 163, 5617-23, 1999.
- (147) Kakeya H.; Onose R.; Koshino H.; Yoshida A.; Kobayashi K.; Kageyama S.; Osada H., Epoxyquinol A, a highly functionalized pentaketide dimer with antiangiogenic activity isolated from fungal metabolites., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 3496-7, 2002.
- (148) Kakeya H.; Onose R.; Yoshida A.; Koshino H.; Osada H., Epoxyquinol B, a fungal metabolite with a potent antiangiogenic activity., *J. Antibiot.*, 55, 829-31, 2002.
- (149) Kamiyama H.; Kakeya H.; Usui T.; Nishikawa K.; Shoji M.; Hayashi Y.; Osada H., Epoxyquinol B shows antiangiogenic and antitumor effects by inhibiting VEGFR2, EGFR, FGFR, and PDGFR., *Oncol Res.*, 17, 11-21, 2008.
- (150) Kamiyama H.; Usui T.; Sakurai H.; Shoji M.; Hayashi Y.; Kakeya H.; Osada H., Epoxyquinol B, a naturally occurring pentaketide dimer, inhibits NF- $\kappa$ B signaling by crosslinking TAK1., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1894-900, 2008.
- (151) Li C.; Bardhan S.; Pace E. A.; Liang M. C.; Gilmore T. D.; Porco J. A. Jr., Angiogenesis inhibitor epoxyquinol a: total synthesis and inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B., *Org. Lett.*, 4, 3267-70, 2002.

- (152) Li C.; Porco J. A. Jr., Synthesis of epoxyquinol A and related molecules: probing chemical reactivity of epoxyquinol dimers and 2H-pyran precursors., *J. Org. Chem.*, 70, 6053-6065, 2005.
- (153) Shoji M.; Imai H.; Mukaida M.; Sakai K.; Takeya H.; Osada H.; Hayashi Y., Total synthesis of epoxyquinols A, B, and C and epoxytwinol A and the reactivity of a 2H-pyran derivative as the diene component in the Diels-Alder reaction., *J. Org. Chem.*, 70, 79-91, 2005.
- (154) Liang M. C.; Bardhan S.; Pace E. A.; Rosman D.; Beutler J. A.; Porco J. A. Jr.; Gilmore T. D., Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B signaling proteins IKK $\beta$  and p65 through specific cysteine residues by epoxyquinone A monomer: correlation with its anti-cancer cell growth activity., *Biochem. Pharmacol.*, 71, 634-45, 2006.
- (155) Wakamatsu K.; Nanki T.; Miyasaka N.; Umezawa K.; Kubota T. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells. *Arthritis. Res. Ther.*, 7, R1348-59, 2005.
- (156) Miyajima A.; Kosaka T.; Seta K.; Asano T.; Umezawa K.; Hayakawa M. Novel nuclear factor  $\kappa$ B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction. *J. Urol.*, 169, 1559-63, 2003.
- (157) Kuroda K.; Horiguchi Y.; Nakashima J.; Kikuchi E.; Kanao K.; Miyajima A.; Ohigashi T.; Umezawa K.; Murai M., Prevention of cancer cachexia by a novel nuclear factor  $\kappa$ B inhibitor in prostate cancer., *Clin. Cancer. Res.*, 11, 5590-4, 2005.
- (158) Kubota T.; Hoshino M.; Aoki K.; Ohya K.; Komano Y.; Nanki T.; Miyasaka N.; Umezawa K., NF- $\kappa$ B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin suppresses osteoclastogenesis and expression of NFATc1 in mouse arthritis without affecting expression of RANKL, osteoprotegerin or macrophage colony-stimulating factor., *Arthritis. Res. Ther.*, 9, R97, 2007.
- (159) Kikuchi E.; Horiguchi Y.; Nakashima J.; Kuroda K.; Oya M.; Ohigashi T.; Takahashi N.; Shima Y.; Umezawa K.; Murai M., Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor  $\kappa$ B inhibitor in nude mice., *Cancer. Res.*, 63, 107-10, 2003.

- (160) Starenki D. V.; Namba H.; Saenko V. A.; Ohtsuru A.; Maeda S.; Umezawa, K.; Yamashita S., Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin., *Clin. Cancer. Res.*, 10, 6821-9, 2004.
- (161) Matsumoto G.; Namekawa J.; Muta M.; Nakamura T.; Bando H.; Tohyama K.; Toi M.; Umezawa K., Targeting of nuclear factor  $\kappa$ B Pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo., *Clin. Cancer. Res.*, 11, 1287-93, 2005.
- (162) Matsumoto G.; Muta M.; Umezawa K.; Suzuki T.; Misumi K.; Tsuruta K.; Okamoto A.; Toi M., Enhancement of the caspase-independent apoptotic sensitivity of pancreatic cancer cells by DHMEQ, an NF- $\kappa$ B inhibitor., *Int. J. Oncol.*, 27, 1247-55, 2005.
- (163) Tatetsu H., Okuno Y., Nakamura M., Matsuno F.; Sonoki T.; Taniguchi I.; Uneda S.; Umezawa K.; Mitsuya H.; Hata H., Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma cells in an I $\kappa$ B $\alpha$ -independent manner., *Mol. Cancer. Ther.*, 4, 1114-20, 2005.
- (164) Umezawa K., Inhibition of tumor growth by NF- $\kappa$ B inhibitors., *Cancer. Sci.*, 97, 990-5, 2006.
- (165) Wang Z. C.; Igarashi M.; Ikeda Y.; Horie R.; Umezawa K. Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by 9-methylstreptimidone isolated from *Streptomyces*., *Heterocycles*., 69, 377-383, 2006.
- (166) Saito N.; Suzuki F.; Sasaki K.; Ishida N., Antiviral and interferon-inducing activity of a new glutarimide antibiotic, 9-methylstreptimidone., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 10, 14-19, 1976.
- (167) Umenai T.; Suzuki F.; Ishida N., Effect of an interferon inducer, 9-methylstreptimidone, on *Candida albicans* infection in mice., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 13, 939-943, 1978.

- (168) Ishikawa Y.; Tachibana M.; Matsui C.; Obata R.; Umezawa K.; Nishiyama S., Synthesis and biological evaluation on novel analogs of 9-methylstreptimidone, an inhibitor of NF- $\kappa$ B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 1726-8, 2009.
- (169) Dignm J. D.; Lebovitz R. M.; Roeder R. G., Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei., *Nucleic Acids Res.*, 11, 1475-89, 1983.
- (170) Andrews N. C.; Faller D. V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells., *Nucleic Acids Res.*, 19, 2499, 1991.
- (171) Chen F. E.; Huang D. B.; Chen Y. Q.; Ghosh G., Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- $\kappa$ B bound to DNA., *Nature*, 391, 410-413, 1998.
- (172) Cramer P.; Larson C. J.; Verdine G. L.; Müller C. W., Structure of the human NF- $\kappa$ B p52 homodimer-DNA complex at 2.1 Å resolution., *EMBO. J.*, 16, 7078-7090, 1997.
- (173) Fusco A. J.; Huang D. B.; Miller D.; Wang V. Y.; Vu D.; Ghosh G., NF- $\kappa$ B p52:RelB heterodimer recognizes two classes of  $\kappa$ B sites with two distinct modes., *EMBO. Rep.*, 152-9, 2009
- (174) Harhaj E W.; Harhaj N. S., Mechanisms of persistent NF- $\kappa$ B activation by HTLV-I tax., *IUBMB. Life.*, 83-91, 2005.
- (175) Inn K. S.; Gack M. U.; Tokunaga F.; Shi M.; Wong L. Y.; Iwai K.; Jung J. U., Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction., 41, 354-65, *Mol. Cell.*, 2011.
- (176) Rosebeck S.; Madden L.; Jin X.; Gu S.; Apel I. J.; Appert A.; Hamoudi R. A.; Noels H.; Sagaert X.; Van Loo P.; Baens M.; Du M. Q.; Lucas P. C.; McAllister-Lucas L. M., Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF- $\kappa$ B activation., *Science.*, 331, 468-72, 2011.
- (177) Fusco A. J.; Savinova O. V.; Talwar R.; Kearns J. D.; Hoffmann A.; Ghosh G.,

- Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52., *J. Biol. Chem.*, 283, 12324-32, 2008.
- (178) Toledano M. B.; Ghosh D.; Trinh F.; Leonard W. J., N-terminal DNA-binding domains contribute to differential DNA-binding specificities of NF- $\kappa$ B p50 and p65., *Mol. Cell. Biol.*, 13, 852-60, 1993.
- (179) Hailfinger S.; Nogai H.; Pelzer C.; Jaworski M.; Cabalzar K.; Charton J. E.; Guzzardi M.; Décaillot C.; Grau M.; Dörken B.; Lenz P.; Lenz G.; Thome M., Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF- $\kappa$ B activation in lymphocytes and lymphoma cell lines., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 14596-601, 2011.
- (180) Schaus R., Griess' nitrite test in diagnosis of urinary infection. *J. Am. Med. Assoc.*, 161, 528-529, 1956.
- (181) Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63, 1983.
- (182) Sun S. C., Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway., *Cell Res.*, 21, 71-85, 2010.
- (183) Razani B.; Zarnegar B.; Ytterberg A. J.; Shiba T.; Dempsey P. W.; Ware C. F.; Loo J. A.; Cheng G., Negative feedback in noncanonical NF- $\kappa$ B signaling modulates NIK stability through IKK $\alpha$ -mediated phosphorylation., *Sci. Signal.*, 3, ra41, 2010.

## 第6章 謝辞

本研究の遂行に際して、終始御指導、御鞭撻を賜り、常に温かく研究生活を支えて頂きました慶應義塾大学理工学部教授 梅澤一夫博士に深く感謝するとともに、敬意を表します。

本研究の遂行に当たり有益なご助言、御指導を賜りました慶應義塾大学理工学部教授 西山繁博士、同教授 戸嶋一敦博士、同准教授 末永聖武博士、並びに慶應義塾大学医学部薬理学教室教授 安井正人博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際して的確で丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部専任講師 清水史郎博士に深く感謝いたします。

また、有益な御指導、御助言を頂いた北里大学医学部血液内科学准教授 堀江良一博士、渡邊真理子博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、動物実験のご協力を賜りました北海道大学医学部第一外科学教授 藤堂省博士、同分子制御外科学講座教授 尾崎倫孝博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、streptovitacin 類を合成、供与いただきました東北大学大学院農学研究科准教授 清田洋正博士に深く感謝いたします。

MOE の使用についてご丁寧な指導をして頂きました慶應義塾大学理工学部助教 高橋大介博士に深く感謝いたします。

化合物の合成、合成化学的見地からの的確なご助言を頂きました慶應義塾大学理工学部助教 斉藤毅修士に深く感謝いたします。

DTCM-glutarimide、9-methylstreptimidone 類似体の合成、化学的見地からの御助言を賜りました横浜市立大学国際総合科学部助教 石川裕一博士、慶應義塾大学理工学部化学科西山研究室 修士課程 2 年 太田英介君に深く感謝いたします。

在学中、卒業後ともに常に温かな指導、ご助言を賜りました東京農工大学農学部応用生物科学科発酵研究室助教 鈴木絵里子博士に深謝すると共に敬意を表します。

在学中、卒業後ともに師匠として実験のみならず、研究室生活を含め様々な面で御指導頂いた東京大学大学院医科学研究所分子発癌分野 博士課程 4 年 山本瑞生さんに深く感謝すると共に敬意を表します。

研究の御指導、常に親身になって御助言を下された慶應義塾大学理工学研究科 松井知野さんに深く感謝いたします。

同期として常に切磋琢磨し、討論を交わした慶應義塾大学理工学部分子生命化学研究室 博士課程 3 年 谷本周穂君に感謝と敬意を表します。

研究室生活を共に過ごし、切磋琢磨し合えた岩佐俊君、神林佑輔君、戸田崇

史君、橘みゆきさん、原田皓子さん、宮西那実さんに深く感謝いたします。

頼りない私ではありましたが、弟子としてついてきてくれ、討論を交わした兼田亜弓さん、坂下雅子さん、小笠原彬君、伊藤あゆみさん、堀江佳奈さんに深く感謝いたします。

そして、研究室生活を公私ともに支えていただいた生物化学研究室の先輩、後輩の皆様に深く感謝いたします。

また、大学生活を共に過ごした友人たちに深く感謝いたします。

最後に、勉学の機会を与え、大学生活、研究室生活を終始支え続けて下さった両親、祖母に深く感謝いたします。