

抗アレルギー物質(-)-maackiain の
標的分子の探索及びヒスタミン H₁ 受容体
遺伝子発現シグナルに対する影響

2017
成相 祐希

目次

第1章 緒言	1
第2章 アレルギー疾患感受性遺伝子の遺伝子発現亢進に対する (-)-maackiain の効果	4
2.1 序論	5
2.2 実験方法	7
2.2.1. 使用した試薬・キット	7
2.2.2. (±)-Maackiain の合成.....	7
2.2.3. 動物実験	8
2.2.3.1 実験動物.....	8
2.2.3.2 鼻過敏症モデルラット.....	8
2.2.3.3 (±)-Maackiain の投与.....	8
2.2.3.4 鼻過敏症症状の評価.....	8
2.2.3.5 ラット鼻粘膜組織サンプルの調整.....	9
2.2.3.6 組織からの total RNA 抽出	9
2.2.4 培養細胞を用いた実験	9
2.2.4.1 細胞培養及び薬剤処置.....	9
2.2.4.2 Total RNA 抽出.....	10
2.2.5. 定量リアルタイム RT-PCR	10
2.2.5.1 逆転写反応.....	10
2.2.5.2 定量リアルタイム RT-PCR.....	10
2.2.6. ウェスタンブロット	11
2.2.6.1 タンパク抽出.....	11
2.2.6.2 SDS-PAGE.....	12
2.2.6.3 ウェスタンブロット.....	12
2.2.7. PKCδ キナーゼアッセイ	13
2.2.8. (±)-Maackiain の分割.....	13
2.2.9. 統計処理	13
2.3 実験結果	14
2.3.1. (±)-Maackiain の合成.....	14
2.3.2. 鼻過敏症モデルラットに対する(±)-maackian の効果.....	15
2.3.3. Maackiain の H1R 遺伝子発現亢進に対する効果.....	16
2.3.4. PKCδ のリン酸化に対する(-)-maackiain の効果	17

2.3.5. PKC δ のキナーゼ活性に対する(-)-maackiain の効果	18
2.4 考察	19
第3章 (-)-Maackiain 標的分子の探索及びヒスタミン H ₁ 受容体遺伝子発現に対する(-)-maackiain 標的分子の関与	21
3.1. 序論	22
3.2. 実験方法	23
3.2.1. 使用した試薬・キットなど	23
3.2.2. 細胞培養及び薬剤処置	23
3.2.3. (-)-maackiain の分子標的の探索	23
3.2.4. HSP90 と(-)-maackiain の相互作用	24
3.2.5. (-)-Maackiain immobilized beads binding assay	24
3.2.5.1 (-)-Maackiain immobilized beads の作製	24
3.2.5.2 HeLa 細胞溶解液サンプルの調製	25
3.2.5.3 各試薬溶液の調製	25
3.2.5.4 (-)-Maackiain immobilized beads binding assay	25
3.2.6. ATP beads binding assay	26
3.2.7. ゲルダナマイシン competition assay	26
3.2.8. HSP90 ATPase assay	27
3.2.9. 定量リアルタイム RT-PCR	27
3.2.10. ウェスタンブロット	27
3.2.11. 鼻過敏症モデルラットに対する celastrol の効果	27
3.2.12. 共免疫沈降	27
3.2.13. 免疫蛍光染色	28
3.3. 実験結果	29
3.3.1. (-)-maackiain の分子標的の探索	29
3.3.2. HSP90 と(-)-maackiain の相互作用	30
3.3.3. (-)-Maackiain immobilized beads binding assay	31
3.3.4. ATP beads binding assay	31
3.3.5. ゲルダナマイシン competition assay	32
3.3.6. HSP90 ATPase assay	32
3.3.7. HSP90 阻害剤の H ₁ R 遺伝子発現亢進に対する効果	33
3.3.8. 鼻過敏症モデルラットに対する celastrol の効果	34
3.3.9. PKC δ のリン酸化に対する効果	35
3.3.10. HSP90-PKC δ の相互作用	36
3.3.11. PKC δ の Golgi への移行に対する HSP90 の関与	37
3.4 考察	40

第4章 総括	43
第5章 参考文献	46

第 1 章 緒言

アレルギー性鼻炎は日本において罹患率の高い疾患であり、通年性のものと季節性のものに分類される。花粉症は代表的なアレルギー疾患の一つであり樹木や草の花粉により誘発される季節性アレルギー性鼻炎である。アレルギー性鼻炎の治療法は、アレルギーの原因となるアレルゲンへの曝露を回避することが主とされ、薬物療法は抗ヒスタミン薬等を用いた対症療法となっている。そのため、医療におけるアレルギー性鼻炎の新薬のニーズは非常に高く、日本の医師に対して新薬ニーズを調査した PatientsMap 2014(株式会社社会情報サービス、エムスリー株式会社)では、季節性アレルギー性鼻炎・花粉症は認知症に次ぐ第2位であり、新薬の開発が望まれる。

これまでに、我々の研究室では、職業性喘息の原因物質として知られる toluene2,4-diisocyanate(TDI)を用いて作製する鼻過敏症モデルラットにおいて、発作誘発に伴い、鼻粘膜のヒスタミン H₁ 受容体(H1R)、ヒスチジン脱炭酸酵素及びアレルギー性炎症に関与することが知られる Th2 サイトカインであるインターロイキン(IL)-4 等の遺伝子発現が亢進することを明らかにし、抗ヒスタミン薬の反復投与によって、鼻症状の抑制に伴い H1R 遺伝子発現亢進が抑制されることを見出した。さらに、我々の研究室では、花粉症患者の鼻粘膜における H1R 遺伝子発現と症状が相関することを明らかにしている。

また、HeLa 細胞を用いた研究により、H1R はヒスタミン刺激により遺伝子発現が亢進し、H1R 遺伝子発現亢進において Protein kinase C(PKC) δ が関与することを明らかにした。さらに、PKC δ はヒスタミン及び PMA 刺激により細胞質から Golgi に移行することを見出し、H1R 遺伝子発現は PKC δ に加えて extracellular signal-regulated kinase(ERK)及び poly(ADP-ribose) polymerase-1 を介したシグナルによるものであることを明らかにした。

以上の知見から、H1R 遺伝子発現の亢進を抑制することは、効果的なアレルギー性鼻炎の治療に繋がると考えられ、PKC δ を初めとした H1R 遺伝子発現シグナルに関与する分子を標的とした化合物の探索は新規作用機序を有する治療薬の開発に繋がると考えられる。

これまでに、我々は様々な天然物に着目して研究を行ってきた。その中で、苦参が鼻過敏症モデルラットにおいて、鼻症状及び H1R や IL-4 等の遺伝子発現亢進を抑制することを見出した。そして、苦参より有効成分として(-)-maackiain を単離・同定した。本研究では、苦参より単離された抗アレルギー物質である(-)-maackiain に着目した。(-)-maackiain の鼻過敏症モデルラット及び H1R 遺伝子発現亢進に対する効果を検討し、標的分子の探索を行った。

第2章「アレルギー疾患感受性遺伝子の遺伝子発現亢進に対する(-)-maackiain の効果」において、(±)-maackiain の全合成を試みた。合成によって得た(±)-maackiain を鼻過敏症モデルラットに投与し、その効果を検討した。また、HeLa 細胞を用いて(-)-maackiain の H1R 遺伝子発現亢進に対する効果を検討した。さらに、(±)-maackiain をキラルカラムにより (-)-maackiain と(+)-maackiain に分割し、(+)-maackiain の H1R 遺伝子発現亢進に対する効果も検討した。加えて、H1R 遺伝子発現に強く関与する PKC δ のキナーゼ活性及び PKC δ の活性化に必要と考えられているリン酸化に対する(-)-maackiain の効果について検

討を行った。

第 3 章「(-)-Maackiain 標的分子の探索及びヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現に対する (-)-maackiain 標的分子の関与」において、(-)-maackiain の標的分子の探索を試みた。さらに、H1R 遺伝子発現における(-)-maackiain 標的分子の関与について検討を行った。

以上により、(-)-maackiain は H1R 遺伝子発現亢進を抑制し鼻過敏症モデルラットにおいて鼻症状を改善する効果を示し、(-)-maackiain の標的分子は H1R 遺伝子発現に関与していることを明らかにした。

第2章 アレルギー疾患感受性遺伝子の遺伝子発現亢進に対する(-)-maackiain の効果

2.1 序論

アレルギー疾患は遺伝子発現異常を伴う難治性多因子疾患である。アレルギー性鼻炎は通年性のものと季節性のものに分類される。花粉症は代表的なアレルギー疾患の一つであり樹木や草の花粉により誘発される季節性鼻過敏症であり、日本人の約 30%が罹患している国民病である[1, 2]。ヒスタミンはアレルギー性鼻炎を引き起こす主要ケミカルメディエーターである。ヒスタミンによるヒスタミン H₁ 受容体(H1R)の活性化は、くしゃみ、鼻汁、痒みを含むアレルギー性鼻炎の症状を引き起こす。

これまでに、我々の研究室は、toluene2,4-diisocyanate(TDI)を用いて作製する鼻過敏症モデルラット及び花粉症患者において H1R 遺伝子発現が鼻症状と強く相関することを報告している[3, 4]。さらに、恒常的に H1R を発現する HeLa 細胞において、ヒスタミン及び phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)刺激により、H1R 遺伝子発現が亢進することを明らかにした[5]。加えて、H1R 遺伝子発現は、PKC δ 、extracellular signal-regulated kinase(ERK)及び poly(ADP-ribose) polymerase-1 を介したシグナルによるものであることを明らかにした[6]。以上より、H1R 遺伝子発現亢進を抑制する化合物はアレルギー症状を緩和すると考えられる[7-9]。

また、Th1/Th2 バランスが Th2 側に傾くと鼻過敏症や喘息の症状を起こる[10]。それゆえ、インターロイキン(IL)-4、IL-5、IL-9 および IL-13 のような Th2 サイトカインはアレルギー性鼻炎において重要なメディエーターである。その中でも IL-4 は B 細胞における IgE 産生や Th2 反応の増大に中心的な役割をはたしている[11]。我々の研究室は、鼻過敏症モデルラットにおいて、IL-4 の遺伝子発現が亢進していることを明らかにした[12]。

一方で、我々の研究室は、抗アレルギー作用を有することが古くから知られる天然物に着目して研究を行ってきた。その中の一つである苦参が鼻症状や H1R や IL-4 の遺伝子発現亢進を抑制することを鼻過敏症モデルラットにおいて見出している[13]。苦参は外用の炎症抑制剤として用いられる和漢薬であり、アトピー性皮膚炎などに処方される消風散の生薬原料としても用いられる。そして、RBL2H-3 細胞における IL-4 遺伝子発現亢進に対する抑制活性を指標として、苦参より有効成分として(-)-maackiain を単離・同定した。苦参は鼻過敏症モデルラットにおいて、鼻症状や H1R 遺伝子発現亢進を抑制することから、(-)-maackiain も H1R 遺伝子発現亢進抑制活性を示すこと、鼻過敏症モデルラットにおいて鼻症状を緩和する効果を示すことが考えられる。

本研究では、鼻過敏症モデルラットに対する(-)-maackiain の効果を検討するため、実験に用いる(±)-maackiain の全合成を試みた。既存の合成方法は水銀やタリウムといった有毒の重金属類を用いるため、生体や環境に対する負荷が大きいと考えられる[14, 15]。そこで、より安全性の高い合成経路の検討を行った。合成した(±)-maackiain を鼻過敏症モデルラットに経口投与し、鼻過敏症モデルラットの鼻症状及び H1R 遺伝子発現亢進に対する効果を評価した。また、HeLa 細胞を用いて、(-)-maackiain 及び(±)-maackiain より単離した

(+)-maackiain の H1R 遺伝子発現亢進に対する効果を検討した。HeLa 細胞におけるヒスタミン刺激及び PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進は PKC δ 選択的阻害剤である rottlerin により抑制されることから、H1R の遺伝子発現において PKC δ は強く関与していることが考えられる。そこで、PKC δ のキナーゼ活性及び PKC δ の活性化に必要であるとされているチロシン(Y)311 のリン酸化に対する(-)-maackiain の効果の検討を行った。

2.2 実験方法

2.2.1. 使用した試薬・キット

Toluene, 2,4-diisocyanate (TDI) は和光純薬工業株式会社から、MEM-alpha 培地は Gibco から、RNA later 及び High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits は Applied Biosystems から、プロテアーゼインヒビター (Complete Mini) 及び フォスファターゼインヒビター (Phos STOP) は Roche から、ウサギ抗ヒト PKC δ 抗体 (C-20) は Santa Cruz Biotechnology から、ウサギ抗ヒト p-PKC δ (Tyr311) 抗体及びマウス抗ヒト β -actin 抗体は Cell Signaling Technology から、Goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate 及び Immuno-Star goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate は Bio-Rad から、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate は Merck Millipore から、PKC δ kinase enzyme system 及び ADP-Glo kinase assay kit は Promega からそれぞれ購入した。その他のすべての実験試薬は分析用試薬を使用した。

2.2.2. (±)-Maackiain の合成

(±)-Maackiain の全合成は Breytenbach らの方法 [14] を一部改良して行った。

^1H NMR と ^{13}C NMR は CDCl_3 を溶媒、TMS を基準物質として、Bruker AV400N を用いて測定した。MS は LCTPREMIER (Waters /Micromass) を用いて測定した。IR は FT/IR-6000 (JASCO) によって測定した。Silica gel 60N (関東化学) をカラムクロマトグラフィに用いた。

Bis(benzonitrile)palladium(II)dichloride は既知法に従って合成した [16]。

2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol は下記の方法により合成した。セサモール (300 mg, 2.17 mmol) を塩化メチレンに溶解し、氷冷しながら N-Bromosuccinimide (464 mg, 2.606 mmol) をゆっくり添加した。炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を止め、塩化メチレン層を飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥し、エバポレータで濃縮した。これをカラムクロマトグラフィ (hexane-chloroform, 1:2) により精製した。

(±)-3-Benzylmaackiaing は下記の方法により合成した。Breytenbach らの方法に従って合成した 7-Benzylloxy-2H-1-benzopyran 300mg (1equiv) 、 2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol 1093mg (3equiv) 、 potassium acetate 1300mg (9equiv) を、DMF 5mL に加えて 40 °C、argon 雰囲気下で攪拌した。bis(benzonitrile)palladium(II)dichloride を一日ごとに 49mg (0.1equiv) ずつ加え (計 4 回)、4 日間反応させた。反応液をろ過し、palladium を除いた後、brine で洗った。抽出は ethyl acetate で行い、 Na_2SO_4 で乾燥させた。ろ過し、エバポレートしたものをカラムクロマトグラフィ (methylene chloride-hexane, 1:1) で精製した。

(±)-Maackain は (±)-3-benzylmaackiaing より Breytenbach らの方法によって合成した。

2.2.3. 動物実験

2.2.3.1 実験動物

6週齢 Brown-Norway 系雄性ラット(SLC, Hamamatsu, Japan)を使用した。動物は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ の室温で 12 時間毎の昼夜サイクルで飼育した。すべての動物実験は、「徳島大学動物実験指針」に基づき徳島大学動物実験委員会において動物実験計画書の承認を受けた。

2.2.3.2 鼻過敏症モデルラット

TDI をラットの両側鼻前庭に反復塗布し感作させた後に TDI を塗布し誘発させることで鼻過敏症モデルラットを作製した。TDI 感作は、Sharabanti D らの方法に従って行った[13]。TDI 感作として、Brown-Norway 系雄性ラットの両側鼻前庭に極細耳鼻用綿棒を用い、10 μL の 10% TDI 酢酸エチル溶液を 1 日 1 回連日 2 週間塗布し(TDI 感作)、その後 1 週間無処置期間をおいた上で 10% TDI 酢酸エチル溶液の鼻前庭塗布にて誘発した(Fig. 1)。

なお、以上の実験における症状の観察および実験結果の比較のため、TDI 塗布と同時に同回数酢酸エチルのみを塗布した対照動物を用いた。

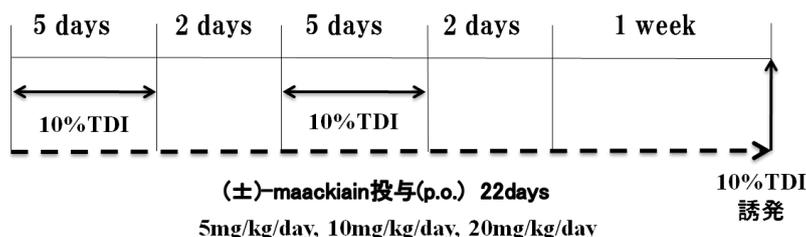


Figure 1. 鼻過敏症モデルラット作製スケジュール

2.2.3.3 (±)-Maackiain の投与

(±)-Maackiain は 2.3.2. Maackiain の合成により得たものを投与した。

0.5% Carboxymethylcellulose 懸濁液(蒸留水)に懸濁した(±)-maackiain (5, 10, 20mg/kg) を経口で TDI 誘発前に単回投与および、3 週間早期連続投与した(Fig. 1)。

2.2.3.4 鼻過敏症症状の評価

鼻過敏症症状は、くしゃみ回数を数え、鼻症状をスコアかすることで評価した。くしゃみ回数は 10% TDI 酢酸エチル溶液塗布による誘発後 10 分間のくしゃみ回数をカウントした。鼻症状のスコア化は、水溶性鼻漏及び鼻の腫れ・発赤を Table1 に示す指標により評価しスコア化した。

Table 1. 鼻症状スコア

鼻症状	スコア			
	0	1	2	3
水溶性鼻漏	(-)	鼻腔中	1 と 3 の間	鼻から落ちる
鼻の腫れ及び発赤	(-)	少し膨らむ	1 と 3 の間	強く腫れ上がる

2.2.3.5 ラット鼻粘膜組織サンプルの調整

TDI 感作 21 日目(TDI 誘発直前)、4 時間後に断頭し、鼻粘膜組織を採取して、mRNA の定量に供した。なお、採取した組織サンプルは後で処理するため、解剖後直ちに 500 μ L の RNA later 中に浸漬し、 -80°C で保存した。

2.2.3.6 組織からの total RNA 抽出

RNA later に保存していた組織を溶液から取り出し、組織量の 10 倍量の TRIzol Reagent (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% sodium lauryl sulfate, 100 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM sodium citrate; pH 7.0) に浸漬し、Polytron(Model PT-K; Kinematica AG, Littau/Luzern, Switzerland)を用いて直ちにホモジナイズして細胞を粉砕した後、遠心(12000 rpm、10 分、 4°C)して、可溶化されないゴミを沈殿させて取り除いた後、上清を以下の操作に用いた。室温で 5 分間放置した後、0.2 mL の chloroform を加え 15 秒間強く振盪し 2-3 分室温で放置後、遠心(15000 rpm、15 分、 4°C)して水層を 0.45 mL 採取した。この水層に 0.45 ml の isopropanol を加え 15 秒間強く振盪した後 5 分放置し、遠心(15000 rpm、5 分、 4°C)するとペレット状の RNA が沈殿した。沈殿したペレットに 75% EtOH (-20°C) を 1 ml 加え洗浄し、vortex して 10 分室温放置した。さらに遠心(15000 rpm、5 分、 4°C)後、得られたペレット状の RNA に diethylpyrocarbonate 処理水(DEPC 水) 20 μ L を加え RNA solution とした。その後波長 260 nm で吸光度を測定し total RNA 濃度を求めた。

2.2.4 培養細胞を用いた実験

2.2.4.1 細胞培養及び薬剤処置

HeLa 細胞は 8%ウシ胎児血清 (FBS, Sigma, MO, USA) および抗生物質(10000 Units/mL penicillin G sodium, 10mg/ml streptomycin in 0.9% saline)を添加した MEM- α 培地 (Gibco Grand Island, NY, USA)を用い培養シャーレにまき、 37°C 、5% CO_2 インキュベータにて静置培養した。共に約 80% confluent の状態で実験を行った。phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA, 100 nM) または histamine (100 μ M)刺激 24 時間前に FBS を抜き(-)-maackiain 及び(+)-maackiain を処置した。刺激 3 時間後に細胞をかきとり total RNA を抽出した。

2.2.4.2 Total RNA 抽出

HeLa 細胞を 35 mm ディッシュで培養し刺激後 PBS(-)で洗浄した後、0.7 mL RNAiso を加えかきとった。140 μ L の chlorform を加え、15 秒間強く振盪し二層に分離させた後、15000 rpm、15 分、4°C で遠心した。RNA を含む上層を採取し、上層と同量の isopropanol を加え 15 秒間強く振盪し室温で 5 分間放置したものを 15000 rpm、10 分、4°C で遠心すると RNA のペレットが得られた。75% EtOH (-20°C) 1 mL で洗浄した。15000 rpm、10 分、4°C で遠心後、得られたペレットに 20 μ L diethylpyrocarbonate (DEPC) 水を加え RNA solution とした。これを NanoDrop ND-1000 (NanoDrop、Technologies、Wilmington、DE、USA)により波長 260 nm、280 nm で吸光度測定し、260nm の吸光度と 2 つの波長の比による検定で、それぞれ total RNA 濃度と純度を測定した。

2.2.5. 定量リアルタイム RT-PCR

2.2.5.1 逆転写反応

DEPC 水を用いて、total RNA 2 μ g/10 μ L の RNA solution を調製し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits を用いて cDNA に逆転写反応を行った。

2.2.5.2 定量リアルタイム RT-PCR

Fast Start Universal Probe Master (ROX)(Roche, Mannheim, Germany)を含む以下の試薬を混合し、Micro Amp Optical 96-well Reaction Plate の 1 ウェル当たり 20 μ L の反応液を調製した。Sequence Detector (GeneAmp 7300 Sequence Detection System、Applied Biosystems)にて PCR 反応を行い、PCR 産物の増幅曲線をリアルタイムで検出し、Sequence Detection ソフトウェアを用いて解析、定量化した。

Rat H1R、IL-4 および GAPDH		human H1R および GAPDH	
cDNA	3.0 μ l	cDNA	3.0 μ l
DEPC 水	1.45 μ l	DEPC 水	2.0 μ l
Forward primer	1.5 μ l	Forward primer	1.5 μ l
Reverse primer	1.5 μ l	Reverse primer	1.5 μ l
Probe Master (ROX)	10 μ l	Probe Master (ROX)	10 μ l
probe	1.0 μ l	probe	1.0 μ l
GAPDH For	0.275 μ l	GAPDH probe+primer	1.0 μ l
GAPDH Re	0.275 μ l	Total	20 μ l
GAPDH probe	1.0 μ l		
Total	20 μ l		

定量は Calibrator (陽性対象 ; Lot も含めて同一の cDNA 溶液) を使用して mRNA 発現量の相対値を求める、Relative Standard Curve Method (Separate Tubes)により行った。human H1R mRNA、rat H1R mRNA 及び rat IL-4 mRNA のそれぞれのプライマーを Table 2 に示す。また、定量的 RT-PCR の主な変動の要因である RNA の純度や逆転写効率の差を補正する内部標準として、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子に特異的な TaqMan Probe と Primer を用いた。Table 3 のプログラムで PCR 反応を行った。

Table 2. リアルタイム PCR プライマーおよびプローブ

Primer/probe name		Sequence
human H1R mRNA	Sense primer	5'-CAGAGGATCAGATGTTAGGTGATAGC-3'
	Anti sense primer	5'-AGCGGAGCCTCTTCCAAGTAA-3'
	Probe	FAM-CTTCTCTCGAACGGACTCAGATACCACC-TAMRA
rat H1R mRNA	Sense primer	5'- TATGTGTCCGGGCTGCACT -3'
	Anti sense primer	5'- CGCCATGATAAAAACCCAAGT -3'
	Probe	FAM- CCGAGAGCGGAAGGCAGCCA -TAMRA
rat IL-4 mRNA	Sense primer	5'- CAGGGTGCTTCGCAAATTTTAC -3'
	Antisense primer	5'- CACCGAGAACCCAGACTTG -3'
	Probe	FAM- CCCACGTGATGTACCTCCGTGCTTG - TAMRA

rat GAPDH mRNA 及び human GAPDH mRNA は Applied Biosystems の製品を用いた。

Table 3. PCR 反応プログラム

	Initial Steps		Melt	Anneal/Extend
Stage	Hold	Hold	Cycle (40 cycles)	
Temperature	50.0°C	95.0°C	95.0°C	60.0°C
Time (min)	2:00	10:00	00:15	1:00

2.2.6. ウェスタンブロット

2.2.6.1 タンパク抽出

100 mm dish に HeLa 細胞を 24 時間培養し 24 時間 FBS を除いた。FBS を除く際に (-)-maackiain を同時に処置する。24 時間後に 100 nM PMA を 10 分間処置することで刺激を行った。その後、PBS(-)で 2 回洗浄した後、200 µL のプロテアーゼインヒビター (Complete Mini : Roche) およびフォスファターゼインヒビター(Phos STOP : Roche)を含

む TBS buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8)、0.15 M NaCl)を加えてセルスクレーパーで細胞をかきとり、1.5 mL チューブに移し、3000 rpm、10分、4°Cで遠心した。得られたペレットに上記の TBS buffer を 60 μ L 加え、ソニケーションにより細胞を破碎し、15000rpm、15分、4°Cで遠心し、この上清を全細胞溶解液とした。この溶液のタンパク質濃度を BCA 法によって測定し、タンパク量が 30 μ g/10 μ L となるように全細胞溶解液を滅菌 MilliQ 水で希釈したものと、SDS sample buffer (62.5 mM Tris HCl (pH6.8)、10% Glycerol、2% SDS、0.1% 2-Mercaptoethanol、0.001% Bromophenol blue)を 1 : 1 で混合して全量を 20 μ L とし、100°Cで 3 分間処理したものをサンプルとした。

2.2.6.2 SDS-PAGE

以下の組成の分離ゲルをまずゲル板に流し込んで固化させ、その上に濃縮ゲルを流し込みコームをセットして固化させ、SDS-PAGE 用のゲルを作製した。ゲルを泳動装置にセットし、サンプルをゲルにアプライした後、泳動 Buffer (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% SDS)中、30 mA で電気泳動を行った。

	分離ゲル(10%)	濃縮ゲル
29%AA-1%BisAA 溶液	2 mL	300 μ L
1M Tris-HCl (pH 8.8)	2.25 mL	-
1M Tris-HCl (pH 6.8)	-	375 μ L
10% SDS	60 μ L	30 μ L
3% APS	190 μ L	95 μ L
滅菌超純水	1.5 mL	2.2 mL
TEMED	2.5 μ L	2.5 μ L

2.2.6.3 ウェスタンブロット

SDS-PAGE により分離したタンパクを Immun-Blot PVDF Membrane (BIO-RAD) に 160 mA の電流を流して転写した。メンブレンを 1% BSA を含む TBS-t buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8)、0.15 M NaCl、0.1% Tween-20)(ブロッキング溶液)に浸し、室温で 60 分ブロッキングした。ブロッキング液に一次抗体 [ウサギ抗ヒト PKC δ 抗体(C-20)、ウサギ抗ヒト p-PKC δ (Tyr311)抗体、マウス抗ヒト β -actin 抗体] を適切な濃度に希釈したものにメンブレンを浸し、4°Cで overnight インキュベーションした。その後、一次抗体の動物種に対する HRP 結合型二次抗体 [Goat anti-rabbit IgG(H+L)-HRP conjugate 及び Immuno-Star goat anti-mouse IgG(H+L)-HRP conjugate] をブロッキング液で適切な濃度に希釈したもので室温、1 時間インキュベーションした。Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate で化学発光し、検出は LAS-4000 imaging system(Fujifilm)で行った。

2.2.7. PKC δ キナーゼアッセイ

PKC δ キナーゼアッセイは PKC δ kinase enzyme system 及び ADP-Glo kinase assay kit を用いて行った。ADP-Glo kinase assay kit の取り扱い説明書に従った操作を行い、200 well プレートに 3 ng の recombinant PKC δ と基質(50 μ mol/L ATP、0.2 mg/mL CREBtide) を加え、種々の濃度の(-)-maackian 存在下、非存在下及び陽性対照として PKC 阻害剤である staurosporine 存在下の各条件で 25 $^{\circ}$ C、20 分インキュベーションした。ADP-Glo Reagent solution を加えて反応を停止後、Infinite M200 microplate reader(Tecan Japan, Kanagawa, Japan)を用いて蛍光を測定した。

2.2.8. (\pm)-Maackiain の分割

(\pm)-Maackiain の分割は Chiral Pack IC(0.46 cmID x 25 cmL, ダイセル化学工業株式会社)を用いて行った。移動相は hexane/ethanol=80/20(v/v)、流速は 0.4 mL/min で、サンプルは 0.5 mg の(\pm)-maackiain を 1 mL の移動相に溶かして調製した。調製したサンプルを 1 mL インジェクトし、検出は 310nm の吸光により行った。ピークをそれぞれ分取した。旋光度の測定はサンプルを移動相(hexane/ethanol=80/20(v/v))に溶かし、F-4500(日立)を用いて行った。それぞれ単離した(-)-maackiain 及び(+)-maackiain は HeLa 細胞に処置し、PMA 刺激による H1R mRNA 発現亢進に対する影響を検討した。

2.2.9. 統計処理

実験データは Mean value \pm S.E.M で示し Fisher's paired least-significant difference test または One-way ANOVA および Dunnet's multiple comparison test を用いて統計処理を行った。

2.3 実験結果

2.3.1. (±)-Maackiain の合成

セサモールと N-Bromosuccinimide を用いて、2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol を 295.9 mg(1.36 mmol, 63%yield) 得た。7-Benzyloxy-2H-1-benzopyran と 2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol を用いて(±)-3-Benzyloxymaackiain を 77.1 mg(0.206 mmol, 16.4% yield)得た。(m.p. 146-147 °C ; IR(KBr): 3446, 2924, 1619, 1541, 1506, 1474, 1434, 1377, 1329, 1269, 1146, 1038, 939, 828, 779 cm⁻¹; ¹H NMR(400MHz; CDCl₃): δ 7.48-7.31 (m, 6H), 6.77-6.70 (m, 2H), 6.57 (d, J = 2.4, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.93 (d, J = 10.8, 1H), 5.93 (d, J = 10.8, 1H), 5.51 (d, J = 6.8, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.25 (dd, J = 11.2, 5.2, 1H), 3.68 (dd, J = 11.2, 11.2, 1H), 3.50 (ddd, J = 11.2, 6.8, 5.2, 1H); ¹³C NMR(400MHz, CDCl₃): δ 160.2 (C), 156.5 (C), 154.2 (C), 148.1 (C), 141.7 (C), 136.7 (C), 131.7 (CH), 128.6 (CH × 2), 128.0 (CH), 127.4 (CH × 2), 117.9 (C), 112.7 (C), 109.8 (CH), 104.7 (CH), 102.7 (CH), 101.2 (CH₂), 93.8 (CH), 78.4 (CH), 70.0 (CH₂), 66.5 (CH₂), 40.2 (CH); MS: m/z=397.1054.)

以上の結果から、Breytenbach らの方法を一部改良することにより Fig. 2 のスキームを確立した。

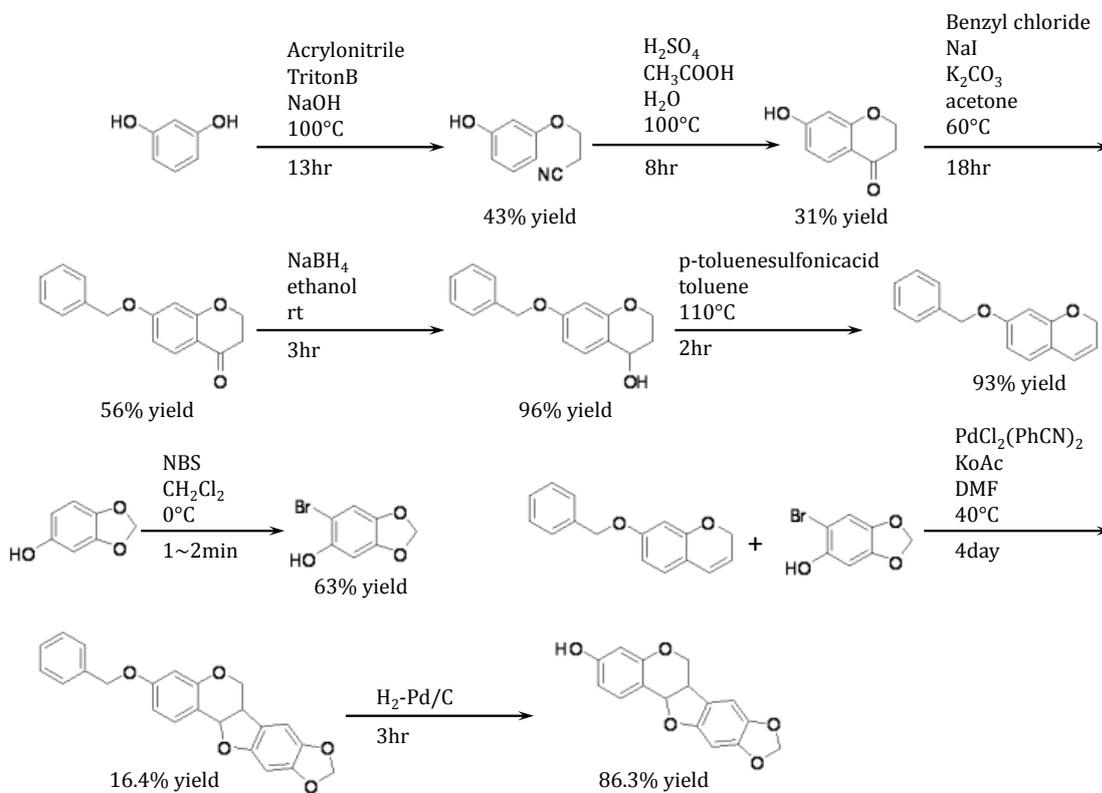


Figure 2 (±)-maackiain 全合成のスキーム

2.3.2. 鼻過敏症モデルラットに対する(±)-maackian の効果

鼻過敏症モデルラットにおいて TDI 誘発により鼻粘膜中の H1R 及び Th2 サイトカインである IL-4 の遺伝子発現が亢進することが明らかになっている。過去の研究において、苦参抽出物を 22 日間連日経口投与することにより、鼻過敏症モデルラットの症状及び H1R 及び IL-4 遺伝子発現亢進は抑制された。苦参より抗アレルギー成分として単離同定された (-)-maackiain の鼻過敏症モデルラットに対する効果を検証するために、合成により得た (±)-maackiain を 22 日間連日経口投与することにより、その効果を検討した。

その結果、(±)-maackiain の投与により、鼻過敏症モデルラットにおけるくしゃみや鼻の腫れ、鼻水等の症状や H1R 及び IL-4 遺伝子発現が有意に抑制された(Fig. 3)。

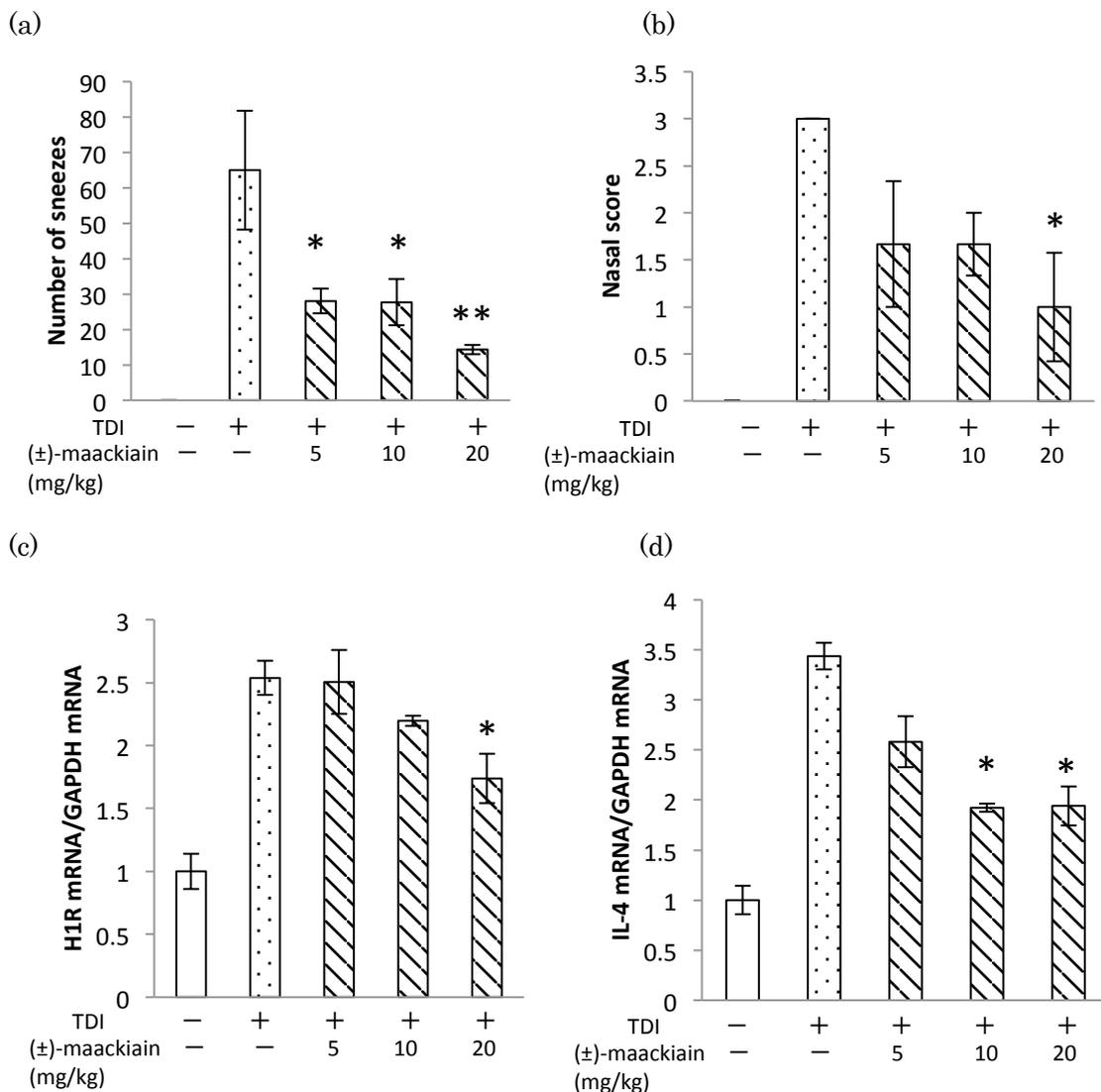


Figure 3 鼻過敏症モデルラットにおける(±)-maackiain の効果

(a): くしゃみ回数 (b):鼻症状 (c): H1R 遺伝子発現 (d): IL-4 遺伝子発現

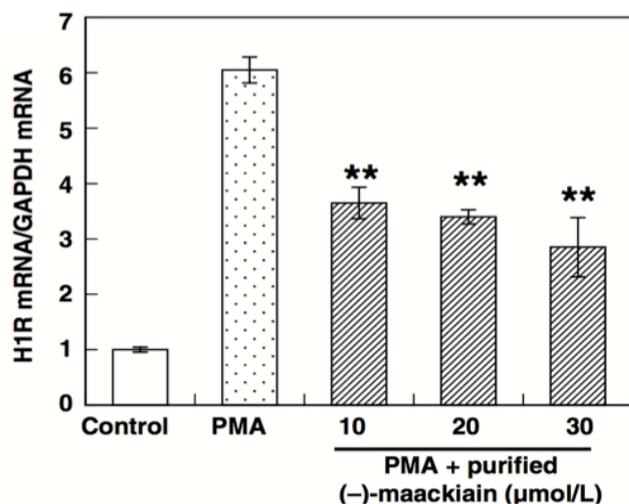
*: P<0.05 vs TDI n=3 **: P<0.01 vs TDI n=3

2.3.3. Maackiain の H1R 遺伝子発現亢進に対する効果

HeLa 細胞に苦参より単離した(-)-maackiain を処置し、PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進に対する抑制効果を検討した。その結果、HeLa 細胞において、(-)-maackiain は PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を有意に抑制した(Fig. 4 a)。

また、合成した(±)-maackiain をキラルカラム(Chiral Pack IC、ダイセル化学工業株式会社)を用いて分割し、(-)-maackiain と(+)-maackiain をそれぞれ分取した(Fig. 5)。分取した(-)-maackiain と(+)-maackiain を HeLa 細胞に処置し、PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進に対する抑制効果を検討した。その結果、HeLa 細胞において、(+)-maackiain は(-)-maackiain と同様に PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を有意に抑制した(Fig 4 b)。

(a)



(b)

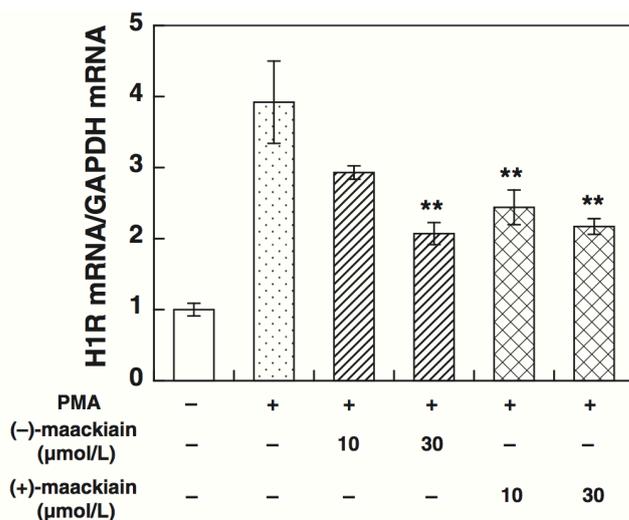


Figure 4 PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進に対する maackiain の効果

(a): (-)-maackiain (**: $P < 0.05$ vs PMA $n=3$)

(b): (-)-maackiain 及び(+)-maackiain (**: $P < 0.01$ vs PMA $n=3$)

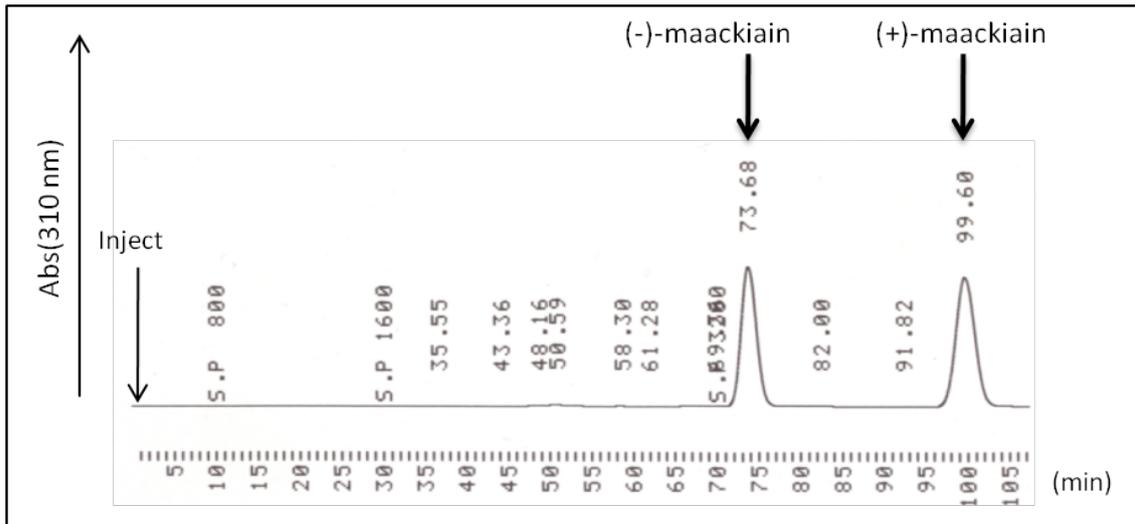


Figure 5 (±)-maackiain の分割

旋光度の測定により、RT 73.7sec のピークが(-)-maackiain、RT 99.6 sec のピークが(+)-maackiain であった。

2.3.4. PKCδ のリン酸化に対する(-)-maackiain の効果

PKCδ の活性化には Y311 のリン酸化が必要であるという報告がある[17]。HeLa 細胞を PMA で刺激すると、PKCδ のリン酸化が起こる。そこで、PMA 刺激による PKCδ のリン酸化に対する(-)-maackiain の影響を検討した。HeLa 細胞に(-)-maackiain を前処置することにより、PMA 刺激による PKCδ のリン酸化は抑制された(Fig. 6)。

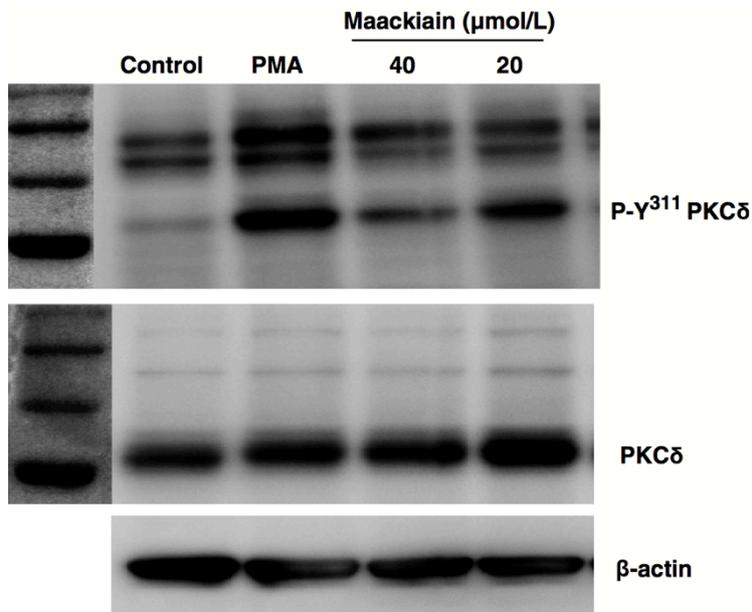


Figure 6 PKCδ のリン酸化に対する(-)-maackiain の効果

2.3.5. PKC δ のキナーゼ活性に対する(-)-maackiain の効果

PKC δ kinase enzyme system 及び ADP-Glo kinase assay kit を用いて、recombinant PKC δ のキナーゼ活性に対する(-)-maackiain の効果を検討した。PKC 阻害剤である staurosporine を陽性対照として用いた。Staurosporine によって PKC δ のキナーゼ活性は有意に抑制されたが、(-)-maackiain は PKC δ のキナーゼ活性を抑制しなかった(Fig. 7)。

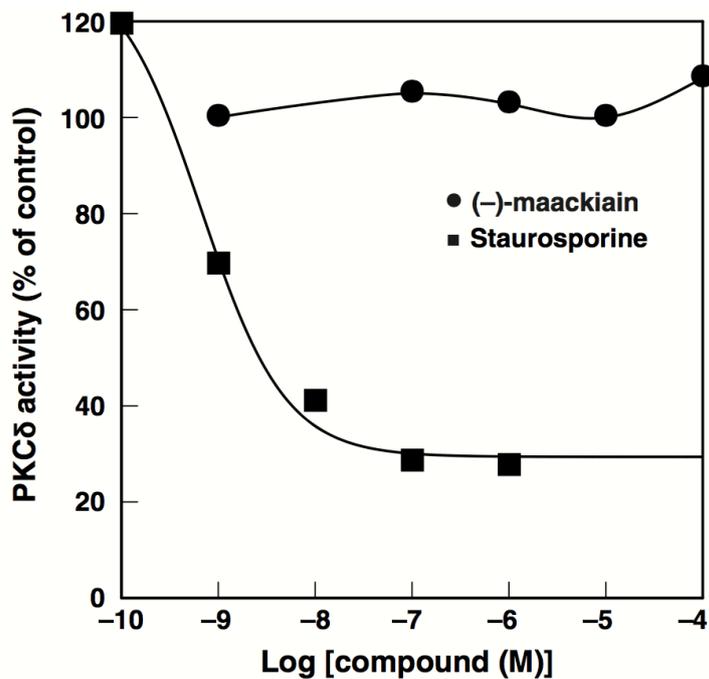


Figure 7 PKC δ キナーゼ活性に対する(-)-maackiain の効果

2.4 考察

過去の研究において、我々の研究室は苦参より活性成分として(-)-maackiain を単離・同定した。(-)-maackiain はマメ科植物に広く分布していることが知られており、プテロカルパン骨格を有するフラボノイドである。(-)-maackiain は抗がん作用や抗菌作用を有することや、芳香族炭化水素水酸化酵素を阻害することが報告されているが[18-20]、しかし、maackiain が抗アレルギー作用を有する報告はない。本章で、我々は(-)-maackiain の鼻過敏症モデルラットに対する効果及び H1R 遺伝子発現亢進に対する効果を検討した。

鼻過敏症モデルラットに対する(-)-maackiain の効果を検討するにあたり、投与する(±)-maackiain の合成を検討した。水銀やタリウムといった有毒の重金属類を用いる既存の方法とは異なる合成方法を検討し、新たな合成方法を確立した(Fig. 2)。

合成した(±)-maackiain を鼻過敏症モデルラットに 22 日間経口投与し、鼻症状及び H1R 及び IL-4 遺伝子発現亢進に対する効果を検討した。その結果、くしゃみや鼻の腫れ、鼻水等の鼻症状及び H1R、IL-4 遺伝子発現亢進は(±)-maackiain 投与により抑制された(Fig. 3)。(±)-maackiain 5 mg/kg 投与群において、H1R 及び IL-4 遺伝子発現亢進の抑制はわずかであるが、くしゃみや鼻症状は抑制された。過去に、我々の研究室は、ラットにヒスタミンを鼻腔内投与することにより、IL-4 及び IL-5 遺伝子発現が亢進し、IL-4 鼻腔内投与により H1R 遺伝子発現が亢進することを見出した[12]。また、我々の研究室は、H1R 遺伝子発現は IL-5 等の遺伝子発現と強く相関することを報告している[21]。これらの知見から、H1R シグナルと IL-4 シグナルがクロストークすることが示唆されている。このクロストークにより、低容量の(±)-maackiain 投与群において、H1R や IL-4 の mRNA 発現抑制はほとんど認められないが、鼻症状の抑制が認められた可能性が示唆される。

HeLa 細胞における PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進に対して、苦参より単離した(-)-maackiain 及び合成した(±)-maackiain より分割した(-)-maackiain と(+)-maackiain の効果を検討した結果、(-)-maackiain と(+)-maackiain は H1R 遺伝子発現亢進を抑制した(Fig. 4, 5)。過去に、我々の研究室は、H1R 遺伝子発現は PKC δ 、ERK 及び poly(ADP-ribose) polymerase-1 を介したシグナルによるものであることを報告している[6]。また、H1R 遺伝子発現亢進は PKC δ 選択的阻害剤である rottlerin により強く抑制されることから、H1R 遺伝子発現において PKC δ は強く関与していると考えられる。

PKC δ の活性には、PKC δ の Y311 のリン酸化が必要であることが報告されている[17]。そこで、HeLa 細胞における PMA 刺激による PKC δ の Y311 のリン酸化に対する影響を検討した。その結果、(-)-maackiain は PKC δ の Y311 のリン酸化を抑制した(Fig. 6)。一方で、PKC δ のキナーゼ活性に対する影響を recombinant PKC δ を用いて検討した結果、(-)-maackiain は PKC δ のキナーゼ活性を抑制しなかった(Fig. 7)。

これまでに我々の研究室は、(-)-maackiain 以外に、epigallocatechin-3-O-gallate(EGCG) や quercetin が HeLa 細胞や鼻過敏症モデルラットにおける H1R 遺伝子発現亢進を抑制す

ることを明らかにしている[7, 9]。これらの化合物は、PKC δ の Y311 のリン酸化を抑制する[7, 9]。これらの知見から、PKC δ の抑制はアレルギー症状の治療に有効であると考えられ、鼻粘膜細胞における PKC δ が鼻症状に関与している可能性が示唆される。ヒト鼻粘膜の上皮細胞及び血管内皮細胞に H1R が発現していることが報告されている[22]。また、慢性気道疾患を引き起こすことが知られているディーゼル排気微粒子刺激によりヒト鼻内皮細胞において、H1R mRNA が増加すること、ヒト鼻内皮細胞において、ヒスタミン刺激によって granulocyte macrophage-colony-stimulating factor(GM-CSF)及び IL-8 の産生が引き起こされるが報告されている[23]。さらに、気管支の上皮細胞において、ヒスタミン刺激による GM-CSF や IL-8 産生に H1R-PKC-ERK シグナルが関与することが報告されており[24]、ヒト鼻上皮細胞には PKC δ が発現していることも報告されている[25]。上記の知見より、HeLa 細胞は、アレルギー反応に関係する細胞に由来するものではないが、上皮細胞より生じた子宮頸がん細胞由来の細胞株であることから、鼻粘膜におけるヒスタミン刺激による H1R 遺伝子発現亢進の分子メカニズム解析のための有用なモデルであると考えられる。

以上の検討において、合成した(±)-maackiain は鼻過敏症モデルラットの鼻症状及び H1R 遺伝子発現亢進を抑制し、(-)-maackian 及び(+)-maackiain は HeLa 細胞における PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。また、(-)-maackian は HeLa 細胞における PMA 刺激による PKC δ の Y311 のリン酸化を抑制したが、PKC δ のキナーゼ活性阻害作用は示さなかった。この結果から、(-)-maackiain の H1R 遺伝子発現シグナルにおける標的分子は PKC δ に関連のタンパク質であることが示唆された。

第3章 (-)-Maackiain 標的分子の探索及びヒスタミン H₁ 受容体遺
伝子発現に対する(-)-maackiain 標的分子の関与

3.1. 序論

花粉症は代表的なアレルギー疾患の一つであり、樹木や草の花粉に暴露することで症状が現れるアレルギー性鼻炎であり、日本人の約 30%が罹患している国民病である。ヒスタミンはアレルギー性鼻炎を引き起こす主要ケミカルメディエーターであり、ヒスタミン H₁ 受容体(H1R)を介してくしゃみ、鼻汁、痒み等の症状を引き起こす。

これまでに、我々の研究室は、toluene2,4-diisocyanate(TDI)を用いて作製する鼻過敏症モデルラット及び花粉症患者において H1R 遺伝子発現が鼻症状と強く相関すること、H1R 遺伝子発現は、PKC δ 、extracellular signal-regulated kinase(ERK)及び poly(ADP-ribose) polymerase-1 を介したシグナルによるものであることを報告している。

第 2 章の結果より、抗アレルギー作用を有することが知られる和漢薬である苦参より有効成分として単離・同定された(-)-maackiain は、鼻過敏症モデルラットにおいて鼻症状と H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。さらに、(-)-maackiain は H1R 遺伝子発現に関与する PKC δ の活性化に必要とされる Y311 のリン酸化を抑制した。しかし、(-)-maackiain は PKC δ のキナーゼ活性を抑制しなかった。このことから、H1R 遺伝子発現における(-)-maackiain の標的となるタンパク質は、PKC δ ではなく PKC δ のリン酸化に関与するタンパク質であることが示唆された。H1R 遺伝子発現に関与する PKC δ の活性を調整している(-)-maackiain の標的タンパク質を同定し、H1R 遺伝子発現シグナルにおける(-)-maackiain の標的タンパク質の役割について研究することは、新規作用機序を有する花粉症治療薬の開発に繋がると考えられた。

本章では、(-)-maackiain が結合するタンパク質の探索を行い、Heat shock protein(HSP)90 を同定した。HSP90 は細胞質に豊富に存在するタンパク質の一つであり、細胞質の全タンパク質の約 2%である[1]。HSP90 は、様々な細胞シグナルやストレスに対する反応に必要な多数のクライアントタンパク質の安定化や活性化に関与することが知られおり、これまでに HSP90 とクライアントタンパク質の相互作用を阻害する HSP90 阻害剤は抗がん剤として応用する研究が行われている[2]。本章において我々は、HSP90 阻害剤として知られる 17AAG(17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin)、celastrol 及び novobiocin を用いて H1R 遺伝子発現亢進に対する HSP90 の関与を検討した。また、celastrol を鼻過敏症モデルラットに投与し、その効果を検討した。さらに、H1R 遺伝子発現シグナルに強く関与している PKC δ に対する HSP90 の関与を検討し、HSP90 がどのように H1R 遺伝子発現に関与しているか、(-)-maackiain の HSP90 に対する作用及び(-)-maackiain の H1R 遺伝子発現亢進を抑制し抗アレルギー作用を示すメカニズムについて考察した。

3.2. 実験方法

3.2.1. 使用した試薬・キットなど

MEM- α 培地は Gibco から、RNA later 及び High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits は Applied Biosystems から、プロテアーゼインヒビター(Complete Mini)及びフォスファターゼインヒビター(Phos STOP)は Roche から、ウサギ抗ヒト PKC δ 抗体(C-20)は Santa Cruz Biotechnology から、ウサギ抗ヒト p-PKC δ (Tyr311)抗体、ウサギ抗ヒト HSP90 抗体及びマウス抗ヒト β -actin 抗体は Cell Signaling Technology から、Goat anti-rabbit IgG(H+L)-HRP conjugate 及び Immuno-Star goat anti-mouse IgG(H+L)-HRP conjugate は Bio-Rad から、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate は Merck Millipore からそれぞれ購入した。その他のすべての実験試薬は分析用試薬を使用した。

3.2.2. 細胞培養及び薬剤処置

第2章と同様の方法で HeLa 細胞を培養及び薬剤処置を行った。PMA(100 nM)またはヒスタミン(100 μ M)による刺激の24時間前に FBS を抜き化合物を処置した。PMA またはヒスタミン刺激3時間後に細胞をかきとった。

ヒスタミン刺激はヒスタミン 100 μ M を用いて行い、刺激24時間前に FBS を除き、(-)-maackiain、17-AAG、celastrol や noboviocin の化合物を処置した。刺激3時間後に細胞をかきとり total RNA を抽出した。

3.2.3. (-)-maackiain の分子標的の探索

HeLa 細胞溶解液を用いて Böhl らの方法[3]により行った。HeLa 細胞を 37°C、5%CO₂ インキュベーターで、8%ウシ胎児血清(FBS, Sigma, MO, USA)及び抗生物質 [(10000 Units/mL penicillin G sodium (Sigma), 10mg/ml streptomycin (Sigma) in 0.9% saline)] を添加した MEM- α 培地(Gibco Grand Island, NY, USA)を用いて 150 mm 7 枚に培養した。24時間のスタベーション後、プロテアーゼインヒビター (Complete Mini, Roche Applied Science) およびフォスファターゼインヒビター(Phos STOP, Roche Applied Science)を含む TBS buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8), 0.15 M NaCl)を用いて細胞をかきとり、1.5 mL チューブに移し、3000 rpm、10分、4°Cで遠心した。得られたペレットに上記の TBS buffer を 60 μ L 加え、ソニケーションにより細胞を破碎し、15000rpm、15分、4°Cで遠心し、この上清を細胞溶解液とした。細胞溶解液 700 μ L を、TBS buffer で平衡化した陰イオン交換カラム(HiTrap Q FF, 5mL: GE Healthcare)にアプライした。0~5M NaCl のリニアグラジエントにより、各フラクションが 4 mL になるように分画した。各フラクション 1 mL に DMSO を 1 μ L 加え 1 分インキュベートし、蛍光(Ex 285/Em 335 nm)を測定した。続いて各フラクション 1 mL に DMSO に溶かした 100mM (-)-maackiain を 1 μ L 加え 1 分イン

キュベートし、蛍光(Ex 285/Em 335 nm)を測定した。(-)-Maackiain による蛍光のクエンチが強かったフラクションを 10% SDS-PAGE で泳動し、銀染色 MS キット(和光純薬工業株式会社)を用いて銀染色した。検出したバンドに含まれるタンパク質をトリプシンにより消化し、ESI-MS/MS によるタンパク質同定法[4]により同定した。ペプチドの分析は、nano-flow-HPLC/ nanospray ionization MS/MS on an Esquire 3000 ion trap mass spectrum (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany)を用いて行った。MS/MS データは、MASCOT アルゴリズム(Matrix Science Ltd., London, UK)を用いて処理し、ペプチド配列を NCBI データベースで帰属した。

3.2.4. HSP90 と (-)-maackiain の相互作用

ヒト HSP90 α の cDNA を Table 1 に示したプライマーを用いて PCR により増幅した[5]。増幅したフラグメントは pGEM-T-Easy vector(Promega)を用いてクローニングし、シーケンス解析を行った後、pCold I(タカラバイオ株式会社)に挿入し(SalI 及び PstI サイト)、BL21(DE3)pLys 細胞 (Novagen) にトランスフェクションした。1-thio- β -D-galactopyranoside により HSP90 の発現を誘導し、タンパク質発現はウエスタンブロットにより確認した。Recombinant HSP90 は TALON metal affinity resin(Clontech)及び His Trap HP(GE Healthcare)を用いて精製した。精製した recombinant HSP90 を用いて、10 μ M~30 μ M の (-)-maackiain を添加し、蛍光(Ex 285/Em 335 nm)を測定した。

Table 1 ヒト HSP90 α プライマー

Forward primer	5'-AAATAAGTCGACATGCCTGAGGAAACCCAG-3'
Revers primer	5'-CTTCATCTGCAGTTAGTCTACTTCTTCCAT-3'

3.2.5. (-)-Maackiain immobilized beads binding assay

3.2.5.1 (-)-Maackiain immobilized beads の作製

(-)-Maackiain immobilized beads の作製は FG ビーズ(エポキシビーズ:多摩川精機)を用いて行った。FG ビーズに(-)-maackiain を結合させる反応を Fig. 1 に示す。DMF 100 μ L に、エポキシビーズ 0.5 mg、DMSO に溶かした(-)-maackiain 100mM 2 μ L、炭酸カリウム 2.8 mg を加えて 60 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。その後、15000rpm、室温、5 分遠心し上清を破棄し 50% DMF 500 μ L で洗った。これを 2 回行った後、滅菌 MilliQ 水 500 μ L で洗い、50% メタノールで 3 回洗ったものを(-)-maackiain immonilized beads とした。

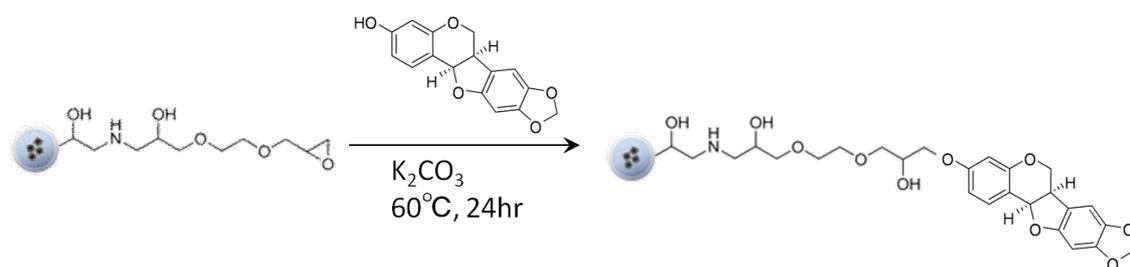


Figure 1 FG ビーズと(-)-maackiain の結合反応

3.2.5.2 HeLa 細胞溶解液サンプルの調製

100 mm dish に HeLa 細胞を培養し、24 時間 FBS を除いた。5 mL の PBS で 2 回洗い、200 μ L のプロテアーゼインヒビター (Complete Mini : Roche) およびフォスファターゼインヒビター (Phos STOP : Roche)を含む TBS buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8)、0.15 M NaCl)を加えてセルスクレーパーで細胞をかきとり、1.5 ml チューブに移し、3000 rpm、10 分、4°C で遠心した。上清破棄後、NP-40 lysis buffer(150 mM NaCl、1% NP-40、50 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1 mM DTT、0.5mM PMSF)を 50 μ L 加え 30 分氷上にインキュベートし 10 分ごとに vortex した。15000rpm、4°C、10 分遠心し上清を 50 μ L とり、100 mM KCl buffer を 150 μ L 加えて 15000rpm、4°C、30 分遠心した上清を HeLa 細胞溶解液とした。

3.2.5.3 各試薬溶液の調製

以下に示す方法で各試薬溶液を調製した。

- 2x100 mM KCl buffer(500 mL) : 2.5 M KCl 40mL、グリセロール 126 g、1 M HEPES-NaOH 溶液 (pH 7.9) 20mL、1M MgCl₂ 溶液 200 μ L、1 M CaCl₂ 溶液 200 μ L、0.5 M EDTA 溶液(pH 8.0) 400 μ L、10% NP-40 溶液 10mL を混合し、MilliQ 水にて 500 mL までメスアップする。
- 100 mM KCl buffer : MilliQ 水 25 mL、2x100 mM KCl buffer 25 mL を混合する。使用前に 1 M DTT 溶液 50 μ L、1 M PMSF 溶液を 10 μ L 添加する。
- 1 M KCl buffer : 2.5 M KCl 18 mL、MilliQ 水 7 mL、2x100 mM KCl buffer 25 mL 混合する。使用前に 1 M DTT 溶液 50 μ L、1 M PMSF 溶液を 10 μ L 添加する。
- 1 M DTT 溶液および 1 M PMSF 溶液 : DTT を MilliQ 水に、PMSF を DMSO に溶かし 1 M にする。

3.2.5.4 (-)-Maackiain immobilized beads binding assay

(-)-Maackiain immobilized beads を 100 mM KCl buffer 200 μ L に懸濁し、スピンドウン後に磁気分離し上清を破棄する操作を 3 回行った。(-)-maackiain を HeLa 細胞溶解液に加えるものは、DMSO に溶かした(-)-maackiain 100 mM を 2 μ L 加えて 30 分氷上でインキ

ュベーションした。 immobilized beads に HeLa 細胞溶解液を加え室温、1 時間ローテータにて攪拌した。攪拌後、スピンドアウン、磁気分離により上清を破棄し 100 mM KCl buffer で beads を 5 回洗い、1M KCl 30 μ L による洗浄を 2 回行う。残った beads に 2 倍に希釈した SDS sample buffer を 40 μ L 加え、5 分間煮沸した。煮沸後スピンドアウン、磁気分離により上清を回収し、サンプルとした。検出はウエスタンブロットにより行った。サンプルは 20 μ L をゲルのウェルにアプライした。

3.2.6. ATP beads binding assay

(-)-Maackiain および 17-AAG を処置した HeLa 細胞溶解液中の HSP90 の ATP に対する結合の変化を検討した。Bali らの方法[6]を参考に行った。100 mm dish に HeLa 細胞を培養し 24 時間 FBS を除いた。(-)-maackiain および 17-AAG は FBS を除く際に処置した。細胞を 5 mL PBS で 2 回洗浄後、200 μ L のプロテアーゼインヒビター (Complete Mini : Roche) およびフォスファターゼインヒビター (Phos STOP : Roche)を含む TBS buffer でかきとり、3000 rpm、10 分、4 $^{\circ}$ C で遠心した。上清を破棄し、TNESV buffer(50 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 nM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM NaF, and 1% Triton X-100, pH 7.5)を 100 μ L 加え、30 分間氷上でインキュベートした後、20 秒間のソニケーションで細胞を破碎した。12000 rpm、30 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を回収し、BCA 法によりタンパク質濃度を測定し、200 μ g/200 μ L になるように溶液を希釈した。そこに γ -Aminophenyl-ATP Immobilized agarose beads (Jena Bioscience)を 50 μ L 加え、4 $^{\circ}$ C で over night ローテータにて攪拌した。その後 3000 rpm、2 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清破棄後 TNESV buffer で beads を 3 回洗った。洗浄後 beads に 50 μ L の SDS sample buffer を加え、5 分間煮沸した。煮沸後 3000 rpm、2 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清をサンプルとした。検出は western blot により行った。サンプルは 20 μ L をゲルのウェルにアプライした。

3.2.7. ゲルダナマイシン competition assay

HSP90 α assay kit(BPS Bioscience)を用いて(-)-maackiain の HSP90 の ATP 結合部位に対する相互作用を検討した。5 \times Hsp90 assay buffer、40 mM DTT、2 mg/mL BSA、MilliQ 水を混和し、1 \times HSP90 assay buffer とした。100 nM FITC-geldanamycin in 1 \times HSP90 assay buffer を 96 well plate の positive control、negative control、test inhibitor の well へ 5 μ L ずつ加えた。各濃度の 17-AAG (1 nM、3.16 nM、10 nM、31.6 nM、100 nM、316 nM、1 μ M)及び(-)-maackiain (1 μ M、3.16 μ M、10 μ M、31.6 μ M、100 μ M、316 μ M、1 mM) を test inhibitor の well へ 10 μ L ずつ加え、blank、positive control、negative control の well へは 10 μ L の 10% DMSO を加えた。20 μ L の 1 \times HSP90 assay buffer を negative control の well へ、25 μ L の 1 \times Hsp90 assay buffer を blank の well へ加えた。35 ng/ μ L HSP90 α in 1 \times Hsp90 assay buffer を positive control、test inhibitor の well へ 20 μ L ずつ加えた。25 $^{\circ}$ C、50 rpm で振盪しながら 2 時間インキュベーションし、PerkinElmer

Enspire Multimode Plate Reader (PerkinElmer)を用いて蛍光(Ex 485/Em 530 nm)を測定した。

3.2.8. HSP90 ATPase assay

Rowlands らの方法[7]に従い、HSP90 ATPase 活性に対する(-)-maackiain の効果を検討した。0.0812% (w/v) malachite green: 2.32% (w/v) polyvinyl alcohol: 5.72% (w/v) ammonium molybdate in 6 M HCl: MilliQ 水=2 : 1 : 1 : 2 の比率で測定の 1.5 時間前に混合し、室温で放置した。100 mM Tris-HCl、20 mM KCl、6 mM MgCl₂ を混合し、pH 7.4 に調整し、assay buffer とした。

各濃度の 17AAG(0.05 μM, 0.2 μM, 1 μM, 4 μM, 20 μM)及び(-)-maackiain (5 μM, 20 μM, 100 μM, 400 μM, 2 mM)を調製し PCR チューブに 5 μL ずつ加えた。blank と negative control のチューブへは assay buffer と DMSO を 5 μL ずつ加えた。0.20 mg/mL Hsp90 in assay buffer を各 PCR チューブへ 10 μL ずつ加えた。blank の PCR チューブへは assay buffer を 10 μL 加えた。2.5 mM ATP in assay buffer を各 PCR チューブへ 10 μL ずつ加えた。37°C で 16 時間インキュベートし、その後 PCR チューブから 96 well plate へサンプルを移し、マラカイト試薬を各 well へ 80 μL ずつ加えた。34% sodium citrate を各 well へ 10 μL ずつ加え、軽く振盪し、室温で 15 分間インキュベートし、PerkinElmer Enspire Multimode Plate Reader (PerkinElmer)を用いて、620 nm の吸光度を測定した。

3.2.9. 定量リアルタイム RT-PCR

2.2.5 と同様の方法で行った。

3.2.10. ウェスタンブロット

2.2.6 と同様の方法で行った。

3.2.11. 鼻過敏症モデルラットに対する celastrol の効果

2.3.3 と同様の方法で鼻過敏症モデルラットを作製し celastrol の投与を行った。Celastrol は 1mg/kg を 1 日 1 回、経口で TDI 誘発前に単回投与および、1 週間早期連続投与した。

3.2.12. 共免疫沈降

100 mm dish に HeLa 細胞を 24 時間培養し 24 時間 FBS を除いた。FBS を除く際に (-)-maackiain および 17AAG を処置した。5 mL の PBS で細胞を 2 回洗い、200 μL のプロテアーゼインヒビター (Complete Mini : Roche) およびフォスファターゼインヒビター (Phos STOP : Roche)を含む TBS buffer でかきとり、3000 rpm、10 分、4°C で遠心した。上清を破棄し、lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5、100 mM NaCl、0.5% Triton X、プロテアーゼインヒビター、フォスファターゼインヒビター)を 100 μL 加えて 10 分ごとに

vortexしながら60分間氷上でインキュベートした。その後26G針のシリンジで10回ピペッティングし、15000 rpm、10分、4℃で遠心した。上清を回収し、BCA法によりタンパク質濃度を測定し、500 µg/200 µLとなるように細胞溶解液を調製した。そこに2.5 µLのrabbit control IgGを加え、4℃、30分間ローテータで攪拌し、40 µLのrProtein A Sepharose Fast Flow(GE Healthcare)(50%懸濁液)を加え4℃、30分間ローテータで攪拌した。3000 rpm、4℃、1分遠心し上清を回収した後に、rabbit control IgG 2.5 µLまたはPKCδ抗体 5µLを加え4℃、2時間ローテータにて攪拌し、40 µLのrProtein A Sepharose Fast Flow(50%懸濁液)を加え4℃、2時間ローテータで攪拌した。3000 rpm、4℃、1分遠心し上清を破棄した後、残ったbeadsを1 mLのlysis bufferで3回洗浄した後、45 µLのSDS sample bufferを加え、5分間煮沸したものをサンプルとした。検出はウエスタンブロットにより行った。サンプルは20 µLをゲルのウェルにアプライした。

3.2.13. 免疫蛍光染色

35 mm ガラスベース dish に HeLa 細胞を 24 時間培養し 24 時間 FBS を除いた。FBS を除く際に(-)-maackiain および 17AAG を同時に処置した。100 nM PMA 処置は 24 時間後に行った。PMA 処置後、5 分後に PBS 2 mL で 2 回洗い、-20℃メタノールを 2 mL 加え、-20℃で 10 分静置し固定した。PBS で 3 回洗浄後、0.1% Triton X-100 を含む PBS を 2 mL 加え室温で 15 分間静置した。PBS で 3 回洗浄後、1% BSA、0.1% Tween 20 を含む PBS(ブロッキング液)を 1 mL 加え、室温で 1 時間静置する。そこに PKCδ(および 58 K Golgi marker protein(abcam)抗体を 2 µL 加え、4℃で over night 静置した。0.1% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄後、Cy3-conjugated Donkey anti-rabbit IgG(Jackson ImmunoResearch)および DyLight488-conjugated Donkey anti-rabbit IgG : Jackson ImmunoResearch をブロッキング液で 500 倍に希釈したものを 1 mL 加え 50 分間室温で静置し、その後 0.25 µg/mL となるように DAPI を加え 10 分間静置した。0.1% Tween 20 を含む PBS で 1 回洗浄し、PBS で 3 回洗浄した。95%グリセロールを含む PBS を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, ZEISS)で観察した。

3.3. 実験結果

3.3.1. (-)-maackiain の分子標的の探索

HeLa 細胞溶解液を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより Fig. 2 のようなチャートを得た。分取した各フラクションの蛍光の(-)-maackiain の蛍光抑制を測定し、フラクション F16 に最も強い蛍光抑制が見られた(Fig. 3)。そして F16 を銀染色し、検出されたバンドに含まれるタンパク質を ESI-MS/MS によるタンパク質同定法による解析を行い、F16 より HSP90 を見出した(Fig. 4)

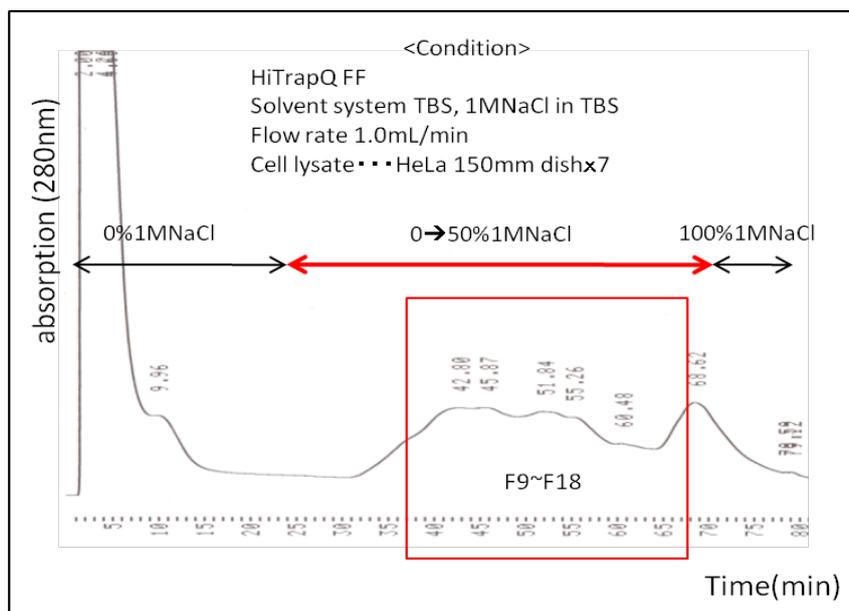


Figure 2 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

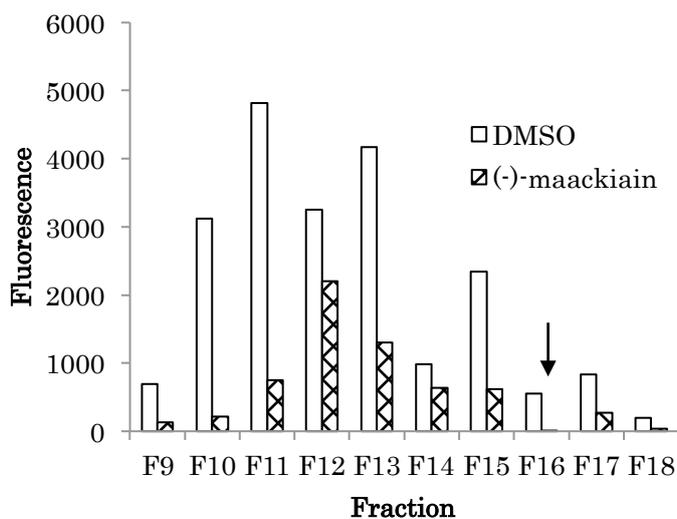


Figure 3 各フラクションの蛍光(Ex 285/Em 335 nm)

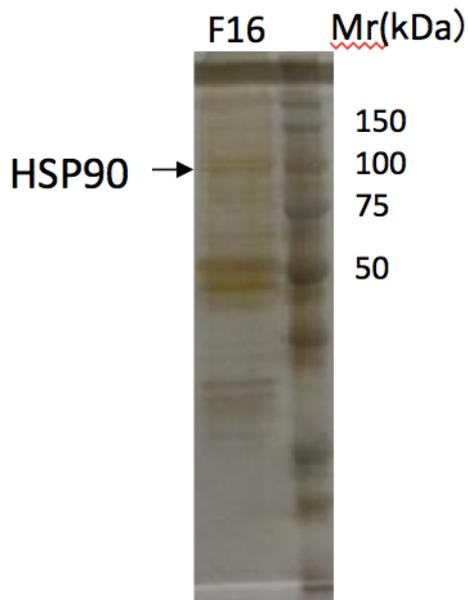


Figure 4 F16 の銀染色

F16 を 10% SDS-PAGE で分離した。電気泳動後、銀染色 MS キットで染色した。

3.3.2. HSP90 と (-)-maackiain の相互作用

タンパク質と低分子化合物が相互作用することで、タンパク質の内在トリプトファンに由来する蛍光が抑制される[3]。Böhl らの方法にしたがって、(-)-maackiain の添加による recombinant HSP90 の内在トリプトファンの蛍光の抑制を測定することで HSP90 と (-)-maackiain の相互作用を検討した。その結果、(-)-maackiain は濃度依存的に蛍光を抑制した(Fig. 5)。

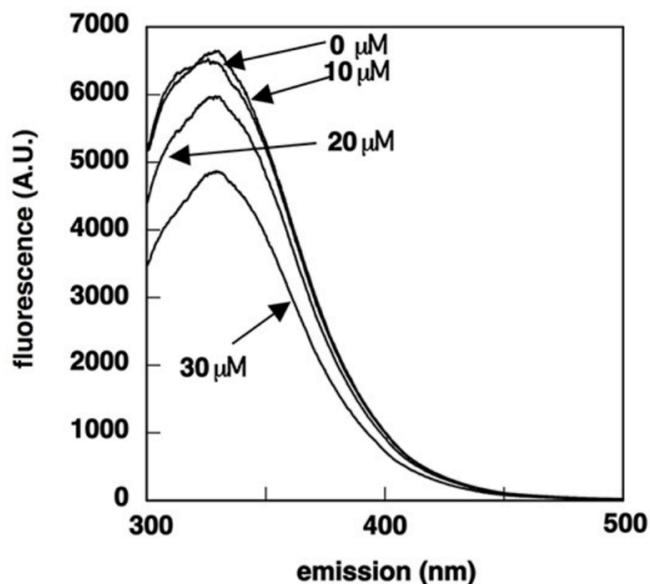


Figure 5 HSP90 内在性トリプトファン由来の蛍光

3.3.3. (-)-Maackiain immobilized beads binding assay

(-)-Maackiain immobilized beads を作製し、HeLa 細胞溶解液中に beads を懸濁しインキュベーションした後に、プルダウンし beads に結合した HSP90 を、HSP90 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。その結果、(-)-maackiain immobilized beads に HSP90 が結合し、それが遊離(-)-maackiain により阻害された(Fig. 6)。この結果から、HSP90 は (-)-maackiain の結合タンパク質であることが示唆された。

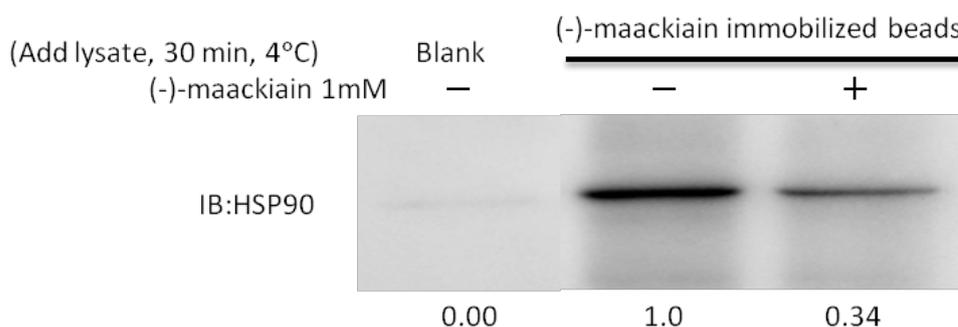


Figure 6 (-)-maackiain immobilized に対する HSP90 の結合

ウエスタンブロットの条件

<1次抗体>

HSP90 抗体(rabbit) 1:1000

<2次抗体>

anti-rabbit 抗体 1:20000

3.3.4. ATP beads binding assay

HSP90 には ATP 結合部位が存在し、HSP90 の構造変化や機能に関与することが報告されている[8-10]。そこで、HSP90 の ATP 結合部位に対する(-)-maackiain の影響を検討したところ、HeLa 細胞に(-)-maackiain を処置すると、HSP90 の ATP 結合が減少した(Fig. 7)。

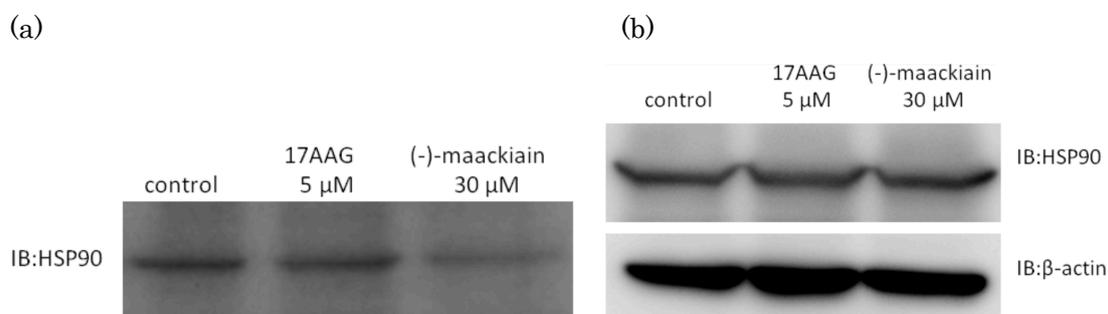


Figure 7 HSP90 の ATP 結合に対する(-)-maackiain の影響

(a): ATP beads (b): total lysate

western blot の条件

<1 次抗体>

HSP90 抗体(rabbit) 1:1000

β -actin 抗体(mouse) 1:3000

<2 次抗体>

anti-rabbit 抗体 1:20000

anti-mouse 抗体(β -actin) 1:30000

3.3.5. ゲルダナマイシン competition assay

HSP90 のゲルダマイシンの結合に対する(-)-maackiain の影響を検討した。その結果、(-)-maackiain の FITC 標識ゲルダナマイシンの HSP90 の ATP 結合部位に対する結合阻害が認められた(Fig 8, IC_{50} : 10 μ M)。一方で、17-AAG の IC_{50} は 0.64 μ M であり、(-)-maackiain は約 16 倍高い IC_{50} であった。

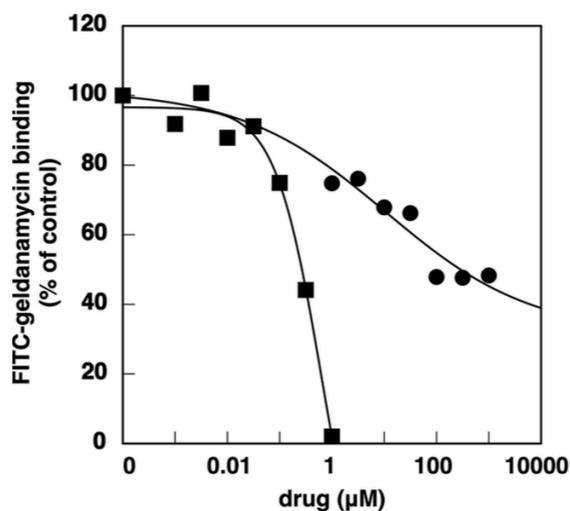


Figure 8 (-)-maackiain のゲルダナマイシン competition assay

■: 17-AAG

●: (-)-maackiain

3.3.6. HSP90 ATPase assay

(-)-Maackiain の HSP90 の ATPase 活性に対する影響を検討した結果、(-)-maackiain は HSP90 の ATPase 活性に対して抑制傾向を示した(Fig. 9)。一方で、(-)-maackiain の HSP90 の ATPase 活性に対する抑制効果は、17-AAG と比較して非常に弱いものであった。

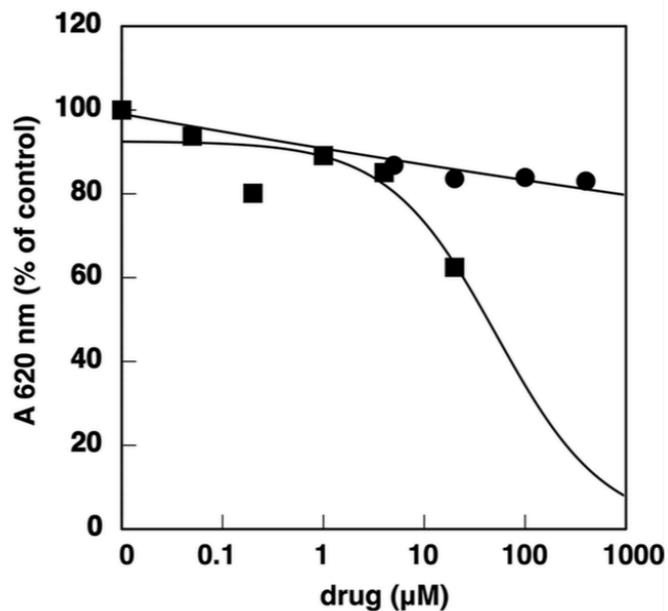


Figure 9 (-)-maackiain の HSP90 ATPase 活性に対する効果

■: 17-AAG

●: (-)-maackiain

3.3.7. HSP90 阻害剤の H1R 遺伝子発現亢進に対する効果

HSP90 の阻害剤である 17-AAG、celastrol 及び novobiocin をそれぞれ用いて、HeLa 細胞における PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進に対する HSP90 の関与を検討した。その結果、17-AAG、celastrol 及び novobiocin の処置により、PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進は有意に抑制された(Fig. 10)。

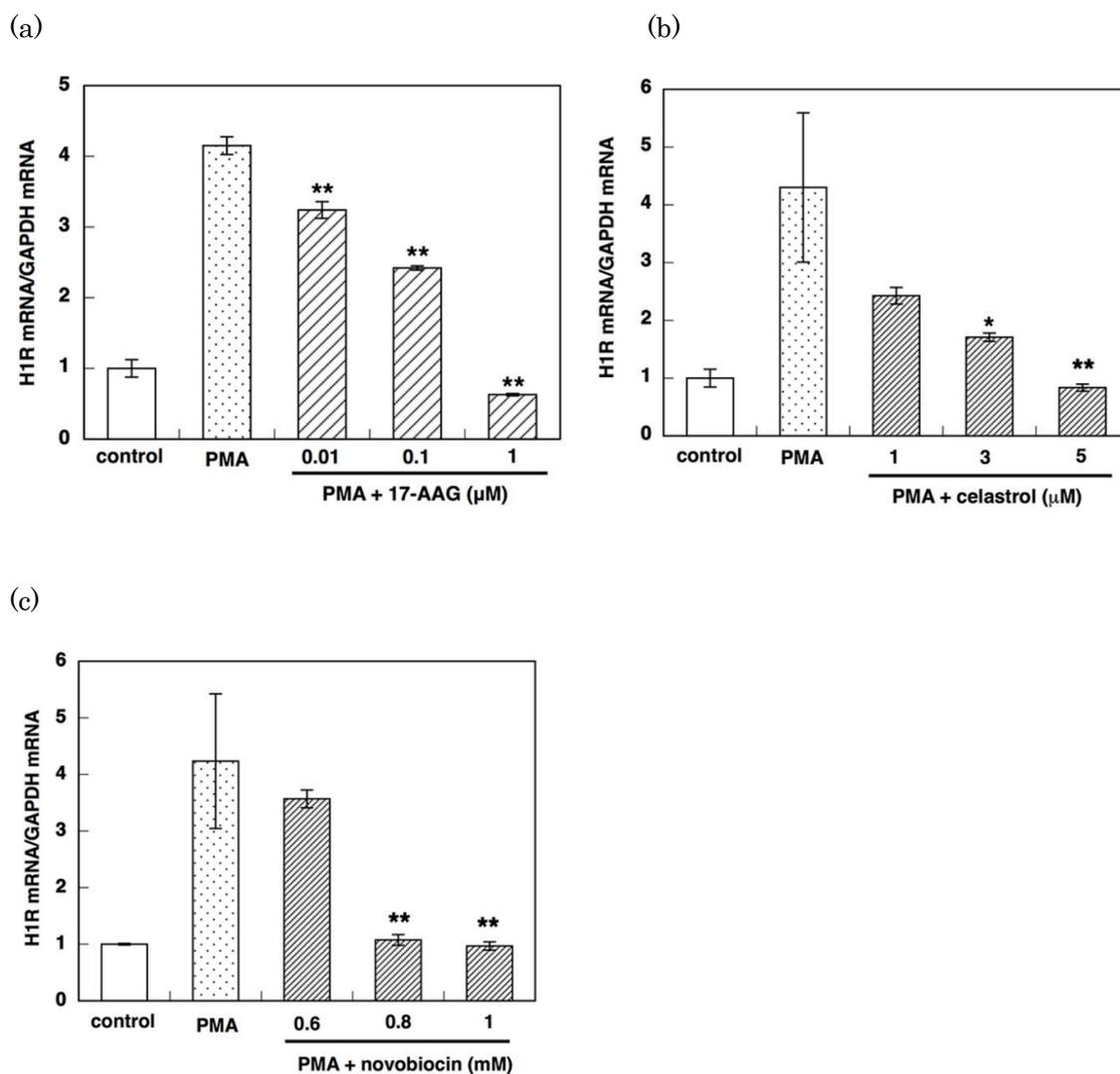


Figure 10 HSP90 阻害剤の H1R 遺伝子発現に対する効果

(a): 17-AAG (b): celestrol (c): novobiocin

*: $P < 0.05$ vs PMA n=3

** : $P < 0.01$ vs PMA n=3

3.3.8. 鼻過敏症モデルラットに対する celestrol の効果

HSP90 の阻害剤である celestrol を鼻過敏症モデルラットに、1 日 1mg/kg を経口で 1 週間連続投与し、鼻過敏症モデルラットに対する効果を検討した。その結果、celestrol の投与により、鼻過敏症モデルラットにおけるくしゃみや鼻の腫れ、鼻水等の症状や H1R 及び IL-4 遺伝子発現が有意に抑制された(Fig. 11)。

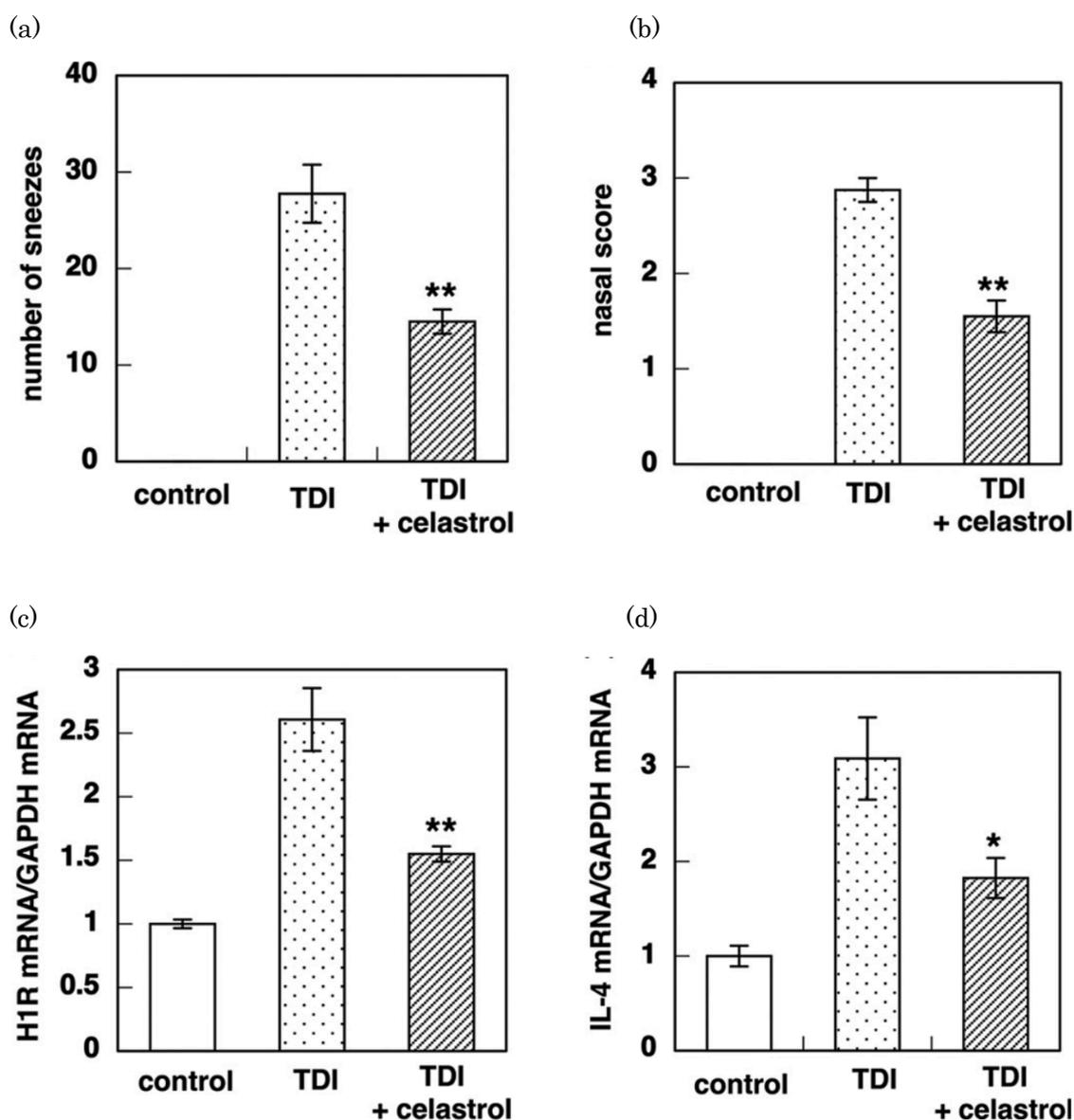


Figure 11 鼻過敏症モデルラットに対する celestrol の効果

(a): くしゃみ回数 (b):鼻症状 (c): H1R 遺伝子発現 (d): IL-4 遺伝子発現

*: $P < 0.05$ vs TDI n=4

** : $P < 0.01$ vs TDI n=4

3.3.9. PKC δ のリン酸化に対する効果

HeLa 細胞における PMA 刺激による PKC δ のリン酸化に対する 17-AAG の影響を検討した。17-AAG の処置により、PKC δ のリン酸化は抑制された(Fig. 12)。この結果から、HSP90 は PKC δ を介した H1R 遺伝子発現メカニズムにおいて重要な役割を担っていることが示唆された。

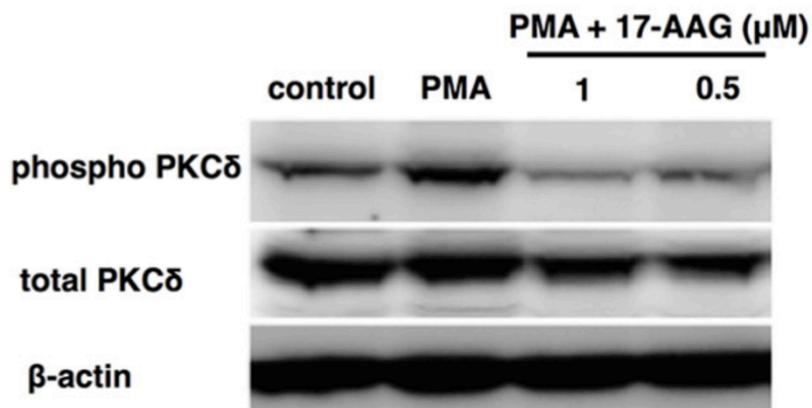


Figure 12 17AAG の PKCδ-ERK シグナルに対する影響

ウエスタンブロットの条件

<1次抗体>

p-PKCδ Y311 抗体 1:1000

PKCδ 抗体(rabbit) 1:1000

β-actin 抗体(mouse) 1:3000

<2次抗体>

anti-rabbit 抗体 1:20000

anti-mouse 抗体(β-actin) 1:30000

3.3.10. HSP90-PKCδ の相互作用

PKCδ と HSP90 が複合体を形成するという報告がある[11-13]。そこで、PKCδ 抗体を用いた共免疫沈降で(-)-maackiain の PKCδ-HSP90 複合体に対する影響を検討した。HeLa 細胞において、HSP90 は PKCδ と複合体を形成して存在しており、(-)-maackiain 及び 17-AAG の処置により、HSP90-PKCδ 複合体形成は阻害された(Fig. 13)。この結果から、(-)-maackiain は HSP90- PKCδ の相互作用を阻害することで、PKCδ シグナルを抑制することが示唆された。

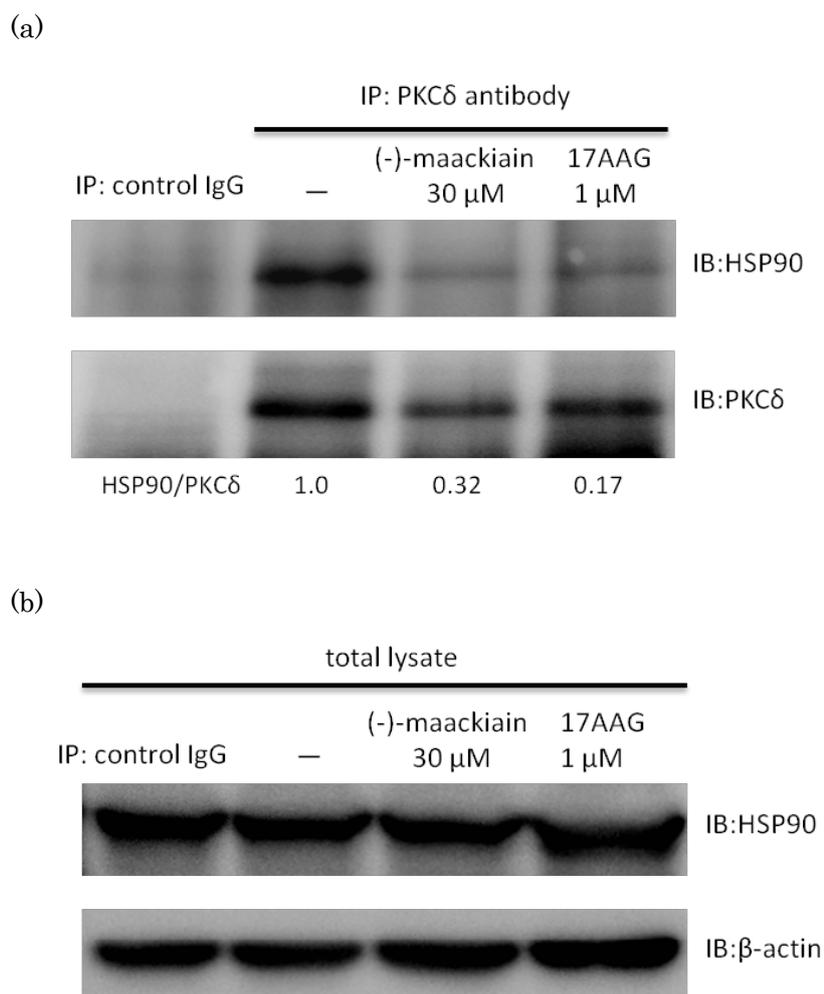


Figure 13 PKC δ -HSP90 複合体に対する(-)-maackiain の影響

(a): IP(PKC δ) (b): total lysate

<1次抗体>

PKC δ 抗体(rabbit) 1:500

HSP90 抗体(rabbit) 1:500(IP)、1:1000(total lysate)

β -actin 抗体(mouse) 1:3000

<2次抗体>

anti-rabbit 抗体 1:15000

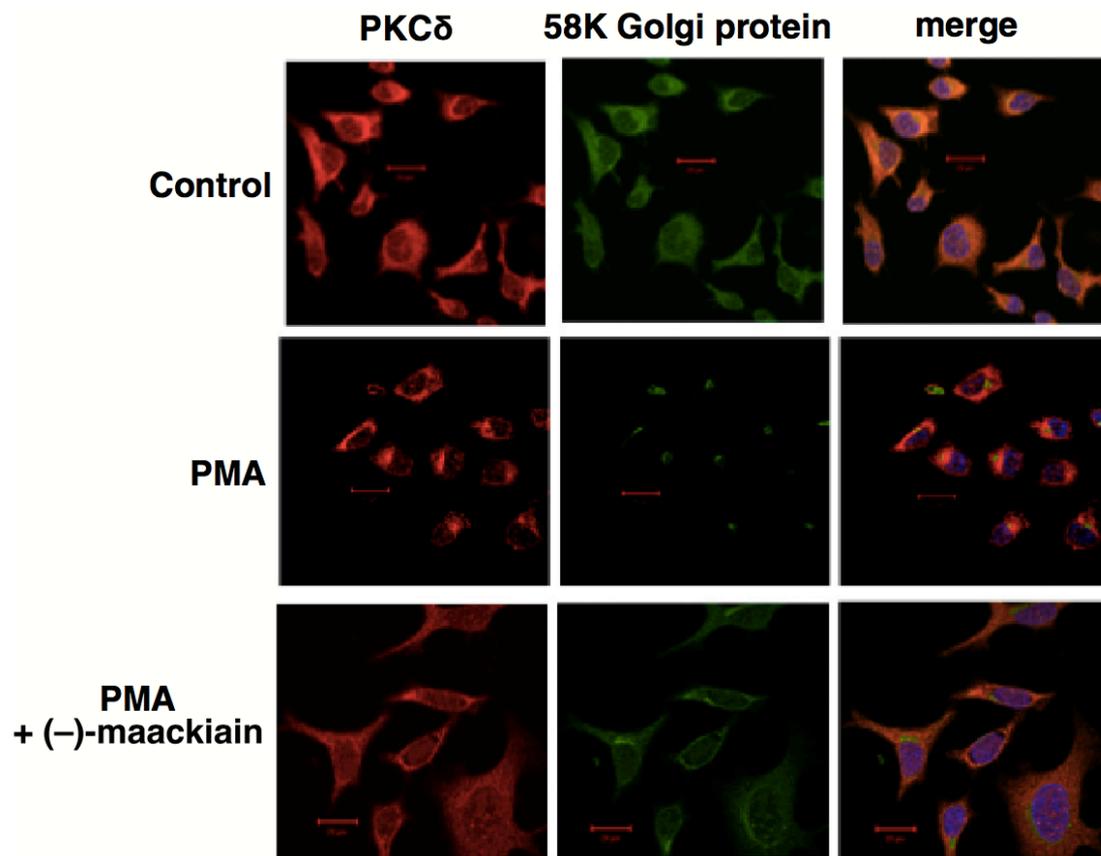
anti-mouse 抗体(β -actin) 1:30000

3.3.11. PKC δ の Golgi への移行に対する HSP90 の関与

我々は、ヒスタミン及び PMA 刺激により、PKC δ が細胞質から Golgi に移行すること明らかにした[14]。この PKC δ の Golgi への局在化は H1R 遺伝子発現に関与していると考えられる。そこで、PKC δ 抗体と 58 K Golgi marker protein 抗体を用いた免疫蛍光染色によ

り、PKC δ トランスロケーションに対する(-)-maackiain および 17-AAG の影響を検討した。PMA 刺激により、PKC δ は Golgi 周辺に局在化するが、(-)-maackiain および 17-AAG 処置によりそれは抑制された(Fig. 14)。

(a)



(b)

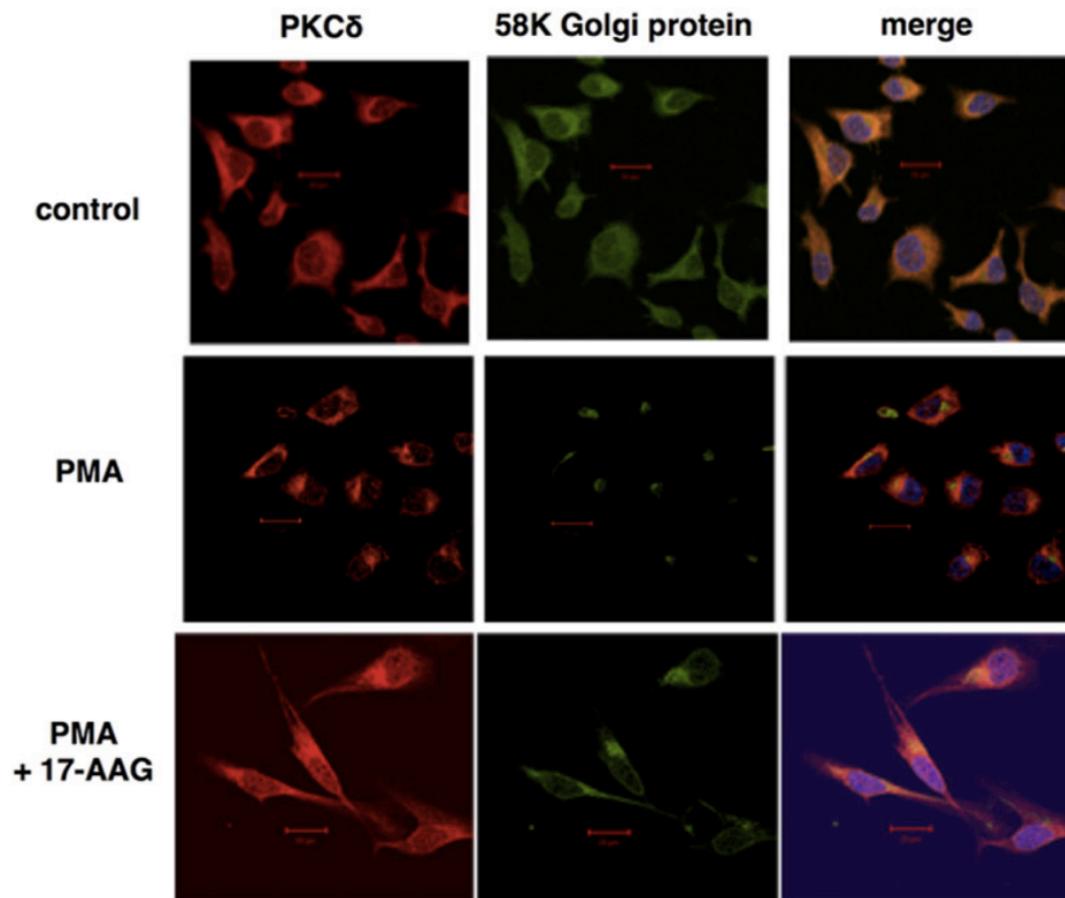


Figure 14. PKC δ のトランスロケーションに対する(-)-maackiain 及び 17-AAG の影響

(a): (-)-maackiain (b): 17-AAG

3.4 考察

本章では、(-)-maackiain が結合するタンパク質の探索を行い、(-)-maackiain が H1R 遺伝子発現亢進を抑制するメカニズムを解明する目的で研究を行った。

Böhl らの方法を用いて HeLa 細胞溶解液中のタンパク質より (-)-maackiain と相互作用するタンパク質を探索した[3]。この方法は、トリプトファンに由来するタンパク質の蛍光が低分子の結合により消光することを利用して、低分子が結合するタンパク質を探索する方法である。その結果、(-)-maackiain に結合する標的タンパク質の候補として、HSP90 を見出した。Recombinant HSP90 を用いて (-)-maackiain と HSP90 の相互作用を検討した結果、(-)-maackiain は濃度依存的に recombinant HSP90 由来の蛍光を抑制した(Fig. 5)。磁気ビーズに (-)-maackiain を固定化し、HeLa 細胞溶解液中の HSP90 との結合を検討した。スパーサーの先端がエポキシ基の磁気ビーズを用いて (-)-maackiain を結合させ、(-)-maackiain immobilized beads を作製した。HeLa 細胞溶解液中に (-)-maackiain immobilized beads を懸濁しインキュベーションした後に、プルダウンし (-)-maackiain immobilized beads に結合した HSP90 を、HSP90 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。その結果、(-)-maackiain immobilized beads により HSP90 がプルダウンされており、HeLa 細胞溶解液と beads をインキュベーションする際に遊離の (-)-maackiain を添加するとプルダウンされる HSP90 の量が減少した(Fig. 6)。この結果から、(-)-maackiain は HSP90 に結合することが明らかとなった。さらに、(-)-maackiain を処置した HeLa 細胞の細胞溶解液に ATP を固定化した ATP beads を懸濁させ、ATP beads に結合した HSP90 をウェスタンブロットにより検出した結果、(-)-maackiain の処置により ATP beads に結合した HSP90 の量は減少した(Fig. 7)。この結果から、(-)-maackiain は HSP90 の ATP への結合に影響を与え、HSP90 の機能を阻害することが示唆された。

ゲルダナマイシンは HSP90 の N 末端の ATP 結合部位に結合し、HSP90 の活性を阻害する阻害剤である。そこで、HSP90 の ATP 結合部位へのゲルダマイシンの結合に対する (-)-maackiain の影響を、FITC 標識ゲルダナマイシンを用いたゲルダナマイシン competition assay により検討した。その結果、(-)-maackiain の FITC 標識ゲルダナマイシンの HSP90 の ATP 結合部位に対する結合阻害が認められた(Fig 8, IC₅₀: 10 μ M)。一方で、17-AAG の IC₅₀ は 0.64 μ M であり、(-)-maackiain は約 16 倍高い IC₅₀ であった。この結果から、(-)-maackiain は HSP90 の ATP 結合部位とは異なるサイトに結合すると考えられた。HSP90 は ATPase 活性を持ち、HSP90 に ATP が結合することによりクライアントタンパク質との親和性が向上することが知られており、クライアントタンパク質に対する種々の機能に重要であることが知られている[6-10]。そこで、マラカイトグリーン試薬を用いて HSP90 の ATPase 活性による ATP の分解により発生する遊離リン酸を測定する HSP90 ATPase assay により、(-)-maackiain の HSP90 の ATPase 活性に対する効果を検討した。その結果、(-)-maackiain は HSP90 の ATPase 活性に対して抑制傾向を示したが、17-AAG

と比較して非常に弱いものであった(Fig. 9)。この結果及びゲルダナマイシン competition assay の結果から、(-)-maackiain は HSP90 の ATP 結合部位の近傍だが若干異なる部位に結合することが示唆された。また、これらの結果は ATP beads binding assay の結果と異なる傾向を示したが、その理由は HSP90 の環境の違いである可能性が考えられる。ゲルダナマイシン competition assay や HSP90 ATPase assay は recombinant HSP90 を用いたのに対し、ATP beads binding assay は(-)-maackiain を HeLa 細胞に処置し、その細胞溶解液を用いて実験を行なった。コシャペロン等の HSP90 の活性に影響を与える因子の存在の有無が結果に影響を与えたと考えられた。

次に、HSP90 の H1R 遺伝子発現に対する関与を検討するために、HSP90 の阻害剤である 17-AAG、celastrol 及び novobiocin をそれぞれ HeLa 細胞に処置し、PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進に対する HSP90 の関与を検討した。17-AAG はゲルダナマイシン誘導体であり、HSP90 の N 末端の ATP 結合部位に結合し、HSP90 の活性を阻害する阻害剤である[9]。Celastrol は HSP90 の C 末端領域に結合し、HSP90 とコシャペロンとの相互作用を阻害する[15, 16]。Novobiocin は、HSP90 の二量体化に関与する C 末端領域に結合し、コシャペロンやクライアントタンパク質への相互作用を阻害する[17]。検討の結果、17-AAG、celastrol 及び novobiocin は HeLa 細胞における PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を有意に抑制した(Fig. 10)。さらに、celastrol を鼻過敏症モデルラットに投与した結果、celastrol の投与により、鼻の腫れ、鼻水等の症状や H1R 及び IL-4 遺伝子発現は抑制された(Fig. 11)。以上の結果から、HSP90 は H1R 遺伝子発現及び花粉症に関与することが示唆された。

PKC δ と HSP90 が複合体を形成するという報告がある[11-13]。このことから、H1R 遺伝子発現シグナルにおいて、HSP90 は PKC δ と複合体を形成し PKC δ の活性化を調節すること H1R 遺伝子発現に関与していると考えられた。そこで、HSP90 阻害剤である 17-AAG を用いて、HeLa 細胞における PMA 刺激による PKC δ の Y311 のリン酸化に対する影響を検討した。その結果、17-AAG の処置により PMA 刺激による PKC δ のリン酸化は抑制された(Fig. 12)。さらに、PKC δ 抗体を用いた共免疫沈降の結果、HSP90 は PKC δ と複合体を形成していることが確認できた。そして、(-)-maackiain 及び 17-AAG の処置により、HSP90-PKC δ の相互作用は阻害された(Fig. 13)。さらに、これまでの研究で、我々はヒスタミン及び PMA 刺激により、PKC δ が細胞質から Golgi に移行すること明らかにしている[14]。PKC δ 抗体と 58 K Golgi marker protein 抗体を用いた免疫蛍光染色により、PKC δ トランスロケーションに対する(-)-maackiain および 17-AAG の影響を検討した結果、PMA 刺激により、PKC δ は Golgi 周辺に局在化するが、(-)-maackiain および 17-AAG 処置によりそれは抑制された(Fig. 14)。この結果より、PKC δ のトランスロケーションには HSP90 が関与しており、(-)-maackiain は HSP90 の機能を阻害して PKC δ のトランスロケーションを抑制することが示唆された。

本章において、我々は、(-)-maackiain の標的タンパク質を探索し、HSP90 を見出した。

HSP90 阻害剤である 17-AAG、celastrol 及び novobiocin は HeLa 細胞における PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を抑制し、17-AAG は PKC δ の Y311 のリン酸化を阻害した。PKC δ 抗体を用いた共免疫沈降により、(-)-maackiain 及び 17-AAG は HSP90-PKC δ 複合体形成を阻害することが明らかとなった。さらに、(-)-maackiain 及び 17-AAG は PKC δ の Golgi へのトランスロケーションを阻害した。上記の結果、HSP90 は PKC δ と複合体を形成し PKC δ の活性を調節することで H1R 遺伝子発現に関与しており、(-)-maackiain は HSP90-PKC δ 複合体形成を阻害することで H1R 遺伝子発現亢進を抑制することが明らかとなった。

第4章 総括

本研究では、苦参より単離された抗アレルギー物質である(-)-maackiain の鼻過敏症モデルラット及び H1R 遺伝子発現亢進に対する効果を検討し、(-)-maackiain の H1R 遺伝子発現亢進抑制効果の作用機序の解明を目的として研究を行った。

まず、我々は第 2 章において(±)-maackiain の全合成を試みた。Bis(benzonitrile)palladium(II)dichloride を用いることで、水銀などの有害な重金属を使用する従来の方法と異なる合成法を確立した。合成によって得た(±)-maackiain は鼻過敏症モデルラットにおいて鼻症状及び H1R、IL-4 遺伝子発現亢進を抑制した。また、HeLa 細胞において、(-)-maackiain 及び(±)-maackiain より分割した(+)-maackiain は、PMA 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。このことから、(-)-maackiain は(±)-maackiain と同様に鼻過敏症モデルラットの症状を抑制すると考えられた。H1R 遺伝子発現に強く関与する PKC δ のキナーゼ活性に対して(-)-maackiain は抑制効果を示さなかった。一方で、(-)-maackiain は PKC δ の活性化に重要と考えられている Y311 のリン酸化を抑制した。以上の結果より、(-)-maackiain は H1R 遺伝子発現亢進を抑制する効果を持ち、花粉症に対して有効であることが示唆された。さらに、(-)-maackiain は PKC δ の Y311 のリン酸化を抑制したが、PKC δ のキナーゼ活性阻害作用は示さなかったことから、(-)-maackiain の標的分子は PKC δ に関連のタンパク質であると考えられた。

第 3 章では、(-)-maackiain が相互作用するタンパク質の探索を行い、候補タンパク質の H1R 遺伝子発現に対する関与について検討した。HeLa 細胞の細胞溶解液を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画し、各フラクションに(-)-maackiain を添加しトリプトファンに由来するタンパク質の蛍光が低分子の結合により消光することを利用し、もっとも変化が大きかったフラクションより HSP90 を見出した。Recombinatn HSP90 を用いた検討においても(-)-maackiain は蛍光を抑制し、(-)-maackiain immobilized beads を用いた検討において、HeLa 細胞溶解液中の HSP90 の結合が認められた。一方で、ゲルダナマイシン competition assay において、(-)-maackiain の ATP 結合部位に対する結合は非常に弱く、HSP90 ATPase assay においても、(-)-maackiain は抑制傾向は示すものの、抑制効果は弱かった。以上の結果より、(-)-maackiain は HSP90 に結合するが、(-)-maackiain の結合部位はゲルダナマイシンと若干異なる ATP 結合部位の近傍部であることが示唆された。

17-AAG、celastrol 及び novobiocin は HSP90 阻害剤として知られている化合物であるが、これらは HeLa 細胞における H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。17-AAG は PKC δ の Y311 のリン酸化を阻害し、celastrol は鼻過敏症モデルラットにおいて、鼻症状及び H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。PKC δ 抗体を用いた共免疫沈降により、HSP90 は PKC δ と複合体を形成しており、(-)-maackiain 及び 17-AAG は HSP90-PKC δ 複合体形成を阻害することが明らかとなった。さらに、(-)-maackiain 及び 17-AAG は PKC δ の Golgi へのトランスロケーションを阻害した。以上の結果より、HSP90 は PKC δ と複合体を形成し PKC δ の活性を

調節することで H1R 遺伝子発現に関与することが示唆された。

本研究の結果より、我々は、(-)-maackiain の H1R 遺伝子発現亢進の抑制のメカニズムは HSP90-PKC δ 複合体形成を阻害し、PKC δ 活性を阻害することであることを明らかにした。H1R 遺伝子発現メカニズムの一端を担う分子として見出された HSP90 は、花粉症をはじめとしたアレルギー疾患治療における標的分子になる可能性を持っており、HSP90 阻害剤は、H1R 遺伝子発現を制御しアレルギー症状の改善や症状の進行を抑制する新たな治療薬になりうると考えられた。

第 5 章 参考文献

第 2 章

1. Nathan, R. A., Meltzer, E. O., Selner, J. C., and Storms, W. Prevalence of allergic rhinitis in the United States. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, S808–S814, 1997
2. Okubo, K., Kurono, Y., Fujieda, S., Ogino, S., Uchio, E., Odajima, H., Takenaka, H., and Japanese Society of Allergology. Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol. Int.* 63, 357–375, 2014
3. Mizuguchi, H., Hatano, M., Matsushita, C., Umehara, H., Kuroda, W., Kitamura, Y., Takeda, N., and Fukui, H. Repeated pre-treatment with antihistamines suppresses transcriptional up-regulations of histamine H₁ receptor and interleukin-4 genes in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J. Pharmacol. Sci.* 108, 480–486, 2008
4. Mizuguchi, H., Kitamura, Y., Kondo, Y., Kuroda, W., Yoshida, H., Miyamoto, Y., Hattori, M., Fukui, H., and Takeda, N. Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses nasal symptoms and expression of histamine H₁ receptor mRNA in the nasal mucosa of patients with pollinosis. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 32, 745–748, 2010
5. Das, A. K., Yoshimura, S., Mishima, R., Fujimoto, K., Mizuguchi, H., Dev, S., Wakayama, Y., Kitamura, Y., Horio, S., Takeda, N., and Fukui, H. Stimulation of histamine H₁ receptor up-regulates histamine receptor itself through activation of receptor gene transcription. *J. Pharmacol. Sci.* 103, 374–382, 2007
6. Mizuguchi, H., Terao, T., Kitai, M., Ikeda, M., Yoshimura, Y., Das, A. K., Kitamura, Y., Takeda, N., and Fukui, H. Involvement of PKC δ /extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) signaling pathway in histamine-induced up-regulation of histamine H₁ receptor gene expression in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 286, 30542–30551, 2011
7. Matsushita, C., Mizuguchi, H., Niino, H., Sagesaka, Y., Masuyama, K., and Fukui, H. Identification of epigallocatechin-3-O-gallate as an active constituent in tea extract that suppresses transcriptional up-regulations of the histamine H₁ receptor and interleukin-4 genes. *J. Trad. Med.* 25, 133–142, 2008
8. Nurul, I. M., Mizuguchi, H., Shahriar, M., Venkatesh, P., Maeyama, K., Mukherjee, P. K., Hattori, M., Choudhuri, M. S., Takeda, N., and Fukui, H. *Albizia lebbeck* suppresses histamine signaling by the inhibition of histamine H₁ receptor and histidine decarboxylase gene transcriptions. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1766–1772, 2011
9. Hattori, M., Mizuguchi, H., Baba, Y., Ono, S., Nakano, T., Zhang, Q., Sasaki, Y., Kobayashi, M., Kitamura, Y., Takeda, N., and Fukui, H. Quercetin inhibits

- transcriptional up-regulation of histamine H₁ receptor via suppressing protein kinase C- δ /extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling pathway in HeLa cells. *Int. Immunopharmacol.* 15, 232–239, 2013
10. Holgate, S. T.: The 1992 Cournand Lecture. Asthma: past, present and future. *Eur. Respir. J.*, **6**, 1507-1520, 1993.
 11. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., Paul, W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 701-738, 1999
 12. Shahriar M, Mizuguchi H, Maeyama K, Kitamura Y, Orimoto N, Horio S, Umehara H, Hattori M, Takeda N, Fukui H. Suplatast tosilate inhibits histamine signaling by direct and indirect down-regulation of histamine H1 receptor gene expression through suppression of histidine decarboxylase and IL-4 gene transcriptions. *J Immunol* 183, 2133-2141, 2009
 13. Sharabanti D, Mizuguchi H, Ashih K.Das, Maeyama K, Horinaga S, Kato S, Tamada M, Hattori M, Umehara H, and Fukui H.: Kujin suppresses histamine signaling at transcriptional level in toluene 2, 4-diisocyanate-sensitized rats. *J Pharmacol Sci No.4* :606-617, Vol. 109, 2009
 14. Jaco C.B., Gerhardus J.H.R.: Structure and Synthesis of isoflavonoid analogues from *Neorautanenia amboensis* Schinz. *J.Chem.Soc. Perkin trans I* : 04-1809, 1980
 15. Sandor A., Katalin G., Laszlo J., Lorand K., Tibor K.: Synthesis of naturally occurring o-heterocyclic compounds of biological activity. *Pure Appl. Chem.* 76(5):1025-1032, 2004
 16. J.R. Doyle, P.E. Slade, and H.B. Jonassen.: Metal-Diolefin Coordination Compounds. *Inorg. Synth.* 6, 218, 1960
 17. Konishi H, Yamauchi E, Taniguchi H, Yamamoto T, Matsuzaki H. Phosphorylation sites of protein kinase C δ in H₂O₂-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. *PNAS.* vol. 98, no. 12, 6587-6592, June 5, 2001
 18. Honda G, Tabata M: Antidermatophytic substance from *Sophora angustifolia*. *Planta Med.* Oct; 46(2): 122-3, 1982
 19. Aratanechemuge Y, Hibasami H, Katsuzaki H, Imai K, Komiya T.: Induction of apoptosis by maackiain and trifolirhizin (maackiain glycoside) isolated from sanzukon (*Sophora Subprostrate* Chen et T. Chen) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncol Rep.* Dec;12(6):1183-8., 2004
 20. Gelboin HV, West D, Gozukara E, Natori S, Nagao M, Sugimura T. (-)Maackiain acetate specifically inhibits different forms of aryl hydrocarbon hydroxylase in rat and man. *Nature.* Jun 25;291(5817):659-61., 1981

21. Kitamura Y, Mizuguchi H, Ogishi H, Kuroda W, Hatthi M, Fukui H, Takeda N. Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses IL-5 but not IL-33 mRNA expression in the nasal mucosa of patients with seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. *Acta Otolaryngol.* Apr;132(4):434-8., 2012
22. Shirasaki H, Kanaizumi E, Seki N, Himi T., Localization and Upregulation of the Nasal Histamine H1 Receptor in Perennial Allergic Rhinitis. *Mediators Inflamm.* 2012:951316., 2012
23. Terada N, Hamano N, Maesako KI, Hiruma K, Suzuki K, Ishikawa K, Kanno A. Diesel exhaust particulates upregulate histamine receptor mRNA and increase histamine-induced IL-8 and GM-CSF production in nasal epithelial cells and endothelial cells. *Clin Exp Allergy.* Jan;29(1):52-9, 1999
24. Matsubara M, Ohmori K, Hasegawa K. Histamine H1 receptor-stimulated interleukin 8 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by bronchial epithelial cells requires extracellular signal-regulated kinase signaling via protein kinase C. *Int Arch Allergy Immunol.* 139(4):279-93., 2006
25. Masaki T, Kojima T, Okabayashi T, Ogasawara N, Ohkuni T, Obata K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirakawa S, Fuchimoto J, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. A nuclear factor- κ B signaling pathway via protein kinase C δ regulates replication of respiratory syncytial virus in polarized normal human nasal epithelial cells. *Mol Biol Cell.* Jul 1;22(13):2144-56, 2011

第 3 章

1. Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J., and Lindquist, S. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3919 –3930, 1989
2. Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., and Neckers, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 10, 537–549, 2010
3. M. Böhl., C. Czupalla., S.V. Tokalov., B. HoXack., H.O. Gutzeit.: Identification of actin as quercetin-binding protein: An approach to identify target molecules for specific ligands. *Anal. Biochem.* 346, 295–299, 2005
4. Yoshimura, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Kobayashi, K., Isobe, T., and Yamauchi, T. Identification of protein substrates of Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II in the postsynaptic density by protein sequencing and mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 948 –954, 2002

5. Millson, S. H., Truman, A. W., Rańcz, A., Hu, B., Panaretou, B., Nuttall, J., Mollapour, M., Söti, C., and Piper, P. W. Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the α and β isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90 β generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *FEBS J.* 274, 4453– 4463, 2007
6. Purva Bali, Michael Pranpat, James Bradner, Maria Balasis, Warren Fiskus, Fei Guo, Kathy Rocha, Sandhya Kumaraswamy, Sandhya Boyapalle, Peter Atadja, Edward Seto, and Kapil Bhalla. Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90. *J Biol Chem* Vol. 280, No. 29, Issue of July 22, pp. 26729–26734, 2005
7. Rowlands, M. G., Newbatt, Y. M., Prodromou, C., Pearl, L. H., Workman, P., and Aherne, W. High-through put screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Anal. Biochem.* 327, 176 –183, 2004
8. Howes, R., Barril, X., Dymock, B. W., Grant, K., Northfield, C. J., Robertson, A. G. S., Surgenor, A., Wayne, J., Wright, L., James, K., Matthews, T., Cheung, K.-M., McDonald, E., Workman, P., and Drysdale, M. J. A fluorescence polarization assay for inhibitors of Hsp90. *Anal. Biochem.* 350, 202–213, 2006
9. Guo, W., Reigan, P., Siegel, D., Zirrolli, J., Gustafson, D., and Ross, D. Formation of 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17-AAG) hydroquinone by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role of 17-AAG hydroquinone in heat shock protein 90 inhibition. *Cancer Res.* 65, 10006 –10015, 2005
10. AGrenert JP, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E, Krutzsch H, Ochel HJ, Schulte TW, Sausville E et al. The amino-terminal domain of heat shock protein90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem* 272, 23843-23850, 1997
11. Christine M. Gould, Natarajan Kannan, Susan S. Taylor, Alexandra C. Newton. The Chaperones Hsp90 and Cdc37 Mediate the Maturation and Stabilization of Protein Kinase C through a Conserved PXXP Motif in the C-terminal Tail. *J Biol Chem* 286, 8, 4921-4935, 2009
12. Tariq S. Adwan, Angela M. Ohm, David N. M. Jones, Michael J. Humphries, Mary E. Reyland. Regulated Binding of Importin- α to Protein Kinase C δ in Response to Apoptotic Signals Facilitates Nuclear Import. *J Biol Chem* 286, 41, 35716-35724, 2011
13. Youngmi Kim, Kyungjong Kim, Hansoo Lee, Sanghwa Han, Yun-Sil Lee, Jongseon Choe, Young-Myeong Kim, Jang-Hee Hahn, Jai Youl Ro, Dooil Jeoung. Celastrol binds to ERK and inhibits Fc ϵ RI signaling to exert an anti-allergic effect. *Eur J*

- Pharmacol 612, 131-142, 2009
14. Mizuguchi, H., Terao, T., Kitai, M., Ikeda, M., Yoshimura, Y., Das, A.K., Kitamura, Y., Takeda, N., and Fukui, H. Involvement of PKC δ /extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) signaling pathway in histamine-induced up-regulation of histamine H1 receptor gene expression in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 286, 30542–30551, 2011
 15. Zhang, T., Li, Y., Yu, Y., Zou, P., Jiang, Y., and Sun, D. Characterization of celastrol to inhibit Hsp90 and Cdc37 interaction. *J. Biol. Chem.* 284, 35381–35389, 2009
 16. Chadli, A., Felts, S.J., Wang, Q., Sullivan, W.P., Botuyan, M.V., Fauq, A., Ramirez-Alvarado, M., and Mer, G. Celastrol inhibits Hsp90 chaperoning of steroid receptors by inducing fibrillization of the co-chaperone p23. *J. Biol. Chem.* 285, 4224 – 4231, 2010
 17. Yun, B.G., Huang, W., Leach, N., Hartson, S.D., and Matts, R.L. Novobiocin induces a distinct conformation of Hsp90 and alters Hsp90-cochaperon-client interaction. *Biochemistry* 43, 8217– 8229, 2004

謝辞

終わりに臨み、多大なる御支援のもと、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 分子難治性疾患学分野 福井 裕行 特任教授、分子情報薬理学分野 藤野 裕道 教授 に心より感謝の意を表するとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、常日頃から親身になって厚く御助言と御指導下さいました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 分子情報薬理学分野 水口 博之 准教授 に心より感謝致します。

また、本研究における有機合成の実験にあたり、他研究室の学生にも関わらず心温かく御指導頂きました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 機能分子合成薬学分野 根本 尚夫 准教授 に厚く感謝致します。

さらに、本研究の共同研究者として御協力下さいました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 耳鼻咽喉科学分野 武田 憲昭 教授、徳島大学大学院医歯薬学研究部 耳鼻咽喉科学分野 北村 嘉章 講師、吉村 好之 先生、岡本 恵暢 氏に深く感謝致します。

そして、常日頃から熱心な議論と有益な御助言を頂きました加藤 周平 氏、坂本(旧姓: 金山) 知代 氏、永井 浩章 氏、小笠原 健泰 氏、佐々木 陽平 氏をはじめ、徳島大学大学院医歯薬学研究部 分子情報薬理学分野の皆様心より感謝致します。

最後に、博士後期課程の履修にあたり、理解と御支援を頂きました家族並びにいつも温かく見守って下さった両親に心より感謝致します。

2017年6月

成相 祐希