

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	園田 健登
審査委員	主査 佐賀大学 准教授 川口 真一
	副査 佐賀大学 講師 辻田 忠志
	副査 鹿児島大学 教授 小松 正治
	副査 佐賀大学 准教授 光武 進
	副査 鹿児島大学 助教 坂尾 こず枝
審査協力者	
実施年月日	令和5年 1月 20日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、令和5年1月20日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	園田 健登
<p>[質問1] PyrZAは人工物か天然物か?どのようなライブラリーから得たものか。</p> <p>[回答1] 公的化合物ライブラリーから得た。PAINS化合物はあらかじめ除いてであるとされるが、紛れ込んで来る。</p> <p>[質問2] 2OGのアナログでなはいPyrZAを単独で作用させると、細胞内の2OGが作用して真逆の効果をも進行させるのか。</p> <p>[回答2] 2OGとPyrZAは競合しない。PyrZAは五員環構造を持つのでHIFタンパク質の部分構造と競合すると考えている。ドッキングシミュレーションからもそう示唆されている。</p> <p>[質問3] HIF-1を安定化するとがんにとって有利になるのでは。</p> <p>[回答3] 確かにHIFはがんを促進させてしまう。虚血性疾患などはHIFを上昇させたほうが良い。がんを増殖させるのは副作用の一つ。がんの増殖マーカーで投与を制御したりする必要があると考えている。</p> <p>[質問4] 使っている細胞はすべてがん細胞だが、初代培養細胞でも同様の効果を示すか?</p> <p>[回答4] 初代培養細胞ではHIFの安定化能は低下する可能性がある。ただし、マウス個体ではいくつかの臓器でHIFの安定化が観察された。ほかのPHD阻害剤についても正常細胞での効果が報告されているおり、PyrZAも同様と考えられる。</p> <p>[質問5] マウスでのmRNA測定のターゲットをEPO、PHD3やCA9に限っていたがなぜか?</p> <p>[回答5] 多くの論文などでHIF-1の標的遺伝子として採用されておりこれらを測定した。</p> <p>[質問6] マウスの性別について、メスの結果をプレゼンでは示していたがなぜか?</p> <p>[回答6] オスでは十分なサンプル数が得られなかったのと、最初にメスで優位性があるのではというデータが得られたので、プレゼンでは採用した。</p> <p>[質問7] 雌雄間でなぜ効果が異なるのか考察はあるか?</p> <p>[回答7] エストロゲンなどのホルモンがPHDに作用する論文などがある。その可能性は否定できない。</p> <p>[質問8] 腹腔内投与にした理由は?なぜ経口投与で見なかったのか?</p> <p>[回答8] 経口より効きやすい腹腔内投与をはじめに選んだ。</p> <p>[質問9] エリスロポエチンの代替として考えているのか、それとももっと広く利用法は考えられるのか?</p> <p>[回答9] 動物個体においては副作用の懸念があるが、広く利用法が考えられる。</p> <p>[質問10] 2OGアナログとのPyrZAの違いや特長について、下流の遺伝子の違いなどで説明できるか?</p> <p>[回答10] 今は実験できていないがIKK<math>\beta</math>のシグナルを調べると、PHD1-3の阻害の選択性が判別できる可能性がある。ただ、一番興味を持っているのがどこに作用しているのかを知りたいので、PHD1-3のタンパク質の大量取得に着手している。</p> <p>[質問11] PyrZAやPyrZA誘導体はHIF-1のプロリン残基に作用するという話だったが、構造活性相関ができそうであるが、後から作ったものがより深くはまるなどの実験結果はあるか?</p> <p>[回答11] まずは、本当に予想している箇所に作用するのかを共結晶構造をとるなどして考察できればと考えている。</p> <p>[質問12] プロリン残基をミミックしていると考えられるが図を見る限りあまりプロリン残基の周りが保存されていない。そして、PyrZAには疎水性残基が多い。それに着目したらより結合の強い化合物を設計できるのではないか。</p> <p>[回答12] そのとおりである。プロリン残基の周りには疎水性残基のアラニンやロイシンなどが多く配置されており、共通点があることも考えている。</p>	

- [質問13] プロリンの場所はC末端のほうかN末端のほうか？真ん中なのか？
- [回答13] 水酸化されるプロリン残基は2つある。真ん中のほうで末端側ではない。
- [質問14] 従来型PHD阻害剤の副作用の話がありました。どれくらいの濃度でどのような副作用が出るのか？
- [回答14] 濃度で説明するのは難しいが、PHDを阻害しすぎると多血症になる。その他、がん化などの副作用が報告されている。
- [質問15] 脂溶性の話があったが、水溶性についてのデータはあるか？LogPは割合なのでそれだけでは水溶性がわからない。
- [回答15] 定量的なデータはない。LogPの実測値はあってそれが1.1であった。しかしPyrzAはコーンオイルに溶解しない。溶媒への溶解性を上昇させる必要がある。
- [質問16] 脂溶性が上昇したから活性が上がったという話であったが、いろいろ変えた置換基の効果で考察はできないのか？
- [回答16] トプリスのtreeに従って化合物の合成をしようと考えたが置換基と活性の相関性が合わないので、脂溶性が問題であるという結論に至った。
- [質問17] 細胞腫3種を使って、HIFの安定化を見ていたが細胞によって感受性が違うように見られたが、考察はあるか？トランスポーターの影響があるか？
- [回答17] トランスポーターについては難しい。細胞によって培養条件が微妙に違ってその影響なのか、細胞の化合物の取り込みが問題なのかはよくわかっていない。
- [質問18] 化合物2Cの時に頭打ちになっているが、細胞毒性ではないのか？
- [回答18] 3回繰り返しているが全部が全部頭打ちになっているわけではないので毒性ではないと考えている。
- [質問19] 化合物2Cの時に何時間目からHIFの安定化がみられたか？
- [回答19] 化合物2CではタイムコースはとっていないがPyrzAはレポーターアッセイではとっており6時間目からHIFレポーター活性は上昇する。
- [質問20] 疎水性を上げているけれども上げすぎたら活性が出ないとあったが、これを見ると取り込み量の差と見えたが、膜透過性を見ようとしたことはあるか？取り込み量がわかれば構造活性相関の議論をすることができる。
- [回答20] 将来的には膜透過性を確認するのは重要だと考える。
- [質問21] R/Sの話が出てきたがこれはラセミ体なのか？R/S=1:1で存在しているのか？ラセミ体であるということの証明はどのようにするのか？
- [回答21] (構造を示しながら) フェニル基が結合しているところに不斉点がある。ラセミ体はNMRでは確認できない。分離はする必要があると考えている。合成経路を見るとR/Sどちらが有利になるというのがないのでラセミではないかと考えている。
- [質問22] R/Sどちらの光学異性体が活性を持つのか？S体なのか？
- [回答22] S体のドッキングシミュレーションの結果のほうが良い数値が出ているのでS体ではないかと考えているが分けて測定する必要がある。
- [質問23] R体とS体のドッキング結果に差が出た原因は？
- [回答23] PHDのポケットの向きが関係していると考えている。
- [質問24] 五員環構造さえあればR/S関係なくHIFを阻害できてしまうのではないのか？どのように考えたらよいか？
- [回答24] 分子が大きくなっているので脂溶性ポケットの相互作用が大きくなっているのが原因ではないかと考えている。分子が大きいほうが結合しやすい。
- [質問25] 収率の低いサンプルについて、なぜ収率が低下していたのか？
- [回答25] 反応性と、精製時にロスをしていたので収率が低下した。
- [質問26] 化合物1oについて、これだけ細胞が増殖しているがなぜか？
- [回答26] MTT活性評価での結果で、細胞を直接観察していない。基本的にHIFを活性化させると細胞は増殖に傾くが、原因は不明。
- [質問27] PyrzAの前駆体はアセチル基がないため活性をもたないとある。それはPHDとの作用で最もキーとなる構造はどれだと考えているのか？
- [回答27] 断言はできないが、五員環周辺の2つのケトン基ではないかと考えている。
- [質問28] PyrzAは平面ですか、それともねじれていますか？

[回答28] Pyr2Aは平面です。フェニル基は張り出しています。

[質問29] 長いアルキル鎖を持つ化合物1pはよい結果が出ていますが採用しなかったのはなぜか？

[回答29] 長い直鎖の分子は界面活性剤のように振る舞い膜に刺さる可能性があるもので省いた。

[質問30] 分子量500を超えるものがある。取り込みを考えると分子量を小さくする必要がある。それについての今後の戦略は？

[回答30] フェニル基を外した分子を考えており、同時に不斉解消もできる。

[質問31] PHD3のターゲットにEPORがある。EPORはフィードバックに効くということですか？

[回答31] EPORはとIKK $\beta$ も同様に低酸素状態では活性化させる方向に、通常酸素状態では止める方向に働くことが報告されている。EPORはフィードバックに関係しており多血症などを抑制するフィードバック機構として働いている。

[質問32] カイコではPHDタンパク質を合成できたが、昆虫細胞では作れなかったとあるがなぜか？

[回答32] 10-15匹のカイコを使用する方がスケールメリットが大きいのが理由。また、昆虫に最適化したコドンを用いたことが成功した理由の一つである。以前実施した昆虫細胞を用いた時はヒト用のコドンで試みており、発現効率は低かった。発現量も低く精製が難航したことが原因である。

[質問33] 今回用いたカイコはどこから購入したものか？遺伝子的にそろっているのか？自然にあるものか？

[回答33] 遺伝的に同一のものかは不明。大スケールでやっているなので個体差があったとしても平均化されていると考えている。

[質問34] 分解系を止めることでHIFの水酸化を確認しているが、合成系を止めることで見なかったのはなぜか？

[回答34] HIFの合成を止めても実験はできると考えている。しかし、HIFは分解されてしまうというのがあるのでMG132を入れるタイミングが難しい。タイムコースを見る必要があるので今回は実験しなかった。

[質問35] タイムコースを測定するときHIFの活性化を測定するポイントを継続的に見ているのかエンドポイントをそろえてみているのか？

[回答35] 同時に培養して、化合物を刺激する時間をずらしてエンドポイントをそろえて測定している。細胞数が変わらないようにしている。

[質問36] ディスカッションのサイドエフェクトの図でHypoxiaが一番上にあってその下に2OGアナログのPHD阻害剤の図の配置になっている。この図の意図は？

[回答36] 低酸素、DMOG、PHD特異的阻害剤の3種類でHIF標的遺伝子の発現誘導を比較した報告があった。3者間の発現誘導の違いから、低酸素では最も広範囲で影響することからこのような図にした。Pyr2AがDMOG、PHD特異的阻害剤とは異なる遺伝子発現誘導になったらよい。