

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病 に対する病態解明と創薬探索システムの確立

所 属：国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第五部
研究者：桃井 隆

研究要旨 神経疾患（パーキンソン病、ポリグルタミン病、ALS、プリオン病）にみられる立体構造異常蛋白が示す蛋白分解に対する抵抗性を解析し、こうした異常蛋白の蓄積凝集が誘導するコンフォメーション病の病態と小胞体ストレスとの関連について解析するとともに、酵母、細胞、マウスの病態モデルを作製し、創薬探索システムを確立し、異常蛋白分解を促進する化合物の探索を目的としている。

分担研究者

- (1) 磯合 敦 旭硝子（株）基盤研究所
- (2) 上田正次 （株）ワイエス研究所
- (3) 日比野利彦 資生堂（株）研究所
- (4) 徳永文稔 大阪市立大学

A. 研究目的

細胞内では絶えず蛋白質が合成され、目的の場所に運ばれる。近年の研究で新しく合成される蛋白質の3分の1が折り畳み不全による不良品蛋白質である事が判明している。この不良品蛋白質の処理に関わるのが品質管理機構と呼ばれ、(1) フォールディングに必要なシャペロン蛋白質の転写速度を上げ、かつ、新たな蛋白質合成を抑制する(2) 異常蛋白質を分解する機構である。この品質管理機構や分解機構が破綻し、小胞体に過剰なストレスがかかると細胞では変性や死が引き起こされ、こうした反応が多様な神経変性の原因と考えられている。細胞は生体にとって有害となる折りたたみ異常蛋白質（ミスフォールド蛋白質）を細胞外へ分泌させず、細胞内で分解除去する品質管理機構を有していることが明らかにされてきた。その代表例が小胞体関連分解（endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD）機構である。ERADは小胞体内に新生された分泌蛋白質のフォールディングの正否を判断し、正常に折りたたまれた蛋白質は細胞外へ分泌させるが、ミスフォールド蛋白質はサイトゾルへ逆輸送し、ユビキチン・プロテアゾーム系によって分解する細

胞機構である。

ERADは多数の蛋白質が協調し構成する新生蛋白質制御システムである。まず、小胞体に新生された蛋白質は、熱ショック蛋白質ファミリー、チオレドキシシンファミリー、レクチンファミリーなどの分子シャペロンが一過性に会合し、折りたたみを識別する。その後、ミスフォールド蛋白質についてはレクチン様蛋白質（EDEMなど）が会合し、小胞体のチャンネル蛋白質（Sec61複合体、Derlinなど）を介してサイトゾルへ輸送される。サイトゾルではVCPなどのATPaseがミスフォールド蛋白質を引きずり出し、各種ユビキチンリガーゼによってユビキチン化された後、プロテアゾーム分解される。

近年、細胞内蛋白質分解の根幹をなすユビキチン・プロテアゾーム系は数多くの生物事象に関与することが明らかになった。ユビキチンシステムは、ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）、ユビキチンリガーゼ（E3）の酵素群が連鎖的に触媒し、ユビキチンを標的蛋白質に転移する反応系である。この中で、ユビキチンリガーゼは標的蛋白質の認識を司る最も重要な酵素である。現在、細胞内には約千種類にもものぼるユビキチンリガーゼが存在するといわれ、リン酸化修飾、N型糖鎖、酸化修飾など様々な構造変化を認識し、ミスフォールド蛋白質を識別すると考えられている。ユビキチンリガーゼによってLys48結合型のポリユビキチン鎖が付加されたミスフォールド蛋白質は、プロテアゾームに結合し、脱ユビキチン化されたのちペプチ

ドレベルに分解されることが知られる。一方、オートファジーは、細胞内の大規模な分解システムで細胞質タンパク質やオルガネラの定常状態の代謝回転に働いていると考えられている。今日までにオートファジーの亢進を伴う疾患がいくつか報告されているが、それが病態の原因なのか、結果なのかはよく解っていない。しかしながら、これらの疾患には神経変性疾患のような異常蛋白質の処理機構に問題があると考えられる疾患が含まれており、異常蛋白質の排除にオートファジーが関与していると考えられてきている。昨年度は、神経変性疾患で観察される空腔 Vacuole 形成がみられるオートファジックな細胞死にはどのような機構が働いているのかを解明するため、ポリグルタミンによるオートファジー形成について報告した。今年度は ER ストレスとオートファジーの関係について検討した。こうした異常蛋白凝集は小胞体内と外でおこる。小胞体内の場合、小胞体分子シャペロンが誘導され小胞体内腔に蓄積した異常たんぱく質を折り畳むことで細胞死から防御する。

本研究は、

1) ヒトコンフォメーション疾患における ER ストレス発生の分子機構と細胞死抑制の分子機構の解明。2) 異常タンパク質の処理・排出を活性化するのに必須の遺伝子の探索を目的としている。

また、ポリグルタミン凝集のように異常蛋白の凝集が小胞体外でおこる場合についても、異常蛋白凝集が誘導する細胞死と凝集抑制の分子機構について解析を目的として、3) 神経変性疾患で観察される空腔 Vacuole 形成がみられるオートファジックな細胞死にはどのような機構が働いているのかを解明するため、ポリグルタミンによるオートファジー形成についての解析。さらに、4) 細胞死の中核をなすカスパーゼ活性化の機構の解明、5) こうした機構を基礎としての疾患治療薬の開発、6) 治療のためのヒト疾患モデル動物の作製を目的とした。

B. 研究方法

1) 免疫沈降・ウェスタンブロット

培養細胞を 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Sigma) にて細胞を可溶化

し回収した後、蛋白質量を Bradford 法にて測定した。これを SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、一次抗体及び HRP を結合した二次抗体を順次反応させ、ECL 法によって HRP 反応性バンドを発光させ、LAS3000 Bioimaging analyzer (FUJI Film) にて検出した。

2) オートファジー形成の検出

オートファジーの検出には、LC3 抗体を用いたイムノブロット法により解析を行った。C2C5 細胞、Atg5+/+MEF 細胞および Atg5-/-MEF 細胞は EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入し、ラパマイシンまたは 3-メチルアデニンを添加し、時間を追って細胞を集めた。集めた細胞は、1% Triton X-100/PBS 溶液で懸濁し、その遠心上清確間を 12% SDS-アクリルアミドゲルにて泳動し、ニトロセルロースフィルターにブロッティングした。抗体と反応させた後、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラビットイムノグロブリンを用い、発色液で反応させた。

3) 免疫染色

EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入した C2C5 細胞、Atg5+/+MEF 細胞および Atg5-/-MEF 細胞を 2% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、LC3 抗体およびカスパーゼ 12 活性型特異的認識抗体 (anti-m12D341) を用いた免疫染色法を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4) DNA ラダーの検出

C2C5 細胞は EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入し、ラパマイシンまたは 3-メチルアデニンを添加し、時間を追って細胞を集めた。集めた細胞は、lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 20mM EDTA, 1% Triton X-100) で懸濁し、遠心上清を RNase A 処理、proteinase K 処理をし、フェノクロ処理後、DNA をエタノール沈澱にて回収した。回収した DNA は、1.8% のアガロースゲルにて泳動し、ラダーを検出した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトの DNA 解析、ヒト生体試料の使用はなかったため特別な配慮は行わなかった。組換え DNA 実験に関しては、規定に基づき申請し承認された。酵母を用いた発現系を用いており、発現させるタンパク質もヒト由

来ではあるものの、既に研究に利用された多くの実績があることから、倫理面での特段の配慮は必要ないと判断した。実験動物を使用する実験においては、動物愛護上の配慮を行い、学内に設置された倫理委員会に諮った上で研究を行った。

C. 研究結果

1) プロテインSをモデルとした小胞体関連分解(ERAD)機構の解析 (徳永)

プロテインSはビタミンK依存性血液凝固因子の一つで、プロテインCの補因子として血液凝固系の制御を行う。プロテインSの遺伝性欠乏症は常染色体劣性形質を示し、深部静脈血栓症を引き起こす。コンフォメーション病のモデル細胞系の一つとしてプロテインS-Y595C変異体をHEK293細胞に発現させ、細胞内局在を調べた。

その結果、まず、①細胞内のY595C変異体は小胞体型の高マンノース型糖鎖を切断するエンドグリコシダーゼH処理によって全てのN型糖鎖が切断されるが、正常型プロテインSはゴルジ体へ移行した一部がエンドグリコシダーゼH耐性になること、免疫蛍光染色を行うとY595C変異体は小胞体のマーカー蛋白質であるプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)と共局在することから、Y595C変異体は小胞体内に滞留することが示された。②次に、パルスチェイス解析からY595C変異体は細胞内で生合成されたのち、分泌されず細胞内で分解されていることが示された。③この分解機構を明らかにするため、各種阻害剤存在下でパルスチェイスを行うとプロテアソーム阻害剤であるMG-132やエポキシマイシンはY595C変異体の分解を抑制するが、リソソーム分解の阻害剤はY595C変異体の細胞内分解に影響しないことから、プロテアソームが主たるY595C変異体の分解酵素として機能することがわかった(図1)。④さらに、興味深いことにトリペプチジルペプチダーゼII(TPPII)の阻害剤であるAla-Ala-Phe-CH₂ClもY595C変異体の細胞内分解を抑制し(図1)、プロテアソーム阻害剤と共添加でその阻害活性が増強したことから、プロテアソームのみならずTPPIIもY595C変異体の細胞内分解に協調的に働く可能性が示唆された。⑤また、N型糖鎖プロ

セシング阻害剤のうち小胞体マンノシダーゼIの阻害剤であるキフネンシンによってY595C変異体の分解が抑制されたことから(図1)、小胞体内におけるN型糖鎖プロセシングがY595C変異体のERADに関与すると考えられた。

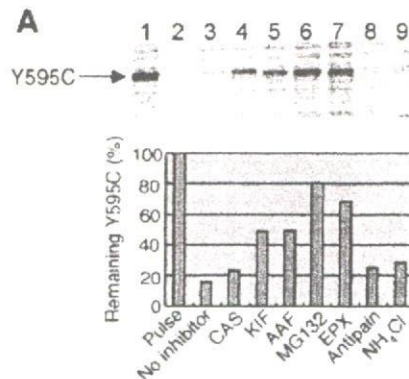


図1 プロテインS-Y595C変異体の細胞内分解における各種阻害剤の影響

プロテインS-Y595C変異体細胞を30分パルスラベルした後、8時間、阻害剤の存在または非存在下で培養し、細胞内に残存するプロテインSを免疫沈降、SDS-PAGEにて解析した。レーン1、パルスラベル；2、阻害剤非存在下でチェイス；3、カスタノスベルミン(CAS、小胞体グルコシダーゼ阻害剤)；4、キフネンシン(KIF、小胞体マンノシダーゼI阻害剤)；5、Ala-Ala-Phe-CH₂Cl(AAF、トリペプチジルペプチダーゼII阻害剤)；6、MG132(プロテアソーム阻害剤)；7、エポキシマイシン(EPX、プロテアソーム阻害剤)；8、アンチパイン(リソソーム酵素阻害剤)；9、塩化アンモニウム(リソソーム酵素阻害剤)。

2) IRP2へのヘムの導入とプロテアソーム分解シグナルの解析 (徳永)

細胞内の鉄濃度制御に関与するトランスフェリンレセプターやフェリチンはmRNA内に特徴的なステムループ(IRE)をもち、これに結合するIRP1とIRP2によってmRNAレベルで制御されている。IRP1とIRP2は高い相同性を示す蛋白質だが、IRP2はIRP1にはないIDDドメインを有する(図2)。高铁濃度下ではIRP2はHOIL-1ユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、プロテアソーム分解されるがIRP1は安定である。

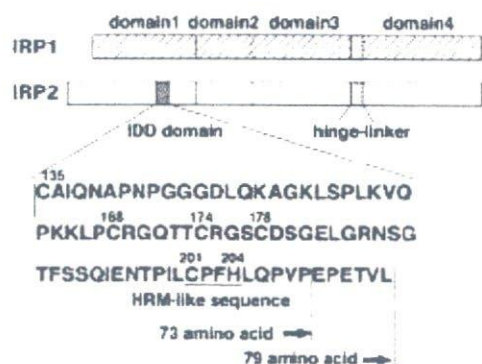


図2 IRP1とIRP2のドメイン構造

IRP2に特異的なIDDドメインのアミノ酸配列とヘム制御モチーフ(HRM)を示す。

①まず、IRP2の鉄依存性分解におけるIDDの役割を明らかにするためIRP2からIDD領域を欠失した変異体およびIRP1にIDDを導入した変異体で鉄依存性分解を調べたところ、IDDに依存し変異体のプロテアソーム分解が起こることからIDD領域がIRP2のヘム依存性分解に重要と示された。②Cys²⁰¹-Pro-X-His²⁰⁴配列のCysとHisの両方をAlaに置換するとIRP2のヘム依存性分解は見られなかった。HOIL-1ユビキチンリガーゼはIRP2のHRMを認識し結合し、特にIRP2に特徴的なHis²⁰⁴がHOIL-1の認識に重要な役割を果たしていた。

3) ERストレスによるオートファジー誘導(磯合、桃井)

ポリグルタミンを強発現させたオートファジー形成の抑制はカスパーゼ12活性化を促進し、ERストレス細胞死を誘導することから、ERストレスによるオートファジー形成について検討した。ERストレスを誘導するツニカマイシン、ブレフェルジン、サブシガラジンはHBSS培養により飢餓状態にしたのと同様に、オートファゴソーム結合型LC3-IIへの変換を促進し、免疫染色でLC3が粒状に観察された。(図3 A, B) オートファジーは細胞内分解機構の一つで、細胞質成分をリソソームで分解するために胞質成分をリソソームに運搬するシステムである。LC3は細胞質遊離型のLC3-Iで存在し、オートファジー形成のシグナルが入るとC末端側に脂質修飾を受けて、膜結合型の

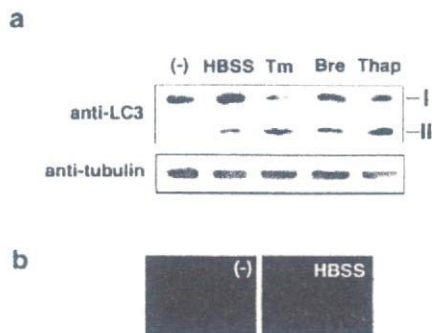


図3 ERストレスによるオートファジー誘導
C2C5細胞にERストレス誘導剤であるツニカマイシン(Tm)、ブレフェルジン(Bre)、サブシガラジン(Tha)を添加し、ERストレスによるオートファジー形成について検討した。(a)プロットティングによりLC3の膜結合型へ変換を検出した。(b)免疫染色によりLC3のdistributionの変化を観察した。ERストレスはHBSS培養により飢餓状態にしたのと同様に、オートファゴソーム結合型LC3-Iへの変換を促進し、免疫染色でLC3が粒状に観察された。

LC3 (LC3-II)に変換されるとオートファゴソーム膜に局在する。このオートファゴソームはリソソームと融合してオートリソソームになり、そこで初めて不要になった細胞質蛋白質やオルガネラを分解ができるようになる。このとき、オートファゴソームの内膜と外膜に局在したLC3-IIのうちの内膜に存在するものは、不要蛋白質と共に分解される。ERストレスにより検出されたオートファゴソーム結合型LC3-IIや免疫染色で粒状に観察されたLC3が、ERストレスシグナルにより、リソソームの分解抑制や、オートファジー形成を途中で阻害してオートファゴソームが蓄積しているためではなく、オートファジーという分解機構を促進しているためであることを証明するため、リソソーム分解酵素の阻害剤であるE64dおよびPepstatinを添加しリソソームの分解を止めた場合、オートファジーによる分解機構がきちんと働いている場合分解されるLC3-IIが分解されずに蓄積するかどうかをLC3のプロットティングにより検討した。C2C5細胞にサブシガラジン、ツニカマイシンを添加し、E64dおよびPepstatin存在下、非存在下においてLC3-IIの蓄積量を検討したところ、両試薬において、E64dおよびPepstatin存在下でLC3-IIの蓄積量が多く見られた。

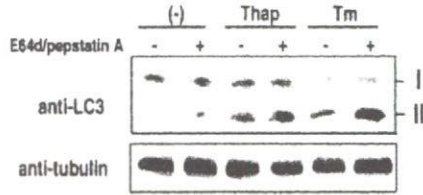


図4 ERストレスによるオートファジー促進
ERストレスによるLC3-IIの増大が、オートファジーを促進している為であることを確認するため、C2C5細胞にリソソーム分解酵素の阻害剤であるE64dおよびPepstatin存在下、非存在下においてERストレス誘導剤であるサブシガラジン(Tha)またはツニカマイシン(Tm)を添加し、LC3 IIの量的変化を検出した。

4) 小胞体ストレスを抑制する化合物の探索 (磯合、桃井)

変異蛋白を発現した酵母、細胞を用いて、i)ERストレスセンサー機能の活性化、ii)異常立体構造をときほぐすシャペロン機能の活性化、iii)小胞体排出分解機構(ユビキチン/プロテアソーム系)の活性化し、異常蛋白の分解を促進する化合物を、1次探索系とし酵母系、2次探索として細胞系を用いておこなった。

とくに、小胞体ストレスシグナルの下流、細胞死シグナルの上流に位置するeIF2aのリン酸化に注目して、小胞体ストレスによるリン酸化シグナルを制御する化合物を探索することにより、細胞死(カスパーゼ活性化)を制御する複数の化合物、化合物I(ラパマイシン誘導體)および化合物II(アニリン誘導體)、を分離した。興味深いことに、化合物IIは小胞膜輸送、膜蛋白、分泌蛋白の輸送促進をもたらし、細胞内蓄積を緩和させることで、小胞体ストレスの制御し、ERストレス細胞死を抑制することが明らかになってきた。

5) トランスロコンSEC61 beta 遺伝子のトランスジェニックマウスの作出 (上田、桃井)。小胞体からの異常蛋白の排出に関係するトランスロコンSec61の構成成分であるβ(Sec61β)の発現プラスミドpBS-CAG/SEC61βを作成した。この発現プラスミドを常法に従って、マウス受精卵に注入し、Sec61βのトランスジェニックマウスを作成した。

6) Foxp2 遺伝子座の変異を導入したノックイ

ンマウスの作製(上田、桃井)

家族性重症言語障害の家系において、Foxp2 遺伝子座の点座、あるいは forkhead domain の一残基のアミノ酸置換を伴う変異が家族性重症言語障害の原因であることが示された。この家系に存在する Foxp2 遺伝子座の変異を導入したノックインマウスを作製することを目的として、マウス Foxp2 遺伝子座のコード領域にヒト由来の変異を導入したターゲティングベクターを構築した。

D. 考察

Y595C 変異体はプロテインSのC末側の性ホルモン結合蛋白様ドメイン中の1アミノ酸置換であるが、グローバルな蛋白質のミスフォールディングを引き起こし、小胞体からマンノーストリミング依存的に逆行輸送され、主にプロテアソーム分解されることがわかった。また、プロテアソームだけでなく、トリペプチジルペプチダーゼ II(TPPII)の関与が示唆されたことから、従来、アポリポ蛋白 B100、a1-アンチトリプシンZ 変異体などプロテアソーム阻害剤によってERADが完全には抑制されない基質蛋白質の分解にプロテアソームとTPPIIが協調して働く可能性が示唆された。

また、小胞体ストレスによりオートファジー・リソソーム系が活性化されること、オートファジーの活性化に関与するラパマイシンが小胞体ストレスを抑制することから、ユビキチン・プロテアソーム系、TPPII以外にもオートファジーがERADに関与している可能性が考えられる。

本研究で作成したトランスロコンのトランスジェニックマウスは来年度、オートファジー形成と小胞体ストレスとの関係を明らかにするのに役立つことが期待される。また、各種神経変性疾患マウスとの交配により、トランスロコンによる排出分解のもつ病態への影響について、解析が可能になることが期待される。

E. 結論

1)プロテアソームのみならずトリペプチジルペプチダーゼ II (TPPII)も Y595C 変異体の細胞内分解に協調的に働く可能性が示唆され

た。

2) 小胞体内におけるN型糖鎖プロセッシングに関与する小胞体マンノシダーゼ I が Y595C 変異体の ERAD に関与すると考えられた。

3) 小胞体ストレスによりオートファジーリソゾーム系の分解系が、活性化されることが明らかになり、ERAD として作動している。

4) 小胞体ストレスを抑制する化合物が複数見出され、その中には eIF2a のリン酸化を促進するラパマイシン誘導体、排出運搬を促進する化合物 II ある。

5) 小胞体内の異常蛋白の排出運搬に関与するトランスロコン Sec61 β のトランスジェニックマウスを作成した。

6) 言語障害疾患原因遺伝子 FOXP2 のヒト変異遺伝子を導入した (ノックイン) 疾患モデルマウスの作製を Red/ET 方法を用いて開始した。

F. 研究発表

主任研究者

桃井 隆

1) Momoi, T. Conformational Diseases and ER stress-Mediated Cell Death: Apoptotic Cell Death and Autophagic Cell Death. *Curr Mol Med.* 2006, 6.111-118.

2) Fujita, E., Kouroku, Y., Ozeki, S., Tanabe, Y., Toyama, Y., Maekawa, M., Kojima, N., Senoo, H., Toshimori K, Momoi, T.

Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking RA175/TSLC1/ SynCAM/IGSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. *Mol. Cell Biol.* 2006, 26,718-26.

3) Fujita, E., Urase, K., oyama, A., Kouroku, Y., Momoi, T. Distribution of RA175/TSLC1 /SynCAM, a member of the immunoglobulin superfamily, in the developing nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2005, 154,199-209.

分担研究者

磯合 敦

1) Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Mizusihima, N., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E., Momoi, T. Inhibition of polyglutamine aggregation by ER stress (PEAK/eIF2a Phosphorylation)-mediated LC3 conversion. *J. Cell Biol.* (in press)

上田 正次

1) Hashimoto, S., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Takahashi, R., Ueda, M. Catalase in manipulation buffer enhances the developmental competence of DNA-injected embryos. *J. Reprod Dev.* 2004, 50, 711-715.

2) Hashimoto, S., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Takahashi, R., Ueda, M., Hirao, M., Kamei, M., Kitada, K., Hirasawa K. Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation. *Exp. Anim.* 2004, 53, 395-397.

日比野 利彦

1) Dainichi, T., Amano, S., Matsunaga, Y., Iriyama, S., Hirao, T., Hariya, T., Hibino, T., Katagiri, C., Takahashi, M., Ueda, S., Furue, M. Chemical peeling by AS-PEG remodels photo-damaged skin: Suppressing p53 expression and normalizing keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 2006, 126, 416-421.

2) Katagiri, C., Nakanishi, J., Kadoya, K., Hibino, T. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-Jun N-terminal kinase. *J. Cell Biology* (in press)

徳永 文穂

1) Tsuda, H., Tokunaga, F., Nagamitsu, H., Koide, T. Characterization of endoplasmic reticulum-associated degradation of a protein S mutant identified in a family of quantitative protein S deficiency. *Thromb. Res.* 2006, 117, 323-331.

2) Ishikawa, H., Kato, M., Hori, H., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., Iwai, K. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. *Mol. Cell.* 2005, 19, 171-181.

2. 学会発表

主任研究者

桃井 隆

1) Momoi, T. Kouroku, Y., Fujita, E. Rapamycin reduces polyglutamine toxicity via eIF 2alpha phosphorylation-mediated LC3 conversion, a key step for autophagy induction. II Meeting on

the MOLECULAR MECHANISMS OF NEURODEGENERATION. Aula Magna, Universita' degli Studi di Milano Via Festa del Perdono 7, 20122-Milano (Italy) May, 10, 2005.

2) Kouroku, Y., Fujita, E., Kaufman, R.J., Momoi, T. ER STRESS-MEDIATED PERK/EIF2a PHOSPHORYLATION INHIBITS POLY-GLUTAMINE AGGREGATION VIA STIMULATING LC3 CONVERSION. PROGRAMMED CELL DEATH meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, September 23, 2005.

分担研究者

日比野 利彦

1) Hibino, T., Katagiri, C., Nakanaishi, J. Purification and characterization of human caspase-14 from cornified cells: degradation of Inhibitor of Caspase-Activated DNase and inhibition by squamous cell carcinoma antigen-1. The Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, St. Louis, May 4-7, 2005.

2) Katagiri, C., Nakanaishi, J., Hibino, T. Squamous cell carcinoma antigen 1 regulates c-Jun N-terminal kinase 1 during ultraviolet-induced apoptotic cell death.

3) 日比野利彦, 片桐千華, 仲西城太郎 「カスパーゼ-14は脱核に関与し、その過程はSCCA1により調節されている」日本研究皮膚科学会、2005年4月

4) 片桐千華, 仲西城太郎, 日比野利彦 「脱核に関与するカスパーゼ14とその調節因子SCCA1」日本分子生物学会、2005年12月
徳永 文稔

1) Ishikawa, H., Kato, M., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., Iwai, K. Involvement of heme regulatory motif in iron-sensing, ubiquitination and degradation of IRP2. The 2005 Meeting on The Ubiquitin Family. Cold Spring Harbor, NY. April 2005.

2) Kirisako, T., Murata, S., Tanaka, K., Tokunaga, E., Iwai, K. A novel RING type ligase complex assembles a new type of polyubiquitin chain. The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology. 2005年6月 埼玉。

3) Miyashita, K., Tokunaga, F., Yoshida, Y., Iwai, K. The functional analysis of novel ubiquitin-ligases SCF^{FBG4} and SCF^{FBG5}. The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology. 2005年6月 埼玉。

4) 石川春人, 加藤美智子, 石森浩一郎, 桐浴隆嘉, 徳永文稔, 岩井一宏: 細胞内鉄代謝制御因子 IRP2 のヘム依存性ユビキチン・プロテアソーム分解には特異的なヘム制御モチーフが重要である。第5回日本蛋白質科学会年会、2005年7月、福岡。

5) Ishikawa, H., Hori, H., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., Iwai, K. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. 第78回日本生化学会大会、2005年10月、神戸。

6) Kirisako, T., Murata, S., Tanaka, K., Tokunaga, E., Iwai, K. Functional analysis of polyubiquitin assembly RING type E3 complex. 第78回日本生化学会大会、2005年10月、神戸。

7) Miyashita, K., Tokunaga, F., Yoshida, Y., Iwai, K. Identification of a novel ubiquitin-ligase SCF^{FBG5} that recognizes N-glycans. International Symposium on Life of Proteins. 2005年11月、淡路。

8) Tokunaga, F., Ishikawa, H., Kirisako, T., Ishimori, K., Iwai, K. Molecular mechanism of heme-mediated degradation of IRP2. International Symposium on Life of Proteins. 2005年11月、淡路。

9) 徳永文稔, 桐浴隆嘉, 村田茂穂, 田中啓二, 岩井一宏: B型肝炎ウイルスX蛋白質(HBx)によるNF- κ B活性化に関与する新規ユビキチンリガーゼ(HOIL-1L/HOIP)の同定、第10回臨床ストレス蛋白質研究会、2005年11月、熊本。

10) 桐浴隆嘉, 村田茂穂, 徳永文稔, 田中啓二, 岩井一宏: 直鎖状ユビキチン鎖形成ユビキチンリガーゼ。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。

11) 櫻井仁美, 徳永文稔, 桐浴隆嘉, 岩井一宏: HBxはユビキチンリガーゼのサブユニットとして機能する。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。

12) 宮下紘一、徳永文稔、吉田雪子、岩井一宏：新規糖鎖認識ユビキチンリガーゼ SCF^{FBG5}の機能解析。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。

13) 徳永文稔、桐浴隆嘉、村田茂穂、亀井希代子、田中啓二、岩井一宏：B型肝炎ウイルスXタンパク質(HBx)は新規RING型ユビキチンリガーゼ複合体(HOIL-1L/HOIP)に結合し古典的NF-κB経路を活性化する。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。

G. 健康危機情報

なし

H. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社