

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oton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JAG1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 of 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－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	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

脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用

所属 国立感染症研究所 細胞化学部
研究者 花田 賢太郎

研究要旨 セラミド輸送タンパク質 CERT にある FFAT モチーフの重要性を示した。スフィンゴミエリン合成を制御するキナーゼを発見した。リン脂質代謝異常酵母変異株を相補する DNA を分離した。真菌スフィンゴ脂質合成酵素の阻害剤探索系を構築し、約二万サンプルの探索を進めた。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所細胞化学部 西島 正弘
齋藤 恭子
- (2) 明治製菓(株)創薬研究部門 星子 繁
- (3) 九州大学大学院理学研究院 久下 理

A. 研究目的

近年、エイズ、結核、マラリアなど新興・再興感染症が、世界的規模で大問題となっており、これらの感染症問題への対策が急務となっている。このような状況の中で、宿主と病原体に関する分子レベルの研究成果に立脚した戦略が、新規抗微生物薬開発においても極めて重要である。

病原微生物による感染において、宿主細胞の生体膜は病原体の細胞内侵入や増殖など種々の過程で重要な役割を果たしている。本研究では、宿主細胞膜の主要構成成分である膜脂質の生合成と機能発現機構に関する研究を遺伝生化学的手法を用いて展開し、その成果を基盤に、細菌、真菌、ウイルス等の病原微生物感染成立における宿主膜脂質の役割を解明する。さらに、宿主細胞と病原微生物との間の脂質代謝経路の違いを見出し、病原微生物の脂質代謝を特異的に阻害する物質を微生物代謝産物等に求め、新規抗微生物薬開発のためのリード化合物を発見することを統括的目的としている。

当分担研究グループは、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞から種々のリン脂質生合成欠損変異株の分離を行い、動物細胞膜脂質の生合成機構と機能に関する研究を行ってきた。そして、このような研究を通し、ある種の宿主膜リン脂質がウイルスや細菌の感染・増殖に必須であることを明らかにした。

本研究課題において、当分担研究グループは、哺

乳動物細胞における脂質の代謝と機能の解析および宿主細胞における脂質代謝異常が病原体感染に与える影響の解析を行う。そして、他の分担研究者である九州大学大学院理学研究院チームおよび明治製菓(株)創薬研究部門チームとの共同研究を通じ、脂質代謝をターゲット部位とするような新規抗微生物剤を見出すことに貢献する。

B. 研究方法

B-1-1) CERT と VAP との共免疫沈降実験

N 末端に FLAG エピトープタグを付加した CERT および N 末端に HA エピトープタグを付加した VAP-A とを CHO-K1 細胞に共導入後、細胞を中性界面活性剤を含有した緩衝液中で溶解し、その高速遠心上澄みを細胞抽出液とした。細胞抽出液を抗 FLAG 抗体アガロース樹脂と混ぜて、遠心法で非結合分子を洗浄した後に、抗体アガロース樹脂に結合したタンパク質を溶出した。この溶出画分中の FLAG-CERT と HA-VAP-A を、それぞれ抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロット法によって検出した。なお、場合によっては、FLAG-CERT の代わりに空ベクターや各種 FLAG-CERT 変異体発現プラスミドを使用し、また、HA-VAP-A の代わりに空ベクターや HA-VAP-B 発現プラスミドを使用した。

B-1-2) セラミドの膜間転移反応の無細胞検出法およびセミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性検出法

大腸菌に発現させた組換え体 CERT およびその変異体の精製、および、それら精製タンパク質を用いたセラミドの膜間転移反応の無細胞系における検出は、昨年度の報告書にその詳細を記載した方法により行った。また、セミインタクト細胞を用いた小胞

体-ゴルジ体間セラミド輸送活性検出法は、われわれがすでに樹立して論文報告した方法(Funakoshi et al, J. Biol. Chem., 2000, 275, 29938-29945)により行った。

B-2) 過剰発現がライセニン耐性を細胞に賦与する遺伝子の探索

マウス由来レトロウイルス受容体 mCAT-1 を安定導入した CHO-K1 細胞(CHO-K1/mCAT-1)に HeLa 細胞由来のレトロウイルスベクター-cDNA 発現ライブラリー(Clontech 社)を感染させた。感染細胞を播種し、ライセニン(25 ng/ml)曝露後に、洗浄し、生き残った細胞を通常培地中で培養した。同様の方法でライセニン曝露と生き残り細胞の培養というサイクルをさらに四回繰り返した。その後、コロニー形成した細胞を回収し、限外希釈法により、細胞クローンを精製した。ライセニン耐性 CHO 細胞ゲノムに導入された cDNA 断片は、PCR 法により取得した。回収した cDNA の同定は、DNA シークエンシングによって得られた配列情報を BLAST 検索することによって行った。クローニングした cDNA を、ピューロマイシン耐性遺伝子を薬剤耐性マーカーに持つレトロウイルスベクター、pMXs-IP 上に移し、当該ベクター由来のレトロウイルス粒子を調整した。CHO-K1/mCAT 細胞に感染させて、ピューロマイシン(5 μ g/ml)添加培地中で選択した後、限外希釈法によってピューロマイシン耐性株を精製した。

得られたライセニン耐性細胞株を解析するための、ライセニン感受性試験、メチル- β -シクロデキストリン(MCD)感受性試験、および、放射性セリンを用いた脂質の代謝標識実験は、われわれがすでに論文報告している方法により行った。

B-3) 温度感受性脂質代謝異常酵母変異株を相補するゲノム断片のクローニング

URA3 マーカーを有する大腸菌・酵母シャトルベクターである Yep50 を用いて構築した酵母ゲノムライブラリーを温度感受性脂質代謝異常酵母変異株に酢酸リチウム法で導入した。導入細胞のなかからウラシル非要求性で高温でも増殖できる形質転換細胞を選択した。形質転換細胞から回収したプラスミドを大腸菌を用いて増幅した。

B-4-1) イノシトールホスホリルセラミド合成酵素(IPCS)活性のマイクروسケール検出法

C.albicans から調整したミクロソーム画分を酵素溶液として使用した。20 μ l の反応液(20mM Tris-HCl (pH 7.0)、20mM KCl、0.25% sodium colate、1.85kBq [4,5- 3 H] *N*-Acetyl-D-erythro-dihydro-sphingosine、1.75 μ g 膜画分)で 1.5 時間室温にて酵素反応を行なった後、3 μ l の反応液を TLC プレート(メルク社)

にスポットし、CHCl₃:MeOH=9:7 を展開溶媒として展開を行った。BAS1800 II システム(富士写真フィルム社)を用いて放射活性を測定し、酵素反応により生成した反応物の放射活性を指標として酵素活性を検出した。

B-4-2) IPCS 阻害剤の探索法

化合物ライブラリーや微生物培養液などの探索サンプルを分注した 96 穴プレートもしくは 384 穴プレート内で B-4-1 の方法により酵素反応を行った後、96 チャンネルの分注ヘッドを有した自動分注器(Multimek96; ベックマン社)で 3 μ l の反応液を TLC 板上にスポットした。乾燥後、同じ分注器で同じスポット上に 10 μ l の展開溶媒を 3 回分注することで同心円状に反応液を展開した。BAS1800 II システムを用いて中心に残存した反応生成物の放射活性を測定し、それを指標に酵素阻害活性を検出した。

(倫理面への配慮) 本研究は、主として微生物と動物培養細胞を用いて行うものであり、これらの研究では特に倫理面で問題になることはない。なお、DNA 組換え実験については指針に従って実験を行い、実験は全て P2 レベルの実験室で行った。

C. 研究結果

C-1) FFAT モチーフに依存した CERT と VAP との相互作用および細胞内セラミド選別輸送

哺乳動物細胞における主要膜リン脂質の一つスフィンゴミエリン(SM)の生合成では、小胞体で合成されたセラミドがゴルジ体に移行して SM へと変換される。我々は、細胞内セラミド選別輸送の欠損 CHO 細胞変異株を分離・解析し、その欠損を回復する遺伝子をクローニングする手法を通じて、セラミド選別輸送を担う特異的因子 CERT の同定にすでに成功している。真菌や原虫などには CERT のホモログは存在しないことから、セラミド選別輸送を担う分子装置は宿主細胞と真核微生物との間で異なっていると考えられる。

CERT は、ホスファチジルイノシトール 4 リン酸を認識してゴルジ体に会合する PH ドメイン、およびセラミドを脂質膜から特異的に引き抜く START ドメインを持つことを我々は明らかにしてきた。しかし、CERT が小胞体にどのようにターゲットできるのかは判然としていなかった。最近、小胞体膜タンパク質(VAP)と相互作用するタンパク質群に保存されたペプチドモチーフ(FFATモチーフと命名されている)が明らかとなった。この 7 アミノ酸からなる FFATモチーフに相当するアミノ酸配列が CERT 中間領域に存在することから、CERT はその FFATモ

チーフに依存して VAP と相互作用する可能性を共免疫沈降実験を用いて検証した。

VAP には異なる遺伝子にコードされた二つの異性体、VAP-A と VAP-B、が存在する。CERT および VAP-A を CHO-K1 細胞に強制発現させて、CERT を免疫沈降した場合、有意に VAP-A が共沈降した。この共沈降は FFAT モチーフの一アミノ酸を置換した変異体 (CERTD324A)、もしくは FFAT モチーフを欠失させた変異体 (CERTΔFFAT) では起きなかった。同様な実験で、CERT と VAP-B との共免疫沈降も観察されたが、VAP-A との場合に比べてその効率は低かった。

次に、CERT の FFAT モチーフ欠損が小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性に与える影響を調べる目的で、小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送再構成実験を行った。

CERT 遺伝子上の変異のために小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送が欠損した CHO 細胞変異株 (LY-A 株) から調整した形質膜開孔細胞と LY-A 細胞由来の細胞質から再構成した場合には小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性は欠損しているが、細胞質を野生型 CHO 細胞由来のものに交換すれば当該活性は回復する。また、精製した組換え体 CERT を LY-A 細胞由来細胞質に添加することでも回復する。しかし、FFAT モチーフに変異をもつ精製組換え体 CERT の添加では、そのような回復は見られなかった。

CERT の C 末端領域に存在する START ドメインがセラミドの膜間転移を触媒すること、および、N 末端領域に存在する PH ドメインが CERT のゴルジ体ターゲットに重要であることをわれわれはすでに明らかにしている。精製組換え体 CERT が触媒するリン脂質人工膜間セラミド転移は、FFAT モチーフに変異を導入しても変化しなかった。また、CERT-GFP の細胞内局在を観察すると、細胞質およびゴルジ体領域に主に分布するパターンは、FFAT モチーフに変異を導入しても変わらなかった。

C-2) 過剰生産すると CHO 細胞にライセニン耐性を賦与する哺乳動物由来 cDNA の探索と同定

ライセニンは SM 結合性の細胞溶解毒素である。レトロウイルスベクター上に構築されたヒト cDNA ライブラリーを導入した CHO 細胞をライセニン処理し、ライセニン耐性を示す 5 つの細胞株を取得した。

分離したライセニン耐性株におけるスフィンゴ脂質代謝の変化を評価するために、 ^{14}C -セリンで代謝標識実験を行った。その結果、ライセニン耐性株 5 株全てが親株に比べて SM 合成量の低下を示した。

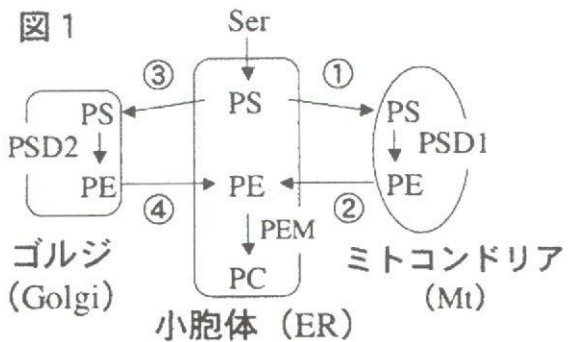
ライセニン耐性株に導入されているヒト cDNA を PCR 法で増幅後、回収し、シーケンシングに供し

た。その結果、タンパク質キナーゼ (本報告書ではタンパク質キナーゼ X と仮に命名する) をコードする cDNA を取得した。

キナーゼ X cDNA を CHO-K1/mCAT-1 細胞にレトロウイルスベクターを用いて安定導入すると、導入細胞は、親株に比べて、高いライセニン耐性および MCD 感受性を示した。また当該導入株の ^{14}C セリン代謝標識実験の結果、親株に比べ SM 合成量の低下を示した。

C-3) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

ホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)は、いずれも、特定の培養条件下では、ホスファチジルセリン(PS)を前駆体として合成される(図1)。この代謝経路において PS は、図1に示されるように、小胞体で合成された後に、ミトコンドリアあるいはゴルジ(正確にはゴルジと液胞)に輸送され(経路1と3)、それぞれに局在する PS 脱炭酸酵素(PSD) 1あるいは2の作用により PE に変換される。さらにこれらコンパートメントで合成された PE は、小胞体に戻され(経路2と4)、PEメチル化酵素(PEM)により PC に変換される。昨年度は、これら4種類のリン脂質輸送経路のいずれかに損傷を有する酵母変異株の分離を試み、増殖に関し温度感受性を示し、リン脂質輸送経路1, 2, 3, 4に損傷を有することが期待される変異株をそれぞれ約40株、4株、約10株、1株分離することに成功した。



本年度は、高温において PE の合成が低下し、経路1に損傷を有することが期待される酵母変異株 40 株に関してその性状解析をさらに進めた。温度感受性脂質代謝異常変異株の増殖に関する温度感受性と脂質代謝異常が単一変異に起因するか否かを調べる目的で、それら変異株の四分子分析をおこなった。四分子分析とは一倍体の変異株と野生株から2倍体の酵母を作成し、その減数分裂(この過程で遺伝子のランダムな分配が行われる)で生じる四つの

胞子由来細胞の性状解析を行うことである。その結果、約半分の変異株において、単一変異が増殖温度感受性と脂質代謝異常の原因となっていることが示された。そこで、この原因変異遺伝子を分離する目的で、これまでに、19 種類の変異株にプラスミドベクターで構築した酵母遺伝子ライブラリーを導入し、高温で増殖できる形質転換細胞を分離した。得られた形質転換細胞の脂質代謝を¹⁴Cセリンの代謝標識で調べたところ、いずれも形質転換前の変異株でみられる PE の合成低下が観察されず、ほぼ正常な脂質代謝を示した。従って、これら形質転換細胞は、変異株の脂質代謝異常を相補する目的遺伝子を運ぶプラスミドを有するものと考えられた。そこで現在、これら形質転換細胞からプラスミド DNA を回収し、その挿入 DNA の塩基配列の決定を行っている。

C-4-1) IPCS 阻害剤の半自動化探索系の効率化

本研究班は、昨年度までに 96 穴プレートを使用した IPCS 活性アッセイ系を構築し、この系を利用して IPCS 阻害剤の半自動化探索を開始していた。本年度は、更なる探索の効率化を目指し、384 穴プレートを使用したアッセイ系の構築を実施した。96 穴プレートと比較し 4 倍の高密度であるため、分注作業、ロボットによる移送時間の短縮が期待でき、また、放射性廃棄物の削減にも成功した。

C-4-2) IPCS 阻害剤探索と候補化合物の予備解析

上記の試験で活性が確認されたサンプルにおいて精製・構造解析を行っている。これまでに、20,000 サンプルの 1 次探索を実施しており、その結果、いくつかの既知物質がヒット物質として選択された。

微生物培養液の IPCS 阻害活性画分に Aranorosin 及び Aranorosinol A 及び B (図 2)が存在していることが認められた。そこで、これらの化合物および類縁体の Aranorosin について阻害活性を測定した(図 3)。いずれの化合物においても IC₅₀ 値が >50 μg/ml と阻害活性は弱かった。液体クロマトグラフィー解析から微生物培養液中において、これらの化合物が多く含まれていることが解っており、このためヒットしたと考えられた。これらの化合物は IPCS 阻害活性が弱いことや他の探索系でもヒットすることから、選択性の点で問題があると考えられるためこれ以上の検討は中止した。

さらに、Azalomycin F4 および F5、Niphimycin I

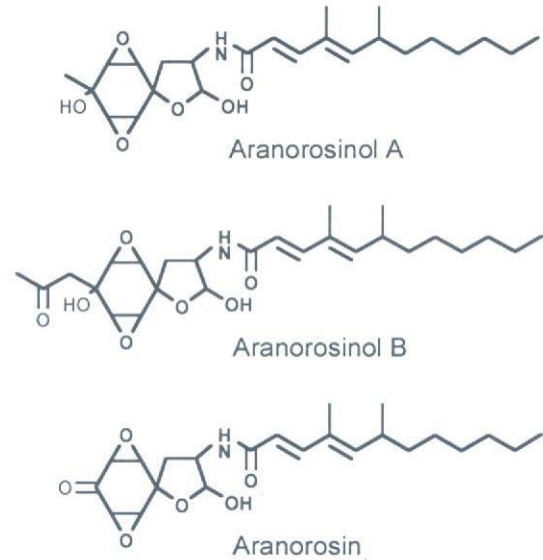


図 2 Aranorosin および Aranorosinol の構造

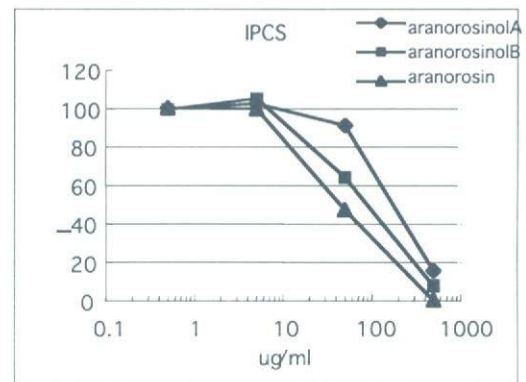


図 3 Aranorosin 類の IPC 合成酵素阻害活性

α、18(もしくは 19)-O-Malonylphimycin I α、Trichosetin、Equisetin、NG011、NG012 および Actinomycins が微生物培養液の IPCS 阻害活性画分に認められた(図 4)。このうち Azalomycin F (混合物)、Trichosetin、Equisetin、NG012 および Actinomycins に関して IPCS 阻害活性を確認した結果、いずれの化合物も IC₅₀ 値が 25 μg/ml 以上であった。いずれの化合物も生産菌は当該化合物を大量に生産していることから、今回の探索において弱い活性ながら選択されたと思われ、今後の検討を中止した。

以上に示したほかに、ヒットサンプルとして選択された微生物培養液から、活性化合物の同定および精製をしている。

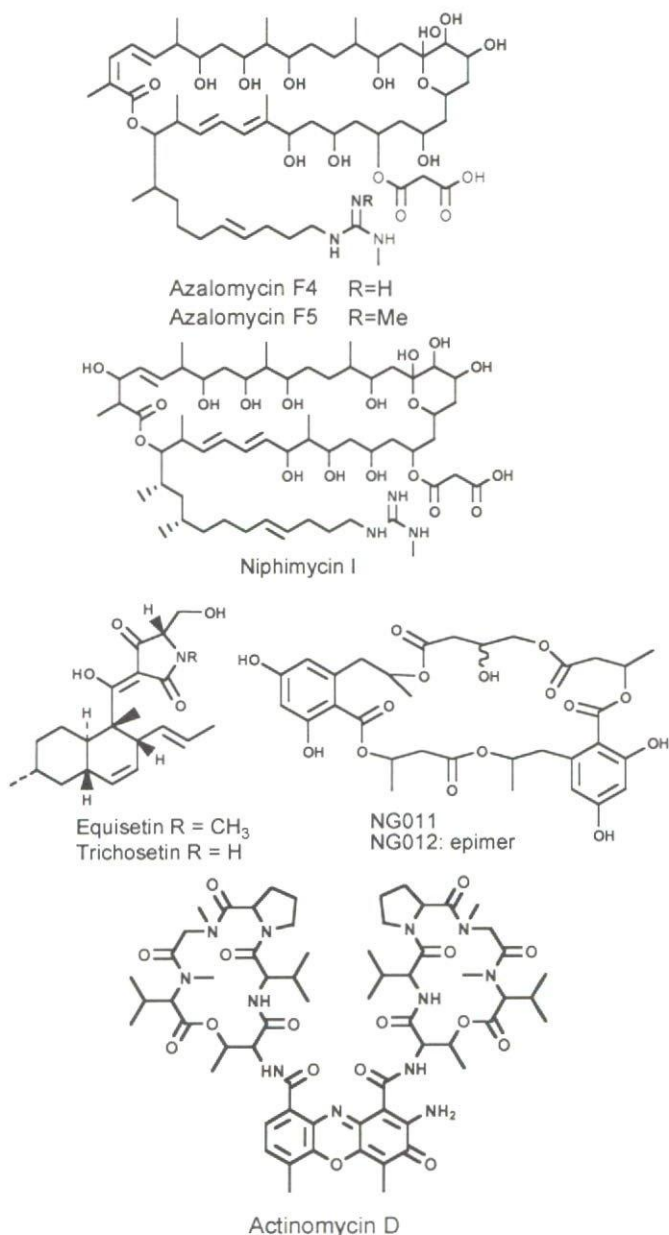


図4 各種ヒット化合物

D. 考察

D-1) CERT 機能における FFAT モチーフの役割

CERT と VAP-A または VAP-B が共免疫沈降されるが、FFAT モチーフ変異型 CERT においては VAP との共免疫沈降が観察されないことから、CERT はその FFAT モチーフに依存して VAP と相互作用することが明らかとなった。セミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送再構成系において、CERT のセラミド輸送活性は FFAT モチーフの変異によって減少したことから、当該モチーフは CERT の小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送機能に重要であることも明らかとなった。一方、CERT の人工膜間セラミド転移とゴルジ体ターゲットは、FFAT モチーフ

の変異でも損なわれなかった。以上の結果から、CERT がその FFAT モチーフに依存して VAP と相互作用することは、CERT の小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送機能に必要であり、おそらく、CERT を効率よく小胞体に会合させる役割を担っていると示唆された。D-2) 過剰生産するとライセニン耐性を CHO 細胞に賦与するヒト由来 cDNA の探索と同定

本探索では、レトロウイルスベクターを利用してヒト cDNA ライブラリーを導入した CHO 細胞に対してライセニン耐性獲得株の選択を行った。レトロウイルスベクターを利用した本法は、1) 極めて高い効率で導入できるため、多くの導入細胞を探索することが可能であり、2) 染色体に安定導入されるため、安定発現株を得ることができ、3) 一つの細胞に one-copy での導入が可能であるとともに、一過性の過剰発現を避けることが可能であるため、一過性過剰発現が細胞にとって毒性を示すような遺伝子であっても、発現・単離が可能であるという優れた点をもっている。実際、本探索で取得されたタンパク質キナーゼをコードする cDNA は、multi-copy ベクターからの一過性過剰発現の条件では、毒性が強く細胞が死滅してしまうために、解析不能であった。結局、ライセニン耐性によって単離された株と同条件（低コピーでゲノムに安定導入）の場合に限り、cDNA 再導入株を単離することができた。このことから、本法は当該 cDNA を単離するに適した方法であると言える。

本探索により単離・同定したタンパク質キナーゼを CHO 細胞に再導入すると、SM 合成量低下とともにライセニン耐性・MCD 高感受性の獲得が見られた。

当該キナーゼは、SM 合成に関わるタンパク質のリン酸化を通じて、SM 合成を負に制御している可能性が考えられ、非常に興味深い。今後は、本キナーゼ導入株の表現型をさらに解析するとともに、SM 合成経路においてこのキナーゼの機能するステップを解明したい。

D-3) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

本研究ではこれまでに、19 種類の酵母変異株の脂質代謝異常をそれぞれ相補できる 19 種類のプラスミドを分離することができた。これらプラスミドは、いずれも約 10 kbp の長さの酵母ゲノム DNA 断片が挿入されており、複数の遺伝子を有するものと考えられる。今後、これら遺伝子のなかから実際に脂質代謝異常を相補する遺伝子を同定する必要がある。また、変異株の損傷のマルチコピーサプレッサー遺伝子や変異株に合成致死性 (synthetic lethal) を与える変異遺伝子など、リン脂質輸送に

関与する遺伝子群をさらに網羅的に同定・分離することも今後可能かもしれない。

D-4) 新たな抗真菌剤リード化合物を指向した IPCS 阻害剤の探索

スフィンゴ脂質は真菌の生育に重要な役割を担っており、その生合成系は動物細胞と真菌で異なっていることから抗真菌薬の標的として注目されている。スフィンゴ脂質生合成系の中でもイノシトールホスホリルセラミドの合成を担う IPCS は真菌の生育に必須であり、Aureobasidin A、Khafrefungin、Rustmicin がこの酵素の活性を阻害することで抗真菌活性を示すことが分かっていることから、抗真菌薬の標的として魅力的である。しかし、この酵素のアッセイ法は、未反応の基質と反応生成物を分離し反応生成物のみを検出することが難しいため、ハイスループット化した報告はなかった。報告のある探索法は、放射性同位体で標識されたイノシトールの菌体への取り込みを指標にした探索が主なものであり、酵素アッセイによる大規模な探索はあまり実施されていないと予想される。

今回、新たな酵素阻害化合物を求め、微生物培養液を探索源とした探索を実施している。さらに、384 穴プレートを使用した探索が可能となり、探索の効率化、省資源化に成功した。これまでに知られている IPCS 阻害化合物は全て天然物由来のものであり、微生物生産化合物に未知の阻害化合物が存在することは大いに期待できる。現時点で約 20,000 サンプルの 1 次探索を実施しており、順次ヒットサンプルの解析を行っている。本探索系の感度は、既知の IPCS 阻害剤 Aureobasidin A を IC_{50} =数 nM で検出できるほどに良い。しかし、現時点では、それ自身の活性は弱いものの、生産性が高い化合物が多数選択されてきている。よって、生産量は微量でも活性の強い化合物をより効果的に選択できるように探索条件を調節することが今後の課題である。

E. 結論

E-1) CERT 機能における FFAT モチーフの役割

CERT はその FFAT モチーフに依存して VAP と相互作用すること、および、当該モチーフは CERT の小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送機能に重要であることを示した。CERT の膜間セラミド転移とゴルジ体ターゲットは、FFAT モチーフ変異でも損なわれなかった。よって、CERT がその FFAT モチーフに依存して VAP と相互作用することは、おそらく、CERT を効率よく小胞体に会合させる役割を担っていると示唆される。

E-2) 過剰生産するとライセニン耐性を CHO 細胞に

賦与するヒト由来 cDNA の探索と同定

レトロウイルスベクターを用いてヒト由来 cDNA ライブラリーを導入した CHO 細胞からライセニン耐性を獲得した細胞を分離した。分離したライセニン耐性株からタンパク質キナーゼをコードする cDNA が回収された。この cDNA の CHO 細胞への再導入は、SM 合成量低下とともにライセニン耐性と MCD 高感受性を引き起した。よって、このキナーゼは、何らかのタンパク質のリン酸化を通じて、SM 合成を制御すると示唆された。今後さらに解析する予定である。

E-3) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

19 種類の酵母変異株の脂質代謝異常をそれぞれ相補できる 19 種類の酵母ゲノム DNA 断片を分離することができ、目的であるリン脂質輸送に関与する遺伝子の同定に着実に近づいている。

E-4) 新たな抗真菌剤リード化合物を指向した IPCS 阻害剤の探索

真菌スフィンゴ脂質合成系を標的とした新規抗真菌薬の探索を目的とし、IPCS 阻害化合物探索系により、微生物培養液を探索源として探索を進めている。現在までにいくつかの酵素阻害化合物を得ており、有望な新規抗真菌薬のリード化合物を見出していくために、今後さらに探索を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kentaro Hanada: Sphingolipids in infectious diseases (an invited review). *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 131-148 (2005)

Kazuo Okemoto, Kiyoshi Kawasaki, Kentaro Hanada, Masami Miura, and Masahiro Nishijima: A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1. *J. Immunol.*, 176, 1203-1208 (2006)

2. 学会発表

Hanada, K.: An emerging model for lipid trafficking: non-vesicular transfer of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus at membrane contact sites, The 5th Annual Meeting of Japanese Protein Science

Society Satellite Symposium, Membrane Dynamics and Cell Regulation, June 29, 2005, Fukuoka, Japan

花田賢太郎 : CERT の FFAT モチーフは効率的な小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送に必要である, 第 78 回日本生化学会大会, 平成 17 年 10 月 21 日, 神戸.

河野美幸、熊谷圭悟、西島正弘、花田賢太郎 : ER-Golgi 間セラミド輸送タンパク質 CERT に存在する FFAT モチーフの役割, 第 78 回日本生化学会大会, 平成 17 年 10 月 20 日, 神戸.

花田賢太郎 : 膜輸送の新パラダイム : 分子引き抜き転移機構による脂質セラミドの小胞体-ゴルジ体間選別輸送, 第 28 回日本分子生物学会年会, 平成 17 年 12 月 10 日, 福岡.

Hanada K. : Discussion leader's comments for the session of sphingolipid biophysics, Gordon Research Conference on Glycolipids and Sphingolipid Biology, January 8, 2006, Ventura, CA, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況
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