

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

# 目 次

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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
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 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

## 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** ハンチントン舞踏病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患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する。

### 分担研究者

- (1) 磯合 敦 旭硝子株式会社  
ASPEX 事業推進部
- (2) 上田正次 (株)ワイエス研究所
- (3) 日比野利彦 資生堂ライフサイエンス  
研究センター
- (4) 今泉 和則 宮崎大学医学部解剖学講座
- (5) 徳永文稔 大阪市立大学医学研究科

### A. 研究目的

ハンチントン舞踏病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患では、神経細胞の細胞死による脱落、変性タンパク質の蓄積、また細胞質の空胞化などの病理像が観察される。最近、これらの異常蛋白の蓄積が観察される神経変性疾患では、異常蛋白の過剰発現と小胞体による蛋白処理機構との関連が示唆されてきた。小胞体の不良品蛋白の処理は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の転写速度を上げ、かつ、新たな蛋白合成を抑制する(2) 異常蛋白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或死が引き起こされ、こうした反応が多様な神経変性の原因と考えられる。

細胞は生体にとって有害となる折りたたみ異常蛋白(ミスフォールド蛋白)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。こうした小胞体の品質管理機構として、小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)機構がある。すなわち、小胞体に新生された蛋白は、熱ショック蛋白ファミリー、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についてはレクチン様蛋白(EDEM など)が会合し、小胞体のチャンネル蛋白(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、プロテアソーム分解される。

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。神経変性疾患のような異常蛋白の処理機構に問題があると考えられる疾患異常蛋白の排除にオートファジーが関与していると考えられている。昨年度は、神経変性疾患で観察される空胞 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。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。小胞体分子シャペロン BiP を細胞内に強制発現させておくと、過剰な小胞体ストレスが誘導される細胞死から保護されることが知られている。

本研究は、小胞体外でのポリグルタミン凝集が誘導する小胞体ストレスとオートファジーによる分解および小胞体分子シャペロン BiP を誘導する化合物や自らシャペロンとして作用する化合物の開発を試み、複数の化合物を、新規低分子化合物 BIX (BiP inducer X) および ERCC-1(endoplasmic reticulum chemical chaperon-1)を、化合物ライブラリーより分離した。この化合物の薬効を細胞レベルおよび動物レベルで詳細に解析することで、薬物の作用機序を解明するとともに神経変性疾患治療薬としての可能性を検討した。

## B. 研究方法

1) ドミナントネガティブタイプの PERK の stable transformant 細胞株の作製

Myc-Tag を付加したドミナントネガティブタイプの PERK (K618A) (DN-PERK; Dr. Ron より供与) を制限酵素で切断し、pcDNA4/TO/myc-His ベクターへサブクローニングした。pcDNA4/TO/myc-His-DN-PERK はリン酸カルシウム法により C2C5 細胞へトランスフェクションし、50ug/ml zeocine; 25ug/ml blastin により安定に発現している細胞 (DN-PERK 細胞) を選別した。

2) 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。

3) 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、その遠心上清確度を 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。

4) 細胞染色法

ER ストレス試薬およびリソゾームプロテアーゼ阻害試薬を添加または HBSS 培養により飢餓状態にした C2C5 細胞、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。

5) 組織染色法

マウスを 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS を用いた還流固定法にて固定した。脳組織を取り出し、スクロースで置換した後、OCT コンパウンドにより包埋凍結し、クリオスタットを用いて切片を作製し、APS コート済スライドガラスに貼り付けた。caspase-12 の活性型を認識する抗体 (m12D341)、eIF alpha-P、c-jun-P、LC-3 抗体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。

6) 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。

また、本研究でのマウスを用いた動物実験は施設にて設定されている動物取り扱いマニュアルに沿って行った。本研究で行う動物実験に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、エーテル麻酔下で行うことにしており、動物に対する倫理面での十分な配慮がなされている。また、マウス各組織の採取に際しては、深いエーテル麻酔の無痛下で二度と覚醒しないよう、安楽死させてから行うことにしており、苦痛の無いように十分な配慮をした。

## C. 研究結果

### 1) 化合物の検索

#### 1-1) 変異蛋白凝集抑制化合物

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) 異常立体構造をとくばく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（ラパマイシン誘導体）および化合物 II（アニリン誘導体）、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

#### 1-2) 化合物 BIX の発見と薬効解析

約 20000 種類のケミカルライブラリーから BiP プロモーター活性を上昇させる化合物をレポーターアッセイによりスクリーニングした。その結果、5つの候補化合物を見出した。そのうち、レポーター活性を最も上昇させる機能をもつ BIX (BiP Inducer X, 図1) について検討を加えた。

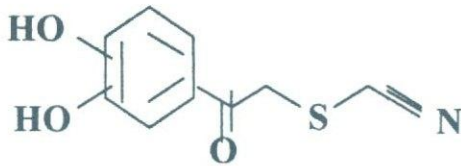


図1 Chemical structure of BIX

BIXを神経芽細胞腫 SK-N-SH の培養上清に加え、12時間後にトータル RNA を抽出しノーザンブロットングで BiP mRNA の発現を検討した。その結果、BIX の濃度依存的に BiP mRNA の発現上昇が認められた (Fig. 2)。BiP 以外の小胞体ストレス関連遺伝子については BIX の投与により発現変動がみられなかった (図2)。このことから、BIX は小胞体ストレスを誘発することなく、小胞体分子シャペロン BiP のみを特異的に発現上昇させることが明らかになった。SK-N-SH 神経芽細胞の培養上清に BIX を添加し、12時間後に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (Tm) を 0.5 μg/ml の濃度で添加し、細胞死の程度を溶媒のみを添加した時と比較した。その結果、BIX を添加した細胞では Tm 誘導性の神経細胞死に対して抵抗性が亢進していた。この結果から BIX は

小胞体ストレスから回避し、細胞に保護的に作用することがわかった。

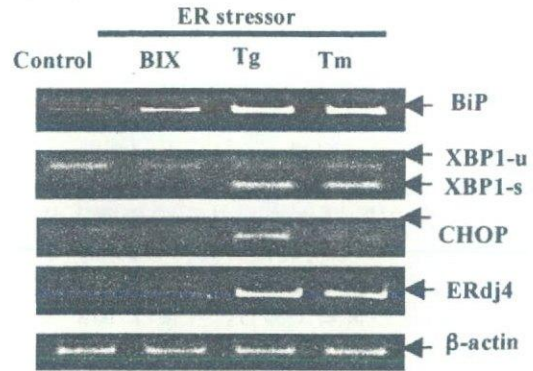


図2 BIX specifically induces the expression of BiP mRNA but not of other ER stress response-related genes. SK-N-SH cells were incubated for 6 h in the absence or presence of 5 mM BIX, 300 nM thapsigargin (Tg) or 0.5 mg/ml tunicamycin(Tm). Total RNA was extracted and analyzed for the expression of ER stress response-related genes by RT-PCR analysis.

マウス脳室内に BIX を持続注入しておき、その後中大脳動脈を永久血塞して脳梗塞を誘発させた。BIX を投与しなかったマウスと比べ、BIX 投与群では明らかに梗塞巣の領域が減少し、脳損傷を軽減させた (図3)。つまり、BIX は in vivo においても神経細胞死を抑制する機能があることがわかった。

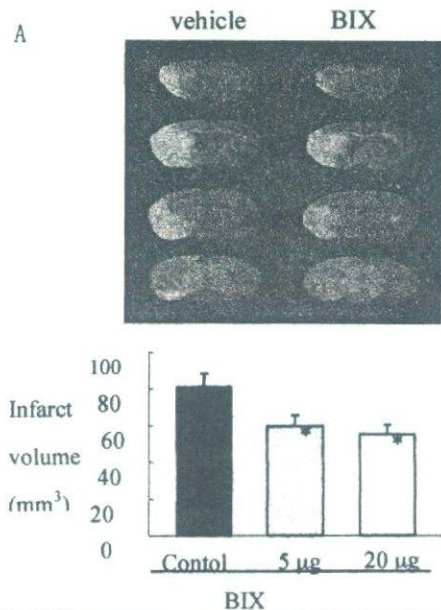


図3 BIX suppresses neuronal death after brain ischemia. A; BIX or vehicle was administered to brain ventricle of mice. After 30 min following drug administration, mice were operated for the permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO). Another 24 h after surgery, the brains of mice were subjected to 2,3,5-triphenyltetra-

zolium chloride (TTC) staining. *B*; Quantitative analysis of infarct area volume of MCAO mice was shown. Data are the means  $\pm$  S.D.

化合物 BIX は小胞体分子シャペロン BiP を転写レベルで発現上昇させる活性があることがわかった。BiP 遺伝子のプロモーター領域には小胞体ストレス応答エレメント (ERSE) とサイクリック AMP 応答エレメント (CRE) が存在することが知られている。今回の解析では BIX による BiP プロモーターの活性上昇は ERSE を介している可能性が考えられた。しかし、どのような機序で BIX が ERSE を活性化しているかは謎のままである。今後は BIX の直接のターゲット分子を明らかにし、作用機序を明確にする必要があると思われる。

## 2) ポリグルタミン凝集とオートファジー形成

### 2-1) ハンチントン病モデルマウス脳での ER ストレスとオートファジー形成

ポリグルタミン(72 リピート)による凝集細胞では、LC3 の変換が引き起こされた(図4)。ポリグルタミン(72 リピート)凝集が、オートファジーによる Atg5 依存的な LC3 変換を伴うことが明らかとなった。生体内でのポリグルタミン凝集について調べるために、ハンチントン病モデルとして知られているポリグルタミン 144 リピートを持つトランスジェニック R6/2 マウスの脳組織を用いて LC3 と ER ストレスについて解析を行った。その結果、

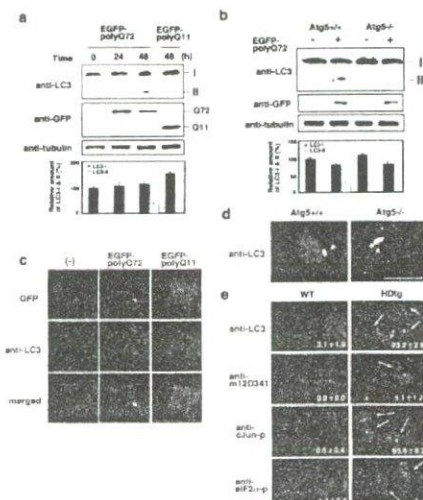


図4 ハンチントン病モデルマウス脳における小胞体ストレス誘導と LC3 変換

R6/2 マウスの脳組織に観察されるポリグルタミン凝集細胞において、LC3 の小胞化および顆粒化、ER ストレスの指標となるリン酸化 c-jun、リン酸化 eIF2 および活性型カスパーゼ 12 が検出された(図4)。野生型マウスでは検出されなかった。これらのことから、生体内にお

いてもポリグルタミン凝集により ER ストレスおよびオートファジーが引き起こされていることが明らかとなった。

### 2-2) ポリグルタミン凝集は Atg5 依存的な LC3 の I 型から II 型の変換に関与。

Atg5-Atg12-Atg16 複合体依存的な LC3 の変換がポリグルタミン凝集より活性化されるカスパーゼ 12 に与える影響について検討した。その結果、Atg5 欠損細胞では、不溶性のポリグルタミン凝集の増加、カスパーゼ 12 の活性化細胞の増加が観察された。一方、この過程では eIF2 のリン酸化および CHOP の増加に影響を与えなかった。ポリグルタミン(72 リピート)凝集が、オートファジーによる Atg5 依存的な LC3 変換を伴うことが明らかとなった(図5)。

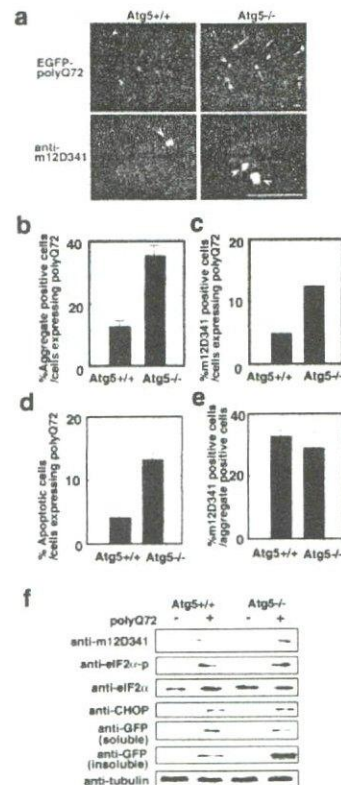


図5 Atg5 欠損細胞におけるポリグルタミン凝集と細胞死の促進

### 2-3) PERK/eIF2 $\alpha$ リン酸化を介する LC3 変換

一方、ER ストレスは PERK の活性化を介して eIF2 $\alpha$  のリン酸化を調節している。PERK 経路がオートファジー形成に関与しているのか検討するため、ドミナントネガティブの PERK (DN-PERK) を発現させた細胞や eIF2A/A (リン酸化変異) をノックインした細胞において、LC3 および Atg12 のプロテイングを行った。DN-PERK を発現させた細胞では膜結合型の LC3 II 型の形成が抑制され、Atg12 蛋

白質の上昇も抑制された。eIF2 $\alpha$ /Aをノックインした細胞でも膜結合型のLC3 II型の形成が抑制され、Atg12蛋白質の上昇も抑制された(図6)。

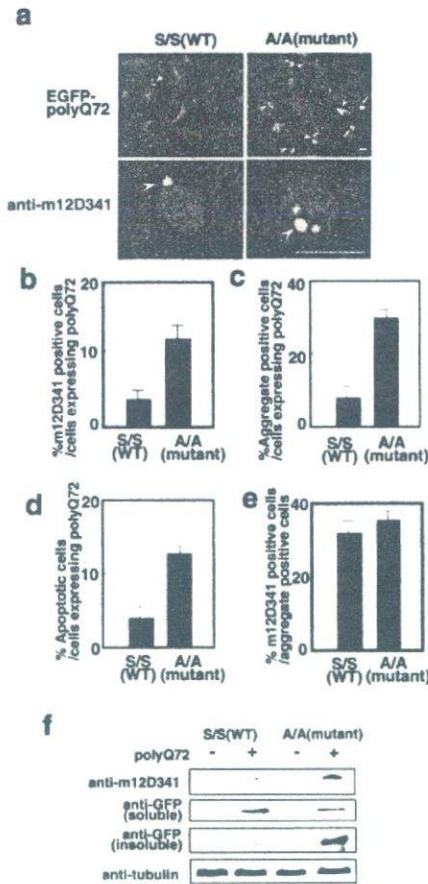


図6 eIF2 $\alpha$ /A細胞におけるポリグルタミン凝集と細胞死の促進

## 2-4) eIF2- $\alpha$ の脱リン酸化とポリグルタミン凝集とカスパーゼ12の活性化

ポリグルタミン(72 リピート)を導入した細胞でカスパーゼ12の活性化および細胞死が観察され、さらにeIF2 $\alpha$ /A細胞においてカスパーゼ12の活性化および細胞死が促進した。ポリグルタミンが誘導するカスパーゼ12の活性化に加えて、eIF2 $\alpha$ のリン酸化はポリグルタミン凝集を抑制することが明らかとなった。以上の結果より、オートファジー形成過程であるAtg5-Atg12-Atg16複合体に依存的なLC3の変換は、細胞質内のポリグルタミン凝集により活性化されるカスパーゼ12を伴うERストレス細胞死を阻害することが示唆された。

## 3)新規E3リガーゼの機能

### 3-1). LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体の同定

我々は、ヘムによる酸化型を認識するユビ

キチンリガーゼとしてHOIL-1 (Heme-Oxidized IPR2 Ligase-1)を同定した(図7)。HOIL-1はユビキチン様(UBL)ドメイン、Zn ファインガードドメイン、RING-IBR-RINGドメインをもつユビキチンリガーゼであるが、機能は未知であった。HOIL-1はN末端部が伸長したアイソフォームであるHOIL-1Lが主要な細胞内型であること、HOIL-1LはHOIP(HOIL-1L interacting protein)と命名したタンパク質と細胞内で600 kDaという高分子量複合体を形成している。

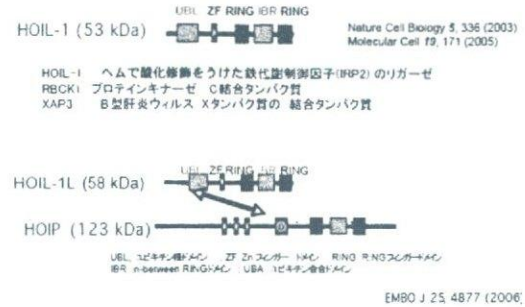


図7 HOIL-1、HOIL-1L、HOIPのドメイン構造

HOIPはZn ファインガードドメイン、UBAドメイン、RING-IBR-RINGドメインをもつユビキチンリガーゼで、HOIL-1LのUBLドメインとHOIPのUBAドメインが複合体形成に関与する(図7)。このリガーゼ複合体はE1、E2 (E2-25K、UbcH5、UbcH7など)、ATP存在下 *in vitro*でユビキチンのポリマーを生成した。興味深いことに、このユビキチンのポリマー形成は、分子内のLysをすべてArgに置換したK0-ユビキチンでも生成可能であったことからLys側鎖がポリユビキチン生成に関与していないと示唆された(図8)。一方、全てのアミノ基をメチル化修飾したユビキチンでは、HOIL-1L/HOIPによるポリユビキチン鎖生成は完全に阻止されたことから(図8)、ユビキチンのN末端 $\alpha$ -NH<sub>2</sub>基がポリユビキチン鎖生成に関与すると考えられた。

事実、質量分析を行ったところユビキチンのC末端が別のユビキチンのN末端に直接結合していることが同定された。これはHOIL-1L/HOIPがMet<sup>1</sup>の $\alpha$ -NH<sub>2</sub>基を介する新たな直鎖型ポリユビキチン鎖を生成していることを示す。この直鎖型ポリユビキチン鎖生成にはHOIL-1LとHOIPが複合体を形成していること、HOIPのRING領域の活性が存在することが必要であった。そこで、我々はHOIL-1LとHOIPからなるE3複合体をLUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex)と命名した。LUBACは細胞内でモデルタンパク質(Ub-GFP; N末端にユビキチンを結合させたGFP)の分解を促進したことから、直鎖型ポリ



ユビキチン鎖が分解シグナルとして機能する可能性が示唆された。

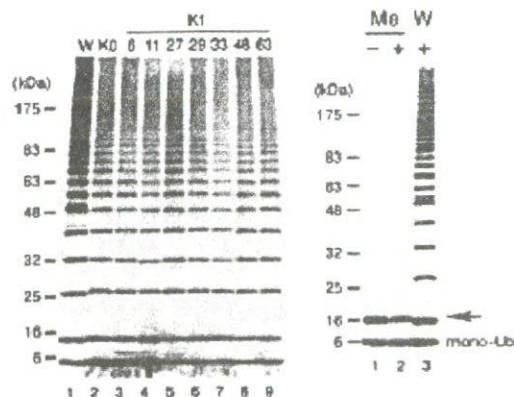


図8 HOIL-1L/HOIP 複合体はユビキチンの Lys 側鎖ではなく N 末端  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 基を介する直鎖型ポリユビキチン鎖を生成する (左図) E1、E2(UbcH5C)、HOIL-1L/HOIP 存在下で正常型ユビキチン(W)、Lys を全て Arg に置換した K0 ユビキチン、または1カ所のみ Lys 残基にした K1 ユビキチンを用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。(右図)同様にメチル化ユビキチンを用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。

### 3-2). プロテインキナーゼ C シグナルと LUBAC ユビキチンリガーゼの相互機能制御機構

PKC には 11 種のイソ酵素があり、カルシウムとジアシルグリセロールへの感受性から従来型 PKC (cPKC; PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ )、新規型 (nPKC; PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ )、及び非定型型 (aPKC;  $\zeta$ ,  $\lambda$ /I) に分類される。活性化 PKC を認識し、ユビキチン修飾を行うユビキチンリガーゼ (E3) は未だ明らかではない。以前に、HOIL-1L は PKC の結合タンパク質として報告されている。そこで本研究では、LUBAC が活性化 PKC を認識する E3 である可能性を明らかにする目的で、LUBAC と cPKC (PKC $\alpha$  や  $\beta$ II) との相互作用を検討した。

その結果、PMA 存在下の cPKC は定常状態や PKC 阻害剤 (G86976) 存在下に比べてより強く HOIL-1L や HOIP と結合した。さらに cPKC の定常的活性化型変異体 (A25E) も野生型より強く LUBAC に結合したことから、PKC は活性化に伴って LUBAC に認識されることが示唆された。また *in vitro* の精製タンパク質を用いた解析から、LUBAC は E1、E2 (UbcH5C) 存在下で cPKC のユビキチン化を行い、ATP 依存性に cPKC が自己リン酸化された場合や、定常的活性化型変異によって LUBAC によるユビキチン化が亢進することが示された (図 9)。さらに *In vivo* における LUBAC の重要性を明らかにするため、HOIL-1L 欠失マウス由来線維芽細胞における PMA 処理後の内在性 PKC  $\alpha$  分解を解析したところ、HOIL-1L 欠失細胞では野生型細胞より PKC

$\alpha$  の分解が遅延した。また、cPKC の活性化に伴って HOIL-1L は分子内で限定分解を受け、LUBAC の E3 活性が減弱した。これらの結果は、LUBAC は活性化 cPKC を認識しユビキチン化する E3 の一つであり、同時に cPKC 活性化に伴って HOIL-1L は限定分解を受け、LUBAC 活性が抑制されるという相互制御機構を示唆した。この cPKC と LUBAC ユビキチンリガーゼとの相互機能制御は適切な PKC シグナル伝達に寄与すると考えられる。

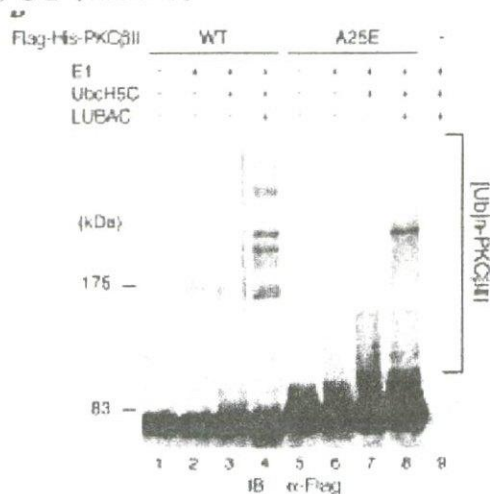


図9 LUBAC による PKC $\beta$ II のユビキチン化  
バキュロウイルス発現系にて作製した正常型 (WT) 及び定常的活性化型 PKC $\beta$ II を基質として E1、E2 (UbcH5C)、E3 (LUBAC) 存在下で *in vitro* ユビキチン化アッセイを行い、SDS-PAGE 後 PKC $\beta$ II に付加した Flag-tag を免疫プロットで検出した。

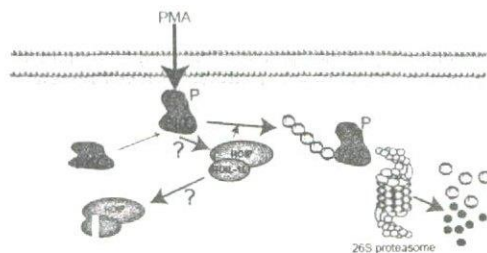


図10 活性化 PKC と LUBAC の相互機能制御  
cPKC は PMA などによって活性化すると LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体が認識しプロテアソーム分解へ導く。一方、活性化 PKC は HOIL-1L の限定分解を導き、LUBAC のユビキチンリガーゼ活性を減弱させる。

### 4) 組換えゲノムクローンの構築

マウス CHOP 遺伝子のゲノム DNA 配列を含む 200 kb もの BAC クローンに、開始コドンの直後にタグをコードする DNA 配列をインフレームになるように挿入した発現ベクターを構築

し、その遺伝子が導入された Tg マウスを作製することができれば、エキソン/イントロン構造が維持されている上に、未同定の制御配列が全て含まれていると思われるので、上述した遺伝子発現のドローバックを全て回避することができると考えられる。

従来の遺伝子工学の技術では 100~200 kb にもおよぶ BAC ゲノムクローンを組み換えてクローン化することは不可能であったが、大腸菌内での能動型相同組み換え反応である、Red/ET Recombination Technology (Zhang Y et al, A new logic for DNA engineering using recombination in E. Coli., Nature 20 (1998) 123-128) を応用することにより、特異的に BAC ゲノムクローンの DNA 配列を操作することが可能になった。(図 3)。

先ず、マウス CHOP 遺伝子座を含む BAC ゲノムクローン RP24-341K21、および RP23-331K3 を入手する。そして、挿入する EGFP タグ、および luc タグをコードする DNA カセットを正確に構築し、EGFP タグ、および luc タグのトランスファーフラグメントを調製する。次に、マウス BAC クローンの CHOP 遺伝子の開始コドンの直後に Red/ET セレクションマーカーを挿入し、そこに EGFP タグ、および luc タグのトランスファーフラグメントを挿入する。以上の 2 段階の Red/ET 反応により、CHOP-GFP、および CHOP-LUC 遺伝子座のエキソン/イントロン構造、およびマウス遺伝子座の発現制御配列を損なうことなく、CHOP-GFP、および CHOP-LUC 組換え BAC (RecBAC) クローンを構築すること

#### D. 考察

細胞質のポリグルタミン凝集は ER 上のレトロトランスロコンおよび ERAD システムでの分解を阻害し、その結果としてカスパーゼ 12 (マウス細胞) およびカスパーゼ 4 (ヒト細胞: 本事業の委託研究により作成した活性化型カスパーゼ 4 を用いて明らかになった) の活性化を伴った ER ストレス細胞死を引き起こす。それとほぼ同時に、Atg5-Atg12-Atg16 複合体が関与する LC3 の I から II への変換というオートファジー形成の主要な過程において細胞質のポリグルタミン凝集が分解される。オートファジは蛋白凝集による ER ストレスを抑制していると考えられる。

また細胞質にある凝集は UPR、ERAD、オートファジーシステムにより、比較的分解しやすいが、大きな凝集塊になるに従ってこれらのシステムでは処理できなくなるが、オートファジーを促進するラパマイシンは、凝集および細胞死を阻害することから、オートファジーをコントロールすることで分解能を高めて

凝集を抑制できる可能性が示唆される。しかしながら、未だ異常蛋白がどのように認識されオートファジーが誘導されるかについては不明な点が多く残されている。仮説としてオートファジーはユビキチン化した蛋白を認識し、ユビキチン化によるそれぞれの蛋白の形態の僅かな差を捉えている可能性も考えられる。

eIF2-alpha のリン酸化は PERK 以外にも GCN2、PKR などによっても起こること、オートファジーは ER ストレス以外にも、アミノ酸の欠乏、ウイルス感染、dsDNA によっても起こることから、様々なストレスによって起こる eIF2-alpha のリン酸化が引き金になって、オートファジーが誘導される可能性が考えられた。

しかしながら、今年度の実験で eIF2 $\alpha$  のリン酸化を介して Atg12 が発現上昇する事が示されたが、eIF2-alpha のリン酸化が膜結合型の LC3 II 型の変換を制御するか、その分子機構はまだ明らかでない。一般的に eIF2 $\alpha$  のリン酸化は翻訳停止シグナルとして働いているが、ER ストレス条件下においては転写因子である ATF4 の翻訳を選択的に行っている事が明らかになっている。同じようなメカニズムが、Atg12 の転写を上昇させるような転写因子の活性化が、ER ストレスで起こっている可能性が考えられた。

2) 化合物 BIX は培養細胞のみならず *in vivo* の実験でも脳神経細胞のアポトーシスから救済できることが本研究で明らかになった。脳虚血以外の神経変性疾患モデルにおいても同様の効果が得られるか否かを検討するとともに、脳内へのドラッグデリバリーに関しても今後は詳細に検討する必要があると思われる。

3) LUBAC は他には例を見ない直鎖型ポリユビキチン鎖を生成する RING 型ユビキチンリガーゼ複合体であり、モデルタンパク質 (Ub-GFP) や PKC のプロテアソーム分解に関与することが明らかになった。

#### E. 結論

1) 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。ポリグルタミンなどの異常蛋白質が蓄積した場合、カスパーゼ 12 (マウス) (委託研究の成果としてヒトではカスパーゼ 4) の活性化を伴う ER ストレスを引き起こすと同時に eIF2 $\alpha$  を介したオートファジー形成が誘導され、リソゾームへの分解経路が働いていると考えられた。初期の段階ではオートファジーは細胞死を回避する機構として作用していると予測される。

2) 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 eIF2 $\alpha$  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。化合物 BIX は培養細胞のみならず *in vivo* の実験でも脳神経細胞のアポトーシスから救済できることが本研究で明らかになった。

3) HOIL-11 と HOIP からなる新規ユビキチンリガーゼ複合体 (LUBAC) が同定され、従来の Lys48 型ではない、新しい直鎖型ポリユビキチン鎖生成によってプロテアソーム分解シグナルとなることが明らかにされた。これは PKC シグナルなど多くの細胞機能制御に関与すると考えられる。

4) Red/ET Recombination Technology を応用することにより、特異的に BAC ゲノムクローンの DNA 配列を操作することが可能になった。ヒト変異を導入したノックインマウスの作成が容易になった。

5) 皮膚では紫外線によるストレスにより JNK-1 が活性化し、細胞死が誘導されるが、SSCA は JNK-1 の核移行を阻害することで、紫外線からの皮膚の細胞死を抑制する。

## F. 研究発表

主任研究者  
桃井 隆

- 1) Bail, J., Nakamura, H., Yong-W, K., Tanito, M., Ueda, S., Tanaka, T., Hattori, I., Ban, S., Momoi, T., Kitao, Y., Ogawa, S., Yodoi, J. Thioredoxin-1 prevents mitochondria- and endoplasmic reticulum-mediated neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Antioxidants & Redox Signaling** (In press)
- 2) Kitao, Y., Matsuyama, T., Takano, K., Tabata, Y., Yoshimoto, T., Momoi, T., Yamatodani, A., Ogawa, S., Hori, O. Does ORP150/HSP12A Protect Dopaminergic Neurons Against MPTP/MPP(+)-Induced Neurotoxicity? **Antioxid Redox Signal.** Feb 1, 2007 (on line)
- 3) Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Matsuda, C., Hayashi, Y., Momoi, T. Two Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Systems (ERAD) for the Novel Variant of the Mutant Dysferlin; Ubiquitin/Proteasome ERAD (I) and Autophagy/Lysosome ERAD (II). **Hum. Mol. Genet.** (Mar 1, 2007 on line)
- 4) Mizutani, A., Matsuzaki, A., Momoi, M.Y., Fujita, E., Tanabe, Y., Momoi, T. Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. **Biochem Biophys Res Commun.** 353,869-874,2007.
- 5) Takai, Y., Matikainen, T., Jurisicova, A., Kim, M.R., Trbovich, A.M., Nakagawa, T., Lemmers, B., Momoi, T., RA Flavell, R Hakem., J Yuan., JL Tilly., GI Perez. Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. **Apoptosis.** 12, 791-800, 2007.
- 6) Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman,

RJ., Kominami, E., Momoi, T. ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death Differ.** 14, 230-239, 2007.

7) Takano, K., Kitao, Y., Inagi, R., Momoi, T., Matsuyama, T., Miyata, T., Yoneda, Y., Iso, H., Stern, D.M., Hori, O., Ogawa, S. A rat model of human FEN1B (familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies). **Biochem Biophys. Res. Commun.** 346,1040-1047,2006.

8) Momoi, T. Conformational Diseases and ER stress-Mediated Cell Death: Apoptotic Cell Death and Autophagic. **Curr Mol Med.** 6,111-118,2006.

9) Fujita, E., Kouroku, Y., Ozeki, S., Tanabe, Y., Toyama, Y., Maekawa, M., Kojima, N., Senoo, H., Toshimori K., Momoi, T. Oligo-asthenoteratozoospermia in mice lacking RA175/TSLC1/SynCAM 1/GSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. **Mol. Cell Biol.** 26, 718-726, 2006.

分担研究者  
磯合 敦

1) Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Mizutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y.K., Momoi, T. Two Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Systems (ERAD) for the Novel Variant of the Mutant Dysferlin; Ubiquitin/Proteasome ERAD (I) and Autophagy/Lysosome ERAD (II). **Hum. Mol. Genet.** (Mar 1, 2007 on line)

2) Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., Momoi, T. ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death Differ.** 14,230-239,2007.

3) Idris, A., Tohda, H., Bi K.W., Isoai, A., Kumagai, H., Giga-Hama, Y. Enhanced productivity of protease-sensitive heterologous proteins by disruption of multiple protease genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 73,404-20, 2006.

上田 正次

1) Takahashi, R., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Hashimoto, S., Miyoshi, I., Kasai, N., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Ueda, M. Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit. **Transgenic Res.** (Nov 14, 2006 online)

2) Oka, A., Aoto, T., Takahashi, R., Ueda, M., Mita, A., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Kuriki, S., Takagi, N., Moriwaki, K., Shiroishi, T. Disruption of genetic interaction between autosomal regions and the X chromosome causes reproductive isolation between mouse strains derived from different subspecies. **Genetics** (Oct 22, 2006 on line)

3) Matsuo, M., Koizumi, K., Yamada, S., Tomi, M., Takahashi, R., Ueda, M., Terasaki, T., Obinata, M., Hosoya, K., Ohtani, O., Saiki, I. Establishment and characterization of conditionally immortalized

endothelial cell lines from the thoracic duct and inferior vena cava of tsA58/EGFP double-transgenic rats. *Cell Tissu Res.*326, 749-758,2006.

4)Togashi, Y., Kobayashi, T., Momose, S., Ueda, M., Okimoto, K., Hino, O. Transgenic rescue from embryonic lethality and renal carcinogenesis in the Nihon rat model by introduction of a wild-type Bhd gene. *Oncogene.* 25,2885-2889, 2006.

5)Numano, R., Yamazaki, S., Umeda, N., Samura, T., Sujino, M., Takahashi, R., Ueda, M., Mori, A., Yamada, K., Sakaki, Y., Inoue, S., Menaker, M., Tei, H. Constitutive expression of the Period1 gene impairs behavioral and molecular circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 3716-3721, 2006.

日比野 利彦

1) Denda, M., Fujiwara, S., Hibino, T. Expression of voltage-gated calcium channel subunit  $\alpha 1C$  in epidermal keratinocytes and effects of agonist and antagonists of the channel on skin barrier homeostasis. *Exp. Dermatol.* 15,455-460,2006.

2)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.* 126,416-421, 2006.

3)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* 27,983-990,2006.

4) Katagiri, C., Negishi, K., Hibino, T. c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK1) but not JNK2 or JNK3 is involved in UV signal transduction in human epidermis. *J. Dermatol. Sci.* 43, 171-179, 2006.

徳永 文穂

1) Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., Iwai, K. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chain. *EMBO J.* 25, 4877-4887, 2006.

2) Nakamura, M., Tokunaga, F., Sakata, S., Iwai, K. Mutual regulation of conventional protein kinase C and a ubiquitin ligase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 340-347, 2006.

3) 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.* 117, 323-331, 2006.

2. 学会発表

分担研究者

日比野 利彦

1)Katagiri, C., Negishi, K., Hibino, T. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-Jun-N-terminal kinase-1

The Annual Meeting of the society for investgative dermatology. May 3-6, 2006.

2)Hibino, T., Katagiri, C., Nakanaishi, J. Increased expression of squamous cell carcinoma antigen protects keratinocytes from UV-induced cell death: critical role of SCCA as a natural inhibitor of the stress kinase JNK/SAPK. The Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, September 7-9, 2006.

徳永 文穂

1) Tokunaga, F., Kirisako, T., Murata, S., Tanaka, K., Iwai, K. RING finger-containing ubiquitin ligase complex, HOIL-1L and HOIP, activates canonical NF- $\kappa$ B pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006年6月、京都。

2) Iwai, K., Kirisako, T., Tokunaga, F. Involvement of heme regulatory motif in iron-sensing, ubiquitination and degradation of IRP. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006年6月、京都。

3) Sakurai, H., Tokunaga, F., Kirisako, T., Iwai, K. Hepatitis B virus X protein functions as a subunit of ubiquitin ligase complex. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006年6月、京都。

4) Tokunaga, F., Nakamura, M., Sakata, S., Iwai, K. Mutual regulation of conventional PKC and a LUBAC ubiquitin ligase. The Fourth NIBB-EMBL Symposium, 2006年12月、岡崎。

#### 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18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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