

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otonics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的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

研究期間: 平成 16 年 4 月～平成 19 年 3 月

**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
- (6) 南 康文 東京大学大学院

### 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、神経変性疾患は、異常蛋白が過剰に発現したコンフォメーション病において、小胞体の蛋白処理機構に起因することが示唆されている。小胞体はこの不良品蛋白質の処理に関わる品質管理機構である。すなわち、(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がある。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。ユビキチン・プロテアゾーム系からなる小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)はこうした品質管理機構のひとつである。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。

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質の処理機構に問題がある疾患では、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いる。しかし、異常蛋白とオートファジー形成との関係は明らかでない。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除去分解することで細胞死から防御する。一方、細胞外での異常蛋白については、その分解と小胞体制御との関係についてはこれまで明らかでなかった。本研究は神経変性疾患の治療を目的とし、小胞体内外における変異蛋白の小胞体制御にりよる分解機構に焦点をあてた。



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。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) 治療薬の薬効を調べるための疾患モデルマウス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<sup>+/+</sup>MEF 細胞および Atg5<sup>-/-</sup>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。

### 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<sup>+/+</sup>MEF 細胞および Atg5<sup>-/-</sup>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 活性化型特異的認識抗体 (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) アストロサイトに発現する新規小胞体ストレスセンサー OASIS (今泉)

データベースサーチによって膜貫通型でかつ bZIP ドメインを持つか、あるいはキナーゼドメインを持つような小胞体ストレスセンサーとしての構造的特徴を有する遺伝子をピックアップし、ATF6 とよく似た構造を有するいくつかの膜貫通型 bZIP 転写因子を見出し、そのうち一つを OASIS と名付けた。OASIS は長期間培養したアストロサイトに発現してくること、脳損傷時に反応性アストロサイトに発現誘導することなど、小胞体ストレスに抵抗性を示すアストロサイト特異的に発現する遺伝子であった。

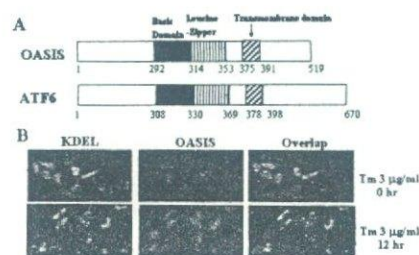


図1. 新規小胞体ストレスセンサー OASIS の構造と誘導性  
A: OASIS (292) 及び ATF6 のドメイン構造。B: OASIS の構造的特徴に発現する C2C5 細胞に 1 μg/ml の Thapsigargin (Tm) を処理した。観察時刻は 0 hr、12 hr。OASIS は細胞質に存在し、Tm 処理後、ER に関連して発現誘導される。OASIS と KDEL の共発現は ER に関連して OASIS が ER に誘導されることを示している。OASIS と ATF6 の bZIP ドメインの共有領域は、両者の構造的特徴を共有している。この構造的特徴は、OASIS と ATF6 の両方に共通している。

2-1) ER ストレス誘導オートファジーによるポリグルタミン凝集の分解 (磯合、桃井)  
LC3 は細胞質遊離型の LC3-I で存在し、C 末端側に脂質修飾を受けて、膜結合型の LC3 (LC3-II) に変換され、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、不要になった細胞質蛋白質を分解ことになる。ERストレスを誘導するツニカマイシン、プレフェルジン、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

## 2-2) 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

ハンチントン舞踏病の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、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2)。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。

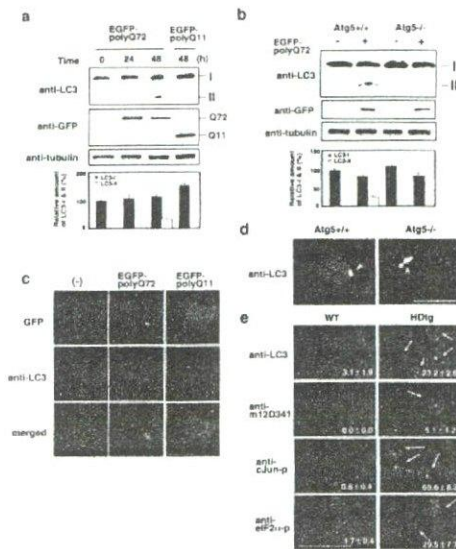


図2 ハンチントンモデルマウス脳での小胞体ストレス誘導とLC3変換

## 2-3) オートファジーはポリグルタミン凝集を分解し、細胞死を防御する。

LC3 I型からII型の変換はAtg5と複合体を形成するAtg12およびAtg16が関与している。Atg5欠損細胞を用いて、ポリグルタミン凝集、細胞死に対するオートファジーの関与を調べた。Atg5欠損細胞細胞では、細胞死、凝集とも促進することから(図3)、オートファジーはポリグルタミン凝集を分解し、細胞死を某

行していることが明らかになった。

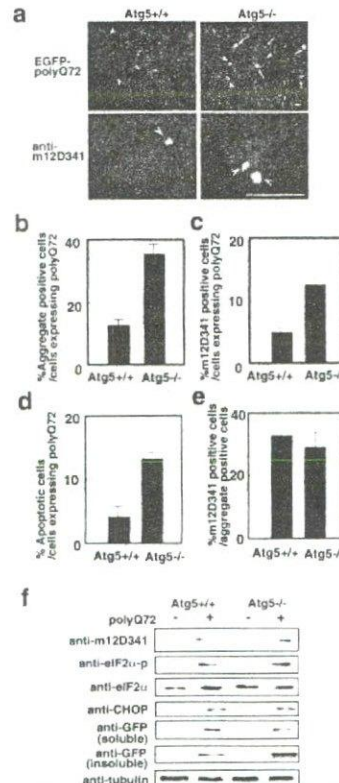


図3 Atg5 欠損細胞におけるポリグルタミン凝集と細胞死の促進

## 2-4) PERK/eIF2aリン酸化を介するLC3変換

ERストレスはPERKの活性化を介してeIF2aのリン酸化を調節している。ドミナントネガティブPERK(DN-PERK)を発現させた細胞やeIF2aA/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。eIF2aA/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。またAtg12のSiRNAを用いたノックダウンにより、ポリグルタミン(72リピート)が誘導するLC3の変換の増加を、eIF2aリン酸化経路を妨げずに阻害した。したがって、ポリグルタミン(72リピート)はAtg12依存的にLC3 I型からII型への変換をPERK/eIF2aリン酸化機構を介して行っていることを示唆した。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eIF2aA/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(図4)。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。

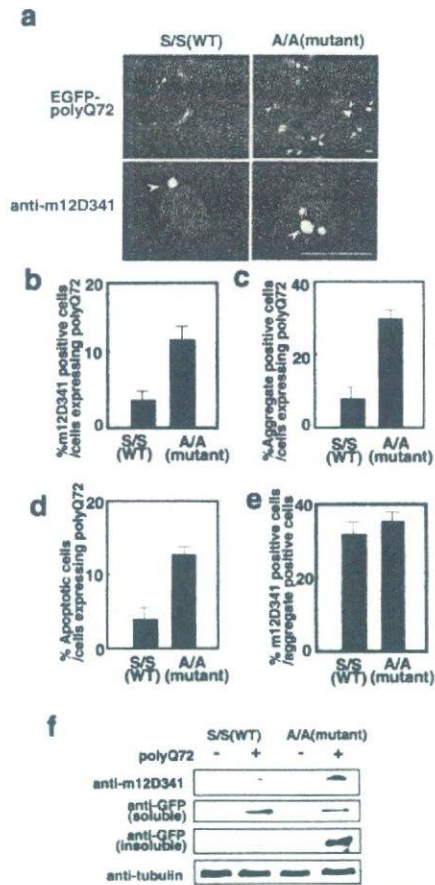


図4 eIF2aA/A 細胞におけるポリグルタミン凝集と細胞死の促進

### 3-1) 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。

### 3-2) 化合物 BIX の発見と薬効解析 (今泉)

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すことに成功した。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5) について検討を加えた。

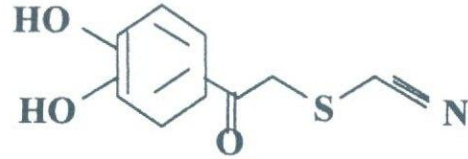


Fig. 5 Chemical structure of BIX

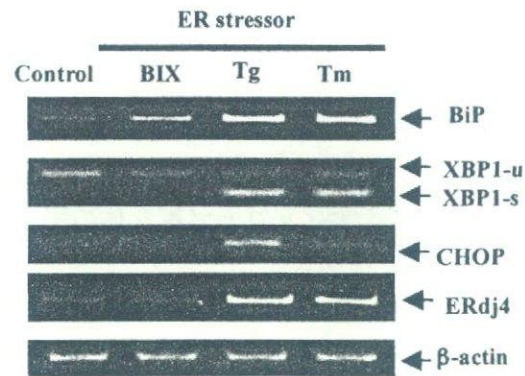


Fig.6 BIX specifically induces the expression of BiP mRNA but not of other ER stress response-related genes.

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. 6)。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。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。

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紮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 (Fig. 7)。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。

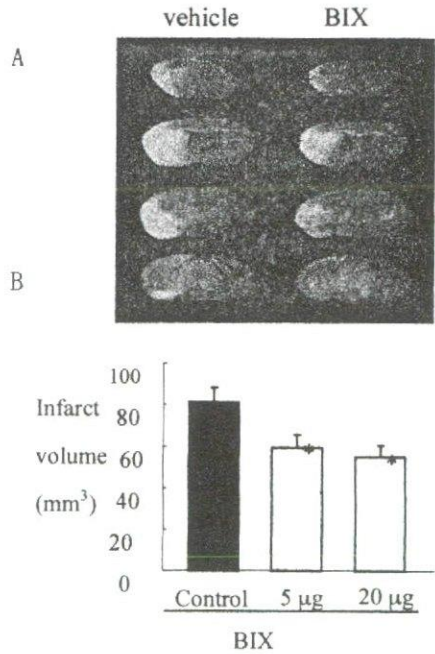


Fig. 7 BIX suppresses neuronal death after brain ischemia.

#### 4) LUBAC ユビキチンリガーゼ複合体の同定 (徳永)

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 8)。HOIL-1 はユビキチン様 (UBL) ドメイン、Zn ファインガードメイン、RING-IBR-RING ドメインをもつユビキチンリガーゼとして報告されていたが機能は未知であった。我々は、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ことを見いだした。HOIP は Zn ファインガードメイン、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。

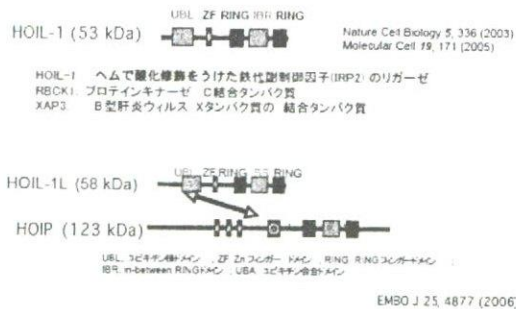


図 8 HOIL-1、HOIL-1L、HOIP のドメイン構造

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 9)。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、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。

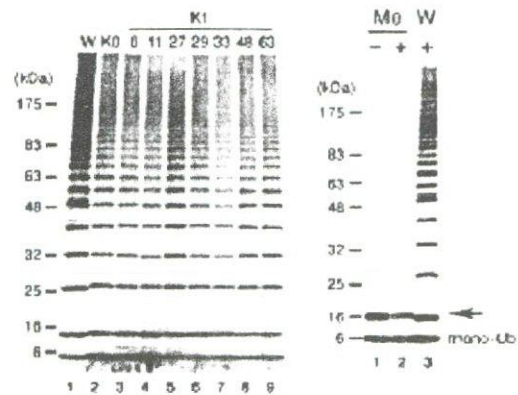


図 9 HOIL-1L と HOIP からなる E3 複合体を LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) と直鎖型ポリユビキチン鎖

#### 5) 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

プロテインキナーゼ C (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。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 10)。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。

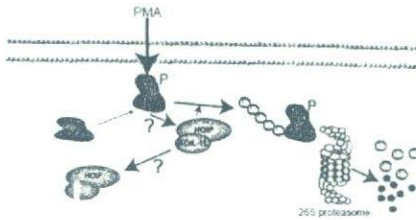


図 10 活性化 PKC と LUBAC の相互機能制御

#### 6) 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  $\beta$  (Sec61 $\beta$ ) の発現プラスミド pBS-CAG/SEC61 $\beta$  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、Sec61 $\beta$  のトランスジェニックマウスを作成した。

また、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 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。

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) クローンを構築した。

#### D. 考察

1) OASIS は細胞種特異的ストレス応答に関連している可能性が高い。小胞体ストレスが各種の神経変性疾患の発症に深く関連することが数多く報告されてきている。疾患治療法開発のためには小胞体ストレス応答の全貌解明とその制御法の確立が今後の課題である。特に細胞種特異的ストレスセンサーが細胞ごとに見つかってくれば、より特異的に効果を示す薬の開発につながる。例えば、黒質ドーパミン神経細胞のストレスセンサーだけを活性化できれば、他の神経細胞に影響を与えることなく、ターゲット細胞のみに小胞体ストレス応答が活性化でき、パーキンソン病で傷害される神経細胞をストレスから守ることができるようになる。

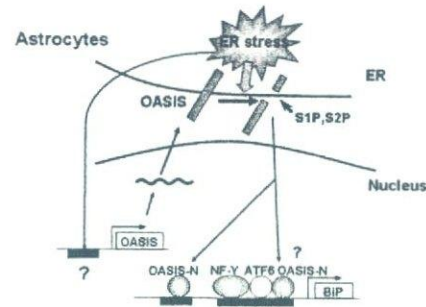


図 3. OASIS の活性化機構とターゲット遺伝子  
アストロサイトでは小胞体ストレスが誘発されると OASIS が活性化され、細胞死を抑制する。OASIS は ER 上の OASIS1 と OASIS2 から構成される。OASIS1 は ER 上の OASIS2 と異なり、ER からの OASIS1 を介して OASIS2 と相互作用する。OASIS1 は ER 上の OASIS2 と相互作用し、それら遺伝子の転写を促進する。なお、CRE は OASIS1 とは直接結合を証明できていない。また、OASIS2 遺伝子そのもののアストロサイト特異的発現調節機構についてはわかっていない。

2) プロテアソームだけでなく、トリペプチルペプチダーゼ II (TPPII) の関与が示唆されたことから、従来、アポリポプロテイン B100、 $\alpha$ 1-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・リソゾ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。

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。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(図 12)。

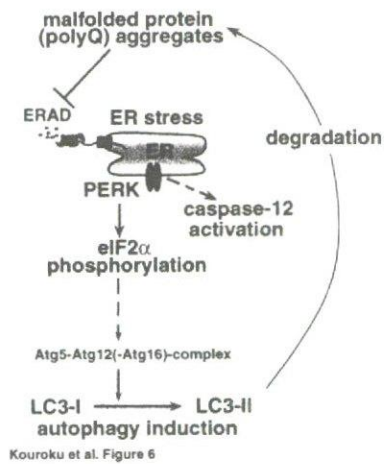


図12 小胞体ストレスを介するオートファジー誘導とポリグルタミン凝集の分解

一般的に eIF2α 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。

3) 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。

4) 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) 新規小胞体ストレスセンサー OASIS の同定に成功し、アストロサイトが小胞体ストレスに対し抵抗性を示す原因が OASIS の発現によることを明らかにした。この OASIS の機能を利用すればコンフォメーション病でみられる異常タンパク質の蓄積を取り除き、細胞死から救済する新しい治療戦略が開発できるものと思われる。

2) 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。また、小胞体内における N 型糖鎖プロセ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。異常蛋白質が蓄積した場合、カスパーゼ 12 (マウス) あるいはカスパーゼ 4 (ヒト) の活性化を伴う ER ストレスを引き起こすと同時に eIF2α 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。本仮説の実証には委託研究により作成したヒトカスパーゼ 4 活性型に特異的な抗体を用いて、患者組織での検証が有効と思われる。

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 eIF2α 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。

5) 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なった。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。

6) 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 Sec61β のトランスジェニックマウスを作成した。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、解析が可能になった。また 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。

7) 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。

## G. 研究発表

主任研究者 桃井 隆

1) Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagi, 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)

2) Mizutani, A., Matsuzaki, A., Momoi, MY., Fujita, E., Tanabe, Y., Momoi, T. Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. **Biochem Biophys Res Commun.** 353,869-874,2007.

3) Takai, Y., Matikainen, T., Jurisicova, A., Kim, MR., Trbovich, AM., Nakagawa, T., Lemmers, B., Momoi, T., RAFlavell, 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.

4) Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, RJ., Kominami, E., Momoi, T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death Differ.** 14, 230-239, 2007.

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

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

7) 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 /IGSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. **Mol. Cell Biol.** 26, 718-726, 2006.

8) Momoi, T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. **J. Chem Neuroanat.** 28, 101-105, 2004.

9) Ganguly A, Oo TF, Rzhetskaya M, Pratt R, Yarygina, Momoi, T., Kholodilov N, Burke RE. CEP11004, a novel inhibitor of the mixed lineage kinases, suppresses apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra induced by 6-hydroxydopamine. **J. Neurochem.** 8, 8469-8480, 2004.

10) Yoneda, K., Furukawa, T., Zheng, YJ., Momoi, T., Izawa, I., Inagaki, M., Manabe, M., Inagaki, N. model of epidermolysis bullosa simplex. **J. Biol Chem.** 279, 7296-7303, 2004.

分担研究者  
磯合 敦

1) Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Mizutani, A., Matsuda, C., Hayashi, YK., 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.** (in press)

2) Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, RJ., Kominami, E., Momoi, T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death Differ.** 14, 230-239, 2007.

3) Idiris, A., Tohda, H., Bi KW., 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 Tissue 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.

6) Ueda, M., Terai, Y., Kanda, K., Kanemura, M., Takehara, M., Futakuchi, H., Yamaguchi, H., Yasuda, M., Nishiyama, K., Ueki, M. Tumor angiogenesis and molecular target therapy in ovarian carcinomas. **Hum Cell.** 18, 1-16, 2005.

7) Ueda, M., Hung, YC., Terai, Y., Kanda, K., Kanemura, M., Futakuchi, H., Yamaguchi, H., Akise, D., Yasuda, M., Ueki, M. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas. **Clin. Cancer Res.** 11, 3225-3232, 2005.

8) Ueda, M., Hung, YC., Terai, Y., Saito, J., Nunobiki, O., Noda, S., Ueki, M. Glutathione-S-transferase and p53 polymorphisms in cervical carcinogenesis. **Gynecol Oncol.** 96, 736-740, 2005.



日比野 利彦

- 1) 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.
- 2) 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.

今泉 和則

- 1) Ogata, M., Hino, S-I., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F., Imaizumi, K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. **Mol. Cell. Biol.** 26, 9220-923, 2006.
- 2) Kondo, S., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Tatsumi, K., Wanaka, A., Imaizumi, K. OASIS, a CREB/ATF family member, modulates the UPR signaling in astrocytes. **Nature Cell Biology** 7, 186-194, 2005.

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) 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.** 19, 171-181, 2005.

南 康文

- 1) Shinozaki, F., Minami, M., Chiba, T., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Ichikawa, Y., Terasawa, K., Emori, Y., Matsumoto, K., Kurosaki, T., Nakai, A., Tanaka, K., Minami, Y. Depletion of hsp90beta induces multiple defects in B cell receptor signaling. **J Biol Chem.** 281, 16361-16369, 2006.
- 2) Terasawa, K., Yoshimatsu, K., Iemura, S., Natsume, T., Tanaka, K., Minami, Y. Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases. **Mol Cell Biol.** 26, 3378-89, 2006.

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.

- 3) 桃井隆、高鹿依子、藤田恵理子、第一回革新脳科学 COE シンポジウム、コンフォメーション病における小胞体が制御する細胞死とオートファジ形成の機構、金沢、2005年1月。

分担研究者

日比野 利彦

- 1) Katagiri, C., Kadoya, K., Nakanishi, J., Hibino, T. Increased exoression 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 Society for Investigative Dermatology, Providence, RI, April 28-May 1, 2004. (Abstract in J. Invest Dermatol. 122, 470A, 2004).

今泉 和則

- 1) Imaizumi, K., Tohyama, M. Endoplasmic reticulum stress and neuronal death in Alzheimer disease. ISN symposium Neuro2004 Osaka, 2004.

徳永 文穂

- 2) Tokunaga, F., Kirisako, T., Murata, S., Tanaka, K., Iwai, K. RING finger-containing ubiquitin ligase complex, HOIL-1L and HOIP, activates canonical NF-κB pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006年6月、京都。
- 3) 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. 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



---

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