

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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	589
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	636
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	656
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ジメントへの応用	山本茂貴	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
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	691
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	707
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	720
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	728
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	740
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	761
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	772
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	783
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	795
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	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
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	836
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	839
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	919
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	939
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の確立に関する研究	乾 賢一	951
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	966

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 …… 979
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 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込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 …… 1021
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 …… 1042
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 …… 1054
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 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発

所属 独立行政法人 医薬基盤研究所
研究者 竹森 洋

研究要旨: 塩誘導性キナーゼ(SIK)は転写因子 CREB の活性を抑制することで様々な遺伝子の発現を制御している。本研究では脂肪細胞に高発現する SIK2 に着目し、糖尿病や肥満に対する創薬標的としての評価系樹立を目指して、SIK2 の遺伝子改変モデル動物の作成と構造解析を行う。

分担研究者

- (1)(株)プロテインエクスプレス 宮内 明
(2) 同 寺岡 宏

A. 研究目的

生活習慣病に分類される肥満および糖尿病は現在患者数が急増している深刻な病態である。これらの病態は循環器疾患等の危険因子ともなり、早期での治療および予防により大幅な医療費削減につながるものと期待される。これまでに複数の治療薬が開発されてきたが、全ての症例に有効というのではなく、さらなる新規作用部位に対する薬の開発が期待されている。脂肪細胞は摂取したエネルギーを蓄積する臓器という観点から肥満の病態に深く関与すると考えられている。また、脂肪細胞が他のエネルギー代謝臓器(肝臓や筋肉)の機能を修飾して糖代謝に異常を来す事例が数多く報告され、脂肪細胞の機能を制御することによりエネルギー代謝異常症すなわち糖尿病の治療に役立てる試みが成されている。

SIK2は脂肪細胞に高発現しているタンパクリン酸

化酵素であり、SIK2を標的とした薬は、既存薬とは異なる新規の薬理作用を示すことが期待される。SIK2の発現動態の解析や褐色脂肪細胞で機能亢進型SIK2を発現させたモデルマウスの解析は、SIK2が脂質代謝に関与することを示唆している。しかし現時点ではSIK2を標的とした創薬に乗り出すには未だリスクが大きく、基礎レベルでの創薬標的としての妥当性の証明が必要である。

これには、SIK2 機能破壊モデル動物の作製、SIK ファミリー酵素の構造解析ならびにアイソフォームごとの特異的構造と酵素活性の相関検討、SIK そのものの機能や SIK シグナルの上流および下流の因子の機能を修飾するモデル低分子化合物のデザインが必要である。本研究の達成により新規の糖尿病・肥満の治療薬開発が加速され、他の生活習慣病の予防にも繋がる新たな治療法が樹立されるものと考えられる。これらの成果は我が国でその権利が優先的に還元されることが可能となる。また、SIK の構造面の解析は現在製薬会社が注目しているタンパクリン酸化酵素を標的とした創薬への応用にも広く役立

つことが期待される。

B. 研究方法

SIK2-KO マウス作製のためのターゲットベクターの構築ならびに予備解析

一般的にマウスでの糖代謝の解析には C57BL/6 が用いられる。そこで、ターゲットティングも同マウス由来ゲノムと ES 細胞の組み合わせで行う。破壊部位は SIK2 遺伝子のエクソン 1 を neo 遺伝子と置き換える。エクソン1はタンパクリン酸化活性に必要不可欠な領域をコードしている。単離される ES から、SIK2 遺伝子が破壊されたマウスの系統を確立し、実際に遺伝子破壊によって活性を持つ SIK2 タンパクが発現していないことの確認を抗体検出法で行なった。

SIK2 タンパクが発現されていないことが確認できた系統は体外受精法によって大量繁殖を行った。マウスをn=6程度の正常およびKO群に分け、1)体重変動、2)摂食量、3)耐糖能試験、4)インスリン負荷試験、5)脂肪量、6)血中脂質解析を行い、SIK2 と糖・脂質代謝の解析のための予備知見を収集した。

(倫理面への配慮)

マウス利用には、動物愛護の精神並びに医薬基盤研究所の動物実験委員会の規約に従う。

SIK タンパクの構造解析

SIK ファミリー酵素の構造解析にはタンパクの大量発現が不可欠である。大腸菌で発現させた酵素には活性が殆ど検出されないことから、昆虫やほ乳類培養細胞を利用した大量発現系を構築する必要がある。ほ乳類細胞と昆虫細胞での発現系のベクター構築と発現条件の検討を行っ

た。ほ乳類細胞と昆虫細胞で最も収量の多いアイソフォームが同一か否かを検討した。また特に、ヒト SIK2 を昆虫細胞で大量発現させるためにコードンの最適化を行った。

SIK シグナル修飾化合物の検索

低分子化合物の検索には、上述、昆虫細胞で作成したヒト SIK2 タンパク(コードンは変更せず)を利用したキナーゼ活性測定用 ELISA 法に化合物を加える方法で検討を行った。まずは、SIK2 の酵素活性を阻害する化合物をスクリーニングした。低分子化合物は MolBio 社から購入した。

SIK2 活性を阻害する化合物の脂肪細胞でのインスリンシグナルへの関与を検討する目的で、AKT のリン酸化(活性化)を抗体を利用して検討した。

化合物が SIK2 の上流シグナルを攪乱したか否かは、活性型 SIK2(pT175)を特異的に認識する抗体を利用して検討した。

化合物の細胞内代謝物の検出

化合物の細胞内での代謝有無は、逆送高速液体クロマトグラフィーを利用した。15cm のディッシュで培養した細胞の培養液に化合物を加え一晩放置した後、培養上清と細胞分画に分離してそれぞれから酢酸エチルで抽出した。抽出物は C18 の逆送カラムで 20%-50%のアセトニトリルにて展開し分離した。

C. 研究結果

SIK2-KO マウスの作成

SIK2-KO マウスを作成するため、C57BL/6 由来のゲノム配列検索した。結果、RP23-10608 の

Bac クローンに SIK2 遺伝子がコードされていることが判明した。そこで、その Bac クローンから SIK2 のエクソン1の上流約7kbと下流1.2kbを単離し、エクソン1の代わりに neo 耐性マーカーが位置するようにデザインした。エクソン1はタンパクへの翻訳開始部位を含んでいる。仮にエクソン2以降でタンパクへの翻訳が始まっても、エクソン1にはキナーゼ活性に重要なドメインが位置するため、得られるタンパクには活性が無いことが予想される。ネガティブセレクションには TK の遺伝子が利用できるように 5' 端へ接続した。

このターゲットベクターを B6N 由来の ES 細胞リンカ株へ導入した。約 380 個の neo 耐性 ES クローンから DNA を抽出して、サザンブロット法でスクリーニングした結果、3 個の相同組換え体が単離できた。得られた組換え ES 細胞を胚へ移植し、キメラマウスを得た。キメラ率の高い個体を B6 と交配させて SIK2-KO ヘテロ個体 (-/+) を得ることに成功した。その後、ヘテロの雌雄を交配させ、ホモ欠損個体 (-/-) を得た。

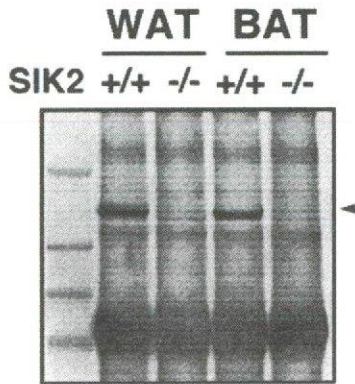


図1 SIK2 タンパクの発現確認のための免疫沈降実験(矢印: SIK2 タンパク)

得られたホモ欠損個体で SIK2 タンパクが発現していないことを確認するため、白色(WAT)および褐色(BAT)脂肪細胞を摘出し、総タンパクを抽

出後、免疫沈降法で SIK2 タンパクを検出した(図1)。ホモ欠損個体(-/-)では野生型(+/)で検出できる SIK2 タンパクは全く観察されないことから、SIK2 遺伝子の破壊に成功したと結論した。

また、SIK2 遺伝子破壊に伴うタンパクの発現変動解析を行った(図2)。

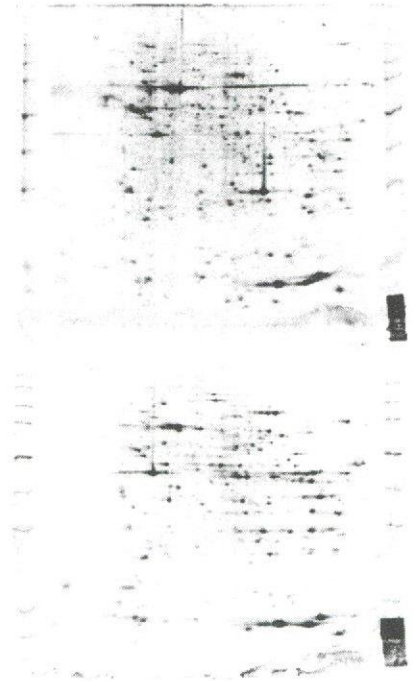


図2 2次元電気泳動による白色脂肪組織のタンパクの差(上:野生型、下:ホモ欠損)

白色脂肪組織のタンパクを抽出して比較した結果、野生型とホモ欠損個体で明らかなタンパク発現パターンの質的違いが観察された。しかし、個体が変わった場合の再現性は低く、今後の多個体での解析が期待される。

SIK2 ホモ欠損個体の糖代謝における異常の差異を検討するために、体重測定や血糖値の測定を行った。元の ES 細胞が B6N 由来であるにもかかわらず、生まれた個体の兄弟、姉妹間の体重差は 25%も異なり、SIK2 遺伝子型の違いによる比較は困難であった。これらの影響は、血糖値を含め

たその他の指標にも影響を及ぼしているものと予想され、今後、B6Cr へ数世代交配させた後、再解析を行う予定である。

SIK タンパクの構造解析

タンパクの構造解析には標的タンパクの大量発現系の構築が不可欠である。大腸菌の発現系では、活性型 SIK はおろか、十分な量のタンパクが可溶化画分へ回収されない。一方、ほ乳類培養細胞では活性型タンパクの発現は可能でも量的に不十分である。そこで、昆虫細胞を利用して大量発現を試みた。

全ての SIK ファミリー酵素を発現させた結果、量的にはヒト SIK2 > ラット SIK1 > マウス SIK2 > ヒト SIK3 の順に発現することが明らかとなった。この順は、ほ乳類細胞の場合と逆であった。最も良く発現するヒト SIK2 でも 1L の培養で数 mg までが最高であった。この値は他のタンパクを昆虫細胞で発現させた場合に比べ、SIK は圧倒的に少ない量しか発現できないことを意味する。

発現量比がほ乳類細胞と異なる知見は SIK の cDNA 配列が昆虫細胞の発現系には向いていないことを示唆する。そこで、ヒト SIK2 に関して、昆虫細胞のコドン頻度を優先させて cDNA を人工合成した。結果、未改変 cDNA 配列に比べ約 1,000 倍にあたる 1L で数 g のヒト SIK2 タンパクの発現に成功した(図3)。発現したタンパクは、細胞破碎液の状態でも既に検出できているが、発現量が多すぎるため、逆に不溶性となっている。現在、発現量の調節を試みている。

SIK シグナル修飾化合物の検索

遺伝子改変技術と平行して、SIK2 機能を攪乱

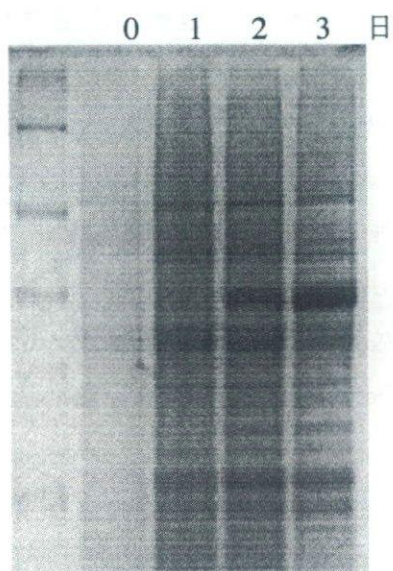


図3 コドンを昆虫型に換えて発現させたヒト SIK2 タンパク (経時的变化)

する化合物を検索し、その作用と糖代謝との関連を検討する目的で SIK2 活性阻害剤のスクリーニングを行った。約 100 種のキナーゼ阻害剤を SIK2 活性を測定する ELISA 法でスクリーニングした。結果、6 種の化合物が microM 前後もしくは以下で SIK2 活性を阻害することが明らかとなった。microM 以下で阻害するものは、Staurosporine、Hypericin、Rottlerin、Damnacanthal である。これらは、他のキナーゼも非特異的に阻害するため以後の解析を断念した。microM 前後で阻害するものには、Tryphostin やフラボノイドの Quercetin(図4)が該当する。

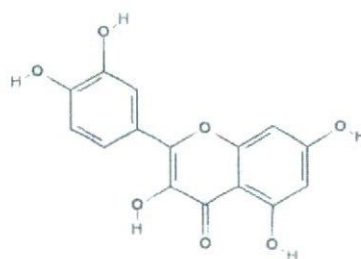


図4 Quercetinの構造

Quercetin はキナーゼ以外にも阻害作用を示す酵素が存在するが、誘導体が豊富なため SIK2 阻害活性と構造との関係を検索することにした。

約 50 種の Quercetin 誘導体を検索した。結果、Quercetin に水酸基が 1 箇所付加されたもの (Hydroxy-Quercetin: Hydroxy-Q) は阻害効果が 10 倍近く上昇した。また反対に、1 箇所外れたもの (Deoxy-Quercetin: Deoxy-Q) も 10 倍阻害活性が上昇していた。これらのことは、Quercetin に極性ができると阻害活性が強まることを示唆する。さらに、2 箇所の水酸基が外れる (Dideoxy-Quercetin: Dideoxy-Q) と殆ど阻害活性を示さなくなった。その他、メチル化された誘導体は、元の誘導体に比べて阻害活性は顕著に低かった。そこで、Deoxy-Q と Dideoxy-Q の比較または、それぞれのメチル化体との比較を利用することで SIK2 の細胞内での機能を探索できるか否かの検討を行うことにした。

まずは、脂肪細胞 (3T3-L1) 内で SIK2 活性を阻害できうるか否かを、CREB の活性の抑制を指標に検討した。結果 (図 5) 予想外に、脂肪細胞内では SIK2 阻害活性の低いメチル化された誘導体が SIK2 を阻害しうる結果を得た。一方、肝臓由来細胞 (HepG2) では全ての誘導体が SIK2 の CREB 抑制作用を阻害した。肝臓ではメチル化転移酵素および水酸化酵素の発現量が高いため、誘導体がメチル化や水酸化されるものと予想される。しかし、メチル化誘導体の方が元の誘導体よりも効率よく阻害する事実は、検出された細胞内での阻害は間接的なものであると考えられる。

阻害が間接的な理由の 1 つとして、SIK2 の活性化に関わるシグナルが阻害されていることが予想

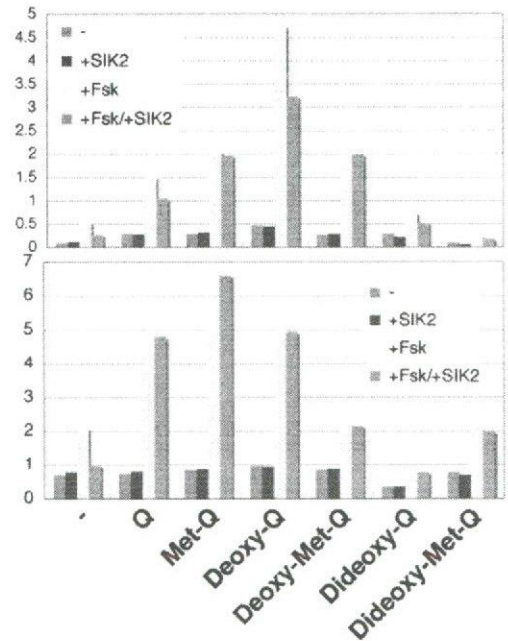


図 5 細胞内での Quercetin(Q)誘導体の SIK2 阻害作用。上: 3T3-L1、下: HepG2。縦軸は CREB 活性を反映したレポーター活性。CREB はフォルスコリン (Fsk) で活性化した。SIK2 活性は Fsk 単独 (+Fsk) と SIK2 存在条件 (+Fsk/+SIK2) の差で判定した。差が大きい場合は阻害無、差が無いか逆転する場合は阻害有りと判定した。

される。そこで、Quercetin 誘導体を処理した細胞から SIK2 を精製し、SIK2 の活性化に関わる Thr175 のリン酸化の程度を特異的抗体を利用して検討した (図 6)。

結果、Quercetin 誘導体を処理した細胞で SIK2 の活性化状態には変化は観察されなかった。他の可能性として、メチル化された Quercetin がさらに細胞内で修飾されている可能性が考えられる。これまでに、3T3-L1 や HepG2 でさらなる代謝・修飾産物の存在が示唆されている。しかし、3T3-L1 と同様な阻害パターンを示す筋肉細胞 C2C12 では同一の代謝産物は検出できていない。今後、検出方法を変えて検討する必要があると思われる。

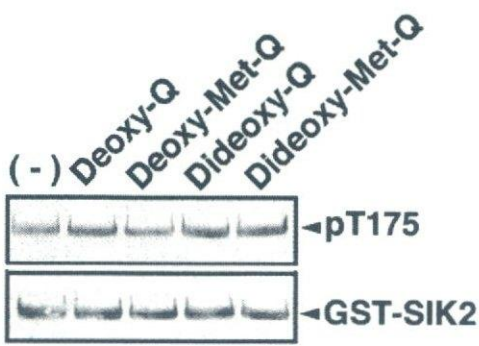


図6 Quercetin 誘導体処理した脂肪細胞での SIK2 の活性化状態。活性化は活性化に特異的な Thr175 のリン酸化 (pT175) で判定した。

D. 考察

脂肪細胞で高発現している SIK2 の糖尿病や肥満への関与を検索する目的で SIK2 の遺伝子破壊マウスの作成に成功した。この SIK2-KO マウスは、正常に生まれ、外観上の差異は未だ認められていない。元の ES 由来の差と予想される、体重差が遺伝子型に依存することなく大きく変動しており、まずは遺伝的バックグラウンドを揃える必要があると思われる。その後、アレイ解析を含めた網羅的解析が必要である。

SIK2 の構造解析を行い、その成果から SIK2 機能を修飾する化合物を検索する目的で、SIK2 の大量発現系の構築を行った。結果 1L の培養で g 単位の SIK2 タンパクを発現できる昆虫細胞培養系を構築できた。

SIK2 活性を阻害することのできる化合物を直接スクリーニングした。Quercetin の誘導体が細胞内で SIK2 シグナルを完全に阻害することが明らかとなった。今後、Quercetin の誘導体による脂肪分化やインスリンシグナルへの影響を検討する予定である。

SIK2 には SIK1 と SIK3 の 2 つの類似した遺伝子

が存在し、それぞれの産物は同一基質をリン酸化する。SIK2 以外のアイソフォームも検討できる方法として RNAi を利用することも視野に入れておく必要がある。

E. 結論

本年度の研究で SIK2 の糖尿病や肥満への関与を検索する材料の確立が完了した。今後それぞれから得られる情報を組み合わせて、糖尿病や肥満に対する創薬評価系の確立を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takemori H, Kanematsu M, Kajimura J, Hatano O, Katoh Y, Lin XZ, Min L, Yamazaki T, Doi J, Okamoto M.

Dephosphorylation of TORC1 initiates expression of the StAR gene. *Mol Cell Endocrinol.* 266, 196-204 2007

2) Zhou Y, Wu H, Li S, Chen Q, Cheng XW, Zheng J, Takemori H, Xiong ZQ

Requirement of TORC1 for Late-Phase Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *PLoS ONE.* 1:e16 2006

2. 学会発表

竹森 洋

塩誘導性キナーゼ SIK による Ca²⁺シグナル調節

日本ステロイドホルモン学会

平成 18 年 12 月:大阪:口頭発表

G. 知的財産の出願・登録状況

無し

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

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