

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
研究者 奥平 桂一郎

抗動脈硬化作用を持つ HDL の産生をコントロールしている膜トランスporter-ABCA1 は、相互作用タンパク質によって分解が制御される。本研究はそのメカニズム解明を目的として、ABCA1 相互作用タンパク質の新規探索と同定、機能評価を行った。

A. 研究目的

動脈硬化症に対しては、一般的に予防と進行抑制が主な手段とされ、形成された病変に対して積極的に治療する薬剤は現在のところ存在しない。最近、HDL (High-Density Lipoprotein 高密度リポタンパク質) が動脈硬化巣を退縮させることが臨床的に証明され、新しい動脈硬化治療法として、HDL 形成責任タンパク質である膜トランスporter-ABCA1(ATP binding cassette transporter A1)の活性を上昇させる薬剤の開発が期待されている。

本研究の目的は、ABCA1 の発現・機能の促進を標的とした ABCA1 タンパク質分解抑制メカニズムの解明にある。ABCA1 の相互作用タンパク質β1-syntrophin が ABCA1 の分解を抑制することに着目し、更なる相互作用タンパク質の同定と、ABCA1 安定化のメカニズム解明を目指す。本年度は、新規 ABCA1 相互作用タンパク質の探索と同定、さらにそれらの機能評価を行った。

B. 研究方法

ABCA1 の C 末端 20 残基を含む biotin 標識ペプチドを合成し、メンブレン上にスポットされた一連の大腸菌発現 PDZ タンパク質 (75 種のタンパク質由来の 122 の PDZ ドメイン) に対して、ABCA1-C 末ペプチドとの結合を、オーバーレイアッセイによって観察した。PDZ ドメインとペプチドとの結合は、avidin-HRP によって検出した。

同定された新規相互作用タンパク質のヒト cDNA をライブラリーよりクローニング、または各種遺伝子バンクから入手し、myc 標識ベクター

(pCMV-Tag3)に導入した。ABCA1 の cDNA はハーバード大学医学部 Mason W. Freeman 博士より供与された。HEK293 細胞を用いて、ABCA1 と各種相互作用タンパク質を共発現させた際の、ABCA1 のタンパク質発現をウエスタンブロッティングにより評価した。

さらに、同様の細胞を用いて HDL 形成量を測定した。cDNA を導入した細胞に対して [³H]cholesterol を含む培地で 24 時間インキュベートし、細胞をよく洗浄した後、apolipoprotein A-1 (apoA-1)を培地に添加した。20 時間後、培地中の [³H]cholesterol の量を測定し、HDL 形成を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた遺伝子組換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用の規制による生物の多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)及びこれに基づく「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」(平成 16 年 7 月改正)に従い、研究内容につき当研究所の遺伝子組換え実験安全委員会の適正な審査を受け、実施の承認を得た上で行った。また、放射性同位元素を使用した実験は「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」(平成 16 年法律第 69 号)及びこれに基づく「国立医薬品食品衛生研究所放射線障害予防規定」(平成 9 年 7 月改正)に従い、研究内容につき当研究所の放射線安全委員会の適正な審査を受け、実施の承認を得た上で行った。動物実験に関しては、今年度は実施されなかった。

C. 研究結果

1. 新規 ABCA1 相互作用タンパク質の同定

ABCA1 は C 末に PDZ 結合モチーフ (ESYV) を持つ。この結合モチーフは、PDZ タンパク質と呼ばれる PDZ ドメインを持つタンパク質と相互作用して、シグナル伝達や細胞骨格系への関与により様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。ABCA1-C 末ペプチドを用いた結合実験により、*in vitro* において ABCA1 の C 末と相互作用する下記 PDZ タンパク質が新たに同定された (図 1)。

- Channel associated protein of synapse 110 (Dlg-2)
- Synapse associated protein 102 (Dlg-3)
- Synaptojanin 2 binding protein (OMP25)
- PDZ domain containing 3 (PDZK3)
- KIAA1849
- Membrane associated guanylate kinase related 3 (MAGI-3)
- BAI1-associated protein 1 (AIP-3, MAGI-1)
- Atrophin 1 interacting protein 1 (AIP-1, MAGI-2)
- Tax1 binding protein 3 (TIP-1)
- Scribble
- Multiple PDZ domain protein (MUPP-1)
- Rho guanine exchange factor 11 (GEF11)
- Rho guanine exchange factor 12 (GEF12)

また以前報告されたものとして、Lin-7, α 1-syntrophin も今回の系より検出された。

2. 共発現時における ABCA1 タンパク質の安定化

HEK293 細胞において、myc 標識した GEF11、GEF12、MUPP-1 を ABCA1 と共発現させると、ABCA1 タンパク質の発現量が増加した (図 2)。しかし、myc 標識された TIP-1 では、共発現による ABCA1 の増加は観察されなかった。

3. HDL 形成能の評価

2 で用いた細胞の HDL 形成を測定したところ、GEF11、GEF12、MUPP-1 の共発現によって、apoA-I による HDL 産生が上昇しており、ABCA1 発現量とほぼ平行な結果が得られた (図 3)。

D. 考察

本研究のゴールは、相互作用タンパク質による ABCA1 の分解抑制メカニズムの解明にある。現在までに複数の ABCA1 相互作用タンパク質が報告されており、本主任研究者は、膜の裏打ち構造を支持するタンパク質 β 1-syntrophin が ABCA1 に結合して、その分解を抑制し HDL 形成を促進することを報告している (Okuhira et al., *J. Biol. Chem.*, 2005)。

ABCA1 に相互作用する、上記 13 種の新規 PDZ タンパク質は、機能の良く知られているものから未知のものまで多岐にわたるが、今回は GEF11、GEF12、MUPP-1、TIP-1 についての機能評価を行った。ABCA1 とこれら相互作用タンパク質との共発現細胞において、GEF11、GEF12、MUPP-1 では、 β 1-syntrophin の場合と同様に、ABCA1 の安定化 (図 2) と、それに伴って apoA-I による HDL 形成の増加 (図 3) が観察された。その一方で、TIP-1 では ABCA1 発現、HDL 形成に与える影響は見られなかった。すなわち、PDZ タンパク質の結合は、ABCA1 安定化に必要であるが十分でないと考えられ、 β 1-syntrophin、GEF、MUPP-1 では、それぞれに特徴的な ABCA1 安定化メカニズムの存在が予想される。

GEF は、低分子量 G タンパク質 Rho が不活性化状態の GDP 結合型から活性化状態の GTP 結合型に変換するのを触媒することで知られており、ヒト繊維芽細胞において、*C. difficile* 由来の毒素 B で Rho の活性を阻害すると、HDL 形成が減少するという報告がされている (Nofer et al., *J. Biol. Chem.*, 2003)。今回の結果と併せて考察すると、GEF は細胞骨格系の代表的なシグナル伝達である Rho の活性化を通じて、ABCA1 の合成を亢進、または分解を抑制し、HDL 形成を促進している構図が強く示唆される。

また、MUPP-1 は分子内に 13 の PDZ ドメインを持つタンパク質であるが、機能については未知な部分が多い。今回の ABCA1-C 末に対する相互作用ドメインに関する詳細な検討では、MUPP-1 分子の PDZ domain-2、-13 は C 末に強く結合するが、PDZ domain-1、-3、-6、-12 の結合は非常に弱いか、まったく結合しないことが判明した。MUPP-1 は ABCA1 が機能する際に、ホモダイマー、または他の因子との複合体を形成するために重要な役割を果たしているのかもしれない。

今後は、同定された GEF11、GEF12、MUPP-1、さらに以前同定された β 1-syntrophin による ABCA1 安定化の詳細なメカニズム解明を目指し、効率的な ABCA1 安定化を達成する反応系探索のための基礎的知見の蓄積を図る。具体的には以下の通りである。また、それ以外の相互作用タンパク質についても順次検討を行っていく予定である。

1) 結合の確認

適切な細胞系または組織を用いて、免疫沈降または免疫染色により、ABCA1 と相互作用タンパク質の細胞内結合を確認する。

2) ノックダウン細胞の構築

生体での相互作用タンパク質の機能を明確にするために、相互作用タンパク質の siRNA を作用させたノックダウン細胞を構築し、ABCA1 発現と HDL 形成に与える影響を評価する。

3) プロテアーゼの同定

各種プロテアーゼ特異的な阻害剤を ABCA1 発現細胞に適用して、相互作用タンパク質による ABCA1 分解抑制がどのような種類のプロテアーゼの阻害によって起こるかを同定する。また、そのプロテアーゼにより ABCA1 が切断される部位を決定する。

4) ABCA1 代謝と Rho との関連

Rho シグナル伝達が HDL 形成に関与していることを検証するために、GEF11 または GEF12 のドミナントネガティブを過剰発現させた細胞系を構築し、ABCA1 タンパク質発現と HDL 形成を評価する。

5) ABCA1 代謝とリン酸化の関連

Syntrophin は、細胞内裏打ちタンパク質の一群に属し、膜タンパク質やシグナル伝達系タンパク質と結合して、それらの間を仲介する役割を果たすことが知られており、その際、自らのリン酸化・脱リン酸化により、結合する膜蛋白質の代謝を制御することが報告されている。そこで、相互作用タンパク質によるリン酸化ステータスの変化を観察する。

E. 結論

相互作用タンパク質によって ABCA1 の分解が抑制されるメカニズムを明らかにするために、ABCA1 相互作用タンパク質の探索を行った結果、13 種の新規相互作用タンパク質 (PDZ タンパク質) が同定された。そのうち、GEF11、GEF12、MUPP-1 は ABCA1 の発現を増強し HDL 形成を促進することが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kiss RS, Kavaslar N, Okuhira K, Freeman MW, Walter S, Milne RW, McPherson R, Marcel YL. Genetic Etiology of Isolated Low HDL Syndrome. Incidence and Heterogeneity of Efflux Defects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* In press (2007)

2. 学会発表

奥平桂一郎、Michael L. Fitzgerald、鈴木和博、最上(西巻)知子
ABCA1 相互作用タンパク質の検索と解析
日本薬学会 127 年会 (2007,3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

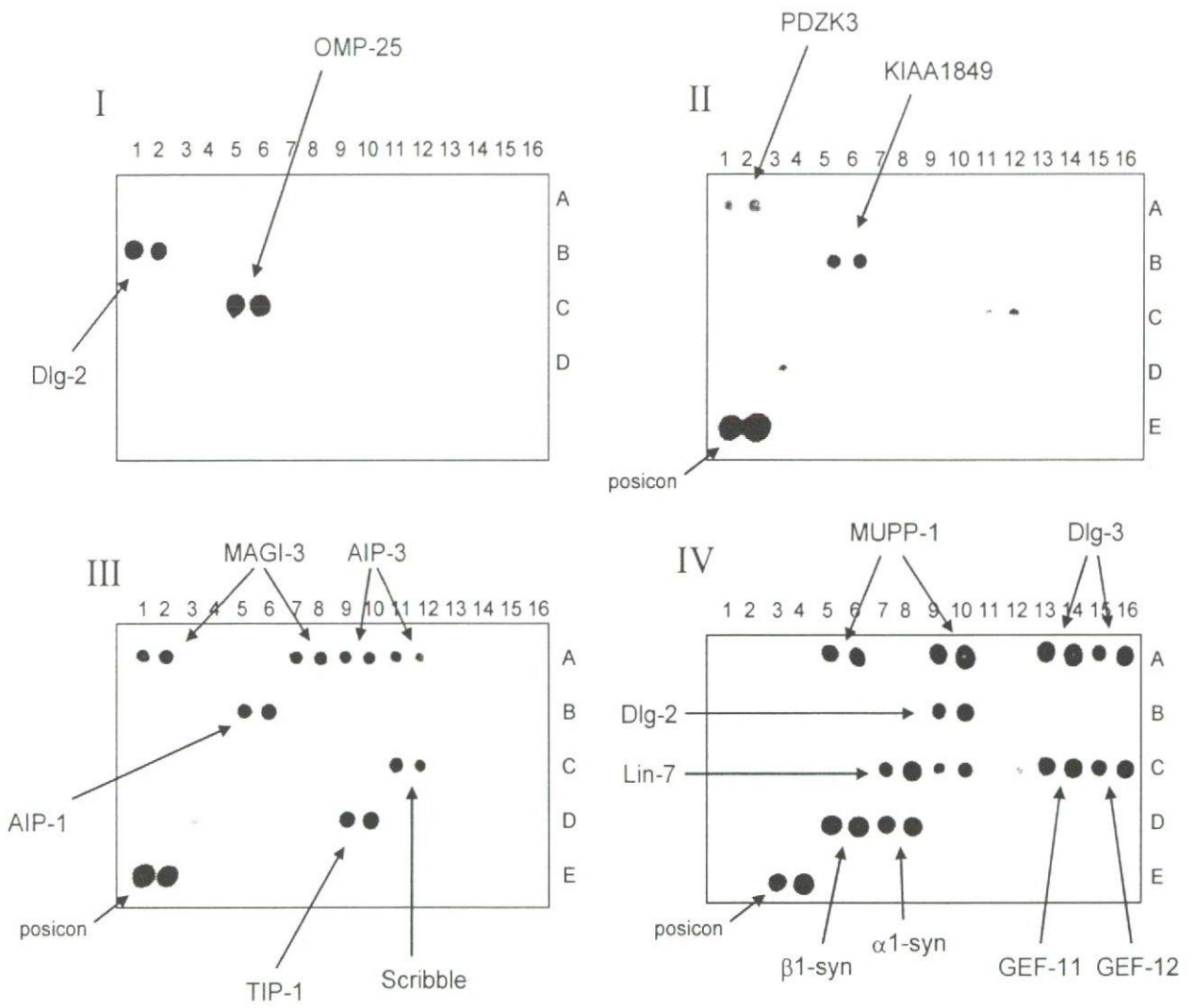


図1 PDZ タンパク質に対する ABCA1-C 末ペプチドの結合

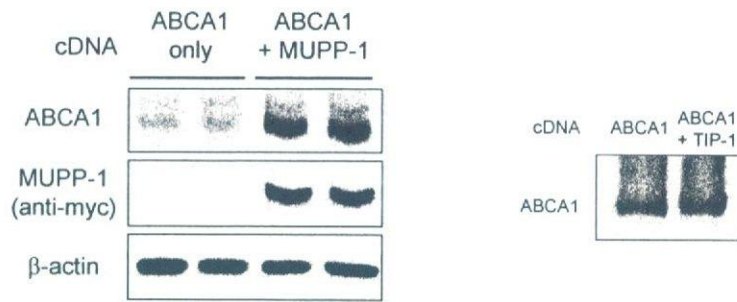
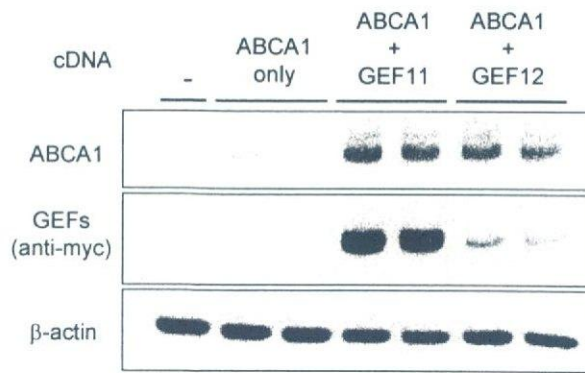


図2 相互作用タンパク質の共発現による ABCA1 タンパク質の発現増加

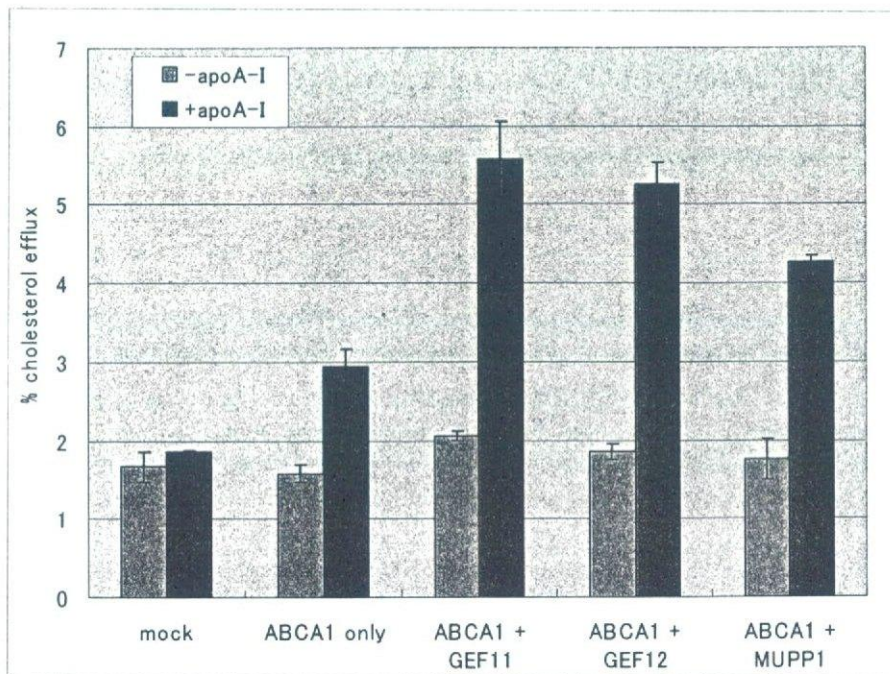


図3 相互作用タンパク質による HDL 形成の促進

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

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