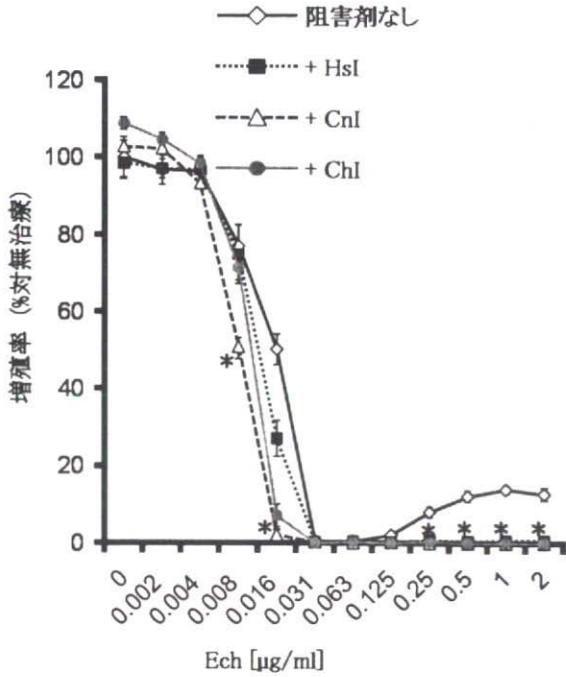
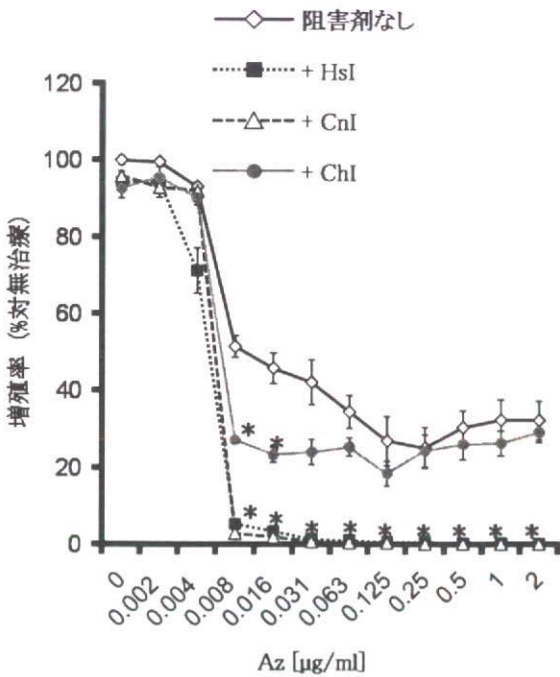


図3 遊離菌に対する増殖阻害効果



a. Ech単独または阻害剤併用時の増殖抑制効果
0.25 μg/ml 以上でPEが認められたが、Hsl、Cnl、ChIを加えることによりPEが消失した。



b. Az単独または阻害剤併用時の増殖抑制効果
HslおよびCnlは、Azの効果を増強した。ChIはAzの効果を劇的に増強することはなかった。

* p<0.01 対 阻害剤なし

Ech: エキノキャンディン系抗真菌薬

Az: アゾール系抗真菌薬

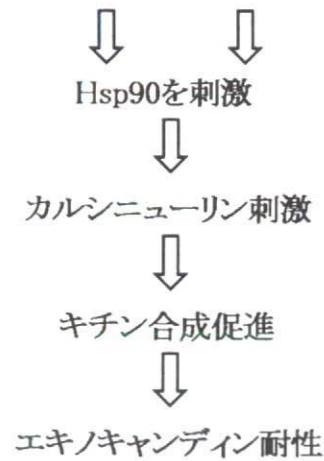
Hsl: Hsp90 阻害剤

Cnl: カルシニューリン阻害剤

ChI: キチン合成阻害剤

図4 予想される Ech耐性機序の模式図

アゾール エキノキャンディン過剰

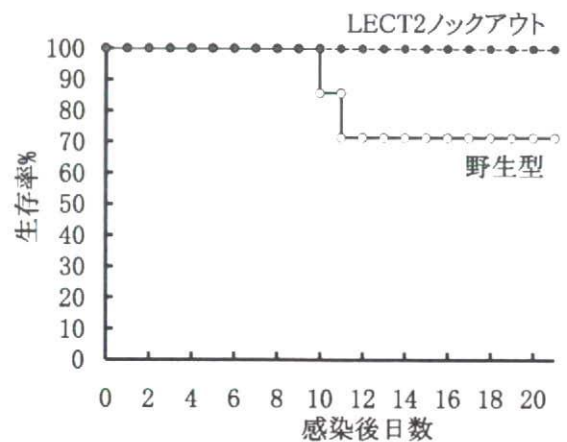


このような機序が、バイオフィームでのAzとEchの拮抗作用、および、EchのPEに関与していると推察される。

3. 免疫学的アプローチ

Candida albicans 感染後の生存率の比較で、野生型とLECT2ノックアウトマウスとの間に、統計学的に有意差を認めた。すなわち、LECT2ノックアウトマウスの方が、*Candida albicans*に耐性を示すことが分かった(図5)。今後、どのような機序でこのような有意差が生じるのか検討する余地がある。しかしながら、野生型マウスとの差がわずかであり、今後、別の真菌等でも感受性を比較してみる必要がある。

図5 *Candida albicans*感染マウスの生存率



生存率において、LECT2-KOマウスと野生型との間に、統計学的有意差を認めた。しかしながら、その差は劇的ではなかった。

D. 考察

これまで、AzはEchとの併用で、*Candida*に対する増殖抑制効果に関しては、相加または相乗的に作用することが報告されてきた。しかしながら、バイオフィームに対しては、拮抗的に作用することが明らかとなった。さらに、ストレス応答因子に着目し、その拮抗作用に、Hsp90等が関与している可能性を発見した。このことは、抗真菌薬の併用療法に注意を喚起するとともに、併用療法の拮抗作用の防止に、Hsp90等の阻害剤が有効であることを示した。今後、真菌に特異的なHsp90等の阻害剤のスクリーニングを行うことで、より有効な真菌の治療に発展するものと期待される。

今回の検討で、Hsp90等は、PEにも関与していることが示唆された。PEは、Echの耐性の出現に関与している可能性が示唆されており、このPEをHsl等が抑制することを示したことは非常に有意義である。すなわち、Hsl等を併用することにより、Echの耐性出現を抑制する可能性がある。

また、現在、解析中の遺伝子発現に関しても、バイオフィームの形成や、バイオフィームの薬剤耐性に関する遺伝子を解明し、そのような遺伝子をターゲットとすることで、新たな治療法の開発が可能であると期待している。

免疫学的アプローチに関しては、まだデータが不十分であり、動物実験も含めて、予備的な実験も必要である。

E. 結論

今回の研究においては、*Candida albicans*のバイオフィームを中心に検討を行った。今後、バイオフィーム内の遺伝子発現が明らかになれば、それらの遺伝子をコントロールすることで、バイオフィームの形成や抗真菌薬に対する感受性をコントロールできる可能性がある。

また、ストレス応答因子が、薬剤の耐性に関与している可能性が示唆された。これらのストレス応答因子(特にHsp90)をコントロールすることが、新規治療法に発展する可能性があり、今後も継続して研究を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野茂、宮崎義継 *Candida albicans*のbiofilmに対するミカファンギンとポリコナゾール、アムホテリシンBとの併用効果 第52回医真菌学会 H20.9

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当せず

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

所属：国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究者： 村上 恭子
研究期間： 平成18年4月～平成21年3月

研究要旨；C型肝炎ウイルス産生 On/off 状態での細胞のプロテオーム解析により、発現に差が見られる蛋白を同定し、ノックダウンによるウイルス粒子産生効率への影響を検討した。その結果、培養上清中の感染価に影響をおよぼす宿主因子 L-FABP を同定した。

1. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染者は現在我が国に200万人以上と推定される。感染後は持続感染により肝炎が慢性化し、肝硬変を経て高率に肝細胞癌を合併することが知られており、公衆衛生上きわめて重要な病原ウイルスである。主たる治療法はインターフェロン(IFN)およびリバビリン投与であるが、日本人におおひ genotypel1, 1b 型はウイルス排除率がひくく、著効率は30-40%である。また重篤な副作用による治療中断となる例も多数存在している。現在、ウイルス酵素阻害剤やヌクレオチドアナログによる HCV-RNA 複製過程を標的とした薬剤が開発されているが、HCV は変異しやすいウイルスであり、薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。従来の抗 HCV 薬とは異なる作用点をもつ治療法の開発は厚生労働行政上の急務である。

そこで、HCV 粒子産生過程に着目した新規治療法の開発を最終目的とし、本研究を開始した。具体的には、HCV 粒子産生制御に関与する宿主因子を同定し、この宿主因子の制御によるウイルス産生制御の可否を検討することを目的とした。

2. 研究方法

申請者は細胞の三次元化により HCV(Con1 株、genotype1b)が産生される実験系の確立に成功した (Virology;351(2);381-92.2006, 特許出願 2005-54835)。この系は細胞の培養形態をかえることで HCV 粒子産生の on/off 制御が可能な系である。この特徴を利用して、本研究では HCV 粒子産生 on/off 状態での細胞内蛋白の変化をプロテオーム解析により検討し、質量分析法による同定を試みた。

発現に差が見られた宿主因子を HCV 粒子産生制御に関与する候補因子としてノックダウンによる HCV 粒子産生効率に及ぼす影響を検討した。各種 siRNA を作製し、HCV 高効率粒子産生系である JFH-1 感染 Huh7 細胞に導入した。ノックダウン効率については抗体によるウエスタンブロットティングによって検討した。上清中の感染性 HCV 粒子量は TCID50 を算出して比較した。HCV-RNA 複製効率への影響を検討するため、luciferase とネオマイシン耐性遺伝子を融合した reporter をもつ subgenomic replicon を維持した Huh7 細胞に siRNA を導入し、HCV-RNA 複製効率を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の組換え DNA 実験は申請者の研究組織における研究委員会で承認されている。

3. 研究結果及び考察

ヒト肝癌 (hepatocellular carcinoma) 由来細胞株 Huh7 細胞を平皿培養もしくは温度感受性ゲルにより三次元培養した。培養開始後、day3 もしくは day7 で細胞を回収し、蛋白を抽出した。蛍光標識ディフレンシャル二次元電気泳動法を用いて、発現量に差のあるタンパクのプロファイリングを行った。発現に 1.5 倍以上の差がみられた spot に関してはゲルから切り出し、プロテアーゼで消化後、ペプチドを抽出し、質量分析法により同定した。

最も差異がみられたのは L-FABP (fatty acid binding protein) であった。この蛋白は肝細胞で強く発現している蛋白であり、細胞内での脂肪酸輸送等に重要な役割を果たしている。一方、細胞骨格蛋白としてよく知られている tubulin、および microtubule の安定性制御に関与する蛋白である stathmin についても発現が亢進していた。その他複数の候補因子を同定したが、同定した蛋白のうち脂質代謝に関与する蛋白が二種類同定された。

これらの宿主因子に対する siRNA を作製し、HCV-JFH1 感染 Huh7 細胞でのノックダウン実験を行った。ノックダウン実験では HCV コア蛋白と結合しユビキチン化することによってコア蛋白を分解する E6 associated protein (E6AP) に対する siRNA をコントロールとしてウイルス産生効率の差を検討することができる条件を決定した。

細胞骨格に関与するチューブリン等の宿主因子についてはノックダウンによる細胞障害がたやすく、HCV 粒子産生量への影響を検討することができなかった。また、一部の宿主因子について

はノックダウン効率の問題から、粒子産生効率への影響について十分に検討することができなかった。それ以外の 6 遺伝子について HCV 粒子量の指標となる培養上清中の HCV コア蛋白量を測定した。このうち、L-FABP はノックダウンにより HCV-RNA 複製効率には影響を与えないが、上清中の感染性粒子量はノックダウンにより増加することが明らかになった。

L-FABP のノックダウンによる培養上清に産生された HCV 感染価の変化については、どのような機序によるものであるか研究期間内に明らかにすることはできなかった。L-FABP は細胞内にとどまるのみならず一部培養上清中にも分泌される蛋白である。ノックダウンによる培養上清の HCV 感染価の低下は L-FABP の減少による HCV 粒子産生量に起因するという仮説の他に、L-FABP 自体が HCV 感染抑制効果を持っておりノックダウンにより培養上清中の L-FABP 減少によって感染効率が上昇した可能性も考えられる。メカニズムの解明にあたっては十分これらの点に配慮しながら研究を進める必要が在るだろう。

また、FABP は遊離脂肪酸が増えると代償的に発現が増加することも報告されている。HCV 粒子産生及び感染効率に遊離脂肪酸が何らかの影響を与えている可能性も十分あり、この点についても以後検討を加えるべきであろう。本研究成果を治療法として応用するには機序解明は不可欠であるが、そのためには様々な角度からこの現象について検討する必要があると考えている。

4. 結論

培養形態の違いにより発現に差のある宿主因子を 10 個同定した。siRNA によるノックダウンで HCV 粒子産生量の変化を検討する系を樹立した。この系を用いたスクリーニングにより、HCV

感染細胞の培養上清中に産生された感染性 HCV 粒子の感染価を制御する宿主因子として肝型脂 肪酸結合蛋白(L-FABP)を同定した。

本研究期間内では具体的な新規治療法の提案 をすることができず、直接的な社会貢献には至 らなかった。しかしながら、今後 FABP の作用点 を明らかにすることで感染性粒子産生制御によ る新規治療法を提案することで国民の福祉に貢 献しようと考えている。

また、本研究遂行中にあらたな HCV レセプタ ー候補因子として occludin と claudin-1 が報 告された。これらの因子は三次元培養下で平皿 培養時と局在が大きく変化する蛋白であることを 申請者は見いだしている。これらのことから、 培養形態による蛋白局在変化に注目した解析を することで、粒子産生制御に関与する候補宿主 因子を見いだせる可能性もあるのではないかと 考えている。

5. 研究発表

1) 論文発表

欧文雑誌 (査読有)

1.Masayuki Shirakura, Kyoko Murakami, Tohru Ichimura, Ryosuke Suzuki, Tetsu Shimoji, Kouichirou Fukuda, Katsutoshi Abe, Shigeko Sato, Masayoshi Fukasawa, Yoshio Yamakawa, Masahiro Nishijima, Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Peter M. Howley, Tatsuo Miyamura, and Ikuo Shoji; The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol*; 81(3); 1174-1185. 2007

2.Kyoko Murakami, Yasushi Inoue, Su-Su Hmwe, Kazuhiko Omata, Tomokatsu Hongo, Koji Ishii, Sayaka Yoshizaki, Hideki Aizaki, Tomokazu

Matsuura, Ikuo Shoji, Tatsuo Miyamura, and Tetsuro Suzuki.; Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system

J. Virol.Methods. 2008 Mar;148(1-2): 174-181.

3.Kyoko Murakami, Toshiro Kimura, Motonao Osaki, Koji Ishii, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita and Ikuo Shoji; Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol.*, 89,1587-1592

2) 学会発表

国内学会

1. 村上恭子、吉崎佐矢香、松田麻未、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字；三次元培養による C 型肝炎ウイルス粒子産生機構の解明；第 15 回肝細胞研究会；2008 年 6 月 静岡

国際学会

1.Kyoko Murakami, Katsutoshi Abe, Ikuo Shoji, Satoshi Takamiya, Toshiro Kimura, Koji Ishii, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, and Takaji Wakita; Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIc region of viral RNA. IUMS2008 (国際ウイルス会議) ;2008.8.

6. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし

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

所 属 国立感染症研究所・ウイルス第二部
研究者 村上 恭子

研究要旨 申請者が樹立した三次元培養HCV粒子産生系は培養形態をかえることで粒子産生の on/off 制御が可能である。培養形態により発現に差が見られた蛋白の一つである脂肪酸結合蛋白 FABP をノックダウンした所、HCV 粒子産生量の変化が見られた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染者は現在我が国に200万人以上と推定される。感染後は持続感染により肝炎が慢性化し、肝硬変を経て高率に肝細胞癌を合併することが知られており、公衆衛生上きわめて重要な病原ウイルスである。主たる治療法はインターフェロン(IFN)およびリバビリン投与であるが、日本人におおひ genotypel a, 1b型はウイルス排除率がひくく、著効率は30-40%である。また重篤な副作用による治療中断となる例も多数存在している。現在、ウイルス酵素阻害剤やヌクレオチドアナログによる HCV-RNA 複製過程を標的とした薬剤が開発されているが、HCVは変異しやすいウイルスであり、薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。従来の抗HCV薬とは異なる作用点をもつ治療法の開発は厚生労働行政上の急務である。

一方、HCVはその塩基配列情報をもとにリバースジェネティクスを駆使して多くの知見が得られているが、ウイルス粒子形成及び放出過程の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。近年、劇症肝炎患者より分離した HCV(JFH1株, genotype2a)が培養細胞において高効率にHCV粒子を産生することが報告され(Wakita et. al, 2005; Nature Medicine)ウイルス粒子形成及び放出過程を解析できるようになった。一方、我々は細胞の三次元化により HCV(Con1株, genotype1b)が産生される実験系の確立に成功した(Virology;351(2);381-92. 2006, 特許出願

2005-54835)。この系は細胞の培養形態をかえることでHCV粒子産生の on/off 制御が可能系である。この特徴を利用して、本研究ではHCV粒子産生 on/off 状態での細胞内蛋白の変化をプロテオーム解析により検討し、粒子産生に關与する宿主因子の同定を試みた。ヒト肝癌由来細胞株 Huh-7細胞を平皿培養もしくは温度感受性ゲルを用いて三次元培養を行い、培養3日目、及び7日目で細胞を回収した。蛍光ディフレンシャル二次元電気泳動法を用いて発現量に差のある蛋白のプロファイリングをおこない、再現性のあるスポットを選んで質量分析により同定を行った。その結果、培養形態により発現に差のある蛋白10個を同定した(H18年度報告書より)。これらの宿主因子のノックダウン条件を検討するとともに、高効率HCV粒子産生系を用いたHCV粒子産生におよぼす影響について検討を行った。また、HCV-RNA複製効率に及ぼす影響について合わせて検討した。

B. 研究方法

a. 候補蛋白のノックダウン

各種 siRNA をデザインし、Hyperfect(QIAGEN)を用いて導入した。を導入後、24h-96h後に細胞を lysis buffer にて回収した。ノックダウン効果は各種抗体をもちいてウエスタンブロッティングにて確認をおこなった。

また十分なノックダウンが確認できた配列

については陰性コントロールとしてスクランブル配列をデザインした。

b. FABP の発現レベルについての解析

ヒト肝癌由来細胞株 Huh-7 を 3 日もしくは 7 日間、平皿培養もしくは温度感受性ゲル(TGP)による三次元培養した。培養後の細胞を回収した。細胞を RIPA buffer で lysis し、ウエスタンブロッティングにより FABP 発現量を確認した。また、コントロールとして GAPDH を用いた。

また、mRNA 量の確認のため、回収した細胞を Trizol にて溶解し、total mRNA を抽出した。FABP 特異的 primer 及び TaqMan-probe を利用した定量的 RT-PCR により FABP の mRNA 量を定量するとともに、コントロールとして GAPDH の mRNA 量についても同様に定量した。

c. FABP 遺伝子発現を調節する転写因子の発現レベルの解析

平皿もしくは三次元培養後の細胞より mRNA を回収し、PPAR α または PPAR γ 特異的 Primer 及び TaqMan-probe を利用した Real time RT-PCR を行った。また、コントロールとして GAPDH の mRNA についても同様に定量した。

d. 粒子産生評価系の検討

Huh7 細胞に HCV-JFH1 RNA を導入し、JFH1 持続感染細胞を作製した。この感染細胞の培養上清中に含まれる感染性ウイルス粒子量を定量し、 1×10^4 IU TCID₅₀/mL のウイルス液 1 mL を 1×10^5 個の naïve な Huh-7 細胞に感染させた。感染後 4-7 日後、HCV コア蛋白もしくは HCV-NS5A 蛋白に対する抗体で細胞を染色し、ほぼ 100% の細胞に HCV が感染していることを確認した。この細胞を真美戻し、siRNA を導入した。導入後 24 時間の時点で、細胞を PBS で三回洗ったのち、新たな培地を加え、2, 4, 8 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の HCV コア蛋白量は ELISA 法を用いて測定した。また、上清中の感染性ウイルス量については、以下の方法で定量した。

Naïve な Huh7 細胞に HCV-JFH1 を含む培地を加え、3 時間 37°C にて incubate した後、siRNA を導入した。48 時間後に培養上清を回収した。こ

の培養上清中の debris を 8000g, 50min の遠心操作により除去し、希釈した。 10^4 cells/well の濃度で naïve な Huh7 細胞を前日に巻き戻しておいた 96well plate に希釈した培養上清を加え、96 時間培養後、細胞を固定した。HCV コア蛋白または HCV-NS5A に対する抗体で免疫染色を行い、感染性ウイルス粒子量の測定を行った。

e. HCV-RNA 複製効率への影響の検討

ネオマイシン耐性遺伝子と luciferase 遺伝子をレポーターとして持つ HCV-JFH1 株由来の subgenomic replicon (SGR-luci/neo-JFH1) を作製した。In vitro で合成した replicon RNA を Huh7 細胞に導入後、G418 1mg/ml にて選択した。この細胞に各種 siRNA を導入後、24 時間-72 時間後の luciferase 活性を測定し、ノックダウンによる HCV-RNA 複製効率への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の組み換え DNA 実験は申請者の研究組織における研究委員会で承認されている。

C. 研究結果

a. 候補蛋白の同定

Huh7 細胞を三次元もしくは平皿培養開始後、day3 もしくは day7 で細胞を回収し、発現量に差のあるタンパクのプロファイリングを行った。Day3 および day7 とともに同様の傾向を示し、かつ再現性がとれた 10 のスポットについて切り出しを行い、質量分析により同定を行った。

最も大きな差異がみられたのは FABP (fatty acid binding protein) であった。この蛋白は肝細胞で強く発現している蛋白であり、細胞内での脂肪酸輸送等に重要な役割を果たしていることが知られている。FABP を含め、Glutathione S-transferase Pi day 3 でより発現亢進がみられた蛋白はいずれも代謝関係の蛋白であった。

一方、細胞骨格蛋白としてよく知られている tubulin、および microtubule の安定性制御に関与する蛋白である stathmin については day7 でより発現が亢進しており、細胞集団としての三次元

的構築に重要であることが考えられる。また、三次元培養細胞で発現が低下していた蛋白としてヒートショック蛋白二種が同定された。Hsp70については HCV 関連肝癌のバイオマーカーとしての可能性等が報告されている。また、今年度新たにサイトケラチン 8 (KRT8) とサイトケラチン 19 (KRT19) を同定した。平皿培養時には KRT8 が高く、三次元培養時には KRT19 が増加する。KRT8 と KRT19 はそれぞれ、胆管細胞および肝細胞のマーカーとして組織染色では汎用されている蛋白であり、細胞を三次元化することで、分化度があがった結果であることが推測された。

このように複数の候補因子を同定したが、同定した蛋白のうち脂質代謝に関与する蛋白が二種類同定された。Glutathione S-transferase Pi 及び FABP である。Glutathione S-transferase Pi は fatty acid ethyl ester synthase III という別名をもつ蛋白であり脂質代謝に関与している。FABP は脂肪酸と結合し、その脂肪酸の輸送と代謝に重要な役割をはたしている。この二つの蛋白の発現が亢進していたことから、脂質代謝全般が大きく動いていることが考えられた。近年、HCV 粒子形成の場が細胞内脂肪滴近辺である事等が報告されており、脂質代謝と HCV との関連は注目されている。競争の激しい分野であることから優先して検討を行った。まず発現増強が非常に顕著であった FABP に着目した。

b. FABP 発現レベルの比較

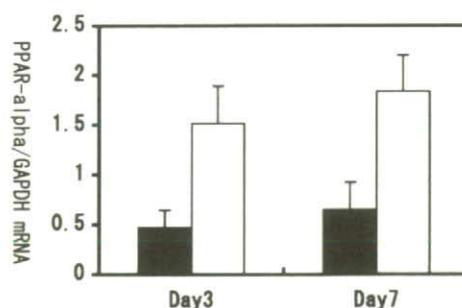
FABP は細胞内のエネルギー・脂質代謝及び疎水性リガンドの輸送を担う分子量 14kDa 程度の可溶性蛋白として知られている。様々な臓器で発現しており、組織特異的な複数のサブタイプが存在する。肝臓型 FABP は小腸等でも発現しているが肝細胞で特に発現がたかく、total cytosolic protein のうち 2-5% を占めている。長鎖脂肪酸、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、分岐鎖脂肪酸等様々な脂肪酸に結合する他、fatty acyl-CoA, haem, lysomphosphatidic acid, eicosanoids, hypolipidemic drugs 抗高脂血症薬(peroxisome

proliferators) との結合が報告されており、特に脂質代謝とその輸送には大きな役割を果たしている事が考えられる。また、ウサギを用いた実験から、この蛋白の発現レベルはペルオキシソームの分化増殖に制御されていることがわかっている。

c. L-FABP mRNA 転写制御因子に関する検討

二次元培養と三次元培養時の L-FABP の発現レベルについて確認した。その結果、三次元培養細胞では L-FABP の発現が蛋白及び mRNA レベルの両方で亢進していることが明らかとなった(平成 19 年度報告書)。これらのことから、細胞の三次元化による L-FABP の遺伝子発現を調節する転写因子の発現亢進が考えられた。

L-FABP mRNA の転写制御には転写因子である PPAR α 及び PPAR γ が関与していることが知られている。そこで、二次元及び三次元培養細胞より RNA を回収し、Real time RT-PCR 法によってそれ



ぞれの mRNA 発現レベルについて検討した。PPAR α の結果を図 1 に示す。

図 1. PPAR α mRNA 発現レベルの検討

縦軸は PPAR α mRNA 量を GAPDH mRNA 量で補正した数値を示した。■は二次元培養、□は三次元培養細胞を示す。

PPAR α の mRNA レベルは三次元培養細胞において、day3, day7 とともに平皿培養にくらべ高い発現レベルをしめした。次に PPAR γ について同様に検討した。その結果を図 2 に示す。

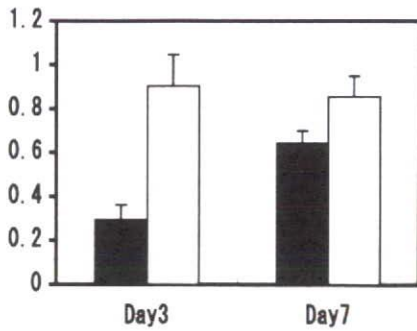


図 2. PPAR γ mRNA 発現レベルの検討

縦軸は PPAR γ mRNA 量を GAPDH mRNA 量で補正した数値を示した。■は二次元培養、□は三次元培養細胞を示す。

day3, day7 ともに平皿培養にくらべ高い発現レベルをしめした。以上のことから、PPAR α 、PPAR γ ともに三次元培養時の mRNA 発現レベルが亢進していた。このことから、FABP の発現上昇は PPAR α 、PPAR γ といった転写因子群の発現亢進に起因することが示唆された。また、データは省略するが、Huh 7 と同様にヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞でもこれらの転写因子の mRNA レベルについて検討したところ、Huh7 細胞同様に PPAR α 、PPAR γ ともに三次元培養細胞で発現レベルが上昇していた。

d. 宿主因子のノックダウンによる HCV 粒子産生効率への影響の検討

FABP の発現が三次元培養細胞で確かに亢進していることを確認したので、高効率 HCV 粒子産生系である JFH1 感染細胞を用いてノックダウンによるウイルス粒子産生量の変化を検討した。

感染細胞に siFABP 及びそのコントロール配列 siFABPsc を導入し、24 時間後培地を除去し、PBS で三回 wash した後、新しい medium を加え、2h、4h、8h 後に培養上清を回収した。8 時間の時点で細胞を回収し、ウェスタンブロッティングによりノックダウンを確認した。その結果を図 3 にしめす。

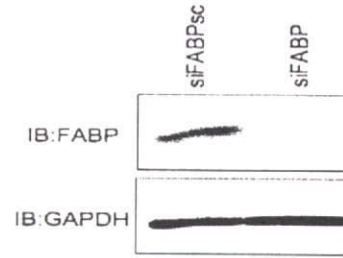


図 3; FABP のノックダウン効率の確認

感染細胞に siRNA を導入後、8h 後に培養細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより FABP 及び GAPDH の蛋白量について検討した。

図 3 に示す通り、siFABP 導入により、FABP の発現が約 90%抑制された。一方、GAPDH の量はかわらなかった。次に回収した培養上清中の core 蛋白量を定量した結果を図 4 に示す。

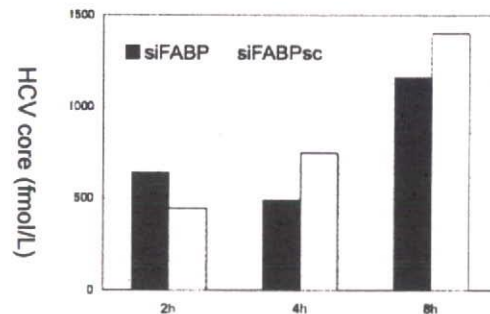


図 4; FABP ノックダウンによる上清中の HCV コア蛋白量の変化

感染細胞に siRNA を導入後、24 時間の時点で培地を交換し、その時点から 2h, 4h, 8h 後に培養上清を回収した。この培養上清中の HCV コア蛋白量を ELISA により定量した。黒い bar は FABP に対する siRNA をくわえたもの、白い bar はコントロールとして作製したスクランブル配列を加えたものを示す。

図 4 に示したように、培養上清中の HCV コア蛋白量は FABP のノックダウンを行った場合、培地交換後 4 時間、8 時間の時点でコントロールと比較して、70-80%程度減少していた。

次に培地交換後 8 時間の培養上清中の HCV 感染性粒子量について検討した。

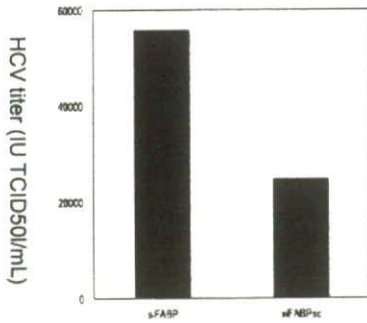


図5. FABP ノックダウンによる培養上清中の感染性粒子量の変化

感染細胞に siRNA を導入後、24 時間の時点で培地を交換し、その時点から 8h 後に培養上清を回収した。この培養上清中の感染性 HCV 量を定量した。縦軸に感染性 HCV 量を示す。

図5に示したように、FABP をノックダウンした場合、培養上清中に存在する感染性粒子量は約2倍に増加した。また、細胞内の HCV コア蛋白量については大きな変化は見られなかったことから (data not shown)、複製効率には影響しないことが示唆された。

図4に示した HCV コア蛋白量では FABP をノックダウンした場合には、ややコア蛋白量が減少している結果となっていた。FABP のノックダウンによって、培養上清中の HCV 粒子の量ではなく、質的な変化が起きている可能性も考えられた。

e. HCV-RNA 複製効率に及ぼす影響

細胞内の HCV コア蛋白量については大きな変化は見られなかったことから (data not shown)、FABP のノックダウンは HCV-RNA 複製効率にはおそらく影響しないと考えられたが、HCV-RNA 複製課程までを検討できるレプリコンシステムを用いてさらに検討を行った。

レポーターとしてネオマイシン耐性遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子の融合蛋白をもつ JFH1 株由来 subgenomic replicon RNA を Huh7 細胞に導入し、G418 による選択培養で replicon 維持 Huh7 細胞を作製した。この細胞に siRNA を導入し、導入後 24 時間、48 時間後の細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図6に示す。

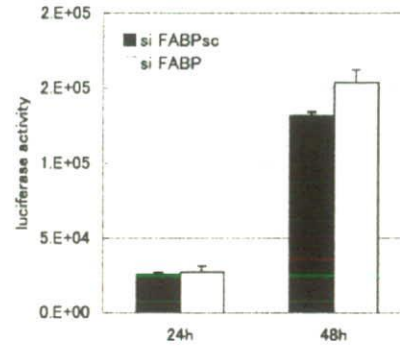


図6. FABP ノックダウンによる HCV-RNA 複製効率の変化

siRNA 導入後、24 時間、48 時間の細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は HCV-RNA 複製効率を示す。縦軸に luciferase 活性を示す。

図6に示すように、FABP のノックダウンによって HCV-RNA 複製効率に大きな変化は見られなかった。以上の結果から、FABP は HCV-RNA 複製に関与する宿主因子である可能性は低いことが示唆された。

D. 考察

FABP については、十分なノックダウン効率がえられ、また感染細胞での検討も行ってきた。しかしながら、siRNA によるノックダウンの実験の場合、予想外のターゲットを同時にノックダウンしている可能性や dsRNA の導入による IFN 系シグナルの影響等、考えなくてはならない可能性が数多くある。今後は、これらの様々な可能性を排除するためにも他の配列をターゲットとした siRNA を作製し、ノックダウン実験を行う必要があるだろう。

FABP のノックダウンにより当初はウイルス産生量が減少するのではないかと予測して実験をおこなったが、実際には FABP のノックダウンによって培養上清中の感染性粒子が増加した。三次

元培養細胞では HCV-RNA 複製がむしろ減少するというを以前に報告しており、このことから FABP が HCV-RNA 複製を負に制御する蛋白である可能性も十分考えられたが、本年度の実験結果から複製効率には影響を与える可能性は低い事が示唆された。

また、FABP をノックダウンした際の培養上清中の HCV コア蛋白量と HCV 感染性ウイルス量の変動は異なっており、培養上清中の HCV 粒子の量ではなく、質的な変化が起きている可能性は十分に考えられる。FABP は細胞外からの脂肪酸の取り込みに関与しているが、細胞内脂肪酸の量の変化により、LDL 等の産生等に影響していることは十分に考えられる。この点を考慮すると、ウイルス粒子の密度等について検討する他にも、ウイルス粒子と結合している可能性が高い LDL 等の産生量についても精査する必要があるだろう。くわえて FABP は細胞外へもある程度分泌される蛋白であることから、FABP 自体が感染阻害因子である可能性も十分に考えられる。FABP は遊離脂肪酸が増減すると代償的に発現が増減する事も報告されている。HCV 感染が脂質代謝に影響を及ぼし、FABP の発現レベル自体が既に影響を受けている可能性もあり、またそれを示唆する実験データもでていいる。今後メカニズムの解明にあたっては十分これらの点に考慮しながら研究を進めてゆく必要があるだろう。

FABP mRNA の転写因子 PPAR α 、PPAR γ の mRNA 発現が三次元培養では亢進していることが、本年度の研究により明らかになった。これらの転写因子はプロテオーム解析によるスクリーニングでは候補としてあがらなかった蛋白である。プロテオーム解析に用いた pH 域や分子量の問題で pick up できなかった可能性も十分にあり得る。今後はトランスクリプトーム解析等によりより広範囲にスクリーニングする必要があると考えていいる。

E. 結論

1. FABP mRNA の転写因子である PPAR α 及び PPAR γ の mRNA レベルは三次元培養細胞で亢進していたで平皿培養時と比較し、有意に上昇していた。
2. FABP ノックダウンの影響を、高効率 HCV 粒子産生系を用いて検討したところ、ノックダウンにより培養上清中のコア蛋白量は変化しないにも関わらず、培地中の HCV 感染価は増加した。
4. FABP ノックダウンによる HCV-RNA 複製効率への影響は見られなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kyoko Murakami, Yasushi Inoue, Su-Su Hmwe, Kazuhiko Omata, Tomokatsu Hongo, Koji Ishii, Sayaka Yoshizaki, Hideki Aizaki, Tomokazu Matsuura, Ikuo Shoji, Tatsuo Miyamura, and Tetsuro Suzuki.; Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system ;J. Virol.Methods. 2008 Mar;148(1-2): 174-181.
- 2)Kyoko Murakami, Toshiro Kimura, Motonao Osaki, Koji Ishii, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita and Ikuo Shoji; Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines; J Gen Virol. 2008;89, 1587-1592

2. 学会発表

- 1) 村上恭子、吉崎佐矢香、松田麻未、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字；三次元培養による C 型肝炎ウイルス粒子産生機構の解明；第 15 回肝細胞研究会 2007 年 6 月
- 2) Itsuki Hamamoto, Kyoko Murakami, Tetsuro Suzuki, Keiko Taya, Nobuhiko Okabe, Takaji Wakita, and Ikuo Shoji ; ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. ; 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses;2008 年 10 月

G. 知的所有権の出願・登録状況

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

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 機能生化学部
研究者 奥平 桂一郎
研究期間 平成 18 年 4 月～平成 21 年 3 月

膜トランスポーターABCA1は、細胞より抗動脈硬化作用を持つHDLを産生する。我々は、ABCA1の発現が相互作用タンパク質であるグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の制御を受けることを明らかにし、その詳細なメカニズムについて検討した。

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まだ存在しない。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ポーター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。

B. 研究方法

新規ABCA1相互作用タンパク質の同定

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。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、細胞の洗浄後、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。細胞内相互作用を観察する実験では、ABCA1と相互作用タンパク質を共発現させた細胞より、FLAG抗体を用いて免疫沈降し、myc抗体でウエスタンブロッティングすることで相互作用を観察した。また、同様の細胞を用いて、免疫染色により相互作用を確認した。

相互作用タンパク質GEFの解析

RhoAの野生型、T19N(Dominant Negative)、Q63L(Constitutively Active)のヒトcDNAをライブラリーよりクローニングし、HA標識ベクター(pCMV-HA)に導入した。ABCA1とRhoAおよび変異体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。同様の細胞を用いてHDL形成量を測定した。さらに、同様の細胞にcycloheximideを加えて、タンパク質合成を阻害し、時間経過とともにABCA1タンパク質の分解をウエスタンブロッティングにより評価した。

RhoA による ABCA1 の活性制御機序の解析

ABCA1 を発現する細胞株として、ホルボールエステル(PMA)により分化させたヒトマクロファージ様細胞株 THP-1、及びヒト初代培養繊維芽細胞を用いた。mRNA は extraction kit (Qiagen)で細胞より抽出し、定量 RT-PCR で測定した。18S rRNA を内部標準として、ABCA1 の mRNA 量を評価した。siRNA は siGENOME ON-TARGETplus SMART pool duplex (Dharmacon)を使用した。siRNA の繊維芽細胞へのトランスフェクションは nucleofector (Amaxa) を用いて、導入方法は Amaxa 社のプロトコル通りに行った。ABCA1 タンパク質の apoA-I による安定化の実験では、siRNA を導入した細胞に apoA-I を一時間作用させて、ABCA1 タンパク質量を評価した。

(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

新規 ABCA1 相互作用タンパク質の同定 (平成 18 年度)

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。

Dlg-2, Dlg-3, OMP25, PDZK3, KIAA1849, MAGI-1, -2, -3, TIP-1, Scribble, MUPP-1, GEF11, GEF12

また以前 yeast-2-hybrid を用いた実験より報告されたものとして、Lin-7, 1-syntrophin も今回の系より検出された。

同定された ABCA1 相互作用タンパク質の機能評価 (平成 18 年度)

HEK293 細胞において、GEF11 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。同様に、GEF12、MUPP-1 でも ABCA1 の発現増強作用が観察された。しかし、TIP-1 では、共発現による ABCA1 の増加は観察されなかった。また、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 発現量とほぼパラレルな結果が得られた。

ABCA1 と GEF タンパク質の細胞内相互作用の確認 (平成 19 年度)

GEF11、GEF12 が、ABCA1 と細胞内で相互作用していることを確認するために、myc 標識した GEF11、GEF12、 β 1-syntrophin (ポジコン) を、FLAG 標識した ABCA1 と共発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降し、myc 抗体で相互作用を観察したところ、GEF11、GEF12、 β 1-syntrophin のいずれも ABCA1 との共沈が確認された。また、GFP 標識した ABCA1 と myc-GEF11 を共発現させ、細胞を固定して myc 抗体と Alexa 標識二次抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、ABCA1、GEF11 ともに細胞表面膜近傍に発現が観察された。この結果は、ABCA1 と GEF が細胞膜付近で相互作用していることを示している。

GEF11 による HDL 形成促進と ABCA1 タンパク質の発現量増加 (平成 19 年度)

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、そのためには GEF の PH/DH ドメインが重要な機能を果たしていることが分かっている。そこで、PH/DH ドメインを欠損した GEF11 のコンストラクト(GEF11-D)を作成し、ABCA1 に対する影響を観察したところ、ABCA1 タンパク質発現、HDL 産生促進の効果が減弱した。このことは GEF の RhoA の活性化作用が ABCA1 の発現及び HDL 形成に重要な役割を果たしている

ことを示唆している。

ABCA1 タンパク質発現と HDL 形成量におよぼす RhoA の効果 (平成 19 年度)

GEF11 の発現により、実際に細胞内で RhoA の活性化が起こっていることを確認し、RhoA 活性化が ABCA1 発現、HDL 形成に及ぼす影響について調べた。野生型 RhoA(WT)を共発現させたときと比較して、常時活性化型 RhoA(Q63L, CA)の共発現により、ABCA1 発現量は増加し、HDL 形成量も増大した。逆に、常時不活性化型 RhoA(T19N, DN)の共発現により、ABCA1 発現量、HDL 形成量は減少した。この結果は、GEF が RhoA の活性化を介して ABCA1 の発現量を調節していることを示している。

ABCA1 タンパク質の分解 (平成 19 年度)

GEF を介した RhoA の活性化が ABCA1 の発現を増加するメカニズムについて、ABCA1 タンパク質の分解について調べた。ABCA1 単独、ABCA1 と野生型 RhoA の共発現、または ABCA1 と常時活性化型 RhoA の共発現細胞において、cycloheximide を加えてタンパク質合成を止めた後、時間経過とともに減衰する ABCA1 タンパク質の量について評価したところ、常時活性化型 RhoA の共発現によって、ABCA1 の分解は抑制され、タンパク質の安定化が観察された。また逆に、常時不活性化型 RhoA の発現によって、ABCA1 の分解は促進した。つまり、活性化 RhoA は ABCA1 の分解を抑制して、ABCA1 の発現を増強し、HDL 産生を促進していることが明らかとなった。

RhoA による ABCA1 の活性制御機序の解析 (平成 20 年度)

Endogenous な系で RhoA の ABCA1 に対する効果を評価したところ、PMA により分化させたヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 で、RhoA の阻害剤の付加により、ABCA1 の mRNA レベルが増加していた。また、THP-1 及びヒト初代培養繊維芽細胞において、RhoA の siRNA による発現抑制によっても、ABCA1 の転写が上昇していた。つまり、RhoA の活性化は ABCA1 タンパク質の分解を抑制し、発現を増強し、不活性化によって分解は促進されるが、RhoA を不活性化することによって、ABCA1 の転写が促進され、結果的に、発現を増強することが示された。

apoA-I による RhoA 活性化 (平成 20 年度)

apoA-I を加えると HDL 形成が起こるが、極

めて短い時間の apoA-I 刺激により、PMA により分化させたヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 で RhoA が活性化することが分かった。apoA-I を細胞に付加すると、ABCA1 タンパク質の発現増強が観察され、この現象は GEF11 及び GEF12 の発現抑制によって抑えられた。apoA-I は ABCA1 と直接結合することは以前に示しており、この結果は apoA-I と ABCA1 の結合から C 末端に結合する GEF11、GEF12 を介して RhoA を活性化し、ABCA1 のタンパク質分解を阻害する細胞内機構の存在を示唆している。

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。ABCA1 タンパク質の turnover は極めて短時間で起こることが知られており、相互作用タンパク質によるタンパク質レベルでの活性制御システムが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。以前に我々は、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)。本研究課題一年目 (前年度) 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 (平成 18 年度)。また、GEF11、GEF12 の機能について、GEF が ABCA1 の細胞内ドメインと結合して RhoA を活性化し、活性化した RhoA は ABCA1 タンパク質の分解を抑制して、HDL 形成を促進することを明らかにした (平成 19 年度)。さらに、RhoA による ABCA1 発現制御が、遺伝子レベル、タンパク質レベルで、逆向きに行われているという複雑なメカニズムについて明らかにした (平成 20 年度)。

GEF11、GEF12 はそれぞれ PDZ-RhoGEF、LARG と呼ばれ、これまで、神経忌避因子であるセマフォリンの受容体 Plexin-B1、インシュリン様成長因子受容体、LPA 受容体などの膜受容体の細胞内ドメインに結合し、外部からの刺激を RhoA シグナルの活性化として情報を内部に伝達する、transducer 的な役割を担っていることが知られている。本研究において、ABCA1 との相互作用が示され、ABCA1 発現量の調節、

HDL 形成量の制御に関わっていることが示された。ここから ABCA1 は、脂質トランスポーターとして HDL を形成するだけでなく、外部からのシグナルを受け取る受容体としての機能をも併せ持つことが推測される。

THP-1 細胞において、apoA-I の刺激によって RhoA が活性化され、また apoA-I の刺激が ABCA1 安定化に繋がることから、apoA-I の ABCA1 への結合からはじまる一連の HDL 形成過程において、GEF/RhoA を介した ABCA1 の安定化が重要な意味を持っていることが強く示唆される。

しかし驚いたことに、THP-1 及び繊維芽細胞において、RhoA の活性化を、阻害剤または siRNA の導入により抑制することで、ABCA1 の転写が上昇し、mRNA の発現が増加していた。このことは、RhoA による ABCA1 発現制御が、遺伝子レベル、タンパク質レベルで、逆向きに行われていることを示している。

この複雑なメカニズムの生理的意味は現在のところ不明である。ABCA1 活性調節には、遺伝子レベル、タンパク質レベルにおける複数の複雑な制御システムが関与しており、このことは細胞内コレステロール恒常性維持の重要性を示しているといえる。タンパク質レベルでの発現制御は、遺伝子のレスポンスと比較して速く、本研究によって示唆された apoA-I 刺激からの GEF/RhoA 活性化による ABCA1 のタンパク質発現安定化作用も、HDL 形成における迅速な ABCA1 発現促進を助けるメカニズムである可能性が示唆される。apoA-I 刺激による RhoA の活性化は極めて速く（約 5 分）かつ一時的であることから、apoA-I が細胞表面の ABCA1 に結合することにより、局所的、かつ一時的に ABCA1 の発現が増強され、HDL 形成の、特に初期段階における反応を促進する効果があると推測される。

本研究課題により、GEF は ABCA1 が細胞内で相互作用しており、RhoA を介した ABCA1 タンパク質の発現制御が行われていることが、世界で始めて明らかとなった。RhoA に関しては、これまで細胞骨格系に対する研究が進んでいたが、脂質輸送を司る ABCA1 に対する効果が明らかにされたことで、細胞骨格と細胞内脂質ホメオスタシスが、RhoA を介してリンクしていることが示唆された。

E. 結論

新規候補タンパク質の探索から、GEF11、GEF12、MUPP-1 という ABCA1 の活性を増加させる可能性のある相互作用タンパク質を同定した。また GEF は ABCA1 が細胞内で相互作用しており、GEF11 は RhoA の活性化を経て、ABCA1 タンパク質を安定化するが、RhoA は ABCA1 の転写制御にも関与しているという複雑な生理システムについて明らかにした。

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.* 2007; 27(5):1139-45.

Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T, Okuhira K, Suzuki K, Sato R, Nagao T, Nishimaki-Mogami T.

Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status.

J Biol Chem. 2007; 282(29):21090-9

Tamehiro N, Zhou S, Okuhira K, Benita Y, Brown CE, Zhuang DZ, Latz E, Hornemann T, von Eckardstein A, Xavier RJ, Freeman MW, Fitzgerald ML.

SPTLC1 binds ABCA1 to negatively regulate trafficking and cholesterol efflux activity of the transporter.

Biochemistry, 2008; 47(23):6138-47

Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira K, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Ohno Y, Inoue K, Sawada J.

The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines.

Biochem Pharmacol, 2008; 76(8):1006-13

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)

Okuhira K., Fitzgerald M.L.*, Tamehiro N. *,
Freeman M.W.*, Shigemoto-Mogami Y.,
Nishimaki-Mogami Y.

The guanine exchange factor 11 PDZ protein binds
ABCA1 positively regulating transporter expression
and cholesterol efflux via Rho activation.

American Heart Association, scientific sessions
2007 (2007. 11)

* Massachusetts General Hospital / Harvard
Medical School

奥平桂一郎、最上（重本）由香里、澤田純一、
最上（西巻）知子
GEF11 による ABCA1 安定化機構
日本薬学会 128 年会 (2008,3)

奥平桂一郎、大岡伸通、崔 紅艶、澤田 純一、
最上（西巻）知子
ABCA1 相互作用タンパク質と RhoA による
HDL 形成制御機構
日本薬学会 129 年会 (2009,3)

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

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 機能生化学部
研究者 奥平 桂一郎

抗動脈硬化作用を持つHDLは、膜トランスポーターABCA1によって産生される。ABCA1の発現を制御する相互作用タンパク質 GEF11 とそのエフェクターである Rho ファミリーG タンパク質 RhoA の機能について検討した。

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まだ存在しない。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ポーター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、相互作用タンパク質の探索において、新たに同定された ABCA1 相互作用タンパク質グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF11) と、そのエフェクターである Rho ファミリーG タンパク質 RhoA の ABCA1 活性制御メカニズムについて検討した。

B. 研究方法

ABCA1 を発現する細胞株として、ホルボールエステル(PMA)により分化させたヒトマクロファージ様細胞株 THP-1、及びヒト初代培養繊維芽細胞を用いた。mRNA は extraction kit (Qiagen)で細胞より抽出し、定量 RT-PCR で測定した。18S rRNA を内部標準として、ABCA1 の mRNA 量を評価した。siRNA は siGENOME

ON-TARGETplus SMART pool duplex (Dharmacon)を使用した。siRNA の繊維芽細胞へのトランスフェクションは nucleofector (Amaxa) を用いて、導入方法は Amaxa 社のプロトコル通りに行った。ABCA1 タンパク質の apoA-I による安定化の実験では、siRNA を導入した細胞に apoA-I を一時間作用させて、ABCA1 タンパク質量を評価した。

(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. RhoA による ABCA1 の活性制御機序の解析

昨年度までの結果で、GEF11、GEF12 が RhoA の活性化を通して、ABCA1 のタンパク質分解

を阻害し、発現を増強することを明らかにしていた。そこで本年度はまず、Endogenous な系で RhoA の ABCA1 に対する効果を評価した。PMA により分化させたヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 で、RhoA の阻害剤の付加により、ABCA1 の mRNA レベルが増加していた (図 1 A)。また、THP-1 及びヒト初代培養繊維芽細胞において、RhoA の siRNA による発現抑制によっても、ABCA1 の転写が上昇していた (図 1 B)。つまり、RhoA の活性化は ABCA1 タンパク質の分解を抑制し、発現を増強し、不活性化によって分解は促進されるが (昨年度結果より)、RhoA を不活性化することによって、ABCA1 の転写が促進され、結果的に、発現を増強することが示された。

2. apoA-I による RhoA 活性化

apoA-I を加えると HDL 形成が起こるが、極めて短い時間の apoA-I 刺激により、PMA により分化させたヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 で RhoA が活性化することが分かった (図 2 A)。apoA-I を細胞に付加すると、ABCA1 タンパク質の発現増強が観察され、この現象は GEF11 及び GEF12 の発現抑制によって抑えられた (図 2 B)。apoA-I は ABCA1 と直接結合することは以前に示しており、この結果は apoA-I と ABCA1 の結合から C 末端に結合する GEF11、GEF12 を介して RhoA を活性化し、ABCA1 のタンパク質分解を阻害する細胞内機構の存在を示唆している (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。ABCA1 タンパク質の turnover は極めて短時間で起こることが知られており、相互作用タンパク質によるタンパク質レベルでの活性制御システムが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。以前に我々は、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)。本研究課題一年目 (前年度) 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 (平成 18 年度)。また、GEF11、GEF12 の機能について、GEF が ABCA1 の細胞内ドメインと結合して RhoA を活性化し、活性化した RhoA は ABCA1 タンパク質の分解を抑制して、HDL 形成を促進することを明らかにした (平成 19 年度)。そこで今年度は、GEF が ABCA1 の発現に及ぼす影響について、より詳細な検討を行った。

驚いたことに、THP-1 及び繊維芽細胞において、RhoA の活性化を、阻害剤または siRNA の導入により抑制することで、ABCA1 の転写が上昇し、mRNA の発現が増加していた。昨年度の研究結果により、RhoA の活性化は ABCA1 タンパク質の分解抑制による発現増強をもたらすことが証明されており、このことは、RhoA による ABCA1 発現制御が、遺伝子レベル、タンパク質レベルで、逆向きに行われていることを示している。

この複雑なメカニズムの生理的意味は現在のところ不明である。ABCA1 活性調節には、遺伝子レベル、タンパク質レベルにおける複数の複雑な制御システムが関与しており、このことは細胞内コレステロール恒常性維持の重要性を示しているといえる。タンパク質レベルでの発現制御は、遺伝子のレスポンスと比較して速く、本研究によって示唆された apoA-I 刺激からの GEF/RhoA 活性化による ABCA1 のタンパク質発現安定化作用も、HDL 形成における迅速な ABCA1 発現促進を助けるメカニズムである可能性が考えられる。apoA-I 刺激による RhoA の活性化は極めて速く (約 5 分) かつ一時的であることから、apoA-I が細胞表面の ABCA1 に結合することにより、局所的、かつ一時的に ABCA1 の発現が増強され、HDL 形成の、特に初期段階における反応を促進する効果があると推測される。

本研究課題は今年度で終了するが、今後は、引き続き ABCA1 の分解抑制メカニズムについての基礎的知見の蓄積を図り、さらに創薬を意識した ABCA1 分解阻害ペプチドの設計について検討する。具体的には以下の通りである。

1) GEF/RhoA シグナル経路の検討

GEF/RhoA 経路の活性化が、ABCA1 タンパク質の分解に抑制的に働くことを示したが、引き続きシグナル伝達の経路について検討する。RhoA のエフェクターとして Rho キナーゼ、コ

フィリンなど多くのシグナル伝達系因子、また PKC α などのリン酸化酵素が報告されている。これらの活性化について特異的リン酸化抗体を用いて評価する。現在、予試験的には PKC α / β 1の阻害剤により RhoA 依存的な ABCA1 タンパク質安定化作用が阻害されるという結果を得ている。RhoA と PKC α が直接相互作用しているという報告や、ABCA1 のリン酸化に PKC α が関与しているという報告もあり、ABCA1 分解阻害活性の関連について検討する。

2) MUPP-1 の機能解析

GEF と同様に MUPP-1 も ABCA1 の発現を増強し HDL 形成を促進することを示したが、そのメカニズムについて詳細に検討する。MUPP-1 は分子内に PDZ ドメインを 13 個持っており、 β 1-syntrophin や GEF に無い特徴的な配列を有している。これは、ABCA1 が機能する際に、ホモダイマーあるいは PDZ 結合モチーフを持つ他のタンパク質との複合体を形成する可能性を示唆している。そこで申請者が以前用いたプロテオミクス的手法により、MUPP-1 と相互作用するタンパク質を解析する。

3) ABCA1 の切断部位の決定

本研究課題を遂行する過程において、ABCA1 発現細胞の溶解液中に、ABCA1 タンパク質の分解産物と考えられる約 40kDa の低分子量タンパク質を確認している。この分解産物をカラムで大量精製し、シーケンサーで末端部位の配列を決定して切断サイトを同定する。さらに、特定した切断部位をアミノ酸置換した ABCA1 変異体を作成し、野生型と比較して ABCA1 の発現量及び半減期に変化が観察されるかを検討する。また、分解反応が実際に生理的条件下で起こっているかどうか、マウス肝臓で分解産物の存在を確認する。

4) 分解阻害ペプチドの設計

プロテアーゼが認識する配列をペプチドとして作成し、偽基質として細胞に導入することによって、ABCA1 の分解抑制を狙う。ABCA1 の切断サイト及びその前後と同じアミノ酸配列を持ち、かつ膜透過のための特異的配列 (11 個のアルギニン) を付加したペプチドを合成、さらにコントロールとしてスクランブルペプチドも合成する。ABCA1 発現細胞にペプチド

を付加し、ABCA1 タンパク質発現量、HDL 形成量について評価する。必要に応じて、ペプチド配列の最適化を行う。ペプチドに FLAG タグを付加して、In vitro でペプチドと細胞溶解液を反応させ、ペプチドの分解をウエスタンブロッティングにより観察し、効率的に分解される配列を決定する。狙い通り ABCA1 分解阻害効果が得られた場合、マウスへの投与を検討する。

E. 結論

ABCA1 相互作用タンパク質 GEF11 は RhoA の活性化を経て、ABCA1 タンパク質を安定化するが、RhoA は ABCA1 の転写制御にも関与しているという複雑な生理システムについて明らかにした。さらに、apoA-I 刺激は、ABCA1/GEF を介して RhoA を活性化し、ABCA1 の発現を増強することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tamehiro N, Zhou S, Okuhira K, Benita Y, Brown CE, Zhuang DZ, Latz E, Hornemann T, von Eckardstein A, Xavier RJ, Freeman MW, Fitzgerald ML.

SPTLC1 binds ABCA1 to negatively regulate trafficking and cholesterol efflux activity of the transporter.

Biochemistry, 2008; 47(23):6138-47

Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira K, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Ohno Y, Inoue K, Sawada J.

The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines.

Biochem Pharmacol, 2008; 76(8):1006-13

2. 学会発表

奥平桂一郎、大岡伸通、崔 紅艶、澤田 純一、最上 (西巻) 知子

ABCA1 相互作用タンパク質と RhoA による HDL 形成制御機構

日本薬学会 129 年会 (2009,3)