

201209013B

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

小胞体ストレス改善性低分子化合物による新規神経変性
疾患治療開発の基礎的研究

平成 23 年度～ 24 年度 総合研究報告書

研究代表者 大岡 伸通

平成 25 (2013) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

小胞体ストレス改善性低分子化合物による新規神経変性疾患治療開発の基礎的
研究 ----- 1

大岡 伸通

(資料1 ~ 資料49) 図1 ~ 図42

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 82

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 83

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

小胞体ストレス改善性低分子化合物による新規神経変性疾患治療開発の基礎的研究

研究代表者 大岡 伸通 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

神経変性疾患は中枢神経系の特定部位のニューロンが、主として中年期以降に進行性に障害・脱落していく疾患の総称であり、代表的なものとしてはアルツハイマー病、パーキンソン病、ALS（筋萎縮性側索硬化症）、脊髄小脳変性症、プリオン病などがあげられる。社会が高齢化し、神経変性疾患を抱える人の数は著しく増加しているが、神経変性疾患の根本的な治療法は未だ見いだされておらず、新規作用機序による治療薬の開発が必要不可欠である。

これまでの国内外の基礎研究の結果から、ほとんど全ての神経変性疾患の発症過程で小胞体ストレスの関与が明らかになってきている。多くの神経変性疾患で原因となる異常タンパク質の蓄積は小胞体のもつ機能を様々な面から障害し、結果として小胞体ストレスを負荷することで、これによる細胞死を起因としたニューロンの脱落を惹起すると考えられている。細胞は恒常性を維持するために、小胞体ストレスに対応するシステムを有しているが、異常タンパク質の蓄積がこのシステムの処理能力を超えるとアポトーシスを起こすことがわかっている。私はこれまでの研究において、機能がよくわかっていなかったタンパクTRB3が、小胞体ストレス時に細胞の生存を促す転写因子ATF4の強力なネガティブレギュレーターとして機能することを発見した。また、TRB3はATF4に結合することでその活性を阻害し、小胞体ストレス依存性の細胞死を誘導することを明らかにしてきた。今後の研究ではこのTRB3の作用メカニズムに着目し、新しい神経変性疾患治療薬の開発を目指す。本研究はその第一段階として、TRB3とATF4間の結合を阻害することができる低分子化合物を発見し、その化合物に小胞体ストレスによる神経細胞死の抑制効果が認められるかどうかを検証することで、新規神経変性疾患治療薬開発に向けたリード化合物の基盤を創りあげることが目的としている。TRB3とATF4の結合を阻害できる化合物は、小胞体ストレスによる細胞死を抑制し、神経変性疾患への治療効果が期待できる。

A. 研究目的

これまでの基礎研究から、ほとんど全ての神経変性疾患の発症過程で小胞体ストレスの関与が明らかになってきている（Cell Death Differ., 13: 385-392, 2006）。一方、現在国内外において神経変性疾患の根本的な治療法は未だ見いだされておらず、新規作用機序による治療薬の開発が必要不可欠である。本研究はこれまでの申請者の研究をもとに考案された、新規神経変性疾患治療薬に有用な候補化合物を発見することを目的としている。

小胞体ストレスが生じたときに細胞は、小胞体恒常性維持のためのシステムにより異

常を回復しようとするが、異常がその処理能力を超えると死に至る。即ち、この恒常性維持作用を高めることが神経細胞死を抑制し、強いては神経変性疾患の予防や治療につながると思われる。転写因子ATF4は小胞体ストレス応答で発現が上昇し、様々な抗小胞体ストレスに関わる遺伝子群の発現を誘導することで小胞体の機能を改善し、細胞の生存を高めている。申請者のこれまでの研究で、TRB3がATF4に結合し、その活性を強力に阻害することで小胞体ストレス依存性の細胞死を誘導していることが明らかになった（EMBO J., 24: 1243-55, 2005; J Biol Chem., 282: 35687-94, 2007）。これに基づき

本研究では、TRB3とATF4の結合を阻害できる低分子化合物のスクリーニングを行い、そして活性が見られた化合物に対して、小胞体ストレスによる神経細胞死の抑制効果が認められるかを検証する。将来的な目的は、本研究で見つけた化合物をもとに、実際に臨床で使用することができる医薬品化合物の開発へと研究を進めることである。本研究は小胞体の機能を改善するATF4の活性制御に着眼した点、また、その分子メカニズムを基盤にスクリーニングを行う点を特色としている。これまでに小胞体ストレスを改善させる化合物は、ケミカルシャペロンと称される、小胞体シャペロンやフォールディング酵素の活性を上昇させる化合物群や、ATF4の上流で機能するeIF2 α キナーゼに作用するSalubrinalなどが発見されているが、本探索化合物とは作用機序が異なるためこれらとは区別できる。これまでに類を見ないATF4の活性制御を直接標的とした化合物を見つけ出すことが本研究の独創的な点である。

本研究において探索する化合物は、小胞体ストレスの改善を標的とするため、神経変性疾患全般に対しての治療効果が期待される。また同様に、糖尿病など他の小胞体ストレス関連疾患の治療に対しても有効であると考えられる。小胞体ストレス応答システムのコンポーネントは互いに複雑に絡み合っているため、一般に小胞体ストレス改善性化合物が大きな臨床効果を発揮するには複数のポイントに作用しうることが必要になると考えられる。このため、既に開発が進んでいるケミカルシャペロン等と作用機序の異なる本探索化合物に予想される活性が見られれば、その成果は臨床的にも、学術的にも評価されることが期待できる。

本研究は神経変性疾患の治療薬開発の基礎的研究として、厚生労働行政の難治療疾患対策に直接関連する。本研究が完成すれば、社会の高齢化に伴い深刻に増加しているアルツハイマー認知症の治療や進行の抑制にも貢献することが期待され、患者の生活の向上及び介護者の負担の減少の面から、社会的にもメリットがある。

上述した様に、本探索化合物は小胞体ストレス改善性化合物であることから、様々な小

胞体ストレス関連疾患に対して治療もしくは予防効果が期待でき、医薬品開発にかかる経済的なコストはそれぞれ個々の疾患に対して開発する場合と比べて、大幅に削減することができる。

B. 研究方法

本研究では、レポーターアッセイ系及び時間分解蛍光共鳴エネルギー転移 (TR-FRET) 系の2種類のスクリーニング系により、TRB3とATF4の結合を阻害し、ATF4の活性を増強する化合物の探索を試みた。

ATF4標的遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポーター遺伝子、もしくはGAL4システムを利用したレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼ・アッセイにより、ATF4の転写活性を簡便に測定することができる。さらにこの培養細胞系において、レポーター遺伝子に加え、ATF4（もしくはGAL4融合型ATF4）とTRB3を異所性に共発現させることで、TRB3によるATF4転写活性の抑制の程度を測定することが可能である（資料1, 図1参照）。レポーターアッセイスクリーニング系では、既に構築された上記細胞培養アッセイ系により、TRB3によるATF4の転写活性の抑制を阻害する活性のある低分子化合物をスクリーニングする。

TR-FRET系はテルビウムキレート標識分子を340nmの励起光で励起させたときに、近くに存在するフルオレセイン標識分子に対して起こるエネルギー転移を利用した*in vitro*のアッセイ系である。スクリーニング系の具体的な方法としては、MycタグTRB3とFlagタグATF4のリコンビナントタンパク質を*in vitro*で混合し、それぞれテルビウム標識した抗Myc抗体、フルオレセイン標識した抗Flag抗体で認識させることで生じるTR-FRETを阻害することができる低分子化合物のスクリーニングを行う（資料1, 図2参照）。スクリーニングに必要なMyc-TRB3及びFlag-ATF4の全長リコンビナントタンパク質の精製を行い、精製が困難な場合は、それぞれ両タンパク質の結合部位を含んだフラグメントタンパク質で代用する。これらのタンパク質を用いて、TR-FRET法によるスクリーニングを低分子化合物ライブラリー

に対して行い、両タンパク質の結合を阻害する化合物を見つける。

TR-FRET系は目的の分子メカニズムで作用する化合物を見つけ出すといった性質を考えると、ハズレの化合物を拾う可能性が低い最適な方法であると考えられるが、*in vitro*のアッセイ系なので化合物の細胞膜や核膜の透過性、細胞内での安定性、細胞毒性を考慮していない点には問題がある。

またレポーターアッセイ系では、目的のメカニズムに沿わない、いわゆる本質的にはネガティブな化合物が数多くヒットする可能性が高いが、化合物の膜透過性、細胞内での安定性、毒性を同時に評価できることは利点である。また、選別の仕方によっては、予定の分子メカニズムとは異なるが、最終的なアウトプットが同じであるという観点から、当研究目的に合致した予想外の化合物を得ることができる可能性がある点は魅力的である。

TR-FRETスクリーニング系でヒットした化合物については、レポーターアッセイ系で、細胞内でもTRB3によるATF4転写活性の抑制を阻害するか確認する。

活性が見られた化合物が、実際に細胞内でATF4とTRB3の結合を阻害することでATF4の転写活性を阻害しているか、免疫沈降法により調べる。具体的には、培養細胞に化合物を添加することで、ATF4とTRB3の結合が減少するか検証する。

選別された化合物をSH-SY5Yなどの神経細胞株に添加することで、ATF4ターゲット遺伝子の発現上昇作用が見られるか、定量性RT-PCRやウエスタンブロットにより検討する。また、同様にこれらの化合物を神経細胞株に添加することで、小胞体ストレスによる細胞死を抑制することができるか検証する。

リコンビナントタンパク質の精製

pGEX-6P-1-Flag-ATF4, pGEX-6P-1-Myc-TRB3, pGEX-6P-1-Flag-ATF4 N98, pET-Myc-TRB3 プラスミドをそれぞれBL21 (DE3) もしくはSoluBL21コンピテントセルに導入し、37°C, over nightで培養した。適量を新しい培地に移し、30°Cで3時間培養後、

30°C, 4時間, IPTG (終濃度 0.2mM)もしくは20°C, 16時間, IPTG (終濃度 0.1mM)でGST融合型タンパク質もしくはHisタグタンパク質の発現誘導を行った。大腸菌は可溶性バッファー (1M Tris-HCl (pH7.5), 0.5M EDTA, 0.5% Triton X-100) もしくは変性可溶性バッファー (0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris, 8M Urea (pH8.0)) にて再懸濁後、sonicationにより溶解し、Glutathione Sepharose 4B担体にてGST融合タンパク質を、Ni-NTA agarose担体にてHisタグタンパク質を精製した。GSTタンパク質の本精製においては、精製後、Glutathione Sepharose 4B担体にPreScission proteaseを加えることで、GSTタンパク質を切除した。切除されたGSTタンパク質やGST融合タンパク質であるPreScission proteaseは新たなGlutathione Sepharose 4B担体にて回収除去した。Hisタグタンパク質の本精製においては、溶出バッファー (0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris, 8M Urea (pH6.3), 0.25M イミダゾール) にて溶出を行った後、透析を行った。回収した各画分タンパク質はサンプルバッファーにて変性後、SDS-PAGE (5-20% gradient gel) により分離し、CBB染色を行った。

免疫沈降、ウエスタンブロット

293T細胞を6.0x10⁵ cells/wellで6 well plateにまき、24時間後、Lipofectamine 2000 Reagent (ライフテクノロジージャパン) により、各種発現ベクターもしくは空ベクターをトランスフェクションした。40時間後、細胞を洗浄、溶解し、anti-FLAG M2-agarose affinity gel (シグマ) にて免疫沈降を行った。サンプルバッファーにて変性後、SDS-PAGE (12.5% gel) でタンパク質を分離し、PVDF膜にトランスファー後、anti-FLAG M2抗体 (シグマ) もしくはanti-Myc抗体 (ロシュ) にてウエスタンブロットを行った。

HeLa細胞を4.0x10⁵ cells/wellで6 well plateにまき、24時間後、Lipofectamine 2000 Reagent (ライフテクノロジージャパン) により、各種発現ベクターもしくは空ベクターをトランスフェクションした。24時間後、

DMSOもしくは終濃度20 μ Mとなる様に各種化合物で処理した。さらに16時間後、細胞を洗浄、溶解し、終濃度200 μ Mとなる様に各種化合物を添加後、anti-FLAG M2-agarose affinity gel (シグマ) にて免疫沈降を行った。サンプルバッファーにて変性後、SDS-PAGE (12.5% gel) でタンパク質を分離し、PVDF膜にトランスファー後、anti-FLAG M2抗体 (シグマ) もしくはanti-Myc抗体 (ロシュ) にてウエスタンブロットを行った。

ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ

HeLa細胞を0.5x10⁵ cells/wellで48 well plateにまき、24時間後、Lipofectamine 2000 Reagent (ライフテクノロジー・ジャパン) により、ルシフェラーゼ・レポーター・プラスミド (pGL3-TRB3-Luc もしくは p(UAS)₅-Luc)、ウミシイタケ・コントロール・レポーター・プラスミド (phRL-SV40)、発現ベクター (pCMV-Flag-ATF4、pCMV-GAL4-ATF4、pCMV-Myc-TRB3)、空ベクターをトランスフェクションした。24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、細胞をPBSで洗い、Dual-Luciferase Reporter Assay System (プロメガ) により、ルシフェラーゼ・アッセイを行った。トランスフェクション、ルシフェラーゼ・アッセイ共にデュプリケートで行い、平均値をグラフ化した。

RNAi干渉

HeLa細胞にTRB3 siRNA (#1 target RNA: CGAGCUCGAAGUGGGCCCC, #2 target RNA: AUGAGGCUAGUUCUUGU CUA, #3 target RNA: GGAAGAAGCGG UUGGAGUU) 及びコントロールsiRNA (キアゲン) をLipofectamine RNAi MAX Reagent (ライフテクノロジー・ジャパン) を用いてリバース・トランスフェクション法によりトランスフェクションした。48時間後、thapsigarginを6時間処理し、細胞を回収後、anti-TRB3抗体 (アブカム) を用いてウエスタンブロットを行った。

HeLa細胞にTRB3 siRNA (#2) 及びコン

トロールsiRNA (キアゲン) をLipofectamine RNAi MAX Reagent (ライフテクノロジー・ジャパン) を用いてリバース・トランスフェクション法によりトランスフェクションした。24時間後、上記と同様に、Lipofectamine 2000 Reagentによりルシフェラーゼ・レポーター・プラスミド等をトランスフェクションし、ルシフェラーゼ・アッセイを行った。

WSTアッセイ

SH-SY5Y細胞を1.0x10⁴ cells/wellで96 well plateにまき、24時間後、DMSO, thapsigargin (400nM) のみ、もしくはthapsigargin (400nM) と各種化合物 (0.6 μ M ~ 20 μ M) で処理した。48時間後、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いてWST-8アッセイを行った。アッセイはトリプリケートで行い、平均値及び標準偏差をグラフ化した。

(倫理面への配慮) 本研究は直接的な研究対象者が存在しないため、倫理面に問題はない。

C. 研究結果

TR-FRETスクリーニング系の構築

スクリーニングに必要なリコンビナントタンパク質を精製するために、Myc-TRB3もしくはFlag-ATF4のコーディング領域をGST融合型タンパク質精製用プラスミドpGEX-6P-1に組み込んだ。それぞれ精製したプラスミドをプロテアーゼ欠損大腸菌株のBL21に導入した後、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) 添加によるGlutathione S-transferase (GST) 融合型タンパク質の誘導発現を行った。目的のリコンビナントタンパク質が十分な量及び純度で精製可能であるか、大腸菌溶解後に可溶性画分、不溶性画分、Glutathione Sepharose 4B担体により精製した画分をSDS-PAGE後、クーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色により確認した。(本精製においては、精製過程において特異的なプロテアーゼによるGSTの切除を行う。) その結果、Myc-TRB3の全長タンパク質はほとんど不溶性画分に存在し、可溶性画分には一部しか溶出しなかった (資料2, 図3参照)。Flag-ATF4に関して

は多くが可溶性画分に存在していたが、GST-pull downによる精製画分には、十分量存在していなかった。

そこで、この打開策として両者の結合領域の同定を行い、結合部位付近を含んだフラグメントリコンビナントタンパク質で代用することとした。まず、Flagタグした様々なATF4の欠失変異体（N末端90アミノ酸欠失変異体： Δ N90、C末端140アミノ酸欠失変異体：N175、N末175アミノ酸欠失変異体：C176）を発現させるプラスミドを作製し、これらを各々Myc-TRB3発現プラスミドと293T培養細胞に共発現させ、免疫沈降法によりATF4内のTRB3結合領域を調べた。その結果、ATF4 Δ N90及びC176ではTRB3との結合が見られず、N175及び野生型では結合が見られたことから、ATF4のN末端90アミノ酸がTRB3との結合領域であることがわかった（資料3, 図4; 資料4, 図6参照）。次に、ATF4のN末端90アミノ酸付近のみでTRB3と結合可能であるか調べるために、N末端98アミノ酸のみのFlag-ATF4 N98とMyc-TRB3の結合を同様に調べたところ、これらの結合が確認されたことから、TRB3との結合にはATF4のN末端98アミノ酸のみで十分であることがわかった（資料3, 図5; 資料4, 図6参照）。そこで、N末端98アミノ酸のみのATF4フラグメントリコンビナントタンパク質が十分量精製できるか、このアミノ酸のコード領域をpGEX-6P-1プラスミドへと領域を導入し、BL21でのタンパク誘導及び精製の確認を行った（資料5, 図7参照）。図に示すように、ATF4のN末端98アミノ酸とGSTの融合タンパク質は十分な量及び純度で精製可能であることが確認できた。

同様の実験をTRB3についても行った。Mycタグした様々なTRB3の欠失変異体（N末端127アミノ酸欠失変異体： Δ N127、C末端76アミノ酸欠失変異体： Δ C76、C末端179アミノ酸欠失変異体：N179、N末179アミノ酸欠失変異体：C179、C末端233アミノ酸欠失変異体：N125、N末116及びC末端111アミノ酸欠失変異体：117-247、N末239アミノ酸欠失変異体：C119）を発現させるプラスミドを作製し、これらを各々Flag-ATF4発現プラスミドと293T培養細胞に共発現させ、免疫沈降法

によりTRB3内のATF4結合領域を調べた（資料6, 図8; 資料4, 図6参照）。その結果、全ての欠失変異体で野生型TRB3に比べてATF4との結合が減弱するものの、両者の結合が確認された。この結果から、TRB3に関してはフラグメントタンパク質による代用も適切でないと考えられた。

通常の条件では、Myc-TRB3全長タンパク質はほとんど可溶化しないことから、大腸菌におけるタンパク質誘導の条件検討を行った。最初に、IPTG誘導型ベクターを組み込む大腸菌株をBL21 (DE3) から、SoluBL21へと変更することを試みた。SoluBL21コンピテントセルはBL21 (DE3)の変異株で、多くの不溶性タンパク質として発現していたタンパク質を可溶性タンパク質として発現することが可能な大腸菌株として市販されている。SoluBL21にGST融合型Myc-TRB3タンパク質精製用プラスミドであるpGEX-6P-1-Myc-TRB3を導入した後、リコンビナントタンパク質の精製・確認を行ったところ、残念ながらBL21 (DE3)を使用したときと比べてほとんど改善しなかった（図省略）。

次に、IPTG誘導型ベクターを組み込んだ大腸菌の培養条件を検討した。これまでに行っていたIPTGによるタンパク質誘導発現時の培養条件である30°C, 4時間, IPTG (終濃度 0.2mM) から20°C, 16時間, IPTG (終濃度 0.1mM)へと変更した。BL21にpGEX-6P-1-Myc-TRB3を導入した後、IPTG添加によるGST融合型タンパク質の発現誘導を行い、BL21溶解後、リコンビナントタンパク質の精製を行った。目的のリコンビナントタンパク質が十分な量及び純度で精製可能であるか、大腸菌溶解後に可溶性画分、不溶性画分、Glutathione Sepharose 4B担体により精製した画分をSDS-PAGE後、クーマシーブリアントブルー(CBB)染色により確認した（資料7, 図9）。その結果、これまでの培養条件ではMyc-TRB3タンパク質がGST-pull downによる精製画分には、ほとんど全く存在していなかったのが、培養条件を上記の様に変更することにより、ある程度存在するように改善された。

そこで、この条件での本精製を行った。上記の様に変更した培養条件で大腸菌を培養後、溶解し、GST-Myc-TRB3リコンビナントタンパク質の精製を行った。また、本精製においては、最終的な精製過程において特異的なプロテアーゼ (PreScission protease) によるGSTの切除を行い、Myc-TRB3のみの回収を試みた。切断後のGST及びGST融合型プロテアーゼであるPreScission proteaseは新たなGlutathione Sepharose 4B担体の添加洗浄により除去された。大腸菌溶解後の可溶性画分、Glutathione Sepharose 4B担体による濃縮・PreScission proteaseによるGST切除後の上清画分、Glutathione Sepharose 4B担体添加によるGSTの洗浄除去 (2回) した後の沈殿画分と、その上清となる最終的な溶出画分をそれぞれSDS-PAGE後、CBB染色により確認した (資料7, 図10)。その結果、PreScission proteaseにより切断されたMyc-TRB3タンパク質と思われるバンド (赤矢印) はGlutathione Sepharose 4B担体画分へと移行してしまい、最終的な溶出画分にはほとんど存在していなかった。Myc-TRB3タンパク質が直接的か間接的にGlutathione Sepharose 4B/GST融合タンパク質複合体に結合してしまった可能性が考えられる。

Myc-TRB3全長タンパク質の変性条件下での精製を検討した。変性条件下においてはGSTタンパク質を利用したpull downが行えないと考えられるので、Myc-TRB3のコーディング領域をHisタグタンパク質精製用プラスミドpET-28aに組み込み、尿素を含んだ変性条件下での大腸菌溶解、Ni-NTA精製を行ったところ、可溶性画分及び精製画分に十分な量存在することが確認できた (資料8, 図11参照)。そこで、この方法での本精製を行った。BL21にHisタグMyc-TRB3タンパク質精製用プラスミドであるpET-28a-Myc-TRB3を導入した後、IPTG添加によるタンパク質の発現誘導を行い、尿素を含んだ変性条件下での大腸菌溶解し、リコンビナントタンパク質の精製を行った。その後、精製したタンパク質が含まれている変性可溶化バッファーをマイルドなバッファーに交換するために

透析を行った。その結果、透析を行うことにより、白色の沈殿物が析出してしまった。この沈殿物がTRB3タンパク質なのか、溶液中にTRB3タンパク質が幾分か残っていないか、それぞれの画分をSDS-PAGE後、CBB染色により確認した (資料9, 図12)。その結果、TRB3リコンビナントタンパク質は透析により析出してしまい、溶液中にはほとんど存在しないことがわかった。

レポーターアッセイスクリーニング系

TR-FRET法によるスクリーニング系の構築があまり順調に進んでいないことから、レポーターアッセイ法によるスクリーニングも並行して行った。まず予備検討として、トランスフェクションにおけるATF4とTRB3のプラスミドの量比を検討した。ATF4標的遺伝子プロモーターとして、TRB3プロモーター (TRB3はATF4によって発現誘導され、ネガティブフィードバック的にATF4の活性を阻害する) を含んだレポーター遺伝子を用いたアッセイにおいて、ATF4とTRB3のプラスミド量比を5 : 1.5から5 : 5にしたときにTRB3によるATF4の抑制活性が十分に見られた (資料10, 図13)。また、GAL4結合配列を含んだプロモーターをレポーター遺伝子として用いたときも同様に、GAL4-ATF4とTRB3のプラスミド量比を5 : 1.5から5 : 5にしたときにTRB3による抑制活性が十分に見られた (資料10, 図14)。また、どちらの系においてもTRB3の用量依存的なATF4の活性抑制が確認された。

上記の検討において十分なTRB3によるATF4活性の抑制効果が見られた条件のもとで、合計802種類の化合物ライブラリーに対してスクリーニングを行った。まずはATF4標的遺伝子としてTRB3プロモーターに対するレポーターアッセイにより、1次スクリーニングを行った (資料11, 図15から資料30, 図34)。そして、得られた結果から、それぞれの化合物によるTRB3活性の抑制度(%)を算出し (資料31から資料40)、抑制度が4.5%以上の化合物をピックアップした (グラフ赤枠: No.25, 26, 34, 42, 50, 73, 107, 118, 119, 127, 130, 131, 135, 151,

158, 182, 186, 198, 225, 238, 247, 268, 286, 293, 334, 354, 366, 371, 379, 384, 385, 422, 464, 473, 538, 553, 583, 599, 603, 630, 633, 638, 736, 738, 739, 742, 743, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 754, 759, 768, 777, 785, 799, 802, 以上61種)。このとき、一見抑制度が高く算出される化合物においても、各種実験操作におけるウェル間のばらつきを補正するために導入した別のレポーター遺伝子（ウミシイタケ・コントロール・レポーター遺伝子）の活性から考慮し、明らかに細胞毒性がある化合物については排除した（グラフ緑枠: No.31, 125, 183, 224, 228, 766）。

ATF4標的遺伝子プロモーターを用いた1次スクリーニング系では、内因性のATF4の発現を上昇させるなどして、意図するメカニズムとは異なる活性でプロモーター活性を上昇させている可能性が考えられる。そこで次に、ピックアップした61種類の化合物に対して、GAL4システムを利用したスクリーニングを行った。GAL4システムでは、酵母の転写因子GAL4のDNA結合ドメインとATF4との融合タンパク質（GAL4-ATF4）の活性をGAL4ターゲット配列に対するレポーター遺伝子で測定することにより、GAL4-ATF4の活性が特異的に測定されるので、内因性のATF4の発現や活性をほとんど排除できると考えられる。この系により、61種類の化合物をスクリーニングし、TRB3活性の抑制度(%)を算出した（資料41, 42, 図35, 36及び資料43）。この結果から、抑制度が50%以上の化合物をさらにピックアップした（No.25, 34, 50, 73, 118, 119, 151, 158, 186, 238, 247, 334, 583, 599, 603, 633, 777, 802, 以上18種）。

1次、2次スクリーニングに用いたアッセイ系の特性を考えると、選別された化合物が何らかのメカニズムでATF4の活性を制御している可能性が高いが、この作用がTRB3を介していない可能性も考えられる。そこで、これまでに選別された化合物からTRB3を介してATF4の活性を制御している化合物をさらに選別するために、TRB3の発現をノックダウンしたときには、ATF4の活性上昇を起こさない化合物が存在する

か調べることにした。まず、TRB3をノックダウンするためのsiRNAを3種類設計し、これらをHeLa細胞にトランスフェクションし、ウエスタンブロットによりノックダウン効率を調べた（資料44, 図37）。その結果、TRB3 siRNA (#2)をトランスフェクションしたときに、その他に比べ高効率でノックダウンできることがわかった。そこで、このsiRNA (#2)を用いてTRB3をノックダウンし、ATF4の転写活性に対する化合物の影響を検討した。具体的には、TRB3を発現させたときには（TRB3が過剰にある状態では）化合物によりATF4の活性が上昇するが、TRB3をノックダウンした時には（TRB3がほとんどない状態では）化合物によりATF4の活性が上昇しない化合物が存在するか調べた（資料45, 図38）。その結果、これまでに選別した18種類の化合物のうち、No.25, 50, 118, 186, 238, 247, 334, 603, 633の9種類がそのような活性を持つ化合物であることがわかった。

これまでの結果から、TRB3が存在するときのみATF4の活性を上昇させることができる化合物を9種類見つけ出した。そこで、これらの化合物の中に実際にATF4とTRB3の結合を阻害できる化合物が存在するか、免疫沈降法により調べた。HeLa細胞にスクリーニング系と同様の比率でFlag-ATF4とMyc-TRB3の発現プラスミドをトランスフェクションし、終濃度20 μ Mとなるようにそれぞれ9種類の化合物で16時間処理した。細胞を溶解後、さらに終濃度200 μ Mとなるように化合物で処理しながら、anti-FLAG抗体により免疫沈降を行い、ウエスタンブロットによりFlag-ATF4に結合したMyc-TRB3の量を検出した（資料46, 図39）。9種類ほとんどの化合物処理で免疫沈降物に存在するMyc-TRB3の量が減少する結果となったが、トランスフェクションしたFlag-ATF4とMyc-TRB3のタンパク発現量も大きく変動してしまった。そこで2分子の発現量を定量化し、発現量に対する結合量を算出した。この解析によると、化合物No.118, No.238, No.247, No.633で幾分か結合阻害が見られる結果となったが、2分子の発現量が大きく変動していること

から実験系を変えて、再度検討する必要がある。

最後に、選別された9種類の化合物が実際に小胞体ストレスによる神経細胞死を回復できるか検討した(資料47-49, 図40-42)。ヒト神経芽細胞腫細胞SH-SY5Yに小胞体ストレス誘導剤であるthapsigarginのみ、もしくは終濃度0.6~20 μ Mの選別化合物とthapsigarginを共処理し、48時間後、WST-8アッセイにより細胞の生存率を測定した。その結果、No.50, No.118, No.186, No.247, No.603, No.633では逆に用量依存的にthapsigarginによる細胞傷害性を高める結果となった。No.334に関しては用量依存的ではないが、細胞傷害性を高める結果となった。一方、No.25とNo.238では低用量において若干の回復が見られたが非常にわずかな効果であり、さらに高用量では毒性が見られた。

D. 考察

TR-FRETスクリーニング系の構築

本研究はTRB3によるATF4の転写活性の抑制を阻害できる低分子化合物を見つけ出すことを目的としており、このTRB3の活性にはATF4との結合が重要であると考えられることから、両者の結合を測定できるTR-FRET系に必要なリコンビナントタンパク質の精製を行った。全長タンパク質の精製において、Flag-ATF4に関しては多くが可溶性画分に存在していたにも関わらず、GST-pull downによる精製画分には、十分量存在していなかった。この解決策としてTRB3との結合領域を解析し、ATF4のN末端98アミノ酸のみがTRB3との結合に重要であることがわかり、さらにこの領域のGST融合リコンビナントタンパク質が十分な量及び純度で精製可能であることが確認できた。ATF4に関しては今後、GST融合Flag-ATF4 N98の本精製を行い、GST-pull down後に特異的なプロテアーゼによるGSTの切除を行うことで精製されるFlag-ATF4 N98を用いてスクリーニング系を構築する予定である。

一方、Myc-TRB3に関しては全長タンパク質の精製において、ほとんど可溶性画分には存在しておらず、GST-pull downにより濃縮

しても全く回収されなかった。TRB3におけるATF4との結合領域を解析したところ、全てのTRB3欠失変異体でATF4との結合が確認された。この結果のみを考えると、TRB3は複数の領域を介してATF4と結合していると想定され、TRB3に関してはフラグメントタンパク質による代用も適切でないと考えられた。しかし、この実験系ではTRB3の結合に特異性がなく、しっかり復元できていない可能性も考えられることから、実験系を再検討する必要もあるのかもしれない。

大腸菌におけるMyc-TRB3全長タンパク質の誘導条件の検討を行い、IPTGの濃度や培養温度を下げ、長時間でゆっくり発現誘導させることで、一部可溶化させることに成功した。しかし、本精製において、PreScission proteaseによりGSTタグを切断したMyc-TRB3タンパク質は、おそらくGSTタンパク質複合体に結合してしまい精製することができなかった。また、尿素を含んだ変性条件下ではMyc-TRB3全長タンパク質が十分量精製可能であったが、透析によりほとんど全て析出してしまいう結果となった。

本研究期間内にはMyc-TRB3タンパク質の精製がうまくいかず、TR-FRETスクリーニング系を構築することができなかったが、この点に関しては今後以下のような解決策が考えられる。まず、GST-Myc-TRB3タンパク質のGSTを切り離さず、GST融合タンパク質のまま精製すれば全長タンパク質が精製可能であるかもしれない。ただ、この方法で精製可能であっても可溶化されたタンパク質が十分量取れない可能性が高く、別の方法で精製する方が妥当であるかもしれない。リコンビナントタンパク質の発現を誘導する宿主としては、大腸菌以外にもバキュロウイルスやカイコを用いた系もあるので、これらを用いた誘導系へと移行する方が望ましいかもしれない。TR-FRETスクリーニング系は数週間で10万化合物以上スクリーニングすることが可能であり、さらに目的の分子メカニズムで働く化合物を選別するのに最適であることから、この系の構築は非常に重要な課題であるといえる。

レポーターアッセイスクリーニング系

TR-FRET法によるスクリーニング系の構築があまり順調に進んでいなかったことから、本年度は当初の研究計画に沿ったレポーターアッセイ法によるスクリーニングも並行して行った。今回のスクリーニングでは、予備検討のもと、TRB3を過剰発現することによりATF4の活性がほとんど完全に抑制される条件下で、化合物添加によるATF4活性の回復程度を測定した。この理由から、添加化合物濃度はやや高め $20\mu\text{M}$ と設定し、TRB3活性の抑制度が低めの4.5%以上の化合物からピックアップした。

GAL4-ATF4スクリーニング系においては、化合物を添加することにより非常に効果的にTRB3による抑制を緩和する化合物が多く見られた。GAL4-ATF4タンパクのDNA結合やダイマー形成はGAL4部位に依存しており、本来のATF4とは異なる高次構造や挙動を示すことが理由の1つかもしれない。またこの系においては、ATF4の活性を、TRB3を発現させていない状態以上に活性化させる化合物もいくつか存在したが、このような化合物はTRB3を介さずにATF4の活性を上昇させている可能性が高いのかもしれない。

ここまでのスクリーニング系では、TRB3の過剰発現によりほぼ完全に抑えられたATF4の活性を回復させることができる化合物を選別した。ただ、この作用が必ずしもTRB3を介していない可能性が考えられるため、TRB3ノックダウンによる選別を行った。即ち、TRB3が過剰に存在するときにはATF4活性上昇を起こすが、TRB3がほとんどないときには、ATF4の活性上昇を起こさない化合物はTRB3を介して作用していると考えた。TRB3ノックダウンのトランスフェクションと、ルシフェラーゼ・アッセイ用のトランスフェクションを組み合わせることから系が複雑になり、多少最初のスクリーニングと再現がない結果も見られたが、9種類の化合物でTRB3発現時にのみATF4を活性化できることがわかった。

そこで、これら9種類の化合物が実際にTRB3とATF4の結合を阻害しているのか、免疫沈降法により検討した。しかし、この結合実験においては、化合物処理によりFlag-ATF4とMyc-TRB3の発現が大きく変

動してしまい、明確な結果は得られなかった。トランスフェクションの効率に変化してしまったか、タンパク質に直接作用して発現量を変化させてしまった可能性などが考えられる。対処法としては細胞での化合物の処理時間を短くしたり、トランスフェクションではなく内在性のタンパク質の結合実験に置き換えたり、化合物を*in vitro*においてのみ添加したりすることなどが考えられる。今回はスクリーニング系に合わせて、16時間という長時間の化合物処理を行ったが、結合の阻害を見るだけならもっと短時間で十分であるかもしれない。また、*in vitro*での化合物添加だけでも結合を阻害することができるかもしれない。このような系で2分子の発現量が変化しない状態において再度検討する必要がある。

最後に、これら9種類の化合物が小胞体ストレスによる神経細胞死を回復することができるのかWSTアッセイより検討した。レポーターアッセイスクリーニングや結合実験においては、TRB3やATF4を過剰発現させているので化合物を $20\mu\text{M}$ という高い濃度で処理したが、thapsigarginで誘導したTRB3やATF4に対してはこのような高い濃度は必要ないであろうこと、高濃度では予期せぬ機構による細胞毒性が出る可能性があることを考え、終濃度を $0.6\sim 20\mu\text{M}$ で設定し用量依存的な効果を調べた。その結果、9種類の化合物全てにおいて、高濃度ではthapsigarginの細胞傷害性を高めてしまうことがわかった。一方、若干ではあるがNo.25とNo.238において $0.6\mu\text{M}$ 処理時に回復傾向が見られたことから、これらの化合物には小胞体ストレスを軽減する作用があるのかもしれない。

本研究から得られた新たな知見としては、ATF4におけるTRB3の結合領域が明らかになったことが挙げられる。ATF4が属するbZIPファミリーの転写因子群は、C末端に存在するロイシンジッパーで二量体を形成し、その近隣に存在する塩基性DNA結合領域で挟むようにDNAと結合し、フリーになったN末端で転写コアクチベーターをリクルートする。私の以前までの研究結果から、TRB3

は同じbZIP型転写因子であるCHOPとN末端を介して結合し、転写コアクチベーターであるp300のリクルートを阻害することがわかっている。また、同様にTRB3がATF4とp300の結合を阻害することも明らかにしている。この結果から考えると、TRB3はCHOPに対してと同様に、ATF4のN末端に存在する転写活性化ドメインを介して結合すると予想され、実際今回の結果から、TRB3はCHOPに対してと同様のメカニズムによりATF4の転写活性を抑制していると考えられた。

また、スクリーニング実験から得られた新たな知見としては、まだpreliminaryな結果ではあるが、総合的に判断すると、No.238がTRB3とATF4の結合を阻害し、小胞体ストレス改善作用を持つ化合物である可能性が示唆されたことが挙げられる。今後、結合実験の再検討及びSH-SY5Y細胞での小胞体ストレス誘導や化合物処理の条件検討を行うことにより、本当にこのような作用があるのか調べる必要がある。また、活性が確認されれば、化合物の最適化を行うことにより、高い小胞体ストレス改善活性を示す化合物を見つけ出すことができるかもしれない。現段階では選別した化合物は全て高濃度では毒性を示すため、小胞体ストレス改善性化合物として使用することは難しいと考えられるが、目的に合ったメカニズムに必要な化合物の構造を調べて最適化することで、副作用的な毒性をなくし、効果的な小胞体ストレス改善性作用を持つ化合物を創り出すことができることを期待している。

E. 結論

TR-FRETスクリーニング系の構築

TR-FRETスクリーニング系に必要なリコンビナントタンパク質の精製において、通常の前製条件ではTRB3及びATF4の全長タンパク質はどちらも十分量精製できなかった。

ATF4のN末端98アミノ酸のみがTRB3との結合に重要であり、この領域のリコンビナントタンパク質は通常の前製条件下で十分量精製可能であった。

TRB3は複数の領域を介してATF4と結合することから、本研究のスクリーニング系に

においてはフラグメントタンパク質により代用することは適切でないことがわかった。

TRB3の全長リコンビナントタンパク質は尿素を含んだ変性条件では十分量可溶性画分に存在することがわかった。

IPTGによるタンパク質誘導発現時の培養条件を20℃、16時間、IPTG (終濃度 0.1mM) にすることにより、Myc-TRB3全長リコンビナントタンパク質が可溶性画分にある程度存在するように改善された。

GST-Myc-TRB3リコンビナントタンパク質のGSTの切除後、Myc-TRB3はGST融合タンパク質複合体に結合してしまう可能性が考えられた。

TRB3の全長リコンビナントタンパク質は尿素を含んだ変性条件では十分量可溶性画分に存在していたが、透析によりほとんど全て析出してしまった。

レポーターアッセイスクリーニング系

ATF4標的遺伝子としてTRB3プロモーターを用いたレポーターアッセイにより、合計802種類の化合物ライブラリーに対して1次スクリーニングを行い、TRB3によるATF4の活性阻害を抑制することができる候補化合物を61種類ピックアップした。

GAL4システムを利用した2次スクリーニングを選別された61種類の化合物に対して行い、候補化合物を18種類ピックアップした。

TRB3をノックダウンした状態においてはATF4活性の作用がない化合物を調べることにより、候補化合物を9種類にまで絞り込んだ。

今回最終的に選別された9種類の化合物の化学構造的な共通点は見られなかった。

F. 健康危険情報

特に該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T. HNF4 α Increases Liver-Specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to

Apolipoprotein A-I in Response to Cholesterol Depletion.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012; 32(4):1005-14.

2. Okuhira K, Ohoka N, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Itoh Y, Ishikawa M, Hashimoto Y, Naito M.

Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein.

FEBS Lett. 2011; 585(8):1147-52.

2. 学会発表

1. 大岡 伸通, 林 秀敏, 内藤 幹彦, 佐藤 隆一郎

ヒト肝癌細胞株における TRB3 による SREBP-2 制御機構の解明

日本薬学会第132年会 2012年3月29日 (札幌)

2. 大岡 伸通, 林 秀敏, 内藤 幹彦, 佐藤 隆一郎

ヒト肝癌細胞株における TRB3 による SREBP-2 制御機構の解明

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日 (横浜)

3. 大岡 伸通, 林 秀敏, 内藤 幹彦, 佐藤 隆一郎

ヒト肝癌細胞株における TRB3 による SREBP-2 制御機構の解明

第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日 (名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に該当なし。

2. 実用新案登録

特に該当なし。

3. その他

特に該当なし。

資料1

図1

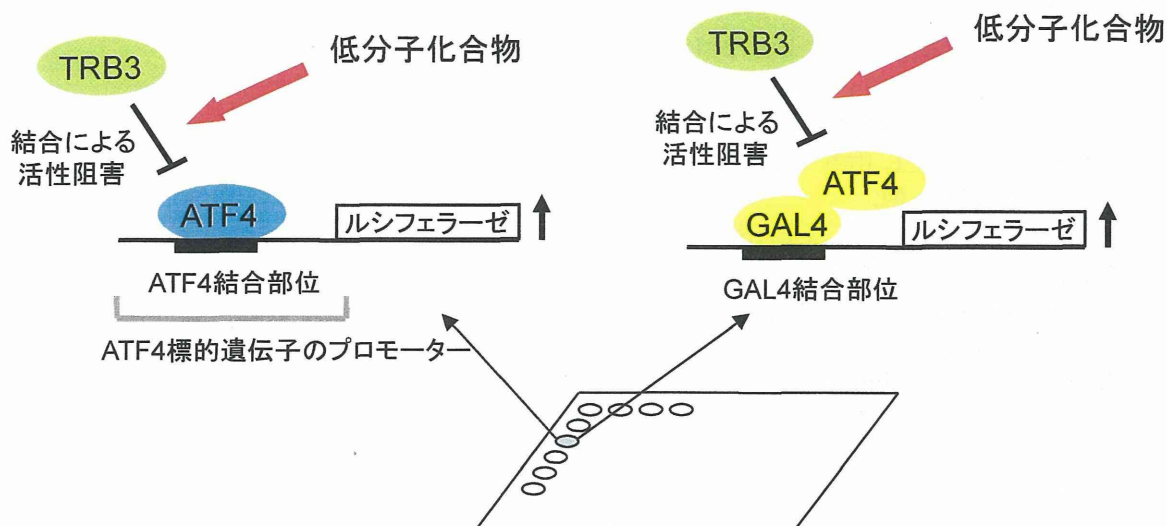


図1. ルシフェラーゼアッセイを用いた低分子化合物スクリーニング系 HeLa細胞などの培養細胞にATF4標的遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポーター遺伝子、もしくはGAL4システムを利用したレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼ・アッセイにより、ATF4の転写活性を測定する。このアッセイ系では、レポーター遺伝子に加え、ATF4(もしくはGAL4融合型ATF4)とTRB3を異所性に共発現させることで、TRB3によるATF4転写活性の抑制の程度を測定できる。この系により、TRB3によるATF4の転写活性の抑制を阻害することができる低分子化合物のスクリーニングを行う予定であった。

図2

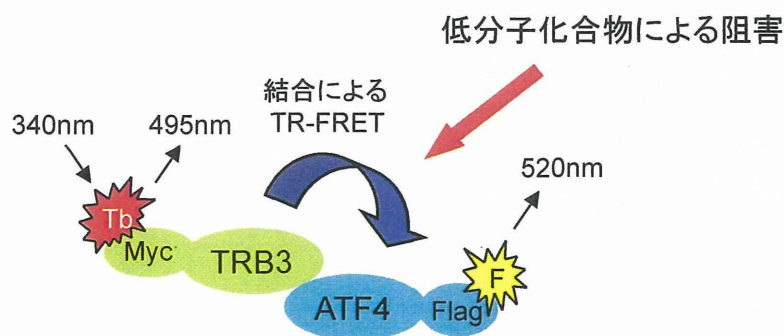


図2. TR-FRET(時間分解蛍光共鳴エネルギー転移)を利用した低分子化合物スクリーニング系 テルビウム(Tb)標識分子であるTRB3とフルオレセイン(F)標的分子であるATF4が結合するとエネルギー転移が生じ、アクセプター(ATF4)の蛍光が増加してドナー(TRB3)の蛍光は減少する。エネルギー転移の程度を測定することで、目的の低分子化合物をスクリーニングする。

図3

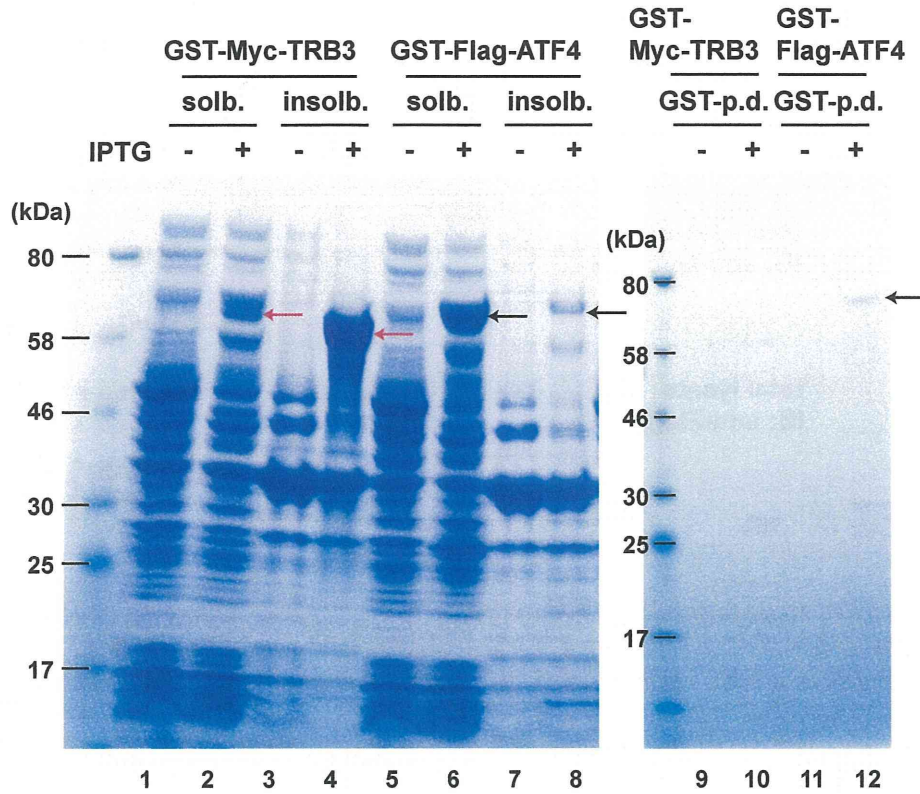


図3. 全長Myc-TRB3, Flag-ATF4リコンビナントタンパク質の精製
 pGEX-6P-Myc-TRB3もしくはpGEX-6P-Flag-ATF4をBL21に導入し、0.2mM IPTGを添加後、30℃で4時間培養しタンパク質の発現を誘導した。それぞれのBL21を可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はGlutathione Sepharose 4B担体により精製した (GST-pull down: GST-p.d.)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。(赤矢印: GST-Myc-TRB3, 黒矢印: GST-Flag-ATF4)

図4

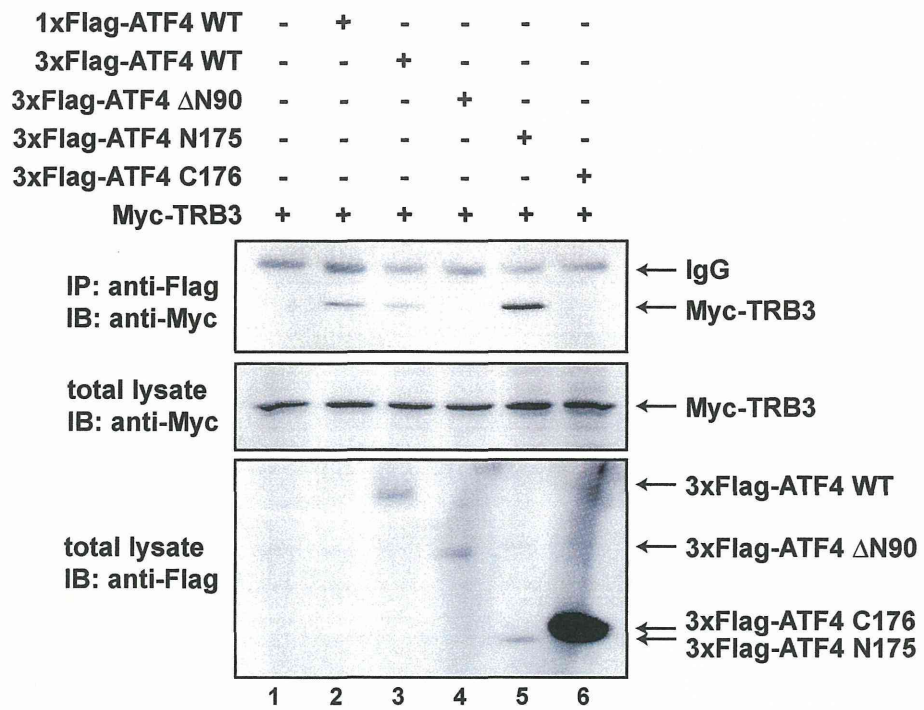


図4. 様々なATF4の欠失変異体とTRB3の結合を調べることで、ATF4内のTRB3結合領域を調べた。293T細胞に、図に示すようにFlag-ATF4野生型(WT: wild type), 欠失変異体, もしくはMyc-TRB3をトランスフェクション後、抗Flag抗体を用いて免疫沈降(IP: Immunoprecipitation)を行い、抗Myc抗体を用いたイムノプロット(IB: immunoblot)により解析した。1xFlag-ATF4は検出限界以下しか発現しなかったが、TRB3との結合は検出可能であった。ATF4の発現を確認するために(検出感度を上げるために)3xFlag-ATF4を用いた。

図5

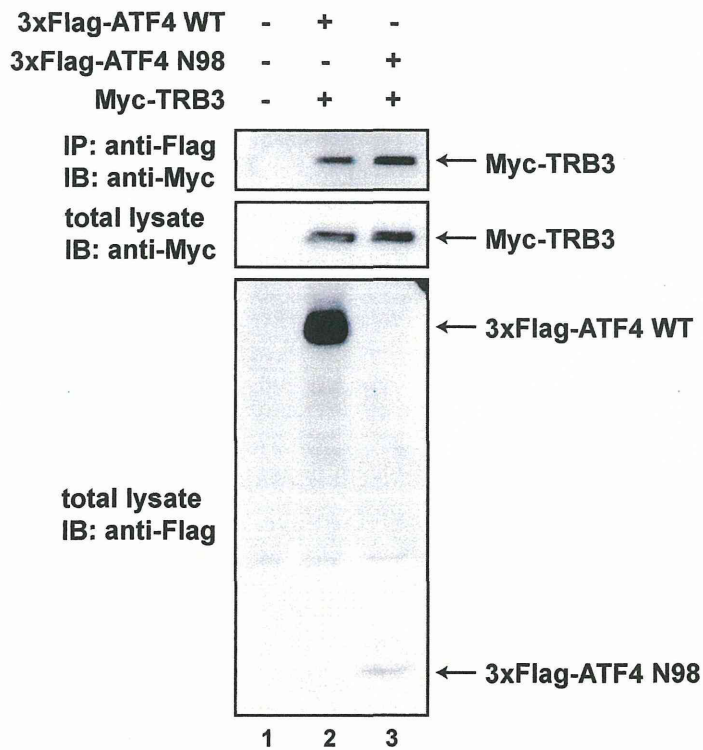


図5. ATF4のN末端98アミノ酸のみでTRB3と結合できるか調べた。293T細胞に、図に示すようにFlag-ATF4野生型(WT: wild type), N98, もしくはMyc-TRB3をトランスフェクション後、抗Flag抗体を用いて免疫沈降(IP: Immunoprecipitation)を行い、抗Myc抗体を用いたイムノプロット(IB: immunoblot)により解析した。

資料4

図6

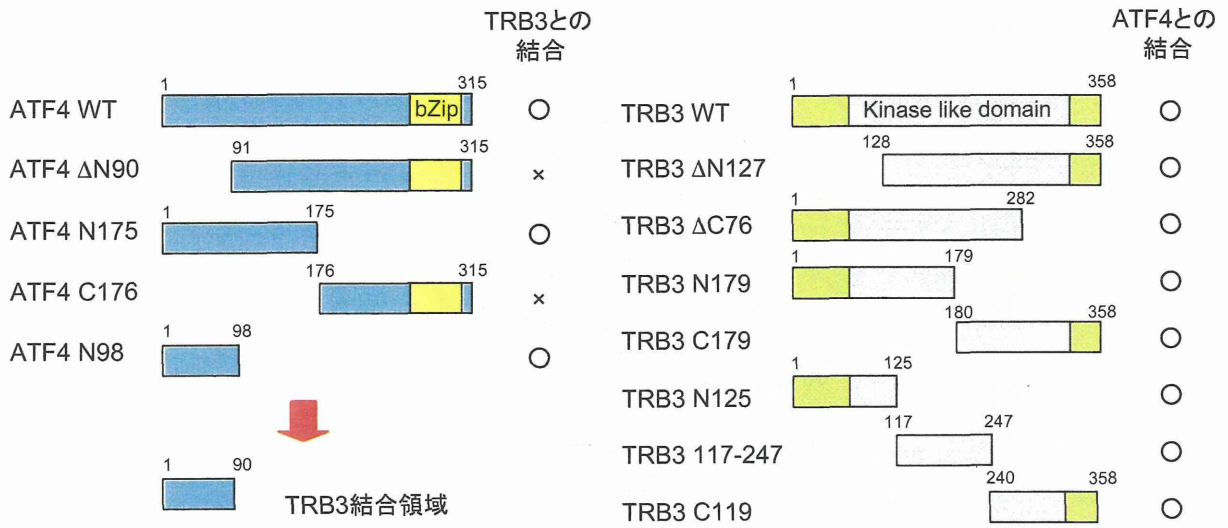


図6. 欠失変異体を利用したATF4とTRB3の結合領域の同定

図7

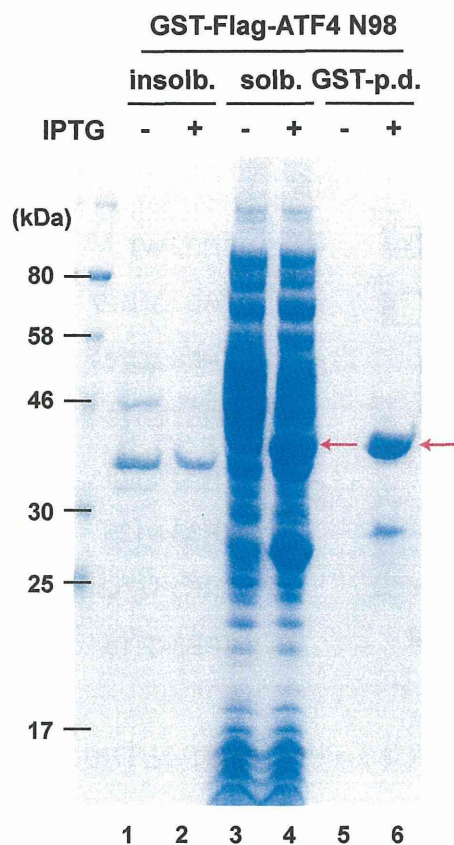


図7. Flag-ATF4 N98 リコンビナントタンパク質の精製

pGEX-6P-pGEX-6P-Flag-ATF4 N98をBL21に導入し、0.2mM IPTGを添加後、30℃で4時間培養しタンパク質の発現を誘導した。それぞれのBL21を可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はGlutathione Sepharose 4B担体により精製した (GST-pull down: GST-p.d.)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。(赤矢印: GST-Flag-ATF4 N98)

図8

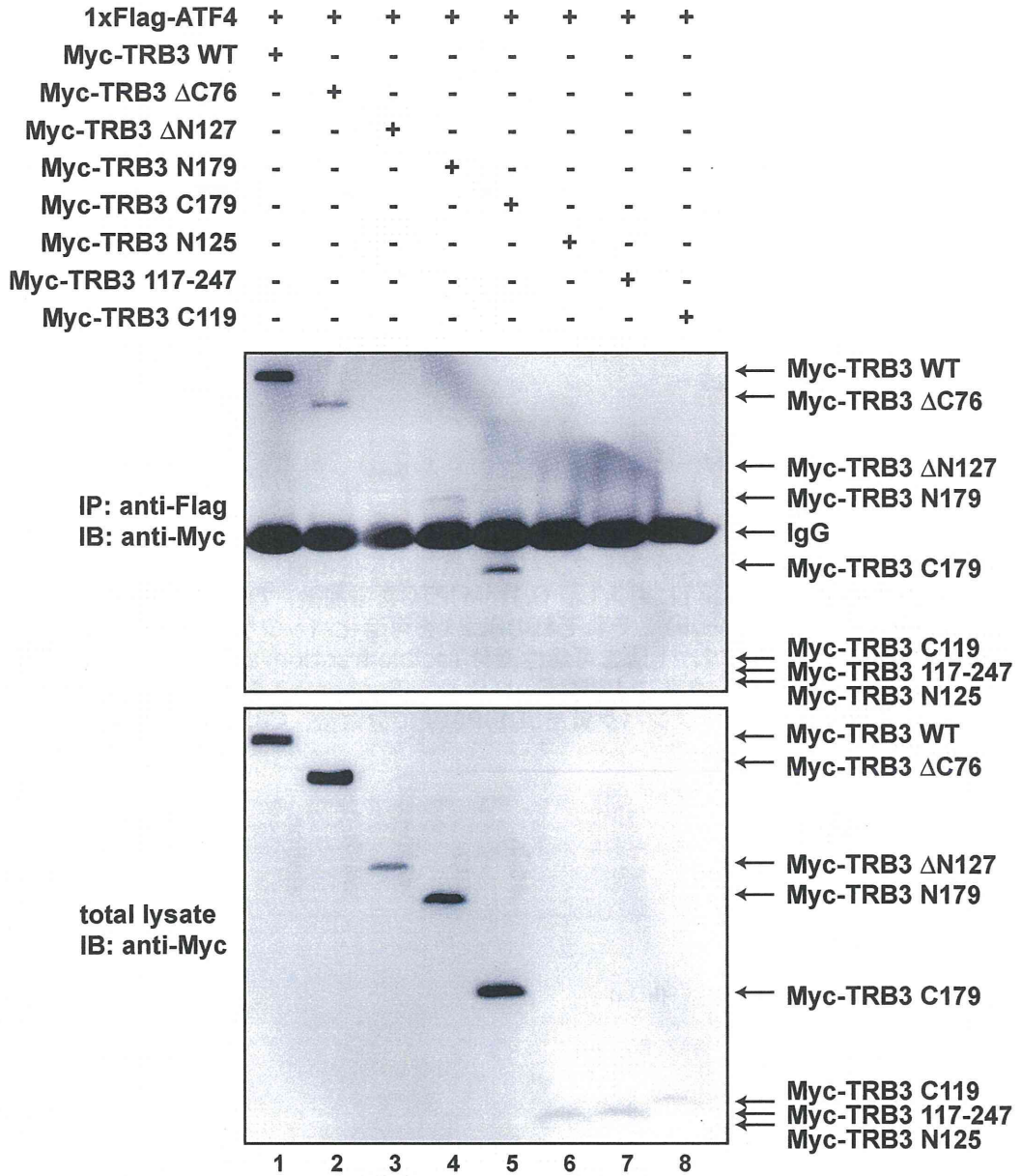


図8. 様々なTRB3の欠失変異体とATF4の結合を調べることで、TRB3内のATF4結合領域を調べた。293T細胞に、図に示すようにMyc-TRB3野生型(WT: wild type), 欠失変異体, もしくはFlag-ATF4をトランスフェクション後、抗Flag抗体を用いて免疫沈降(IP: Immunoprecipitation)を行い、抗Myc抗体を用いたイムノブロット(IB: immunoblot)により解析した。

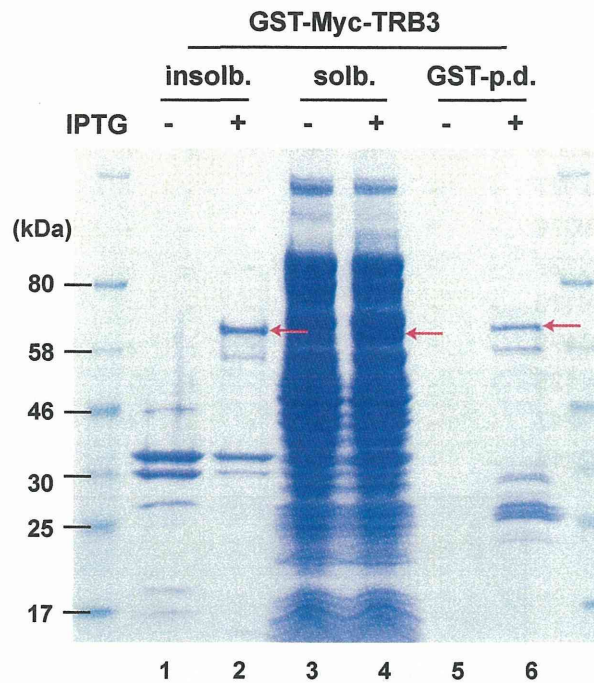


図9. Myc-TRB3全長リコンビナントタンパク質精製の条件検討
pGEX-6P-Myc-TRB3をBL21に導入し、0.1mM IPTGを添加後、20℃で16時間培養しタンパク質の発現を誘導した（小スケール）。それぞれのBL21を可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はGlutathione Sepharose 4B担体により精製した (GST-pull down: GST-p.d.)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。(赤矢印: GST-Myc-TRB3)

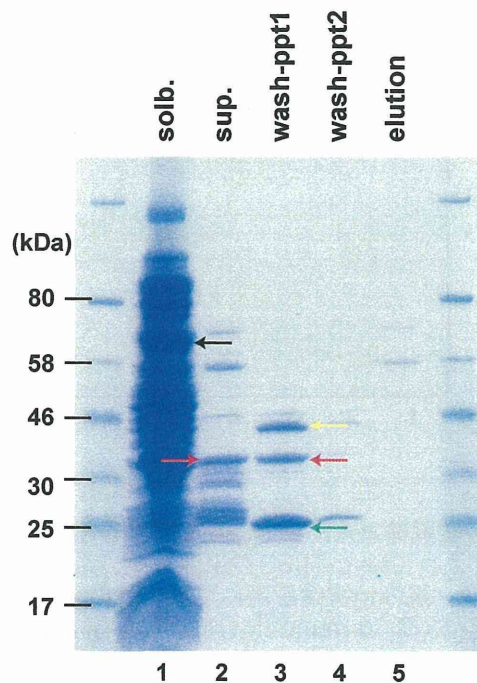


図10. Myc-TRB3全長リコンビナントタンパク質精製
pGEX-6P-Myc-TRB3をBL21に導入し、0.1mM IPTGを添加後、20℃で16時間培養しタンパク質の発現を誘導した（大スケール）。それぞれのBL21を可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分とした。さらに上清はGlutathione Sepharose 4B担体により精製した。その後、Glutathione Sepharose 4B担体にPreScission Proteaseを加えることにより、GST-Myc-TRB3からMyc-TRB3を切り出した。Myc-TRB3が切り出された上清画分 (supernatant: sup.) に新たなGlutathione Sepharose 4B担体を加えることで、GST融合型タンパクであるPreScission Proteaseを除去する過程を2回繰り返した (wash)。各2回のwashのGlutathione Sepharose 4B担体画分をそれぞれwash-ppt1, wash-ppt2画分とし、最終的に得られた上清をelution画分とした。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。(黒矢印: GST-Myc-TRB3, 赤矢印: Myc-TRB3, 黄矢印: PreScission Protease, 緑矢印: GST)