

修正版

201415026B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

# VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する 新規治療法開発に関する研究

平成25年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 池田 華子

平成27（2015）年 5月

## 目 次

I. 総合研究報告	
VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発に関する研究 .....	2
池田 華子	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	16
III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	17

## VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発

研究代表者 池田華子 京都大学医学部附属病院 准教授

### 研究要旨

細胞保護作用が明らかになったVCP ATPase阻害剤であるKUS剤を用い、難治眼疾患である網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に対して、第一相医師主導治験実施に向けての諸準備を実施した。薬効薬理試験として網膜中心動脈閉塞モデルでのKUS剤の効果を確認し、KUS剤のGMP製造に向けた合成法改良、GMP製造準備を行った。また、GLP毒性試験として、各種予備試験後、反復投与毒性試験、局所刺激試験、遺伝毒性試験を行った。疾患レジストリ構築目的で、網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に対する急性期紹介体制を整備し、前向き自然経過臨床研究のプロトコルを作成、臨床研究を開始した。今後、製剤化検討、原薬のGMP製造を実施、プロトコル作成後、医師主導治験実施予定である。

### 研究分担者

吉村 長久：京都大学大学院医学研究科 教授  
辻川 明孝：香川大学医学部 教授  
宮本 和明：京都大学大学院医学研究科 講師  
垣塚 彰：京都大学大学院生命科学研究科 教授  
清水 章：京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 教授  
池田 隆文：京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 講師  
三村 治：兵庫医科大学医学部 教授  
石川 裕人：兵庫医科大学医学部 講師

### A. 研究目的

虚血性視神経症は、50歳以上の年間発症率が2-10人/10万人とされる希少疾患であり (Am. J. Ophthalmol., 1997)、同様に眼虚

血症候群に分類される網膜中心動脈閉塞症は、さらに発症人数が少なく、ともに網膜神経節細胞を中心とした網膜内層の変性・脱落による不可逆的な極度の視力・視野障害

がおこる。両疾患ともに、詳細な発症機構は不明であり、確立した治療法が存在しないため、生活面での永続的な支障は大きい。

VCP(valosin-containing protein) (Kakizuka Aら*J.Biol. Chem.* 2010) は、細胞がストレス応答を引き起こす過程で重要な働きをする蛋白質である。京都大学ではVCPと呼ばれる細胞内の主要 ATPaseに対する阻害剤 (KUS : Kyoto University Substance化合物) の開発に成功し、細胞種を超えて*in vivo*での細胞死を防御する作用、網膜の細胞を細胞死から保護する作用を有し、緑内障や網膜変性モデルマウスへの投与実験にて、網膜神経節細胞、視細胞の変性抑制効果のみならず網膜電図での機能保持が認められることが明らかになってきた (Ikeda OHら、*Sci Rep* 2014)。したがって、この薬剤は緑内障や網膜色素変性のみならず、虚血性視神経症や中心動脈閉塞症など眼難治疾患に対しても、新たな治療薬となる可能性を検証する意義が生じてきた。

本研究では、希少眼難治疾患である虚血性視神経症および網膜中心動脈閉塞症に対し、京都大学で開発されたKUS剤を用い、医師主導治験を実施していく礎として、1) 両疾患に対する非臨床薬効薬理試験をおおまかに完了させること、2) KUS剤のGMP製造検討を行い、GMP製造体制を確立すること、3) 第I相医師主導治験に必要最低限のGLP毒性試験に着手・完了を目指すこと、4) さらに、被験者リクルートの観点から疾患レ

ジストリの構築を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) KUS剤の急性神経節障害モデルに対する非臨床薬効薬理試験

網膜神経節細胞が蛍光標識される thyl-CFPトランスジェニックマウスを用い、眼内 (硝子体内) に *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)を注射することで、急性網膜神経節細胞障害モデル (Nakano N, Ikeda OHら *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8754-8762, 2011) を使用し以下の実験を行った。即ち、KUS121の全身 (50mg/kg/day) 投与、ならびに、硝子体内注射 (5 $\mu$ g単回) 投与を行い、同時蛍光眼底撮影の可能な光干渉断層計 (Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT); *Multiline OCT* (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany)) を用いて、網膜断層のSD-OCT画像およびCFP蛍光眼底撮影を行った (図1)。



図1 最新型同時蛍光眼底撮影可能な光干渉断層計

SD-OCT網膜断層像で網膜厚 (GCC厚 : 網膜神経線維層、神経節細胞層、内網状層) を、CFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測した。対照として、生理食塩水を全身・硝子体内投与したマウスを用いた。

## 2) KUS剤の網膜中心動脈閉塞症に対する 非臨床薬効薬理試験

網膜中心動脈閉塞症モデルとしては、虚血再灌流を用いた。網膜神経節細胞が蛍光標識された、thy1-GFPラット (*Archives of Facial Plastic Surgery* 12, 315-320, 2010) の前房内に33Gカニューレを挿入し、眼圧を120mmHgまで上昇させた。眼底を観察し、網膜血管が虚脱していることを確認し、60分虚血を継続させた (図2)。

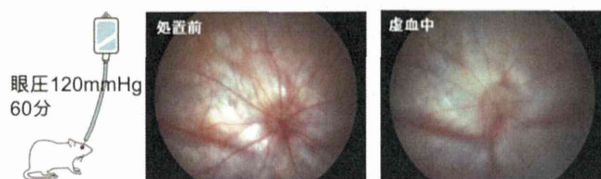


図2 網膜中心動脈閉塞モデル (虚血再灌流) ラット

KUS剤は腹腔内投与 (50mg/kg/day) 及び硝子体内投与を行い、*Multiline OCT* を用いて網膜断層のSD-OCT撮影および、眼底GFP蛍光撮影を行った。SD-OCT網膜断層像で網膜内層 (神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層) 厚を、GFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測した。対照として、生理食塩水を硝子体内投与したラットを用いた。

## 3) KUS剤の虚血性視神経症に対する非臨床薬効薬理試験

虚血性症モデルとして、既報 (*Exp Eye Res* 87, 327, 2008) に基づき、ラット静脈にローズベンガル色素を静注し、視神経乳頭上にレーザー照射することで虚血性視神経症モ

デルラットを作成した。ラットは、上記同様、網膜神経節細胞が蛍光標識された、thy1-GFPラットを用いた。*Multiline OCT* を用いて網膜断層のSD-OCT撮影および、眼底GFP蛍光撮影を行った。SD-OCT網膜断層像で網膜内層 (神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層) 厚を、GFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測した。

## 4) KUS剤の受容体結合試験

副次的薬理試験として、KUS剤の受容体結合試験を行った。KUS剤は、12 $\mu$ Mの一濃度を使用し、トリチウム標識リガンドとの競合結合実験より、標識リガンドの全結合量 (TB) と非特異的結合量 (NSB) の差を100%とし、被験物質の測定値とNSBの差を結合阻害率として算出した。

## 5) KUS剤の製造法検討、GLP原薬製造

KUS121剤のGMP製造に向けて、原薬の純度をあげ、安定した品質での製造が可能となるように、改良プロトコルにて、GLP試験用KUS121原薬製造を行った。

さらに、類縁物質測定法のバリデーション、並びに定量法のバリデーションを委託にて実施した。

## 6) KUS剤の製剤化検討

KUS121の治験薬製造に向けて、プレフォーミュレーションを実施した。硝子体内注射剤としての条件は、pHが弱酸性から中性、浸透圧比0.9-1.1であることが必要であ

る。最初に蒸留水、生理食塩水、0.1% ポリソルベート 20 溶液、0.1% ポリソルベート 80 溶液、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0、7.0、6.0)、20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0、5.0、4.0) について、KUS121 原薬の溶解度をHPLC法で測定した。また、溶液のpH並びに浸透圧測定を行った。ついで、添加剤検討として、トレハロース、スクロース、ブドウ糖、カルボキシメチルセルロースナトリウム、PEG-400を添加し、その溶液の原薬溶解度、pH、浸透圧を測定した。これら溶液の安定性検討の目的で、上記溶液を4週間、5°C、25°C、40°Cで保存し、その安定性を検討した。

## **7) KUS剤の安全性試験**

KUS121のfirst in human前に必要最低限と考えられる安全性試験を実施した。

### **7-1) GLP安全性試験予備検討**

KUS121剤のGLP安全性試験に向けて、原薬の測定法確立、分析法バリデーションを行った。また、カニクイザルを用い、KUS 100 µgを硝子体内注射し、1, 2, 4, 24時間後に血液を採取し、血漿中のKUS濃度をHPLCにて測定した。

### **7-2) 反復投与毒性試験 (GLP)**

ラット尾静脈投与にて、KUS121 2週間連続投与した際の無毒性量を確定した。

臨床投与経路として、硝子体内投与をカニクイザルに3日連続で行い(3用量および

陰性コントロール)、同様に、一般観察、血液・尿検査、病理組織検査を実施した。

### **7-3) 局所刺激試験 (GLP)**

上記カニクイザルを用いて、眼科検査、光干渉断層検査、網膜電図検査を行った。

### **7-4) 安全性薬理試験 (GLP)**

hERG導入CHO細胞を用い、カリウム電流を測定し、KUS121のhERGチャネルへの影響を検討した。局所投与で、全身暴露も極めて低いと予想されることから、本剤が生命維持に重要な影響を及ぼす可能性はほとんどないと考えられるため、他の項目は、上記毒性試験中に評価することとした。

### **7-5) 遺伝毒性試験 (GLP)**

ICH S2(R1)ガイドライン に準拠して、Ames試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、ラット小核試験を実施した。

### **7-6) 光毒性試験**

OECD Guideline for the Testing of Chemicals 432 (In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, Adopted 13 April, 2004)に準拠し、ほ乳類培養細胞 (Balb/c 3T3細胞)を用いて、非照射及び照射 (UV-A光量: 5 J/cm<sup>2</sup>) 条件下で生細胞測定を行い、光毒性の有無を評価した。

## **8) 疾患レジストリ作成**

網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に関して、1) KUS剤の投与タイミン

グを確定、2) 無治療コントロールとしての自然経過、を検討する目的で、自然経過観察に対する、前向き臨床研究のプロトコルを作成、臨床研究を京都大学病院および兵庫医科大学病院にて開始した。さらに、発症早期での患者紹介体制構築を行うため、近隣病院、眼科医院への手紙送付、およびHPでの周知を行った。

## 9) PMDA相談

上記結果の概要をまとめ、PMDA戦略薬事相談の事前面談を平成27年2月4日、大阪にて受けた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、眼科動物研究のスタンダードであるARVOのガイドラインを遵守し、京都大学の「動物実験委員会」に申請し、承認を受けている (MedKyo13221, 14213)。患者臨床研究に際しては、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、京都大学の倫理委員会にて承認済である (E2047)。

## C. 研究結果および考察

### 1) KUS剤の急性神経節障害モデルに対する非臨床薬効薬理試験

KUS全身投与および、硝子体注射投与とともに、網膜内層 (GCC) 厚は、対照生食投与群と比べて有意に厚く、NMDAによる菲薄化が抑制されていた。残存網膜神経節細胞に関しても、KUS投与群では、対照に比べて、有意に多かった。

急性網膜神経節細胞障害モデルマウスにおいて、KUS121は、全身投与および硝子体内投与のいずれにおいても、細胞死の抑制効果があることが明らかになった。

### 2) KUS剤の網膜中心動脈閉塞症に対する非臨床薬効薬理試験

虚血再灌流ラットにおいては、2週間後に内層網膜の菲薄化が認められた。KUS剤投与群では、その菲薄化が有意に抑制されていた。また、網膜神経節細胞は、虚血再灌流後急速に減少したが、KUS剤投与群では、その減少が有意に抑制された。また、網膜電図においても、対照群と比較して有意に振幅が大きく、視機能も保たれていることが明らかになった。

網膜中心動脈閉塞症モデルラットにおいて、KUS121は腹腔内投与および硝子体内投与にいずれの投与経路においても網膜内層保護、視機能低下の抑制効果を示した。

### 3) KUS剤の虚血性視神経症に対する非臨床薬効薬理試験

既報(*Exp Eye Res* 87, 327, 2008)に基づき、ラット静脈にローズベンガル色素を静注し、視神経乳頭上にレーザー照射を行った。SD-OCT網膜断層像で網膜内層 (神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層) 厚を計測したが、レーザー直後に網膜浮腫に起因する網膜厚の増大が認められ、その後レーザー前値へ戻った。また、GFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測したが、網膜神経節細胞の有意な現象は認めら

れなかった。

本法では、虚血性視神経症の有効なモデル作成ができなかった。引き続き、条件検討が必要である。

#### 4) KUS剤の受容体結合試験

ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR、PR、GR、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、RXR $\alpha$ の各受容体に関して、KUSとの結合性は認めなかった。

#### 5) KUS剤の製造法・プロセス検討

KUS剤の中で、動物実験での薬効、いくつかの安全性試験の結果、水溶性等の性質から、GMP原薬にはKUS121を用いることとした。結果、これまでのKUS121剤の製造工程を変更し、より高純度の原薬製造が可能となった。改良法にてGLP試験用原薬を合成した。純度も99.2%で他特に大きな問題もなかった。

	試験項目	Lot. 6453
1	外観	暗赤色、粉末
2	純度試験	
	(1) 塩化物	0.014%以下
	(2) 重金属	20ppm以下
	(3) ヒ素	2ppm以下
	(4) 類縁物質	99.2%
	(5) エタノール	0.26%
3	水分	2.3%

類縁物質測定法のバリデーションとして、特異性・直線性・併行精度および定量限界、検出限界に関して確認し、いずれも

適合範囲内であった。

定量法のバリデーションとして、特異性・直線性・併行精度に関して、確認し、適合範囲内であった。

KUS121のGMPでの製造準備が順調に進んだ。

#### 6) KUS剤の製剤化検討

KUS原薬は、ほぼすべての条件で、一旦溶解するものの、5℃では多くの条件で析出した。原薬の析出には、カルボキシメチルセルロースナトリウムの添加が有効であることが明らかになった。浸透圧調整には、トレハロース及びスクロースを用いると良好な安定性を得ることができた。

治験薬の製剤化に関して、安定な処方がほぼ確定した。今後、処方検討や無菌化検討を実施する必要がある。

#### 7) KUS剤の安全性試験

KUS121のfirst in human前に必要最低限と考えられる安全性試験を実施した。

##### 7-1) GLP安全性試験予備検討

生理食塩水を媒体とした調整液中のKUS121濃度測定を実施するために、特異性・検量線の直線性・オートサンプラー内の安定性・真度および併行精度に各々問題がないことを確認し、HPLC測定法が妥当であることが明らかになった。

また、カニクイザルを用い、KUS121を硝子体内注射すると、注射後2時間をピーク



に、KUS121が血中で検出されることが明らかになった。また、注射後2-4時間では、血中にKUS121はほとんど検出されず、速やかに再分布またはクリアランスを受けることが明らかになった。

#### 7-2) 反復投与毒性試験 (GLP)

ラット尾静脈投与にて、KUS121 (3用量および陰性コントロール) を2週間連続投与し、一般観察、血液・尿検査、病理組織検査を実施、静脈内投与での無毒性量を確定した。

臨床投与経路として、硝子体内投与を雌雄カニクイザルに3日連続で行い、同様に、一般観察、血液・尿検査、病理組織検査を実施、硝子体内投与での無毒性量を確定した。

#### 7-3) 局所刺激試験 (GLP)

上記カニクイザルを用いて、眼科検査、光干渉断層検査、網膜電図検査を行い、眼局所毒性を確認した。

#### 7-4) 安全性薬理試験 (GLP)

hERG導入CHO細胞を用い、カリウム電流を測定し、KUS121がhERGチャネルへの抑制効果を持たないことを確認した。

#### 7-5) 遺伝毒性試験 (GLP)

KUS121は、Ames試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、ラット小核試験いずれにおいても陰性であることが明らかになった。

#### 7-6) 光毒性試験

哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*光毒性試験の結果、KUS121はUV照射の有無で生細胞率に変化なく、光毒性はないことが明らかになった。

以上のように、全身投与、硝子体内投与での無毒性量を確定が可能で、その他の安全性試験でも特に問題となるものはなかった。

### 8) 疾患レジストリ構築

網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に関して、自然経過をみる前向き臨床研究に関し、分担研究者である、三村および石川と話し合いを持ち、研究プロトコルを作成した。主な測定項目および、測定タイミングは表のとおりである。

本臨床研究は、京都大学倫理委員会に申請し、E2047として承認された。現在も前向き臨床研究を続行中である。現在までに、AION12例、CRAO8例の合計20例で半年間の経過観察が可能であった。初診時と6か月後において、視力、視野、中心フリッカ一値に有意な変化を認めなかった。

	初 診	3 日	1 週	2 週	1 ケ 月	2 ケ 月	3 ケ 月	6 ケ 月
視力検査	○	○	○	○	○	○	○	○
フリッカー	○	○	○	○	○	○	○	○
眼科一般検査	○	○	○	○	○	○	○	○
視野検査	○	○	○	○	○	○	○	○
網膜感度検査	○	○	○	○	○	○	○	○
眼底写真撮影	○	○	○	○	○	○	○	○
OCT	○	○	○	○	○	○	○	○
MRI *	○							
一般採血	○							
蛍光眼底造影	○							

さらに、発症早期での患者紹介体制構築を行うため、近隣病院、眼科医院への手紙送付、およびHPでの周知を行った。

以上のように、既存の報告と同様に視力予後が不良であり、その自然経過において有意な改善を認める症例はなく、一度増悪すれば軽快することがないことが改めて確認された。治験実施には、緊急での紹介体制が必須であり、今後も体制強化が必要である。

## 9) PMDA相談

上記結果の概要をまとめ、PMDA戦略薬事相談の事前面談を平成27年2月4日、大阪

にて受けた。現段階では、非臨床パッケージには特に問題がないであろうこと、各種トランスポータ・受容体との結合試験を行うこと、光毒性の初期評価を行うことを助言され、実施可能な試験に関して追加した。

本研究で得られた結果に基づき治験プロトコルの概要を準備のうえ、再度事前面談をうけ、対面助言へと進めていく予定である。

## D. 結論

KUS剤の薬効薬理試験、GMP製造準備、GLP安全性試験が、順調に実施され、特に問題となる事項はなかった。製剤化検討、原薬GMP製造を引き続き行い、医師主導治験を実施予定である。

## E. 健康危険情報

該当なし。

## F. 研究発表

- 論文発表  
査読のあるもの
- Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S, Natsume T, Kakizuka A. VCP is an integral component of a novel feedback mechanism that controls intracellular localization of catalase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. **PLoS One**. 8:e56012, 2013.
- Ehrlich AT, Furuyashiki T, Kitaoka S, Kakizuka A, Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 forms a complex with dopamine D1 receptor and directs D1-induced cAMP

- production to adenylyl cyclase 7 through mobilizing G( $\beta\gamma$ ) subunits in human embryonic kidney 293T cells. **Mol Pharmacol.** 84:476-486, 2013.
3. Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, [Kakizuka A](#), Yokoyama K, Uemura T, Imamura H. In vivo fluorescent adenosine 5'-triphosphate (ATP) imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures. **Anal Chem.** 85:7889-7896, 2013.
  4. Kimura Y, Fukushi J, Hori S, Matsuda N, Okatsu K, Kakiyama Y, Kawawaki J, [Kakizuka A](#), Tanaka K. Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. **Genes Cells.** 18:1131-1143, 2013
  5. Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, [Kakizuka A](#), Imamura H. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca<sup>2+</sup> influx and subsequent Ca<sup>2+</sup> oscillations. **J Biol Chem.** 289:2205-2216, 2014.
  6. Yasuda K, Ohyama K, Onga K, [Kakizuka A](#), Mori N. Mdm20 stimulates polyQ aggregation via inhibiting autophagy through Akt-Ser473 phosphorylation. **PLoS One.** 8:e82523, 2013.
  7. Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Tsukano C, Takemoto Y, [Kakizuka A](#). Long-term oral administration of Hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice. **PLoS One.** 9:e87185, 2014.
  8. [Ikeda H](#), Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, Yoshimura N, Kakizuka A. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. **Sci Rep.** 4:5970, 2014. doi: 10.1038/srep05970.
  9. Yaginuma H, Kawaie S, Kazuhito V. Tabata KV, Tomiyama K, [Kakizuka A](#), Komatsuzaki T, Hiroyuki Noji H, Imamura H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. **Sci Rep.** 4:6522, 2014. doi: 10.1038/srep06522.
  10. Ohnuma Y, Takata T, Kawawaki J, Yasuda K, Tanaka K, Kimura Y, [Kakizuka A](#). VCP/Cdc48 rescues the growth defect of a GPI10 mutant in yeast. **FEBS Lett.** 589:576-580, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.017.
- 査読の無いもの
1. 笹岡紀男、[垣塚彰](#)「ホップ抽出液のアルツハイマー病発症抑制効果」 **BIO INDUSTRY** 31:34-39, 2014.
  2. 木村洋子、[垣塚彰](#) 「タンパク質の品質管理と神経変性」 **Annual Review 神経** 206-211, 2014.
  3. [垣塚彰](#) 「神経変性疾患と細胞死」 **医学の歩み** 246:449-454, 2013.
- その他、著書等
1. [垣塚彰](#) 「ポリグルタミン病」 改訂第3版 **脳神経科学イラストレイテッド**

- 一分子・細胞から実験技術まで 327-334, 2013.
2. 垣塚彰「神経変性疾患と細胞死」 細胞死 Update-基礎から臨床までを俯瞰して (別冊・医学のあゆみ) 97-102, 2014.
  2. 学会発表
    1. Hasegawa T, Ikeda HO, Muraoka Y, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective effect of a valosin-containing-protein ATPase inhibitor on late-stage retinal degeneration in a mouse model. World Ophthalmology Congress 2014, 2014. 4. 2—6. Tokyo.
    2. Hata M, Ikeda HO, Hasegawa T, Nakano N, Muraoka Y, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective effects of a VCP modulator on rat models of ischemia and reperfusion-induced retinal degeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2014. 5. 4—8. Orlando, Fla, USA.
    3. 畑匡侑, 池田華子, 飯田悠人, 吉川宗光, 長谷川智子, 村岡勇貴, 垣塚彰, 吉村長久. 「網膜虚血再灌流ラットモデルにおける valosin-containing protein modifierの神経保護効果の検討」 53回日本網膜硝子体学会総会、平成26年11月28日—30日、大阪国際会議場.
    4. Hasegawa T, Ikeda HO, Hata M, Muraoka Y, Kakizuka A, Yoshimura N. Protective effect of B101, a mixture of nutrients, in a retinal degeneration mouse model. Asia ARVO 2015, 2016年2月16日, Yokohama JAPAN.
    5. 田中喬, 長嶋一昭, 稲垣暢也, 野地博行, 垣塚彰, 今村博臣「蛍光 ATP バイオセンサーを用いたインスリン分泌細胞内 ATP のダイナミクスの計測」平成 25 年 9 月 11 日 第 86 回日本生化学会大会 (ポスター) 平成 25 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜 (横浜)
    6. 柳沼秀幸, 河合信之輔, 田端和仁, 富山佳祐, 垣塚彰, 小松崎民樹, 岡田康志, 野地博行, 今村博臣 「定量 ATP イメージングによる単一細胞内 ATP 濃度の多様性の測定」平成 26 年 9 月 26 日 第 52 回日本生物物理学会年会 (口頭) 札幌コンベンションセンター(札幌)
    7. 岩切竜太, 垣塚彰, 今村博臣「細胞外 ATP ダイナミクスの解明に向けた蛍光 ATP バイオセンサーQUEEN の反応高速化と光安定化」平成 26 年 12 月 1 2 日 日本生体エネルギー研究会第 40 回討論会 (ポスター) 愛媛大学 南加記念ホール(愛媛)
  3. 講演
    1. 池田華子. 「未来の神経保護治療」第25回日本緑内障学会、平成26年9月19日、大阪国際会議場.
    2. 池田華子. 特別講演「VCP ATPase阻害剤による新規神経保護治療」第34回日本眼薬理学会、平成26年9月13日、長良川国際会議場.
    3. 池田華子. 「網膜色素変性に対する新規神経保護治療」第62回医療相談会、平成26年12月7日、神戸勤労会館.
    4. 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞内主要 ATPase, VCP」上原記念生命科学財団特定研究「確信的医療を創生する医学研

- 究」シンポジウム 平成 25 年 6 月 9 日  
下田セントラルホテル (静岡)
5. 垣塚彰「癌ってどういうもの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 平成 25 年 6 月 14 日 京都大学 (京都)
  6. Kakizuka A. “Trials for the prevention of incurable disease models by the regulation of ATP” 第 15 回京都大学生命科学研究科シンポジウム 平成 25 年 7 月 5 日 京都大学芝蘭会館 (京都)
  7. 垣塚彰「新規神経保護創薬標的としての細胞内主要 ATPase、VCP」第 22 回日本 Cell Death 学会学術集会 平成 25 年 7 月 19 日 京都大学芝蘭会館 (京都)
  8. 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞主要 ATPase、VCP」ニューロサイエンスセミナー 平成 25 年 9 月 5 日 金沢大学医学部 (金沢)
  9. 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞内主要 ATPase、VCP」第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜 (横浜)
  10. Kakizuka A. “Novel VCP modulators mitigate major pathologies in mouse models of glaucoma and retinitis pigmentosa by their neuroprotective effects.” EMBO workshop “AAA+ proteins: from mechanism and disease targets” Sept 18, 2013 Neuss (Germany)
  11. 垣塚彰「新規神経保護創薬標的としての細胞内主要 ATPase、VCP」厚労省調査研究班ワークショップ「病態に根ざした ALS の新規治療法開発」平成 25 年 9 月 27 日 都市センターホテル (東京)
  12. Kakizuka A. “Novel VCP modulators for the treatment of incurable eye diseases” BioJapan 2013 Oct. 11, 2013 Pacifico Yokohama (Japan)
  13. 垣塚彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学 (東京) 平成 25 年 10 月 22 日。
  14. 垣塚彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 平成 26 年 5 月 23 日 京都大学 (京都)
  15. Kakizuka A. “VCP, a Major ATPase in the cells, as a novel drug target for currently incurable disorders” Innovative Medicine: Basic Research and Drug Development. (The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014. June 15, 2014. Hyatt Regency Tokyo (Japan)
  16. 垣塚彰「ATP 制御による難治性疾患の新規治療戦略」第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会 平成 26 年 7 月 18 日 東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂(東京)
  17. 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞内主要 ATPase、VCP」ニューロサイエンスセミナー 平成 26 年 9 月 11 日 金沢大学医学部 (金沢)
  18. 垣塚彰「難病への挑戦」京都大学春秋講義 (一般向け) 平成 26 年 9 月 13 日 京都大学時計台ホール(京都)
  19. Kakizuka A. “VCP, a major ATPase in the cells, as a novel drug target for currently incurable disorders.” 7<sup>th</sup> Asian Aging Core for Longevity conference in Jeju. Sept. 22, 2014. Jeju Haevichi Hotel, Jeju (South Korea)
  20. 垣塚彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 平成 26 年 10 月 28 日 東京大学 (東京)

21. 垣塚彰「ATP 制御による加齢関連疾患克服への挑戦」日本抗加齢医学会 平成 26 年 12 月 14 日 大手町サンケイホール (東京)
22. 垣塚彰「インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発」厚生労働科学研究 平成 26 年度研究成果発表会 (研究者向け)。平成 27 年 1 月 20 日 世界貿易センタービル (東京)
23. Kakizuka A. “Challenges for currently incurable disorders.” The Liaison Laboratory regular seminar/ HIGO Program cutting-edge research seminar. Jan. 21, 2015. Kumamoto University (Kumamoto)
24. 垣塚彰「加齢に伴う難治性疾患の克服に向けた挑戦」高等研プロジェクト「老いを考える」研究会 平成 27 年 1 月 23 日 国際高等研究所 (京都府木津川市)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

##### 1. 発明の名称：「ナフトレン誘導体」

発明者：垣塚彰、ほか 3 名。  
出願人：国立大学法人京都大学他一社。  
優先日：平成 22 年 7 月 30 日、  
特願 2010-172467  
国際出願日：平成 23 年 7 月 28 日、  
PCT 出願 (PCT/JP2011/067320)  
米国出願  
出願番号：13/813,190  
米国移行日：平成 25 年 3 月 18 日  
欧州出願  
出願番号：11812583.0  
欧州移行日：平成 25 年 2 月 27 日  
日本出願  
出願番号：特願 2012-526571  
移行日：2013 年 1 月 22 日

##### 2. 発明の名称：「眼疾患処置薬」

発明者：垣塚彰、堀清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、首藤敏之、湊上智弘。  
出願人：国立大学法人京都大学、他一社。  
優先日：平成 22 年 9 月 30 日、  
特願 2010-221873  
国際出願日：平成 23 年 9 月 30 日、  
PCT 出願 (PCT/JP2011/073160)  
欧州出願  
移行日：平成 25 年 4 月 30 日、  
欧州出願番号：11829440.4  
米国出願  
移行日：平成 25 年 7 月 3 日、  
米国出願番号：13/876596  
日本出願  
移行日：2013 年 3 月 28 日  
出願番号：特願 2012-536615

##### 3. 発明の名称：「眼疾患処置薬」

発明者：垣塚彰、池田華子、吉村長久、村岡勇貴。  
出願人：国立大学法人京都大学  
優先日：平成 25 年 2 月 20 日、  
特願 2013-031190  
国際出願日：平成 26 年 2 月 19 日、  
PCT 出願 (PCT/JP2014/053898)

##### 4. 発明の名称：「虚血性眼疾患の処置および/または予防用の医薬組成物」

発明者：垣塚彰、池田華子、吉村長久、畑匡侑。  
出願人：国立大学法人京都大学  
優先日：平成 26 年 2 月 28 日、  
特願 2014-038457  
PCT 出願：2015 年 2 月 26 日、  
PCT/JP2015/055619

##### 5. 発明の名称：「レプチン抵抗性を改善する医薬組成物」

発明者：垣塚彰、他3名。

出願人：国立大学法人京都大学

出願日：平成26年9月3日、PCT出願  
PCT/JP2014/073256

6. 発明の名称：「アルツハイマー病予防薬」  
垣塚彰、笹岡紀男、兼森祥子、坂本めぐみ、竹本佳司、塚野千尋。出願人：国立  
大学法人京都大学 出願日：平成 26 年 6  
月 24 日 特願 2014-129478

研究成果の刊行に関する一覧表  
平成25-26年度

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S, Natsume T, <u>Kakizuka A.</u>	VCP is an integral component of a novel feedback mechanism that controls intracellular localization of catalase and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> levels.	<b>PLoS One</b>	8	e56012	2013
<u>Ikeda H.</u> , Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, <u>Yoshimura N.</u> , <u>Kakizuka A.</u>	A. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa.	<b>Sci Rep</b>	4	5970	2014
Yaginuma H, Kawaie S, Kazuhiro V. Tabata KV, Tomiyama K, <u>Kakizuka A.</u> , Komatsuzaki T, Hiroyuki Noji H, Imamura H.	Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging.	<b>Sci Rep</b>	4	6522	2014
Ohnuma Y, Takata T, Kawawaki J, Yasuda K, Tanaka K, Kimura Y, <u>Kakizuka A.</u>	VCP/Cdc48 rescues the growth defect of a GPI10 mutant in yeast.	<b>FEBS Lett</b>	589	576-580	2015



# VCP Is an Integral Component of a Novel Feedback Mechanism that Controls Intracellular Localization of Catalase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels

Katsuhiro Murakami<sup>1</sup>, Yuzuru Ichinohe<sup>1</sup>, Masaaki Koike<sup>1</sup>, Norio Sasaoka<sup>1</sup>, Shun-ichiro Iemura<sup>2</sup>, Tohru Natsume<sup>2</sup>, Akira Kakizuka<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Functional Biology, Kyoto University Graduate School of Biostudies, Sakyo-ku, Kyoto, Japan, **2** National Institutes of Advanced Industrial Science and Technology, Biological Information Research Center (JBIRC), Kohtoh-ku, Tokyo, Japan

## Abstract

Catalase is a key antioxidant enzyme that catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to water and oxygen, and it appears to shuttle between the cytoplasm and peroxisome via unknown mechanisms. Valosin-containing protein (VCP) belongs to the AAA class of ATPases and is involved in diverse cellular functions, e.g. cell cycle and protein degradation, etc. Here we show that VCP and PEX19, a protein essential for peroxisome biogenesis, interact with each other. Knockdown of either VCP or PEX19 resulted in a predominantly cytoplasmic redistribution of catalase, and loss of VCP ATPase activity also increased its cytoplasmic redistribution. Moreover, VCP knockdown decreased intracellular ROS levels in normal and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells, and an oxidation-resistant VCP impaired the ROS-induced cytoplasmic redistribution of catalase. These observations reveal a novel feedback mechanism, in which VCP can sense H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, and regulates them by controlling the localization of catalase.

**Citation:** Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S-i, et al. (2013) VCP Is an Integral Component of a Novel Feedback Mechanism that Controls Intracellular Localization of Catalase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels. PLoS ONE 8(2): e56012. doi:10.1371/journal.pone.0056012

**Editor:** Junji Yodoi, Institute for Virus Research, Laboratory of Infection and Prevention, Japan

**Received:** October 2, 2012; **Accepted:** January 4, 2013; **Published:** February 14, 2013

**Copyright:** © 2013 Murakami et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by research grants from Solution Oriented Research for Science and Technology (SORST) of Japan Science and Technology Agency (JST), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: kakizuka@lif.kyoto-u.ac.jp

## Introduction

Reactive oxygen species (ROS), e.g. superoxide radicals, hydrogen peroxide, etc., are natural byproducts of the aerobic metabolism of foods, and they have been shown to play important roles in several physiological functions, e.g. transcriptional regulation, mitogen signaling, integrin signaling, Wnt signaling, etc. (see refs in [1–3]). On the other hand, ROS are also produced by UV and X-ray exposure or inflammation, and excess ROS can damage cellular functions by oxidizing proteins, lipids, and DNA, leading to cell aging as well as cancer (see refs in [4]). Among ROS, the superoxide radical is enzymatically converted by superoxide dismutases (SODs) to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which, in turn, is converted by catalase or peroxidases to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub>. Mammalian cells typically possess three SODs, several peroxidases, and one catalase. Among these ROS-scavenging enzymes, only catalase resides in peroxisomes. In certain conditions, such as aging, catalase also resides in the cytoplasm [5], which is believed to be due to its weak peroxisome-targeting signal (PTS). Two types of PTS, PTS1 and PTS2, are known [6]. Typically, PTS1 consists of three sequential amino acids, SKL, and it is present in peroxisome-localized proteins such as peroxisomal Acyl-CoA thioesterase, PTE1. Catalase has a unique PTS1, consisting of four sequential amino acids, KANL. Both PTS1s are recognized by PEX5 (Peroxisome biogenesis factor 5); however, PEX5 binds to SKL

more strongly than to KANL [7], and thus it is believed that PEX5 can transfer SKL-containing proteins more effectively than catalase to peroxisomes. In aged cells, cellular levels of ROS increase, and it is thought that such ROS may weaken PEX5 functions, with transport of catalase to peroxisomes being preferentially compromised, as opposed to transport of SKL-possessing proteins [8]. However, no clear evidence has been provided supporting this speculation.

VCP belongs to the AAA class of ATPases and has been shown to function in many cellular events, including ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation), cell cycle control, membrane fusion, maintenance of Golgi apparatus, protein aggregate formation and clearance, etc. (see refs in [9]). VCP has also been shown to play important roles in several human neurodegenerative disorders [10–12]. We have shown that VCP is modified post-translationally at 60 amino acids, at least, including 18 serines, 14 threonines, 6 tyrosines, and 22 lysines [13]. To investigate the role of post-transcriptional modifications of VCP, we created several modification-mimic forms of VCP, and characterized them [12–14]. These analyses have revealed novel VCP functions and have led us to speculate that VCP may have unidentified functions. In this study, we report a novel VCP function in regulation of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels via the control of catalase localization.

## Materials and Methods

### Antibodies

The following antibodies were purchased: anti-actin (Chemicon), anti-catalase (Calbiochem), anti-PTE1 (ACOT8) (Santa Cruz), anti-FLAG M2 (Sigma), anti-PMP70 (Zymed), anti-HA (Santa Cruz), and anti-PEX19 (BD Pharmingen). The affinity-purified rabbit polyclonal anti-VCP antibody was described previously [15].

### Plasmids and siRNAs

The cDNAs for PEX5, PEX19, catalase, and PTS2 signal sequences of ACAA1 (acetyl-CoA acyltransferase 1) were amplified by RT-PCR from total RNA isolated from HeLa cells, and their sequences were confirmed. The VCP cDNAs (wtVCP, VCP[K251A], VCP[K524A] [16]) or PEX5 cDNA was subcloned into pmCherry vector (Clontech). The PEX19 cDNA was subcloned into pCMV-HA vector (Clontech).

The targeting sequences of siRNAs for VCP and PEX5 mRNAs were as follows:

VCP(nc), 5'-CGGGAGAGGCGCGGCCAT-3';  
 VCP(286), 5'-GGTTAATTTGTTGATGAAGCCATCAA-3';  
 PEX5(192), 5'-CAAGCCTTTGGGAGTAGCTTCTGAA-3';  
 PEX5(955), 5'-GACCTTACGTCAGCTACCTATGATA-3'.  
 Control, 5'-CGGACGCGTCAGGAGCCGGTT-3'.

The siRNAs for PEX19 were purchased from Invitrogen (Stealth Select RNAi, HSS108913 and HSS108914, respectively).

### Cell Culture and Cell Lines

HeLa cells and HEK293A cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. HeLa cell lines stably expressing organelle-targeted GFPs were created by transfection of organelle-targeted GFP expression vectors, and selected in the presence of 2.5 µg/ml of puromycin (Invitrogen). The HEK293A cell line stably expressing GFP-catalase, was also created by similar methods.

### Transfection and Immunostaining

Plasmid transfection was carried out using Lipofectamine plus (Invitrogen), and siRNA transfection was carried out using Oligofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. In co-transfection experiments, cells were transfected with siRNA and plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min at room temperature. Fixed cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature and blocked with blocking buffer (0.1% bovine serum albumin and 0.1% skim milk in PBS) for 1 h. Cells were then incubated 1 h at room temperature with primary antibodies. Subsequently, cells were treated with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (Invitrogen). To detect PMP70, fixed cells were permeabilized with 25 µg/ml digitonin in PBS for 5 min at room temperature, and cells were processed for immunostaining as describe above.

### Subcellular Fractionation and Immunoprecipitation

Cells were fractionated into cytosol, membrane/organelle, and nucleus, using a Subcellular Proteome extraction kit (Calbiochem), according to the manufacturer's protocol. Immunoprecipitation assays were performed as described previously [16]. Briefly, samples were lysed on ice and debris was removed by centrifugation for 30 min at 15,000 ×g at 4°C. The supernatant was mixed with an anti-HA or anti-FLAG antibody and rotated at 4°C overnight after addition of protein G-Sepharose beads (Amersham

Biosciences). After washing of beads, bound proteins were analyzed by Western blot.

### Intracellular ROS Detection

Cells were washed twice with HBSS and incubated with 5 µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA, a ROS-detection reagent (Invitrogen), in HBSS at 37°C for 30 min. Subsequently, cells were washed twice with HBSS and incubated with growth medium at 37°C for 30 min with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Then cells were analyzed by FACScan flow cytometer (BD Biosciences) or LSM510 confocal microscopy (Carl Zeiss).

### Statistical Analysis

Each experiment was conducted at least three times with consistent results. The gel or blot representative of each experiment is presented in this study. The statistical significance was analyzed using Student's *t* test.

## Results

### Involvement of VCP in Intracellular Localization of Catalase

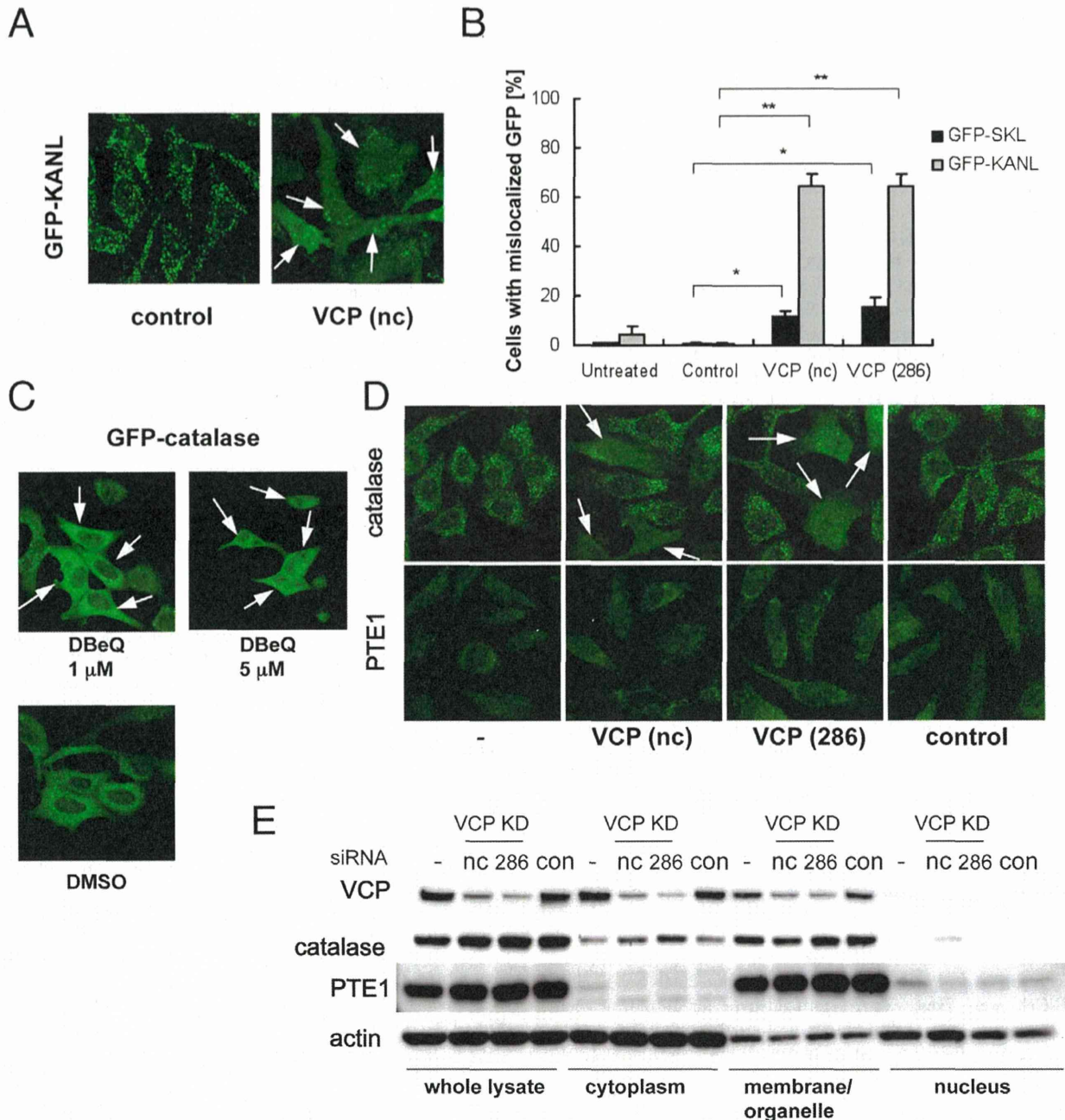
In order to visualize organelle in live cells, we generated several HeLa cell sublines in which GFP was expressed as a fusion protein with a peroxisomal (PTS1 or PTS2)-, nuclear (NLS)-, ER (KDEL)-, or mitochondrial (mito)-targeting signal. Among these, we observed clear mislocalization of GFP-PTS1 (namely, GFP-SKL and GFP-KANL) into the cytoplasm when the cells were treated with VCP siRNAs but not a control siRNA. VCP siRNAs perturbed GFP-KANL localization much more severely than GFP-SKL localization (**Fig. 1A and B**). By contrast, VCP siRNAs did not induce clear mislocalization of PTS2-GFP, mito-GFP, GFP-ER, or GFP-NLS (Fig. S1). We observed similar mislocalization of GFP-KANL by expressing ATPase-negative or dominant-negative VCP mutants, e.g. VCP[K251A] and VCP[K524A] [16] (Fig. S2). In addition, treating cells with DBE<sub>Q</sub>, a VCP inhibitor [17], also induced cytoplasmic localization of GFP-catalase (**Fig. 1C**). These results suggest that the ATPase activity of VCP is necessary for proper localization of catalase.

We then examined the effects of VCP knockdown on intracellular localization of endogenous PTE1 or catalase. In more than 50% of cells treated with VCP siRNAs, endogenous catalase was diffusely observed in the cytoplasm. In contrast, PTE1 localization was not apparently affected by VCP knockdown (**Fig. 1D**). These results were confirmed by cell fractionation experiments. VCP siRNA treatments increased the amounts of catalase but not PTE1 in the cytoplasmic fraction (**Fig. 1E**). Mislocalization of catalase as well as GFP-KANL decreased in cells treated with VCP siRNA together with cycloheximide (Fig. S3), supporting the idea that newly synthesized catalase is transported into peroxisomes with the help of VCP.

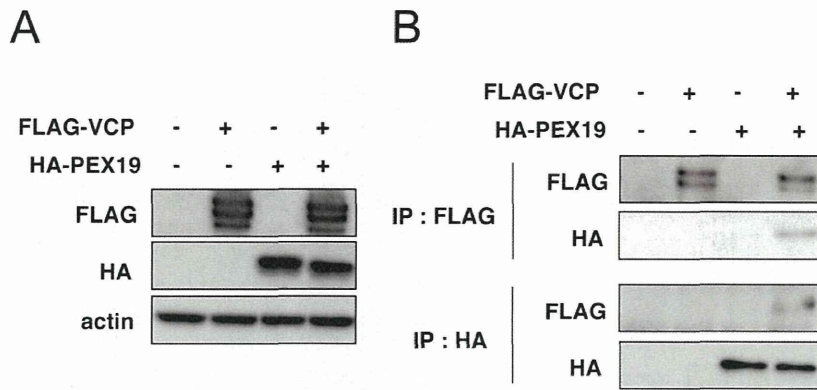
### Interaction between VCP and PEX19

In order to obtain insights for molecular mechanisms underlying VCP-mediated regulation of catalase localization, we searched for VCP-interacting proteins using an immunoprecipitation method followed by a very sensitive MS/MS analysis [18], and identified PEX19 as a potential VCP-interacting protein. Indeed, we could observe a physical association between VCP and PEX19 via immunoprecipitation and western blotting (**Fig. 2**). This interaction appeared very weak, suggesting the possibility that yet-unknown VCP modification may enhance this interaction. This possibility remained to be clarified.





**Figure 1. VCP siRNAs induce cytoplasmic localization of catalase.** (A) Cytochemical analysis of intracellular localization of GFP-KANL. HeLa cells continuously expressing GFP-KANL were treated with control siRNA (control) or VCP siRNAs (nc and 286). Seventy-two hours later, GFP images were analyzed by confocal microscopy. Arrows indicate cells with cytoplasmic localization of GFP-KANL. (B) Quantification of cytochemical analysis on GFP-KANL in (A) and on GFP-SKL. More than 200 cells were examined in each sample, and the fraction (%) of cells with diffuse GFP signals in the cytoplasm were scored.  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ . (C) Fluorescence microscopy analysis of intracellular localization of GFP-catalase. HEK293A cells continuously expressing GFP-catalase were treated with 1  $\mu$ M or 5  $\mu$ M DBeQ, a VCP inhibitor [17], or DMSO for 24 hours, and then GFP signals were detected. Arrows indicate cells with cytoplasmic localization of GFP-catalase. (D) Immunocytochemical analysis of intracellular localization of catalase and PTE1. HeLa cells were treated without (–) or with control siRNA (control), or VCP siRNAs (nc and 286). Seventy-two hours later, catalase and PTE1 were detected with anti-catalase and anti-PTE1 antibodies, respectively. Arrows indicate cells with cytoplasmic localization of catalase. (E) Western blot analyses of protein levels of VCP, catalase, and PTE1 in different cell compartments. HeLa cells were treated without (–) or with control siRNA (control) or VCP siRNAs (nc and 286). Seventy-two hours later, cells were fractionated as described in Methods. Fractionated samples equivalent to 7.5  $\mu$ g total protein of whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting using specific antibodies. Actin served as a loading control.  
doi:10.1371/journal.pone.0056012.g001



**Figure 2. Immunoprecipitation assays to detect physical interactions between VCP and PEX19.** (A) HEK293A cells were transfected with expression vectors for FLAG-VCP and HA-PEX19. Twenty-four hours later, cells were harvested and the cell lysates were analyzed by western blots with antibodies indicated in the panels. Actin served as a loading control. (B) The immunoprecipitation was performed on the cell lysates in (A) with an anti-FLAG or anti-HA antibody. The precipitates were analyzed by western blots with antibodies indicated in the panels. See details in **Materials and methods**.

doi:10.1371/journal.pone.0056012.g002

**Involvement of PEX19 in Intracellular Localization of Catalase**

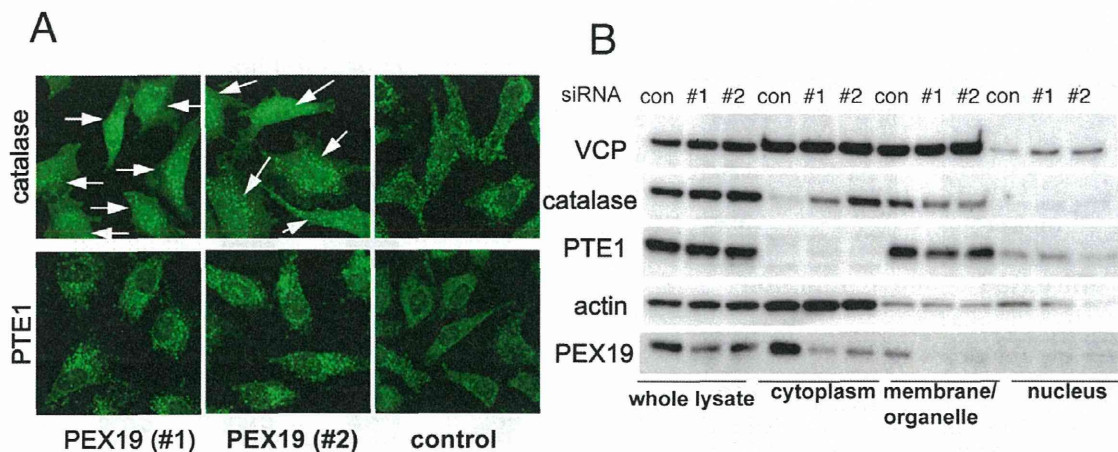
Given that VCP could potentially make a complex with PEX19 and that VCP knockdown apparently affected the transport of catalase into peroxisomes, PEX19 knockdown could also affect the intracellular localization of catalase. Indeed, PEX19 knockdowns produced virtually identical distributions of intracellular catalase as were observed in VCP knockdowns (**Fig. 3A and B**). Moreover, in PEX19 knockdown cells, PTE1 localization was not apparently affected (**Fig. 3A and B**). PEX19 is reportedly involved in the transport of membrane proteins, such as PMP70 (peroxisome membrane protein 70), to peroxisomes. However, we could not detect any clear mislocalization of endogenous PMP70 in VCP-depleted HeLa cells (Fig. S4).

Consistent with previous reports, PEX5 knockdown induced mislocalization of both catalase and PTE1 (Fig. S5). It is notable

that over-expression of PEX5 and VCP could not rectify the mislocalization of GFP-KANL in VCP and PEX5 knockdown cells, respectively (Fig. S6). These results indicate that VCP/PEX19 complexes are required for PEX5 to transport catalase, but not other typical PTS1- or PTS2-possessing proteins, to peroxisomes.

**VCP Activity, Catalase Localization, and ROS Levels**

We next examined the possibility that VCP-depleted cells have a greater capacity to scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as compared with non-treated cells, due to the presence of catalase in the cytoplasm. This was indeed the case. Basal ROS levels were reduced in cells treated with VCP siRNAs compared to those treated with control siRNAs (**Fig. 4A**). Reduction of ROS levels was more pronounced when cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 4A and B**). We have previously shown that the ATPase activity of VCP was inactivated



**Figure 3. PEX19 siRNAs also induce cytoplasmic localization of catalase.** (A) Immunocytochemical analysis of intracellular localization of catalase and PTE1. HeLa cells were treated with control siRNA (control) or PEX19 siRNAs (#1; HSS108913 and #2; HSS108914). Seventy-two hours later, catalase and PTE1 were detected as in (Fig. 1D). Arrows indicate cells with cytoplasmic localization of catalase. (B) Western blot analyses of protein levels of VCP, catalase, PTE1, and PEX19 in different cell compartments. HeLa cells were treated with control siRNA (control) or PEX19 siRNAs (#1; HSS108913 and #2; HSS108914). Seventy-two hours later, cells were analyzed as in (Fig. 1E).

doi:10.1371/journal.pone.0056012.g003