

研究題目 薬理活性化化合物を用いた小胞体ストレス応答調節因子の探索

研究組織

研究代表者：北風 圭介（川崎医科大学 薬理学教室）

共同研究者：親泊 政一（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

小胞体ストレスは、細胞のタンパク質合成の場である小胞体に折り畳み不全タンパク質が蓄積すること等で生じる。細胞は恒常性を保つために小胞体ストレス応答 (UPR) という適応機構を活性化させるが、UPR の破綻や異常活性化は糖尿病、慢性炎症や癌等の様々な疾患の発症に寄与することが報告されている。

UPR を制御する新規タンパク質を見出し、その生理機能を明らかにすることができれば、様々な疾患の新規治療ターゲットになることが期待される。本研究ではキナーゼやホスファターゼ等の酵素活性、あるいはイオンチャネルといった創薬標的になりやすく、かつ発現量の解析だけでは発見できない分子群に特に着目し、製薬企業から提供された標的既知の1万以上の低分子化合物を含むライブラリーと UPR レポーター細胞を用いた網羅的な探索を行うことで、UPR を制御する新規タンパク質の探索を行う。

[1-2]研究の方法・経過

化合物スクリーニングは、96、384 あるいは 1536 well plate に薬理活性化化合物を分注し、293A-EUA-EGFP レポーター細胞 (以下 UPR レポーター細胞) を加えると同時に、小胞体ストレス誘導剤として 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ツニカマイシンおよび 20 nM タブシガルギンの混合溶液を添加し、24 時間後の EGFP の蛍光強度をプレートリーダーもしくは Operetta CLS ハイコンテントイメージングシステム (パーキンエルマー) で測定した。化合物の解析には TIBCO

Spotfire Analyst および ChemFinder ultra を用いた。

CRISPR-Cas9 系によるノックアウト (KO) 細胞株の樹立は、UPR レポーター細胞に組み換えレンチウイルスベクターを用いて guide RNA および SpCas9 を発現させ、限界希釈法により KO クローンを単離した。塩基配列の挿入欠失はサンガーシーケンシングにより確認した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

我々は、12426 種類の薬理活性化化合物のスクリーニングを行い、UPR レポーター活性を顕著に増減させる 172 種類のヒット化合物の同定に成功した。これらの化合物に共通する標的として UPR 活性化因子を 4 候補、UPR 抑制因子を 8 候補見出し、このうち最も顕著に UPR レポーター活性が変化したタンパク質に着目した。候補タンパク質 X はイオンチャネルであり、UPR 活性化因子の候補として見出された。また、候補タンパク質 Y はキナーゼであり、UPR 抑制因子の候補として見出された。

これらの候補遺伝子について、CRISPR-Cas9 系を用いたゲノム編集を行い、KO 細胞株を樹立した。UPR レポーター細胞のレポーター活性測定により、X の KO 細胞株では野生型 (WT) よりも小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンやタブシガルギンに対する UPR が減弱していることが明らかとなった。一方で、Y の KO 細胞株では小胞体ストレス誘導剤の非存

在下であるにも関わらず、UPR が活性化していた。

本共同研究により、UPR を制御する新規タンパク質の候補を複数見出すことに成功した。加えて、探索研究の方法論としても有用であることを示すことができた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究で用いたケミカルゲノミクスの手法は、発現量の解析だけでは発見できない新規 UPR 制御タンパク質を探索できる点に優れている。本研究では特にキナーゼやイオンチャネルといった創薬標的になりやすく、小胞体機能への関与の可能性が高い分子群に着目している。本研究により新規 UPR 制御タンパク質候補を発見したことにより、小胞体ストレスを原因とする疾患の発症機序の解明に向けて大きく前進することが期待される。さらには、そのタンパク質に対する薬理活性化化合物が既に存在するため、治療薬の創出が期待される。加えて、本研究は探索研究の方法論確立という側面も持っており、本研究の手法は UPR 研究に限らず様々なシグナル伝達経路における探索研究にも応用可能であり、生命科学の広い分野に対して有用性を示すものになる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) Kitakaze K, Taniuchi S, Kawano E, Hamada Y, Miyake M, Oyadomari M, Kojima H, Kosako H, Kuribara T, Yoshida S, Hosoya T, Oyadomari S. Cell-based HTS identifies a chemical chaperone for preventing ER protein aggregation and proteotoxicity. *eLife* 8 e43302 2019 年

[3-2]学会発表

1) 北風圭介, 谷内秀輔, 河野恵理, 濱田良真, 三宅雅人, 親泊美帆, 小島宏建, 小迫英

尊, 栗原ともこ, 吉田優, 細谷孝充, 親泊政一. 小胞体ストレス下のタンパク質凝集と細胞毒性を緩和する化学シャペロンの同定. 第93回日本薬理学会年会. 誌上開催. 2020年3月17日

2) 北風圭介, 谷内秀輔, 河野恵理, 濱田良真, 三宅雅人, 親泊美帆, 小島宏建, 小迫英尊, 栗原ともこ, 吉田優, 細谷孝充, 親泊政一. 小胞体ストレス下のタンパク質凝集を標的とする新規化学シャペロンの同定. 第92回日本生化学会大会. 横浜. 2019年9月19日

3) 北風圭介, 谷内秀輔, 河野恵理, 濱田良真, 三宅雅人, 親泊美帆, 小島宏建, 小迫英尊, 栗原ともこ, 吉田優, 細谷孝充, 親泊政一. プロテオパチーの治療薬創出を目指した新規化学シャペロンの探索. 第31回創薬・薬理フォーラム岡山. 岡山. 2019年7月27日

4) 北風圭介, 谷内秀輔, 河野恵理, 濱田良真, 三宅雅人, 親泊美帆, 小島宏建, 小迫英尊, 栗原ともこ, 吉田優, 細谷孝充, 親泊政一. 小胞体におけるタンパク質凝集と細胞毒性を軽減する新規化学シャペロンの同定. 第60回日本生化学中国・四国支部例会. 宇部. 2019年5月18日

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

各候補遺伝子が UPR を制御する詳細なメカニズムについては不明であるため、本研究で見出した化合物や樹立した KO 細胞株を用いてさらに解析を進める必要がある。