

## 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により生じる。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ストレスを解消する。様々な原因による 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、その生理学的・病態生理学的意義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で構成されるライブラリーと 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 タプ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 ハイコンテンツ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 レポーター細胞あるいはヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 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およびウエスタンブロットにより確認した。UPR 下流因子の発現は定量的 PCR 法およびウエスタンブロット法により解析した。

### 【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、12,426 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タンパク質として 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2つのタンパク質に着目した。1 つ目のタンパク質である Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) 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。もう一つのタンパク質である血管内皮細胞増殖因子受容体 VEGFR2 は受容体型チロシンキナーゼであり、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、TRPV1 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プ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。TRPV1 は一部が小胞体膜上に局在することが報告されているが、その機能はよく分か

っていない。実際に、TRPV1 KO 細胞株に対し、C 末端に小胞体膜局在シグナル (KKXX) を付加した TRPV1 を強制発現させることにより、レポーター活性が野生型と同レベルに回復することが明らかとなった。一方で小胞体局在シグナル (KDEL) の付加ではほとんど回復しなかった。また、定量的 PCR の解析から、UPR を構成する PERK 経路、IRE1 経路および ATF6 経路の全てで UPR レポーター活性と同様の傾向が認められた。以上から、小胞体膜上に局在する TRPV1 が小胞体ストレス応答全般に関与することが示唆される。一方で、VEGFR2 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。ウエスタンブロット法によるタンパク質発現解析の結果から、UPR のうち、主に IRE1-XBP1 経路の活性化による可能性が考えられた。さらに、内在性 VEGFR2 の発現が高いヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 についても CRISPR-Cas9 系を用いたゲノム編集を行い、複数の KO 株の作製に成功した。今後、本細胞株を用いてさらなる解析を進めていく予定である。

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的手法は、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

なし

### [3-2] 学会発表

1) 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 津川和江, 河野恵理, 三宅雅人, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 親泊政一. 膵  $\beta$  細胞における小胞体ストレス応答転写因子 ATF4 の機能解明. 第 61 回日本生化学会中国・四国支部例会. 誌上開催. 2020 年 6 月 10 日

2) 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 津川和江, 河野恵理, 三宅雅人, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 親泊政一. 小胞体ストレス応答転写因子 ATF4 の機能不全は膵  $\beta$  細胞の脱分化を惹起する. 第 93 回日本生化学会大会. Web 開催 2020 年 9 月 14 日

3) 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 濱田良真, 竹之内康広, 坪井一人, 藤谷与士夫, 岡本安雄, 親泊政一. 小胞体ストレス下において転写因子 ATF4 は膵  $\beta$  細胞同一性を維持する. 第 94 回日本薬理学会年会. 札幌市 (Web 開催). 2021 年 3 月 9 日

### [3-3] 成果資料等

なし

## 【4】 今後の課題等

今後、各候補タンパク質が UPR を制御する詳細なメカニズムを解明し、生理学的・病態生理学的意義についてさらに解析を進める必要がある。