

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249016

研究課題名(和文)細胞内主要ATP分解酵素VCPの機能とその調節機構の解析

研究課題名(英文)Analyses of the function and regulation of VCP, a major ATPase in the cells

研究代表者

垣塚 彰(KAKIZUKA, Akira)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80204329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、VCPと呼ばれる細胞の主要なATPaseが果たす細胞・生体での生理的な役割と病態での役割との解析を行い、VCPによるATPの消費を抑制することはATPの重要な節約手段になること、飢餓状態で、VCPはファイバー様の構造物となり、自身のATPase活性を抑制すること、新規に開発したVCPのATPase阻害剤KUSは、VCPの細胞機能を阻害せずにVCPによるATPの消費(浪費)を抑制する働きがあり、ストレス下でのATPの消費を抑制することで細胞を保護する作用があること、KUSの投与によって網膜色素変性症および緑内障のモデルマウスの発症及び病態の進行を顕著に抑制できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the functions of VCP, a major ATPase in the cell, in physiological and pathological conditions, and revealed the followings: Suppression of VCP ATPase activities could contribute to reduce the consumption of cellular ATP. VCP could form fiber-like structure, which reduced its ATPase activities. Our newly developed chemical compounds, named KUSs, could suppress VCP ATPase activities without suppressing cellular VCP functions, and KUS could suppress the onset and retard the progression of mouse models of retinitis pigmentosa and glaucoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ATP ATPase VCP ERストレス 細胞死 網膜色素変性症 緑内障

## 1. 研究開始当初の背景

VCP と呼ばれる ATPase は、可溶性蛋白質の中で最も豊富に存在する ATPase で、生理的な条件下で細胞の ATP 量の制御に重要な役割を果たすことが推測されたが、その実態は不明であった。一方我々は、神経変性疾患の分子解析を行う課程で、VCP の ATPase 活性を抑制することが神経細胞にとって極めて有益であることを示す結果を得た。そこで、VCP の ATPase 活性を特異的に阻害する約 200 種類の低分子化合物 (KUS: Kyoto University Substance) を新規合成した。

## 2. 研究の目的

ヒトは一日あたり体重に相当する重さの ATP の合成と分解を行っており、ATP と ATPase は、生物 (細胞) の活動になくならないものである。本研究では、この ATP 制御に重要な役割を果たすと考えられる VCP の ATPase 活性が果たす細胞・生体での生理的な役割と神経変性をはじめとする病態での役割とをその調節機構と併せて解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) VCP ファイバー形成の役割・意義の解析:

我々が作製した VCP に対するモノクローナル抗体 (5H11) は、細胞内で繊維状の構造物 (以下 VCP ファイバー) を染色し、細胞全体を染める、一般的な VCP 抗体とは全く異なる染色像を示した。そこで、いろいろな培養条件で培養細胞をこの 5H11 で染色し、VCP ファイバーが変化する条件を検索した。次に、種々の細胞骨格蛋白質の抗体と共染色し、VCP ファイバーと共局在する蛋白質の検索を行った。さらに、VCP ファイバーの有無と ATP の減少速度と細胞の生存率の解析を行った。

### 2) ATP 産生における VCP の役割の解析:

VCP をノックダウンした細胞でのグルコースの取り込み、解糖系の活動指標である乳酸の産生量、ミトコンドリアの活動指標である酸素消費量の測定を行った。

### 3) 遺伝学的手法を用いた神経変性における VCP の役割の解析:

ポリグルタミンを複眼に発現させた神経変性のショウジョウバエモデルでは、ポリグルタミンの蓄積により Ter94 (ショウジョウバ

エの VCP) が核移行し、ヒストンの脱アセチル化が誘導される。そこで、このポリグルタミン病のモデルと複眼に siRNA を発現させるライブラリーを掛けあわせ、複眼の変性が軽減する系統のスクリーニングを行った。さらに、得られた系統での、ポリグルタミンの蓄積状態、Ter94 の核移行、核内のヒストンのアセチル化を免疫染色し、siRNA の標的となっている蛋白質の作用点を解析した。さらに、切除した複眼に含まれる ATP 量をルシフェラーゼ法で定量した。

### 4) KUS の培養細胞での効果の解析:

KUS を培養細胞の培地に加え、VCP のノックダウン時に見られる細胞死の誘導、ユビキチン蛋白質の蓄積、ER ストレスマーカーの誘導等を観察した。また、低グルコース、血清除去、ツニカマイシン処理のような厳しい培養条件で、KUS 添加の有無によって、培養細胞の胞死の誘導、ユビキチン蛋白質の蓄積、ER ストレスマーカーの誘導、細胞内の ATP レベルがどのように変化するかを解析した。

### 5) KUS の疾患モデルでの治療効果の解析:

① 網膜色素変性症モデル rd10 に対する治療効果の解析: 生後 2 ヶ月までに網膜桿体細胞が消失する網膜色素変性症モデルである rd10 マウスに対し、KUS121、KUS187 (それぞれ 50mg/kg/day) を生後 7 日より約 3 週間投与し、桿体細胞の消失をマウス用の光干渉断層計を用いて経時的に評価すると同時に、桿体細胞の機能を表す網膜電図の測定を行った。また、投与終了後、組織学的に網膜の解析を行った。

② 緑内障モデル DBA/2J に対する治療効果の解析: ヒトの眼圧上昇型緑内障モデルである DBA/2J マウスに対し、眼圧の上昇が始まる 2 ヶ月齢から KUS121、KUS187 (それぞれ 50mg/kg/day) を 10 ヶ月齢まで投与し、視神経乳頭陥凹、網膜神経節細胞の消失、神経線維層菲薄化を光干渉断層計を用いて経時的に評価した。また、投与終了後、組織学的に網膜の解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) VCP ファイバー形成の役割・意義の解析:

細胞を飢餓状態で培養すると VCP ファイバーの形成が著しく亢進した。この VCP ファイバーと共局在をする細胞骨格蛋白質を検索したところ、ビメンチンとチュブリンの共

局在が観察された。さらに、ビメンチンとチューブリンをノックアウトすると VCP ファイバーの形成が抑制された。VCP ファイバーを形成した細胞では、ATP の消費が約 20%抑制されていることが観察された。従って、細胞質での VCP は、総 ATP の消費の 20%程度を担っていることが示唆された。また、VCP ファイバーを形成出来なくした細胞は、飢餓時で容易に細胞死をおこした。以上のことから、この VCP ファイバーの形成は、VCP の ATPase 活性を素早くシャットダウンすることで、ATP の消費を抑制する、飢餓に対する防御反応であることが示唆された。さらに、VCP ファイバーを持つ突起状の構造物は、近接する細胞とネットワークを形成し、ATP のやりとりを行っていることを見いだした。即ち、ATP の減少した細胞に回りの細胞が VCP ファイバーを有する突起状の構造物を介して ATP を供給し、その細胞を救っていることが見いだされた。

#### 2) ATP 産生における VCP の役割の解析：

VCP をノックダウンした細胞では、細胞外のグルコースを有効に利用できないこと、すなわち、グルコースの細胞内への取り込みに VCP が重要な役割を果たすことが示唆された。さらにこの時、グルコースの細胞内への取り込みの抑制が起こることと同時に、ATP の産生が解糖系からミトコンドリアへとスイッチすることが示唆された。

#### 3) 遺伝学的手法を用いた神経変性における VCP の役割の解析：

ポリグルタミンの蓄積による神経変性を抑制する 2 系統の siRNA 発現ラインを得た。この時、Ter94 の核移行が抑制され、さらにヒストンのアセチル化の低下が抑制されており、これら 2 つの遺伝子産物がポリグルタミン蓄積時での Ter94 の核移行に関与していることが示唆された。複眼の変性の程度と ATP 量に逆相関があり、変性の強い複眼では、著しく ATP が減少していることが示唆された。

#### 4) KUS の培養細胞での効果の解析：

我々が開発した VCP の新規 ATPase 阻害剤 (KUSs:Kyoto University Substances)は、100~300nM の IC50 で VCP の ATPase 活性を阻害したが、VCP のノックダウンによって認められるユビキチン化蛋白質の蓄積、ERAD の阻害、細胞周期の停止、細胞死は全く観察され

なかった。よって、KUS による VCP の ATPase 活性の阻害は、VCP の細胞での機能を抑制しないことが示唆された。さらに、幾つかの KUS は細胞毒性を示さないばかりか、低グルコース、血清除去、ツニカマイシン処理のような厳しい培養条件で、培養細胞の生存を容量依存的に維持させた。これらの細胞死には ER ストレスが関わることを示されており、実際、KUS 投与によって ER ストレスマーカー(CHOP、GRP78)の上昇が抑制された。低グルコースや血清除去は、細胞内の ATP 量の減少を引き起こすことが知られており、我々は、ツニカマイシン処理によっても細胞内の ATP 量が減少することを見いだしていた。さらに、培養細胞の可溶性分画の ATPase 活性の 20%程度が、VCP の ATPase 活性によることが判明した。そして、これらの処理によって引き起こされる ATP の減少を KUS が抑制すること、さらに、ツニカマイシン処理によって誘導される ER ストレスが、ATP やメチルピルビン酸(膜透過性ピルビン酸：TCA サイクルに入って ATP を産生する)によって、KUS の場合と同様に抑制されることを見いだした。これらの結果から、ER が一義的に認識しているのは、異常蛋白質の蓄積ではなく、細胞内の ATP 減少であり、ER は ATP センサーとしての機能を担っていることが考えられた。

#### 5) KUS の疾患モデルでの治療効果の解析：

①網膜色素変性症モデル rd10 に対する治療効果の解析：薬剤投与 2 週目である生後 21 日から 33 日にかけて、KUS 投与群では、有意に全層網膜厚が保たれ、また、網膜電図の b 派の振幅低下も有意に抑制された。組織学的解析で、視神経細胞外節部も有意に厚く残存していること、電気顕微鏡像で視神経細胞外節部の形態がよく保持されていることを確認できた。以上の結果から、KUS は、網膜色素変性症の発症に対し、予防および進行の抑制効果が期待できることが判明した。

②緑内障モデル DBA/2J に対する治療効果の解析：KUS 投与群では、網膜の内層の厚さが有意に保たれ、組織学的解析で、神経節細胞数も有意に多く残存していた。また、視神経乳頭陥凹の程度も有意に抑制されていた。以上の結果から、KUS は、眼圧上昇による緑内障の発症に対し、予防および進行の抑制効果が期待できることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 14 件)

1. [Ohashi-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. 査読有 doi: 10.1038/srep05970.
2. Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Kan M, Tsukano C, Takemoto Y, [Kakizuka A](#). Long-term oral administration of hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice. **PLoS One**. 9:e87185, 2014. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0081785.
3. 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. 査読有 DOI:10.174/jbc.M113.499111.
4. 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. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0082523.
5. 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. 査読有 DOI: 10.1111/gtc.12103.
6. 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. 査読有 DOI:10.1021/ac4015325.
7. 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 Gβγ subunits in human embryonic kidney 293T cells. **Mol Pharmacol**. 84:476-486, 2013. 査読有 DOI: 10.1124/mb.113.087288.
8. 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. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0056012.
9. Sakurai H, Sakaguchi Y, Shoji E, Nishino T, Maki I, Sakai H, Hanaoka K, [Kakizuka A](#), & Sehara-Fujisawa A. In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. **PLoS One** 7:e47078, 2012. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0047078.
10. Takata T, Kimura Y, Ohnuma Y, Kawawaki J, Kakiyama S, Tanaka K, & [Kakizuka A](#). Rescue of growth defects of yeast *cdc48* mutants by pathogenic IBMPFD-VCPs. **J Str Biol** 179: 93-103, 2012. 査読有 DOI: 101016/j.jsb.2012.06.005.
11. Muraoka Y, [Ohashi-Ikeda H](#), Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto- Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, [Kakizuka A](#), & Yoshimura N. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. **PLoS ONE** 7: e36135, 2012. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0036135.
12. Ohyama K, Yasuda K, Onga K, [Kakizuka A](#), & Mori N. Spatio-temporal expression pattern of the NatB complex, Nat5/Mdm20 in the developing mouse brain: implications for co-operative versus non-co-operative actions of Mdm20 and Nat5. **Gene Expr Patterns** 12:36-45, 2012. 査読有 DOI: 22101279.
13. Nakano N, [Ohashi-Ikeda H](#), Hangai M, Muraoka Y, Toda Y, [Kakizuka A](#), & Yoshimura N. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 52:8754-8762, 2011. 査

読有 DOI: 22003119

14. Takeshita Y, Fujinaga R, Kokubu K, Islam MN, Jahan MR, Yanai A, Kakizuka A, & Shinoda K. Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain. **Neuroreport** 22: 232-238, 2011. 査読有 DOI: 21386698

[学会発表] (計 59 件)

1. Akira Kakizuka “Novel VCP modulators for the treatment of incurable eye diseases“ **BioJapan** 2013 Oct. 11, 2013 Pacifico Yokohama (Japan)
2. 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)
3. Akira Kakizuka “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)
4. 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
5. 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)
6. 垣塚 彰 「新規の作用機序による緑内障および網膜色素変性症治療薬」イノベーション関西 グランキューブ大阪 (大阪) 平成 24 年 12 月 6 日
7. 垣塚 彰 「細胞内主要 ATPase VCP の生理・病態における役割とその新規制御薬の開発」奈良県立医大大学院セミナー 奈良県立医大 (奈良) 平成 24 年 11 月 30 日
8. 垣塚 彰 「細胞内主要 ATPase VCP の役割とその新規制御薬の開発」糖尿病研究センターセミナー/転写代謝セミナー 国立国際医療研究センター (東京) 平成 24 年 10 月 19 日
9. 垣塚 彰 「新規神経保護薬の開発とその緑内障動物モデルに対する応用」第 23 回日本緑内障学会 石川県立音楽堂 (金沢) 平成 24 年 9 月 28 日

10. 垣塚 彰 「緑内障および網膜色素変性症マウスモデルに対して有効性を示した新規 VCP 阻害剤の開発」京都大学新技術説明会 JST 東京別館ホール (東京) 平成 24 年 8 月 24 日

11. Akira Kakizuka “Roles of VCP in neurodegenerative disorders.” The 10<sup>th</sup> NTU-Japan International mini-symposium on Molecular and Cell biology & promotion of Academic Exchange and Collaborations for NTU-Japan. Taiwan National University (Taiwan) January 8, 2012.

12. Akira Kakizuka “Roles of VCP in human neurodegenerative disorders.” Kyoto University day in Nanjing. Nanjing University (China) December 2, 2011.

13. Akira Kakizuka “Roles of VCP in polyglutamine diseases.” Asian Aging Core for Longevity (AACL)-Nagasaki Symposium Asian Aging 2011: Japan-Korea Joint Conference on Brain Aging and Neurodegeneration (Molecular Perspectives and Regional Bridging). Nagasaki University (Japan) November 21, 2011.

14. Akira Kakizuka “Roles of VCP in abnormal phospholipid metabolisms in polyglutamine disease models.” 9<sup>th</sup> International conference on AAA proteins. Kumamoto City International Center (Japan) November 10, 2011.

15. 垣塚 彰 「VCP が関わる異常蛋白質に対するストレス応答機構と ATP 制御機構」第 84 回日本生化学会大会シンポジウム (2S2a) ストレスシグナル研究の最前線 京都国際会議場 (京都) 平成 23 年 9 月 22 日

16. 垣塚 彰 「神経変性疾患およびストレス応答における VCP の役割」第 20 回日本 Cell Death 学会 東京大学薬学講堂 (東京) 平成 23 年 7 月 30 日

他 43 件

[図書] (計 2 件)

1. 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
2. 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

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

1. 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、他 2 名

出願者: 国立大学法人京都大学。

種類: 特許出願

番号: 特願 2014-038457

出願年月日: 平成 26 年 2 月 28 日

国内外の別: 国内

2. 名称: 眼疾患処置薬

発明者: 垣塚 彰、池田華子、他 2 名

出願者: 国立大学法人京都大学。

種類: 特許出願

番号: 特願 2013-031190.

出願年月日: 平成 25 年 2 月 20 日

国内外の別: 国内

種類: PCT 出願

番号: PCT/ JP2014/053898

出願年月日: 平成 26 年 2 月 19 日

国内外の別: 海外

3. 名称: ペルオキシソーム増殖剤応答性受容  
体活性化剤および組成物 (分割出願)

発明者: 垣塚 彰、他 5 名

出願者: 国立大学法人京都大学、

サニーヘルス株式会社。

種類: 特許出願 (分割出願)

番号: 特願 2013-142127

出願年月日: 平成 25 年 10 月 24 日

国内外の別: 国内

4. 名称: 眼疾患処置薬

発明者: 垣塚 彰、堀 清次、池田華子、  
他 4 名

出願者: 国立大学法人京都大学、

ダイトーケミックス株式会社。

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2011/ 073160

出願年月日: 平成 23 年 9 月 30 日

国内外の別:

国内移行日: 平成 25 年 3 月 28 日

米国移行日: 平成 25 年 7 月 3 日

出願番号: 13/876596

欧州移行日: 平成 25 年 4 月 30 日

出願番号: 11829440.4

5. 名称: アルツハイマー病予防薬のスクリー  
ニング法と同定物

発明者: 垣塚 彰、笹岡紀男、他 4 名

出願者: 国立大学法人京都大学。

種類: 特許出願

番号: 特願 2011-19043

出願年月日: 平成 23 年 9 月 1 日

国内外の別: 国内

6. 名称: ナフトレン誘導体

発明者: 垣塚 彰、他 3 名

出願者: 国立大学法人京都大学、

ダイトーケミックス株式会社。

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2011/067320

出願年月日: 平成 23 年 7 月 28 日

国内外の別:

国内移行日: 平成 25 年 1 月 22 日

米国移行日: 平成 25 年 3 月 18 日

出願番号: 13/813,190

欧州移行日: 平成 25 年 2 月 27 日

出願番号: 11812583.0

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等:

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/funcbiol/>

<http://ocw.kyoto-u.ac.jp/ja/graduate-school-of-biostudies/03>

6. 研究組織

(1)研究代表者

垣塚 彰 (KAKIZUKA, Akira)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号: 80204329

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

池田華子 (IKEDA, Hanako)

京都大学・大学院医学研究所・助教

研究者番号: 20372162

今村博臣 (IMAMURA, Hiromi)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号: 20422545

家村俊一郎 (IEMURA, Shun-ichiro)

福島県立医科大学・医療-産業 TR セン  
ー・教授

研究者番号: 90356410