

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月12日現在

機関番号：23903
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659045
 研究課題名（和文） 酵母を利用したアミロイドーシス治療薬のハイスループットスクリーニング系の開発
 研究課題名（英文） Development of a yeast-based high-throughput screening system for therapeutic drugs against amyloidoses
 研究代表者
 星野 真一（HOSHINO SHINICHI）
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号：40219168

研究成果の概要（和文）：

ヒトプリオン病の酵母モデルを作製するために、酵母eRF3のプリオンドメインをヒトPrPのプリオンドメインに置き換えたキメラタンパク質を発現する酵母株を作製した。その酵母株の大部分はプリオン型 $[PSI^+]$ へと変化し、グアニジン処理を施すと、 $[PSI^+]$ 形質は $[psi^-]$ へと復帰した。また、eRF3-PrPプリオンは生育毒性を示さず、本研究において作製したeRF3-PrPを発現する改良型 $[PSI^+]$ 株がヒトプリオン病の病態モデルとしてプリオン病治療薬のスクリーニング系開発に応用できることを実証した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have constructed a yeast strain expressing chimeric prion protein in which prion domain of the yeast eRF3 (Sup35) was replaced by that of human PrP. Most of the modified yeast cells spontaneously transformed to $[PSI^+]$ and the $[PSI^+]$ transformants were returned to $[psi^-]$ when the cells were treated with guanidine hydrochloride. The eRF3-PrP prion had no effect on the growth of yeast cells. Thus, we confirmed that the modified $[PSI^+]$ prion, the amyloidogenic isoform of eRF3-PrP, could be an ideal model for investigating prion disease in yeast and for screening therapeutic drugs against prion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学、翻訳終結、eRF3、酵母プリオン

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病やウシ海綿状脳症などのプリオン病、ハンチントン病、脊髄小脳変性症をはじめとするポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病とい

ったアミロイド繊維の沈着を伴う疾患を総称する『アミロイドーシス』の研究は、1990年代から急速な発展を遂げ、タンパク質科学との連携によってアミロイド繊維の形成機構をはじめアミロイドーシスの病態形成に

共通する分子基盤が明らかにされてきた。すなわち、これらの疾患において、アミロイド繊維は、 β シートで構成される幅 10nm 程度の枝分かれのない線維構造をもち、核形成と成長の二段階で形成されることに加え、コンゴレッド色素で染色されるといった共通の性質を有する。しかしながら、このような分子基盤解明の進展にもかかわらず、これらの疾患に対する治療薬は、世界的規模でも根治治療にはほど遠く、対症療法のみが行なわれているのが現状であり、予防・治療薬の開発が切に望まれている。治療薬開発に関しては、例えばクロイツフェルト・ヤコブ病の治療薬にみられるように、プリオンを感染させた神経芽細胞腫を用い、プロテイナーゼ K 耐性のプリオンタンパク質が減少することを SDS-PAGE によって解析するといった非常に複雑なスクリーニング系が開発され、小規模スクリーニングによりある一定の成果が報告されているというのが現状である。

2. 研究の目的

プリオン病、ポリグルタミン病、アルツハイマー病など『アミロイドーシス』の研究は 1990 年代から急速な進展を遂げ、すべてのアミロイドーシスの病態形成に共通する分子基盤が明らかにされてきた。しかしながら、このような分子基盤解明の進展にもかかわらず、これら疾患に対する治療薬の開発は立遅れているのが現状である。申請者は、これまで 20 年にわたり eRF3 の機能解析をおこなってきた経緯から、本研究においては eRF3 がアミロイドを形成するプリオン型酵母[PSI⁺]株を利用し、各種アミロイドーシス疾患治療薬のスクリーニング系を開発する。具体的には eRF3 のプリオンドメインを各種疾患のアミロイド形成に関わる領域に置換した改変型[Psi⁺]株を作製し、各疾患に対しアミロイド形成の阻害あるいはアミロイドの分解を促進する薬物を、[PSI⁺]株の生育とコロニーの色の変化によりスクリーニング系を確立する。本スクリーニング系を開発は、アミロイドーシス疾患治療薬のハイスループットスクリーニングを可能にする。

3. 研究の方法

eRF3 のプリオンドメインを各種疾患原因遺伝子産物のアミロイド形成に関わる領域（ヒトプリオン蛋白質 PrP のプリオンドメイン）に置換した改変型[PSI⁺]株を作製する。この改変型酵母において eRF3 によるアミロイド形成はコロニーの色により識別することが可能である。

そこで、すでにアミロイド線維形成を阻害する抗プリオン化合物の候補として同定されているピラゾロン誘導体の化合物ライブ

ラリーを用いてスクリーニングを行ない、作製した出芽酵母[PSI⁺]改変株の有効性の検証を行なう。また、平成 23 年度においては、スクリーニングに伴う擬陽性、擬陰性を排除することを目的として、新たに β ガラクトシダーゼを利用したスクリーニング系を代替系として導入する。

4. 研究成果

酵母プリオン [PSI⁺] 株を用いてスクリーニングの条件を確立しその有効性を示した。またヒトプリオン病の酵母モデルを作製するために、酵母 eRF3 のプリオンドメインをヒト PrP のプリオンドメインに置き換えたキメラタンパク質を発現する酵母株を作製した。その酵母株の大部分は [PSI⁺] へと変化し、グアニジン処理を施すと、eRF3-PrP 発現により新たに出現した [PSI⁺] 形質は [psi⁻] へと復帰することが観察された。一方、復帰した eRF3-PrP 発現株からは再び高頻度に [PSI⁺] 株を誘導できることを確認した。また、eRF3-PrP 発現プリオン株は生育毒性がないことからスクリーニングに使用する際は通常の酵母と同様に取り扱うことができることも明らかにした。

以上のように、本研究において作製した eRF3-PrP を発現する改良型[PSI⁺]株がヒトプリオン病の病態モデルとしてプリオン病治療薬のスクリーニング系開発に応用できることを実証した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Saito, S., Hosoda, N., Hoshino, S. (2013) Hbs1-Dom34 functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells. **J Biol Chem** (in press). 査読有

2. Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, N., Hoshino, S. (2013) Anti proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. **Oncogene** (in press). 査読有

3. Ogami, K., Cho, R., Hoshino, S. (2013) Molecular cloning and characterization of a novel

isoform of the non-canonical poly(A) polymerase PAPD7. **Biochem Biophys Res Commun** 432, 135-140. 査読有

4. Hashimoto, Y., Hosoda, N., Datta, P., Alnemri, ES., Hoshino, S. (2012) Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis.

Apoptosis 17, 1287-1299. 査読有

5. Hoshino, S. (2012) Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. **Wiley Interdiscip Rev RNA** 3, 743-757. 査読有

6. Osawa, M., Hosoda, N., Nakanishi, T., Uchida, N., Kimura, T., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S., Shimada, I. (2012) Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. **RNA** 18, 1957-1967. 査読有

7. Hosoda, N., Funakoshi, Y., Hirasawa, M., Yamagishi, R., Asano, Y., Miyagawa, R., Ogami, K., Tsujimoto, M., Hoshino, S. (2011) Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. **EMBO J** 30, 1311-1323. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. 橋本芳史、細田直、星野真一：切断型 eRF3 によるアポトーシス阻害タンパク質 IAP を介したアポトーシス制御機構の解析、第 133 回薬学会年会、2013 年 3 月 28 日 (静岡)

2. 星野真一：細胞内 mRNP 顆粒形成の分子メカニズム、第 133 回薬学会、シンポジウム『RNA

ダイナミクスから迫る生命現象』、2013 年 3 月 29 日 (横浜) オーガナイザー兼シンポジスト

3. 星野真一：mRNA3' 末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現制御・RNA 品質管理機構の解明、平成 24 年度新学術領域研究『RNA 制御学』班会議、2013 年 1 月 7-9 日 (仙台)

4. 三瓶祥子、尾上耕一、星野真一：細胞質ポリ A 鎖伸長因子 CPEB による c-myc mRNA の安定性制御、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日 (福岡)

5. 趙理海、尾上耕一、星野真一：非正準ポリ A ポリメラーゼ PAPD5, PAPD7 の機能解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日 (福岡)

6. 田中麻記子、細田直、星野真一：テロメラーゼ RNA (TLC1) の成熟化機構の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日 (福岡)

7. Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, N., Hoshino, S.: Anti proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. EMBO/EMBL symposium 'The complex life of mRNA', 2012 年 10 月 7-10 日 (ドイツ、ハイデルベルク)

8. Hashimoto, Y., Hosoda, N., Datta, P., Alnemri, ES., Hoshino, S.: Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis. EMBO/EMBL symposium 'The complex life of mRNA', 2012 年 10 月 7-10 日 (ドイツ、ハイデルベルク)

9. 尾上耕一、市川史、星野真一：非正準ポリ(A)ポリメラーゼ PAPD7 の新規アイソフォームの同定と機能解析、第 14 回日本 RNA 学会年会、2012 年 7 月 18-20 日 (仙台)

10. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一：

癌抑制遺伝子産物 Tob による転写後の c-myc 遺伝子発現調節機構、第 58 回日本薬学会東海支部大会、2012 年 7 月 9 日（静岡）

11. 橋本芳史、細田直、星野真一：翻訳終結因子 GSPT/eRF3 のカスパーゼ依存的切断の生理的意義の解析、第 76 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2012 年 5 月 26 日（岡崎）

12. 尾上耕一、細田直、船越佑司、星野真一：癌抑制遺伝子産物 Tob による c-myc 遺伝子の発現調節機構、第 132 回薬学会年会、2012 年 3 月 29 日（札幌）

13. 星野真一：mRNA3' 末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現制御・RNA 品質管理機構の解明、平成 23 年度新学術領域研究『RNA 制御学』班会議、2012 年 1 月 6-7 日（神戸）

14. 杉山遥、成瀬貴文、細田直、星野真一：PAM2 モチーフ含有タンパク質 USP10 のストレス顆粒形成に果たす役割、第 57 回日本薬学会東海支部大会、2011 年 7 月 9 日（名古屋）

15. 田中麻記子、細田直、星野真一：テロメラーゼ RNA (TLC1) の成熟化機構の解明、第 57 回日本薬学会東海支部大会、2011 年 7 月 9 日（名古屋）

16. Ogami K, Hosoda N, Funakoshi Y, Hoshino S: Anti-proliferative protein Tob negatively regulates c-myc oncogene expression by accelerating mRNA deadenylation, RNA 2011 (6th annual meeting of the RNA society), 2011 年 6 月 14 日（京都）

17. Hirose, T. Nuclear body formation on the specific long noncoding RNAs. Tokyo RNA Club the 5th meeting, Tokyo, 2011. 6. 13

18. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一：癌抑制遺伝子産物 Tob は癌原遺伝子 c-myc の発現を負に制御する、第 131 回薬学会年会、2011 年 3 月 31 日（静岡）

19. 橋本芳史、細田直、星野真一：カスパーゼによる翻訳終結因子 eRF3 の分解と翻訳抑

制、第 131 回薬学会年会、2011 年 3 月 30 日（静岡）

20. 星野真一：mRNA3' 末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現制御・RNA 品質管理機構の解明、平成 22 年度新学術領域研究『RNA 制御学』班会議、2011 年 1 月 6-7 日（京都）

21. 星野真一：癌抑制遺伝子産物 Tob における mRNA 分解開始調節の分子メカニズム、“GCOE 特別セミナー”（招待講演）東京大学医科学研究所、2010 年 11 月 16 日（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 真一 (HOSHINO SHINICHI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40219268