

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860050

研究課題名(和文)25ヒドロキシコレステロールによる抗ウイルス活性の解析

研究課題名(英文)Analysis of antiviral activity of 25-hydroxycholesterol

研究代表者

柴田 識人 (Shibata, Norihito)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：30391973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な疾患を引き起こすウイルスは数多く存在するが、抗ウイルス治療薬の充足率は決して高くない。私はこれまでに酸化コレステロールである25ヒドロキシコレステロール(25OHC)が宿主細胞の生存に影響を与えずに、ウイルスの複製を抑制することを見出している。本研究では、宿主細胞における25OHCの受容機構、そしてそれに伴うストレス関連遺伝子の発現誘導機構を解明した。本結果は25OHCの持つ抗ウイルス作用の分子機構を明らかにすると共に、25OHCを基盤とした新たなウイルス治療薬開発の可能性を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：Although it is well known that many viruses can cause severe diseases, existing drugs against viruses are not sufficient and development of novel anti-virus drugs is required. Previously, I found that 25-hydroxycholesterol (25OHC) can inhibit virus replication without affecting on the viability of host cells. In this study, I investigated the molecular mechanism how 25OHC is recognized by the host cells, and how 25OHC induces the expression of specific stress-related genes. These results suggest that 25OHC may be a promising target for development of a novel anti-virus drug.

研究分野：生化学

キーワード：酸化コレステロール

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザやエイズなど、未だ根本的な治療法は確立されていないウイルス性疾患は数多く存在している。この要因として、ウイルスごとに構成蛋白質や生活環が異なることや、容易に遺伝子変異することが挙げられる。その結果、ウイルスごとに治療薬標的が異なり、たとえ薬剤開発できても耐性化する懸念が付きまとう。その結果、抗ウイルス治療薬の充足率は決して高くない。一方でどんなウイルスでも宿主細胞の細胞内小器官を借用しなければ複製できない。従ってウイルス複製に必須となる分子機構の理解、あるいはこれを阻害する因子が同定できれば、汎用性の高いウイルス治療薬の開発標的になり得る。

## 2. 研究の目的

マクロファージなどの免疫細胞はウイルスを認識すると、様々な抗ウイルス蛋白質を発現させて、ウイルスを排除しようとする。近年このような抗ウイルス蛋白質として、酸化コレステロールである 25 ヒドロキシコレステロール(25OHC)の合成酵素(コレステロール-25 ヒドロキシラーゼ CH25Hase)が報告された。ウイルスによりマクロファージ内で CH25Hase の発現が誘導されるのだが、これによって 25OHC が爆発的に産生される。これまでの研究からこの 25OHC は宿主細胞の生存に影響を与えずに、様々なウイルスの複製を抑制することが見出されている。こうした知見は、ウイルスに対して選択性の高いウイルス複製抑制因子として、25OHC が働くことを示唆している。本研究では、25OHC による抗ウイルス機構を解明し、新たなウイルス治療薬開発の基盤とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

25OHC が抗ウイルス活性を発揮する際、真核細胞翻訳開始因子 2 キナーゼ 4

EIF2AK4 を介した翻訳制御因子 eIF2 のリン酸化が起きることを、これまでに明らかにしている。EIF2AK4 は酸化ストレスやアミノ酸枯渇時に活性化するキナーゼであり、活性化すると、ストレス応答遺伝子の発現に影響を与えることが知られている。本研究では、培養マクロファージ細胞を用いて、下記の三点に関する研究を行った。

- (1) 25OHC による eIF2 のリン酸化によって細胞内にどのような応答が引き起こされるのか検討した。
- (2) 25OHC 以外の酸化コレステロールでは eIF2 のリン酸化が起こらなかったことから、25OHC に対して特異的な受容機構の存在が示唆される。そこで 25OHC を受容し、EIF2AK4 の活性化に繋げる因子を同定するために、既知 25OHC 結合蛋白質の関与を、阻害剤や siRNA などを用いて検討した。
- (3) 25OHC が EIF2AK4 を活性化させるなら、ストレス応答遺伝子の発現に影響を与える可能性が高い。そこで 25OHC によるストレス応答遺伝子の発現への影響を調べた。またもしその発現に影響があるなら、その分子機構の解析を試みることにした。

## 4. 研究成果

- (1) 25OHC による eIF2 のリン酸化は翻訳停止に伴う蛋白質合成の全般的な抑制を引き起こすことを明らかにした。
- (2) 25OHC を受容し、EIF2AK4 の活性化に繋げる因子としてある G 蛋白質共役受容体の関与を明らかにした。また 25OHC による eIF2 のリン酸化には EIF2AK4 とは別のキナーゼも関わり、その分子機構にユビキチン-プロテアソーム系が関与する事を明らかにした。
- (3) 25OHC によって様々なストレス応答遺

伝子の発現が増加することを明らかにした。またこの分子機構として、ATF4, NRF などの転写因子がマスターレギュレーターとして働き、ストレス応答遺伝子の発現誘導に繋がる事を明らかにした。

以上の結果は、250HC による抗ウイルス機構を解明するばかりでなく、これを基盤とした新たなウイルス治療薬開発において、有望な創薬標的を提示するものである。また従来は主に栄養学的な側面からしか語られてこなかったコレステロール代謝が、生体防御機構にも関わるといふ新たな生理機能を提起することにも繋がり学術的にも意義深いと考えられる。

#### 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 9 件)

Norihito Shibata, Katsunori Nagai, Yoko Morita, Osamu Ujikawa, Nobumichi Ohoka, Takayuki Hattori, Ryokichi Koyama, Osamu Sano, Yasuhiro Imaeda, Hiroshi Nara, Nobuo Cho, Mikihiko Naito

Development of protein degradation inducers of androgen receptor by conjugation of androgen receptor ligands and inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 査読有, 2017, *In press*,

Doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00168.

Norihito Shibata, Naoki Miyamoto, Katsunori Nagai, Kenichiro Shimokawa, Tomoya Sameshima, Nobumichi Ohoka, Takayuki Hattori, Yasuhiro Imaeda, Hiroshi Nara, Nobuo Cho, Mikihiko Naito

Development of protein degradation inducers of oncogenic BCR-ABL protein by conjugation of ABL kinase inhibitors and IAP ligands. *Cancer Science*, 査読有, 2017, *In press*,

Doi: 10.1111/cas.13284.

Nobumichi Ohoka, Katsunori Nagai, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Hiroshi Nara, Nobuo Cho, Mikihiko Naito

SNIPER(TACC3) induces cytoplasmic vacuolization and sensitizes cancer cells to Bortezomib. *Cancer Science*, 査読有, 2016, 108, 1032-1041.

Doi: 10.1111/cas.13198.

Nobumichi Ohoka, Keiichiro Okuhira, Masahiro Ito, Katsunori Nagai, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Osamu Ujikawa, Kenichiro Shimokawa, Osamu Sano, Ryokichi Koyama, Hisashi Fujita, Mika Teratani, Hirikazu Matsumoto, Yasuhiro Imaeda, Hiroshi Nara, Nobuo Cho, Mikihiko Naito

*In Vivo* Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 2017, 292, 4556-4570.

DOI: 10.1074/jbc.M116.768853.

Keiichiro Okuhira, Takuji Shoda, Risa Omura, Nobumichi Ohoka, Takayuki Hattori, Norihito Shibata, Yosuke Demizu, Ryo Sugihara, Asato Ichino, Haruka Kawahara, Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Masaaki Kurihara, Susumu Itoh, Hiroyuki Saito, Mikihiko Naito

Targeted Degradation of Proteins Localized in Subcellular Compartments by Hybrid Small Molecules. *Molecular Pharmacology*, 査読有, 2017, 91, 159-166.

DOI: 10.1124/mol.116.105569.

Yosuke Demizu\*, Norihito Shibata\*, Takayuki Hattori, Nobumichi Ohoka, Hiromi Motoi, Takashi Misawa, Takuji Shoda, Mikihiko Naito, Masaaki Kurihara

Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an derivative and a cIAP1 ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 2016, 26, 4865-4869.

\*These authors are equally contributed.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.09.041.

Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Takayuki Hattori, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Masaaki Kurihara, Mikihiko Naito

Molecular Design, Synthesis, and Evaluation of SNIPER(ER) That Induces Proteasomal Degradation of ER. *Methods in Molecular Biology*, 査読有, 2016, 1366, 549-560.

DOI: 10.1007/978-1-4939-3127-9\_42.  
Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata,  
Takayuki Hattori, Mikihiro Naito  
Protein Knockdown Technology:  
Application of Ubiquitin Ligase to  
Cancer Therapy. *Current Cancer Drug  
Targets*, 査読有, 2016, 16, 136-146.  
DOI:  
10.2174/1568009616666151112122502.  
Norihito Shibata, Nobumichi Ohoka,  
Yusuke Sugaki, Chiaki Onodera, Mizuho  
Inoue, Yoshiyuki Sakuraba, Daisuke  
Takakura, Noritaka Hashii, Nana  
Kawasaki, Yoichi Gondo, Mikihiro  
Naito  
Degradation of stop codon  
read-through mutant proteins via the  
ubiquitin-proteasome system causes  
hereditary disorders. *Journal of  
Biological Chemistry*, 査読有, 2015,  
290, 28428-28437.  
DOI: 10.1074/jbc.M115.670901.

〔学会発表〕(計 7件)

柴田識人、永井克典、森田陽子、宇治川  
治、大岡伸通、服部隆行、今枝泰宏、奈  
良洋、長展生、内藤幹彦  
プロテインノックダウン法を利用した  
アンドロゲン受容体タンパク質分解誘  
導剤の開発  
日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24  
日～27 日、仙台  
柴田識人、大岡伸通、服部隆行、内藤幹  
彦  
発がん因子 BCR-ABL を分解する低分子  
化合物の開発  
第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10  
月 6 日～8 日、横浜  
柴田識人、大岡伸通、服部隆行、橋井則  
貴、斎藤臣雄、近藤恭光、石井明子、長  
田裕之、内藤幹彦  
BCR-ABL 蛋白質分解誘導剤開発を指向  
した BCR-ABL 結合化合物の探索  
日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26  
日～29 日、横浜  
柴田識人、大岡伸通、権藤洋一、内藤幹  
彦  
終止コドンリードスルー変異による蛋  
白質のユビキチン-プロテアソーム依  
存的な分解はある種の遺伝性疾患の原因  
となりえる  
第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10  
月 8 日～10 日、名古屋  
柴田識人、大岡伸通、櫻庭喜行、権藤洋  
一、内藤幹彦  
終止コドンリードスルー変異によるユ  
ビキチン-プロテアソーム系を介した蛋  
白質の不安定化  
日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25

日～28 日、神戸  
柴田識人、大岡伸通、櫻庭喜行、権藤洋  
一、内藤幹彦  
終止コドンリードスルー変異によるユ  
ビキチン-プロテアソーム系を介した蛋  
白質の不安定化  
Symposium for young ubiquitin  
researchers in Japan “New Era in the  
Ubiquitin Research”、2014 年 11 月 10  
日～12 日、京都  
柴田識人、大岡伸通、権藤洋一、内藤幹  
彦  
終止コドンリードスルー変異によるユ  
ビキチン-プロテアソーム系を介した蛋  
白質の不安定化  
第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9  
月 25 日～27 日、横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 識人 (SHIBATA, Norihito)  
国立医薬品食品衛生研究所  
・ 遺伝子医薬部・主任研究官  
研究者番号：30393973