

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 24 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659036

研究課題名（和文） ラパマイシンで惹起されない新しいオートファジー機構を用いた新規薬剤スクリーニング

研究課題名（英文） Screening for compounds targeted to novel rapamycin-independent autophagic mechanism

研究代表者 小堤 保則 (KOZUTSUMI YASUNORI)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：70205425

研究成果の概要（和文）：

申請者らは、窒素源飢餓によるオートファジー誘導系に、ラパマイシンで惹起される経路の他に、惹起されない経路があることを見いだしたさらに、後者の経路もラパマイシンで惹起される経路と同程度に飢餓応答に必要な経路であることを明らかにした。ラパマイシンが免疫抑制剤、抗ガン剤さらには寿命を延ばす薬剤としても注目を集めていることから、本研究では、後者のオートファジーを惹起する物質も同様に有用なものであると考え、この物質を、新しいオートファジー機構を利用してスクリーニングする系の開発を行うために、以下の2点について研究した。

(1) 薬剤スクリーニング系の確立を目指した研究

ラパマイシンで模倣できない新しいオートファジー経路で分解されるタンパク質として酵母の細胞質にある Ypk1 に注目し、蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させ顕微鏡で観察できる系を確立した。主要な液胞（哺乳動物のリソソーム）のタンパク分解酵素を欠損させた細胞を使うことにより、薬剤添加時に、このオートファジー経路が活性化されれば、融合タンパク質が細胞質から液胞に運ばれるため、細胞質の蛍光強度が減少し、液胞の蛍光強度がすることが判定できる。また、適当な Ypk1 の断片を使うことにより、より一層観察しやすい系を確立した。また、簡便な系としては野生株を用いて SDS-PAGE 後に、western blot を行い、分解の有無で判断するシステムを確立した。

(2) セリン/スレオニンキナーゼ欠損株のスクリーニング

ラパマイシンで惹起されない経路に於ける、Ypk1 の上流のキナーゼが TORC1 と同様、セリン/スレオニンキナーゼであると仮定して、セリン/スレオニンキナーゼ欠損株のスクリーニングを行った。その結果、ある種のセリン/スレオニンキナーゼが *in vivo* あるいは *in vitro* においても Ypk1 をリン酸化することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

In this grant, we established monitoring system of rapamycin-independent autophagic protein degradation utilizing GFP-tagged Ypk1 localization change under fluorescent microscope. In this assay, inhibitory activity of compounds could be monitored by the loss of vacuolar localization of Ypk1 when vacuolar peptidase deficient strain (pep4Δ) is used.

This assay should be utilized along with primary screening system of normal protein degradation, namely Western blotting analysis after SDS-PAGE to monitor the degree of Ypk1 proteolysis. We also screened a set of yeast protein kinase mutant strains to understand the autophagic degradation of Ypk1. This screening was based on the hypothesis that intracellular signaling event is involved in the Ypk1 degradation. We have identified a pair of protein kinase that is responsible of Ypk1 phosphorylation both in vivo and in vitro. Data obtained here will be fundamentally required for future screening to target novel autophagic pathway.

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：オートファジー ラパマイシン 酵母 Ypk1 スクリーニング セリン・スレオニンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ラパマイシンは、放線菌の一種Streptomyces hygroscopicus の産物であり、当初、酵母などの真菌類の増殖を阻害する物質として見いだされた。その後、哺乳動物に対する作用が検討され、現在では、ラパマイシン及び類縁体は、免疫抑制剤、抗ガン剤さらには寿命を延ばす薬剤としても注目を集めている。ラパマイシンの作用機序は酵母を用いて研究され、ターゲットタンパク分子として、Tor (Target of rapamycin)が同定された。その後Tor は、他のタンパク質と複合体を形成していることが明らかになり、今日ではTORC1 (Tor complex)と呼ばれている (哺乳動物ではmTORC1)。これまでの研究で、TORC1 は窒素源等の飢餓応答機構のセンサーキナーゼとして機能しており、飢餓時に、TORC1 のキナーゼ活性が抑制され、そのシグナルが最終的にオートファジーのトリガーキナーゼであるAtg1 の活性化につながる事が知られている (図1)。ラパマイシンは、栄養条件下でも、TORC1 を抑制し、オートファジーの引き金を

引く物質、すなわち飢餓を模倣する物質である。

研究代表者は、酵母の増殖に必要なキナーゼであるYpk1 の分解機構を研究する中で、Ypk1 の分解が、窒素源飢餓で引き起こされるものの、ラパマイシン処理では起こらないことを見いだした(1)。

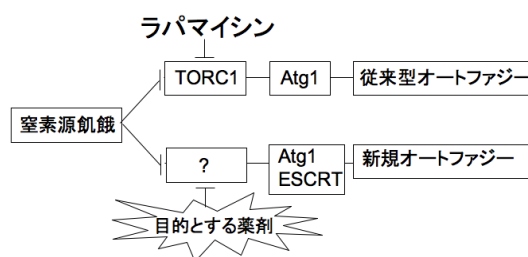


図1. 窒素源飢餓に対する二つのオートファジー経路

2. 研究の目的

Ypk1 の分解はこれまでのラパマイシンで惹起されるオートファジー機構とは異なる新たな機構によるものと考えられた (図1)。さらに、この経路にはESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport)タンパク質の一部が必要なことも明らかになった。また、飢餓時の生存にどの程度重要かを検討し

たところ、新しい経路も従来のラパマイシンで惹起される経路と同程度に飢餓時の生存に必要な経路であることが明らかになった。研究代表者らは、従来の経路でオートファジーを惹起するラパマイシンが、多彩な生理活性を有していることから、新しい経路でオートファジーを活性化する物質も同様に有用な薬剤として利用できるのではないかと考え、新しいオートファジー誘導機構を用いて、これを活性化する物質のスクリーニング系を開発することを提案した(図1)。

3. 研究の方法

スクリーニングで得られる候補薬剤は便宜上 Ypk1 の分解のみでスクリーニングすると、その作用機序は以下のいくつかの可能性が考えられる。

- (a) TORC1 に相当する目的とするターゲットに作用するもの
- (b) 液胞での分解以外で Ypk1 の発現を低下させるもの
- (c) ESCRT タンパク質に作用し Ypk1 のオートファジー分解を促進するもの
- (d) Atg1 以降の従来型のオートファジー機構も含めて促進するもの
- (e) 上記以外もの

そこで、これらをさらに詳細に検討するために、蛍光顕微鏡で阻害機構を検討できる計を樹立することが必要となる。そこで、様々な条件(遺伝子挿入、遺伝子欠損、試薬処理など)での Ypk1 細胞内局在を検討する。

一方で、別の視点からの研究として、ラパマイシンで惹起されない経路に於ける TORC1 に相当するタンパク質の探索も行う(図1の「?」の部分)。TORC1 と同じようにセリン/スレオニンキナーゼと考え、酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から、セリン/スレオニンキナーゼ欠損株を選択し、Ypk1 の分解

を指標にして、スクリーニングを行う。

4. 研究成果

条件検討の結果、GFP-Ypk1 を恒常的に発現する酵母細胞株が、細胞内局在解析に適していることを明らかとした。

しかしながら、この細胞株では、オートファジーを活性化すると、当然、GFP-Ypk1 の分解が誘導され、元々発現の弱い、つまり、分解系の阻害ではなく、発現の阻害を示す化合物との区別が付かない。そこで、GFP-Ypk1 細胞から、さらに、液胞プロテアーゼ活性化に必要な PEP4 遺伝子を破壊した、GFP-Ypk1/pep4Δ 細胞を作成した。この細胞では、新規オートファジー活性化後において、GFP-Ypk1 の液胞への蓄積が見られた。液胞分解をさらに阻害するために、プロテアーゼ阻害剤 PMSF 処理することで、液胞内部に取り込まれた GFP-Ypk1 の蛍光シグナルがさらに改善した。これらの条件が、最終的に薬剤評価するときには基盤となる情報を提供すると考えられる。一方、Ypk1 の制御に関わるプロテインキナーゼのスクリーニングにおいては、Ypk1 を特異的に認識、リン酸化するプロテインキナーゼ Dir1/2 を得た。Dir とは Deletion-mediated ISP-1 Resistance の略であり、Ypk1 によりもたらされることが分かっているスフィンゴ脂質合成阻害剤に対する耐性を、欠損することで増強するキナーゼ遺伝子の同定法として行った。

近年、TORC1 阻害作用を指標として、種々のラパマイシン類縁体が開発され、臓器移植の際の免疫抑制剤(エベロリムス)や、抗ガン剤(テムシロリムス)として承認されてきている。またラパマイシンが酵母やハエの寿命を延ばすことはこれまで報告されていたが、昨年になってマウスを使った実験でも同様の

作用があることが報告され、寿命を延ばす薬としても注目を集めている。ラパマイシンやその類縁体の作用はTORC1 阻害作用により、飢餓を模倣するものであり、飢餓が寿命を延ばすというこれまでの多くの研究と矛盾しない。このように飢餓を模倣する薬剤は多彩な作用が期待でき、今後の創薬のターゲットとして注目に値する。さらに、ラパマイシンやその類縁体の実績からすれば、本研究の成果としてスクリーニングが可能となった目的とする薬剤は有用なものになる可能性がある。

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 5 件)

(1) Adachi T, Harumiya S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Wabl M, Fujimoto M, Tedder TF
CD22 serves as a receptor for soluble IgM
Eur J Immunol. 42 (1): 241-247 (2012)

(2) Takematsu H, Yamamoto H, Naito-Matsui Y, Fujinawa R, Tanaka K, Okuno Y, Tanaka Y, Kyogashima M, Kannagi R, Kozutsumi Y
Quantitative transcriptomic profiling of branching in a glycosphingolipid biosynthetic pathway
J Biol Chem, 286 (31): 27214-27224 (2011)

(3) Abdu-Allah HHM, Watanabe K, Completo GC, Sadagopan M, Hayashizaki K, Takaku C, Tamanaka T, Takematsu H, Kozutsumi Y, Paulson JC, Tsubata T, Ando H, Ishida H, Kiso M
CD22-Antagonists with nanomolar potency: The synergistic effect of hydrophobic groups at C-2 and C-9 of sialic acid scaffold
Bioorg and Med Chem. 19 (6):1966-71. (2011)

(4) Yamamoto H, Naito Y, Okano M, Kanazawa T, Takematsu H, Kozutsumi Y
Sphingosylphosphorylcholine and

lysosulfatide have inverse regulatory function in monocytic cell differentiation into macrophages
Arch Biochem Biophys. 506 (1):83-91. (2011)

(5) Shimobayashi M, Takematsu H, Eiho K, Yamane Y, Kozutsumi Y
Identification of Ypk1 as a novel selective substrate for nitrogen starvation-triggered proteolysis requiring autophagy system and ESCRT machinery components
J Biol Chem. 285(47):36984-94. (2010)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Y. Kozutsumi, M. Tomioka, M. Shimobayashi, Y. Yamane, H. Takematsu
Involvement of sphingolipids in phosphorylation and degradation of Ypk1 in the stress response of Yeast
The 31st NAITO conference on Glycan expression and regulation[II]
Sep 13-16, 2011
Sapporo, Japan

(2) 下林 貢、富岡 真、山根ゆかり、竹松 弘、小堤保則
スフィンゴ脂質と ESCRT 複合体が関与する Ypk1 の窒素源飢餓による分解
第 53 回日本脂質生化学会 2011 年 5 月 13 日 (金) 東京

(3) Y. Naito-Matsui, H. Takematsu, K. Murata, Y. Kozutsumi
Regulatory Functions of Activation-Dependent Reduction of N-glycolylneuraminic Acid in Mouse T Cells
2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology
2011 年 11 月 10 日

シアトル (アメリカ)

[図書] (計1件)

(1) 竹松 弘, 小堤保則

スフィンゴ脂質が関わる免疫抑制とシグナル伝達

化学と生物 49 (05) (2011) 日本農芸化学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 小堤 保則 (Kozutsumi Yasunori)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 70205425

(2) 研究分担者: 山銅 ゆかり (Sando Yukari)

京都大学・大学院生命科学研究科・教務職員
研究者番号: 70359785