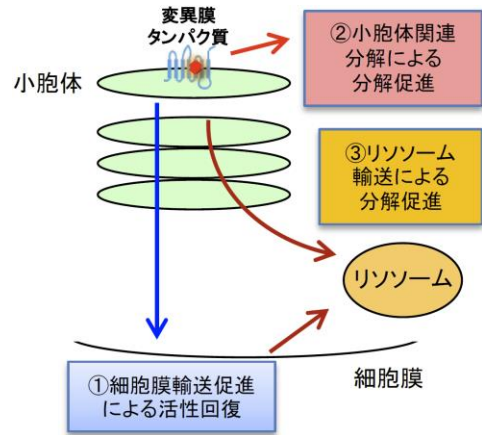


最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	異常膜タンパク質の小胞体局在化疾患の分子基盤の解明と創薬に向けた研究開発
研究機関・部局・職名	群馬大学・生体調節研究所・教授
氏名	佐藤 健

【研究目的】

小胞体品質管理機構は、新生タンパク質の糖鎖修飾、フォールディングや複合体形成が正常に行われているか精査し、正しく加工されたタンパク質のみを小胞体からそれ以降の目的地へと輸送するように分子選別を行っている。しかしながら、品質管理機構が反対に疾患を引き起こすケースが知られている。遺伝性の腎性尿崩症などでは、本来、細胞膜に存在し尿濃縮に働く水チャネル AQP2 などの膜タンパク質に変異が生じた結果、タンパク質活性を保持しているにも関わらず小胞体品質管理機構によってトラップされてしまい、重篤な疾患を引き起こすことが知られている。一方、網膜色素変性症や筋萎縮と感覚障害を呈するシャルコー・マリー・トゥース (CMT) 病では、それぞれロドプシンや PMP22 などの変異膜タンパク質が過剰に小胞体に蓄積した結果、細胞傷害性を呈することも知られている。このように変異膜タンパク質が小胞体に蓄積してしまうことが原因の疾患は多数報告されているが、可溶性領域における変異に比べ膜貫通領域に変異が生じた膜タンパク質を選別し小胞体に留めるメカニズムはほとんど明らかとなっていない。



本研究では、これらの膜貫通領域に変異をもつ疾患原因膜タンパク質の小胞体局在化機構に焦点をあて、培養細胞および線虫 *C. elegans*、マウスといった動物個体の両者を駆使してその分子メカニズムの解明と小胞体局在化を解除する薬剤の発見を目指す。これまでの研究から、変異膜タンパク質が小胞体に蓄積する疾患の原因としては、1) 活性を完全に喪失している、2) ある程度活性を保持しているにもかかわらず小胞体から輸出されない、3) 小胞体に蓄積することによって細胞機能を傷害する、の少なくとも3つの要因が考えられる。変異膜タンパク質が活性をほとんど喪失している場合は治療が困難であるが、活性を保持している場合はタンパク質を安定化させ細胞膜へと輸送させることで機能が回復する可能性がある。また、小胞体に蓄積することによって細胞傷害性を示す場合には、変異タンパク質の分解を促すことによって細胞傷害性を除去できる可能性がある。この場合、変異膜タンパク質の小胞体関連分解による分解促進もしくは変異膜タンパク質を小胞体からエスケープさせリソ

ソーム経路に送る方法が想定される。

そこで本研究課題では、まず動物培養細胞と線虫において疾患の原因となる異常膜タンパク質を発見させ、疾患モデルの構築を行う。申請者らはこれまでに出芽酵母を用いることにより、様々なタイプの小胞体膜タンパク質の局在化に働くゴルジ体膜タンパク質 Rer1p を発見し、この Rer1p が膜貫通領域に変異を持つ異常膜タンパク質などの小胞体局在化に働くことを明らかにしている。そこで、これらの動物疾患モデルを用いて異常膜タンパク質の小胞体局在化における Rer1p の役割について検討する。また、線虫を用いた遺伝学的アプローチにより、これらの異常膜タンパク質の小胞体局在化に働く新規因子の探索を行う。小胞体に過剰蓄積すると細胞傷害性を呈する PMP22 などの疾患原因膜タンパク質に関しては、その小胞体局在化に働く分子とともに分解に関与する因子も探索する。さらに、得られた関連因子についてノックアウト (KO) マウスを構築し、哺乳類個体における機能解析を行う。一方、開発した各疾患モデルを用いて疾患原因膜タンパク質を小胞体から細胞膜あるいはリソソームへとエスケープさせる、もしくは減少させる新規薬剤のスクリーニングを行い、得られた候補薬剤の作用について評価を行う。このようにしてこれまでほとんど解析されてこなかった膜貫通領域に変異を持つ膜タンパク質の局在異常による様々な疾患に遺伝学的メスを入れ、その分子基盤の解明を目指すとともに創薬に向けたライフ・イノベーションを推進する。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題は、膜貫通領域に変異を持つ疾患原因膜タンパク質の小胞体局在機構に焦点をあて、培養細胞と線虫・マウスの動物個体の両者を駆使して分子メカニズムの解明と小胞体局在化を解除する薬剤の発見を目指すものである。研究計画に沿って研究が順調に進んだと判断される。作成された Rer1p のノックアウトマウスや線虫における疾患原因となる AQP2 の G175R 変異体やそれ以外の変異体が様々に取得されており、Rer1 が疾患原因膜タンパク質の分子選別に関わる事が初めて明らかにされる一方、Rer1 非依存的な小胞体局在化機構およびゴルジ体からリソソームへの輸送についても新たな発見がなされている。目的は概ね達成され、今後の研究の進展に大きな期待が持てる。社会への貢献は大きいものと考えられることから、今後のさらなる研究の展開に期待したい。

国民との科学・技術対話については効果的に実施したが、これまで以上に研究成果をより効果的に社会に発信することが望まれる。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究課題では、線虫、動物培養細胞及び遺伝子改変マウス等を用い、疾患原因膜タンパク質の細胞内局在をモニターし、腎尿崩症をはじめとする幾つかの疾患に関して多くの種類の変異タンパク質の細胞動態を調べている。そして、①小胞体をほとんど出ないもの、②小胞体とゴルジ体をリサイクリングするもの及び③一部は細胞膜からリソゾームまで輸送されるものに分類している。さらに、小胞体から一部漏れ出るタイプではゴルジに輸送された変異タンパク質の小胞体内局在化に Rer 1 が関与していることを明らかにする一方で、Rer 1 に非依存的な小胞体局在化機構の存在も明らかにした。疾患原因膜タンパク質との相互作用を有する新規因子の確認、疾患原因膜タンパク質の小胞体における分解に関与する因子の探索も行っている。疾患モデル細胞に化合物ライブラリーを添加することによる疾患原因膜タンパク質の蛋白量、細胞内局在における化合物の一次スクリーニングを実施し、複数の候補化合物を得ている。

その後も、Rer 1 組織特異的ノックアウトマウス、新規因子の遺伝子ノックダウン等による疾患原因膜タンパク質の小胞体局在化の分子機序に対する遺伝的側面からの解明及び薬剤の二次スクリーニングによる薬理的側面からの解明を進めた。この中で Rer1 ノックアウトマウスが胎性 6.5 日で致死であったことは不運であった。しかし、コンディショナルに Rer1 遺伝子を欠損するマウスの作製を行い、このマウスから Rer1 完全 KO 胚性線維芽細胞 (MEF) を樹立して解析した結果から、変異膜タンパク質が小胞体からエスケープしてもリソゾームへと選別輸送する第 2 の品質管理機構が存在することを示唆するなど、困難な状況下で研究を進めた。これらのことも含め、概ね初期の目標を達成したと考えられる。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

Rer1 が疾患原因膜タンパク質の分子選別に関わる事が初めて明らかにされる一方、Rer1 非依存的な小胞体局在化機構およびゴルジ体からリソゾームへの輸送についても新たな発見がなされている。このような疾患原因膜タンパク質の小胞体局在化に Rer1 依存的機構が存在すること、並びに非依存的機構が存在することは未だ報告されておらず、本研究課題及びその成果は他の研究者より先んじていると考えられる。

本研究課題では、膜貫通領域に変異が生じた膜タンパク質の小胞体局在化が疾患の原因となることに加えて、その小胞体局在化の解消には幾つかの方法が存在することを証明しつつある。このことは、膜タンパク質の細胞質側あるいは小胞体内腔側における

変異の有無に焦点を当ててきた疾患原因膜タンパク質の研究に新しい概念を導入するものと思われ、今後大きなブレークスルーをもたらすことが期待される。

ゴルジ体の膜タンパク質 Rer1p の機能解析のために、ノックアウトマウスを作製する過程で、Rer1p ノックアウトが胎生致死であったことは本来の目的達成には障害になったが、細胞分化における Rer1p の新たな生理機能の存在の可能性を示すこととなったことは当初目的外の成果である。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

膜タンパク質のうち膜貫通領域に変異を持つ膜タンパク質の性質は研究が遅れており、未知の部分が多く残されている。本研究課題によって、それらの特徴のうち、特に疾患膜タンパク質の小胞体局在化の仕組みや分解の分子制御機構について、Rer1p のノックアウトマウスを用いた解析によって解明が進んだが、これらが明らかにされれば、他の神経疾患等、異なる疾患膜タンパク質の局在化・安定性の理解に大きく寄与すると思われる。さらに、変異タンパク質が異常に小胞体局在をすることで発症する幾つかの疾患の原因の遺伝子レベルでの解明に貢献することも期待できる。

これまでに完了した薬剤の一次スクリーニングおよび今後行われる二次スクリーニングが成功すれば、小胞体に異常膜タンパク質が蓄積する疾病に対し、広く有効な医薬品の創出につながる可能性がある。特に疾患タンパク質が小胞体に蓄積するタイプの、未だ根本的な治療法のない各種の難病の治療のための薬物開発においてリード化合物となるならば社会的、経済的課題の解決への多大なる寄与が期待できる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究計画はよく考えて立てられており、その計画に従って研究が進められた。研究の実施体制、マネジメント、および助成金の活用について、特に問題はない。助成金も必要に応じて使用計画を変更するなど、有効に利活用することに努められている。

また、指摘に従い、化合物スクリーニングを前倒して平成 23 年度からスタートし、一次スクリーニングを既に完了した。

Rer1 ノックアウトマウスが胎性 6.5 日で致死であったことから、組織特異的ノックアウトマウスを構築し、一定の成果をあげたことは評価できる。今後は、細胞レベル研究を優先させるため、CRISPR-Cas9 システムの構築も検討すべきと思われる。

Science をはじめとした優れたジャーナルに発表した 9 件の原著論文発表 (査読有り) がなされている。国内の学会における発表も 20 件と適切に行われている。

これまでに 4 件の「国民との科学・技術対話」を実施しており、また、所属機関主催の広報事業を利用するなど、アウトリーチ活動にも積極的に取り組んだと評価する。