

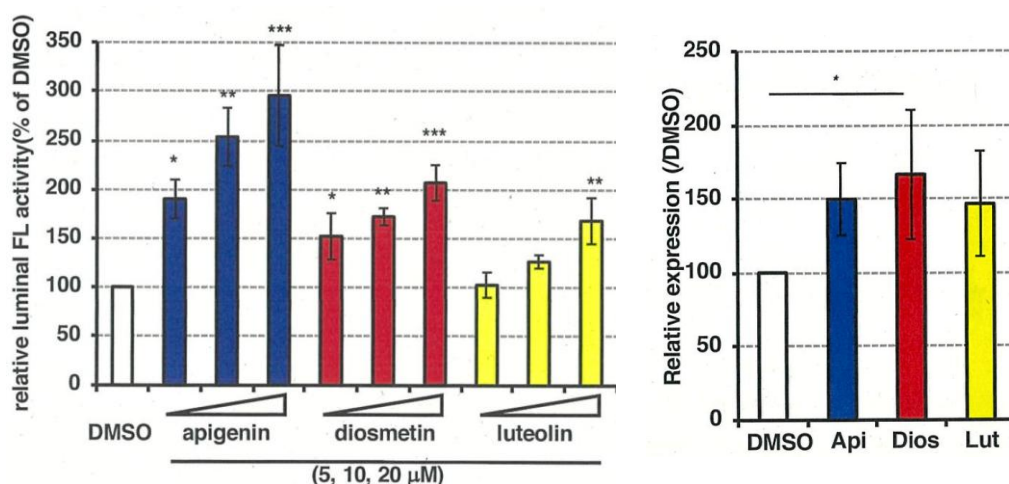
テーマ：ミスフォールドタンパク質の構造変化に基づく小胞体ストレスを改善する化合物のスクリーニング方法

■ 背景

膜タンパクや分泌タンパクは翻訳合成された後、細胞内の小胞体において正しいコンフォメーションに折り畳まれる。しかし、細胞内外からのストレスによって、小胞体内に折り畳み不完全なタンパク質が蓄積することがある。この現象は小胞体ストレスと呼ばれる。これに対してユビキチン-プロテアソーム系による異常タンパク質の分解亢進などの防御機構により小胞体への異常タンパク質の集積が軽減されるが、その処理能力以上に異常タンパク質が小胞体に集積すると、細胞の過剰なストレス応答や細胞死が起こると考えられている。このように小胞体におけるミスフォールドタンパク質の蓄積は、小胞体ストレスを惹起し、生活習慣病、感染症、神経難病など多くの疾患の危険因子又は原因として広く認識されている。そのため、小胞体ストレスの改善は疾患治療のターゲットとして注目されている。小胞体ストレスは、細胞質や核で引き起こされる抗ストレス応答、すなわちunfolded protein response (UPR)によってこれまで評価され、抗小胞体ストレス薬の評価法として最も汎用されている。しかし、UPRは核や細胞質で起こる抗小胞体ストレス応答を平均化した指標であり、必ずしもミスフォールドタンパク質の状態をリアルタイムに示す値ではなく、小胞体内ミスフォールドタンパク質の定量性とリアルタイム性を備えた評価系の報告はほとんどない。

■ ホタルルシフェラーゼを用いるスクリーニング系の構築

ホタルルシフェラーゼを小胞体内で発現させると、ほとんど分泌されることなくミスフォールド化し、小胞体ストレスを誘導する事、小胞体タンパク質のフォールディングに影響する小胞体ストレス試薬は小胞体内ルシフェラーゼ活性を誘導するという知見を得た。ホタルルシフェラーゼを強制発現させたHeLa細胞を作成し、化合物スクリーニングを行ったところ、下左図に示す様にフラボン誘導体が濃度依存的にホタルルシフェラーゼ活性を誘導すること、小胞体内ホタルルシフェラーゼ活性の上昇に相関し、ホタルルシフェラーゼの分泌効率が回復することを見出した。また、Charcot-Marie-Tooth病関連変異Myelin Protein Zeroを強制発現させたHeLa細胞にこれらのフラボン誘導体を作用させ、総タンパク質量に対する細胞表面タンパク質の相対量をデンストメトリーにより解析した結果を右図に示す。フラボン誘導体はミスフォールドタンパク質を細胞表面へ輸送させる作用があることが示唆された。



■ 企業との協働

我々が確立した新規なスクリーニング法は、小胞体内でミスフォールドタンパク生成阻害作用を持つ化合物の1次スクリーニングに適していると考えられる。なお、この方法は特許出願済である（特開2022-155258）。今後、スループット性の向上は課題ではあるが、小胞体ストレスを原因とする疾患に対する治療薬開発に向け、我々と協働して探索研究に取り組んで下さる企業を求めています。

■ 動物生命科学研究センターのホームページ

<https://rcals.jp/>