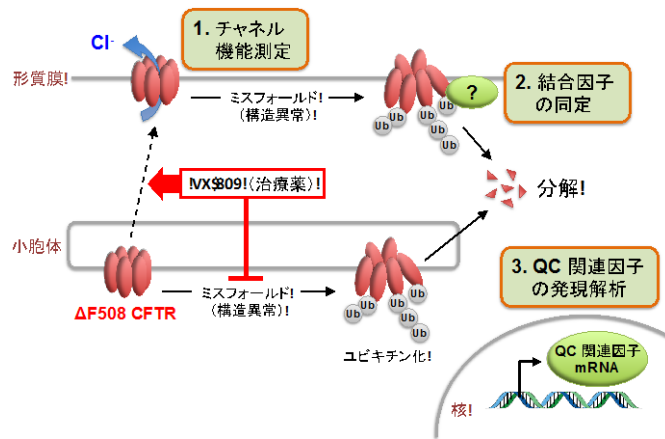


2015年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 宮田 聖子 (理工学研究科 沖米田研究室)
研究課題 異常膜タンパク質の品質管理機構の解析
研究期間 2015年4月1日～2016年2月29日
研究成果概要

異常 (ミスフォールド) タンパク質はタンパク質品質管理機構 (Quality Control: QC) により分解除去される。現在、小胞体や細胞質における QC の分子機構はよく理解されているが、形質膜 QC の分子機構は不明な点が多い。根本的な治療法がなく、致死的な遺伝病である嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis: CF) は形質膜の塩素チャンネル CFTR の変異体が小胞体および形質膜の QC により分解



されることで発病する。従って、CFTR の形質膜における QC の分子機構を解明することは、CF の根本的な治療法開発に重要である。本研究では 1) CFTR の機能評価系構築、2) CFTR 結合因子の同定法確立、3) CFTR の QC 関連因子の発現解析を行うことで上記目的の達成を目指した。

項目 1: CFTR の機能評価系構築

本項では、簡便で高スループットに CFTR 機能を評価できる系の構築を目的とした。評価系の感度の基準として ΔF508 CFTR に対する治療薬 (VX-809) の効果が検出可能であることとした。

1-1. MQAE 法

MQAE はハロゲン濃度の増加とともに蛍光強度が減少する蛍光試薬である。細胞内へ取り込ませた MQAE の蛍光強度を測定することで CFTR 機能を評価できることが知られている (West et al., *Anal Biochem.* 1996; Munkongke et al., *J Cyst Fibros.* 2004)。Doxycycline (DOX) により CFTR の発現誘導が可能である細胞 CFBEtet WT CFTR-3HA、CFBEtet ΔF508 CFTR-3HA および陰性対象である CFBEtet を 96 ウェルプレート (黒) に播種し、500 ng/ml DOX を 4 日間、10 mM MQAE (同仁化学研究所) を一晩処理した。洗浄用緩衝液で洗浄後、Γ 緩衝液で 15 分間培養し、刺激剤 (10 μM Forskolin (FSK) + 100 μM IBMX + 10 μM VX-770) 処理後の蛍光強度 (励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm) を Varioskan Flash 2.4 (Thermo Scientific) にて測定した。CFTR 発現細胞では非発現細胞に比べて蛍光強度が増加しており、その増加は CFTR 阻害剤によって抑制された。しかし、VX-809 (3 μM) による ΔF508 CFTR の機能増加は検出されなかった。よって、本法により CFTR 機能を測定することは可能であるが、その感度は不十分であることが示唆された。

1-2. YFP 法

2-1 と並行して、アニオンにより消光する EYFP H148Q/I152L (以下 EYFP*) を用いた CFTR の機能測定系 (Galiotta et al., *FEBS Lett.* 2001) の構築を進めた。EYFP* 遺伝子 (Addgene) をサブクローニングし pENTRY-EYFP* を作製後、Gateway 法によりレンチウイルスベクター pLX303-EYFP* を作製した。本ベクターを用いてレンチウイルスを作製し、CFBEtet WT CFTR-3HA 細胞、CFBEtet

Δ F508 CFTR-3HA 細胞および陰性対象である CFBEtet 細胞に感染させ、EYFP* 安定高発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いて WT CFTR の機能は測定できたが、 Δ F508 CFTR の機能は検出できなかった。FACS を用いて CFTR と EYFP* の共発現細胞を濃縮したが、結果は改善されなかった。そこで、熱安定性を高めた EYFP* F46L (Veit et al., *Sci Trans Med.* 2014) の安定高発現細胞株を樹立した。その結果、蛍光強度は約 10 倍増加したが、 Δ F508 CFTR に対する VX-809 (3 μ M) の効果は検出されなかった。そこで、Dr. G. L. Lukacs から単一クローン化した CFBEtet WT CFTR-3HA EYFP* F46L と CFBEtet Δ F508 CFTR-3HA EYFP* F46L 細胞を分与頂き、測定を行った。細胞を 96 ウェルプレート (黒) に播種し、500 ng/ml DOX を 4 日間処理後、洗浄用緩衝液で洗浄した。バックグラウンド値を測定後、刺激剤 (10 μ M FSK + 250 μ M IBMX + 250 μ M cpt-cAMP + 50 μ M Genistein) を添加し 60 秒後に Γ 緩衝液を添加した。蛍光強度 (励起波長 500 nm、蛍光波長 535 nm) の測定は 0.2 秒間隔で 32 秒間 Varioskan Flash 2.4 を用いて行った。その結果、VX-809 (3 μ M) による Δ F508 CFTR の機能増加が検出された。また、低温培養によるレスキュー効果および siRNA を用いた QC 関連候補因子の影響も評価可能であることを確認した。

項目 2 : CFTR 結合因子の同定法確立

BioID 法は大腸菌由来のビオチン化酵素 BirA R118G (以下 BirA*) を標的タンパク質に融合させ、標的タンパク質に結合する因子をビオチン化する方法である (Roux et al., *Curr Protoc Protein Sci.* 2013)。本項では CFTR 結合因子の網羅的解析に使用できる BirA* 融合 CFTR 安定高発現細胞株の樹立を目的とした。

2-1. CFTR-BirA* ベクターの作製

Gateway 用のデスティネーションベクター pLX304-Linker-BirA*-HA をサブクローニングにより作製し、Gateway 法により 3 種の CFTR (WT, Δ F508, T70) それぞれのレンチウイルスベクター pLX304-CFTR-Linker-BirA*-HA を作製した。各 CFTR の発現およびビオチン化能は COS7 細胞にトランスフェクション後、ウエスタンブロット及び免疫蛍光染色で検出することにより確認した。

2-2. CFTR-BirA* 安定高発現細胞株の樹立

1-1 のベクターを用いて作製したレンチウイルスを CFBE 細胞に感染させ、安定高発現細胞株の樹立を試みたが、選択培地により全ての細胞が死滅した。レンチウイルス感染後の CFBE 細胞を抗 HA 抗体を用いた免疫蛍光染色法により解析した結果、CFTR の発現が確認できなかったため、レンチウイルスがうまく調製できていない可能性が考えられた。そこで、レンチウイルス調製時の条件を改良 (導入 DNA 量の増加および遺伝子導入試薬の変更) したところ、CFTR-BirA* 安定高発現細胞株の樹立に成功した。樹立した細胞は CFTR 結合因子の網羅的解析に使用する予定である。

項目 3 : CFTR の QC 関連因子の発現解析

本項では CFTR の QC 関連候補因子の遺伝子発現解析を目的とし、定量的 PCR 法を用いた解析を行った。測定および解析には LightCycler 480 (Roche) を用いた。これまでに 34 ペアのプライマーに対する検量線を作製し、27 標的遺伝子の解析が可能であることを確認した。CFBEtet Δ F508 CFTR-3HA 細胞が種々のストレス条件 (小胞体ストレス、炎症誘導、酸化ストレス、熱ショック、飢餓ストレス) に晒された際の QC 関連候補因子の発現変化を mRNA レベルで解析した。その結果、特定のストレス条件下において発現が増加する QC 関連候補因子を同定した。また、半定量的 PCR 法を用いて、CFBE 細胞におけるいくつかの QC 関連候補因子サブタイプの発現パターンを解析することにも成功した。