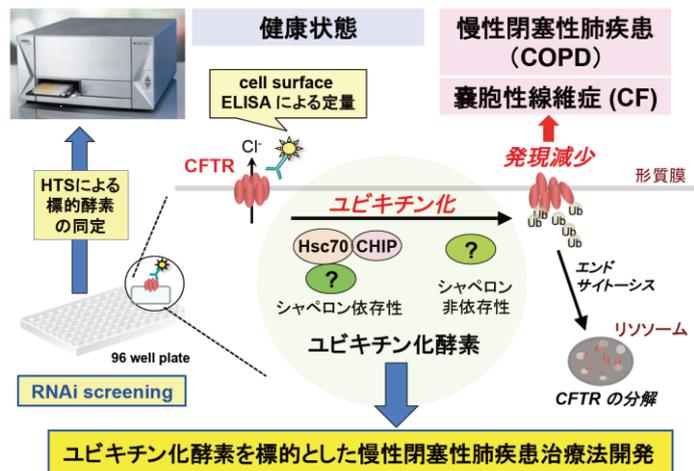


閉塞性肺疾患に関わる膜タンパク質の発現制御機構

関西学院大学 理工学部 生命科学科 生命医化学専攻 沖米田研究室
沖米田 司

1. 背景, および, 研究目的

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) はタバコ煙などの有害物質の暴露により生じる肺の慢性炎症性疾患である。現在, 全世界で約8000万人の患者が存在し, 対症療法が行われているが, 毎年約300万人の患者が死亡している。COPDは今後10年間で約30%増加することが予測されており, 今後さらなる社会問題に発展する可能性が高い。従って, COPDの予防薬や新規治療薬の開発は急務である。近年, COPD のリスク因子として形質膜タンパク質であるCFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) が報告された。CFTR は肺などの上皮細胞のアピカル膜に発現し, 塩素イオンチャネルとして機能する。CFTR の遺伝子変異 ($\Delta F508$ 変異) は白色人種間で頻度が高い遺伝性疾患であり, COPDと同じく慢性感染症および致死性の呼吸器不全を引き起す嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis : CF) の原因となる。CFTR は気道上皮のイオンおよび水輸送を制御し, 正常な粘液産生, 気道クリアランスの維持および感染防御に重要である事, さらに, CFTR の形質膜発現の減少は COPD や CF 病態発症に関連する事から, CFTR の形質膜発現を増大させる事はこれらの難治性閉塞性肺疾患の根治療法になる可能性がある。そこで, 本研究では難治性閉塞性肺疾患の治療標的分子の同定を究極的な目的とし, RNA干渉 (RNAi) スクリーニング法により閉塞性肺疾患関連膜タンパク質 CFTR の膜発現・機能を制御する分子, 特に, その膜発現量を規定するユビキチン化酵素の同定を目指すために, CFTR の形質膜発現量を簡便に定量する評価系の確立を行った。



2. 方法

1. Cell surface ELISA 法を利用した形質膜 CFTR 発現の簡便定量法の確立

CFTR および大部分の CF 患者で見られる $\Delta F508$ -CFTR 変異体の形質膜発現を簡便に, また, 特異的に検出するために, CFTR の細胞外ドメインにエピトープタグ (HA tag) を導入した CFTR-HA を組換えレンチウイルスベクター (Lenti-X, Clontech) を用いて, ヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE 細胞に恒常的に発現させた。なお, CFTR-HA の発現は Tet-ON 発現システム (Clontech) を用いた。作製した CFBE 細胞における CFTR-HA および $\Delta F508$ -CFTR-HA 形質膜発現は, 我々が以前開発した cell surface ELISA 法 (Peters KW and Okiyonedo T et al, Methods Mol Biol 2011) を用いて定量を行った。具体的には, 細胞表面の $\Delta F508$ -CFTR-HA に結合した anti-HA 抗体量を HorseRadish Peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体および HRP 蛍光基質 (Amplex Red, Invitrogen) を用いて蛍光プレートリーダーで測定した。ネガティブコントロールとして, CFTR-HA 未発現細胞, ポジティブコントロールとして, 正常な (WT) CFTR-HA 安定高発現細胞を用いた。また, コントロール実験として $\Delta F508$ -CFTR を改善するコレクター VX-809 (Selleck Chemicals) および低温培養 (26°C) の効果を検討した。siRNA screening (項目 2) を行うために, 96 ウェルプレートを用いた cell surface ELISA 法の確立, つまり, 細胞播種数, 抗体量, wash 条件, 検出基質 (蛍光または発光) の最適化を行った。

2. Δ F508-CFTR 形質膜発現を制御するユビキチン化酵素の同定

Δ F508-CFTR の形質膜発現を制御する分子、特に、 Δ F508-CFTR の分解を促進するユビキチン化酵素を同定するために、RNA 干渉 (RNAi) スクリーニングを行った。まず Qiagen FlexiPlate を用いて、約600種類のユビキチン化酵素 (E3 ligase) に対する small interfering RNA (siRNA) を選択し、custom siRNA library を作製した。96 穴プレートを用いて、リポフェクションにより siRNA library を項目 1 で作製した CFBE 細胞にトランスフェクションし、約600種類のユビキチン化酵素をそれぞれノックダウンした。なお、網羅的 siRNA スクリーニングはマギル大学生理学部ルーカックス教授との共同研究で行った。siRNA トランスフェクション条件は GAPDH siRNA と KDalert GAPDH assay kit (Ambion) を用いて最適化を行った。siRNA トランスフェクション 4-5 日後、 Δ F508-CFTR-HA の形質膜発現を項目 1 で確立した cell surface ELISA 法で定量化した。なお、ポジティブコントロールとして以前報告されている Aha1 siRNA (Wang X et al, Cell 2006) を用いた。

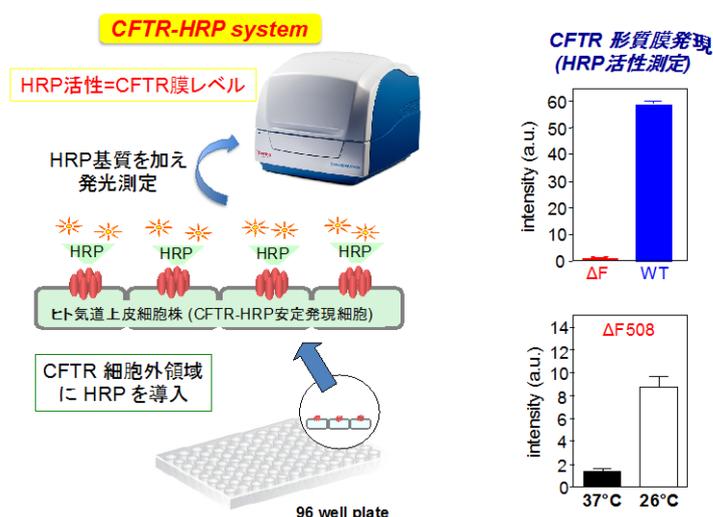
3. 結果

CFTR の細胞外ドメインに HA tag を導入した CFTR-HA を構築し、tetracycline 誘導性ヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE細胞を樹立した。96ウェルプレートでの HA 抗体を用いた ELISA 法により CFTR 膜発現の定量法を行ったが、エッジ効果などにより、データのばらつきに大きな問題が生じた。そこで、無標識で細胞表面の CFTR 発現を直接定量化するために、細胞外領域に Horse Radish Peroxidase (HRP) tag を融合した CFTR-HRP を構築し、安定発現する tetracycline 誘導性ヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE細胞を樹立した。HRP tag は HA tag と比較して、分子量が 34 kDa と非常に大きいため、CFTR の形質膜発現、膜安定性、チャネル機能などのフェノタイプに影響する可能性が懸念された。そこで、HRP tag の影響を検討するために、ELISA法、および、ヨウ素分泌実験を行った結果、HRP tag は CFTR のフェノタイプには影響しないことが確認できた。次に、 Δ F508-CFTR-HRP 発現 CFBE 細胞を用いた 96 穴プレートでの評価を行った。細胞外の HRP 活性を指標に CFTR 膜発現を評価した結果、 Δ F508-CFTR の膜発現を改善する化合物の効果を再現良く確認できた。また、ハイスループット評価系の指標となる Z' -factor も 0.6 以上であり、ハイスループットアッセイに適した評価系が確立できた。

次に、 Δ F508-CFTR-HRP 評価系を用いた網羅的ユビキチンリガーゼ siRNA スクリーニング (600 種類) をマギル大学生理学科 ルーカックス教授との共同研究により実施した。その結果、 Δ F508-CFTR 変異体の形質膜発現を阻害するユビキチンリガーゼ候補分子を約 40 種類同定した。現在、同定した複数の候補分子のバリデーションを行っている所である。

4. まとめ

本研究により、嚢胞性線維症の原因となる Δ F508-CFTR 変異体の形質膜発現を阻害するユビキチンリガーゼ候補分子を約40種類同定した。今後、2次スクリーニングにより、CFTR 特異的に形質膜発現を制御するユビキチンリガーゼを同定することで、遺伝性の慢性閉塞性肺疾患である嚢胞性線維症の新規治療標的分子の同定を目指す。また、肺の生活習慣病であり、環境因子による CFTR 膜発現・機能低下が起こる慢性閉塞性肺疾患 (COPD) においても、CFTR 特異的ユビキチンリガーゼは、新規治療標的分子となる可能性がある。今後、ユビキチンリガーゼ阻害薬探索を通じて、全世界で約8000万人の患者が存在する難治性慢性閉塞性疾患の新規治療戦略の開発に貢献したい。



5. 参考文献

1. Okiyoneda T, Barrière H, Bagdány M, Rabeh WM, Du K, Höhfeld J, Young JC, Lukacs GL. Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*. (Article) 2010 Aug 13;329(5993):805-10.
2. *Peters KW, *Okiyoneda T (*equal contribution), Balch WE, Braakman I, Brodsky JL, Guggino WB, Penland CM, Pollard HB, Sorscher EJ, Skach WR, Thomas PJ, Lukacs GL, Frizzell RA. CFTR Folding Consortium: methods available for studies of CFTR folding and correction. *Methods Mol Biol*. 2011;742:335-53.
3. Okiyoneda T, Apaja PM, Lukacs GL. Protein quality control at the plasma membrane. *Curr Opin Cell Biol*. (Review) 2011 Aug;23(4):483-91.
4. Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, Roldan A, Verkman AS, Kurth M, Simon A, Hegedus T, Beekman JM, Lukacs GL. Mechanism-based corrector combination restores $\Delta F508$ -CFTR folding and function. *Nat Chem Biol*. 2013 Jul;9(7):444-54