HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	核酸を用いた迅速な標的探索手法の確立と新規抗菌剤に関する研究
Author(s)	前川, 和彦
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第6997号
Issue Date	2016-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6997
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62466
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuhiko_Maekawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

核酸を用いた迅速な標的探索手法の確立と新規抗菌剤に関する研究

前川　和彦

北海道大学大学院生命科学院

2016 年 6 月

目 次

緒論 …… 5
参考文献

本論

第一章　ヒト好塩基球からの鍵分子を起点とした抗アレルギー薬の標的探索
（1）高親和性 IgE 受容体 β 鎖のクローニング
1. 序論 …… 7
2. 試験材料および方法 …… 8
3. 結果と考察 …… 12
4. まとめ …… 17
参考文献
（2）新規チロシンフォスファターゼ PTP-BAS のクローニング
1. 序論 …… 19
2. 材料と方法 …… 19
3. 結果 …… 21
4. 考察 …… 28
第一章のまとめ …… 30
参考文献

第二章　siRNA を用いた表現型スクリーニングによる抗癌剤標的探索
1. 序論 …… 35
2. 実験条件 …… 36
3. 実験結果 …… 39
4. 考察 …… 58
第二章のまとめ …… 64
参考文献

第三章　核酸を用いた抗菌標的の迅速な探索手法の確立と新規抗菌剤の開発
1. 序論 …… 67
2. 実験条件 …… 69
3. 実験結果 …… 70
4. 考察 …… 79
第三章のまとめ …… 80
参考文献

結論 …… 83
参考文献
謝辞

略号

AmNA: amido-bridged nucleic acid
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
CFU: colony forming units
dCTP: deoxycytidine triphosphate
DDS: drug delivery system
DEPC: Diethylpyrocarbonate
D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA: deoxyribonucleic acid
dsDNA: double strand deoxyribonucleic acid
EPR: enhanced permeability and retention
EST: expressed sequence tag
FACS: fluorescence-activated cell sorter
FCS: fetal calf serum
FIC: first in class
IgE: immunoglobulin E
iPS 細胞: Induced Pluripotent Stem cells
IPTG: Isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside
KIF: kinesin family member
KO mouse: knock out mouse
LNA: Locked Nucleic Acid
MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization –time of fright
PCR: polymerase chain reaction
PMA: peptide morpholino acid
PNA: peptide nucleic acid
PTK: protein tyrosine kinase
PTPase: protein tyrosine phosphatase
RACE: Rapid Amplification of cDNA End
RNA: ribonucleic acid
RNAi: RNA interference
RNase: ribonuclease
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SH2: src homology 2
SH3: src homology 3
TAR syndrome: Thrombocytopenia-absent radius syndrome

核酸を用いた迅速な標的探索手法の確立と新規抗菌剤に関する研究

緒論

医療技術の発達、特に治療のために新しく開発された薬剤は多くの病気から命を救ってきた。しかしながら現代においても、まだ根治に至らない病は多く残っており、新たな薬が待たれている状況に変わりはない。アスピリンに心筋梗塞の予防という思わぬ薬効が発見されたように[1]、既存薬が新たな治療薬となる例も最近は増えているが、最も期待されているのは、First in class（FIC）と呼ばれる新しい作用機序による新薬である。FIC 新薬の創製には、近年、標的を意識しない、細胞株をつかった表現型スクリーニングのような手法[2]も再び使われるようになってきているが、やはり多くの場合は、新しい創薬標的の発見から始まる。

しかしながら、新規標的を合理的に探索する手法は確立されていない。最近の例では癌免疫治療薬の標的として見つかった PD-1[3,4]のように、地道な基礎研究の過程で偶然に見つかることが多く効率が高いとは言えない。加えて、研究によく利用される細胞株などを使った実験で創薬標的候補が見つかっても動物では薬効不足であったり、深刻な副作用懸念が見つかったりすることで候補から落ちてしまい、実際の創薬に結びつく確率は極めて低くなっている。このような極めて低い成功確率と、研究を開始してから上市されるまでに長い時間を要することが FIC 新薬の創製を難しくさせている。

一方で、近年の科学の進歩による朗報もある。ヒトゲノムの解明や RNAi の発見により RNAi ライブラリーを用いた網羅スクリーニングが可能となった。また、創薬標的として従来は不適であった蛋白質と蛋白質の相互作用の阻害も、細胞外のものに対しては抗体医薬の登場で可能となった。核酸医薬など新たな創薬手法も登場してきて、狙える標的の幅は増加しつつある。

本研究では、これらの技術の進歩を取り入れながら、FIC 新薬の創薬の起点となる、新規創薬標的の迅速かつ合理的探索手法の確立を目的とする。

第一章では、アレルギーにおける FcεRI のような鍵分子を起点とした、現代では古典的となった標的探索手法についてまとめた。この手法は、たとえば、まだよい細胞株がない神経系の標的探索では現代でも現役であるが、シグナル伝達系をたどっていくという事自体が難しく、結果的に新しい創薬手法のデザインへと展開するための序章となった。第二章では、近年利用可能となった siRNA ライブラリーや DNAChip を利用した創薬手法の構築と探索結果について述べた。この手法は iPS 細胞[5]などの利用で従来は難しかった種々の細胞株が大量に手に入るようになり、非常に有用で様々な新規創薬標的候補が見つかる。一方で、細菌感染症の治療のように、病原体を創薬標的とせねばならない場合には使えない。第三章では、そのための手法としてゲノム情報を直接利用可能で、標的の選択の自由

度が高く、かつ薬効検証が迅速であるアンチセンス核酸を選択し、細菌での創薬標的評価法の検討について述べた。

本研究によって、FIC 新薬の創薬を開始するための迅速かつ合理的な標的探索法が確立できた。

参考文献

[1] Juul-Moller, S., Edvardsson, N., Sorensen, S., Jahnmatz, B., Rosén, A., & Omblus, R. (1992). The Lancet, 340, 1421-1425.

[2] Zanella, F., Lorens, J. B., & Link, W. (2010) Trends in biotechnology, 28, 237-245

[3] Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H.,Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C.R. and Honjo, T. (2000). J. Exp. Med., 192, 1027-1034.

[4] Okazaki, T., & Honjo, T. (2007) Int. immunology, 19, 813-824.

[5] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007) cell, 131, 861-872.

第一章

ヒト好塩基球からの鍵分子を起点とした抗アレルギー薬の標的探索

（1）高親和性 IgE 受容体β鎖のクローニング

1. 序論

疾患の発症に重要な役割を担うと考えられる細胞を探し当て、その表現型を引き起こすために鍵となる責任分子を起点として創薬を開始する手法は古くから行われてきた。現代では、第二章で述べる RNAi スクリーニングや、遺伝子連鎖解析など様々な手法で、種々の責任分子が見出されているが、それ以前は、責任分子は偶然的な発見か、生化学的な精製手法を駆使して苦労の末の発見であることが多く、低分子創薬が一般的な時代では責任分子としては細胞表面での受容体、および細胞内外に存在する酵素が選ばれることが多かった。現代においてもアルツハイマーなど脳機能における創薬では、このような限られた責任分子の周辺を丹念に調べる手法が使われている。

本章では、アレルギー疾患を念頭に、細胞表面での受容体を手掛かりに細胞内の酵素へと視点を移した探索について述べる。

高親和性 IgE 受容体（FcεRI）は主に肥満細胞や好塩基球に発現している。肥満細胞は主に IgE による即時型のアレルギーに関与し、好塩基球は遅発型のアレルギーに関与すると言われている。いずれの細胞においても、FcεRI に多価抗原が IgE を介して結合すると、細胞にシグナルが入りアレルギーや炎症を引き起こす媒介物質を放出し、アレルギー反応が惹起される。

FcεRI はα鎖、β鎖、そして S-S 結合で架橋された 2 つのγ鎖の 4 つのプリペプチド鎖から構成される[1,2]。ラットのα鎖[3-5]、β鎖[6]、γ鎖[7]をコードする cDNA は basophilic leukemia(RBL)細胞からクローニングされ、マウスでは３鎖とも肥満細胞株である PT18 からクローニングされた[8]。ヒトのα鎖、γ鎖は、それぞれ好塩基球細胞株 KU812 及び白血球ゲノムライブラリーからクローニングされたが[4,9]、β鎖はクローニングされていなかった。α鎖の細胞外ドメインのみで十分な IgE 結合が観察されるが[11,12]、過剰発現実験では細胞表面への FcεRI の発現[8,13]、および細胞内へのシグナル伝達にはラットおよびマウスのβ鎖は必須である[14]。きちんと機能を持ったヒト FcεRI を細胞上に発現させ、機能解析を進めるためには、ヒトβ鎖のクローニングが必要であった。現代では、このような場合、EST やゲノム配列の DB に対し、ラットやマウスのβ鎖の配列をキーとして相同性検索を行うことで、候補となる分子を見つけることが出来るが、当時はまだヒトゲノム

が解明されていなかったため、PCR を組み合わせて cDNA 全長のクローニングを行う必要があった。

ヒトの肥満細胞は現代においても入手しがたく、一方で、好塩基球も全血球の中でも１％以下の存在率であるため、クローニングの材料として直接使うことができない。本研究では、ヒト臍帯血より分離し、分化させた好塩基球と、ヒト好塩基球細胞株である KU812[15]を材料に実験を行った。マウスやラットでクローニングされたβ鎖の配列を参考に PCR を行う事でヒトβ鎖の中央部分のクローニングを最初に行い、その配列を足掛かりに 3‘端部分を増幅し、最後に 5‘端部分を新たに開発した PCR walking 法で増幅することで全長配列を決定した。

2. 試験材料および方法

2.1. 細胞培養

ヒト臍帯血から単離した単球から文献[16]に示されたように好塩基球を分化させた。すなわち、ヒト臍帯血から Ficoll-Paque (1.077 mg/ml: GE ヘルスケア)を用いて単球を単離し、$2x10^6$ cells/ml の濃度で 10% fetal calf serum、0.05mM 2-merucaptoethanol、2mM L-glutamine、抗生物質（100u /ml penicillin、0.05mg/ml streptomycin、0.025mg/ml gentamycin）及び 200u/ml recombinant human IL-3(Genzyme, Boston, MA)を含む RPMI 1640 培地にて２～４週間培養した。この細胞（15～30%の細胞が FcεRI 陽性）を RNA 単離に用いた。

2.2. RNA の単離

Total RNA は約 10^7個の培養細胞から acid guanidium-phenol-chloroform 法[17]によって単離した。mRNA は約 10^7個の培養細胞から QuickPrep mRNA Purification Kit（GE ヘルスケア）を用いて単離精製した。

2.3. オリゴ核酸合成

オリゴ核酸は DNA 合成機（CYCLONE, MilliGen, Bedford, MA）にて合成し、Oligo-Pak column（MilliGen）を使って精製し PCR や塩基配列決定のプライマーとして用いた。主な PCR プライマーは Fig.1-3 に表示してある。EB と数字で名前が構成されるプライマーはラット及びマウスのβ鎖 cDNA と相同なように設計してある。EBH と数字で名前が構成されるプライマーはヒトβ鎖 cDNA と同一（奇数）もしくは相補的（偶数）な配列を持っている【Fig.1-4】。NPA5 プライマー【5’-GACTAGTTCTAGATCGCG-3’】、NPA3 プライマー【5’-AGCGGCCGCCCTTTTT-3’】は NotI Primer-Adapter (Cat.No.8248SA,A1:Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD)のそれぞれ 5’端部分と中央部分に同一の配列。CaN_7 プライマーはユニーク配列 （Ca, 5’-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3’）の後にランダムヘプタマー（N_7）配列を持っている。Ca1 及び

Ca2 プライマーはそれぞれユニーク配列（Ca）の 5'側半分、3'側半分に相当する配列を持っている。

2.4. PCR

2.4.1. β 鎖 cDNA の中心部分の増幅

Oligo(dT)$_{15}$（Boheringer, Mannheim, Germany）をプライマーとして、単離した total RNA から first strand cDNA 合成を M-MLV reverse transcriptase (BRL)を用いて行った。こうして合成した first strand cDNA を鋳型にして EB1 および EB6 プライマーを用いて PCR でアミノ末端側の細胞内ドメイン（IC）部分から膜貫通ドメイン 4（TM4）の部分までが増幅された。PCR の条件は total RNA2.5μg 分相当の cDNA を鋳型に各 100 pmol のプライマーを 100μl の溶液【各 20 pmol　NTPs、2.5U AmpliTaq DNA polymerase (Cetus →Perkin Elmer, Norwalk, CT)を含む】に添加し、94℃1 分、60℃1 分、72℃1 分 30 秒のサイクルを DNA Thermal Cycler (Cetus)で 30 回繰り返すことで行った。増幅された cDNA 断片は 2.5% agarose gel にて電気泳動し精製した。

2.4.2. β 鎖 cDNA の 3'末端部分の増幅

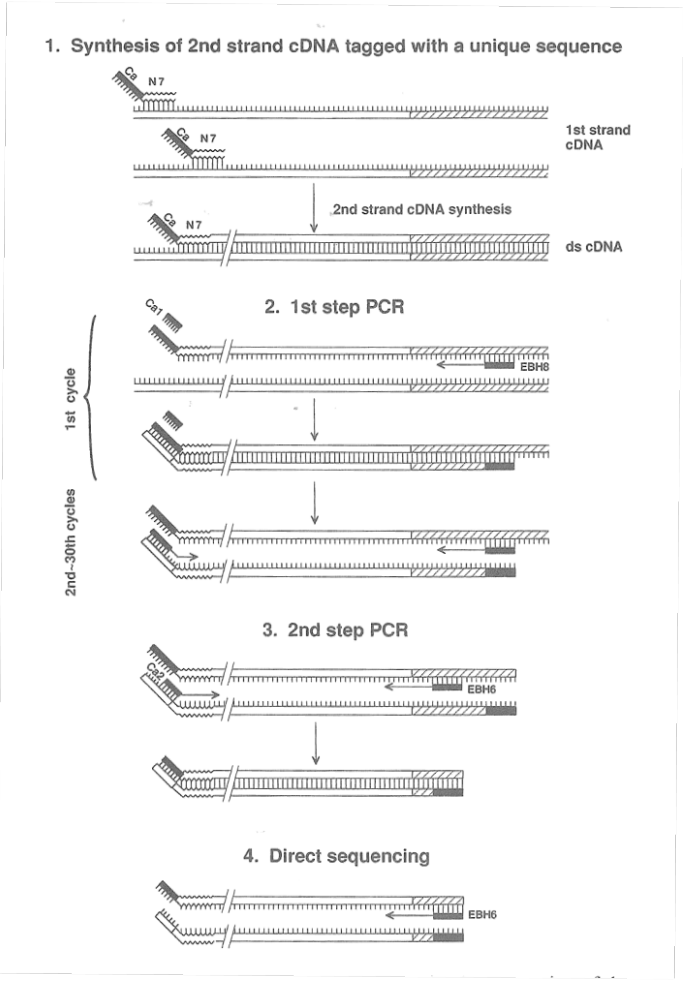
first strand cDNA 合成は、NotI Primer-Adapter をプライマーとして、単離した m RNA から SuperScript RT (BRL) を逆転写酵素として用いて行った。5' 端に NotI Primer-Adapter のユニーク配列を持った first-strand cDNA を鋳型にして TM4 のカルボキシ末端部分から polyA 領域までを改良 2step PCR[18]で増幅した。すなわち、mRNA で 0.14μg 相当の first-strand cDNA を用い、2.4.1.で記述した方法に以下の 2 点の変更を加えて増幅した。

①100 pmol ではなく 10 pmol の EBH7 と NPA5 プライマーを用いた。②反応は 94℃1 分、50℃1 分、72℃3 分を 25 サイクル繰り返し、その反応液 1μl 分を 100 pmol の EBH5 と NPA3 プライマーを含む新たな 100μl に加え、今度は 30 サイクル増幅反応を繰り返した。増幅された cDNA 断片は 2.5% agarose gel にて電気泳動し精製した。

2.4.3. β 鎖 cDNA の 5'末端部分の増幅

我々が新たに開発した 5'部分の未知配列への PCR walking 法の概要を【Fig.1-1】に示す。second-strand 合成反応は AmpliTaq DNA polymerase（Cetus）を用いて 2.4.1 にて記述した first-strand cDNA を鋳型にして行った。その際 CaN7 を walking プライマーとして用いた。すなわち、混合液を 94℃10 分、37℃30 分、37→72℃30 分、72℃30 分の順に Thermal Cycler（Cetus)を用いて加温し、できた二本鎖 cDNA を鋳型に改良型 2 ステップ PCR[18]を用いて、IC 部分のアミノ末端領域と 5'上流側の non-coding 領域を増幅した。最初の PCR は各 10 pmol の EBH8 と Ca1 プライマーを用い、94℃1 分、55℃1 分、72℃2 分のサイクルを 30 回繰り返し、その反応液を 1μl 使い、2 回目の PCR を各 100 pmol の EBH6 と Ca2

プライマーを用いて最初の PCR と同じサイクルで増幅し、電気泳動した。



【Fig.1-1】新規 PCR walking 法によるヒト FcεRI β 鎖の 5'端側未知領域の増幅および塩基配列決定

5'端部にユニーク配列を付加したランダムな heptanucleotide（N7）の walking primer は first-strand cDNA 既知領域（斜線バー）部分の 5'端側未知領域（白抜きのバー）の色々な部分にハイブリダイズし、そこから second-strand が合成される。この様々な長さの二本鎖 cDNA をテンプレートに walking primer の 5'端部と同じ配列を持ったプライマーCa1 と、既知領域の相補鎖と同じ配列をもった EBH8 プライマーで 1 回目の PCR を行う。この一部を今度は waking primer の Ca1 より更に 3'端側の配列をもった Ca2 プライマーと、既知領域の更に 5'端側に相補的な配列を持ち EBH6 プライマーを使い 2 回目の PCR を行う。1 回目の PCR 産物を十分に希釈し、2 回目の PCR 反応液の 1 チューブに 1 コピー程度しか 1 回目の PCR 産物が入らないような条件で、かつ複数のチューブで 2 回目の PCR を行うことで、walking primer が最初にハイブリダイズした場所に応じた様々なサイズの PCR 産物が得られる。得られた PCR 産物を EBH6 プライマーでダイレクトシーケンスすることで、上流の未知領域の配列情報を得ることができる。

2.4.4. β鎖 cDNA 全体部分の増幅

2.4.2.で記述したように合成した first-strand cDNA を鋳型として用いて、改良型 2 ステップ PCR にて全コード領域の増幅を行った。すなわち、mRNA にして約 0.19μl 相当の first-strand cDNA を各 10 pmol の EBH15、EBH22 プライマーで 94℃1 分、45℃1 分 20 秒、72℃4 分のサイクルを 30 回繰り返し、反応液の 3μl を今度は各 100 pmol の EBH17 と EBH18 プライマーで、94℃1 分、55℃1 分、72℃2 分のサイクルを 25 回繰り返した。

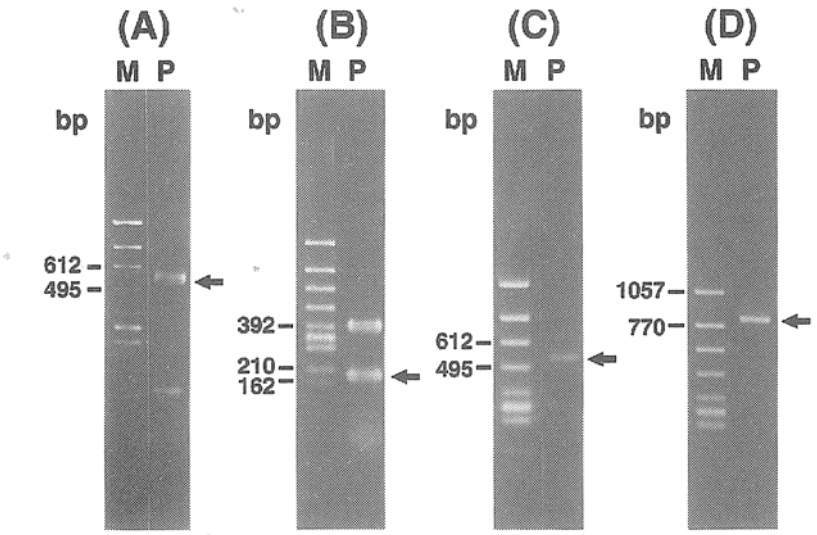
2.5. 塩基配列決定

PCR 増幅した cDNA 断片は Sequenase version2.0 (Code No. 70772, United States Biochemical, Cleveland)、[α-32P]dCTP 及び dsDNA Cycle Sequencing System (BRL)を用いてダイレクト塩基配列決定を行った。EcoRV で酵素消化した pBluescript SK(-)ベクター（Stratagene, La Jolla, CA）にサブクローニングされた cDNA 断片も SK 及び KS プライマーを用いて塩基配列決定した。

3. 結果と考察

3.1. β鎖 cDNA の主要部分の増幅と塩基配列決定

ラットとマウスのβ鎖の配列をもとにして共通配列部分から 8 つの 20mer のプライマー（EB1～8）を合成した。末尾奇数番号のプライマーがセンス鎖と同一配列、偶数のプライマーが相補配列である。これらを組み合わせて 10 回の PCR 増幅が個別に実施された。EB8 プライマーを用いた 4 つの PCR 増幅は全て失敗したが、EB1 と EB6 を組み合わせた PCR 増幅で最も大きく、妥当なサイズ（550bp）の増幅物が得られた【Fig.1-2A】。最終的に今回の研究で判明したヒトβ鎖 cDNA 配列と比較すると EB8 プライマーは 3'末端にミスマッチ【nucleotide 670 in Fig.1-4】があり、これが EB8 プライマーを用いた増幅がうまく行かなかった理由と考えられる。ヒトβ鎖の主要部分、細胞内ドメインから TM4 領域にかけての領域をコードする cDNA 増幅断片（EB1-EB6）は pBluescrit にクローニング後、または直接法で塩基配列決定された（data not shown）。



【Fig.1-2】ヒト FcεRI β 鎖の主要部分（A)、5'末端部分（B)、3‘末端部分（C）及び全長（D）の PCR 増幅： 増幅物（レーン P）は 2.5%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムにて染色した。矢印で示したバンドを切り出し、精製した。レーン M は DNA ザイズマーカー、φX174/HincII 消化物

3.2. 3'端部分への伸長

ヒト β 鎖の 3'末端配列の増幅には RNA template-specific PCR (RS-PCR)[19]と改良 2 step PCR[18]が使用された。RS-PCR においては プライマーの 5'端部分にユニーク配列を付加したものを用いて first-strand cDNA を合成し、既に分かっている部分に特異的なプライマーと逆転写時に使われたプライマーのユニーク配列部分の配列を持つプライマーの組み合わせで増幅を行った。外側と内側で 2 組のプライマーを用いる改良 2 step PCR は、従来型の 2 step PCR [20]に、最初の PCR のプライマー量と 2 回目の PCR に使う 1 回目の PCR 反応物の量を共に絞る改良を加えることで、高い特異性と感度を達成した。

Oligo(dT)$_{15}$配列の 5'端部分に更に 29base のユニーク配列を含む NotI Primer-Adapter を mRNA の ploy(A)領域にハイブリダイズさせ、first-strand cDNA 合成を開始した。そしてそれは 3'末端配列の PCR 増幅の鋳型として用いられた。NPA5 及び NPA3 プライマーは NotI Primer-Adapter のそれぞれ 5'端および中央部分に相当する配列を持ち、ユニーク配列特異的プライマーとして使用した。PCR 産物（EB1-EB6）の 3'端に相当する配列を持つ EBH5 と EBH7 プライマーを既知配列部分特異的プライマーとして使用した。

PCR 増幅した cDNA 断片（EBH5-NPA3）は TM4 から poly(A)領域まで（約 550bp, Fig.1-2C にて矢印で表示）を直接塩基配列決定した（data not shown)。

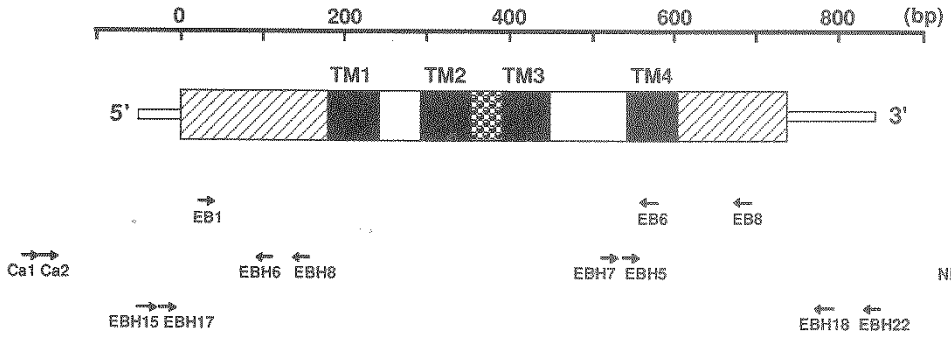
3.3. 5'端部分への伸長

ヒト β 鎖の 5'端の未知領域は新たに改良した PCR walking 法【Fig. 1-1】にて増幅に成

功した。ランダム 7 塩基（N_7）の 5'側にユニークな 46base の配列を付加した（CaN_7プライマー）を walking プライマーとして用いた。このプライマーのいくらかは、ヒトβ鎖の既に配列が分かっている部分（EB1-EB6）の 5'上流にハイブリダイズし、5'端にユニーク配列を持った second-strand 鎖の合成が始まる。これを鋳型に 3.2 で記述した RS-PCR と改良 2step　PCR をくみあわせて特異的増幅を行った。Ca1 および Ca2 プライマーはそれぞれ 46base 配列（Ca）の 5'および 3'側と同じ配列を持っており、ユニーク配列プライマーとして使用し、既知 PCR 産物（EB1-EB6）配列の 5'端部分に相当する EBH6 と EBH8 プライマーは既知配列特異的プライマーとして使用した【Fig. 1-3】。最終的に 12 個の PCR 増幅で 200bp 前後の DNA 断片が得られた。いくつかの PCR 増幅ではより大きな、そして複数の小さなサイズの DNA 断片が得られた。代表的な増幅例は Fig. 2B に示す。　6 つの PCR 増幅での 200bp 付近の主要な断片【Fig.1-2B にて矢印で表示】は塩基配列決定され、全て同一の 5'側上流配列を持っていることがわかった(data not shown)。その他のより大きな断片は非特異増幅で既知配列とは重ならないものと分かった。これらの 200bp 断片はヒトβ鎖 cDNA の 5‘末端をカバーしていると考えられた。

3.4. β鎖 cDNA の全体領域の増幅と塩基配列決定

Fig.1-3 に示すように 3 つの PCR 産物（EB1-EB6、EBH5-NPA3 および Ca2-EBH6）は配列の重なりを持ち、結合可能で、これによりヒトβ鎖 cDNA 全長配列の仮決定が出来た。この配列情報をもとに 27 個のプライマー（EBH シリーズ）が両鎖全長にわたってデザイン、合成され、増幅および配列の確認に供された。



【Fig.1-3】代表的なプライマーの位置

上部のスケールはヒト FcεRI β鎖 cDNA の翻訳開始コドンの最初の塩基を起点とした塩基番号を示す。四角で囲っている部分がβ鎖のコード領域に該当し黒塗りの部分は膜貫通領域、斜線部分は細胞内領域、クロス部分は細胞内ループ、白抜き部分は細胞外ループ。細いバー部分は non-coding 領域を示す。矢印の向きはプライマーの向きを示す。

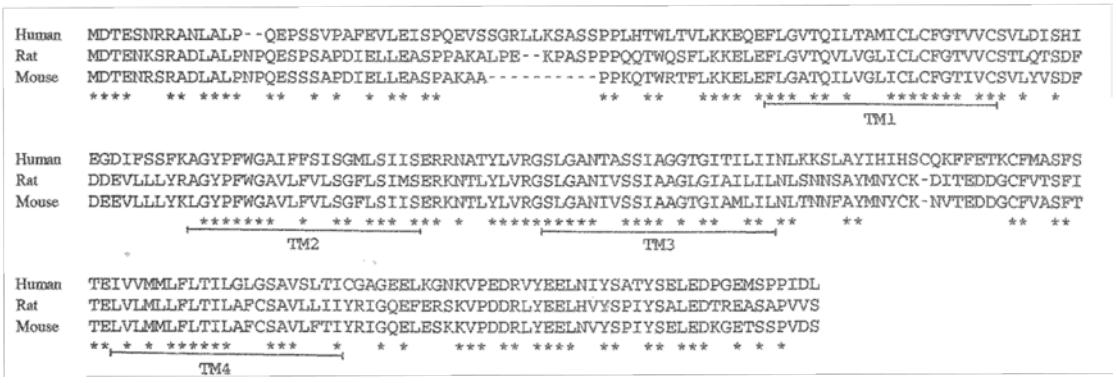
5'上流および3'下流部分のnon-coding領域に対応する入れ子構造のプライマーを使用し、改良2step PCR法によりコード領域全長が増幅された【Fig.1-2D】。増幅されたcDNAは種々のEBHプライマーを用いて直接シーケンス決定された（data not shown）。以上によりヒトFcεRIβ鎖の塩基配列と予測アミノ酸配列が決定された【Fig.1-4】。

```
-50          5'  TCTCAATATAATAATATTCTTTATTCCTGGACAGCTCGGTTAATGAAAAA

 +1   ATGGACACAGAAAGTAATAGGAGAGCAAATCTTGCTCTCCCACAGGAGCCTTCCAGTGTG
      M  D  T  E  S  N  R  R  A  N  L  A  L  P  Q  E  P  S  S  V

 61   CCTGCATTTGAAGTCTTGGAAATATCTCCCCAGGAAGTATCTTCAGGCAGACTATTGAAG
      P  A  F  E  V  L  E  I  S  P  Q  E  V  S  S  G  R  L  L  K

121   TCGGCCTCATCCCCACCACTGCATACATGGCTGACAGTTTTGAAAAAAGAGCAGGAGTTC
      S  A  S  S  P  P  L  H  T  W  L  T  V  L  K  K  E  Q  E  F

181   CTGGGGGTAACACAAATTCTGACTGCTATGATATGCCTTTGTTTTTGGAACAGTTGTCTGC
      L  G  V  T  Q  I  L  T  A  M  I  C  L  C  F  G  T  V  V  C

241   TCTGTACTTGATATTTCACACATTGAGGGAGACATTTTTTTCATCATTTAAAGCAGGTTAT
      S  V  L  D  I  S  H  I  E  G  D  I  F  S  S  F  K  A  G  Y

301   CCATTCTGGGGGAGCCATATTTTTTTTCTATTTCTGGAATGTTGTCAATTATATCTGAAAGG
      P  F  W  G  A  I  F  F  S  I  S  G  M  L  S  I  I  S  E  R

361   AGAAATGCAACATATCTGGTGAGAGGAAGCCTGGGAGCAAACACTGCCAGCAGCATAGCT
      R  N  A  T  Y  L  V  R  G  S  L  G  A  N  T  A  S  S  I  A

421   GGGGGAACGGGAATTACCATCCTGATCATCAACCTGAAGAAGAGCTTGGCCTATATCCAC
      G  G  T  G  I  T  I  L  I  I  N  L  K  K  S  L  A  Y  I  H

481   ATCCACAGTTGCCAGAAATTTTTTTGAGACCAAGTGCTTTATGGCTTCCTTTTCCACTGAA
      I  H  S  C  Q  K  F  F  E  T  K  C  F  M  A  S  F  S  T  E

541   ATTGTAGTGATGATGCTGTTTCTCACCATTCTGGGACTTGGTAGTGCTGTGTCACTCACA
      I  V  V  M  M  L  F  L  T  I  L  G  L  G  S  A  V  S  L  T

601   ATCTGTGGAGCTGGGGAAGAACTCAAAGGAAACAAGGTTCCAGAGGATCGTGTTTATGAA
      I  C  G  A  G  E  E  L  K  G  N  K  V  P  E  D  R  V  Y  E

661   GAATTAAACATATATTCAGCTACTTACAGTGAGTTGGAAGACCCAGGGGAAATGTCTCCT
      E  L  N  I  Y  S  A  T  Y  S  E  L  E  D  P  G  E  M  S  P

721   CCCATTGATTTATAAGAATCACGTGTCCAGAACACTCTGATTCACAGCCAAGGATCCAGA
      P  I  D  L  *

781   AGGCCAAGGTCTTGTTAAGGGGCTACTGGAAAAATTTCTATTCTCTCCACAGCCTGCTGG
841   TTTT  3'
```

【Fig.1-4】ヒトFcεRIβ鎖の塩基配列と予測アミノ酸配列
左側の番号はスタートコドンを＋1とした場合の相対的な塩基番号を意味する。上流にはマイナスの数字が振られている。

3.5. 予測アミノ酸配列の特徴

ヒト β 鎖アミノ酸配列の疎水性プロファイルを解析したところ、ラット[6]およびマウス[8]の β 鎖と同様で膜貫通領域に相当する特徴的な 4 つの疎水領域が存在することがわかった（data not shown）。ヒト、ラット、マウス、三種のアミノ酸配列を比較した【Fig.1-5】。全ての膜貫通領域に相当する部分と 2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間の細胞質領域がよく保存されている一方、2 つの細胞外領域の相同性は小さかった。1 番目と 2 番目の膜貫通領域の間の細胞外領域の保存性は 18%で、3 番目と 4 番目の膜貫通領域の間の細胞外領域は 33%であった。ラットとマウスの β 鎖は高い相同性（全領域で 82%、一番低い領域でも 70%を下回らない）を示す[6,8]にも関わらず、ヒト β 鎖の 2 つの細胞外領域はげっ歯類と比べて相同性が低かった。ヒト β 鎖の 3 番目と 4 番目の膜貫通領域に挟まれた部分の細胞外領域はヒトでは正に荷電（＋2）しており、ラットとマウスでは負に荷電（－4 及び－3）していた。複数膜貫通領域をもつ蛋白質のトポロジーを決定する「positive inside rule」[21,22]によると、無極性領域に挟まれた陽性アミノ酸残基の多い領域は細胞内領域であることが多い。げっ歯類の β 鎖とヒト β 鎖のトポロジーが同じであるのか更なる検討が必要である。



【Fig.1-5】ヒト、ラット、マウスの FcεRI β 鎖のアミノ酸配列の比較
Dr. Yasuo Ina (National Institute of Genetics, Japan)の開発した ALIGN プログラムを用いて配置。３つの種で同一のアミノ酸残基は＊で表示。膜貫通領域は下線で示す。

4. まとめ

ヒト高親和性 IgE 受容体（FcεRI）β鎖のクローニングにより、α、β、γの全てのコンポーネントが揃い、機能解析が可能となった。しかしながら当時はまだ、MALDI-TOF 型の質量分析器は普及していなかったため、免疫沈降した複合体を調べるには感度の点において劣るプロテインシーケンサーを使うしかなく、FcεRI のような存在量の少ない受容体では網羅的な解析は不可能であった。その間に他の研究者からγ鎖に Syk などの Src ファミリーチロシンキナーゼが会合し、IgE によるシグナル伝達系にチロシンリン酸化が関与しているとの報告がなされた[23]。チロシンのリン酸化については、他の細胞においても、増殖やサイトカイン刺激など種々のシグナル伝達系において重要な働きをしていることが次々と明らかになり研究が進んでいた[24]。Src ファミリーに対する抗体なども市販され、Western ブロット等で調べることは可能であった。その意味で、チロシンリン酸化が関与していると判明したことは貴重な唯一の手がかりであった。

一方、他の細胞系でもシグナル伝達系におけるチロシンキナーゼの重要性が増すと共に、逆反応を担うチロシンフォスファターゼ（PTPase）も研究が進むようになり、PTPase の酵素ドメインには触媒残基であるシステインを中心に保存された領域が存在することがわかってきた[25]。その保存された領域に対する Degenerate primer を作製し、緩い条件で PCR 増幅することで、その細胞に存在する PTPase の触媒ドメインを増幅することができる。これらを配列解析することで、その細胞に存在する PTPase を調べる手法が報告され始めた。細胞によって新規を含む異なる種類の PTPase が発現しており、これらが細胞特有の機能を説明しているのではないかと考えられていた。

我々の強みの一つとして、入手が難しいヒト好塩基球を臍帯血から単離した細胞から分化できることがある。そこで高親和性 IgE 受容体が発現する細胞内のチロシンリン酸化に焦点を絞り、研究がなされていなかった、好塩基球に発現するチロシンフォスファターゼ（PTPase）を調べ、特に好塩基球特有の新規 PTPase に焦点を絞り研究を行うことにした。

参考文献

[1] Metzger, H., Kinet, J.-P., Perez-Montfort, R., Rivnay, B. and Wank, S. A. (1983) Prog. Immun. 5, 493-501.

[2] Metzger, H. (1991) Clin. Exp, Allergy 21, 269-279.

[3] Kinet, J.-P., Metzger, H., Hakimi, J. And Kochan, J. (1987) Biochemistry 26, 4605-4610.

[4] Shimizu, A., Tepler, I., Benfey, P. N., Berenstein, E. H.,
Siraganian, R. P. and Leder, P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1907-1911.

[5] Liu, F.-T., A1brandt, K. and Robertson, M. W. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5639-5643.

[6] Kinet, J.-P., Blank, U., Ra, C., White, K., Metzger, H. and Kochan, J. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6483-6487.

[7] Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H. and Kinet, J.-P. (1989) Nature 337, 187-189.

[8] Ra, C., Jouvin, M.-H. E. and Kinet, J.-P. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15323-1 5327.

[9] Kochan, J., Pettine, L. F., Hakimi, J., Kishi, K. and Kinet, J. P. (1988) Nucleic Asicd Res. 16, 3584

[10] Küster, H., Thompson, H. and Kinet, J.-P. (1990) J. Biol. Chem. 265, 6448-6452.

[11] Hakimi, J., Seals, C., Kondas, J. A., Pettine, L., Danho, W. and Kochan, J. (1990) J. Biol. Chem. 265, 22079-22081.

[12] Blank, U., Ra, C. and Kinet, J.-P. (1991) J. Biol. Chem. 266, 2639-2646.

[13] Miller, L., Blank, U., Metzger. H. and Kinet, J.-P. (1989) Science 244, 334-337.

[14] Alben, G., Miller, L., Jelsema, C. L., Varin-Blank, N. and Metzger, H. (1991) J. Biol. Chem. 266, 22613-22620.

[15] Fischkoff, S. A., Kishi, K., Benjamin, W. R., Rossi, R. M., Hoessly, M. C., Hoxie, J. A., Seals, C., Anderson, L., Ishizaka, T. and Hakimi, J. (1987) Leukemia Research 11, 1105-1113.

[16] Saito, H., Hatake, K., Dvorak, A. M., Leiferman, K. M., Donnenberg, A. D., Arai, N., Ishizaka, K. and Ishizaka, T. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2288-2292.

[17] Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159.

[18] Aono. Y., Imai, J., Tominaga, K., Orira, S., Sato, A. and Igarashi, H. (1992) Virus Genes 6. 93-105.

[19] Shuldiner, A. R., Nirula, A. and Roth, J. (1990) Gene 91, 139-142.

[20] Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) Methods Enzymol. 155, 335-350.

[21] von Heijne, G. and Gavel, Y. (1988) Eur. J. Biochem. 174, 671-678.

[22] Andersson, H., Bakker, E. and von Heijne, G. (1992) J. Biol. Chem. 267, 1491-1495.

[23] Benhamou, M., Ryba, N. J., Kihara, H., Nishikata, H., & Siraganian, R. P. (1993) J. Biol. Chem., 268, 23318-23324.

[24] Sakamaki, K., Miyajima, I., Kitamura, T., and Miyajima, A. (1992) EMBO J., 11, 3541.

[25] Walton, K. M., & Dixon, J. E. (1993)　Ann. Rev. biochem, 62, 101-120.

（2）新規チロシンフォスファターゼ PTP-BAS のクローニング

1. 序論

好塩基球や肥満細胞上の高親和性 IgE 受容体（FcεRI）が架橋されるとアレルギー性のメディエーターが即座に放出される。マウス細胞株を用いた研究で、FcεRI に媒介されるチロシンリン酸化がこのシグナル伝達系における、主たる最初のイベントであることが示された。FcεRI に会合しているチロシンリン酸化酵素（PTKs）である Src ファミリー（Syk, Lyn、c-Src そして c-Yes[1]）や PTK72[2]が、レセプター架橋後活性化し、様々な蛋白質のチロシンリン酸化を引き起こす。これらのリン酸化は架橋が解除されると速やかに減弱する［3-5］。これらのことから FcεRI を介した最初のシグナル伝達にはチロシン脱リン酸化酵素（PTPs）による脱リン酸化反応も重要であると考えられるが、特にヒトの好塩基球や肥満細胞は、入手が困難なこともあり、研究が進んでいなかった［6,7］。我々はこのような特殊な細胞株には未知の PTPs が発現し、シグナル伝達を担っているのではないかという仮説をたて、ヒト好塩基球を培養分化し［8］FACS（fluorescence-activated cell sorter）で純化後、発現する PTPs を曖昧なプライマー（degenerative primer）を使用した PCR 増幅によって単離した。その過程で新規 PTP（PTP-BAS と命名）を発見した。全長 cDNA をクローニングし、配列決定を行った。

2. 材料と方法

2.1. 試薬

Fluorescein amidite (FluorePrime)、mRNA purification Kit、QuickPrep Micro mRNA Purification Kit、および Ready-to-Go-DNA Labeling Kit は Pharmacia 社（現 GE Healthcare 社）から購入した。

2.2. 好塩基球への分化

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 KU812E は日本癌研究資源バンク（JCRB0104.1）より入手し、10% fetal calf serum(FCS)を含む RPMI1640 で培養した。好塩基球への分化は、この細胞株を 200U/ml の組換えヒト IL-3（Genzyme）を含む無血清培地　COSMEDIUM-003（コスモバイオ）で２～３週間培養することで行った［8］。

2.3. 好塩基球の FACS ソーティング

好塩基球分化培地で培養した細胞は、ヒト IgE、抗ヒト IgE マウスモノクローナル抗体の F(ab')2 断片、および FITC 標識抗マウス IgG 抗体で染色した。更にヨウ化プロピジウムで染色後、FACStarPLUS　フローサイトメーター（Becton Dickinson）でソーティングを行った。蛍光は 530nm（FL1）、630nm（FL2）でそれぞれ FITC とヨウ化プロピジウムを検出した。好塩基球がこの分化培養物中では唯一、高親和性 IgE 受容体を発現することを

利用して、FL1 陽性（FITC 陽性）、FL2 陰性（ヨウ化プロピジウム陰性）画分をソートし集めた。

2.4. オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチドは DNA 合成機（CYCLONE、MilliGen）を使用して合成した。5'FITC ラベルオリゴヌクレオチドはフルオロセインアミダイトを用いて合成し、ALF DNA シーケンサー（Pharmacia）での塩基配列決定のためのプライマーとして用いた。PTP 触媒ドメインの保存された領域［9］の 2 か所から degenerate プライマーA、B を設計した。プライマーA（センス）、プライマーB（アンチセンス）はそれぞれ、FWRM(I/V)W(E/Q)を狙った【 5'-TT(C/T)TGGCGIATG(G/A)TITGG(C/G)A-3' 】 と HCSAG(V/I)G を狙った【5'-CC(G/A)A(C/T)ICCNGCIGA(A/G)CA(A/G)TG-3'】である。I はイノシン、N は A、C、G、T の混合を意味する。

2.5.PCR

2.5.1. PTP 触媒ドメインの増幅

Poly(A)+RNA は 1.6X10^{6}個の FACS ソートした好塩基球から QuickPrep Micro mRNA Purification Kit を使って精製し、これを鋳型として oligo(dT)15 プライマーと SUPERSCRIPT 逆転写酵素を用いて first-strand cDNA を合成した。この first-strand cDNA をつかって、AmpliTaq DNA polymerase と degenerate primer A と B にて保存された PTP 触媒ドメインが増幅された。DNA Thermal Cycler (Cetus)で 25 サイクル（94℃ 1min、50℃ 1min、72℃ 2min）増幅後、PCR 産物は pCRII ベクターへクローニングされた。

2.5.2. 5'端方向への PCR ウォーキング

鋳型となる first-strand cDNA は好塩基球へと分化させた KU812E から単離した total RNA を配列特異的オリゴヌクレオチドプライマーで合成した。5'端の未知領域は我々が開発した PCR ウォーキング法［10］にて増幅した。

2.5.3. PTP-BAS の 5'末端の増幅

PTP-BAS の 5'末端は改変した 5'RACE 法と 2step PCR［10］を組み合わせて増幅した。すなわち、2.5.2 に示した first-strand cDNA の 3'末端に poly(dC)配列を 5'RACE System の説明に従い、terminal deoxynucleotidyl transferase を用いて付加した。second-strand cDNA はユニーク配列を付加した oligo(dG)15 プライマーを用いて合成した。この二本鎖 cDNA と既知 BAS 配列部分とユニーク配列に特異的なプライマーを各 2 つ設計し、入れ子にして使うことで 2step PCR を実施した［10］。

2.6. PTP-BAS cDNA の単離

Total RNA は約 10^8 個の好塩基球へと分化させた KU812E 細胞から acid guanidium/phenol/chloroform 法[11]で単離した。Poly(A)$^+$RNA は mRNA Purification Kit で精製した。3μg の poly(A)$^+$RNA から、SUPERSCRIPT Lambda System、λZAPII/EcoRI Cloning Kit と GigapakII Gold packaging extract を使い KU812E cDNA ライブラリーを作製した。作製したライブラリーは 6.3X10^{5}の independent clone を含んでいた。新規 PTP（NPTP と命名）の PCR 断片は［α-^{32}P］dCTP と Ready-To-Go DNA Labeling Kit を用いて RI 標識された。KU812E cDNA ライブラリーは RI 標識された NPTP プローブでスクリーニングされた。条件は 5xSSC、5xDenhardt's 溶液、0.5% SDS、10μg/ml salmon sperm DNA を含む溶液中で 60℃、一晩保温し、室温にてフィルターは 10 分間洗浄（2xSSC、0.1%SDS の溶液中）を 2 回、42℃にて 15 分間洗浄（1xSSC、0.1%SDS の溶液中）にて行った。スクリーニングで陽性となったクローンは純化され、プラスミドへと変換された。

2.7. 塩基配列決定

クローニングされた cDNA 断片は 5'fluorecein でラベル化されたプライマーを用いて ALF DNA sequencer (Pharmacia)で決定された。PCR でクローニングされた配列は少なくとも個別に増幅された 3 つ以上のクローンの配列から決定された。2.5.2. や 2.5.3.で記述した PCR 増幅断片は dsDNA Cycle Sequencing System にて直接配列決定され、配列決定は両鎖にわたって行った。

2.8. Northern blot 解析

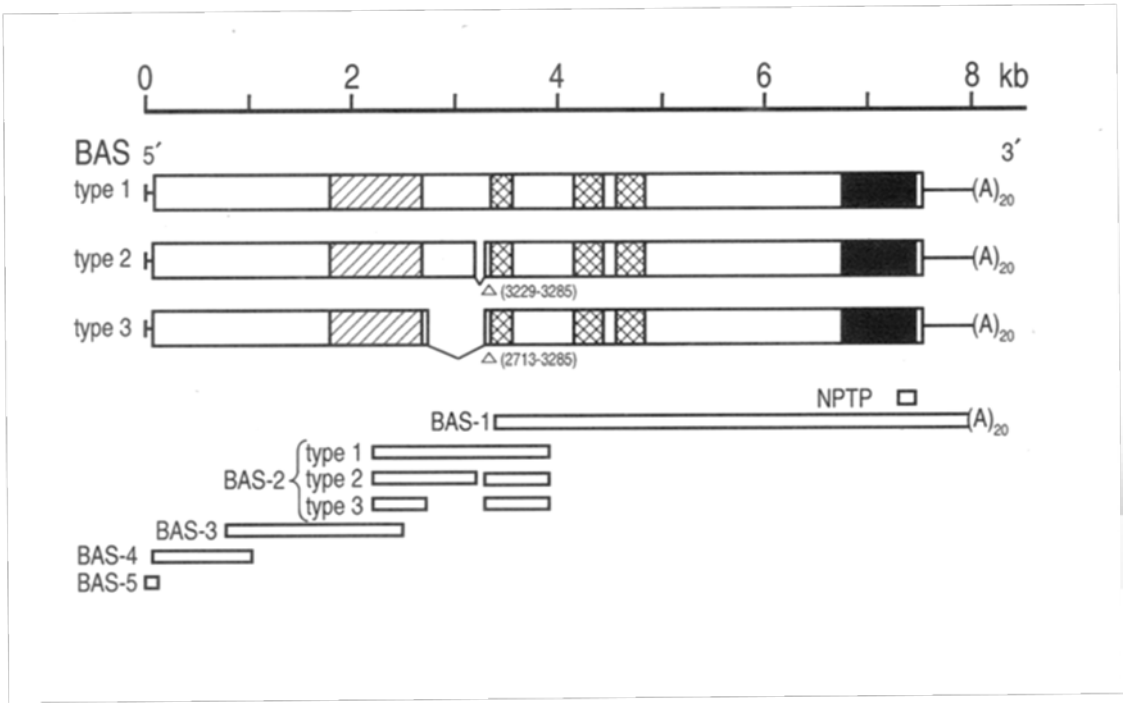
ヒトの様々な組織における PTP-BAS の発現は Multiple Tissue Northern Blot(Human MTN と Human Fetal MTN Blot)を使って調べられた。BAS cDNA 断片[BAS-1、【Fig. 1-6】]とヒト G3PDH コントロール probe は Ready-To-Go DNA Labeling Kit をもちいて RI ラベル化された。5xSSPE 10xDenharst's 溶液、50%formamide、2%SDS、100μg/ml の salmon sperm DNA を含む溶液中で 42℃にて、16 時間ハイブリダイズした。その後 2xSSC、0.05% SDS で室温にて 2 回、1xSSC、0.1% SDS で 50℃にて 2 回洗浄し、その後 Kodak XAR-film に-80℃で増感紙と共に感光させた。

3. 結果

3.1. 新規チロシンフォスファターゼの同定

ヒト好塩基球に発現しているチロシンフォスファターゼ（PTP）を同定するため、FACS ソートした好塩基球から作製して first-strand cDNA から PTP 触媒ドメインをコードする部分を、保存された領域を狙った Degenerate primer （A 及び B）を用い PCR 増幅した。増幅物は pCRII ベクターにクローニングされ、33 クローンが配列決定された。このうち 27 個は LCA［12、13］、MEG［14］、MEG2［15］および TCPTP［16］等の既知 PTP 由

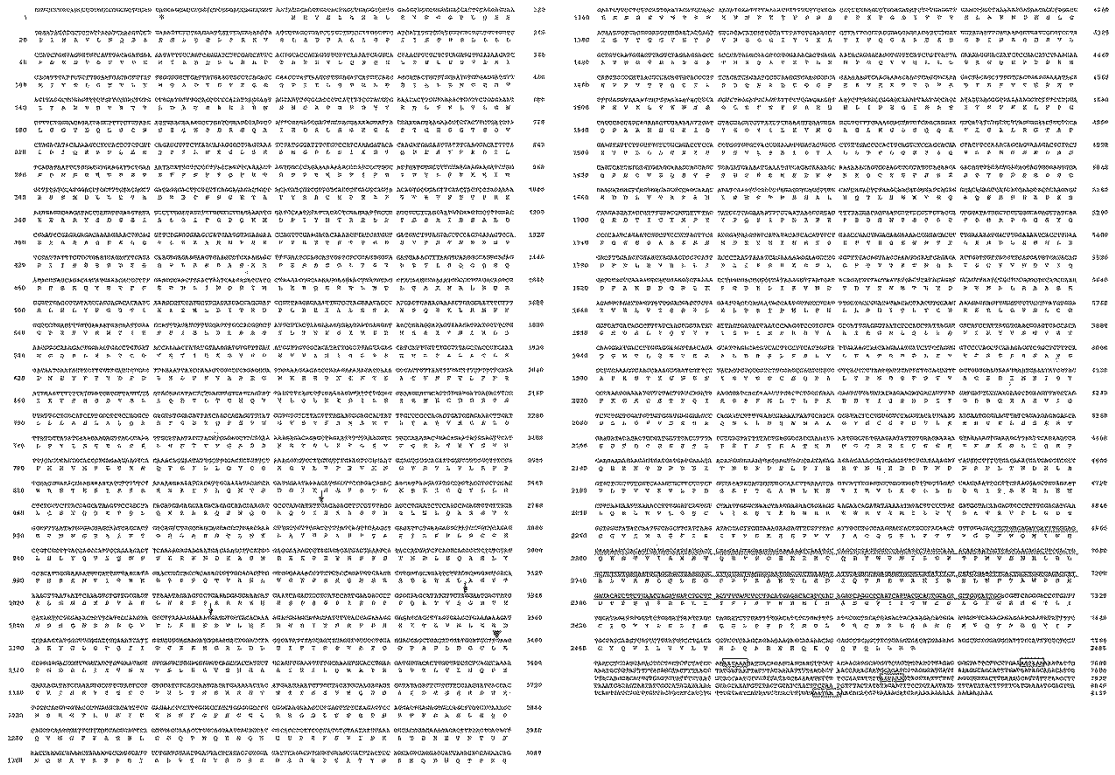
来であった。残りの 6 個は全て同一配列で、これは既知 PTP の配列とは異なっていた。この PCR 増幅された cDNA 断片は NPTP【Fig.1-6 および Fig.1-7】と名付けた。好塩基球へと分化させた KU812E 細胞から作製した cDNA ライブラリーをこの NPTP を RI 標識したプローブでスクリーニングした。２つの陽性クローンが同定され、塩基配列決定された【BAS-1、Fig.1-6 および Fig.1-7】。poly(A)部分の上流には４つのコンセンサス poly(A)付加シグナル（AATAAA）が見つかったが一番上流のメチオニンの上流には in-frame の Stop codon は見つからなかった。このことから、BAS-1 の 5'側には更に配列が続いていると考えられた。



【Fig.1-6】PTP-BAS 全長(type1、type2、type3)の構造と単離した BAS-1 及び代表的な PCR 断片の位置

スケールは cDNA の最初の塩基からの位置を示す。type2 と type3 において欠失した部分は type1 における塩基番号で表示。四角で囲んでいる部分が PTP-BAS のコード領域で、黒塗り部分が PTP 酵素ドメイン、斜線部分が membrane-binding domain、網掛け部分が GLGF リピート部分を示す。PCR 断片の位置は細めの四角で、おおよそのサイズと相対的な位置を表す。

新規 PTP の 5'端配列を含む cDNA を得るため、BAS-1 の 5'端付近の配列を使った primer を使い first-strand cDNA が合成された。この first-strand cDNA を鋳型にして、PCR walking 法によって 5'側の未知配列部分が増幅された。6 回 PCR walking を行い BAS-1 配列の 5'上流部分、約 3Kb が得られた。5'末端の配列は 5'RACE 法で得られた【BAS-5：Fig.1-6】。配列を確認するため、配列特異的なプライマーを使って、overlap した cDNA 断片が増幅され【BAS-2、BAS-3、BAS-4：Fig.1-6】、pCRII ベクターにクローニングされ塩基配列決定された。2 つの in-frame 欠失が見つかり、新しい PTP には 3 つの isoform（type1、type2、type3）が存在することが分かった。新しい PTP は好塩基球 Basophil からクローニングされたので PTP-BAS と命名した。

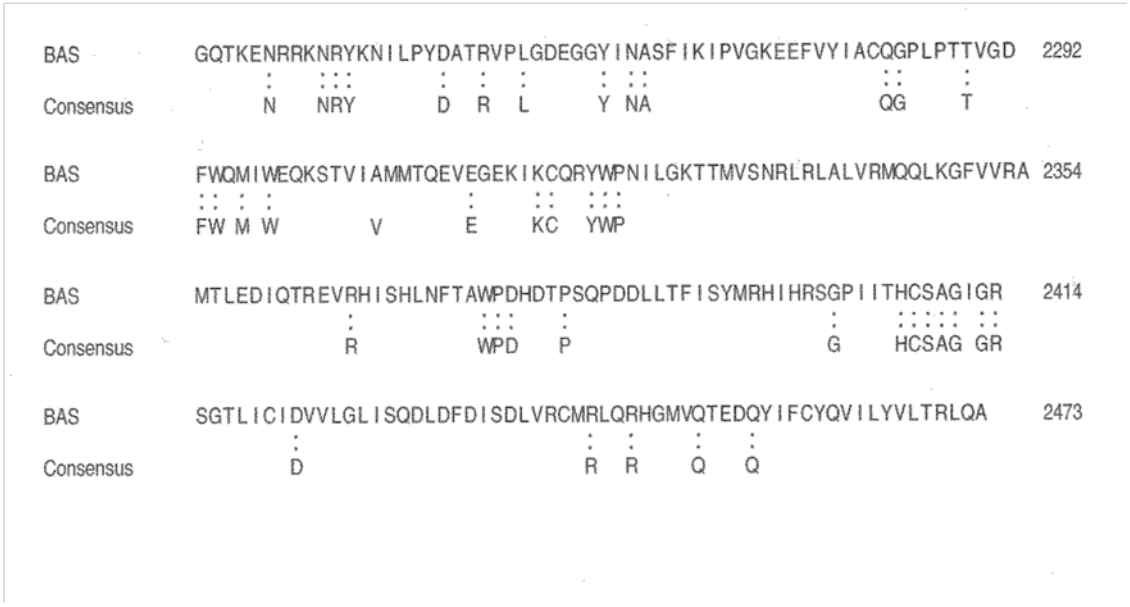


【Fig.1-7】

PTP-BAS type1 の塩基配列および推定アミノ酸配列。右側の数字は塩基配列番号、左側はアミノ酸番号。type 2 の欠失部分（塩基番号 3229-3285）および type3 の欠失部分（塩基番号 2713-3285）は矢印で表示。in-frame での終止コドンは＊で表示。Polyadenylation signal は資格で囲ってある。PTP 酵素ドメイン内の NPTP として増幅された PCR 産物の該当部分には下線を引いてある。BAS-1 断片の 5‘端は黒塗り逆三角で表示。

Acc. No.: D21209【PTP-BAS　type1】、D21210 【type2】、D21211【type3】

PTP-BAS type1 の完全長塩基配列は、consensus initiation codon（AATATGC）［17］を塩基番号 64 にもち、in-frame stop codon も持っていた【Fig.1-7】。Open Reading Frame は 1 つで全長 7455bp、2485 アミノ酸であることが分かった。Type 2、Type 3 はそれぞれ type 1 の塩基配列番号 3229 から 3285（アミノ酸番号 1056 から 1074）、type 1 の塩基配列番号 2713 から 3285（アミノ酸番号 884 から 1074）が欠失していた【Fig.1-6 および Fig.1-7】。Type 2 及び type 3 の Open Reading Frame はそれぞれ 7398bp（2466 アミノ酸）、6882bp（2294 アミノ酸）であった。3 つの isoform は 1 つの PTP 触媒度面を C 末付近にもっており【Fig.1-6 及び Fig.1-7】、酵素反応に必須［18］であるシステイン（type 1 におけるアミノ酸番号 2408）および代表的な 12 の PTP で保存されている 42 アミノ酸［9］のうち 98%を持っていた【Fig.1-8】。

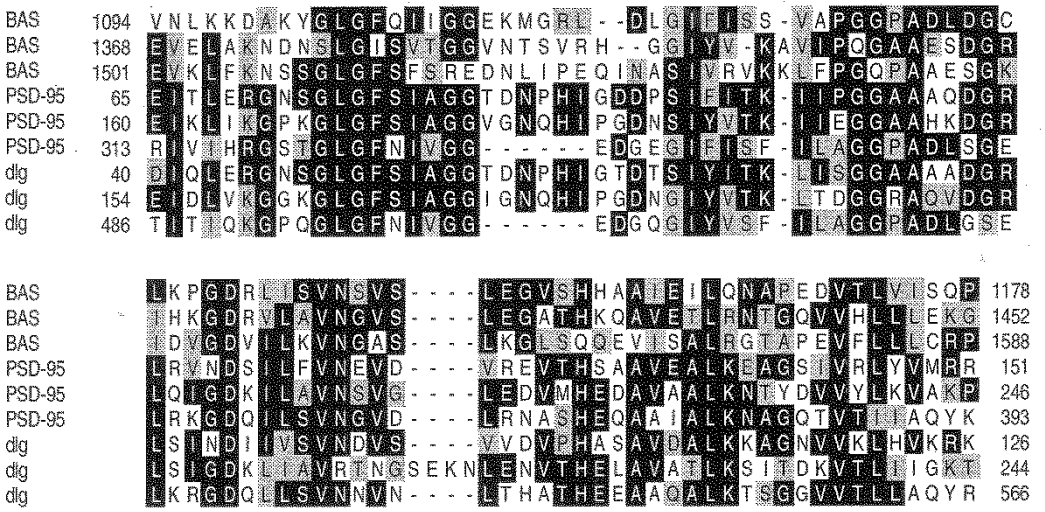


【Fig.1-8】PTP-BAS 及び他の既知 PTP の PTP 酵素ドメインの配列比較
PTP-BAS（type 1）のアミノ酸配列番号は右に表示。主な 12 種類の PTP（PTP1B[28]、TCPTP[16]、LAR[29]、LCA[12、13]、HPTPα、β、γ、δ、ε、ζ[9]、DLAR[18]、DPTP[18]）のコンセンサス配列を表示。コロンはコンセンサス配列と相同である残基に表示。

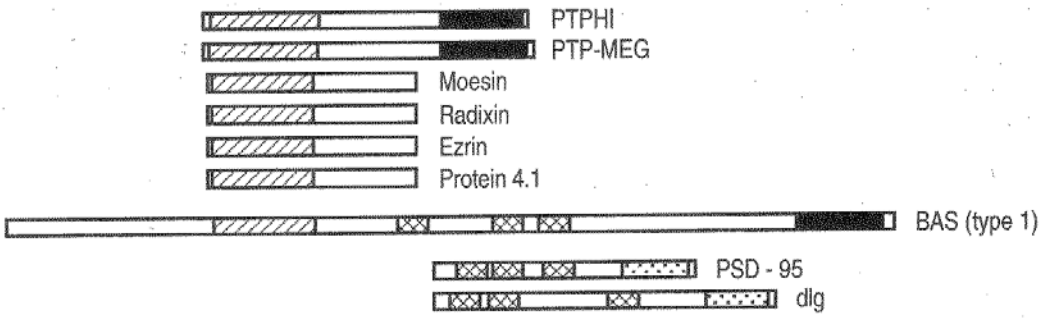
3.2. 配列の相同性

PTP 触媒ドメインのアミノ末端側部分の相動性検索を FASTA プログラムを用いて、Genbank データベース（release 78）に対して行った。PTP-BAS のアミノ酸番号 574 から 881 の領域で強い相同性（25～30%identity、40～50%similarity）を示すものが見つかった。それは細胞骨格結合蛋白（protein 4.1、ezrin、radixin、moesin）と 2 つの細胞質 PTP（PTPH1、PTP-MEG）【Fig.1-9、Fig.1-11】であった。 Drosophila lethal(1)discs-large-1 tumor suppressor protein (dlg)［20］の homologue である rat brain postsynaptic density protein（PSD-95）にて報告された GLGF repeat も 3 つ、PTP-BAS の中心部分（PTP-BAS type1 でのアミノ酸番号 1094 から 1178、1368 から 1452、1501 から 1588）に見つかった【Fig.1-10、Fig.1-11】。この GLGF repeat は 23～44%identical で 43～63%similar であった。

【Fig.1-9】PTP-BAS のアミノ酸番号 574-881 部分と代表的なヒト細胞骨格介護具蛋白（ezrin[30]、radixin[31]、moesin[32]）の membrane-binding domain との比較
相同性の高いアミノ酸は＊で表示。保存されたアミノ酸はドットで表示。



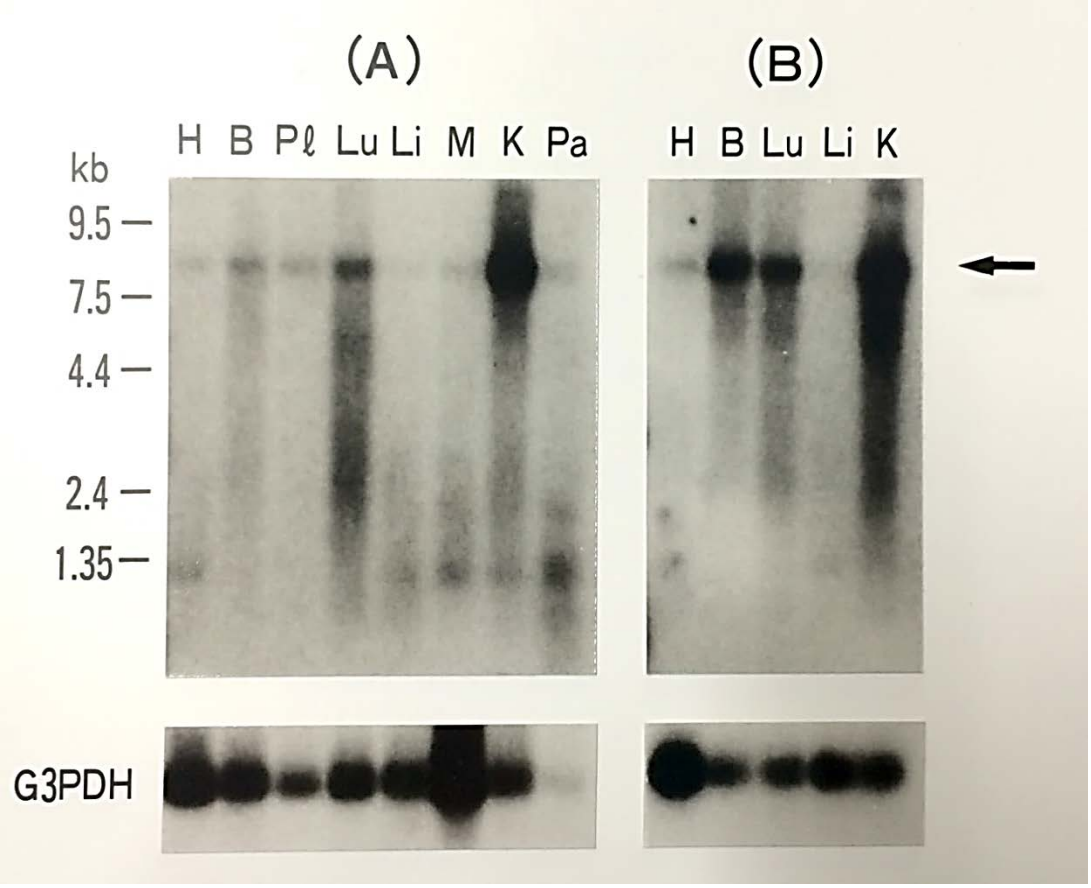
【Fig.1-10】PTP-BAS、PSD-95[19]、dlg[20]の GLGF リピートの配列アミノ酸番号を表示。
各位置で 3 つ以上同一のアミノ酸が並んでいる場合は黒に白字表示、同等のアミノ酸である場合は灰色に黒字表示



【Fig.1-11】PTP-BAS（type 1）と関連する蛋白質の概略図
PTP-BAS は membrane-binding domain（斜線部分）と GLGF リピート（網掛け部分）の２つの相同ドメインをもつ。代表的なヒト細胞骨格会合蛋白質（band 4.1[22]、ezrin[30]、radixin[31]、moesin[32]）とヒト細胞質 PTP（PTP-MEG[14]、PTPH1[27]）の membrane-binding domain を表示。細胞質蛋白（PSD-95[19]と dlg[20]）における３つの GLGF リピートを表示。PTP 酵素ドメインは黒塗り、guanylate kinase ドメインはドットで表示。各部分の長さは相対的な配列上での長さを反映している。

3.3. ヒト臓器における PTP-BAS mRNA の発現

ヒト臓器における PTP-BAS の発現分布を Northern blot で調べた【Fig.1-12】。G3PDH プローブによる normalization 後、PTP-BAS の成人での発現レベルを調べた結果：腎臓で最も発現が高く、肺でも発現は高め、胎盤、脳、膵臓、心臓および骨格筋では低く、肝臓ではかなり低めの発現であった【Fig.1-12A】。成人に比べ、胎児（２０から２６週齢）の臓器では腎臓、肺、心臓、肝臓での発現は変化なかったが、脳は非常に発現が高くなっていた【Fig.1-12B】。



【Fig.1-12】様々なヒト成人（A）および胎児（B）臓器における PTP-BAS mRNA の発現

Multiple tissue Northern blot(CLONTECH)を使用。各レーンは 2μg の poly(A)+RNA を含む。BAS-1 もしくは G3PDH cDNA を RI ラベルし、別個にハイブリダイズした。PTP-BAS のバンドは矢印で表示。RNA のサイズ表示は製造業者によるもの。H:heart、B:brain、Pl:placenta、Lu:lung、Li:liber、M:skeletal muscle、K:kidney、Pa:pancreas

4. 考察

PTP 触媒ドメイン中の保存されたアミノ酸に対する degenerate primer を用い、ヒト好塩基球から新規 PTP を同定した。4663bp（BAS-1：Fig.1-6、Fig.1-7）を KU812E 細胞から作製した cDNA ライブラリーより単離した。5'端側の未知領域は改変した 5' walking 法及び 5'RACE 法を用いて増幅、配列決定した。得られた完全長 cDNA は consensus polyadenylation signal と poly(A)部分を持っており、Kozak[17]ルールにのっとった consensus initiation sequence、そしてその上流に in-frame stop codon【Fig.1-7】を持っていた。コード領域は２つの in-frame 欠失を持っており、３つの isoform を持っていることが示唆され、これらを長いものから type1、type2、type3 と名付けた【Fig.1-6、Fig.1-7】。完全長 cDNA（type1:8139bp、type2:8082bp、type3:7566bp）から推定されたサイズの

mRNA が Northern blot で確認された【Fig.1-12 の矢印】が、欠失部分の長さが全長にくらべあまりにも小さいためか、別々のバンドとしては確認できなかった。全ての isoform の C 末端部分に 1 つの PTP 触媒ドメインが存在したが、既知の PTP[9]では保存されていた 42 アミノ酸のうち 1 つは異なっていた。触媒残基として知られている[18]システイン残基は保存されていた【Fig.1-8】。アミノ酸配列を hydropathy plot 解析してみたが、シグナルシーケンスや、膜貫通ドメインらしき疎水性領域は見つからず（data not shown）、PTP-BAS のすべての isoform は細胞質 PTP と考えられた。PTP-BAS は現時点で一番大きな細胞質 PTP で type1 は 2485 アミノ酸、type2 は 2466 アミノ酸、type3 は 2294 アミノ酸からなる【Fig.1-7】。3 つの isoform の役割については現時点では不明だが、何らかの機能的な意味があると考えられる。

PTP 触媒ドメインのアミノ末端側領域の相動性検索から、全ての isoform は 2 つの異なる特徴的な配列を持っていることがわかった【Fig.1-6】。アミノ酸番号 571 から 881 は細胞骨格結合蛋白のアミノ末端部分の配列と高い相同性を持っている。Ezrin-radixin-moesin family[21]とは 27-29% identity、50% similarity【Fig.1-9】で protein 4.1 とも 25% identity、41% similarity で似ていた。Protein 4.1 は glycophorin[23]や band 3[24]などの膜貫通蛋白質の細胞質側末端にアミノ末端ドメインで結合する[25]。ゆえにこのアミノ末端ドメインは membrane-binding domain[22]と呼ばれる。 Ezrin-radixin-moesin family のアミノ末端ドメインは membrane-binding domain と相同性があり、細胞膜に結合していると考えられている[21、26]。これまでに membrane-binding domain を持っている細胞質 PTP としては PTP-MEG[14]及び PTPH1[27]が報告されている【Fig.1-11】。 PTP-BAS はもう 1 つ特徴的な配列を持っている。その配列は 90 アミノ酸の繰り返しで、rat brain PSD-95 蛋白[19]、drosophila dlg 蛋白[20]などの guanylate kinase で報告された GLGF repeat と相同性があり 3 回（後に 5 回と判明）繰り返している【Fig.1-10、Fig.1-11】。この繰り返し部分は細胞骨格部位への局在において、何等かの機能を果たしている、もしくは酵素活性の調節に関与していると考えられている[19]。これらのことから PTP-BAS は新規細胞質 PTP であり、細胞膜にアミノ末端部の membrane-binding domain で結合し、中央部の GLGF repeat によって、基質選択性や酵素活性が調節されているのではないかと考えられた。

PTP-BAS は最初ヒト好塩基球から単離されたが、様々な臓器で発現しており、特に腎臓や肺で発現が高い。また、脳においては胎生期にはきわめて発現が高いにも関わらず、成人では発現が低い【Fig.1-12】。更に PTP-BAS の mRNA は臍帯血から単離した単球をヒト好塩基球に分化する過程[10]において発現が高まる（data not shown）。PTP-BAS は細胞内シグナル伝達系において、何らかの役割を担い、細胞増殖や分化にかかわっているのかもしれない。

第一章のまとめ

IgE を介した即時型アレルギーに関与する FcεRI を鍵分子として選び、ヒトβ鎖をクローニングすることで、FcεRI を構成するα鎖、β鎖、γ鎖を揃えた。その間に外部の研究者らが、FcεRI の架橋で細胞内にシグナルが入るとチロシンのリン酸化が活性化すること、既にクローニングされていた Syk 等のチロシンキナーゼ免疫沈降で FcεRI のγ鎖、β鎖が共沈してくることが報告された [33]。

当時既に Src ファミリーチロシンキナーゼは、癌など他のシグナル伝達系でも関与が報告されていた分子である[34]。重要な分子であることは明らかで、分子内に保存された SH2、SH3 というドメインや[35]、その活性化機構については色々な報告がなされたものの[36]、Src ファミリーチロシンキナーゼの真の基質は何であるかについては謎であった。おそらく活性化されると、まわりの分子のチロシンを低い特異性で網羅的にリン酸化し、その中に潜んだごく少数の真の標的が細胞内にシグナルを伝えていたのであろう。基質が分からないこともあって Scr ファミリーチロシンキナーゼから先のシグナル伝達機構は長らく謎であった。まだヒトゲノムが明らかになる前であり、細胞内で、どれほどの分子がシグナル伝達にかかわっているかもわかっていなかったため、「好塩基球のような特殊な細胞であるならば、ここに発現している新規遺伝子を調べていけば、FcεR I 関連の主要な分子にあたるのではないか」と考え、逆反応であるチロシンフォスファターゼをキーとしてアプローチすることとした。細胞内に発現するチロシンフォスファターゼを調べ、新規であったものをクローニングし、Basophil から見つけたということで PTP-BAS と名付けた。この遺伝子を起点にその後 FcεR I との関連を調べ始めたが、PTP-BAS は約 2500 アミノ酸から構成される巨大分子であったため、細胞での強制発現も一苦労で、現代から考えると困難すぎるアプローチであった。その後の研究で、FcεR I 関連のシグナル伝達において関与するチロシンフォスファターゼは PTPεや同時期にクローニングされた SHP-1 であることが明らかになっている[37][38]。

PTP-BAS は取り扱いが難しく、その後の研究が進まなかったため、癌患者での欠失等の報告はあるものの、未だに機能はよくわかっていないが、この分子のクローニングをきっかけに新たなドメインの存在が注目を集めることとなった。PTP-BAS に 3 つ（後に 2 つが追加で見つかり最終的には 5 つとわかった）存在するドメインを、その当時は相同性の比較的高い残基から GLGF リピート[19]と呼んでいた。PTP-BAS がクローニングされる前までは、dlg や PSD-95 などタイトジャンクションに存在する蛋白質にしか見つかっていなかった配列であったため、膜貫通ドメインのように、タイトジャンクションに存在するために必須である配列のように考えられていた。しかし、シグナル伝達系の酵素であるチロシンフォスファターゼに見つかったことで改めて他の分子での探索が行われ、実は様々な分子に存在するドメインであることが報告された[39]。この当時は DHR ドメインと命名され

たが、現在は PDZ ドメインと名前がかわり、Ser-Xxx-Val のような蛋白質の特定の C 末端配列を認識して結合するなど、分子を認識して結合するドメインであることがわかっている[40] [41]。

シグナル伝達系については、分子同士が直接会合してシグナル伝達を行う場合は下流の分子が明らかになることが多いが、チロシンキナーゼやプロテアーゼなど酵素の下流は、MAP キナーゼなどパスウエイマップに記載されたものでない場合、現代でも手繰り寄せるのは簡単ではない。質量分析器を用いて長い時間をかけて、シグナルが入った時に変動する分子を見つけたのち、最終的にはその候補分子を siRNA などで欠損させ、表現型の変化で確かめることになる。

それならば、最初からあらゆる分子に対する siRNA を準備し、網羅的に蛋白質の発現抑制を行うことで表現系の変化を指標にシグナル伝達系にかかわる因子を洗い出そうという合理的な発想が出てくる。ヒトゲノムの解明、RNAi の発見という恩恵の賜物として、いくつかの会社から全遺伝子に対して設計された siRNA ライブラリーが発売され、これを使った創薬標的探索が報告されるようになってきた。そこで、この siRNA ライブラリーを導入し、網羅的な表現型スクリーニングによる新規創薬標的探索に挑むこととした。また、siRNA ライブラリーを用いたスクリーニング自体が一般的ではなかったため、検出系としては複雑なものが使えなかったこと、また細胞株の制約などから、アレルギーではなく、増殖アッセイで判定できる癌を対象疾患として進めることとなった。

参考文献

[1] Eiseman, E. and Bolen, J.B. (1992) Nature 355, 78-80.

[2] Hutchcroft, J.E., Geahlen, R.L., Deanin, G.G. and Oliver, J.M. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9107-9111.

[3] Paolini, R., Jouvin, M.H. and Kinet, J.P. (1991) Nature 353, 855-858.

[4] Pribluda, V.S. and Metzger, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11446-11450.

[5] Paolini, R., Numerof, R. and Kinet, J.P. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10733-10737.

[6] Hook, W.A., Berenstein, E.H., Zinsser, F.U., Fischler, C. and Siraganian, R.P. (1991) J. Immunol. 147, 2670-2676.

[7] Beaven, M.A. and Metzger, H. (1993) Immunol. Today 14, 222-226.

[8] Takemoto, H., Nishimura, S., Kosada, Y., Hata, S., Takagi, S., Hosoi, S., Ezumi, K., Ide, M. and Harada, S. (1994) Microbiol. Immunol. 38, 63-71.

[9] Krueger, NX., Streuli, M. and Saito, H. (1990) EMBO J. 9, 3241-3252.

[10] Maekawa, K., Imagawa, N., Tanaka, Y. and Harada, S. (1992) FEBS Lett. 302, 161-165.

[11] Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159.

[12] Ralpf, S.J., Thomas, M.L., Morton, c.c. and Trowbridge, I.S. (1987) EMBO J. 6, 1251-1257.

[13] Streuli, M., Hall, L.R., Saga, Y., Schlossman, S.F. and Saito, H. (1987) J. Exp. Med. 166, 1548-1566.

[14] Gu, M., York, J.D., Warshawsky, I. and Majerus, P.w. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5867-5871.

[15] Gu, M., Warshawsky, I. and Majerus, P.w. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2980-2984.

[16] Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. and Krebs, E.G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5257-5261.

[17] Kozak, M. (1987) Nucleic Acids Res. 15, 8125-8148.

[18] Streuli, M., Krueger, NX., Tsai, A.Y.M. and Saito, H. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8698-8702.

[19] Cho, K.O., Hunt, C.A. and Kennedy, M.B. (1992) Neuron 9, 929-942.

[20] Woods, D.F. and Bryant, P.J. (1991) Cell 66, 451-464.

[21] Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, Sa. and Tsukita, Sh. (1992) J. Cell Sci. 103, 131-143.

[22] Conboy, J., Kan, Y.w., Shohet, S.B. and Mohandas, N. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9512-9516.

[23] Anderson, R.A. and Lovrien, R.E. (1984) Nature 307, 655-658.

[24] Pasternack, G.R., Anderson, R.A., Leto, T.L. and Marchesi, v.T. (1985) J. BioI. Chem. 260, 3676-3683.

[25] Leto, T.L., Correas, I., Tobe, T., Anderson, R.A. and Marchesi, V.T. (1986) in: Membrane Skeletons and Cytoskeletal Membrane Associations (Bennett, v., Cohen, C.M., Lux, S. and Palek, J., Eds.) pp. 201-219, Alan R. Liss, New York.

[26] Trofatter, J.A., MacCollin, M.M., Rutter, J.L., Murrell, J.R., Duyao, M.P., Parry, D.M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A.G., Pulaski, K., Haase, V.H., Ambrose, C.M., Munroe, D., Bove, C., Haines, J.L., Martuza, R.L, MacDonald, M.E., Seizinger, B.R., Short, M.P., Buckler, A.J. and Gusella, J.F. (1993) Cell 72, 791-800.

[27] Yang, Q. and Tonks, N.K. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5949-5953.

[28] Charbonneau, H., Tonks, N.K., Kumar, S., Diltz, C.D., Har-ry1ock, M., Cool, D.E., Krebs, E.G., Fischer, E.H. and Walsh, K.A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5252-5256.

[29] Streu1i, M., Krueger, N.x., Hall, L.R., Schlossman, S.F. and Saito, H. (1988) J. Exp. Med. 168, 1523-1530.

[30] Gould, K.L., Bretscher, A., Esch, F.S. and Hunter, T. (1989) EMBO J. 8, 4133-4142.
[31] Wilgenbus, K.K., Milatovich, A., Francke, U. and Furthmayr, H. (1993) Genomics 16, 199-206.
[32] Lankes, W. T., and Furthmayr, H. (1991) Proc. Nat. Acad. Sci., 88, 8297-8301.
[33] Benhamou, M., Ryba, N. J., Kihara, H., Nishikata, H., & Siraganian, R. P. (1993) J. Biol. Chem., 268, 23318-23324.
[34] Ottenhoff-Kalff, A. E., Rijksen, G., Van Beurden, E. A. C. M., Hennipman, A., Michels, A. A., & Staal, G. E. J. (1992) Cancer Research, 52(17), 4773-4778.
[35] Pawson, T., & Gish, G. D. (1992) Cell, 71(3), 359-362.
[36] Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., Okada, M. and Aizawa, S. (1993) Cell, 73(6), 1125-1135.
[37] Siraganian, R. P. (2003) Current opinion in immunology, 15(6), 639-646.
[38] Kimura, T., Zhang, J., Sagawa, K., Sakaguchi, K., Appella, E. and Siraganian, R. P. (1997) J. Immunol. 159, 4426-4434.
[39] Ponting, C. P. and Phillips, C. (1995) Trends in Biochemical Sciences , 20, 102-3
[40] Cabral, J. H. M., Petosa, C., Sutcliffe, M. J., Raza, S., Byron, O., Poy, F.,Marfatia, S., Chishti, H. and Liddington, R. C. (1996) Nature 382, 649 - 652
[41] Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996) Cell, 85, 1067-1076.

第二章

siRNA を用いた表現型スクリーニングによる抗癌剤標的探索

1. 序論

癌細胞の最も一般的な特徴は、正常細胞に比べて急速かつ制御不能な増殖をすることである。また、他の疾患と違い、細胞株での挙動（増殖抑制）が、生体内の挙動とよく一致するという特徴ももつ。これらの特徴を利用して、癌領域においては増殖性細胞に対して毒性を持つ薬剤を用いた化学療法が行われている。このような癌細胞の増殖を抑制する薬剤（抗癌剤）の種類としては、シクロフォスファミドなどの核酸合成阻害剤、アクチノマイシン D 及びブレオマイシンなどの抗生物質、5-フルオロウラシルトなどの代謝拮抗剤、パクリタキセルなどの微小管脱重合阻害薬などが知られている［1］。しかしこれらの薬剤は増殖する正常細胞にも同様に毒性を示すため、これらの副作用が障害となって十分な治療効果を得ることができていない。正常細胞への毒性を軽減するため、特定の分子を狙ったイマチニブなどの分子標的薬が開発され治療に使われている。しかし、これらの薬剤も、必ずしも癌に対する十分な治療効果が得られず、また使用により薬剤耐性が生じるという問題がある［2］。しかもこれまでに開発された分子標的薬の標的遺伝子は生体内の一部の細胞にも発現しているため、副作用を伴うこともある。したがって、新たな作用機序の分子標的抗癌剤、すなわち、癌細胞に対する増殖抑制作用を有しつつ正常細胞に対する毒性の少ない標的分子を狙った抗癌剤の開発が依然として望まれている。

現在、癌治療に利用されている分子標的薬のほとんどは、第一章で述べたような重要な役割をになうことが明らかな分子を起点とした創薬の結果である。例えばセツキシマブやゲフィニチブは癌の増殖に必須である EGF 受容体を狙っている［3］。しかしながら先に述べたとおり、まだ満足のいく治療効果は得られておらず、もっと強力な手段で治療標的探索を行う必要がある。

本章での研究目的は、新規標的遺伝子探索を網羅的に進める手法を確立し、これを使って副作用少なく、効果的に癌の治療を可能とする新規標的遺伝子を見出すことである。

近年、DNAChip など網羅的な遺伝子発現を調べる技術［4］の普及により、癌細胞特異的に発現している遺伝子を容易に見出すことが可能となった［5］。こういった手法で見いだされた癌治療の標的遺伝子を発現あるいは機能を抑制することで癌細胞の増殖を抑制し、癌を治療するアプローチがさかんに研究されている。しかしながら DNAChip では増殖の原因となった遺伝子以外に、増殖の結果発現上昇した遺伝子、たとえば細胞骨格を構成する分子なども多数検出され、原因と結果を見分けることが難しく標的探索の効率は必ずしも高くない［6］。

同時期に二本鎖 RNA（small interfering RNA：siRNA）が開発され［7］、哺乳類細胞においても任意の遺伝子の発現を抑制する事が可能となった［8］。その後ソフトウエアによる siRNA の設計技術も進歩し、実際に実験的にたしかめずとも、ある程度の効率で狙った遺伝子の発現抑制が期

待できるようになってきている［9］。これらの技術の進歩をうけて、ヒトやマウスの全遺伝子についての siRNA を設計合成した siRNA ライブラリーが登場してきた。これらを使えば、原理的には各遺伝子に対する阻害剤を投与した状態を全遺伝子分網羅的に、in vitro で作り出すことができる［10-12］。癌細胞であれば、増殖状態を測定することで、各遺伝子全てにおいて、癌細胞に対するその遺伝子の阻害剤による増殖抑制効果を調べることが可能となる。

今回、我々は肺癌由来細胞株に、ヒトの全遺伝子を網羅する siRNA ライブラリーを遺伝子導入し、その増殖状態を測定することで、新規抗がん剤の標的遺伝子探索を行った。そして遺伝子発現の抑制により肺癌由来細胞株の増殖を顕著に抑制する 4 種の遺伝子（AQR、NHP2L1、NUP205 及び RBM8A）を同定した。また、これらの遺伝子の発現を抑制することにより、癌細胞の増殖を抑制できることを確認した。

2. 実験条件

2.1. 細胞

A549（Lung cancer: adenocarcinoma）、A427(Lung cancer: carcinoma)、H460(Lung cancer: non-small cell carcinoma)、NCI-H1975(Lung cancer: adenocarcinoma)、MRC-5(Lung normal: fibroblast)、WI-38(Lung normal: fibroblast)、WI-26(Lung normal; epithelial)、BEAS-2B(Lung normal: epithelial) 、HCT116(Colon cancer: epithelial) 及び BxPC-3（Pancreas cancer: adenocarcinoma）は ATCC より入手した。RERF-LC-AI(Lung: squamous cell carcinoma)、PC14(Lung: adenocarcinoma)は理研 BRC セルバンクより入手した。SBC-3(Lung: small cell carcinoma)は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。いずれも添付の条件に従って培養し実験に使用した。

2.2. トランスフェクション試薬の検討

96 ウェルプレートにて GAPDH siRNA による発現抑制を定量 PCR による発現抑制効果で評価。siRNA 濃度は 100nM、siGENOME Control Pool Non-Targeting #1 _ Cat.D-001206-13-20（Dharmacon）、 OTP Pool GAPD Human _ Cat.001830-10-20（Dharmacon）を使用し、3 試薬を同量（0.3μL/well）で比較検討した。播種細胞数は 2,000 cells/well で、siRNA 導入 3 日後 に RNeasy Plus Micro Kit （QIAGEN）を用いて RNA 抽出を行い、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR（Invitrogen）にて cDNA 化した。定量 PCR 試薬 として SYBRPremix Ex Taq（Perfect Real Time）（TAKARA）、プライマーとして TAKARAsiRNA を用いて定量PCRを行った。

2.3. スクリーニングのプロトコール

384 ウェルプレート（Corning 社；カタログ番号 3570）に siGENOME(Dharmacon 社)のライブラリーを 1.25 pmol ずつ分注した。各プレートに陽性コントロールとして kinesin family member 11（KIF11）［13］に対する siRNA（Thermo Scientific 社；カタログ番号 M-003317-01-0020）、及び陰性コント

ロールとして Non-Targeting siRNA Pool #2（NT-2；Thermo Scientific 社；カタログ番号 D-001206-14-20）も同量分注し、活性値及びアッセイ精度の算出に用いた。

一方で、Opti-MEM I（Gibco 社；カタログ番号 31985）5μl と siRNA 導入試薬である RNAiMAX（Invitrogen 社；カタログ番号 13778-150）0.025μl を混合し、室温で 10 分間保持した後、前述の siRNA を分注した 384 ウェルプレートに添加した。室温で 20 分間インキュベーションした後、D-MEM（ナカライテスク社；カタログ番号 08456-65）、10% Fetal Bovine Serum（Sigma 社；カタログ番号 13778-150）から成り、RERF-LC-AI 細胞を 500 個含む培養液を 20μl 添加し、37℃、5%CO^2 環境下で 4 日間培養した。各ウェルに CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（Promega 社；カタログ番号 G7571/2/3）の溶液を 25μl 添加し、発光量を ViewLux ハイスループットマイクロプレートイメージャー（PerkinElmer 社製）を用いて測定した。各ウェルの発光値を基に、プレート毎に陽性コントロールである KIF11 siRNA の増殖抑制度活性を 100%、陰性コントロール NT-2 の増殖抑制活性を 0%として、ライブラリーの各遺伝子に対する siRNA の増殖抑制活性を算出した。

2.4. 二次評価

Ambion 社の siRNA（製品名 Silencer Select）を各遺伝子 3 配列ずつ用い、前述と同様な方法により RERF-LC-AI 細胞を用いて二次評価を実施した。なお、陽性コントロールには Ambion 社の KIF11 siRNA（siRNA ID s7903；カタログ番号 4390822）、陰性コントロールには Ambion 社の Negative Control #1 siRNA（カタログ番号 4390844, NC-#1）を使用し、各 siRNA を 0.625 pmol ずつ用いた。3 配列の siRNA の平均が KIF11 siRNA の 75%以上の増殖抑制を示す遺伝子を再現性のあるものとした

2.5. 三次評価 A549 での評価

A549 細胞を 300cells/well で播種し、RNAiMAX 0.05μl を用い 5 日後に一次スクリーニングと同様に評価した。

2.6. 細胞株及び正常組織での発現量評価

RERF-LC-AI 細胞及び A549 細胞を、D-MEM（ナカライテスク社；カタログ番号 08456-65）、10% Fetal Bovine Serum（MP Biomedicals 社；カタログ番号 2916754）、 ペニシリン ：5,000 単位/ml、ストレプトマイシン ：5,000μg/ml（Invitrogen 社；カタログ番号 15070-063）を用いて 37℃、5%CO2 環境下で培養し、全 RNA を抽出した。また、クロンテック社より 23 種類のヒト正常組織（脂肪、骨髄、脳海馬、脳、結腸、胎児脳、胎児肝臓、心臓、腎臓、肝臓、肺、末梢白血球、胎盤、前立腺、骨格筋、小腸、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、気管、子宮）を、BioChain 社より 3 種類のヒト正常組織（動脈、静脈、皮膚）の全 RNA を購入した。これらの全 RNA についてアジレント社のマイクロアレイ（Whole Human Genome Microarray Kit；カタログ番号 G4112F）を用いて発現プロファイルデータを取得した。当該データを用い、上記 38 遺伝子の中でヒト正常組織と比較して RERF-LC-AI 細胞及び A549 細胞において 2 倍以上に発現亢進している遺伝子を抽出した。

増殖への影響の詳細評価

A549、RERF-LC-AI、MRC-5 及びBEAS-2B に加えて、ヒト大腸癌細胞株HCT116 及びヒト膵臓癌細胞株 BxPC-3 を用い、Ambion 社の siRNA を各遺伝子 2 もしくは 3 配列ずつ用い(カタログ番号 AQR, s18725, s18726, s18727;NUP205, s23175, s23176, s23177;NHP2L1, s9548, s9549; RBM8A, s19290, s19291, s19292)、前述と同様に各遺伝子をノックダウンした際の細胞の生存性を評価した。各 siRNA の配列を【Table 2-1】に示す。

【Table 2-1】AQR、NUP205、NHP2L1、RBM8A のノックダウンに使用した siRNA 配列

遺伝子シンボル	siRNA 番号	センス RNA 配列および 3'オーバーハング(小文字)	配列番号	アンチセンス RNA 配列および 3'オーバーハング	配列番号
AQR	s18725	5'-GAAGUAGACUUGAUACGAAtt-3'	9	5'-UUCGUAUCAAGUCUACUUCca-3'	10
AQR	s18726	CGACAUCAUCAAUAGACGAtt	11	UCGUCUAUUGAUGAUGUCGcg	12
AQR	s18727	GGCACUAAGUUUGACCGGAtt	13	UCCGGUCAAACUUAGUGCCat	14
NUP205	s23175	GGAGCAAGAUGGAUUGAUUtt	15	AAUCAAUCCAUCUUGCUCCtt	16
NUP205	s23176	GAGUACUACUUGUUACAUUtt	17	AAUGUAACAAGUAGUACUCca	18
NUP205	s23177	GGAACGAGAUGAUAUGAUUtt	19	AAUCAUAUCAUCUCGUUCCtc	20
NHP2L1	s9548	CAGCAGUCAUGUAACUAUAtt	21	UAUAGUUACAUGACUGCUGaa	22
NHP2L1	s9549	GAAUGUGCCCUACGUGUUUtt	23	AAACACGUAGGGCACAUUCtt	24
RBM8A	s19290	ACAUUCAUCUCAACCUCGAtt	25	UCGAGGUUGAGAUGAAUGUtt	26
RBM8A	s19291	AGAGCAUUCACAAACUGAAtt	27	UUCAGUUUGUGAAUGCUCUcg	28
RBM8A	s19292	AUAUGAAACAUACAAGGAAtt	29	UUCCUUGUAUGUUUCAUAUtc	30

ノックダウンの評価については、siRNA導入後48時間の段階で、Cell Amp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR(タカラバイオ社;カタログ番号 3732)を用いて鋳型サンプルを調製し、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II(タカラバイオ社;カタログ番号 RR086A)を用いて定量 PCR 法により行った。なお、各遺伝子の定量 PCR 用プライマーはタカラバイオ社(カタログ番号 AQR, HA080236; NUP205, HA078518 ; RBM8A, HA139286)もしくはキアゲン社(カタログ番号 NHP2L1, QT00027867)の製品を使用した。発現量測定においては、同時に補正遺伝子としてβアクチンの測定を行い、補正を行った。

3. 実験結果

3.1. スクリーニング対象細胞株の選択

肺癌由来の細胞株としては、RERF-LC-AI(squamous cell carcinoma)、A549(adenocarcinoma)、A427(carcinoma)、H460(non-small cell carcinoma)、NCI-H1975(adenocarcinoma)、PC14(adenocarcinoma)、SBC-3(small cell carcinoma)の中から、細胞の増殖性、取り扱い安さ、導入効率の良さ（data not shown）から1stスクリーニングの対象細胞として RERF-LC-AI、2nd スクリーニングの対象細胞として A549 を選択した。癌細胞に対する正常細胞株としては、肺由来の正常細胞として MRC5(fibroblast)、WI-38(fibroblast)、WI-26(epithelial)、BEAS-2B(epithelial)の中から、siRNA 導入が可能であった MRC5 と BEAS-2B を選択した【Table 2-2】。

【Table 2-2】 今回のスクリーニングに使用した細胞株の特徴

		臓器	形態	性状	由来	用途
RERF-LC-AI	扁平上皮癌	肺	上皮様細胞	付着細胞	ヒト	1 次スクリーニング
A549	上皮癌	肺	上皮細胞	付着細胞	ヒト	2 次スクリーニング
MRC5	正常	肺	繊維芽細胞	付着細胞	ヒト	コントロール
BEAS-2B	正常	肺/気道	上皮細胞	付着細胞	ヒト	コントロール

3.2. siRNA ライブラリーの選択

siRNA ライブラリーは複数の会社から発売されているが、大きくわけて 2 つのタイプに分類される。

【Fig.2-1】Pool 配列タイプと Single 配列タイプの siRNA ライブラリー

pool 配列タイプと single 配列タイプである【Fig. 2-1】。通常、ライブラリーに含まれる siRNA は実験などで実際にノックダウン活性を調べたものではなく、ソフトウエアでデザ

インしたものであるため、必ずしも高活性とは限らない。そのため、通常は各遺伝子に対し複数（通常 2 個～4 個）の siRNA を設計し使用する。pool 配列タイプは、文字通り、一つの遺伝子に対して設計した複数の siRNA を pool してあり、single は pool せずに複数の Well に分注してある。狙った遺伝子を確実にノックダウンするという目的に対しては、複数 siRNA をミックスして使う pool 配列タイプが簡便であるが、一方で siRNA には似た塩基配列をもった mRNA を分解してしまうというオフターゲット効果がある［14］。このため、pool 配列タイプでスクリーニングした結果には、オフターゲット効果による多数の偽陽性が含まれる。これを見分けるためには、各 siRNA を違う well に分注した single 配列タイプが役に立つ。例えば同じ遺伝子を狙った異なる siRNA 3 つのうち、1 つでしか表現型が出ていないものはオフターゲット効果による可能性が高いという判定が可能である。つまり、siRNA ライブラリーには、ノックダウン活性のばらつきと、予期せぬオフターゲット効果の 2 つの欠点が常に付きまとうため、実際の所はこれらのライブラリーを使い分けながらスクリーニングを進めることになる。

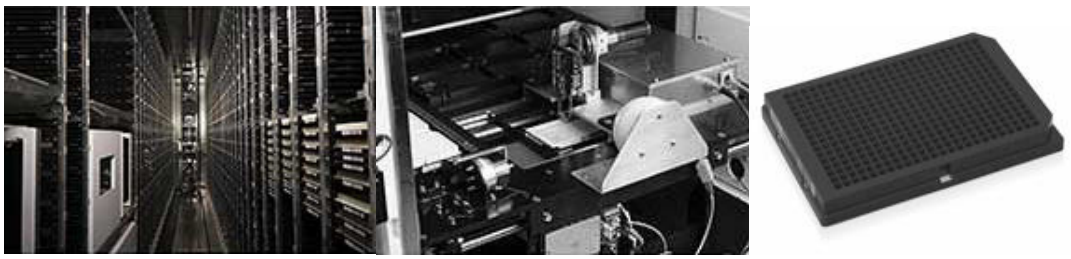
【Table 2-3】に現在利用可能な siRNA ライブラリーの情報をまとめた。Pool 配列タイプとしては Dharmacon 社（現 Thermo Fisher Scientific）のものが唯一で、他の会社の製品は基本的に single 配列タイプである。ヒトの全遺伝子に対する配列が格納されているのは siGENOME (Dharmacon 社)と Silencer Select(Ambion 社)の製品だけである。全遺伝子を対象とした第一次のスクリーニングとしては、この 2 つのどちらかを選ぶことになる。siGENOME は各遺伝子に 4 つの siRNA がデザインされ 1 つの well に分注され、Silencer Select は各遺伝子に 3 つの siRNA がデザインされ､それぞれ別の Well に分注されている。第一次スクリーニングでは、多数のアッセイを行わねばならないことから、偽陽性は高いものの、Well の数が少なくて済む siGENOME を選択することにした。

【Table 2-3】各社から発売されている siRNA ライブラリーの特徴

メーカー	Dharmacon	Ambion	QIAGEN	Sigma-Aldrich RNAi
製品名	siGENOME	Silencer Select	—	siPerfect
遺伝子数	18,000	21,585	19,121	(8,589 genes)
siRNAs / gene	4 (Pool)	3 (Single)	2 or 4 (Single)	1
Off-Target 考慮	No	Yes	Yes	Yes
化学修飾	No	Yes	No	No
使用濃度	100 nM (25 nM each)	5 nM	20 nM?	5 nM?
コメント	Hitが多いことが問題。使用濃度は100nMと高い。配列設計ではOff-targetを考慮せず。	最新のアルゴリズム+化学修飾でOff-target回避。KD効率も良いとされる。使用推奨濃度は5nMと低い。	Off-targetを考慮したアルゴリズム。	Whole Genome Libraryはなし。Off-targetを考慮したアルゴリズム。

3.3. siRNA ライブラリーの準備

siRNA ライブラリーは、何回かのスクリーニングに使える量の siRNA がまとめて分注された状態で購入するため、実際にスクリーニングに使用するには、準備作業が必要となる。まず、凍結乾燥状態で納品された siRNA を溶解し、マスタープレートを作製する
次にマスタープレートから、アッセイ実施濃度に合わせて、１回のスクリーニングで使い切る量を分注したレプリカプレートを作製する（通常は一度に複数回分のレプリカプレートを作製する。凍結融解は siRNA にダメージを与えるため、できる限り凍結融解を避けるためである。また、siRNA は分解しやすいため、プラスチック備品は RNase free が保証されているディスポーザブル製品を利用し、使用するすべての機器などは DEPC (diethyl pyro carbonate)　RNase-OFF（宝バイオ社）などで RNase Free 処理を行う。全遺伝子に対する siRNA は莫大な数となるため、分注したプレートにはバーコードを配布し、データベース上で登録しながら、全体が－20℃に保たれた自動倉庫に格納する【Fig.2-2】。各プレートの各 well に何の遺伝子に対する siRNA が分注されているかのデータベースも作製する。最終的に Dharmacon siGENOME Library　384 plate 68 枚をスクリーニングすることで、21121 遺伝子に対する RNAi スクリーニングが実施できるセットが出来上がった。



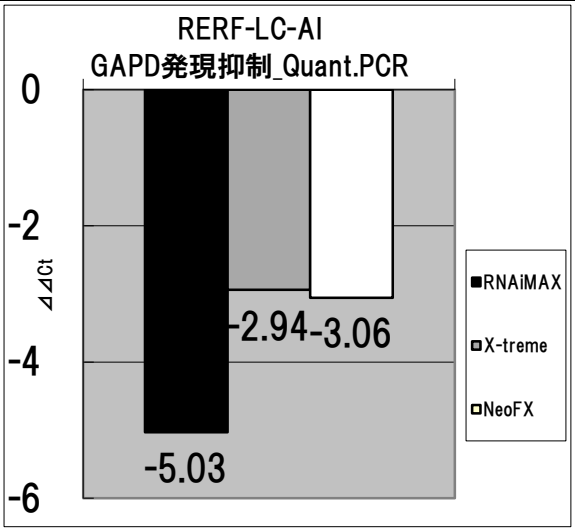
【Fig. 2-2】siRNA ライブラリーの保管装置

3.4. スクリーニング系の構築

3.4.1. siRNA 導入条件の至適化（その１）：トランスフェクション試薬の選択

実際に RNAi スクリーニングを行うにあたって、各試薬の使用量など、実験条件の設定を行った。まず、トランスフェクション試薬としては、X-treme（Roche 社）、RNAiMAX(Thermo 社)、NeoFX（Thermo 社）の試薬をそれぞれ検討した。検討には GAPDH に対する siRNA を用い、定量 PCR によって発現抑制率を測定した【Fig.2-3】。その結果、細胞毒性は他の試薬にくらべ若干強いが発現抑制活性が強い RNAiMAX 試薬を使うことに決定した。

試薬と細胞の混合方法には、接着している細胞に対し siRNA 混合物をかける Forward transfection 法と、先に siRNA 混合物を well にいれておき、あとから細胞を加える reverse transfection 法があるが、発現抑制効率および、作業手順の少なさから結果が安定すると期待できる reverse transfection 法を採用することとした。

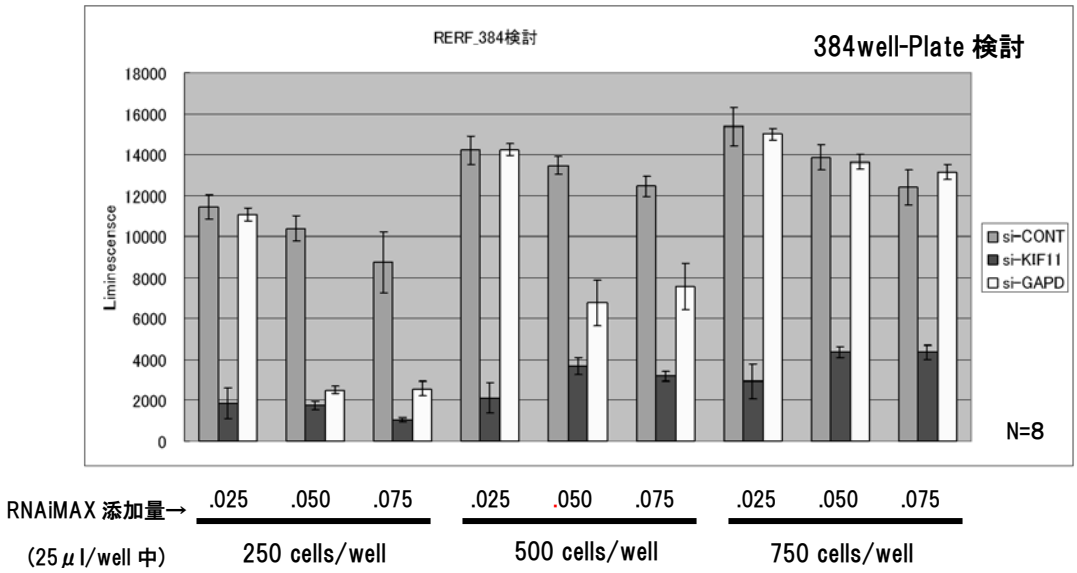


【Fig.2-3】トランスフェクション試薬の検討

96well plate に 2000cells/well で細胞をまき、siRNA 濃度は 100nM でトランスフェクション試薬は各 0.3μl/well 使用し、siRNA 導入 3 日後に定量 PCR で測定

3.4.2. siRNA 導入条件の至適化（その２）：384well plate での細胞密度の至適化

次に細胞密度の設定を行った。RERF-LC-AI 細胞に対し、細胞増殖抑制効果が既に確認されている KIF11 [13] に対する siRNA を用い、RNAiMAX の使用量を 0.025～0.075μl、細胞数を well あたり 250～750 個に変化させ、細胞増殖を指標として評価した。コントロールとして siRNAcontrol、GAPDH に対する siRNA を用いた。siRNA の濃度としては、オフターゲット効果を回避するため、50nM とした。384well plate でのトータルの液量は 25μl/well で実施した【Fig. 2-4】。この条件では GAPDH は非特異抑制が強く細胞の viability が下がっていたが、細胞増殖抑制活性が高く、かつ、ネガティブコントロールでの増殖抑制が見られない条件を選択することとし、500 もしくは 750 細胞/well で細胞をまき、0.025μl の RNAiMAX を使用することとした。



【Fig. 2-4】細胞数とトランスフェクション試薬量の検討
siRNA 濃度 50nM で、導入 4 日後に CellTiterGlo で Assay

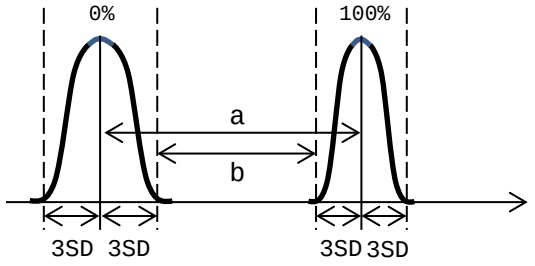
3.4.3. 大規模スクリーニングでのスクリーニング精度の確認

大規模スクリーニングの場合、何枚もの 384well プレートを何日かに渡ってアッセイすることになるが、プレート間でのばらつきが大きくなりすぎると、全ての実験を通したデータ比較ができなくなり、スクリーニングとして成立しない。スクリーニングとして成立するためには、同じ値を示すべき実験（実際には well）が一定の基準以内の値に収まること（通常±10%以内)、バックグラウンドノイズの値が一定以下に収まること（通常ポジティブシグナルの 1/3 以下)、複数回の測定において０となるべきネガティブコントロールの測定値群と、１００となるべきポジティブコントロールの測定値群に十分な乖離があることが必要で､これらを知るためのスクリーニングの精度指標としてそれぞれCV値､S/B比、Z'値がある

・CV 値（coefficient of variation）:【CV（%）＝標準偏差（SD）/平均（Av)】
どれ位のばらつきがあるかを示す指標

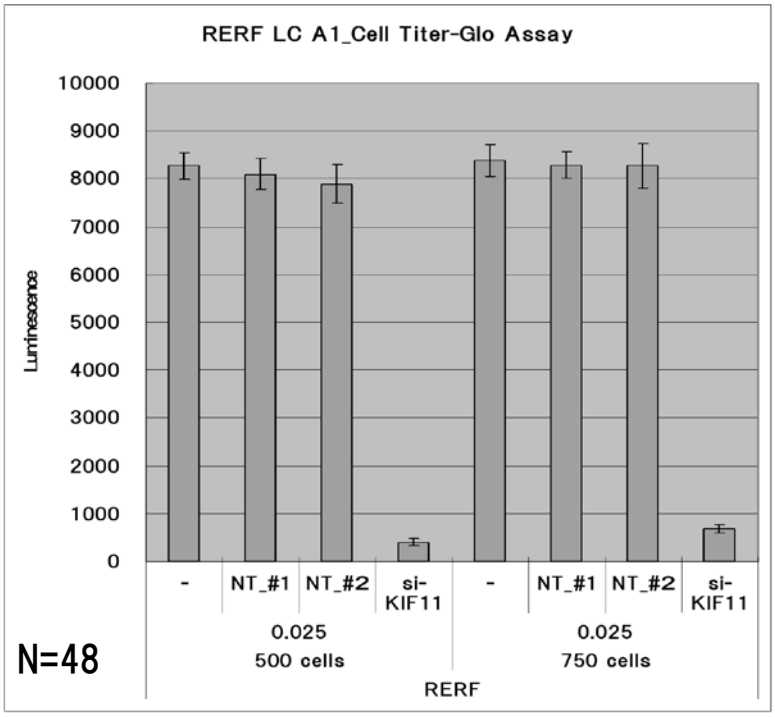
・ S/B 比（Signal/Background Ratio）:【$S/B=Av_{100\%}/Av_{0\%}$】
バックグランドに対するシグナル値の比

・ Z'値 (Z' factor) :【Z'= 1 － 3 × (SD100%＋SD0%) / (Av100%－Av0%) あるいは Z'=b/a】
アッセイ系の精度を表す指標【Fig.2-5】



【Fig.2-5】 Z'値の算出の仕方

一般的にスクリーニングが成立するためにはCV値≦10%､S/B≧3､Z'≧0.5が目安となる。スクリーニング精度を確認するため、RNAiMAX0.25μl、siRNA として siKIF11 と NT_#1 と NT_#2 を用いて 500 細胞/ well および 750 細胞/well の条件で N=48 で精度確認を行った。その結果、siKIF11 では細胞死が起こるため CV 値が若干基準を超えるが、Z'値はそれぞれ Z'=0.847 および 0.857 といずれも 0.5 を上回る良好な精度を出せることがわかった【Fig.2-6 及び Table 2-4】。



【Fig. 2-6】RFRE-LCAI 細胞での増殖アッセイの安定性

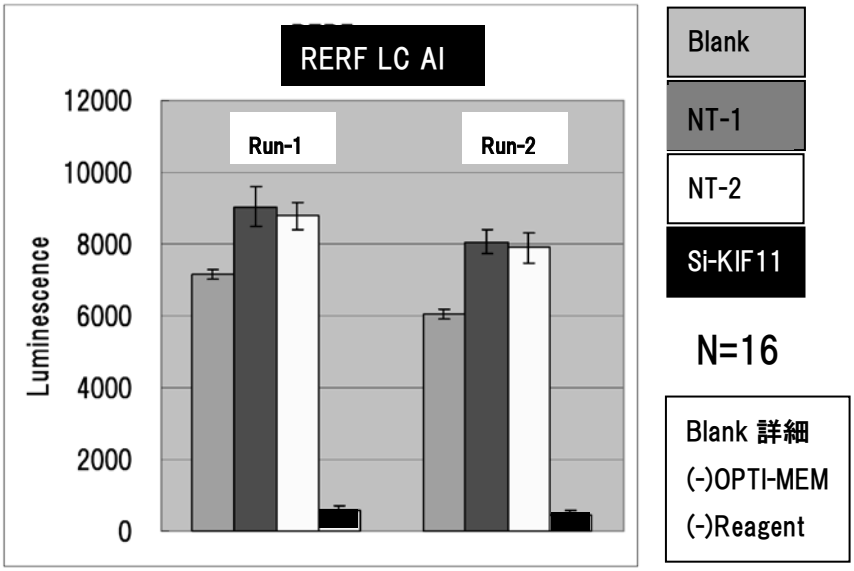
【Table 2-4】RERF-LCAI 細胞でのスクリーニング精度

	500cells/well		750cells/well	
	NT	siKIF11	NT	siKIF11
平均	8097	404	8288	692
SD	317	75	277	84
CV	3.9	18.6	3.3	12.1
S/B	20.0		12.0	
Z’	0.847		0.857	

3.4.4. 実施日を変えてのスクリーニング安定性の検証

実際のスクリーニングでは、多数のプレートを処理するため、実験が何週にもわたって継続することとなる。実験室の環境は一定の温度湿度に保たれるようになってはいるが、休日の空調停止や天候などが原因で、CO^2インキュベーターや分注機などの機器にはコントロール値が日差変動を示すものがあり、スクリーニング精度を保てない場合がある。これを確認するため、実施日を変更して精度確認を行った。

実験は Duplicate で N=16　siRNA 濃度は 50nM 細胞数は 500 細胞/well でアッセイ期間は 5 日、それぞれ開始日を 3 日ずらしておこなった。その結果 Z'=0.76 ～0.82 と良好な精度が保たれていることを確認できた【Fig.2-7 及び Table 2-5】。



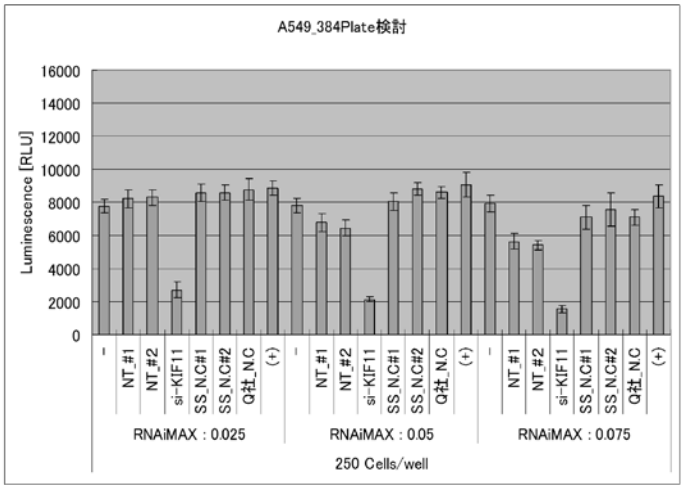
【Fig. 2-7】 実施日 Day_#1 のデータ

【Table 2-5】 Day_#1 および#2 の Z'値

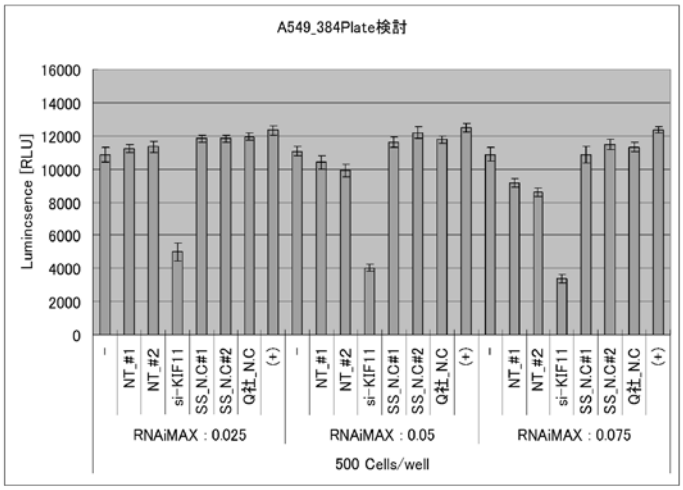
実施日		Z'
Day_#1	Day_#1-RUN1	0.76
	Day_#1-RUN2	0.82
Day_#2	Day_#2-RUN3	0.81
	Day_#2-RUN4	0.79

3.4.5.　細胞を A549 細胞株に変えての検討

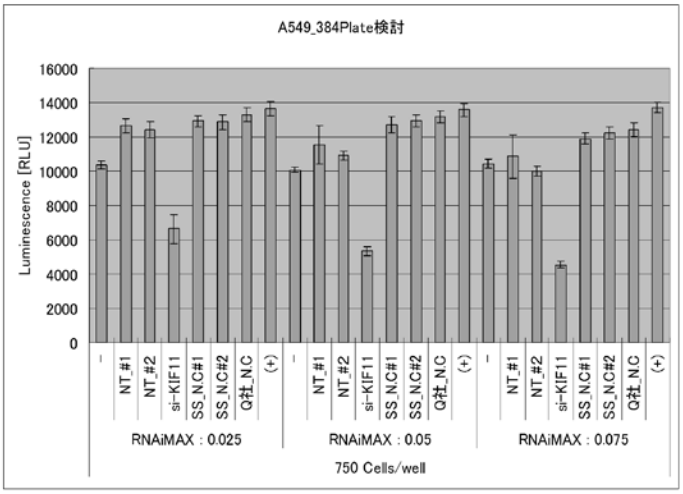
一次スクリーニングは RERF-LC-AI 細胞で実施するが、このスクリーニングで陽性として選抜されたクローンは A549 細胞でも確認を行う。一次スクリーニング程多数のプレートを処理することはないが、384plate で処理することが予想されるため、今度は細胞を A549 に変えて条件設定を行った。siRNA ライブラリーとしては、Ambion 社の Silencer Select を 25nM で使用し、細胞数は 250 細胞、500 細胞、750 細胞/well で RNAiMAX 試薬も 0.025μl、0.05μl、0.075μl と変化させ、siRNA 導入効率を測定した【Fig.2-8A から 2-8C】。その結果、一番少ない 250 細胞でも測定できることが判明したが、細胞が少なすぎると、安定性が損なわれる傾向が見えたので 300 細胞/well を最終的な条件とした（data not shown）



【Fig.2-8A】細胞密度 250 細胞/well :RNAiMAX 試薬 0.025～0.075μl
A549 細胞に siRNA を濃度 25nM で導入。5 日後に CellTiterGlo で Assay



【Fig.2-8B】細胞密度 500 細胞/well :RNAiMAX 試薬 0.025～0.075μl
A549 細胞に siRNA を濃度 25nM で導入。5 日後に CellTiterGlo で Assay



【Fig.2-8C】細胞密度 750 細胞/well :RNAiMAX 試薬 0.025～0.075µl
A549 細胞に siRNA を濃度 25nM で導入。5 日後に CellTiterGlo で Assay

3.4.6. スクリーニングスケジュールの決定

スクリーニング機器は他の実験者との共用であること、また休日は実験室が利用できないという制約があるため、数週にわたって安定して作業が繰り返せるようにスケジュールを調整し、これまでに設定したパラメーターを用いて、以下のようにスクリーニングスケジュールを決定した。

スクリーニングスケジュール

【木曜日 (Run x-1)、金曜日 (Run x-2)】

Reverse transfection 10 枚

・**transfection 溶液調整**

↓

5μl 添加［Multidrop combi］

・**細胞調整**　2.5×10^4　cells/ml（20μl×384×10=76.8ml 以上必要）

↓

RERF-LC-AI の場合 500 細胞/20μl 播種[Mutidrop384]、A549 は 300 細胞/20μl 播種[Mutidrop384]

Plate 遠心

【月曜日 (Run x-1)、火曜日 (Run x-2)】

CellTiterGlo Assay　10 枚

・室温の 30min

・25μl Cell TiterGlo Assay soln.　添加[Multidrop 384]

↓10 min 以上後

・Viewlux 測定

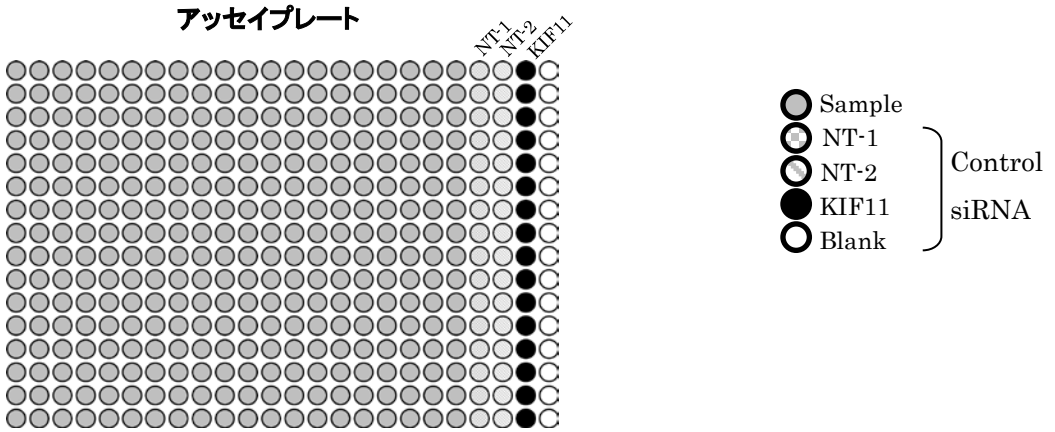
【水曜日】

siRNA 分注　20 枚

1.25μl　[Cybi-well 384]

使用アッセイプレート：corning 384 white plate #3570

マップは下記 Fig.2-9 参照



【Fig. 2-9】プレートのマップ

3.5.　siRNA を用いた発現抑制一次スクリーニングの実施

ヒト肺扁平上皮癌由来の細胞株 RERF-LC-AI を対象とし、384 ウェルプレートに分注したヒト全遺伝子 siRNA ライブラリー（Human siGENOME siRNA Library – Genome；Thermo Scientific 社；21,121 遺伝子）を用いて、発現抑制により同細胞の増殖が抑制される遺伝子をスクリーニングした。陽性コントロールとして kinesin family member 11（KIF11）に対する siRNA を、陰性コントロールとして Non-Targeting siRNA Pool #2 を用い、活性値及びアッセイ精度の算出に用いた。増殖抑制活性が 75%以上の遺伝子 421 個から、Ambion 社 siRNA が購入可能で、プロテオソーム・サブユニットをコードする遺伝子ではない計 337個を二次評価の対象とした【Fig.2-10A】及び Table 2-8】。プロテオソーム・サブユニットをコードする遺伝子を対象外とした理由は、プロテオソームを標的とした抗がん剤が既に市販されているため、当該遺伝子群は癌の新規標的とはなり得ないものの、同 421 遺伝子の中に多数（26 個）含まれていたためである。

3.6.　オフターゲット効果による結果の排除【二次評価】

一次スクリーニングで得られた遺伝子が、これらのオフターゲット効果ではなく、真の遺伝子の発現抑制効果であることを確かめるため、同じ遺伝子の違う部分を狙った siRNA を使い、同様の実験を行った。Ambion 社の siRNA（製品名 Silencer Select）を各遺伝子 3 配列ずつ用い、一次スクリーニングと同様な方法により RERF-LC-AI 細胞を用いて二次評価を実施した。3 配列の siRNA の平均が KIF11 siRNA の 75%以上の増殖抑制を示す遺伝子を再現性のあるものとした。42 遺伝子を抽出した【Fig.2-10A 及び Table 2-8】。

3.7.　違う癌細胞株での効果を調べる【三次評価】

より普遍的な抗がん作用を持った標的を選ぶため、RERF-LC-AI 細胞とは異なった細胞株への影響を調べた。二次評価で選ばれた 42 遺伝子について、ヒト肺腺癌由来細胞株 A549 を用い、同様にして 3 配列の siRNA の平均が KIF11 siRNA の 75%以上の増殖抑制を示す遺伝子を抽出した。結果、RERF-LC-AI 細胞及び A549 細胞の両方で増殖・生存に重要な遺伝子として 38 遺伝子を同定した【Fig.2-10A 及び Table 2-8】。

3.8.　正常細胞に対する毒性評価

これまで得られた標的候補には、癌細胞に限らず正常細胞においても増殖にかかわる遺伝子が含まれる。これらの抑制は正常細胞にも影響し、毒性につながる。正常細胞での増殖抑制活性と、癌細胞での活性は可能な限り乖離していることが望ましい。こういった候補を選び出すため、以下の評価を行った。

ヒト肺正常繊維芽細胞 MRC-5 及びヒト正常気管支上皮細胞 BEAS-2B を用い、前述の 3 配列の Ambion 社 siRNA を用いて同様な実験を行い、各 siRNA の増殖抑制活性を算出した。そして、各正常細胞における 3 配列の siRNA の平均増殖抑制活性が、A549 細胞のそれに比べて 30%以上低い遺伝子を抽出し、Table 2-6 に示す 4 遺伝子を同定した。これらの遺伝子の発現を抑制しても、

正常細胞の増殖に与える影響は小さいことが分かった。なお、残念ながら RERF-LC-AI 細胞と正常細胞 2 種の間で 30%以上の乖離のある遺伝子は見出されなかった。

【Table 2-6】 正常細胞に対する毒性評価

GeneSymbol	RERF-LC-AI における増殖抑制活性(%)	A549 における増殖抑制活性(%)	A549 と MRC-5 の増殖抑制活性の乖離(%)	A549 と BEAS2B の増殖抑制活性の乖離(%)
MFAP1	80.3	113.0	40.7	30.2
NHP2L1	96.3	116.5	61.0	30.0
NUP205	75.5	113.5	47.3	35.3
SNRPB	86.8	105.2	42.0	30.2

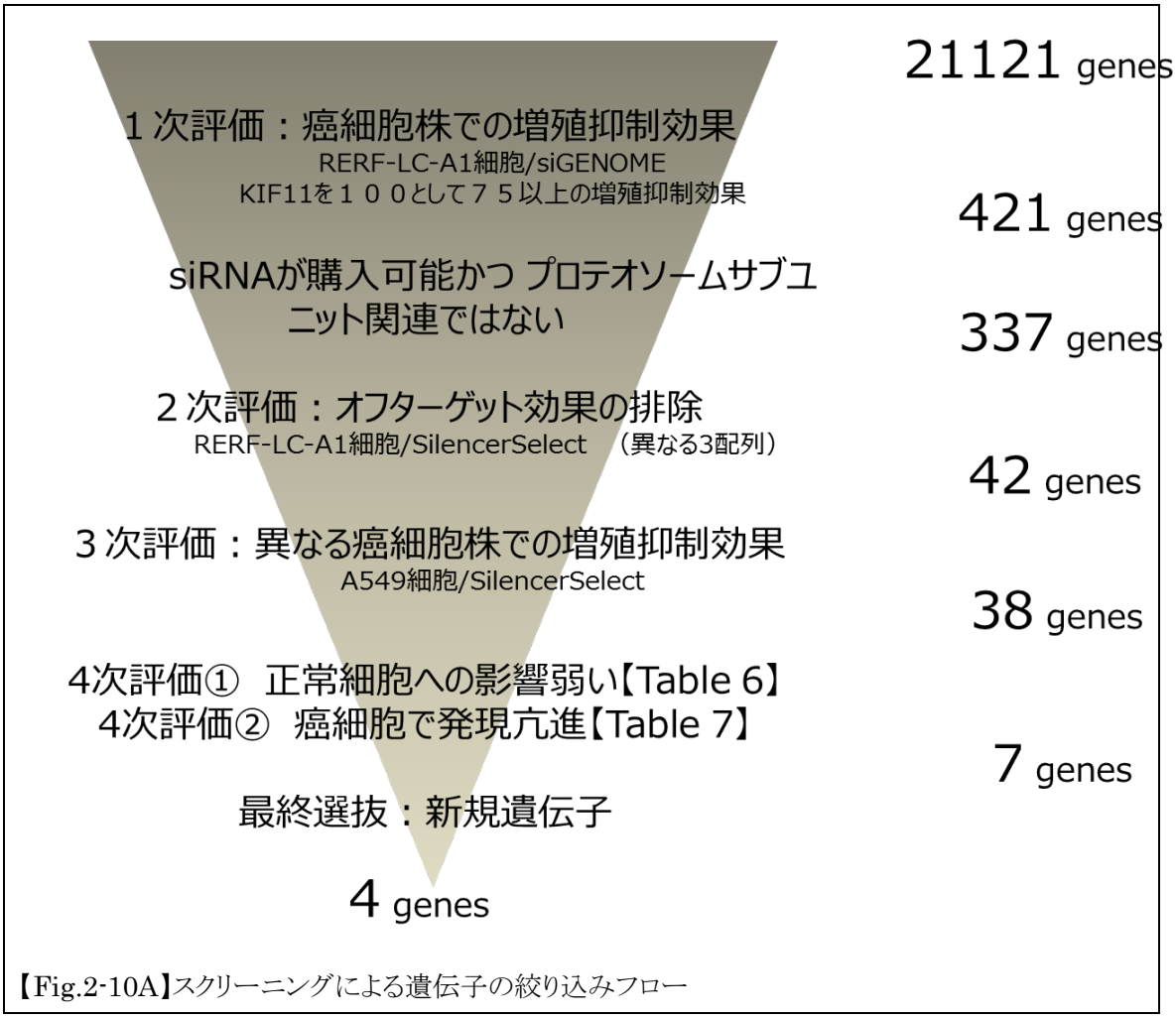
3.9. 癌細胞での各遺伝子の発現状態

正常細胞にくらべ、癌細胞で発現が亢進している遺伝子であれば、毒性に関するマージンは更に大きくなる。この観点で候補遺伝子を更に絞り込むため、RERF-LC-AI 細胞及び A549 細胞を培養し、全 RNA を抽出した。また、クロンテック社より 23 種類のヒト正常組織(脂肪、骨髄、脳海馬、脳、結腸、胎児脳、胎児肝臓、心臓、腎臓、肝臓、肺、末梢白血球、胎盤、前立腺、骨格筋、小腸、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、気管、子宮)を、BioChain 社より 3 種類のヒト正常組織(動脈、静脈、皮膚)の全 RNA を購入し、アジレント社のマイクロアレイ(Whole Human Genome Microarray Kit)を用いて発現プロファイルデータを取得した。当該データを用い、上記 38 遺伝子の中でヒト正常組織と比較して RERF-LC-AI 細胞及び A549 細胞において 2 倍以上に発現亢進している遺伝子を抽出し、Table 2-7 に示す 5 遺伝子を見出した。

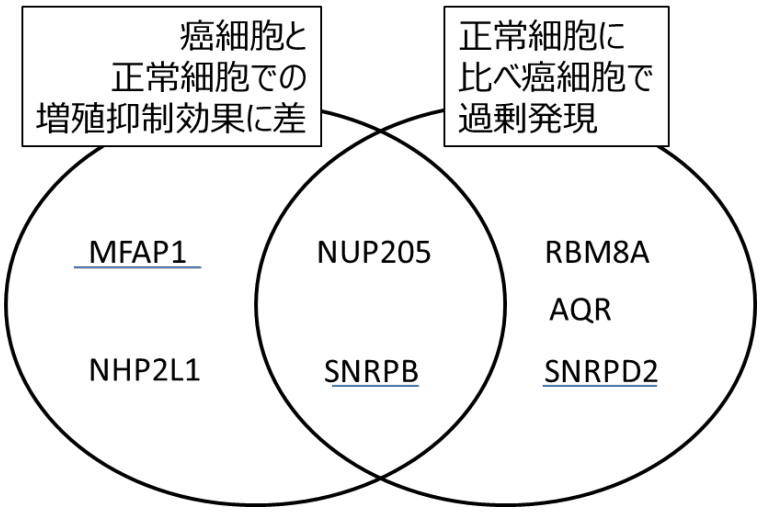
Fig.2-10B、Table 2-6 および Table 2-7 に示す 7 遺伝子(2 遺伝子は表 1 と表 2 で重複)について、米国 National Center for Biological Information の PubMed に登録されている文献において、癌もしくは細胞増殖との明確な関連が報告されているか否かを調査した結果、AQR、NHP2L1、NUP205 及び RBM8A に関してその関連性は報告されておらず、癌の新規標的分子であることが明らかとなった。

【Table 2-7】癌組織と正常組織における発現量

GeneSymbol	RERF-LC-AI における増殖抑制活性(%)	A549 における増殖抑制活性(%)	RERF-LC-AI における相対発現量(対正常組織平均)	A549 における相対発現量(対正常組織平均)
AQR	86.5	121.0	2.7	4.9
NUP205	75.5	113.5	4.1	3.9
RBM8A	99.7	123.3	5.0	2.2
SNRPB	86.8	105.2	3.3	5.0
SNRPD2	88.8	110.7	2.0	2.7



【Fig.2-10A】スクリーニングによる遺伝子の絞り込みフロー

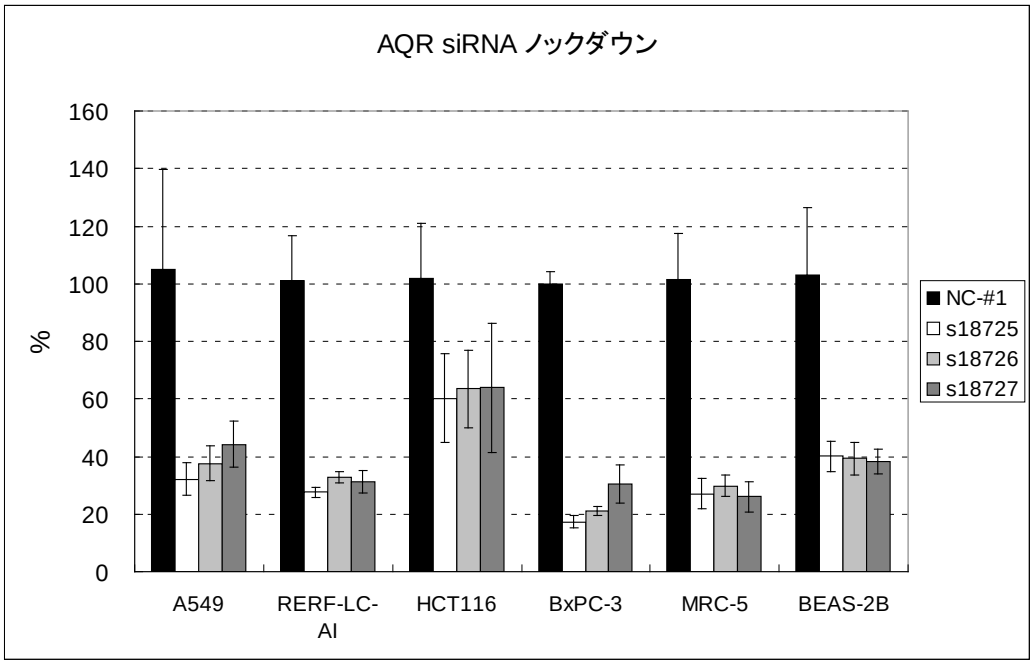


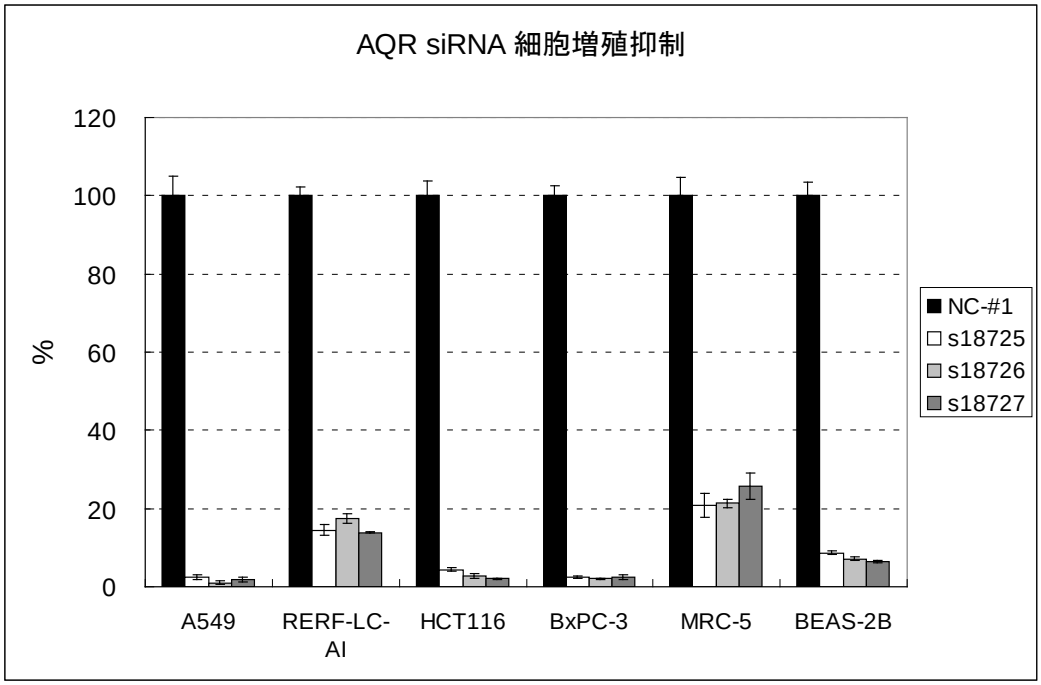
【Fig.2-10B】4次評価で絞り込まれた7遺伝子

3.10.　増殖抑制時の発現抑制率の測定

癌新規標的 4 遺伝子について、siRNA による発現抑制の確認と増殖抑制の再現性の確認、並びに肺以外の臓器由来の癌細胞に対する効果を調べる目的で以下の実験を実施した。前述の A549、RERF-LC-AI、MRC-5 及び BEAS-2B に加えて、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 及びヒト膵臓癌細胞株 BxPC-3 を用い、Ambion 社の siRNA を各遺伝子 2 もしくは 3 配列ずつ用い、前述と同様に各遺伝子を発現抑制した際の細胞の生存性を評価した。

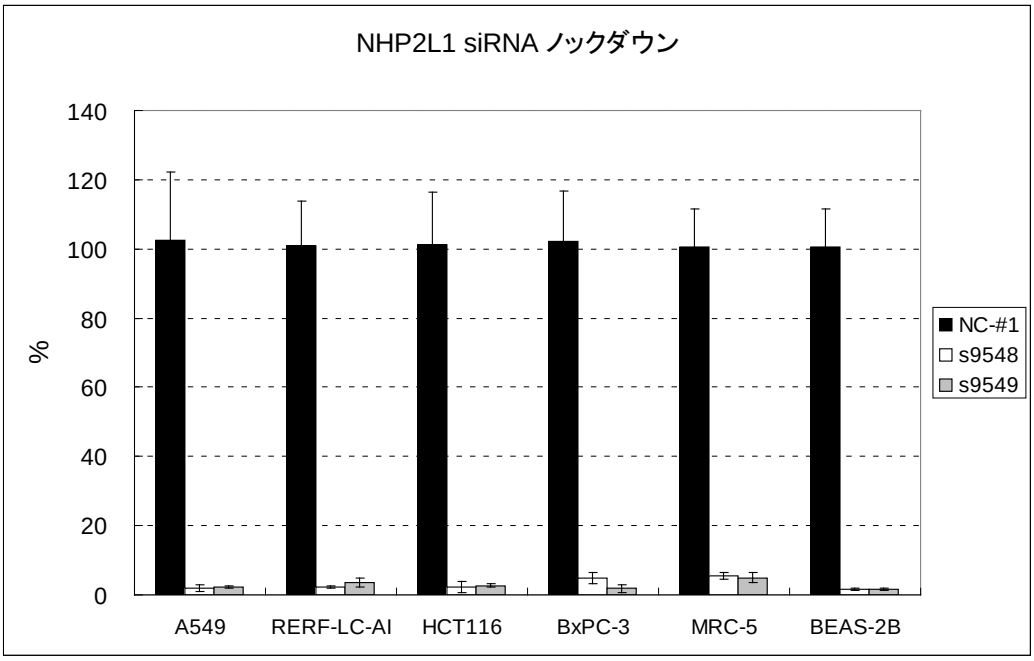
siRNA 導入後 48 時間の段階で発現抑制率の測定を定量 PCR 法により行った。その結果、当該 4 遺伝子に対する siRNA を導入することで、A549 細胞及び RERF-LC-AI 細胞の増殖が強く抑制され、スクリーニング結果が再現された【Fig.2-11～14】。NHP2L1 及び NUP205 に関しては、肺癌細胞 A549 と肺正常細胞 MRC-5 との間で作用に乖離がある現象も再現された【Fig.2-12～13】。また、これら 4 遺伝子に対する siRNA を導入することにより、肺癌由来細胞のみならず、大腸癌由来細胞 HCT116 及び膵臓癌由来細胞 BxPC-3 の増殖も顕著に抑制された。また、siRNA 導入 48 時間後において、siRNA による各遺伝子の発現抑制を確認することができた【Fig.2-11～14】。

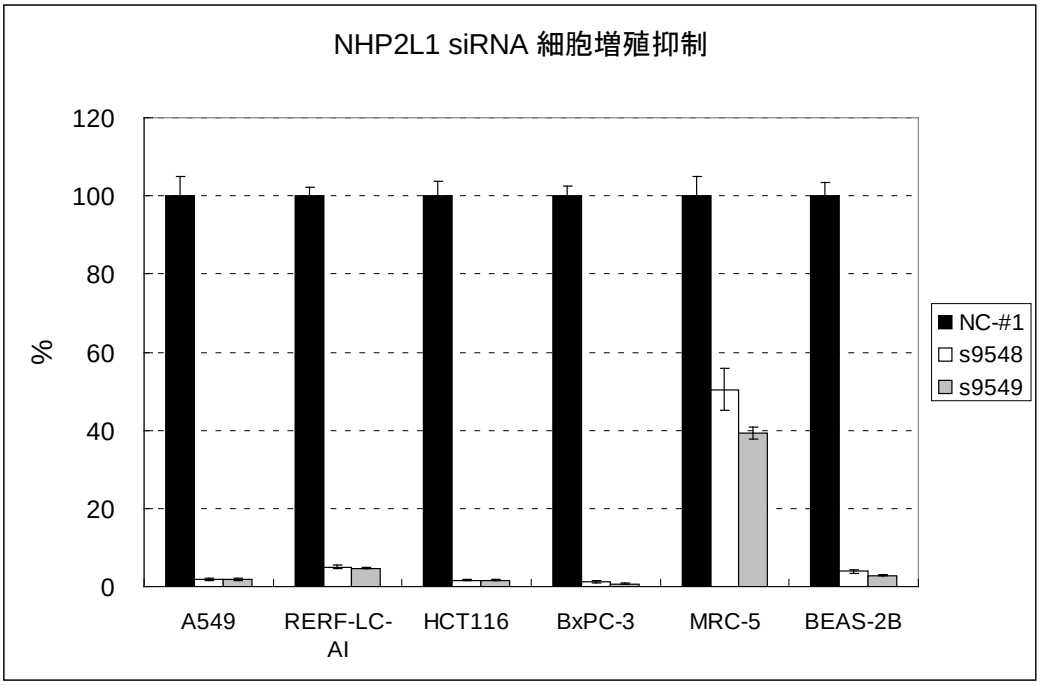




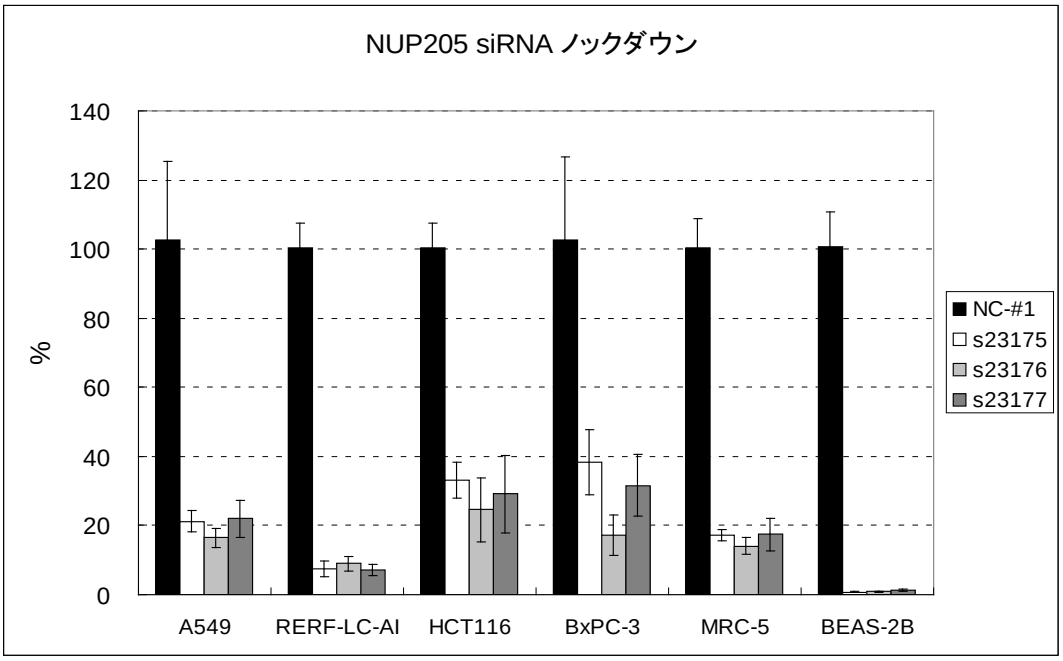
【Fig. 2-11】AQR 遺伝子の発現抑制率と増殖抑制

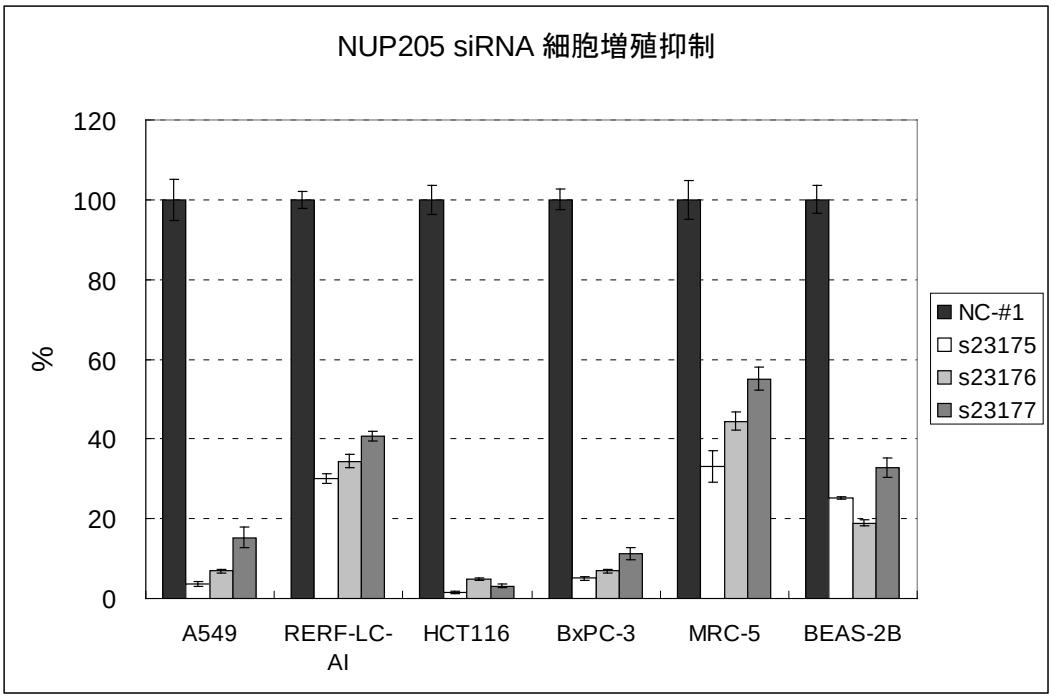
siRNA 導入2日後に定量 PCR





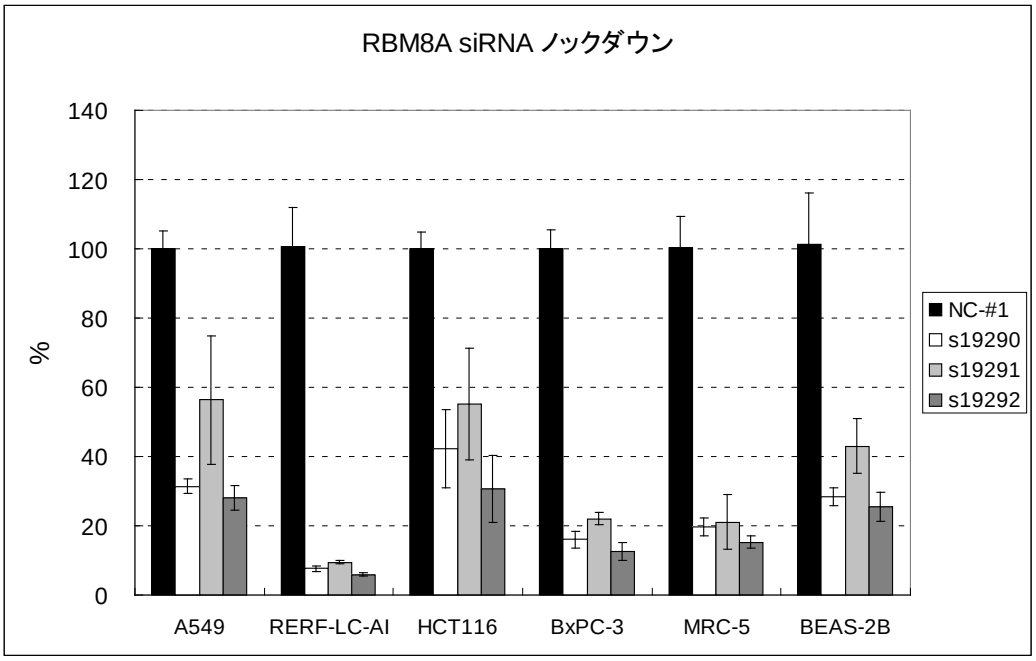
【Fig. 2-12】NHP2L1 遺伝子の発現抑制率と増殖抑制
siRNA 導入2日後に定量 PCR

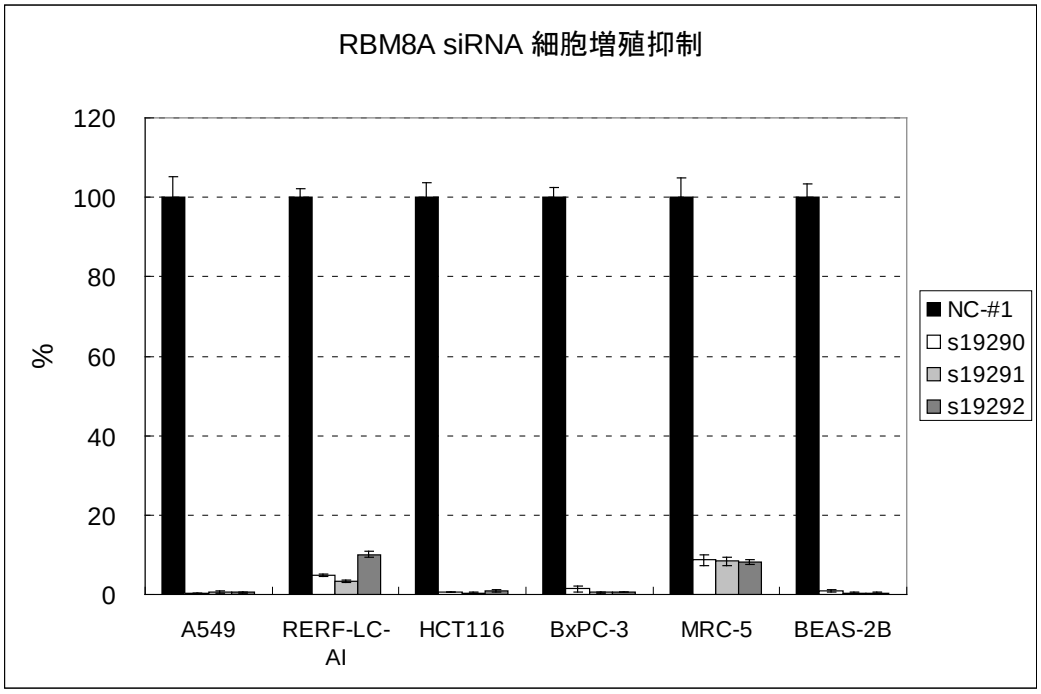




【Fig. 2-13】NUP205 遺伝子の発現抑制率と増殖抑制

siRNA 導入2日後に定量 PCR





【Fig. 2-14】RBM8A 遺伝子の発現抑制率と増殖抑制
siRNA 導入2日後に定量 PCR

4. 考察

ヒト全遺伝子（21121 遺伝子）に対する siRNA ライブラリーを用い、癌細胞の増殖を抑制する機能を持った遺伝子のスクリーニングを行った。再現性や、正常細胞に対する毒性の少なさ、癌細胞での発現量、そして創薬標的としての新規性を指標に選抜を進め、最終的に 4 つの新規標的候補（AQR、NUP205、NHP2L1、RBM8A）を見出した。

4.1. siRNA スクリーニングについて

4.1.1. 一次スクリーニングにおけるヒット遺伝子の選抜基準について

得られた結果から Hit 遺伝子を抽出する際に考慮すべき点が2つある。1つは、siRNA ライブラリーに含まれている siRNA は高い RNAi 効果を示すようにデザインされてはいるものの、実際の発現抑制率にはばらつきがあり、かつ、遺伝子が欠損することによる表現型が出現するために必要な発現抑制率も遺伝子毎に異なるということ、もう1つは、siRNA が狙った遺伝子以外の配列的に相同性を示す遺伝子の発現を抑制してしまうオフターゲット効果[14]の存在である。後者のオフターゲット効果による偽陽性については比較的よく知られているが、ヒット遺伝子の選抜において、本当に注意が必要であるのは前者である。

発現抑制率については、全ての遺伝子に対して実験的に確認したものを準備できないため、各社、それぞれ異なるソフトウエアで効率が高くなるよう設計したものを販売している。経験として実際には抑制効果が弱いものが少なからず存在する。また、表現型が出現する抑制率の閾値が異なるため、半分以下に抑制する siRNA でも遺伝子によっては十分な抑制になっていない事もある。表現型が出現する抑制率が異なる理由としては、遺伝子産物である蛋白質の寿命が異なること、生体内では、その蛋白質が機能を遂行するために必要最小限の量のみが生産されているわけではなく、通常は、やや多めに作られているが、その安全マージン分が遺伝子毎に異なることが考えられる。これらのことから、全遺伝子に対する網羅的なスクリーニングを実施しても、それなりの検索漏れの発生は避けられないと考えられる。 今回はその検索漏れをできる限り少なくするため、一次スクリーニングでは各遺伝子対してデザインされた4つの異なる siRNA を混合して強力に発現抑制してスクリーニングするタイプの siGENOME siRNA Library を使用した。そのため、抑制率不足で表現型が出ない可能性は低くなるが、その一方でオフターゲット効果による偽の表現型出現が起こっている可能性は比較的高目となる。

siRNA 毎に発現抑制率が違うこと、また遺伝子毎に表現型が出始める閾値は異なること、これらの相乗効果で表現型が出ることから、単純に一次スクリーニングにおいて表現型が強烈な順に有望な標的候補遺伝子となるわけではない。よって、比較的弱い表現型まで含め、幅広い範囲で Hit 遺伝子を選抜していくことになるが、あまりこの数が多すぎると、二次スクリーニングでの負担が大きくなる。今回の一次スクリーニングでは、陽性コントロールとして使用した強力な増殖抑制効果のある KIF11[13]に対する siRNA の効果を 100%としたときに 75%以上の増殖抑制効果のあるものを選抜した。この 75%を更に厳しめに 90%以上とした場合だとヒット遺伝子は 134 個に減り、反対に

65%にゆるめるとヒット遺伝子は 1110 個にまで増える。

4.1.2. 二次スクリーニング以降のヒット遺伝子の選抜について

一次スクリーニングでは抑制率優先でオフターゲット効果が比較的多くみられる siGENOME siRNA Library を用いたため、二次スクリーニングでは、single タイプであるAmbion社の Silencer select を用いた。siRNA の設計ソフトも異なるため抑制率も一次スクリーニングとは異なり、二次スクリーニングではヒット遺伝子が 42 個まで絞られた。その後、三次スクリーニングとして、同じこのライブラリーを使い、細胞株を A549 に変更して肺癌細胞に幅広く効く標的を同様の基準で調べたが、ここでは 38 個が残った。抗癌標的遺伝子であるため、正常細胞への毒性は完全には避けられないが、できる限りの乖離を取るため、最後の四次スクリーニングとして、正常細胞での比較検討を2つの手法で行った。1つは増殖抑制に対する効果の違いで、当然癌細胞にのみ増殖抑制効果を示すものが一番よいものとなる。もう1つは正常細胞や組織にくらべ、癌細胞でのみ強力に発現している遺伝子の選抜である。通常スクリーニングに使える細胞は、無限に増殖することが要求されるため完全に正常とは言えないが、siRNA が導入可能という視点から呼吸器系の癌を形成しない細胞 MRC-5 と BEAS-2B を用いた。結果的にこれら 2 株には活性がなく、癌細胞株にだけ増殖抑制効果を示すものはなかったため、どちらか一方と A549 との増殖抑制率が 3 割以上異なるものを選抜した。RERF-LC-AI 細胞は正常細胞と挙動が似ており、A549 及び RERF-LC-AI 両方で増殖抑制率が 3 割以上異なるものはなかった。

4.1.3. スクリーニング全体の構成について

今回、RERF-LC-AI 細胞で最初に行い、次に A549 細胞で実施し、その後 MRC-5 及び BEAS-2B の順で実施した。仮に最初のスクリーニングを A549 細胞で行い、次に RERF-LC-AI 細胞で行った場合は、また違った結果が得られたかもしれない。ただ、RERF-LC-AI 細胞に比べて A549 細胞は感受性が高いため、一次スクリーニングで非常に多くの遺伝子がヒットし、二次スクリーニング以降に進むために厳しい基準での絞り込みが必要となったと考えられる。A549 は EGF 受容体が過剰発現した癌細胞株で、この株を使った抗がん剤が当時、多数開発中であったため、今回はそれとは少しタイプの違う肺癌細胞株である RERF-LC-AI 細胞を最初のスクリーニングに用いた。

4.2. 見出された創薬標的候補遺伝子について

AQR は RNA 結合タンパクであり（Genbank Accession ID: NM_014691）、スプライソソーム複合体の構成因子であることが推測されているが（Gene Ontology データベース）、機能の詳細については不明である。ヒト HEK293T 細胞において AQR を siRNA で発現抑制すると、ヒト免疫不全ウイルスである HIV-1 の同細胞に対する感染効率が低下すると報告されている[15]。

NHP2L1 はスプライソソーム複合体の構成因子であり（Genbank Accession ID: NM_001003796）、U4 核内低分子 RNA（snRNA）に結合することで、スプライソソームの会合において重要な役割を果たしている[16]。

NUP205 はヌクレオポリンと呼ばれる核膜孔複合体の構成因子の一つであり[17](Genbank Accession ID:NM_015135 ; Molecular biology of the cell、15 巻、4261－4277 頁、2004 年)、核膜孔に局在して細胞質から核へのタンパク質輸送に関与している[18]。

RBM8A は RNA 結合タンパクであり、主として核に局在するが、細胞質側にも存在する(Genbank Accession ID:NM_005105)。スプライシング中の mRNA に結合し、スプライシング後もその結合を維持することで、イントロンが存在した場所を示し、スプライシングの前後の過程を繋げる役割を担っていると考えられている[19](Molecular cell、6 巻、673－682 頁、2000 年)。

これら 4 つの遺伝子はこの当時、癌細胞に対する活性は報告されておらず、なぜこれらの抑制が癌細胞の増殖を抑えるのかも不明であった。その後、NUP205 と RBM8a についてはいくつかの報告があり、その機構が推定されるようになった。

NUP205 については、のちに別の新規肺癌治療標的として見出された TMEM209 と複合体を形成し、c-Myc や STAT3、p65 など肺がん細胞で細胞質から核内へ移動している蛋白の輸送に関与していることが報告されている[20]。TEM209 は NUP205 の安定化を担い、TEM209 の発現を抑制すると NUP205 の蛋白レベルが減少し、これによって癌細胞内で核内へ輸送されている蛋白、たとえば c-Myc の核内移行が妨げられ、c-Myc の下流に位置する CDC25A や CDK1 の過剰発現が抑えられる。当然、核内輸送の本体である NUP205 を抑制することでも、同様の結果が予想され、これが NUP205 の発現抑制が肺癌細胞の増殖を抑制する機構であると思われる。この遺伝子は、最後の正常細胞との抑制効果の違い、および発現量の違いの2つのスクリーニングで共通して残った唯一の新規標的候補であり、今回、一番有望な標的遺伝子である。

RBM8a については、精神遅滞や統合失調症などとの関連が示唆される 1q21.1 に位置することから、神経系での機能が調べられ、歯状回における過剰発現でマウスの不安動作が増えること、RBM8a は神経細胞において CaMK2 や GluR1、Egr1 の mRNA と結合し、Nonsense-mediated mRNA decay(NMD)を呼ばれる機構で、これらの mRNA を壊すのではないかと考えられている[21]。最近になって皮質神経前駆細胞[cortical neural progenitor cells: NPCs]の増殖と分化に必須であることも報告された。RBM8a が発現抑制されると、NPCs の増殖が抑制され、神経細胞への分化が始まる。 また、違う研究では A549 細胞で MAGOH という遺伝子産物とヘテロダイマーを形成し、centrosome に位置してM期の進行に必須の因子となっていることが報告されている[22]。NMD は色々な細胞で、mRNA を分解する機構として使われているので、癌細胞では違う mRNA を標的とし、これらを発現調節しているのかもしれない。しかしながら、細胞のM期進行に必須であるならば、RBM8a は多くの細胞の増殖を止めることとなり、実際にノックダウン実験の増殖アッセイでも増殖抑制効果が強くでている。また、別の報告では RBM8a は血小板減少―橈骨欠損症候群[Thrombocytopenia-absent radius syndrome: TAR syndrome]の原因遺伝子であることが報告された[23]。 TAR syndrome は一過性の血小板減少症と橈骨の欠損が特徴的な常染色体劣性遺伝性疾患で、RBM8a のヘテロ接合変異が引き金となるが、同時に起こる広範囲の染色体の欠失によって、低身長、精神遅滞など様々な症状が出る。発生期での深刻な副作用は、従来抗癌標的で

は許容とされてきたが、神経系への作用も考えられることなどから、現代の創薬の標的としてはかなり厳しいのかもしれない。

【Table 2-8】RERF-LC-AI_Ave、A549_Ave は各スクリーニング（細胞）での KIF11を 100 とした場合の増殖抑制率の平均値、A549-MRC5_Ave、A549-BEAS2B_Ave は A549 細胞での増殖抑制率の平均値から MRC5 細胞、BEAS2B 細胞での抑制率の平均値を引いたもの。着色している部分はヒット判定された遺伝子

Gene Symbol	RERF-LC-AI_Ave	A549_Ave	A549-MRC5_Ave	A549-BEAS2B_Ave	Full Gene Name
ALDOA	78.8	102.5	-15.3	22.8	aldolase A, fructose-bisphosphate
DHFR	86.5	91.7	14.0	33.3	dihydrofolate reductase
HNRNPC	77.2	83.3	45.2	17.8	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)
KIF11	101.5	98.8	4.5	-2.5	kinesin family member 11
MFAP1	80.3	113.0	40.7	30.2	microfibrillar-associated protein 1
NHP2L1	96.3	116.5	61.0	30.0	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)
PLK1	98.3	102.0	7.3	5.3	polo-like kinase 1 (Drosophila)
POLR2A	78.2	97.0	2.0	18.2	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa
PPAT	84.0	106.7	4.3	12.3	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase
PSMB5	81.8	101.0	28.7	30.7	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5
RAN	94.2	121.8	18.5	14.0	RAN, member RAS oncogene family
RPA1	88.3	87.5	13.5	-10.0	replication protein A1, 70kDa
RRM1	92.3	112.8	15.5	3.7	ribonucleotide reductase M1
SNRPB	86.8	105.2	42.0	30.2	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1
SNRPD1	81.5	108.3	39.7	23.3	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa
SNRPD2	88.8	110.7	52.7	20.0	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa
SNRPE	87.8	99.2	43.7	23.7	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E
SON	101.0	117.8	-0.3	9.5	SON DNA binding protein
AURKA	77.2	72.5	-10.0	-12.8	aurora kinase A

SART1	78.8	114.0	35.2	23.7	squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells
EFTUD2	84.2	116.3	44.8	27.2	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2
AQR	86.5	121.0	16.5	26.7	aquarius homolog (mouse)
EIF4A3	102.0	123.0	-2.2	16.2	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 3
CKAP5	98.5	101.0	10.7	5.7	cytoskeleton associated protein 5
PSMD6	100.2	116.2	30.2	10.7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6
RBM8A	99.7	123.3	-5.8	13.3	RNA binding motif protein 8A
SF3A1	85.3	116.0	39.5	15.5	splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa
TUBA1B	86.2	3.8	-12.3	-36.3	tubulin, alpha 1b
NXF1	82.7	122.7	-19.7	24.0	nuclear RNA export factor 1
SLU7	85.8	117.8	19.0	28.5	SLU7 splicing factor homolog (S. cerevisiae)
PRPF8	85.5	104.0	31.7	7.8	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (S. cerevisiae)
SF3B2	80.8	110.8	26.2	14.8	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa
TPX2	102.3	92.3	10.2	5.5	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)
SNRNP200	81.7	114.0	40.0	22.5	small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)
NUP205	75.5	113.5	47.3	35.3	nucleoporin 205kDa
SF3B3	76.0	107.3	39.3	27.8	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa
SF3B1	84.7	114.3	-9.5	11.2	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa
POMP	96.7	108.7	25.8	14.5	proteasome maturation protein
SF3B14	80.7	117.2	45.3	23.2	splicing factor 3B, 14 kDa subunit
SF3B5	77.8	114.5	32.8	19.3	splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa
C18orf24	75.8	45.8	12.5	2.2	chromosome 18 open reading frame 24
C13orf3	90.3	66.5	25.5	3.5	chromosome 13 open reading frame 3

第二章のまとめ

網羅的なRNAiスクリーニングの結果、4つの新規抗癌標的候補を得ることができた。癌に関してシグナル伝達系などの研究を行うことなく、スクリーニングを実施することで、直接的に新規標的候補を得ることが出来た。この手法の応用性は高く、細胞株や表現型の検出法を変えることで、様々な疾患における標的探索が可能になる。一方で、適応疾患の限界もある。ヒト以外の遺伝子を創薬標的とせねばならない場合、たとえば細菌感染症の場合には、デザインされた核酸ライブラリーが存在せず、また、そもそもRNAiの機構が細菌では働かない。

細菌のゲノムはヒトよりもはるかに小さく、多くの病原菌でゲノム配列は既に明らかとなっている。また、トランスポゾンなどを利用した欠損株の作製によって、生存に必須である遺伝子が判明しているものも多い[24]。つまり殺菌を狙うのであれば、動物細胞における RNAi スクリーニングに該当する、最初の候補遺伝子のスクリーニングは完了している。臨床上、重要な菌である緑膿菌もその一つである。一方で、数多くある必須遺伝子には、少し機能を失っただけで菌が死滅するものと、似た機能の遺伝子が存在するなどで、機能をほぼ完全におさえないと菌が死滅しないものがある。ヒト体内の創薬標的を狙う場合、低分子化合物は細胞膜を通過しやすいものが多いため、遺伝子固有の感受性はあまり問題とならないが、緑膿菌などの細菌は強固な細胞膜をもっており、多くの低分子化合物は充分な菌体内への浸透を達成できない。副作用が少なく、低濃度でも殺菌活性をしめす治療薬を設計するためには、感受性の高い標的を選ぶ必要があるが、このような情報は明らかにはなっていない。実際の菌でのバリデーションが必要である。よって、目的とするのは、各必須遺伝子の細菌内での標的としての感受性を評価できる手法の開発となる。

この手法開発について、緑膿菌を題材に第三章で述べる。

参考文献

[1] DeVita, V.T. and Chu, E. (2008) Cancer Res. 68, 8643-8653.

[2] Vaidya, S., Ghosh, K. and Vundinti, B.R. (2011) Eur. J. Hematology 87, 381-393.

[3] Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. and Haber, D. A. (2007) Nature Reviews Cancer, 7(3), 169-181.

[4] Schena, M., Shalon, D., Davis, R. and Brown, P.O. (1995) Science 270, 467-470.

[5] Ross, D.T., Schert, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S., Rijin, M. V., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J. C. F., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T.G., Weinstein, J. N., Bostein, D. and Brown, P. O. (2000) Nature 24, 227-235.

[6] Dupuy, A., and Simon, R. M. (2007) J. National Cancer Institute, 99, 147-157.

[7] Fire, A., Xu,S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. A. and Mello, C. C. (1998) Nature 391, 806-811.

[8] Elbashir SM1, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Nature 411, 494-498.

[9] Horn, T., Sandmann, T. and Boultros, M. (2010) Geonome Biology 11, R61. siRNA

[10] Lee, C. Y., Johnson, R. L., Wichterman-Kouznetsova, J., Guha, R., Ferrer, M., Tuzmen, P., Martin, S.E., Zhu, W. and DePamphilis, M.L. (2012) Methods 57, 234-248.

[11] Sirotkin, A. V., Ovcharenko, D. and Mlyncek, M. (2010) J Mol Endocrinol. 44, 45-53.

[12] Parsons , B. D,, Schindler, A,, Evans, D.H. and Foley, E. (2009) PLoS One 4, e8471.

[13] WOJCIK, E. J., Buckley, R. S., Richard, J., Liu, L., Huckaba, T. M., and Kim, S. (2013) Gene, 531, 133-149.

[14] Fedorov, Y., Anderson, E., M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S. and Khvorova, A. (2006). RNA 12, 1188-1196

[15] König, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T. L., Bonamy, G. M., Irelan, J. T.,
Chiang, C-y, Tu, B. P., Jesus,P. D.D., Lilley, C. E., Seidel, S., Opaluch, A., M., Caldwell, J. S., Weitzman, M. D., Kuhen, K. L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A. P., Miraglia, L. J., Bushman, F. D., Young, J. A., Chanda, S.K. and Seidel, S. (2008). Cell, 135, 49-60.

[16] Nottrott, S., Hartmuth, K., Fabrizio, P., Urlaub, H., Vidovic, I., Ficner, R., and Lührmann, R. (1999) EMBO J., 18(21), 6119-6133.

[17] Krull, S., Thyberg, J., Björkroth, B., Rackwitz, H. R., and Cordes, V. C. (2004). Mol. Boil. Cell, 15, 4261-4277

[18] Grandi, P., Dang, T., Pané, N., Shevchenko, A., Mann, M., Forbes, D., and Hurt, E. (1997). Mol. Biol. Cell, 8(10), 2017-2038.

[19] Kataoka, N., Yong, J., Kim, V. N., Velazquez, F., Perkinson, R. A., Wang, F., and Dreyfuss, G. (2000) Mol. cell, 6, 673-682.

[20] Fujitomo, T., Daigo, Y., Matsuda, K., Ueda, K., and Nakamura, Y. (2012) Cancer Res., 72, 4110-4118.

[21] Alachkar, A., Jiang, D., Harrison, M., Zhou, Y., Chen, G., and Mao, Y. (2013). Current molecular medicine, 13(6), 887-899.

[22] Zou, D., McSweeney, C., Sebastian, A., Reynolds, D. J., Dong, F., Zhou, Y., Deng, D., Wang, Y., Liu, L, Zhu, J., Zou, J., Shi, Y., Albert, I and Mao, Y. (2015). Neural development, 10 18.

[23] Yassaee, V. R., Hashemi-Gorji, F., Soltani, Z., and Poorhosseini, S. M. (2014) Clinical biochemistry, 47, 835-839.

[24] Juhas, M. (2015) Microbiology, 161, 2053-2060.

第三章

核酸を用いた抗菌標的の迅速な探索手法の確立と新規抗菌剤の開発

1. 序論

緑膿菌（*P.aeruginosa*）はグラム陰性菌の一つであり、日常的に土の中など、随所に存在する病原体である[1]。通常は深刻な疾病を引き起こしたりはしないが、深刻な火傷や HIV 感染の患者等では、臨床上の脅威となる[2]。特に膿胞性線維症（cystic fibrosis: CF）患者などでは、深刻な問題となり、感染制御が難しい上に、治療の選択肢は限られているのが現状である[3]。近年、多剤耐性の緑膿菌の出現により、ますます治療が難しくなっており、新しい治療法の必要性が増している[4]。

一般的な緑膿菌については、全ゲノム配列が既に明らかになっており[5]、欠損株の解析結果から増殖に必須であろう遺伝子群も明らかになっている[6]。これらの中から低分子化合物で阻害可能な候補を選び、活性の阻害を指標に通常の創薬を開始しても、最終的な治療薬となることは稀である。その理由は、ヒトの細胞と違い、緑膿菌などの細菌は強固な細胞膜をもっており、低分子化合物のほとんどはこの細胞膜を通過できないからである。通過できても、菌体内で十分な濃度を保つことは簡単ではない。

効果的な創薬を行うためには、既に明らかになっている必須遺伝子の中から、どれを狙えば低濃度で効果的に殺菌効果が得られるのかを調べることが必要となる。遺伝子毎に菌体内での発現量や、蛋白質の寿命などが違うため、少し機能阻害するだけで菌が死ぬものもあれば、徹底的に機能阻害せねば死なないものがある。これらを、標的阻害活性と菌膜通過を両立しづらい低分子化合物で調べることは難しい。数多くの標的候補を迅速に評価できる新たな手法が必要である。そのためには菌体膜を通過する、そして狙った標的に特異的に作用するという 2 つの特徴をあわせ持ち、かつこれらが独立して調節できるものが適している。

核酸のなかでもアンチセンス核酸はこの候補の 1 つとなる。

第二章で用いた siRNA は真核細胞でしか機能しないが、アンチセンス核酸は細菌においても RNA の配列を認識して特異的な遺伝子発現阻害を行うことができる。まだ、種類は限られるが大腸菌などのグラム陰性菌において菌膜を通過できるペプチド配列が報告され、これらを組み合わせたものが（アンチセンス核酸複合体）が菌体内で阻害活性を示すことが報告されている。アンチセンス核酸部分は、ヌクレアーゼに対する耐性を付与するため天然の核酸ではなく、peptide nucleotide acid(PNA)や peptide morpholino acid(PMA)が使われることが多い[7] [8] [9]。実際に大腸菌（E.coli）[9]、黄色ブドウ球菌（*S.aureus*）[10]、肺炎レンサ球菌（*K.pneumoniae*）[11]、アシネトバクター（*Acinetobacter*）[12]などで抗菌効果を示した例がある。

アンチセンス核酸複合体を用いることで、原理的に配列情報があれば菌体内で標的を阻害し、その感受性評価が出来る。

本章では緑膿菌による感染症治療を念頭に、必須遺伝子の中から、効率よく殺菌効果を発揮できる標的を選抜する手法の構築を行う。

本研究の進行中に Ghosal&Nielsen から（KFF）$_3$K ペプチドもしくは（RXR）$_4$　ペプチドを菌体膜通過機能として用い、これと PNA アンチセンスを用いたペプチド PNA アンチセンス複合体による抗菌活性効果の報告があった[13]。内容としては以下の 2 点が示されていた。緑膿菌では（RXR）$_4$　ペプチドのみが PNA アンチセンスの carrier として働くこと、及び、２つの必須遺伝子（acpP、ftsZ）に対するペプチドーPNA アンチセンス複合体が３つの緑膿菌株に対し抗菌活性をもつことである。しかしながら Ghosal&Nielsen の報告では、ネガティブコントロール（ペプチドーPNA ミスマッチ）も弱いながら抗菌活性を示しており、ペプチドーPNA に general toxicity がある可能性を排除できていなかった。ペプチドーPNA に基本的な毒性があるとしても、抗菌的に作用するので問題ないように思われるが、この上乗せ効果懸念があると、多くの必須遺伝子の中から効果的な創薬標的を選ぶ際に、抗菌活性の強弱が単純に標的のポテンシャルに依存して決まっているのか、相乗効果の強弱の結果であるのか判定しづらい。よって、ペプチドーPNA 自体に細菌に対する毒性があるのかを明らかにすべく、本研究では２つの改善点を加えた。すなわち、ACGT の数を変えずに（電荷特性などは固定したまま）配列の順のみを変更したスクランブル配列を使うこと、及び必須、非必須遺伝子からなる多くの標的遺伝子を検討し、かつレスキュー実験を行う[14]ことである。

これらの改善により、ペプチドーPNA には general toxicity はなく、基本的に on target 由来の抗菌活性を反映することが明らかになった。

2. 実験条件

2.1. 細菌株、ベクター、PNA

P. aeruginosa PA01 株は東海大学より、E.coli K12 株は大阪大学微生物病研究所から入手した。ベクターは全て pMMB67HE をもとに E.coli DH5α株で作製した。*P.aeruginosa* PA01 株への遺伝子導入はエレクトロポレーションで行った。今回の研究にて使用した Peptide-PNA アンチセンス複合体は全てバイオロジカ社（愛知県）より購入した。

2.2. LacZ 活性測定

LacZ 遺伝子の発現は、pMMB67HE-lacZ プラスミドを保持した E.coli K12 株および *P.aeruginosa* PA01 株に isopropyl ß-D-thiogalactopyranoside (IPTG)をそれぞれ 100μM、10μM 加えることによって行った。 約 10^8 CFU/ml の pMMB67HE もしくは pMMB67HE-lacZ プラスミドを保持した E.coli K12 株および *P.aeruginosa* PA01 株を 96well マイクロプレート（丸底、Corning Inc., Corning, NY）にて Mueller-Hinton(MH)培地中で peptide-PNA アンチセンス複合体と共に培養を開始した。37℃で 6 時間培養したのち、LacZ 活性は文献[7]に書かれている方法によって ortho-nitrophenyl-ß-galactoside (ONPG)を使って測定した。

2.3. peptide-PNA アンチセンスによる P.aeruginosa の増殖抑制

約 10^8 CFU/ml の P.aeruginosa PA01 株を Mueller-Hinton(MH)培地にて調整し、96well マイクロプレート（丸底、Corning Inc., Corning, NY）にて peptide-PNA アンチセンス複合体と共に培養を開始。37℃で 6 時間培養後、LB 寒天培地に塗り広げることによって colony-forming units(CFU)を決定。 成長曲線をはかる実験においては $5x10^5$CFU/ml の *P.aeruginosa* PA01 株を peptide-PNA アンチセンス複合体を含んだ MH 培地で 96 well microplate に調製した。595nm における濁度を毎時間ごとに 24 時間測定。mt-mraY を使ったレスキュー実験では 100μM の IPTG と一晩培養することで mt-mraY の発現を増強した。約 10^8 CFU/ml の pMMB67HE もしくは pMMB67HE-mt-mraY プラスミドを保持した P.aeruginosa PA01 株を Mueller-Hinton(MH)培地にて調整し、96well マイクロプレート（丸底、Corning Inc., Corning, NY）にて peptide-PNA アンチセンス複合体と共に培養を開始。37℃で 6 時間培養後、LB 寒天プレートに塗り広げることで CFU 数を決定した。

2.4. Semi-quantitative PCR and quantitative PCR

pMMB67HE もしくは pMMB67HE-lacZ を保持した *P.aeruginosa* PA01 株の培養は LacZ 活性の測定の時と同様に実施した。RNeasy Protect Bacteria Mini Kit（Qiagen, Valencia, CA）を説明書通りに使い total RNA を抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA)をつかって逆転写を行い cDNA を作製。作製した cDNA は semi-quantitative PCR もしくは quantitative PCR で分析した。

Semi-Quantitative PCR は SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara-Bio, Shiga, Japan)を使用して指示通りに行った。PCR 増幅は 94℃1 分で変性後、25 サイクルの増幅反応（98℃5 秒、55℃5 秒、72℃30 秒）を実施した。Quantitative PCR は SYBR　Premix Ex Taq II (Takara-Bio)を使って指示通りに行った。PCR プライマーは以下の通り：【LacZ 5'】ATGAACGGTCTGGTCTTTGC,　【 LacZ 3'】ATGACGGAACAGGTATTCGC, 【rpsL 5'】 TACATCGGTGGTGAAGGTCA、【rpsL 3'】TACTTCGAACGACCCTGCTT

3.　実験結果

3.1. 菌体膜貫通ペプチドの評価

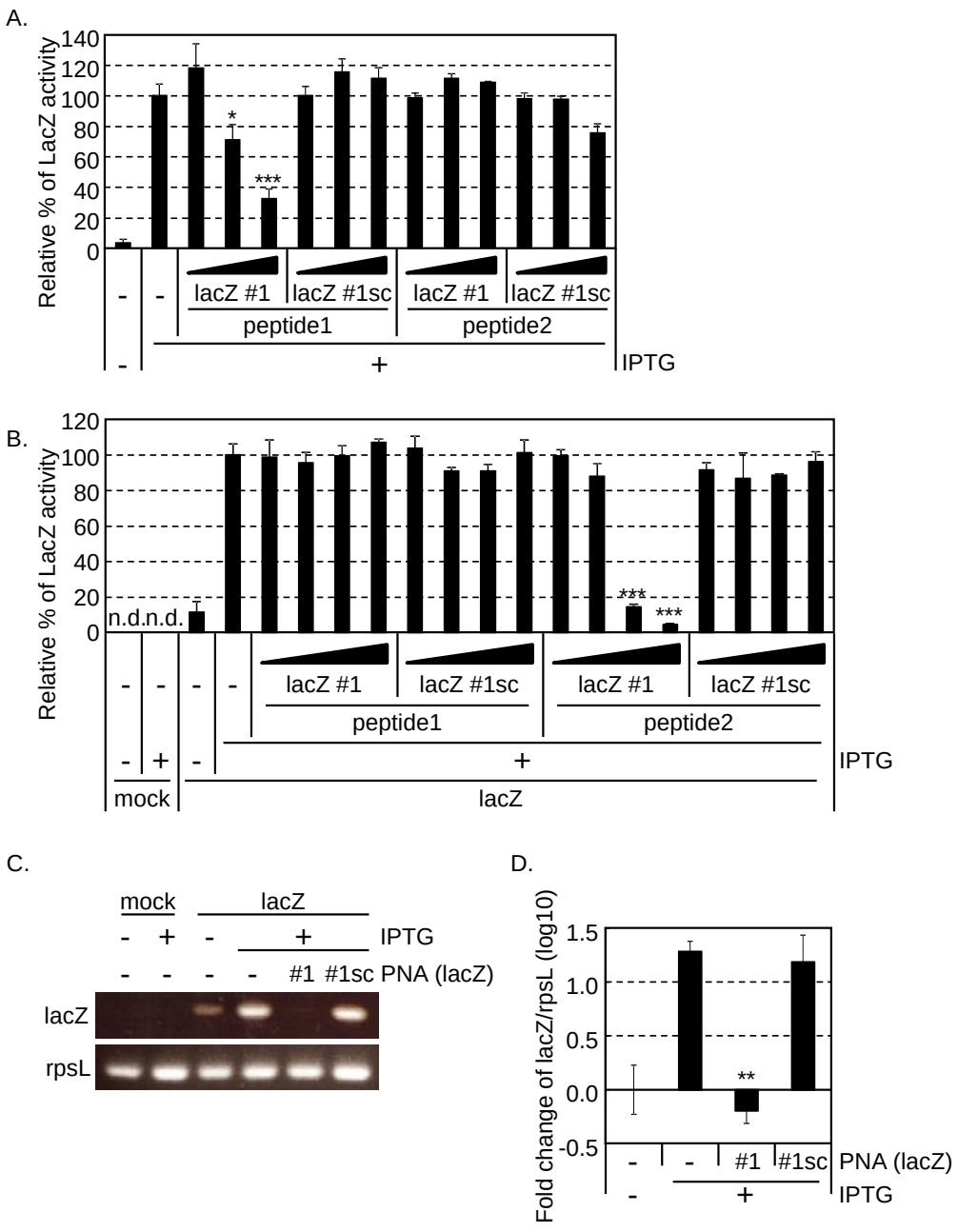
緑膿菌でペプチド核酸複合体が効果をだすためには、緑膿菌で有効な菌体膜貫通ペプチドと標的遺伝子に対し効果的に発現抑制作用をしめす塩基配列の２つをそろえる必要がある。まずは、塩基配列として、大腸菌の LacZ を阻害することがわかっている[7]アンチセンス配列を用いることとした。　緑膿菌は LacZ 配列をもっていないため、大腸菌の LacZ を IPTG のコントロールで発現するプラスミドを構築し、これを強制発現した緑膿菌を作製した。

これらを使い、２つのペプチド、ペプチド１：(KFF)$_3$K[7] [10] [13]とペプチド２：(RXR)$_4$[9] [13]の活性を大腸菌及び緑膿菌で比較したところ、大腸菌ではペプチド１：（KFF）$_3$K は用量依存的に LacZ 阻害活性を示したが、ペプチド２：（RXR）$_4$は阻害を示さなかった。ペプチド１：（KFF）$_3$K で示した阻害活性は塩基配列をスクランブルしたものに変更すると活性を消失し、アンチセンスとして働いていることがわかった【Fig.3-1A】。

一方同様の実験を緑膿菌で行ってみると、ペプチド１：（KFF）$_3$K は効果がなく、反対にペプチド２：（RXR）$_4$は用量依存的に阻害効果を示すことがわかり、大腸菌とは相反する結果であった【Fig.3-1B】。

Ghosal & Nielsen の報告[13]では大腸菌 と緑膿菌にて標的遺伝子 mRNA の量を変化させていることが報告されていたため、今回のこの緑膿菌での LacZ 活性の抑制がmRNA の分解によって起こっていることを半定量 PCR【Fig.3-1C】および定量 PCR【Fig.3-1D】にて確かめたところ、確かに mRNA 量が減少していることがわかった。

同じグラム陰性菌の間でも至適な菌体貫通ペプチドは違うことがわかった。今後、緑膿菌では効果のあった、（RXR）$_4$を使用することとした。

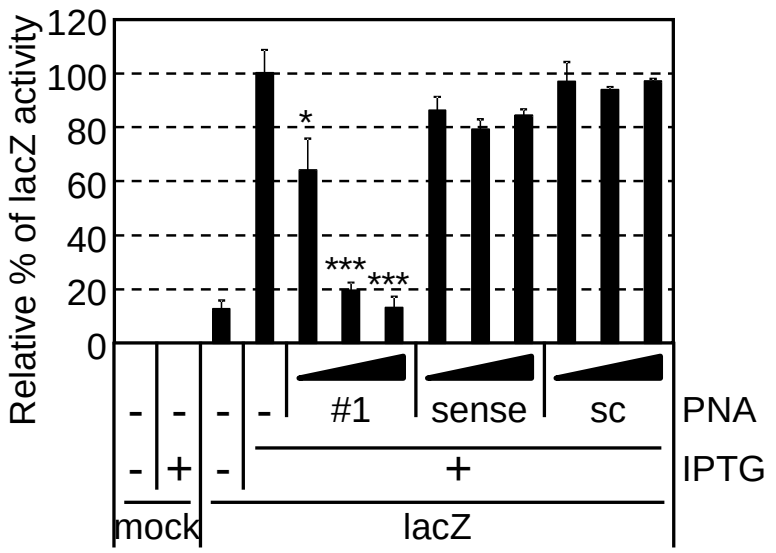


【Fig.3-1】***E.coli*** と ***P.aeruginosa*** での lacZ 活性及び mRNA 量への peptide-PNA AS の効果

LacZ 活性は *E.coli*【A】と *P.aeruginosa*【B】に lacZ プラスミドをいれたもの、いれてないものを 6 時間培養して測定。Peptide-PNA AS の濃度はそれぞれ、1, 3, 10 μM と 0.25, 0.5, 1, 2 μM 、同時に *P.aeruginosa* での peptide2-lacZ#1 と peptide2-lacZ#1sc の lacZ mRNA への影響を semi-quantitative PCR【C】 quantitative PCR【D】で測定

3.2. LacZ mRNA 量の抑制機構の確認

mRNA 量の抑制はアンチセンスが細菌のゲノム DNA に結合し、RNA ポリメラーゼを物理的に阻害することによっておこる「転写の抑制」もしくは、mRNA と結合し、RNase によって分解切断される「mRNA 分解の促進」で起こりうる。このどちらであるかを調べるため、LacZ のアンチセンス配列の相補配列であるセンス配列を菌体貫通ペプチドと結合した（RXR）$_4$-lacZ#1sense を作製した。もしアンチセンスが DNA のセンス鎖に結合し RNA ポリメラーセを阻害することで mRNA 量の抑制を引き起こしているのならば、（RXR）$_4$-lacZ#1sense も同様に DNA の相補側のアンチセンス鎖に結合し、LacZ 活性の抑制を示すはずである。しかしながら（RXR）$_4$-lacZ#1sense は LacZ 活性の抑制を引き起こさなかった【Fig.3-2】。よって、この mRNA 量の抑制は転写の抑制ではないことが明らかとなった。



【Fig.3-2】*P.aeruginosa* での peptide-PNA AS または S の lacZ 活性への効果

lacZ プラスミドを入れた *P.aeruginosa* に Peptide-PNA AS もしくは S を加えて(0, 0.5, 1, 2 μM) 6 時間培養し lacZ 活性を測定

3.3. 必須遺伝子に対する peptide-PNA アンチセンスによる増殖阻害

これまでは大腸菌や緑膿菌に LacZ を発現させ、アンチセンス部分は既に活性が確認されていた配列を使用していたが、緑膿菌の必須遺伝子を狙い、増殖阻害活性を見るには適したアンチセンス配列を設計する必要がある。まず狙う必須遺伝子としては、細胞壁の合成に必要な酵素の一つである mraY[16]、シグナルペプチドの切断酵素である lepB[17]、そして細胞壁を構成している lipopolysaccharide の構成要素である lptD[18]の 3 つを選び、コントロール用に非必須遺伝子の中から lepB 同様にシグナルペプチド切断酵素である PA1303 と、通常は存在しない lacZ を選択した[19] [20]。 ATG の近傍を中心に 4 配列程度を設計し、緑膿菌に対して効果的な菌体貫通ペプチドである $(KFF)_3K$ との複合体として合成した【Table3-1】。

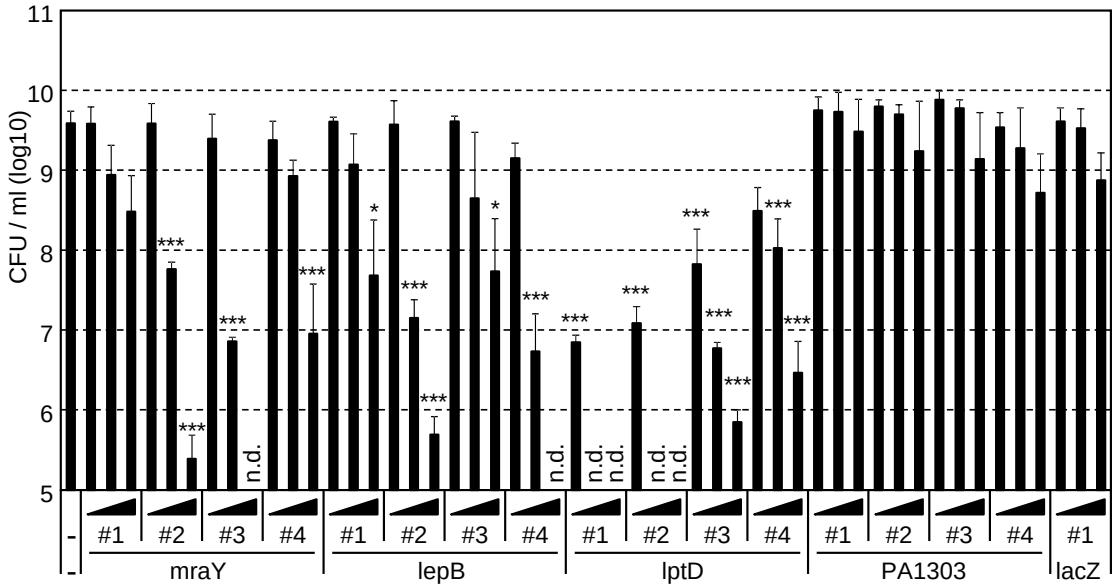
Table 3-1. ペプチドーPNA アンチセンス複合体の配列

Name	Sequence
peptide1-LacZ #1	$(KFF)_3$K-OO-catagctgtttc
peptide1-LacZ #1sc	$(KFF)_3$K-OO-acatgtcgtctt
peptide2-LacZ #1	$(RXR)_4$-OO-catagctgtttc
peptide2-LacZ #1sc	$(RXR)_4$-OO-acatgtcgtctt
peptide2-LacZ #1sense	$(RXR)_4$-OO-gaaacagctatg
peptide2-MraY #1	$(RXR)_4$-OO-cattagtgactc
peptide2-MraY #2	$(RXR)_4$-OO-gagcattagtga
peptide2-MraY #3	$(RXR)_4$-OO-caggagcattag
peptide2-MraY #4	$(RXR)_4$-OO-agcaggagcatt
peptide2-lepB #1	$(RXR)_4$-OO-catgggttctag
peptide2-lepB #2	$(RXR)_4$-OO-tgtcatgggttc
peptide2-lepB #3	$(RXR)_4$-OO-gagtgtcatggg
peptide2-lepB #4	$(RXR)_4$-OO-attgagtgtcat
peptide2-PA1303 #1	$(RXR)_4$-OO-catggcgggcca
peptide2-PA1303 #2	$(RXR)_4$-OO-cccatggcgggc
peptide2-PA1303 #3	$(RXR)_4$-OO-aggcccatggcg
peptide2-PA1303 #4	$(RXR)_4$-OO-gagcaggcccat
peptide2-lptD #1	$(RXR)_4$-OO-catcttgttaat
peptide2-lptD #2	$(RXR)_4$-OO-tgccatcttgtt
peptide2-lptD #3	$(RXR)_4$-OO-cactgccatctt
peptide2-lptD #4	$(RXR)_4$-OO-tttcactgccat

O: ethylene glycol linker

X: 6-aminohexanoic acid

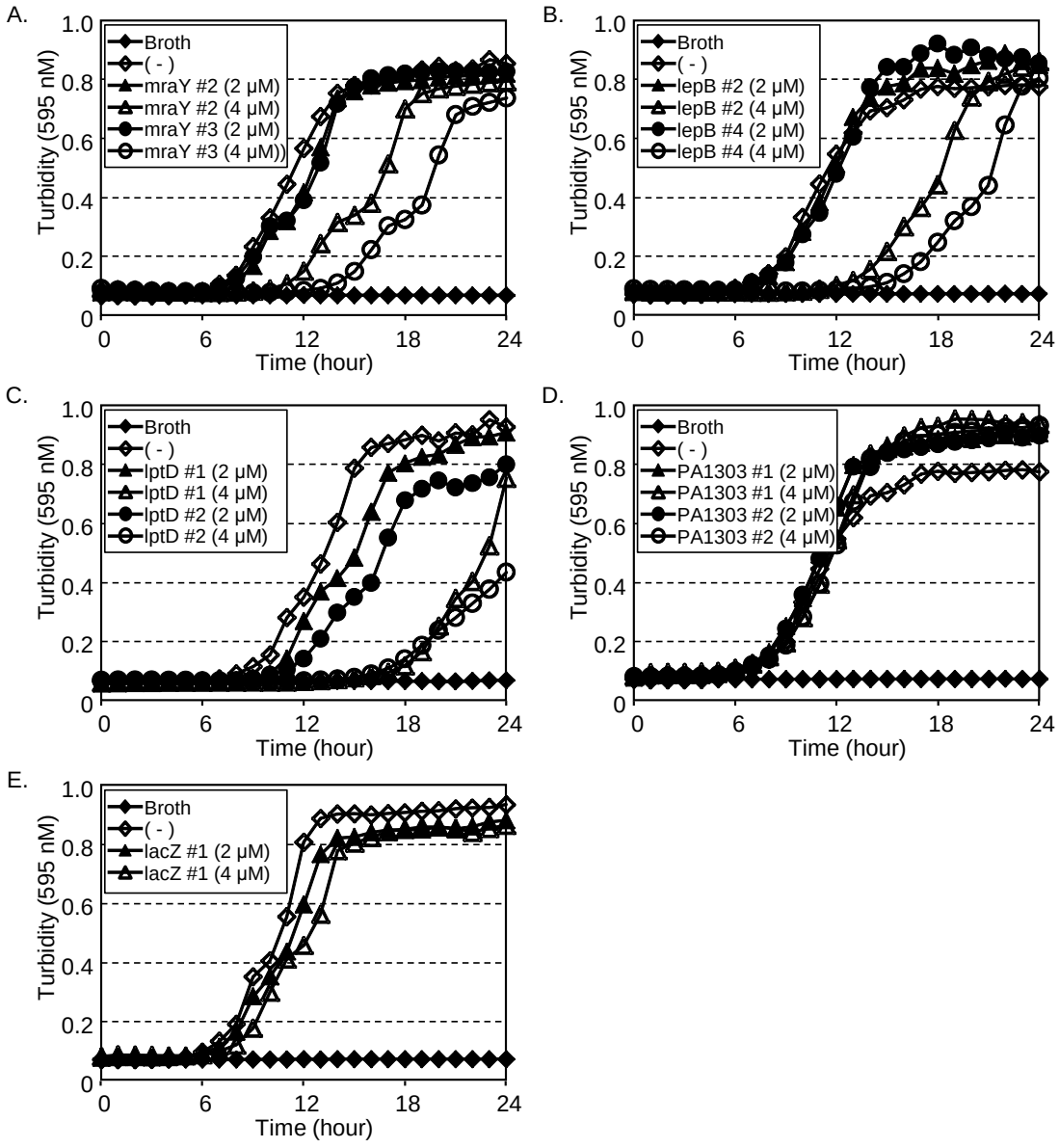
合成したペプチドーPNAアンチセンス複合体を2～8μMの濃度で培地に加えて緑膿菌を6時間培養し、その後プレートに塗り広げてコロニー数を計測し、各ペプチドーPNAアンチセンス複合体の効果を測定した。その結果、アンチセンス配列によって効果の大小はあるものの、必須遺伝子であるmraY、lepB、lptDでは濃度依存的にコロニー形成数が減少し、非必須遺伝子であるPA1303やLacZに対するアンチセンス配列では全く影響がなかった【Fig.3-3】。



【Fig.3-3】*P.aeruginosa* での必須遺伝子もしくは非必須遺伝子を狙った peptide-PNA AS の効果

Peptide-PNA AS（2, 4, 8 μM）入れて6時間培養後、colony-forming units(CFU)を測定

次に各遺伝子に対する代表的な配列を 2 配列程度選択（mraY は配列#2 と配列#3、lepB は配列#2 と配列#4、 lptD は 配列#1 と配列#2、PA1303 は配列 #1 と配列#2、そして LacZ は配列#1 のみ）し、培養液の濁度を時系列でモニターすることで効果を調べた【Fig.3-4】。やはり必須遺伝子に対する配列のみが濃度依存的に増殖抑制効果を発揮していることがわかった。



【Fig.3-4】peptide-PNA AS を加えた *P.aeruginosa* の growth curve

P.aeruginosa に peptide-PNA AS（2, 4 μM）をくわえて 1 時間ごとに 24 時間濁度（595 nm）を測定　【A】mraY、【B】lepB、【C】lptD、【D】PA1303、【E】lacZ

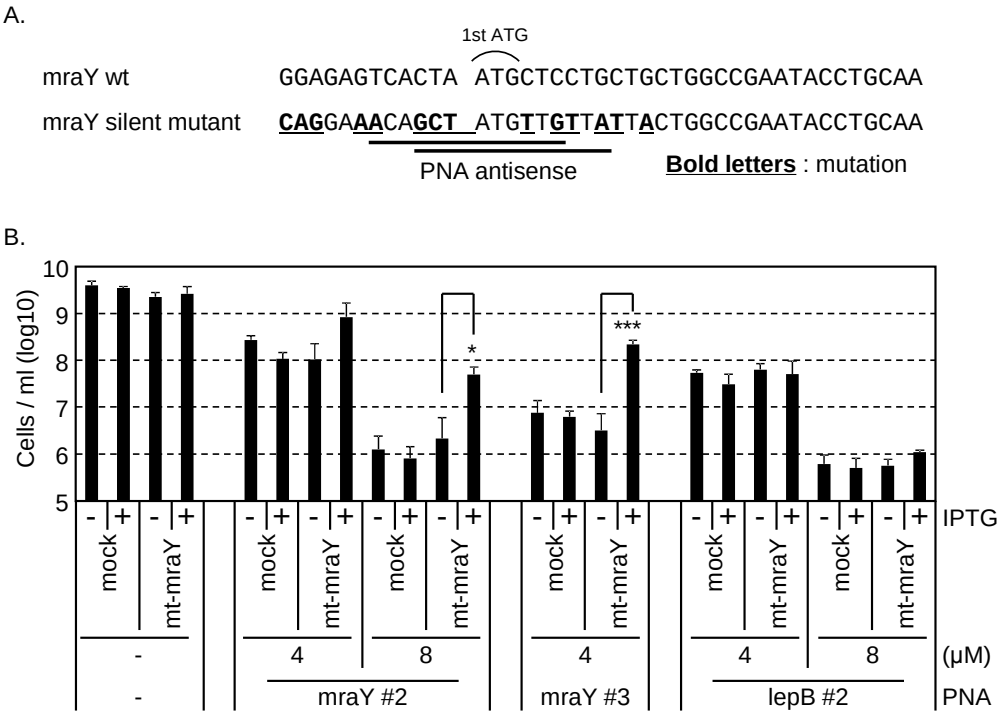
3.4. 標的遺伝子の強制発現による増殖阻害効果の減弱

ペプチドーPNA アンチセンス複合体により、緑膿菌にて増殖阻害が起こることがこれまでに確認されたが、核酸には配列が似ている本来は無関係の核酸に相互作用すること、いわゆるオフターゲット効果や、核酸という物質自体が構造をとり予期しない標的と相互作用することが報告されている[21]。今回観察された緑膿菌の増殖阻害が、こういった効果によるもの、あるいは本来の標的遺伝子の発現抑制との相乗効果でおこっている可能性を排除するため、標的遺伝子の過剰発現によるレスキュー実験を行った。

緑膿菌の mraY 遺伝子をクローニングし、mraY に対して設計した PNA アンチセンス（mraY#2 と mraY#3）が結合する部分にアミノ酸置換が起こらないよう変異（サイレント変異）を 14 か所導入した Mt-mraY（mutation をいれた mraY）を発現するベクターを作製した【Fig.3-5A】。

この Mt-mraY を発現する緑膿菌、およびコントロールとして mock ベクターを導入した緑膿菌にペプチドーPNA アンチセンス複合体として mraY に対して結合する配列 2 種（#2 と#3）、コントロールとして lepB に対する配列 1 種（#2）を加えて培養後、コロニー形成数を調べた。その結果、mraY に対する配列 2 種（mraY#2 と mraY#3）による増殖阻害は mt-mraY 発現でレスキューされ、lepB に対する配列（lepB#2）による増殖阻害は mt-mraY を発現しても変化なかった【Fig.3-5B】。

以上のことから、ペプチドーPNA アンチセンス複合体による緑膿菌の増殖阻害は標的遺伝子の発現抑制によってのみ起こっていることが確認できた。



【Fig.3-5】peptide-PNA AS による増殖阻害に対する mt-mraY 強制発現の効果

【A】 mt-mraY の配列：下線で太字の部分が silent mt、黒いバーがと PNA 結合部位

【B】 peptide-PNA AS による増殖阻害に対する mt-mraY 強制発現の効果

4. 考察

本研究では、$(RXR)_4$が緑膿菌の菌膜貫通ペプチドとして機能することが明らかとなった。一方で、緑膿菌と同じグラム陰性菌の中でも、たとえば大腸菌とは効果的な菌膜貫通ペプチドの配列が違うこともわかった。理由としては菌体を構成する脂質や蛋白の違いが考えられる。また、たとえば、 $(RXR)_4$-phosphorodiamidate morpholino(PM)は大腸菌には効果があった[9]が、PM 部分を PNA に変えた$(RXR)_4$-PNA は効果がなく、菌膜貫通ペプチドとアンチセンスの組み合わせも重要であることがわかった。電荷的な構造の違いが原因ではないかと推察している。

これまでに$(RXR)_4$-PNA は mRNA 量を下げるという報告[13] [15]があったが、これは本研究でも確認された。これはセンス配列を使った実験で mRNA の転写阻害による機構によるものではないとわかった。mRNA を壊す RNaseE を ribosome が抑えるという報告と、大腸菌での例ではあるが、PNA アンチセンスが ribosome の loading を阻害するという報告[15] [22]があり、同じことが緑膿菌で起こっているのかもしれない。

Ghosal & Nielsen の論文では peptide-PNA には general toxicity があると報告されていた。我々は、ネガコンとして塩基組成は同じであるが、順番を変更したスクランブル配列を使用した。その結果、ネガコンの活性では増殖抑制活性は観察されず、ペプチドーPNA アンチセンス自体には緑膿菌に対する毒性はないとわかった。アンチセンスには若干のミスマッチが入っていても標的配列に結合する例が報告されており[21]Ghosal＆Nielsen ら[13]の使ったミスマッチ配列には標的配列への結合活性が残っていたのではないかと考えられる。ペプチドーPNA アンチセンスの作用がアンチセンス機構だけによるものであることは変異導入プラスミドを用いた強制発現で抗菌活性が消失することからも確かめられた。また、非必須遺伝子を狙った場合は抗菌活性がないことも確かめられた。以上のことから、peptide-PNA は効果的な配列を選抜すれば狙った標的のポテンシャルに応じた抗菌活性を発揮すると期待される。

今回、緑膿菌の必須遺伝子として、mraY、lepB、lptD の抑制による増殖への影響を調べた。その結果、全ての必須遺伝子で増殖抑制が観察されたが、中でも lptD は多くのペプチドーPNA アンチセンスで低い濃度から強力な抑制効果が得られた。必須遺伝子を狙った殺菌状態なので、標的遺伝子の正確な抑制率は測定できないが、複数のペプチドーPNA アンチセンスの結果を見ると、lptD は低い薬剤濃度でも抗菌活性を示すことができる良い創薬標的であると推定される。

第二章の siRNA スクリーニングと同様に、個々の核酸の抑制率を確かめながらのスクリーニングではないため、たまたま、核酸の抑制率が悪い場合などの見逃し（偽陰性）が発生する可能性はあるが、抗感受性を示した有望な創薬標的は間違いなく有望である。並行して複数の検証が可能という利点もあり、病原菌において有用な標的検証手段であると結論できる。

第三章のまとめ

第二章で行った siRNA ライブラリーによる検索が行えない緑膿菌の感染症治療における創薬標的探索のため、ゲノム情報とペプチドーPNA アンチセンスを使った手法を構築し、lptD などの有望な標的を見つけた。この手法は狙った標的を阻害した場合の表現型を菌で見ることができるので、たとえば、いくつかのアッセイを組み合わせて、必須遺伝子抑制による増殖抑制が静菌的であるのか、殺菌的であるのかを調べることもできる。こうして見つけた標的をもとに阻害効果のある低分子などを探索していくことになるが、予めペプチドーPNA アンチセンスで標的をいくらか抑制した状態の菌を使うと、低濃度で化合物を節約しながらスクリーニングすることができる。高濃度の化合物を用いると沈殿析出などに悩むことが多いため、この点でも有利となる。

今回用いたペプチドーPNA アンチセンスは、そのまま医薬として利用できる可能性がある。細菌などの病原体感染モデルは、古くから培養条件を適切に設定すれば、ほぼ体内と同じ状態が再現できることが分かっている。膿胞性線維症で問題となる細菌感染のように、気道感染している緑膿菌を狙う場合は吸入などの手段で血中を介さずに細菌表面へ薬剤を届けることができ、*in vitro* で機能した手法を実際の治療へとつなげ易い。低分子医薬で課題となる、標的の阻害活性と、菌膜通過の両立もペプチドーPNA アンチセンスがそのまま医薬として用いることができれば解決することができる。

今回はゲノム情報および、必須遺伝子が既に明らかになっている緑膿菌を使ったため、標的遺伝子の探索は不要であったが、そのような情報が明らかではない病原菌を標的とする場合は、ゲノム情報の解読が必要となる。しかしながら、最近の次世代シーケンサーの解析能力の向上により、そのハードルは低くなっている。欠損株を用いた必須遺伝子探索は簡単ではないが、多くの細菌において必須となっている遺伝子との *in silico* での比較から、その候補となりうる遺伝子は見つけることができる。その候補を今回のシステムで比較検討することで、異なった細菌でも同様のことが可能である。ただし、その細菌においても、今回利用した菌膜貫通ペプチドが機能するという前提が必要で、そうでない場合は再度のペプチド検索が必要である。菌種を増やすためにも、菌膜貫通ペプチドの探索には引き続き取り組んでいく必要がある。

参考文献

[1] Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M-W, Tsongalis, J., Walendziewicz, C.L., and Tompkins, R.G. (2000) Proc. Nat. Acad. Sci., 97, 8815-8821.

[2] Manfredi, R., Nanetti, A., Ferri, M., and Chiodo, F. (2000) Eur. J. Epidemiol. 16, 111-118.

[3] Schelstraete, P., Haerynck, F., Deseyne, S. and De Baets, F. (2013) J. Cyst. Fibros. 12, 1-8.

[4] Kerr, K. G. and Snelling, A. M. (2009) J. Hosp. Infect. 73, 338-344.

[5] Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino ,E., Westbrock-Wadman , S., Yuan , Y., Brody , L. L., Coulter , S. N., Folger , K. R., Kas , A., Larbig , K., Lim , R., Smith , K., Spencer, D., Wong , G. K.-S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, J.,Hancock, R. E. W., Lory, S. and Olson, M. V. (2000). Nature, 406, 959-964.

[6] Juhas, M. (2015) Microbiology, 161, 2053-2060.

[7] Good, L., Awasthi, S. K., Dryselius, R., Larsson, O., and Nielsen, P. E. (2001) Nature Biotechnol. 19, 360-364.

[8] Tilley, L. D., Hine, O. S., Kellogg, J. A., Hassinger, J. N., Weller, D. D., Iversen, P. L. and Geller, B. L. (2006)　Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2789-2796.

[9] Mellbye, B. L., Puckett, S. E., Tilley, L. D., Iversen, P. L. and Geller, B. L. (2009) Antimicrob. Agents Chemother. 53, 525-530.

[10] Nekhotiaeva, N., Awasthi, S. K., Nielsen, P. E. and Good, L. (2004) Mol. Ther. 10, 652-659.

[11] Bai, H., You, Y., Yan, H., Meng, J., Xue, X., Hou, Z., Zhou, Y., Ma, X., Sang, G.and Luo, X. (2012). Biomaterials, 33(2), 659-667.

[12] Wang, H., He, Y., Xia, Y., Wang, L., and Liang, S. (2014) Mol. Biol. Rep. 41, 7535-7541.

[13] Ghosal, A., and Nielsen, P. E. (2012) Nucleic Acid Ther. 22, 323-334.

[14] Kaelin Jr, W. G. (2012) Science 337, 421.

[15] Dryselius, R., Nikravesh, A., Kulyté, A., Goh, S., and Good, L. (2006) BMC Microbial. 6, 97.

[16] Boyle, D. S., and Donachie, W. D. (1998). J. Bacteriol. 180, 6429-6432.

[17] Waite, R. D., Rose, R. S., Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Hashim, A., and Curtis, M. A. (2012) J. Bacteriol. 194, 4521-4536.

[18] Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D. and Mengin - Lecreulx, D. (2008) FEMS Microbiol. Reviews 32, 208-233.

[19] Braun, M., & Silhavy, T. J. (2002) Mol. Microbiol. 45, 1289-1302.

[20] Srinivas, N., Jetter, P., Ueberbacher, B. J., Werneburg, M., Zerbe, K., Steinmann, J., Van der Meijden, B., Bernardini, F., Lederer, A., Dias, R. L. A., Misson, P. E., Henze, H., Zumbrunn, J., Gombert, F. O., Obrecht, D., Hunziker, P., Schauer, S., Ziegler, U., Kach, A., Eberl, L., Riedel, K., DeMarco, S. J. and Robinson, J. A. (2010) Science, 327, 1010-1013.

[21] Dias, N., Dheur, S., Nielsen, P. E., Gryaznov, S., Van Aerschot, A., Herdewijn, P., Helene, C. and Saison-Behmoaras, T. E. (1999) J. Mol. Biol. 294, 403-416.

[22] Braun, F., Le Derout, J., and Regnier, P. (1998) EMBO J. 17, 4790-4797.

結論：

First in class 創薬のために必要な新規標的探索システムとして、第一章では鍵分子を起点とした探索、第二章では siRNA を用いた表現型スクリーニングを用いた探索について述べた。第二章で述べた siRNA スクリーニングは非常に強力であり、従来見つからなかった新規標的候補を複数見つけることが出来た。今回は比較的取り扱い易い癌細胞を使い、表現型も増殖アッセイとしたが、現在では、iPS 細胞や画像解析システムなど新たな技術の登場で、材料とする細胞のバリエーションも、薬効判定の指標となる表現型も多種多様のものを使うことが出来るようになってきており、幅広い疾患の創薬標的探索に使うことが出来る。一方でこの siRNA を用いたシステムは非常に強力ではあるものの、感染症で問題となる細菌など原核生物での標的探索には使えない。これらを克服する手段として第三章では必須遺伝子が明らかとなっている緑膿菌を題材としてアンチセンス核酸による標的選抜に取り組んだ。その結果、低い阻害率でも増殖抑制効果のある標的候補を見つけることができた。

以上により、核酸を用いたヒト及び細菌を対象とした迅速な標的探索手法の構築が出来た。

しかしながら、FIC 新薬というアウトプットにたどり着くまでには、これから越えねばならない大きなハードルがある。

第二章での siRNA スクリーニング後の創薬（新薬の大部分を占めるヒト体内の標的を狙った創薬）で考えるとハードルの１つ目は *vitro* と *vivo* の壁である。

今回のスクリーニングは培養細胞株を使っており、*in vitro* の系での現象となる。実際に薬が作用するのは体内であり、*vivo* と *vitro* の差異が大きな問題となる。たとえば、培養細胞と実際の体内の細胞では、栄養状態、他の細胞との相互作用などの条件が違うため、スクリーニング時（*vitro*）の条件では効果があっても、*vivo* では効果が出ないことは珍しくない。そのため、実際には、*vitro* のスクリーニングで見出した標的候補について、実験動物などを使った *in vivo* でのバリデーションが必要となる。 *in vivo* バリデーション法としては、遺伝子の機能を欠失させて薬効および副作用評価を行う方法がよく利用される。具体的には KO マウスが利用されることが多い。この手法の問題点は、まず作製に年単位の時間がかかることである。Cas9/Crisper[1]などのシステムによって、KO マウス作製の効率は向上したが、複数の標的評価を並行してするためには多くのタスクと時間がかかる状況には変わりがない。そのため多大なタスクをかけたスクリーニングで数多くの候補遺伝子が見つかっても、KO マウス作製の部分が律速となって、実験者の勘で数個の遺伝子に絞らねばならないような事態が発生する。また出生時から遺伝子が機能を失っているため、マウスの器官形成が正常に行われず、遺伝子の評価が正しく行われない可能性もある。発生時への影響は創薬において一つの懸念材料ではあるが、通常、薬剤は器官形成が正常に行われた状態の人間を対象とするため、落とさなくてもよい標的遺伝子をこのステップで落

としてしまう可能性がある。

ハードルの２つ目は化合物探索の壁である。上記のような *in vivo* バリデーションで、薬効、副作用懸念がクリアされても、その遺伝子の機能阻害を引き起こせる低分子化合物の探索を行わねばならない。十分な阻害活性があり、最低限の選択性をもった低分子化合物が見つからないことも多く、そもそも標的遺伝子が、酵素や受容体など低分子化合物で阻害できるものではなかった場合は先に進めなくなる。今回のスクリーニングで最終的に残った候補遺伝子のほとんども、そのタイプの標的遺伝子であった。また、たとえ低分子化合物で阻害可能と推定できる遺伝子であっても、実際には基質がわからず、スクリーニング系が組めないこともよくある。このように低分子化合物で阻害可能、すなわち Durg-able であるという制約は極めて厳しい。

これら２つの制約は、薬は従来型の低分子化合物であるべきという前提から発生する。この前提こそが、siRNA スクリーニングが多くの製薬企業で実施されながら、容易に新規標的に作用する FIC 新薬が出てこない理由である。

今回の標的探索に用いた siRNA をそのまま、*vivo* の評価からヒトへの医薬まで用いることができれば、これらの課題を一気に解消することができる。起点となる効果のある核酸は siRNA スクリーニングの時点で入手できており、更に活性を上げる際も、標的の塩基配列から候補を合理的にデザイン出来るため低分子化合物に比べ至適化の効率もよく迅速である。基本的に塩基の並び方を変えるだけで標的を変えることができるので、薬物動態などが大きく変動せず、大規模合成なども一度確立してしまえば、同様の手法ですばやく進めることが出来る。

しかしながら、このように核酸を利用するためには障壁となる課題が４つ存在する。

① 持続時間：腸間膜の通過は難しいため、注射薬が基本となるが、体内には核酸を分解する nuclease 類が多数存在する。また、核酸は、速やかに腎臓より体外に排出されるため、薬効持続時間が短い
② 毒性：核酸自体に起因する肝毒性などの問題と、狙った標的とは違う標的が発現抑制されてしまうオフターゲット効果に起因する毒性がある
③ コスト：通常の低分子医薬にくらべ、核酸は合成に手間がかかるため高コストとなってしまう
④ 臓器デリバリー：静脈もしくは皮下経由で体内に注射しても、標的となる臓器へのデリバリー技術が確立していない。

これらに対してはいくつかの試みが既になされている。たとえば、核酸の比活性を向上させることができれば、より少ない量の核酸で薬効を出せるようになり、③コストの問題、および②毒性の問題はクリア可能である[2]。 ①の持続についても、nuclease 耐性を付与する改変核酸を採用することにより克服可能となりつつある[3]。一方で④臓器デリバリーに関しては、肝臓などへはほぼ確立しつつあるものの[3][4]、その他の臓器では実用的なものは未だに出てきていない。この DDS の未確立が、核酸による FIC 医薬の実用化を阻害

している最大の理由と言える。

DDS 研究の難しい所は、注射された血中では、まわりの細胞に吸収されずに、標的となる臓器の狙った細胞でのみ取り込まれるという、相反した要素を両立せねばならないところにある。*in vitro* で標的細胞への導入に効果のある試薬や核酸を選択しても、*in vivo* では再現できないことが多い。その理由としては、臓器自身が単一の細胞で構成されていないこと、疾患において責任となる細胞が何であるのかが明白ではないことが多く、判明していても、*vitro* で培養する過程で、性質が変化してしまうことなどがあげられる。糖鎖や種々の修飾を用いた挑戦が多数なされているが、十分な効果を出せていない。

現状では臓器デリバリーの部分がボトルネックとなり核酸医薬はまだ発展途上といえる。

デリバリー手法にまだ多大な研究が必要であっても、核酸医薬が有望な理由はもう一つある。それは、近年、次世代シーケンサーとインフォマティックス技術が飛躍的な進歩を遂げつつあることに起因する。ヒトのゲノムからは蛋白質をコードする mRNA 以外に、複数の遺伝子の転写を制御する non-coding RNA が大量に作られる。 DNAChip やゲノム配列データでは、これら non-coding RNA の動きはほとんど見ることが出来なかったが、次世代シーケンサーの進歩により、これらについて気軽に解析できる時代が来ている。また、次世代シーケンサーは現在でも、人間には理解できないほどの大量のデータを生成するが、この解析手法にも並列化によるサーバー能力やクラウド技術をもとにした機械学習技術が役に立つと期待されている。膨大なデータの観測と、その中からソフトウエアが自分で意味のある関連を見出すようになり、疾患の発症前の兆候や、そのきっかけ、悪化の原因となる non-coding RNA の変化がいずれ多数報告されるようになる。こういう標的については、低分子創薬や抗体医薬は無力である。もちろん non-coding RNA の変化はいずれ mRNA の変化に現れ、それらは蛋白質の変化となるが、non-coding RNA が変化させる mRNA は通常一種ではなく、複数であるからである。核酸医薬であれば、non-coding RNA を直接狙うことができるし、相互作用をほとんど気にせずに、複数の核酸をまぜて複数の蛋白質の mRNA を同時に狙うことができる。

本研究によって見出されてみた最大の課題は、先に述べたように核酸医薬におけるデリバリー手段の開発であることは間違いないが、それに加えて、non-coding RNA に対する標的探索手段の拡充も上げておきたい。miRNA については、かなり解明されてきたこともあり、これに対する siRNA ライブラリーはすぐにも拡充が必要と考えられる。加えて今回、第二章で見出した抗癌標的や、第三章で見出した緑膿菌の標的遺伝子をもとに更なる研究を継続することで、First in class の創薬への発展が期待できる。

参考文献

[1] Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E. and Church, G. M. (2013) Science, 339, 823-826

[2] Nishina, T., Numata, J., Nishina, K., Yoshida-Tanaka, K., Nitta, K., Piao, W., Iwata,R., Ito,S., Kuwahara,H., Wada,T., Mizusawa, H. and Yokota, T. (2015) Mol. Ther., 4, e220.

[3] Yamamoto, T., Yahara, A., Waki, R., Yasuhara, H., Wada, F., Harada-Shiba, M., and Obika, S. (2015). Organ. biomol. chem., 13, 3757-3765.

[4] Yamamoto, T., Sawamura, M., Wada, F., Harada-Shiba, M., and Obika, S. (2016). Bioorgan. Med. Chem., 24, 26-32

謝辞

本研究に際し、ご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学先端生命科学研究院長　出村誠先生並びに北海道大学の先生方に心から感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、様々な評価に多大な御尽力を頂きますと共に、有益な御助言及びご指導を頂きました塩野義製薬株式会社　東基記様、我原義成様、六嶋正知様、ならびに生物一号館の皆様、感染症部門、HTS ユニットの皆様に深く感謝いたします。

本研究を行う機会を賜りました塩野義製薬株式会社　武本浩様、　沼田義人様に深く感謝いたします。皆様、本当にありがとうございました。