

コラーゲンに正しい構造を取らせる、HSP47 誘導剤の発見

熊本大学大学院医学薬学研究部

水島 徹

Since HSP make cells resistant to various stressors, HSP-inducers are effective against various diseases, such as gastric ulcer. Therefore, we here try to establish the screening system for HSP-inducers. We construct plasmid in which the luciferase gene is located downstream of the promoter of HSP gene. Cells transfected with this plasmid showed phenotype of stimulation of luciferase activity upon heat shock, suggesting that this system is useful for screening of HSP-inducers. We are now starting such screening from natural products.

1 緒言

細胞、特に人体を外界から隔てている上皮細胞の傷害(細胞死)は疾患の直接の原因となる。例えば胃を様々なストレスから守っている胃粘膜細胞の傷害は胃潰瘍を導く。また、気道を保護している気道上皮細胞の傷害は、神経終末の露出により気道過敏症、即ち喘息を起こす。従って、細胞を様々なストレスから守る物質は、疾患治療薬として有望である。本研究提案は、細胞を保護する蛋白質を誘導する物質を天然物から選択し、疾患治療薬(抗潰瘍薬、抗喘息薬)として開発することを目的としている。このような医薬品は現在なく、本研究は独創的である。

我々が注目しているのはストレス蛋白質である。細胞はストレスに対し、適切な蛋白質(ストレス蛋白質)を発現することによって、自らの生存を保っている。そこでストレス蛋白質を人工的に発現させることによって、細胞をストレスから守ることが出来る。実際我々は胃粘膜細胞において、代表的なストレス蛋白質である熱ショック蛋白質(HSP)を人工的に誘導することによって、胃粘膜細胞を様々なストレス(アルコール、酸、ピロリ菌など)に耐性化出来ること、及びそれによりストレス性胃潰瘍を防御できることを初めて見出した。また最近、気道上皮細胞にHSPを人工的に誘導することによって、気道上皮細胞を様々なストレス(アレルギー、活性酸素、炎症性細胞傷害因子)に耐性化出来ること、及びそれにより喘息症状を和らげることが出来ることを初めて見出した。

一方最近、蛋白質の高次構造(これをフォールディング(折り畳み)と呼ぶ)の異常が多く疾患の原因になって

いることが明らかにされ、それらの疾患は“蛋白質フォールディング異常病”と総称されるようになった。代表的な蛋白質フォールディング異常病は、神経変性疾患、プリオン病(いわゆる狂牛病)、嚢胞性繊維症などである。ほとんど全ての蛋白質フォールディング異常病の根本的な治療法は確立していない。これは蛋白質フォールディング異常病の根本的な原因である、蛋白質のフォールディング異常の観点からその治療法を開発しようとする研究がほとんどなされてこなかったためである。HSPは蛋白質が正しいフォールディングをとるのを積極的に助けている。そこで、安全なHSP誘導薬は、抗潰瘍薬、及び抗喘息薬としてだけでなく、蛋白質フォールディング異常病の根本的治療法を確立にもつながると期待されている。

2 実験

2.1 プラスミドの構築

プラスミド、LSNWTを入手し、それをHaeIIIとBamHIで切断し、human HSP47プロモーター部分を切り出し、それをpGL3-basic Neo Vector plasmidのBglII-SmaI部位に導入した。作成されたプラスミドを、pGL3-pHSP47と命名した。

2.2 細胞への導入

CHO-K1細胞に、pGL3-basic Neo Vector plasmid、pGL3-pHSP47、及びpGL3-pHSP47をリポフェクトアミン(プロメガ社)を用いて導入した。モノセル化後、G418(400 µg/ml)で選択した。熱ショックによるルシフェラーゼ活性上昇を指標に候補細胞を選択し、さらに同様の条件でモノセル化を2回行った(モノセル化後、同様の方法で候補細胞を選択した)。最も誘導効率の高い細胞をストックし、それを起こして、次の項で述べる実験を行った。

2.3 ルシフェラーゼアッセイ

24wellプレート上でconfluentになるまで培養した(Ham F12, 10%FCS, 400 µg/ml G418)。42度で1.5 h熱シヨッ



Identification of HSP47-inducers

Toru Mizushima

Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

クをかけ、その後 37 度で 12 時間培養した。ルシフェラーゼアッセイは、プロメガ社のルシフェラーゼアッセイキットを用いた。

3 結果

熱ショック依存にルシフェラーゼ活性の上昇が顕著に見られた。この結果は、継代培養を続けても、また一端ストックし、それをまた起こして使用しても、ほぼ同じ結果が得られている。

4 考察

以上の結果から、ルシフェラーゼを用いた、HSP 誘導薬のスクリーニングシステムを確立することが出来たと考えている。そこで現在このシステムを用いて、様々な生薬成分から、HSP 誘導薬の検索を行っている。

(参考文献) (本研究成果は投稿準備中)

- 1) Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. *Cell Death Differ.* 11, 1009-1016. (2004)
- 2) Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. *Cancer Res.* 65, 1868-1876. (2005)
- 3) Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Nanba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S. and Mizushima, T. *J. Biol. Chem.* 280, 31059-31067. (2005)
- 4) Ushijima, H., Tanaka, K., Takeda, M., Katsu, T., Mima, S. and Mizushima, T. *Mol. Pharmacol.* 68, 1156-1161. (2005)
- 5) Tsutsumi, S., Namba, T., Tanaka, K., Ishihara, T., Arai, Y., Aburaya, M., Suzuki, K., Hoshino, T. and Mizushima, T. *Oncogene* 25, 1028-1029. (2006)
- 6) Aburaya, M., Tanaka, K., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Suzuki, K., Makise M., Akagi, R. and Mizushima, T. Heme oxygenase-1 protects gastric mucosal cells against non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* in press. (2006)