

## 糖質ステロイドの新規下流分子 Glcci1 の機能解明 --- 抗炎症・抗増殖・抗腫瘍へのペプチド創薬 ---

楊 國 昌 秋 元 義 弘<sup>1</sup> 今 泉 美 佳<sup>2</sup>

杏林大学医学部小児科学

<sup>1</sup> 杏林大学医学部解剖学

<sup>2</sup> 杏林大学医学部生化学

### 【背景】

1955年のプレドニゾロンの合成以降、糖質ステロイド薬はアレルギー・自己免疫疾患、腎疾患、膠原病、リンパ球性悪性腫瘍、各種病態におけるサイトカインストームに対する first line 治療薬として頻用されている。しかし、その劇的な奏功作用とは裏腹に、多彩かつ深刻な副作用をも惹起する。過去にステロイド薬の改良も試みられたが、プレドニゾロンの修飾基の minor modification のみ行われ、1960年以降は新規のステロイド薬は合成されていない。一方、臨床の場では、今もなお同薬の作用機序は全く不明なまま、あくまで臨床経験に基づいた使用が行われ、重度の副作用の軽減化についても未だ解決されていない。したがって、ステロイド薬作用のみを發揮し、かつ副作用の無い（少ない）新規薬剤の創薬は、患者のみならず医療者側においても悲願の一つである。

Gluocorticoid induced transcript-1 (Glcci1) は、胸腺 T 細胞と精巣において糖質ステロイドによりその mRNA が増加すること (Immunogenetics 54:68,2003)、また、その variant transcript である GIG18 が、胸腺 T 細胞のアポトーシスの誘導に関与する可能性があること (Mol Endocrinol 10:967,1996) が報告されていた。しかし、Glcci1 の蛋白機能は未だ全く解明されていない。Glcci1 のアミノ酸配列において 60 カ所以上のセリン/スレオニン/チロシンリン酸化ドメインの存在が推測されることから、その蛋白特性として、多数のキナーゼの基質であることが考えられる。糖質ステロイド薬の治療対象疾患の臓器障害の病態においても、細胞内シグナリングの活性化すなわちキナーゼの活性化が存在することは明らかである。本研究は、Glcci1 の各リン酸化ドメインの多

彩なキナーゼに対する阻害能が、糖質ステロイド薬の薬理作用に関与することを仮説とした。

### 【方法と結果】

ヒト GLCCI cDNA クローンを用いて、大腸菌用とほ乳類細胞用感染ベクターを各々作成した。大腸菌へ導入後、その産物から full-length recombinant Glcci1 を獲得し、これを用いて抗 Glcci1 特異的抗体を作成した。Human Embryonic Kidney-293 cell にベクターを導入し、ヒト Glcci1 永久発現株を樹立した。これらを材料とした Western blot 法と免疫染色により、Glcci1 は 70 ~ 75kDa の tubulin 上に発現する細胞質内タンパクとして同定された。マウス胸腺細胞株を合成糖質ステロイド薬 (dexamethasone: DEX) で処理すると、時間および量依存性に Glcci1 の mRNA と蛋白の発現が増加した。糖質ステロイド受容体拮抗薬 (RU-486) の前処理実験によりこの作用が消失したことから、DEX による Glcci1 の発現増加には糖質ステロイド受容体の存在が必須であることが判明した。Western blot 法による 2 種類の Glcci1 (70 と 75kDa) は、λ phosphatase 処理実験の結果、75kDa はリン酸化フォーム、70kDa は非リン酸化フォーム（新生産物）と考えられた。腎および胸腺 cDNA ライブラリーを prey とした酵母ツーハイブリッド法により、Glcci1 のリガンドとして dynein-light chain 1 (LC8) がスクリーニングされ、Glcci1 永久発現株を用いたプルダウン法により、LC8 は Glcci1 のリガンドであることが確定した。胸腺 T 細胞における LC8 の関与については、p-21 activated protein kinase (PAK1) によるリン酸化能減少の結果、単量体 LC8 の tubulin からの離

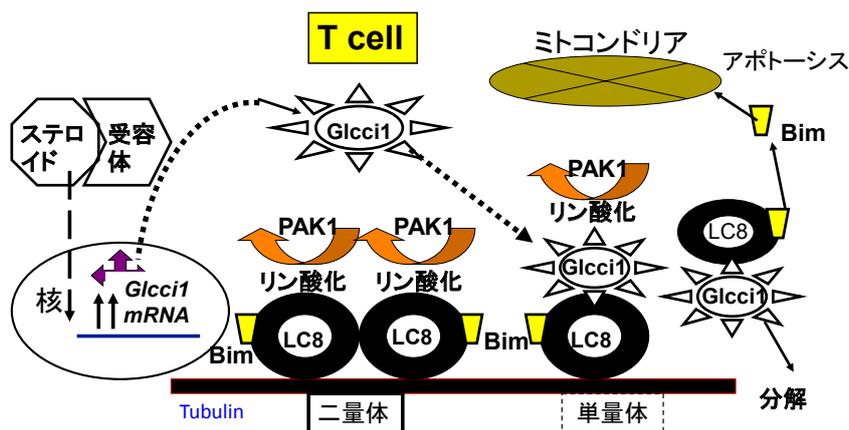


図1 胸腺T細胞におけるGlcci1機能の仮説

Glcci1は、tubulin上で、PAK1によるリン酸化により安定している二量体LC8に対して、PAK1のリン酸化を横取りすることにより、LC8単量体を誘導する。この単量体は自身に結合しているアポトーシス誘導因子Bimの遊離をすることにより、アポトーシスを惹起する。

脱と LC8 結合物である Bim の遊離による double positive T (CD4+CD8+) 細胞のアポトーシス惹起が報告されている。そこで、LC8-PAK1 相互作用に関わる Glcci1 機能について検証した。すなわち、Glcci1 永久発現株を用いたプルダウン法により、Glcci1 は LC8 のみならず PAK1 とも結合することが判明した。さらに、リコンビナント Glcci1, LC8, PAK1 の組み合わせによる *in vitro* リン酸化実験により、Glcci1 は PAK1 によりリン酸化され、その結果 PAK1 の自己リン酸化能を抑制し、同時に PAK1 による LC8 のリン酸化を阻害することが同定された。

C57BL/6 マウスに DEX を静注し、前述のマウス胸腺細胞株で得られた結果の再現性を確認した。まず、摘出した胸腺細胞と脾臓細胞を材料に抗 CD8 抗体あるいは抗 CD4 抗体結合磁気ビーズを用いて、胸腺 CD4+CD8+ T, rest of CD4+CD8+ T, 脾臓 CD4+ T, CD8+ T 細胞を単離し、Glcci1 の蛋白発現を Western blot 法で比較検討した。胸腺 CD4+CD8+ T > rest of CD4+CD8+ T > 脾臓 CD4+ T=CD8+ T の順に Glcci1 の高発現がみられた。全胸腺 T 細胞 (約 80% は double positive T) の Glcci1 は、DEX 投与 0.2 ~ 5mg/kg/day 1 回静注により、その mRNA 発現についてはいずれも発現増加がみられたが、蛋白産物は 2mg/kg/day 以上において、その発現は減少した。すべての条件において、LC8, PAK1, Bim の蛋白発現パターンは、Glcci1 の発現と正の相関関係として観察された。

PAK1 のキナーゼ活性の阻害を実行する Glcci1 上のリン酸化ドメイン同定について、さらに検討を行った。まず、Glcci1 永久発現株から FLAG-免疫沈降により Glcci1 蛋白を回収し、トリプシン消化後に得た Glcci1 断片群を材料にリン酸化質量解析を行った。その結果、アミノ酸シーケンス上のセリン/スレオニン/チロシン部位の殆どが実際にリン酸化されることが判明した。そこで、PAK1 のキナーゼ活性発現予測モチーフを基に、

Glcci1 の各 10mer ペプチドを合成し、*in vitro* PAK1 キナーゼ阻害アッセイを行った。強烈なマルチキナーゼ阻害物 staurosporine の阻害率を 100% としたところ、アミノ酸配列 351-360 (PSVQERSSSC) 部位のペプチドにおいて 75% の阻害率が得られた。この合成ペプチドあるいは full-length recombinant Glcci1 をマウス胸腺細胞株にエレクトロポレーション法 (Amaxa Nucleofector System) により導入を行い、annexin V, 活性化 caspase の発現を検討した。しかし、いずれの系においても、胸腺細胞の有意なアポトーシスの促進は観察されなかった。

#### 【考 察】

本研究により、Glcci1 の基本的な蛋白機能が明らかになった。すなわち、希有に多数のセリン/スレオニン/チロシンリン酸化部位を有するキナーゼの基質蛋白であることが判明した。さらに、その一部に、PAK1 阻害能を発揮する選択的セリンリン酸化ドメインを同定した。このドメインは、2 次的に PAK1 の LC8 リン酸化を阻害することが考えられる。正常の胸腺 T 細胞では、LC8 は PAK1 によりリン酸化されることにより安定した 2 量体形成が可能になり、これにより tubulin 上の滑車蛋白の一員として機能することが判明している。本研究から、Glcci1 がこの PAK1 の LC8 リン酸化能を阻害することにより、不安定である単量体 LC8 が形成されたと考えられた。LC8 にはアポトーシス誘導因子 Bim が結合しているが、不安定 LC8 が tubulin 上から離脱することにより、この Bim も tubulin からミトコンドリアに移動すると考えられる (図 1)。すなわち、胸腺 double positive T 細胞における Glcci1 の高発現は、胸腺上皮細胞から産生される内因性糖質ステロイドにより発現促進された結果と推測され、この高発現 Glcci1 は PAK1-LC8 相互作用を妨害することによりアポトーシスを惹起すると考え

られる。この Glcci1-PAK1-LC8 相互作用は、胸腺 double positive T 細胞の negative selection の根幹に關与する新規カスケードである。

一方、single positive T や脾臓 T、さらには末梢血 T 細胞のキナーゼの活性化は、double positive T 細胞に比してかなり弱い。しかし、種々の条件下において容易にシグナリングの活性化が惹起され、分裂・増殖、サイトカイン分泌の亢進などの生態における有害事象が誘導される。この状態での T 細胞に対して作用する糖質ステロイド作用もまた、Glcci1 のキナーゼ阻害の結果と推測される。その実証のためには、活性化 T 細胞における Glcci1 結合キナーゼの同定が必須である。現在、我々が有する recombinant Glcci1 が生化学的に active であることをすでに実証している。すなわち、活性化リンパ球の蛋白ライセートと recombinant Glcci1 を混合し、抗 Glcci1 抗体により得られる沈降産物を質量解析にて解析し、活性化 T 細胞における Glcci1 結合キナーゼを同定することを進行中である。

本研究の最終目標は、糖質ステロイド代替薬の創薬である。これまでの結果から、Glcci1 の各リン酸化ドメインの対応キナーゼ群同定の道筋がみえてきた。しかし、最終的に各キナーゼ対応ペプチドが、実際の代替薬候補になることについては、多くの検証が必要である。我々が行った 10mer のペプチドによる実際の細胞内のキナーゼ活性の阻害は同定されなかった。ペプチドの長さにくわえて、細胞内への導入の困難さが問題になるであ

ろう。一方、Glcci1 自身を代替薬として考えるのではなく、各疾患の細胞内活性化キナーゼの結合ツールとして利用することも重要である。各疾患の病態を表現系とする活性化細胞における Glcci1 特異的キナーゼ群を同定し、この阻害効果を発揮する低分子化合物を探索することを計画している。これは、タンパク質と化合物との結合情報（ケミカルゲノミクス情報）から抽出したタンパク質のリガンド認識パターンに基づいた新規の方法である。すなわち、 $10^{60}$  個も存在する活性化化合物から効率的に候補化合物を発見する新たなインフォマティクスである Chemical Genomics-based Virtual Screening を用いる。これらの方法により、新規糖質ステロイド代替薬の創薬研究をさらに進めたい。

#### 講演記録

1. 楊 國昌：ネフローゼ症候群の成因：第 41 回日本腎臓学会東部学術大会，東京，平成 23 年 10 月 14 日。（教育講演）
2. 楊 國昌：ネフローゼの病態からみた免疫抑制薬の抗タンパク尿作用機序．石川県病院薬剤師会学術講演会．金沢，平成 23 年 7 月 30 日．（特別講演）
3. 楊 國昌：糖質ステロイド作用の過去・現在・未来．第 7 回多摩小児腎フォーラム，東京，平成 23 年 7 月 23 日．（特別講演）
4. 楊 國昌：糖質ステロイド作用の過去・現在・未来．第 3 回城南小児腎フォーラム，東京，平成 23 年 7 月 11 日．（特別講演）