

平成22年12月

# 李林静 学位論文審査要旨

主査 久留一郎  
副主査 難波栄二  
同 大野耕策

## 主論文

Chemical chaperone therapy: Luciferase assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations

(ケミカルシャペロン療法：ベータガラクトシダーゼ変異スクリーニングのためのルシフェラーゼアッセイ)

(著者：李林静、檜垣克美、二宮治明、栞卓、飯田真巳、小川誠一郎、鈴木義之、大野耕策、難波栄二)

平成22年 Molecular Genetics and Metabolism 101巻 364頁～369頁

# 学 位 論 文 要 旨

Chemical chaperone therapy: Luciferase assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations

(ケミカルシャペロン療法：ベータガラクトシダーゼ変異スクリーニングのためのルシフェラーゼアッセイ)

ベータガラクトシドーシスは、ライソゾーム内の酸性ベータガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) をコードするGLB1遺伝子の変異により発症する疾患である。以前に、ケミカルシャペロン NOEVが様々な種類のヒト変異 $\beta$ -gal蛋白質を安定化し、ヒト患者由来培養線維芽細胞において残存酵素活性上昇効果 (ケミカルシャペロン効果) を示すことが報告されていた。このケミカルシャペロン効果は変異特異的である。本研究ではケミカルシャペロンの変異特異性を効率的に検討するために、ヒト変異 $\beta$ -galに対するシャペロン効果を調べる際に有用なルシフェラーゼアッセイ系を構築した。

## 方 法

GLB1 cDNAのC末端にflagタグとDinofla-luciferase (Dluc) を付加したプラスミドDNA ( $\beta$ -gal-flag-Dluc) を作製した。リポフェクタミン2000試薬を用い、このプラスミドDNAをCOS7細胞へ導入し一過性に発現させ、ケミカルシャペロンの一つである N-octyl- $\beta$ -valienamine (NOEV) を0, 0.2あるいは2  $\mu$ M含む培養液中で48または96時間の培養を行った。また、プロテアソーム阻害剤処理では、2  $\mu$ Mのセラステロールあるいは0.1  $\mu$ MのMG132を加えた。NH<sub>4</sub>Cl処理は、NOEVを含む培養液に0あるいは20 mMになるようにNH<sub>4</sub>Clを添加した。

酵素活性は、0.1 %TritonX-100溶液で細胞抽出液を作製後、4-MU- $\beta$ -galactosideを基質とし蛍光マイクロプレートリーダー (CytoFluorII, PerSeptive Systems) を用いて測定した。また、ウェスタンブロッティングはマウスモノクローナル抗flag-M2抗体あるいはウサギポリクローナル抗 $\beta$ -gal抗体を用いた。発色反応はECL Western Blotting Analysis system (Amersham Bioscience) を用い、X線フィルム (Fuji) に露光した。ルシフェラーゼ活性は、NH<sub>4</sub>Cl処理を行った細胞培養液を回収し、chemiluminescencer AB2000を用い測定した。データは、StatView softwareを用いたStudent t 検定を行い統計的に処理した。

## 結 果

変異のない $\beta$ -gal-flag-Dluc導入細胞は、 $\beta$ -gal活性と高いルシフェラーゼ活性を示した。 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 処理により細胞抽出液中の酵素活性が減少する一方、細胞培養液中の酵素活性が上昇した。また、この導入細胞内の酵素活性はNOEVにより安定化された。R201C、R457Q変異をもつ $\beta$ -gal-flag-Dluc導入細胞では $\text{NH}_4\text{Cl}$ 非存在下の細胞抽出液と $\text{NH}_4\text{Cl}$ 存在下の細胞培養液の両方で酵素活性が上昇したが、I51T変異をもつ $\beta$ -gal-flag-Dluc導入細胞ではこれらに変化がみられなかった。これらの結果は、過去の研究結果と一致し、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 存在下の細胞培養液中のルシフェラーゼ活性が、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 非存在下の細胞抽出液中の $\beta$ -gal活性を反映していることが示された。さらに、R201C変異 $\beta$ -gal-flag-Dluc導入細胞を用いて2種類のプロテアソーム阻害剤（セラステロールとMG132）の影響も調べたところ、これらの阻害剤は変異酵素を安定化させることが明らかとなった。

## 考 察

ケミカルシャペロン療法は、不安定な変異酵素蛋白質の小胞体における分解を防ぎ、酵素活性を上昇させる。これまでは、酵素活性の上昇を指標にケミカルシャペロンの候補化合物を同定していたが、本研究ではルシフェラーゼアッセイ系により変異蛋白質の安定化を直接確認する新たな方法を確立した。さらに、この方法により2種類のプロテアソーム阻害剤（セラステロールとMG132）がR201C変異 $\beta$ -galに対して、ケミカルシャペロンNOEVと相乗効果を示すことを明らかにした。このことからシャペロン分子が変異蛋白質の折りたたみを正常化し、小胞体関連分解を妨げることが示された。

## 結 論

本研究では、ルシフェラーゼアッセイ系により酸性ベータガラクトシダーゼ( $\beta$ -gal)変異蛋白質の安定化を直接確認する新たな方法を確立した。さらに、プロテアソーム阻害剤がケミカルシャペロンの一つであるNOEVの効果を促進することも明らかにした。本方法は、生細胞におけるケミカルシャペロンのスクリーニングや活性評価を行うにあたって信頼性が高く簡便であり、新規のケミカルシャペロンの探索に極めて有用である。