

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591007
 研究課題名（和文） 抗 ALS 及び抗アルツハイマー病活性を有する新規神経保護因子の探索と作用機序解析
 研究課題名（英文） Novel neuroprotective factors against both ALS and Alzheimer' s disease and the action mechanism study

研究代表者

喜多 淑子 (KITA YOSHIKO)
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：00327496

研究成果の概要：抗 ALS 及び抗アルツハイマー活性を有する神経保護因子コリベリン（ADNF-HN 誘導体）の高活性（fM）のメカニズム解明をめざして、構成成分である ADNF、AGAC8R-HNG17 と共にキャラクタライゼーションを実施した。CD、分析用超遠心によるキャラクタライゼーションの結果は今までの2量体化説に反し、コリベリン、ADNF、AGAC8R-HNG17 とも単量体である事が、CD 及び、分析用超遠心の測定から強く示唆された。またターゲット分子の1つとして FPRL-1 が考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ADNF, HN, ALS, アルツハイマー病、コリベリン

1. 研究開始当初の背景

VIP で刺激されたアストロサイトの培養液から発見された ADNF は極めて低い濃度 fM で Abeta による神経細胞死抑制機能を発揮したが、高濃度ではその作用が消失するといったユニークな性質が欠点となり実用化が断念されていた。一方、我々が発見したヒューマニン（HN）を ADNF と比較試験中、ADNF が ALS 関連の神経細胞死を抑制する事がわかり、その活性は濃度依存性があり、欠点であった高濃度での活性低下は消失していた。G93R-SOD1Tg マウス（ALS マウス）による in vivo 実験では ADNF は運動機能を改善するが、

延命効果はなかった。しかし、ADNF に HN 最強誘導体 AGAC8R-HNG17 を融合させたコリベリンは ALS マウスの運動機能改善のみならず、延命効果をももたらした。Vitro での神経細胞死抑制効果は ADNF と同様 fM という高活性を有し、HN 誘導体の活性を上昇させる結果となった。この fM 活性にたいするメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

上述のように、ADNF を HN 誘導体の N 末端に融合させることにより活性を ADNF と同じレベルまで上昇させる ADNF に特異的

な機能に注目し (1) ADNF、コリベリンのターゲット分子を探索する。また ADNF、コリベリンの fM での神経細胞死抑制機能のメカニズムおよび、安定性、DDS 探求のための (2) キャラクターライゼーションからペプチドの構造的情報を得る。

3. 研究の方法

(1) コリベリンターゲット分子の探索
HEK293 あるいは NSC34 細胞に FPRL-1 を導入しコリベリン、HN と反応させ、Erk 活性をみる

(2) コリベリン、ADNF、HN 誘導体について CD (円偏光 2 色性) スペクトル、分析用超遠心機によりモノマーであるかダイマーであるかを決定する

4. 研究成果

HN の神経細胞死抑制機能は HN 分子が二量体化すると報告されている。コリベリンの活性が構成分子の HN 誘導体より約 100 倍上昇することの機序を説明するため、コリベリンの二量体化を仮定し、HN 誘導体部分の二量体化を ADNF 部分が二量体化することにより強化すると考えていた。これを確認するため、CD (円偏光 2 色性)、及び、分析用超遠心機により探索したところ、ADNF、AGAC8R-HNG17 及びコリベリンも予想に反しモノマーであった。更に他の HN、HN 誘導体である HNG もモノマーの様である。確認のため、ダイマー能欠損 HN とされている S7A-HN で上記実験を行ったところ、これは予想どおりモノマーであった。これらより、ADNF、AGAC8R-HNG17、コリベリン、HNG、HN とすべてモノマーであることを示す結果となった。また ADNF を他のペプチドの N 末端に融合させその活性が上昇するかどうかを確認するためにエポミメティクスを考えていたが、より短いペプチドで活性が ADNF と同様の NAP という 7 個のアミノ酸からなる ADNF-NAP を合成してキャラクターライゼーションを実施中である。各ファクターの Erk 活性については HNG の活性を対照に種々の結果が得られ、発表段階にある。

以下に結果の一部を示す。

図 1 は各因子の CD スペクトルであるが、赤のコリベリンと黒点の ADNF はほとんど重なっている。一番上のブルーはコリベリンの C 末部分の AGAC8R-HNG17 のスペクトルで、コリベリンが単に構成因子同士の混合物のス

ペクトル (理論値) であるグリーンとは異なり ADNF に近い構造を取っている事を示している。図 2 の分析用超遠心の結果はコリベリンがモノマーである事を強く示唆している。

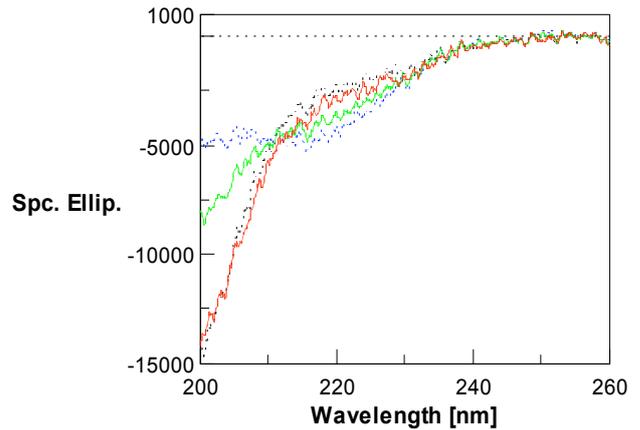


図 1 PBS 中におけるコリベリンと ADNF、AGAC8R-HNG17 の CD スペクトル理論値と実験値の比較

赤 : コリベリン 黒点線 : ADNF
緑 : 理論値 ADNF+AGAC8R-HNG17
水色 : AGAC8R-HNG17

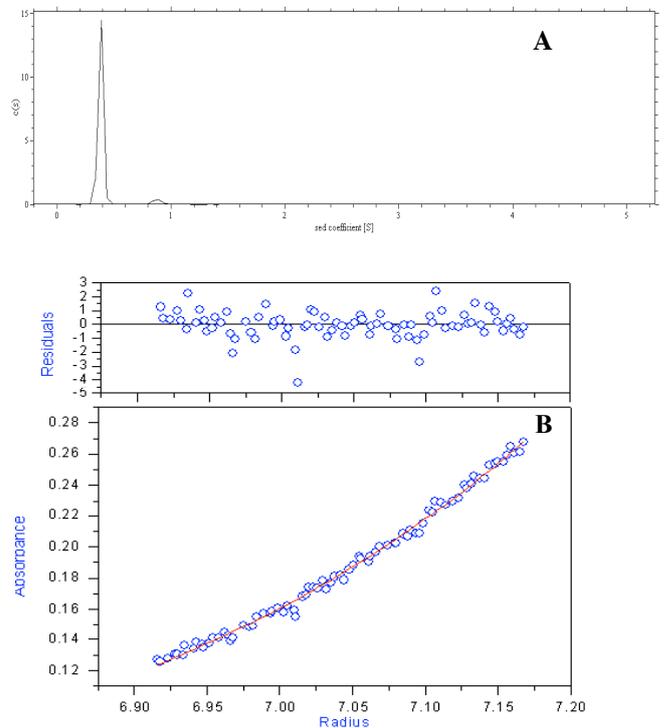


図 2 PBS 中のコリベリン分析用超遠心 (4000rpm, 0.25mg/ml) Sedimentation velocity, 0.386S (96%), 0.872S (4%) (A) and equilibrium analysis (B) of Colivelin in PBS

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Arisaka F, Arakawa T, Niikura T, Kita Y, Active form of Neuroprotective Humanin, HN and inactive analog , S7A-HN, are monomeric and disordered in aqueous phosphate solution at pH6.0; No correlation of solution structure with activity. Protein Pept Lett, 16, 2009, 132-137. 査読 有
- ② Arakawa T, Kita Y, Koyama H, Synergistic virus inactivation effects of arginine. Biotechnology J, 4, 2009, 174-178. 査読 有
- ③ Arakawa T, Kita Y, Sato H, Ejima D, MEP chromatography of antibody and Fc-fusion protein using aqueous arginine solution, Protein Expt. Purf., 63, 2009, 158-163, 査読 有
- ④ Arakawa T, Kita Y, Niikura T A rescue factor for Alzheimer's disease: discovery, activity, structure and mechanism, Curr. Med. Chem., 15, 2008, 2088-2098. 査読 有
- ⑤ Arisaka F, Niikura T, Arakawa T, Kita Y, The structure analysis of Humanin analog, AGAC8R-HNG17, by circular dichroism and sedimentation equilibrium: Comparison with the parent molecule. Int. J. Biol. Macromol. 43, 2008, 88-93. 査読 有
- ⑥ Kita Y, Niikura T, Arisaka F, Arakawa T, The complex structure transition of Humanin peptides by sodium dodecylsulfate and trifluoroethanol, Protein Pept. Lett., 15, 2008, 510-515 査読 有
- ⑦ Arakawa T, Kita Y, Ejima D, Gagnon P, Solvent modulation of column chromatography, Protein Pept. Lett., 15, 2008, 544-555, 査読 有
- ⑧ Abe Y, Kita Y, Niikura T Mammalian Gup1, a homolog of Saccharomyces cerevisiae glycerol uptake/transporter 1, acts as a negative regulator for N-terminal palmitoylation of Sonic hedgehog, FEBS J., 275, 2008, 318-331. 査読 有
- ⑨ Arakawa T, Kita Y, Koyama AH, Solubility enhancement of gluten and organic compounds by arginine, Int. J. Pharm., 355, 2008, 220-223, 査読 有
- ⑩ Arakawa T, Niikura T, Tajima H, Arisaka F, Kita Y Structure analysis of Activity -Dependent Neurotrophic factor 9 by circular dichroism and sedimentation equilibrium, J. Mol. Neurosci, 33, 2007, 262-267. 査読 有
- ⑪ Arakawa T, Niikura T, Arisaka F, Kita Y, Activity dependent neurotrophic factor ADNF, determined the structure characteristics of Colvelin a fusion protein of ADNF9 and Humanin. J. Pept Sci., 14, 2007, 631-636, 査読 有
- ⑫ Arakawa T, Kita Y, Timasheff S. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide, Biophys Chem, 131, 2007, 62-70, 査読 有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kita Y, Niikura T, Arakawa T, Arisaka F, A Structure-Activity relationship of AGAC8R-HNG17, a component of femtomolar acting factor Colivelin against Alzheimer's disease insults: Comparison studied of ADNF, Humanin(HN) and the analogues , Neuroscience 2008, SFN (Society for Neuroscience) Nov. 19, 2008, Washington DC, USA
- ② 中木戸誠、田中良和、三堀麻理子、工藤基徳、江島大輔、喜多淑子、荒川力、津本浩平 「結晶構造を基盤としたアルギニン塩酸塩の存在による蛋白質の水和変化の解析 (Structure-based analysis reveals hydration changes induced by arginine hydrochloride) , 第31回日本分子生物学会年会、合同大会、Dec. 9, 2008 神戸
- ③ Kita Y, Niikura T, Arisaka F, Arakawa T, Drug candidate for Alzheimer's disease and ALS: Characterization of femto molar acting neuroprotective peptides ADNF and Colivelin, a linking peptide of ADNF and HN defivative. Keystone Symposia, Mar. 26 2008, Keystone, Colorado, USA
- ④ Kita Y, Niikura T, Tajima H, Arisaka F, Arakawa T, Drug candidate for AD and ALS : structure analysis of femto-molar acting neuroprotective peptides ADNF and Colivelin, Neuroscinece 2007, SFN (Society of Neuroscience) Nov. 6th, 2007, San Diego, California USA

⑤ Kita Y. Characterization of femto-molar acting neuroprotective peptides, ADFN and Colivelin: Potential mechanism of their action, Summer Neuropeptide Conference, Sep. 9, 2007, Essex Vermont, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 淑子 (KITA YOSHIKO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00327496

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者