

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19341

研究課題名（和文）20Sプロテアソームのゲート開口を促進する革新的神経変性疾患治療戦略

研究課題名（英文）Search for the activators of the 20S proteasome from natural sources

研究代表者

塚本 佐知子（Tsukamoto, Sachiko）

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・教授

研究者番号：40192190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患では、内因性変性タンパク質が凝集し神経細胞を傷害する。内因性変性タンパク質は20Sプロテアソームにより分解されるが、20Sプロテアソームではタンパク質が内部の触媒部位へと侵入するゲートが閉じられている。そこで本研究では、20Sプロテアソームのゲートの開口を促進することにより、変性タンパク質の分解を亢進させる低分子性プロテアソーム活性化剤を天然資源から探索した。そして、化合物ライブラリーからsyrosingopineを見出すことに成功した。本化合物は、パーキンソン病の発症に関係する-synucleinの分解を促進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は高齢社会に突入し、神経変性疾患が大きな社会問題になっている。これら疾患では、加齢に伴いタンパク質の凝集体が形成され神経細胞を傷害する。凝集体を形成するタンパク質は、生理的条件下で三次元構造をとれない内因性変性タンパク質で、最近認可された抗体医薬が治療薬として期待されている。しかし、血液脳関門を通過できる抗体医薬は血中濃度の0.1%と極微量であること、また、抗体医薬で脳からアミロイド斑を減少させても、認知機能の低下を止めることはできないため効果は限定的である。そこで、本研究では新しい機序の治療薬の開発を目指し、20Sプロテアソームを活性化させることにより凝集体を分解させる天然物を探索した。

研究成果の概要（英文）：In neurodegenerative diseases, intrinsically disordered proteins accumulate and aggregate in cells, leading to nerve cell disorders. Intrinsically disordered proteins are degraded by the 20S proteasome, but its gate leading to the catalytic sites is closed in the inactive form. The compounds that open the gate can promote the degradation of intrinsically disordered proteins and prevent their accumulation. Then, such compounds may be promising therapeutic drugs for neurodegenerative diseases. We screened the natural products in the Prestwick Library and found syrosingopine as the most potent activator of the 20S proteasome. Syrosingopine enhanced the degradation of -synuclein, an intrinsically disordered protein. In addition, syrosingopine enabled the binding of a membrane-permeable fluorescent probe to the catalytic site of the 20S proteasome by opening the gate in HeLa cells.

研究分野：天然物化学

キーワード：20S proteasome 神経変性疾患 天然資源

## 1. 研究開始当初の背景

日本は高齢社会に突入し、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患が大きな社会問題になっている。これら疾患では、加齢に伴い特定のタンパク質の凝集体が形成され神経細胞を傷害する。凝集体を形成するタンパク質は、生理的条件下で三次元構造をとれない内因性変性タンパク質で、 $\beta$ -amyloid (アルツハイマー病) や  $\alpha$ -synuclein (パーキンソン病) などが知られている。そしてプロテオーム解析で、真核生物が有するタンパク質の41%が内因性変性タンパク質であることが明らかとされた<sup>1</sup>。

## 2. 研究の目的

ユビキチン-プロテアソームシステム (ubiquitin-proteasome system, UPS) は、細胞内において三次元構造を有するタンパク質を選択的に分解する重要な役割を果たしている。UPS でタンパク質を分解する26Sプロテアソーム (図1A) は、20Sプロテアソームの両端に19Sユニットが結合した構造をとる。三次元構造を有するタンパク質は、ポリユビキチン化後、19Sユニットの作用によりユビキチンが除去されるとともに立体構造が崩され、20Sプロテアソームの内部に入り分解される。20Sプロテアソーム単独では、両端に存在するゲートが閉じているので、内部にタンパク質を侵入させることができないが、19Sユニットが結合することによりゲートが開き侵入が可能となる。一方、内因性変性タンパク質 (図1B) は、20Sプロテアソームに活性化因子 (proteasome activator, PA) が結合した複合体により分解される<sup>2</sup>。このシステムでは、PAが20Sプロテアソームのゲートを開く役割を果たしているが、ユビキチン化されることなく進行するので、ユビキチン非依存的プロテアソームシステム (ubiquitin-independent proteasome system, UIPS) とよばれている。さらに、細胞内において20Sプロテアソームのゲートが常に開いた変異体の存在が発見され、その変異体が内因性変性タンパク質を分解していると報告されていることは、ゲートの開口がタンパク質分解に重要であることを強く支持している<sup>3</sup>。

興味深いことに、細胞内では老化に伴い26Sプロテアソームに対する20Sプロテアソームの比率が増加し、UPSによる分解が低下している<sup>4</sup>。そのため、低分子性PAの投与により20Sプロテアソームを活性化できれば、内因性変性タンパク質の分解が促進され、神経変性疾患の予防や治療につながると期待できる。しかし、低分子性PAに関する研究はほとんど進んでいないのが現状である<sup>5</sup>。そこで本研究では、20Sプロテアソームのゲートの開口を促進する低分子性PAを天然資源から探索することを目的とする、神経変性疾患治療戦略を立案した。

## 3. 研究の方法

### (1) 20Sプロテアソーム活性化物質のスクリーニング

384穴プレートに50 mM Tris-HCl (pH 7.5, 10  $\mu$ L) を分注し、化合物 (20  $\mu$ M) とヒト20Sプロテアソーム (2 nM) を37度で20分間インキュベートした。そこに、50 mM Tris-HCl (pH 7.5, 10  $\mu$ L) に溶かした発蛍光性ペプチド Suc-LLVY-MCA (20  $\mu$ M) を加え、37度で1時間反応させた。そして、加水分解の結果として遊離したアミノメチルクマリンの蛍光強度から、20Sプロテアソームによる分解活性を測定した (励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm)。

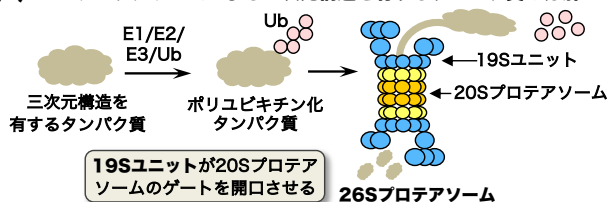
### (2) Syrosingopine (1) と reserpine (2) による20Sプロテアソーム活性化作用

96穴プレートに50 mM Tris-HCl (pH 7.5, 50  $\mu$ L) を分注し、化合物1, 2とヒト20Sプロテアソーム (2 nM) を37度で20分間インキュベートした。そこに、50 mM Tris-HCl (pH 7.5, 50  $\mu$ L) に溶かした発蛍光性ペプチド (20  $\mu$ M) を加え、37度で1時間反応させた。そして、加水分解の結果として遊離したアミノメチルクマリンの蛍光強度から、20Sプロテアソームによる分解活性を測定した。発蛍光性ペプチドとして、Suc-LLVY-MCA (キモトリプシン様活性)、Z-LLE-AMC (カスパーゼ様活性)、Boc-LRR-AMC (トリプシン様活性) を用いた。26Sプロテアソーム活性化作用を測定する際には、バッファーに5 mM MgCl<sub>2</sub> および2.5 mM ATP を添加して用いた。

### (3) Syrosingopine (1) による $\alpha$ -synucleinの分解

化合物1と20Sプロテアソーム (17 nM) を22.5  $\mu$ Lのバッファー (20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 1 mM EGTAA, pH 7.4) に溶かし、37度で20分間インキュベートした。そして、2.5  $\mu$ Lの $\alpha$ -synuclein溶液 (5  $\mu$ M) を添加し、37度で4時間反応させた。反応を停止させた後、ウエスタンブロットにより $\alpha$ -シヌクレインを検出した。

(A) 26Sプロテアソームによる三次元構造を有するタンパク質の分解



(B) 20Sプロテアソームによる内因性変性タンパク質の分解

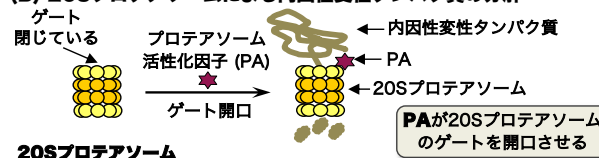


図1. (A) 26Sプロテアソームによる三次元構造を有するタンパク質の分解. (B) 20Sプロテアソームによる内因性変性タンパク質の分解.

#### (4) 蛍光プローブを用いた細胞内プロテアソーム活性化試験

HeLa 細胞は、DMEM 培地 (10% FBS, 100 U/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin) を用いて培養した。96 穴プレートに HeLa 細胞を播種し (100,000 cells/mL, 0.1 mL)、37 度で 20 時間培養した後、化合物 **1** を添加して 20 時間培養した。蛍光プローブ Me<sub>4</sub>BodipyFL-Ahx<sub>3</sub>Leu<sub>3</sub>VS の DMSO 溶液 (250 nM) を添加し、2 時間反応させた後、PBS で 2 回洗浄後、トリプシン処理により細胞を回収した。回収した細胞を 500 g で 3 分間遠心し PBS で洗浄した。細胞を 1% フォルムアルデヒドで固定した後、PBST で洗浄し、フローサイトメーターで 2000 細胞分の蛍光強度を測定した (励起波長 488 nm、蛍光波長 533 nm)。

### 4. 研究成果

#### (1) Prestwick ライブラリーを用いた 20S プロテアソーム活性化物質のスクリーニング

Prestwick ライブラリーに含まれる 320 種類の化合物 (10 µM) について、20S プロテアソーム活性化作用があるかどうかを、キモトリプシン様活性を指標にスクリーニングした。その結果、chlorpromazine (CPZ, 20 µM) よりも強く活性化させる化合物が 12 種類得られた (図 2)。その中に yohinbin 型アルカロイドが 2 種類 (**1**, **2**)、エルゴットアルカロイドが 5 種類 (**3**–**7**) 含まれていた (図 3)。最も活性が強かったのが yohinbin 型アルカロイドの syrosingopine (**1**) で、reserpine (**2**) も強い活性を示した。Prestwick ライブラリーには、他に 7 種類の yohinbin 型アルカロイド **8**–**14** が含まれていたが、それらは CPZ よりも活性が弱かった (図 4)。構造-活性相関から、没食子酸誘導体の存在が活性を増強させ、さらにエトキシカルボニル基が結合すると活性がより増強されると考えられた。

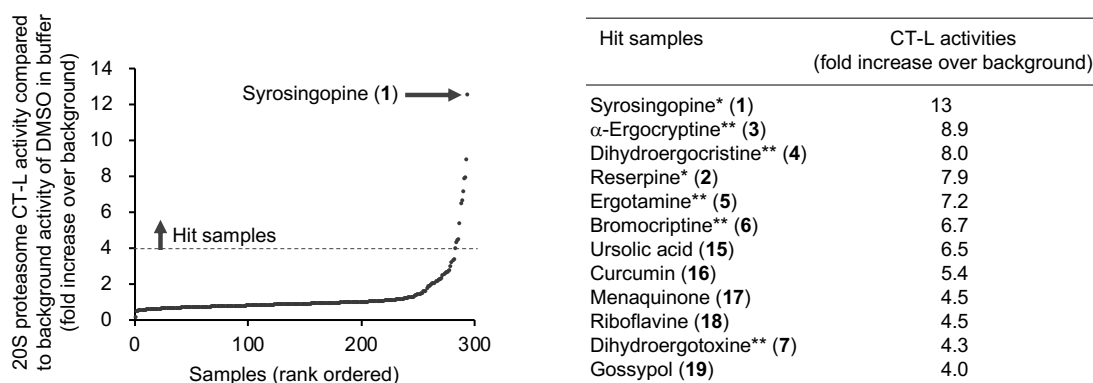


図 2. Prestwick ライブラリーを用いた 20S プロテアソーム活性化物質のスクリーニング結果。\*Yohimbine 型アルカロイド。  
\*\*Ergot アルカロイド。

#### (2) 化合物 **1** と **2** による 20S および 26S プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する作用

化合物 **1** と **2** により 20S プロテアソームの活性が増強されるかどうかを調べるため、それぞれキモトリプシン様活性、カスパーゼ様活性、トリプシン様活性について速度論的に解析した (図 5A)。その結果、**1** と **2** は 3 種類の触媒活性に対して濃度依存的に活性を増強させ、**1** は 8.0 ~ 9.8 倍、**2** は 4.8 ~ 7.0 倍活性を増強させた。そして、エトキシカルボニル基を有する **1** は、**2** に比較して増強の程度は大きかった。さらに、**1** と **2** を用いて 26S プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する増強作用を調べたところ、いずれの化合物も活性を増強させないことがわかった (図 5B)。この結果から、**1** と **2** が示す増強作用は、プロテアソームによる触媒作用に対する増強ではなく、20S プロテアソームのゲートを開かせることにより活性を増強させていると考えられた。

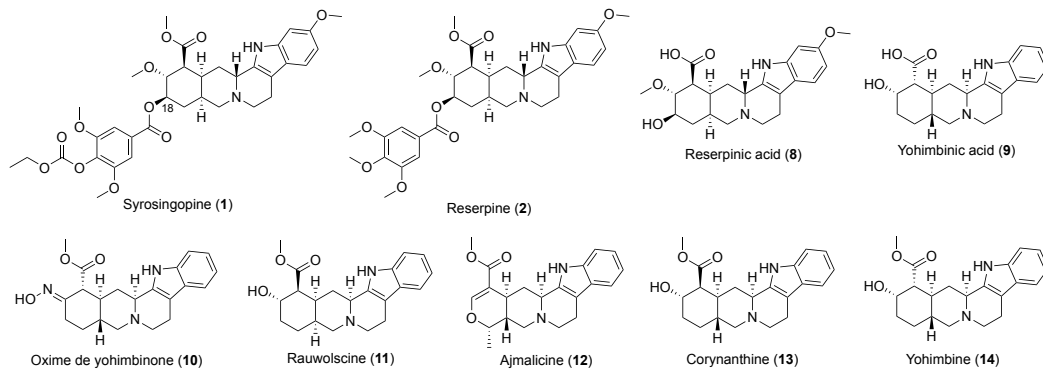
#### (3) 化合物 **1** による α-synuclein の分解

化合物 **1** により 20S プロテアソームの活性が増強されることにより、パーキンソン病の関連タンパク質である α-synuclein の分解が促進されるかを調べたところ、**1** (10 µM) を添加することにより、DMSO と比較して α-synuclein 量が減少した (図 6)。この結果は、**1** が 20S プロテアソームを活性化させ、α-synuclein の分解を亢進させたことを示唆している。

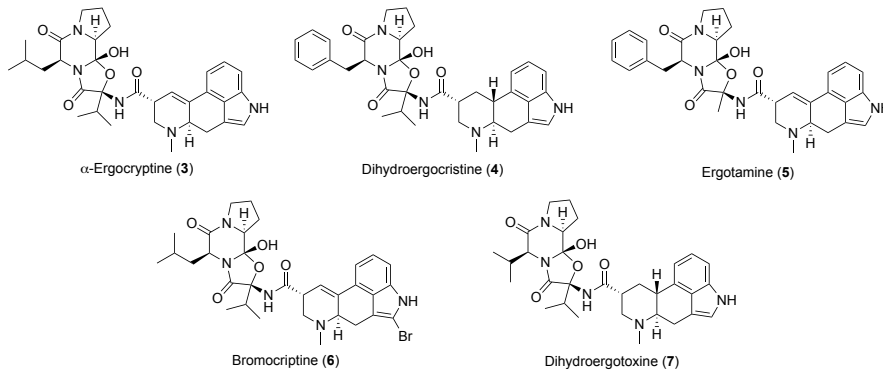
#### (4) 蛍光プローブを用いた細胞内プロテアソーム活性化試験

以上の研究から、化合物 **1** は酵素試験において 20S プロテアソームの作用を強く活性化させることが分かった。そこで、細胞を用いた実験において **1** がプロテアソームを活性化させるかを、細胞膜透過性の蛍光プローブ Me<sub>4</sub>BodipyFL-Ahx<sub>3</sub>Leu<sub>3</sub>VS を用いて評価した (図 7A)。その結果、細胞を **1** で処理することにより蛍光強度が約 3 倍になったので (図 7B)、**1** は細胞内においても 20S プロテアソームのゲートを開かせることにより、活性を増強させると考えられた<sup>6</sup>。

Yohimbine-type alkaloids



Ergot alkaloids



Other compounds

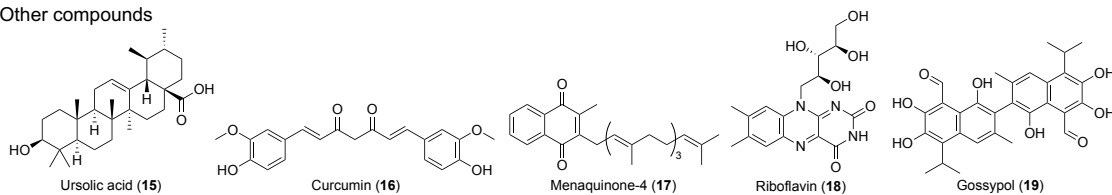


図3. 20S プロテアソーム活性化物質 (1-7, 15-19) および yohimbine 型アルカロイド (8-14) の構造。

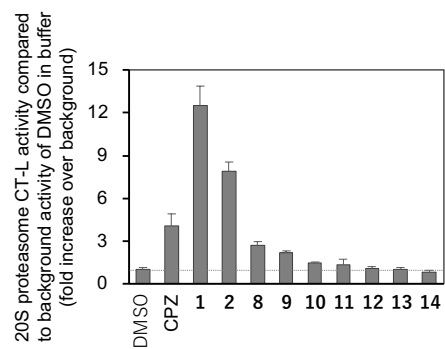


図4. Yohimbine 型アルカロイドによる 20S プロテアソームの活性化. CPZ: chlorpromazine.

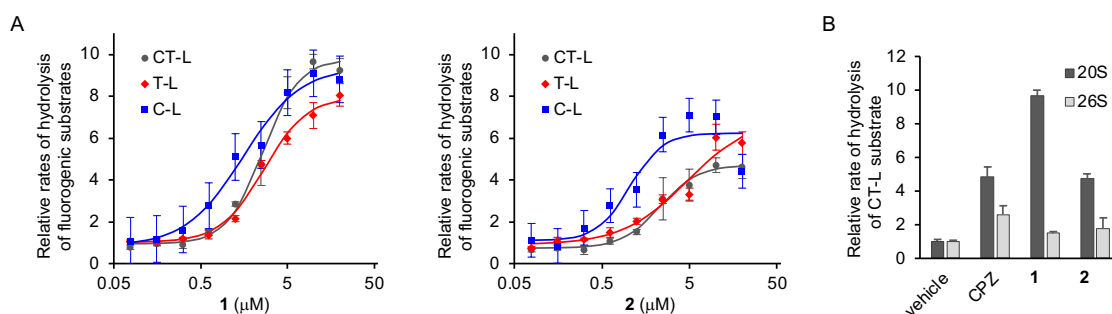


図5. (A) 化合物 1 と 2 による 20S プロテアソーム活性化. (B) 化合物 1 と 2 による 20S および 26S プロテアソームのキモトリプシン様活性の増強.

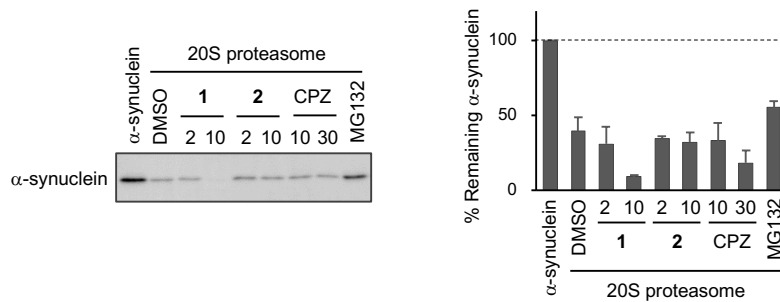


図6. 化合物 1 と 2 により 20S プロテアソームが活性化されα-synuclein の分解が増強された。

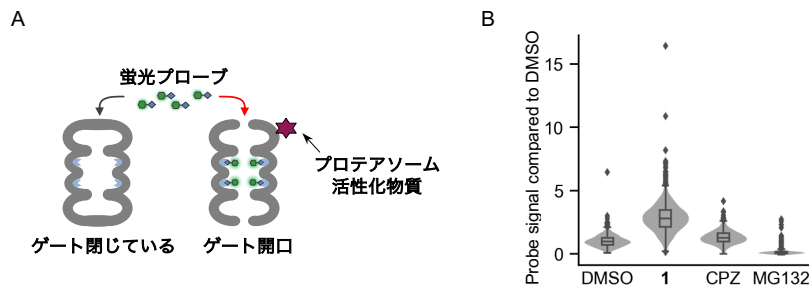


図7. (A) 蛍光プローブは、プロテアソーム活性化物質の結合によりゲートが開くとプロテアソームの内部に入ることができる。(B) 化合物 1 (10 μM)、CPZ (10 μM)、MG132 (1 μM) の存在下、20S プロテアソームの内部に入った蛍光プローブの蛍光強度。

<引用文献>

1. Dunker, A. K.; Obradovic, Z.; Romero, P.; Garner, E. C.; Brown, C. J. *Genome Informatics* **2000**, *11*, 161–171.
2. Raynes, R.; Pomatto, L. C. D.; Davies, K. J. A. *Mol. Aspects Med.* **2016**, *50*, 41–55.
3. Choi, W. H.; de Poot, S. A. H.; Lee, J. H.; Kim, J. H.; Han, D. H.; Kim, Y. K.; Finley, D.; Lee, M. J. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10963.
4. Hwang, J. S.; Hwang, J. S.; Chang, I.; Kim, S. J. *Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2007**, *62*, 490–499.
5. Lee, B.-H.; Lee, M. J.; Park, S.; Oh, D.-C.; Elsasser, S.; Chen, P.-C.; Gartner, C.; Dimova, N.; Hanna, J.; Gygi, S. P.; Wilson, S. M.; King, R. W.; Finley, D. *Nature* **2010**, *467*, 179–184.
6. Sadahiro, Y.; Nishimura, S.; Hitora, Y.; Tsukamoto, S. *J. Nat. Prod.* **2024**, *87*, 554–559.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sadahiro Yusaku, Nishimura Soichiro, Hitora Yuki, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 87
2. 論文標題 Syrosingopine Enhances 20S Proteasome Activity and Degradation of $\alpha$ -Synuclein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 554 ~ 559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.3c00661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 人羅勇氣、西村宗一郎、塚本佐知子
2. 発表標題 細胞試験系を用いたプロテアソーム活性化作用を示す天然物の探索とレセルピン類の活性について
3. 学会等名 第9回食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村宗一郎、人羅勇氣、塚本佐知子
2. 発表標題 天然物由来プロテアソーム活性化物質の探索
3. 学会等名 第37回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貞廣優作、人羅勇氣、本田公洋、手島徳哉、長野由梨子、塚本佐知子
2. 発表標題 Bioactive molecular networkingを利用した真菌由来20Sプロテアソーム活性化物質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部附属 グローバル天然物科学研究センター 天然薬物学分野  
<https://kumamoto-natmed.org>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------