

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670022

研究課題名(和文) 疾患治療を指向した潜在性プロテアソーム活性化剤の探索

研究課題名(英文) Screening for proteasome-activating compounds that could cure neurodegenerative diseases

研究代表者

村田 茂穂 (Murata, Shigeo)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20344070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の根治薬の開発を目的とし、プロテアソームを活性化させ、SOD1、tau、シヌクレインなどの神経変性疾患で蓄積することが知られる変性タンパク質の分解を促進させる化合物をスクリーニングにより探索した。その結果、試験管内でプロテアソームを活性化させるとともに変性タンパク質の分解を促進する化合物、および細胞内で同様の効果を示す化合物など、有望な化合物を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：To develop a drug that can cure neurodegenerative diseases, we screened a chemical library for small molecules that activate proteasomes and promote degradation of misfolded proteins observed in neurodegenerative diseases such as SOD1, tau, and α -synuclein, and identified several promising compounds.

研究分野：細胞内タンパク質分解

キーワード：プロテアソーム 変性タンパク質 タンパク質分解 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

26S プロテアソームは真核細胞内の主要なタンパク質分解酵素であり、主としてユビキチン化されたタンパク質を分解することにより、細胞周期、転写制御、シグナル伝達、タンパク質品質管理をはじめとした様々な生命活動と密接に関与している。

この 26S プロテアソームは、タンパク質分解を実行する CP (core particle) と ATP 依存的に基質タンパク質の構造解きほぐしと CP 活性化を行う RP (regulatory particle) からなる。CP は 7 つの α サブユニットからなる α リングと 7 つの β サブユニットからなる β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順に 4 層重なった樽型の構造を持ち、触媒サブユニットは β リング内に存在するが、基質侵入口にあたる α リングが通常閉じているため、CP は単体では基本的に不活性である (図 1)。

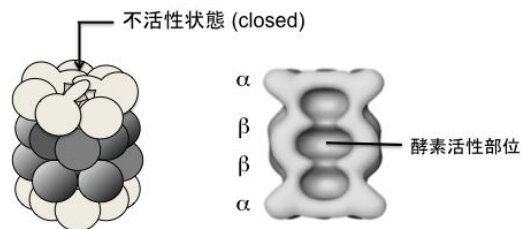


図1 CPの構造と酵素活性部位

多くの神経変性疾患では神経細胞の細胞質内に遺伝子変異を起こしたタンパク質の異常な蓄積が観察されている。例えば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では SOD1 や TDP-43、アルツハイマー病ではアミロイド β や tau、パーキンソン病では α -synuclein の蓄積が確認され、これらのタンパク質の蓄積が疾患の原因であるという考えが有力な仮説の一つとして提唱されている。このようなタンパク質の蓄積が起きる原因の一つとしてプロテアソームの活性低下が考えられ、実際に ALS の原因遺伝子の一つである SOD1 やハンチントン病の原因遺伝子であるポリグルタミンを過剰発現させた細胞においてプロテアソーム活性が低下しているという報告がある。

従って、プロテアソームの機能低下によってミスフォールドしたタンパク質や本来除去されるべきタンパク質の分解に障害が起き、神経変性疾患を引き起こす原因になっていることが想定される。

一般に、タンパク質がプロテアソームにより分解されるためにはユビキチン化され、RP により捕捉されることが必要である。しかし、遺伝子変異によって構造異常を生じた変異 SOD1、 α -synuclein、tau などのタンパク質を、CP は RP の助けなしにユビキチン非依存的・ATP 非依存的に分解し得ることが判明している。従って CP 分解活性を RP に依存せず直接促進できる化合物が見つければ、神経変性疾患の根治療法薬になる可能性がある。

2. 研究の目的

創薬を目的に構築された低分子化合物ライブラリー (約 20 万種類) を用いて、プロテアソーム CP を活性化させる化合物を探索し、神経変性疾患の根治療法薬の基礎となる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* での CP 活性化剤候補化合物の選択

マウス肝臓から生化学的手法により精製した CP と、CP のペプチダーゼ活性により切断されると 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) が蛍光を発するペプチド基質を混合し、AMC 由来の蛍光強度の上昇から CP 活性化能を測定する *in vitro* のアッセイ系を構築した (図 2)。

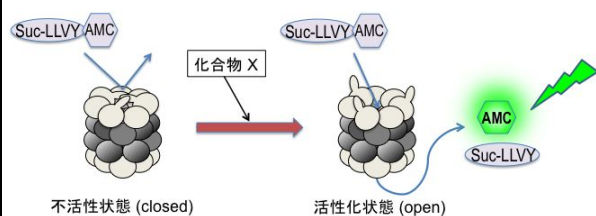


図2 *in vitro*でのアッセイ系の概念図

(2) 細胞ベースでの候補化合物による CP 活性化能の検討

上記スクリーニングで取得した化合物の細胞内での効果を観察するため、Flag タグを

C 末に付与した変異型 SOD1 タンパク質 (SOD1 G85R cFlag) 発現細胞を作製し、構造異常タンパク質の分解に対する効果を検討した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* での CP 活性化剤候補化合物の選択

このアッセイ系で、211,364 種類の化合物を対象としたスクリーニング (n=1) を行い、2,223 個の候補化合物を得た。次に n=4 で結果の再現性を確認し、1,539 個の化合物を選別した。さらに CP と非選択的に結合して CP を活性化し得る化合物除去のため、BSA (0.1 mg/ml) 存在下でも CP を活性化させる化合物を選択した。その結果、124 個の候補化合物が得られた。さらに、化合物本来の性質によらずに高濃度のみで CP 活性化能を示し得るような化合物を除去するため、濃度依存的な CP 活性化能を示す化合物のみを選択し、最終的に 21 個の候補化合物が得られた (図 3)。

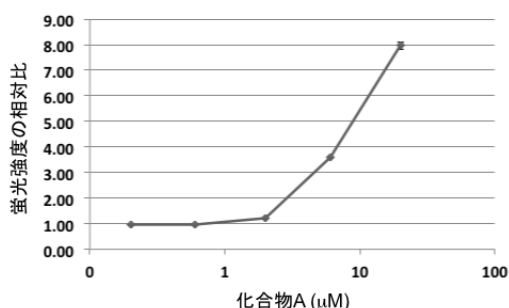


図3 *in vitro* における用量依存的な CP 活性化の一例 (化合物 A) 蛍光強度の相対比は DMSO サンプル (化合物 0 μM) の値を 1 とし て算出 Mean ± SEM (n=4)。

(2) 細胞ベースでの候補化合物による CP 活性化能の検討

次にこれらの化合物の細胞内での効果を観察するため、Flag タグを C 末に付与した変異型 SOD1 タンパク質 (SOD1 G85R cFlag) 発現細胞を作製し、構造異常タンパク質の分解

に対する効果を検討した。この細胞に化合物を各々 20 μM 加えて 6 時間インキュベートした後、ウェスタンブロッティング法で Flag バンドの変化を測定したところ、結果として 3 つの化合物で Flag バンド (変異型 SOD1 タンパク質) の減少が確認された。

候補化合物の *in vitro* での基質減少の確認

(1) の *in vitro* の系では、化合物自体が分解し、時間依存的に AMC と同波長の蛍光を発する物質に変化するものも選択している可能性がある。(2) で選んだ 3 つの化合物からそのような化合物を排除するため、実際に CP が基質を減少させているかの確認を行った。CP、基質 (Suc-LLVY-AMC) および化合物の反応サンプルを HPLC で分画し、基質本体の減少を吸光度から定量する方法でアッセイした。解析の結果、3 つの化合物のうち化合物 A で基質の有意な減少が確認された (図 4)。

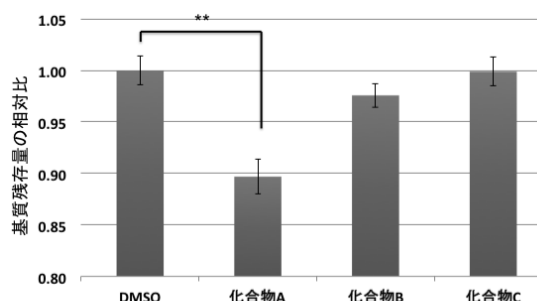


図4 化合物 A 存在下で CP は *in vitro* にて基質を有意に減少させた基質 (Suc-LLVY-AMC) 残存量の相対比は DMSO サンプル (化合物 0 μM) の値を 1 とし て算出。Mean ± SEM (n=6), **p<0.01 (t-test)。

化合物 A に対する詳細解析

まず MTT アッセイにより、変異型タンパク質減少効果を示す化合物濃度 20 μM において、有意な細胞毒性が生じていないことを確認した。また化合物 A の変異型 SOD1 タンパク質発現細胞投与時における作用を投与時間および化合物濃度の観点から詳細に解析した。結果として化合物 A を 20 μM にて 6 時間反応させることにより変異 SOD1 タンパク質量が約半分になることが判明した (図 5)。

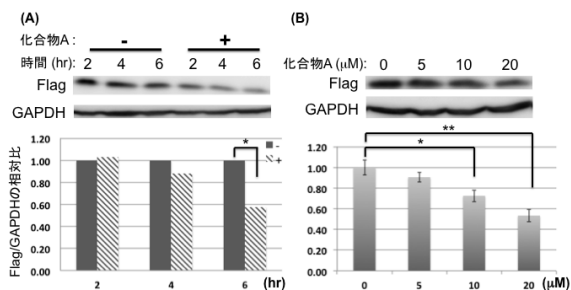


図5 化合物A存在下で時間・濃度依存的に変異型SOD1タンパク質が減少した。(A) 37°C, 5% CO₂, 20μM 化合物A存在下でインキュベーション。(B) 37°C, 5% CO₂で6hrインキュベーション。(A), (B) Flag/GAPDHの相対比は(A)では化合物-, (B)では化合物0 μMの値を1として算出。Mean ± SEM (n=4), *p<0.05, **p<0.01 (t-test)。

今後は化合物 A と CP との結晶構造解析を行うことで結合部位を特定すると同時に、有機化学者との連携で、より CP 選択性の高い化合物の作製を目的とした構造展開を行うことで神経変性疾患の根治療法薬の創成につながることを期待される。さらに結晶構造解析により化合物と CP の結合部位を特定することを通して、新たな CP 活性化機構の解明につながる可能性も考えられる。

また細胞ベースで化合物 A が変異型 SOD1 タンパク質の分解を促進した理由については、化合物 A と細胞内にある未知の内在性の因子の寄与によって、CP を介した変異型 SOD1 タンパク質の分解が促進した可能性が考えられる。この点については今後、さらなる解析が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

橋本悠生、江頭慎一郎、米須清明、磯川宗生、角田誠、船津高志、岡部隆義、小島宏建、八代田英樹、村田茂穂 化合物スクリーニングによるプロテアソーム活性化剤の探索 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学回大会 合同大会 2015 年 12 月 1-4 日神戸国際会議場 (神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tanpaku/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田 茂穂 (MURATA Shigeo)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号: 20344070

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: