

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21247

研究課題名（和文）ユビキチン-プロテアソーム系活性化剤を用いた新規アルツハイマー病治療法の開発

研究課題名（英文）Development of anti-Alzheimer's disease based on a ubiquitin-proteasome activator

研究代表者

甲斐田 大輔（KAIDA, Daisuke）

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：60415122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチン-プロテアソーム系は、細胞内の異常なタンパク質を分解する非常に重要な機構である。私たちは、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を促進し、アルツハイマー病に対する治療効果を有する低分子化合物CGK733が働くメカニズムに関する研究をおこなった。その結果、CGK733がプロテアソームの量やユビキチン化されたタンパク質を増加させるわけではないことを明らかとした。今後さらなる研究を行い、詳細なメカニズムを明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、ユビキチン-プロテアソーム系による基質の認識、分解機構の一端が明らかとなり、学術的に非常に意味のある研究であると言える。また、この研究を進めていくことにより、アルツハイマー病の根本的な治療薬の開発に大きく近づくと考えており、我が国が抱える超高齢化によるさまざまな問題の解決に貢献できると考えられる。このことから、社会的にも非常に意味のある研究であると言える。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitin-proteasome pathway is one of the indispensable mechanisms that degrades abnormal proteins. We previously found that CGK733 induces proteasomal degradation and relieves symptoms of Alzheimer's disease. In this study, we investigated the molecular mechanisms underlying the effect of CGK733. We found that CGK733 did not affect on the amount of the proteasome and ubiquitylated proteins. In a future study, we will reveal how CGK733 exerts its activity.

研究分野：分子生物学 ケミカルバイオロジー

キーワード：ユビキチン プロテアソーム アルツハイマー病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソーム系 (以下 UPS) は、細胞内の異常なタンパク質や機能を終えたタンパク質を分解し、細胞内の恒常性を守る必須の機構である。老化に伴い UPS の活性は低下し、その結果、異常タンパク質が細胞内に蓄積することが知られている。蓄積した異常タンパク質は、アルツハイマー病をはじめとした様々な老化関連疾患の原因となり得る。したがって、UPS の活性低下は老化関連疾患の一因であると考えられ、人為的な UPS の活性化は老化関連疾患を抑制できると期待される。我々は、低分子化合物 CGK733 が、UPS によるタンパク分解を活性化することや、アルツハイマー病に対する治療効果を有することを見出した。

2. 研究の目的

上述のように、CGK733 は UPS によるタンパク質分解を促進し、アルツハイマー病に対する治療効果を有するが、その詳細な分子機構は明らかではなかった。そこで、これらの点を明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) CGK733 の細胞内標的分子の同定

化合物の作用機序を解明するためには、化合物の細胞内標的分子の情報が有用である。そのため、ビオチン化した CGK733 を作成する必要がある。そこで、CGK733 誘導体を多数作成し、構造活性相関研究を行うことにより、CGK733 をビオチン化する部位の選択を行った。

(2) CGK733 が UPS を活性化する分子機構の解明

UPS によるタンパク質分解は、基質タンパク質のユビキチン化と、プロテアソームによるユビキチン化基質の分解の 2 段階に分けられる。いずれの段階が活性化されているかを明らかにするために、以下の実験を行う。

CGK733 が基質のユビキチン化を亢進している可能性の検討

通常、プロテアソームによるタンパク質分解には基質のユビキチン化が必要であるが、ユビキチン様ドメイン (以下 UbL ドメイン) と、非構造領域を持つタンパク質はユビキチン化を経ずにプロテアソームにより分解される。そこで、ユビキチン化依存的な基質と、ユビキチン化非依存的な基質の分解が CGK733 により促進されるかどうかを調べることにより、CGK733 がユビキチン化を促進しているかどうかを調べることができる。

また、MG132 で細胞を処理し、その際のユビキチン化タンパク質をウェスタンブロッティングで検出することによっても、CGK733 が基質のユビキチン化を促進しているかどうかを知ることができる。

CGK733 が活性型プロテアソームの量を増加させる可能性の検討

プロテアソームは 19S の制御サブユニットと 20S の触媒サブユニットが会合し 26S の活性型となる。そこで、19S や 20S の構成因子の量をウェスタンブロッティングにより測定し、プロテアソームが増加するかどうかを確かめる。また、精製した 26S プロテアソームの活性を測定することにより、26S プロテアソームの活性化が起きているかどうかを確かめる。さらに、CGK733 で処理した細胞の抽出液を Native-PAGE で解析することにより 26S の会合が促進されているかどうかを確かめる。

4. 研究成果

(1) CGK733 の細胞内標的分子の同定

構造活性相関研究の結果、複数の活性に必要な官能機を特定できた。今後は、それ以外の部位にビオチン化することで活性が維持されるかどうかを確認する。

(2) CGK733 が UPS を活性化する分子機構の解明

CGK733 が基質のユビキチン化を亢進している可能性の検討

ユビキチン化依存的にプロテアソームにより分解されるレポータータンパク質である R-eKK-GFP-Su9 と、ユビキチン化非依存的に分解される UbL-GFP-Su9 を細胞内で発現させ、CGK733 処理したところ、CGK733 処理によりいずれのレポータータンパク質の分解も促進された。また、MG132 処理し、プロテアソームによる基質分解を阻害した細胞をさらに CGK733 処理してもユビキチン化されたタンパク質の総量に変化は見られなかった。これらのことから、CGK733 はユビキチン化を更新しているわけではないと考えられる。

CGK733 が活性型プロテアソームの量を増加させる可能性の検討

CGK733 処理した細胞中のプロテアソームの構成因子の量をウェスタンブロッティングで確認したところ、20S の構成因子である PSMA3 や PSMB1、また、19S の構成因子である PSMC2 のタンパク量に変化は見られなかった。以上のことから、プロテアソーム量自体が増加しているわけではないと考えられる。

また、精製した 26S プロテアソームを用いて *in vitro* で基質分解実験を行ったところ、CGK733 はプロテアソームの活性そのものには影響を与えないことが明らかとなった。

さらに、CGK733 処理した細胞の抽出液を用いて Native-PAGE 法で解析したところ、26S への会合が促進されているわけではなかった。

以上のことから、CGK733 はこれらの経路以外に作用することにより、UPS によるタンパク質分解を促進していると考えられる。今後は、さらなる実験を行うことにより、CGK733 がタンパク質分解を促進する詳細なメカニズムを明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗田桜子、甲斐田大輔
2. 発表標題 CGK733はユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を活性化する
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田桜子、伊野部智由、東田千尋、石神健、甲斐田大輔
2. 発表標題 CGK733がユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を促進する機構の解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 甲斐田大輔、栗田桜子、伊野部智由、石神健、東田千尋
2. 発表標題 低分子化合物CGK733はユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を促進することによりアルツハイマー病の症状を改善する
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 甲斐田大輔、栗田桜子、伊野部智由、石神健、東田千尋
2. 発表標題 低分子化合物CGK733はユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を促進することによりアルツハイマー病の症状を改善する
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第40回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ユビキチン - プロテアソーム系の活性化剤、およびその利用	発明者 甲斐田大輔、東田千尋、伊野部智由	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-114185	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	東田 千尋 (Tohda Chihiro) (10272931)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	
研究分担者	伊野部 智由 (Inobe Tomonao) (50568855)	富山大学・学術研究部工学系・准教授 (13201)	
研究分担者	石神 健 (Ishigami Ken) (70292787)	東京農業大学・生命科学部・教授 (32658)	

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
---------	---------