

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659172

研究課題名（和文） 凝集阻害ペプチド QBP1 の化合物アナログデザインによるポリグルタミン病治療薬創薬

研究課題名（英文） Development of a drug for the polyglutamine diseases by molecular design of chemical analogues of the aggregation inhibitor peptide QBP1

研究代表者

永井 義隆 (NAGAI YOSHITAKA)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号：60335354

研究成果の概要（和文）：

神経変性疾患ポリグルタミン（PolyQ）病に対して、凝集阻害ペプチド QBP1 の化合物アナログの分子デザインによる治療薬創薬を目指して、1) QBP1 の最小活性配列（WKWWPGIF）を同定し、W3、W5、W6、I9、F10 の 5 アミノ酸が PolyQ 凝集阻害活性に必須であることを明らかにした。また、PolyQ 凝集阻害活性と PolyQ 鎖への結合親和性が相関することを見出した。2) NMR 解析の結果、QBP1-PolyQ 蛋白質複合体の PolyQ 鎖部分は均一な構造をとらないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Toward developing a drug for the polyglutamine (polyQ) neurodegenerative diseases by molecular design of chemical analogues of the aggregation inhibitor peptide QBP1, 1) we identified the minimal sequence of QBP1 (WKWWPGIF) and five essential residues within QBP1 for its activity. We also found a tight correlation between their aggregation inhibitory activity and polyQ binding affinity. 2) We further showed by NMR analyses that the polyQ stretch does not adopt an ordered structure in the QBP1-polyQ complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	0	700,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	600,000	3,300,000

研究分野：神経内科学、神経科学、分子生物学

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：神経変性疾患、ポリグルタミン病、蛋白質、凝集、アミロイド、治療薬、ペプチド、分子デザイン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン（PolyQ）病など多くの神経変性疾患において、蛋白質の構造異常（ミスフォールディング）・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが

考えられるようになった。このうち PolyQ 病は、様々な原因蛋白質内の PolyQ 鎖の異常伸長 (>40) により発症するハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症などの 9 つの難治性神経変性疾患の総称である。これらの疾患では、異常伸長 PolyQ 鎖を持つ変異蛋白質が  $\beta$  シ

一ト構造への異常構造変移を起し、その結果オリゴマー・凝集体を形成し神経細胞内に蓄積して、最終的に神経変性を引き起こすと考えられている。

申請者は、このカスケードの中で最も上流に位置する異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディングが治療標的として最適であると考えて、治療法開発を目指した研究を行ってきた。これまでの研究でランダムペプチドライブラリーからのフェージディスプレイスクリーニングにより異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 (SNWKWWPGIFD、US 特許 No. 6,632,616) を同定した (Nagai et al. *J Biol Chem*, 2000)。そして、QBP1 が異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性  $\beta$  シート構造変移を阻害してオリゴマー・凝集体形成を阻害し (Nagai et al. *Nature Struct Mol Biol*, 2007、Takahashi et al. *J Biol Chem*, 2007、Takahashi et al. *Hum Mol Genet*, 2008)、QBP1 の遺伝子発現により PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性が抑制されることを明らかにした (Nagai et al. *Hum Mol Genet*, 2003)。さらに細胞膜透過性シグナルを付加した PTD-QBP1 を体外から経口投与することにより、PolyQ 病モデルショウジョウバエへの治療効果を明らかにし、QBP1 自身の治療分子としての可能性を見出した (Popiel et al. *Mol Ther*, 2007)。しかし PolyQ 病モデルマウスに対しては、PTD-QBP1 の血液脳関門 (BBB) 透過性が低く、腹腔内投与ではわずかな治療効果が得られたのみであった (Popiel et al. *Neurosci Lett*, 2009)。

## 2. 研究の目的

QBP1 の BBB 透過性・脳内浸透性を改善するために、アラニン・スキャン、ペプチドミメティクス技術、NMR を用いた構造解析などを駆使して QBP1 配列の低分子化・非ペプチド化を行い、QBP1 の活性を保持し、かつ生体内・脳内への移行性が高い新規ドラッグライク化合物アナログの分子デザインを行い、PolyQ 病治療薬の創薬を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) QBP1 配列 (SNWKWWPGIFD) 中の活性必須アミノ酸配列の同定

QBP1 配列内各アミノ酸残基のアラニン置換体、D アミノ酸置換体、欠失変異体など様々な変異体を系統的に作成し、*in vitro* での Thio-PolyQ 凝集濁度アッセイを用いて、これらの変異体の PolyQ 凝集阻害活性の網羅的な解析を行った。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析により、各 QBP1 変異体の PolyQ 鎖に対する結合親和性を評価した。

### (2) NMR を用いた QBP1-PolyQ 鎖複合体の構造解析

QBP1-PolyQ 鎖の結合に寄与するアミノ酸残基とその立体配位、QBP1 の立体構造を明

らかにするために、NMR を用いて QBP1-Thio-PolyQ 蛋白質複合体の構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) QBP1 配列 (SNWKWWPGIFD) 中の活性必須アミノ酸配列の同定

様々な QBP1 の変異体の PolyQ 凝集阻害活性について、*in vitro* での Thio-PolyQ 凝集濁度アッセイを用いて検討したところ、QBP1 配列 (SNWKWWPGIFD) 中 N 末端の SN、および C 末端の D は PolyQ 凝集阻害活性に明らかな影響を与えず、WKWWPGIF の 8 アミノ酸が最小活性配列であることを明らかにした。また、この最小活性配列中のうち、W3、W5、W6、I9、F10 の 5 アミノ酸が PolyQ 凝集阻害活性に必須であることを明らかにした。

一方、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析の結果、QBP1 変異体の PolyQ 鎖に対する結合親和性と PolyQ 凝集阻害活性とが関連することを見出した。

### (2) NMR を用いた QBP1-PolyQ 鎖複合体の構造解析

$^{15}\text{N}$  標識した Thio-Q62 (20  $\mu\text{M}$ ) に過剰量の高濃度 QBP1 (100  $\mu\text{M}$ ) を添加して、QBP1-Thio-PolyQ 蛋白質複合体の NMR 構造解析を行ったところ、1 週間程度は Thio-Q62 は凝集せずに可溶性を保持でき、安定で良好な NMR スペクトルを得ることに成功した。NMR 解析の結果、Thio-PolyQ の PolyQ 鎖部分は主鎖由来のシグナルがほとんど得られず、均一な構造をとらないか微細な凝集体を形成していると考えられた。Thioredoxin 部分は本来の立体構造を保ったままであることが明らかになった。

以上の結果から、QBP1 のドラッグ-ライク化合物アナログの分子デザインに必須の構造活性相関が明らかになり、PolyQ 病治療薬の創薬につながることを期待される。

## 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 10 件)

(以下、1-5 は査読有、6-10 は査読無)

1. Popiel HA, Burke JR, Strittmatter WJ, Oishi S, Fujii N, Toda T, Wada K, \*Nagai Y. The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases. *J Amino Acids* 2011: 265084 (2011) (DOI: 10.4061/2011/265084)
2. Konya C, Hatanaka Y, Fujiwara Y, Uchida K, Nagai Y, Wada K, Kabuta T. Parkinson's disease-associated mutations in  $\alpha$ -synuclein

- and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. *Neurochem Int* 59 (2): 251-258 (2011) (DOI: 10.1016/j.neuint.2011.05.012)
3. Sun H, Satake W, Zhang C, Nagai Y, Tian Y, Fu S, Yu J, Qian Y, Qian Y, Chu J, Toda T. Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* 56 (4): 330-334 (2011) (DOI: 10.1038/jhg.2011.14)
  4. Mizuno H, Fujikake N, Wada K, \*Nagai Y.  $\alpha$ -Synuclein transgenic *Drosophila* as a model of Parkinson's Disease and related synucleinopathies. *Parkinsons Dis* 2011: 212706 (2011) (DOI:10.4061/2011/212706)
  5. Rahman MS, Nagai Y, Popiel HA, Fujikake N, Okamoto Y, Ahmed MU, Islam MA, Islam MT, Ahmed S, Rahman KM, Uddin MJ, Dey SK, Ahmed Q, Hossain MA, Jahan N, Toda T. Genetic Testing for Huntington's Disease in Parkinsonism. *Mymensingh Med J* 19 (4): 510-514 (2010) (<http://www.banglajol.info/index.php/MMJ/article/view/6708>)
  6. 藤掛伸宏、長野清一、永井義隆. ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル. *神経内科* 76 (3): 266-274 (2012) (<http://www.kahyo.com/item/S201203-763>)
  7. 永井義隆、藤掛伸宏. ショウジョウバエモデルから解明されたTDP-43プロテインパチーの分子病態. *Dementia Japan* 25 (2): 129-136 (2011) (<http://www.sasappa.co.jp/online/abstract/jsdr/1/25/html/101250206.html>)
  8. 永井義隆、貫名信行. QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解. *臨床神経学* 51 (11): 1108-1110 (2011) ([http://www.neurology-jp.org/Journal/index\\_j.html](http://www.neurology-jp.org/Journal/index_j.html))
  9. 永井義隆. TDP-43 プロテインパチーの動物モデル. *最新医学* 65 (7): 1603-1613 (2010) (<http://www.saishin-igaku.co.jp/backnum/2010/y6507.html>)
  10. 永井義隆. 脊髄小脳変性症. *ドクターサロン* 54 (10): 729-732 (2010)
- [学会発表] (計 25 件)
1. Nagai Y, Takeuchi T, Popiel HA, Wada K. Molecular mechanism of novel unconventional secretion of Hsp40 to function extracellularly. 6th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (Garga, Italy, June 5-10, 2011)
  2. Popiel HA, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Muramatsu S, Toda T, Wada K, Nagai Y. Hsp40 exerts non-cell autonomous therapeutic effects on polyglutamine disease mice via its unconventional secretion. 6th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (Garga, Italy, June 5-10, 2011)
  3. Fujikake N, Saitoh Y, Yokoseki A, Onodera O, Wada K, Nagai Y. Expression of TDP-43 causes neurological phenotypes with an enhancement by FALS mutations in novel *Drosophila* models of ALS. 10th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (Barcelona, Spain, March 9-13, 2011)
  4. Fujikake N, Saitoh Y, Yokoseki A, Onodera O, Wada K, Nagai Y. Expression of FALS-linked TDP-43 mutants causes severe motor dysfunction in *Drosophila*. Niigata University BRI International Symposium on Current Understandings and Future Directions for ALS (Niigata, Japan, November 22-23, 2010)
  5. Popiel HA, Fujita H, Yamamoto K, Yamane H, Fujikake N, Muramatsu S, Wada K, Nagai Y. Molecular chaperone gene therapy ameliorates neurological phenotypes and protein aggregation in polyglutamine neurodegenerative disease mice. 3rd International Symposium on Protein Community (Nara, Japan, September 13-16, 2010)
  6. Fujikake N, Saitoh Y, Yokoseki A, Onodera O, Wada K, Nagai Y. Abnormal accumulation of TDP-43 proteins causes neurodegeneration in novel *Drosophila* models of ALS. 3rd International Symposium on Protein Community (Nara, Japan, September 13-16, 2010)
  7. 永井義隆. ショウジョウバエモデルを用いた神経変性疾患の病態治療研究～ALSモデルを中心に～ (招待講演). 神経疾患のモデル動物研究会 (H24.1.14-15、大阪)
  8. 永井義隆. 神経変性疾患の創薬に向けた動物モデル～筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病を中心に～ (招待講演). 技術情報協会セミナー「神経変性疾患に求められる薬剤プロファイルと試験デザイン」 (H23.10.27-28、東京)
  9. 永井義隆、貫名信行. QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解 (招待講演). 第 52 回日本神経学会学術大会 (H23.5.18-20、愛知)
  10. 永井義隆. 異常凝集病と病態 (招待講演). H23 年度大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質異常凝集の原理と制御」 (H23.4.27-28、大阪)
  11. 永井義隆. ショウジョウバエモデルを用

- いたTDP-43プロテインパチーの病態解析 (招待講演). 第 29 回日本認知症学会学術集会 (H22.11.5-7、愛知)
12. 永井義隆. 神経変性疾患の発症分子メカニズムに基づいた治療法開発 - 目的指向型研究の進め方 - (招待講演). 第 53 回日本神経化学会若手育成セミナー (H22.8.31-9.1、兵庫)
  13. 永井義隆. TDP-43 を発現する新規ALSモデルショウジョウバエを用いたALSの病態解析 (招待講演). H22 年度厚生省「筋萎縮性側索硬化症の画期的治療法研究班」ワークショップ (H22.6.18、東京)
  14. 武内敏秀、ポピエル明子、和田圭司、永井義隆. エクソソームを介したHsp40 の細胞外分泌. 第 6 回臨床ストレス応答学会 (H23.11.4-5、名古屋)
  15. 武内敏秀、ポピエル明子、和田圭司、永井義隆. HSP40 は新規の細胞外分泌機序によりポリグルタミン病モデルに対して細胞非自律的な治療効果を発揮する. 第 34 回日本神経科学会 (H23.9.14-17、横浜)
  16. 鈴木マリ、藤掛伸宏、和田圭司、永井義隆. 高栄養負荷は神経変性疾患モデルショウジョウバエにおける神経変性を増悪する. 第 34 回日本神経科学会 (H23.9.14-17、横浜)
  17. ポピエル明子、武内敏秀、藤田寛美、山本和弘、村松慎一、戸田達史、和田圭司、永井義隆. ポリグルタミン病モデルマウスに対する凝集阻害分子の遺伝子治療による効果. H23 年度「包括脳」夏のワークショップ (H23.8.21-23、兵庫)
  18. ポピエル明子、藤田寛美、山本和弘、武内敏秀、村松慎一、戸田達史、和田圭司、永井義隆. 凝集阻害分子の遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスに対する治療効果. 第 52 回日本神経学会学術大会 (H23.5.18-20、愛知)
  19. 藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、永井義隆. TDP-43 を発現するALSモデルショウジョウバエにおけるオートファジー系蛋白質分解の関与. 第 52 回日本神経学会学術大会 (H23.5.18-20、愛知)
  20. 紺谷千穂、藤原悠紀、永井義隆、内田健康、和田圭司、株田智弘. 家族性パーキンソン病変異によるUCH-L1 の分泌減少. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同大会 (H22.12.7-10、神戸)
  21. 永井義隆、ポピエル明子、藤田寛美、山本和弘、藤掛伸宏、村松慎一、戸田達史、和田圭司. AAV5 を用いた分子シャペロンの遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスの封入体形成と神経症状の抑制効果. 第 5 回臨床ストレス応答学会 (H22.11.19-20、徳島)
  22. ポピエル明子、藤田寛美、山本和弘、藤掛伸宏、村松慎一、戸田達史、和田圭司、永井義隆. 凝集阻害分子を用いた遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスの神経症状と封入体形成の抑制. 第 33 回日本神経科学会・第 53 回日本神経化学会合同大会 (H22.9.2-4、兵庫)
  23. 藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、永井義隆. TDP-43 を発現する新規ALSモデルショウジョウバエの樹立とその病態解析. 第 33 回日本神経科学会・第 53 回日本神経化学会合同大会 (H22.9.2-4、兵庫)
  24. 藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、永井義隆. TDP-43 の過剰発現による新規ALSモデルショウジョウバエの樹立とその病態解析. H22 年度「包括脳」夏のワークショップ (H22.7.27-30、北海道)
  25. 永井義隆、藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司. TDP-43 を発現する新規ALSモデルショウジョウバエを用いた病態解析. 第 51 回日本神経学会 (H22.5.20-22、東京)
- 〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 義隆 (NAGAI YOSHITAKA)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・室長  
研究者番号：60335354

### (2) 研究分担者

鈴木 マリ (SUZUKI MARI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・外来研究員  
研究者番号：20455405