

ユビキチン-プロテアソーム活性化剤を用いた新規認知症治療法の開発

甲斐田大輔

富山大学学術研究部医学系 遺伝子発現制御学講座

【研究の背景】

ユビキチン-プロテアソーム系(UPS)は、細胞内の異常タンパク質などを分解する機構である。UPS の活性は加齢とともに低下し、その結果、細胞内に異常タンパク質が蓄積し、アルツハイマー病をはじめとした老化関連疾患を引き起こす。したがって、UPS を活性化させる化合物は、老化関連疾患の治療薬となる可能性を秘めている。我々の先行研究から、化合物 A が UPS によるタンパク質分解を活性化することが明らかとなった。さらに、化合物 A はアミロイド β 処理により萎縮した神経細胞を回復させる効果があることや、アルツハイマー病モデルマウスの認知記憶能力を改善させることも明らかとなった。しかしながら、化合物 A が UPS によるタンパク質分解を促進する分子機構や、萎縮した神経細胞を回復させる分子機構は明らかとなっていない。

【目 的】

本研究では、化合物 A が UPS を活性化するメカニズムを明らかにし、その知見をもとに新規アルツハイマー病治療薬の開発に貢献することを目的とする。

【方 法】

培養細胞を化合物 A で処理することにより、UPS で分解されることが知られている内在性のタンパク質の分解速度を測定する。また、それらのタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、発現プラスミドを作成し、外来性のタンパク質でも同様の効果があるかどうかを確かめる。さらに、それらのタンパク質のユビキチン化に関わる部位に変異を導入し、化合物 A が変異タンパク質の分解速度に影響を与えるかどうかを確かめる。これらの実験から、化合物 A が UPS によるタンパク質分解を促進する詳細な分子機構を明らかにすることができる。

【結 果】

培養細胞を化合物 A で処理し、内在性のサイクリン A タンパク質やサイクリン B タンパク質の量の変化をウェスタンブロッティングにより解析した。化合物 A 処理により、顕著にタンパク量が減少し、その減少パターンは翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドとは異なっていたことから、化合物 A の効果はタンパク質合成の阻害ではなく、UPS によるタンパク質分解の促進であることが強く裏付けられた。さらに、サイクリン A 遺伝子やサイクリン B 遺伝子を発現させるプラスミドを培養細胞に導入したのち、化合物 A で処理したところ、外来性のサイクリン A タンパク質やサイクリン B タンパク質の量も減少することが明らかとなった。そこで、サイクリン A タンパク質やサイクリン B タンパク質におけるユビキチン化に関する部位を GFP タンパク質に結合した融合タンパク質をコードする遺伝子を作成した。今後、化合物 A がこの融合タンパク質の分解に影響を及ぼすかどうかを解析する予定である。

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を分解するのみならず、ユビキチン化されていないタンパク質も分解することができる。そこで、ユビキチン化依存的にプロテアソームにより分解を受ける R-eKK-GFP タンパク質と、ユビキチン化非

依存的に分解を受ける Ubl-GFP タンパク質の分解に化合物 A が与える影響を観察した。化合物 A は R-eKK-GFP タンパク質の分解を促進させたものの、Ubl-GFP タンパク質の分解は促進させなかった。これらのことから、化合物 A は 26S プロテアソームによるユビキチン化依存的なタンパク質分解を促進していることが明らかとなった。

【考 察】

今回の結果から、化合物 A は 26S プロテアソームによるユビキチン化依存的なタンパク質分解を促進していることが明らかとなった。考えられるメカニズムとしては、ユビキチン化の亢進や脱ユビキチン化の阻害、もしくは 26S プロテアソームの会合の促進などが考えられる。いずれにせよ、機能を失うなどした不必要なタンパク質を分解することを促進していると考えられ、必要なタンパク質を分解することによる細胞機能の異常は起きづらいと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

我々の先行研究から、化合物 A 投与マウスの運動量や体重などに変化は観察されなかった。今回の研究から、必要なタンパク分解は見られなかったため、マウスレベルでの副作用が観察されなかったことが、分子生物学的実験でも裏付けられたと考えられる。今後は、マウスを用いた実験をさらに行うことにより、新規アルツハイマー病治療薬の開発に近づくことができると考えている。