

記憶障害の革新的治療法の確立を目指した特異的ユビキチン化の阻害剤の開発

川辺浩志

国立大学法人 群馬大学大学院医学系研究科 薬理学分野

【研究の背景】

認知症は大きく4つに分類できる。アルツハイマー型認知症、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症のいずれの場合も脳高次機能の中でも特に記憶能力が顕著に低下している。認知症の中ではアルツハイマー型認知症が約60%を占めて最も多い。この認知症にはアミロイドβの集合体であるオリゴマーや、繊維、またはアミロイド班がシナプスの機能低下や神経細胞死を引き起こすと考えられている。マウスやラットを使った実験ではアミロイドβのオリゴマーがシナプスレベルでの記憶と考えられている長期増強を抑制すると報告されている。他の型の認知症でも、シナプスレベルで記憶能力が障害されている可能性が考えられている。

申請者は、タンパク質分解に関与するユビキチン化に注目してE3ユビキチンリガーゼをコードするNedd4ファミリー遺伝子が神経細胞発達とシナプス伝達に重要であることを報告してきた(川辺ら, *Neuron*, 2010; Hsia, 川辺ら, *PNAS*, 2014; Ambrozkiwicz, 川辺ら, *Neuron*, 2018; Ambrozkiwicz, 川辺ら, *Mol Psychiatry*, 2020)。一連の研究を通じて得られた神経科学研究の豊富な実績と経験をもとに本研究を立案した。

【目的】

認知症の根治療法の開発が進んでいないため、記憶障害に対する対症療法の開発が重要になっている。記憶は神経細胞の中でもシナプスで制御されている。申請者は、シナプスの形成と機能の制御機構の中でも、ユビキチン化による制御機構の研究に関して多くの成果をあげてきた。ユビキチン化の基質特異性を決定するE3リガーゼであるNedd4ファミリーのE3リガーゼが記憶能力を抑制していることを発見した。本研究ではこの結果を踏まえ、このNedd4ファミリーE3リガーゼによる特異的ユビキチン化の阻害剤を見出して記憶能力を改善する手法を開発することを目的とした。

【方法】

申請者は、Nedd4ファミリーE3リガーゼのいくつかはシナプス後部のスパインに濃縮していることを超解像STED顕微鏡で見出した。Nedd4ファミリーの一つの遺伝子(特許申請準備中のためNedd4Xと記載する)の神経細胞特異的欠損マウス(*Nedd4X^{fllox/fllox};NexCre*)では、シナプス伝達の長期増強が増加し、行動学的実験で空間学習能力が亢進していた。長期増強の増加に関与しているNedd4Xの基質として、シナプス後部のタンパク質を同定した(特許申請準備中のためPSD-Yと記載する)。PSD-Yタンパク質の発現量が*Nedd4X^{fllox/fllox};NexCre*で増加していることを見出した。これらの結果から、シナプス後部のスパインでPSD-YをNedd4Xがユビキチン化して分解に導くことが、長期増強と空間学習能力の抑制につながると考えられた。そこでPSD-YとNedd4Xの結合、または、PSD-YのNedd4Xによるユビキチン化を阻害する低分子・タンパク質を同定することを目的に研究を進めた。その目的で2つの方法を計画した。まず、理化学研究所の天然化合物バンク(NPDepo)の低分子ライブラリーからPSD-Yのユビキチン化を阻害する低分子をスクリーニングすることを計画した。2つ目の計画として、PSD-YのNedd4X結合領域を認識するリコンビナント抗体であるナノボディーを阻害抗体として作成することを計画した。

【結 果】

本研究では 96 well plate に PSD-Y のリコンビナント精製タンパク質を吸着させることを試みた。PSD-Y タンパク質に関して立体構造や結合タンパク質について多くが発表されておらず、その性状は不明な点が多い。そのため、全長のタンパク質を基質として使うべきであると判断してこのリコンビナントタンパク質の精製を試みた。しかしながら、大腸菌にこのタンパク質を発現させたところ、ほとんど可溶化されなかった。数アミノ酸を欠損したタンパク質の発現を試みたが、このタンパク質も可溶化されなかった。一方で、生化学的実験と並行して、*Nedd4X^{flox/flox};NexCre* マウスの電気生理学的解析を進めた。海馬の切片をマウスから作成してシナプス前部神経細胞からの軸索束である Shaffer 側枝を刺激してこの神経細胞の出力先である海馬 CA1 領域から局所フィールド電位を測定した。シナプスレベルでの可塑性である長期増強の一種である L-LTP の亢進が認められたことはすでに結果が出ていた。PSD-Y が *Nedd4X* に特異的にユビキチン化されることと *Nedd4X^{flox/flox};NexCre* で PSD-Y タンパク質の発現量が増加していることから、*Nedd4X^{flox/flox};NexCre* に認められた電気生理学的表現型は PSD-Y の発現量増加が原因であるとの仮説を立てた。この仮説を検証するために私どもは *Nedd4X^{flox/flox};NexCre* マウスに *PSD-Y^{flox/flox}* マウスを交配して *Nedd4X^{flox/flox}; PSD-Y^{flox/+};NexCre* マウスを確立した。このマウスでは PSD-Y タンパク質の発現量がコントロールマウスのレベルまで回復していた。このマウスを電気生理学的に解析したところ、L-LTP の亢進はコントロールマウスのレベルまで回復した。この結果から、PSD-Y タンパク質発現量が増加することが *Nedd4X^{flox/flox};NexCre* マウスでの L-LTP 亢進につながると結論した。

【考 察】

本申請研究の結果から特異的ユビキチン化がシナプスレベルでの記憶である長期増強を抑制していると結論できた。引き続き行動学的実験で *Nedd4X^{flox/flox}; PSD-Y^{flox/+};NexCre* マウスを解析することで、*Nedd4X^{flox/flox};NexCre* に認められた記憶亢進の表現型が回復するかを検討する。

大腸菌から PSD-Y のリコンビナントタンパク質を精製できなかったため、行動学的実験と並行して無細胞タンパク質合成系や昆虫細胞を使って基質である PSD-Y の精製を試みる。このリコンビナントタンパク質を使って PSD-Y の *Nedd4X* によるユビキチン化の阻害剤をスクリーニングすることで、記憶能力改善薬剤候補物質の同定を行う。この薬剤を海馬スライスに投与して長期増強が亢進するか、野生型マウスに投与することで空間記憶が改善するかと検討することで、認知症に対する創薬研究へと発展させる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では、*Nedd4X* の欠損によりシナプスと行動のレベルでの記憶能力が改善することを明らかにした。さらにその分子機構として PSD-Y タンパク質の発現量上昇が原因になることも明らかにした。このように記憶能力が改善する遺伝子欠損マウスは非常に稀で、記憶能力改善の分子機構を明らかにした例はさらに少ない。高齢化とともに認知症患者の数は年々増加している中、本研究が発展することで新しい認知症治療薬の開発へつながる可能性が期待できる。

【参考・引用文献】

1. Ambrozkiwicz MC*, Borisova E, Schwark M, Ripamonti S, Schaub T, Smorodchenko A, Weber AI, Rhee HJ, Altas B, Yilmaz R, Mueller S, Piepkorn L, Horan ST, Straussberg R, Zaqout S, Jahn O, Dere E, Rosário M, Boehm-Sturm P, Borck G, Willig KI, Rhee J, Tarabykin V, **Kawabe H***: The murine ortholog of Kaufman oculocerebrofacial syndrome protein Ube3b regulates synapse number by ubiquitinating Ppp3cc. *Molecular Psychiatry*, 26: 1980-1995 (2021)
*=Corresponding authors
2. Ambrozkiwicz MC*, Schwark M, Kishimoto-Suga M, Borisova E, Hori K, Salazar-Lázaro A, Rusanova A, Altas B,

- Piepkorn L, Bessa P, Schaub T, Zhang, X, Rabe T, Ripamonti S, Rosário S, Akiyama H, Jahn O, Kobayashi T, Hoshino M, Tarabykin V, **Kawabe H***: Polarity acquisition in cortical neurons is driven by synergistic action of Sox9-regulated Wwp1 and Wwp2 E3 ubiquitin ligases and intronic miR-140. *Neuron*, 100: 1097–1115 (2018) *=Corresponding authors
3. Hsia HE, Kumar R, Luca R, Takeda M, Curchet J, Nakashima J, Wu S, Goebbels S, An W, Eickholt B, Polleux F, Rotin D, Wu H, Rossner M, Bagni C, Rhee JS, Brose N, **Kawabe H***: The Ubiquitin E3 Ligase Nedd4-1 Acts as a Downstream Target of PI3K/PTEN-mTORC1 Signaling to Promote Neurite Growth. *PNAS*, 111: 13205–13210 (2014) *=Corresponding author
4. **Kawabe H***, Neeb A, Dimova K, Young SM Jr, Takeda M, Katsurabayashi S, Mitkovski M, Malakhova OA, Zhang DE, Umikawa M, Kariya K, Goebbels S, Nave KA, Rosenmund C, Jahn O, Rhee JS, Brose N*: Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Neuron*, 65: 358–372 (2010) *=Corresponding authors