

75. 神経変性に対する逆行輸送の制御を標的にした創薬研究

位田 雅俊

岐阜薬科大学 薬物治療学研究室

Key words : VPS35, レトロマー, *In silico* スクリーニング

緒言

近年のパーキンソン病 (PD) のゲノム研究は目覚ましい。2011 年、家族性 PD 患者より vacuolar protein sorting-associated protein 35 (VPS35) が PD 原因遺伝子 (PARK17) として同定された [1]。後に VPS35 変異は、家族性のみでなく、孤発性 PD 患者からも報告された。VPS35 は、逆行性輸送を制御するレトロマーと呼ばれるタンパク質複合体の 1 つである。このレトロマーは VPS35、VPS29、VPS26 で構成され、特に VPS35-VPS29 の相互作用が重要である。逆行性輸送経路は、細胞膜またはエンドソームを出発点としてゴルジ体へ、さらに一部の分子については小胞体へと運ばれる輸送システムで、オルガネラの恒常性やタンパク質の恒常性 (プロテオタキシス) の維持や制御を担っている。

未だ VPS35 機能異常と PD 発症との因果関係を示す有力な説は少ないが、divalent metal transporter 1 (DMT1) のミスソーティングという報告がある [2]。DMT1 は、鉄の活性本体である Fe^{2+} の細胞内取込みや、エンドソーム内の Fe^{2+} をオルガネラへ輸送する際に重要な役割を担っている。従って、VPS35 機能異常による逆行性輸送の破綻、すなわち DMT1 のミスソーティングがおり、細胞内 Fe^{2+} 動態が攪乱することでオルガネラやプロテオタキシスが破綻し、細胞死につながるということ仮説を筆者はたてた。また、古くから PD では鉄代謝異常に伴う細胞内の鉄の過剰蓄積が黒質変性に関連することや、PD 患者の中脳黒質では DMT1 の発現増加や、DMT1 変異が PD の発症リスクを上昇させることなどが報告されている [3] ことは、仮説を補強する 1 つの根拠となる。

これまでに筆者は、特異的な Fe^{2+} 蛍光プローブやヘムに特異的な蛍光プローブの開発に参画し、鉄恒常性・動態を可視化できる最先端のツールを用いて病態における細胞内 Fe^{2+} 動態が攪乱を検討している [4, 5]。VPS35 変異の病態では、DMT1 の機能障害がおり、その結果、ミトコンドリア、リソソーム、ゴルジ体において、それぞれの細胞小器官ごとで異なる Fe^{2+} 動態の乱れが生じ、機能障害が起こることを明らかにした。さらに、VPS35-VPS29 のタンパク質-タンパク質相互作用を安定化する既知化合物である R55 を処置したところ、VPS35-VPS29 結合が安定化することで Fe^{2+} 動態の乱れを正常化し病態を改善させた。以上は、VPS35-VPS29 結合の安定化が逆行性輸送経路を標的とした新たな創薬の可能性を示した [4]。

現状、VPS35-VPS29 を標的にしたタンパク質-タンパク質相互作用の安定化に関わる低分子化合物 (VPS35-VPS29 制御化合物) は R55 を含むたった数種しかなく、神経変性疾患においては全く実用化されていない。新たな低分子化合物が真の創薬シーズになるためには、いかに病態に基づく標的候補と特異的に相互作用をするか、その標的候補に対してのスクリーニングを短時間、低コストで実施するかなどにその成否が関わってくる。筆者は、生物学的解析に計算科学と物理化学を融合させた次世代型創薬サイクルを活用し、新たな VPS35-VPS29 制御化合物を創出することを目的とした。まず、Structure Based Drug Design (SBDD) を利用して、理化学研究所で構築されている一億以上の市販化合物ライブラリから *in silico* スクリーニングを実施した。レトロマーの予測結合ポケットをもとに、*in silico* スクリーニングを実施し、結合スコアの高い候補化合物を得た。その中から、 α -synuclein による細胞死を有意に抑制する化合物②を得た。さらに化合物②は過剰発現させた α -Synuclein

を有意に減少させ、さらに VPS35 を有意に増加させた。これらの結果は、レトロマーを標的にした新たな神経変性疾患の治療薬開発に繋がっていくことが期待される。

方法

1. *In silico* スクリーニング

協力研究者の高谷大輔博士（大阪大学・理研）によって Structure Based Drug Design (SBDD) を実施した。理化学研究所で構築されている一億以上の市販化合物ライブラリから VPS35-VPS29 の予測結合ポケットをもとに、*in silico* スクリーニングを実施した。

2. α -Synuclein タンパク質の蓄積モデル細胞と薬物処置

マウス神経芽細胞腫 N2a 細胞に Cumate 誘導型の PiggyBac Transposon Vector System を用いて野生型 α -synuclein (WT) および変異型 α -synuclein (A53T) の遺伝子配列を組み込んだベクターをそれぞれ導入した[6]。ピューロマイシンを用いて導入細胞をセクションした。Cumate 処置と同時に候補化合物を種々の濃度で処置をした。細胞生存率は Cumate 誘導した 72 時間後に、Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

3. 生化学的解析

薬物処置して 48 時間後にタンパク質抽出を行った。タンパク質の回収には、lysis buffer で溶解し遠心後、上清を soluble 分画としてウエスタンブロット法を実施した。一次抗体には、mouse monoclonal antibody against β -actin (1 : 5,000)、rabbit monoclonal anti-alpha-synuclein antibody (1 : 1,000)、rabbit monoclonal anti-VPS35 antibody (1 : 500) を用いた。二次抗体には HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1 : 5,000) および HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1 : 2,000) を用いた。タンパク質の発現強度は、Image J を用いて解析した。

4. 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差で示した。統計学的な比較は、群間解析については分散分析以後、Bonferroni/Dunn test により行った。危険率が 5%未満を有意差ありとした。

結果および考察

1. *In silico* スクリーニング

VPS35-VPS29 の予測結合ポケットをもとに、*in silico* スクリーニングを実施した。その結果、結合スコアの高い化合物リストのリストを作成することができた。この中から結合スコアの上位でかつ、購入可能な化合物 5 つを入手して、 α -synuclein 誘発の細胞死に関して検討を行った。

2. 候補化合物の α -synuclein 誘発の細胞死に対する保護作用

これまで筆者は、cumate 誘導性の α -synuclein 発現細胞を構築し、野生型および変異型 α -synuclein 毒性機序を検討している [6]。そこで、 α -synuclein 発現細胞における候補化合物の効果を検討した。候補化合物 5 つのうち、2 つは野生型 α -synuclein 毒性に対して保護効果を示した (図 1)。また、変異型 α -synuclein 毒性に対しても、候補化合物 3 つは保護効果を示した (図 1)。これらの保護効果のあった候補化合物のうち、化合物②に注目した。化合物②は、野生型および野生型 α -synuclein 毒性に対して最も効果のあった候補化合物と考えられる。 α -Synuclein 毒性機序に関しては、そのタンパク量が重要である。そこで、cumate で誘導した野生型 α -synuclein のタンパク質量を検討したところ、化合物②を処置すると野生型 α -synuclein が有意に減少した

(図 1)。この保護効果に VPS35 が関与するかを検討するために、VPS35 のタンパク質量を検討した。その結果、化合物②を処置すると cumate で誘導した野生型 α -synuclein によって低下した VPS35 を有意に改善させた(図 2)。これらの結果は、化合物②は VPS35 に相互作用することで、逆行性輸送経路が活性化し、 α -synuclein のタンパク質量を減少させることで、神経保護の効果を発揮した可能性が考えられる。今後さらに詳細な検討を行うことで、レトロマーを標的にした新たな神経変性疾患の治療薬開発に繋がっていくことが期待される。

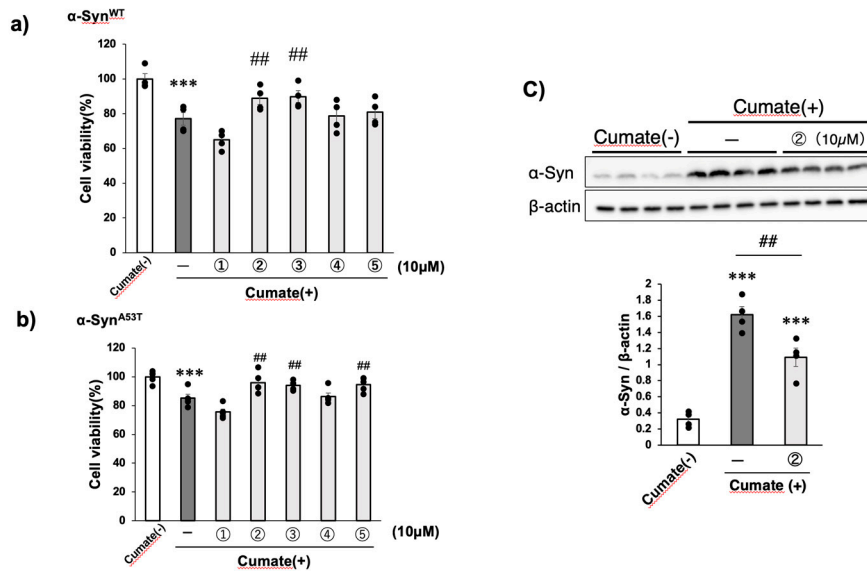


図 1. α -Synuclein 毒性に対する候補化合物の保護効果

野生型および変異型 α -synuclein 遺伝子を導入した N2a 細胞に、cumate 誘導と同時に候補化合物を処置した。

- a) 野生型 α -synuclein 毒性に対する候補化合物の細胞生存率。
- b) 変異型 α -synuclein 毒性に対する候補化合物の細胞生存率。
- c) 野生型 α -synuclein に対する化合物②の効果。

平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、多群間解析については分散分析以後、Bonferroni/Dunn test を行った。*** $p < 0.001$ vs cumate (-)、## $p < 0.01$ vs Cumate (+)。①~⑤は候補化合物。

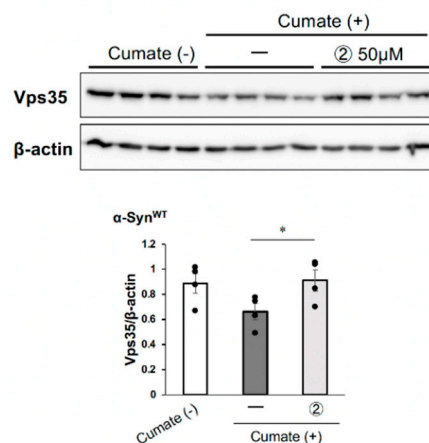


図 2. VPS35 に対する候補化合物②の効果

野生型 α -synuclein 遺伝子を導入した N2a 細胞に、cumate 誘導と同時に候補化合物②を処置した。平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、多群間解析については分散分析以後、Bonferroni/Dunn test を行った。* $p < 0.05$ vs Cumate (+)。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜薬科大学薬物治療学研究室の栗田尚佳博士、大内一輝博士である。また、本研究にご支援して頂きました公益財団法人上原記念生命科学財団の関係者の皆様に深く感謝いたします。

文献

- 1) Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, Behrouz B, Melrose HL, Hentati E, Puschmann A, Evans DM, Conibear E, Wasserman WW, Aasly JO, Burkhard PR, Djaldetti R, Ghika J, Hentati F, Krygowska-Wajs A, Lynch T, Melamed E, Rajput A, Rajput AH, Solida A, Wu RM, Uitti RJ, Wszolek ZK, Vingerhoets F, Farrer MJ. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2011 Jul 15;89(1):162-7. PMID: 21763482. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.06.001.
- 2) Tabuchi M, Yanatori I, Kawai Y, Kishi F. Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1. *J Cell Sci.* 2010 Mar 1;123:756-66. PMID: 20164305. DOI: 10.1242/jcs.060574.
- 3) He Q, Du T, Yu X, Xie A, Song N, Kang Q, Yu J, Tan L, Xie J, Jiang H. DMT1 polymorphism and risk of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2011 Sep 1;501(3):128-31. PMID: 21777657. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.07.001.
- 4) Hirayama T, Inden M, Tsuboi H, Niwa M, Uchida Y, Naka Y, Hozumi I, Nagasawa H. A Golgi-targeting fluorescent probe for labile Fe(ii) to reveal an abnormal cellular iron distribution induced by dysfunction of VPS35. *Chem Sci.* 2018 Nov 26;10(5):1514-1521. PMID: 30809369. DOI: 10.1039/c8sc04386h.
- 5) Kawai K, Hirayama T, Imai H, Murakami T, Inden M, Hozumi I, Nagasawa H. Molecular Imaging of Labile Heme in Living Cells Using a Small Molecule Fluorescent Probe. *J Am Chem Soc.* 2022 Mar 9;144(9):3793-3803. PMID: 35133144. DOI: 10.1021/jacs.1c08485.
- 6) Inden M, Takagi A, Kitai H, Ito T, Kurita H, Honda R, Kamatari YO, Nozaki S, Wen X, Hijioka M, Kitamura Y, Hozumi I. Kaempferol Has Potent Protective and Antifibrillogenic Effects for α -Synuclein Neurotoxicity In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 25;22(21):11484. PMID: 34768913. DOI: 10.3390/ijms222111484.