

オルガネラ局在操作による認知障害の新たな治療戦略

東邦大学 理学部 生物分子科学科

上田(石原) 奈津実

【研究の目的】

2050年には認知症患者数が国内だけでも1千万を超えると推計されるなど、神経変性疾患の治療法の開発は世界的に喫緊の課題である。既知の病態メカニズムに基づいて責任蛋白質を標的とする疾患修飾薬の開発が期待を集めているが、難航する例も多く、メカニズムが不明な病態や役割が不明な因子の探索研究は依然として重要である。

報告者は第4の細胞骨格である重合性ヌクレオチド結合タンパク質ファミリー(SEPT1-14)から成るセプチンの神経系における役割を探索してきた(Ageta-Ishihara et al., Nature Commun 2013, Nature Commun 2015, Neurochem Int 2018, Neurosci Res 2021)。セプチンはニューロンやグリアに高発現し、多様な精神・神経疾患との関連が示唆されている。①遺伝性神経痛性筋萎縮症における優性変異型SEPT9の関連(Kuhlenbäumer et al., Nature Genet 2005)、②統合失調症および双極性障害患者死後脳の背外側前頭前野におけるSEPT5/6/11の蓄積(Pennington et al., Mol Psychiatry 2008)、③パーキンソン病および類縁疾患におけるSEPT4の α -シヌクレインとの共凝集(Ihara et al., JBC 2003, Neuron 2007)、④前頭側頭葉変性症におけるSEPT3の蓄積(Gozal et al., Front Neurol 2011)、⑤アルツハイマー病における認知機能とSEPT3の関連(Tremblay et al., J Neuropathol Exp Neurol 2017)。しかし、いずれも病態との因果関係や寄与度は不明である。

報告者は認知機能に関与するセプチン・サブユニットを探索する目的で、長期記憶モデルとして局所的電気刺激でシナプス伝達の後期長期増強(L-LTP)をテタヌス刺激で誘発したラット海馬におけるSEPT1-14の免疫反応性をスクリーニングし、脳特異的かつニューロン選択的に発現する特定のセプチン・サブユニットがリモデリングすることを見出した。この生理的意義を探索するため、行動/回路/細胞/分子レベルで解析を行い、①特定のセプチンサブユニット遺伝子欠損マウスの文脈記憶パラダイムで長期記憶が減弱していること、②その責任領域である海馬歯状回顆粒細胞への入力シナプスでは樹状突起棘(スパイン)の滑面小胞体(ER: Ca^{2+} の貯蔵や放出を担うオルガネラ)含有率が低いこと、③培養系において顆粒細胞へのL-LTP誘発直後にスパインが拡大し、遅れて樹状突起基幹部のERがスパイン内に伸展すること、④スパインへのER伸展には特定の分子と特定のセプチンサブユニットのシナプス活動依存的会合が必要であること、⑤特定のセプチンサブユニット欠乏ニューロンではL-LTP誘発直後の自発発火亢進は正常であるが、短時間で減弱することなどを見出した。これらの知見から、シナプス活動依存的にスパイン内に伸展したERからの Ca^{2+} 放出がシナプス伝達効率を持続的に亢進させることで、記憶の長期化に寄与するというメカニズムが想定される(Ageta-Ishihara et al., 投稿中)。

そこで本研究では、これら未発表データ「刺激依存的な滑面小胞体(ER)の移動が記憶維持の基盤」という概念を活用した新たな創薬戦略を提案することを目的とする。具体的には、chemically induced dimerization(CID: 化学的タンパク質二量体化法)によりER局在を操作する技術を構築し、短期記憶を長期記憶に転換させることを狙う。既存の認知症治療薬は個々の分子を標的とした薬剤開発が中心であり、オルガネラの局在変化に着目した開発は皆無であるため、本研究成果で得られる技術や化合物が創薬に繋がり、パラダイムシフトを起こす可能性

を包含している。

【方法】

ERをスパイン内に引き入れる候補分子に対して、N末とC末に対して相互作用蛋白質ペアのモデルとして、FKBP (FK506-binding protein) とFRB (FKBP-rapamycin binding domain of FKBP12-rapamycin associated protein) を融合したプラスミドを作製した。COS-7細胞に導入し、ラパマイシンを添加し、蛍光顕微鏡により画像を取得した。

初代培養ニューロンにCIDプラスミドをリポフェクションで導入し、ER含有スパインの割合を算出した。具体的には、生後一日ラットから海馬歯状回を摘出し、トリプシン処理により細胞を分散し、細胞を播種した。培養開始から19-23日後に、rapalog(または対照EtOH)添加培地を作製し、半量置換により初代培養DGニューロンを終濃度100 nM のrapamycin analog(rapalog)で処理した。4%パラホルムアルデヒド(PFA)/PBSにより細胞を固定し、スライドガラスにマウントし、蛍光顕微鏡により画像を取得した。樹状突起は、細胞体から50 μ m以上400 μ m以下の距離にある1回以上分岐した樹状突起(2次樹状突起)を撮影対象とし、512 x 100 pixel(106.7 μ m x 20.72 μ m)の領域で撮影し、ERを含有するスパインの割合を算出した。さらに、形態マーカーの画像においてスパイン頭部にROI(Region of Interest)を設定し、ROI内の蛍光輝度の合計値を算出した。細胞間の蛍光輝度の差を正規化するため、樹状突起内にROIを設定し、スパインのROI内の合計蛍光輝度を樹状突起のROI内の平均蛍光輝度で割った値をスパイン体積として算出した。

【結果】

まずCID法の成立を確認するため、候補分子のN末とC末に対して相互作用蛋白質ペアのモデルとして、FKBP (FK506-binding protein) とFRB (FKBP-rapamycin binding domain of FKBP12-rapamycin associated protein) を融合したプラスミドを様々な組み合わせでCOS-7細胞に導入し、局在を観察したところ、rapalog処理により共局在している様子が観察できるプラスミドの組み合わせが決定した。候補として3種類の組み合わせを見出すことができた。

次に初代培養ニューロンで3種類の組み合わせでプラスミドを発現させた結果、CIDによる組み合わせ1はER含有率に影響しなかったが(60% vs. 63%, $p=0.72$)、組み合わせ2、組み合わせ3をrapalog処理で誘発するとER含有率が有意に高くなった(64 vs. 77%, $p=0.0023$, 62% vs. 74%, $p=0.034$)。さらにこれらプラスミドの発現によりスパイン形態異常が惹起されていないかを確認するため、スパイン体積を算出した結果、rapalog処理はスパイン体積指標に影響を与えなかった(組み合わせ1 rapalog(-)群 0.37 vs. rapalog(+)群 0.36, $p=0.79$, 組み合わせ2 rapalog(-)群 0.36 vs. 0.38, $p=0.66$, 組み合わせ3 rapalog(-)群 0.34 vs. rapalog(+)群 0.39, $p=0.49$)。これらの結果から、スパインへのER伸展を促進する技術構築に成功したと結論付けた。

【考察】

近年、CIDの一種であるPROTACを応用した新薬開発が注目されており、多くの特許出願と臨床試験が行われている(Whitworth & Ciulli, Nature 2020)。PROTACは、E3ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とを結びつけることで、標的タンパク質の分解を引き起こす。本研究提案はPROTAC同様、CIDを基軸とした創薬技術に繋がることから、基礎から臨床応用への道が迅速であることから、本研究により構築したCIDの組み合わせで記憶異常を示すマウスに導入し、回復効果を評価していくとともに、内在的にCIDを引き起こす化合物の合成を行い、将来的には創薬候補として提案することを目指す。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援をいただきました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に心より感謝申し上げます。

【発表論文】

- Terada Y, Obara K, Yoshioka Y, Ochiya T, Bito H, Tsuchida K, Ageta H[#], Ageta-Ishihara N[#](#共同責任著者).

Intracellular dynamics of ubiquitin-like 3 visualized using an inducible fluorescent timer expression system
Biology Open, 13:bio060345, 2024

- Ageta H[#], Nishioka T, Yamaguchi H, Tsuchida K[#], Ageta-Ishihara N[#](#共同責任著者).

Comprehensive identification of ubiquitin-like 3 (UBL3)-interacting proteins in the mouse brain
Molecular Brain, 7:57, 2024

- Wagatsuma N[#], Terada Y, Ageta-Ishihara N[#](#共同責任著者).

Activation of neurons in layers 2/3 of V1 by environmental enrichment and its cortical microcircuit
IEICE Technical Report, 123, 356, 1-5, 2024

- Ageta-Ishihara N^{*}(#共同筆頭著者, #共同責任著者), Takemoto-Kimura S^{*}, Kondo Y, Okamura M, Bito H[#].

Lipidation states orchestrate CLICK-III/CaMKI γ 's stepwise association with Golgi and rafts-enriched membranes and specify its functional coupling to STEF-Rac1-dependent neurite extension
Frontiers in Cellular Neuroscience, 17:1204302, 2023