

アミロイドオリゴマー形成を阻害する化合物の探索および 新規心不全治療法の開発

岩手医科大学 薬学部 薬剤治療学講座
三部 篤

1. はじめに

神経筋疾患の多くは、正常な立体構造を保てない変性タンパク質 (unfolded protein) の凝集が原因で発症することが知られている。しかしその細胞毒性機序は必ずしも明らかではなかった。近年、変性タンパク質の細胞毒性機序として可溶性中間体 (アミロイドオリゴマー) の存在が見いだされた。この発見により、変性タンパク質の凝集体そのものが毒性を示すのではなく、凝集過程で形成されるアミロイドオリゴマーが毒性を示し、その細胞毒性により病態が発症すると考えられている。アミロイドオリゴマーの概念は、神経筋疾患領域においては認識されているが、神経筋疾患以外の領域、特に心臓疾患領域でのこのアミロイドオリゴマーに関する研究はほとんど無い。申請者のグループは、神経筋疾患だけでなく、特発性心筋症 (デスミン心筋症) にもアミロイドオリゴマーが深く関わっていることを明らかにしてきている¹⁻⁶。その上、低分子ストレスタンパク質である HSPB8 および HSPB1 がアミロイドオリゴマー形成を阻害し、デスミン心筋症に有用であることを、*in vitro* および *in vivo* レベルで証明した^{3, 4}。また、低分子ストレスタンパク質の発現誘導剤として知られているグラニルグラニルアセトン (GGA) がデスミン心筋症治療に有効であることも明らかとした⁴。しかしながら、GGA の効果と HSPB8 の効果には相違点が多く認められ、GGA がストレスタンパク質の発現亢進によって心筋症に有効であるか否かは不明である。また、デスミン心筋症以外の心臓疾患において、アミロイドオリゴマーの形成を阻害することにより、病態が改善するか否かも明らかではなく、今後の検討課題である。

本申請研究では、強力なアミロイドオリゴマー形成阻害物質の探索を目指すため、グラニルグラニルアセトン (GGA) および GGA 誘導体を用い、低分子ストレスタンパク質の発現誘導作用およびアミロイドオリゴマー形成阻害作用をそれぞれ比較検討した。

2. 方法

アミロイドオリゴマー構造を形成する変性タンパク質として、点変異 α - β クリスタリン (CryAB) (120番目のアルギニンをグリシン、R120G) および凝集アミロイト β タンパク ($A\beta$ 1-42) を入れたリコンビナントタンパク質を pET ベクターおよび大腸菌株 (BL21) を用いて作製し、Ni-NTA カラムを用いて単離した。このリコンビナントタンパク質に GGA および GGA 誘導体を加え、37°C にて 24 時間インキュベート後、ニトロセルロース膜上にブロットした。そのブロットの抗アミロイドオリゴマー抗体反応性を定量し、比較検討した。

3. 結果

CryAB R120G および $A\beta$ 1-42 リコンビナントタンパク質は、用量依存的に抗アミロイドオリゴマー抗体に対して反応した。このリコンビナントタンパク質の抗アミロイドオリゴマー抗体反応性は GGA (0.1-10 nM) を加えることにより用量依存的に抑制された。すなわち、GGA は CryAB R120G、お

よび A β 1-42 タンパク質そのものに作用し、そのアミロイドオリゴマー形成を阻害することが示唆された。この抑制作用は、GGA のアセトン部分をカルボン酸およびアルコールに変えることによって低下した。また、イソプレノイド基を短くしてもその活性は低下した。

4. 考察

これらの知見は、GGA が 1) CryAB R120G、あるいは A β 1-42 に直接結合することにより抗アミロイド抗体反応性を低下させること、2) 抗アミロイド抗体反応を抑制する為には、イソプレノイド基の長さが有る程度必要、3) 化合物としては極性が低い必要があることを示唆した。今後、このアミロイド構造に結合する化合物が、変性タンパク質の細胞毒性に対して、有効で有るか否かを検討していく予定である。

5. 発表論文・参考文献

発表論文

Sanbe A. Molecular mechanisms of alpha-crystallinopathy and its therapeutic strategy. *Biol Pharm Bull.*34:1653-1658.

参考文献

1. Sanbe A, Osinska H, Saffitz JE, Glabe CG, Kaye R, Maloyan A, Robbins J. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2004;101:10132-10136.
2. Sanbe A, Osinska H, Villa C, Gulick J, Klevitsky R, Glabe CG, Kaye R, Robbins J. Reversal of amyloid-induced heart disease in desmin-related cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2005;102:13592-13597.
3. Sanbe A, Yamauchi J, Miyamoto Y, Fujiwara Y, Murabe M, Tanoue A. Interruption of CryAB-amyloid oligomer formation by HSP22. *J Biol Chem.*2007;282:555-563.
4. Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Endo T, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Glabe C, Tanoue A. Protective effect of geranylgeranylacetone via enhancement of HSPB8 induction in desmin-related cardiomyopathy. *PLoS ONE.*2009;4:e5351.
5. Sanbe A, Marunouchi T, Yamauchi J, Tanonaka K, Nishigori H, Tanoue A. Cardioprotective effect of nicorandil, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, prolongs survival in HSPB5 R120G transgenic mice. *PLoS One.*6:e18922.
6. Sanbe A. Molecular mechanisms of alpha-crystallinopathy and its therapeutic strategy. *Biol Pharm Bull.*34:1653-1658.