

<研究課題>

解糖系酵素のスプライシングファクターを標的とした新規アルツハイマー型認知症治療薬の開発

代表研究者 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座講師 今野雅允
共同研究者 名古屋大学大学院医学系研究科 特任准教授 小関準

【まとめ】

我々は解糖系関連酵素であるピルビン酸キナーゼ (PKM) ノックイン新規認知症モデルマウスの開発に成功し、認知症発症の新たなメカニズムを解明した。本研究では PKM のスプライシングファクターの阻害剤スクリーニングを行い、新規認知症治療薬の開発を目指すことを目的とした。約 500 万化合物を用いた *in silico* スクリーニングと細胞を用いたスクリーニングを行った結果、PKM1 陽性細胞が顕著に増加する 1 化合物の同定に成功した。

1. 研究の目的

我々は新規認知症モデルマウスの開発に成功し、認知症発症の新たなメカニズムを解明した。細胞の解糖系に関わる酵素ピルビン酸キナーゼ(PKM)は選択的スプライシングにより PKM1 型、PKM2 型を取ることが知られている。PKM1 型がメインの場合、細胞は好気性代謝を行い、グルコースは解糖系で代謝された後、TCA サイクル、電子伝達系へと流れる。一方で PKM2 型がメインの場合、グルコースは乳酸へと代謝され嫌気性呼吸を行うことが知られている。我々は PKM2 型の酵素を発言する細胞は嫌気性呼吸を行うだけでなく、認知

症の原因の一つとして考えられている $\omega 6$ 脂肪酸の代謝が亢進することを見出した (Regenerative Therapy 2015)。PKM2 ノックインマウスを作成したところ約 10 週で Y-maze のスコア低下がみられ、認知症を発症していることを見出した。更に PKM1 ノックインマウスを作成したところ認知症の傾向は見られず、PKM の選択的スプライシングが認知症発症の原因であることを明らかにした。PKM のスプライシングは HnRNPA1、HnRNPA2/B1、PTBP1 のタンパク質コンプレックスにより引き起こされる。これらスプライシングファクターの発現量が少ない場合、PKM は PKM1 型に、多い場合は PKM2 型にスプライシングされることが知られている。世界的に有名な認知症の解析研究として知られる久山町研究により得られたヒト脳を用いた網羅的遺伝子発現解析のデータを再解析してみると PKM 自体の発現は変化していないものの、PKM のスプライシングファクターである HnRNPA1、HnRNPA2/B1、PTBP1 の発現は認知症患者の海馬領域において有意に発現亢進していることが明らかとなった。したがってヒトにおいても認知症では PKM のスプライシングが M1 型から M2 型へと変化していることが示され

た。以上のことから本研究では PKM のスプライシングファクターの阻害剤スクリーニングを行い、新規認知症治療薬の開発を目指すことを目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 in silico スクリーニング

Protein Data Bank から HNRNP ファミリータンパク質の結晶構造を探索した。結晶構造を初期構造とした分子動力学計算により、タンパク質の熱振動をサンプリングした。サンプリング条件は 310 [K] (≈ 37 [°C])、水浴環境下とし、力場はタンパク質には AMBEWR 03, 水分子には TIP3P を使用した。サンプリングされた立体構造を重ね合わせ、構造類似クラスタリングにより、統計的に十分量の代表構造を抽出した。抽出された代表構造に対し、阻害剤候補となりえる化合物の選別するため 3 段階で *in silico* スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングでは、購入可能な 500 万化合物の中から HNRNPA1 と A2/B1 初期構造(熱揺らぎを考慮していない結晶構造)に結合可能かどうかを大まかに選別し、2 次スクリーニングにおいては、より詳細に候補化合物の立体構造柔軟性を考慮した選別を行い、3 次スクリーニングではタンパク質の生体内柔軟性を考慮する為に分子動力学計算で抽出した構造に対し、水分子の分極効果を考慮したスクリーニングを実施した。最終的にリピンスキールールに照らし合わせ、其々10 化合物程度を抽出した。さらに、抽出した化合物が、HNRNPA1, HNRNPA2/B1 以外のファミリータンパク質への選択性を検証するため、結晶構造が報告されている HNRNPK に

対しても結合能算出を行った。

2-2 細胞での効果検討

in silico で絞り込んだ化合物 7 種類を大腸がん細胞(DLD1)に添加(100 μ M)し培養を行った。培養 48 時間後に細胞を固定し、PLM1 及び PKM2 抗体を用いて細胞免疫染色を行なった。免疫染色した細胞は蛍光顕微鏡で観察を行い、化合物の影響により PKM2 から PKM1 へのスプライシングの変化が起こるか検討を行った。

3. 研究成果

3-1 in silico スクリーニング

今回の阻害標的である HNRNPA1 と HNRNPA2/B1 には其々17 個, 2 個の結晶構造が報告されており、他のファミリータンパク質では、HNRNPK のみが DNA Binding 領域の構造が報告されていた。HNRNPA1 と A2/B1 の結晶構造の中からそれぞれ最も高解像度で観測されている構

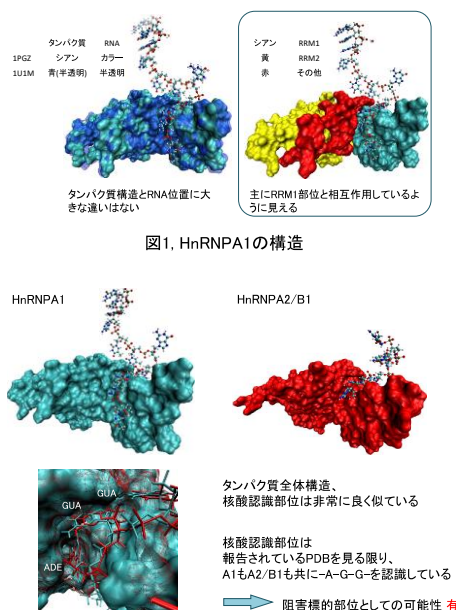


図1, HnRNPA1の構造

図2, HnRNPA2/B1の構造

造を初期構造とし(図 1,2)、分子動力学計算を実施した。その結果をもとに構造類似性クラスタリングを行う事で、それぞれ 16 パターン、19 パターンの代表的な DNA 認識部位配座を選択した(図 3,4)。一方で

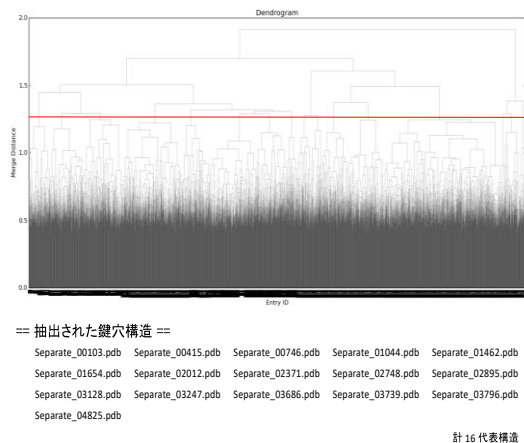


図3, HnRNPA1の類似性解析

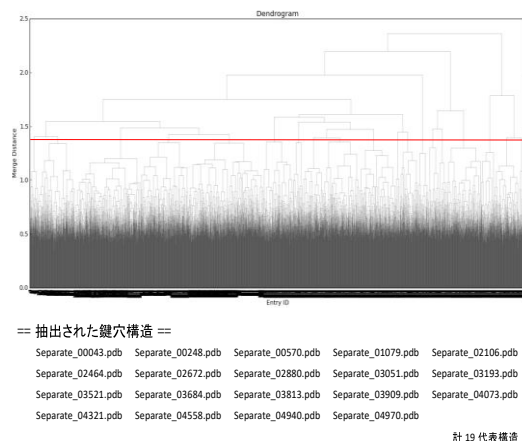


図4, HnRNPA2/B1の類似性解析

約 500 万化合物を用いた in silico スクリーニングでは、其々250 化合物程度まで抽出した。その後、骨格構造の類似性からグループ分割して其々のグループから代表構造を抽出し、スクリーニング結果の化合物とした。結果、HNRNPA1, A2/B1 に対して其々14, 7 化合物を抽出した。これらの化合物が HNRNPK に結合可能かどうかを検証したところ、安定した結合は生じない

(阻害化合物としては適切ではない) と予測された(図 5)。すなわち、我々がコンピュータを用いて抽出した化合物は、A1, A2/B1 に対して選択的特異性を持っている可能性が示唆された。

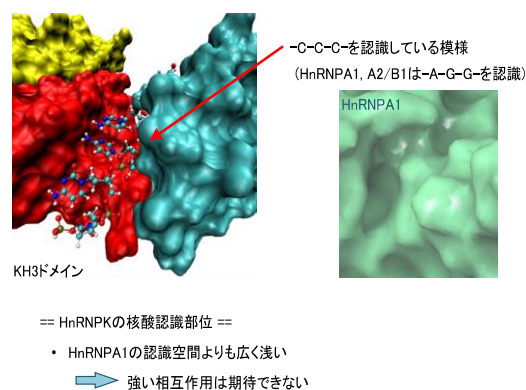


図5, HnRNPKの構造

3-2 細胞での効果検討

in silico で絞り込んだ化合物 7 種類を大腸がん細胞(DLD1)に添加(100 μ M)し培養を行った。培養 48 時間後に細胞を固定し、PLM1 及び PKM2 抗体を用いて細胞免疫染色を行なった。免疫染色した細胞は蛍光顕微鏡で観察を行い、化合物の影響により PKM2 から PKM1 へのスプライシングの変化が起こるか検討を行った。結果、1 つの化合物については PKM1 陽性細胞が顕著に増加していることが明らかとなり(図 6)、今後マウスへの投与による効果検討、

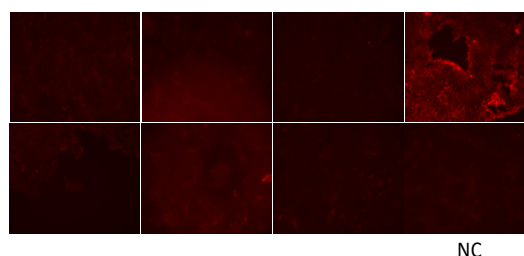


図6, PKM1抗体での免疫染色

化合物の合成展開、及び動物を用いた安全性試験を進めることで新規認知症治療薬の

開発につながることを期待される。

4. 今後の課題

海馬領域における代謝酵素のスプライシング変化が認知症の原因となることを世界で初めて発見した。これまでの認知症治療薬の開発とは全く異なるポイントを押さえる治療薬として開発が期待される。スプライシング変化による疾患の発症に関しては様々な疾患においてこれまで論文報告はあるものの治療薬の開発に至ったものは存在しない。本研究成果をさらに発展させ、スプライシング制御薬の開発に至れば今後他の疾患においても同様の効果を期待した治療薬の開発に繋がることを期待される。