

<研究課題> ユビキチン鎖修飾タンパク質の蓄積が老化に果たす役割の解明とそれに基づく老化の進行を緩和、抑制する化合物の探索

代表研究者 高崎健康福祉大学薬学部細胞生物学研究室 准教授 今井 純
共同研究者 高崎健康福祉大学薬学部細胞生物学研究室 助教 坂井 隆浩

【まとめ】

本研究では、2分子に分割した luciferase の2分子相補システムとユビキチンの融合タンパク質を用いて、ユビキチン鎖の蓄積を luciferase の発光によって高感度で非侵襲的に定量できる遺伝子発現ベクターを開発するとともに、この遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。その結果、*in vitro* および *in vivo* の双方において各種のストレス依存的なユビキチン鎖の蓄積を非侵襲的に定量化することに成功した。現在、これらの実験系を用いてユビキチン鎖の蓄積量を緩和および抑制する化合物の探索を行なっている。

1. 研究の目的

アルツハイマー病などの多くの老化関連疾患では、病変部への顕著なユビキチン鎖の蓄積が認められ、老化関連疾患の発症とその進行にユビキチン鎖の蓄積が関与することが強く示唆されている。しかし、これらのユビキチン鎖の蓄積が、老化関連疾患発症の原因であるのか、疾患の進行の結果あるのかは未だに明らかではない。その大きな要因の一つが、ユビキチン鎖の蓄積を経時的、非侵襲的に定量化することができる実験系が存在せず、その結果、効果的にユビキチン鎖の蓄積を抑制する薬剤が同定されていないことにある。本研究ではユビキチン鎖の蓄積を経時的、非侵襲的に定量化することのできる実験系の開発を目的とし、以下の研究を行なった。1)、2分子相補システムに基づく Split luciferase 系によってユビキチン鎖を定量できる遺伝子発現ベクターを構築する。2)、この遺伝子発現ベクターを導入した Split luciferase ubiquitin Tg マウスを開発する。3)、作成した *in vitro* および *in vivo* によるスクリーニング系によって、低分子化合物ライブラリーからユビキチン鎖の蓄積を抑制する化合物を同定する。4)、これらの化合物をユビキチン鎖の蓄積が認められる種々の老化関連疾患モデルマウスと Split luciferase ubiquitin-Tg マウスを交配し作出した個体を

用いた解析により、種々の老化関連疾患の予防および治療薬の同定と、その分子機序を明らかにする。

2. 研究方法と経過

1)、ユビキチン鎖定量遺伝子発現ベクターの作製

Large BiT (LgBiT) と Small BiT (SmBiT) が相互作用することによって、ルシフェラーゼが形成される2分子相補システムに基づく Split luciferase 系を使用し、LgBiT および SmBiT のC末端側に、ユビキチンを融合させた融合遺伝子を作成する。ユビキチンと LgBiT および SmBiT の間に、グリシンを主体とする柔軟性の高いリンカー配列を挿入し、ユビキチン鎖形成時の立体障害によって、LgBiT と SmBiT の相互作用が阻害されることを回避する。さらに、LgBiT-*liker*-ubiquitin、SmBiT-*liker*-ubiquitin 融合遺伝子の間にウイルス由来 2A 自己切断ペプチドを挿入、両融合遺伝子が独立した分子として発現する Split luciferase ubiquitin 遺伝子発現ベクターを作製した (図1)。

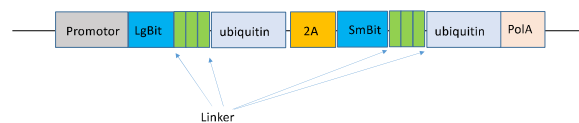


図1. Split luciferase - ubiquitin 遺伝子発現ベクター

2)、ユビキチン鎖定量マウスの開発

Split luciferase ubiquitin 遺伝子発現ベクターをマイクロインジェクション法によってマウス受精卵に遺伝子導入し、これを仮親の子宮に移植し、F₀個体を作成した。さらに、遺伝子タイピングを行い導入遺伝子陽性個体を同定し、これらを C57BL/6J と交配することによって、Split luciferase ubiquitin - Transgenic (Tg) マウスを作成した。

3. 研究の成果

1)、*in vitro* におけるユビキチン鎖定量の検

討

Split luciferase - ubiquitin 遺伝子発現ベクターを HEK293 細胞株、神経細胞由来の NG108 細胞株などに導入、プロテアソーム阻害剤、酸化ストレス誘導剤、炎症誘導剤を添加し、ルシフェラーゼアッセイにより発光強度を測定した。その結果、全てのストレス誘導剤薬剤において、濃度依存的にルシフェラーゼの発光が亢進することを確認した。この結果は、ユビキチン鎖特異的な抗体を用いた Western-blotting の結果と一致した。

2)、*in vivo*におけるユビキチン鎖定量化の検討

Split luciferase ubiquitin- Tg マウスに、プロテアソーム阻害剤、酸化ストレス誘導剤、炎症誘導剤により各種ストレスを誘導した後、ルシフェルリンを腹腔内投与し、IVIS *in vivo* Imaging System によって、ユビキチン鎖を定量化した。その結果、全てのストレス誘導剤において、経時的なユビキチン鎖の蓄積を確認した。この結果は、*in vitro*の細胞レベルの実験結果と一致した。

4. 今後の課題

現在、Split luciferase ubiquitin 遺伝子発現ベクターを導入した細胞株に、各種ストレス誘導剤を刺激した後、低分子化合物ライブラリーを利用した一次スクリーニングにより、ユビキチン鎖の蓄積を抑制する化合物を同定している。さらに、同定した化合物は、ユビキチン鎖

の蓄積が病態の発症・悪化に寄与する老化関連疾患モデルマウスと Split luciferase ubiquitin- Tg マウスを交配し作出した個体に投与することにより、その薬理効果を検討している。また、これらの検討の中から、ユビキチン鎖の蓄積を抑制する候補化合物を同定し、これが、いくつかの老化関連疾患モデルマウスのユビキチン鎖の蓄積を抑制し、病態の緩和および抑制する可能性を示唆する結果を得ている。これと並行して、同定した化合物を介するユビキチン鎖の蓄積を抑制する分子機序の解明を目指した検討を進めている。

5. 研究成果の公表方法

上記の研究成果および今後の課題で述べた研究成果をまとめ、学術論文として投稿および発表する予定である。また、本研究と関連する以下の学術論文を研究期間内に国際誌に発表した。

- 1) Takahiro Sakai, Hidetsugu Takagaki, Noriyuki Yamagiwa, Michio Ui, Shinichi Hatta, Jun Imai. Effects of the Cytoplasm and Mitochondrial Specific Hydroxyl Radical Scavengers TA293 and mitoTA293 in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis Model Mice. Antioxidants. 9(10):1398, 2021.

以上