

平成 27 年度 博士論文

(平成 25 年度進学)

SOD1-Derlin-1 結合を標的とした

ALS 治療薬の基盤開発

東京大学大学院薬学系研究科

細胞情報学教室

圓谷 奈保美

(指導教員：一條 秀憲)

目次

1. 序論	3
2. 方法	9
3. 結果	16
4. 考察	25
5. 総括	32
6. 参考文献	33
7. 謝辞	39
8. 図表	41

1. 序論

ALS と SOD1

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis ; ALS) は、上位及び下位の運動神経細胞が選択的に障害される進行性・晩発性の神経変性疾患である^[1]。痙攣や筋麻痺、筋萎縮といった症状がみられ、主に呼吸筋麻痺による呼吸不全から、発症後数年で死に至る非常に重篤な疾患である。一方で、日本国内での罹患者数は約 9000 人、全世界でも数十万人程度と言われており、アルツハイマー病やパーキンソン病といった他の神経変性疾患と比べて罹患者が少ないため、治療薬開発の取り組みが遅れている。現在認可されている治療薬は、一時的な進行遅延効果をもつグルタミン酸神経終末放出抑制剤 (リルゾール) と活性酸素除去剤 (エダラボン) のみである^[2-4]。しかしながら、ALS におけるこれらの神経細胞保護効果の作用機序は明らかでなく、また ALS 発症の病態分子メカニズムが未だ不明のため、明確な分子基盤に基づく根本的な治療法は存在していない。

ALS の多くは孤発性 (Sporadic ALS : SALS) であり、全体のおよそ 10%を家族性 (Familial ALS : FALS) が占めている。1993 年に FALS の原因遺伝子として *Cu, Zn Superoxide dismutase (SOD1)* が初めて同定され^[5]、現在までに 100 種類を超える ALS 関連 *SOD1* 変異が報告されている (ALS Online Database: ALSod)。FALS の中では比較的高頻度に変異がみられる遺伝子であり、FALS 全体の 20%ほどが *SOD1* の遺伝子変異に起因すると考えられている。*SOD1* は分子内ジスルフィド結合を持ち、Zn 及び Cu イオンを 1 つずつ配位する金属タンパク質である。通常はホモ 2 量体を形成し、活性中心の Cu イオンの酸化還元を介して活性酸素 ($O_2^{\cdot-}$) を過酸化水素 (H_2O_2) へと不均化する抗酸化酵素として働くことが知られている。一方、ALS 発症との関連においてはこれまで数多くの研究がなされ、*SOD1* 遺伝子変異による FALS が常染色体優性遺伝形式であることや、*SOD1* KO マウスは運動機能障害の症状を示さないのに対し^[6]、変異型 *SOD1* トランスジェニックマウスが ALS 様病態を示すこと^[7-9]、さらに *SOD1* の抗酸化活性と ALS の病態重篤度に相関がないことなどが明らかとなり^[10]、現在では単なる SOD 活性の喪失や亢進ではなく、変異により *SOD1* が新たな獲得性細胞毒性を発揮することが運動神経細胞死とそれに続く ALS 発症に重要であると考えられている^[11]。この獲得性細胞毒性として、神経興奮毒性、小胞体ストレス、

プロテアソーム阻害、酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常、軸索輸送異常などが運動神経細胞死に関わっていることが示唆されているが、ALS の詳細な発症機構は未解明のままである^[12]。

小胞体ストレス

小胞体は、新規合成された分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成とともに、これらタンパク質の品質管理を担う細胞小器官である。小胞体内腔に存在するタンパク質の中には、正しい立体構造をとれなかった、いわゆる不良タンパク質が一定の割合で存在する。また、栄養飢餓、低酸素、遺伝子変異など、様々な生理的・病的なストレスによっても不良タンパク質が形成され、こういった不良タンパク質が小胞体内腔に蓄積することで小胞体ストレスが引き起こされる。

このとき細胞内では、正常な機能維持のために小胞体ストレス応答（unfolded protein response : UPR）による小胞体品質管理機構が働くことが知られている^[13]。UPR では Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6)、inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) の3種類の小胞体膜貫通型受容体の活性化を介してシグナルが伝達され、①タンパク質合成の抑制、②小胞体シャペロンおよび小胞体関連分解（ER associated degradation : ERAD）に関与する分子の発現誘導、③ERADによる不良タンパク質の分解などを行うことにより、小胞体の機能回復を図っている。一方、持続的または過度なストレスや UPR の機能不全などによって小胞体内腔に不良タンパク質が過剰に蓄積し、小胞体の恒常性を維持できない場合にはアポトーシスが誘導される。この小胞体ストレス誘導性細胞死は、構造異常タンパク質の蓄積を原因とする疾患の分子メカニズムとして、糖尿病や神経変性疾患などを含む様々な病態への関与が示唆されている^[14]。

ALS と小胞体ストレス

近年、変異型 SOD1 トランスジェニックマウスを用いた解析や、ヒト ALS 患者由来の脊髄組織サンプルを用いた解析から、ALS と小胞体ストレスとの関連が報告されている^[15-19]。しかしながら、ALS における小胞体ストレス誘導の分子メカニズムについては明らかになっていなかった。

当研究室では以前の研究により、FALS の発症メカニズムとして変異型 SOD1 によ

り ERAD の機能が阻害され、小胞体ストレスを介した運動神経細胞死が誘導されることを報告している^[20]。通常、小胞体シャペロンの働きによっても正しい立体構造をとれなかった小胞体内腔の不良タンパク質は、ERAD によって分解される (Fig. 1A)。つまり、不良タンパク質は BiP をはじめとする小胞体シャペロンによって認識され、ERAD 複合体を介して小胞体内腔から細胞質側へと逆輸送される。その後、細胞質側に存在するユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることで、小胞体内腔における不良タンパク質の蓄積が軽減され、小胞体の恒常性が保たれている^[21,22]。一方、変異型 SOD1 の発現している細胞では、変異型 SOD1 が ERAD 複合体の重要な構成因子である Derlin-1 の C 末端 12 アミノ酸 (以下、CT4) と特異的に結合し、ERAD の流れを阻害することで ERAD 基質の分解を抑制することが分かった。この ERAD の機能阻害により不良タンパク質が小胞体内腔に蓄積し、こうして誘導された小胞体ストレスがアポトーシスを介した運動神経細胞死を引き起こしている (Fig. 1B)^[20]。

Derlin-1 は、ERAD 基質の逆輸送において重要な働きを担う分子として同定された小胞体膜貫通タンパク質である^[23,24]。哺乳類における Derlin-1 のホモログとしては Derlin-2、Derlin-3 が存在しており、これら Derlin family 分子はホモまたはヘテロ複合体を形成し、HRD1、SEL1L、Herp、VIMP、p97 といった ERAD 関連分子と相互作用することが示されている^[25-27]。ERAD における Derlin-1 の機能の詳細は未だ明らかとなっていないが、ALS 関連変異型 SOD1 は Derlin-2 や Derlin-3、また VIMP や p97 などの ERAD 関連分子とは結合せず、Derlin-1 の C 末端のみに特異的に結合することが分かっている。またノックダウンによる Derlin-1 の発現抑制は小胞体ストレスを惹起しない一方で、変異型 SOD1 による小胞体ストレス誘導を阻害した^[20]。このことから、変異型 SOD1 による小胞体ストレスは Derlin-1 の機能消失を介してではなく、変異型 SOD1 との結合により Derlin-1 が獲得性機能異常を示し、正常な ERAD が阻害されることで誘導されると考えられる。

ALS 関連変異型 SOD1 における Derlin-1 との結合の共通性

当研究室ではさらに、既知 130 種類の ALS 関連変異型 SOD1 の発現ベクターを複製し、すべての変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合について検討した。その結果、病態との関連性が希薄な変異を除いたすべて (122 種類) の変異型 SOD1 が Derlin-1 CT4 と結合することが明らかとなった^[28] (Fig. 1C)。変異は SOD1 の一次配列上の広範囲

に及ぶことから、それぞれの変異型 SOD1 が変異によって個別に Derlin-1 との結合面を獲得するのではなく、野生型 SOD1 の配列中に Derlin-1 との結合領域が存在することが考えられた。そこで、SOD1 側の Derlin-1 との相互作用領域を検討したところ、予想どおり野生型 SOD1 に 14 アミノ酸からなる Derlin-1 との結合領域 (Derlin-1 binding region: DBR) が存在することが明らかとなった (Fig. 1C) [28]。さらに、この DBR 領域に対して作製したモノクローナル抗体は、免疫沈降実験において野生型 SOD1 は認識せず、Derlin-1 と結合する全ての変異型 SOD1 (抗体エピトープ部の変異を除く) を特異的に認識した [28]。これらの結果から、野生型 SOD1 では立体構造上内側に隠れている DBR が変異に伴う構造変化によって外側に露出することが、ALS 関連変異型 SOD1 の共通の性質である可能性が示唆された。さらに、*SOD1* 遺伝子変異をもつヒト ALS 患者由来の B 細胞中の SOD1 も変異型 SOD1 特異的抗体によって認識され [28,29]、実際に内在性の SOD1 と Derlin-1 が結合していることも確認されたことから、ヒト ALS 病態においても SOD1 の DBR 露出を介した Derlin-1 との結合が関与していると考えられる。加えて、マウス脊髄由来の初代運動神経細胞培養系において、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害するペプチド (Derlin-1 (CT4) ペプチド: Derlin-1 CT4 領域由来のペプチド) を細胞内に発現させることで、変異型 SOD1 誘導性の運動神経細胞死が抑制されることが明らかとなっている (Fig. 1D) [20]。以上の結果より、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害することが、*SOD1* 変異によるすべての ALS の治療につながる可能性が強く示唆される。実際の治療を想定した場合には、細胞膜透過性を持ち、細胞内の SOD1-Derlin-1 結合を標的とすることが求められる。しかしながら、Derlin-1 (CT4) ペプチドによる細胞内の SOD1-Derlin-1 結合阻害は発現ベクターを用いた細胞内強制発現系でのみ効果を示し、膜透過性を向上させるべく改変したペプチドにおいても細胞外からの添加によっては効果を確認できなかった。そこで、ALS 治療薬候補としてだけでなく、強力な実験ツールにもなりうる低分子化合物に注目し、SOD1 と Derlin-1 の結合阻害化合物を獲得することが今後の ALS 発症機構解析において有用であると考えられた。

低分子化合物によるタンパク質間相互作用を標的とした創薬

一般にタンパク質間相互作用 (Protein-protein interaction: PPI) は、細胞応答におけるシグナル伝達を始め、様々な生命現象に関わっていると同時に、その恒常性の

破綻や異常な相互作用が様々な病態に関与することが示唆されている。そのため、PPI を制御する低分子化合物は、治療薬そのものとしての可能性とともに、病態分子メカニズムを解明するための有力な実験ツールとなり、解明されたメカニズムを基に、新たな治療薬開発の幅を広げる可能性も秘めている。しかしながら、PPI を阻害するためには、限られた相互作用面に特異的に結合する低分子化合物を見出す必要がある一方で、タンパク質間の相互作用面は一般に広く浅い範囲に及ぶことが多いため、低分子化合物の相互作用面への結合そのものや、PPI 阻害活性の特異性を出すことは困難であると考えられてきた^[30]。そのような中で、近年の研究結果より、一部の PPI には hot spot と呼ばれる局所的な部位が相互作用面の中でも結合の安定性に重要であることが分かってきた^[31]。その hot spot をターゲットとすることで、PPI を阻害する低分子化合物が得られた例が報告されている^[32-39]。また、ターゲット分子の相互作用面とは異なる部位に結合し、ターゲットタンパク質の構造を変化させてアロステリックな結合阻害活性を示す化合物の例も存在する^[33,40,41]。このように、低分子化合物による PPI 阻害は非常にチャレンジングな課題であるが、実際に PPI 阻害化合物が得られる可能性も示されてきている。

これまでアカデミアでは、様々な疾患の病態発症に関与する PPI が数多く発見され、報告されてきた。しかしながら、疾患関連タンパク質の解析から創薬標的分子の同定を行い、新たな治療薬開発の可能性を示すことまでが、アカデミアにおける従来の研究の主な流れであり、実際に創薬のシードとなる化合物を見つけるための手段は限られていた。このような中で、近年における公的大規模化合物ライブラリーの整備は、アカデミアにおいても実際に標的分子に作用する化合物の探索研究を行うことが可能とした。本学では、創薬機構が保有する化合物ライブラリーやハイスループットスクリーニング実施のための設備・機器の整備が進んだことから、学内において SOD1-Derlin1 結合を標的とした阻害化合物の獲得を目指すことが可能となった。

本研究の目的と成果

本研究では、ALS 関連変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を介した細胞死誘導による ALS の発症メカニズムに基づき、結合阻害低分子化合物を見出すことで、ALS 病態における SOD1-Derlin-1 結合の重要性と、新たな ALS 治療薬開発の可能性を示すことを目指した。PPI 阻害剤の獲得という困難な課題への挑戦であると同時に、希少疾

患である ALS の治療を目指した研究であるという点においても、本研究の遂行は意義深い試みであると考えられる。

本研究において私は、新規 SOD1-Derlin-1 結合評価系を確立し、化合物のハイスループットスクリーニングを実施することに成功した。そしてスクリーニングにより得られた候補化合物の合成展開と活性評価を経て、細胞内における SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する低分子化合物を得た。さらには、ALS モデルマウスへの化合物投与により、*in vivo* 系において SOD1-Derlin-1 結合阻害が ALS 病態の改善効果を示すことを明らかにした。

2. 方法

(1) 主な試薬、抗体など

FRET 検出に用いた Eu³⁺ cryptate 標識抗体 (Eu)、および d2 標識抗体 (d2) は、CIS biointernational より購入した。

Western blotting に用いた抗体は、anti-Flag 抗体 (M2) : Sigma、anti-HA 抗体 (3F10) : Roche、anti- α -tubulin 抗体: Harlan、Anti-rat IgG HRP-linked 抗体: Cell Signaling、Anti-mouse IgG HRP-linked 抗体: GE healthcare、Anti-biotin HRP-linked 抗体: Cell Signaling よりそれぞれ購入した。

Anti-Flag M2 affinity gel および 1x Flag peptide は Sigma より購入した。Centrifugal Filters (Amicon Ultra 10K) は Millipore より購入した。

(2) 方法

Cell culture

細胞は、ヒト胎児腎臓由来 Human Embryonic Kidney 293A (HEK293A) 細胞を用いた。補体不活性化した 10 % fetal bovine serum (FBS, Vitromex)、100 units/mL Penicillin G (Meiji) を含む High Glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: 4.5 mg/ml glucose, Sigma) 中で、37 °C、5 % CO₂ の条件に設定したインキュベーターに入れ、培養した。

Transfection

HEK293A 細胞へのトランスフェクションは、プラスミド 1 μ g に対して 3 μ L の割合で PEI-Max (Polyscience) を用いて行った。DMEM と PEI-Max を混合して 5 分間静置後、プラスミド DNA の DMEM 溶解液に加えてさらに 15 分間静置し、播種後 12-24 時間培養した後で 10 % FBS のみ含む DMEM に培地交換した細胞の培養液中に添加した。

<プラスミド>

pcDNA3.0-Derlin-1-HA、pcDNA3.0-Venus-Derlin-1(CT4)-HA、pcDNA3.0-Derlin-1-Flag、pcDNA3.0-Flag-SOD1 WT、pcDNA3.0-Flag-SOD1 G93A とその他変異 129 種類、pcDNA3.0-Flag-SOD1(5-20)-CFP は、以前当研究室にて作

製されているものを用いた。TR-FRET を用いた結合評価系の構築において用いたプラスミド (Table 1A, B) は、すべて pcDNA3.0 ベクターで作製されたものを用いた。

Cell lysis

FRET 測定用の HEK293A 細胞の溶解には、FRET buffer (25 mM phosphate buffer pH 7.0、400 mM KF、0.1% BSA、0.5 % Triton-X 100、5 µg/mL leupeptin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を使用した。

共免疫沈降実験用の HEK293A 細胞の溶解には、IP lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM EDTA pH 8.0、1 % Triton-X 100、5 µg/mL leupeptin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を使用した。

FRET measurement assay

6 ウェルプレートでトランスフェクション後 48 時間培養した細胞を、FRET buffer 500 µL/well で 4°C にて 25 分間インキュベートすることにより溶解し、4 °C、15000 rpm、10 分間遠心して上清を回収した。上清は-80 °C 冷凍庫にて凍結保存し、使用時に氷上で融解した。384 ウェルプレート (Greiner, #784076) の各ウェル内で、FRET buffer で 20 倍希釈した細胞溶解液 10 µL に対し、FRET buffer で希釈した Eu³⁺ cryptate 標識抗体 (Eu) 溶液と d2 標識抗体 (d2) 溶液の混合液 10 µL を添加し、室温にて 1 時間インキュベートした。その後、プレートリーダー PHERAstar (BMG Labtech) により 620 nm と 665 nm の時間分解蛍光強度を測定した。スクリーニング時には、あらかじめ各種化合物が分注されている 384 ウェルプレートに細胞溶解液 10 µL を添加し、4 °C にて一晩インキュベートした後、抗体混合溶液 10 µL を加えて室温にて 1 時間インキュベートし、同様に蛍光強度を測定した。FRET Ratio は以下の計算式により算出した。

$$\text{FRET Ratio} = (665 \text{ nm 蛍光強度}) / (620 \text{ nm 蛍光強度})$$

FRET シグナル (S/B 比) は、Flag-SOD1 G93A と Derlin-1-HA あるいは各タンパク質を過剰発現させた細胞溶解液での FRET Ratio を最大値、過剰発現させていない細胞溶解液での FRET Ratio を最小値として、以下の計算式により算出した。

$$\text{FRET シグナル} = (\text{FRET Ratio 最大値}) / (\text{FRET Ratio 最小値})$$

Z score は、FRET Ratio 最大値の平均値を 0 とし、以下の計算式により算出した。

$$Z \text{ score} = \{(\text{被検化合物の FRET Ratio}) - (\text{FRET Ratio 最大値の平均値})\} / \text{FRET Ratio 最大値の標準偏差}$$

阻害率 (%) は、以下の計算式により算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - 100 \times \{(\text{被検化合物の FRET Ratio}) - (\text{FRET Ratio 最小値})\} / \{(\text{FRET Ratio 最大値}) - (\text{FRET Ratio 最小値})\}$$

Z' factor は、以下の計算式により算出した。

$$Z' \text{ factor} = 1 - 3 \times \{(\text{FRET Ratio 最大値の標準偏差}) + (\text{FRET Ratio 最小値の標準偏差})\} / \{(\text{FRET Ratio 最大値}) - (\text{FRET Ratio 最小値})\}$$

Purification and Lysate-based immunoprecipitation assay

6 ウェルプレートでトランスフェクション後 48 時間培養した細胞を、IP lysis buffer 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 25 分間インキュベートすることにより溶解し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15000 rpm、10 分間遠心して上清を回収した。この上清を 300 $\mu\text{L}/\text{tube}$ で分注し、Anti-Flag M2 affinity gel (Sigma) を液量で 20 μL 加えて、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 25 分間転倒混和し反応させた。反応後、上清を除去して High salt wash buffer (1 % Triton X 100、500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM EGTA) で 2 回、IP lysis buffer で 1 回ずつ洗浄した。洗浄後のビーズに elution buffer (0.1 % Triton-X 100、500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM EGTA) で希釈した 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 1x Flag peptide を添加して 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 30 分間転倒混和し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、13000 rpm、3 分間遠心して上清を回収した。回収した上清から、Cenrifugal Filters を用いた限外ろ過により Flag peptide を除去し、このように得られた溶液を dilution buffer (0.01 % Triton-X 100、500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM EGTA) で希釈して精製溶液とした。100 $\mu\text{L}/\text{tube}$ に分注した精製溶液に 5 % DMSO または各濃度の各種化合物を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 16 時間転倒混和し反応させた。反応後の溶液に Anti-Flag M2 affinity gel を液量で 20 μL 加え、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 25 分間転倒混和し反応させた。4 $^{\circ}\text{C}$ 、13000 rpm、3 分間で 2 回遠心した後、上清を除去してビーズに SDS Sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.08 mg/ml Bromophenol Blue、28.8 % glycerol、4 % SDS、10 mM DTT) を加え、SDS-PAGE サンプルとした。

IC50 値の算出の際には、コントロールサンプルの希釈系列を作製し、タンパク濃度 (%) とバンド強度の検量線を作成した。得られた検量線から、各化合物を添加した

レーンにおける Derlin-1 のバンド強度に対応するタンパク濃度 (=結合率 (%)) を算出した。阻害率 (%) を下記の式により求め、得られる濃度作用曲線から IC50 値を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - \text{結合率 (\%)}$$

Cell-based immunoprecipitation assay

24 ウェルプレートでトランスフェクション後 12 時間あるいは 24 時間培養した細胞培養液を 200 μL の培地に交換し、1 % DMSO あるいは各濃度の各種化合物を培養液中に添加した。36 時間あるいは 24 時間後に、細胞を IP lysis buffer 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 25 分間インキュベートすることにより溶解し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15000 rpm、10 分間遠心して上清を回収した。この上清に Anti-Flag M2 affinity gel を液量で 20 μL 加え、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 25 分間転倒混和し反応させた。反応後、上清を除去して High salt wash buffer で 2 回、Low salt wash buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EGTA) で 1 回ずつ洗浄した。最後に 50 μL の 2x SDS sample buffer を加えて 98 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間ボイルし、SDS-PAGE サンプルとした。Lysate は、上清と等量の 2x SDS sample buffer を加えて 98 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間ボイルし、SDS-PAGE サンプルとした。

Pulldown assay

6 ウェルプレートでトランスフェクション後 24 時間培養した細胞培養液を 800 μL の培地に交換し、1 % DMSO あるいは 200 μM の光親和性ビオチン化合物を培養液中に添加した。24 時間後に培地を除去し、PBS にて 3 回洗浄後、氷上にて 60 分間 365 nm の UV 照射を行った。細胞を IP lysis buffer 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 25 分間インキュベートすることにより溶解し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15000 rpm、10 分間遠心して上清を回収した。この上清に Anti-Flag M2 affinity gel を液量で 20 μL 加え、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 25 分間転倒混和し反応させた。反応後、上清を除去して High salt wash buffer で 2 回、Low salt wash buffer で 1 回ずつ洗浄した。最後に 50 μL の 2x SDS sample buffer を加えて 98 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間ボイルし、SDS-PAGE サンプルとした。Lysate は、上清と等量の 2x SDS sample buffer を加えて 98 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間ボイルし、SDS-PAGE サンプルとした。

Western blot analysis

SDS-PAGE 後、ゲルから polyvinylidene difluoride membrane (0.2 μm , Pall) にタンパク質を転写し、5 %スキムミルクを含む TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.05 % Tween 20) で室温にて 2 時間以上ブロッキングした後、5 % bovine serum albumin と 0.1 % NaN_3 を含む TBS-T で希釈した 1 次抗体を、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 12 時間以上 PVDF 膜上の各分子に結合させた。反応後、5 %スキムミルクを含む TBS-T で希釈した 2 次抗体 (HRP-linked 2nd antibody) を、1 時間室温にて 1 次抗体に結合させた。ビオチン検出の際は、ブロッキング後に 5 %スキムミルクを含む TBS-T で希釈した Anti-biotin HRP-linked 抗体を 1 時間室温にて結合させた。この後、TBS-T で 15 分間 \times 3 回以上 Wash を行い、enhanced chemiluminescence (ECL) システムにより detection を行った。

Mice

野生型マウス (C57BL/6) 及び SOD1 G93A トランスジェニックマウス (G1L/+ line, backcrossed to C57BL/6) は The Jackson Laboratory より購入し、繁殖・飼育したものをを用いた。アッセイはすべて雄のマウスを用いて行った。

Intracerebroventricular (i.c.v.) delivery

SOD1 G93A トランスジェニックマウス (平均発症時期: 28.1 ± 1.3 週齢^[20]) に対して、22 週齢から Brain infusion kit 3 (Alzet) と Osmotic pump (Model 2006, Alzet) を用いて、化合物の脳室内持続投与を行った ($0.15 \mu\text{L/h}$, 6 週間/pump)。準備段階として、50 %DMSO/PBS あるいは各化合物を pump に充填し、0.9 %NaCl に浸して 37°C で 60 時間以上プライミングを行った。Pump の取り付けの際は、 $0.01 \mu\text{L/g}$ xylazine (1 mg/ml, Sigma) と $0.007 \mu\text{L/g}$ Pentobarbital Sodium Salt (5.4 mg/ml, ナカライ) の腹腔内投与により麻酔を施した。マウス頭部の毛を剃り、マニピュレーターを取り付けた脳定位固定装置 (ナリシグ) にマウスを固定後、皮膚を切開して頭蓋骨を露出させた。Bregma の座標を 0 に設定し、右方に 1.1 mm、後方に 0.5 mm、下方に 2.5 mm の位置を投与脳室座標とした。Pump を背側皮下に配置し、接着剤を用いてカニューレを固定後、マウス頭部の皮膚を接着剤で閉じた。ALS 病態発症により手術が困難になるまで、6 週間毎に pump 交換を行った。

Pump 交換の際には、導入には 4 %、維持には 2 %の Isoflurane (和光純薬) を用いてマウスへの麻酔を施した。Pump 挿入部位の背面の毛を剃り、皮膚を切開して pump を取り出し、あらかじめ 50 %DMSO/PBS あるいは各化合物を充填しておいた新しい pump と交換した。Pump 交換後、開いた皮膚は Wound clip (Alzet) により閉じた。

Behavioral analysis

マウスが 25 週齢になった週から、週に 3 回ロータロッド試験により運動機能測定を行った。ロータロッド (室町機械) を到達回転速度 40 rpm、加速時間 180 秒として設定し、最長 300 秒間で対象マウスが落下するまでの時間を記録した。180 秒間の休憩時間を設けて各回 2 度の測定を行い、良い方の記録をその日の結果として週の平均値を算出した。2 週続けて前週の結果を下回った場合に、ピークとなった 2 週間前の週齢をそのマウスの onset として定義した。

Motoneuron count assay

31 週齢のマウスを 4 %パラホルムアルデヒド/PBS を用いて灌流固定し、脳脊髄組織を取り出した。4 %パラホルムアルデヒド/PBS に浸して 4 °C にて 24 時間以上固定した後、30 %スクロース液/MilliQ に移して 4 °C にて 24 時間以上で置換した。腰髄領域を切断し、ドライアイス上でクリオモルド 1 号 (SAKURA) に垂直に立てて、クリオマウント I (低粘度、武藤化学) を満たして固定し、脊髄組織凍結サンプルを作製した。-20 °C に設定した CM3050 S クライオスタット (Leica) を用い、40 μm 切片を作製した。ゼラチンコートしたスライドガラス (MAS コート、MATSUNAMI) 上に切片を貼り付け、十分に乾燥させた後、5 %酢酸/95 %エタノール中で 60°C にて一晩放置した。95 %エタノール、70 %エタノールの順に 5 分間ずつ馴染ませた後、軽く水洗して 0.1 % Cresyl Violet Acetate (WALDECK; 1A-400) /10 %酢酸/MilliQ に浸し、電子レンジにて沸騰直前まで加熱し、室温まで戻すことでニッスル染色を行った。再び軽く水洗した後、70 %エタノールに浸し、分別状況を確認した。95 %エタノール、100 %エタノールに順次 5 分間ずつ浸し、Xylene (和光純薬) の脱水系列を経てマウントクイック (大道産業) にて封入した。明視野顕微鏡 (Leica) により 20 倍の対物レンズをしようして染色切片の観察を行い、脊髄前角に存在する直径 20 μm

以上の大きさで神経細胞の形態が確認でき、核と区別して細胞質の染色が判断できるものを運動神経細胞としてカウントした。

3. 結果

TR-FRET を利用した SOD1-Derlin-1 結合評価系の確立

SOD1 と Derlin-1 の結合を評価する実験系として、当研究室ではこれまで主に共免疫沈降実験を行っていた。しかしながら、大規模な化合物スクリーニングのように大量のサンプルを評価することを考えると、スループット性が低いことが課題となった。そこでまずは、ハイスループットな新規 SOD1-Derlin-1 結合評価系として、時間分解 FRET (TR-FRET) の原理を利用した実験系を構築した^[42]。この系においては、異なる 2 種類の蛍光分子 (ドナー用の蛍光分子とアクセプター用の蛍光分子) で標識された、各タンパク質のタグに対する抗体を用いることを特徴としている (Fig. 2A)。

はじめに、変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を FRET によって検出することが可能であるかを検討した。共免疫沈降実験において結合を確認できる Flag-SOD1 G93A (代表的な ALS 関連変異型 SOD1 の 1 つ) と Derlin-1-HA の発現ベクターを用いて HEK293A 細胞に両タンパク質を共発現させ、その細胞溶解液を 384 ウェルプレートに添加し、プレート内で蛍光分子標識されたそれぞれの抗体と混合した。SOD1 側にドナーとなる Eu 標識 Flag 抗体 (anti-Flag-Eu) を、Derlin-1 側にアクセプターとなる d2 標識 HA 抗体 (anti-HA-d2) を用いて蛍光測定を行ったところ、結合依存的な FRET Ratio 値の上昇が検出された (Fig. 2B)。

FRET 効率は蛍光分子間の距離や配向性によって大きく変化することから、実際にスクリーニングを行うことを考慮し、最も FRET 効率の良い条件を検討するため、SOD1 と Derlin-1 の様々な発現ベクターの組み合わせや、蛍光標識抗体との組み合わせ、また各タンパク質の発現量や発現比、抗体との量比等、合計 1400 通りの条件検討を行った (Table 1)。高い S/B 比を得られることに加えて、凍結融解の影響や必要な抗体量、細胞溶解液の濃度をさらに比較検討した結果、最終的には Flag-SOD1 G93A と Derlin-1-HA に anti-Flag-Eu と anti-HA-d2 を使用する組み合わせにおいて約 6 倍の FRET シグナルを検出する条件を見出すことができ、検討した条件の中で最良の結果となった (Fig. 2C)。またこのとき、スクリーニングを行う上で系の安定性を示す Z' factor が 0.9 を超える値となった (Fig. 2C)。Z' factor は、ポジティブコントロールとネガティブコントロールの平均値の差が大きく、ばらつきが小さいほど 1 に近づく値であり、低分子化合物のスクリーニング系においては一般に 0.5 以上であ

れば優れた系であるといわれている。以上より、TR-FRET を利用した新規 SOD1-Derlin-1 結合評価系が、十分に化合物スクリーニングに適した系であることが分かった。

TR-FRET シグナルの評価による化合物スクリーニング

以上の結果から、TR-FRET を利用した SOD1-Derlin-1 結合評価系を用いて、実際に結合阻害化合物を得るためのスクリーニングを開始した。SOD1 と Derlin-1 の結合状態では FRET が起こる一方で、低分子化合物によって結合が阻害されると FRET が起こらなくなり、シグナルが減弱すると考えられる (Fig. 2A)。これより、FRET シグナルを結合の指標として、本学創薬機構が保有する約 16 万化合物についてスクリーニングを行った。

<パイロットスクリーニング: 1 次>

最終濃度 50 μM となるようにあらかじめ化合物が分注されている 384 ウェルプレートに、Flag-SOD1 G93A と Derlin-1-HA を過剰発現させた細胞溶解液を添加し、FRET が減弱したウェルに入っていた化合物を陽性として選別するという方法で 1 次スクリーニングを実施した (Fig. 3A)。化合物と細胞溶解液の反応時間を設定する際に、反応時間が長いほど大きな阻害効果が期待される一方で、長時間プレート内に細胞溶解液を放置すると FRET シグナルがやや低下する傾向があった。そこで、16 万化合物に対する大規模スクリーニングに先立って、ライブラリーの中でも PPI をターゲットとする化合物として集められた約 1 万化合物に対してパイロットスクリーニングを行い、スクリーニング時の作業・操作行程を加味して、反応条件を①常温 3 時間と②4 $^{\circ}\text{C}$ over night の 2 通り設けた。1 次スクリーニングの結果、各 31 プレート、合計 62 プレートの Z' factor はすべて 0.5 を超え、①の条件の平均は 0.87、②の条件の平均は 0.85 となった (Fig. 3B)。このように、十分安定した Z' factor が得られていたが、さらに各プレート間のばらつきを補正するため、このときの化合物の絞り込みには FRET Ratio を標準化した Z score を用いた。SOD1-Derlin-1 結合阻害により FRET Ratio が減少する化合物は Z score がマイナスとなるので、Z score < -3 (正規分布する場合の p 値 0.01 以下) であった化合物を陽性とし、①の条件から 231 個、②の条件から 323 個の化合物を得た。1 次スクリーニングの段階では、たとえ偽陽性

化合物が増えたとしても、その後アッセイにまわされることのない偽陰性化合物を極力減らすように化合物を絞り込むべきであると考え、これらの和集合である 459 化合物を 2 次スクリーニングへと進めた (Fig. 3G)。

<パイロットスクリーニング: 2 次>

1 次スクリーニングにおいて得られた候補化合物の中には、抗体とタグの結合を阻害する化合物や、蛍光分子のエネルギー移動を阻害する化合物など、目的とする SOD1-Derlin-1 結合阻害とは異なる阻害効果をもつ化合物が含まれる可能性がある。そこで、このような偽陽性化合物を排除するため、単一分子内で FRET が起こる SOD1 の発現ベクター (HA-SOD1-Flag) を作製して、各種化合物による一分子 FRET シグナルへの影響を検討することを考えた。単一分子内で起こる FRET にも影響を及ぼす化合物は、SOD1-Derlin-1 結合への作用と関係のない効果をもっていることになる。つまりこの化合物による FRET シグナルの減少は、目的とする SOD1-Derlin-1 結合阻害効果に寄与するものではないと考えられる (Fig. 3C)。そこで 2 次スクリーニングにおいては、Flag-SOD1 G93A と Derlin-1-HA の二分子 FRET と HA-SOD1-Flag の一分子 FRET を用いて、化合物の影響を Z score により比較した。これより、二分子 FRET にも一分子 FRET にも同様に影響を与える化合物は排除することで、31 個の候補化合物を得た (Fig. 3G)。

<パイロットスクリーニング: 3 次>

さらに 3 次スクリーニングでは、化合物による結合阻害効果の濃度依存性の検討を行った。候補化合物 31 個の 50 μM におけるそれぞれの阻害率をみると、最大では 90% を超える化合物がある中で、20-30% 程度の阻害率の化合物も多かった。これはスクリーニング系の性質上、もともと結合している SOD1-Derlin-1 を後から解離させる必要があるため、結合阻害効果を十分示すためには、より高濃度の化合物が必要となっている可能性が考えられる。そこで、3 次スクリーニングでの化合物濃度は、FRET に影響を与えない DMSO 量を考慮した上で高濃度条件を設定することとし、最終 150 μM 、100 μM 、66 μM 、44 μM 、29 μM の 5 点 (150 μM から 1.5 倍希釈) の濃度をとった。そして得られた阻害率データから、候補として 14 化合物を得た (Fig. 3G)。

<大規模スクリーニング>

以上のパイロットスクリーニングを経て、SOD1-Derlin-1 結合を阻害する候補化合物のさらなる獲得を目指し、本学創薬機構が保有する残り約 15 万化合物に対する大規模化合物スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングは、384 ウェルプレートで 475 枚分の化合物を対象とし、最終化合物濃度は 50 μM 、化合物と細胞溶解液の反応条件は 4 $^{\circ}\text{C}$ over night で行った。反応条件は、パイロットスクリーニングの結果と今回のプレート数、実験計画を考慮した結果として上記の 1 点に絞った。各プレートにおける FRET シグナルは 3.38 から 4.83 までとなり、475 枚の平均は 3.78 であった。また Z' factor は 0.77 を下限として平均 0.86 となった (Fig. 3D)。以上より、このスクリーニングは非常に高い感度と精度をもって実施されたと考えられる。化合物の絞り込みには阻害率を用いることとし、15 %以上の阻害率を示した 1001 化合物を 2 次スクリーニングへと選出した (Fig. 3E)。

2 次スクリーニングでは、1 次スクリーニングと同じ化合物濃度と反応条件において、パイロットスクリーニング時と同様に、SOD1-Derlin-1 の二分子 FRET に対する再現性の検討と HA-SOD1-Flag による一分子 FRET を利用した偽陽性化合物の排除を行った。そして、SOD1-Derlin-1 結合の FRET 阻害率が 15 %以上かつ、HA-SOD1-Flag の FRET 阻害率が 15 %未満の 100 化合物に絞り込んだ (Fig. 3F)。

さらに 3 次スクリーニングでは、150 μM から 2 倍希釈で化合物濃度を 5 点振り、濃度依存的な化合物の阻害効果を検討した。これより、候補化合物として 63 個化合物を得た (Fig. 3G)。

共免疫沈降法による SOD1-Derlin-1 結合阻害効果の再評価

TR-FRET スクリーニングにおいて陽性となった、合わせて 77 個の候補化合物に関して、その結合阻害活性を FRET とは異なる系でも検出できるかを確認するため、共免疫沈降実験を行った (Fig. 3G)。まずは、FRET 系において細胞溶解液を化合物と反応させてその活性評価を行ってきたことから、HEK293A 細胞に Flag-SOD1 G93A と Derlin-1-HA を過剰発現させた細胞溶解液に最終濃度 100 μM となる各種化合物を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 16 時間転倒混和して反応させた。その後、抗 Flag 抗体ビーズによって免疫沈降したところ、いずれの化合物においても結合阻害を検出することはできなかった (データ未掲載)。検出系を変えたことで阻害効果がみられなくなった理由と

して、FRET に比べて共免疫沈降法は結合の減弱の検出感度が低かったために、FRET では検出される化合物の結合阻害効果が確認できない可能性が考えられた。また、共免疫沈降時の化合物に対して反応させている細胞溶解液中の SOD1、Derlin-1 濃度は、FRET アッセイ時のそれよりも高濃度であるため、化合物による結合阻害効果が減弱していることも予想される。そこで、化合物による SOD1-Derlin-1 結合阻害効率を上げ、共免疫沈降法により結合阻害を検出するため、Flag-SOD1 G93A と Derlin-1-HA を過剰発現させた細胞溶解液から、抗 Flag 抗体ビーズにより免疫沈降を行って SOD1-Derlin-1 複合体を精製し、その精製溶液に最終濃度 100 μM となるように各種化合物を添加するという方法をとった。その結果、12 化合物において SOD1 と Derlin-1 の結合阻害活性を確認することができた (Fig. 4A-E)。その中で、再現よく顕著な結合阻害活性がみられ、構造式上有望であると考えられた化合物である化合物 #56 に注目し、以下の実験を進めた (Fig. 5)。

#56 構造類似体の活性評価

まず、活性本体としての#56 の確からしさを再評価するため、市販されている#56 構造類似化合物 208 個について、各化合物の SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を FRET の系を用いて検討した。150 μM から 2 倍希釈で化合物濃度を 5 点振り、濃度依存的な化合物の阻害効果を検討したところ、37 化合物について阻害活性がみられた。これら化合物について、続いて共免疫沈降実験による結合阻害活性の確認を行った。Flag-SOD1 G93A と Derlin-1-HA を過剰発現させた細胞溶解液から、免疫沈降によって精製した SOD1-Derlin-1 複合体を含む溶液に 50 μM の各化合物を添加したところ、#56 そのものと同様に、共免疫沈降実験でも SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を示す化合物が存在していることが分かった (Fig. 6, Table 2)。このことから、#56 と類似構造を有する化合物が活性本体として SOD1-Derlin-1 結合に作用していると考えられた。さらに、化合物の濃度検討を重ねて共免疫沈降実験を行った結果、いくつかの#56 構造類似体が#56 よりも高い阻害活性を示すことが明らかとなった (Fig. 7A)。実際に、バンド強度とタンパク濃度の検量線を作成し、これら化合物の IC₅₀ 値を算出したところ、#56 は 23 μM 程度であったのに対し、#56-20 や#56-26 といった構造類似化合物では 10 μM を下回る値となった (Fig. 7B)。

当研究室ではすでに、SOD1 と Derlin-1 それぞれの結合領域をマッピングし、それ

ぞれ DBR 領域、CT4 領域として明らかにしている。そこで、全長同士のみならず、全長と結合領域の組み合わせや結合領域同士の組み合わせの SOD1-Derlin-1 結合に対し、#56 類似化合物が結合阻害活性を示すかどうか、各複合体の精製溶液に化合物を添加し、その影響を共免疫沈降実験により検討した。すると、#56 類似化合物はすべての組み合わせにおいて、SOD1-Derlin-1 結合を阻害することが明らかとなった (Fig. 8)。つまり、#56 構造類似体が SOD1 と Derlin-1 の結合領域同士の結合に対しても阻害活性を示したことから、その結合阻害様式はそれぞれの非結合領域に対するアロステリックな阻害ではなく、結合領域を直接ターゲットにしたものであることが示唆された。

#56 構造類似体の新規合成と活性評価

ここまで評価してきた#56 とその構造類似化合物について、細胞培養液中への添加によって細胞内の SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害できるかどうかを共免疫沈降実験によって検討したところ、活性を示す化合物は確認できなかった。この実験系の場合、すでに形成された SOD1-Derlin-1 複合体を解離させるだけではなく、細胞内で新規合成された SOD1 と Derlin-1 の結合をあらかじめ阻害できる可能性もあるため、細胞溶解液に対して作用させる場合より高い阻害効果を期待できる一方で、化合物の細胞膜透過性や細胞毒性、標的分子への指向性といった問題が存在する。

そこで続いて、上記構造類似体の評価から、#56 の基本骨格をもとに構造展開を行い、より SOD1-Derlin-1 結合に対する阻害活性が高く、細胞膜透過性を持った化合物を得ることを目指した。市販の#56 類似化合物の評価からは、明確な構造展開のヒントとなる傾向が得られていなかったため、ひとまずは複素芳香環部分 (Ar) を展開していくことで膜透過性を持つ化合物が得られないか検討を行った (Table 2、Fig. 9)。すると、新規 5 化合物のうち 1 化合物 (#56-40) について、細胞培養液中に化合物を添加することによっても結合阻害活性を示すことが確認できた (Fig. 10)。しかしながら、#56-40 は実験回ごとにその活性を示す濃度と細胞へのダメージを示す濃度が異なり、安定した濃度設定が困難な化合物であったため、さらに化合物の構造展開と活性評価を行い、より安定的に阻害活性がみられる化合物の獲得を目指した。その結果、2 級アミド構造から 3 級アミド構造へと構造展開した#56-59 が、再現よく顕著な SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を示す化合物として得られた (Fig. 11)。このように、

化合物の構造展開と活性評価を行うことにより、細胞レベルで SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を示す化合物の構造上の共通点が明らかになるとともに、さらなる活性増強を目指した合成展開が可能となった。

#56-59 による結合阻害活性の精査

結合阻害を検討するための変異型 SOD1 として、これまで ALS 病態発症に関与する代表的な変異型 SOD1 である SOD1 G93A を用いていたが、前述のように、先行研究により 122 種類の ALS 関連変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合することが明らかになっている。そこで、得られた化合物がこれら複数種類の変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害するかを細胞レベルでの共免疫沈降実験により検討した。以前の報告においては Derlin-1 CT4 との結合で評価していたが^[28]、今回は全長の Derlin-1 との結合を評価した。すると、CT4 と結合する 122 種類すべての変異型 SOD1 が Derlin-1 全長とも結合することが確認されると同時に、#56-59 がすべての変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害することが明らかとなった (Fig. 12A-H)。また、通常 SOD1 はホモダイマーを形成することが知られており、Derlin-1 は Derlin family 分子やその他 ERAD 複合体の構成分子と結合することが知られている。そこで、これらのタンパク質間相互作用に対する SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物の影響を確認するために共免疫沈降実験を行ったところ、#56-59 は SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する条件下において、SOD1 のダイマー化や Derlin-1 の複合体形成に対しては阻害活性を示さなかった (Fig. 13)。以上の結果から、得られた化合物が非特異的なタンパク質間相互作用阻害活性を持つのではなく、標的とする SOD1-Derlin-1 結合に選択性を有することが示唆された。

さらに、SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物の標的分子の同定に向けて、光反応性の官能基としてベンゾフェノンが付加したビオチン化#56-59 を用い、プルダウン実験を行った。ベンゾフェノンが付加することで、細胞内の標的分子と化合物が結合した際、UV 照射により、ベンゾフェノンの近傍に存在する標的分子との間で共有結合を形成させることが可能となる (Fig. 14A-C) ^[43,44]。そして、タンパク質のタグに対する抗体を用いてプルダウンを行い、免疫沈降されたタンパク質が化合物の標的分子であった場合には、そのタンパク質とほぼ同じ分子量の位置に、抗ビオチン抗体によるシグナルを検出できる一方で、化合物の標的分子ではなかった場合には、抗ビオチン抗体

により分子を検出することは難しいと考えられる (Fig. 14D)。空ベクター、あるいは Flag-SOD1 G93A か Derlin-1-Flag を発現させ、細胞培養液中に光反応性ビオチン化 #56-59 を添加したところ、抗ビオチン抗体により SOD1 と同じ分子量の位置に、ビオチンのシグナルが検出されることが分かった (Fig. 14E)。つまり、化合物が Derlin-1 ではなく、SOD1 を標的としてその結合阻害活性を発揮していることが示唆された。さらに、野生型 SOD1 と SOD1 G93A を比較すると、化合物が SOD1 G93A により嗜好性をもって結合していることが明らかとなった (Fig. 14F)。現在は、より詳細に標的分子としての変異型 SOD1 と化合物の相互作用について検討している段階であり、今後 SOD1 と化合物の共結晶解析を進めることを予定している。

SOD1-Derlin-1 結合阻害による ALS モデルマウスの病態改善効果の検討

最後に、ALS 病態における SOD1-Derlin-1 結合の重要性と、治療薬としての可能性を検証するため、ALS モデルマウスへ得られた結合阻害化合物を投与し、その病態改善効果の検討を行った。この場合、標的とする中枢神経系にて化合物を作用させる必要があるが、一般に薬剤を血流から中枢神経系へ到達させる際、血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) の透過性が問題となる。そこで、BBB 透過性の懸念を排除し、効果的に中枢神経系へ SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物を届けるために、直接脳脊髄液中に化合物を投与することを考えた。また、ALS 病態が晩発性・進行性であることをふまえ、持続的に一定濃度の化合物を投与することが、効果的な化合物の活性発揮に繋がると考えられた。そこで化合物の投与方法としては、オスモティックポンプを利用したマウス脳室内への持続投与を選択した^[45-48]。ALS モデルマウスとして雄の SOD1 G93A トランスジェニックマウスを用い、ALS 病態発症以前の 22 週齢から、脳室内へオスモティックポンプを利用して各化合物 (コントロール: DMSO, 1 mM #56-40, 3 mM #56-59) の持続投与を行うことで、マウスの運動機能と生存期間に影響がみられるかを検討した。ロータロッド試験に基づく、マウスの運動機能から定義した病態発症までの期間 (Onset) は、コントロール群に対して #56-40 投与群では差がみられない一方で、#56-59 投与群においては有意に発症までの期間が遅延した (Fig. 15A)。そして生存期間 (Survival) については、onset と同様、#56-40 投与群ではコントロール群と差がみられないのに対し、#56-59 投与群では、14 %ほどの、有意な生存期間の延長効果が明らかとなった (Fig. 15B)。

またこのとき、SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物による、ALS モデルマウスにおける運動神経細胞死への影響を確認するため、コントロール群の平均的な発症時期であった 31 週齢のマウス脊髄において、運動神経細胞をニッスル染色により検出した (Fig. 16A)。各化合物の投与マウス群における運動神経細胞数をカウントしたところ、#56-59 投与群において有意に運動神経細胞数が多いことが明らかとなった (Fig. 16B)。

以上の結果より、SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物が *in vivo* において運動神経細胞死を抑制し、ALS 病態の改善効果を示したと考えられる。

4. 考察

TR-FRET による結合評価を利用したスクリーニング系

大規模なスクリーニングを行う際には、感度や操作行程、スループット性を考慮した検出系の確立が非常に重要である。タンパク質間相互作用を検出するためには、共免疫沈降法や ELISA 法、表面プラズモン共鳴法などを利用した方法が知られているが、本研究において私は、TR-FRET を利用したタンパク質間相互作用の検出法に着目し^[42]、SOD1-Derlin-1 結合をハイスループットに検出する系を構築することで、大規模化合物スクリーニングを実施することに成功した。

本研究における解析で注目した化合物#56 は、SOD1 の Derlin-1 との結合領域に作用してその阻害活性を発揮することが示唆されている。一方で、スクリーニング系の特徴から考えると、全長同士の変異型 SOD1 と Derlin-1 を過剰発現させた細胞溶解液を用いたことから、それぞれの非結合領域に作用してアロステリックな結合阻害活性をもつ化合物を得ることも可能な系であると考えられる。つまり、本スクリーニングの候補化合物の中には、#56 とは阻害機序の異なる SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物が含まれている可能性が高い。一般に、低分子化合物による標的タンパク質への結合は局所的な部位に限られている。標的タンパク質の異なる部位に結合するいくつかの化合物が得られている場合、それらを組み合わせて高活性・高特異性の阻害剤を設計して合成するフラグメントベースドドラッグディスカバリー (Fragment based drug discovery: FBDD) という手法が知られている。本研究においても、得られた候補化合物の標的タンパク質を明らかにすることで、FBDD を利用した新たな化合物の合成という側面から、結合阻害化合物の獲得を目指すことも可能であると考えられる。

また、細胞溶解液を用いた結合評価アッセイ系の確立は、Derlin-1 のように精製が困難だと予想される膜タンパク質の全長での評価を可能にした。つまり本スクリーニング系は、膜タンパク質を標的分子として設定することができ、さらに膜タンパク質を含んだ PPI を標的とする化合物スクリーニングの可能性を広げるものとして期待される。

共免疫沈降法による化合物の結合阻害活性評価

TR-FRET スクリーニングで陽性となった 77 化合物のうち、精製 SOD1-Derlin-1

複合体を用いた共免疫沈降実験において陽性となった化合物は 12 個であった (Fig. 4A-E)。スクリーニング時と同様に、未精製な細胞溶解液を用いた場合にはいずれの化合物においても結合阻害を確認できなかったことから、TR-FRET 法が SOD1-Derlin-1 の結合・解離検出系として、共免疫沈降法に比べて感度が高い可能性がある。また、FRET シグナルは蛍光分子間の距離が離れたり配向性が変化したりすることで減弱するので、SOD1 と Derlin-1 が完全に解離していなくても陽性化合物となりうる。一方の共免疫沈降においては、複合体の構造やタンパク質間距離の変化が引き起こされていたとしても、SOD1 と Derlin-1 の結合状態が維持されたままであれば陽性とならない。FRET 法における阻害率の高い化合物と共免疫沈降法における陽性化合物との間に相関性がみられなかったことも、このような検出状態の差が影響していると考えられる。以上の理由から、FRET 法よりも共免疫沈降法のほうが陽性と判断できる化合物の数が少なくなると考えられ、化合物の絞り込みにおいて TR-FRET スクリーニングから共免疫沈降実験による再評価を行うというステップが妥当であったと判断した。

化合物の合成展開と細胞内 SOD1-Derlin-1 結合の阻害活性

スクリーニングで得られた#56 または市販の#56 類似化合物は、細胞培養液中への化合物添加によって細胞内の SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害することはできなかった。特に精製 SOD1-Derlin-1 複合体に対する結合阻害活性が高かった#56-20 や #56-26 といった構造類似体も、細胞内の SOD1-Derlin-1 結合に対する阻害活性はみられなかった。この点に関して、精製溶液を用いた共免疫沈降法では陽性化合物となっても、細胞毒性がある化合物や膜透過性をもたない化合物、また標的指向性が低い化合物であった場合などには、添加濃度の限界や標的の SOD1-Derlin-1 複合体以外の様々な分子の存在・細胞内局在の問題といった点から、細胞内の SOD1-Derlin-1 結合に対して陽性とならない可能性が考えられる。本研究において#56 やその類似化合物については、共同研究による合成展開を行うことで、細胞培養液への添加により活性を示す化合物の獲得を目指すという方針をとった。実際に最初の新規合成化合物の 5 種類のうち、#56-40 という 1 化合物において細胞内の SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を確認することができたため、活性と構造の情報を得ることも期待しながら、さらなる結合阻害化合物の新規合成を継続した。そこで新たに有望な結合阻害化合物として

#56-59 を得ることに成功し、さらには 3 級アミドという構造上の特徴を明らかにすることができた。今後のさらなる活性評価と合成展開の発展により、いっそう高活性な阻害化合物の合成が進むことが期待される。実際に、ALS モデルマウスへの投与により #56-59 が ALS 病態改善効果を示すことが明らかになったことから、本研究方針が有効であったと考えられる。

一方、精製溶液を使用したアッセイでは、すでに結合している SOD1-Derlin-1 複合体を解離させる必要があるため、化合物濃度の高さや結合阻害活性の強さが求められると予想される。しかしながら、細胞培養時の培地中に化合物を添加する場合には、細胞内で活性を發揮できる化合物であれば、細胞内の結合状態にない SOD1 や Derlin-1 に対してあらかじめ作用することで、効率的に SOD1-Derlin-1 結合を阻害することも可能となる。そのため、TR-FRET によるスクリーニングで陽性となった化合物のうち、精製溶液を用いた共免疫沈降法においては陰性となった化合物であっても、細胞培養液への添加によって阻害効果を示す可能性がある。さらに、複合体形成前の標的分子への作用が可能であることから、化合物濃度がより低い状態においても結合阻害効果を示すことが期待できる。つまり、TR-FRET スクリーニング陽性化合物について、細胞培養液添加による共免疫沈降実験を行い、そこで陽性であった化合物に注目することも一つの方針であると考えられた。実際に、77 化合物について評価を行ったところ、精製溶液を用いた場合には陽性とならなかった 7 化合物が結合阻害活性を示すことが明らかとなっている (データ未掲載)。そのうち最も顕著な活性を示した 1 化合物に注目したが、残念ながら再合成による活性評価の結果、活性本体の構造を明らかにすることができず、おそらくは当該化合物合成過程における不純物・混合物等による作用であることが考えられたため、現在は追跡を中止している。しかしながらその他 6 化合物について、#56 とは異なる阻害様式を示す化合物である可能性は残されており、今後の解析対象であると考えられる。

#56-59 の標的分子と特異性

光反応性ビオチン化 #56-59 を利用したプルダウンアッセイにより、#56-59 の標的分子は Derlin-1 ではなく SOD1 であることが示唆された (Fig. 14E)。また、野生型 SOD1 と SOD1 G93A を比較したところ、SOD1 G93A の方により嗜好性を持っていたことから、野生型構造とは異なる変異型構造の SOD1 に化合物が結合してその活性

を發揮している可能性が考えられる (Fig. 14F)。精製 SOD1-Derlin-1 複合体に対する共免疫沈降実験の結果から、#56 類似化合物は SOD1 の DBR に作用することが示唆されており、この領域は野生型構造では内部に隠され、変異型構造では外部環境に露出することが明らかとなっている (Fig. 8) [28]。以上の結果から、化合物の阻害活性は、少なくとも部分的には野生型構造では立体構造上内側に隠れている DBR に結合することで發揮されるために、野生型 SOD1 よりも変異型 SOD1 への嗜好性が高くなっていると予想される。

#56-59 は、野生型 SOD1 のダイマー化や Derlin-1 複合体形成には影響を与えなかったことから、非特異的な PPI 阻害剤ではないと考えられる (Fig. 13)。しかしながら、変異型 SOD1 が標的である可能性が示唆されたことを考えると、変異型 SOD1 と結合することが知られている Derlin-1 以外のタンパク質と変異型 SOD1 の結合に関しては、その結合が SOD1 の DBR 領域を介したものであれば得られた化合物により結合が阻害される可能性も想定される。報告されている結合は、ALS 病態への関与が示唆される異常な PPI に分類されるものであり、これらの PPI を阻害することはその毒性軽減に繋がる可能性も考えられる。本化合物が SOD1-Derlin-1 結合にどの程度の特異性を有しているか、変異型 SOD1 との結合タンパク質に注目した結合阻害アッセイを行うことで今後明らかにしていきたい。

細胞内 SOD1-Derlin-1 結合に作用する化合物

本研究では、細胞内の SOD1-Derlin-1 結合を阻害する化合物として #56-40 と #56-59 を得て、ALS モデルマウスへの投与実験を行った。各化合物は、HEK293A 細胞において結合阻害が確認できる濃度を参考に投与濃度設定を行ったが、#56-40 に関しては実験回ごとに活性と細胞毒性がみられる濃度が異なり、有効濃度の範囲が非常に狭い化合物であるという問題点があった (Fig. 10, 11)。ALS モデルマウスへの投与においてコントロール群と有意な差がみられなかったことは、この濃度設定の困難さに原因があったと予想される。より最適な化合物濃度での投与を行うことで、#56-40 による病態改善効果がみられる可能性があると考えている。一方の #56-59 に関しては、細胞内の SOD1-Derlin-1 結合を再現よく阻害する化合物であり、ALS モデルマウスの病態を有意に改善することが示された (Fig. 15, 16)。本研究においては、投与時期と投与濃度を 1 点ずつのみでしか検討できなかったが、条件検討によりさら

なる効果の増強も期待できると考えている。また、#56-59 が安定的に細胞内で活性を示したことから、その構造に注目して合成展開を続けたところ、3 級アミド構造を有することが活性発揮に重要であることが明らかとなってきた。現在までに#56-59 よりも高活性な化合物がいくつか得られており、これらを用いて *in vivo* アッセイを行うことにより、さらに ALS 治療薬としての候補化合物を見出すことが可能である。

ALS 研究における SOD1-Derlin-1 結合阻害の意義

これまで、SOD1 を対象とした ALS 研究が数多く行われてきたが、代表的な 1 種類あるいは数種類の変異型 SOD1 を用いた解析が中心であった。当研究室では先行研究において、ALS 関連変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を介した小胞体ストレスが運動神経細胞死を誘導するという ALS 発症メカニズムを報告した^[20,28]。さらに 2012 年当時に報告されていた 130 種類もの ALS 関連変異型 SOD1 について解析を行い、病態との関連性が希薄な変異を除いたすべての変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合するという共通の現象を明らかにしている^[28]。つまり、様々な変異型 SOD1 による細胞毒性を、Derlin-1 との結合能の獲得という共通のメカニズムで説明するという点で極めて興味深く、SOD1-Derlin-1 結合が SOD1 変異によるすべての ALS の治療標的となる可能性を示唆している。本研究により、実際に SOD1-Derlin-1 結合を標的とした阻害化合物が得られたことで、ALS 発症機構における SOD1-Derlin-1 結合を介した小胞体ストレスの関与を、低分子化合物という実験ツールとしての使用価値が高い阻害剤によって確立することができると考えられる。ALS モデルマウスの脊髄中において、化合物投与により実際に SOD1-Derlin-1 結合が減弱しているかについてと同時に、小胞体ストレスが軽減しているかについて、今後引き続き解析を行う予定である。

また SOD1 遺伝子変異をもつヒト ALS 患者の B 細胞において、内在性の SOD1 が Derlin-1 と結合していることが明らかになったことから^[28]、ALS の発症メカニズムに SOD1 と Derlin-1 の結合が関与する可能性が強く示唆されている。これらのことから、SOD1-Derlin-1 結合を阻害する低分子化合物は、ALS の治療薬候補として有力であると考えられる。

また近年、SOD1 遺伝子変異によらない SALS において、構造変化した野生型 SOD1 の運動神経細胞死への関与が示唆されており^[49]、SALS 患者由来のアストロサイトにおける野生型 SOD1 が、非自律的な運動神経細胞死に必要であることも報告されてい

る^[50]。さらに、ALS 原因因子として知られる変異型 FUS や TDP-43 によって、野生型 SOD1 が変異型様構造をとることも報告された^[51]。さらに当研究室の最近の研究により、亜鉛枯渇条件において野生型 SOD1 が配位した亜鉛を失うことで構造変化して Derlin-1 と結合し、小胞体ストレスを誘導することを見出した^[52]。これらの事実には、SOD1 遺伝子変異をもたない ALS 患者の病態発症においても、野生型 SOD1 が他の遺伝子変異や環境要因などの SOD1 遺伝子変異以外の要因によって構造変化を起こして Derlin-1 との結合能を獲得し、SOD1-Derlin-1 結合を介した運動神経細胞死を誘導している可能性を示唆している。つまり、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する低分子化合物は、SOD1 遺伝子変異による ALS だけでなく、孤発性を含むより広い ALS の治療につながる可能性を秘めていると考えられる。これまでに ALS の原因遺伝子として上述の TDP-43 や FUS/TLS などが知られている他^[53-55]、近年では OPTN や PFN1、C9ORF72 に続いて TBK1 など約 20 種類の原因遺伝子が報告されている^[56-62]。今後は、このような SOD1 遺伝子に変異が存在しない FALS や SALS の病態に、野生型 SOD1 が変異型様構造をとることによる SOD1-Derlin-1 結合が関与しているかを検討する必要がある。

ALS 治療薬としての可能性

前述の通り、ALS には明確な分子基盤に基づく治療法が存在していない。現在までに ALS 治療薬として承認されているリルゾールは、グルタミン酸放出抑制による神経保護作用を有し、2~3 ヶ月の延命効果をもたらすことが報告された^[2]。しかしながらその効果は確実なものではなく、また神経保護の作用機序は明らかでない。ALS モデルマウスにおいては、発症以前からの経口投与により、コントロール群と比べて 7.5 %程度の寿命延長効果が報告されている^[63]。また、現在臨床試験中の治療薬候補である肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) については、ALS モデルラットにおいて、発症後から髄腔内への持続投与により、寿命が約 7 %延長することが報告されている^[64]。こういった効果を示す化合物や栄養因子が ALS 治療薬、あるいは治療薬候補とされているのが、ALS 治療の現状である。このような中で、本研究において得られた SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物は、発症前からの投与により SOD1 G93A トランスジェニックマウスの発症時期の遅延と約 14 %の生存期間の延長効果を示した。つまり本化合物は、ALS 治療薬候補としての素質を十分に兼ね備えている

と考えられる。

過去 20 年間にわたり、数多くの ALS 治療薬候補が臨床試験へと進められてきた^[65]。しかしながら、現在までに承認まで至った化合物は 2 種類のみである。前臨床試験のモデル動物を用いたアッセイでは有効性が確認される一方で、臨床試験ではその活性が認められない原因の 1 つとして、ヒトとモデル動物との種間の差が影響している可能性が指摘されている。近年、この点を克服するために ALS 患者由来のヒト iPS 細胞を利用したアッセイ系の有用性が唱えられ、ALS モデルとして用いた例が報告されているが^[66,67]、どこまで生体内の環境を模倣できているか、どの程度安定した系であるかについてはまだ議論の余地が残されている。また、ALS 治療薬候補の多くはその作用機序・分子機構が不明瞭なまま臨床試験が行われている点も、確かな有効性が確認できない原因であると考えられる。本研究では、これまでに当研究室で明らかにした SOD1 と Derlin-1 の結合というほぼすべての変異型 SOD1 に共通する現象を基に、いまだ存在しない明確な分子基盤に基づく ALS 治療薬の開発を目指し、SOD1-Derlin-1 を標的とした結合阻害化合物を得ている。このことから、SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物による ALS 治療への期待は大きいと考える。

5. 総括

本研究において私は、

1. FRET シグナルを指標とした、ハイスループットな新規 SOD1-Derlin-1 結合評価系を確立した。
2. 約 16 万化合物を対象とした大規模な化合物スクリーニングを行い、SOD1-Derlin-1 結合を阻害する候補化合物として 77 化合物を得た。
3. 共免疫沈降法による化合物の活性評価により、12 個の陽性化合物を得た。
4. 化合物の合成展開と活性評価を経て、細胞培養時に培地へ化合物を添加することで SOD1-Derlin-1 結合を阻害する新規化合物を得た。
5. ALS モデルマウスへの結合阻害化合物投与により、ALS 病態が発症するまでの期間と生存期間に有意な延長効果がみられることを明らかにした。

以上の結果は、低分子化合物による PPI 阻害の新たな一例を提示するとともに、ALS 発症メカニズムにおける SOD1-Derlin-1 結合の重要性と、新たな ALS 治療法開発の可能性を示すものであると考える。今後、結合阻害様式の詳細な解析と化合物の物性評価により標的指向性の向上を目指し、世界初の分子標的 ALS 治療薬の誕生につなげたい。

6. 文献

- 1 Cleveland, D. W. & Rothstein, J. D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**, 806-819, (2001).
- 2 Bensimon, G., Lacomblez, L. & Meininger, V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* **330**, 585-591, (1994).
- 3 Miller, R. G. *et al.* Clinical trials of riluzole in patients with ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology* **47**, S86-90; discussion S90-82, (1996).
- 4 Yoshino, H. & Kimura, A. Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotroph Lateral Scler* **7**, 241-245, (2006).
- 5 Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62, (1993).
- 6 Reaume, A. G. *et al.* Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* **13**, 43-47, (1996).
- 7 Gurney, M. E. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-1775, (1994).
- 8 Bruijn, L. I. *et al.* ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **18**, 327-338, (1997).
- 9 Bruijn, L. I. *et al.* Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* **281**, 1851-1854, (1998).
- 10 Cleveland, D. W., Laing, N., Hulse, P. V. & Brown, R. H., Jr. Toxic mutants

- in Charcot's sclerosis. *Nature* **378**, 342-343, (1995).
- 11 Boillee, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D. W. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**, 39-59, (2006).
- 12 Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* **187**, 761-772, (2009).
- 13 Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**, 451-454, (2000).
- 14 Homma, K., Katagiri, K., Nishitoh, H. & Ichijo, H. Targeting ASK1 in ER stress-related neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets* **13**, 653-664, (2009).
- 15 Atkin, J. D. *et al.* Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* **281**, 30152-30165, (2006).
- 16 Kikuchi, H. *et al.* Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6025-6030, (2006).
- 17 Tobisawa, S. *et al.* Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 496-503, (2003).
- 18 Ito, Y. *et al.* Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol Dis* **36**, 470-476, (2009).
- 19 Atkin, J. D. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **30**, 400-407, (2008).
- 20 Nishitoh, H. *et al.* ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* **22**, 1451-1464, (2008).
- 21 Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. & Sommer, T. ERAD: the long road to

- destruction. *Nat Cell Biol* **7**, 766-772, (2005).
- 22 Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 246-255, (2002).
- 23 Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D. & Rapoport, T. A. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**, 841-847, (2004).
- 24 Lilley, B. N. & Ploegh, H. L. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834-840, (2004).
- 25 Oda, Y. *et al.* Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* **172**, 383-393, (2006).
- 26 Lilley, B. N. & Ploegh, H. L. Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14296-14301, (2005).
- 27 Ye, Y. *et al.* Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14132-14138, (2005).
- 28 Fujisawa, T. *et al.* A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Ann Neurol* **72**, 739-749, (2012).
- 29 Fujisawa, T. *et al.* A systematic immunoprecipitation approach reinforces the concept of common conformational alterations in amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Neurobiol Dis* **82**, 478-486, (2015).
- 30 Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 727-730, (2002).
- 31 Moreira, I. S., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Hot spots--a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* **68**, 803-812, (2007).
- 32 Wells, J. A. & McClendon, C. L. Reaching for high-hanging fruit in drug

- discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **450**, 1001-1009, (2007).
- 33 Arkin, M. R. & Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 301-317, (2004).
- 34 Kussie, P. H. *et al.* Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**, 948-953, (1996).
- 35 Ding, K. *et al.* Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc* **127**, 10130-10131, (2005).
- 36 Vassilev, L. T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848, (2004).
- 37 Graves, B. *et al.* Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11788-11793, (2012).
- 38 Oltersdorf, T. *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677-681, (2005).
- 39 Tse, C. *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* **68**, 3421-3428, (2008).
- 40 Winn, M. *et al.* Discovery of novel p-arylthio cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. 4. Structure-activity relationship of substituents on the benzene ring of the cinnamide. *J Med Chem* **44**, 4393-4403, (2001).
- 41 McMillan, K. *et al.* Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1506-1511, (2000).
- 42 Degorce, F. *et al.* HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics* **3**, 22-32, (2009).
- 43 Jung, Y. *et al.* Photoactivable antibody binding protein: site-selective and covalent coupling of antibody. *Anal Chem* **81**, 936-942, (2009).
- 44 Lee, S. *et al.* A small molecule binding HMGB1 and HMGB2 inhibits

- microglia-mediated neuroinflammation. *Nat Chem Biol* **10**, 1055-1060, (2014).
- 45 DeVos, S. L. & Miller, T. M. Direct intraventricular delivery of drugs to the rodent central nervous system. *J Vis Exp*, e50326, (2013).
- 46 Storkebaum, E. *et al.* Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* **8**, 85-92, (2005).
- 47 Haji, N. *et al.* TNF-alpha-mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* **237**, 296-303, (2012).
- 48 Audet, J. N., Gowing, G., Paradis, R., Soucy, G. & Julien, J. P. Ablation of proliferating cells in the CNS exacerbates motor neuron disease caused by mutant superoxide dismutase. *PLoS One* **7**, e34932, (2012).
- 49 Bosco, D. A. *et al.* Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* **13**, 1396-1403, (2010).
- 50 Haidet-Phillips, A. M. *et al.* Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* **29**, 824-828, (2011).
- 51 Pokrishevsky, E. *et al.* Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **7**, e35050, (2012).
- 52 Homma, K. *et al.* SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol Cell* **52**, 75-86, (2013).
- 53 Arai, T. *et al.* TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 602-611, (2006).
- 54 Kwiatkowski, T. J., Jr. *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**, 1205-1208, (2009).
- 55 Vance, C. *et al.* Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**, 1208-1211,

- (2009).
- 56 Maruyama, H. *et al.* Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**, 223-226, (2010).
- 57 Wu, C. H. *et al.* Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **488**, 499-503, (2012).
- 58 DeJesus-Hernandez, M. *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245-256, (2011).
- 59 Renton, A. E. *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257-268, (2011).
- 60 Cirulli, E. T. *et al.* Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* **347**, 1436-1441, (2015).
- 61 Freischmidt, A. *et al.* Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* **18**, 631-636, (2015).
- 62 Renton, A. E., Chio, A. & Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* **17**, 17-23, (2014).
- 63 Del Signore, S. J. *et al.* Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph Lateral Scler* **10**, 85-94, (2009).
- 64 Ishigaki, A. *et al.* Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**, 1037-1044, (2007).
- 65 Zhu, Y. *et al.* Neuroprotective agents target molecular mechanisms of disease in ALS. *Drug Discov Today* **20**, 65-75, (2015).
- 66 Dimos, J. T. *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**, 1218-1221, (2008).
- 67 Egawa, N. *et al.* Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* **4**, 145ra104, (2012).

7. 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました、
東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 一條 秀憲 教授
に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導ならびに多くのご助言とご協力をいただき、研究
生活を支えていただきました、
東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 本間 謙吾 特任助教
に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くのご助言、ご協力をいただきました、
東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 名黒 功 講師
同 関根 (村上) 史織 助教
同 服部 一輝 特任助教
同 渡邊 謙吾 学振特別研究員
宮崎大学医学部 機能制御学講座機能生化学分野 西頭 英起 教授
同 門脇 寿枝 助教

Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine,
University of Oxford 藤澤 貴央 博士
に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、化合物の合成展開や新規化合物の創出を行っていただき、ま
た有機化学の面から多くのご助言とご協力をいただきました、
名古屋市立大学大学院薬学研究科 精密有機反応学分野 樋口 恒彦 教授
名古屋大学大学院創薬科学研究科 天然物化学分野 横島 聡 准教授
に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験機器や化合物の使用を快諾していただき、さらに貴重な
ご助言と多大なご協力をいただきました、

東京大学創薬機構 長野 哲雄 名誉教授

同 岡部 隆義 特任教授

同 小島 宏建 特任教授

同 峰岸 泉 特任研究員

同 機構員の皆様

に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、ALS モデルマウスに対する化合物の脳室内持続投与実験に関して、快くサポートしていただきました、

東京大学大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 池谷 裕二 教授

に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始温かいご助言、ご協力をいただきました、

東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 高橋 寛光 くん、中島 勇祐 くん、
林 裕輝くん、坪田 充司 くん、木田 将義 くん

に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、研究室での生活を温かく見守り、また様々な面から支えていただきました、

東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 巽 圭子 学術支援専門職員

同 教室員の皆様

に心より感謝いたします。

研究生活を送る上で、常に良き理解者として寄り添い、たくさんの協力と心強い励ましとともに、最後まで日々のすべてを支えてくれた家族に心より感謝します。

最後に、研究生活を支えてくれた友人をはじめ、お世話になったすべての皆様に心より感謝いたします。

8. 図表

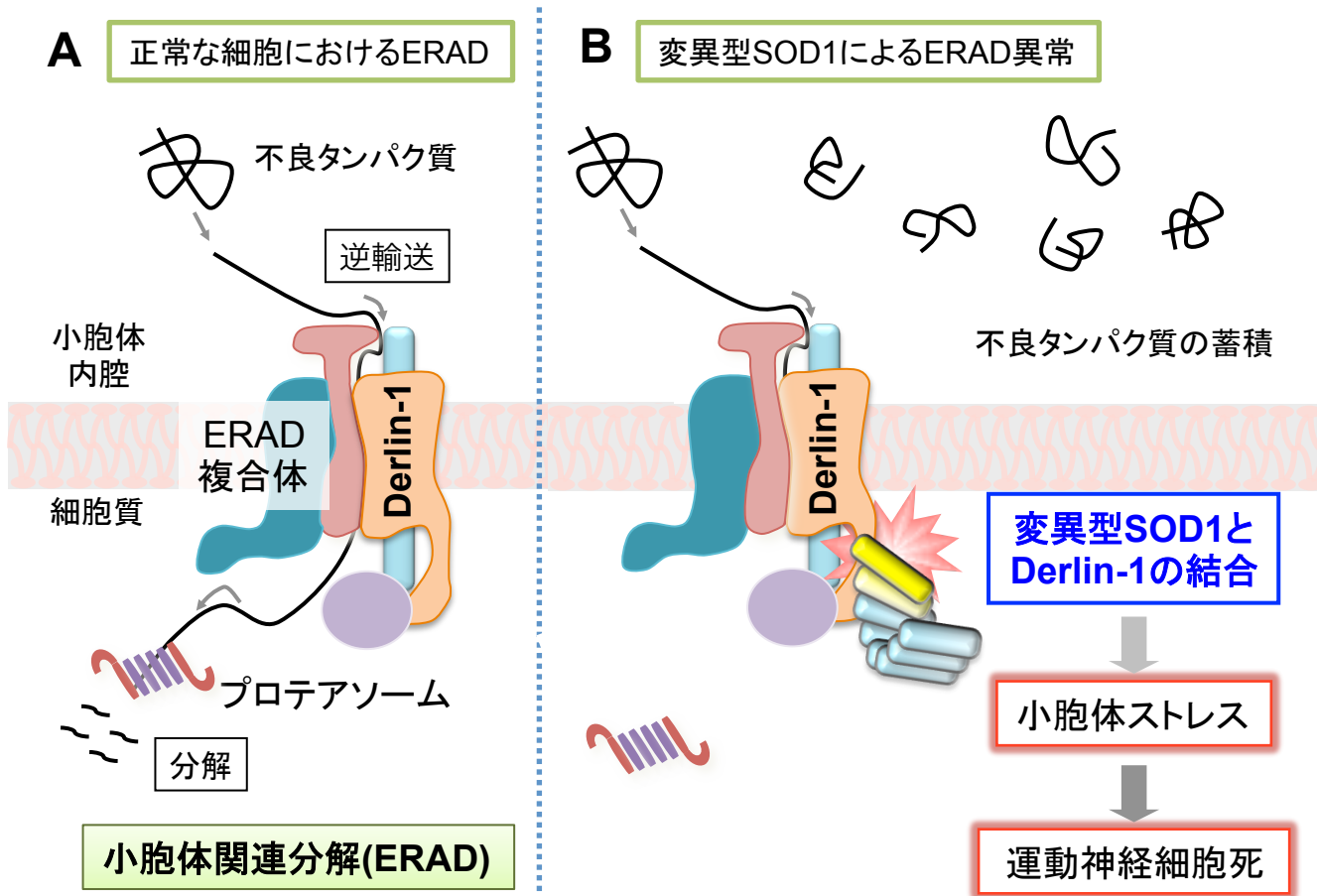
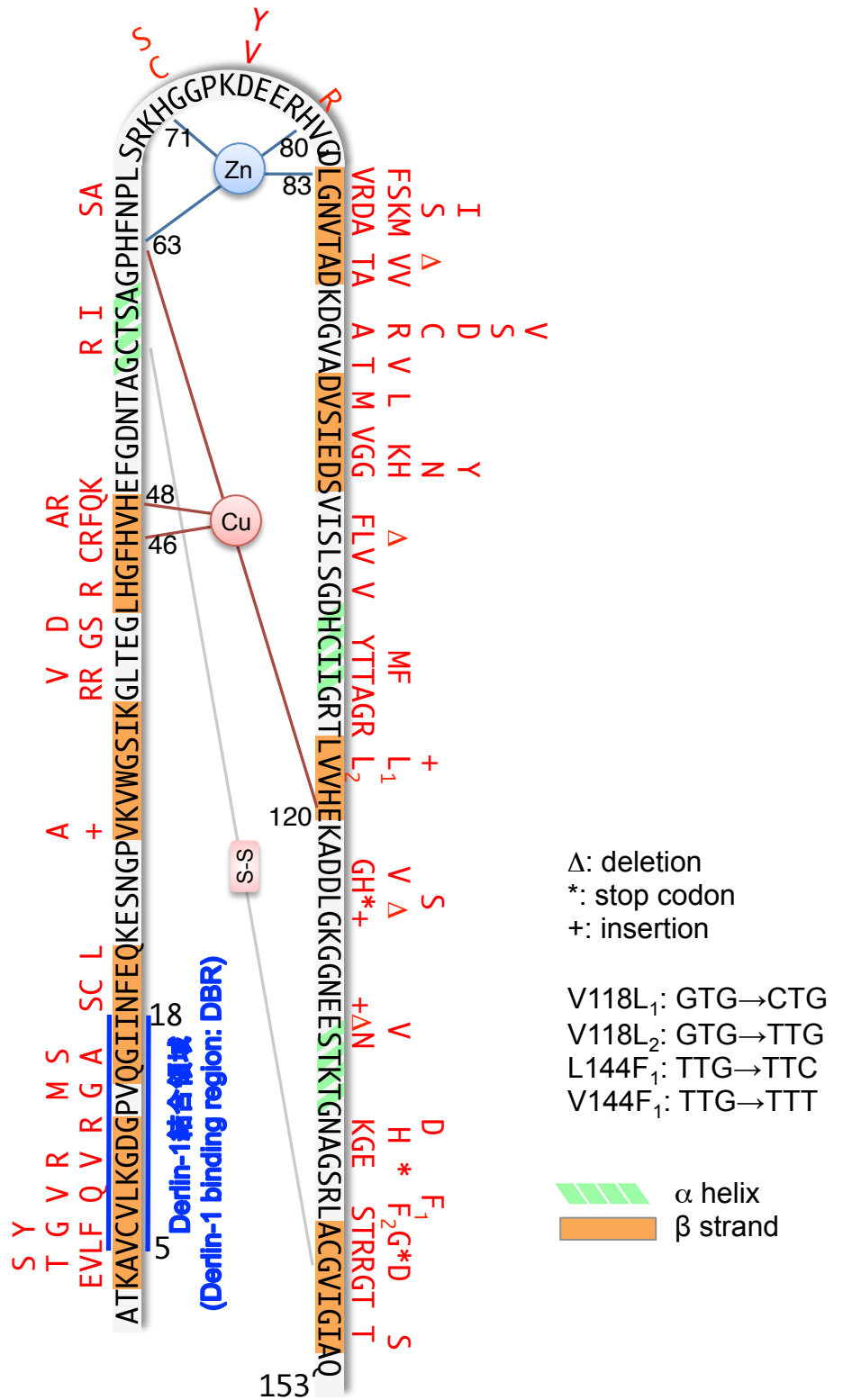


Fig. 1 変異型SOD1-Derlin-1結合による小胞体ストレスを介した運動神経細胞死誘導機構

- A** 正常な細胞ではERADにより小胞体内腔の不良タンパク質はDerlin-1を介して細胞質側へと逆輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系により分解される。
- B** ALS関連変異型SOD1存在下では、SOD1がDerlin-1と結合してERADを阻害する。これにより、不良タンパク質が小胞体内に蓄積することで小胞体ストレスが誘導され、運動神経細胞死が引き起こされる。

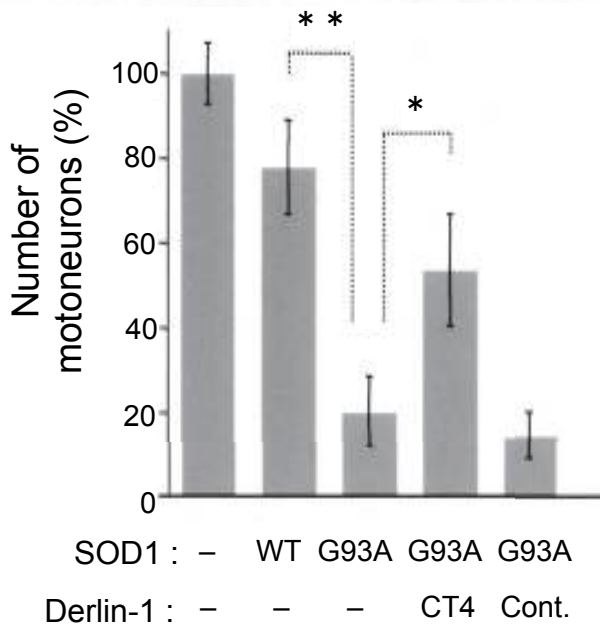
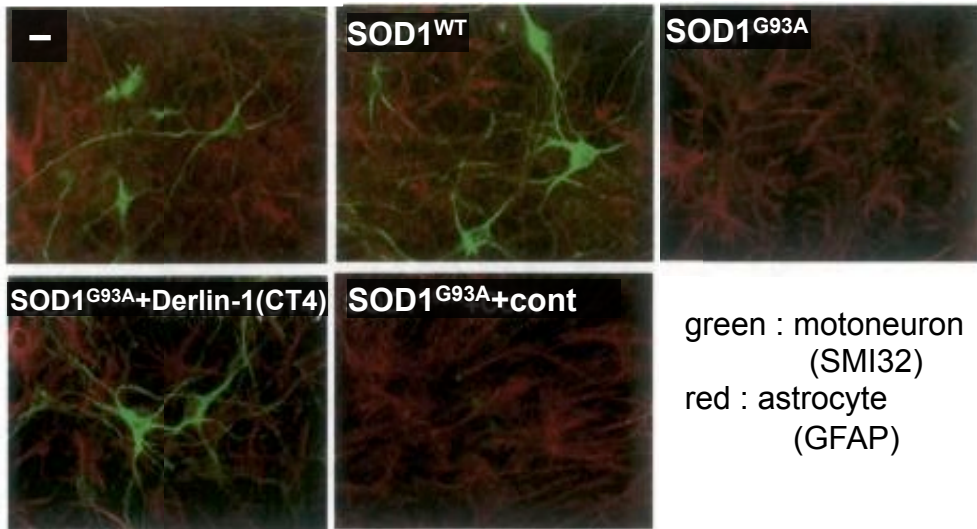
(Nishitoh et al. *Genes Dev.* 2008)

C



C 黒字でSOD1のアミノ酸配列を、赤字でDerlin-1に結合するFALS関連の124種類の変異（122種類の変異型SOD1）を示した。SOD1は153アミノ酸からなり、分子内でジスルフィド結合（S-S）を形成し、亜鉛イオン（Zn）と銅イオン（Cu）をそれぞれ一つずつ配位する。

D mice spinal cord cultures



• SOD1 G93A
→ 代表的な変異型 SOD1のひとつ

• Derlin-1(CT4)
→ SOD1-Derlin-1結合を阻害するペプチド

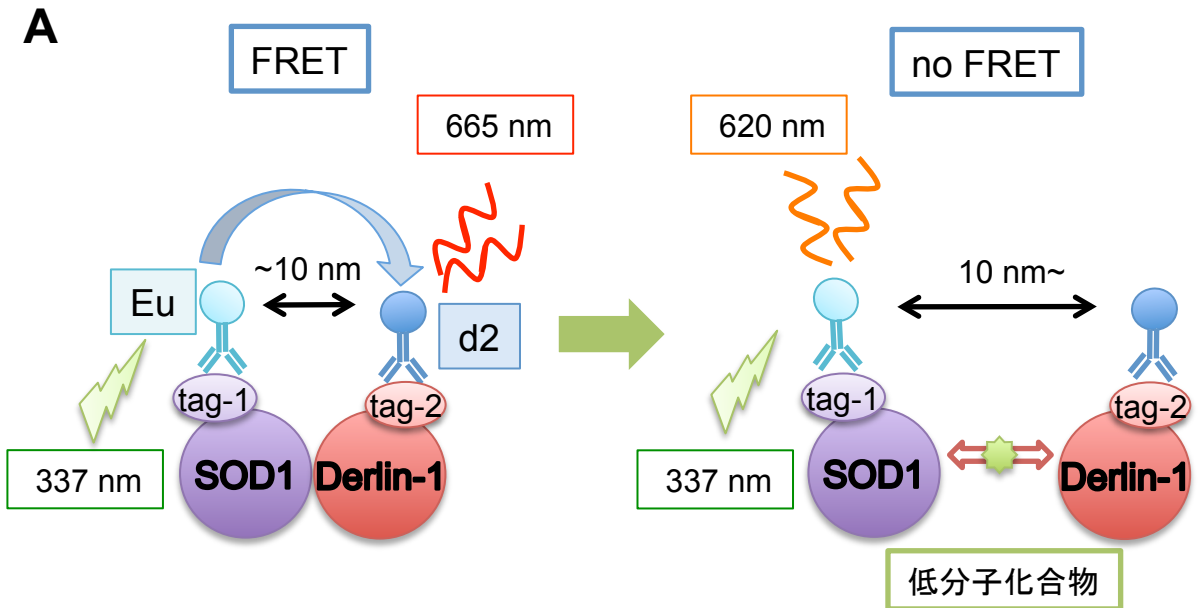
(Nishitoh et al. *Genes Dev.* 2008)

D 野生型マウス由来の初代運動神経細胞に上記の通りレンチウイルス感染 (72h) による過剰発現を行い、SMI32 (運動神経細胞) とGFAP (アストロサイト) を共染色した。変異型SOD1により誘導される運動神経細胞死が、SOD1とDerlin-1の結合阻害により抑制されることが明らかとなっている。

(上図) SMI32 (運動神経細胞) とGFAP (アストロサイト) の共染色像

(下図) SMI32ポジティブな運動神経細胞数の比較 (コントロールに対する比、mean±SE (n=3)) (*) P < 0.05、(**) P < 0.01

(Student's t-test)



• ドナー: Europium Cryptates conjugated antibody (Eu)
 ...長寿命蛍光分子(ms), ex. 337 nm; em. 620 nm

• アクセプター: d2 conjugated antibody (d2)
 ...短寿命蛍光分子(ns), maximum light output : 665 nm

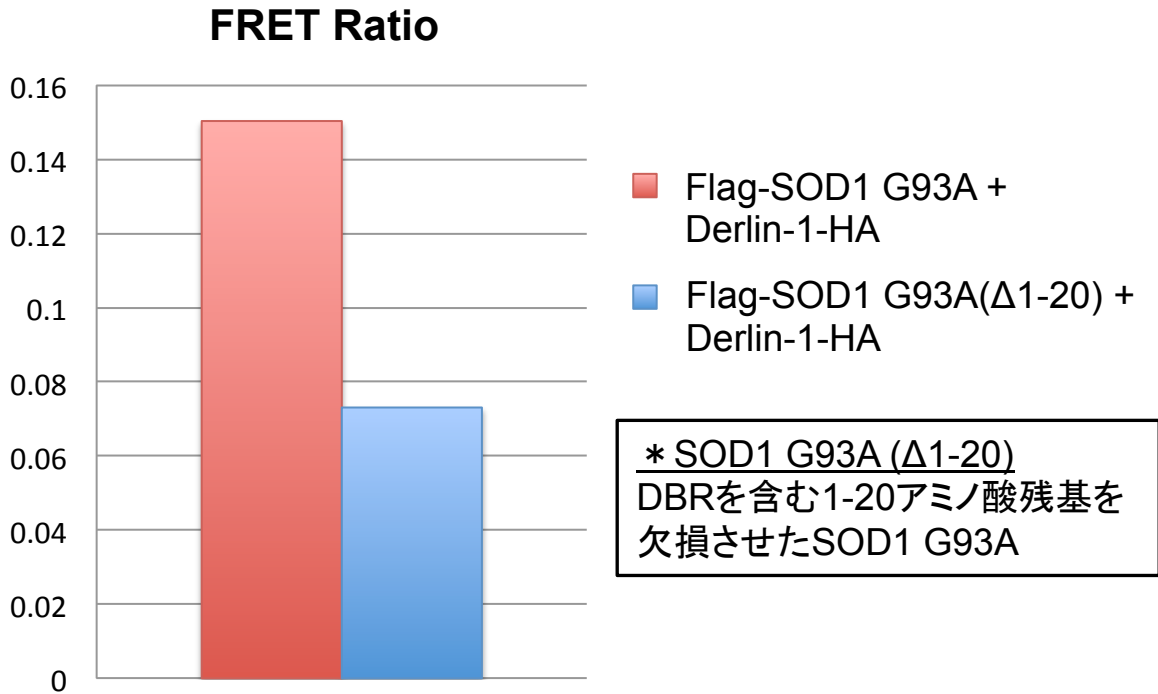
Fig. 2 TR-FRETを利用したSOD1-Derlin-1結合評価

A 各タンパク質のタグに対する蛍光分子標識抗体を用いることで、SOD1-Derlin-1結合をFRETシグナルの有無で判断する結合評価系の模式図を示した。

(左図) SOD1とDerlin-1が結合していると蛍光分子間の距離も近接し、FRETがおこる。

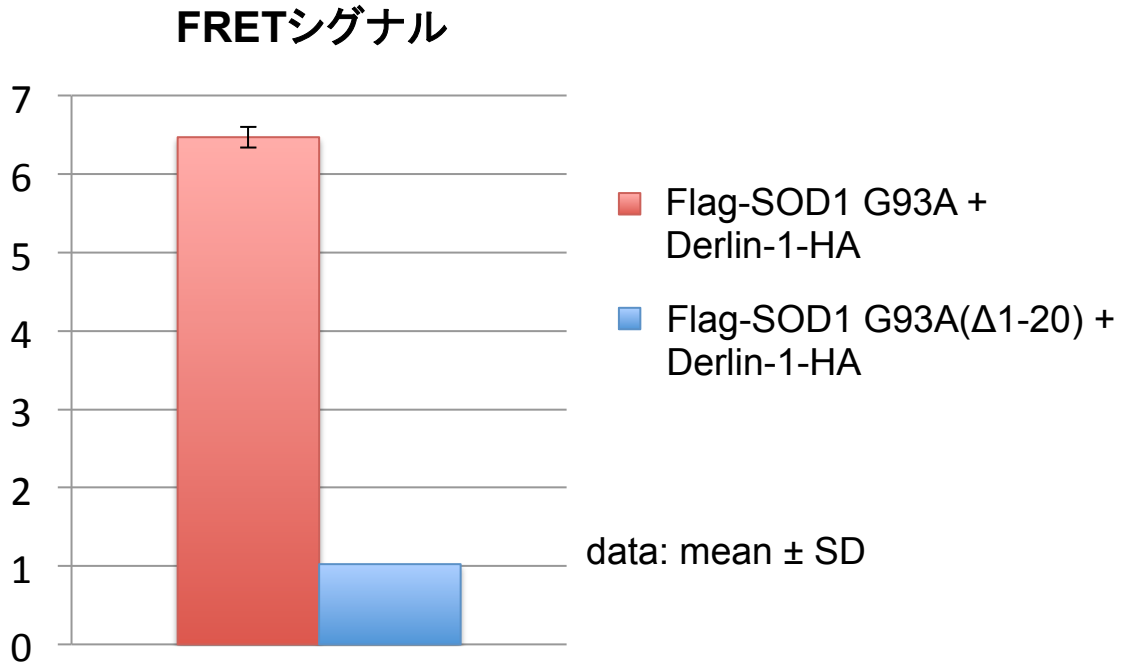
(右図) 低分子化合物によってSOD1-Derlin-1結合が阻害されるとFRETがおこらない。

B



B FRETによってSOD1とDerlin-1の結合を検出できるかどうかをFlag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAの組み合わせを用いて確認した。抗体としてanti-Flag-Euとanti-HA-d2を使用したところ、結合が起こらないFlag-SOD1 G93A (Δ1-20) とDerlin-1-HAの組み合わせに対して2倍程度のFRET Ratio値を得られ、FRETによるSOD1-Derlin-1結合評価が可能であると考えられた。

C



Z' factor = 0.91 (n=8)

- C** スクリーニングを行うことを考慮した上で条件を比較検討した結果、Flag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAにanti-Flag-Euとanti-HA-d2を使用する組み合わせを選出した。Flag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAによるFRETシグナルは約6倍となった。
また、Flag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAにanti-Flag-Euとanti-HA-d2を使用する組み合わせにおいてZ' factorが0.91となり、この系が十分スクリーニングに適していることが分かった。

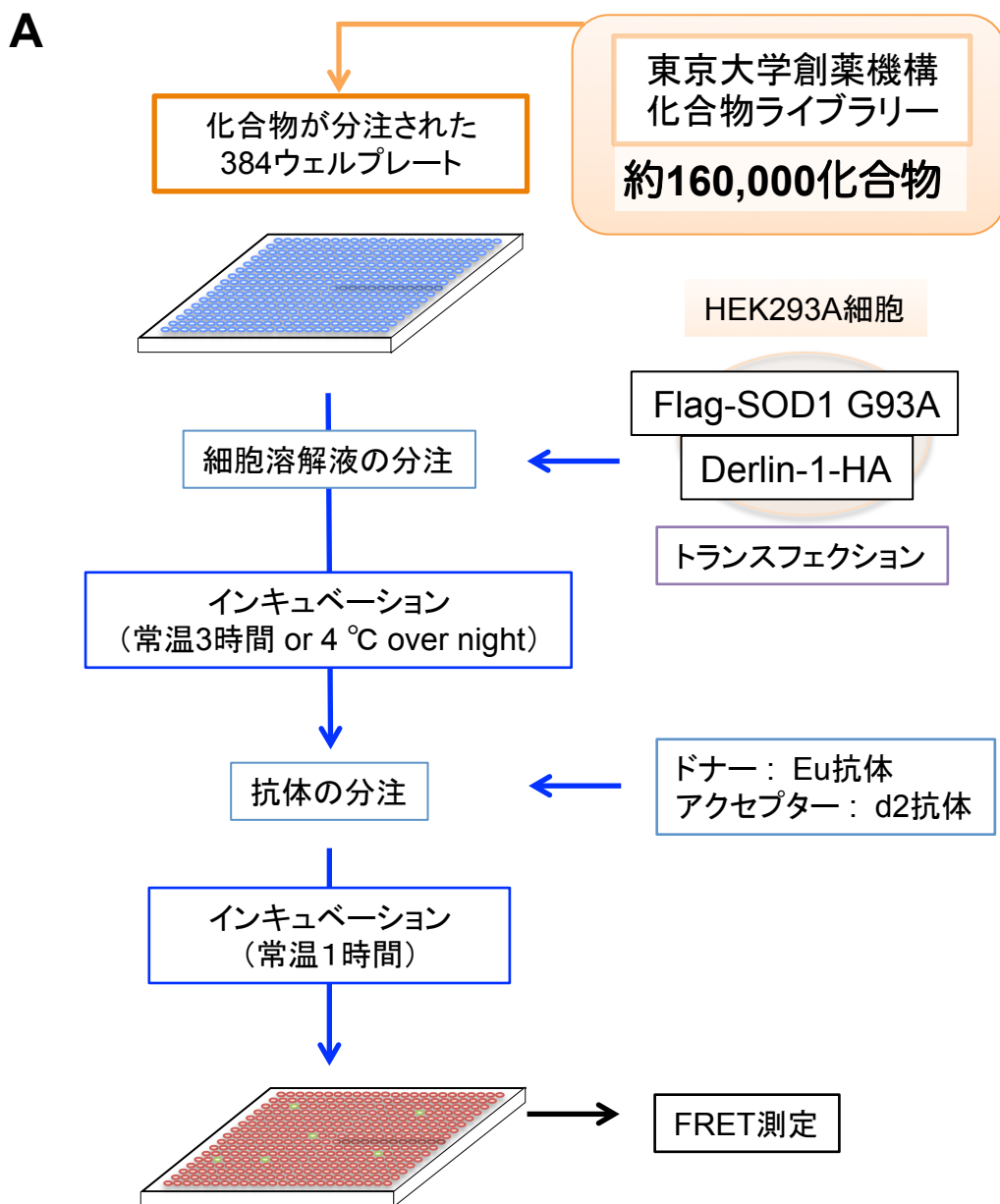
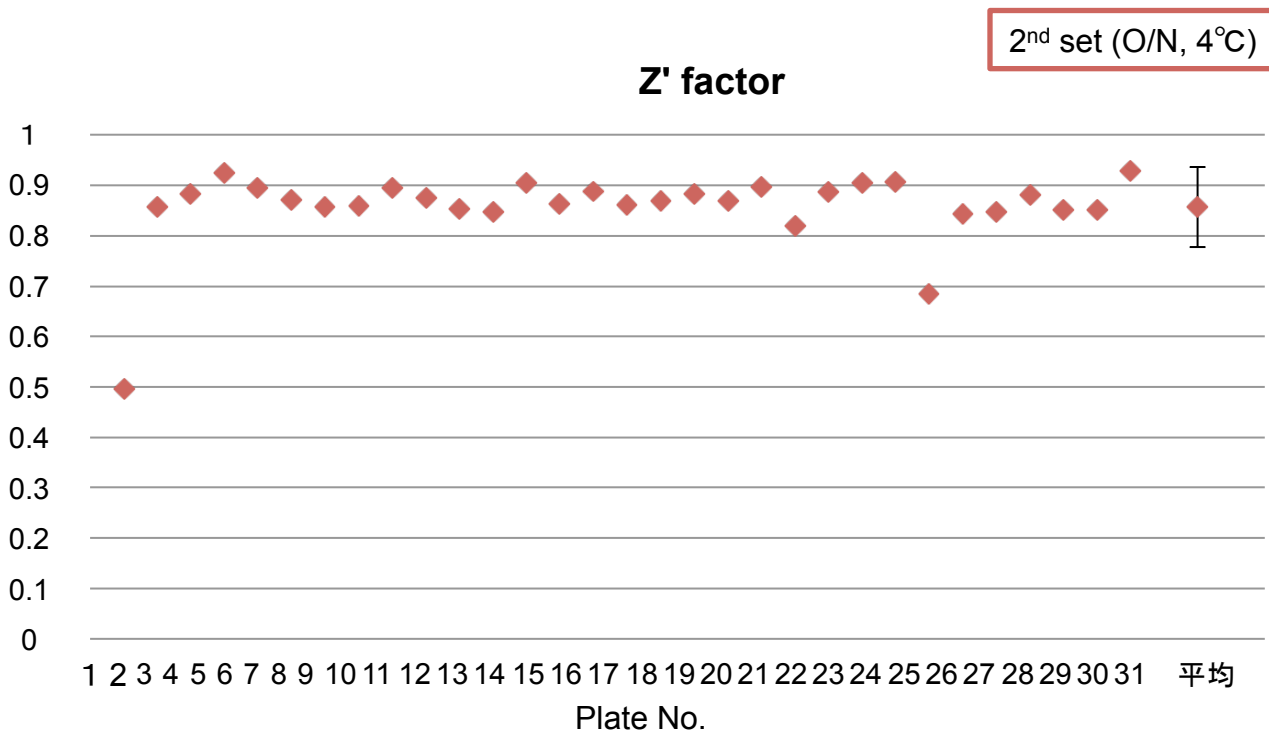
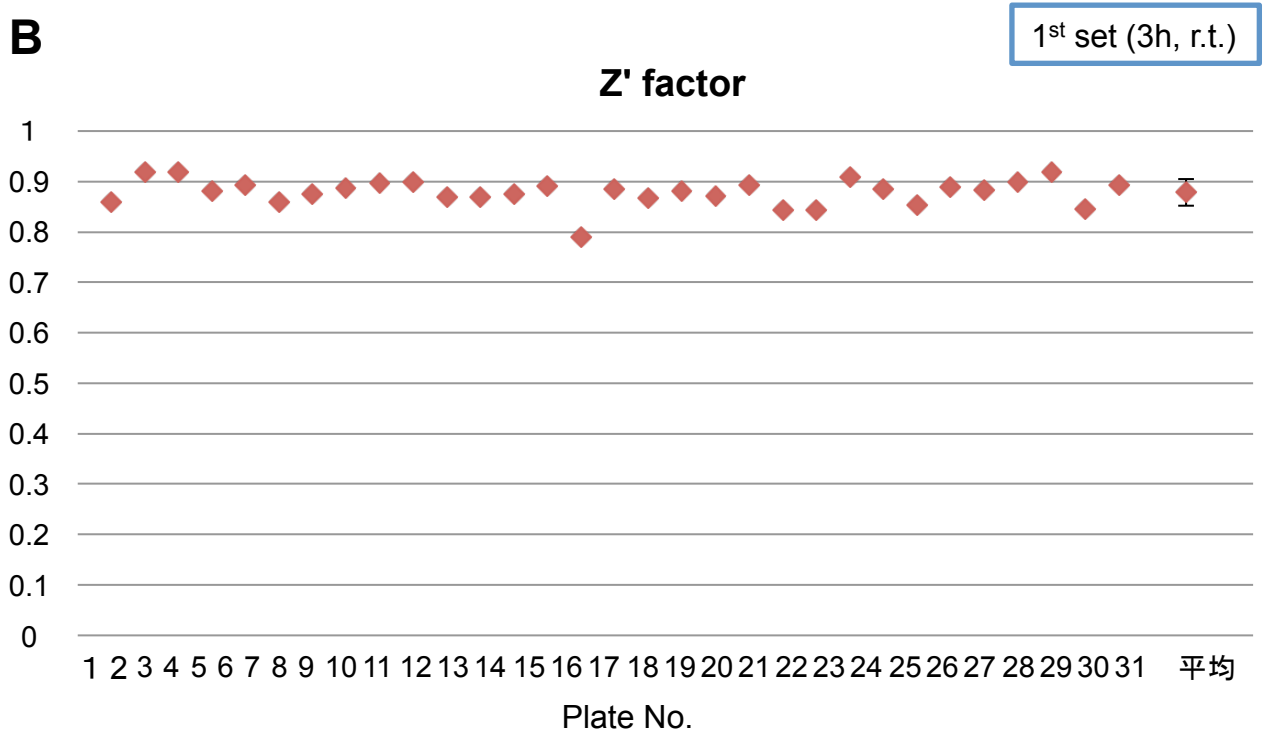


Fig. 3 TR-FRETを利用したSOD1-Derlin-1結合評価系による阻害化合物のスクリーニング

A あらかじめ化合物が分注された384ウェルプレートに各タンパク質を過剰発現させた細胞溶解液を添加してインキュベーションした後、抗体を添加して1時間反応させ、FRET測定を行った。

1次スクリーニングでは、Flag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAを過剰発現させた細胞溶解液と、最終濃度50 μ Mの化合物、anti-Flag-Euとanti-HA-d2の抗体を使用した。

B

B パイロット 1 次スクリーニングにおける各プレートの Z' factor は、常温 3 時間の反応条件の場合（上図）も 4 °C over night の反応条件の場合（下図）もすべて 0.5 以上となり、全プレートの Z' factor の平均は 0.8 を超えた（error bar: ±SD）。

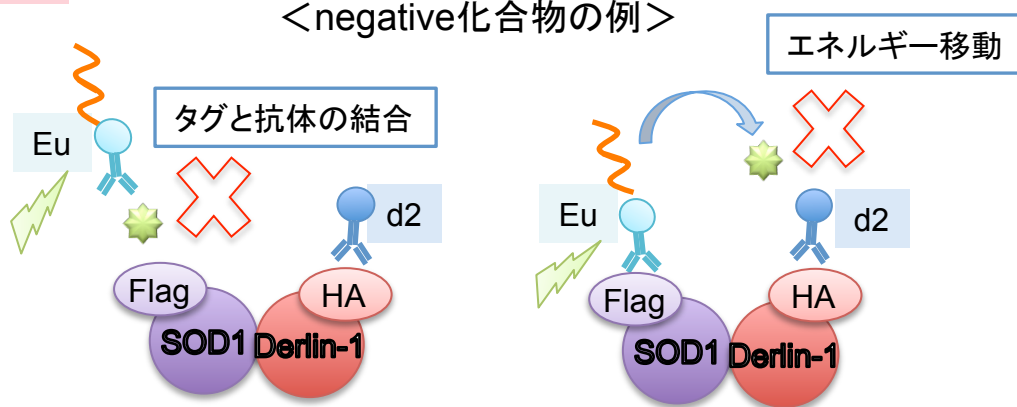
C

FRETシグナルに影響を与える可能性がある原因

1次スクリーニング

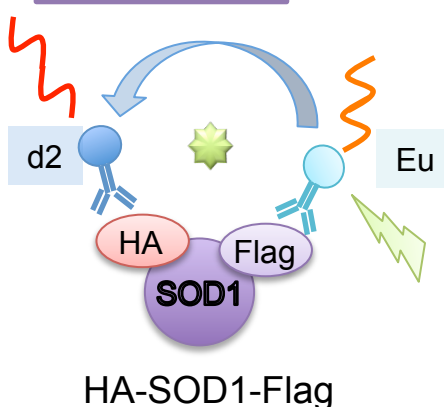
1. SOD1とDerlin-1との結合阻害 → **positive!!**
2. タグと抗体との結合阻害 → **negative!**
3. エネルギー移動阻害
励起光や蛍光の吸収、放出など → **negative!**

<negative化合物の例>



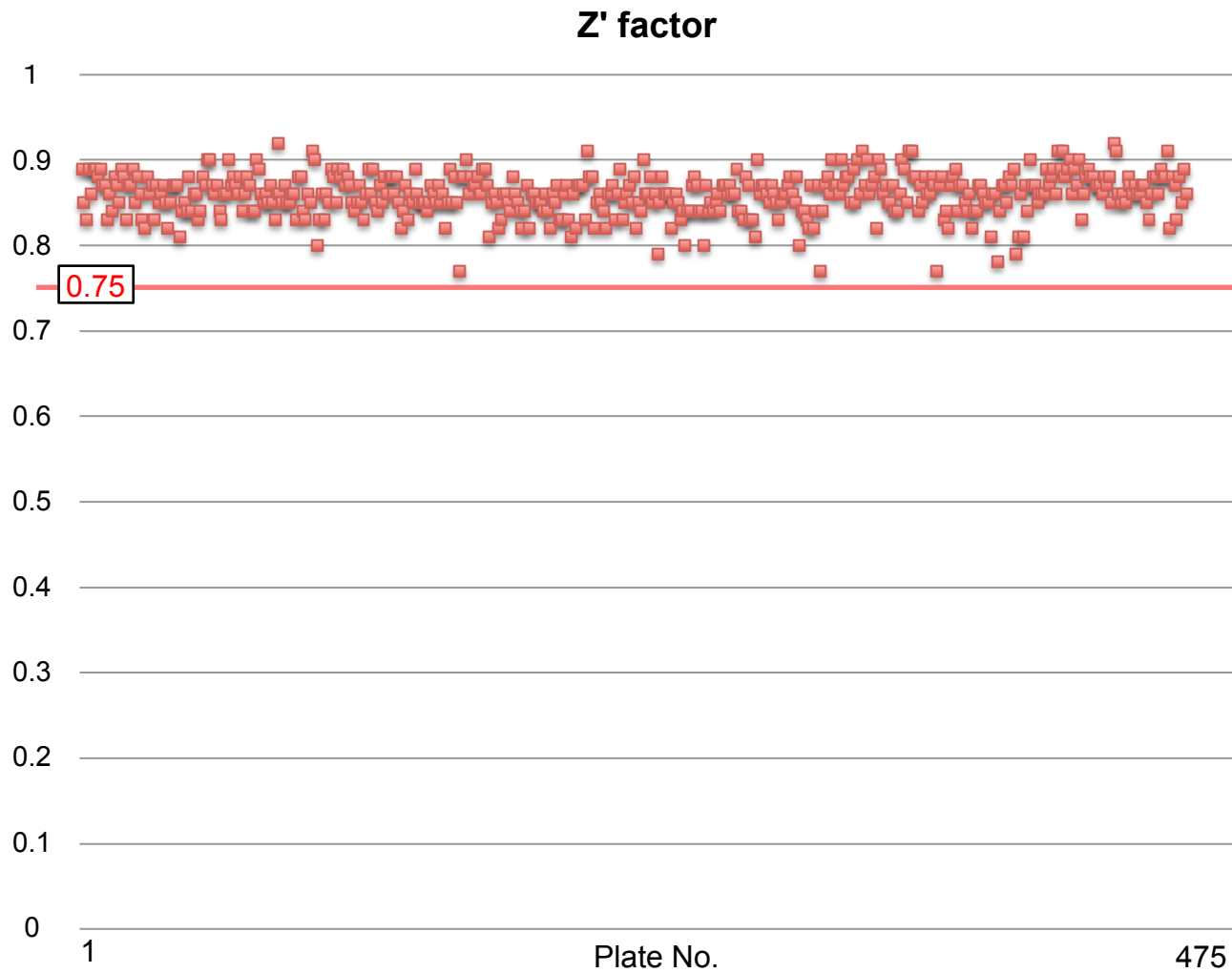
一分子FRET

2次スクリーニング

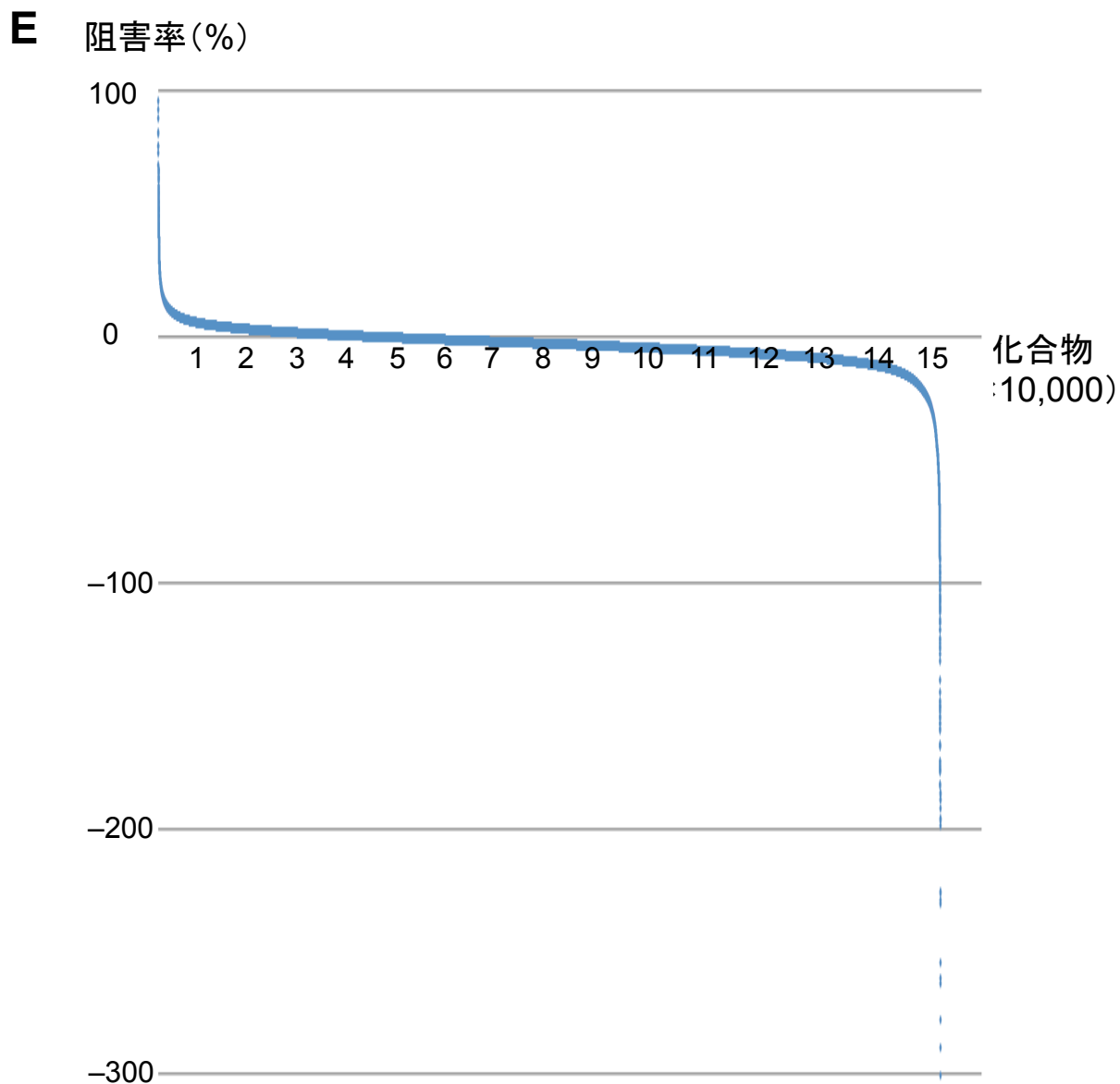


C 1次スクリーニングにおける化合物の絞り込みでは、タグと抗体の結合阻害やエネルギー移動阻害などでFRETを減弱させる偽陽性化合物が含まれると考えられる。そこで、一分子でFRETを起こす発現ベクターの作製を試み、HA-SOD1-Flagを得た。一分子FRETのシグナルが減弱する化合物は、目的とするSOD1-Derlin-1結合阻害以外の影響を持つ。

D

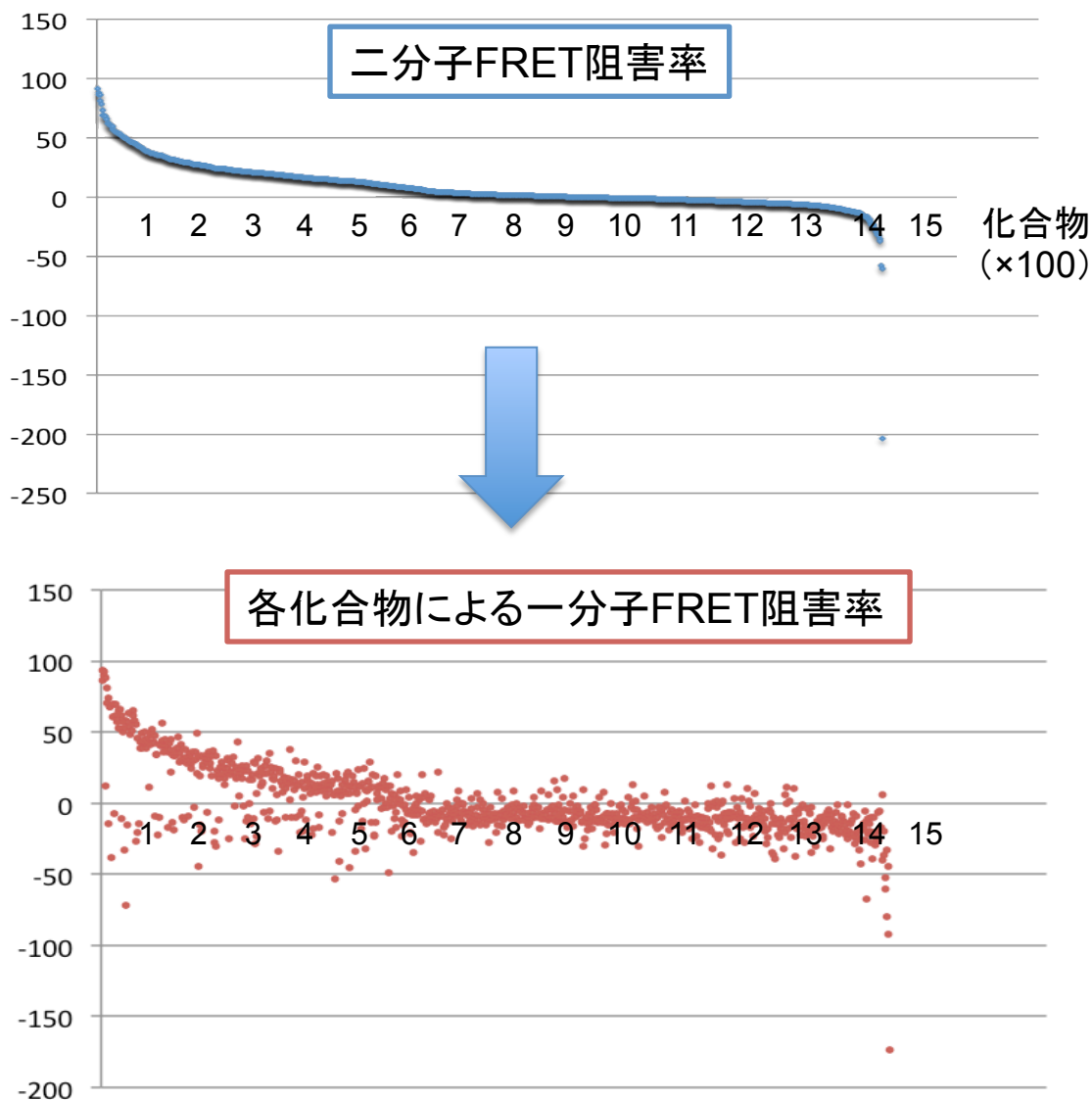


D 384ウェルプレートで475枚分の低分子化合物を対象とした大規模スクリーニングの1次スクリーニングにおいて、 Z' factorは0.77を下限として平均0.86となった。



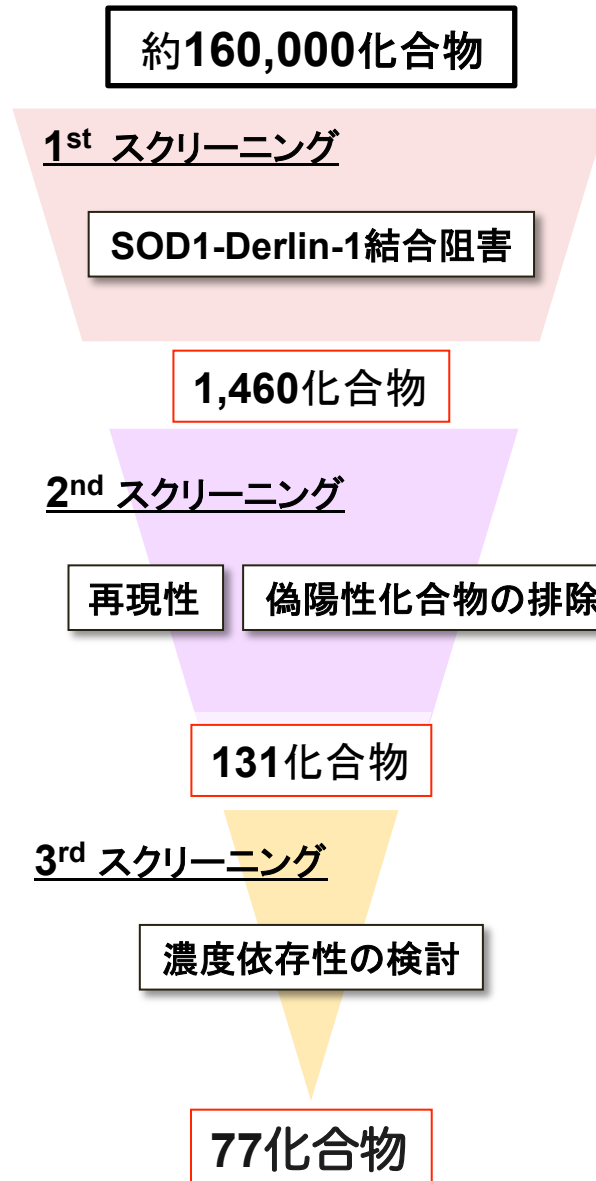
E 大規模1次スクリーニングで評価した各化合物について、縦軸に各化合物の阻害率をとり、横軸に阻害率が高いものから順に化合物を並べた散布図を示す。阻害率が15%以上であった1001化合物を選出した。

F 阻害率(%)



F 大規模2次スクリーニングで評価した各化合物の阻害率についての散布図を示す。上段はFlag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAの二分子FRETに対する阻害率を、阻害率が高かった化合物から順に並べ、下段はHA-SOD1-Flagの一分子FRETに対する阻害率を、上段の化合物の順に揃えて並べた。二分子FRETに対する阻害率が15%以上かつ、一分子FRETに対する阻害率が15%未満の100化合物を選出した。

G



- G** TR-FRETスクリーニングの流れ図を示した。パイロットスクリーニングと大規模スクリーニング合わせて約160,000化合物に対して1次スクリーニングを実施し、候補化合物を1,460個に絞り込んだ。2次スクリーニングでは、再現性の検討とHA-SOD1-Flagによる一分子FRETを利用した偽陽性化合物の排除を行った。その結果得られた131化合物について、3次スクリーニングで濃度依存性を検討し、77個のSOD1-Derlin-1結合阻害の候補化合物を得た。

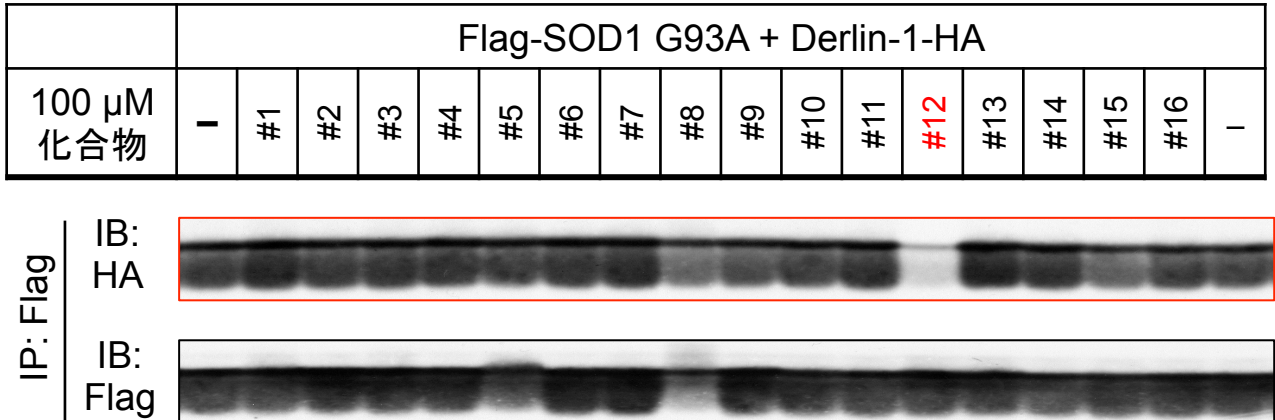
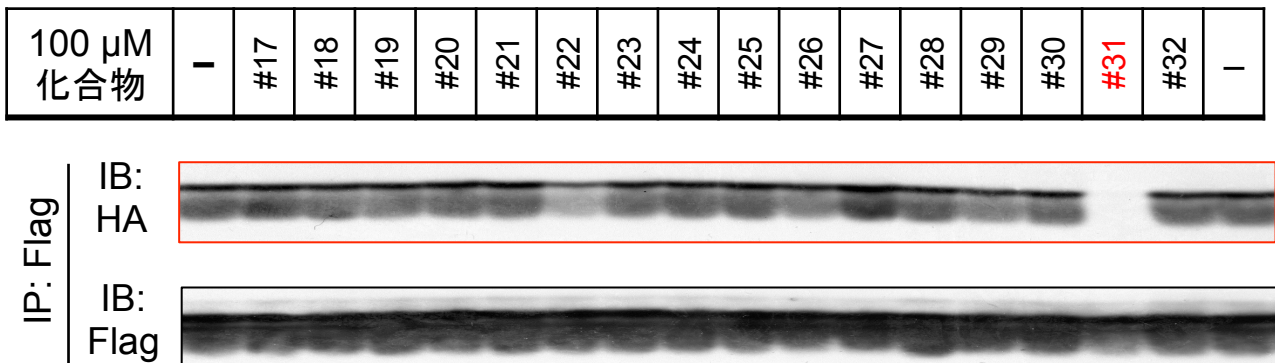
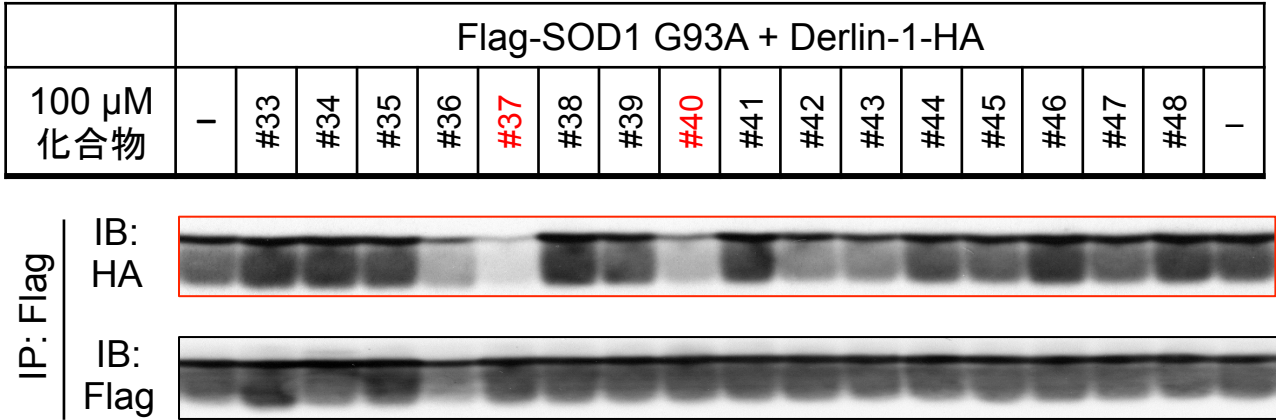
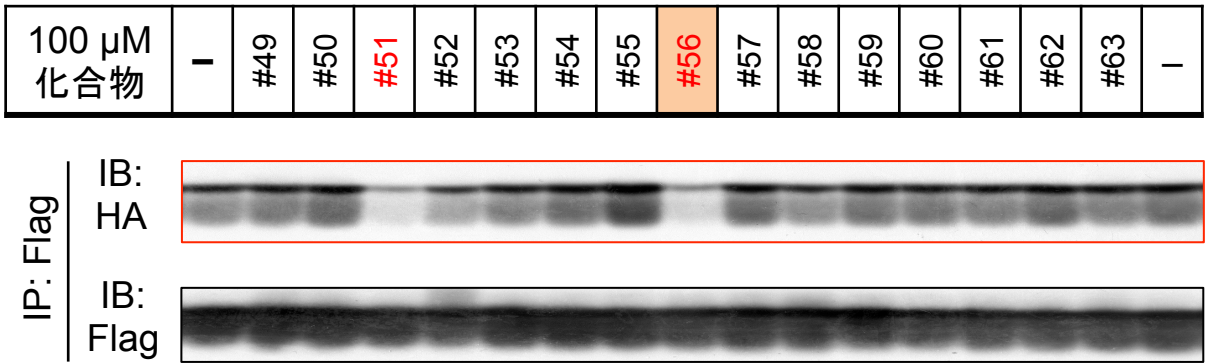
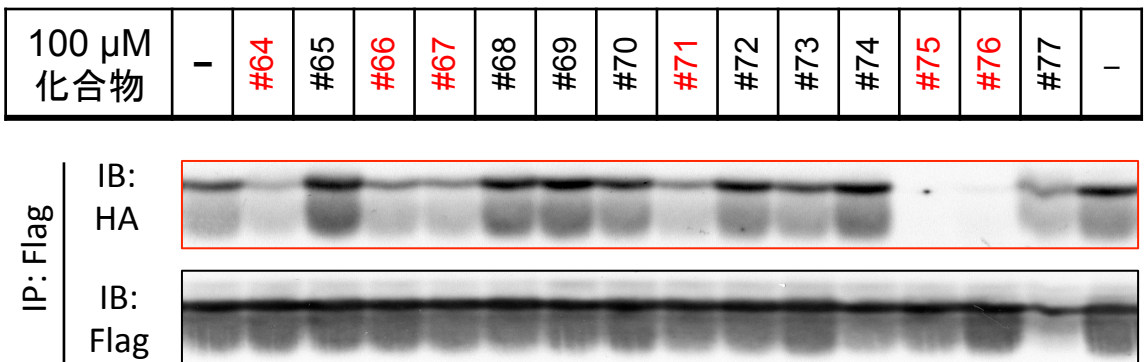
A**B**

Fig. 4 共免疫沈降実験による精製SOD1-Derlin-1複合体に対するFRETスクリーニング陽性化合物の結合阻害活性の評価

HEK293A細胞にFlag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAを過剰発現させ、その細胞溶解液から抗Flag抗体ビーズにより免疫沈降を行ってSOD1-Derlin-1複合体を精製した。その精製溶液に最終濃度100 μ Mとなるように各種化合物を添加し、共免疫沈降を行った。

77個の候補化合物のうち、赤字で示した12化合物において、再現よく顕著な結合阻害活性が確認された。

- A** FRETスクリーニング陽性化合物#1~#16までの活性評価の結果を示した。
- B** FRETスクリーニング陽性化合物#17~#32までの活性評価の結果を示した。

C**D****E**

- C** FRETスクリーニング陽性化合物#33～#48までの活性評価の結果を示した。
- D** FRETスクリーニング陽性化合物#49～#63までの活性評価の結果を示した。
- E** FRETスクリーニング陽性化合物#64～#77までの活性評価の結果を示した。

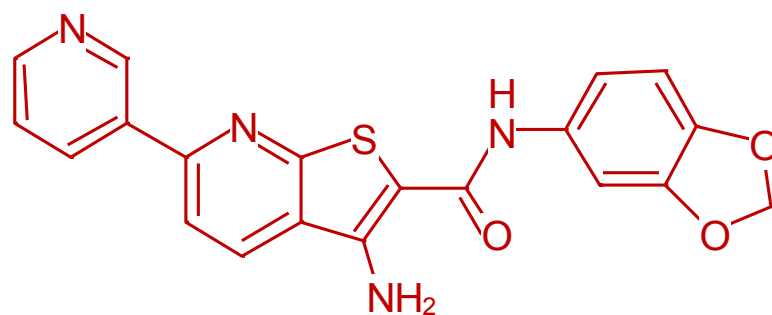


Fig. 5 化合物#56の構造式

TR-FRETによるスクリーニング、共免疫沈降実験による精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性の評価、構造式の評価を経て、化合物#56（分子量 390.4）に注目した。

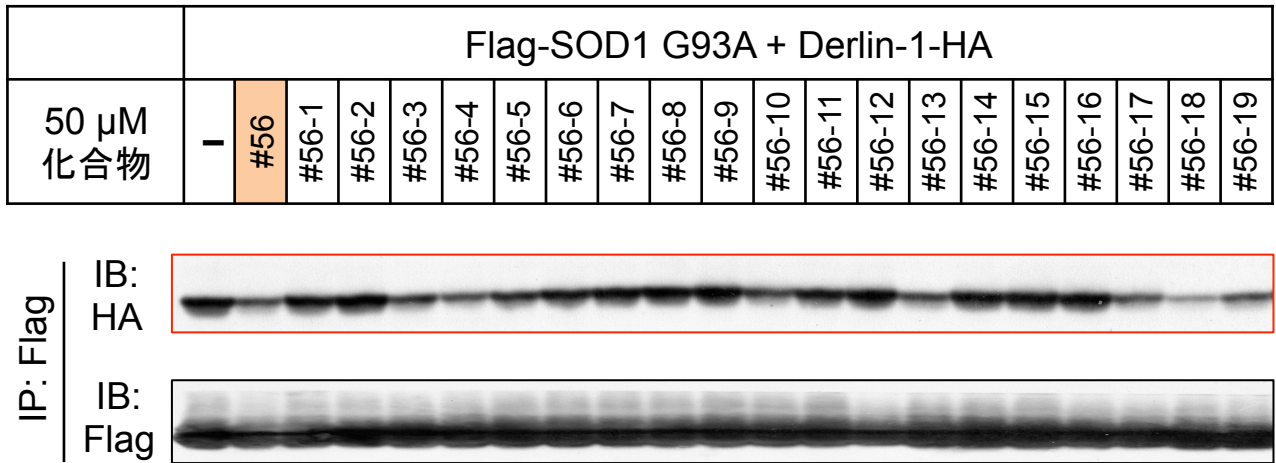
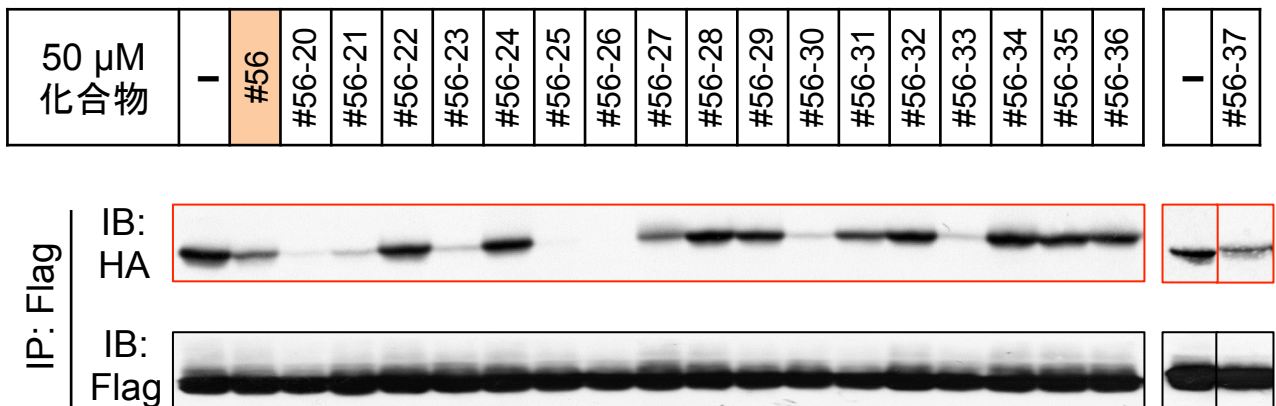
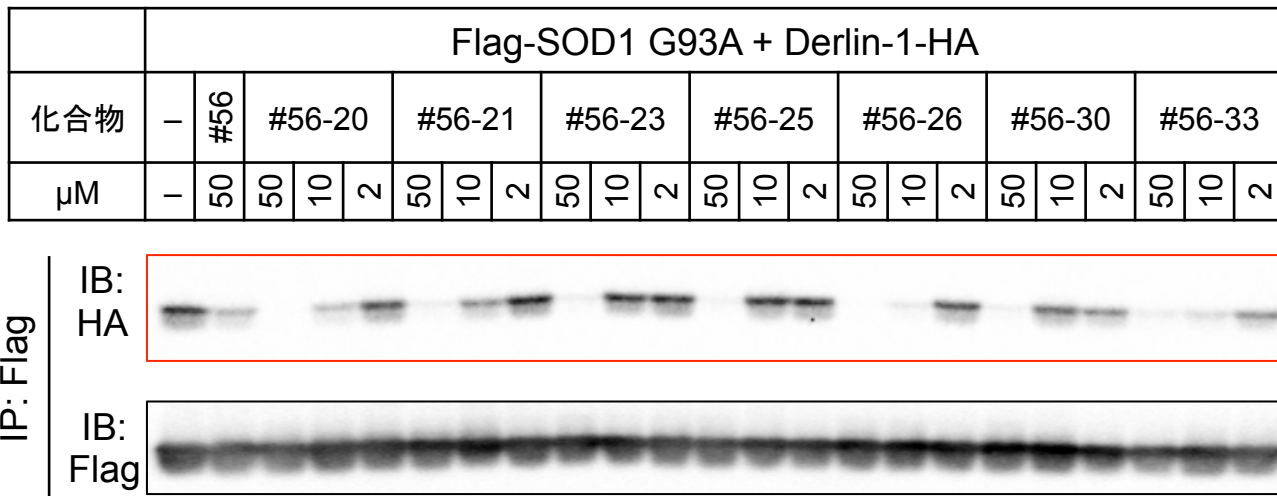
A**B**

Fig. 6 共免疫沈降実験による精製SOD1-Derlin-1複合体に対する#56類似化合物の結合阻害活性の評価

HEK293A細胞にFlag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAを過剰発現させ、その細胞溶解液から抗Flag抗体ビーズにより免疫沈降を行ってSOD1-Derlin-1複合体を精製した。その精製溶液に最終濃度50 μ Mとなるように各化合物を添加し、共免疫沈降を行った。

37個の#56類似化合物の中に、再現よくSOD1-Derlin-1結合阻害活性が確認できる化合物が複数個存在した (Table 2)。

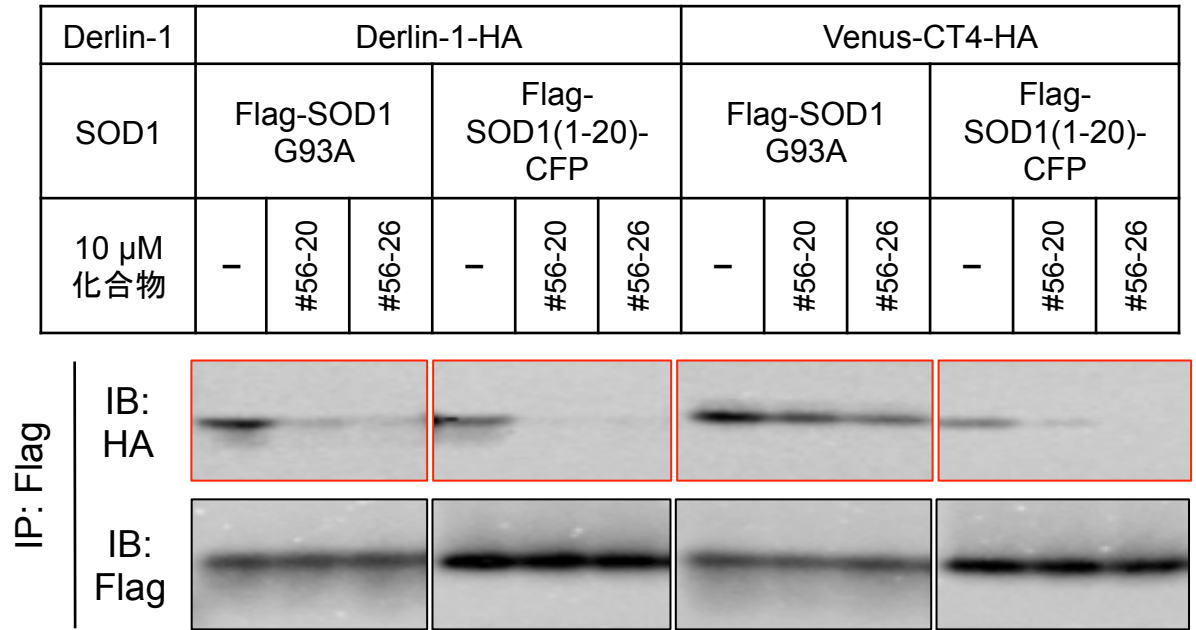
- A** 類似化合物#56-1～#56-19までの活性評価の結果を示す。
B 類似化合物#56-20～#56-37までの活性評価の結果を示す。

A**B**

化合物	#56	#56-20	#56-21	#56-23	#56-25	#56-26	#56-30	#56-33
IC50 (μM)	23.3	7.11	24.3	25.5	16.9	6.20	28.6	11.5

Fig. 7 #56類似化合物の結合阻害活性濃度依存性とIC50値

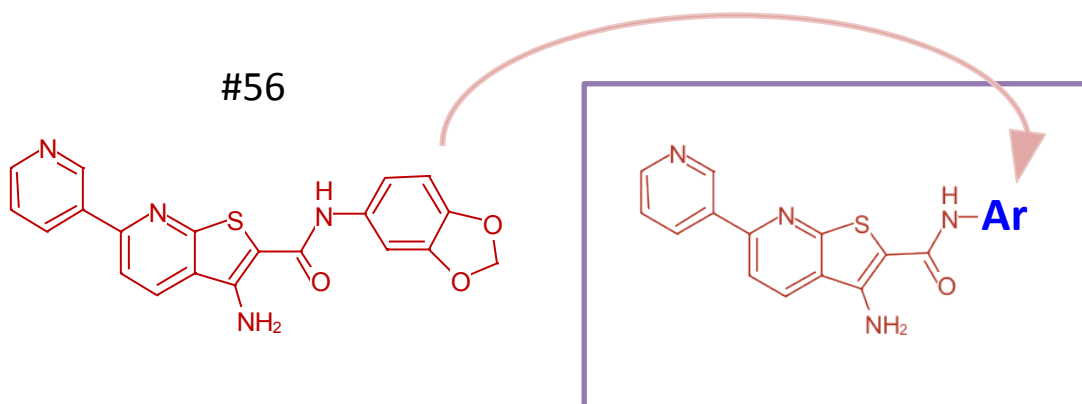
- A** HEK293A細胞にFlag-SOD1 G93AとDerlin-1-HAを過剰発現させ、その細胞溶解液から抗Flag抗体ビーズにより免疫沈降を行ってSOD1-Derlin-1複合体を精製した。その精製溶液に各濃度の各化合物を添加し、共免疫沈降を行ったところ、上記化合物の結合阻害活性の濃度依存性が示された。
- B** タンパク濃度とバンド強度の検量線を作成し、得られた検量線を基に各化合物のIC50値を算出したところ、#56よりも高活性な類似化合物が存在することが示された。



SOD1(1-20)
 DBRを含む1-20アミノ酸残基以外を欠損させた
 SOD1

Fig. 8 全長同士、全長と結合領域、結合領域同士の精製SOD1-Derlin-1複合体に対する#56類似化合物の結合阻害活性の評価

HEK293A細胞に各タンパク質を過剰発現させ、その細胞溶解液から抗Flag抗体ビーズにより免疫沈降を行ってSOD1-Derlin-1複合体を精製した。その精製溶液に各濃度の各化合物を添加し、共免疫沈降を行った。
 #56類似化合物の#56-20と#56-26は、すべての組み合わせのSOD1-Derlin-1結合に対して阻害活性を示した。



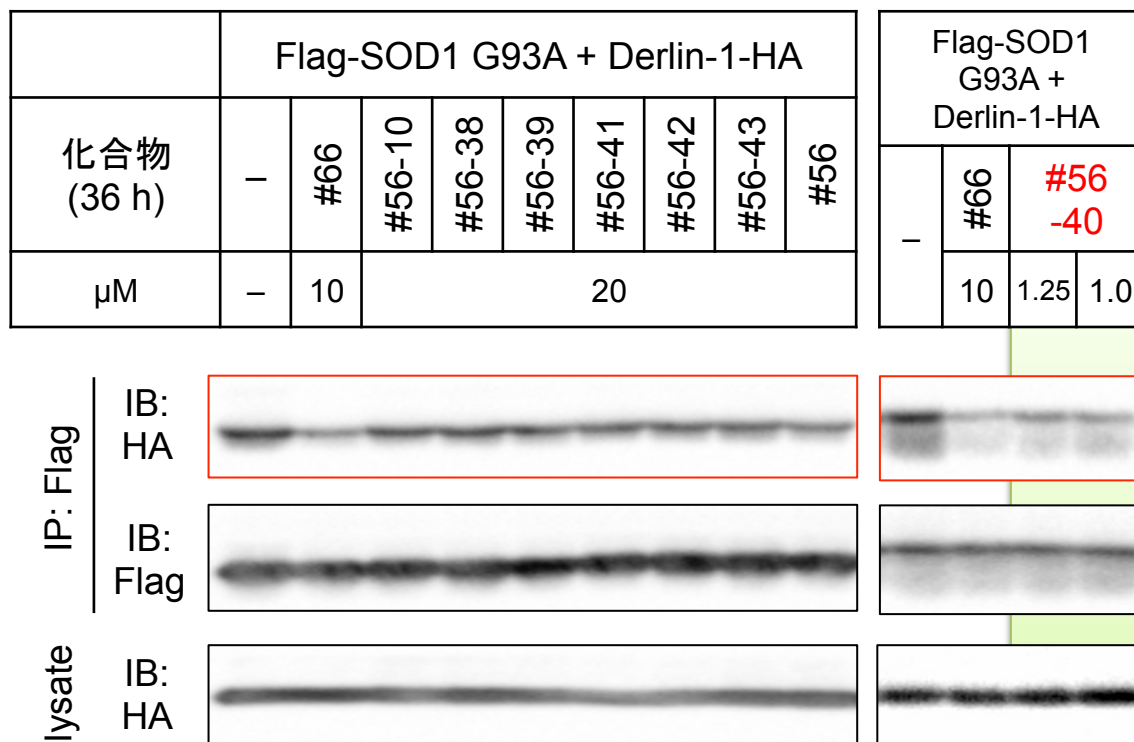
<Ar->

#56-38	#56-39	#56-40
#56-41	#56-42	共同研究 名古屋市立大学 樋口 恒彦 教授

Fig. 9 #56の新規構造類似化合物の構造式

名古屋市立大学樋口恒彦教授との共同研究により、図中のArで示す#56の複素芳香環部分を展開して#56-38~42の新規5化合物を合成した。

#66: positive compound



(HEK293A cell)

#56-10

新規5化合物合成の際に、出発反応物として用いた市販の#56類似化合物

#56-43

#56-10の再合成化合物(#56-10と同一化合物)

Fig. 10 共免疫沈降実験による細胞内SOD1-Derlin-1結合に対する新規#56類似化合物の結合阻害活性の評価

HEK293A細胞に各タンパク質を過剰発現させ、その細胞培養液中に各濃度の各化合物を添加し、共免疫沈降を行った。

#56-40が細胞内SOD1-Derlin-1結合に対して阻害活性を示した。

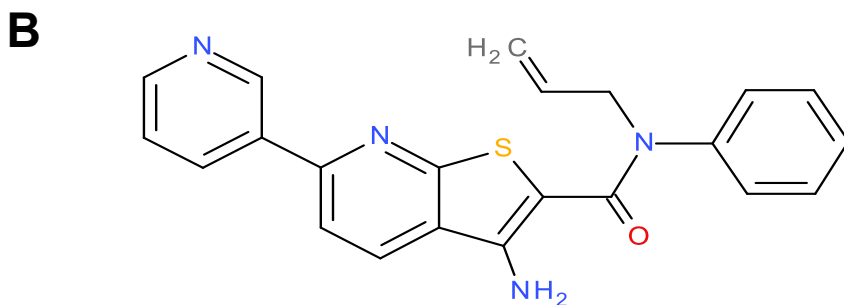
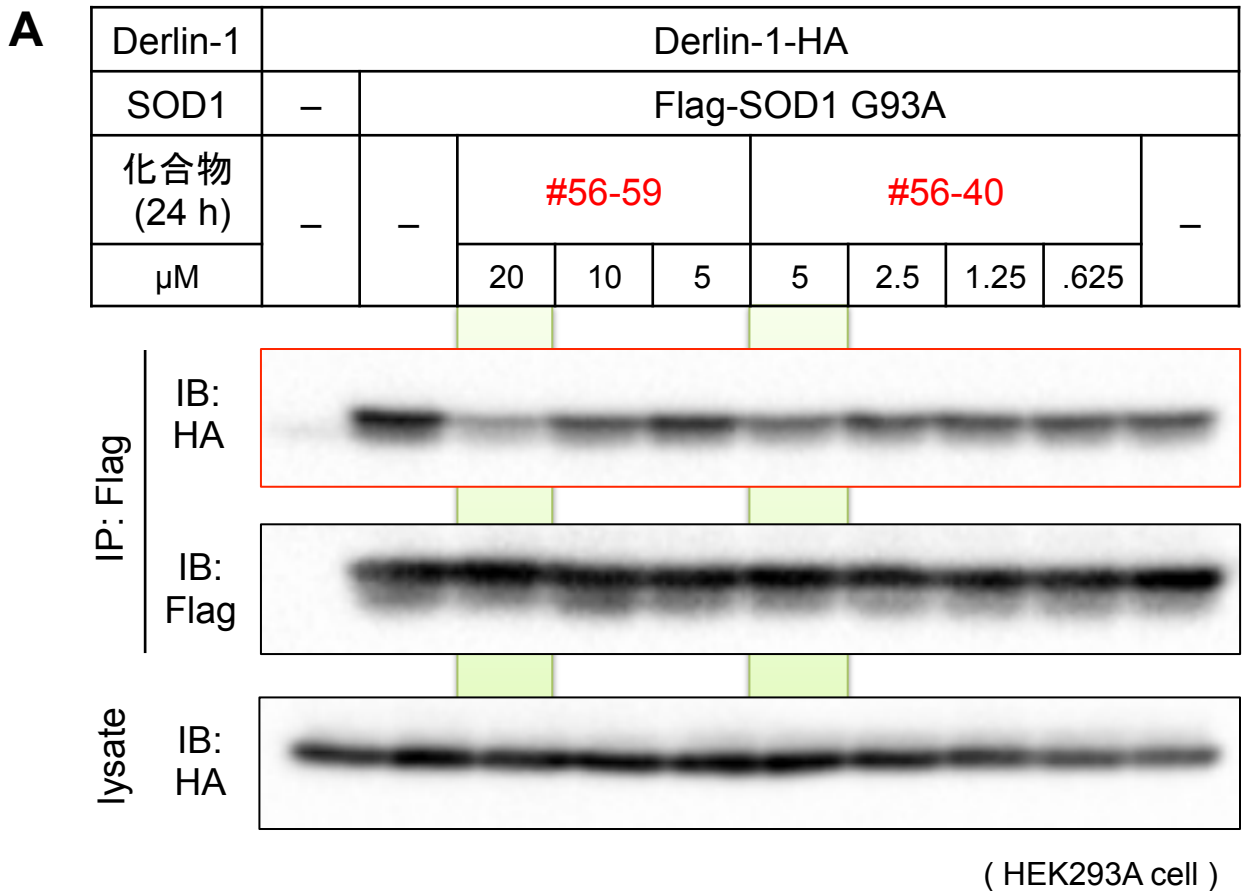


Fig. 11 共免疫沈降実験による細胞内SOD1-Derlin-1結合に対する#56-59の結合阻害活性の評価

- A** HEK293A細胞に各タンパク質を過剰発現させ、その細胞培養液中に各濃度の#56-59あるいは#56-40を添加し、共免疫沈降を行った。
#56-40と同様、#56-59が細胞内SOD1-Derlin-1結合に対して阻害活性を示した。
- B** #56-59 (分子量 386.5) の構造式を示した。

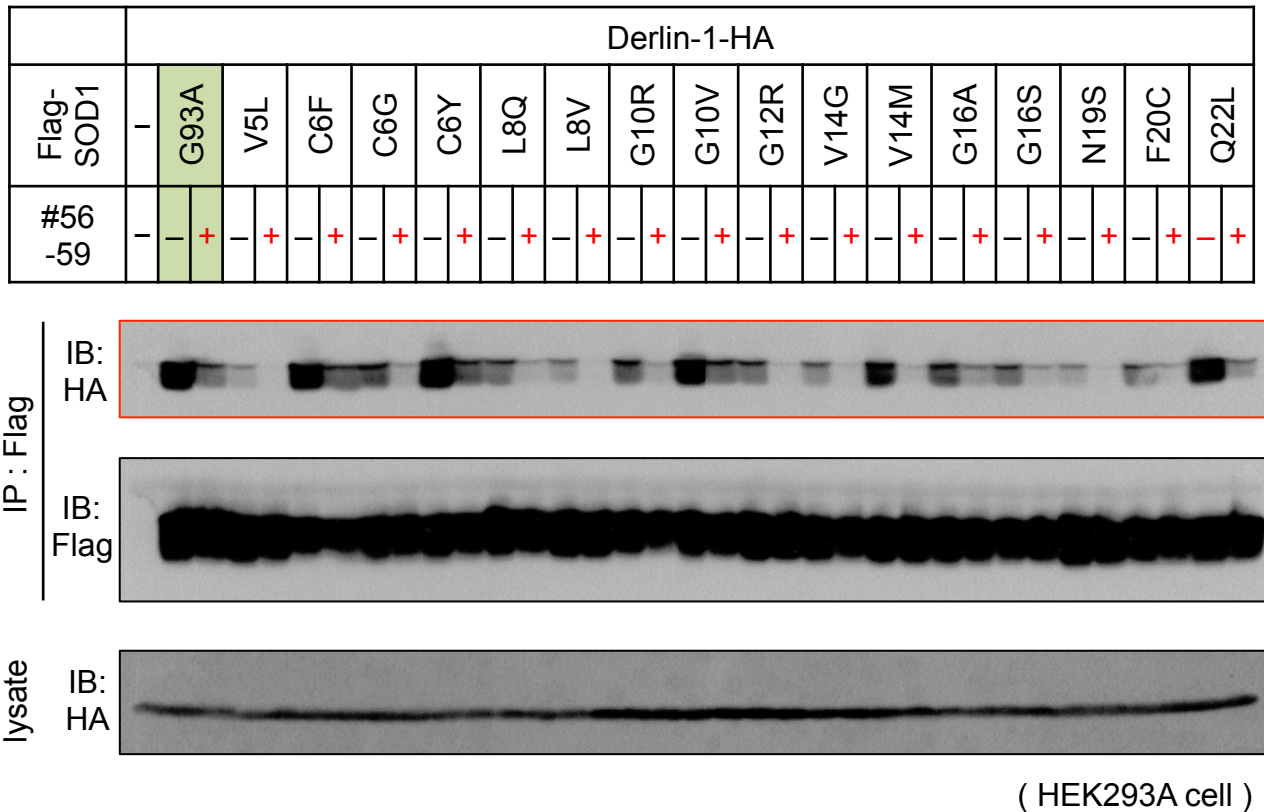


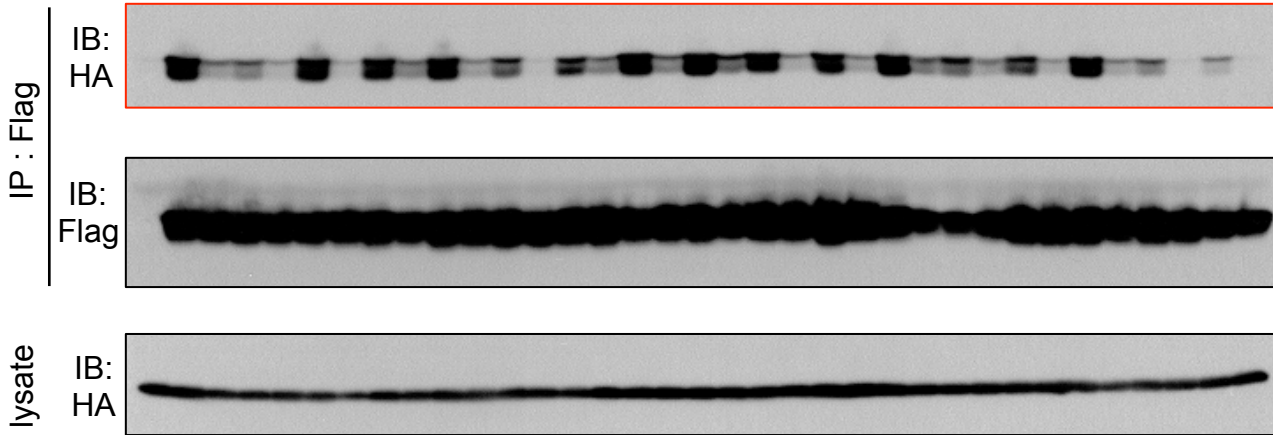
Fig. 12 共免疫沈降実験による細胞内SOD1-Derlin-1結合に対する#56-59の結合阻害活性の評価

HEK293A細胞に各タンパク質を過剰発現させ、その細胞培養液中に20 μ Mの#56-59を添加してから24 h培養後、共免疫沈降を行った。
#56-59は、122種類すべてのALS関連変異型SOD1とDerlin-1の結合を阻害することが明らかとなった。

A 122種類中17種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。

B

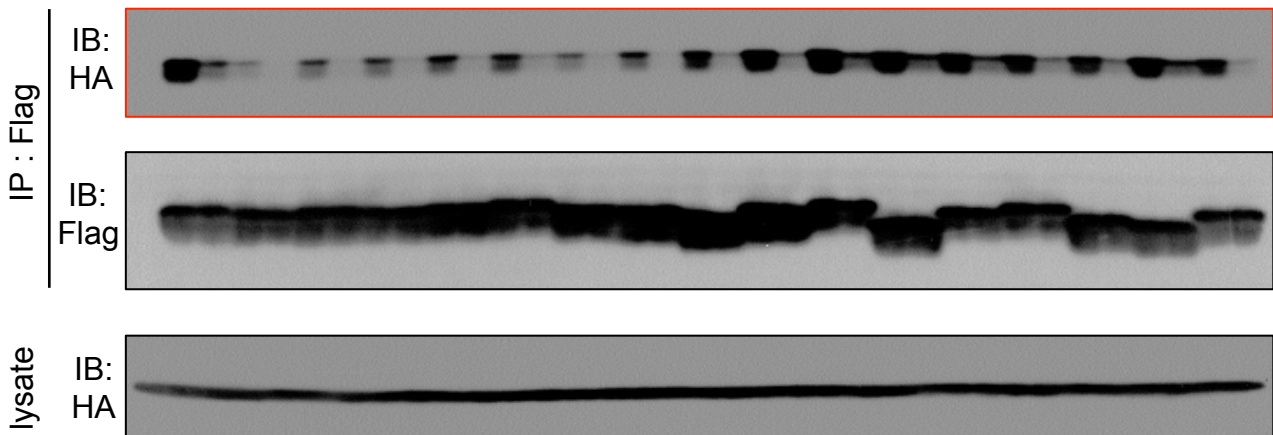
		Derlin-1-HA																	
Flag-SOD1		G93A	V29A	G37R	L38R	L38V	E40G	G41D	G41S	H43R	F45C	H46R	V47A	V47F	H48Q	H48R	E49K	C57R	
#56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



(HEK293A cell)

C

		Derlin-1-HA																	
Flag-SOD1		G93A	S59I	N65S	P66A	G72C	G72S	D76V	D76Y	H80R	L84F	L84V	N86S	G85R	G85S	N86D	N86I	N86K	
#56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

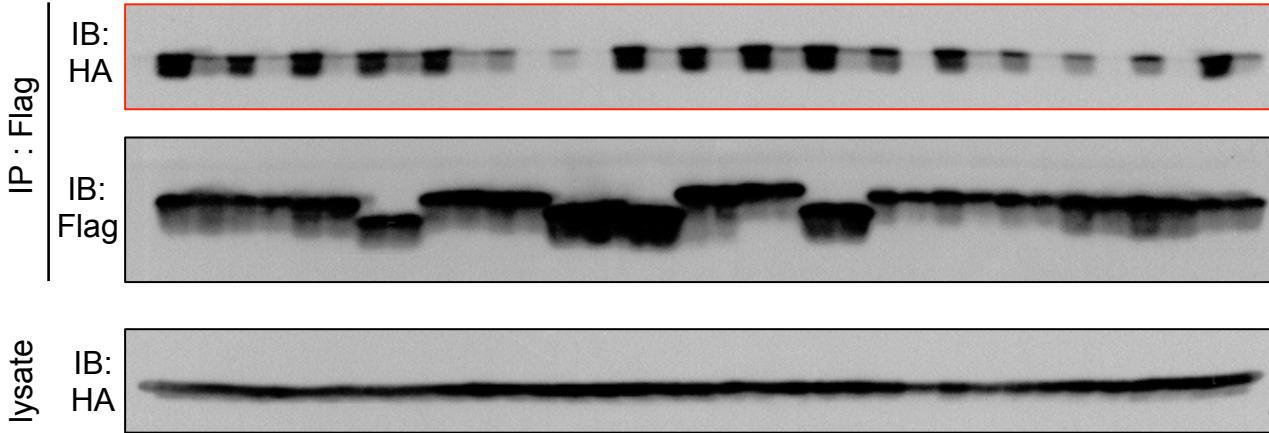


(HEK293A cell)

B 122種類中33種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。**C** 122種類中49種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。

D

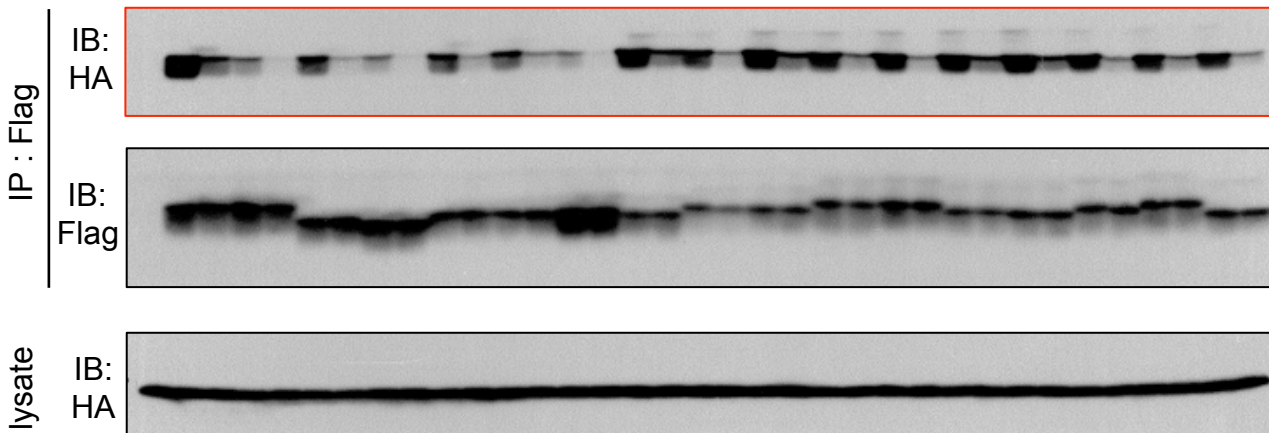
		Derlin-1-HA																
Flag-SOD1		G93A	V87A	V87M	T88Δ	A89T	A89V	D90A	D90V	G93C	G93D	G93R	G93S	G93V	A95T	A95V	V97L	V97M
#56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



(HEK293A cell)

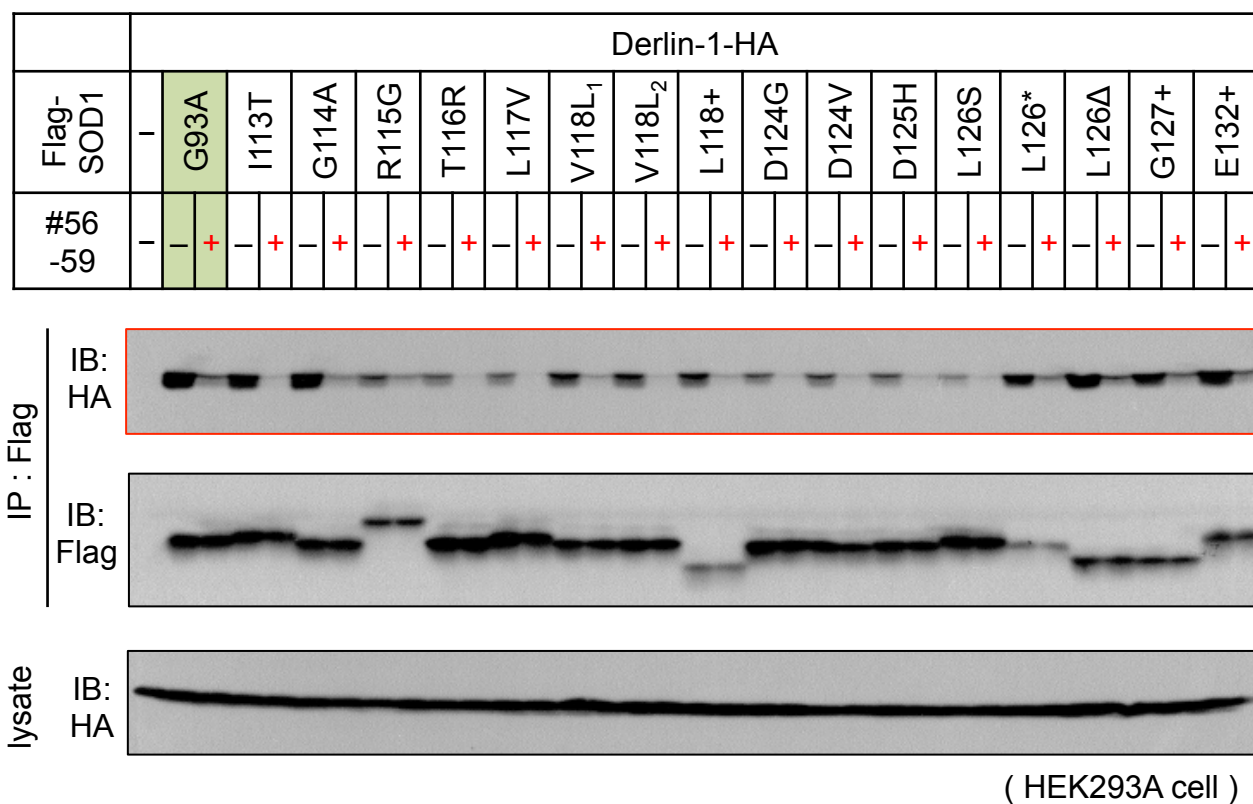
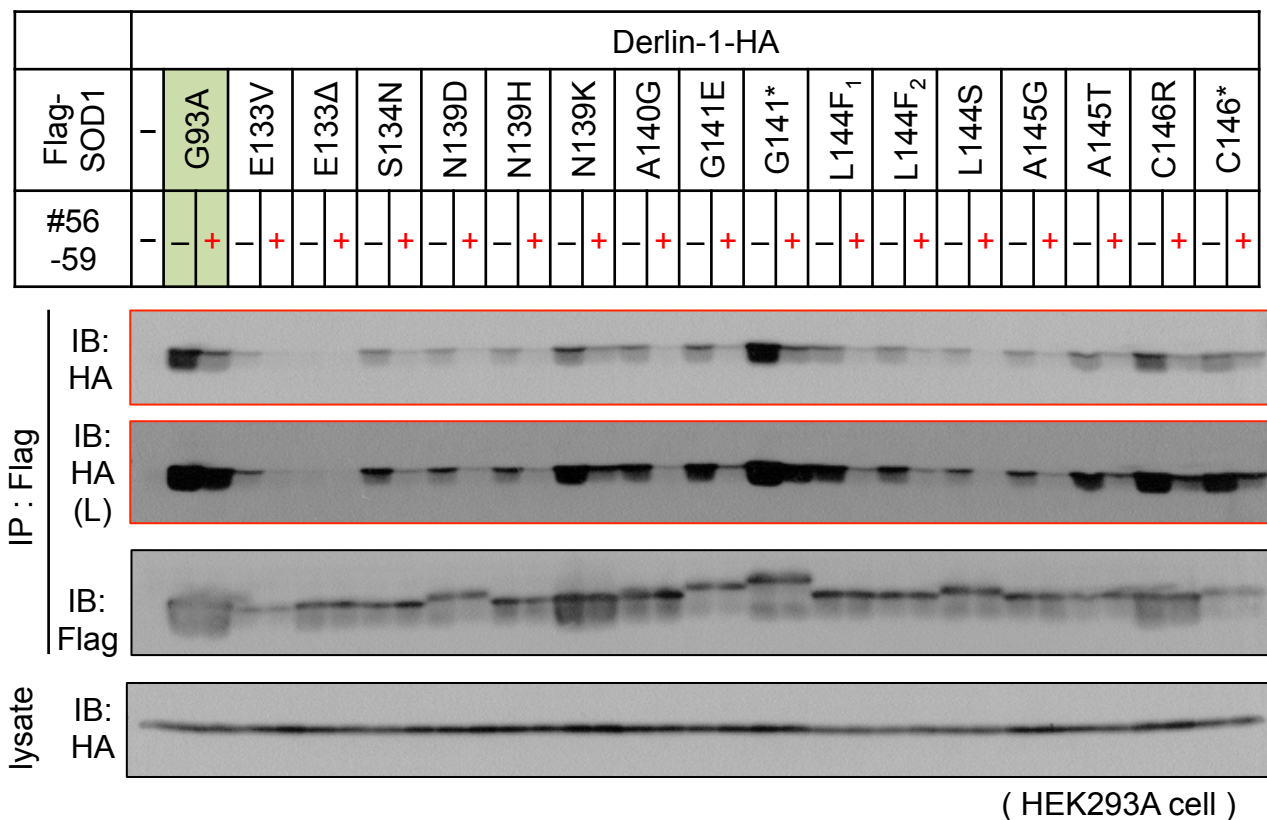
E

		Derlin-1-HA																
Flag-SOD1		G93A	I99V	E100G	E100K	D101G	D101H	D101N	D101Y	I104F	S105L	S105Δ	L106V	G108V	C111Y	I112M	I112T	I113F
#56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



(HEK293A cell)

D 122種類中65種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。**E** 122種類中81種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。

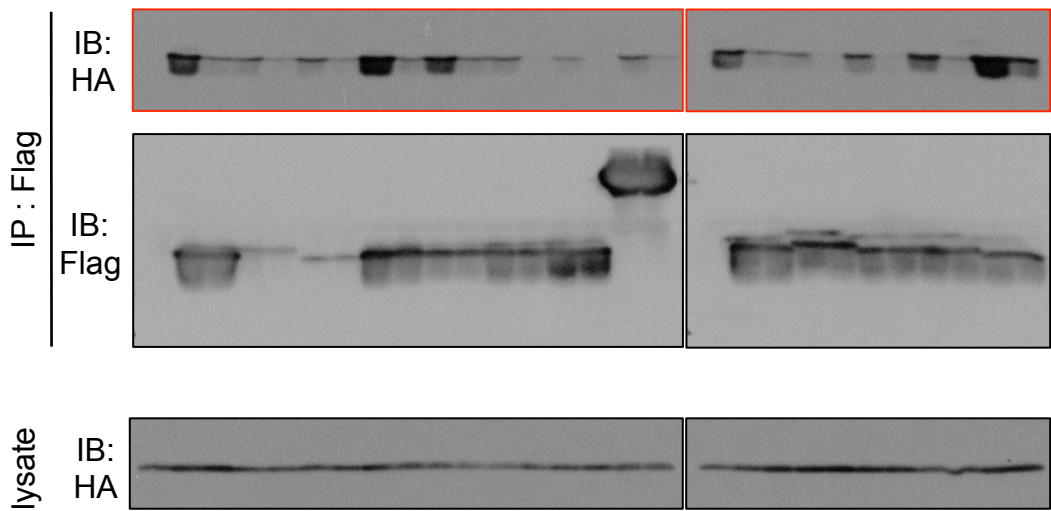
F**G**

F 122種類中97種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。

G 122種類中113種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。
L: long exposure time

H

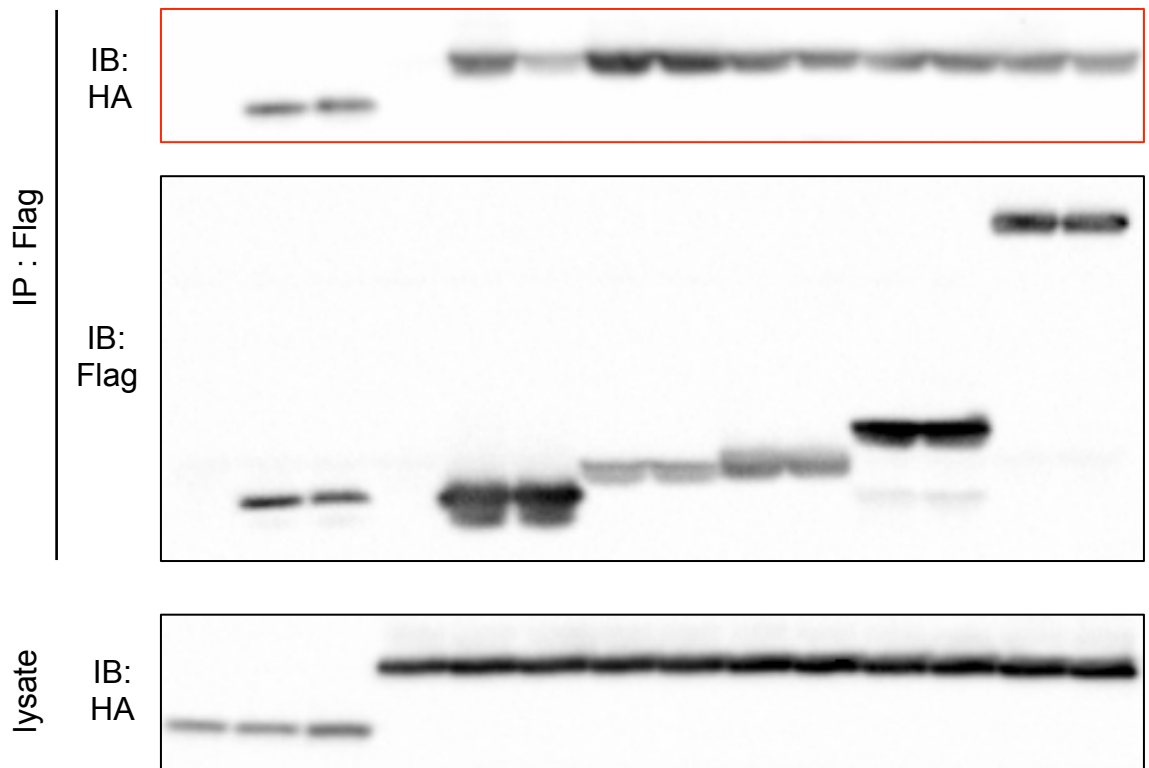
	Derlin-1-HA																
Flag-SOD1	-	G93A	G147D	G147R	V148G	I149T	I151S	I151T	V29+	CFP	-	G93A	K3E	A4S	A4T	A4V	
#56 -59	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+



(HEK293A cell)

H 122種類中122種類目までの変異型SOD1を用いた場合の結果を示した。

HA construct	HA-SOD1 WT			Derlin-1-HA												
	-	Flag-SOD1 WT		-	Flag-SOD1 G93A		Derlin-1-Flag		Derlin-2-Flag		Derlin-3-Flag		HRD1-Flag			
#56-59	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+



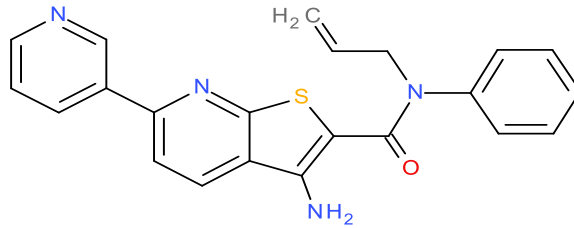
(HEK293A cell)

Fig. 13 野生型SOD1のダイマー化やDerlin-1複合体形成に対する#56-59の結合阻害活性の評価

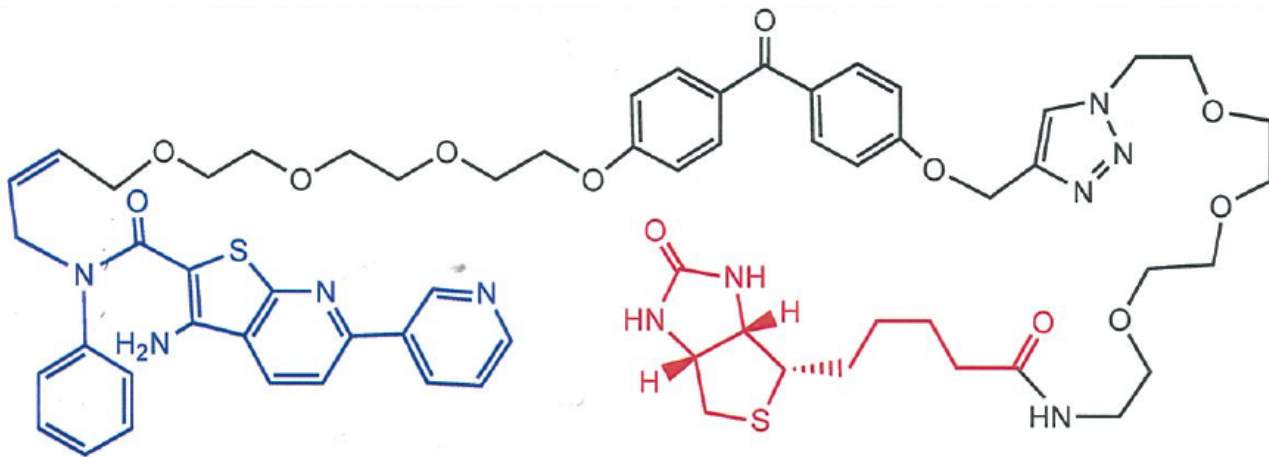
HEK293A細胞に各タンパク質を過剰発現させ、その細胞培養液中に20 μ Mの#56-59を添加してから24 h培養後、共免疫沈降を行った。
#56-59はSOD1-Derlin-1結合に対して阻害活性を示した一方で、SOD1ダイマーやDerlin-1複合体に対しては影響がみられなかった。

A

#56-59



光反応性ビオチン化#56-59



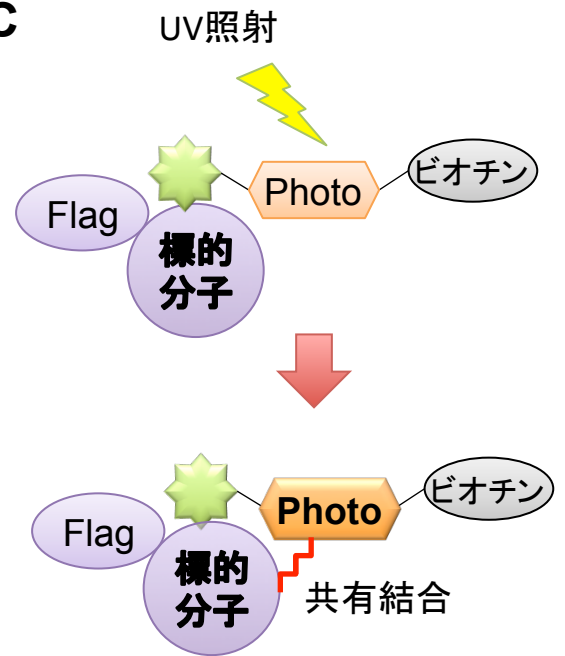
青: #56-59

黒: スペース(ポリエチレングリコール: PEG)とベンゾフェノン

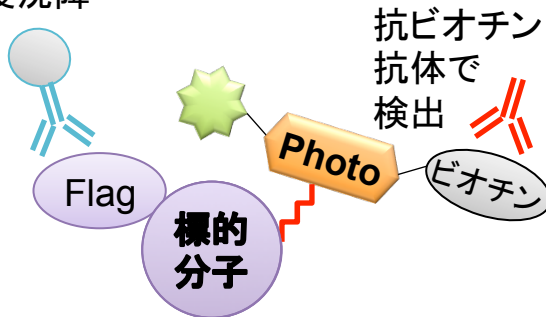
赤: ビオチン

Fig. 14 光反応性ビオチン化#56-59を用いたプルダウン実験

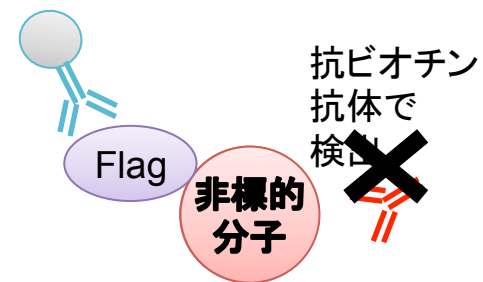
- A 光反応性官能基としてベンゾフェノンを用い、化合物の検出のためにビオチン修飾を施した#56-59の構造式を示した。

B**C****D**

抗Flag抗体で
免疫沈降



抗Flag抗体で
免疫沈降



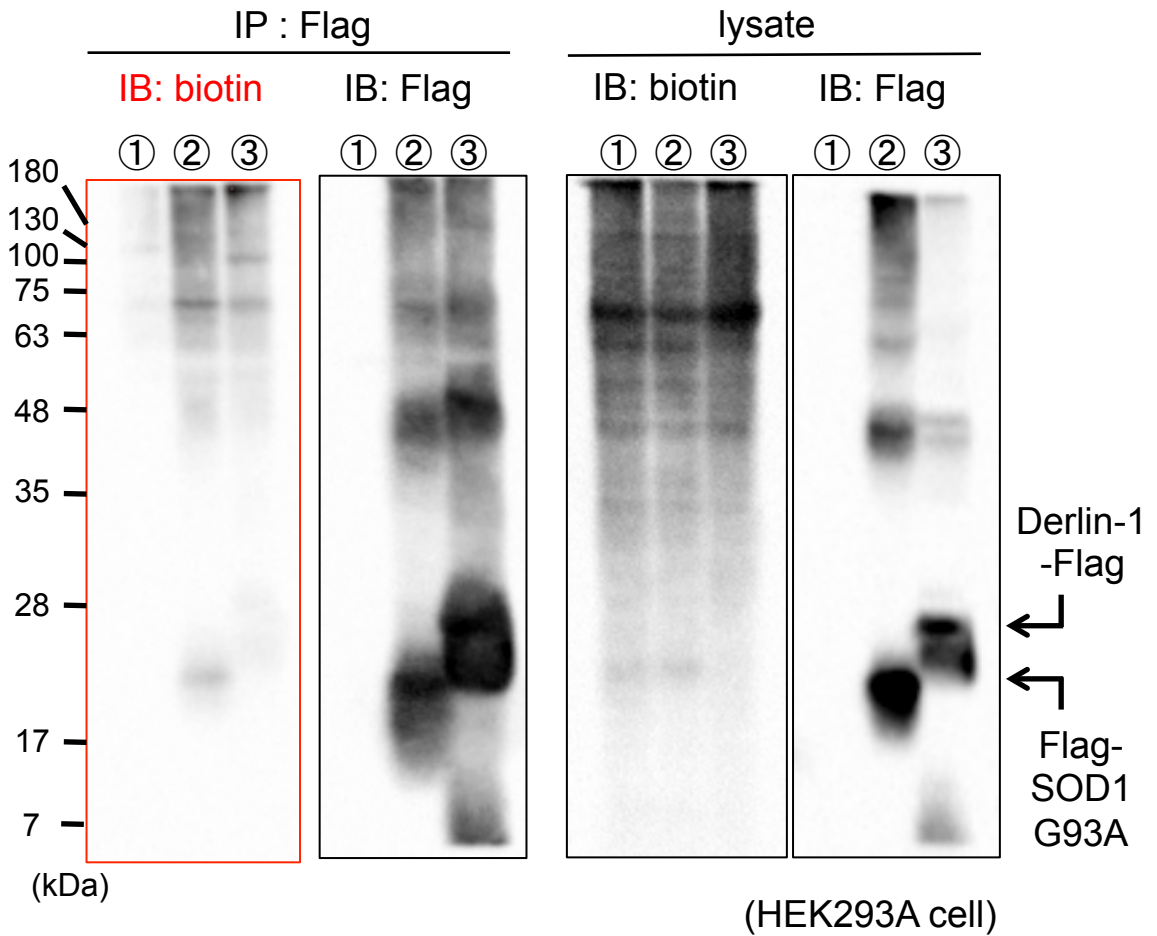
B 光反応性ビオチン化#56-59による標的分子同定の模式図を示した。

C 細胞内の標的分子と化合物が結合した際、UV照射により、ベンゾフェノンの近傍に存在する標的分子との間で共有結合を形成させる。

D 抗Flag抗体により免疫沈降を行い、抗ビオチン抗体により標的分子を検出する。

E**<レーン構成>**

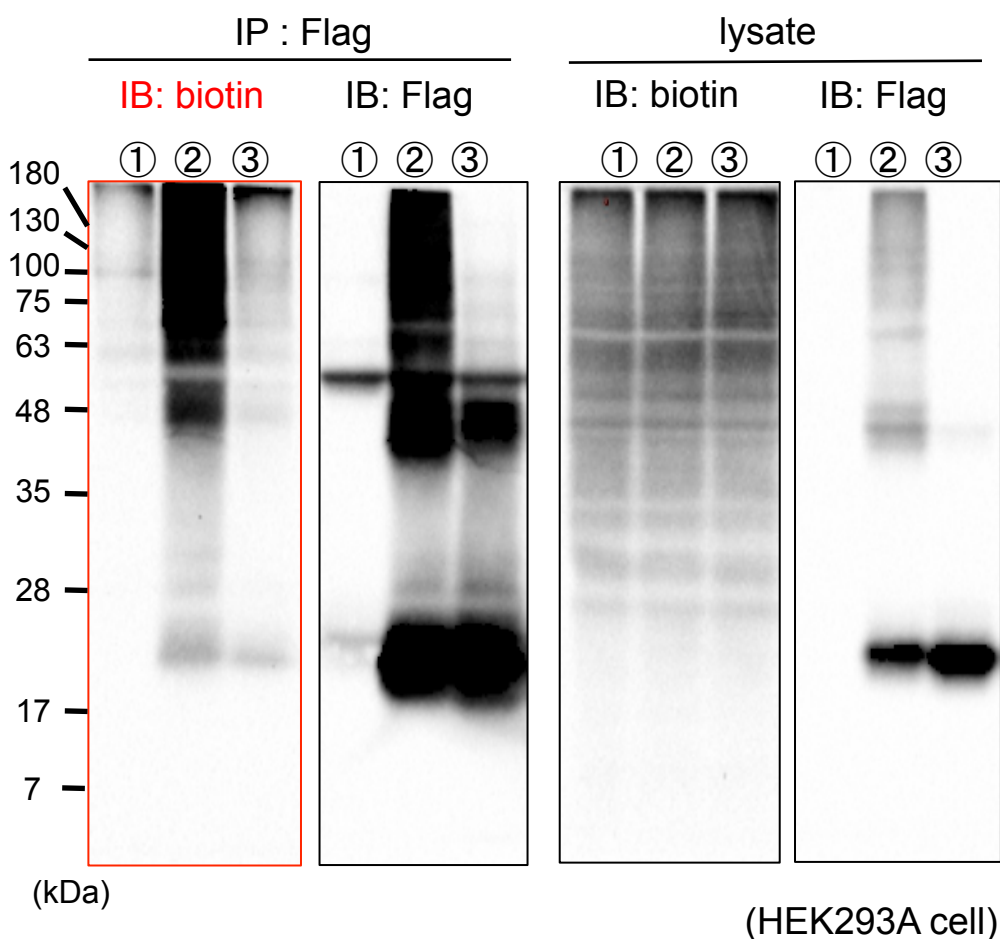
200 μ M 光反応性ビオチン化#56-59		
① -	② Flag-SOD1 G93A	③ Derlin-1-Flag



E HEK293A細胞に各タンパク質を過剰発現させ、細胞培養液中に200 μ Mの光反応性ビオチン化#56-59を添加して24 h培養した後にUV照射を行い、抗Flag抗体により免疫沈降したところ、抗ビオチン抗体により、SOD1と同じ分子量の位置にビオチンのシグナルが検出された。

F**<レーン構成>**

200 μ M 光反応性ビオチン化#56-59		
① -	② Flag-SOD1 G93A	③ Flag-SOD1 WT



F HEK293A細胞に各タンパク質を過剰発現させ、細胞培養液中に200 μ Mの光反応性ビオチン化#56-59を添加して24 h後にUV照射を行い、抗Flag抗体により免疫沈降したところ、抗ビオチン抗体により、SOD1 WTと比べてSOD1 G93Aの方が強くビオチンのシグナルが検出された。

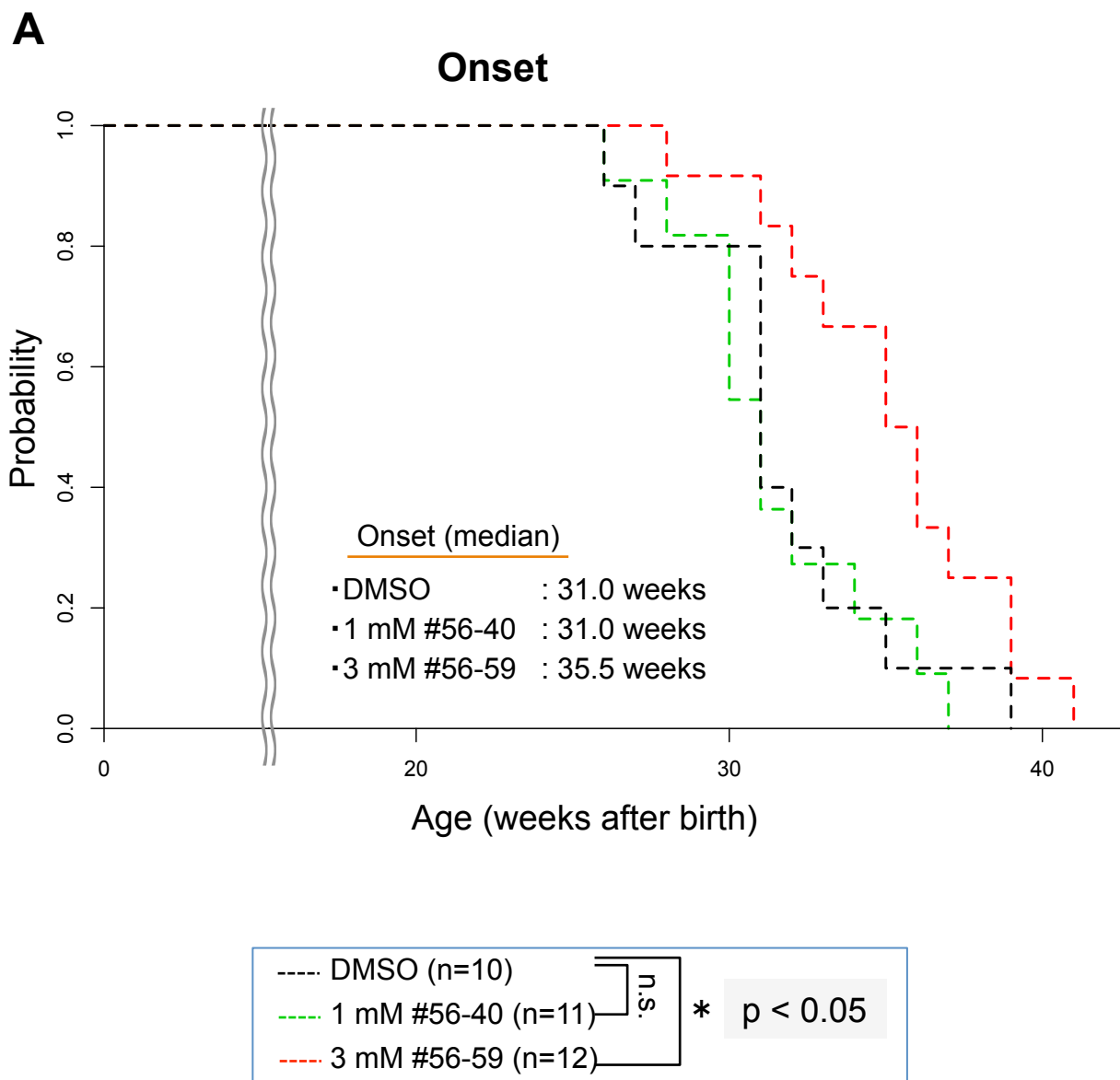
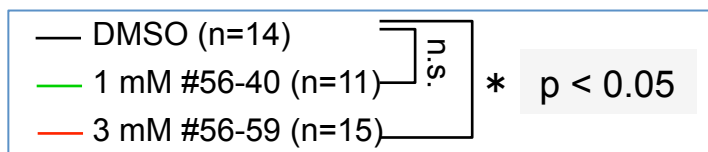
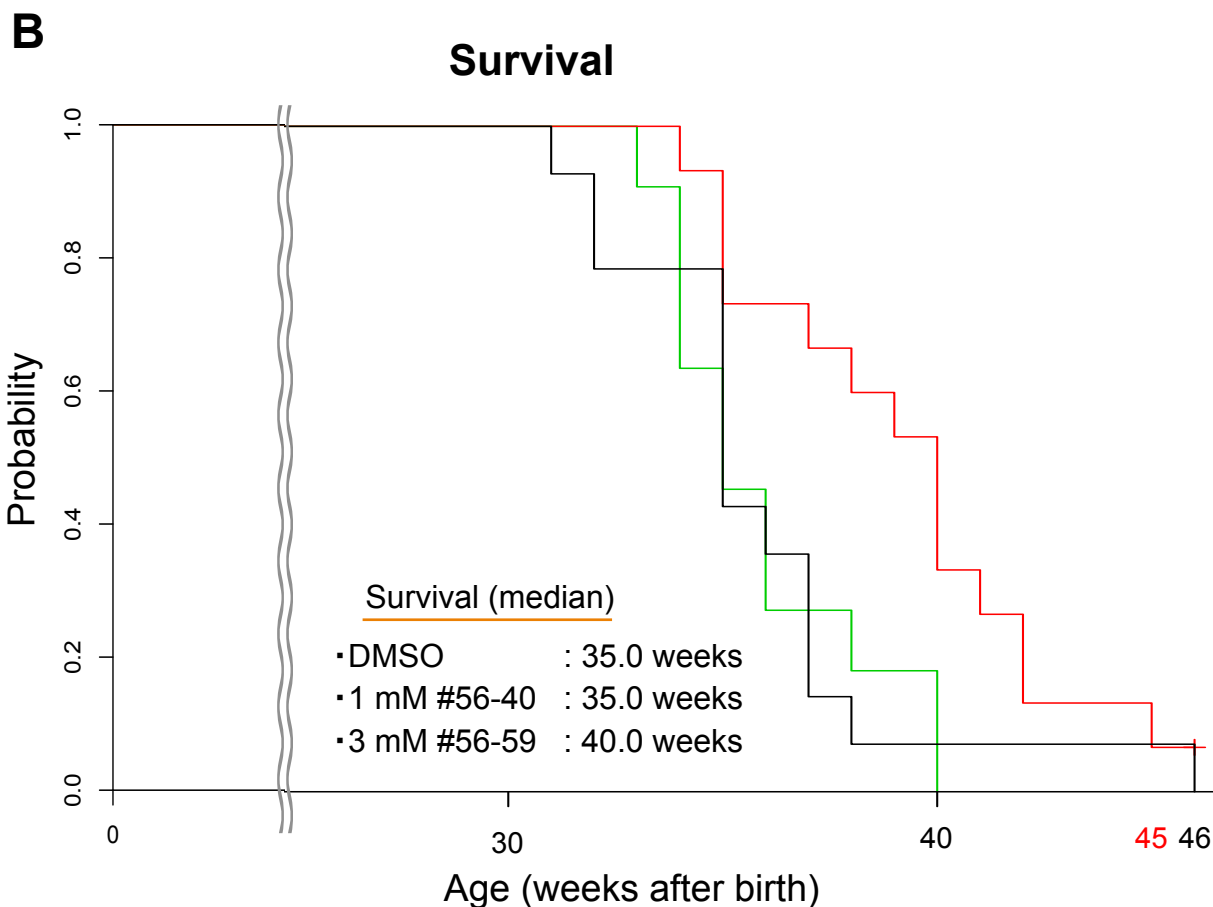


Fig. 15 ALSモデルマウスへのSOD1-Derlin-1結合阻害化合物の持続投与による病態改善効果の検討

- A** 到達回転速度40 rpm、加速時間 180 秒として設定し、最長300 秒間でロータロッド試験を行い、運動機能低下に基づき定義したonsetのカプランマイヤー曲線を示した。
 #56-59投与により、有意にonsetまでの期間が延長することが明らかとなった (*p < 0.05 by log-rank test and the Gehan-Breslow-Wilcoxon test)。



B 生存期間のカプランマイヤー曲線を示した。
 #56-59投与により、有意にonsetまでの期間が延長することが明らかとなった
 (* $p < 0.05$ by log-rank test and the Gehan-Breslow-Wilcoxon test、平成28年
 1月8日時点)。

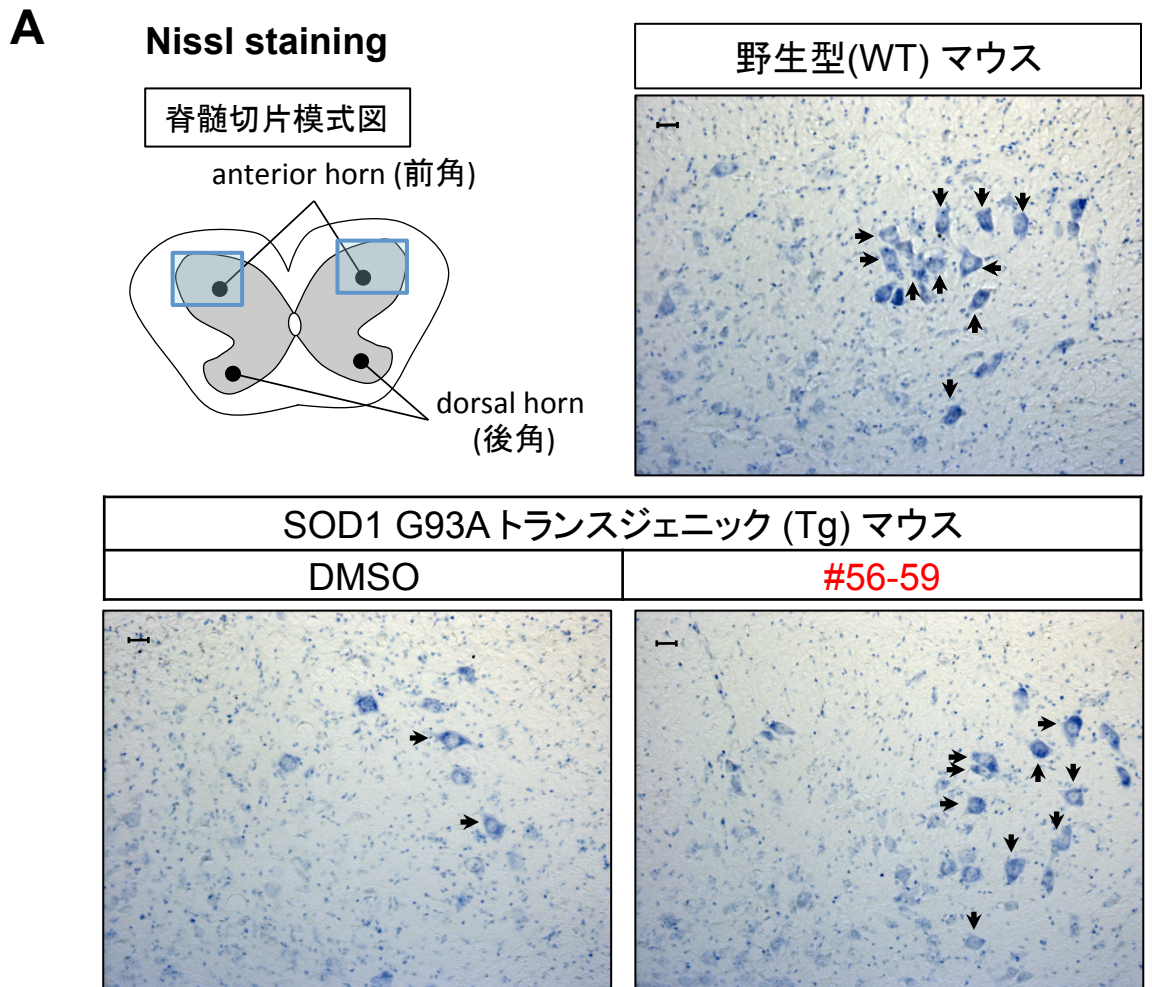
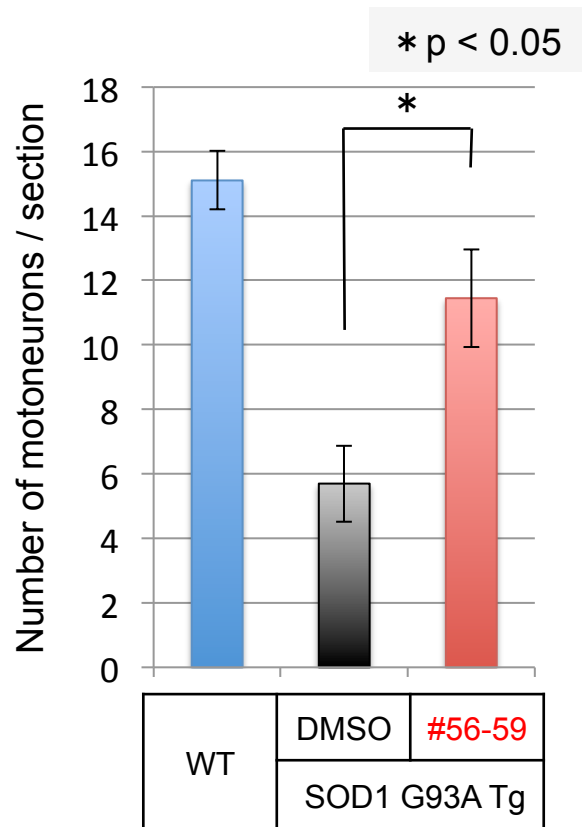


Fig. 16 ALSモデルマウスへのSOD1-Derlin-1結合阻害化合物の持続投与による運動神経細胞死抑制効果の検討

- A** 31週齢の各SOD1 G93A Tg マウス群と、34週齢のWTマウスの凍結脊髓切片 (40 μm) のニッスル染色を行い顕微鏡観察した、腰随前角における代表的なニッスル染色像を示した。
SOD1 G93A Tg マウスの#56-59投与群において、DMSO投与群よりも運動神経細胞数が多くみられた (矢印: 運動神経細胞)。

B motoneuron count



- B** 各マウス由来のニッスル染色切片における運動神経細胞数をカウントした結果を示した (mean±s.e.m.)。SOD1 G93A Tg マウスの#56-59投与群において、DMSO投与群よりも有意に運動神経細胞数が多いことが分かった。(WT マウス: n=4; DMSO投与あるいは#56-59投与SOD1 G93A Tg マウス: n=8 in each group; 5 sections per each mice; *p<0.05 by Student's t-test.)

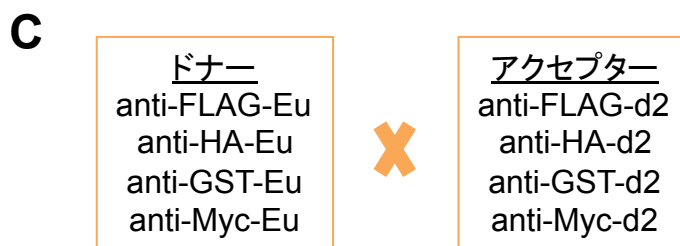
Table 1

SOD1(G93A)(全長)		SOD1(1-20)		SOD1(1-30)	
HA	SOD1(G93A)	FKP (1-20)	HA	HA	(1-30)
Flag	SOD1(G93A)	FRB (1-20)	HA	Flag	(1-30)
myc ⁶	SOD1(G93A)	Trx (1-20)	HA	myc ⁶	(1-30)
GST	SOD1(G93A)	GST (1-20)	HA	GST	(1-30)
	SOD1(G93A) HA	myc ⁶ (1-20)	HA	(1-30)	HA
	SOD1(G93A) Flag	HA (1-20)	FKP	(1-30)	Flag
	SOD1(G93A) myc ⁶	HA (1-20)	Trx	(1-30)	myc ⁶
	SOD1(G93A) GST	HA (1-20)	GST	(1-30)	GST
		HA (1-20)	myc ⁶	SOD1(1-40)	
		FKP (1-20)	Flag	HA	(1-40)
		FRB (1-20)	Flag	Flag	(1-40)
		Trx (1-20)	Flag	myc ⁶	(1-40)
		GST (1-20)	Flag	GST	(1-40)
		myc ⁶ (1-20)	Flag	(1-40)	HA
		Flag (1-20)	FKP	(1-40)	Flag
		Flag (1-20)	Trx	(1-40)	myc ⁶
		Flag (1-20)	GST	(1-40)	GST
		Flag (1-20)	myc ⁶	SOD1(1-50)	
				HA	(1-50)
				Flag	(1-50)
				myc ⁶	(1-50)
				GST	(1-50)
				(1-50)	HA
				(1-50)	Flag
				(1-50)	myc ⁶
				(1-50)	GST

A 作製したSOD1側の様々な発現ベクター（赤字：タグとして使用、青字：分子量を確保するため使用、SOD1(1-20): SOD1の1-20アミノ酸残基、SOD1(1-30): SOD1の1-30アミノ酸残基、SOD1(1-40): SOD1の1-40アミノ酸残基、SOD1(1-50): SOD1の1-50アミノ酸残基）を示した。

B

Derlin-1(全長)		Derlin-1(CT4)	
Derlin-1	HA	FKP	CT4 HA
Derlin-1	Flag	FRB	CT4 HA
Derlin-1	myc ⁶	Trx	CT4 HA
Derlin-1	GST	GST	CT4 HA
		myc ⁶	CT4 HA
Derlin-1(CT1)		HA	CT4 FKP
HA	CT1	HA	CT4 Trx
Flag	CT1	HA	CT4 GST
myc ⁶	CT1	HA	CT4 myc ⁶
GST	CT1	FKP	CT4 Flag
	CT1 HA	FRB	CT4 Flag
	CT1 Flag	Trx	CT4 Flag
	CT1 myc ⁶	GST	CT4 Flag
	CT1 GST	myc ⁶	CT4 Flag
		Flag	CT4 FKP
		Flag	CT4 Trx
		Flag	CT4 GST
		Flag	CT4 myc ⁶



- B** 作製したDerlin-1側の様々な発現ベクター（赤字：タグとして使用、青字：分子量を確保するため使用、CT1：CT4領域を含むC末端64アミノ酸）を示した。
- C** 使用した抗体の種類を示した。

Table 2

活性値 (スコア)	精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性評価
2	#56よりも高い阻害効果がみられたもの
1	#56と同程度あるいはそれ以下の阻害効果がみられたもの
0	阻害効果がないもの

→上記スコアが2だった化合物について、IC50を算出

A

精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性評価						
備考(番号)	構造式	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (スコア)	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (阻害率%)	活性値 (IC50)
#56		50	-	100	78.10	23.3
				50	73.72	
				25	53.85	
				12.5	16.76	
				6.25	0.10	
#56-1		50	0	-	-	-
#56-2		50	0	-	-	-
#56-3		50	1	-	-	-
#56-4		50	1	-	-	-

共免疫沈降実験によって、精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性の評価を行った市販の#56類似化合物についてまとめた。

A #56と#56-1から#56-4までの結果を示した。

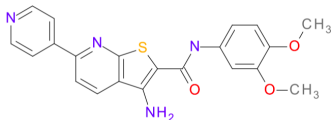
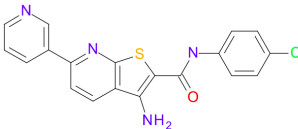
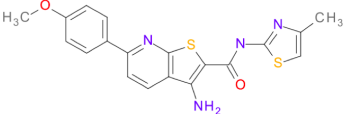
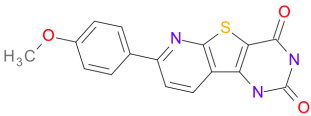
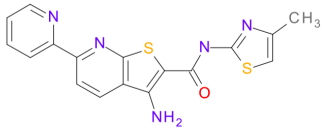
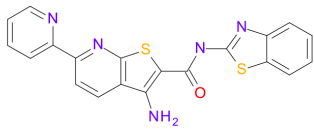
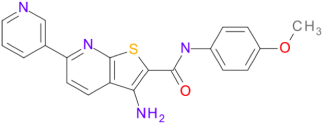
B

精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性評価						
備考(番号)	構造式	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (スコア)	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (阻害率%)	活性値 (IC50)
#56-5		50	0	-	-	-
#56-6		50	0	-	-	-
#56-7		50	0	-	-	-
#56-8		50	0	-	-	-
#56-9		50	0	-	-	-
#56-10		50	1	-	-	-
#56-11		50	0	-	-	-

B #56-5から#56-11までの結果を示した。

C

精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性評価

備考(番号)	構造式	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (スコア)	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (阻害率%)	活性値 (IC50)
#56-12		50	0	-	-	-
#56-13		50	1	-	-	-
#56-14		50	0	-	-	-
#56-15		50	0	-	-	-
#56-16		50	0	-	-	-
#56-17		50	1	-	-	-
#56-18		50	1	-	-	-

C #56-12から#56-18までの結果を示した。

D

精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性評価						
備考(番号)	構造式	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (スコア)	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (阻害率%)	活性値 (IC50)
#56-19		50	0	-	-	-
#56-20		50	2	25	75.53	7.11
				12.5	57.77	
				6.25	48.23	
				3.125	28.91	
				1.5625	18.35	
#56-21		50	2	25	51.06	24.3
				12.5	25.69	
				6.25	25.70	
				3.125	15.85	
				1.5625	14.41	
#56-22		50	0	-	-	-
#56-23		50	2	50	58.50	25.5
				40	56.38	
				30	56.22	
				20	40.84	
				10	10.87	
#56-24		50	0	-	-	-
#56-25		50	2	50	90.83	16.9
				40	88.72	
				30	78.29	
				20	59.44	
				10	20.81	

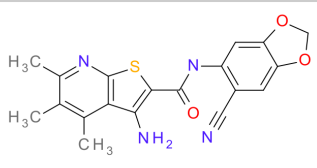
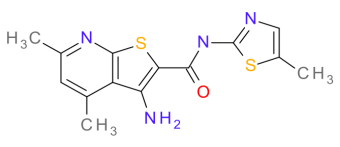
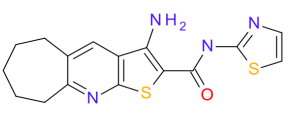
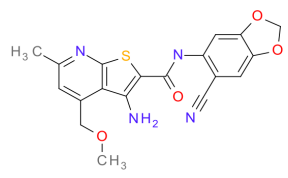
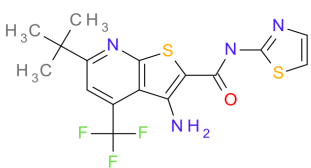
D #56-19から#56-25までの結果を示した。

E

精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性評価						
備考(番号)	構造式	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (スコア)	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (阻害率%)	活性値 (IC50)
#56-26		50	2	10	74.53	6.20
				5	38.97	
				2.5	3.20	
				1.25	-1.04	
				0.625	-6.51	
#56-27		50	1	-	-	-
#56-28		50	0	-	-	-
#56-29		50	0	-	-	-
#56-30		50	2	25	43.54	17.8
				12.5	37.71	
				6.25	13.45	
				3.125	18.58	
				1.5625	16.55	
#56-31		50	0	-	-	-
#56-32		50	0	-	-	-

E #56-26から#56-32までの結果を示した。

F

精製SOD1-Derlin-1複合体に対する結合阻害活性評価						
備考(番号)	構造式	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (スコア)	アッセイ濃度 (μ M)	活性値 (阻害率%)	活性値 (IC50)
#56-33		50	2	50	79.02	28.6
				25	42.93	
				10	16.09	
				5	17.01	
				2.5	11.03	
#56-34		50	0	-	-	-
#56-35		50	0	-	-	-
#56-36		50	0	-	-	-
#56-37		50	0	-	-	-

F #56-33から#56-37までの結果を示した。