

令和元年6月20日現在

機関番号：13201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K08193
研究課題名(和文) トランスサイレチンの単量体補足を基盤とする革新的抗アミロイドーシス薬の開発

研究課題名(英文) Development of a TTR amyloidogenesis inhibitor based on the capture of transthyretin monomers

研究代表者
横山 武司 (Takeshi, Yokoyama)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50524162
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：トランスサイレチンの単量体に結合することでアミロイド線維形成を阻害する、全く新しい作用機序をもつトランスサイレチン(TTR)アミロイドーシス阻害薬の開発を行った。コンピューターによるスクリーニングや化合物ライブラリを探索することにより、抗炎症薬であるジアセレインが候補化合物であることが明らかになった。物理化学的な実験から、ジアセレインは、既存の阻害剤と同様に四量体に結合して立体構造を安定化する一方で、単量体・および二量体を安定化することでアミロイド線維形成を阻害していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、国内で承認されているATTR-FAPの治療は肝移植またはTTRを安定化するピンダケルに依存している。治療の選択肢を広げるために、新しい作用機序のアミロイド線維形成阻害剤の創製が望まれる。本研究ではジアセレインが強い線維阻害作用を示すことを発見し、ピンダケルとは異なる作用機序であることが示唆された。ジアセレインは新規のアミロイド線維形成阻害剤、あるいはその誘導体化合物となりうる。

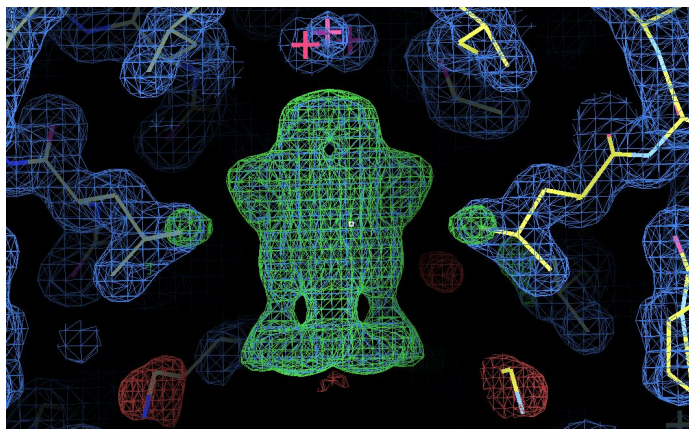
研究成果の概要(英文)：We explored a candidate for a novel transthyretin (TTR) amyloidogenesis inhibitor that binds to the TTR monomer. We found diacerein, an anti-inflammatory drug, as a candidate of a TTR amyloidogenesis inhibitor by computer-aided screening and screening of in-house compound library. We discovered by biophysical experiments that while diacerein stabilized the TTR tetramer by binding to TTR in a same manner as other TTR amyloidogenesis inhibitors, diacerein inhibited the TTR amyloid fibril formation of TTR by stabilizing the TTR monomer and dimer. Although further investigation is required, our study indicates diacerein would be a novel TTR amyloidogenesis inhibitor.

研究分野：医薬品化学

キーワード：トランスサイレチン アミロイドーシス ATTR-FAP ジアセレイン

さらに V30M-TTR とジアセレイン複合体の X 線結晶構造解析を行った。サイロキシン(T4) 結合部位に大きな差フーリエピークが観測された。T4 結合部位に結合したジアセレインであると考えられる。しかし、この電子密度図にジアセレインをフィットすると、ジアセレインのアセチル基や水酸基がタンパク質の側鎖と接触してジアセレインを置くことができない。この原因はいくつか考えられるが、一つはジアセレインの親和性が低く、電子密度図があいまいであるため、ジアセレインの構造と電子密度図がフィットしない可能性である。もう一つは、結晶の育成途中にジアセレインが分解（例えばアセチル基の分解など）している可能性である。いずれにしても、結晶構造解析の結果から、ジアセレインは T4 結合部位に結合し、四量体を安定化していることが明らかになった。

図 2 . 1.45 分解能で決定した V30M-TTR-ジアセレイン複合体の結晶構造。T4-結合部位に大きな差フーリエピーク(綠色メッシュ : 3.3) が観測された。



本課題では、ジアセレインが TTR アミロイド線維形成阻害剤であることを同定し、阻害能力の指標である IC50 は 5.4 μM と極めて強く TTR のアミロイド線維形成を阻害することを明らかにした。また、ジアセレインは TTR 四量体だけでなく、二量体と単量体にも結合し、その立体構造を安定化していることが明らかになった。ただし、等温滴定カロリーメトリー実験ではジアセレインは二量体 TTR (S112I 変異体 TTR) には結合しない結果が得られており、さらなる反芻実験および異なる手法での検証が必要である。しかしながら、本研究で得られた結果は、ジアセレインが既存の TTR 安定化剤としてだけでなく、TTR をタンパク質品質管理機構誘導して線維形成を阻害する、デュアルインヒビターである可能性を提示するものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. [Yokoyama T](#), Mizuguchi M. Crown Ethers as Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 62, 2076-2082 (2019).
2. [Yokoyama T](#), Kitakami R, Mizuguchi M. Discovery of a new class of MTH1 inhibitor by X-ray crystallographic screening. *Eur J Med Chem* 167, 153-160 (2019).
3. Chaudhary N, et al. Transthyretin Amyloid Fibril Disrupting Activities of Extracts and Fractions from *Juglans mandshurica* Maxim. var. *cordiformis* (Makino) Kitam. *Molecules* 24, (2019).
4. [Yokoyama T](#), Mizuguchi M. Inhibition of the Amyloidogenesis of Transthyretin by Natural Products and Synthetic Compounds. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 41, 979-984 (2018).
5. Daikoku T, et al. Characterization of susceptibility variants of poliovirus grown in the presence of favipiravir. *J Microbiol Immunol* 51, 581-586 (2018).
6. [Yokoyama T](#), Hanawa Y, Obita T, Mizuguchi M. Stability and crystal structures of His88 mutant human transthyretins. *FEBS Lett* 591, 1862-1871 (2017).
7. [Yokoyama T](#), Ostermann A, Schrader TE, Mizuguchi M. Large-scale crystallization and neutron crystallographic analysis of HSP70 in complex with ADP. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 73, 555-559 (2017).

〔学会発表〕(計 18 件)

- 1) [横山武司](#), 水口峰之. 抗アミロイドーシス薬としてのクラウンエーテルの有用性: クラウンエーテル-トランスサイレチン複合体の安定性と結晶構造. 第 16 回日本蛋白質科学会年会; 2016 Jun 21; 福岡.
- 2) 北上龍太, [横山武司](#), 水口峰之. トランスサイレチンのアミロイド線維形成におけるアントラキノン類の阻害機構. 日本薬学会北陸支部第 128 回例会; 2016 Nov 27; 金沢.
- 3) [横山武司](#). トランスサイレチン型アミロイドーシスの治療を目指した構造生物学的研究.

- 第 1051 回金曜セミナーおよび第 4 回 neutrons in biology 研究会 ; 2016 Mar 25 ; 東海 .
- 4) 横山武司 . FPPS-ビスホスホネート複合体におけるプロトン化状態の変化と水和構造 . 平成 28 年度 J-PARC/MLF 産業利用報告会 ; 2016 Jul 21 ; 東京 .
 - 5) Matsumoto K, Yokoyama T, Mizuguchi M. Novel BRD4 bromodomain binders with different binding modes revealed by crystallographic limited screening. The first international symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama.
 - 6) Inose M, Obita, T, Yokoyama T, Mizuguchi M. Analysis of the stability of transthyretins from different primates. The first international symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama.
 - 7) 北上龍太, 横山武司, 水口峰之 . アントラキノン誘導体のプルプリンによるトランスサイレチンアミロイド線維形成の阻害機構 . 第 17 回日本蛋白質科学会年会 ; 2017 年 6 月 20 日 ~ 22 日 ; 仙台 .
 - 8) 横山武司, 小坂友人, 松本知憲, 北上龍太, 水口峰之 . クラウンエーテルと創薬標的タンパク質複合体の X 線結晶構造解析 . 第 17 回日本蛋白質科学会年会 ; 2017 年 6 月 20 日 ~ 22 日 ; 仙台 .
 - 9) 横山武司, 松本知憲, 鍋島裕子, 水口峰之 . X 線結晶解析スクリーニングによる BRD4 阻害剤の探索と BRD4 - 阻害剤複合体の中性子結晶構造解析 . 第 55 回日本生物物理学会年会 ; 2017 年 9 月 19 日 ~ 21 日 ; 熊本 .
 - 10) Wijaya P, Yokoyama T, Mizuguchi M. Identification of Purpurin as DAPK1 Inhibitor and X-ray Structural Analysis of DAPK1-Purpurin Complex. 日本薬学会北陸支部第 129 回例会 ; 2017 年 11 月 26 日 ; 金沢 .
 - 11) 横山武司, Andreas Ostermann, Tobias Schrader, 水口峰之 . 中性子結晶解析による HSP70 内部の水和構造の可視化 . 日本薬学会北陸支部第 129 回例会 ; 2017 年 11 月 26 日 ; 金沢 .
 - 12) Takeshi Yokoyama, Yuma Hanawa, Takayuki Obita, Mineyuki Mizuguchi. The effect of amino acid substitution at position 88 on the structure and stability of transthyretin. The XVIth International Symposium on Amyloidosis; 2018 Mar 26-29; Kumamoto.
 - 13) Keisuke Chosa, Yukiko Teranishi, Ryoko Sasaki, Shun Takaki, Takeshi Yokoyama, Yoshiki Imai, Yuriko Wakita, Takashi Sato, Tsuyoshi Shuto, Mary Ann Suico, Mineyuki Mizuguchi, Hirofumi Kai. Virtual and high-throughput screenings identify novel TTR stabilizers for hereditary ATTR amyloidosis. The XVIth International Symposium on Amyloidosis; 2018 Mar 26-29; Kumamoto.
 - 14) Ryota Kitakami, Takeshi Yokoyama, Kishin Inui, Takuya Okada, Naoki Toyooka, and Mineyuki Mizuguchi. Characterization of diacerein as a transthyretin amyloidogenesis inhibitor. The 3rd Toyama-Asia-Africa-Pharm Symposium; 2018 Sep 10-12; Toyama.
 - 15) 横山武司, Peter Wijaya, 水口峰之 . DAPK1 阻害剤としての天然アントラキノンの同定と構造活性相関研究 . 第 18 回日本蛋白質科学会年会 ; 2017 Jun 20-24 ; 新潟 .
 - 16) 水口峰之, 横山武司 . トランスサイレチンのアミロイド線維形成を阻害する天然化合物の探索 . 第 6 回日本アミロイドーシス研究会学術集会 ; 2018 Aug 25 ; 松本市 .
 - 17) 乾貴信, 岡田卓哉, 北上龍太, 横山武司, 水口峰之, 豊岡尚樹 . -mangostin を基盤としたアミロイド病治療薬の開発研究 . 平成 30 年度有機合成化学北陸セミナー ; 2018 Sep 13-14 ; 魚津 .
 - 18) 日下勝弘, 横山武司, 山田太郎, 矢野直峰, 田中伊知朗, 水口峰之 . iBIX によるトランスサイレチン変異体の中性子回折実験 . 日本中性子科学学会 第 18 回年会 ; 2018 Dec 4-5 ; 水戸

[図書](計 1 件)

- 1) 水口峰之, 横山武司 . トランスサイレチン分子構造の安定性と水素結合 . 医学のあゆみ アミロイドーシスの最新情報 . 2016 ; 258(6) : 746-7 .

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。