

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790086

研究課題名（和文） 変異酵素の構造安定化に基づいたリソソーム病治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of new concept drugs against lysosome disease base on enzyme structures stabilized effects.

研究代表者

加藤 敦 (KATO ATSUSHI)

富山大学・大学病院・准教授

研究者番号：60303236

研究成果の概要：ピロリジン型イミノ糖が活性部位指向的なケミカルシャペロン効果を持つことを見いだした。これら化合物は、細胞表面の糖鎖構造に影響を与えることなく、Gaucher 病モデル細胞内の $\beta$ -glucocerebrosidase 活性を増加させた。これまでピロリジン型イミノ糖は、水溶液中におけるコンフォメーションが安定せず、特定のグリコシダーゼに対し選択的に結合することは難しいとされてきた。本研究成果により、特定の誘導体化により生体内の pH に依存することなく、ほぼ一定のコンフォメーションを保たせることが可能であることを明らかにした。従って、これらピロリジン型イミノ糖は、新しいタイプのケミカルシャペロンと成り得る可能性が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：糖質生化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：リソソーム病、イミノ糖、ケミカルシャペロン、小胞体品質管理機構、グリコシダーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) リソソーム病は、リソソーム酸性加水分解酵素の活性が低下し、未消化の糖脂質が蓄積するために起きる先天性代謝疾患の総称である。 $\alpha$ -galactosidase A の欠損による Fabry 病や、 $\beta$ -hexosaminidase A,B の欠損による Sandhoff 病などが存在する。発症は非常に稀であるが、その病状は重篤かつ多様である。Gaucher 病は、リソソーム病の中で日本にお

ける患者数が比較的多く、有効な治療法の開発が望まれている。

(2) Gaucher 病は、リソソーム酵素 Glucocerebrosidase 活性の低下により、その基質である Glucosylceramide (以下 GlcCer) が蓄積することで発症し、臨床症状に応じて I 型から III 型に分類される。発症年齢が高く、中枢神経障害を併発しない I 型に対し、乳

児・新生児に発症する急性神経型のⅡ型、幼児期に発症する亜急性神経型のⅢ型が存在する。GlcCerが肝臓・脾臓・骨髄といった細網内皮系に蓄積し、肝脾腫や極度の貧血、出血傾向、骨粗鬆症を引き起こす。Ⅱ型・Ⅲ型では中枢神経系にまでGlcCerが蓄積するため、斜視や開口障害のほか強直性の痙攣や呼吸不全を発症する。

(3) Gaucher病の治療には、欠損酵素の補充、蓄積脂質の生合成の抑制、レトロウイルス・アデノウイルスを利用する遺伝子治療、さらには骨髄移植などが考えられている。しかし現時点では遺伝子治療および骨髄移植に関しては、アメリカを中心に治療法の確立が試みられているものの、具体的な臨床応用の実現のめどは立っていない。日本では欠損酵素を外から補充する酵素補充療法が行われており、酵素製剤 cerezyme™ が認可されている。Ⅰ型からⅢ型にまで適応され、肝脾腫・出血傾向・貧血に対し著明な効果を発揮している。しかし、酵素補充療法は根本的治療法ではないために治療は一生継続し、治療を受ける患者の負担は大変大きい。さらに、血液脳関門を通過しないため、神経症状を呈するⅡ型及びⅢ型患者の中枢神経症状には効果が得られないという問題点がある。

(4) 先天的な遺伝病の多くは、重要な機能を持つタンパク質の点突然変異や部分的欠損が原因で起こる。これらの変異によってタンパク質分子は正しく折りたたまれなくなり、機能が減退したり、異常な凝集体を形成するようになる。小胞体には新生タンパク質分子の折りたたみ状態をモニターする品質管理機構が存在し、品質管理からふるい落とされた未成熟なタンパク質分子はゴルジ装置へ送られることなく小胞体に留められ、最終的には分解過程へと送られる。最近、フォールディングに異常がある変異タンパク質であっても分子シャペロンを過剰発現させると分解過程に移行するタンパク質の割合が減少し、機能性の向上が認められるという報告がなされている。

(5) 亜型 Fabry 病患者由来の変異酵素は、基質に対する  $K_m$ ,  $V_{max}$  は正常酵素と変わらないとの報告がある。また、酵素の合成自体には異常は認められないことも確認されている。これら変異酵素を解析した結果、小胞体内と同じ中性条件下においては、酵素活性の速やかな失活が認められるのに対し、リソソームと同じ酸性条件下では、その活性は正常酵素よりは低いものの保持される傾向が見られる。つまり、変異酵素は、熱安定性と中性付近での pH 安定性が低下しているといえる。

## 2. 研究の目的

(1) 内因性分子シャペロンと同様に、コンフォメーションが不安定であったり、正しい折りたたみ構造が取れないような変異酵素に対し、コンフォメーションの安定化を促したり、正しい折りたたみ構造の形成を促すような化合物を外因的に加えることによって、変異酵素が分解過程に回される割合を減少させ、結果としてリソソーム酵素活性を向上させる化合物のデザインを行う。

(2) 具体的な化合物の探索・修飾にあたっては、酵素の X 線結晶解析データに基づいた Rational Design だけでなく、酵素と化合物の induced fit を考慮したデザインを用いた。また、作用メカニズムに関して小胞体品質管理や小胞体関連分解との関わりを精査し、細胞生物学的な基礎研究に裏打ちされた効果的な治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 変異酵素の活性中心と可逆的に結合し、かつ高い親和性を有する化合物ほどタンパク分子のコンフォメーションを安定化させ、ゴルジ装置へ輸送を手助けする能力が高いことが考えられた。従ってターゲット酵素が候補化合物を認識するかどうかだけではなく、ターゲット酵素と化合物の複合体の安定性、カイネティック分析を、同時に測定し候補化合物を効率よく絞り込んだ。測定サンプルとしては、酵素の基質特異性の面から、ピラノース環の酸素原子を窒素原子に置き換えたピロリジンあるいはピペリジンアルカロイドや炭素環式糖アナログであるカルバ糖を中心に用いた。

(2) 候補化合物については更に、ミュレーション部位の異なる多様なモデル細胞を用い、酵素活性の測定ならびにウエスタンブロットによるターゲット酵素タンパク量の増加の有無を確認した。効果が認められた化合物については構造活性相関を検討し、作用発現に必要な条件を検討するとともに、必要に応じて系統だった一連の化学的・酵素的な修飾を実行した。

## 4. 研究成果

(1) スクリーニングの結果、ノルトロパンアルカロイドである calystegine やピペリジン型のイミノ糖に活性部位指向的なケミカルシャペロン効果が確認された。以下に、イミノ糖によるケミカルシャペロン効果について、基本骨格ごとに研究成果を示す。

(2) ノルトロパン型イミノ糖：初期スクリーニングの結果、calystegine B<sub>2</sub>が、β-glucocerebrosidase およびα-galactosidase A に対して高い親和性を示した。そこで水酸基の配位の異なる一連のcalystegine 類について測定を行い、構造活性相関を検討したところ、calystegine B<sub>2</sub>の2-デオキシ体であるcalystegine A<sub>5</sub> および2-エピマーであるcalystegine B<sub>3</sub>では、両酵素に対する親和性が著しく低下した。また、calystegine B<sub>2</sub>のC6exo位に水酸基が配位したcalystegine C<sub>1</sub>では、β-glucocerebrosidase に対する親和性が、calystegine B<sub>2</sub>よりも強くなる一方で、α-galactosidase A に対する親和性は大きく低下した。この現象は、C6exo位に水酸基が配位しているcalystegine B<sub>1</sub>においても確認された。以上の結果から、母核上のC2位の位水酸基が、エクアトリアルに配位していることがβ-glucocerebrosidase およびα-galactosidase A に対する強い親和性に必要であり、またC6exo位に水酸基が配位させることにより、β-glucocerebrosidase に対する選択性を向上させることが可能であることが明らかになった。更に、α-galactosidase A に対する選択性を向上させるデザインを模索した結果、ノルトロパン骨格上の窒素原子にメチル基を導入することにより、選択性が向上することが示唆された。Calystegine B<sub>2</sub>およびcalystegine C<sub>1</sub>をGaucher病モデル細胞に添加したところ、有意な活性の上昇が認められた。一方、N-methyl-calystegine B<sub>2</sub>を垂型Fabry病モデル細胞に添加したところ、同様に明らかな活性の上昇が認められたが、その効果は、既にケミカルシャペロン作用が報告されているピペリジン型イミノ糖1-deoxygalactonojirimycin (DGJ)よりも弱かった。

(3) ピペリジン型イミノ糖：ピペリジン型イミノ糖のうち、DGJは既にα-galactosidase A に対し選択的な親和性をし、Fabry病モデル細胞の酵素活性を正常細胞の約60%まで上昇させることが報告されている。また、垂型患者由来のcDNAを導入したTgMマウスにおいても、30mg/kg body weight/dayの濃度で1週間経口投与したところ、心臓、腎臓、脾臓、肝臓で活性上昇を認め、特に心臓では非投与群と比べ約18倍の酵素活性が認められたとの報告がある。そこで、本研究では、ターゲット酵素をβ-glucocerebrosidase にしぼり、スクリーニングを行った。ピペリジン型イミノ糖は、ヘキソースの構造を忠実に擬態した構造であるため、ピペリジン環上の水酸基の配位がglucoseと相同性が高いDNJをベースとして各種誘導体化を試みた。その結果、DNJのN-アルキル誘導体N-nonyl-DNJ (NN-DNJ)はβ-glucocerebrosidase に対しKi値が0.30 μM

と強い親和性を示す優れた化合物であった。しかしながらNN-DNJは、β-glucocerebrosidase だけでなくα-glucosidase に対しても強い親和性を示すことが明らかとなり、実用化に向けては、いかにβ-glucocerebrosidase に対する選択性を高めるかという新たな課題が出てきた。そこで、ピペリジン型イミノ糖にアルキル側鎖を導入する位置を窒素原子ではなくアノメリック位(C-1α)に変え同様に検討したところ、α-1-C-octyl-DNJではKi値が0.28 μM、α-1-C-nonyl-DNJではKi値が0.20 μMとC-1α位のアルキル側鎖の延長に伴ってβ-glucocerebrosidase に対する強い親和性が増し、選択性もN-アルキル誘導体よりも優れていることが明らかになった。

(4) ピロリジン型イミノ糖：ピロリジン型イミノ糖は、加水分解酵素が基質を分解する際の反応中間体を模しているといわれている。これまでピロリジン型イミノ糖が活性部位指向的なケミカルシャペロン効果を示すという報告は、ほとんどなされていなかったが、今回のスクリーニングの結果、ピペリジン型イミノと比較するとその効果は低いもののいくつかの化合物にシャペロン活性が認められた。実験の結果、これらピロリジン型のイミノ糖は、ピペリジン型イミノ糖とは異なり、細胞内糖鎖プロセッシングに対し、最大1mM添加によっても糖鎖構造に全く影響を与えないことが明らかとなった。そのためピロリジン型イミノ糖は、従来型に代わる副作用の発現を抑えた新たな基本化合物となりうる可能性が考えられた。しかしながら、これまでピロリジン型イミノ糖は、ピロリジン型イミノ糖と比べ、水溶液中におけるコンフォメーションが安定せず、特定のグリコシダーゼに対し選択的に結合することは難しいとされてきた。しかしながら本研究成果により、特定の誘導体化を行うことにより、生体内のpHに依存することなく、ほぼ一定のコンフォメーションを保たせることが可能であることが明らかになった。また、実際に各種グリコシダーゼに対する結合指向性を測定したところ、β-galactosidase やα-glucosidase に対する親和性は低下し、目的とするβ-glucocerebrosidase に対する明らかな選択性の向上が認められた。また、これら誘導体を細胞に添加したところ、酵素活性の有意な上昇が認められた。今後、生体内への吸収及び代謝過程などを明らかにしていく必要があるが、これらピロリジン型イミノ糖は、新しいタイプのケミカルシャペロンと成り得る可能性があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kuriyama, C., Kamiyama, O., Ikeda, K., Sanae, F., Kato, A., Adachi, I., Imahori, T., Takahata, H., Okamoto, T., Asano, N. (2008) In vitro inhibition of glycogen-degrading enzymes and glycosidases by six-membered sugar mimics and their evaluation in cell cultures. *Bioorg. Med. Chem.* 16 (15), 7330-7336, 2008, 査読有.
- ② Minami, Y., Kuriyama, C., Ikeda, K., Kato, A., Takebayashi, K., Adachi, I., Fleet, G.W.J., Kettawan, A., Okamoto, T., Asano, N. Effect of five-membered sugar mimics on mammalian glycogen-degrading enzymes and various glucosidases. *Bioorg. Med. Chem.* 16 (6), 2734-2740, 2008, 査読有.
- ③ Kato, A., Kato, N., Miyauchi, S., Minoshima, Y., Adachi, I., Ikeda, K., Asano, N., Watson, A.A., Nash, R.J. Isolation of iminosugars from *Baphia nitida* Lodd. *Phytochemistry* 69 (5), 1261-1265, 2008, 査読有.
- ④ Kato, A., Kato, N., Adachi, I., Hollinshead, J., Fleet, G.W.J., Kuriyama, C., Ikeda, K., Asano, N., Nash, R.J. Isolation of glycosidase-inhibiting hyacinthacines and related alkaloids from *Scilla socialis*. *J. Nat. Prod.* 70 (6), 993-997, 2007, 査読有.
- ⑤ Yu, L., Ikeda, K., Kato, A., Adachi, I., Godin, G., Compain, P., Martin, O., Asano, N.  $\alpha$ -1-C-Octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 7736-7744, 2006, 査読有.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 宮内沙織、加藤 敦、今堀龍志、高畑廣紀、足立伊佐雄: ピペリジン型イミノ糖を用いた糖尿病治療薬の開発研究: 日本薬学会第 129 年会、2009. 3, 京都
- ② 吉村祐一、大原千明、加藤 敦、足立伊佐雄、高畑廣紀: 5-アザウロン酸類の合成と $\beta$ -グルクロニダーゼ阻害に関する構造活性相関研究: 第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム 2008.11, 大阪
- ③ 大原千明、高橋遼子、宮川達徳、吉村祐一、高畑廣紀、加藤 敦、足立伊佐雄: ウロン酸型アザ糖類の合成と $\beta$ -glucuronidase 阻害活性の評価: 日本薬学会第 128 年会、

2008. 3, 横浜

- ④ Atsushi Kato, Noriko Kato, Isao Adachi, Hiroki Takahata, and Naoki Asano: Biological Properties of D- and L-1-deoxyiminosugars: Rare Sugar Congress 2006 November Takamatsu, Kagawa, Japan.
- ⑤ 浅野直樹、虞亮、池田京子、加藤 敦、足立伊佐雄、Philippe Compain、Olivier R. Martin、石井達、樊建強: グルコセレブロシダーゼ阻害剤の構造活性相関とシヤペロニング活性について: 日本糖質学会第 26 回年会、2006. 8, 仙台
- ⑥ 加藤 敦、足立伊佐雄、大島京子、浅野直樹、栗山ちなみ、加藤典子、Robert, J. Nash: 新規hyacinthacine類の構造とグリコシダーゼ阻害活性: 日本糖質学会第 26 回年会、2006. 8, 仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 敦 (ATSUSHI KATO)  
富山大学・附属病院・准教授  
研究者番号: 60303236