

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16319

研究課題名(和文) スルファターゼの変異で起こるライソゾーム病に対するボロン酸を用いた治療薬の創製

研究課題名(英文) Development of Boronic Acid Derivatives for the Treatment of the Lysosomal Storage Diseases Caused by Mutations in the Sulfatases

研究代表者

唐木 文霞 (Karakai, Fumika)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80756057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの細胞の中には、不要になった物質を分解するための、スルファターゼと呼ばれる酵素がある。このスルファターゼが遺伝子の異常により機能を失うと、本来分解されるべき物質が細胞の中に溜まっていき、細胞の機能を損ない死に至ることがある。本研究では、このような機能を失ったスルファターゼに結合することで、その機能を回復させ、スルファターゼの異常に起因する疾患を治療する化合物の創製を試みた。予備検討の結果、ボロン酸と呼ばれる部位を持つ一連の化合物が、スルファターゼに結合することが示唆されたため、構造が異なるボロン酸類を種々合成し、これらがスルファターゼに結合するかを調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スルファターゼの異常に起因する疾患の一部では、骨髄移植やスルファターゼを体外から投与方法(酵素補充療法)による治療が行われている。しかし、前者は患者の身体的負担が非常に大きく、後者では酵素を補充するのに要する時間や酵素の費用が負担となる。もし、スルファターゼの異常に起因する疾患を一般的な飲み薬で治療できるようになれば、上述した負担をなくすることができる。本研究では、そのような薬を創製する上で必要な情報を取得できた。したがって、将来的な薬の開発につながり得るといえる。

研究成果の概要(英文)：In human cells, there is a family of enzymes named sulfatases, which degrade the waste products in the cells. Mutations of the genes can induce loss of activities of the sulfatases, which causes storage of the waste products, malfunction of the cells, and finally death of the affected individuals. In this study, we set out to develop compounds that bind to the abnormal sulfatases and restore the activity of them, and treat the diseases caused by mutations of the sulfatases. In our preliminary study, it was suggested that boronic acids bind to the sulfatases. Thus, we synthesized various derivatives of boronic acids, and tested if they bind to the sulfatases.

研究分野：創薬化学(ドラッグライクネス, 希少疾病), ケミカルバイオロジー

キーワード：スルファターゼ ファーマコロジカルシャペロン ライソゾーム病 ボロン酸 ムコ多糖症 シャペロン化合物

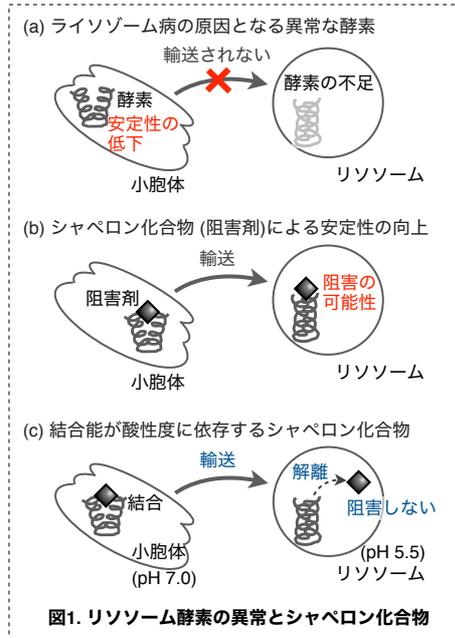
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) ライソゾーム病とシャペロン療法

細胞内のリソゾームという器官には、不要になった物質を分解するための酵素が備わっている。遺伝子の異常によりこの酵素が機能しないと、本来分解されるべき物質がリソゾームに貯留する。その結果、細胞の正常な働きが妨げられ、健康を害し、最終的に死に至る場合もある。このように、リソゾームの酵素の機能不全により引き起こされる疾患を一般にライソゾーム病(ライソゾームはリソゾームの英語読み)といい、本邦での患者数は900人ほどとされている。

ライソゾーム病の原因となる酵素の異常の中には、酵素としての機能を保持しているにも関わらず、合成途中の酵素の安定性が低下しているために酵素がリソゾームに到達できず、結果として機能が失われるものもある(図1(a))。これに対して、酵素の基質や阻害剤を結合させると安定性が向上し、リソゾームへの輸送が起きて酵素活性が回復する場合がある。このときに使われる基質や阻害剤を一般にシャペロン化合物といい、既に一部のライソゾーム病の治療に用いられている。しかし、酵素の阻害剤をシャペロン化合物として用いた場合には、リソゾームに到達した酵素を阻害剤(= シャペロン化合物)が阻害してしまう場合もあり、シャペロン作用(プラスの作用)と酵素阻害作用(マイナスの作用)の分離が課題となる場合も多い(図1(b))。酵素の合成の場である小胞体という器官は中性の環境であるが、リソゾーム内は酸性である。したがって、中性環境下で異常をきたした酵素に結合し、酸性条件下では解離する阻害剤をシャペロン化合物として用いれば、シャペロン作用と酵素阻害作用を分離することが可能だと期待できる(図1(c))。



(2) スルファターゼの異常に起因するライソゾーム病

生体内には硫酸基で修飾された物質が複数種存在し、これらが不要になった際に、硫酸基部分を加水分解する酵素が備わっている。これらの一連の酵素を総称してスルファターゼという。リソゾームに存在するスルファターゼの異常は、1.(1)で述べたライソゾーム病の原因になり得る。たとえば、異染性白質ジストロフィーという疾患はアリアルスルファターゼ A という酵素の異常により、ムコ多糖症 VI 型という疾患はアリアルスルファターゼ B という酵素の異常により、それぞれ引き起こされる。

スルファターゼの異常に起因するライソゾーム病に関しても、図1(a)のように合成途中の酵素の安定性が低下しているものに関しては、シャペロン化合物を用いることで治療できると期待される。しかし、スルファターゼの基質である硫酸基をもつ化合物は一般に親水性が高く細胞膜を透過しにくいいため、酵素を合成する場、すなわちシャペロン化合物が機能を発揮する場である小胞体に到達させるのは容易ではない。おそらくこのような理由から、スルファターゼを標的としたシャペロン化合物の創製は難航している。

2. 研究の目的

本研究では、ライソゾーム病の原因となるスルファターゼに結合することで安定性を向上させ、機能を回復させるシャペロン化合物を創製することを目的とした。さらに、図1(c)にあるように酸性度による結合能の違いを利用することで、シャペロン作用と酵素阻害作用を分離することも試みた。

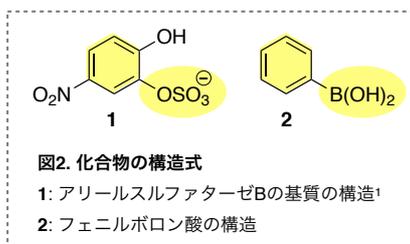
3. 研究の方法

本研究では、ムコ多糖症 VI 型の原因となるアリアルスルファターゼ B について検討した。アリアルスルファターゼ B の生体内での基質は糖であるが、この酵素は単純な芳香族硫酸エステルをも基質とすることが知られている(次頁 図2, 化合物1)。このような芳香族硫酸エステルの硫酸基部分を他の酸性官能基で代替可能か検討したところ、ボロン酸による置き換えが可能であることが示唆された(次頁 図2, 化合物2)。

1-(1)で述べた通り、酸性度に依存して結合/解離する阻害剤を用いれば、酵素活性を回復させるシャペロン作用と、阻害剤自体がもつ酵素阻害作用の分離が可能だと期待される。したがって、本研究では、フェニルボロン酸の類縁体を種々合成し、pH5.5 (酸性条件下)と pH7.0 (中性条件下)における野生型アリールスルファターゼ B に対する阻害作用を評価した。さらに、この中から比較的阻害作用の強かったものを選択し、ムコ多糖症 VI 型の原因となる変異体アリールスルファターゼ B に対しておおよそ影響を検討した。

(参考文献)

1. *Clin. Chem. Acta* 1959, 4, 453.



4. 研究成果

(1) ボロン酸の保護基の検討

ボロン酸は三量体化してボロキシンになることが知られており、ボロン酸とボロキシンが混在した状態では、化合物の構造や純度の決定、化合物処理の際の正確な濃度の決定が難しい。したがって、ボロン酸部分を何らかの形で保護できるか検討した。フェニルボロン酸 (2) のボロン酸部分を既知の方法で保護し、化合物 3-5 を合成した (表 1)。これらの野生型アリールスルファターゼ B に対する阻害作用を、4-メチルウンベリフェリル硫酸カリウムを基質として用いる方法で評価した¹。その結果、フェニルボロン酸 (2) とジエタノールアミンを反応させることで得られた化合物 5 に、フェニルボロン酸 (2) より強く、かつ酸性度に依存した阻害作用が認められた。

この結果を受けて、化合物 5 のフェニル基部分に種々の置換基を有する誘導体を合成し、その阻害作用を評価したが、明確な構造活性相関は認められなかった (データ非掲載)。さらに、本研究で用いた評価系ではジエタノールアミン自体でもアリールスルファターゼ B を阻害するような結果が認められたことから、阻害作用の評価の際には化合物 5 の誘導体が分解して生じるジエタノールアミンの影響が避けられないと考えられる。以上より、化合物 5 は構造展開に適さないと考え、保護されていないボロン酸の誘導体について検討を進めた。

表1 フェニルボロン酸の保護体の阻害作用

compound	structure	IC ₅₀ (mM)		ratio pH5.5/pH7.0
		pH5.5	pH7.0	
2		89.6	17.2	5.20
3		ND	ND	-
4		0.949	4.11	0.229
5		28.3	5.22	5.41

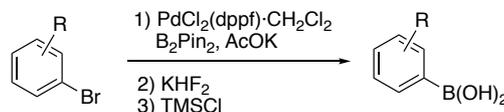
ND: Not Determined

(2) 無保護のボロン酸の野生型アリールスルファターゼ B に対する阻害作用

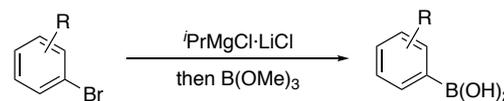
次に、フェニルボロン酸 (2) のフェニル基部分に種々の置換基を有する誘導体について、野生型アリールスルファターゼ B に対する阻害作用を調べ、構造活性相関情報の取得を試みた。ここで用いた誘導体のうち市販されていないものについては、(A) カップリング反応による方法^{2,3} (B) ハロゲン-金属交換反応を用いる方法⁴ (C) オルトリチオ化による方法⁵ のいずれかで合成した (スキーム 1)。

置換基をもたないフェニルボロン酸 (表 1, 化合物 2) と比較して、オルト位に置換基を有するものでは強い阻害作用が認められたため、これらについて詳細に検討した (次頁 表 2)。オルト位にメトキシ基を有する化合物 6 およびフルオロ基を有する化合物 8 は、いずれも無置換の化合物 2 より強い阻害作用を示した。これを受けて、両オルト位に置換基を有するフェニルボロン酸誘導体について検討したところ、フルオロ基をふたつ有する化合物 9 では阻害活性が向上したのに対し、メトキシ基をふたつ有する化合物 7 では活性が低下するという相反する結果となった。置換基

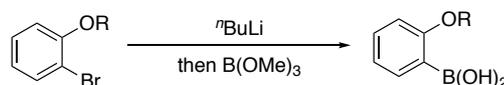
(A) カップリング反応による方法



(B) ハロゲン-金属交換反応を用いる方法



(C) オルトリチオ化による方法

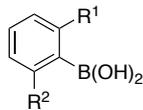


スキーム1 種々の置換基を有するフェニルボロン酸誘導体の合成

同士の単純な相加効果が認められない理由はいくつか考えられるが、現時点ではボロン酸部分の電子密度が関与している可能性があると考えている。この点に関しては、今後さらに検討する予定である。

表2 オルト位に置換基を有するフェニルボロン酸誘導体の阻害作用

compound	R ¹	R ²	IC ₅₀ (mM)		ratio pH5.5/pH7.0
			pH5.5	pH7.0	
6	H	OMe	3.84	0.218	18.8
7	OMe	OMe	NA	40.1	-
8	H	F	10.9	1.11	9.81
9	F	F	3.49	0.147	23.8
10	OMe	F	4.15	0.369	11.3



NA: No Activity (1 mM)

(参考文献)

1. *Clin. Chem. Acta* **1977**, *80*, 423.
2. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 6622.
3. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 468.
4. *Org. Lett.* **2017**, *13*, 4479.
5. *Org. Proc. Res. Dev.* **2018**, *22*, 1489.

(3) フェニルボロン酸誘導体の野生型アリアルスルファターゼ B に対する安定化作用

変異体アリアルスルファターゼ B の機能を回復させるシャペロン化合物は、アリアルスルファターゼ B への結合能を有している必要がある。2-(2)で見出したフェニルボロン酸類がアリアルスルファターゼ B に結合するか調べるために、野生型アリアルスルファターゼ B がフェニルボロン酸類を共存させることで熱変性に耐性となるか検討した(図 3)。リゾソーム酵素を含む酵素はタンパク質であるため、熱をかけると失活し、酵素活性を失う。このときに、酵素に結合する化合物を共存させておくと、化合物の安定化作用により酵素が熱変性に耐性となる現象が知られており、この耐性を化合物の結合の指標として用いた例がある¹。

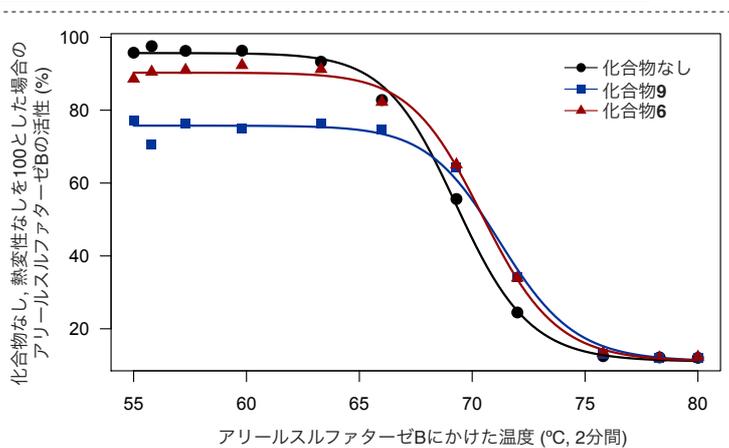


図3. 野生型アリアルスルファターゼBの熱変性試験の結果

野生型アリアルスルファターゼ B に 55~80 °C の熱を 2 分間かけ、残存した酵素活性を測定したところ、予想通り、かけた温度の上昇ともなって酵素活性が低下した(図 3)。熱変性によるアリアルスルファターゼ B の失活の度合いを、フェニルボロン酸類の共存下と非共存下で比較したところ、フェニルボロン酸類を共存させた条件ではグラフが右側に移動している、すなわち熱変性に耐性となっていることがわかる。したがって、フェニルボロン酸類は野生型アリアルスルファターゼ B に対する結合能を有していると考えられる。なお、このグラフから算出した各条件の T_m 値 (酵素活性が半分になるときの温度)は、化合物なしでは 69.6 °C、化合物 9 の共存下では 71.4 °C、化合物 6 の共存下では 70.7 °C であった。

(参考文献)

1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23502.

(4) ムコ多糖症 VI 型の原因となる変異体アリアルスルファターゼ B に対する作用の検討

アリアルスルファターゼ B の N 末端から 137 番目のグリシンがバリンに置換した変異 (G137V 変異)は、ムコ多糖症 VI 型の原因になる。この変異体をもったムコ多糖症 VI 型の患者に由来する細胞では、酵素活性が健常者の細胞の 1/70 ほどに低下している。一方で、アリアルスルファターゼ B 1 分子あたりの酵素活性は、野生型と同程度であることが報告されている¹。このことから、G137V 変異体の酵素活性は、図 1(a)のように合成途中の酵素の安定性が低下しているために損なわれている可能性があると考え、この変異体に対するフェニルボロン酸類の作用を検討した。

① G137V 変異体アリアルスルファターゼ B に対する安定化作用の検討

2.-(3)と同様の手法で、G137V 変異体アリアルスルファターゼ B にフェニルボロン酸類を共存させることで熱変性に耐性となるか検討した。しかし、熱変性に耐性となるという結果を再現性良く得ることはできなかった。この理由として (1) 安定発現細胞がもつ酵素活性がもともと低いので、安定化作用があったとしても検出が困難である (2) フェニルボロン酸類は G137V 変異体アリアルスルファターゼ B には結合しない のふたつの可能性を考えている。もし前者であれば、フェニルボロン酸類を作用させることで酵素活性を回復させられる可能性は大いにあるので、次に G137V 変異体の酵素活性を回復させる作用、すなわちシャペロン作用について検討を進めた。

② G137V 変異体アリアルスルファターゼ B に対するシャペロン作用の検討

G137V 変異体アリアルスルファターゼ B を安定発現した細胞をフェニルボロン酸類で処理し、酵素活性が回復するか、すなわちシャペロン作用が認められるか検討した。しかし、この検討では酵素活性の回復は認められなかった。化合物処理の方法 (濃度および時間) は詳細には検討できていないため、濃度が高すぎて阻害作用の発現が無視できなかった可能性があると考えられる。それ以外の可能性として、そもそも G137V 変異体が、シャペロン化合物を用いても酵素活性が回復しない変異体であった可能性もある。137 番目のグリシンは、アリアルスルファターゼ B 以外のスルファターゼの間でも広く保存されている²。したがって、このアミノ酸がバリンに置き換えると、合成途中の酵素の安定性以外にも影響を及ぼし、それが酵素活性を損なう原因であったため、シャペロン作用が発現しなかった可能性が考えられる。

(参考文献)

1. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21386.
2. *Structure* **1997**, *5*, 277.

(5) 今後の展望

① G137V 変異体以外の、ムコ多糖症 VI 型の原因となる変異体の作製

ムコ多糖症 VI の原因となるアリアルスルファターゼ B の変異体は、G137V 以外にも複数知られており¹、これらの中にはシャペロン化合物による酵素活性の回復が可能な変異体、すなわち合成途中の酵素の安定性が損なわれている変異体が含まれている可能性がある。したがって、ムコ多糖症 VI 型の原因となる変異体のうち、活性中心のアミノ酸から離れた場所に位置し、かつスルファターゼ間で保存されていないアミノ酸の変異体を作製する。シャペロン化合物による酵素活性の回復が可能な変異体か否かは、発現細胞を通常より低温の条件で培養することで、ある程度判別できると考えられる²。

② スルファターゼの成熟に必要な酵素の導入

4.-(4)①で述べた通り G137V 変異体を用いた検討では、安定発現細胞の酵素活性が著しく低かったために、フェニルボロン酸類による安定化作用を再現性良く検出することはできなかった。スルファターゼの成熟には SUMF1 (sulfatase-modifying factor 1) と呼ばれる酵素が必須であり³、これを導入すれば変異体アリアルスルファターゼ B の酵素活性が増大して、酵素活性を指標とした評価を行える可能性がある。したがって、この点についても引き続き検討する予定である。

③ シャペロン作用の検出方法の変更

4.-(4)②では酵素活性を指標としてシャペロン作用を検出することを試みたが、阻害作用が強く現れた場合には、この方法では検出できない。したがって、酵素活性以外のものを指標とした検出方法についても今後検討する。具体的には、小胞体で合成途中のスルファターゼと、リソソームに到達したスルファターゼでは分子量が異なることから⁴、ウエスタンブロット法によりこの違いの検出を試みる予定である。

(参考文献)

1. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 1788.
2. *Nature* **1992**, *358*, 761.
3. *Cell* **2003**, *133*, 445.
4. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1159*, 243.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日高恭子, 唐木文霞, 大金賢司, 西山郵子, 橋本祐一, 藤井秀明
2. 発表標題 ムコ多糖症VI型の治療を志向した arylsulfatase B のリガンドの探索
3. 学会等名 第64回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------