

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18850

研究課題名（和文）低分子化合物の分子凝集による酵素の新規阻害様式

研究課題名（英文）A novel mode of enzyme inhibition by molecular aggregation of low molecular weight compounds

研究代表者

丸山 達生（MARUYAMA, TATSUO）

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：30346811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：酵素と酵素阻害剤の関係は一对一の反応をイメージするのが一般的である。ところが、我々は酵素に対して多対一で阻害する低分子を発見した。Mn007という低分子化合物は筋ジストロフィ治療薬の候補化合物として2015年に報告された。我々はこのMn007がその溶解度を超えて不溶になり始めると、DNase Iに対する阻害活性が現れることを発見した。シクロデキストリンを用いてMn007の凝集物を強制的に可溶化させると、阻害効果が消失した。顕微鏡観察においてもMn007凝集物とDNase Iの相互作用が確認された。種々の検討から、DNase Iの阻害にMn007分子の凝集が重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで想定されていなかった阻害剤分子多数対酵素一分子という阻害様式を発見した。このことは生化学分野における酵素阻害の認識を大きく広げるものである。酵素阻害は創薬と深く関連するからである。またこれまで難しかったDNA分解酵素の阻害を実証できたことは大きい。これを元により実用的なDNA分解酵素阻害剤の開発につながる可能性がある。特に、DNA分解酵素は溶連菌感染症と深く関わっているため、実用的なDNA分解酵素阻害剤の開発はこれまで有効な手立てがなかった劇症型溶血性連鎖球菌の薬になる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of enzyme inhibition by an inhibitor is commonly recognized as a one-on-one reaction. However, we discovered a small molecule that inhibits an enzyme in a many-on-one manner. Mn007 is a small molecule compound reported in 2015 as a candidate for muscular dystrophy therapeutics. We found that when Mn007 exceeded its water solubility and became insoluble, it exhibited the inhibitory activity against DNase I. When cyclodextrin was used to solubilize Mn007 aggregates in water, the inhibitory effect disappeared. Microscopic observation also confirmed the interaction of Mn007 aggregates with DNase I. The various investigations revealed that the aggregation of Mn007 molecules was important for the inhibition of DNase I. Our finding would open up a new field in drug discovery.

研究分野：生物化学工学

キーワード：低分子 凝集 酵素阻害 DNA分解酵素 溶解度

### 1. 研究開始当初の背景

化合物1が比較的高濃度(220 μM)でFKTN型筋ジストロフィーモデルマウスに対して薬効を示すことを連携研究者の池田(藤田医科大)が発見していた。しかしながら、Mn007が水難溶性であり、薬として投与するためには可溶化させる工夫が必要であった。そこで池田と丸山は水難溶性の化合物1を、有機溶剤を用いず水に高濃度で溶かすことを検討した。2-ヒドロキシプロピルβシクロデキストリンにより化合物1を包接し、化合物1の水溶性を向上させることには成功したが、薬効が下がってしまうという壁に苦しんでいた。同時に、化合物1が細胞内の特定の酵素に対して阻害機能を発揮すると予想し、いくつかの検討を重ねたところ偶発的にDNA分解酵素に対して顕著な阻害活性を示すことを共同研究者の青井(神戸大医学研究科)が発見した。DNA分解酵素の阻害剤は、二価金属イオンのキレート剤が古くから知られている。しかしながら、このキレート剤は生体適合性がなく、また環境中での安定性も非常に高いため、実用的ではない(難分解性)。また他にも阻害剤として二種類ほど報告があるが、生体適合性がなく実用的ではない。

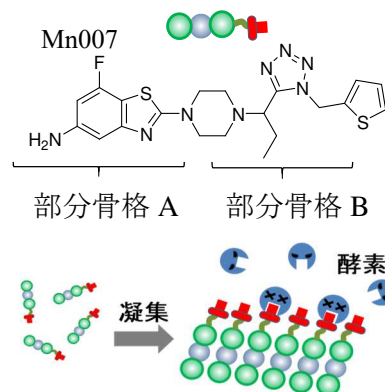


図1 本研究で用いる新規酵素阻害剤(Mn007)とその分子凝集による酵素阻害のイメージ

### 2. 研究の目的

本研究では、化合物分子の凝集が引き起こす全く新しい酵素阻害機構の解明に挑戦する(図1)。我々は図1に示した多環式低分子化合物Mn007がその溶解度を超えて不溶になり始めると、DNA分解酵素に対する阻害活性が現れることを発見した。従来の阻害剤は、阻害剤1分子がタンパク質1分子と相互作用し、阻害効果を発揮していた。本研究で明らかにする酵素阻害機構は、1分子では特段の機能を持たない低分子化合物が分子レベルで凝集し、この凝集体が核酸分解酵素(DNase)に対して阻害活性を示すという全く新しいものである(図1)。本研究では、1分子では特段の機能を持たない低分子化合物が凝集することで酵素阻害機能を発揮することの実証を目的とした。

### 3. 研究の方法

**DNase 活性測定:** 蛍光修飾オリゴ DNA (2本鎖、20-mer) と DNase I、DMSO に溶解した Mn007 を緩衝液中で混合し、蛍光光度計を用いて Ex/Em=495/515nm の蛍光を経時的に測定した。単位時間当たりの蛍光強度変化を酵素活性とした。  
**分子の凝集測定:** DNase I 活性測定と同じ条件で Mn007 水溶液を作製し、DLS 装置を用いて光散乱強度を測定した。Mn007 濃度に対して散乱強度をプロットした。

### 4. 研究成果

Mn007によるDNase Iの阻害と、Mn007の凝集状態が相関しているかどうかを調べた。蛍光DNAを用いた実験から、DNase IはMn007がおおよそ45 μM以上の濃度で阻害された。溶液の光散乱測定から、Mn007は45 μMから凝集体の形成が確認された(図2)。以上から、Mn007は凝集して初めてDNase Iを阻害することが示唆された。

DNase Iはその酵素活性に二価金属イオン(Mg<sup>2+</sup>)を必要とする。そのためMn007が金属イオンのキレート剤として関与している懸念が考えられた。そこでMg<sup>2+</sup>濃度を3~12 mMに変化させ、Mn007によるDNase I阻害を調べた。その結果、いずれのMg<sup>2+</sup>濃度においてもDNase I阻害はMn007濃度45 μMから観測された。こ

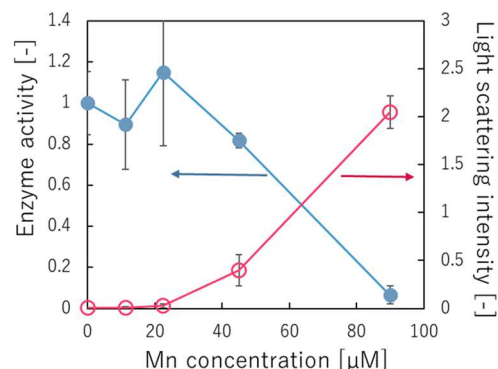


図2 Mn007によるDNA分解酵素(DNase I)の阻害(青)およびMn007の凝集濃度測定(赤)

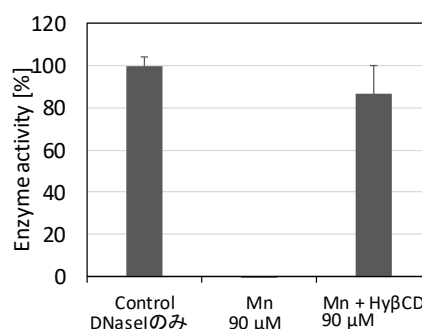


図3 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HyβCD)がMn007の可溶化がDNase I阻害に及ぼす影響

のことは、Mn007 による DNase I 阻害は  $Mg^{2+}$  に対するキレート効果でないことを示している。

次に Mn007 分子の凝集状態が阻害に直接関与していることを示すため、阻害効果を示す Mn007 濃度 90  $\mu M$  において 2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリンを用いて Mn007 を強制的に溶解させた。2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリンは Mn007 分子を包摂し、水に可溶化可能である。Mn007 濃度 90  $\mu M$  において凝集状態では明確な阻害効果が観測されたにもかかわらず、2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン存在下では DNase I 阻害効果が消失した (図 3)。このことは Mn007 の凝集が DNase I 阻害に重要であることを強く示している。

次に Mn007 凝集体と DNase I の相互作用を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。ここでは DNase I 分子に rhodamine B (赤色蛍光) をラベル化し、蛍光顕微鏡観察に用いた。その結果、Mn007 凝集体に対する DNase I の吸着が観察された。このことは、Mn007 凝集体に DNase I 分子が吸着し、このことが DNase I 酵素機能を阻害していることを強く示唆している。

続いて、Mn007 の分子構造を改変し、Mn007 より凝集能が高い化合物 compound 1 と緩衝液中で凝集しない化合物 compound 2 を合成した。

これらについても DNase I の阻害活性と凝集の相関を調査した。compound 1 は Mn007 より低い濃度 (約 10  $\mu M$ ) から凝集を開始し、それに伴って DNase I の阻害開始濃度も低下した (約 10  $\mu M$ 、図 4 上)。

一方、compound 2 は DNase I の活性測定溶液中で凝集せず、DNase I の阻害もしなかった (図 4 左)。以上から、Mn007 の基本骨格は凝集することで DNase I を阻害する特性を持つことが強く示唆された (図 5)。

この Mn007 は DNase I のみならず DNase II にも阻害効果を示した。そのときの Mn007 濃度も凝集体ができる濃度であった。

教科書的には、酵素阻害

剤は一分子が酵素一分子に作用し、酵素機能を阻害するとされている。さらに阻害様式は、拮抗阻害、非拮抗阻害、不拮抗阻害等に分類される。多くの疾病薬がこの阻害機構を元に開発されてきたが、この様式に当てはまらない酵素阻害が存在する可能性が高い。このことはこれからの創薬戦略にも大きな影響を与えると考えられる。

DNase は溶連菌感染症を引き起こす溶血性連鎖球菌が人体内で増殖する際に分泌する酵素としても知られている。人体は微生物等の侵入外敵に対して好中球細胞外トラップ (NETs) を放出し、菌類を捕縛・分解している。NETs は主に DNA でできているため、溶血性連鎖球菌は NETs を DNase により分解し、好中球による攻撃を回避し、増殖・感染拡大する。つまり DNase 阻害剤は溶連菌感染症の薬になりうる。1987 年から劇症型溶血性連鎖球菌が報告され、21 世紀においてもこの劇症型の致死率は 30% を超える。病状進行が早いいため特効薬が待ち望まれている。今後溶血性連鎖球菌の分泌する DNase および増殖抑制に Mn007 やその類似化合物が機能するかどうかを検証していく。

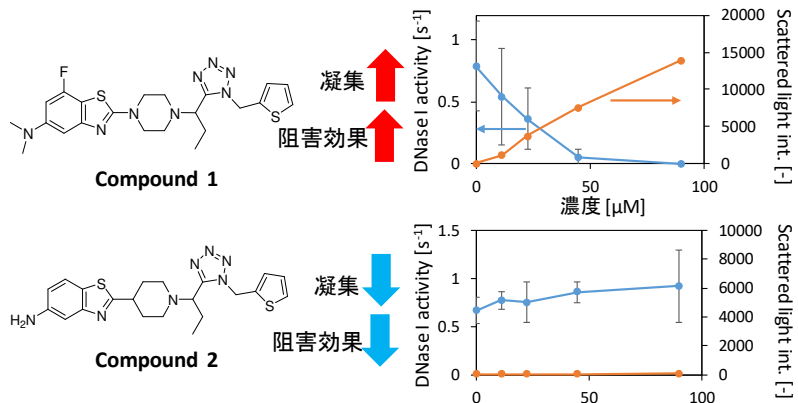


図 4 Mn007 類似化合物による DNase I の阻害

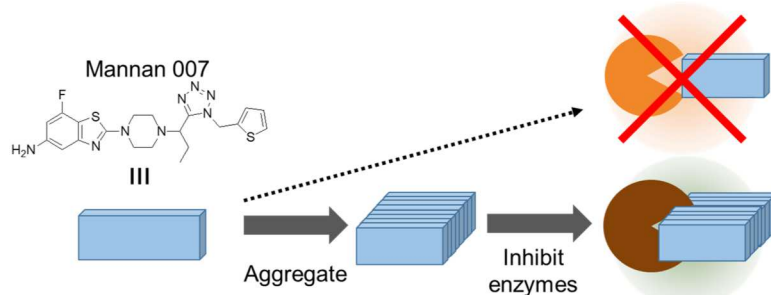


図 5 Mn007 凝集体による DNase I の阻害イメージ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchii Takane, Kaneko Kazuki, Morita Kenta, Nishino Takashi, Maruyama Tatsuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Rewritable Surface on a Plastic Substrate Using Fluorous Affinity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 3255 ~ 3263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.1c18633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga Yudai, Kanemitsu Sayuki, Yamamoto Shota, Kimura Toshihisa, Nishida Yuki, Morita Kenta, Maruyama Tatsuo	4. 巻 656
2. 論文標題 Thermally irreversible supramolecular hydrogels record thermal history	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 130416 ~ 130416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2022.130416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanemitsu Sayuki, Morita Kenta, Tominaga Yudai, Nishimura Kanon, Yashiro Tomoko, Sakurai Haruka, Yamamoto Yumemi, Kurisaki Ikuo, Tanaka Shigenori, Matsui Masaki, Ooya Tooru, Tamura Atsuo, Maruyama Tatsuo	4. 巻 126
2. 論文標題 Inhibition of Melittin Activity Using a Small Molecule with an Indole Ring	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5793 ~ 5802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.2c03595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Kenta, Nishimura Kanon, Yamamoto Shota, Shimizu Natsumi, Yashiro Tomoko, Kawabata Ryoko, Aoi Takashi, Tamura Atsuo, Maruyama Tatsuo	4. 巻 2
2. 論文標題 In Situ Synthesis of an Anticancer Peptide Amphiphile Using Tyrosine Kinase Overexpressed in Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 2023 ~ 2028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.2c00301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kanon Nishimura, Kenta Morita, Shota Yamamoto, Natsumi Shimizu, Takashi Aoi, and Tatsuo Maruyama
2. 発表標題 Intracellular Synthesis of a Self-Assembling Peptide Amphiphile to Selectively Kill Cancer Cells Overexpressing Tyrosine Kinase
3. 学会等名 The Pacific Polymer Conference 17 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshihisa Kimura, Natsumi Shimizu, Kenta Morita and Tatsuo Maruyama
2. 発表標題 Hydrolysis of amide bonds of foreign molecules using self-assembly of peptide lipids
3. 学会等名 The Pacific Polymer Conference 17 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsumi Shimizu, Sayuki Kanemitsu, Tomoko Yashiro, Kenta Morita, Takashi Aoi, Tatsuo Maruyama
2. 発表標題 Selective death of cancer cells using the overexpressed kinase and a peptide lipid
3. 学会等名 The Pacific Polymer Conference 17 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsumi Shimizu, Sayuki Kanemitsu, Tomoko Yashiro, Kenta Morita, Takashi Aoi, Tatsuo Maruyama
2. 発表標題 Induction of cancer cell apoptosis using an overexpressed kinase and a peptide lipid
3. 学会等名 The 14th Japan-Korea Symposium on Materials and Interfaces (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山達生, 西村香音, 森田健太, 山本翔太, 清水なつみ, 青井貴之, 田村厚夫
2. 発表標題 がん細胞内過剰発現キナーゼによる抗がんペプチド脂質の合成とがん細胞の殺傷
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田 健太, 青井 貴之, 池田 真理子, 丸山 達生
2. 発表標題 酵素を阻害する凝集性低分子
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	青井 貴之  (Aoi Takashi)  (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授   (14501)	

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
---------	---------