

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570195

研究課題名(和文) 構造生物学的手法によるセルピン病治療薬開発のための新しい戦略

研究課題名(英文) New strategy for the development of drugs to treat serpinopathies based on structural biology

研究代表者

恩田 真紀 (Onda, Maki)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60311916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：セルピン蛋白質がポリマー化して認知症や肝硬変が発症するセルピン病の治療薬開発戦略は、2008年を境に大きく変わり、ターゲット分子はNative型セルピンからFolding中間体になった。本研究では、病原性ニューロセルピン変異体とオボアルブミンをモデル蛋白質とし、Refolding中間体の構造解析、ポリマー伸長機構の解析、ポリマーのスワッピング領域の解析、X線結晶構造解析によるポリマー連結部分の相互作用の分析などで得たデータを基に治療薬のシーズとなるポリマー化抑制剤を探索し、3つの薬剤候補を見出した。

研究成果の概要(英文)：The serpinopathies resulting from serpin polymerization include dementia and cirrhosis. Since 2008, the target molecule for the development of the therapeutic agents has changed from the native protein to folding intermediates. In this study, we found three seed compounds for a cure of serpinopathies based on the data obtained by mapping of a refolding intermediate of neuroserpin, analysis of elongation and domain-swapping mechanisms of polymers of neuroserpin and ovalbumin, and a crystal structure of the cleaved form of the pathogenic mutant Ser49Pro of neuroserpin.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：serpin conformational diseases dementia folding neurodegeneration drug design neuroserpin ovalbumin

1. 研究開始当初の背景

セルピン病は、セルピン蛋白質がポリマー化して起こるコンフォメーション病の総称で若年性認知症（ニューロセルピン）や肝硬変（ α_1 -アンチトリプシン）などが良く知られている。2008年まで、セルピンのポリマー化はNative型が構造転移して起こるというモデルが多く、専門家に支持され、治療薬開発のターゲット分子はNative型のセルピンであった。しかし、「セルピンのポリマーはFolding中間体から形成される」という全く新しいポリマー化機構が発表されて以降（Yamasaki *et al.*, *Nature*, 2008）、治療薬開発のターゲット分子として、Folding中間体の重要性が一気に高まった。代表研究者は、セルピンのFolding中間体に相当する、Refolding中間体の捕捉・大量調製に世界で初めて成功しており（Takehara *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010）、同中間体の構造解析をいち早く行える状況にあった。

2. 研究の目的

セルピンのFolding中間体の構造解析を基盤とした、セルピン病の新しい治療薬開発戦略の提案

3. 研究の方法

モデル蛋白質として、代表研究者が世界で初めてX線結晶構造解析に成功した認知症の病原蛋白質であるヒト・ニューロセルピンと、これまでポリマー化が起こらないセルピンと考えられてきたオボアルブミンを使用し、以下の方法で研究を実施した。

(1) ペプチドマッピングによる病原性ニューロセルピン変異体のRefolding中間体の構造解析：セルピンのRefolding中間体（創薬のターゲットであるFolding中間体に相当する分子種）は、揺らぎが大きいため結晶構造解析は不向きであり、またセルピンは分子量が5万前後あるためNMRによる解析も困難である。そこで、ペプチドマッピングにより構造解析を行った。

(2) 蛍光プローブを利用したポリマー伸長機構の解析：ポリマーの伸長反応を抑制する方法を見出すためには、その伸長機構を明らかにすることが重要である。そこで、病原性ニューロセルピン変異体のRefolding中間体を開始物質とし、これからポリマーが伸長していく過程を、蛍光プローブを利用して調べた。セルピンは β -シートAと呼ばれる領域がドメイン・スワッピングすることでポリマーが伸長するが、ループの受け手となる部分は、蛋白質の分子内コアに似た疎水的な性質を持つことを代表研究者は既に見出している。そこで、この部分に結合すると蛍光強度が増大する蛍光プローブを利用し、ポリマー化速度や、ポリマーの伸長限界などを解析した。

(3) オボアルブミンのポリマー調製法の確立と諸性質の解析：セルピンのポリマー化には、反応中心ループ（RCL）と呼ばれる部分が β -シート3Aと5Aの間に挿入されて新たに β -シート4Aが形成されることが必須であるとされてきた。そして、Arg338の立体障害によりRCL挿入ができないオボアルブミンは、これまでポリマー化が起こらないと考えられてきた。しかし、代表研究者が明らかにしたセルピンのRefolding中間体の構造から、オボアルブミンもポリマー化できる可能性が出てきた。そこで、セルピンのポリマー形成機構をより明確にするため、オボアルブミンがポリマーを形成できるかどうか調べた。そしてポリマーを形成した場合は、その大量調製法を確立し、その諸性質を分析することを試みた。

(4) Cys変異体を使ったポリマーのスワッピング領域の解析： β -シートAやC末端など、セルピンのポリマー伸長に関わる領域にCysを導入し、調製したセルピン・ポリマーについて、S-S結合の形成や、Cys指向性蛍光プローブを使った蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）などにより構造解析を行った。

(5) X線結晶構造解析によるポリマー連結部分の相互作用の分析：ポリマーは凝集しやすく結晶化が極めて困難であるため、ポリマーの連結部分と酷似したRCL挿入型構造を持つ熱安定な単量体（Latent型およびCleaved型）の結晶構造解析を試み、連結部分の相互作用の分析に取り組んだ。

(6) ポリマー抑制剤の探索：上記(1)～(4)で見出した結果を基に薬剤候補を絞り込み、ポリマー化抑制効果が期待できる低分子化合物の探索を行った。探索には、代表研究者が開発したリアルタイムPCR装置を利用したポリマー化反応測定システム（JST平成23年度A-STEP, AS231Z05126F）を使用した。

4. 研究成果

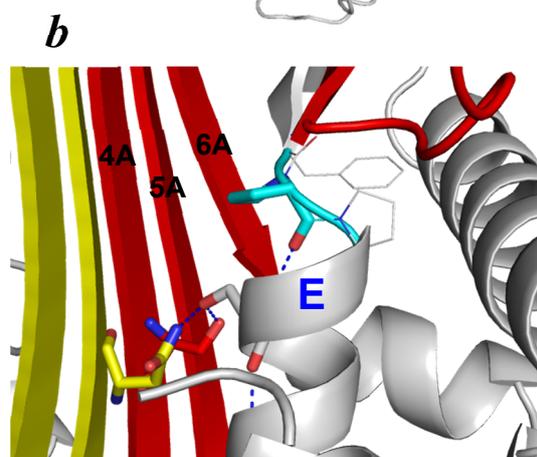
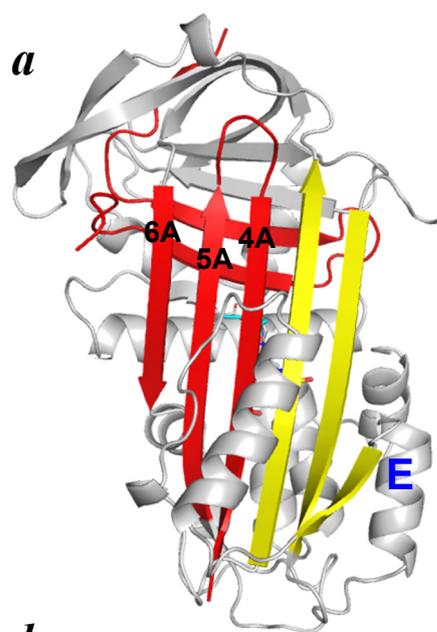
(1) ペプチドマッピングによる病原性ニューロセルピン変異体のRefolding中間体の構造解析：セルピンのFolding中間体はこれまで、 β -シート5AとヘリックスIがUnfoldingしているとされてきたが、これに加え β -シート6AとヘリックスGもUnfoldingしていることを明らかにし、新奇のポリマー前駆体の構造を提唱した。本成果は、ノースカロライナ大学で開催されたセルピン専門学会（学会発表⑧）他で発表した。

(2) 蛍光プローブを利用したポリマー伸長機構の解析：セルピンのポリマーは双方向に伸長すること、また安定して可溶性画分に存在できるのは10merまでであることを明らかにした。10merを超えると、オリゴマーどうしが無秩序に結合し、凝集して沈殿化することが分かった。本成果は、神戸大学で開催された先端融合科学シンポジウム（学会発表⑦）他で発表した。

(3) オボアルブミンのポリマー調製法の確立と諸性質の解析：まず、ポリマーの前駆体となるオボアルブミンの Refolding 中間体が安定に存在する条件を決定し、その条件下、37°Cでインキュベーションしたところ、オボアルブミンのポリマーが得られた。ポリマー形成後、凝集抑制剤を緩衝液に添加するなどの工夫をして、同ポリマーをゲルろ過クロマトグラフィーで大量精製することに成功した。そしてその諸性質を、認知症を引き起こすニューロセルピンのポリマーと比較した。その結果、Native-PAGEおよびゲルろ過法で観察されるポリマーの鎖長や形状、Trp 蛍光測定やCDで観察される立体構造特性、チオフラビンTにより見積もったポリマー化速度について、両ポリマーは極めて似た特性を持っていることが分かった。そこで、ポリマーの構造についてより詳細に調べるために、(4)以下の解析をニューロセルピンと共に実施した。本成果は、日本蛋白質科学会年会、日本生化学会大会、日本農芸化学会(学会発表③④⑥)他で発表した。

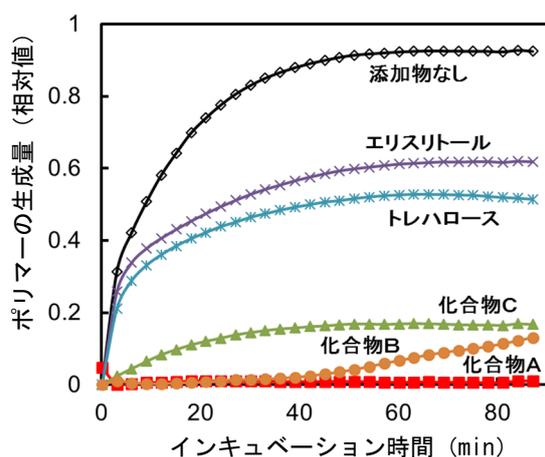
(4) Cys 変異体を使ったポリマーのスイッチング領域の解析：これまで明らかとなっているセルピン・ポリマーの構造は、RCLが挿入されてβ-シート4Aと5Aがスイッチングするタイプ(4A/5A型)と、RCLが挿入されてC末端領域がスイッチングするタイプ(C末端型)の2通りであった。しかし、ニューロセルピンのポリマーはRCLが挿入されてβ-シート4A, 5A, 6AおよびC末端がスイッチングする新奇のものであった。また、オボアルブミンのポリマーについては、RCL挿入が起らずC末端がスイッチングする新奇のものであることが明らかとなった。本成果は、オーストリアで開催されたセルピン専門学会(学会発表①)他で発表した。

(5) X線結晶構造解析：研究開始当初は、病原性ニューロセルピン変異体のLatent型の結晶構造解析に取り組んだが、分解能8Å以下での解析はできなかった。そこで、Latent型よりも更に熱安定なCleaved型の病原性ニューロセルピン変異体Ser49Proについて結晶化を試みたところ、2.3Åでの解析に成功した【図1】。得られた成果について、現在学術誌への論文投稿を準備中である。



【図1】Cleaved型の病原性ニューロセルピン変異体Ser49Proの結晶構造：(a)全体構造。ポリマーが伸長する際にスイッチングするβ-シート4A, 5A, 6AおよびC末端領域を赤色で示す。黄色はβ-シート1A, 2A, 3A。(b)ヘリックスE側からみた病原性変異部位(Ser49→Pro)とポリマーの連結に関与すると予想される領域。Pro49(水色), Ser52(灰色), Asn182(黄色), Ser355(赤色)をスティック描法で強調。

(6) ポリマー抑制剤の探索：探索の結果、グリセロールアミド(化合物A)、アルギニンアミド(化合物B)、ヒドロキシンエン酸(化合物C)でポリマー化抑制効果があることを見出した【図2】。そこで、これらの化合物を、病原性ニューロセルピン変異体を過剰発現するCOS-7を使ったモデル系で効果を確認したところ、いずれもポリマー化を抑制することが分かった。本成果の一部は、オーストリアで開催されたセルピン専門学会(学会発表①)で発表した。また、学術誌への論文投稿を準備中である。



【図2】シーズ化合物によるニューロセルピンのポリマー化の抑制：これまでセルピンのポリマー化を抑制することで知られていた糖類との比較。代表研究者が開発したポリマー化反応測定システム(JST平成23年度A-STEP, AS231Z05126F)によりデータを得た。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計17件)

①M. Onda

「Serpine polymerization by an inter-molecular displacement of the C-terminal region and strands 4A, 5A and 6A.」7th International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function (2014年3月31日), レオガング(オーストリア), 招待講演

②A. Nakamura, M. Onda

「Preparation of the latent form of the pathogenic mutant of neuroserpin G392E」第86回日本生化学会大会(2013年9月11日), パシフィコ横浜

③J. Zhang, A. Nakamura, M. Onda

「Serpine polymerization unaccompanied by insertion of the reactive center loop」第13回日本蛋白質科学会年会(2013年6月12日), とりぎん文化会館

④J. Zhang, M. Onda

「反応中心ループの挿入を伴わないセルピンのポリマー化」第85回日本生化学会大会(2012年12月16日), マリンメッセ福岡

⑤J. Zhang, S. Takehara, T. Tada, M. Onda

「Configuration of neuroserpin polymers」第12回日本蛋白質科学会年会(2012年6月20日), 名古屋国際会議場

⑥Y. Kawamoto, T. Tada, M. Onda

「オボアルブミンのポリマー化機構」日本農芸化学会2012年度大会(2012年3月24日), 京都女子大学

⑦M. Onda

「セルピンのドメイン・スワッピングによるミスフォールディング」先端融合科学シンポジウム タンパク質アセンブリ ー会合、超分子化、凝集ー(2012年1月31日), 神戸大学, 招待講演

⑧M. Onda

「Refolding and polymerization of neuroserpin」6th International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function (2011年10月25日) ノースカロライナ大学(アメリカ), 招待講演

⑨X. Yang, S. Takehara, T. Tada, M. Onda

「On-column refolding によるループ挿入型ニューロセルピンの調製」第84回日本生化学会大会(2011年9月22日), 京都国際会館

⑩M. Onda

「セルピノパシー：セルピンのポリマー化により発症する疾患」第12回 Pharmacology Hematology シンポジウム(2011年6月18日), 富山国際会議場, 招待講演

⑪M. Onda

「天然型が準安定な蛋白質のフォールディングとフォールディング病」第11回日本蛋白質科学会年会ワークショップ(2011年6月9日), ホテル阪急エキスポパーク(大阪), 招待講演

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恩田 真紀 (ONDA, Maki)

大阪府立大学・理学系研究科・准教授

研究者番号：60311916

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

多田 俊治 (TADA, Toshiji)

大阪府立大学・理学系研究科・教授

研究者番号：70275288

三上 文三 (MIKAMI, Bunzo)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40135611