

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23651241

研究課題名(和文) 肝臓型グリコーゲンホスホリラーゼの選択的阻害剤の探索

研究課題名(英文) Search for selective inhibitors of liver-type glycogen phosphorylase

研究代表者

牧野 泰士 (MAKINO, Yasushi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70332955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：グリコーゲンホスホリラーゼ(GP)は数種類のリガンド結合部位を有するアロステリック酵素であることから、その触媒活性の阻害方法として複数の候補が挙げられる。これらのリガンド結合部位の性質を調べた結果、貯蔵部位は触媒活性部位の働きに直接的な影響を及ぼさないことを明らかにすることができた。また、GPの触媒活性部位において、触媒活性の発現に対して特に重要な役割を担っていると考えられるサブサイトが2つ存在することを示すことができた。しかし、肝臓型GPを選択的に阻害する化合物を見つけ出すには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Glycogen phosphorylase (GP) is a typical allosteric enzyme with several different ligand-binding sites, thus offering multiple opportunities for inhibition of the catalytic activity. Characterization of the properties of these sites indicated that the GP storage site does not directly affect the action of the GP catalytic site. In the GP catalytic site, there are two subsites, which might play important roles in the catalytic action of GP. However, I could not find a selective inhibitor of liver-type GP.

研究分野：生体分子科学

キーワード：グリコーゲンホスホリラーゼ 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

グリコーゲンはグルコースの重合体であり、あらゆる動物細胞に貯蔵多糖として存在する。個々の細胞でエネルギーが必要とされる際に分解されるのが基本であるが、肝臓のものは血糖値の維持にも利用されている。グリコーゲンからグルコース単位への分解様式は動物体内の各組織で共通しており、その律速酵素はグリコーゲンホスホリラーゼ (GP) である。体内において、GP はグリコーゲンのマルトオリゴ糖鎖を非還元末端側からグルコース 1 残基ずつ加リン酸分解して、グルコース 1-リン酸 (Glc-1-P) とする。なお、本来 GP は可逆酵素であるから、Glc-1-P が過剰に存在する試験管内では逆反応 (グルカン合成反応) を起こすことも可能である。

GP の阻害剤は 2 型糖尿病の有力な治療薬になると期待されるが、心臓や脳でのグリコーゲン分解まで阻害しては大変危険である。GP はアロステリック酵素であり、触媒活性部位のほか、AMP-結合部位や貯蔵部位といったリガンド結合部位も存在する。このため、GP の触媒活性の阻害方法として、多数の候補を挙げることができる。古くから検討されているのは、糖誘導体を GP の触媒活性部位に作用させようというものである。しかし、GP には糖に対して触媒活性部位よりも強い親和性を示す貯蔵部位が存在する。このため、長年に亘って行われてきた触媒活性部位と貯蔵部位の間の相互作用 (サイト-サイト相互作用) の有無の議論に決着をつけることなしに、糖誘導体の GP 阻害剤としての評価を行うことは困難であった。

2. 研究の目的

ヒトの場合、GP には肝臓型・筋肉型・脳型という 3 種類のアイソザイム (アミノ酸配列が部分的に異なる酵素) が存在する。つまり、肝臓型・筋肉型・脳型では立体構造が部分的に異なり、性質も部分的に異なるのである。よって、これら 3 種類のアイソザイムは、ある種の化合物に対して異なる挙動を示す可能性があると期待される。そこで、本研究では、GP の触媒活性の阻害に適したリガンド結合部位を検討するとともに、安全な 2 型糖尿病治療薬の候補となるような肝臓型 GP を選択的に阻害する化合物の探索に取り組むこととした。

3. 研究の方法

肝臓型 GP は、筋肉型 GP や脳型 GP とは異なり、AMP による触媒活性の調節を受けない。肝臓型 GP の主たる役割は血糖値の維持であるため、血糖値が個々の肝細胞のエネルギー状態に影響されないよう、肝臓型 GP は独自の進化を遂げたものと考えられる。このため、AMP-結合部位を標的とした阻害剤 (AMP 誘導体) は、調査の対象から外すこと

とした。

シクロデキストリン (CD) は GP の阻害剤であると複数の研究グループが報告している。CD は GP の貯蔵部位に結合し、サイト-サイト相互作用によって GP の触媒活性を阻害すると考えられてきた。しかし、GP の貯蔵部位と触媒活性部位の間に直接的な相互作用があることを証明した文献は、過去に存在しなかった。そこで、貯蔵部位と触媒活性部位の間の相互作用の有無の議論に決着をつけ、肝臓型 GP の選択的阻害の標的として貯蔵部位が適しているかどうかを検討することとした。

本研究において、GP の貯蔵部位と触媒活性部位との間に直接的な相互作用が存在しないことが確認されたことから、GP の触媒活性部位に対する糖誘導体の阻害能を評価することが可能になった。GP の触媒活性部位には、グルコース残基 1 つを認識・収容するサブサイト 5 つが直列に配置していると考えられている。そこで、GP の触媒活性の発現に対して特に重要な役割を担っているサブサイトを見つけ出し、そのサブサイトを標的とした肝臓型 GP の選択的阻害剤を探索することとした。

4. 研究成果

これまで GP 阻害剤の評価は、牡蠣グリコーゲンと Glc-1-P を基質として、逆反応 (グルカン合成反応) を利用して行われることが多かった。しかし、動物の体内において逆反応は起きていないことから、正反応 (グルカン分解反応) で評価するのが望ましいと言える。そこで、正反応によって生成する Glc-1-P を HPLC で分離・定量する方法を検討した。HPLC 用カラムの充填剤にはポリマー系アミノ樹脂を採用し、陰イオン交換モードで Glc-1-P を分離することとした。Glc-1-P の検出には、示差屈折率検出器を用いた。

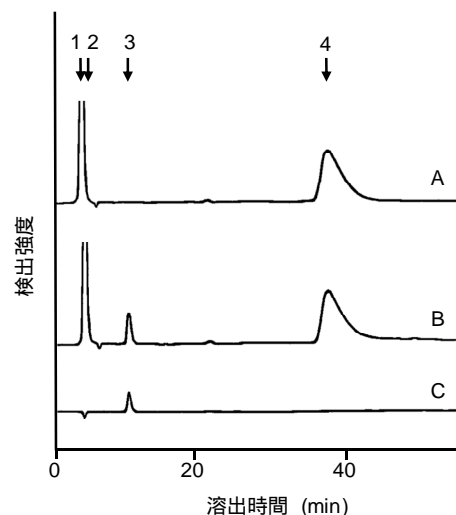


図1 陰イオン交換HPLCによるGlc-1-Pの分離
 A: 反応時間0分の場合のクロマトグラム。
 B: 反応時間が30分の場合のクロマトグラム。
 C: 標準Glc-1-Pを1nmol分析した場合のクロマトグラム。
 矢印1-4は、マルトヘキサオース、グリコーゲン、Glc-1-P、AMPの溶出位置を示している。

なお、GP 活性測定の際に活性化剤として添加されることの多い AMP が、Glc-1-P の分離・定量に影響を及ぼすことはなかった。

研究開始当初は、GP 阻害剤であると過去に報告されていた化合物の構造とその K_i 値を本研究遂行の参考にしようと考えていた。しかし、これらの化合物について、GP 阻害能を確認することができなかつたり、報告されているほどの GP 阻害能を確認できないケースが相次いだ。この原因の究明に多くの時間と労力を費やしたが、GP の働きにイオン強度依存性とグリコーゲンサイズ依存性があることを明らかにすることができた。さらに、この2つの依存性が主に GP の貯蔵部位の働きに起因することを明らかにするとともに、グリコーゲンの代わりにマルトオリゴ糖基質を用いることでイオン強度の影響を小さくすることができた。

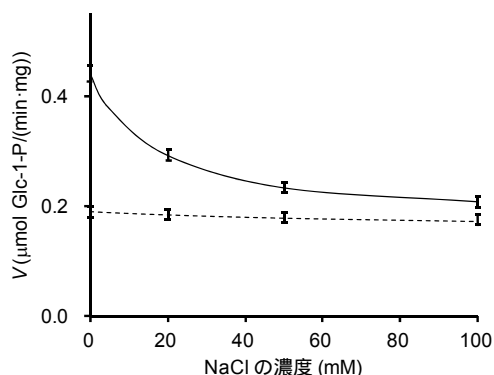


図2 ウサギ筋肉GPの触媒活性のイオン強度依存性
実線: 基質がウシ肝臓グリコーゲンの場合。
点線: 基質がマルトヘキサオースの場合。

CD は、GP の貯蔵部位に結合することで、GP の触媒活性を阻害すると考えられてきた。このため、CD は糖尿病治療薬の候補と目されてきた。そこで、CD が肝臓型・筋肉型・脳型 GP の触媒活性へ及ぼす影響を調べた。なお、貯蔵部位へのマルトオリゴ糖基質の結合を最小限に抑える必要があるため、マルトヘキサオースの還元末端を 2-アミノピリジンで蛍光標識した PA-マルトヘキサオースを基質とし、その濃度は 5 μ M とした。

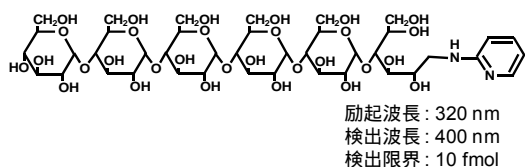


図3 蛍光性基質PA-マルトヘキサオースの構造

その結果、驚くべきことに、CD は 3 種類のアイズイムのいずれに対しても阻害作用を示さなかった。このことは、従来行われてきた GP 阻害剤の評価手法に問題があることを示していた。

表1 ウサギ筋肉GPの触媒活性に及ぼすCDの効果

添加物	濃度 (mM)	相対GP活性
None	-	1.00 \pm 0.03
α -CD	1	1.00 \pm 0.02
	10	0.96 \pm 0.03
β -CD	1	1.02 \pm 0.04
	10	0.97 \pm 0.03
γ -CD	1	1.01 \pm 0.03
	10	0.96 \pm 0.03

従来の GP 阻害剤の評価は、グリコーゲンを基質として行われることが多かった。グリコーゲンは分子量が 100 万 ~ 1000 万もあるグルコースの重合体であり、アミロペクチンよりも高度に枝分かれした構造を有している。このため、グリコーゲン溶液中において、GP の触媒作用の作用点となる非還元末端グリコース残基は、グリコーゲン分子の表面に局在していることになる。GP は貯蔵部位を介してグリコーゲン分子の表面に結合することで、高濃度の非還元末端グルコース残基を獲得することができ、効率良くグリコーゲン分解を進行させているものと考えられる。グリコーゲン分子の表面に結合することによってこのような好結果が得られることを、本研究では「アドバンテージ」と呼ぶことにした。CD は GP の触媒活性部位の働きに直接的な影響を及ぼさないが、グリコーゲンが基質である場合にはアドバンテージを減少させるため、結果的に反応速度の低下をもたらすことになる。一方、分子量が 1000 程度の直鎖状のマルトオリゴ糖誘導体を基質として用いる場合には、非還元末端グルコース残基は溶液中にほぼ均一に分布することになる。この場合、もともとアドバンテージは得られないため、CD を加えても反応速度の低下は見られないことになる。

また、アドバンテージという概念を導入することで、GP のグリコーゲンへの反応性がグリコーゲンの分子量に依存するという実験結果をうまく説明することができた。肝臓に存在するグリコーゲンは、分子量が 1000 万程度あり、11 ~ 13 層の同心円状の構造を有している。この層の数が増すほど、グリコーゲン分子の表面にはマルトオリゴ糖鎖が密集して存在することになる。この層状構造が GP にアドバンテージをもたらすのであるが、13 層構造にもなると、密集しすぎたマルトオリゴ糖鎖によって引き起こされる立体障害のために GP (分子量 19 万) がグリコーゲン分子の表面に結合することが難しくなると考えられる。この結果、肝臓グリコーゲンのような高分子量のグリコーゲンが基質である場合、アドバンテージはあまり得られないことになる。

糖尿病治療薬の候補としてGP阻害剤の探索が長年行われてきたが、基質として牡蠣グリコーゲン（分子量約100万、6~8層構造）が用いられることが多かった。血糖値は肝臓のグリコーゲンを分解することで維持されていることから、肝臓グリコーゲンよりも分子サイズがかなり小さい牡蠣グリコーゲンを基質として糖尿病治療薬の評価を行うのは不適切と言えよう。CDが糖尿病治療薬の候補として過大な評価を受けてきた原因は、この点にあると言える。

本研究において、GPの貯蔵部位と触媒活性部位との間に直接的な相互作用が存在しないことが確認されたことから、オリゴ糖基質への反応性を調べることで、触媒活性の発現に対して特に重要な役割を担っている触媒活性部位のサブサイトを調べることが可能となった。GPの触媒活性部位には、グルコース残基1つを認識・収容するサブサイト5つが直列に配置していると考えられている。そこで、本研究では、PA-マルトヘキサオースとは構造が部分的に異なる蛍光性基質FD1~FD5に対するGPの反応性を調べてみることにした。

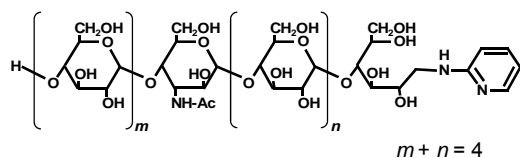


図4 GP触媒活性部位探索用基質の構造

その結果、FD2とFD3に対するGPの反応性が特に低いことが分かった。この実験結果から、マルトオリゴ糖鎖の非還元末端から2つ目と3つ目のグルコース残基をGPの触媒活性部位内の対応するサブサイト(S2とS3)へと正しく結合させることが、GPの触媒活性の発現において特に重要であることが示唆された。

表2 ウサギ筋肉GPの基質特異性

基質	m	n	相対GP活性*
FD1	0	4	0.011
FD2	1	3	0.0021
FD3	2	2	0.0031
FD4	3	1	0.0092
FD5	4	0	1.0

*PA-マルトヘキサオースに対する反応速度を1とした。

触媒活性部位を標的とした阻害剤は、触媒活性部位への結合力と阻害力を両立させることが重要である。今回の実験結果から、サブサイトS2および/もしくはS3を標的とした阻害剤が有効であると考えられる。残念ながら

ら、FD2とFD3の阻害剤として能力と肝臓型GPへの選択性を評価するところで時間切れとなった。なお、本研究を通して、肝臓でのグリコーゲン分解を選択的に阻害する方法として、ホスホリラーゼキナーゼを阻害することも検討する価値があると思われた。これについても今後の検討課題としたい。

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1件)

牧野泰土、藤井雄太、谷口基、Properties and functions of the storage sites of glycogen phosphorylase, The journal of biochemistry、査読有、2015、印刷中
DOI: 10.1093/jb/mvv007

〔学会発表〕(計4件)

藤井雄太、牧野泰土、佐藤正明、グリコーゲンホスホリラーゼ活性に及ぼす硫酸アンモニウムの効果、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、京都国際会館(京都)

牧野泰土、藤井雄太、谷口基、グリコーゲン分解酵素の活性に及ぼすシクロデキストリンの効果、第86回日本生化学会大会、2013年9月13日、パシフィコ横浜(横浜)

牧野泰土、電気伝導度検出器を利用したグルコース-1-リン酸の検出とグリコーゲンホスホリラーゼ活性測定への応用、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡国際会議場(福岡)

牧野泰土、大道薫、肝臓ホモジネート中のグリコーゲンホスホリラーゼ活性の測定、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、京都国際会館(京都)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

牧野 泰土 (MAKINO Yasushi)

大阪府立大学・理学系研究科・助教

研究者番号：70332955