様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：１３２０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６０１４３

研究課題名（和文）変異酵素の構造安定化剤として機能するイミノ糖型シャペロンの設計と合成

研究課題名（英文）Design and synthesis of iminosugar-based pharmacological chaperone as a structure stabilizing agent for mutation enzyme

研究代表者
加藤　敦（Kato, Atsushi）

富山大学・附属病院・准教授

研究者番号：６０３０３２３６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：テイ-サックス病の原因酵素であるHex Aを標的酵素としたライブラリースクリーニングを実施した。その結果、Hex Aは、基質認識が寛容であり、イミノ糖の環サイズを変えても高い親和性を示す事が明らかになった。その中でプロリンアミド型イミノ糖に特に強力な親和性が認められた。そこで全16種の異性体について構造活性相関を検討した結果、(2S, 3R) -コンフィグレーションを取ることが強い認識に必須であることが明らかになった。最も強力な親和性を示したDMDP amideは、濃度依存的に変異酵素の熱安定性を向上させるとともにテイ－サックス病患者由来線維芽細胞内の酵素活性を約 15 倍程度上昇させた。

研究成果の概要（英文）：We performed the computer modelling aided design and synthesis of Hex A inhibitors along with their applicability to Tay-Sachs disease treatment through biological evaluation in both an enzymatic and cellular setting. All 16 stereoisomeric N-methyl proline amides iminosugars have been synthesized from lactone saccessible from the enantiomers of glucuronolactone. All eight enantiomers with a (3R)-hydroxyl configuration are low micromolar to nanomolar inhibitors of a range of Hex A. Furthermore, its stereoisomers bearing a (2S,3R)-trans configuration are significantly more potent inhibitors than those with a (2R,3R)-cis motif. DMDP amide improved the thermostability of Hex A in vitro and increased intracellular Hex A activity by 15-fold in Tay-Sachs G269S fibroblasts after incubation for 5 days. These experimental results suggested that DMDP amide will be a good candidate for treatment of Tay-Sachs disease.

研究分野：糖質生化学

キーワード：リソソーム病　グリコシダーゼ　イミノ糖　シャペロン　フォールディング　テイーサックス病

１．研究開始当初の背景

(1) リソソーム病は、リソソームに局在する酸性グリコシダーゼの遺伝的活性低下に起因する疾患である。これら酸性加水分解酵素の欠損または酵素活性の低下は、基質である糖脂質のリソソーム内蓄積を招き、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。リソソーム病は、ミューテーションを受けた酵素に応じて分類され、これまでに約 40 種類が明らかとなっており、厚生労働省難治性疾患等政策研究事業の一つとなっている。

(2) β-*N*-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52：以下、Hex と略す) は役割を終えた糖脂質末端の *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)残基 や、*N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) 残基の加水分解を触媒する酸性加水分解酵素である。Hex は、αおよび□βサブユニットから構成されるが、それぞれ単量体では、機能を発揮できず、二量体として存在する。ヒトでは、α および βサブユニットの二量体 (α□β)からなる Hex A、βサブユニットの二量体 (ββ) からなる Hex B が主なアイソザイムとして知られている。また、マイナーではあるが αサブユニットの二量体 (αα) からなる Hex S が存在する。

(3) HEXA 遺伝子は Hex A, S のαサブユニットを、HEXB 遺伝子は Hex A, B のβサブユニットをそれぞれコードし、いずれかの遺伝子変異により、GM2 ガングリオシドーシスが発症する。このうち、HEXA の遺伝子異常により Hex A 酵素活性が低下することに起因するテイ-サックス (Tay-Sachs) 病は、多様な民族で確認されているが、特にアシュケナージ系ユダヤ人に多いことが知られている。その割合は、一般的な民族が 112,000 出生児に 1 人であるのに対し、アシュケナージ系ユダヤ人では 4,000 出生児に 1 人程度とかなり高頻度である。

(4) これまでのところ GM2 ガングリオシドーシスに対する治療薬はなく対症療法に限定されている。様々な治療薬の開発研究が試みられているが、その一つに酵素補充療法 (Enzyme Replacement Therapy：ERT) がある。酵素補充療法は、遺伝的要因により機能しなくなった内因性のリソソーム酵素に代わり、外部から正常酵素を補充することで蓄積基質の分解を促進させるという方法である。この酵素補充療法は、Gaucher 病や Pompe 病、Fabry 病、ムコ多糖症 I 型といった一部の LSD については実現され末梢症状の改善効果が認められているが、従来行われている点滴静注では薬剤が血液脳関門を通過できないことから神経症状には効果が認められていない。そのため、神経症状を主症状とする GM2 ガングリオシドーシスについては、酵素補充療法は効果が期待できない。

(5) リソソーム病は、原因酵素の残存活性の有無により、古典型と亜型に分類される。このうち亜型は、酵素合成に異常は認められないものの、特定のアミノ酸残基が１箇所ミューテーションを起こすことにより正しい三次元構造がとれないため発症する。これらミューテーションタンパク質は、中性条件下の環境にある小胞体では、不安定であり著しい活性低下が認められるが、小胞体品質管理機構を通過し、本来機能すべき酸性条件下のリソソームまで輸送されれば、安定構造を保持できることが明らかにされている。

２．研究の目的

(1)これまでにファブリー病に対するファーマコロジカル・シャペロンとして Galafold™ (migalastat)が上市され、ミューテーションタンパク質のフォールディングを促し、コンフォメーションを安定化させる効果が実証されたが、一方で、それ以外のリソソーム病では酵素の安定性を高めることができる実用的なシャペロン化合物が十分に見いだされていないという課題もある。そこで本研究課題では、テイ−サックス病の治療に最適なイミノ糖のデザイン合成と治療効果の評価を目的とした。

(2) テイ−サックス病に対するイミノ糖型シャペロンは、DNJNAc に代表されるピペリジン型イミノ糖に限定されているが、その効果は十分であるとは言えない。また、シャペロン効果を発揮するために必要な OH 基の配位や結合配向等に関する網羅的な研究は行われていない。そこで、本研究では、ピペリジン型イミノ糖のみならず、アゼチジン型、ピロリジン型およびアゼパン型など、環構造にとらわれない幅広い候補化合物のスクリーニングを行うとともに、汎用性の高いシャペロンのデザインを行った。

３．研究の方法

(1)スクリーニング初期段階から基質の化学構造から予測される化合物にのみ限定しデザインを行うのではなく、申請者が所有する約 900 種類のイミノ糖ライブラリーを活用し、あくまでも Hex A に対して強いアフィニティーを持つ化合物を新たに見いだし、化合物個々の構造活性相関を検討することにより、最適構造を導くこととした。

(2)標的酵素である Hex A に対する結合親和性を指標としたスクリーニングを行った。候補化合物については更に、熱安定性に及ぼす効果、テイ−サックス病患者由来線維芽細胞を用いたシャペロン効果の評価を行った。
効果が認められた化合物については、一連の異性体及び関連化合物の合成を行い、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) 基質構造との類似性が Hex A との親和性に与える影響を調べる目的で GlcNAc との相同性が高い β-HNJNAc と α-HMJNAc を新たに合成し、Hex A に対する阻害効果を検討した。その結果、両化合物の human placenta 由来 Hex A に対する IC_{50} 値は、それぞれ 72 および 303 μM となり、その阻害活性は、これまで報告されている同じ基質類似体 DNJNAc あるいは DGJNAc と比較して明らかに弱かった。このことからも Hex A に関しては基質構造との類似性が必ずしも高い親和性を産み出すわけではないことが示唆された。

(2) プロリンアミド型のイミノ糖である *N*-methyl 5-(hydroxymethyl)-3,4-dihydroxyproline amide の異性体・全 16 種について Hex A に対する構造活性相関を検討した。その結果、測定した 16 種のうち 8 種の化合物に Hex A に対する高い親和性が認められ、特に D-manno 型のイミノ糖では IC_{50} 値が 0.033 μM と極めて強力な阻害活性が認められた。阻害効果を示した 8 種のプロリンアミド型のイミノ糖は、いずれも C3(*R*)-コンフィグレーションを取っていたことから、C3(*R*)-コンフィグレーションを取ることが活性発現に極めて重要であることが明らかになった。更に強力な阻害活性を示した D-manno 型プロリンアミドを中心に置換基の配位を変えたところ C2 位の CONHMe 基の配位を反転させると活性が明らかに低下した。このことからプロリンアミド型のイミノ糖においては(2*S*, 3*R*) -コンフィグレーションを取ることが Hex A に対する強い認識に必須であることが明らかになった。

これまでプロリンアミド型イミノ糖と同様にピロリジンを母核とするイミノ糖として L-arabinose 型の C2 位に NHAc 基を有する LABNAc が IC_{50} 6.7 μM を示すことが報告されている。更に我々は LABNAc の構造異性体である XYLNAc を glucuronolactone から合成するとともに LYXNAc のエナンチオマーを L-arabino-*δ*-lactone と D-ribino-*δ*-lactone からそれぞれ合成し、Hex A に対する親和性を比較したところ D-xylo 型の XYLNAc に IC_{50} 4.9 μM を示すことを明らかにしている。LABNAc に対して D-XYLNAc は C4 エピマーの関係にあり、これは今回得られたプロリンアミド型イミノ糖の活性発現条件とも異なる。これらの結果は、Hex A との親和性において NHAc 基の位置が大きく影響しているためと考えられる。

(3) より環サイズがより小さいアゼチジン型イミノ糖 17 種についても同様に Hex A に対する結合能を評価した。このうち L-ribono-azetidine amide が Hex A に対し *K*i 値 0.9 μM を示すなど、DNJNAc とほぼ同程度の強力な親和性を持つ化合物を見いだすことに成功した。更により環サイズの大きいアゼパン型イミノ糖についてもスクリーニングを行った結果、*K*i 値 1.8 μM を示す化合物が含まれるなど、アゼチジン（4 員環)、ピロリジン（5 員環)、ピペリジン（6 員環）およびアゼパン（7 員環）と環サイズを変えても高い親和性を示す化合物が認められたことから、Hex A は従来までのグリコシダーゼとは異なり、かなり柔軟性に富んだ酵素である事が明らかになった。

(4) 環サイズが異なるイミノ糖のうち、高い親和性が認められた化合物として、azetidine amide、DMDP amide、DNJNAc および azepane NAc を選択し、PDB (Protein Data Bank)に収載されているヒト Hex A の 3 次元座標データを応用した、コンピュータリガンドドッキングを行った。その結果、これらイミノ糖類は、共通したアミノ酸相互作用を有していることが明らかになった。特に高い親和性を示した DMDP amide は、R178、E462、Y456、Y421、E323、D322 および W460 と相互作用していることも示唆された。

(5) プロリンアミド型イミノ糖は、濃度依存的に変異酵素の熱安定性を向上させた。更にテイ−サックス病患者由来線維芽細胞に本化合物を 100 μM 添加することにより、未添加群と比較して約 15 倍程度、細胞内酵素活性が上昇した。比較対象として、先行研究にて臨床試験が行われている pyrimethamine (PMT) を用い、同様の試験を行ったが PMT 添加による酵素活性の上昇は 2 倍程度にとどまった。この事からも我々が見いだしたプロリンアミド型イミノ糖は、十分な治療効果が期待できる化合物であると考えている。

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　16　件）

(1) Miyawaki, S., Hirokami, Y., Kinami, K., Hoshino, M., Minehira, D., Miyamoto, D., Nash, R. J., Fleet, G. W. J., Adachi, I., Kato, A. (2017) Strategy for designing selective α-L-rhamnosidase inhibitors: Synthesis and biological evaluation of L-DMDP cyclic isothioureas. *Bioorg. Med. Chem. 25* (1) 107-115. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.10.015, 査読有

(2) Glawar, A. F. G., Martínez, R. F., Ayers, B. J., Hollas, M. A., Ngo, N. Nakagawa, S., Kato, A., Butters, T. D., Fleet, G. W. J., Jenkinson, S. F. (2016) Structural essentials for β-*N*-acetylhexosaminidase inhibition by amides of prolines, pipecolic and azetidine carboxylic acids. *Org. Biomol. Chem*. 14 (44) 10371-10385. DOI: 10.1039/C6OB01549B, 査読有

(3) Liu, Z., Jenkinson, S. F., Kato, A.,

Nakagawa, S., Wormald, M. R., Yu, C.-Y., Fleet, G. W. J. (2016) 3-Azidoazetidines as the first scaffolds for β-amino azetidine carboxylic acid peptidomimetics: azetidine iminosugars containing an acetamido group do not inhibit β-*N*-acetylhexosaminidases. *Tetrahedron Asymm. 27*(17-18) 872-881.
DOI: 10.1016/j.tetasy.2016.08.001, **査読有**

(4) Liu, Z., Yoshihara, A., Kelly, C., Heap, J., Marqvorsen, M. H. S., Jenkinson, S. F., Wormald, M. R., Estévez, A., Otero, J., Kato, A., Fleet, G. W. J., Estévez, R. J., Izumori, K. (2016) 6-Deoxyhexoses from L-rhamnose in the search for inducers of the rhamnose operon: synergy of chemistry and biotechnology. *Chem. Eur. J. 22* (35) 12557-12565.
DOI: 10.1002/chem.201602482, **査読有**

(5) Song. Y.-Y., Kinami, K., Kato, A., Jia, Y.-M., Li, Y.-X., Fleet, G. W. J., Yu, C.-Y. (2016) First total synthesis of (+)-broussonetine W: Glycosisdase inhibitory activities of natural product & analogs. *Org. Biomol. Chem. 14* (22) 5157-5174.
DOI: 10.1039/c6ob00720a, **査読有**

(6) Wang, H.Y., Kato, A., Kinami, K., Li, Y.-X., Fleet, G.W.J., Yu, C.-Y. (2016) Concise synthesis of calystegine B$_2$ and B$_3$ *via* intramolecular Nozaki–Hiyama–Kishi reaction. *Org. Biomol. Chem. 14* (21) 4885-4896.
DOI: 10.1039/C6OB00697C, **査読有**

(7) Qian, B.-C., Kamori, A., Kinami, K., Kato, A., Li, Y.-X., Fleet, G. W. J., Yu, C-.Y. (2016) Epimerization of C5 of an *N*-hydroxypyrrolidine in the synthesis of swainsonine related iminosugars. *Org. Biomol. Chem. 14*(19) 4488-4498.
DOI: 10.1039/C6OB00531D, **査読有**

(8) Li, Y.-X., Iwaki, R., Kato, A., Jia, Y.-M., Fleet, G. W. J., Zhao, X., Xiao, M., Yu, C.-Y. (2016) Fluorinated radicamine A and B: synthesis and glycosidase inhibition. *Eur. J. Org. Chem. 7*, 1429-1438, 2016.
DOI: 10.1002/ejoc.201501453, **査読有**

(9) Li, Y.-X., Kinami, K., Hirokami, Y., Kato, A., Su, J.-K., Jia, Y.-M., Fleet, G. W. J., Yu, C.-Y., (2016) Gem-difluoromethylated and trifluoromethylated derivatives of DMDP-related iminosugars: synthesis and glycosidase inhibition. *Org. Biomol. Chem.* 14(7) 2249-2263.
DOI: 10.1039/c5ob02474a, **査読有**

(10) Kato, A., Nakagome, I., Sato, K., Yamamoto, A., Adachi, I., Nash, R. J., Fleet, G. W. J., Natori, Y., Watanabe, Y., Imahori, T., Yoshimura, Y., Takahata, H., Hirono, S. (2016) Docking study and biological evaluation of pyrrolidine-based iminosugars as pharmacological chaperones for Gaucher disease. *Org. Biomol. Chem. 14*(3) 1039-1048.
DOI: 10.1039/c5ob02223a, **査読有**

(11) Li, Yi.-X., Shimada, Y., Adachi, I., Kato, A., Jia, Y.-M., Fleet, G. W. J., Xiao, M., Yu. C.-Y. (2015) Fluorinated and conformationally fixed derivatives of L-homoDMDP: synthesis and glycosidase inhibition. *J. Org. Chem. 80*(10) 5151-5158.
DOI: 10.1021/acs.joc.5b00571, **査読有**

(12) Liu, Z., Jenkinson, S. F., Vermaas, T., Adachi, I., Wormald, M. R., Hata, U., Kurashima, Y., Kaji, A., Yu, C,-Y., Kato, A., Fleet, G. W. J. (2015) 3-Fluoro-azetidine carboxylic acids and trans,trans-3,4-difluoroproline as peptide scaffolds: inhibition of pancreatic cancer cell growth by a fluoroazetidine iminosugar. *J. Org. Chem. 80*(9) 4244-4258.
DOI: 10.1021/acs.joc.5b00463, **査読有**

(13) Kato, A., Zhang, Z.-L., Wang, H.-Y., Jia, Y.-M., Yu, C.-Y., Kinami, K., Hirokami, Y., Tsuji, Y., Adachi, I., Nash, R. J., Fleet, G. W. J., Koseki, J., Nakagome, I., Hirono, S. (2015) Design and synthesis of labystegines, hybrid iminosugars from LAB and calystegine, as inhibitors of intestinal α-glucosidases: binding conformation and interaction for ntSI. *J. Org. Chem. 80*(9) 4501-4515.
DOI: 10.1021/acs.joc.5b00342, **査読有**

(14) Li, Y.-X., Shimada, Y., Sato, K., Kato, A., Zhang, W., Jia, Y.-M., Fleet, G. W. J., Yu, C.-Y. (2015) Synthesis and glycosidase inhibition of australine and its fluorinated derivatives. *Org. Lett. 17*(3) 716-719.
DOI: 10.1021/ol503728e, **査読有**

(15) Kato, A., Hirokami, Y., Kinami, K., Tsuji, Y., Miyawaki, S., Adachi, I., Hollinshead, J., Nash, R. J. Kiappes, J. L., Zitzmann, N., Cha, J. K., Molyneux, R. J., Fleet, G. W. J., Asano, N. (2015) Isolation and SAR studies of bicyclic iminosugars from *Castanospermum australe* as glycosidase inhibitors. *Phytochemistry* 111, 124-131.
DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.12.011, **査読有**

(16) Bleriot, Y., Auberger, N., Jagadeesh, Y., Gauthier, C., Prencipe, G., Tran, A. T., Marrot, J., Désiré, J., Yamamoto, A., Kato, A., Sollogoub, M. (2014) Synthesis of 1,2-*cis*-homoiminosugars derived from GlcNAc and GalNAc exploiting a β-aminoalcohol skeletal rearrangement. *Org. Lett.* 16 (21) 5512–5515.

DOI: 10.1021/ol502926f, 査読有

〔学会発表〕（計 11 件）

(1) 中込 泉、加藤 敦、山乙 教之、足立 伊左雄、広野 修一：コンピュータリガンドドッキングと分子動力学シミュレーションによる Hexosaminidase A—リガンド複合体の相互作用解析：日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日～3 月 27 日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

(2) 中込 泉、加藤 敦、山乙 教之、足立伊左雄、広野修一：Hexosaminidase A の高親和性リガンドに対するイン・シリコ相互作用解析：第 44 回構造活性相関シンポジウム、2016 年 11 月 16 日～11 月 17 日、京都大学医学部創立百年記念施設 芝蘭会館（京都府・京都市）

(3) 加藤 敦、中込 泉、佐藤香純、山本亜里紗、足立伊左雄、広野修一：イミノ糖を基盤とした GCase 高親和性リガンドの創製とファーマコロジカルシャペロン効果について：第 35 回糖質学会年会、2016 年 9 月 1 日～9 月 3 日、高知市文化プラザ かるぽーと（高知県・高知市）

(4) 加藤 敦、山本亜里紗、友原啓介、足立伊左雄、渡邊靖香、名取良浩、吉村祐一、中込泉、広野修一：ピロリジン型イミノ糖を基盤とした新規GCase高親和性リガンドのデザインとファーマコロジカルシャペロン効果について：日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日～3 月 29 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

(5) Natori, Y., Kato, A., Adachi, I., Yoshimura, Y., Catalytic asymmetric syntheses and biological evaluations of α-1-*C*-substituted L-iminofuranose derivatives as α-glucosidase inhibitor, Pacifichem2015, 15-20 December, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.

(6) Nakagome, I., Kato, A., Yoshida, T., Yamaotsu, N., Adachi, I., Hirono, S., *In silico* study on the interaction of high affinity ligand calystegine B_2 with β-glucocerebrosidase, Pacifichem2015, 15-20 December, 2015 Honolulu, Hawaii, USA.

(7) 佐久間俊嘉、名取良浩、中川進平、加藤敦、足立伊左雄、吉村祐一：1-*C*-n-ブチル-L-イミノフラノース誘導体の触媒的不斉合成と酵素阻害活性評価：第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2015 年 11 月 25 日～11 月 27 日、幕張国際研修センター（千葉県・千葉市）

(8) 中込 泉、加藤 敦、山乙教之、吉田智喜、足立伊左雄、広野修一：Computational study of the interaction of α-1-*C*-alkyl derivatives of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol with β-glucocerebrosidase：第 43 回構造活性相関シンポジウム、2015 年 9 月 27 日～9 月 29 日、新潟日報メディアシップ 日報ホール（新潟県・新潟市）

(9) 中込 泉、小関 準、加藤 敦、山乙教之、足立伊左雄、広野修一：α-glucosidase 阻害剤α-1-*C*-butyl-LAB のイソマルターゼに対する結合様式解析：日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26 日～3 月 28 日、神戸学院大学他（兵庫県・神戸市）

(10) 中込 泉、加藤 敦、山乙教之、足立伊左雄、広野修一：β-glucocerebrosidase に対する高親和性リガンド calystegine B_2 類縁体の計算化学的相互作用解析: 第 42 回構造活性相関シンポジウム、2014 年 11 月 13 日～11 月 14 日、くまもと森都心プラザ（熊本県・熊本市）

(11) 加藤 敦、山本亜里紗、中川進平、足立伊左雄、中込 泉、広野修一：GCase 高親和性リガンドである 1-*N* 型イミノ糖の結合親和性とファーマコロジカルシャペロン効果について：第 33 回糖質学会年会、2014 年 8 月 10 日～8 月 12 日、名古屋大学豊田講堂（愛知県・名古屋市）

６．研究組織

(1) 研究代表者
加藤 敦（KATO, Atsushi）
富山大学・附属病院・准教授
研究者番号：60303236

(2) 研究分担者
広野 修一（HIRONO, Shuichi）
北里大学・薬学部・教授
研究者番号：30146328

石井 達（ISHII, Satoshi）
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号：00222935

足立 伊左雄（ADACHI, Isao）
富山大学・附属病院・教授
研究者番号：30151070