

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15949

研究課題名(和文) 生理的なタンパク質安定性制御機構への介入による新奇コレステロール合成調節剤の創製

研究課題名(英文) Development of novel cholesterol synthesis modulators that alter stability of cholesterol-biosynthetic enzymes

研究代表者

大金 賢司 (Ohgane, Kenji)

お茶の水女子大学・基幹研究院・講師

研究者番号：30771092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コレステロール合成酵素の安定性が低分子化合物により変化するという現象に着目し、これを変化させる化合物の探索をおこなった。スクアレンモノオキシゲナーゼ(SM)については、内在性のオキシステロールおよびその関連化合物のスクリーニングおよび誘導体合成を通し、構造活性相関を明らかにした。また、研究過程において当該酵素の触媒ドメインがその阻害剤により安定化されること、触媒ドメインにルシフェラーゼを融合したタンパク質を細胞内で発現させることで、細胞内でSMの触媒ドメインに結合する化合物を検出できることを見出し、その阻害剤探索法としての有用性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素の機能を阻害する化合物は、これまで阻害剤として数多く医薬応用されてきた。本研究では、機能ではなく酵素自体の量を変化させる化合物について探求をおこない、特にコレステロール合成経路のスクアレンモノオキシゲナーゼに着目して化合物の探索を行なった。本酵素の安定性を低下させるオキシステロールを見出し、そのどのような構造が必要かを明らかにし、高活性化を目指す上での基礎となる情報を得た。また、スクアレンモノオキシゲナーゼの阻害剤を探索する新しい方法として、簡便かつ細胞内での作用を検出できる実験系の開発をおこなった。今後、新たなスクアレンモノオキシゲナーゼ阻害剤の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol biosynthetic pathway is tightly regulated at both transcriptional and post-translational levels. In this study, we specifically focused on the latter, and sought to identify small molecules that alter stability of cholesterol biosynthesis enzymes, including squalene monooxygenase. Based on our initial hit compounds from a screening that monitor squalene monooxygenase stability, we synthesized oxysterol derivatives, and clarified its structure-activity relationships. Also, during the course of the study, we noted that the catalytic domain of the enzyme is specifically stabilized by its inhibitors, and the stabilization could be sensitively detected by luciferase activity fused to the enzyme. Expecting this could be a useful cell-based screen for squalene monooxygenase inhibitors, we performed characterization of the screen.

研究分野：医薬化学

キーワード：コレステロール タンパク質安定性

1. 研究開始当初の背景

低分子医薬のほとんどは、酵素の阻害剤や受容体のアゴニスト・アンタゴニストなど、標的タンパク質の機能を直接変化させるものである。一方で近年、生体内の恒常性を保つために、特定の内在性低分子化合物の量に応じて、特定のタンパク質の安定性を変化させるというメカニズムが用いられている例が見つかってきている。もし、このような生理的な安定性制御機構を低分子化合物で制御することができれば、一般的な低分子医薬のカテゴリーに当てはまらない、新奇な作用機序・枠組みを提案できる。低分子医薬品は、狙いやすい標的に対しては研究開発がされつくしており、飽和状態にあるとも言われる。そのような状況を踏まえ、安定性を化合物で制御するという新しいアプローチの開拓を進めることは、アカデミアでの医薬化学研究として重要であると考えられる。

本研究では、コレステロール合成経路の律速酵素の一つとして知られる squalene monoxygenase (SM)を対象とし、安定性制御というアプローチでコレステロール合成を調節する低分子化合物の創製することを目指した。SMはコレステロール合成経路において、ステロイド環形成の直前でスクアレンのエポキシ化を触媒する膜タンパク質であり、N末端ドメインとC末端側の触媒ドメインからなる。研究代表者らは、SMがN末端ドメインでスクアレンを感知して自身を安定化するという、新奇なフィードフォワード型の恒常性維持機構を発見した (Yoshioka et al., PNAS 117: 7150, 2020)。この安定化現象は、基質であるスクアレンが、SMの代謝キャパシティを増やすことで、その蓄積を回避するメカニズムとして合理的である。さらに、スクアレンがN末端の非触媒ドメインに直接結合することで、アロステリックにSMの分解を抑えていることも明らかにした。また一方で、直接結合するかは不明であるが、ステロールはN末端ドメインを介してSMの不安定化を起こすことも共同研究者らにより報告されている (Gill et al., Cell Metab 13: 260, 2011)。これらの知見は、医薬化学という観点からは、N末端ドメインに結合するような低分子化合物でSMの安定性を制御できることを示唆している、と見ることができる。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究ではSMの安定性を調節するような低分子化合物を得ることができるのか、医薬化学的な観点から調べることを目的とした。

3. 研究の方法

SMの安定性を評価する方法として、SMとルシフェラーゼの融合タンパク質を培養細胞に安定発現させ、その定常状態発現量をルシフェラーゼの生物発光により定量する方法を用いた。SMとしては全長SMのほか、安定性制御に関わるN末端ドメイン、およびC末端の触媒ドメインを用いた。研究開始時点で、スクアレンがN末端ドメインを介してSMを安定化することを研究代表者らが示し、ステロールが不安定化することは共同研究者らが示していた。そこで、これらの化合物を元に類縁体のスクリーニング・構造展開を進めることとした。

4. 研究成果

SMのN末端ドメインの安定性に影響を与える化合物としては、研究代表者らのスクアレンのほか、これまでにいくつかの内在性ステロールのみが調べられていた。そこで、内在性化合物に限らず、より広い範囲で構造的に類似性のある化合物を上記の活性評価系にてスクリーニングを行なった。その結果、20-ヒドロキシコレステロールにコレステロール以上のSMの分解誘導活性があることを見出した。スクアレンの安定化効果に関しては、より高濃度が必要であること、溶解性・膜透過性が低いことから、まずは20-ヒドロキシコレステロールに着目して構造展開を開始した。その結果、ステロール側鎖が必須であること、およびステロイドA環部分はステロイドホルモンに見られるような芳香環を導入すると活性が失われること、ステロイドコアのヒドロキシル化は活性低下を招くことが明らかとなった。

このような構造活性相関を踏まえ、20-ヒドロキシコレステロールの側鎖アルキル基に着目した構造展開を進めた。芳香環や多重結合、ヘテロ原子を含む側鎖を持つ誘導体などを合成し、SMの安定性に与える影響を評価したが、活性が消失する誘導体は明確に得られるものの、低濃度で作用するような活性の向上した誘導体を得るには至らなかった。同様に、3位ヒドロキシル基の修飾についても検討したものの、活性の向上には至らなかった。コレステロール自体よりも20-ヒドロキシコレステロールは溶解性も高く扱いやすいことから、今後、当該作用を調べるためには有効と考えられるが、構造変換による高活性化は容易ではないと思われる。

上記の実験を進める過程で、C末端側の触媒ドメインがSM阻害剤で安定化され、その安定化が細胞レベルで融合したルシフェラーゼの発光量の増加により検出できることを見出した。これまでSM阻害剤の探索には、スクアレンのエポキシ化反応をLC-MSにより定量する方法や、放射性同位体標識したスクアレンを用いてエポキシ体を薄層クロマトグラフィーにより分離して検出する方法が用いられてきた。それらの方法と比べ、本方法は細胞内で作用することが確認で

きること、ルシフェラーゼの発光により簡便にかつ高いスループットで阻害剤探索が可能となることを見込めることから、この生細胞中での触媒ドメイン安定化現象の特性を調べた。SM 触媒ドメインの安定化作用は、SM 阻害剤に選択的に観測され、その他のスタチンを含むコレステロール合成経路の阻害剤では観測されなかった。また、濃度依存性試験においては、既存の SM 阻害剤でわかっているヒト SM 阻害活性の序列を再現できることを確認した。これより、本実験系は細胞レベルで SM 阻害剤の探索を可能にする実験として有用であることがわかった。

現在までに真菌 SM の阻害剤はテルビナフィンやリラナフテートなどが知られているが、ヒトに対して開発された化合物は少ない。本細胞ベースの評価系にて、各種真菌 SM 阻害剤や rat SM 阻害剤として報告されている化合物(compound 19, Musso et al., Org. Biomol. Chem.1: 498, 2003)のヒト SM 阻害剤としての評価を行った。その結果、compound 19 はヒト SM に対しては非常に弱い活性を示すのみ(>10 μ M)である一方、真菌 SM 阻害剤であるリラナフテートに比較的強いヒト SM 阻害活性があることが示唆された。この結果から、リラナフテート誘導体を元にした構造展開により、新たなヒト SM 阻害剤が得られる可能性が考えられたことから、構造活性相関研究を行なった。リラナフテートの構造のうち、チオカルバメート構造や N アルキル基の重要性が明らかになった一方で、疎水性置換基は他の構造に置き換えても活性が維持できることなど、ヒト SM に対する構造活性相関を明らかにした。リラナフテート自体は古い化合物であるがこれまでヒト SM に対する活性は精査されてこなかったことから、今回見出されたヒト SM の作用およびその構造活性相関は、今後のヒト SM 阻害剤探索に役立つ可能性がある。

また、抗真菌剤としての真菌 SM の阻害剤は広く使用されている。本研究で見出された触媒ドメインの安定化という現象が、ヒト SM 阻害剤の探索だけでなく真菌 SM 阻害剤の探索に応用できるのか、酵母 SM を用いて検証を行った。酵母の対応する酵素である Erg1 に対してルシフェラーゼを融合し、培養細胞に安定発現させ、SM 阻害剤による安定化が検出できるか検証を行った。残念ながら、酵母 SM では安定化は観測されず、真菌 SM 阻害剤のスクリーニング系としての応用は難しいという結果であった。この結果は、タンパク質の生細胞中での安定性はタンパク質ごとに大きく異なり、本研究で用いたようなリガンドによる安定化はかならずしも 37 °C で 24-48 時間という条件では観測できないことを示唆している。このようなリガンド探索法は、どのようなタンパク質でも使えるというような汎用的なものではないこともわかったが、今回見出したヒト SM 阻害剤のスクリーニング系は、今後リガンド探索や構造活性相関研究に有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamura Kota, Yoshioka Hiromasa, Sato Chikako, Yajima Tomoko, Furuyama Yuuki, Kuramochi Kouji, Ohgane Kenji	4. 巻 78
2. 論文標題 Fine-tuning of nitrogen-containing bisphosphonate esters that potently induce degradation of HMG-CoA reductase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117145 ~ 117145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.117145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoda Tomoka, Furuta Masateru, Tsutsumi Tomohiko, Ikeda Seiki, Yukizawa Shunsuke, Arai Satoshi, Morita Akinori, Yamatoya Kenji, Nakata Kazuya, Tomoshige Shusuke, Ohgane Kenji, Furuyama Yuuki, Sakaguchi Kengo, Sugawara Fumio, Kobayashi Susumu, Ikekita Masahiko, Kuramochi Kouji	4. 巻 41
2. 論文標題 Epo-C12 inhibits peroxiredoxin 1 peroxidase activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116203 ~ 116203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116203	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 Kato Yuichi, Inoue Tomoka, Furuyama Yuuki, Ohgane Kenji, Sadaie Mahito, Kuramochi Kouji	4. 巻 86
2. 論文標題 Deoxygenation of tertiary and secondary alcohols with sodium borohydride, trimethylsilyl chloride, and potassium iodide in acetonitrile	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153519 ~ 153519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.153519	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 Nishiuchi Kota, Ohashi Hirofumi, Nishioka Kazane, Yamasaki Masako, Furuta Masateru, Mashiko Takumi, Tomoshige Shusuke, Ohgane Kenji, Kamisuki Shinji, Watashi Koichi, Kuramochi Kouji	4. 巻 85
2. 論文標題 Synthesis and Antiviral Activities of Neoechinulin B and Its Derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 284 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c01120	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 大金 賢司、吉岡 広大	4. 巻 93
2. 論文標題 コレステロール生合成の新たな制御ポイント	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 147 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930147	査読の有無 無
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 Shioi Ryuta, Karaki Fumika, Yoshioka Hiromasa, Noguchi-Yachide Tomomi, Ishikawa Minoru, Dodo Kosuke, Hashimoto Yuichi, Sodeoka Mikiko, Ohgane Kenji	4. 巻 15
2. 論文標題 Image-based screen capturing misfolding status of Niemann-Pick type C1 identifies potential candidates for chaperone drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toyota Yosuke, Yoshioka Hiromasa, Sagimori Ikuya, Hashimoto Yuichi, Ohgane Kenji	4. 巻 28
2. 論文標題 Bisphosphonate esters interact with HMG-CoA reductase membrane domain to induce its degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115576 ~ 115576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115576	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大金 賢司
2. 発表標題 タンパク質を安定化・不安定化する低分子化合物
3. 学会等名 東北大学生命科学研究科セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河村 幸汰, 吉岡 広大, 倉持 幸司, 古山 祐貴, 大金 賢司
2. 発表標題 HMG-CoA 還元酵素を不安定化する新規低分子化合物の創製
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝田 寛, 吉岡 広大, 倉持 幸司, 大金 賢司
2. 発表標題 スクアレンモノオキシゲナーゼの分解を誘導するステロールの構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 朋香, 吉岡 広大, 倉持 幸司, 大金 賢司
2. 発表標題 生細胞中でのタンパク質安定性変化に着目したスクアレンモノオキシゲナーゼ阻害剤探索法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (広島)
4. 発表年 2021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
---------	---------