

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440079

研究課題名(和文) 構造生物学的手法による神経変性病治療薬開発のための新しい戦略

研究課題名(英文) A new strategy to develop therapeutic agents for neurodegenerative diseases by 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ニューロセルピンの阻害剤を構造生物学的手法により見出し、神経変性病治療薬の開発を目指すものである。まず、ニューロセルピン-tPA複合体(4 Å)、および活性が弱い病原性ニューロセルピン変異体S49P(1.9 Å)のX線結晶構造解析に成功した。そしてこれらの構造データを基に、ニューロセルピンのlatent化を速める薬剤3種、およびtPAとの結合を阻止する薬剤を2種見出した。これらの効果や毒性を、アミロイド 蛋白質を過剰発現する培養神経細胞で検証した結果、2種の有望なリード化合物を見出した。

研究成果の概要(英文)：Neuroserpin is a promising target for cure of neurodegenerative diseases because the protein inhibits tissue type plasminogen activator (tPA) in the brain and central nervous system. Neuroserpin inhibitor compounds thus, without effects on thrombolysis, can assist to produce plasmin that degrades amyloid fibril in the brain. In this project, crystal structures of a complex of neuroserpin with tPA and a pathogenic mutant of neuroserpin S49P were determined at 4 angstrom resolution and 1.9 angstrom resolution, respectively. Based on these structural data, three compounds that accelerate latent transition of neuroserpin, and two compounds that inhibit binding of neuroserpin with tPA were found. These five compounds were subjected to effect and toxic tests using a neuronal cell culture model of Alzheimer's disease, and based on the results, we successfully found two potential leads for drug design.

研究分野：構造生物学

キーワード：neuroserpin tPA inhibitor drug design serpin alzheimer neurodegeneration dementia

1. 研究開始当初の背景

神経変性病は、異常凝集した蛋白質が脳・神経組織に蓄積することで起こる疾患で、決定的な治療法は未だ見つかっていない。本研究開始当時における治療法開発研究の多くは、蛋白質の異常凝集を抑制する手法を見出すことが中心だった。しかし、その一方で、凝集蛋白質の分解・排出を促進するというアプローチが注目され始めていた。その1つがプラスミンで、この酵素は血栓を溶解することで知られているが、脳内に蓄積したアミロイドβ蛋白質も分解・排除する。

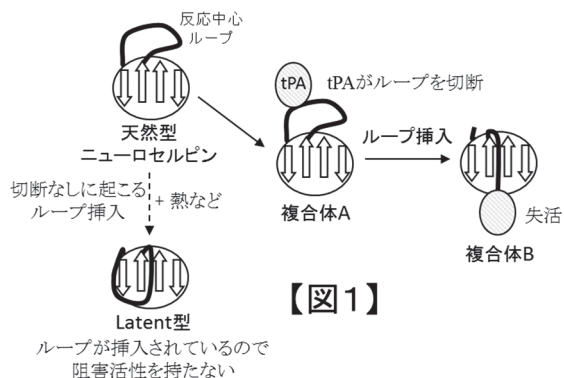
プラスミンは、プラスミノゲンが tPA (組織プラスミノゲン活性化因子) により限定加水分解されることにより生成するが、この tPA を阻害する蛋白質群のうち、唯一、脳・中枢神経系に局在して発現するのがニューロセルピンである。そこで、ニューロセルピンの阻害剤を見出し、これを利用することで、血液凝固系に影響を与えることなく脳内のプラスミンを活性化し、アミロイドβ凝集物の分解・排除を促す戦略を発案した。

2. 研究の目的

ニューロセルピンの阻害剤を構造生物学的アプローチにより見出し、これにより、神経組織における異常凝集蛋白質の排出を促進させる手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 戦略: 異常凝集蛋白質の排出を促進させるには、プラスミンを活性化する因子である tPA のはたらきを促せばよい。従って、tPA を脳内で特異的に阻害するニューロセルピンの作用を抑制すればよい。ニューロセルピンは、特有の複合体 A, B を形成して tPA を阻害するので (図 1)、①複合体 A の形成を阻害する、② Latent 型への移行を速める、以上 2 つの戦略を試みた。



(2) 複合体 A の X 線結晶構造解析 (戦略①): 複合体 A の形成を阻害する薬物をデザインするため、複合体 A の X 線結晶構造解析を実施した。A の状態で停止させるため、tPA の活性中心である Ser195 を Ala に置換し、その他、結晶化に有利となる変異を導入して、tPA のプロテアーゼドメインを大腸菌で調製した。こ

れに、代表研究者が既に確立ずみの手法で調製した野生型ニューロセルピンを混合し、結晶化して、X 線回折測定を行った。

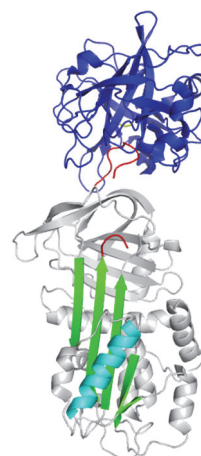
(3) Cleaved 型病原性ニューロセルピン変異体 S49P の X 線結晶構造解析 (戦略②): ニューロセルピンには、ループ挿入速度が遅く、複合体 B の形成効率が悪い変異体 S49P が存在する。そこで、これの Cleaved 型 (Cleaved-S49P) の X 線結晶構造解析を行い、既に構造が明らかとなっている野生型の Cleaved 型 (Cleaved-WT) と比較することで、ループ挿入速度を速める (Latent 化を速める) 相互作用を分析することを試みた。

(4) 複合体 A の形成を阻止する薬剤、Latent 型への移行を速める薬剤の探索: 前述 (2), (3) で得た構造データを基に、まず in silico で化合物の絞り込みを行った (240 万種→50 種)。次に、in vitro での絞り込みを実施した。前者については、複合体は共有結合を介して形成されるので、SDD-PAGE で確認した。後者については、代表研究者が発明したリアルタイム PCR システム (JST 平成 23 年度 A-STEP, AS231Z05126F) を利用した。

(5) 培養細胞での検証効果の検証: 前述 (4) の探索で見出した薬物の効果について、アミロイドβ蛋白質を過剰発現する神経前駆細胞株 (NPCAb) を使って検証した。実験に使用した細胞株は、Miranda 博士 (ローマ・ラ・サピエンツァ大学・チャールズ・ダーウィン生物学・生物工学研究科) から協力を得て樹立した。NPCAb を培養してアミロイドを十分発現させた後、培地にプラスミノゲン、tPA、ニューロセルピン、および薬剤 AX~EX を添加した。アミロイド量の変化はサンドイッチ ELISA 法により定量した。また、細胞毒性は LDH Cytotoxicity Detection Kit で確認した。

4. 研究成果

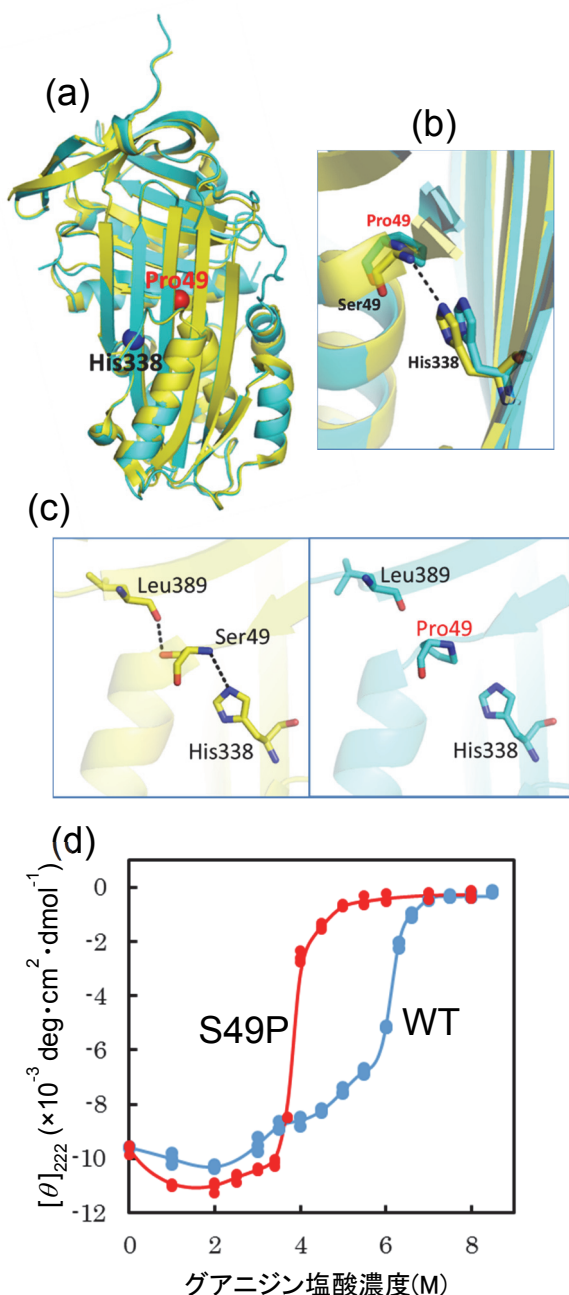
(1) 複合体 A の X 線結晶構造解析に成功し、4Å 分解能までの解析データを得ることが出来た (図 2)。しかし、分解能が不十分であったため、反応中心ループや、ヘリックス D, E の近傍の構造が見えなかった。今後の方策としては、薬物をデザインするために、分解能 2.5Å 以下を目指すのが、tPA とニューロセルピンの位置関係はこの構造データから明確になったので、これを基に阻害剤の探索を行った。



【図2】

(2) Cleaved-S49P の結晶構造を、セルピンとしては高分解能である 1.9Å で決定することに

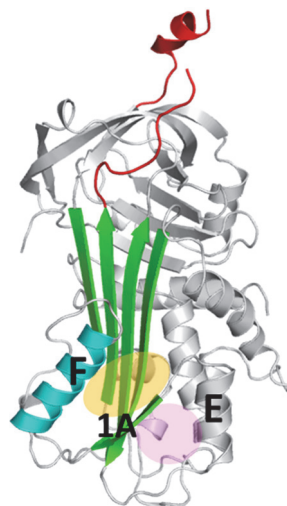
成功した。加えて、この結晶構造解析の成功は、セルピノパシー原性変異体としては世界で二例目の希少なものである。得られた構造データと Cleaved-WT のそれを比較したところ、ループが挿入されるシャッター領域近傍において、S49P の方が WT に比べて相互作用が少なく、この僅かな違いが、分子全体の安定性に大きく寄与していることが明らかとなった (図3)。現在、得られた成果をまとめた論文を投稿中である。



【図3】(a) Cleaved-S49P (水色) と Cleaved-WT (黄色) の全体構造の比較。(b) (c) シャッター領域近傍の比較。(d) 安定性の比較 (変性曲線)。

(3) Cleaved-S49P の結晶構造データを基に、Latent 型を安定化し、天然型から Latent 型への転移速度を速める薬剤を3種 (AX, BX, CX)

見出した。3種はいずれもキノンの誘導体で、蛍光プローブ 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthalene)-sulfonic acid を利用した蛍光測定の結果から、AX はヘリックス F とストランド 1A の間、BX と CX はヘリックス E とストランド 1A 近傍に結合し (図4)、ニューロセルピンの5倍モル濃度存在下で、Latent 化速度をそれぞれ1030倍 (AX)、320倍 (BX)、110倍 (CX) 速めることが分かった。



【図4】推定される薬剤 AX の結合部位 (薄茶色) と、薬剤 BX および CX の結合部位 (桃色)。

次に、複合体 A の結晶構造解析の結果を基に、ニューロセルピンの結合を阻害する薬物の探索を行った。その結果、ニューロセルピンの1:1のモル比で結合し、tPA との複合体形成を阻害する薬剤を2種 (DX, EX: いずれもビフェニル系化合物) 見出した。薬剤の結合部位や阻害機構の解析はまだ行っていないが、効果が期待できたので、細胞試験を先に行った。

(4) NPC<sub>Ab</sub> を使った効果の検証を行った結果、AX, DX, EX を添加した場合、コントロールに比べてプラスミン濃度の上昇がみられ、アミロイドβ蛋白質総量が減少した。また、細胞毒性試験を行ったところ、EX 以外では毒性は検出されなかった。以上の結果から、ニューロセルピン阻害剤の有望なリード化合物として AX と DX を見出すことに成功した。ニューロセルピンの結合定数や IC<sub>50</sub>、および特異性について、SPR や Native-PAGE で解析をしたところ、親和性・特異性ともに改善の必要があることが分かったため、今後は AX と DX を基に、薬物のデザインを進める。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計15件)

① Y. Nishikawa, T. Kinoshita, M. Onda

「Mechanism of a novel inhibitor of PAI-1」 第17回日本蛋白質科学会年会 (2017年6月20日), 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

- ②A. Kurumiya, M. Tsuda, M. Yamasaki, M. Onda  
「The crystal structure of cleaved neuroserpin reveals instability of the linkage region of the protomer」日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017 年 3 月 19 日), 京都女子大学 (京都府・京都市)
- ③M. Tsuda, A. Kurumiya, M. Onda  
「ニューロセルピン-tPA 複合体の結晶化を目的とした tPA プロテアーゼドメインの調製」第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日), 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ④M. Tsuda, A. Kurumiya, M. Onda  
「Preparation of tPA for crystallization of a tPA-neuroserpin complex」第 16 回日本蛋白質科学会年会 (2016 年 6 月 9 日), 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ⑤A. Kurumiya, M. Tsuda, M. Yamasaki, M. Onda  
「Cleaved 型病原性ニューロセルピン変異体 S49P の X 線結晶構造解析」日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016 年 3 月 30 日), 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- ⑥A. Kurumiya, M. Tsuda, M. Yamasaki, M. Onda  
「病原性ニューロセルピン変異体の Cleaved 型の X 線結晶構造解析」BMB2015 (2015 年 12 月 2 日), 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑦J. Zhang, A. Kurumiya, M. Onda  
「Serpins polymerization from refolding/unfolding intermediates」第 15 回日本蛋白質科学会年会 (2015 年 6 月 25 日), あわぎんホール (徳島県・徳島市)
- ⑧A. Kurumiya, A. Nakamura, M. Onda  
「Preparation of aggregenic neuroserpin by Long-time refolding」日本農芸化学会 2015 年度大会 (2015 年 3 月 27 日), 岡山大学 (岡山県・岡山市)
- ⑨A. Nakamura, A. Kurumiya, M. Onda  
「Configuration of ovalbumin polymers」第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 17 日), 京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑩A. Kurumiya, A. Nakamura, M. Onda  
「Preparation of the pathogenic mutant of neuroserpin S49P by Long-time refolding」第 14 回日本蛋白質科学会年会 (2014 年 6 月 25 日), ワークピア横浜 (神奈川県・横浜市)

〔図書〕 (計 1 件)

- ①石原道博, 居原秀, 恩田真紀, 川西優喜, 木下誉富, 児玉靖司, 佐藤孝哉, 白石一乗, 竹田恵美, 竹中延之, 円谷健, 西野貴子, 原正之, 藤井郁雄, 藤原大祐, 森英樹, 八木孝司, 吉原静江  
大阪公立大学共同出版会「バイオサイエンス実験・入門から応用へ」(2016) p9-15, p117-122

〔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

山崎 正幸 (YAMASAKI, Masayuki)  
龍谷大学・農学部・准教授  
研究者番号: 80397562

(3)連携研究者

三上 文三 (MIKAMI, Bunzo)  
京都大学・農学研究科・教授  
研究者番号: 40135611

多田 俊治 (TADA, Toshiji)  
大阪府立大学・理学系研究科・客員研究員  
研究者番号: 70275288

木下 誉富 (KINOSHITA, Takatoshi)  
大阪府立大学・理学系研究科・准教授  
研究者番号: 90405340

(4)研究協力者

David A. Lomas  
ロンドン大学・ユニヴァーシティ・カレッジ・ロンドン・医学部呼吸生物学・教授

Elena Miranda

ローマ・ラ・サピエンツァ大学・チャールズ・ダーウィン生物学・生物工学研究科・常任研究員