

学位論文要約

Molecular basis of 1-deoxygalactonojirimycin arylthiourea binding to human α -galactosidase A: pharmacological chaperoning efficacy on Fabry disease mutants

(1-デオキシガラクトノジリマイシン アリルチオウレアとヒト α -ガラクトシダーゼAの結合の分子基盤に関する検討: ファブリー病変異に対する薬理的シャペロンの効果について)

(著者: 于一、Teresa Mena-Barragán、檜垣克美、Jennifer L. Johnson、Jason E. Drury、Raquel L. Lieberman、仲宗根真恵、二宮治明、月村考宏、櫻庭均、鈴木義之、難波栄二、Carmen Ortiz Mellet、José M. García Fernández、大野耕策)

平成26年 ACS Chemical Biology 9巻 1460頁～1469頁

ファブリー病はX染色体上にある α -ガラクトシダーゼA酵素をコードするGLA遺伝子異常により引き起こされるライソゾーム病の一つで、ミスセンス変異の多くは蛋白質の折りたたむ異常により小胞体分解される。本研究は、中性両親媒性の新規薬理的シャペロン化合物、1-デオキシガラクトノジリマイシンアリルチオウレア(DGJ-ArTs)、を有機合成し、ヒト α -ガラクトシダーゼAに対する蛋白質安定化と細胞内輸送に及ぼす効果を検討した。共結晶構造解析により、化合物のアリル-N'Hチオウレア水素基と α -ガラクトシダーゼAの活性中心部のアスパラギン酸(D231)の強い結合が重要な役割を果たしていることが分かった。選別した化合物について、ファブリー病細胞に対する効果を調べた結果、 α -ガラクトシダーゼAの上昇効果と蓄積基質Gb3の減少効果を認めた。さらに、この化合物は蛋白質恒常性維持に関わる4-フェニル酪酸と併用することで相乗効果を認めた。以上の結果から、DGJ-ArTsはファブリー病に対する新規シャペロン化合物としての有効性が示された。

方法

ファブリー病に対する新規シャペロン候補化合物として6種類の化合物(DGJ-ArTs)を有機合成した。化合物とヒト α -ガラクトシダーゼAとの結合様式の解析は、共結晶構造解析により行った。ライソゾーム効果活性の測定は、蛍光4-メチルウンベリフェロンが標識された人工基質を用い測定した。化合物の試験管内酵素阻害活性と酵素安定化活性の測定は、ヒト正常線維芽細胞抽出液を用い測定した。ファブリー病患者由来培養線維芽細胞に対する化合物の効果は、化合物を含む培地で4日間培養後、細胞抽出液中の α -ガラクトシダーゼA酵素活性を測定することにより行った。変異 α -ガラクトシダーゼA酵素活性に対する化合物の効果の検討は、変異GLA cDNA

発現ベクターを一過性に発現させた培養COS細胞を用い、ファブリー病線維芽細胞と同様に化合物を含む培地で4日間培養後の酵素活性測定により行った。細胞内基質と蛋白質発現の検討は、免疫蛍光染色とウェスタンブロット法により行った。

結 果

6種類のDGJ-ArTs化合物のヒト α -ガラクトシダーゼAに対する試験管内活性を調べた結果、いずれの化合物においても酵素阻害活性と安定化活性を認めた。特に強い試験管内活性を認めた1化合物(DGJ-*p*FPhT)とヒト α -ガラクトシダーゼAの共結晶構造解析の結果、化合物のアリル-N'Hチオウレア水素基と α -ガラクトシダーゼAの活性中心部のアスパラギン酸(D231)が強く結合していることが分かった。ファブリー病患者由来培養線維芽細胞に対する検討では、4化合物において有意な変異酵素活性上昇効果を認めた。この化合物は、17種類の変異のうち16種類の変異型に同様の効果を示し、細胞内基質Gb3の減少効果を認めた。また、ファブリー病細胞におけるオートファジー異常の改善効果を認めた。さらに、この化合物は、細胞内小胞体における蛋白質恒常性維持に関わる4-フェニル酪酸と併用することで、より強い変異酵素活性上昇効果を示した。

考 察

ファブリー病に対するシャペロン化合物DGJは現在シャペロン治療薬として開発されているが、一方で細胞膜透過性が低いなどの問題点が明らかになってきた。今回、DGJにアリルチオウレア基を付したDGJ-ArTsは、中性両親媒性で細胞膜の高い透過性をもつ新規化合物の合成に成功した。また、培養細胞および結晶構造解析から、シャペロン化合物と酵素との結合に重要な結合部位を明らかにでき、これは他のライソゾーム病を標的にした同様の化合物の開発のためにも、重要な知見であった。今後は、モデルマウスなど動物個体に対するDGJ-ArTsの効果を検討することで、ファブリー病に有効な新規シャペロン治療薬の開発に発展すると考えられた。

結 論

ファブリー病患者細胞に対し有効性を示す新規薬理的シャペロン化合物を開発した。