

200833072A

別添1

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の確立

(H20 - こころ - 一般 - 022)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木義之

平成21(2009)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告		
ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の確立	1	鈴木義之
II. 分担研究報告		
ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発：新規化合物二環系 SP2-アザ糖質のシャペロン活性	7	大野耕策
ライソゾーム病モデル動物の作製と病態解析	9	松田潤一郎
$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究	13	難波栄二
酵素分子の計算的構造解析 - 分子動力学シミュレーションを用いたケミカルシャペロン療法の作用機序の検証 -	17	榎原康文
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21	
IV. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	23	
V. 健康危険情報	24	
VI. 研究成果の刊行物・別刷	25	

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総括研究報告書

ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の確立

研究代表者	鈴木 義之	国際医療福祉大学大学院・教授
研究分担者	大野 耕策 榊原 康文 難波 栄二 松田潤一郎	鳥取大学医学部・教授 慶應義塾大学理工学部・教授 鳥取大学生命機能研究支援センター・教授 医薬基盤研究所生物資源研究部・研究リーダー
研究協力者	飯田 真己 一ノ宮悟史 大久保眞人 小川誠一郎 黒澤美枝子 滝本 一広 中村 紘一 西村 吉雄 二宮 治明 樂 卓 檜垣 克己 Jose Garcia Fernandez Carmen Ortiz Mellet	生化学工業株式会社中央研究所・室長 大田原赤十字病院リハビリテーション科・理学療法士 国際医療福祉大学基礎医学研究センター・教授 慶應義塾大学理工学部・名誉教授 国際医療福祉大学薬学部・教授 国立感染症研究所動物管理室・研究員 国際医療福祉大学薬学部・教授 微生物化学研究センター・副センター長 鳥取大学医学部・教授 鳥取大学大学院医学系・大学院生 鳥取大学生命機能研究支援センター・准教授 セベリア化学研究所・教授 セベリア大学化学部・教授

研究要旨

遺伝性ライソゾーム病に対するシャペロン療法開発のための基礎的研究を行った。中枢神経障害を主徴とするG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス、中枢神経ならびに全身臓器の広範な病像を呈するゴーシェ病を対象として、分子・細胞・個体実験により、シャペロン効果の分子機構、遺伝子変異特異性、臨床効果を多面的に解析した。シャペロンとして、パリエナミン系化合物のほか、二環系アザ糖、1-N-イミノ糖を試験管内実験、細胞実験により検討した。これらもシャペロン療法の薬剤として有望であることが分かった。また新しい疾患モデル動物の開発に成功した。今後の実験効率の促進に役立つと期待する。更に新しいアプローチとして、動力学的シミュレーションによるシャペロン・蛋白分子結合のエネルギー計算を行った。ライソゾームの酸性環境で、この複合体の結合エネルギーが減少し、解離が起こることを理論的に明らかにした。マウス個体を用いたNOEV治療実験において、より少量の投薬で臨床効果が得られる可能性を示した。シャペロン治療効果の裏づけとして、マイクロアレイ解析により、多くの細胞機能に関与する遺伝子群の発現が正常化することが分かった。

A. 研究目的

遺伝性ライソゾーム病をモデル疾患とした新しい分子治療法（ケミカルシャペロン療法）の確立を目的とする。これまでの研究対象であるパリエナミン系化合物NOEV（N-オクチル-4-エピ-β-パリエナミン）、NOV

（N-オクチル-β-パリエナミン）に加えて、二環系アザ糖誘導体、1-N-イミノ糖誘導体など、新しい構造を持つシャペロン化合物の生物活性を調べ、β-ガラクトシダーゼ欠損症、β-グルコシダーゼ欠損症に対して、よりよい治療効果を示すシャペロン化合物を探索する。

これらの化合物と変異酵素蛋白質との分子反応機序を解析することにより、シャペロン効果の最大達成を図る。モデル動物実験においては至適効果を得るため、そして同時に、起こりうる毒性を可能な限り軽減するための投与方法を検討する。このような基礎的なデータの集積後、動物毒性試験、ヒト個体への臨床試験を開始する。

## B. 研究方法

### 1. シャペロン化合物の合成と細胞内分子動態

これまで解析してきたバリエナミン系化合物NOEVとNOV(飯田)のほかに、新しい化合物として、二環系アザ糖誘導体(Garcia Fernandez, Ortiz Mellet)の $\beta$ -グルコシダーゼ活性に対する阻害・シャペロン効果、1-N-イミノ糖誘導体(西村)の $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトサミニダーゼ活性に対する阻害・シャペロン効果を調べた。

今年度はNOEVとともに、マウスに投与したNOVを組織、血液、尿中でLC-MS/MS法により測定し、投与量との関係を検討した。

さらに、NOEVと $\beta$ -ガラクトシダーゼ、NOVと $\beta$ -グルコシダーゼの結合動態を、分子動力的シミュレーションにより計算し、細胞内での複合体形成、ライゾゾームでの解離機構を理論的に解明した。

### 2. 新規モデル動物の開発

これまで用いてきたR201C変異発現 $G_{MI}$ -ガングリオシドーマウスに加え、より効率的な実験を目指して、R457Q変異発現マウスの開発を行い、遺伝子解析、変異酵素の活性発現の確認を行った。さらにゴーシェ病モデルマウスの開発のために、F213I変異発現 $\beta$ -グルコシダーゼ欠損マウスを作成し、凍結胚・精子の保存を行った。

### 3. 脂質性化学分析

R201C発現 $G_{MI}$ -ガングリオシドーマウスに対するNOEV投与との蓄積脂質の変化を、すでに報告してきた方法により検討した。

### 4. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とNOEV効果の検討

患者由来線維芽細胞を培養し、全エクソンのシーケンシング解析を行った。そしてNOEV添加による活性上昇効果との関係を検討した。さらに48種のミスセンス変異を導入した変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼcDNAを酵素欠損ノックアウトマウス線維芽細胞に導入し、NOEV

効果を検討した。

### 5. マウス脳組織のマイクロアレイ解析

マウスに対するNOEV治療の前後における脳内遺伝子発現をマイクロアレイ法により解析し、データのソフトウェア解析を行った。

### 6. 培養細胞・マウス個体シャペロン治療実験

$G_{MI}$ -ガングリオシドーマウスにいくつかの異なる濃度のNOEV水溶液を経口投与した。そして連日持続投与と3日毎の間歇投与の効果を、主に神経学的に評価した。臨床評価はすでに報告した11の検査法により行ったが、個々の検査法の脳障害検出特異性についても検討した。

### 7. 培養細胞・マウス個体のシャペロン治療実験

新規に開発された二環系アザ糖質7種のシャペロン効果を、ゴーシェ病患者由来の培養線維芽細胞、変異酵素発現COS細胞8種について検討した。

また正常マウスに4段階濃度のNOV水溶液を1週間経口投与し、このシャペロンの組織・体液中濃度の変化を検討した。

### 8. 動物実験倫理

動物実験は国際医療福祉大学研究倫理委員会、鳥取大学医学部実験動物委員会、医薬基盤研究所動物実験委員会の指針に従い、承認を受けた。行動観察は無麻酔で行った。組織の化学分析における薬剤の影響を避けるため、動物実験終了時には、短時間のエーテル麻酔のあと、頸椎脱臼により速やかな処理を行った。

## C. 研究結果

### 1. シャペロン化合物NOVの組織・体液中濃度測定

NOVは0.3、1、3、10 mMの4段階の水溶液として7日間投与した。投与後、脳(大脳、小脳)、肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、骨格筋の組織内濃度、そして尿および血漿内濃度を測定した。すべての組織、体液での濃度依存的上昇を確認した。中でも腎臓、肝臓、肺での上昇が大きかった。脳内濃度は腎臓の5-10%程度であった。大量の尿中排泄が見られた。

この短期間投与において、血液生化学検査に異常は認められなかった。

### 2. シャペロン効果の分子機構解析

シャペロンNOVと変異 $\beta$ -グルコシダーゼの分子結合強度を調べるため、異なるpH条件におけるシミュレ

ーション実験を行った。この酵素の立体構造が確定しているからである。1例としてF213IとNOVとの結合自由エネルギーを計算した。pH 7での結合エネルギーはpH 5での予測値の2倍程度であり、ライソゾームでの酸性条件で結合が弱くなり、複合体が解離することの理論的根拠が得られた。構造が確定していない $\beta$ -ガラクトシダーゼについても予備実験を行い、同様のデータが得られた (Perspect Med Chem, in press)。

### 3. 新規モデル動物の開発

R457Q変異発現マウスの遺伝子特性を2ラインの臓器について確認した。現在、このラインを確立中であり、今後の動物実験に使用予定である。

ゴーシェ病モデルマウスは肺凍結と精子凍結まで進んでいるが、まだ系統化するにいたっていない。今後の課題として残される。

### 4. $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスのシャペロン効果

培養系において、48種の変異遺伝子を検討した。16種類にシャペロン効果を認めた。モデルマウスの脳についてのマイクロアレイ解析は、シグナル伝達、細胞内輸送、細胞死、細胞増殖にかかわる遺伝子群の変動のあることを示した。そして48の異なった遺伝子の発現がNOEV投与により正常化した。この結果は、単一遺伝子欠損が細胞機能にかかわる多くの遺伝子発現に影響を与え、中枢神経系の機能障害の発生原因となっていることを示唆する。

新規化合物A (西村) は著しく強い $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性阻害効果を示した。そして熱に不安定な変異酵素の安定化作用があった。しかし、予備実験ではR201C変異培養細胞に対するシャペロン効果を認めなかった。

モデルマウスに対するシャペロン経口投与は投与方法、投与NOEV水溶液濃度を変えて検討した。これまでの投与濃度1 mM連日投与と3日ごとの間歇投与との効果比較を行ったが、間歇投与でははっきりした臨床効果を認めなかった。

低濃度NOEV水溶液の投与実験は現在進行中であるが、これまで行ってきた濃度(1 mM)よりも低濃度(0.3 mM, 0.1 mM)でも臨床効果があるという予備的な結果が得られた。現在少数例について長期の観察を継続中である。

昨年度まで、マウスの臨床神経学的検査は11項目の異なった手法の合計スコアとして評価してきたが、今年度、個別検査データを詳細に検討した。その結果、R201Cマウスに対するNOEV効果の評価には、必ずし

も意味のある変化を示す検査ばかりでないことが分かった。この疾患病型に最も鋭敏な検査は尾の病的姿勢であり、パラシュート、ふみ抜きなどの検査も有用であることが分かった。

中枢神経病変の進行は非可逆的と考えるべきである。したがって可能な限り早期診断・早期治療が求められる。今回、病初期の、未だ臨床所見ははっきりしていない生後2ヶ月のモデルマウスにNOEVを28週間投与し、生化学的にも脳内脂質( $G_{M1}$ 、 $G_{A1}$ )蓄積減少に有効であることを確認した。

NOEV投与前後のマウスに病理学的検査を行った。1 mM水溶液の6ヶ月間までの投与で、脳、腎臓、肝臓を含む全身臓器に特異的形態的变化を認めなかった。しかし10 mM投与では投与開始3-4ヶ月後に腎尿細管細胞の膨満、空胞化を認め、強い全身症状を示す死亡例があった。臨床化学分析では、疾患の有無を問わず、加齢とともにGOTの上昇傾向が見られた。しかし投薬との関係はなかった。

### 5. ゴーシェ病のシャペロン効果

二環系アザ糖の $\beta$ -グルコシダーゼに対するシャペロン効果は化合物の構造、遺伝子変異の種類により異なっていた。その中で、MTD47、RV21、MTD38、MG174は0.3 mMから30 mMの範囲で濃度依存的に有意なシャペロン効果を示した。

ゴーシェ病モデルマウスは未だ確立していないが、シャペロン毒性の予備的な試験を行った。生後8週の正常マウスに経口投与後、NOVがNOEV同様、脳を含む多くの臓器組織に到達することを確認した。この化合物は主に尿中に排泄されるが、短期間の投与実験では、大きな細胞毒性はないという結論が得られた。

### D. 考察

今年度の研究は変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼに標的を絞り、シャペロン効果を多面的に解析した。シャペロン分子に関する情報も広く知られるようになり、国内国外からいくつもの新しい化合物の提供を受けることができた。

これらの化合物の効果を変異遺伝子発現、生化学的分析、培養細胞の酵素活性発現、モデル動物個体の臨床評価などの側面から詳細に検討した。NOEV投与により蓄積脂質が減少し、細胞機能にかかわる多くの遺伝子の発現変動が矯正されることが分かった。そして多くの変異遺伝子についての分析により、シャペロン効果の変異スペクトルが明らかになった。

シャペロン効果の細胞内分子機構の詳細は明らか

にされていない。そこで分子動力学シミュレーションの技法を用い、シャペロンと酵素分子の反応動態を計算・予測し、中性環境に比べ、ライソゾームの酸性環境では結合が弱いことを明らかにした。この結果は、シャペロン・酵素複合体がライソゾームに到達して、自然解離することの理論的根拠となった。

疾患モデル動物における中枢神経障害の臨床評価法は未だ確立していないが、われわれが試みている新しい検査法の有効性を改めて確認した。ただし、疾患あるいは重症度を考慮し、11の検査項目の一部を選ぶことにより、検査結果をより明確に示すことが出来ると期待している。たとえば、軽症型G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスマウスのシャペロン治療効果は、11項目の検査スコアの合計値のみならず、より簡単な尾の検査のみでもある程度の評価が出来るはずである。他の神経遺伝病でも、早期診断に特に有効な他の検査項目が脳障害があるかもしれない。今後検討を進める予定である。

現在までに詳細な検討を進めているバリエナミン系シャペロン (NOEV, NOV) の中枢神経系への効果は十分に確認し、その投与方法、投与量を動物実験により検討する段階に来ている。これ以後、小動物、大動物の毒性実験を経てヒト臨床試験に向けての準備をする予定であるが、化合物の大量合成の技術的な問題があり、必ずしも予定通りに研究が進んでいない。

そこで新しいシャペロンの探索も同時に進めることにした。二環系アザ糖化合物は、ゴーシェ病細胞にNOVと同等のシャペロン効果を示した。未だ実験室合成の段階であるが、大量合成の可能性も視野に入れて、今年度、スペイン・日本共同の特許出願を行った。今後の実用化を期待している。

1-N-イミノ糖グループの中に、極めて強力なβ-ガラクトシダーゼ阻害剤が発見された。この阻害剤が変異酵素分子に結合し、安定化する効果のあることも確認した。ただし予備的な培養系実験では十分なシャペロン効果が得られなかった。現在マウスに対する経口投与により、腸管を経て血流から脳に移行するかどうか検討中である。この化合物はプロドラッグとしての構造を持ち、腸管吸収の際に分子構造の修飾が起こるのかもしれない。大量供給も可能である。

現在β-ガラクトシダーゼ欠損症に対するシャペロン実験に用いてきたモデルマウスの臨床経過は比較的長く、しかも病初期の脳障害の検出が必ずしも容易でない。そのためわれわれはシャペロン反応がよく、臨床経過が短い重症型のモデルマウス開発の努力を重ねてきた。ようやくR457Q変異を発現するマウスを作

成し、その個体特性を検討する段階に至った。このマウスをシャペロン治療実験に用いることが出来るようになると、よりよい実験効率を得られるであろう。

## E. 結論

分子・細胞・個体のレベルでシャペロン効果の多面的な解析を行った。新しいシャペロン、新しいモデル動物の開発とともに、シャペロン治療に伴う細胞内分子動態の詳細が明らかになった。

中枢神経系には血液脳関門が存在するため、神経遺伝病一般を対象とする治療実験はこれまで極めて困難であった。低分子化合物によるケミカルシャペロン療法は、この問題の解決に大きな意味を持つ。

本研究がシャペロン療法の概念を確立し、多くの遺伝病に適用されるようになることを期待する。対象疾患の拡大により、心身障害児・者への予防・治療的対応が可能になるであろう。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. *Cell Molec Life Sci* 10: 351-353, 2008.
2. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 616-622, 2008.
3. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A: β-Galactosidase deficiency (β-galactosidosis): G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis and Morquio B disease. Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SF, Ballabio A (eds): *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* <<http://www.ommbid.com/>>, McGraw-Hill, New York, Chap 151, pp1-101, 2008.
4. 鈴木義之:ケミカルシャペロン療法,有馬正高監修,加我牧子・稲垣真澄編集:小児神経学,pp512-514, 2008.
5. Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, Sinigerska I, Nanba E, Higaki K, Gucev F, Suzuki Y: Novel β-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type

IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Amer J Med Genet* 146A: 1736-1740, 2008.

6. Suzuki Y, Ogawa S, Sakakibara Y: Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: Competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. *Perspect Med Chem*, in press, 2009.
7. Ogawa S, Kanto M: Synthesis of bio-active compounds from cyclitol derivatives provided by bioconversion of *myo*-inositol. *Curr Trends Med Chem*, in press, 2009.

#### 学会発表

1. Suzuki Y: Genetic aspects of brain dysfunction in children. Beijing Children's Hospital Teaching Seminar, Beijing, China, May 21-22, 2008.
2. Suzuki Y: New therapeutic approaches to neurogenetic diseases in children. Beijing Children's Hospital Teaching Seminar, Beijing, China, May 21-22, 2008.
3. Suzuki Y, Nanba E, Higaki K, Sakakibara Y, Jo H, Yugi K, Ogawa S, Iida M: Chaperone effects on molecular pathology in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism: Annual Symposium 2008, Lisbon, Portugal, September 2-5, 2008.
4. 難波栄二、檜垣克美、足立香織、Li Lingjing、飯田真己、松田潤一郎、鈴木義之: ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法、第53回日本人類遺伝学会、横浜、2008.9.27-30.
5. Suzuki Y, Nanba E, Higaki K, Sakakibara Y, Ogawa S, Iida M: Chemical chaperone therapy: Magic bullet to the brain in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. 2nd World Congress on Magic Bullets, Commemorating the 100th Anniversary of Nobel Prize to Paul Ehrlich, Nürnberg, Germany, October 3-5, 2008.
6. Suzuki Y: Neurodegenerative disorders. International Child Neurology Association Symposium and Peking University International Forum on Child Neurology, Beijing, China, October 9-12, 2008.
7. Zhuo L, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y: The effect of *N*-octyl-β-valienamine on

β-glucocerebrosidase activity of the organs in normal mice. 第50回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.

8. 鈴木義之: ケミカルシャペロン療法 (モーニングセミナー). 第50回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.
9. 李 林静、檜垣克美、高村歩美、飯田真己、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスにおける神経細胞膜機能異常とTrkシグナルの亢進. 第50回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.
10. 檜垣克美、高村歩美、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジーの異常. 第50回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.
11. 池端宏記、檜垣克美、李 林静、飯田真己、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第50回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.
12. 檜垣克美、李林静、高村歩美、鈴木義之、難波栄二: G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスマウス神経変性とオートファジーの異常. 日本ライソゾーム病研究会、東京、2008.11.28-29.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 特許出願

- 名称: Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes (変異グリコシダーゼ活性を上昇させる化合物)
- 発明者: Jose Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, M. Isabel Garcia Moreno, Matilde Aguilar Moreno, 鈴木義之、大野耕策
- 番号: P0200802988
- 年月日: 2008年10月23日

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発：  
新規化合物二環系 SP2-アザ糖質のシャペロン活性

研究分担者：大野耕策 鳥取大学・医学部・教授

研究要旨

我々はこれまで N-octyl-β-valienamine (NOV) (Patent No. 02762961.7-2103-JP0208882：カルバ糖アミン誘導体および当該物質を有効成分として含有する糖脂質代謝異常症処置剤；発明者：小川誠一郎、鈴木義之、難波栄二、松田潤一郎、大野耕策) が、ゴーシェ病の原因である β-glucosidase の F213I 変異酵素の活性を上昇させることを見出し (Lin H et al, 2004)、N370S, G202R, N188S 変異の活性も上昇させることを報告してきた (Lei K et al, 2007)。今回、スペインの研究協力者が合成した新規化合物二環系 SP2-アザ糖質が、変異 β-glucosidase の活性を上昇させることを明らかにした。この化合物も低分子であり、脳内に移行し、中枢神経症状への治療効果が期待できる (Patent No. スペイン P200802988 Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes、発明者：Jose Manuel Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, Yoshiyuki Suzuki, Kousaku Ohno)。

A. 研究目的

ゴーシェ病は、リソソーム内の β-glucocerebrosidase (β-glu) の遺伝的欠陥のために、組織に glucosylceramide が蓄積することによって、肝臓、骨、神経系の障害を起す常染色体劣性遺伝病である。この疾患に対して、酵素補充療法が適応になり、肝腫大、骨病変に対して、有効性が確認されているが、中枢神経症状に対しての効果は明らかではない。

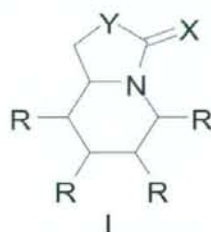
我々は、これまで、変異 β-glu に対する酵素活性増強効果) を持つ薬剤をスクリーニングし、グルコース類似体である N-octyl-β-valienamine (NOV) が F213I 変異 β-glu に対して優れた変異酵素を活性化させる作用を持つことを見出した (Lin H, et al., Biochem Biophys Acta 2004)。さらに、種々の変異を持つゴーシェ病患者由来皮膚繊維芽細胞およびヒト変異 β-glu を持つ cDNA を導入した COS 細胞での発現系を用いて N188S、F213I、N370S、G202R の各変異に対しては有効で、G193W、L444P、D409H に対しては無効であることを明らかにした (Lei K, et al., Biochem Biophys Acta 2007)。

今回スペインのセビリヤで合成された新規化合物二環系 SP2-アザ糖質が変異 β-glu に対してケミカルシャペロン効果を示すことを明らかにした。

B. 研究方法

1) 二環系 SP2-アザ糖質は、五単糖あるいは六単糖類似の構造が結合した擬似糖の構造を持つ。環内に存

在するアミドあるいは擬似アミドは N-C(=X)Y という構造式で表現される。X はヘテロ原子、Y は炭素またはヘテロ原子である。ヘテロ原子として窒素 (N)、酸素 (O)、硫黄 (S) に置換できる (下の図)。



Y が N である MTD47、MTD58、MG192、S である RV21、MTD38、O である MG174、PD166 をスペインから分与を受けた。

2) 正常ヒト線維芽細胞の細胞抽出液を用いて、各濃度の二環系 SP2-アザ糖質を用いて、β-glu の阻害活性を求めた。

3) ヒト正常線維芽細胞および種々の変異を持つゴーシェ病細胞を種々濃度の二環系 SP2-アザ糖質存在下で培養し、単層生存細胞で 4-methylumbelliferyl β-D-glucoside を基質に β-glu 活性を測定し、酵素活性の増強効果を調べた。

4) ヒト β-glu cDNA の 3' 側に Flag を標識し pCAGGS ベクターに組み込み、その後、Quick Change 部位特異的変異導入キットを用い、F213I、N188S、G202R、N370S、R359Q、T369M、G193W、L444P 変異を持つ



cDNAを作成した。

これらのリコンビナントをCOS細胞に導入し、24時間後、種々濃度の二環系SP2-アザ糖質存在下で培養し、抗Flag抗体で免疫沈降し、4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucosideを基質に $\beta$ -glu活性を測定した。

### C. 研究結果

#### 1) $\beta$ -glu に対する IC50

MTD47、MTD58、MG192、RV21、MTD38、MG174、PD166のIC50は4mM、5.2mM、1.77mM、3.5mM、7.1mM、5.6mM、80.8mMであった。

2) ゴーシェ病患者線維芽細胞での酵素活性増強効果  
ヒト線維芽細胞へ4日間それぞれの二環系SP2-アザ糖質を0-30mM投与した時の $\beta$ -glu活性を検討した。

MTD47、RV21、MTD38、MG174はF213/F213I変異、G202R/L444P変異、N188S/G193W変異、N370S/N370S変異、F213I/L444P変異を持つ細胞の $\beta$ -glu活性を0.3mMから30mMの範囲で濃度依存的に有意に酵素活性を上昇させた。一方、L444P/L444P変異、L444P/RecNcil変異、D409H/unknown変異の活性は上昇させなかった。

また、MTD58、MG194、PD166は有意に酵素活性を上昇させなかった。

3) COS細胞に導入したリコンビナント変異酵素たんぱく質の二環系SP2-アザ糖質による活性上昇

F213I、G202R、N188S、N370S、R539Q、T369M変異はMTD47、RV21、MTD38、MG174で活性の上昇がみられた。G193W、L444P変異ではいずれの二環系SP2-アザ糖質でも活性の上昇は認められなかった。

### D. 結論

二環系SP2-アザ糖質の中で、MTD47、RV21、MTD38、MG174はF213I、G202R、N188S、N370S、R539Q、T369M変異に対して、ケミカルシャペロンとして働き、変異酵素活性を上昇させることを明らかにした。

### E. 研究発表

#### 論文発表

1. Hayashi Y, Zama K, Abe E, Okino N, Inoue T, Ohno K, Ito M: A sensitive and reproducible fluorescent- based

HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral beta-glucocerebrosidases. Anal Biochem. 2008 Jul 30. [Epub ahead of print]

2. Takano K, Shimono M, Shiota N, Kato A, Tomioka S, Oka A, Ohno K, Sathou H. Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: The first reported case in Japan diagnosed by palmitoyl-protein thioesterase enzyme activity deficiency. Brain Dev 30: 370-373, 2008.
3. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. Biochem Biophys Res Commun. 367:616-22, 2008.
4. Luan Z, Saito Y, Miyata H, Ohama E, Ninomiya H, Ohno K: Brainstem neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. J Neurol Sci. 268: 108-116, 2008.

#### 学会発表

1. Zhuo L, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The effect of N-octyl- $\beta$ -valienamine on  $\beta$ -glucocerebrosidase activity of the organs in normal mice. 第50回日本先天代謝異常学会、第7回アジア先天代謝異常症シンポジウム。米子市、2008.11.6-8.
2. Zhuo L, Ninomiya H, Ohno K, Mellet K, Fernandez J, Suzuki Y. Chaperone activity of bicyclic SP2-azasugars for Gaucher mutations. 10th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology. June 10-13, 2009, Daegu, Korea (発表予定)

### F. 知的財産権の出願・登録状況

#### 特許出願

Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes (変異グリコシダーゼ活性を上昇させる化合物)、発明者: Jose Manuel Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, Yoshiyuki Suzuki, Kousaku Ohno、スペイン P200802988

ライソゾーム病モデル動物の作製と病態解析

研究分担者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

研究要旨

ケミカルシャペロン療法の治療実験モデル動物として、遺伝子改変によりライソゾーム病モデルマウスの作出を行い、(1) ゴーシェ病モデルマウスとしてヒト変異型 $\beta$ -グルコシダーゼF213I 遺伝子導入マウスおよびヒト野生型 $\beta$ -グルコシダーゼ Tgマウスの作製と系統化を行い、凍結胚・精子の保存を行った。(2) 新規のG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスモデルマウスとしてヒト変異型 $\beta$ -ガラクトシダーゼR457Q 遺伝子導入マウス2ラインを作製し、変異酵素の発現を確認し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼノックアウトマウスへの導入を行った。

A. 研究目的

ライソゾームは酸性で作用する加水分解酵素を多数含んでおり、高分子化合物を低分子物質に順次分解するが、これらの酵素に異常が起きると基質が蓄積し、多様な病態を示し、多くのライソゾーム酵素欠損症として知られている。発症時期や重症度はさまざまであるが、典型的には乳幼児期に発症し、多くは重症の中樞神経症状を伴い、有効な治療法がない。

最近、ケミカルシャペロン療法が開発され、経口治療薬が変異酵素分子を安定化し活性を高めることが示され、中樞神経系をもターゲットとした治療法として注目されている。本研究では、ケミカルシャペロン療法のin vivo治療実験モデルとして、ヒト患者の変異酵素遺伝子を導入するなどによって、ゴーシェ病およびG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスのモデルマウスの作製を目指した。本年度は引き続きゴーシェ病モデルマウスの系統化と保存および新規G<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスモデルマウスの作出のためTgマウスの発現解析を行うとともに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼKOマウスとの交配を開始した。

B. 研究方法

1) ゴーシェ病モデルマウス

ヒト変異型 $\beta$ -グルコシダーゼF213I Tgマウスとヒ

ト野生型 $\beta$ -グルコシダーゼ Tgマウスをこれまでに作製し、系統化を進めるとともに、系統保存のため、体外受精による胚の作出とEFS40保存液を用いた胚凍結及びR18S3保存液を用いた精子凍結を行い、液体窒素中への保存を行った。

2) G<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスモデルマウス

昨年度までに作製したヒト変異型 $\beta$ -ガラクトシダーゼR457Q Tgマウス(C57BL/6Jの遺伝的背景を持つ) 4ラインについて、C57BL/6Jマウスとの交配により引き続き系統化を進めた。発現検索として、RT-PCRによる導入遺伝子の発現を脳、肝臓、腎臓、尾について検討し、さらに $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を人工基質4-methylumbelliferyl $\beta$ -D-galactosideを用いて測定した。遺伝子発現の認められた2ラインについて、 $\beta$ -ガラクトシダーゼKOマウスとの交配により、 $\beta$ -ガラクトシダーゼKOマウスへのヒト変異遺伝子の導入を開始した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

1) ゴーシェ病モデルマウス

ヒト変異型 $\beta$ -グルコシダーゼF213I Tgマウス1ラインとヒト野生型 $\beta$ -グルコシダーゼ Tgマウス1ライ

ンについて、次世代へのトランスジーン伝達を確認することで系統化を行い、鳥取大学に提供するとともに、安全のため、凍結胚と凍結精子の作製を行った。

#### 2) G<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスモデルマウス

ヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q Tgマウス4ラインについて、トランスジーンの子孫への伝達をPCRにより確認し、系統化を行うことが出来た。この4ラインにおいて尾の組織を用いてRT-PCRによる導入遺伝子の発現を検索したところ、2ライン(#2, #3)が陽性であった。

この2ラインについて脳、肝臓、腎臓の遺伝子発現解析を行ったところ、2ラインとも3組織で全て発現が確認された。さらにこの2ラインの脳、肝臓、腎臓におけるβ-ガラクトシダーゼ活性(内在性のマウスβ-ガラクトシダーゼ活性とヒト変異型β-ガラクトシダーゼ活性の総和と考えられる)は、対照のC57BL/6マウス(non-Tgマウス)と比較して、#2マウスでは、脳9.8%、肝臓13.5%、腎臓15.9%の増大がみられ、#3マウスでは、脳10.9%、肝臓17.1%、腎臓43.5%の増大がみられた。この2ライン(#2, #3)について、β-ガラクトシダーゼKOマウスとの交配が進み、内在性のマウスβ-ガラクトシダーゼを発現せずにヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q遺伝子のみを発現するヒト型モデルマウスが作製される予定である。

#### D. 考察

ゴーシェ病モデルマウスについては、ヒト変異型β-グルコシダーゼF213Iを導入したTgマウスとヒト野生型β-グルコシダーゼ Tgマウスの作製と系統化を行い、安全のため凍結胚と凍結精子を保存した。ヒト変異型β-グルコシダーゼF213I Tgをβ-ガラクトシダーゼノックアウトマウスに導入することで、残存酵素活性をもち新たなシャペロン療法開発のためのモデルとなることが期待される。

新規のG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスモデルマウスを作製する目的でヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Qを発現するTgマウスが2ライン作製された。内在性のマウスβ-ガラクトシダーゼ活性と比べ脳の酵素活性が約10%増大していることが判明し、これはヒト変異酵素の活性を反映していると考えられた。今

後ノックアウトマウスとの交配により、ヒト変異酵素のみを発現するマウスが得られ、変異β-ガラクトシダーゼR457Qを標的としたケミカルシャペロン療法開発のための良いモデル動物となることが期待される。

#### E. 結論

ケミカルシャペロン療法の治療実験モデル動物として、遺伝子改変によりライソゾーム病モデルマウスの作出を行い、(1) ゴーシェ病モデルマウスとしてヒト変異型β-グルコシダーゼF213I遺伝子導入マウスおよびヒト野生型β-グルコシダーゼ Tgマウスの作製と系統化を行い、凍結胚・精子の保存を行った。(2) 新規のG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスモデルマウスとしてヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q遺伝子導入マウス2ラインを作製し、変異酵素の発現を確認し、β-ガラクトシダーゼノックアウトマウスへの導入を行った。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A. β-Galactosidase Deficiency (β-Galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. In The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. eds. Valle D et al. Part 16: LYSOSOMAL DISORDERS Chapter 151 pp.1-101. Revised-July 2008. McGraw-Hill, 2008. <http://www.ommbid.com/>
2. Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. Brain Dev in press.

##### 学会発表

1. 池端宏樹、檜垣克美、李林静、飯田真己、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二：β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法、第59回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.
2. 李林静、檜垣克美、高村歩美、飯田真己、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二：G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスにおける神経細胞膜機能異常と Trk シグナ

ルの亢進、第 59 回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.

3. 檜垣克美、高村歩美、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二：G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジーの異常、第 59 回日本先天代謝異常学会、米子、2008.11.6-8.
4. 難波栄二、檜垣克美、足立香織、Li Lingjing、飯

田真巳、松田潤一郎、鈴木義之：ヒト  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法、第 53 回日本人類遺伝学会、横浜、2008.9.27-30.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)  
分担研究報告書

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究

研究分担者： 難波 栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター教授

研究要旨

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者遺伝子変異解析を行い、変異型とケミカルシャペロンNOEV (N-octyl-4-epi- $\beta$ -valienamine) 効果の相関を検討した。マイクロアレイ解析により、NOEVにより発現変動する遺伝子群の検索を行った。新規シャペロン候補化合物について、予備的に試験管内酵素阻害活性とシャペロン活性を既存シャペロン化合物と比較検討した。

A. 研究目的

遺伝子変異型とケミカルシャペロン効果の相関について、およびシャペロン効果の分子機構の解明についてケミカルシャペロン療法の臨床応用に向けた基礎的な研究を行った。

B. 研究方法

1.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とNOEV効果の検討

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者由来培養皮膚線維芽細胞からゲノムDNAを抽出し、全エクソンのシーケンシング解析により変異解析を行った。培養皮膚線維芽細胞を0.2、2  $\mu$ M のNOEVを含む培地で4日間培養後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を4-MU人工基質を用い測定し、シャペロン効果の判定を行った。ヒト正常 $\beta$ -ガラクトシダーゼ cDNA発現ベクターを鋳型として、PCR site-directed mutagenesis法により48種類のミスセンス変異を導入した変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼ cDNA発現ベクターを作製した。正常および、変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼ cDNA発現ベクターをリポフェクション法により $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損ノックアウトマウス由来線維芽細胞株に一過性に発現後、0.2または2  $\mu$ MのNOEVを含む培地で2日間培養後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。

2. モデルマウス脳組織を用いたマイクロアレイ解析  
3ヶ月齢正常およびヒトR201C変異発現 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス (R201Cマウス) にそれぞ

れ1 mM NOEVを2週間飲水投与後の脳組織よりtotal RNAを抽出した。マイクロアレイ発現解析はイルミナ社Sentrix Mouse-6 expression BeadChipを用い、解析はモリテックス受託解析で行った。発現結果はGeneSpringソフトウェアにより解析した。

3. 新規ケミカルシャペロン候補化合物の試験管内阻害活性とシャペロン効果

新規ケミカルシャペロン候補化合物 (4種類の低分子化合物は化合物A, B, C, Dと称す) は研究協力者・西村吉雄氏から供給を受けた。化合物A, Bは $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素、化合物C, Dは $\beta$ -ガラクトサミニダーゼに対するケミカルシャペロン候補化合物で、ヒト、マウス線維芽細胞を用い、試験管内酵素阻害活性とシャペロン活性について既存ケミカルシャペロン (NOEV, ピリメサミン) と比較検討した。

C. 研究結果

乳児型G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者2名の遺伝子変異解析を行い、G190D/G190D変異とH281Y/?変異を同定した。また、培養皮膚線維芽細胞では、ともにNOEV効果の有意なケミカルシャペロン効果を認めた。発現実験系を用い48種類の遺伝子変異型に対するNOEVの酵素活性還元効果を調べた結果、16種類の変異において0.2または2  $\mu$ MのNOEVによる有意なケミカルシャペロン効果を認め、3種類 (L173P, G190D, R590C) では0.2、2  $\mu$ M共に効

果を認めた。

神経症状発症前3ヶ月齢のGM1-ガングリオシドーシスモデルマウス脳組織を用いたマイクロアレイ解析を行い、シグナル伝達、細胞内輸送、細胞死、細胞増殖などに関わる遺伝子群を同定した。また、昨年度神経発症後の10ヶ月齢マウス脳マイクロアレイ解析結果との比較で、3ヶ月と10ヶ月齢に共通してNOEVにより発現変動が正常化した遺伝子群(48遺伝子)を同定した。

ヒト正常β-ガラクトシダーゼ試験内酵素阻害活性について、化合物AはNOEVの約10倍強い活性を認めたが、化合物Bでは認めなかった。ヒト正常β-ヘキサミニダーゼ試験内酵素阻害活性では化合物Cはピリメサミンと同等の、化合物Dはピリメサミンより弱い阻害活性を認めた。しかし、化合物AのR201C変異β-ガラクトシダーゼに対するケミカルシャペロン効果は認めなかった。一方、酵素熱不安定性に対し、化合物A、化合物Cは安定化作用を示した。

#### D. 考察

マウス細胞発現系を用いたNOEV効果と変異型の相関性について、昨年度まで結果を合わせると88変異のうち24変異(27%)で有意なNOEVの効果を確認した。また、NOEVが有効な変異型をもつ患者の割合は38.5%(16/39)であった。

マイクロアレイ解析の結果、マウス週齢に伴い疾患マウス脳で発現が変動する遺伝子群を同定し、そのうちNOEVにより発現が正常化する遺伝子群を同定した。今後はこの遺伝子群の機能パスウェイを解析することにより、マウス脳病態に対するNOEV効果の分子機構を明らかにして行く。

化合物AはNOEVより強い試験管内阻害活性を持ち、試験管内熱不安定性に対する安定化作用を示したが、シャペロン効果は認めなかった。今後、細胞内化合物濃度の測定などにより、化合物の細胞内動態を明らかにする必要がある。

#### E. 結論

遺伝子変異型とNOEV効果の相関を明らかにした。マイクロアレイ解析でNOEVにより発現が変動する遺伝子群を同定した。新規ケミカルシャペロン候補化合物について、予備的な検討を行った。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Matsumoto N, Gondo K, Kukita J, Higaki K, Paragison RC, Nanba E: A case of galactosialidosis with a homozygous Q49R point mutation. *Brain Dev* 30: 595-598, 2008.
2. Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, Sinigerska I, Nanba E, Higaki K, Gucev F, Suzuki Y: Novel beta-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Am J Med Genet A* 146A: 1736-1740, 2008.
3. Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda M, Yamano T: Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev* Dec 31 [Epub ahead of print] 2008.

##### 学会発表

1. 難波栄二、檜垣克美: GM1-ガングリオシドーシスとオートファジー機能異常. 第50回日本小児神経学総会、東京、2008.5.
2. 難波栄二、檜垣克美、足立香織、李林静、飯田真巳、松田潤一郎、鈴木義之: ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第53回日本人類遺伝学会、横浜、2008.9.
3. 難波栄二: ライソゾーム病の中枢神経症状の治療. 第50回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008.11.
4. 李林静、檜垣克美、高村歩美、飯田真巳、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: GM1-ガングリオシドーシスにおける神経細胞膜機能異常とTrkシグナルの亢進. 第50回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008.11.
5. 檜垣克美、高村歩美、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジーの異常. 第50回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008.11.
6. 池端宏記、檜垣克美、李林静、飯田真巳、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第50回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008.11.
7. 檜垣克美、李林静、高村歩美、鈴木義之、難波栄二: ライソゾーム病神経変性とオートファジ

一の異常. 第13回日本ライソゾーム病研究会、東京、2008. 11.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

酵素分子の計算的構造解析

- 分子動力学シミュレーションを用いたケミカルシャペロン療法の作用機序の検証 -

研究分担者 榊原康文 慶應義塾大学 教授

研究要旨

本研究では、酵素及び阻害剤のプロトネーション状態を変えることで異なるpH条件を実現した分子動力学シミュレーションを行い、結合自由エネルギー計算によりケミカルシャペロン療法の作用機序を検証した。また、シミュレーション結果を詳細に解析し、pHによる結合強度の変化の要因を探った。β-グルコシダーゼとそのケミカルシャペロンN-octyl-β-valienamine (NOV)を用いた実験では、pH5条件の方がpH7条件より結合強度が弱くなることが示され、仮説を裏付けるものとなった。これはβ-グルコシダーゼの至適pHは5.6であり、本来の基質であるグルコセラミドに対してはpH5条件で結合強度が強くなるであろうこととは逆の結果である。シミュレーション中の酵素とケミカルシャペロンの水素結合を観察したところ、pH7条件では127ASPとの2つの水素結合がほとんどの時間で確認できるのに対して、pH5条件では同水素結合が1つであり、しかも頻度も比較的低かった。この水素結合はβ-グルコシダーゼ、NOVのプロトネーションを変化させた原子を直接は含んでいない。さらに両状態でNOVの配座を比べてみると、NOVの窒素原子を挟んだねじれ角が異なっており、それにより結合配座が変化していた。この結合配座の差は、127ASPとNOVの水素結合がpH7条件でできやすく、pH5条件でできにくいような差であった。つまりプロトネーション状態の変化によりNOVの結合配座が変化し、結合強度の差につながったと考えられる。

A. 研究目的

ケミカルシャペロン療法はリソソーム病に対する新規治療法である。リソソーム病はリソソーム酵素の欠損により代謝されるべき不要物が細胞内に蓄積することで発症する。リソソーム酵素の欠損の原因としては、遺伝子の欠失、組換えのほか複数のリソソーム病で多数の一残基変異が同定されている。この一残基変異体の多くは酵素としての活性を完全に失ってはいないが、中性条件では不安定なためリソソームに輸送される前に分解されてしまう。近年、ある種の阻害剤を与えると変異酵素と結合し、その構造を安定化させ、結果としてリソソームへの輸送までを助ける働きが確認された。シャペロンタンパク質のような働きを持つこの阻害剤をケミカルシャペロンと呼ぶ。一度リソソームに輸送され、酸性条件下におかれると変異酵素はもはや不安定ではなく、その残存活性を発揮する。このとき、阻害剤が存在するにも関わらず酵素が活性を発揮できる理由として、pHの変化により酵素と阻害剤の親和性が弱くなるためという仮説がある。本研究では、酵素及び阻害剤のプロトネーション状態を変え

ることで異なるpH条件を実現して分子動力学シミュレーションを行い、結合自由エネルギー計算により上記仮説を検証した。また、シミュレーション結果を詳細に解析し、pHによる結合強度の変化の要因を探った。

B. 研究方法

対象はヒトβ-グルコシダーゼ(B-Glu)とヒトβ-ガラクトシダーゼ(B-Gal)を用いた。B-GluのケミカルシャペロンはN-octyl-β-valienamine (NOV)、コントロールとしてケミカルシャペロンではない阻害剤N,N-octyl-β-valienamineの派生物N,N-butyl-β-valienamine (NNBV)を用いた。B-GalのケミカルシャペロンとしてはN-octyl-4-epi-β-valienamine (NOEV)を採用した。B-Gluの立体構造はPDBより取得し、B-Galの構造は予測プログラムにより予測した。化合物の構造はChemOfficeを用いて化学構造式より生成した。次に、既知複合体構造を参照にするかまたはAutoDockを使用して酵素と阻害剤をドッキングし、複合体を生成した。さらに、PROPKAを使用して酵素の



イオン性残基の $pK_a$ 予測を行い、pH7とpH5のpH条件を実現するためにプロトネーション状態の違う複合体を用意した。これらの複合体をNPT条件下で3nsの分子動力学シミュレーションを実行した。最後にMMPBSA法による結合自由エネルギー計算と挙動の解析を行った。

### C. 研究結果と考察

B-GluとNOVを用いた実験では、全129イオン性残基とNOVに対して、そのプロトネーション状態は、pH7では69残基とNOVが水素付加状態、60残基が水素放出状態、pH5では79残基とNOVが水素付加、50残基が水素放出状態と予測された。ここで、プロトドナーであるGLU235が水素放出状態、求核基であるGLU340が水素付加状態と予測された。B-Gluが活性を持つ状態はGLU235が水素付加状態、GLU340が水素放出状態にあると考えられるため、この状態をpH5(active)条件として実験することとした。次に、シミュレーションを行い、結合自由エネルギーを計算した(表1)。NOVは低pH条件でpH7より結合強度が低下することが確認された。一方、NNBVは低pHで結合強度が下がることは確認されなかった。よってケミカルシャペロンであるためには低pH条件での結合強度の低下が必要であることが示唆され、作用機序仮説が裏付けられた。

表1 結合自由エネルギー計算結果

pH condition	Ligand	$\Delta G$ (kcal/mol)
pH7	NOV	46.26
pH5	NOV	14.46
pH5 (active)	NOV	9.62
pH7	NNBV	15.72
pH5	NNBV	14.46
pH5 (active)	NNBV	23.79

次に、この結合強度変化の要因を探る解析を行った。その結果、pHによるNOVの配座の変化と酵素との水素結合の変化が観察された。配座は、pH7においてNOVが活性ポケットにより深く入るように変化していることが確認され(図1)、これはpH7で結合が強いことと矛盾しない。

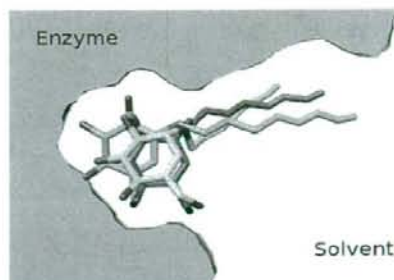


図1 平均構造の重ね合わせ。Cyan: pH7, Magenta: pH5, Yellow: pH5(active)

また、水素結合に着目するとNOVと酵素のASP127およびGLU235との水素結合がpHによって異なっていた。これらの水素結合の変化と結合強度の間には因果関係があることは確かであるが、本研究ではそれを見出すまでには至らなかった。さらに、これらの結果が実際にNOVの効果が確認されている変異型B-Gluにも当てはまるかを調べるため、NOVの効果が最も高いF213I変異型B-Gluを用いてpHによるNOVの結合強度の変化を調べた。その結果、野生型B-Gluと同様にpH5で結合強度の低下が確認された(表2)。これより、本研究の解析手法が野生型B-Gluに対してだけでなく、NOVの効果が確認されている変異型B-Gluにも適用できること、そして変異型B-Gluに対するNOVのケミカルシャペロン作用機序を示すことができた。

同様のメカニズムが他のリソソーム酵素にも存在するかを検討するべく、B-GalとNOEVを用いた実験を行った。しかし、分子動力学シミュレーションにおいて構造が平衡に達せず、それ以降の解析を行うことができなかった。構造が平衡に達しなかった原因は、ヒトB-Galの立体構造は未決定のため、代わりに用いた予測構造の精度が十分でなかったことだと考えられる。

表2 F213I-B-GluとNOVの $\Delta G$

pH condition	$\Delta G$ (kcal/mol)
pH7	38.44
pH5	17.26
pH5 (active)	12.14

表2 pH5における結合自由エネルギー予測結果

### D. 結論

B-GluとNOVを用いて、低pHでは阻害剤の結合強度が弱まるというケミカルシャペロンの仮説を計算機実験により裏付けた。また、シミュレーション結果を解析し、pHによる結合強度の変化をもたらす要因を

考察した。

今後は対象酵素を変えて同様の実験を行い，本研究で支持された結合強度変化メカニズムがより広範囲に当てはまることを示す必要がある。また，変異体やNOV以外のケミカルシャペロンを用いて同様の実験を行い，さらに実験的知見との整合性を説明付けたい。これが実現すれば，ケミカルシャペロンの改良酵素の一残基変異体と効果のあるケミカルシャペロンの予測やより効果的なケミカルシャペロンのデザインなどにつながると考えられる。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Sasaki K, Nagamine N, Sakakibara Y: Support vector machine prediction of N- and O-glycosylation sites using whole sequence information and subcellular localization, IPSJ Transactions on Bioinformatics, in press, 2009.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A.	$\beta$ -Galactosidase Deficiency ( $\beta$ -Galactosidosis): G <sub>M1</sub> -Gangliosidosis and Morquio B Disease.	Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SF, Ballabio A.	In The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. Chapter 151	McGraw- Hill	New York	2008	1-101 <a href="http://www.ommbid.com/">http://www.o mmbid.com/</a>
鈴木義之	ケミカルシャペロン 療法.	有馬正高監 修、加我牧 子・稲垣真 澄編集	小児神経学	診断と 治療社	東京	2008	512-514

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki Y.	Chemical chaperone therapy for G <sub>M1</sub> -gangliosidosis.	Cell Molec Life Sci	10	351-353	2008
Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E.	Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G <sub>M1</sub> -gangliosidosis.	Biochem Biophys Res Commun	367	616-622	2008
Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafrovski G, Kremensky I, Sinergiska I, Nanba E, Higaki K, Suzuki Y.	Novel $\beta$ -galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vivo chaperone treatment of her skin fibroblasts.	Am J Med Genet	146A	1736-1740	2008
Hayashi Y, Zama K, Abe E, Okino N, Inoue T, Ohno K, Ito M.	A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral beta-glucocerebrosidases.	Anal Biochem	383	122-129	2008

Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T.	Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis.	Brain Dev			Dec 30, [Epub ahead of print] 2008
Suzuki Y, Ogawa S, Sakakibara Y.	Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: Competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities.	Perspect Med Chem		in press	2009
Sasaki K, Nagamine N, Sakakibara Y.	Support vector machine prediction of N- and O-glycosylation sites using whole sequence information and subcellular localization.	IPSIJ Transactions on Bioinformatics	50	in press	2009
Ogawa S, Kanto M.	Synthesis of bio-active compounds from cyclitol derivatives provided by bioconversion of <i>myo</i> -inositol.	Curr Trends Med Chem		in press	2009