論文の内容の要旨

論文題目

Pharmacological chaperone 作用を応用した新規 NPC1L1 阻害剤の創製

氏名　唐木 文霞

研究背景および目的 (序章および第 1 章)

タンパク質とリガンド(標的タンパク質に特異的に結合する小分子化合物)の結合評価は, 精製タンパク質と標識されたリガンドを用いて行われることが多い. しかし, 細胞の膜成分に埋め込まれた膜(貫通)タンパク質では, 生理的な三次元構造を維持して精製することが困難であり, 結合を指標としたリガンドの探索は難しい. それに対し本研究では, pharmacological chaperone (PC)作用による変異体タンパク質の局在変化を結合に相当する指標として用い, 精製タンパク質を必要としない細胞レベルでのリガンドスクリーニングを試みた.

PC 作用とは, リガンドが変異体タンパク質におよぼす局在修正作用のことである. 膜タンパク質は合成の過程で小胞体を経由し, ここで適切な三次元構造をとったものだけが, 目的地へ輸送される. フォールディングに失敗し, 適切な構造に至らなかったタンパク質は, 目的地へ輸送されず小胞体に滞留し, やがて分解される. フォールディングの効率は変異により低下し得るが, この場合にはタンパク質が目的地へ輸送されず, 機能が欠失するため, 遺伝性疾患の要因となることがある. リガンドには標的タンパク質を安定化する作用があり, フォールディング効率の低下した変異体に結合することで PC 作用を発現し, 局在異常を修正し, 機能を回復させることができる. そのため, 従来の PC 作用に関する研究は, 遺伝性疾患の治療を指向して行われてきた.

当研究室でも, Niemann-Pick 病 C 型の原因となる変異 NPC1 に対して, PC として作用するステロール誘導体を創製している. ステロールが NPC1 に結合することは過去に示されていたが, 我々はこの研究の過程で, **1.** PC 作用の発現に重要な結合部位が, 既知のステロール結合部位とは異なること **2.** この“第二のステロール結合部位”に結合するリガンドが, NPC1 阻害剤となり得ること の 2 点の知見を得ている.

本研究の対象としたNPC1L1は, NPC1とホモログの関係にある (42% identity, 51% similarity). NPC1L1は, 小腸および肝臓の頂端膜上に発現する13回膜貫通型の膜タンパク質であり(**Fig.1**), 消化管からのコレステロール吸収を担う. このような機能を有することから, NPC1L1は脂質異常症治療薬の標的として注目されており, 既にezetimibeという阻害剤が臨床応用されている. 研究開始時点でNPC1L1との結合が示されていたのは, ステロール類とezetimibeならびにezetimibeとの競合により見出された化合物群の2種類のみであった. しかし筆者は, NPC1に関する知見を基に, **1.** NPC1L1にも, NPC1の"第二のステロール結合部位"に対応する結合部位が存在する **2.** この部位へのリガンドの結合は, 変異NPC1L1に対するPC作用を利用することで検出できる **3.** "第二のステロール結合部位"に結合するリガンドは, NPC1L1の機能を阻害する という仮説を構築した. そこで, PC作用による局在変化を指標としたリガンドスクリーニングが可能であることを示し, この手法により新規NPC1L1阻害剤を創製することを本研究の目的とした. なお, この方法はezetimibeとの競合によらないものなので, ezetimibeとは異なる部位に結合する阻害剤が得られる可能性がある.

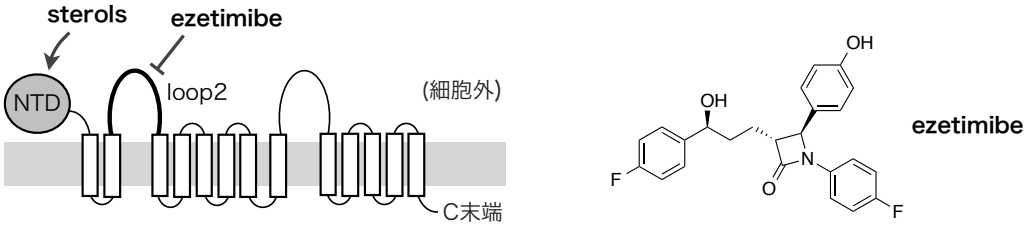

Fig. 1 (左) NPC1L1の模式図とステロールおよびezetimibeの結合部位. (右) ezetimibeの構造式.

スクリーニング系の構築とステロール誘導体に関する構造活性相関 (第2章)

PC作用による局在変化を利用して, NPC1L1に対するリガンドを探索するためには, 適度にフォールディング効率が低下したNPC1L1変異体が必要であった. ここでの"適度"とは, 小胞体局在を示し, かつ化合物による局在修正が見られる程度であることを意味する. 局在異常を示す変異体であっても, フォールディングの効率の低下が軽微なものについては, 低温で培養することにより局在が修正されることが知られている. したがって, 小胞体に局在し, かつ低温培養による局在修正が見られる変異体であれば, リガンドスクリーニングに利用できると考え, 変異体の探索を行った. 各種NPC1L1変異体をHEK細胞に発現させ, 通常の温度(37 ℃)および低温(27 ℃)培養後にNPC1L1の局在を調べることで, 上述の条件を満たす変異体としてL1072T/L1168I(Leu→Thr, Ile)の二重変異体を見出すことに成功した.

NPC1L1自身はコレステロールトランスポーターであり, ホモログのNPC1の"第二のステロール結合部位"にはステロール誘導体が結合する. このことから, ステロール誘導体が変異NPC1L1に対するPCとなる可能性があると考え, オキシステロール類がNPC1L1変異体の局在異常を修正するか検討した. スクリーニングの結果, 25-hydroxycholesterol (25HC)に, このような局在修正作用が認められた (**Fig. 2**). これを基に詳細な構造活性相関研究を行い, ステロールの17位側鎖部分が活性の発現に重要であること, および25HCの末端ジメチルに対応する位置に2つのメチル基を有するアミド体OG828が, 25HCよりも高活性であることを明らかにした. このOG828の3位水酸基部分を構造展開することで, さらに高活性な誘導体FK085を得ることに成功した.

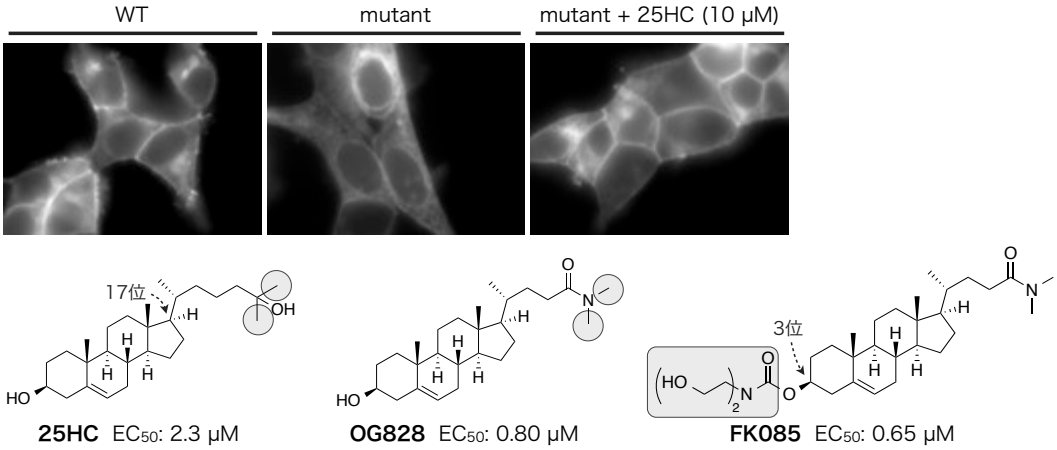

Fig. 2 (上) NPC1L1-GFPを発現させた細胞の蛍光顕微鏡画像. 変異体の局在異常は25HC処理により修正される. (下) ステロール誘導体の構造式.

新規 NPC1L1 リガンドの結合部位に関する知見 (第 3 章)

NPC1L1 のステロール結合部位は, N 末端ドメイン (NTD)であることが報告されていた. しかし, ホモログの NPC1 に対する PC 作用が, NTD とは異なる部位への結合を介していることから, NPC1L1 に関しても PC 作用の発現に NTD が必要であるか検討した. NTD を欠失させた変異体 ΔNTD-NPC1L1$^{L1072T/L1168I}$ を FK085 で処理したところ, 局在の修正が見られた. この結果から, NPC1L1 変異体に対する PC 作用は, NTD とは異なる“第二のステロール結合部位”に対する結合を介することが示唆される.

次に, 既知の NPC1L1 阻害剤である ezetimibe の結合部位と, 上述した“第二のステロール結合部位”が同一であるか検討した. ezetimibe が NPC1L1 変異体に対する PC となるのか, および ezetimibe がステロール誘導体による PC 作用と競合するかを調べた結果, ezetimibe 処理による局在修正は見られず, FK085 による PC 作用との競合も認められなかった. このことから, “第二のステロール結合部位”は, ezetimibe の結合部位とは異なる可能性が高いと考えられる.

新規 NPC1L1 リガンドのコレステロール吸収阻害作用 (第 4 章)

次に, 以上で創製した新規 NPC1L1 リガンドが有するコレステロール吸収阻害作用を東京大学医学部付属病院薬剤部の高田龍平講師ならびに山梨義英助教に評価していただいた. その結果, Caco-2 細胞およびマウスのコレステロール吸収が, FK085 処理により有意に抑制されることが明らかになった. NPC1L1 に対する特異性など, 今後さらなる検討が必要ではあるが, この結果から FK085 が作業仮説通りに NPC1L1 によるコレステロール輸送を阻害する可能性があると言える.

非ステロイド性 NPC1L1 リガンドの探索 (第 5 章)

以上ではステロイド骨格を有する NPC1L1 リガンドの創製について述べてきた. しかし, ステロイドを認識するタンパク質は生体内に数多く存在するため, 選択性の欠如や代謝不安定性が懸念される. そこで, 非ステロイド性 NPC1L1 リガンドの探索に着手した. LXR (Liver X receptor)は NPC1L1 と同様に, オキシステロール類を認識するタンパク質のひとつである. したがって, LXR リガンドおよびその類縁体の中に, NPC1L1 のリガンドとなる化合物が存在し得ると考え, PC 作用によるスクリーニングを行った. その結果, フェナンスリジノン骨格を有する化合物 OG1130 に, NPC1L1 変異体に対する局在修正作用が認められた (Fig. 3). しかし, フェナンスリジノン骨格を有する一連の化合物は, おそらく高い平面性のために溶解性に乏しく, その後の構造展開が困難であった. そこで, 平面性を低下させるための構造展開を行い,

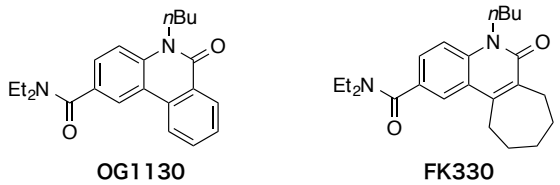

Fig. 3 OG1130およびFK330の構造式.

ベンゾシクロヘプタキノリノン骨格を有する化合物 FK330 を見出すことに成功した (**Fig. 3**). 現在, FK330 をリードとした構造展開を行っており, 今後は LXR に対する作用との分離についても検討する予定である.

結論

本研究では, 変異体の局在変化を結合に相当する指標として用いた新しい手法により, 膜タンパク質 NPC1L1 に対するリガンドの創製に成功した. この手法で必要とされるのは, 適切な変異体だけであることから, 機能が未知のタンパク質にも応用できると考えられる. また, 本研究のように未知の結合部位に対するリガンドを発見できる可能性もある. 以上より, 本研究で用いた手法により, 膜タンパク質を標的とした今後の創薬がさらに発展するものと信じている.

本研究ではまた, 従来知られていたリガンドとは異なる部位に結合する, 新規 NPC1L1 阻害剤の創製に成功した. この阻害剤を臨床応用できれば, 脂質異常症の治療の選択肢が広がるだけでなく, ezetimibe との併用による相乗効果が現れることも期待できる. また, NPC1L1 によるコレステロール吸収の機構は詳細には解明されていないが, 何らかの機能的意義を有する“第二のステロール結合部位”が存在する可能性を示せたことで, この研究分野に一石を投じられたものと考える.