

2024年6月3日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学
国立大学法人東京農工大学
国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

**タンパク質の品質管理を担う酵素を
高活性化する低分子を開発**
アルツハイマー病、Ⅱ型糖尿病などに対峙する新しい創薬戦略

【発表のポイント】

- 生体内でタンパク質の品質管理を担う Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリー酵素^(注1)の触媒活性を増強させる低分子 pMePySH を見いだしました。
- 血糖値を下げるインスリンの生合成に本分子を用いることで PDI ファミリー酵素の触媒速度が最大4倍となり、収率の向上に成功しました。
- PDI ファミリー酵素の機能低下によって引き起こされるパーキンソン病、アルツハイマー病、Ⅱ型糖尿病などの創薬につながると期待されます。

【概要】

PDI ファミリー酵素は生体内でタンパク質の品質管理を担う酵素のグループです。本酵素の機能が失われることと、構造異常タンパク質が引き起こすパーキンソン病やアルツハイマー病、Ⅱ型糖尿病などのミスフォールディング病^(注2)との関わりは深く、本酵素の活性亢進剤は新たな治療戦略に貢献することが期待されていました。

東北大学学際科学フロンティア研究所の奥村正樹准教授、東京農工大学大学院工学研究院の村岡貴博教授らの研究グループは、新しいアプローチによる薬剤開発によって、PDI ファミリーの酵素活性を亢進する化合物を示しました。本分子によって PDI ファミリー酵素は、最大4倍の触媒速度を達成しインスリンなど幅広い基質の生産収率向上に成功しました。この成果は、PDI ファミリー酵素の機能低下によって引き起こされるミスフォールディング病の治療において、全く新しいアプローチとなる可能性が期待されます。

本研究成果は、英国化学会誌 Chemical Communications にて、2024年6月4日付で公開され、また同誌の Inside Front Cover に採用される予定です。

【詳細な説明】

研究の背景

酵素の活性亢進剤の開発は、酵素に関わる様々な病理の治療に役立ちます。PDI ファミリー酵素は、小胞体内でタンパク質のジスルフィド結合^(注3)形成を伴う立体構造形成（以後、酸化的フォールディングという）を触媒する役割を担っています。また PDI ファミリー酵素は、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー症、パーキンソン病、II 型糖尿病などのタンパク質のミスフォールディング病と関わりがあることが報告されています。特にアルツハイマー症患者においては、PDI ファミリー酵素のうち PDIA1 と PDIA6 の活性部位である CxxC モチーフ^(注4)の化学修飾と機能失活が報告されており、PDI ファミリー酵素の酸化還元触媒活性の維持は極めて重要です。

これまで血栓症やガンなどの疾患では PDI の発現量が上昇するため、PDI を標的とした阻害剤の開発が多く報告されてきました。しかし、上述のミスフォールディング病と PDI ファミリー酵素の機能失活を鑑みると、PDI ファミリー酵素の活性機能の亢進剤が望まれていましたが、報告例は極めて少なく、幅広い PDI ファミリー酵素に対する亢進剤の開発は未踏でした。

今回の取り組み

今回、東北大学大学院生命科学研究科の倉持円来氏（学際高等研究教育院生、博士後期課程学生）、学際科学フロンティア研究所の奥村正樹准教授、金村進吾助教、東京農工大学大学院工学府の山下有希乃氏（博士前期課程学生）、東京農工大学大学院工学研究院の村岡貴博教授、東海大学理学部の荒井堅太准教授の研究グループは、PDI ファミリー酵素の CxxC モチーフ内のシステイン残基をターゲットとし、新規チオール化合物の開発が非常に有効であると考えました。

汎用されるレドックス分子グルタチオン^(注5)に比べ、新規レドックス分子 N-メチル化ピリジニルメタンチオール (pMePySH) と PDI ファミリー酵素間の反応性を調べた結果、pMePySH の方が PDI ファミリー酵素内の酸化還元活性 CxxC モチーフに対する反応性が高いことがわかりました。さらに、pMePySH によって活性化された PDI ファミリー酵素は天然型インスリンなどの生産量を増大させました。これらの結果は、PDI ファミリー酵素の機能低下によって引き起こされるミスフォールディング病の治療アプローチとして期待されます（図 1）。

詳細に説明すると、小胞体内ではグルタチオンがタンパク質のチオール-ジスルフィド交換反応を制御しており、PDI ファミリー酵素の酸化還元状態を制御しています。グルタチオン内のチオール官能基は $pK_a=9.17$ 、 $E^{\circ}=-256$ mV である一方で、以前本研究グループが開発した pMePySH のチオール官能基は $pK_a=7.34$ 、 $E^{\circ}=-211$ mV という化学特性があり、酸性度が高く酸化力が強い特徴を有していました。今回研究グループは、直接 PDI ファミリー酵素の CxxC

モチーフへの影響を見積もるため、pMePySH による PDIA1, PDIA3, PDIA6, PDIA15 のそれぞれ酸化還元平衡定数を求めました。ここでは、PDI ファミリー酵素のうち CxxC モチーフを保有する代表的な PDIA1, PDIA3, PDIA6, PDIA15 を採用しました。また、グルタチオンは酸化還元反応を起こす際一般的に mM オーダーを使用しますが、本化合物の有効性を示すために最小量である mM オーダーの濃度域で評価しました。その結果、グルタチオンによる酸化還元条件下の各種 PDIA1, PDIA3, PDIA6, PDIA15 の酸化還元平衡定数よりも、pMePySH/pMePySS (pMePySH の酸化型) による酸化還元条件下の各種 PDI ファミリー酵素の酸化還元平衡定数が高くなったことから、グルタチオンよりも pMePySH の方が、PDI ファミリー酵素内の酸化還元活性 CxxC 部位に対する反応性が高いことがわかりました (図 2)。

還元変性基質に対する酸化的フォールディングの触媒活性を評価するために、3 つのジスルフィド結合をもつ基質 BPTI を用いました。ここでは、基質のチオール濃度と等量の pMePySS の最小量を使用し、グルタチオンによる系と比較したところ、PDIA1 では約 4 倍、PDIA6 では約 2.5 倍速度の触媒活性を示すことがわかりました (図 3)。

酸化的フォールディングの触媒速度と最終のおりたたまれた量には相関があり、基質はフォールディング中間体から出来るだけ早く天然構造へフォールドする必要があります。そこで、次にミスフォールディング病の代表例である II 型糖尿病に焦点を当て、プロインスリンの酸化的フォールディング触媒による収量を評価しました。既存のグルタチオンによる酸化還元反応では殆どプロインスリンがフォールディング出来ない条件において、PDIA1 と PDIA6 はプロインスリンを直接触媒し、収量を増加させることが出来ます。さらに、今回開発した pMePySH/pMePySS による酸化還元条件下であれば、PDIA1 と PDIA6 の活性はさらに上昇し、最大 81.6%までプロインスリンをフォールドさせることに成功しました (図 4)。

以上の結果は、pMePySS というチオール化合物が幅広い PDI ファミリー酵素の活性亢進に繋がることを実証しただけでなく、最小量で酵素活性を増加させることも意味しており、今後の PDI ファミリー酵素の活性亢進剤の新たな設計指針を与えるものです。

今後の展開

ミスフォールドしたアミロイド原性タンパク質を認識する抗体など、昨今多くのミスフォールディング病に対峙するアプローチが為されていますが、その機序の多くは不明であり治療法の開発が望まれています。本研究においては、生体内でミスフォールドのリスク低減に働く酵素群を幅広く、最小量でより高活性化する戦略であり、今後さらにタンパク質の品質管理を化学的に増強する薬剤の開発が抗体医薬品と一線を画す、ミスフォールディング病に立ち向かう新しいアプローチの手がかりとなる可能性が期待できます。

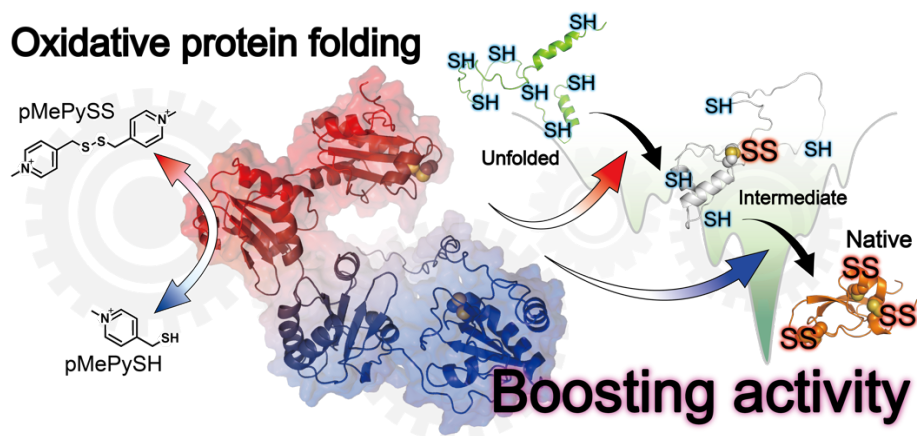


図 1. 本研究の概要。

新規レドックス分子 pMePySH は、PDI ファミリー酵素の活性、および天然型インスリンなどの生産量を増大させることができます。これは、PDI ファミリー酵素の機能低下によって引き起こされるミスフォールディング病の治療アプローチとして期待できます。

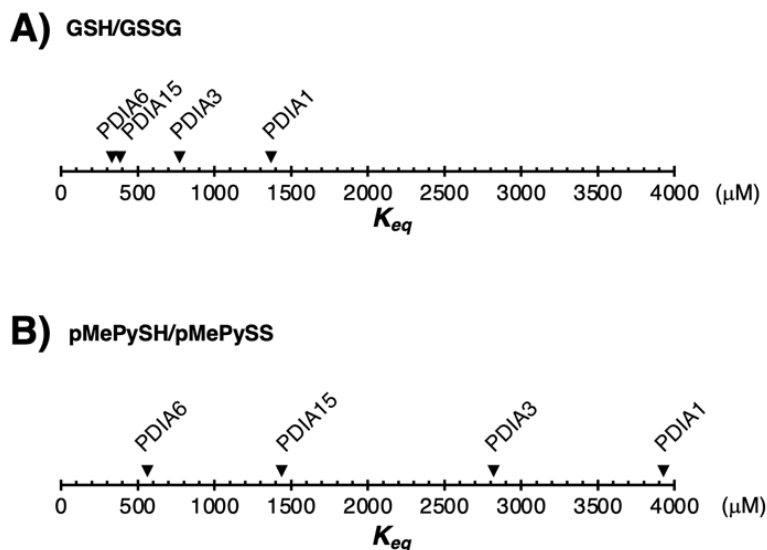


図 2. 各種 PDI ファミリー酵素の酸化還元平衡定数

A) グルタチオンもしくは、B) 新規レドックス分子 pMePySH による PDI ファミリー酵素内の酸化還元触媒活性部位の酸化還元平衡定数(K_{eq})を算出しました。結果、各々PDI ファミリー酵素内の酸化還元触媒活性部位の酸化還元平衡定数を上昇させ、pMePySH が PDI ファミリー酵素内の酸化還元活性 CxxC 部位に対する反応性が高いことがわかりました。

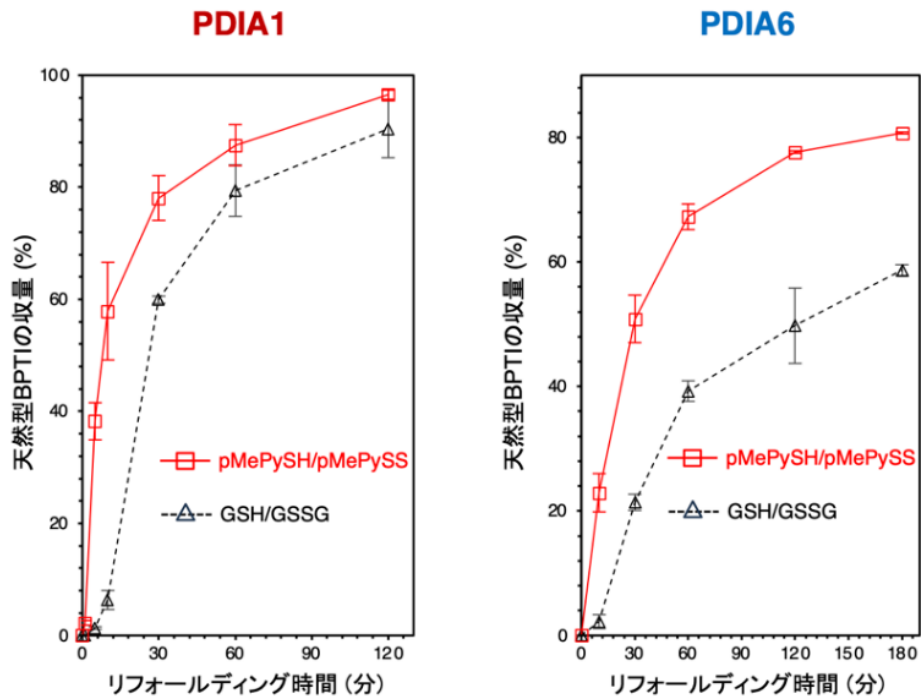


図 3. グルタチオンと比較して pMePySH による PDI ファミリー酵素の活性亢進を調べた結果、基質の 1 つである BPTI の天然型の生産量が増大しました。

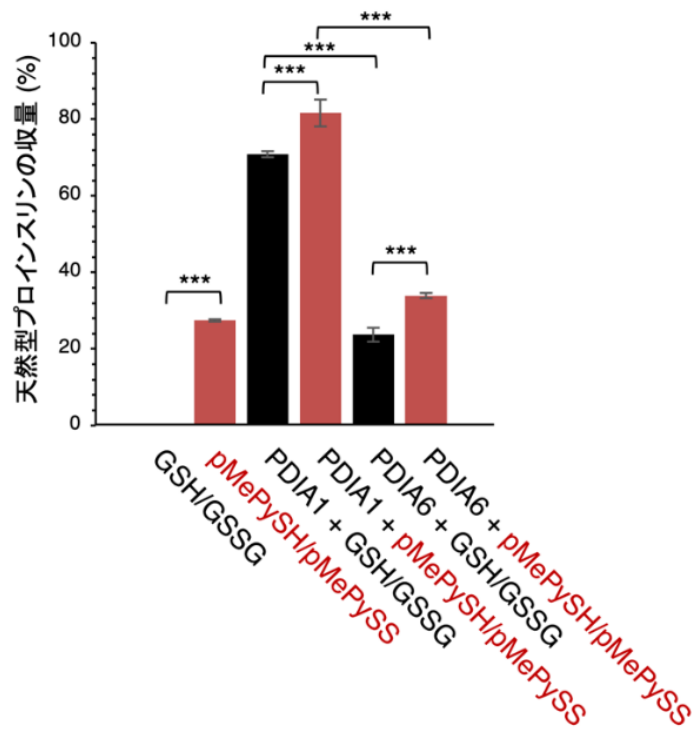


図 4. グルタチオンと比較して pMePySH による PDI ファミリー酵素の活性亢進を調べた結果、基質の 1 つであるプロインスリンの天然型の生産量が増大しました。

【謝辞】

本成果は、科学技術振興機構（JST）創発的研究支援事業 FOREST（課題番号：JPMJFR2122、研究代表者：村岡貴博、課題番号：JPMJFR201F、研究代表者：奥村正樹）、戦略的創造研究推進事業 CREST（課題番号：JPMJCR19S4、研究代表者：野地博行）、次世代研究者挑戦的研究プログラム（課題番号：JPMJSP2114）、日本学術振興会 科学研究費助成事業 学術変革領域研究（B）「遅延制御超分子化学」（課題番号：JP21H05096、研究代表者：村岡貴博；課題番号：JP21H05095、研究代表者：奥村正樹）、公益財団法人武田科学振興財団（村岡貴博、奥村正樹）などの支援を受けて得られました。

【用語説明】

注1. Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリー酵素

タンパク質内ジスルフィド結合形成を伴う立体構造形成（酸化的フォールディングという）を触媒する役割を担う酵素群である。タンパク質は天然型の立体構造を獲得して初めて機能発現するため、タンパク質の品質を管理する上で極めて重要な酵素群である。

注2. ミスフォールディング病

ミスフォールドタンパク質（不良化タンパク質）の蓄積が起因する疾患のことである。パーキンソン病やアルツハイマー病などがあげられる。

注3. ジスルフィド結合

ポリペプチド鎖中のシステイン残基の側鎖に含まれるチオール基（-SH）が酸化され、硫黄原子間で形成される共有結合。タンパク質の立体構造を安定化する役割や機能調節に関わる。

注4. CxxC モチーフ

モチーフとは複数のタンパク質や DNA の配列で共通して見られる短い配列のパターンであり、CxxC モチーフは特に PDI ファミリー酵素の触媒活性を示す部位で、アミノ酸残基のシステイン-x-x-システインからなる。x は任意のアミノ酸。

注5. グルタチオン

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンの3つのアミノ酸残基から成るペプチドである。

【論文情報】

タイトル：Boosting the enzymatic activity of CxxC motif-containing PDI family members

著者：Tsubura Kuramochi, Yukino Yamashita, Kenta Arai, Shingo Kanemura, *Takahiro Muraoka and *Masaki Okumura

*責任著者：東北大学 学際科学フロンティア研究所 准教授 奥村正樹
東京農工大学 大学院工学研究院 教授 村岡貴博

掲載誌 : Chemical Communications

DOI : 10.1039/D4CC01712A

URL : <https://doi.org/10.1039/D4CC01712A>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学 学際科学フロンティア研究所

准教授 奥村正樹 (おくむら まさき)

TEL : 022-795-5764

Email : okmasaki@tohoku.ac.jp

東京農工大学 大学院工学研究院

教授 村岡貴博 (むらおか たかひろ)

TEL : 042-388-7052

Email : muraoka@go.tuat.ac.jp

(JST 事業に関すること)

科学技術振興機構 創発的研究推進部

加藤豪 (かとう ごう)

TEL : 03-5214-7276

E-mail : souhatsu-inquiry@jst.go.jp

(報道に関すること)

東北大学 学際科学フロンティア研究所 企画部

特任准教授 藤原 英明 (ふじわら ひであき)

TEL : 022-795-5259

Email : hideaki@fris.tohoku.ac.jp

東京農工大学 総務課広報室

TEL : 042-367-5930

Email : koho2@cc.tuat.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

TEL : 03-5214-8404

Email : jstkoho@jst.go.jp