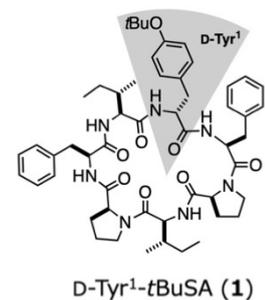


海洋由来慢性炎症性疾患治療リード化合物の創出

名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻
天然物ケミカルバイオロジー研究室
北 将樹

1. 研究の背景・目的

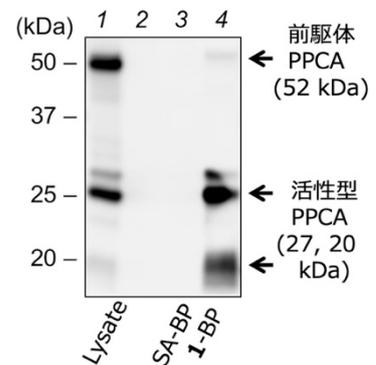
糖尿病や肥満などの生活習慣病は近年増加傾向にあり、その予防や克服は健康長寿を目指す社会における急務の課題である。これら生活習慣病やがんを引き起こす要因として、炎症反応が長期間持続して慢性化する慢性炎症が挙げられる。しかし、慢性炎症の発生メカニズムについては不明な点が多く、治療法も確立されていないことから、新奇な作用機序に基づく治療・改善薬の創出が望まれている。Stylissatin A (SA) は申請者がパプアニューギニア産のカイメン動物 *Stylissa* 属から発見した複数のプロリン残基を含む環状ペプチドであり、リポ多糖 (LPS) で刺激したマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞の一酸化窒素 (NO) の産生を抑制する [*Tetrahedron Lett.* 54, 6826 (2013); *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 88, 600 (2015)]。そこで計40種のSA誘導体を化学合成して構造活性相関を調べた結果、抗炎症活性が向上し、かつ毒性が低い D-Tyr¹-tBuSA (**1**) を創出した。また**1**が脂肪前駆細胞 (3T3-L1) の脂肪細胞への分化を阻害し、かつ分化した脂肪細胞に蓄積した脂肪滴を顕著に減少させることを発見した (EC₅₀ = 0.44 μM) [*Chem. Commun.* 55, 5471 (2019)]。さらに**1**のビオチン誘導体を用いたプルダウン実験により、RAW267.4 細胞の抽出液から標的候補タンパク質 acyl-CoA dehydrogenase, long chain (ACADL) を同定した [*J. Antibiot.* 73, 589 (2020)]。しかし、脂肪細胞の分化や脂肪滴の蓄積における ACADL の関わりや細胞内シグナル伝達系に及ぼす効果は説明が難しく、**1**には未知の作用機序の存在が予想されていた。そこで、本研究ではSA類がマクロファージや脂肪細胞にどのように作用するのか解析し、新たなタンパク質間相互作用 (protein-protein interaction, PPI) を制御する機構を見出すことで、慢性炎症性疾患の治療リード化合物を創出することを目指して本研究を実施した。



2. 結果

ケミカルプローブを用いた標的的同定と細胞内動態の解析

構造活性相関研究に基づいて、SA類のTyr残基のフェノール性ヒドロキシ基にアルキルPEGリンカーを挿入し、ビオチン基や蛍光基(テトラメチルローダミン)で修飾した誘導体(ケミカルプローブ)を合成した。RAW264.7細胞の細胞抽出液を用いたプルダウン実験と元の高活性リガンドによる競合溶出を行った結果、新たな標的候補分子として protective protein cathepsin A (PPCA) を同定した。PPCAはリソソームに局在するカテプシンであり、前駆体が酵素的切断を受けて活性型となるが、SA類は活性型のみ結合することをイムノブロットングにより確認した。



Biotin probe を用いた細胞抽出液からの標的分子のアフィニティー精製

次に、実際の細胞内ではSA類がACADLとPPCAのどちらを標的とするか確認するため、上記で合成した蛍光プローブとオルガネラ選択的染色試薬を用いたライブセルイメージングを行った。その結果、天然型のL-Tyr体、**1**に対応するD-Tyr体のプローブはともに細胞内に短時間で取り込まれ、ACADLが含まれるミトコンドリアではなく、PPCAが含まれるリソソームに安定して局在することが判明した。

PPI制御メカニズムの解析

PPCAは単なる酵素として働くだけでなく、リソソームにおいてノイラミニダーゼ1 (Neu1) やβ-ガラクトシダーゼ (β-Gal) と高次複合体を形成して、細胞内におけるそれぞれの機能を向上させる「保護タンパク質」(分子シャペロン)として働く。マクロファージのTLR4にLPSが結合するとNeu1のシアリダーゼ活性が増強され、NF-κBの活性化を通じてNOや炎症性サイトカインの放出が促進される。したがってPPCAはNeu1を安定化することで、その活性を増強して炎症惹起をもたらすが、SA誘導体はPPCAが関与するPPI、もしくは複合体の細胞膜への移行を阻害することで抗炎症や脂肪蓄積阻害活性を発現すると予想された。この仮説を実証するため、SA類が実際にPPCAに結合して機能を制御するのか、*in vitro*での検証を行った。

まず、リコンビナントタンパク質として市販されているPPCA前駆体をPPCLと反応させることで活性化PPCAを調製した。蛍光ペプチド基質を用いた活性試験においては、**1**は100 μMの濃度で活性化PPCAを阻害したが、既存の酵素阻害剤よりも効果はかなり弱かった。一方でリコンビナントNeu1を用いたsandwich ELISA法および共免疫沈降 (Co-IP) 法により、**1**は活性型PPCAとNeu1間の相互作用を阻害することを確認した。この効果は前駆体PPCAでは見られなかったことから、上述の細胞内標的の同定の結果とも合致した。

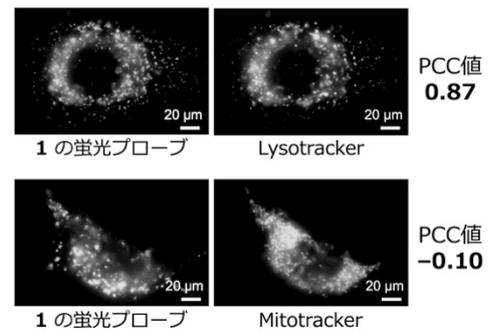
さらに、実際の細胞内におけるPPI阻害効果を調べるため、RAW264.7細胞をLPSと**1**で処理してから細胞内タンパク質を抽出し、抗PPCA抗体を用いたCo-IP法を検討した。その結果、前駆体PPCAや活性型PPCAの検出量はLPSや**1**の有無に関わらずほぼ一定であったが、Neu1の検出量は**1**の処理により有意に減少することを見出した。

分子モデリング計算による標的分子との結合様式解析

SA類のPPCAとの結合様式を解明し、さらなる活性リガンドを創出することを目指して分子モデリング計算を検討した。前駆体PPCAのX線結晶構造を鋳型として活性型PPCAの初期構造を構築し、統合計算化学システムMOEを用いたドッキングシミュレーション、さらにYASARAによる分子動力学シミュレーションを行った。その結果、SA類は活性型PPCAの酵素活性に重要なSer150残基付近に結合し、特に高活性アナログである**1**では効果的な分子内水素結合によりマクロ環の立体配座が固定されるため、Ser150に加えて周囲のGly57・Tyr247・Cys375・Asn339とも水素結合を介して効果的に結合するドッキングモデルが得られた。一般にNeu1は会合性を持ち、*in vitro*で不安定なタンパク質であることが知られており、PPCAとの共結晶などの高次複合体の構造はこれまで報告されていないが、部分ペプチドの結合実験などから活性型PPCAのSer150付近で結合することが推定されている。よって、Neu1と近い位置で結合するSA類が効果的にPPCA-Neu1間のPPIを阻害することは妥当と考えられた。

脂肪蓄積阻害活性の発現メカニズムの解明

SA類が脂肪前駆細胞3T3-L1の脂肪細胞への分化を顕著に阻害し、さらに分化した脂肪細胞における脂肪蓄積を大幅に減少させる効果に注目して、実際の細胞内におけるタンパク量の変動を調べた。分化誘導時に**1**を添加した細胞について、リソソームを含む膜タンパク質画分を選択的に抽出し、含まれるタンパク質をウェスタンブロットリングで定量した結果、前駆体PPCAと活性型PPCAは分化誘導の有無や**1**の添加によってほとんど変動は見られなかったが、Neu1は**1**の添加濃度に依存して有意に減少した。



3T3-L1 細胞における **1** の局在解析
(PCC : ピアソンの積率相関係数)

さらに、Neu1の減少に付随して、脂肪細胞でNeu1と相互作用することが知られているペリリピン1 (perilipin 1) の異常な分解も起こることを、ウェスタンブロットと免疫蛍光染色法により解明した。Perilipin 1は脂肪滴を取り巻く膜に局在して脂肪の蓄積・分解で重要な役割を果たすタンパク質であり、リパーゼによる脂肪代謝の制御にも関わっている。以上から、SA類の脂肪細胞における分化抑制や脂肪蓄積阻害活性が、PPI阻害活性に基づく新しい機序で引き起こされていることを実証した。

遺伝子発現変動解析

Neu1は細胞表面受容体の糖鎖末端においてシアル酸を脱離させることで、様々なシグナル伝達を調節する。SA類が分化した脂肪細胞に対しても脂肪蓄積量を顕著に減少させる点に注目して、脂肪細胞で高発現している遺伝子の発現変動をRT-qPCR法で解析した。その結果、脂肪前駆細胞から脂肪細胞に分化させる段階で**1**を添加、あるいは分化した脂肪細胞に対して**1**を添加した場合のどちらにおいても、脂肪酸のβ酸化を促進する遺伝子A、熱産生によりエネルギー消費をもたらす遺伝子Bなどの増強が見られた。加えて、Mitotrackerで処理したライブセルイメージングにおいて、**1**の処理は脂肪前駆細胞・脂肪細胞双方のミトコンドリア数も増加させたことから、SA類のPPI阻害作用により、脂肪細胞の代謝が大きく変化することが示された。

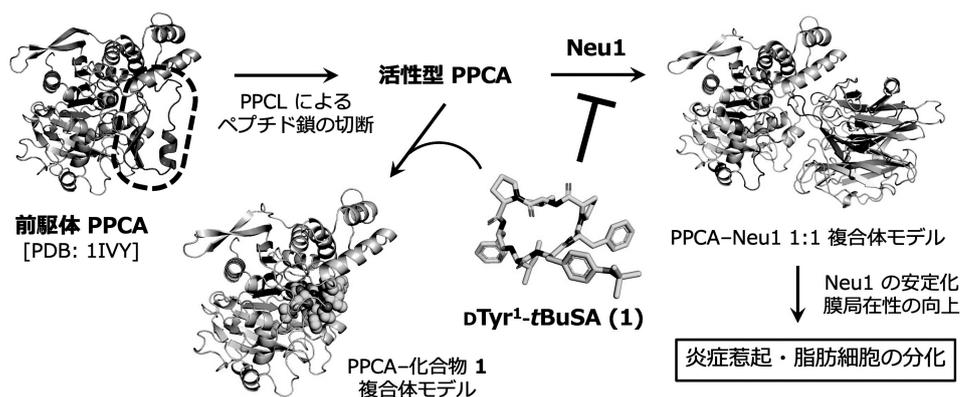
3. まとめ・今後の展望

一般に、ポリフェノール類やカテキン類など抗酸化物質がマクロファージに対する抗炎症活性を示すことや、ノルアドレナリンなど生体内物質が脂肪細胞の分化や脂肪蓄積を阻害することが知られている。しかし、SA誘導体のようにマクロファージの炎症応答と脂肪細胞の分化の両方を抑制し、かつ毒性が低い化合物はこれまで知られていない。またSA類の標的候補分子として同定したPPCAのPPIを特異的に制御する有機小分子もこれまで例がなく、本研究の展開により炎症や肥満に関わる新たなシグナル伝達の制御方法や、分化誘導に関わる転写因子など、慢性炎症の新たな創薬ターゲットの発見が期待される。

Neu1の先天性欠損症はシアリドーシスと呼ばれ、糖鎖修飾の欠陥により様々な病態を引き起こす原因となる。またNeu1ノックアウトマウスは胎生致死となることが知られている。既存のノイラミニダーゼ阻害剤は酵素活性中心に直接結合し、Neu1~4のうちNeu1のみを選択的に阻害することは難しいため、これを標的とした創薬研究は進んでいない。一方、本研究で見出したSA類は、Neu1には直接結合せず、リソソームに局在するPPCAを介したPPI阻害効果により膜上のNeu1の機能を選択的に阻害する点が特徴であり、炎症や脂肪蓄積を効果的に阻害する新たな創薬展開が期待される。今後はSA類のユニークなPPI阻害機構に基づく構造活性相関や高次複合体解析をさらに進展させ、新たな慢性炎症疾患リードの創出を目指していきたい。

発表論文

Y. Sun, A. Dakiiwa, M. Zhang, T. Shibata, and M. Kita: Inhibition of lysosomal cathepsin A and neuraminidase 1 interaction by anti-obesity cyclic peptide. *Chem. Eur. J.* 30, e202402049 (2024).



想定される **1** の PPI 阻害メカニズム。PPCA-1 複合体モデルは MOE、PPCA-Neu1 複合体モデルは H-DOCK でそれぞれ構築した。