

論文の内容の要旨

論文題目：小分子スクリーニングを用いたパーキンソン病関連因子 DJ-1 の機能解析

氏名：田代 晋也

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻
疾患蛋白質工学分野 津本研究室

【研究の背景・課題】

家族性パーキンソン病関連遺伝子 DJ-1 は、その変異が若年性パーキンソン病を引き起こすことが知られている。本蛋白質は、パーキンソン病の有力な原因仮説である、ミトコンドリアの機能不全および酸化ストレスの軽減に関与すると推定されているが、いまだ生体内での役割の決定には至っておらず、パーキンソン病発症機構解明を目指して研究が進められている。

機能未知蛋白質を解析するうえで有力な手法は、siRNA 及び阻害剤を用いた阻害を行い、表現形質を解析することである。これら二つの手法は特異性・定量性で相補的な関係にあり (siRNA: 特異性は高いが定性的、阻害剤: 特異性は必ずしも高くないが定量的)、組み合わせで解析を行うことが重要であると考えられている。DJ-1 に関しては、siRNA を用いた解析は過去行われているものの、阻害剤は現時点では開発されておらず、阻害剤を用いた解析もなされていない。

【研究の目的・概要】

上記背景を踏まえ、DJ-1 阻害剤の同定およびそれを用いた解析を本研究の目的として設定した。

本研究ではまずスクリーニングにより DJ-1 結合小分子を同定した。さらに、同定された化合物の有用性を確認するため、これまでに集められた DJ-1 に関する知見を検証し、その中でも特に信頼性が高いと思われる機能に関して、得られた化合物の阻害能を測定した。

【研究結果】

(i) スクリーニングによる DJ-1 機能制御小分子化合物の同定

(a) DJ-1 結合小分子のスクリーニング

DJ-1 の構造中で最も重要であるとされている部位は Cys106 残基周辺のポケットである。特にその中心の Cys106 は、酸化状態と DJ-1 の不活化の強い関連が示唆されている重要な残基である。本研究ではこの部位を標的とした化合物を探索した。

具体的には、少数の化合物で広いケミカルスペースを探索できるフラグメントライブラリに関してスクリーニングを行った。スクリーニング手法としては、フラグメント化合物の結合によって検出されるシグナルが微小であることを勘案して、表面プラズモン共鳴法を用いた。

表面プラズモン共鳴法を用いた DJ-1 結合化合物のスクリーニングの結果、生体内に存在する小分子化合物 1 がヒットとして同定された。本化合物と DJ-1 の結合を等温滴定型熱量測定法 (ITC) により測定したところ $K_D=2.5 \mu\text{M}$ の強い親和性が確認された (Figure 1)。

(b) 共結晶構造解析

相互作用様式をより精密に解析するため、化合物 1 との共結晶構造解析を行った。

結果、本化合物は DJ-1 の機能上重要な 3 残基である Glu18、Cys106、His126 周辺のポケットに結合していた。特に Cys106 の硫黄原子は化合物 1 の炭素原子と共有結合しており、DJ-1 との結合により化合物 1 の芳香族性が失われることが吸光度測定により確認された。

(c)変異体解析

結晶構造解析の結果が溶液中の状態を反映しているかを確認するため、E18A、C106A、H126A 変異体をそれぞれ作製し、ITC により化合物との相互作用を検証した。結果、E18A、C106A 変異体に関しては結合が消失し、H126A についても大幅に弱化した。以上から溶液中においてもこれらの 3 残基が結合に主に寄与していることが確認された。

(ii)提案されている DJ-1 の機能の検証、および化合物によるその阻害

DJ-1 の機能は現在いくつか提案されている。本研究では、これらの中で(a)プロテアーゼ活性による凝集蛋白質の除去、(b)金属結合による銅毒性の防止、(c)グリオキシラーゼ活性による酸化ストレス物質の除去の 3 つに関して検証を行い、最も信頼性の高い活性に関して、得られた化合物による阻害を確認した。

(a)プロテアーゼ活性

パーキンソン病の進行とともに、細胞内に α -Synuclein を主成分とした蛋白質の凝集体が蓄積することが知られている。DJ-1 は構造から Cys106、Glu18、His126 で構成された触媒三残基を持つプロテアーゼであり、プロテアーゼ活性によって α -Synuclein を除去すると提案されてきた。

本研究ではプロテアーゼ活性に関して測定を行い、さらに触媒三残基の配向の変化によりプロテアーゼ活性を促進するとされる変異体に関しても、同様の測定・および結晶構造解析を行った。

しかしながら、プロテアーゼ活性は確認されず、結晶構造上も触媒三残基に関しては大きな変化は観察されなかった。

(b)金属結合による銅毒性の防止

パーキンソン病患者の脳内においては、銅、亜鉛、鉄など一部の生体内金属の濃度が有意に上昇していることが知られている。この中で銅に関しては強い毒性が存在し、DJ-1 は Cys106 残基を介して銅と結合・その毒性を緩和すると提案されていた。本研究では ITC および結晶構造解析によって銅を含むいくつかの生体内必須金属に関して DJ-1 との結合を精査した。結果、DJ-1 は銅ではなくむしろ亜鉛に対して強く結合することが明らかとなった(亜鉛との親和性: $K_D=0.6 \mu\text{M}$, 銅との親和性: $K_D=400 \mu\text{M}$, Figure 2 左, [1])。さらに結晶構造解析の結果(Figure 2 右)から、この結合が Cys106 を介したものであることが判明した。変異体解析も結晶構造解析の結果を裏付けた。

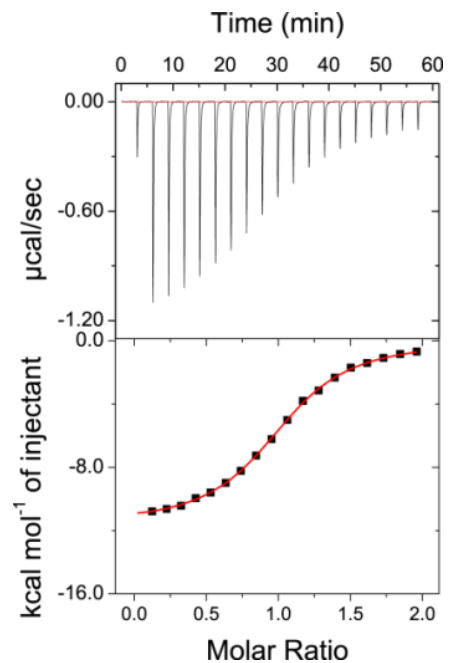


Figure 1. DJ-1 と化合物 1 の ITC 測定結果

以上の結果から DJ-1 は銅のみならず亜鉛とも結合する可能性が高いことが明らかとなり、得られた化合物は亜鉛との結合を阻害することが示された。このことは DJ-1 が亜鉛ホメオスタシスにも関与しており、本化合物がその作用を阻害する可能性を示唆している。

(c) グリオキシラーゼ活性

近年、DJ-1 の構造類似蛋白質 Hsp31 が グリオキシラーゼを有し、DJ-1 も同様にグ

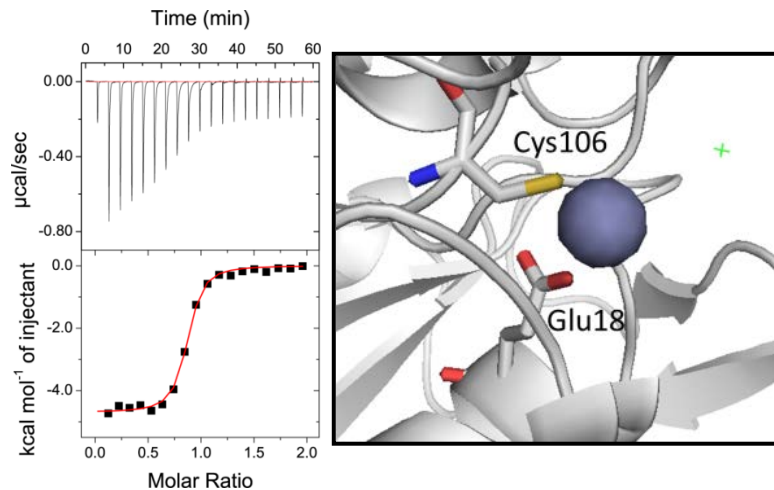


Figure 2. DJ-1 と Zn(II) の ITC 測定結果および結晶構造

リオキシラーゼ活性を有すると報告された[2]。また、その後の検証により DJ-1 と グリオキサール様化合物の結晶構造も明らかになっており、これらの理由から、DJ-1 は報告通り グリオキシラーゼ活性を有する可能性が高いと判断した。活性を確認したのち、化合物 1 に関して阻害実験を行ったところ、濃度依存的に活性を阻害した ($IC_{50}=11.7 \mu M$)。

(iii) 構造解析に基づいた化合物の伸長

これまでの結果から、生体内化合物化合物 1 は DJ-1 の グリオキシラーゼ活性を阻害することが判明した。しかし本化合物の親和性は $K_D \approx 3 \mu M$ であり、生体内での阻害に必要とされる K_D =数百 nM の親和性と比較すると弱い。

そこで化合物 1 の DJ-1 に対する親和性の向上を目指して化合物の伸長を行った。共結晶構造に基づき類縁体を設計し、その中でも購入可能な化合物に関してスクリーニングを行った。手法として、化合物存在下の変性中点のシフトによって化合物の結合を検出するサーマルシフトアッセイを用いた。結果、いくつかの化合物に関しては $1^\circ C$ 以上の変性中点のシフトが観察された。ITC により親和性を検証したところ 4 倍程度親和性が向上した化合物 2 が得られた ($K_D = 0.63 \mu M$, Figure 3)。

さらに最適化を進め、最終的には $K_D < 100 \text{ nM}$ の親和性を有する化合物 3 が得られた。化合物 3 は化合物 1 と比べ DJ-1 の グリオキシラーゼ活性阻害効率も高かった ($IC_{50} \approx 300 \text{ nM}$)。

以上の結果から、細胞内での DJ-1 の阻害に十分な親和性をもつ化合物が複数種得られたといえる。

【考察】

(i) スクリーニングで得られた化合物について

化合物 1 は、生体内に存在することが確認されており、パーキンソン病患者の尿中では有意に

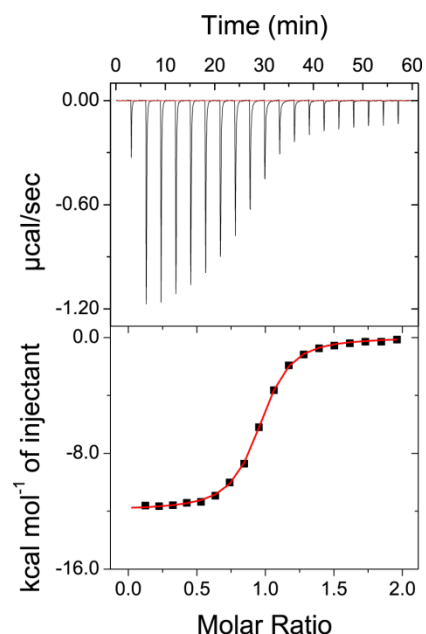


Figure 3. DJ-1 と伸長化合物の ITC 測定結果

濃度が上昇していることが知られている。

また、提案されているグリオキシラーゼ活性の反応機構は、化合物 1 と同様に Cys106 とグリオキサールの共有結合を経由する[3]。そして DJ-1 がグリオキシラーゼ活性を発揮するには、Cys106 が還元状態であることが必須であることが確認されている。

以上の事実と今回の実験結果を照合すると、DJ-1 の Cys106 は通常時は化合物 1 によって酸化から保護されているが、ストレスなどにより化合物 1 の濃度が低下した際、グリオキシラーゼ活性を発揮するという機構が考えられる。

(ii)伸長化合物について

今回の最適化では主に ITC を用いて親和性の測定を行った。その結果、わずかな官能基の付加によって、それまでエンタルピー駆動だった化合物の結合が、エントロピー駆動へと変化する現象が見られた。これは、最終的に得られた伸長化合物が、基礎となったフラグメント化合物に比べ脂溶性が高く、官能基付加に伴う化合物の物性変化および水和状態の変化が、ITC の結果に反映されたためと考えられる。

この結果は、過去提案されたエンタルピー変化に基づく化合物の選別が、化合物の結合の質のみならず化合物の物性の変化も反映し、脂溶性の低い、良い阻害剤を作る指標となることを示唆している。[4]

【結論】

本研究では、DJ-1 に $K_D < 100$ nM の親和性で結合し、さらにその機能を阻害する小分子化合物を取得することに成功した。

化合物 1 は、生体内での DJ-1 の機能調節機構に関して、示唆を与えた。また、最終的に得られた化合物は、細胞内での阻害、がん治療標的としての DJ-1 の評価を行う上で十分な親和性を備えていると考えられ、さらに化合物 1 よりも特異性は向上していると予想される。

【参考文献】

[1] Giroto S. et al. *J. Biol. Chem.*, 289(15):10887-99, 2014, [2] Lee JY. et al. *Hum Mol Genet.*, 21(14):3215-25, 2012, [3] Choi D. et al. *FEBS J.*, 2014, Epub ahead of print, [4] Ernesto Freire. et al. *Drug Discov Today*: Oct 2008; 13(19-20): 869–874.

【発表者の原著論文】

Tashiro S., Caaveiro JM, Wu CX, Hoang QQ, Tsumoto K.

Thermodynamic and Structural Characterization of the Specific Binding of Zn(II) to Human Protein DJ-1. *Biochemistry*. 53, 2218-2220 (2014)