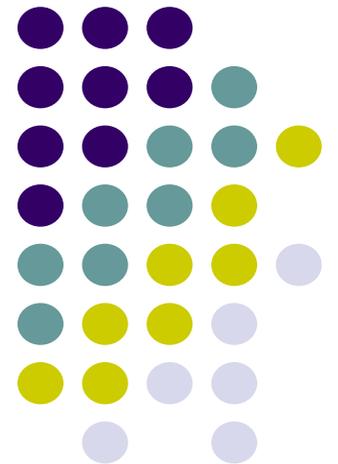


異常プリオンを抑える物質の発見とそのメカニズムの解明

桑田一夫

岐阜大・人獣感染防御研究センター



プリオン病

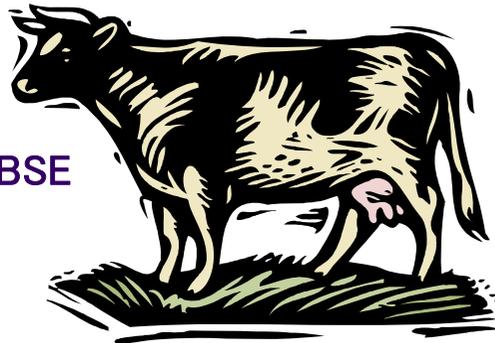


- ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ウシ海綿状脳症(BSE)、ヒツジのスクレイピーなどのプリオン病は脳の海綿状変性を特徴とする致死性の神経変性疾患である。
- 病原体の正体は不明な点が多いが、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})によって脳内に存在している正常型プリオン蛋白質(PrP^{C})が構造変換し、凝集体を形成して脳内に蓄積することが発病機構と考えられている。
- 発病や病状進展を抑制する薬剤の開発が試みられているが、どの候補薬も治療効果は限定的で、とくに末梢投与にて効果を示す薬剤は見つかっていない。

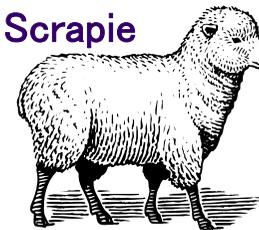
CJD
Kuru
GSS
FI



BSE



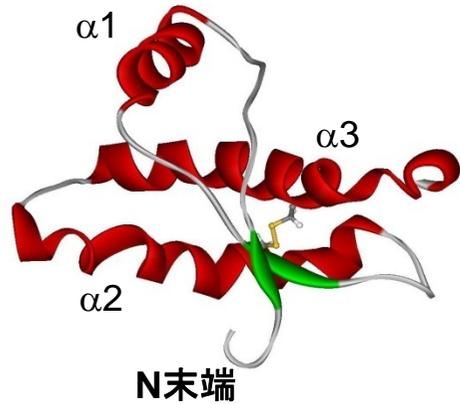
Scrapie



CWD

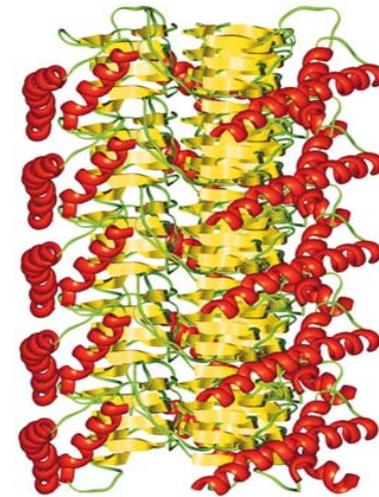


発病機構



正常型プリオン(PrP^C)

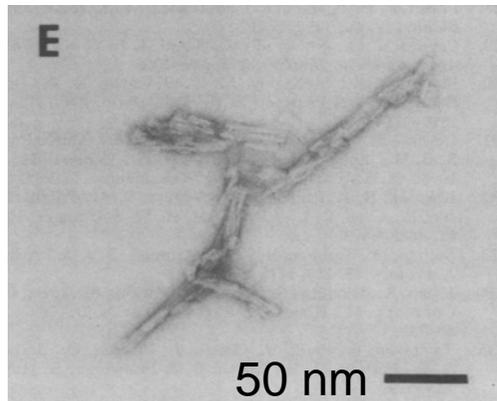
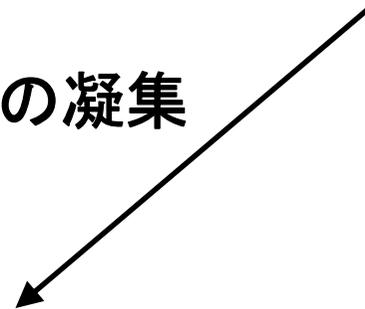
構造変換



異常型プリオン (PrP^{Sc})モデル¹⁾

¹⁾ Govaerts, C. et al., *PNAS*. (2004)

PrP^{Sc}の凝集

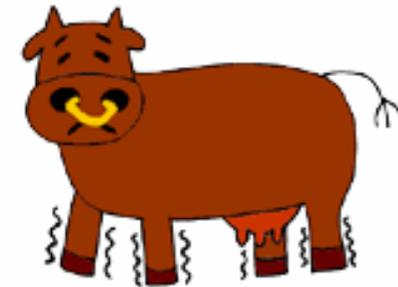


PrP^{Sc}の電子顕微鏡像²⁾

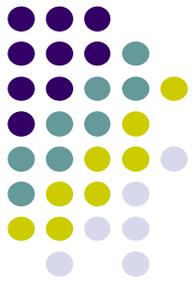
²⁾ Gasset, M. et al., *PNAS*. (1992)



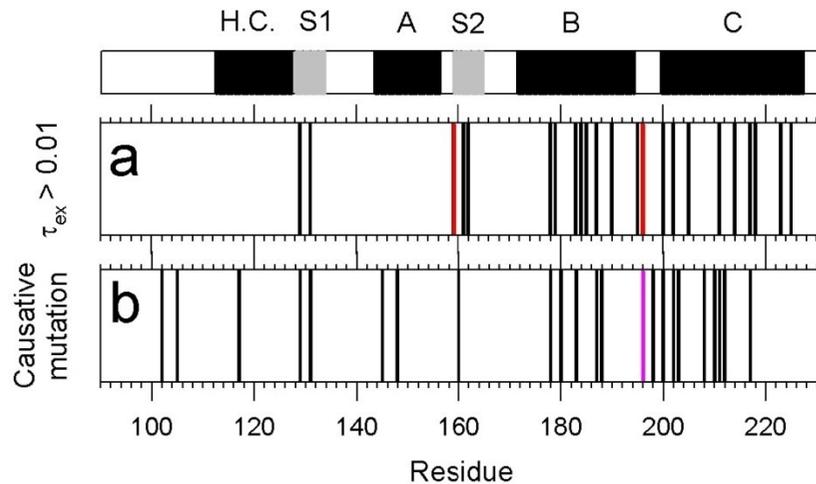
脳内に蓄積



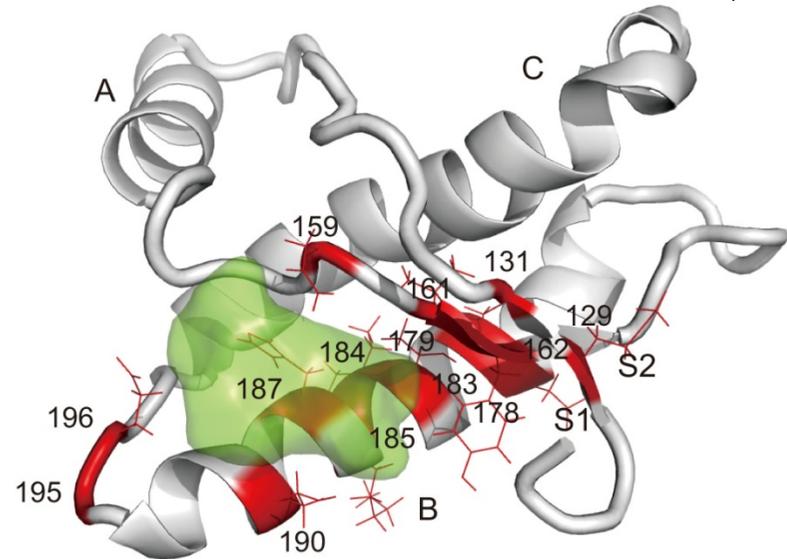
発病



準安定状態PrP*の存在



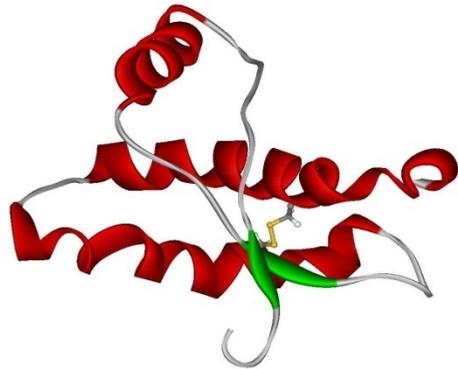
Kuwata et al. 2004



マウスPrP^Cの立体構造
τ_{ex} > 0.01の揺らぎを持つ残基(赤)
分子ポケット(緑)

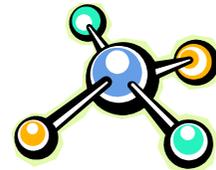
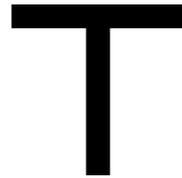
NMRの緩和実験は、遅いタイムスケールの揺らぎが分子ポケット周辺に局在すること示しており、天然状態PrP^Cと準安定状態PrP*を行き来していることを示唆する。

本研究の目的

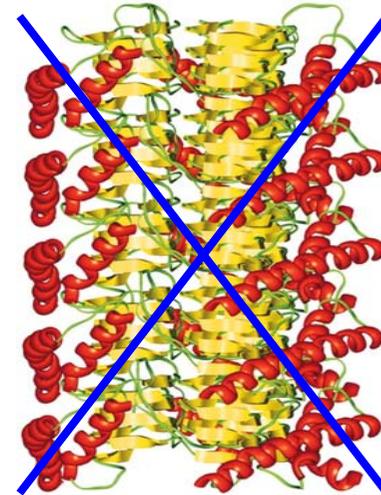


正常型
プリオン
PrP^C

構造変換



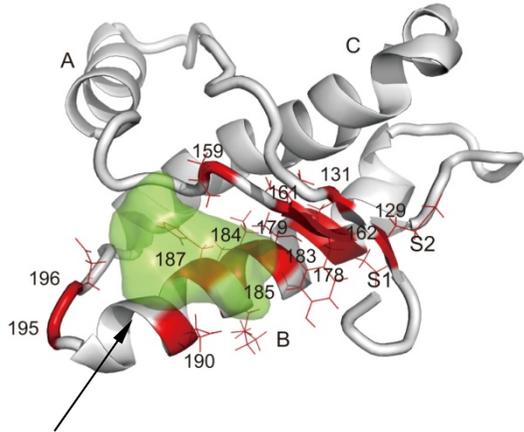
化合物 A



異常型
プリオン
PrP^{Sc}

正常型プリオン蛋白質の構造変換を阻害し、異常型プリオン蛋白質の凝集を抑制できれば発病を阻止することが可能と考え、正常型プリオン蛋白質の立体構造を安定化する低分子化合物の探索を行った。

in silico スクリーニング



分子ポケット



MDL社のAvailable Chemicals
Directory(ACD)データベース

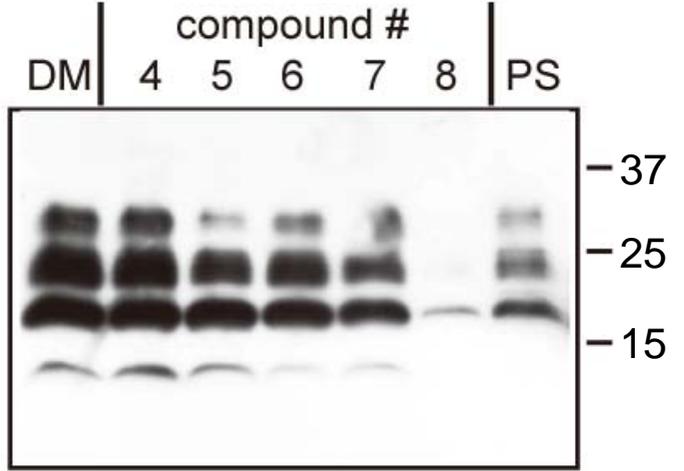
Docking simulation program
であるICM (スクリプス研究所で開
発) による探索

データベースにある約32万個の化合物からマウスPrP^Cの分子ポケットに結合する低分子化合物をICMを用いて探索し、結合力の高いものから44個を選出した。

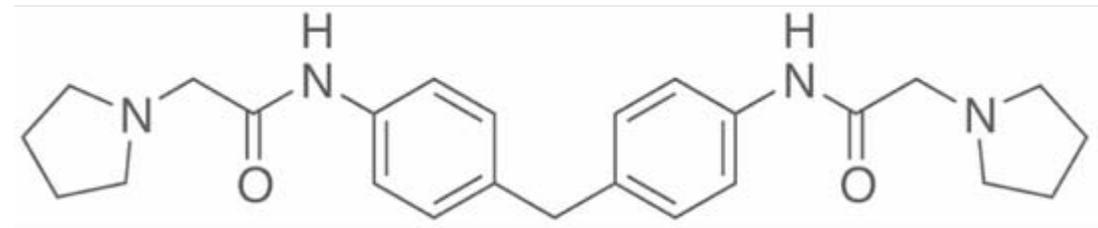


ex vivo スクリーニング

(代表例, 10 μ M)



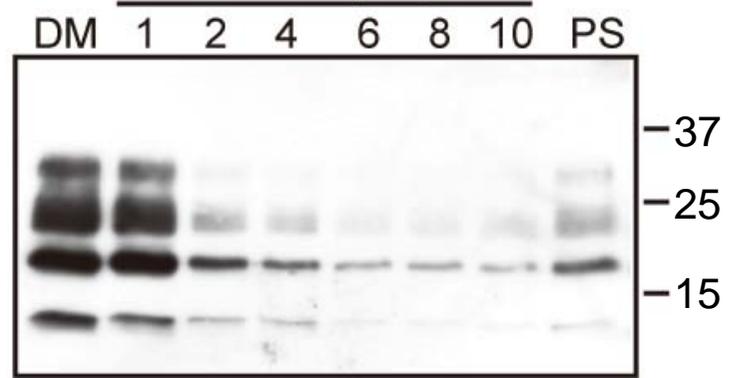
44化合物のうち、PrP^{Sc}の産生を効率的に抑制する化合物(#8)が見つかった(GN8と呼称)。



GN8, C₂₅H₃₂N₄O₂(分子量=420)

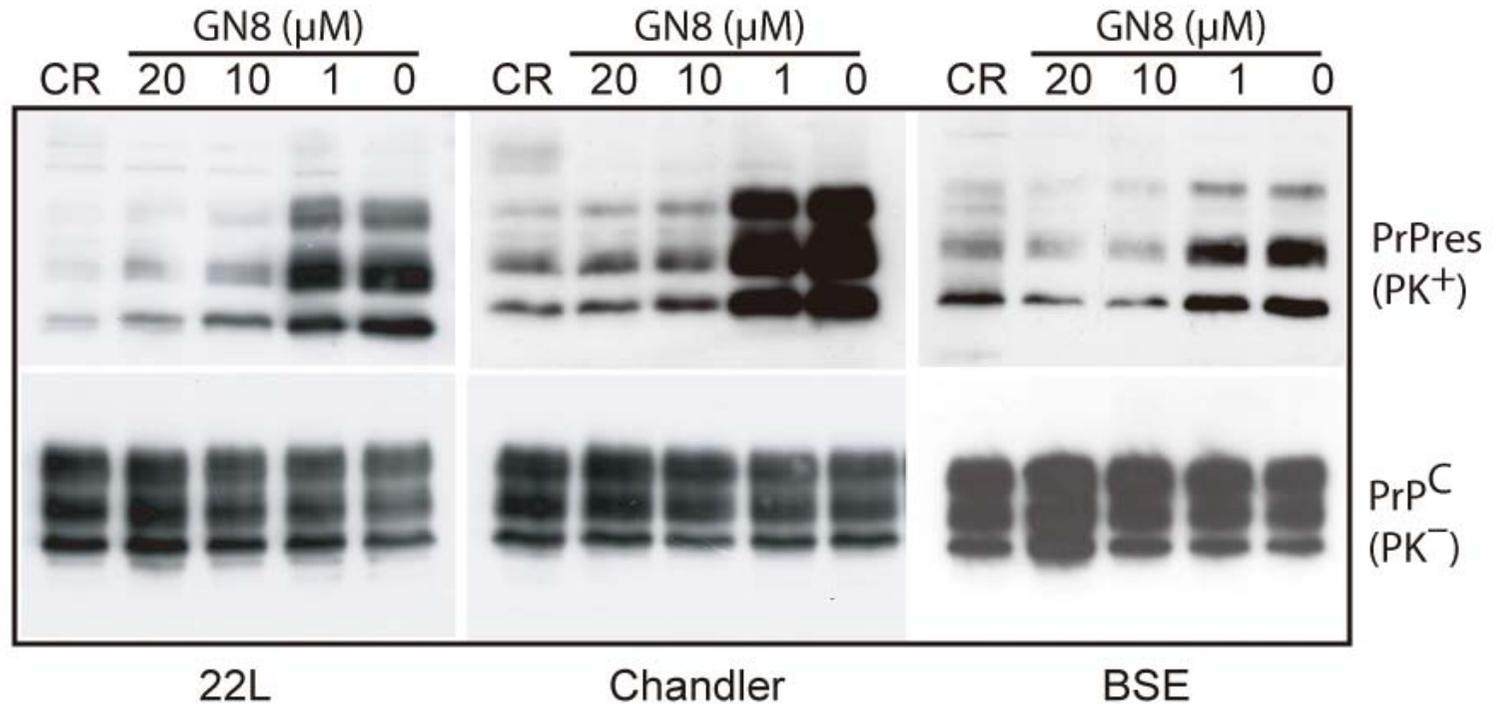
DM: DMSO 0.1%
PS: Pentosan polysulfate (10 μ g/ml)

GN8 (μ M)



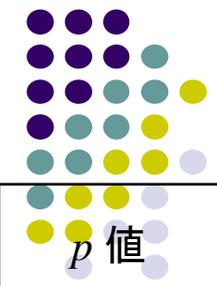
GN8は濃度依存的にPrP^{Sc}の産生を抑制し、IC₅₀=1.35 μ Mと求められた(n=4)。

複数のプリオン株に対する効果

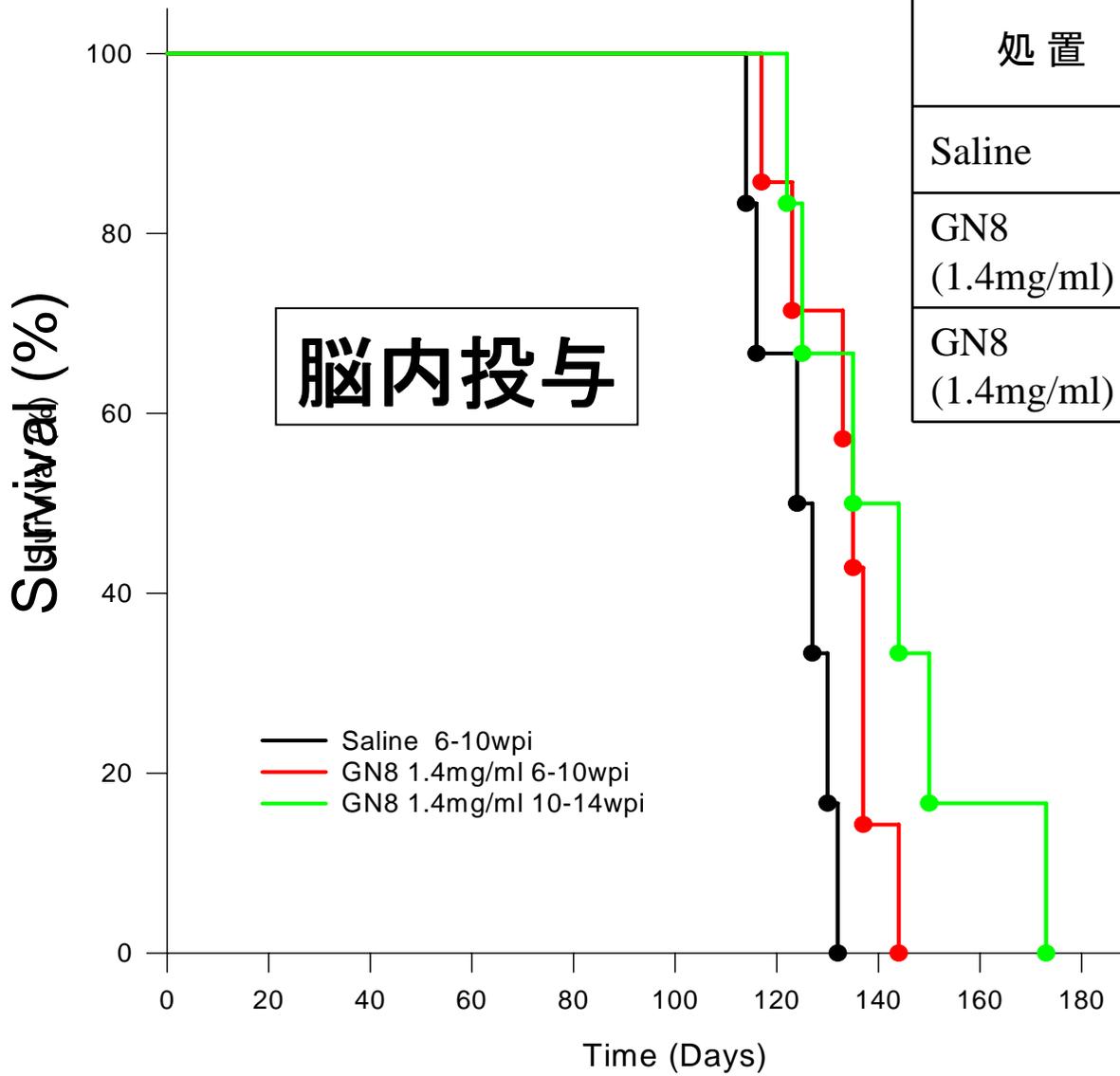


CR: Congo Red
(10 $\mu\text{g/ml}$)

Fukuoka-1株のほか、22L、ChandlerおよびBSE株持続感染GT1-7細胞においても、GN8はPrP^{Sc}の産生を効率的に抑制した。



in vivo におけるGN8の効果



処置	n	投与期間 (wpi)	生存期間 (days ± SD)	p 値
Saline	6	6-10	123.8 ± 7.4	
GN8 (1.4mg/ml)	7	6-10	132.3 ± 9.2	p=0.021
GN8 (1.4mg/ml)	6	10-14	141.5 ± 18.8	p=0.035

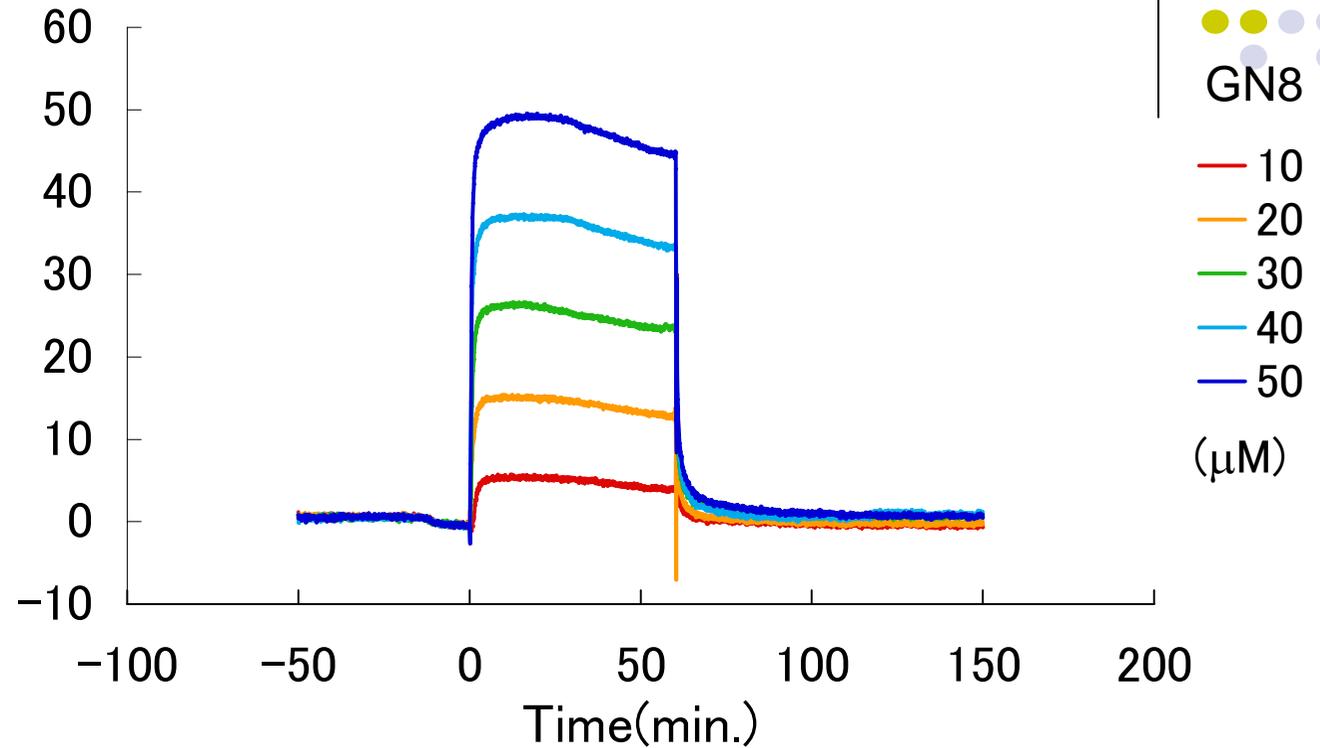
wpi: weeks post inoculation

Fukuoka-1株感染マウス脳乳剤をddYマウスに脳内接種後、浸透圧ポンプ(Alzet)を使ってGN8を脳内投与した。

in vitro における結合の測定

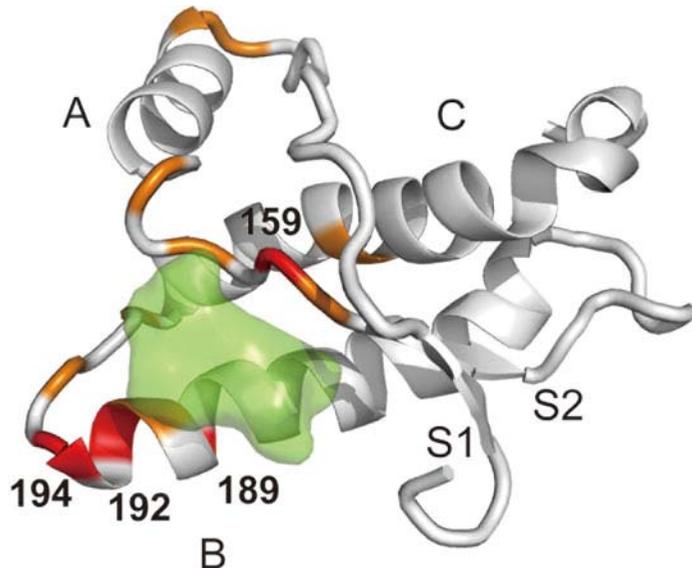
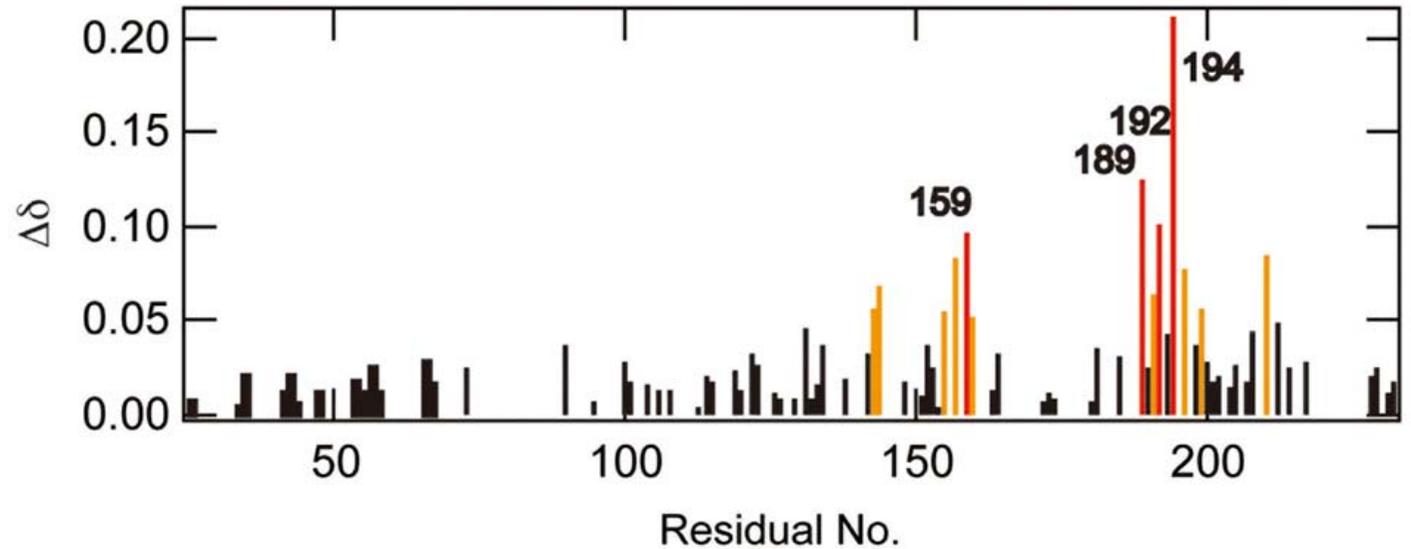
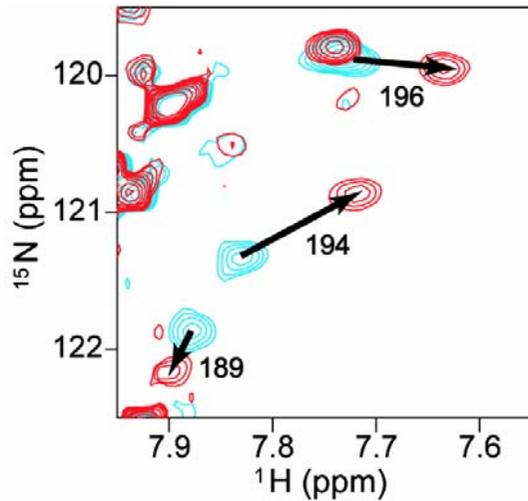


ビアコアT100



表面プラズモン共鳴現象を用いた物質間相互作用解析装置ビアコアT100により、リコンビナント・マウスPrP^CとGN8の結合を測定した。GN8はセンサーチップに固定化したPrP^Cと濃度依存的に結合した。(解離定数 = $3.9 \mu\text{M}$)

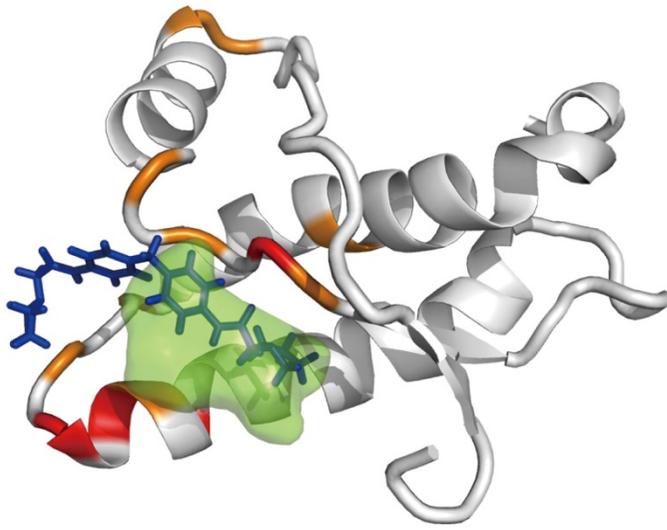
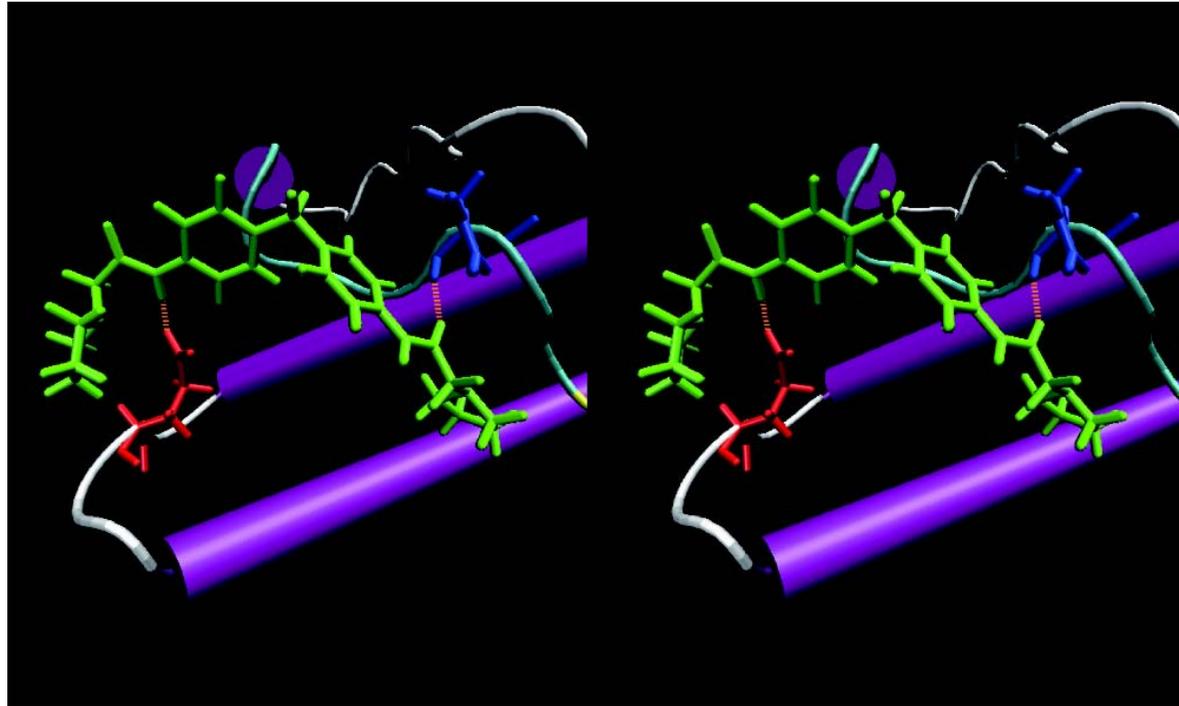
GN8とPrPの結合状態の推定①



シフトの見られたアミノ酸部位(赤・黄)

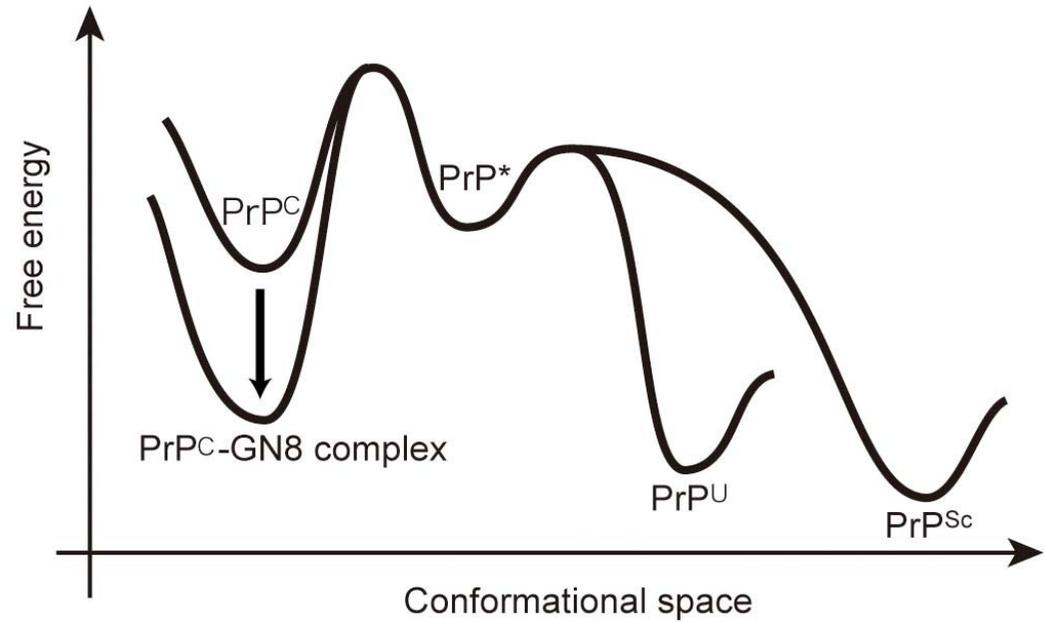
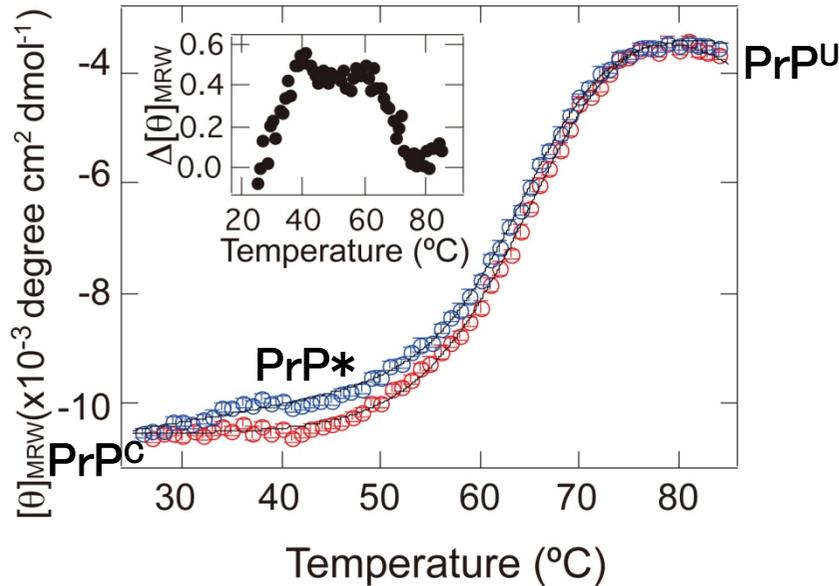
リコンビナントPrPにGN8を添加してNMRを測定するとVal189、Lys194、Glu196などのNMRシグナルが有意にシフトした。

GN8とPrPの結合状態の推定②



NMR化学シフト摂動法とコンピュータ・シミュレーションにより、上図のようにGN8(緑)が結合していると推定される。(青=Asn159、赤=Glu196、点線=水素結合)

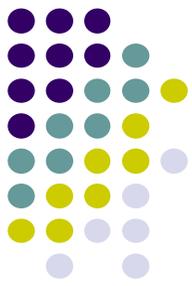
GN8の作用機構に対する考察



PrP^CにGN8を添加し(赤)、CDを測定すると、PrP*の出現が抑制される。

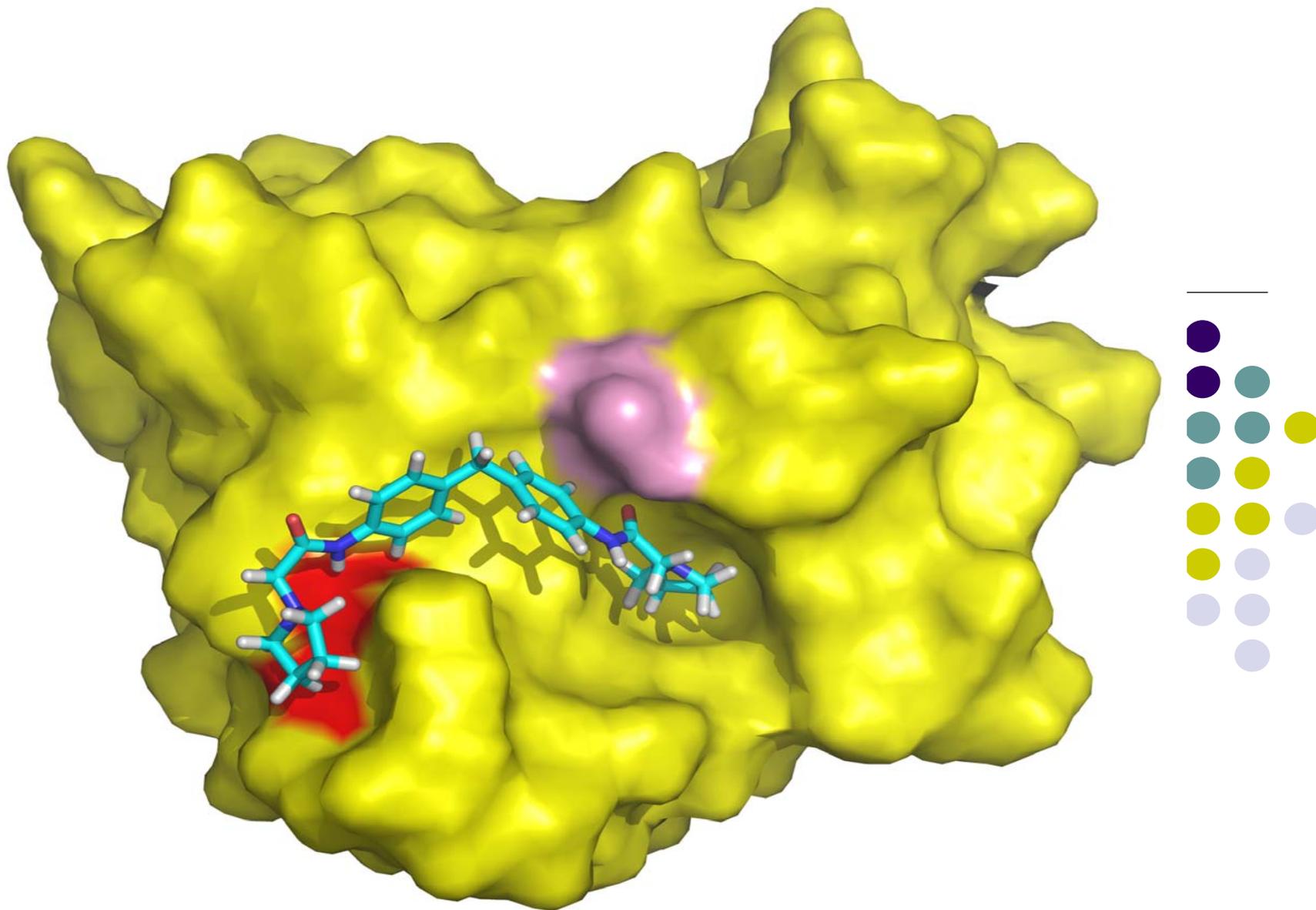
GN8は天然構造を安定化する(ケミカルシャペロンとして働く)ことにより、PrP^{Sc}への構造転移を抑制しているものと考えられる。

まとめ



- Fukuoka-1株のほか、様々なプリオン株のPrP^{Sc}の産生を抑制する低分子化合物 GN8 を同定した。
- GN8は、PrP^Cのポケット周辺の遅い揺らぎの局在する領域に結合する。
- GN8は天然構造を安定化する(準安定状態の出現を抑制するケミカルシャペロンとして働く)ことにより、PrP^{Sc}への構造転移を抑制しているものと考えられる。
- 本研究で同定したGN8はプリオン病治療薬のリード化合物として有用であり、今後、化学構造の最適化を行ってさらに有効な化合物を合成していく予定である。

GN8(青)は、正常プリオンタンパク質(黄色)のアスパラギン159(ピンク)及びグルタミン酸196(赤)に水素結合し、プリオンタンパク質の構造揺らぎを抑えることにより、異常構造への変換を抑制する。

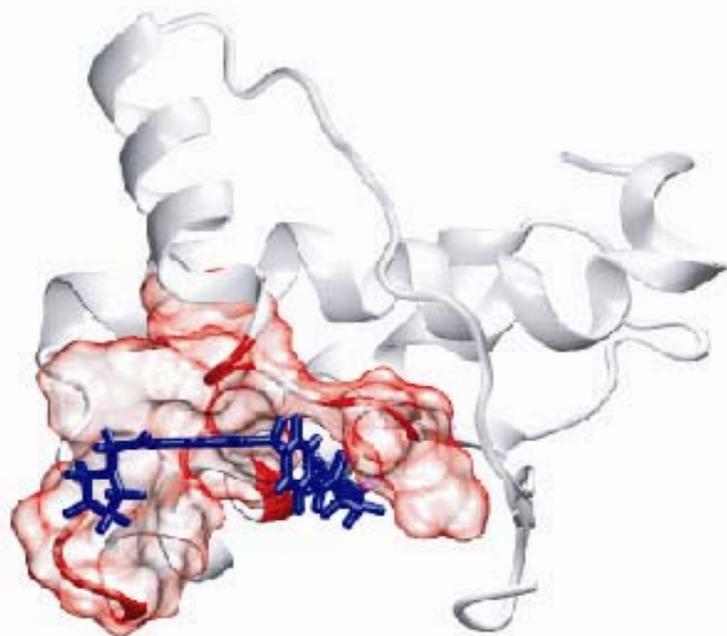


抗プリオン作用のメカニズム



GN8(青)が結合するアスパラギン159及びグルタミン酸196間の距離は、正常プリオンタンパク質(A)では15オングストロームである。一方、異常プリオン(B)では45オングストロームと広がる。GN8はこれらの距離を15オングストロームに固定することにより、異常型への構造変換を防いでいる。

A



B

