

論文の内容の要旨

論文題目

変異 NPC1 のフェノタイプを修正するステロール誘導体の創製、
ならびに NPC1 の新規ステロール結合部位の発見

氏名 大金 賢司

【序論】

タンパク質は、その合成過程において適切な三次元構造を形成する、すなわちフォールディングすることが、本来の機能を果たすのに必要である。このフォールディングの効率は、1 アミノ酸の変異によっても低下することがあり、多くの遺伝性・難治性疾患の原因となっている。ニーマンピック病 C 型はそのような疾患の 1 つである。ニーマンピック病 C 型の 95% は、エンドソームに局在する 13 回膜貫通型タンパク質 Niemann-Pick type C1 (NPC1) の変異により起こる。NPC1 は細胞外から LDL の形で取り込んだコレステロールを他のオルガネラへ輸送するのに必須なタンパク質であり、ニーマンピック病 C 型では特徴的なフェノタイプとしてコレステロールがエンドソームに蓄積する。NPC1 はその機能から予想されるように、ステロールと結合することが示されており、その結合部位は N 末端ドメインであると報告されている。N 末端ドメインに関しては結晶構造も解かれ、機能が明らかとなりつつあるが、コレステロールを NPC1 がどのように輸送するのか、未だ明確ではない。

代表的な変異として知られる I1061T (Ile¹⁰⁶¹→Thr) は直接 NPC1 の機能を損なうのではなく、フォールディング効率を低下させることで結果的に機能の欠損が起きることが示されている。NPC1 を含め膜タンパク質は、一般に小胞体 (ER) においてフォールディングし、ゴルジ体を経て目的地 (NPC1 の場合はエンドソーム) へと輸送される。一方で、フォールディング効率の低下した NPC1^{I1061T} 変異体は ER の品質管理機構により認識されて ER にとどまり、エンドソームには輸送されずに分解される。このようなフォールディング効率の低下に伴う局在異常および ER における分解の結果、エンドソームに存在する NPC1 が減少し、機能の欠損が起こる。

近年、リガンドに標的タンパク質のフォールディング効率を向上させる作用があることが明らかとなっており、そのような作用を示すリガンドは pharmacological chaperone (PC) と呼ばれる。前述の通り、NPC1 変異体はフォールディング効率低下の結果として機能低下が起きており、pharmacological chaperone の有用性が期待される。そこで本研究では、NPC1 変異体のフォールディング効率低下および機能を修正する小分子の創製を目的として設定した。

【本論】

(1) NPC1 変異体に対して pharmacological chaperone として作用するステロール誘導体の創製

Pharmacological chaperone (PC) 作用はリガンドの作用であることから、NPC1 に結合するステロールが PC になりうると考え、検証を行った。NPC1 は通常エンドソームに分布するが、I1061T 変異体は ER の品質管理機構を通過できないため、定常状態において ER 局在を示す。検討の結果、この変異体の局在は、25-hydroxycholesterol (25HC) で処理することで、WT 同様に LAMP1 陽性のエンドソーム局在へと変化することが明らかとなった (Fig. 1)。この局在変化 (局在異常の修正) を指標として構造展開を行うことで、高活性化したステロール誘導体を得ることに成功した (Fig. 2)。

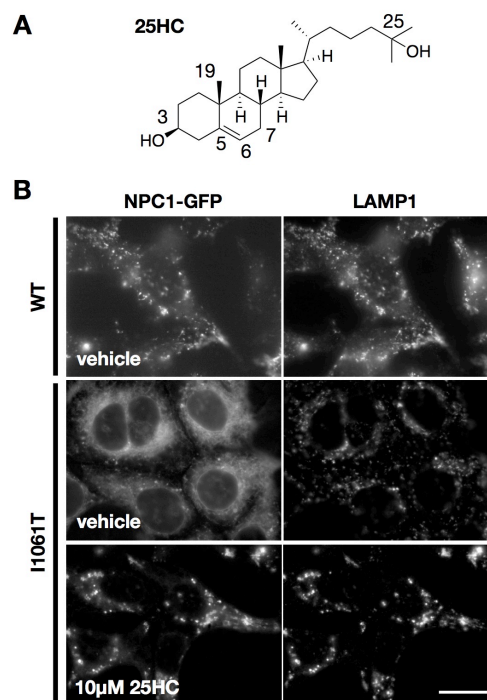


Figure 1. A. Structure of 25HC, showing relevant carbon number. **B.** Subcellular localization of WT and I1061T mutant NPC1-GFP, and effect of 25HC on I1061T mutant NPC1-GFP localization. Scale bar, 20 μm .

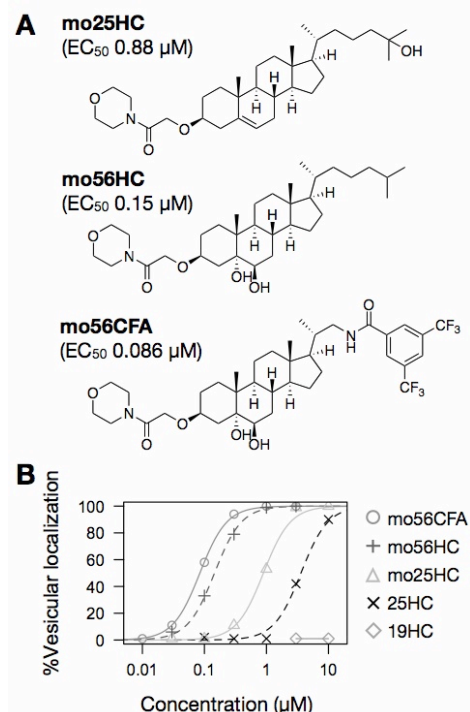


Figure 2. A. Structure and EC_{50} value of oxysterol derivatives. **B.** Dose-response curves of the oxysterol derivatives.

次に、ステロール誘導体が仮説通り PC として作用していることを示すため、NPC1 とステロール誘導体の結合を検証した。構造活性相関情報を基に創製した光親和性標識プローブを用いることで、NPC1 とステロール誘導体が結合することを確認した。さらに、ステロール誘導体が NPC1 変異体を安定化すること、および成熟を促すことを合わせれば、ステロール誘導体が NPC1 変異体に結合して PC として作用することで、変異体の局在異常を修正していると考えられる。

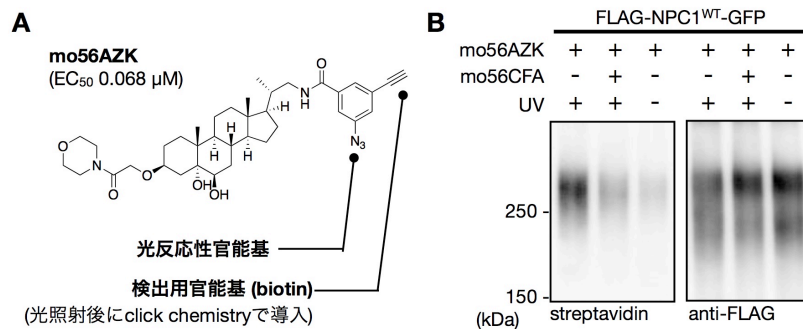


Figure 3. Direct binding between oxysterol derivatives and NPC1. **A.** Structure and EC₅₀ value of bifunctional photoaffinity probe mo56AZK. **B.** The probe mo56AZK specifically labels FLAG-NPC1-GFP.

得られた PC が NPC1 変異体の機能を回復させるか、I1061T 変異を持つ患者由来細胞において検討を行った。その結果、高濃度においては NPC1 阻害と見られるコレステロールの蓄積がみられるものの、1 μM 以下の濃度ではニーマンピック病 C 型の特徴であるコレステロールのエンドソームへの蓄積を軽減することが分かった (Fig. 4)。以上より、ステロール誘導体を PC として用いることで NPC1 変異体の機能低下を修正できることが示せたと言える。

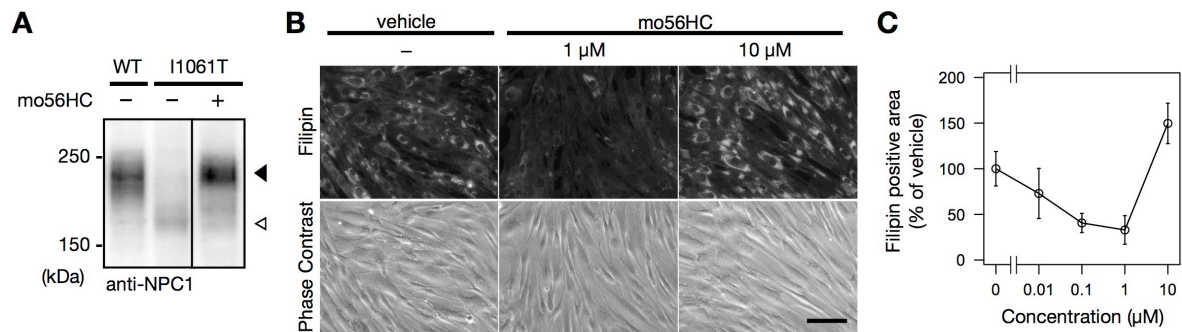


Figure 4. Functional rescue of patient-derived fibroblasts. **A.** Effects of mo56HC on expression level and band pattern of endogenous NPC1-I1061T mutant. The filled arrowhead indicates the mature form, and the open arrowhead indicates the immature form. **B.** Alleviation of intracellular cholesterol accumulation by mo56HC. To visualize accumulated cholesterol, filipin stain was performed. Calibration bar, 100 μm. **C.** NPC fibroblasts were treated with mo56HC as in (B), and the intracellular cholesterol accumulation was quantified. Error bar, standard error (n=12).

(2) NPC1 の新規ステロール結合部位の存在証明

構造活性相関研究を進める中で、得られた構造活性相関と既知のステロール結合部位である NTD の結晶構造の間に矛盾が見られることが分かった。このことから、PC 作用を示すステロール誘導体の結合部位は NTD ではなく新規なステロール結合部位である可能性を考え、NTD を欠失させた NPC1 (Δ NTD-NPC1) を用いて検証した。その結果、ステロール誘導体は Δ NTD-NPC1^{I1061T} に対しても PC 作用および安定化作用を示し、その誘導体間における活性の序列も full-length NPC1 に対するものと同じであった。さらに光親和性標識実験により、PC 作用を示すステロール誘導体が NTD には結合せず、 Δ NTD-NPC1 とは結合することを明らかにした (Fig. 5)。これらの結果より、NPC1 には NTD 以外にステロール結合部位が存在し、PC 作用を持つステロール誘導体はその第二のステロール結合部位を介して作用することが示せたと考えている。

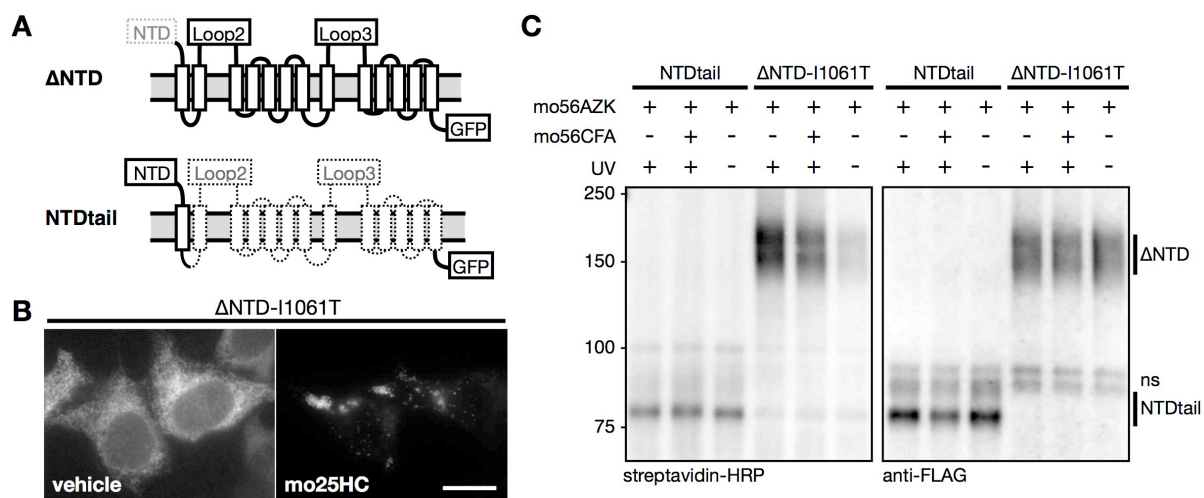


Figure 5. Dispensability of NTD for oxysterol derivative-mediated rescue of mutant NPC1 protein and existence of non-NTD sterol binding site. **A.** Schematic representation of the NTD-deleted NPC1 (Δ NTD) and membrane-anchored NTD (NTDtail). **B.** Subcellular localization of the Δ NTD-NPC1-GFP constructs (WT or I1061T mutant) with or without mo25HC (10 μ M). Scale bar, 20 μ m. **C.** Photoaffinity labeling experiments of Δ NTD and NTDtail NPC1. ns, nonspecific labeling/staining.

【結論】

本研究では、ニーマンピック病 C 型の原因となる変異 NPC1 のフェノタイプを修正するステロール誘導体の創製に成功した。得られた化合物はニーマンピック病 C 型に対する初の pharmacological chaperone である。これによりニーマンピック病 C 型の治療法として、低分子化合物で変異体のフォールディング効率を改善するというアプローチの可能性を示すことができたと考えている。

また、pharmacological chaperone の創製の過程で、ステロール誘導体がそれまでに知られていたステロール結合部位とは異なる結合部位を介して作用していることを見だし、プローブ化した誘導体を用いることで NPC1 に NTD 以外の第二のステロール結合部位があることを証明した。NPC1 のコレステロール輸送機構は徐々に解明されつつあるが、NPC1 が如何にしてエンドソーム内から細胞質あるいは他のオルガネラへと膜を隔ててコレステロールを輸送しているのか、未だ不明である。本研究で明らかとなった第二のステロール結合部位は、この膜を隔てた輸送に関わる基質結合部位である可能性がある。今後、この第二のステロール結合部位の機能面での解析を進めることで、NPC1 のコレステロール輸送の分子機序が明らかになると考えられる。