

厚生省
新薬開発研究費

低分子酵素阻害物質による
難病治療薬の開発研究

江 橋 班

平成元年度研究報告書

平成2年3月

研究報告書の作成にあたって

本年度は新薬開発研究の主旨に沿って、本研究班の眼目であったベスタチン及びESTの臨床における薬効判定の二重盲検試験に入った。その成果が待たれるところである。

この研究を通して明らかになったことは、筋ジストロフィーの自然経過について治療薬検定の指針となるような的確な資料が不十分であったことである。これはどうやら世界的な傾向であって、業績主義の欧米では、この点で我が国よりも杜撰であることは想像に難くない。意外なところに研究のアキレス腱があったわけである。筋ジストロフィー治療の現実性が乏しかった時代には、薬効判定の立場からの厳密な臨床観察及びテストとその統計学的取り扱いに真の意欲がわかなかつたとしても止むを得ないことであった。

この度、本研究班員の涙ぐましいまでの努力により、幾多のテストを並行させながら、多数の症例の数年にわたる経過が集計されたことは、今後の本症研究者に大きな福音となることは疑いない。

今回の報告に見られた、適切、簡潔なテストと統計的処理は、現代的な臨床試験の一つのモデルを確立したものであって、世界に誇るに足るものと考えられる。

この外にも診断法について、数多くの有意義な知見がもたらされたのも、本年度の特徴であり、その多くが我が国独自の開発である。臨床研究というものが本当の意味で我が国に根を下して来たということであろう。

平成2年3月

主任研究者 江橋節郎

目 次

I 分担研究報告

- 1) CANP 遺伝子のクローニングに関する研究 3
—CANP インヒビターの構造と機能—
東京都臨床医学総合研究所 鈴木 紘一 石田 重樹 榎森 康文
川崎 博史 西道 隆臣
青山学院大学理工学部 伊藤 尚
- 2) 細胞内 CANP の活性化とその阻害 7
東京都老人総合研究所 川島 誠一 林 昌美
- 3) CANP 阻害剤の合成11
東京理科大学理学部 向山 光昭 植木 正彬
大正製薬株式会社総合研究所 大関 正弘 花田 和紀 玉井 正晴
横尾 千尋 田名 見享 村田 充男
宮下さつき
- 4) プロリン含有ペプチド分解酵素とその阻害物質.....16
微生物化学研究所 青柳 高明 和田 孝雄 小川 慶治
小島 藤子 永井真知子 原田 滋子
- 5) MEL 細胞の機能とプロリルエンドペプチダーゼ21
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫 塚原 俊文 石浦 章一
- 6) E-64-C および EST の薬物動態24
—蛍光 HPLC によるマウス血清および筋肉中濃度の測定—
九州大学薬学部 大倉 洋甫 巢 文峰 甲斐 雅亮
- 7) CANP 阻害剤の一般薬理学的研究30
—表面筋電図中の呼吸運動関連成分の定量化に基づく筋機能評価法に関する基礎的研究—
東京慈恵会医科大学第二薬理学教室 福原 武彦 加藤 總夫 木村 直史
高野 一夫 塚元 葉子
- 8) 骨粗鬆現象における Cathepsin B の関与と E-64誘導体の効果37
徳島大学酵素科学研究センター 勝沼 信彦 二川 健 唐渡 孝枝
大正製薬総合研究所 花田 和紀 樋口 昭平 村田 光男
- 9) 哺乳類 C-タンパク質のアイソフォーム特異的モノクローン抗体の作成および
それを用いた筋病変に伴う C-タンパク質アイソフォーム変換の解析41
千葉大学理学部生物学科 丸山 工作 大日方 昂 小島 崇

- 10) jimpy マウス脳ミエリン局在の Ca 依在性プロテアーゼ活性の変動46
和歌山県立医科大学第二生理学教室 辻 繁勝
- 11) mdx マウスに対する bestatin の効果49
東邦大学医学部大橋病院第四内科 木下 眞男 岸 雅彦 栗原 照幸
根本 博之 日高 隆信
- 12) ベスタチン投与 mdx マウスにおける骨格筋組織所見53
国立療養所宇多野病院 西谷 裕 板垣 泰子 斎田 恭子
- 13) DMD 骨格筋 CT の経時的変化の検討57
東京大学医学部脳研病理 中野 今治
国立療養所下志津病院 清水 潤 松村喜一郎
東京大学医学部脳研神経内科 川井 充 国本 雅也
- 14) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程61
—CT による経時的評価—
国立療養所東埼玉病院内科 石原 傳幸 青柳 昭雄 儀武 三郎
国立療養所東埼玉病院リハビリテーション科 里宇 明元 原 行弘 江端 広樹
近藤 国嗣
- 15) 筋ジストロフィー症の血清 LAP について65
国立療養所兵庫中央病院 高橋 桂一
国立療養所兵庫中央病院研究検査科 益田 喜信 森鼻 文明 小林 浩子
岡 昭夫 梅枝 孝之
- 16) ヒト血清中の自己免疫筋抗原 (SE-antigen) の測定68
国立精神・神経センター武蔵病院 春原 経彦
国立精神・神経センター神経研究所 古川 昭栄 里吉栄二郎
- 17) 骨格筋ミオシン軽鎖測定のためのラジオイムノアッセイ法のキット化の試み71
東京大学医学部第三内科 矢崎 義雄 永井 良三 加藤 祐之
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫
- 18) 当院において EST 服用を開始した一症例の経過74
—正常児との比較フォローを中心に—
国立療養所西別府病院 三吉野産治 山田みどり 江田伊勢松
- 19) EST 投与 Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の臨床経過：77
—6年目の報告—
新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正 桑原 武夫 湯浅 龍彦
国立療養所新潟病院 山崎 元義 近藤 隆春
- 20) Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチン長期投与の握力に対する影響81
国立療養所箱根病院 村上 慶郎 岡崎 隆 林 英人
梁 正淵

21) Duchenne 型筋ジストロフィー症幼児例における運動機能	84
—ベスタチン二重盲検例を中心に—	
東京女子医科大学小児科	福山 幸夫 大沢真木子 斎藤加代子
	平沢 恭子 炭田 沢子 池中 晴美
	新井 ゆみ
22) Duchenne 型筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果に関する研究	87
—年少児及び年長児に対する二重盲検試験の比較—	
東邦大学医学部大橋病院第四内科	木下 眞男
国立精神・神経センター神経研究所	里吉栄二郎
国立療養所箱根病院	村上 慶郎
国立療養所西別府病院	三吉野産治
東京女子医科大学小児科	福山 幸夫
国立療養所宇多野病院	西谷 裕
国立療養所兵庫中央病院	高橋 桂一
II 低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班分担研究者一覧	93

分担研究報告

CANP 遺伝子のクローニングに関する研究 —CANP インヒビターの構造と機能—

鈴木 紘 一*

研究協力者 石田 重樹* 榎 森 康 文* 川 崎 博 史*
西 道 隆 臣* 伊 藤 尚**

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の内存性インヒビター (CANP インヒビター) は CANP に特異的なタンパク性インヒビターである。昨年までに、ウサギ CANP インヒビターに関し、cDNA のクローニング及びその発現実験を行って、CANP 阻害活性領域及び阻害機構を検討した^{1,2)}。その結果、CANP インヒビターは分子内に 3~4 回の繰り返し構造を持ち、その中央に存在する TIPPTYR 配列周辺が基質と競合的に CANP 分子と相互作用し、その活性を阻害することが明らかになった^{3,4)}。本年度は、ラットを材料に用いて、cDNA 及び遺伝子 DNA の単離と構造解析を行い、さらに詳細な CANP インヒビターの構造・活性相関等を明らかにした。

実験材料及び方法

既に報告したウサギ CANP インヒビターの cDNA を用いて、 λ gt 10 ベクターに組み込んだラット肝 cDNA ライブラリーをスクリーニングしてラット CANP インヒビターの cDNA クローンを単離した。得られたクローン of cDNA 挿入断片をプラスミドベクターにサブクローニングし、ジデオキシ法によってその塩基配列を解析し、その配列からラット CANP インヒビターの全アミノ酸配列を決定した。

ラット染色体 DNA ライブラリーを λ EM-BL 3 をベクターに用いて構築し、上述したラット CANP インヒビターの cDNA をプローブに用いてスクリーニングしてラット CANP インヒビターの遺伝子クローンを得た。数百塩基対に細分した cDNA 断片をプローブとして得られた遺伝子クローン of サザンハイブリダイゼーション分析を行って、各クローンに含まれる cDNA 領域を決定した後、エキソンを含む DNA 断片をプラスミドベクターを用いたショットガン法によって得た。続いてその塩基配列の解析からラット CANP インヒビターの遺伝子構造を決定した。

結果および考察

1) ラット CANP インヒビターの構造

ラット CANP インヒビターの全アミノ酸配列を cDNA の塩基配列から明らかにした。その結果、ラット CANP インヒビターは、603 アミノ酸残基からなり、ウサギ CANP インヒビターと同様に分子内に約 140 残基からなる繰り返りを 4 回含んでいた。ラット・ウサギ間の相同性 (図 1) は、全体にわたって存在していたが、アミノ酸の一致は 64% で、これは標的プロテアーゼ (CANP) の哺乳動物間の相同性 (約 95%) より低かった。しかも、N 末端領域に 2 ケ所、第 2 と第 3 の繰り返し単位間に 1 ケ所の計 3 ケ所に数十アミノ酸残基の欠失が見られ、種間の相違が大きなタンパク質であることがわかった。しかし、反応部位である TIPPTYR 周辺の配

* 東京都臨床医学総合研究所
** 青山学院大学理工学部

列 (図1のA I~A IV) 及びその両側の α -ヘリックス領域 (α N-I~IV及び α C-I~IV) は同一性は高く、基本構造は互いによく類似しており、これらの同一性の高い領域がCANPインヒビターの機能に重要であることが確認された。このように、CANPインヒビターは動物種間の差は全体では大きいものの、反応部位周辺の配列はよく似ており、昨年報告した合成ペプチドCANPインヒビター、及び、それに官能基を付加した誘導体は種を超えて有効に作用すると考えられた。現在、ここで得られた反応部位周辺のアミノ酸配列も考慮して、さらにCANPに特異的でより強い阻害剤の合成と活性の検討を進めている。

2) CANPインヒビター遺伝子の単位と構造解析

CANPインヒビターには阻害単位を4個含み、肝臓、心臓などの多くの臓器に分布する一

般臓器型と、赤血球型と呼ばれる一般臓器型のN末端領域を欠き、阻害単位を3回含む分子量の小さい型の2種が存在するが、この生理的意味や生成機構は不明である。また、CANPインヒビターの発現量は臓器によって異なっているが、その遺伝子発現の制御機構に関する知見は全くない。これらの問題の解決や種々の疾病の病態と関係しているCANP活性の人為的制御等を行う上で、CANPインヒビターの遺伝子に関する情報は必須である。これを目的としてラットCANPインヒビター遺伝子の単離と構造解析を行った。

cDNAをプローブに用いて単離した6個の遺伝子クローンは図2および図3に示したようにそれぞれcDNAの数百塩基対に相当する領域を含んでいることが明らかになった。各クローンの挿入断片の長さ(10数kbp)とcDNAとの対応を考えると、CANPインヒビター遺伝子

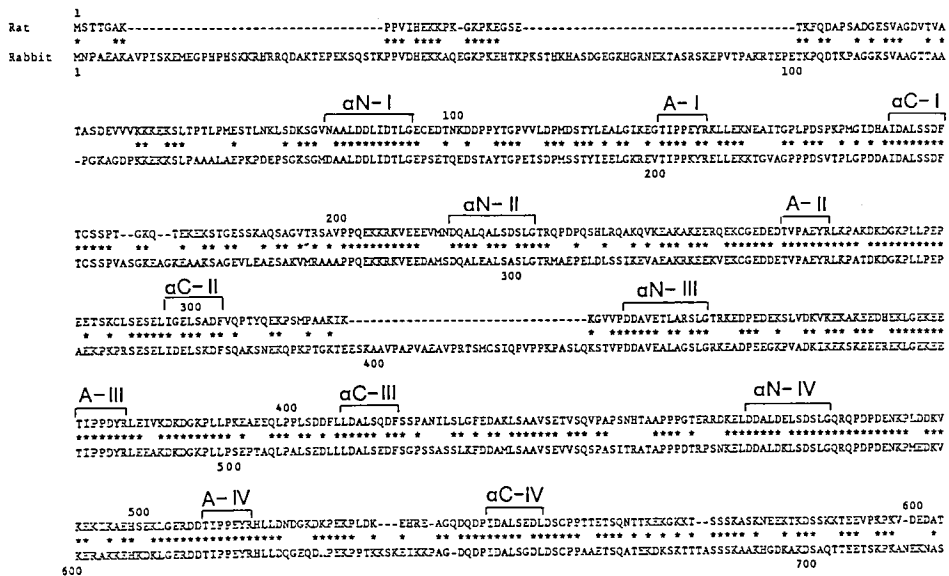


図1 ラット及びウサギCANPインヒビターのアミノ酸配列の比較

同じ残基は星印を2者の配列の間に示した。-は欠失を示す。A-I~IVは反応部位の中心にあるTIPPX_YR配列を、 α N-I~IV及び α C-I~IVはその両側に存在する α -ヘリックス領域を示している。

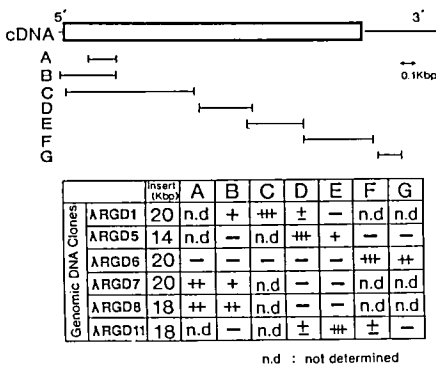


図2 得られた6個の遺伝子クローン (λRGD1, 5, 6, 7, 8, 11) とそれにハイブリダイズするcDNAの領域、上半分にプローブに用いたcDNA断片の領域を示し、下半分にサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。+〜###は強度を示す。

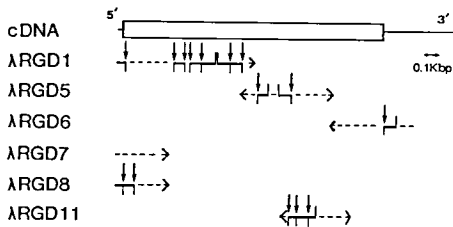


図3 遺伝子クローンとcDNAとの対応。横矢印(←→)は図2の結果から予想される各クローンが含むcDNAの領域を表す。その中で実線部分は塩基配列の解析から確認された部分を示し、破線部分は未だ塩基配列の解析が済んでいない部分を示す。下向矢印は塩基配列の解析から明らかになったエクソン-イントロン接合部位を示す。

は少なくとも5万塩基対の大きさを持ち、おそらく多くのエクソンに分割して存在すると考えられた。

次に、各クローンに含まれるエクソンを同定するため、cDNAとハイブリダイズするサブクローンの塩基配列の解析を行った。現在までに約半分の遺伝子構造が明らかになっており、こ

の段階で得られた知見は以下のようにまとめることができた。

① CANP インヒビター遺伝子は少なくとも5万塩基対の範囲に及び、全体で20個以上のエクソンから構成されている。

② 4個の繰り返し(阻害)単位はそれぞれ4個のエクソンからなり、エクソン-イントロン接合部位は単位間で相同な位置に存在する。したがって、4回の繰り返しは遺伝子重複によって生じたと考えられる。

③ ラット CANP インヒビターに存在する3カ所の欠失領域(図1)は、いずれもエクソン-イントロン接合部位に存在した(図4)。このことから、ウサギには存在する3カ所の領域をコードするエクソンがラットでは用いられなくなったため欠失が生じた可能性が強く示唆された。

④ 赤血球型 CANP インヒビターのN末端の3残基前にエクソン-イントロン接合部位が存在した。このことは、この上流のイントロン中に赤血球特異的な転写を行うプロモーターが存在する可能性を示唆している。

現在、残された遺伝子構造の解明と CANP インヒビターの転写制御領域の構造と機能の解析を行っている。また、われわれが発見した骨格筋に特異的かつ多量に発現している nCANP のタンパク質レベルでの同定を行い、骨格筋における機能の解析を続けている^{5,6)}。

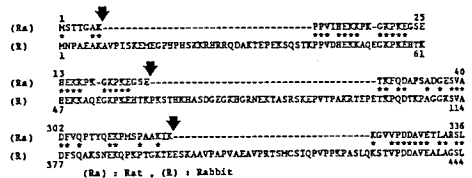


図4 ラット CANP インヒビターに存在する3カ所の大きな欠失領域(---)とエクソン-イントロン接合部位(下向矢印)。

文 献

- 1) Enori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: J. Biol. Chem., 263: 2364-2370 1988.
- 2) Kawasaki, H., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: J. Biochem., 106, 274-281 1989.
- 3) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Ishida, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: "Intra Cellular Protein Catabolism," (ed by, Katunuma, N. and Kominami, E.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 1989, pp. 345-352.
- 4) Suzuki, K. and Ohno, S.: Cell Structure and Function, 15: 1-6 1990.
- 5) Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: J. Biol. Chem., 264: 20106-20111 1989.
- 6) Sorimachi, H., Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Saido, C.T., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: Biol. Chem. Hoppe-Syler, 1990, in press.

