

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2年度研究報告書

平成3年3月

研究報告書の作成にあたって

今年は、五年間に亘った「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」班の最終年度であり、ベスタチン及びEST、特に後者の二重盲検法による薬効判定に重点がおかれた。ジストロフィン発見によって招来された筋ジストロフィー研究の新時代において本研究班を推進することの意義は、前回及び前々回の報告書冒頭に記された通りであるが、ジストロフィン研究の進展に伴い、遺伝子欠損状況、及びそれと病状との関係が複数多岐に亘り、遺伝子治療への道は当初考えられた程平坦でないことが明らかになりつつある。他方、この線に沿った我々の希望が、いつの日か実現することもまた疑いのないところである。このような情勢の下においては、筋崩壊阻止という対症的治療法の追求は、却って緊急性を増大したというべきであろう。

今回の二重盲検法による結果の厳密な解析は更に時間を要するが、この様な解析を必要とすること自体、上記2物質が、実地に応用する対症療法薬としては理想から程遠いものであることを示している。しかし、今回の判定に際してとられた調査方法は、統計学的、臨床医学的な規準と、現場における実務的な要請とを見事に調和させたものであり、従来薬効判定法が、瑣瑣にすぎて現実性に乏しく、結果として有効例を見落した場合もありうることを深く反省するものである。本研究班の成果に更に改良を加えることにより、筋ジストロフィーのみならず、広く難病一般の治療における薬効判定の標準モデルが確立されることが期待される。

平成3年3月

主任研究者 江橋節郎

目 次

I 分担研究報告

- 1) マルチキャタリティックプロティナーゼの構造と機能..... 3
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫 石浦 章一 田川 一彦
野村 泰広 安楽 治美
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部 鈴木 紘一
- 2) 筋ジスマウスにおけるジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 活性の動態 7
微生物化学研究所 青柳 高明 和田 孝雄 小島 路子
永井真知子 原田 滋子
実験動物中央研究所 斉藤 宗男
- 3) CANP 遺伝子のクローニングに関する研究11
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部 鈴木 紘一 西道 隆臣 川崎 博史
羽田 明子 大野 茂男
- 4) 細胞の増殖・分化と CANP13
東京都老人総合研究所 川島 誠一 中村 愛
- 5) CANP 阻害剤の合成16
東京理科大学理学部 向山 光昭 植木 正彬
大正製薬(株)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
- 6) E-64-CおよびESTの薬物動態19
—LC/MSによる精密計測の基礎研究—
九州大学薬学部 大倉 洋甫 甲斐 雅亮 高橋 利明
- 7) CANP 阻害剤の一般薬理学的研究23
—筋ジストロフィー疾患モデル動物筋電図の定量的スペクトル解析に基づく薬効評価法—
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) 骨吸収疾患モデルに対するE-64誘導体の効果26
徳島大学酵素科学研究センター 勝沼 信彦 唐渡 孝枝 二川 健
大正製薬(株)総合研究所 村田 充男 玉井 正晴 花田 和紀
横尾 千尋
- 9) ジストロフィンの分子形態.....28
千葉大学理学部生物学科 丸山 工作 佐藤 治

| | |
|--|--|
| 10) ミエリン膜局在の Ca の依存性プロテアーゼ活性に対する各種脂質の影響 | 30 |
| 和歌山県立医科大学第二生理学教室 辻 繁勝 | |
| 11) mdx mouse に対する bestatin の週 2 回間歇投与の効果 | 33 |
| —電気生理学的及び病理学的検討— | |
| 東邦大学医学部第四内科 | 木下 眞男 岸 雅彦 吉村 牧子 栗原 照幸 根本 博之 日高 隆信 |
| 12) DMD における筋障害の進行過程 | 37 |
| —CT による 2 年間の経時的評価 | |
| 国立療養所東埼玉病院 | 石原 傅幸 里宇 明元 江端 広樹 道免 和久 青柳 昭雄 儀武 三郎 |
| 13) 培養神経細胞に及ぼす自己免疫筋抗原 (SE-antigen) の作用の検討 | 41 |
| 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 |
| * 岐阜薬科大学分子生物 | |
| 14) 比較的良好な経過を示したいわゆる Duchenne 型筋ジストロフィーの臨床特徴 | 43 |
| 東京女子医科大学小児科 | 福山 幸夫 大沢真木子 池谷紀代子 平沢 恭子 新井 ゆみ 須加原信子 池中 晴美 炭田 沢子 斎藤加代子 宍倉 啓子 鈴木 暁子 |
| 国立精神・神経センター神経研究所機能研究部 | 小沢鉄二郎 |
| 15) ベスタチンの Duchenne PMD 投与に対する免疫グロブリンの変動 | 46 |
| 国立療養所箱根病院 | 村上 慶郎 岡崎 隆 西岡 昌紀 |
| 16) EST 投与対象の 1 症例における臨床的背景について | 48 |
| 国立療養所西別府病院 | 三吉野産治 |
| 八代総合病院小児科 | 山田みどり |
| 17) サンドイッチ法による骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発とキット化の試み | 52 |
| 東京大学医学部第三内科 | 矢崎 義雄 永井 良三 加藤 裕久 |
| 国立精神・神経センター神経研究所 | 杉田 秀夫 |
| 18) Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の新しい理学的評価法 | 56 |
| —その意義と問題点— | |
| 東京大学医学部脳研病理 | 中野 今治 |
| 国立精神・神経センター神経研究所 | 杉田 秀夫 |
| 国立療養所東埼玉病院 | 石原 傅幸 熊井 初穂 浅野 賢 |
| 国立療養所下志津病院 | 藤村 則子 土佐 千秋 石沢 真弓 松村喜一郎 |
| 新潟大学脳研究所神経内科 | 桑原 武夫 |
| 国立療養所新潟病院 | 近藤 隆春 水野 京子 山崎 元義 |
| 国立療養所医王病院 | 崎田 朝保 本家 一也 武田 洋子 |
| 国立療養所南九州病院 | 幸福 圭子 福永 秀敏 |
| 大正製薬㈱開発部 | 藤田 繁 青木 寛 篠 由美子 |

| | |
|--|-----------------|
| 19) EST の Duchenne 型筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究 | 58 |
| —Scalographic analysis による薬効判定法— | |
| 国立療養所東埼玉病院 | 石原 傳幸 |
| 東京医科歯科大学難治疾患研究所 | 佐久間 昭 |
| 東京大学医学部脳研病理 | 中野 今治 |
| 国立療養所新潟病院 | 山崎 元義 |
| 国立療養所医王病院 | 本家 一也 |
| 国立療養所南九州病院 | 福永 秀敏 |
| 新潟大学脳研究所神経内科 | 宮武 正 |
| 国立精神・神経センター神経研究所 | 杉田 秀夫 |
| 大正製薬㈱開発部 | 藤田 繁 青木 寛 篠 由美子 |
| 20) デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー症に対する EST の臨床効果 | 64 |
| —二重盲検試験結果報告— | |
| 新潟大学脳研究所神経内科 | 宮武 正 山崎 元義 |
| 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 | 69 |

分担研究報告

マルチキャタリティックプロテイナーゼの構造と機能

杉田秀夫*

研究協力者 石浦章一* 田川一彦* 野村泰広*
安楽治美* 鈴木紘一**

はじめに

マルチキャタリティックプロテイナーゼ (MCP) はインゲンシン、プロテアソームとも呼ばれる細胞質中の高分子量タンパク分解酵素で、サブユニット 20 数個から成り立つ巨大分子である。その特徴の 1 つは、多くの活性部位を持つことで、Arg の C 末端を水解するトリプシン活性や Tyr の C 末端側を水解するキモトリプシン活性をあわせ持つことが知られている¹⁾。

今回、我々は CANP 阻害剤として開発された E-64 アナログ並びに FD-056 誘導体²⁾の一部が MCP 活性を阻害することを見出した。また、活性部位がサブユニットに分散しているのか、という点についても若干の知見を得たので報告する。

実験方法

(1) MCP の精製

MCP は従来の方法によって均一に精製した。方法は、硫酸沈殿、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、G-4000 によるゲルろ過、並びにブルーセファロースである。材料は、ヒト赤血球、酵母ともに新鮮なものを用いた。

(2) 阻害活性の測定

ヒト赤血球 MCP を用い以下のように阻害活性を測定した。MCP 50 unit と阻害剤 (DMSO に可溶化し、DMSO で希釈したもので、DMSO の最終濃度は 2% 以下とした) を加え、37°C 30

分間インキュベートした。5% SDS にて反応を停止させた後、遊離したアミノメチルクマリンを蛍光光度計にて定量した。

結果並びに考察

表 1 に FD-056 誘導体の阻害効果を示す。MCP 活性はトリプシン型 (Boc-Leu-Arg-Arg-MCA, BLRR)、キモトリプシン型 (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, SLLVY) 及びメチオニンエンドペプチダーゼ型 (Z-Val-Lys-Met-MCA, ZVKM) に分けて測定したものである。また比較のため、細胞質酵素の代表例の 1 つであるプロリルエンドペプチダーゼ³⁾ の値も示してある。これらロイシナル誘導体は低濃度で MCP のキモトリプシン活性を抑制することがわかる。最も効果があったのは Ac-Asp (OB₂l)-Glu (OB₂l)-Leu-H で、IC₅₀ は 1 μM 以下であった。興味ある点はメチオニンエンドペプチダーゼ活性もこれら化合物で阻害されることで、トリプシン活性には全く影響がないことと

表 1 FD-056 類縁体 (F-64 アナログ) による MCP と PEP の活性阻害(1)
Leu アナログの阻害活性は IC₅₀(μM) で表してある。

| Reagent | SLLVY | BLRR | ZVKM | PEPase |
|--|-------|------|------|--------|
| Ac-Asp(OB ₂ l)-Glu(OB ₂ l)-Leu-H | 0.80 | >100 | 0.71 | 15 |
| Z-Asp(OB ₂ l)-Glu(OB ₂ l)-Leu-H | 0.66 | >100 | 2.1 | >100 |
| Ac-Asp(OMe)-Glu(OB ₂ l)-Leu-H | 2.5 | 32 | 5.2 | 76 |
| Ac-Asp(OB ₂ l)-Glu(OMe)-Leu-H | 5.4 | >100 | 27 | 42 |
| Ac-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Leu-H | 20 | >100 | 6.4 | 130 |

* 国立精神・神経センター神経研究所

** 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究所

好対照を示した。この値は CANP に対する値よりも小さく、CANP よりも MCP により強く作用する可能性が考えられた。

次に、ロイシナル部分を他のアミノ酸に置換した化合物群の作用を検討した(表2)。ここでは表1よりも強力な MCP 阻害物質は見つからなかったが、プロリナルを持つ物質がプロリルエンドペプチダーゼを特異的に阻害するという結論を得た。IC₅₀ は 52 μM とかなり強力な阻害物質であることが判明した。

昨年来、CANP インヒビター(カルパスタチン)の活性部位のアミノ酸数個と E-64 の中心となっているエポキシコハク酸を結合させてより特異的な CANP 阻害剤を合成する計画が進められている²⁾。本年度はこれら CA シリーズの阻害剤が MCP を阻害するかどうか検討したところ、Tyr-Arg (NO₂), Pro-Pro, Tyr-Arg,

Thr-Ile の4種のペプチドを含む阻害剤は全く MCP を阻害しないことが判明した。

次に、MCP のどのサブユニットに活性が存在するかを明らかにするため、サブユニットのクローニングを行った⁴⁾。材料は酵母を用い genomic DNA のクローニングを行った⁵⁾。図1に、3つのサブユニット Y 7, Y 8, Y 13 の推定1次構造を示す。3サブユニット共に約30%のホモロジーを示し共通の祖先の存在が示唆された。しかし、プロテアーゼ特有の配列は見出せなかった。

これらサブユニットの重要性を検討するため、遺伝子破壊を行った⁶⁾。これらの遺伝子を URA 3 遺伝子で分断し生じた diploid から胞子を取り出し生育を観察したところ、Y 7 及び Y 8 を分断すると全く生育できなかった。このことより、Y 7, Y 8 遺伝子産物は酵母の生育に重要な役割をはたしていることが明らかとなった。一方、Y 13 遺伝子を破壊した半数体は一世代が正常の1.2倍と少々遅いが生育を見た。そこで Y 13 遺伝子破壊体(Y 13-D)と正常(N)から MCP を精製したところ、Y 13-D では分子量 29 KD のバンド1本が欠けていることが明らかとなった。これは、Y 13 の理論サブユニット分子量 28,700 と一致した(図2)。

そこで次に Y 13-D 酵素の作用について検討した。まず MCP の作用と考えられる ATP 依存性タンパク分解活性を見たところ、N 及び Y 13-D 共にタンパク分解に差がないことが判明した(表3)。人工基質に対する活性もほぼ同じ

表2 FD-056 類縁体による MCP と PEP の活性阻害(2)

表1で Leucinal の代わりに種々のアミノ酸のアルデヒドを導入したもの。Prolinol が PEP の強い阻害剤であることがわかる。値は IC₅₀ (μM)。

| Reagent | SLLVY | BLRR | ZVKM | PEPase |
|-------------------------------|-------|-------|------|--------|
| Boc-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-H | 1.5 | 54 | 2.7 | 49 |
| -Ile-H | 5.4 | >100 | 6.0 | 140 |
| -Val-H | 5.4 | >100 | 6.0 | 87 |
| -Phe-H | 3.2 | >100 | 8.3 | 320 |
| -Met-H | 9.1 | >100 | 7.6 | 0.36 |
| -Ala-H | 23 | >100 | >100 | >1000 |
| -Pro-H | >100 | >1000 | 1000 | 0.052 |
| -Gly-H | >100 | >1000 | >100 | 14 |

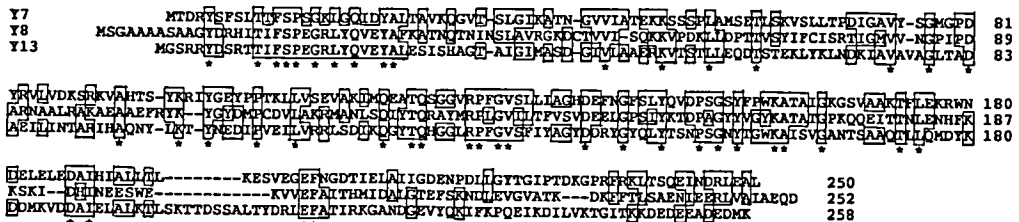


図1 酵母 MCP の3つのサブユニットの推定1次構造

3つのサブユニットに共通なものには*, また共通シークエンスは囲ってある。

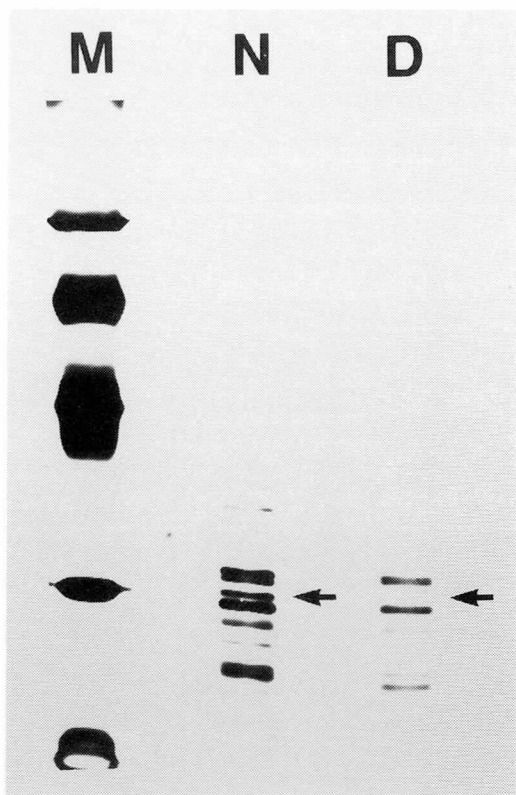


図2 精製した酵母 MCP (12% SDS)
 M, マーカー (96 k, 67 k, 42 k, 30 k, 21.5 k)
 N, 正常株
 D, Y 13-D 株
 矢印のサブユニットが Y 13 がコードするもの。

表3 酵母エキス中の ATP 依存性タンパク分解活性基質はカゼイン, BSA 共に ¹⁴C ラベルしてあるものを用いた。活性は抽出液 mg 当たりの TCA 可溶性部分のカウントで表現してある。

| Substrate | Non-disruptant | | Y13-disruptant | |
|-----------|----------------|--------|----------------|-------|
| | -ATP | +ATP | -ATP | +ATP |
| Casein | 9,849 | 12,111 | 8,825 | 9,376 |
| BSA | 4,818 | 3,571 | 1,848 | 2,116 |

cpm/mg

であったが, Y 13-D では予想に反して ZVKM, SLLVY 活性が上昇していることが明らかになった (表 4)。SLLVY についてはタンパク質当たり 15 倍もの比活性が観察された。そこで, MCP に特徴的に見られる SDS による活性化を観察したところ, N では顕著な活性化が見られたが, Y 13-D では活性化能が低く, Conformation がもともとおかしい可能性が指摘された (図 3)。従来より精製段階が上がるにつれて活性化に必要な SDS 濃度が低下していく傾向にあったが, これは精製に伴う酵素の変性と考えられている。本実験によって Y 13-D の MCP は 20 数個のサブユニットのうち 1 個を欠くものであるがこの欠失によって特殊な活性がなくなることはないこと, 逆に変性することによって活性化されることが発見された。この事実か

表4 N と Y 13-D の基質特異性の検索。基質は 0.1 mM (DMSO 1%) の条件で測定した。値はタンパク質当たり換算してある。

| | N | D | D/N |
|-------------------------|------|------|------|
| Boc-Leu-Arg-Arg-MCA | 4.37 | 4.65 | 1.07 |
| Boc-Val-Leu-Lys-MCA | 3.70 | 1.28 | 0.35 |
| Suc-His-Gln-Lys-MCA | 0.27 | 0.16 | 0.58 |
| Suc-His-His-Gln-MCA | 0.11 | 0.11 | 1.00 |
| Z-Val-Lys-Met-MCA | 1.95 | 17.2 | 8.80 |
| Suc-Leu-Tyr-MCA | 3.77 | 9.37 | 2.49 |
| Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA | 4.33 | 63.7 | 14.7 |

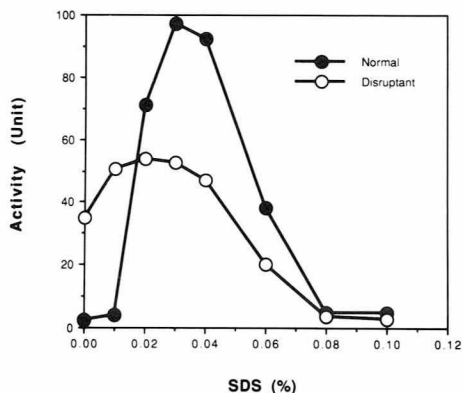


図3 正常 (N) と遺伝子破壊 (Y 13-D) 酵母中の MCP の SDS 感受性。活性は SLLUY-MCA を基質にして測定した。

らも Y 13 サブユニットは生存には必須でないが、構造を保つうえで重要な役割を担っていると考えられる。

今後は、他のサブユニットについてもその作用を解明していく予定である。

文 献

- 1) Ishiura, S., et al.: FEBS Lett., 189: 119—123, 1985.
- 2) 向山光昭ほか：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，1990，pp 11—15.

- 3) Tsukahara, T., et al.: J. Biol. Chem., 265 : 21448—21453, 1990.
- 4) Sorimachi, H., et al.: Eur. J. Biochem., 193 : 775—781, 1990.
- 5) Emori, Y., et al.: Mol. Cell. Biol., 11 : 344—353, 1991.

