

遺伝性腎炎アルポート症候群の原因タンパク質 Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の三量体形成を標的とした治療戦略

大町 紘平[†], Mary Ann Suico, 首藤 剛, 甲斐 広文

1. はじめに

アルポート症候群は、腎臓の糸球体の基底膜を構成する Type IV collagen 遺伝子 (*COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*) のいずれかの変異を原因とする遺伝性疾患である。多くが小児期から発症し、10~20代で末期腎不全に至る重篤な疾患である¹⁾。現在、アルポート症候群の治療は、他の慢性腎臓病と同様にレニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害剤による対症療法が行われる²⁾。糸球体腎炎では、糸球体内圧の低下を企図した降圧剤による治療が一般的であり、アルポート症候群の治療に関しても例外ではない。一方、アルポート症候群患者の予後は、RAS 阻害剤による早期治療介入により改善が認められるものの、最終的に例外なく末期腎不全へ進行し、人工透析もしくは腎移植を余儀なくされることとなる。したがって、現在の対症療法に加えて、病気の発症機序に基づく直接的な治療法の開発が強く求められている。

そのような背景の中、筆者らはアルポート症候群の原因タンパク質 COL4A3/A4/A5 の喪失した機能の正常化による本疾患の根本治療法の可能性を検討してきた。そして、最近、アルポート症候群の原因タンパク質の機能をハイスループットに評価できる系の構築に成功し、原因を標的とした治療薬の開発に一步近づいた。本稿では、筆者らが開発したアルポート症候群の原因タンパク質 COL4A3/A4/A5 の機能評価系³⁾を概説し、本疾患に対する治療薬開発の可能性について議論したい。

熊本大学生命科学研究部遺伝子機能応用学分野 (〒862-0973 熊本県熊本市中央区大江本町5番1号)

Therapeutic strategy to target collagen IV $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ in Alport syndrome

Kohei Omachi[†], Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto and Hirofumi Kai (Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan)

[†] [Present address: Washington University in St. Louis, School of Medicine]

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910413

© 2019 公益社団法人日本生化学会

2. アルポート症候群と Type IV collagen

腎臓の糸球体基底膜は主に Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, Laminin-521 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$), Nidogen, Agrin によって構成されている⁴⁾。アルポート症候群は、Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ をコードする *COL4A3/A4/A5* 遺伝子の変異により、Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ による基底膜の形成ができなくなること、糸球体基底膜の恒常性が失われ、最終的に糸球体の尿濾過機構が破綻することが発症原因である¹⁾。

Type IV collagen は、6種類の α 鎖 ($\alpha 1\sim\alpha 6$) から決まった組合せの三量体 ($\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$) として細胞内で形成され、分泌される (図1A)。分泌された三量体は細胞外でそれぞれ head-to-head, tail-to-tail で結合し、六量体を形成することで基底膜のネットワークを形成する。腎糸球体基底膜では発生期に Type IV collagen $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ による基底膜が発現し、発生後期には $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ へと構成因子が変化することで糸球体基底膜の維持が行われている。一方、アルポート症候群では、*COL4A3/A4/A5* 遺伝子変異により Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ を含む糸球体基底膜の形成不全が引き起こされる。このとき、本来は主に発生期に発現し成熟糸球体では消失するはずの $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ が発現し続けることで糸球体基底膜が維持されるが⁵⁾、代償性 $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ の発現だけでは糸球体基底膜の恒常性を長期的に保つことができない。この要因として、 $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ が形成するネットワークは $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ のものと比べて、分解シグナルに対して脆弱であることが想定されている。事実、ジスルフィド結合 (S-S) の数は $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ と比べて $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ が多い⁶⁾。これらのことから、アルポート症候群の発症原因に基づく治療法の開発において、変異 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の機能の回復による糸球体基底膜の恒常性維持が新たな治療標的となりうることが想定される。

3. Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の機能の回復

筆者らはアルポート症候群の *COL4A5* 遺伝子の変異の中でもミスセンス変異に着目して、変異によって失われる Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の三量体形成能を是正することができればアルポート症候群の原因に基づく画期的な治療法の開発になると考えた。

(A) Type IV collagenの α 鎖は $\alpha 1 \sim \alpha 6$ まであり、それぞれが決まった組合わせのヘテロ三量体が細胞内で形成され、その後、細胞外に分泌される。(B) NanoLuc断片によるタンパク質間相互作用解析手法。NanoLuc断片を融合したタンパク質が近接したとき初めてNanoLucが活性を持ち、基質の存在下で発光する。(C) NanoLuc断片をさまざまな組合わせで $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ に融合した場合、ヘテロ三量体を形成するすべての条件で発光が認められた。(D) Type IV collagenの構造的に重要なCOLドメイン (Gly-X-Y), NC1ドメインを欠失した変異体 (Δ COL, Δ NC1)は三量体形成しない。WT: 野生型。(E) NanoLuc断片を融合した $\alpha 3$ (SmBiT), $\alpha 5$ (LgBiT), 非標識の $\alpha 4$ を単独で発現する細胞 ($\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$) および各種 α 鎖を単独で発現する細胞の共培養 ($\alpha 3 + \alpha 4 + \alpha 5$) では三量体は形成されない。一方で、すべての α 鎖を同時に発現する細胞 ($\alpha 3\alpha 4\alpha 5$) でのみ三量体が形成された。(F) NanoLuc断片を $\alpha 3, \alpha 5$ のC末端およびN末端へ融合することにより、臨床報告のあるCOL4A5変異体の多くで三量体形成が低下することを反映した。(G) 代表的な変異であるG869R変異体は、ケミカルシャペロン活性を有するいくつかの化合物の処理によって三量体形成が回復した。

1) 変異COL4A5の細胞内安定化による治療の可能性

変異を有するCOL4A5は、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ とのヘテロ三量体形成能を低下させ、機能的なType IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の産生を減少させると考えられている。しかし、①変異COL4A5の細胞内安定性が低下した結果、 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 三量体が作られなくなるのか、②変異COL4A5は細胞内で安定性を保っているが、三量体が形成できないのか、は明らかでなかった。もし、前者の細胞内安定性が問題であれば細胞内分解を抑制することによって $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 三量体を増加させることができると考えられる。そこで、各種ミスセンス変異COL4A5 (*G869R*, *G1107R*, *P1517T*, *C1567R*, *L1649R*) を293T細胞に過剰発現し、タンパク質安定性を評価した。その結果、野生型および変異COL4A5の細胞内安定性に有意な変化はなく、ミスセンス変異COL4A5は細胞内安定性を野生型と同等に保つことを明らかにした。したがって、アルポート症候群における $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体形成の回復には、変異COL4A5の細胞内安定化ではなく異なる標的が必要であることが明らかとなった。

2) 変異COL4A5の小胞体シャペロンによる細胞内局在制御による治療の可能性

前述のように、ミスセンス変異を有するCOL4A5は野生型と同等のタンパク質安定性を有することが明らかになった。そこで、野生型と変異COL4A5の小胞体シャペロンによる細胞内局在制御機構に差異があるか否かに関して検討を行った。野生型と変異COL4A5 (*G869R*, *C1567R*) を発現する細胞に代表的な小胞体シャペロン (*BiP*, *GRP94*, *PDI*, *CRT*, *HSP47*) を過剰発現およびノックダウンし、細胞内と細胞培養上清中のタンパク質発現量の変化を検討した。その結果、各種小胞体シャペロンの発現によってCOL4A5の細胞内局在が制御されるものの、野生型と変異COL4A5における顕著な差異は認められなかった。したがって、変異COL4A5の機能喪失を是正するためには、細胞内安定性や細胞内局在制御ではなく、 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体の形成そのものを標的化することが必要であることが示唆された。

3) COL4A5の $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体形成評価系の開発

Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の三量体形成を標的とした治療法の確立には、 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体を評価する系の構築が必要である。これまでに、免疫沈降法によって $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体の評価が可能であることが報告されているが⁷⁻⁹⁾、実際の創薬への応用性を考えると、三量体形成を亢進しうる化合物の探索に適したハイスループット性を有する $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体評価系の開発が求められる。将来的な化合物スクリーニングへの適応を見据えて、本研究室では新たな定量的かつ高感度に $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体を

検出できる評価系の開発に関して種々の検討を行った。

ハイスループットな $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体評価系の確立のため、本研究室では、split NanoLuciferase (split NanoLuc) によるタンパク質相互作用評価系を用いた¹⁰⁾ (図1B)。その理由として、split NanoLucは、NanoLucの断片を付加したタンパク質どうしの相互作用を発光により検出する系であり、他のタンパク質相互作用を検出する方法と比較して高感度であること、NanoLucは他の発光・蛍光タンパク質と比較してサイズが小さいことから (19kDa)、巨大分子であるType IV collagen (単量体: 約180kDa, 三量体: 約540kDa) の本来の三量体形成に与える影響が少ないことが予想されたためである。

そこで、まず、NanoLuc断片融合タンパク質の最適化を行った。さまざまな組合わせでsplit NanoLuc断片 (Lg-BiT, SmBiT) をそれぞれ $\alpha 5$ 、 $\alpha 3$ のC末端に付加し、標識された α 鎖をホモ二量体 ($\alpha 3$ -LgBiT/ $\alpha 3$ -SmBiT, $\alpha 4$ -LgBiT/ $\alpha 4$ -SmBiT, $\alpha 5$ -LgBiT/ $\alpha 5$ -SmBiT), ヘテロ二量体 ($\alpha 3$ -SmBiT/ $\alpha 4$ -LgBiT, $\alpha 3$ -SmBiT/ $\alpha 5$ -LgBiT, $\alpha 4$ -SmBiT/ $\alpha 5$ -LgBiT), ヘテロ三量体 ($\alpha 3$ -SmBiT/ $\alpha 4$ / $\alpha 5$ -LgBiT) を作りうる組合わせで293T細胞に過剰発現し、培養上清中の発光を測定した。その結果、 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体を形成するすべての条件において発光を確認し、一方、 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体を形成しえないようなホモ二量体、ヘテロ二量体の条件で過剰発現した細胞の培養上清中の発光は認められなかった (図1C)。そこで、最も効率のよいsplit NanoLuc断片の組合わせを用いて、N末端付加による三量体の検出を検討したところ、C末端付加と同様に $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体を形成する条件でのみ培養上清中の発光が顕著に認められた。これらの検討から、Type IV collagen $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ のCおよびN末端に融合したNanoLuc断片は $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体が会合したときのみ近接し、基質の存在下で発光することが示唆された。

次に、認められた発光が $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体の形成量依存的であるか検討を行った。 $\alpha 3$ -SmBiT/ $\alpha 4$ / $\alpha 5$ -LgBiT共発現において発光検出される発光は、三量体の構成因子の一つである $\alpha 4$ 発現量依存的に増加すること、非標識 $\alpha 3/\alpha 5$ の発現により競合的に発光が減弱することから、本評価系は、 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ヘテロ三量体特異的に検出できることが示唆された。

Type IV collagenには、二つの構造的に重要なドメインが存在する。一つ目はNC1ドメインと呼ばれ、collagenのC末端にある非らせん構造をとり、三量体形成の初期会合に重要である。二つ目は、COLドメインと呼ばれ、アミノ酸のGly-X-Yを基本配列とした繰り返し配列で、collagenの特徴的な三重らせん構造の形成に重要なドメインである¹¹⁾。したがって、これらを欠失したCOL4A5は三量体を形成しないことが想定される。そこで、ドメインの欠失変異COL4A5 (Δ COL, Δ NC1) を用いたところ、顕著な

三量体形成抑制が認められた (図1D)。さらに三量体形成に伴い認められる発光がType IV collagenの生理的な制御機構を反映しているかについて種々の検討を行った。多くのcollagenの生合成に重要な補酵素アスコルビン酸の処理^{12,13)}は本評価系における三量体の分泌を増加させた。また、各 α 鎖単独発現細胞 ($\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$) の共培養 ($\alpha 3 + \alpha 4 + \alpha 5$) では発光は認められず、すべての α 鎖を共発現した場合 ($\alpha 3\alpha 4\alpha 5$) においてのみ発光が認められたことから、Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ は細胞内で複合体を形成し、分泌される特性を反映していることが確認された (図1E)。

次に、臨床報告があり、頻度の高いCOL4A5 ミスセンス変異の約30種類に関して¹⁴⁾、細胞内で三量体が形成し、細胞外へ分泌された三量体の量を指標に、各種変異COL4A5の三量体形成能を評価した。その結果、全変異体のうち、約4割の変異体がC末端およびN末端タグ評価系とともに野生型の50%以下に発光の減少を認めた。C末端もしくはN末端のいずれかで発光の減少が認められた変異体は評価した変異体のうち約8割であった。したがって、本評価系は、CおよびN末端タグの二つの評価系を用いることで $\alpha 5$ 変異による機能喪失の多くを反映できることが示唆された (図1F)。一方、一部の変異体はどちらの評価系においても発光の減少を認めなかった。これら変異については三量体形成能が保持されている可能性があり、糸球体基底膜上のType IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 発現との相関をさらに検討していく必要がある。さらに細胞内と細胞外の複合体形成を比較したところ、半数以上の変異COL4A5が細胞内ではType IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 三量体を形成するものの、分泌不全であることが示唆された。

4) 化合物による変異COL4A5の三量体形成促進による治療の可能性

最後に、Type IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 三量体評価系を用いて変異COL4A5の喪失した三量体形成能を化合物により是正することが可能であるか否か検討した。まず、頻度の高いG869R変異を代表例とし、ケミカルシャペロン様作用がすでに報告されている化合物14種類¹⁵⁾を処理した。その結果、浸透圧調節系のケミカルシャペロンによりG869R変異COL4A5の三量体形成に伴う分泌の増加が認められた (図1G)。高い効果が認められたMannitolおよびTMAOに関して、他の変異についても同様に効果を検討したところ、Gly-X-YであるCOLドメイン上のGly置換変異体G1107R, G1143D, G1244Dに対しても三量体形成の増加を示した。以上のことから、低分子化合物により変異COL4A5の三量体形成および分泌を是正できる可能性を明らかにした。

4. おわりに

本稿では、遺伝性腎炎アルポート症候群の原因であるType IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の三量体形成を高感度かつハイスループットに評価できるアッセイ系の構築に成功したことを著した。また、その評価系を用いてType IV collagen $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の三量体形成が低分子化合物により是正できる可能性を示した。しかし、本稿で紹介した $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ の三量体形成へ影響した低分子化合物は、活性に高濃度を要することや安全性の観点から、現実的には多くの課題が残っている。現在、熊本大学では、平成29年度地域イノベーション・エコシステム形成プログラム (文部科学省)「有用植物×創薬システムインテグレーション拠点推進事業」の天然物化合物ライブラリーを用いた評価を行っているところであり、いくつかのヒット化合物を得ている。今後、本評価系のハイスループット性を活かして臨床応用可能な低分子化合物を見いだせるものと期待している。また、治療薬開発の観点以外でも本評価系の有用性が注目されている。アルポート症候群の既知の変異の種類は多岐にわたること、近年の遺伝子解析技術の発展により新規変異も多数同定されてきていることから、各遺伝型と臨床的表現型の関係性の解明が非常に重要になっている。そこで、新規変異の病原性・非病原性の予測診断としての本評価系の可能性についても検討中である。今後、遺伝子解析により同定される新規変異の病原性・非病原性の予測診断ができるようになれば、アルポート症候群に対する創薬のみならず臨床診断の観点からも有用なツールになるであろう。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、熊本大学薬学部遺伝子機能応用学分野の多くの方々のご協力を得て達成できたものである。また、本研究は筆者らに対する日本学術振興会の科学研究費補助金 (甲斐: S2803, Suico: 17K08309, 大町: JP 17J11628), Alport Syndrome Foundation Research Program, 文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラム「有用植物×創薬システムインテグレーション拠点推進事業」により支援していただいた。この場を借りて、厚く御礼申し上げたい。

文 献

- Hudson, B.G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., & Neilson, E.G. (2003) Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 2543–2556.
- Gross, O., Licht, C., Anders, H.J., Hoppe, B., Beck, B., Tönshoff, B., Höcker, B., Wygoda, S., Ehrich, J.H., Pape, L., et al.; Study Group Members of the Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie. (2012) Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kid-*

- ney Int., **81**, 494–501.
- 3) Omachi, K., Kamura, M., Teramoto, K., Kojima, H., Yokota, T., Kaseda, S., Kuwazuru, J., Fukuda, R., Koyama, K., Matsuyama, S., et al. (2018) A Split-Luciferase-Based Trimer Formation Assay as a High-throughput Screening Platform for Therapeutics in Alport Syndrome. *Cell Chem. Biol.*, **25**, 634–643.
 - 4) Miner, J.H. (2012) The glomerular basement membrane. *Exp. Cell Res.*, **318**, 973–978.
 - 5) Kalluri, R., Shield, C.F., Todd, P., Hudson, B.G., & Neilson, E.G. (1997) Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J. Clin. Invest.*, **99**, 2470–2478.
 - 6) Boutaud, A., Borza, D.B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K.O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M.E., & Hudson, B.G. (2000) Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 30716–30724.
 - 7) Kobayashi, T. & Uchiyama, M. (2003) Characterization of assembly of recombinant type IV collagen alpha3, alpha4, and alpha5 chains in transfected cell strains. *Kidney Int.*, **64**, 1986–1996.
 - 8) Kobayashi, T., Kakiyama, T., & Uchiyama, M. (2008) Mutational analysis of type IV collagen alpha5 chain, with respect to heterotrimer formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 60–65.
 - 9) Kobayashi, T. & Uchiyama, M. (2010) Mutant-type alpha5(IV) collagen in a mild form of Alport syndrome has residual ability to form a heterotrimer. *Pediatr. Nephrol.*, **25**, 1169–1172.
 - 10) Dixon, A.S., Schwinn, M.K., Hall, M.P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T.H., Butler, B.L., Binkowski, B.F., Machleidt, T., Kirkland, T.A., et al. (2016) NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem. Biol.*, **11**, 400–408.
 - 11) Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 422–433.
 - 12) Murad, S., Grove, D., Lindberg, K.A., Reynolds, G., Sivarajah, A., & Pinnell, S.R. (1981) Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2879–2882.
 - 13) Roach, H.I., Hillier, K., & Shearer, J.R. (1985) Ascorbic acid requirements for collagen synthesis (proline hydroxylation) during long-term culture of embryonic chick femurs. *Biochim. Biophys. Acta*, **842**, 139–145.
 - 14) Crockett, D.K., Pont-Kingdon, G., Gedge, F., Sumner, K., Seamons, R., & Lyon, E. (2010) The Alport syndrome COL4A5 variant database. *Hum. Mutat.*, **31**, E1652–E1657.
 - 15) Okiyonedo, T., Veit, G., Dekkers, J.F., Bagdany, M., Soya, N., Xu, H., Roldan, A., Verkman, A.S., Kurth, M., Simon, A., et al. (2013) Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function. *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 444–454.

著者寸描

●大町 紘平 (おおまち こうへい)



Postdoctoral Research Associate, Renal division (Jeff Miner Lab), Washington University in St. Louis, School of Medicine. 薬科学博士.

■略歴 1990年長崎県に生る。2013年熊本大学薬学部卒業。15年熊本大学大学院薬学教育部修士課程修了。18年熊本大学大学院薬学教育部博士課程修了。18年より現職。

■研究テーマと抱負 これまで行ってきたアルポート症候群とType IV collagenの研究に加えて、Lamininなど他の糸球体基底膜構成タンパク質がどのように腎糸球体の恒常性維持に重要であるのか解明したい。

■趣味 コーヒー、サイクリング。