

フォールディング・トラフィック異常の修正作用を有するリガンドの創製
～網膜色素変性症への応用を目指した変異型ロドプシンのフォールディングを促進する
ロドプシンリガンドの創製研究～

大金賢司,^{*,a} 閼閼孝介,^b 橋本祐一^a

**Structural Development Study of a Novel Pharmacological Chaperone for
Folding-defective Rhodopsin Mutants Responsible for Retinitis Pigmentosa**

Kenji OHGANE,^{*,a} Kosuke DODO,^b and Yuichi HASHIMOTO^a

^a*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, and* ^b*RIKEN, Advanced Science Institute (ASI), 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan*

(Received August 5, 2010)

The retinitis pigmentosa (RP)-causing mutant of rhodopsin, Pro23His (P23H) rhodopsin, is folding defective and unable to traffic beyond the endoplasmic reticulum (ER). This ER retention, and in some cases, aggregation are proposed to result in ER-stress and eventually cell death. The endogenous rhodopsin ligand 11-*cis*-retinal and its isomer 9-*cis*-retinal have been shown to act as pharmacological chaperones, promoting proper folding and trafficking of the P23H rhodopsin. In spite of this promising effect, the development of retinals and related polyenealdehydes as pharmacological agents has been hampered by their undesirable properties, which include chemical instability, photolability, and potential retinoidal actions. Here we report the design and synthesis of a class of more stable nonpolyene-type rhodopsin ligands, structurally distinct from, and with lower toxicity than, retinals. A structure-activity relationship study was conducted using cell-surface expression assay to quantify folding/trafficking efficiency of P23H rhodopsin.

Key words—pharmacological chaperone; rhodopsin; retinitis pigmentosa

はじめに

一般にリガンドの作用というと、アゴニストやアンタゴニスト、モジュレーター、阻害剤などのように、標的タンパク質に結合してそのタンパク質の機能を調節する作用を指す。しかしながら、リガンドの作用にはこのような機能的側面だけではなく、構造的側面があることが近年明らかになりつつある。ここで構造的側面と呼んでいるのは、リガンドによる標的タンパク質の安定化作用とフォールディング効率向上作用である。溶液中においてリガンドが標的タンパク質を安定化することは、数十年前から知られており、^{1,2)} 結合評価の方法としても用いられている。^{3,4)} その一方で、細胞レベルでもリガンドが安

定化作用を示す（標的タンパク質の寿命を延ばす）ことが分かってきたのは比較的最近のことである。^{5,6)} 細胞レベルでの安定化作用の応用という点では、リガンドのスクリーニング方法として安定化作用を観測する手法が提案されているが、現時点では一部の G-protein coupled receptor (GPCR) に限られ、広く用いられるには至っていない。⁷⁻¹⁰⁾ また、リガンドによる安定化作用はスクリーニング系への干渉・交絡因子という点からも注目されている。安定化作用は細胞内安定性の低い、寿命の短いタンパク質ほど顕著に現れる。一般的にレポーター遺伝子として使われているホタルルシフェラーゼは比較的細胞内での寿命が短く、このような安定化作用の影響を受けることが分かっている。⁵⁾ ルシフェラーゼのリガンド（阻害剤）となる化合物により分解量が減るため細胞内のルシフェラーゼ量が増加し、ルシフェラーゼ活性が上昇する。結果として、転写活性化が起こっているように見える（擬陽性となる）こ

^a東京大学分子細胞生物学研究所（〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1）、^b理化学研究所（〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1）

*e-mail: ohgane@me.com

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム GS04 で発表したものを中心に記述したものである。

とが知られている。¹¹⁾

一方のフォールディング効率向上作用は、90年代に現象として認識され、^{12,13)} 膜タンパク質及び分泌タンパク質を用いて解析が進められてきた作用である。本研究は、このようなフォールディング効率に対する作用の応用を目指すものであるが、恐らくあまりなじみのない作用であると思われるので、ここでフォールディング効率向上作用について紹介したい。

タンパク質のフォールディングと品質管理

まずタンパク質のフォールディングと品質管理に関して、膜タンパク質を例に簡単に説明する。膜タンパク質は、翻訳と同時に小胞体 (ER) の膜へ埋め込まれる。疎水性環境である膜内では α ヘリックス等の二次構造は素早く形成されるとされており、二次構造がある程度形成された後にヘリックス間の配置やループ部位の構造が形成されると考えられている。¹⁴⁾ このような三次元構造の形成過程をフォールディングと呼ぶ。小胞体内ではフォールディングに伴い、ジスルフィド結合の形成や糖鎖付加などの翻訳後修飾も起こる。そして、そのような修飾なども含めて正しい構造に到達したタンパク質は、ゴルジ体へ運ばれてさらなる糖鎖などのプロセッシングを受け、最終的に目的地 (細胞膜やリソソームなど) へと輸送される。

翻訳されたタンパク質のすべてが正しい構造に到達する訳ではなく、一部は正常な構造をとらずに除去される。¹⁵⁾ 正しい構造に到達した割合、すなわちフォールディング効率というものは、かならずしも高いものではなく、タンパク質によっては25%程度にすぎない。¹⁶⁾ 正しい構造に到達しなかったものは、シャペロンやレクチン、フォールディング酵素等から構成される品質管理機構により認識されてERに留められ、主にユビキチンプロテアソーム系で分解される。フォールディング効率は、点変異や一アミノ酸の欠失により著しく低下し得る。少なくとも一部の遺伝性疾患は、特定のタンパク質の変異によるフォールディング効率の低下が病因となっていることが分かっている。^{17,18)} そのような疾患の代表例として、嚢胞性線維症が挙げられる。嚢胞性線維症の9割ほどはABC (ATP-binding cassette) トランスポーターに属するCystic Fibrosis Conductance Regulator (CFTR) の $\Delta F508$ (508番Pheの

欠失) により起こるが、この変異はCFTRの機能そのものではなくフォールディング効率を損なうことで、表現型としての機能欠失を引き起こす。¹⁹⁻²¹⁾ $\Delta F508$ CFTR そのものは機能を保持しているが、フォールディング効率が低いのために品質管理機構を通過できずにERに留まり、最終的に分解される。その結果、本来あるべき場所である細胞膜上のCFTRが減少し、アウトプットとして機能の欠損が起こる。嚢胞性線維症のほかにも、フォールディング効率の低下が機序であると考えられている疾患は多くあり、バソプレシンV2受容体 (V2R) の変異により起こる腎性尿崩症、Gaucher病などのリソソーム蓄積病、²²⁾ Niemann-Pick病C型、²³⁾ そして本研究で扱っている網膜色素変性症などが挙げられる。

Pharmacological Chaperone: リガンドによるフォールディング効率向上

上記のような疾患に対する治療法として、リガンドのフォールディング効率向上作用が期待されており、そのような作用を示すリガンドは pharmacological chaperone と呼ばれる。²⁴⁾ これは、リガンドがあたかもシャペロンのごとく標的タンパク質のフォールディングを助けるようにみえることから名付けられたものである。²⁵⁾ 例えば、腎性尿崩症の原因となるV2Rの変異体は、フォールディング効率が低くERに局在するが、非ペプチド性アンタゴニスト処理によりフォールディングが促進され、品質管理機構のチェックを通過して細胞膜へと移行し、表現型としての受容体機能の回復が観測される。²⁶⁾ 「V2Rの機能が欠失している疾患に対してV2Rのアンタゴニストを投与する」、これはリガンドの機能的側面からみると逆説的ではあるが、フォールディング効率向上作用という構造的側面を考えれば理解し得るものである。過剰量のアンタゴニストを用いた場合は、フォールディング効率の向上による受容体の増加をアンタゴニストとしての作用が上回り、機能の阻害が起こり得る。理論的には、アンタ



大金賢司

東京大学大学院薬学系研究科分子薬学専攻 (分子細胞生物学研究所生体有機化学研究分野) 博士課程1年 (2010年度)。2010年学術振興会特別研究員。東京大学薬学部卒業。同大学院薬学系研究科修士課程修了。

ゴニスト濃度に対して受容体機能の濃度作用曲線は上に凸のベルシェイプとなる。腎性尿崩症に対する V2R リガンドの有用性は、臨床試験においても確認されており、今後の応用が期待される。²⁷⁾ また、フォールディング効率向上作用というものの *in vivo* での有効性を示した一例であり、他の疾患への応用の可能性を示していると考えている。

V2R のほかにもオピオイド受容体などの GPCR、また CFTR や P 糖タンパク質 (P-gp) などの ABC トランスポーターにおいてリガンドのフォールディング効率向上作用が観測されており、作用機序に関する知見が得られている。例えば、膜透過性のある非ペプチド性リガンドはフォールディング効率向上作用を示すのに対し、膜透過性のないペプチド性リガンドはそのような作用を示さないことなどから、作用点が ER であることが提案されている。^{26,28)} つまり、リガンドは ER のフォールディング中間体に結合することで ER の品質管理機構のチェックを通過できる構造へと誘導するものと考えられている。また、標的受容体への結合は必須であるが、アゴニストであるかアンタゴニストであるかといった機能的側面とは無関係な作用 (構造的な作用) であることも示されている。^{29,30)}

「品質管理機構のチェックを通過できる構造」とはいったいどんな構造なのか、フォールディング効率向上作用の分子レベル・原子レベルでどう説明できるのか、現時点では直接的な実験データはなく状況証拠の積み重ねに基づく推論といったところである。ER の品質管理機構は、本来タンパク質の内部にあるはずの疎水性領域やチオールの露出を認識するという説がある。³¹⁾ 変異体は野生型 (WT) のタンパク質に比べてコンパクトな構造を取り難く、³²⁾ 疎水性領域の露出時間が長い、あるいは露出する確率が高く、品質管理機構にトラップされ易いものと推察される。このような変異体もリガンド存在下では、リガンドとの相互作用によりコンパクトとなり、品質管理機構のチェックを通過し易いと考えられることができる。このような考え方は、リガンドの結合がある程度標的タンパク質のフォールディングが完成に近い段階で起こることを想定している。³³⁾ その一方で、もっと早い段階からリガンドが作用する可能性も否定できない。例えば、*in vitro* のフォールディング実験から、少なくとも一部のタンパク質

ではリガンドの結合と協調してフォールディングが起こる可能性が示唆されている。³⁴⁾

P-gp の変異体をリガンド存在下で発現させると、ドメイン間相互作用の形成が促進されるというデータも報告されており、³⁵⁾ リガンドの存在が構造・相互作用の形成を助ける方向へ作用することは確かであろう。今後、より具体的かつ明確な機序が明らかとなることを期待したい。

ここまでリガンドのフォールディング効率向上作用について説明してきた。現在、タンパク質のフォールディング異常とその結果としてのトラフィッキング異常に起因する疾患のリストは更新され続けている。^{36,37)} フォールディング効率向上作用の適用可能な範囲が広がっているにもかかわらず、現実的にはこのような作用を目指したりガンド創製はまだまだ少ない。³⁸⁾ このフォールディング効率向上作用の応用の 1 つとして、網膜色素変性症への応用を目指したロドプシンリガンドの創製を行ったので、ここで紹介する。

網膜色素変性症とロドプシンのフォールディング異常

常染色体優性網膜色素変性症 (ADRP) は、遺伝性・進行性の網膜変性疾患であり、現時点では治療法が確立されていない。³⁹⁾ ADRP の原因として、最初に発見されたのが光受容体ロドプシンの Pro23His (P23H) 変異である。⁴⁰⁾ ADRP を起こすロドプシンの変異は現在までに 100 以上が報告されている。⁴¹⁾ P23H 変異を含めてその多くの変異体は、フォールディング過程に異常があり細胞膜まで輸送されず ER に局在することが、培養細胞レベルの研究から明らかとなっている。⁴²⁻⁴⁴⁾

ADRP では、最終的にはロドプシンを発現している網膜の細胞である桿体細胞が変性する (細胞死を起こす)。ロドプシンのフォールディング・トラフィッキングの異常がどのように細胞死へとつながるのか、諸説あるが現在提案されている機序を 2 つ紹介する。⁴⁵⁾

1 つは、「異常なロドプシンが存在すること」によるとする機序である。培養細胞においてロドプシンは細胞膜に発現するが、フォールディング異常を起こした変異体は品質管理機構を通過できずに ER に留まり、異常なジスルフィド結合の形成、^{46,47)} 場合によっては凝集体・封入体の形成、^{48,49)} が起こ

る。このような ER への異常なタンパク質の蓄積に対し、細胞は UPR (unfolded protein response) と呼ばれる応答により対処する。この応答は、シャペロンのアップレギュレーションや翻訳抑制などにより、さらなる異常なタンパク質の蓄積を防ぐ応答である。⁵⁰⁾ この UPR によって対処しきれないと細胞死が起こると考えられている。また、ER に蓄積した変異体はユビキチン・プロテアソーム系により分解されるが、⁴⁸⁾ 桿体細胞の合成するタンパク質のかなりの割合をロドプシンが占めることから、分解系への負担も細胞死の要因であると考えられている。特に、正常な状態ではロドプシンは桿体細胞の外節 (OS) に存在し [Fig. 1(A)], 桿体細胞自身ではなく近接する網膜色素上皮細胞によるファゴサイトーシスによって分解されている。⁵¹⁾ ER に蓄積した変異体の分解は、桿体細胞自身の分解系に頼らざるを得ず、桿体細胞にとって過度の負担であると考えられる。

もう 1 つは、「あるべき場所にロドプシンがないこと」によるとする機序である。これは、OS の形成・構造の維持にはロドプシンが必要であるという可能性である。ロドプシンのノックアウトマウス ($\rho^{-/-}$) では、桿体細胞に OS が形成されず、視細胞の変性が起こることが報告されている。^{52,53)} ロドプシンがどのようにして OS の形成・維持に係わっているのか詳細は不明であるが、ロドプシンが OS に十分量存在しないことが視細胞の変性を起こす可能性を示唆する結果である。

ロドプシン変異体の中には、恒常的な活性化を引き起こす変異体も存在するが、少なくともフォールディング異常を起こす変異体に関しては、上記の 2 つの説が細胞死につながる有力な機序であると思わ

れる。

内因性リガンドレチナルによるフォールディング効率上昇

ADRP の一部は上で述べたようにロドプシン変異体のフォールディング効率の低下に起因することから、リガンドのフォールディング効率向上作用が有用であり得る。ここで、「ロドプシンのリガンド」について説明を加えておきたい。受容体-リガンドの組み合わせとしてはやや特殊であるが、ロドプシンの内因性リガンドはレチナルであるとみることができる。特殊な点とは、1 つにはロドプシンの Lys アミノ基とイミンを形成して結合するという点、もう 1 点は光依存性に受容体内でインバースアゴニストからアゴニストへと変化する点である [Fig. 1(B)]. 11-*cis*-レチナルが結合したロドプシンは不活性化状態であり、ここに 500 nm 付近の波長の可視光があたることでレチナルは *all-trans* 型へ異性化し、活性化状態となり、イミンの加水分解と新たな 11-*cis*-レチナルの供給により不活性化状態へと戻る。このようにロドプシンはレチナルとの複合体として機能することから一般的にはレチナルはロドプシンの補因子としてみなされるが、受容体とリガンドという観点からは、11-*cis*-レチナルはインバースアゴニストであり *all-trans*-レチナルはアゴニストに対応すると考えることができる。

本題に戻るが、内因性リガンドである 11-*cis*-レチナルとその異性体 9-*cis*-レチナルに、ロドプシン変異体のフォールディング効率向上作用が報告されている。⁵⁴⁻⁵⁸⁾ P23H 変異体は、レチナル存在下で発現させることで、成熟した状態で細胞膜へ移行することが示されている。同じくフォールディン

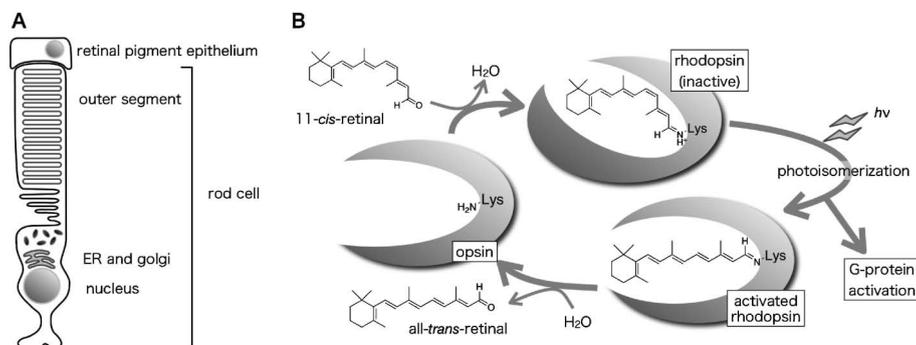


Fig. 1. Schematic Representations of the Rod Cell (A) and the Rhodopsin Cycle (B)

ゲ異常のある変異として知られている Thr17Met (T17M) 変異を有するマウスにおいては、レチナール前駆体であるビタミン A の投与により視細胞の変性が抑制されるとの報告もあり,⁵⁹⁾ リガンドのフォールディング効率向上作用の ADRP に対する *in vivo* での有効性を示唆している。このようにレチナールには新たな治療法として有望な活性があるにもかかわらず、医薬としての応用はあまり進んでいないのが現状である。その主な理由は、レチナールの構造に由来する問題点にあると考えられる。レチナールはポリエナルデヒド構造を有しているため、化学的に不安定で光に対する安定性も低い。特に 11-*cis*-レチナールは可視光の下で容易に異性化が進行する。また、代謝によりレチノイン酸へと変換されるため、レチノイドとしての作用が問題となり得る。このような問題点を解決するために、安定な非ポリエナルデヒド型の構造を有するロドプシンリガンドの創製を行った。

評価系の構築

ロドプシン変異体はフォールディング異常により ER に局在するが、リガンドによりフォールディング効率が向上すれば細胞膜へと移行する。この局在変化を化合物の活性評価に用いることとした。実験系としては、N 末端（細胞外領域）に HA タグを導入したロドプシンを HEK293 細胞に一過性発現

させた系を用いた。膜透過性処理を行わない条件下で抗 HA 抗体で染色することで細胞膜上のロドプシンを、膜透過性処理をした上でロドプシン C 末端に対する抗体で染色することで細胞内すべてのロドプシンを染めることができる。Figure 2(A) に示したように、WT のロドプシンは細胞内のロドプシンの大部分が細胞膜に存在する。一方で、P23H 変異体では細胞膜上にはほとんど発現せず、ER に局在している。レチナール存在下で発現させると、P23H 変異体も細胞膜へ移行する。このように、化合物の活性は細胞膜へ移行した変異体の量により評価が可能である。化合物の構造展開を進める上で定量的な評価系は必須であるので、変異体の膜上発現量を Fig. 2(A) のような蛍光顕微鏡による評価ではなく、酵素活性として定量する Cell-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) により化合物の活性評価を行うこととした。レチナール (11-*cis*-体と 9-*cis*-体) での Cell-ELISA の結果を、細胞毒性試験の結果とともに Fig. 2(B) に示した。⁶⁰⁾ 高濃度域では細胞毒性が現れるためにベルシェイプとなっているが、1–10 μM 付近で濃度依存的な変異体の膜上発現量の増加が観測された。以後この評価系を用いて構造展開を進めることとした。

非ポリエナルデヒドタイプのリード化合物

共著者らはレチノイドの医薬化学、すなわち all-

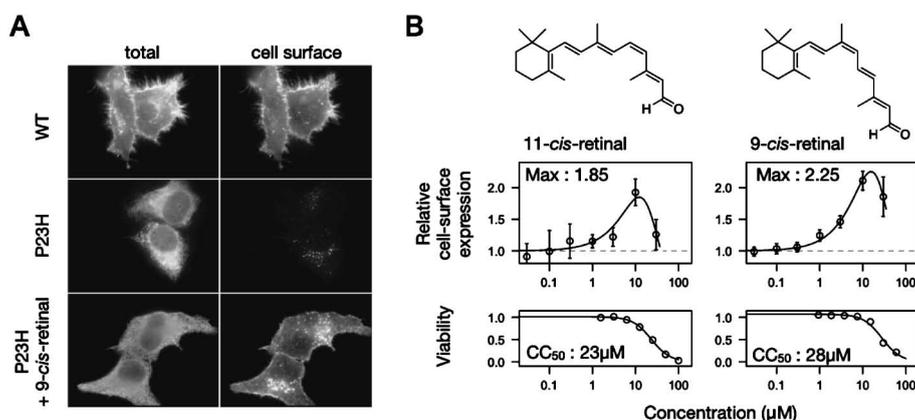


Fig. 2. Subcellular Localization of P23H Mutant and Dose-dependent, Retinal-induced Translocation of the Mutant to the Plasma Membrane⁶⁰⁾

(A) Subcellular localization of HA-tagged rhodopsin (WT and P23H) in HEK293 cells was examined by immunofluorescence microscopy. HEK293 cells were transiently transfected with HA-tagged human rhodopsin (WT or P23H mutant), and incubated for 22 h in the presence or absence of 15 μM 9-*cis*-retinal. Before fixation, cells were incubated with anti-HA antibody for 1 h and then fixed, permeabilized, and blocked. Then, cells were incubated with anti-rhodopsin antibody and processed for immunofluorescence microscopy. FITC- or TRITC-labeled secondary antibody was used for anti-rhodopsin or anti-HA, respectively. (B) The effect of the retinals on the cell-surface expression level of the P23H mutant was evaluated by cell-surface ELISA of non-permeabilized cells with anti-HA. Both of the retinals dose-dependently enhanced the cell-surface trafficking of the mutant, although significant toxicity was observed at higher concentrations. The graphs represent the average values of at least two independent experiments ($n > 4$), and the error bars represent 95% confidence intervals. The lower panels show viability of cells exposed to the retinals, evaluated using a water-soluble tetrazolium, WST-1.

trans-レチノイン酸 (ATRA) の構造展開による Am80 (タミバロテン), Am555S (TAC-101), Ch55 といったレチノ安息香酸の創製に係わってきた経緯がある [Fig. 3(A)].⁶¹⁻⁶⁴ このような背景から, 11-*cis*-レチナールの疎水性末端部位を Am80 に含まれるテトラメチルテトラヒドロナフタレン (TM) で置き換え, アルデヒド部位をベンズアルデヒド構造とし, *cis* 型のコンフォメーションに対応したリンカーでつなぐことで非ポリエンアルデヒド型のロドプシンリガンドが得られると考えた. 報告されているロドプシンの結晶構造^{65,66} を参考に Fig. 3(B) に示す TMAm と TMEs をデザインし, 活性評価を行った. その結果, レチナールよりも弱いものの, 両化合物ともに濃度依存的に P23H 変異体の膜移行を促した [Fig. 3(C)].⁶⁰ リンカー部位に関して, エーテルやスルホンアミド等への変換を行ったが, TMEs 以上の活性を有する化合物は得られなかったことから, TMEs を新たなリードとして設定し, 構造展開を進めることとした.

なお, 上記のデザインと並行してレチナール誘導体の合成・活性評価も行った. 安定性の付与という観点から, ポリエン部位の一部の二重結合を単結合へ置き換えた誘導体をデザインした. その一部の化合物と活性評価の結果を Fig. 4 に示す. 恐らく単結合にすることによるコンフォメーションの違いが理由だと思われるが, 活性が消失するという結果が得られた. このような結果も合わせて, Am80 タイプの構造を用いたデザインは安定性の向上したロドプシンリガンドを効率的に得るのに有効であったと考えている.

疎水性部位の検討

まず最初に, TM 構造のメチル基の寄与を調べるために Fig. 5 に示すようなメチル基のない誘導体 HNEs を合成し, 活性を評価した.⁶⁰ その結果, 活性が消失した. この結果は, シクロヘキセン環状のメチル基をなくした 11-*cis*-レチナールがロドプシンに結合しないという過去の報告^{67,68} と対応している. 次に, 3 位側 (メタ位) と 4 位側 (パラ位) のどちらのメチル基の寄与が大きいのか調べるため, TB3Es と TB4Es の活性を評価した.⁶⁰ TB3Es では活性が維持された一方で, TB4Es には活性は認められず, 4 位側メチル基の寄与が小さいことが示唆された. この 4 位側置換基の位置が最適でないとい

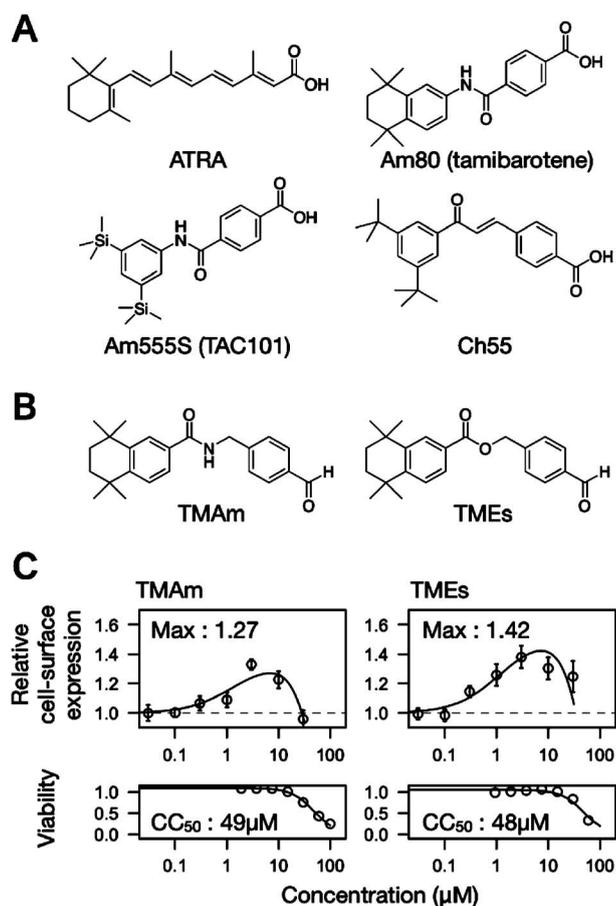


Fig. 3. Molecular Design of Retinobenzaldehydes, TMAm/TMEs⁶⁰

(A) Structures of ATRA and retinobenzoic acids. (B) Structures of TMAm and TMEs. (C) Effect of TMAm and TMEs on cell surface expression level of P23H mutant rhodopsin. The graphs show the average values of at least three independent experiments ($n > 6$), and each error bar represents the standard error of the mean.

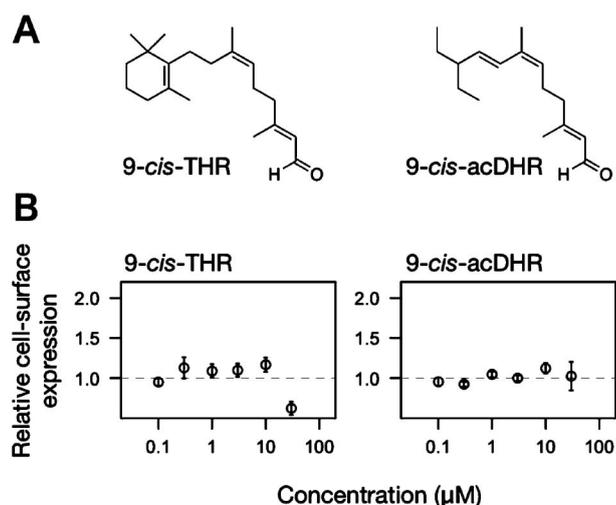


Fig. 4. 9-*cis*-THR and 9-*cis*-acDHR

(A) Structures. (B) Effects of retinal analogues on cell-surface expression level of P23H rhodopsin. The graphs represent the average values of two independent experiments, and each error bar represents the standard error of the mean ($n = 5$).

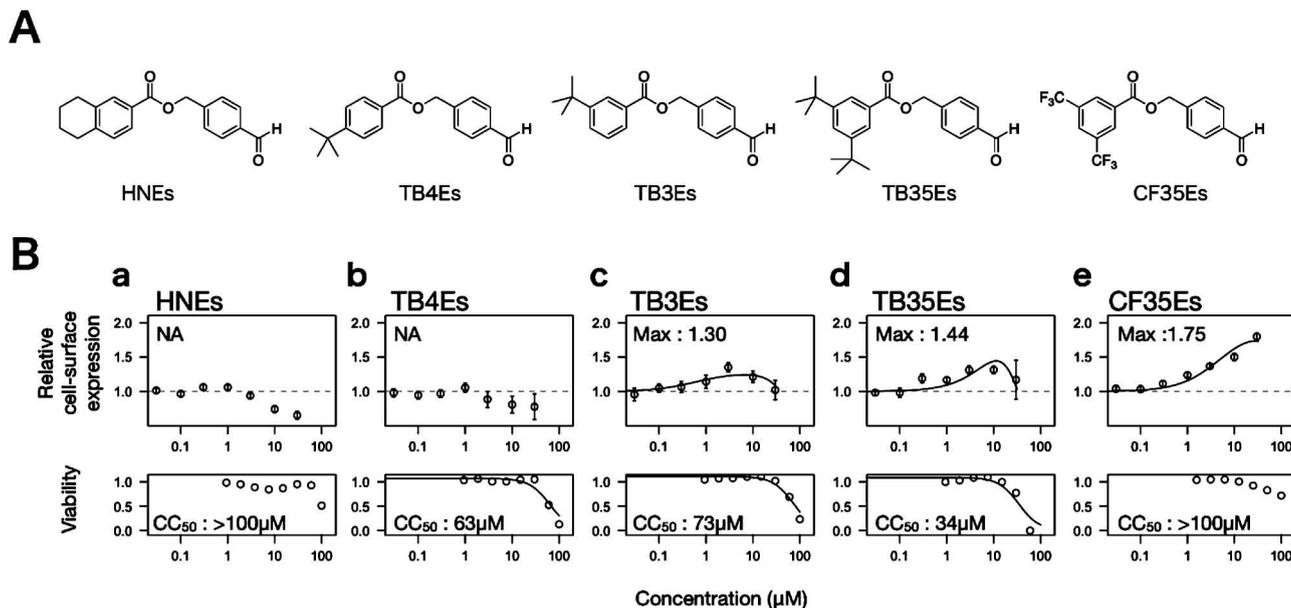


Fig. 5. Retinobenzaldehydes⁶⁰⁾

(A) Structures of retinobenzaldehydes. (B) Effects of retinobenzaldehydes on cell-surface expression level of P23H mutant rhodopsin.

うことと、レチノイン酸での研究で Am555S のような 3,5 二置換の化合物群に優れた活性が認められたこと^{61,62)}から、3,5 二置換の誘導体 (TB35Es) をデザインした。レチノイン酸のターゲットであるレチノイン酸受容体 (RAR) の TM 構造に対応する部分の空間は非常に広い。⁶⁹⁻⁷¹⁾ その一方で、ロドプシンの疎水性末端部位の結合ポケットはそれほど広くないことが結晶構造から分かっている。^{65,66)} そこで、*tert*-ブチル基よりも小さいトリフルオロメチル基を有する誘導体 CF35Es についても活性評価を行った。⁶⁰⁾ その結果、TB35Es にはそれほどの活性向上はみられなかったが、CF35Es で活性の向上と細胞毒性の低下がみられた。

アルデヒドの代替構造

レチナルのアルデヒドは、ロドプシンの Lys アミノ基とイミンを形成して結合する。医薬応用を考える場合、より可逆性の高い相互作用で代替できることが望ましい。そこで、可逆的な相互作用を目指して、CF35Es のアルデヒド部位の検討を行った (Fig. 6)。⁶⁰⁾ アミノ基と相互作用し得る官能基として、カルボン酸 (プロトン酸としてのイオン性相互作用)、ボロン酸 (イオン性相互作用と空軌道への配位)、アミド (水素結合) を選び、CF35Es のアルデヒドをこれらの官能基で置き換えた化合物を合成・評価した。結果、ボロン酸 (CF35EsB) では

細胞毒性の上昇がみられたものの、いずれの化合物にも活性が認められた。CF35EsC のカルボン酸をメチルエステルとすると活性が消失したことから、酸性プロトンの重要性が示唆された。

CF35Es や CF35EsC は、安定性・毒性という点ではレチナルより優れていると言えると思われるが、活性の強さという面ではいまだレチナルを上回るに至っていない。活性の向上と詳細な機序の解析などが今後の課題として考えられる。

おわりに

本総説では、リガンドのフォールディング効率向上作用についてと、その作用の網膜色素変性症への応用 (ロドプシン変異体のフォールディング効率を向上させるリガンドの創製) について紹介した。この研究を足がかりにして、化合物をリードとしてよりよい化合物が生まれることを望んでいる。

フォールディング過程の異常に起因する疾患は数多くあり、難治性疾患も多く含まれる。このような疾患群に対するアプローチとして、リガンドのフォールディング効率向上作用は有用であると考えており、今後積極的に応用を進めていきたい。また、リガンドのフォールディング・トラフィッキングへの作用は、医薬応用のみならず、相互作用の解析法としても有用であると考えている。そのような点からも研究を展開していきたい。

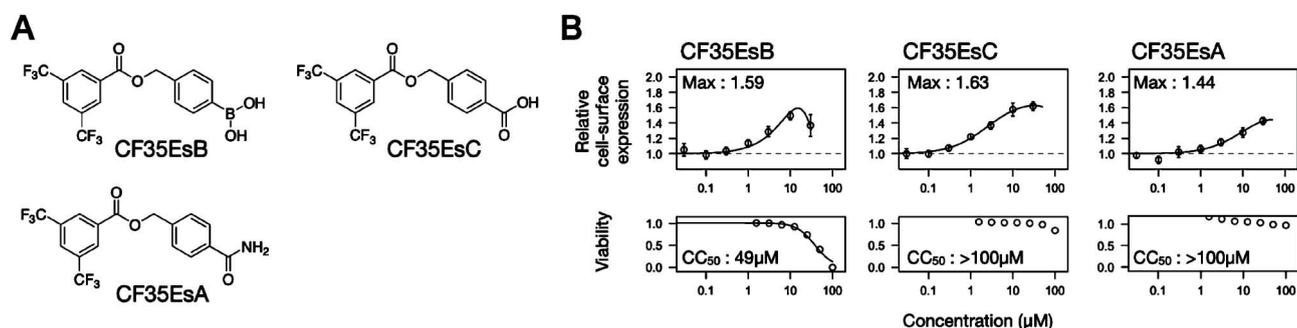


Fig. 6. Retinobenzaldehyde Analogues (Bioisoster of Aldehyde Group)⁶⁰

(A) Structures of retinobenzaldehyde analogues. (B) Effects of retinobenzaldehyde analogues on cell-surface expression level of P23H mutant rhodopsin.

謝辞 東京大学分子細胞生物学研究所 RNA 機能研究分野の皆様、特に岩崎信太郎、依田真由子両氏には多くの助言を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。また、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費（特別研究員奨励費）の補助を受けて行われたものです。

REFERENCES

- Rieder R. F., *J. Clin. Invest.*, **49**, 2369–2376 (1970).
- Eilers M., Schatz G., *Nature*, **322**, 228–232 (1986).
- Alexandrov A. I., Mileni M., Chien E. Y., Hanson M. A., Stevens R. C., *Structure*, **16**, 351–359 (2008).
- Yeh A. P., McMillan A., Stowell M. H., *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, **62**, 451–457 (2006).
- Thompson J. F., Hayes L. S., Lloyd D. B., *Gene*, **103**, 171–177 (1991).
- MacEwan D. J., Milligan G., *Mol. Pharmacol.*, **50**, 1479–1486 (1996).
- McLean A. J., Bevan N., Rees S., Milligan G., *Mol. Pharmacol.*, **56**, 1182–1191 (1999).
- Ramsay D., Bevan N., Rees S., Milligan G., *Br. J. Pharmacol.*, **133**, 315–323 (2001).
- Milligan G., Stevens P. A., Ramsay D., McLean A. J., *Neurosignals*, **11**, 29–33 (2002).
- Zeng F. Y., McLean A. J., Milligan G., Lerner M., Chalmers D. T., Behan D. P., *Mol. Pharmacol.*, **64**, 1474–1484 (2003).
- Thorne N., Inglese J., Auld D. S., *Chem. Biol.*, **17**, 646–657 (2010).
- Ishii S., Kase R., Sakuraba H., Suzuki Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 1585–1589 (1993).
- Loo T. W., Clarke D. M., *J. Biol. Chem.*, **272**, 709–712 (1997).
- Popot J. L., Engelman D. M., *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 881–922 (2000).
- Petäjä-Repo U. E., Hogue M., Laperrière A., Walker P., Bouvier M., *J. Biol. Chem.*, **275**, 13727–13736 (2000).
- Ward C. L., Kopito R. R., *J. Biol. Chem.*, **269**, 25710–25718 (1994).
- Sanders C. R., Myers J. K., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**, 25–51 (2004).
- Schöneberg T., Schulz A., Biebermann H., Hermsdorf T., Römpler H., Sangkuhl K., *Pharmacol. Ther.*, **104**, 173–206 (2004).
- Denning G. M., Anderson M. P., Amara J. F., Marshall J., Smith A. E., Welsh M. J., *Nature*, **358**, 761–764 (1992).
- Sato S., Ward C. L., Krouse M. E., Wine J. J., Kopito R. R., *J. Biol. Chem.*, **271**, 635–638 (1996).
- Brown C. R., Hong-Brown L. Q., Biwersi J., Verkman A. S., Welch W. J., *Cell Stress Chaperones*, **1**, 117–125 (1996).
- Parenti G., *EMBO Mol. Med.*, **1**, 268–279 (2009).
- Gelsthorpe M. E., Baumann N., Millard E., Gale S. E., Langmade S. J., Schaffer J. E., Ory D. S., *J. Biol. Chem.*, **283**, 8229–8236 (2008).
- Loo T. W., Clarke D. M., *Expert Rev. Mol. Med.*, **9**, 1–18 (2007).
- Morello J. P., Petäjä-Repo U. E., Bichet D. G., Bouvier M., *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 466–469 (2000).

- 26) Morello J. P., Salahpour A., Laperrière A., Bernier V., Arthus M. F., Lonergan M., Petäjä-Repo U., Angers S., Morin D., Bichet D. G., Bouvier M., *J. Clin. Invest.*, **105**, 887–895 (2000).
- 27) Bernier V., Morello J. P., Zarruk A., Debrand N., Salahpour A., Lonergan M., Arthus M. F., Laperrière A., Brouard R., Bouvier M., Bichet D. G., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**, 232–243 (2006).
- 28) Loo T. W., Bartlett M. C., Clarke D. M., *Biochem. J.*, **413**, 29–36 (2008).
- 29) Chen Y., Chen C., Wang Y., Liu-Chen L. Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**, 765–775 (2006).
- 30) Petäjä-Repo U. E., Hogue M., Bhalla S., Laperrière A., Morello J. P., Bouvier M., *EMBO J.*, **21**, 1628–1637 (2002).
- 31) Leskelä T. T., Markkanen P. M., Pietilä E. M., Tuusa J. T., Petäjä-Repo U. E., *J. Biol. Chem.*, **282**, 23171–23183 (2007).
- 32) Gether U., Ballesteros J. A., Seifert R., Sanders-Bush E., Weinstein H., Kobilka B. K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 2587–2590 (1997).
- 33) Arakawa T., Ejima D., Kita Y., Tsumoto K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 1677–1687 (2006).
- 34) Rea A. M., Thurston V., Searle M. S., *Biochemistry*, **48**, 7556–7564 (2009).
- 35) Loo T. W., Clarke D. M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 14671–14674 (1998).
- 36) Aridor M., Hannan L. A., *Traffic*, **1**, 836–851 (2000).
- 37) Aridor M., Hannan L. A., *Traffic*, **3**, 781–790 (2002).
- 38) Wang G. N., Reinkensmeier G., Zhang S. W., Zhou J., Zhang L. R., Zhang L. H., Butters T. D., Ye X. S., *J. Med. Chem.*, **52**, 3146–3149 (2009).
- 39) Hartong D. T., Berson E. L., Dryja T. P., *Lancet*, **368**, 1795–1809 (2006).
- 40) Dryja T. P., McGee T. L., Reichel E., Hahn L. B., Cowley G. S., Yandell D. W., Sandberg M. A., Berson E. L., *Nature*, **343**, 364–366 (1990).
- 41) Stojanovic A., Hwa J., *Recept. Channels*, **8**, 33–50 (2002).
- 42) Sung C. H., Schneider B. G., Agarwal N., Papermaster D. S., Nathans J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8840–8844 (1991).
- 43) Sung C. H., Davenport C. M., Nathans J., *J. Biol. Chem.*, **268**, 26645–26649 (1993).
- 44) Kaushal S., Khorana H. G., *Biochemistry*, **33**, 6121–6128 (1994).
- 45) Mendes H. F., van der Spuy J., Chapple J. P., Cheetham M. E., *Trends Mol. Med.*, **11**, 177–185 (2005).
- 46) Hwa J., Klein-Seetharaman J., Khorana H. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4872–4876 (2001).
- 47) McKibbin C., Toye A. M., Reeves P. J., Khorana H. G., Edwards P. C., Villa C., Booth P. J., *J. Mol. Biol.*, **374**, 1309–1318 (2007).
- 48) Illing M. E., Rajan R. S., Bence N. F., Kopito R. R., *J. Biol. Chem.*, **277**, 34150–34160 (2002).
- 49) Saliba R. S., Munro P. M., Luthert P. J., Cheetham M. E., *J. Cell Sci.*, **115**, 2907–2918 (2002).
- 50) Rutkowski D. T., Kaufman R. J., *Trends Cell Biol.*, **14**, 20–28 (2004).
- 51) Bok D., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **26**, 1659–1694 (1985).
- 52) Humphries M. M., Rancourt D., Farrar G. J., Kenna P., Hazel M., Bush R. A., Sieving P. A., Sheils D. M., McNally N., Creighton P., Erven A., Boros A., Gulya K., Capecchi M. R., Humphries P., *Nat. Genet.*, **15**, 216–219 (1997).
- 53) Lem J., Krasnoperova N. V., Calvert P. D., Kosaras B., Cameron D. A., Nicolò M., Maki-no C. L., Sidman R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 736–741 (1999).
- 54) Noorwez S. M., Kuksa V., Imanishi Y., Zhu L., Filipek S., Palczewski K., Kaushal S., *J. Biol. Chem.*, **278**, 14442–14450 (2003).
- 55) Noorwez S. M., Malhotra R., McDowell J. H., Smith K. A., Krebs M. P., Kaushal S., *J. Biol. Chem.*, **279**, 16278–16284 (2004).
- 56) Noorwez S. M., Ostrov D. A., McDowell J. H., Krebs M. P., Kaushal S., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 3224–3230 (2008).
- 57) Krebs M. P., Holden D. C., Joshi P., Clark C. L., Lee A. H., Kaushal S., *J. Mol. Biol.*, **395**, 1063–1078 (2010).
- 58) Mendes H. F., Cheetham M. E., *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3043–3054 (2008).

- 59) Li T., Sandberg M. A., Pawlyk B. S., Rosner B., Hayes K. C., Dryja T. P., Berson E. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11933–11938 (1998).
- 60) Ohgane K., Dodo K., Hashimoto Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 7022–7028 (2010).
- 61) Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Himi T., Shudo K., *J. Med. Chem.*, **31**, 2182–2192 (1988).
- 62) Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K., *J. Med. Chem.*, **32**, 834–840 (1989).
- 63) Yamakawa T., Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K., *J. Med. Chem.*, **33**, 1430–1437 (1990).
- 64) Hashimoto Y., *Cell Struct. Funct.*, **16**, 113–123 (1991).
- 65) Okada T., Sugihara M., Bondar A. N., Elstner M., Entel P., Buss V., *J. Mol. Biol.*, **342**, 571–583 (2004).
- 66) Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M., *Science*, **289**, 739–745 (2000).
- 67) Imai H., Hirano T., Terakita A., Shichida Y., Muthyala R. S., Chen R. L., Colmenares L. U., Liu R. S., *Photochem. Photobiol.*, **70**, 111–115 (1999).
- 68) Domínguez M., Alvarez R., Pérez M., Palczewski K., de Lera A. R., *Chembiochem*, **7**, 1815–1825 (2006).
- 69) Kaneko S., Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K., *Med. Chem. Res.*, **1**, 220–225 (1991).
- 70) Renaud J.-P., Rochel N., Ruff M., Vivat V., Chambon P., Gronemyer H., Moras D., *Nature*, **378**, 681–689 (1995).
- 71) Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemyer H., Moras D., *Nature*, **375**, 377–382 (1995).