

創薬の標的となり得るタンパク質群に関する構造機能相関研究

田中 信忠

Structural and Functional Studies on Proteins as Potential Drug Discovery Targets

Nobutada TANAKA

School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8 Hatanodai,
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

(Received June 5, 2007)

Structural biology teaches us about the fundamental nature of biological molecules. Drug design is the most immediate medical application of structural biology. Therefore our studies have been focused on structural and functional studies of human disease-related proteins and proteins essential for the growth and development of pathogenic organisms. The present paper describes 1) structural biological studies of human autocrine motility factor, 2) structural biological studies of human ribonuclease L, and 3) structural biological studies of *Plasmodium falciparum* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase.

Key words—crystal structure; drug design; X-ray; cancer; interferon; malaria

1. はじめに

遺伝子組換え技術の普及及び近年のゲノム解析の進展に伴い、現在では多種多様な生物種由来タンパク質の立体構造解析が網羅的に行われている。あるタンパク質の立体構造解析を行う意義を大まかに説明するとすると、1) 生命現象の解明による人類の知的財産の蓄積（理学的発想）、2) 創薬への応用による人類の健康に対する貢献（医・薬学的発想）、3) 産業への応用による人類の生活向上に対する貢献（工・農学的発想）のいずれかに当てはまるであろう。筆者自身も、専門外の方々から「あなたの研究は、一体何の役に立つのですか？」という疑問を投げかけられた際、研究意義を単純明快に説明できるような構造生物学的研究を行いたいと常々強く意識している。そうすると、薬学分野における研究の標的は自ずから絞られてくる。すなわち、「ヒト由来疾病関連タンパク質あるいは病原生物由来タンパク質の立体構造解析を行い、それらの機能を制御する化合物（阻害剤や活性化剤）の合理的デザインを目

指す」という研究戦略となる。本稿では、そのような理念に基づいて展開したタンパク質の構造機能相関研究の成果に関して、筆者らの研究を中心に概説する。

2. ヒト由来がん細胞運動刺激因子 AMF に関する構造生物学的研究

2-1. AMF とは 日本人の主要な死因が感染症から成人病、いわゆる生活習慣病へと移行する中で、がんは、1981年以來日本人の死因第一位の座を守り続け、疾病対策上の最重要課題として対策が進められてきた。科学技術の進歩によるがんの診断・治療法のめざましい発展にも係わらず、依然としてがんが致死の疾病として恐れられている原因の1つは、がんが「転移」・「再発」することである。がん転移成立の過程（血行性転移の場合）は、次のようなステップに分けて考えられている。原発巣からの腫瘍細胞の遊離、血管内への侵入、血管内を血流に乗って移動、標的臓器の血管内皮に接着、血管外に脱出、そして標的臓器内での増殖というステップである。腫瘍細胞の転移の達成には、原発巣より転移巣への移動が不可欠であるため、細胞レベルでの移動には細胞自体の固有運動能が関与すると考えられている。

近年、自己分泌（autocrine）又は傍分泌（para-

昭和大学薬学部（〒142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8）

e-mail: ntanaka@pharm.showa-u.ac.jp

本総説は、平成19年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

crine) ないしはその両方によって腫瘍細胞の運動を刺激するサイトカインが報告されている。これらの中で、腫瘍細胞の chemotaxis (走化性) 及び chemokinesis (方向性を無視した運動能) を刺激する能力を持っているものが、自己分泌型がん細胞運動刺激因子 (autocrine motility factor, 以下 AMF) である。1986 年, NIH の Liotta らがヒト黒色腫細胞より細胞運動刺激活性を有する 55 kDa のタンパク質の分離・精製に成功し, これをヒト AMF (human AMF, 以下 hAMF) として報告した。¹⁾ その後, 筆者の共同研究者である Wayne State 大の Avraham Raz 教授らのグループにより hAMF の一次構造が決定され,²⁾ cDNA クローニングも同グループによりなされた。³⁾ 興味深いことに, AMF は, 細胞内糖代謝酵素である phosphoglucose isomerase (PGI) と同一タンパク質であることが明らかとなった。また, AMF は, 細胞外サイトカインである neuroleukin (以下, NLK) や maturation factor (以下, MF) とも同一タンパク質である。すなわち, 同一のタンパク質に関し, 細胞内で機能するものは PGI と呼ばれ, 細胞外で機能するものは各々の機能に基づいて複数の名称 AMF/NLK/MF が付けられていたのである。一方, ヒト AMF 受容体 (human autocrine motility factor receptor, 以下 hAMFR) に関しては, 1990 年に Raz 教授のグループにより単離され,⁴⁾ 1999 年に全長 cDNA クローニングがなされ,⁵⁾ hAMFR が RING-H2 motif や leucine zipper を用いて 2 量体を形成する新規の 7 回膜貫通型 G タンパク質共役受容体であることが明らかとなった。このようなことから, AMF の立体構造に関する研究及び細胞外サイトカインとしての AMF の立体構造に基づいた生化学的研究は, その知見を腫瘍細胞の運動能の制御等に役立てる上で重要である。筆者らは, 阻害剤非結合型のオープン型 hAMF の結晶構造と AMF に対する阻害剤の一種である erythrose 4-phosphate (E4P) 結合型のクローズド型 hAMF の結晶構造を決定し, 立体構造に基づく機能解析の結果から, hAMF-hAMFR 結合モデルを提唱した。

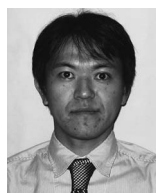
2-2. ヒト AMF の発現・精製・結晶化・結晶構造解析 hAMF (558 a.a.) とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質 (GST-hAMF) を大腸菌内で発現させ, 精製した。

発現ベクターとして pGEX-6P, 発現用ホストとして大腸菌 JM109 を用いた。GST-hAMF をグルタチオンセファロースカラムに結合させ, カラム内で PreScission Protease による切断を行い, 切断された hAMF を溶出して回収するという手順により, 一段階のカラム操作だけで推定純度 90% 以上の hAMF 標品を得た。結晶化条件スクリーニングの結果, 緩衝液: 0.1M カコジル酸ナトリウム, 塩: 0.2M 酢酸ナトリウム, 沈殿剤: 28 (w/v) % ポリエチレングリコール 8000 (PEG8000), 添加剤 (抗凍結剤): 20 (v/v) % グリセロール, pH6.5, 温度 20 °C, hAMF 濃度: 8 mg/ml という条件下において, 空間群 $P2_12_12_1$, 格子定数 $a=80.77 \text{ \AA}$, $b=107.4 \text{ \AA}$, $c=270.8 \text{ \AA}$, 結晶のサイズが最大で $0.05 \times 0.05 \times 0.8 \text{ mm}^3$ 程度の針状結晶を得た。⁶⁾

阻害剤非結合型 hAMF に関し, PF BL18B において低温 (100 K) 下で 1.9 \AA 分解能までの回折強度データを収集した。ウサギ PGI (PDB code: 1DQR) をモデルとした分子置換法により位相を決定し, 1.9 \AA 分解能において構造精密化を行った ($R=0.167$, $R_{\text{free}}=0.198$)。E4P との複合体に関しては, ソーキング法により複合体結晶を調製し, 2.4 \AA 分解能での構造決定を行った ($R=0.193$, $R_{\text{free}}=0.241$)。

2-3. ヒト AMF の立体構造と阻害剤結合様式 結晶構造解析の結果,⁷⁾ AMF は単量体タンパク質であるとの既報¹⁾とは異なり, hAMF は 2 量体として存在することが明らかとなった (Fig. 1)。また, われわれは架橋実験により, 腫瘍細胞の培養上清中でも hAMF は 2 量体を形成することを確認した。各々のサブユニットは, 3 つのドメイン (large, small, C-terminal) から構成されていた。サブユニット間の接触は, 主として各々のサブユニットの large ドメインと C-terminal ドメインとの間にみられた。

hAMF と阻害剤である E4P との複合体の結晶構



田中 信忠

昭和大学薬学部講師。1970 年北海道小樽市生まれ。長岡技術科学大学工学部卒業, 同大学院工学研究科修士課程修了, 同博士課程 (日本学術振興会特別研究員 DC1) を中退し, 1996 年昭和大学薬学部薬品物理化学教室 (中村和郎教授) 助手。2000 年 11 月より現職。

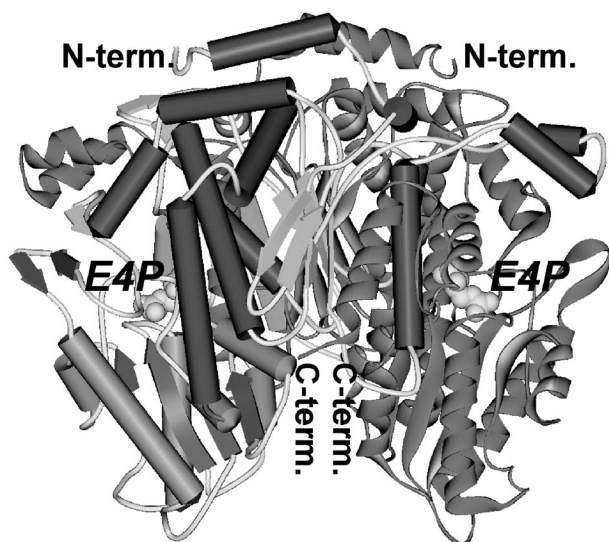


Fig. 1. Overall Structure of Human AMF/E4P Complex

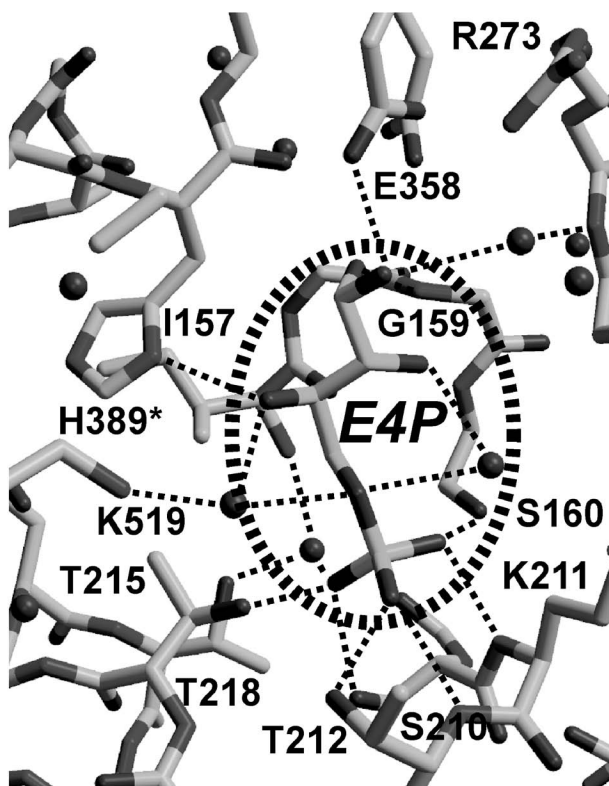


Fig. 2. Inhibitor (E4P) Binding Site of Human AMF

造解析の結果、阻害剤である E4P は、2 量体の各サブユニットのドメイン間クレフトに結合していた。E4P と hAMF との間の相互作用は、主として水素結合によるものであった (Fig. 2)。E4P のリン酸基は、Ser160, Ser210, Thr212, Thr215 の側鎖の水酸基並びに Lys211, Thr212 の主鎖の窒素原子と強固

に相互作用していた。また、2 量体を形成するもう一方のサブユニットに属する His389 (His389*) と E4P の 3 位の水酸基との間に水素結合がみられた。阻害剤非結合型 hAMF と E4P 結合型 hAMF の立体構造を比較してみると、E4P のリン基結合部位 (残基番号 210-216) において E4P の結合に伴う大きな構造変化が生じていることが明らかとなった。

2-4. リン酸化単糖による活性阻害機構と受容体との結合モデル AMF のサイトカイン活性は、E4P 等のリン酸化単糖により阻害されることが知られている。既報のデータ及びわれわれによる hAMF の結晶構造解析の結果から、リン酸化単糖による AMF のサイトカイン活性阻害機構として、「AMF による糖タンパク質 AMFR の糖鎖認識を、リン酸化単糖が競合阻害する」という仮説を立てることができる。この仮説を検証するため、われわれは hAMF の阻害剤結合部位に位置するアミノ酸残基の置換体を 2 種類調製し、それらの細胞運動刺激活性を評価した。置換体の 1 つは、E4P の水酸基と水素結合する His389 を Phe に置換することにより水素結合能を失わせ、hAMF による糖の水酸基認識の重要性を評価するものであった。もう 1 つは、E4P のリン酸基と結合する Thr215 を Asp に置換することにより負電荷による静電的反発を生じさせ、hAMF とリン酸基との結合の重要性を評価するものであった。その結果、いずれの置換体においてもサイトカイン活性が劇的に低下した。この結果から、これらの残基が AMFR の糖鎖の認識に関与しているのではないかと推測され、リン酸化単糖による AMF のサイトカイン活性阻害機構として、「AMF による AMFR の糖鎖認識を競合する」という仮説の妥当性が示唆された。

hAMF の立体構造解析^{6,7)} 及びその後の機能解析⁸⁻¹⁰⁾ hAMFR に関する機能解析¹⁰⁾ マウス AMF に関する高分解能結晶構造解析^{11,12)} などから、AMF と AMFR の結合様式として Fig. 3 に示すようなモデルをわれわれは提唱している。¹⁰⁾ すなわち、AMF/AMFR 複合体において、タンパク質-タンパク質間相互作用だけではなく、図中の星印で示した AMFR の糖鎖部分と AMF との相互作用も重要であろうというモデルである。また、AMF が結晶中のみならず生理的条件下でも 2 量体として存在する

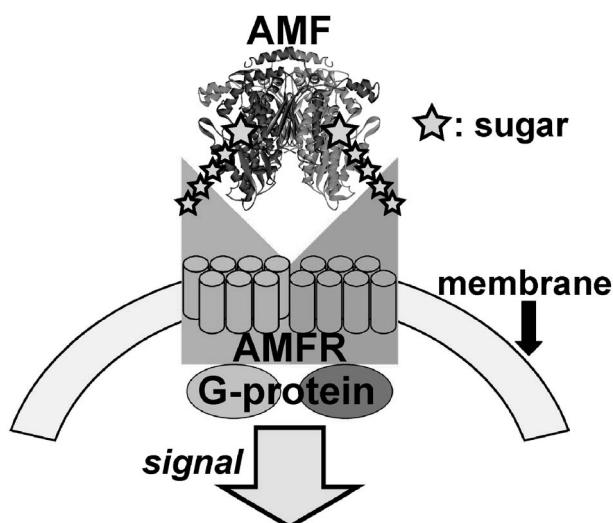


Fig. 3. A Hypothetical Model of AMF/AMFR 2:2 Complex

こと,⁷⁾ 並びに AMFR が RING-H2 motif や leucine zipper を用いて 2 量体を形成すると推定されること^{5,10)} から, AMF と AMFR との結合比は 2:2 であると考えられる。

3. ヒト由来インターフェロン誘導型抗ウイルス酵素 RNase L に関する構造生物学的研究

3-1. RNase L とは 免疫には, 大きく分けて自然免疫と獲得免疫という 2 つのシステムがある。自然免疫において機能するサイトカインの 1 つとしてインターフェロン (IFN) がある。¹³⁾ われわれがウイルスに感染すると, 体内の細胞が IFN を産生し細胞外へ分泌する。IFN が周辺の細胞の IFN 受容体へ結合することにより細胞内にシグナルが伝わり, 細胞はウイルス感染を防御できる状態となる。IFN 誘導型の抗ウイルス機構としては, 「2-5A システム」,¹⁴⁾ 「PKR」,¹⁵⁾ 「Mx proteins」¹⁶⁾ の 3 つの系が知られている。われわれが研究の対象としている「2-5A システム」とは, 1) IFN により誘導される 2',5'-結合オリゴアデニル酸 (2-5A) 合成酵素 (2-5OAS) がウイルス由来 2 本鎖 RNA により活性化され, 2) 活性型 2-5OAS が ATP から 2-5A を合成し, 3) 2-5A が不活性型単量体リボヌクレアーゼ L (RNase L) を 2 量体化及び活性化し, 4) 活性型 RNase L/2-5A 複合体 (2 量体) がウイルスの mRNA を分解し, タンパク質合成の阻害によりウイルスの増殖を抑制するという仕組みになっている。

ヒト RNase L は全長 741 アミノ酸残基からなるタンパク質で, N 末端アンキリンリピートドメイ

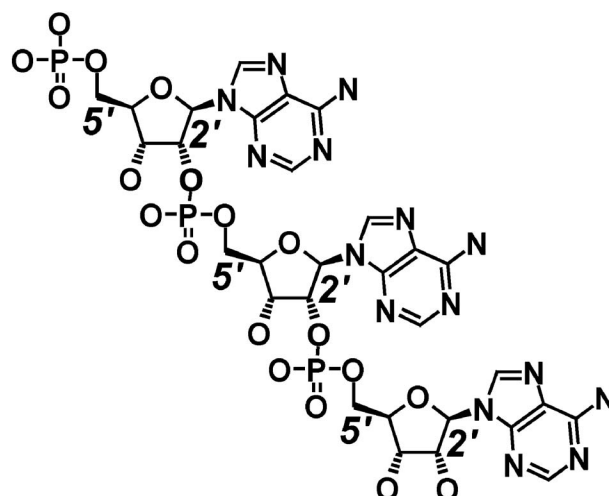


Fig. 4. Structure of the Trimeric Species of 2-5A Used for the Present Crystal Structure Analysis

ン (ANK), 中央部キナーゼ類似ドメイン, C 末端 RNase ドメインという 3 つのドメインにより構成されている。¹⁷⁾ 2-5A とは, その名の通り 2',5'-ホスホジエステル結合により連なるオリゴアデニル酸のことである。通常の DNA や RNA が 3',5'-ホスホジエステル結合により連なっているのとは比べると, 非常にユニークな構造 (Fig. 4) をしている。¹⁸⁾

より強力な RNase L 活性化能を有する 2-5A 類似体は新しいタイプの抗ウイルス薬となり得るため, 核酸化学の専門家達により各種 2-5A 誘導体の合成が盛んに行われている。¹⁴⁾ 筆者らは, RNase L に対する 2-5A の結合様式や 2-5A の結合による RNase L の活性化機構を原子レベルで解明し新規抗ウイルス薬のデザインに役立てるためヒト RNase L の立体構造解析に着手し, ANK と 2-5A との複合体の結晶構造解析に成功した。

3-2. ヒト RNase L の N 末端アンキリンリピートドメイン (ANK) の発現・精製・結晶化・結晶構造解析 全長ヒト RNase L に関し, 2-5A の存在下及び非存在下において結晶化条件のスクリーニングを行ったが, いまだ結晶は得られていない。そこで, RNase L の 3 つのドメインの中で創薬の標的として最も興味深い研究対象である ANK の立体構造を決定するため, 各種コンストラクトを調製した。まず最初に, 残基番号 1-362 (精製用タグの付加は行っていない) に関し 2-5A 存在下で結晶化に成功し, SPring-8 BL41XU において 2.1 Å 分解能までの回折強度データの収集に成功した。¹⁹⁾ しか

し、このコンストラクトは結晶化の再現性が悪く、位相決定に成功しなかった。その後数年間の試行錯誤の末、以下の如く N 末端にヒスチジンタグを付加したヒト RNase L の ANK (残基番号 1-333) と 2-5A との複合体の結晶化に成功した。

このコンストラクトでは、発現ベクターとして pQE30Xa, 発現宿主として大腸菌 JM109 を用い、陽イオン交換 (SP-Sepharose) カラム, Co-キレート (TALON) カラム, ゲル濾過 (Sephacryl S200) カラムの 3 段階で精製を行った。

結晶化条件スクリーニングの結果、緩衝液: 0.1M HEPES, 塩: 0.2M 酢酸ナトリウム, 沈殿剤: 15 (w/v) % ポリエチレングリコール 8000 (PEG8000), 添加剤 (抗凍結剤): 20 (v/v) % グリセロール, pH7.5, 温度 20°C, ANK 濃度: 2.7 mg/ml, 2-5A 濃度: 2 mM という条件下において、空間群 $P2_12_12_1$, 格子定数 $a=63.20 \text{ \AA}$, $b=72.83 \text{ \AA}$, $c=82.63 \text{ \AA}$, 結晶のサイズが最大で $0.02 \times 0.02 \times 0.25 \text{ mm}^3$ 程度の針状結晶を得た。²⁰⁾ N 末端のヒスチジンタグの直後に Factor Xa による切断配列を含んでいたが、タグの切断を行わずに結晶が得られた。なお、結晶化に用いたサンプルはすべて、共同研究者である岐阜大学工学部 (現・松山大学薬学部) の中西雅之博士が精製したものである。中西博士以外の人間が調製したサンプルでは結晶が得られなかったため、岐阜において中西博士が精製したサンプルを -80°C にて凍結後クール便で発送し、当方において解凍・濃縮・結晶化を行った。

PF-AR NW12 において 1.8 \AA 分解能までの回折強度データを得、「5 回繰り返しアンキリンリピートの理想構造」²¹⁾ に基づいて構築した「6 回繰り返しアンキリンリピート構造」をサーチモデルとした分子置換法により初期位相の決定に成功し、 1.8 \AA 分解能において構造精密化を行った ($R=0.202$, $R_{\text{free}}=0.230$)。

3-3. ANK の立体構造と 2-5A の結合様式 結晶構造解析の結果,²⁰⁾ ANK は 8 回繰り返しアンキリンリピートからなり、2-5A はリピート 2 から 4 の範囲に結合していた (Fig. 5)。リピート 4 と 5 の間に挿入ヘリックス αI が存在し、リピート 2 と 3 及び 3 と 4 の間の β -ヘアピン構造とともに 2-5A が結合するプラットフォームを形成していた。ANK の 8 回繰り返し構造は、他のタンパク質中の

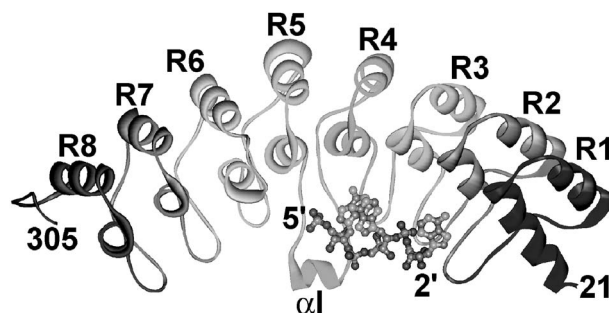


Fig. 5. Crystal Structure of the N-terminal Ankyrin Repeat Domain of Human RNase L Complexed with 2-5A

アンキリンリピートドメインの構造に比べ、顕著に湾曲していた。溶液中での実験から、この湾曲は、2-5A の結合により生じるものであることが示唆されている。²²⁾

アンキリンリピートドメインは、多種多様なタンパク質中に存在することが知られている。しかし、そのほとんどは分子内あるいは分子間のタンパク質-タンパク質相互作用による機能制御に関与しており、核酸と直接相互作用するアンキリンリピートドメインは筆者の知る限りにおいて RNase L の ANK だけである。一般的に、オリゴヌクレオチド結合タンパク質の核酸結合部位には、リン酸基を認識するための正電荷を持つアミノ酸のクラスターが存在する。しかし、ANK の分子表面には、正電荷のクラスターは存在せず、むしろ ANK の分子表面は負に荷電していた。ANK は、主として 2-5A の塩基部分を認識していたのである。すなわち、2-5A の 1 番目と 3 番目の AMP 部位 (2-5A は、2',5'-結合による 5'-AMP の 3 量体とみなすことができる) が、ANK のリピート 4 とリピート 2 によって全く等価な結合様式で認識されていた (Fig. 6)。塩基性側鎖 (Arg155, Lys89) がリン酸基 (Phos1, Phos3) を認識し、芳香族側鎖 (Phe126, Trp60) がアデニン環 (Ade1, Ade3) とスタッキングし、親水性側鎖 (Glu131, Asn65) がアデニン環と水素結合していた。さらに、Ade1 及び Ade3 は 4 重 (Arg155-Phe126-Ade1-Ade2) 及び 3 重 (Lys89-Trp60-Ade3) のスタッキング相互作用によりコンフォメーションが安定化されていた。これら 2-5A の認識に関与する残基は、ANK の繰り返し配列上で等価な場所に位置するアミノ酸であり、かつ、コンセンサス配列ではないことが明らかとなった。つまり、コンセン

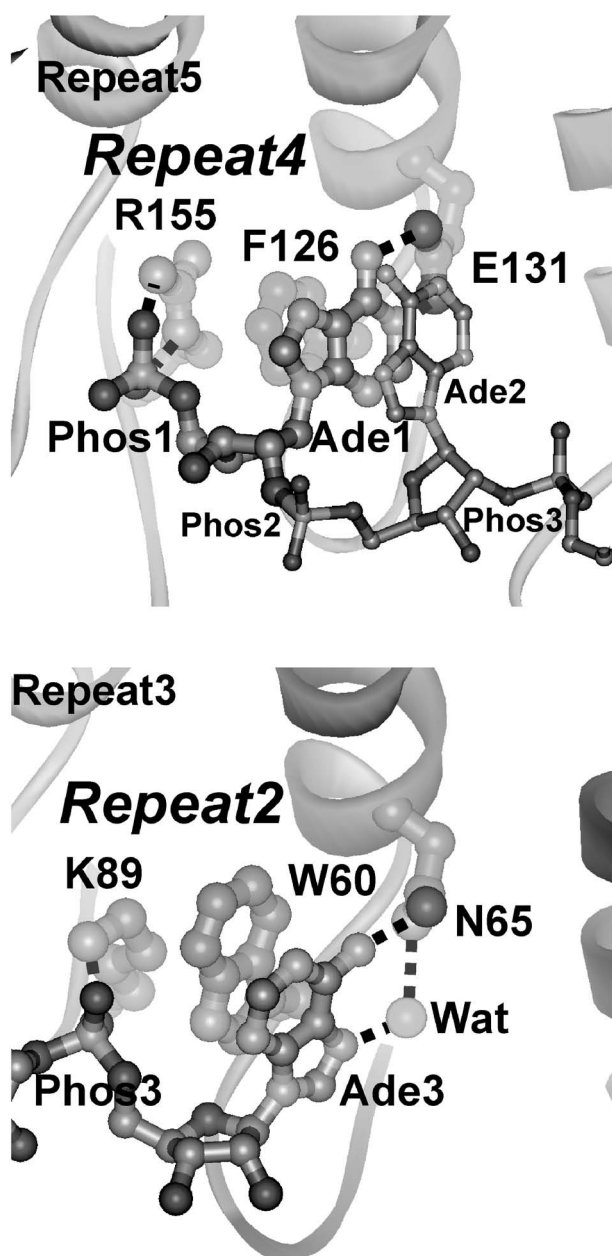


Fig. 6. Recognition of the First (upper panel) and Third (lower panel) AMP Moieties of 2-5A by Repeats 4 and 2, Respectively, of ANK

サス配列がアンキリンリピートの構造形成に重要な役割を担い、保存されていない側鎖が多様な結合特異性を決定していた。これらの残基がヒト、マウス、ラットの RNase L の間で完全に保存されていることから、ANK による 2-5A の認識においては、1 番目と 3 番目の AMP 部位の認識が重要であると考えられる。実際、これらのアミノ酸残基に変異を導入すると 2-5A 結合能のみならず RNase 活性が著しく低下した。²³⁾ 一方、2 番目の AMP 部位の認識

に関しては、ANK と 2-5A との間の相互作用は Tyr131 (マウス RNase L では、Arg となり保存されていない) との間の 1 本の水素結合しかないことから、さほど重要ではないように思われる。これまでに蓄積されている 2-5A 類似化合物の構造活性相関データも、1 番目と 3 番目の AMP 部位が必須骨格であり、その部位への官能基導入は活性化能を低下させるが、2 番目の AMP 部位への官能基導入はそれほど悪影響を及ぼさないという結果を示している。¹⁴⁾

また、筆者らによる ANK/2-5A 複合体の立体構造解析の結果に基づいて既報の 2-5A 類似化合物の構造活性相関データを再評価することにより (Fig. 7), 2-5A が RNase L 活性化能を発揮するために必須の骨格、修飾可能な部位が明らかとなった。現在、共同研究者の北出幸夫教授 (岐阜大・工) のグループにより、新規 2-5A 誘導体の合成が進められている。

3-4. 2-5A の結合による RNase L の活性化機構
筆者らによる ANK/2-5A 複合体の結晶構造解析の結果、ANK は著しく湾曲していること並びに ANK の分子表面が負に荷電していることが明らかとなった。これらの知見並びに既報の各種機能解析の結果に基づき、2-5A の結合による RNase L の 2 量体化及び活性化機構として次のような仮説が考えられる (Fig. 8). 1) 2-5A 非存在下では、静電的相互作用により ANK (分子表面が負に荷電) が RNase ドメイン (立体構造が未知だが、アミノ酸配列から分子表面は正に荷電していると推定される) をマスクしており、RNase L は不活性型単量体として存在する。2) 2-5A の結合により ANK に構造変化が生じる、²²⁾ その結果として、3) RNase ドメインがリリースされると同時に 2 量体化を生じ、活性型 RNase L/2-5A 複合体となる。

これらの仮説を検証するためには、全長 RNase L に関し 2-5A 存在下及び非存在下の両者の立体構造を決定し、それらを比較する必要がある。現在、ヒト、マウス、ラットの全長 RNase L に関し、発現・精製・結晶化に取り組んでいる。

4. 熱帯熱マラリア原虫由来加水分解酵素 SAHH に関する構造生物学的研究

4-1. SAHH とは エイズ、結核とともに世界 3 大感染症の 1 つであるマラリアは、ハマダラ蚊の

2-5A and its analogs	RNase L activation	Interpretation provided by the structure
[1] ppp5'A3'p5'A2'p5'A	+	} 2',5'-Linkages The 2',5'-linkages are essential for ANK binding
[2] ppp5'A2'p5'A3'p5'A	+	
[3] ppp5'A3'p5'A3'p5'A	-	
[4] ppp5'A2'p5'A2'p5'A	+++	} 5'-Phosphoryl groups 5'-Mono-phosphoryl group is sufficient for ANK binding
[5] pp5'A2'p5'A2'p5'A	+++	
[6] p5'A2'p5'A2'p5'A (see Fig.4)	+++	
[7] A2'p5'A2'p5'A	-	} Adenylyl residues At least three 2',5'-linked adenylyl residues are required for ANK binding
[8] ppp5'A2'p5'A	-	
[9] ppp5'A2'p5'A2'p5'A2'p5'A	+++	} Base specificities The 1st and 3rd base must be adenine
[10] p5'N2'p5'N2'p5'N (N ≠ A)	-	
[11] ppp5'A2'p5'A2'p5'N (N ≠ A)	-	
[12] ppp5'I2'p5'A2'p5'A	+	} Base conformations The 3rd adenine should adopt a <i>syn</i> conformation
[13] ppp5'A2'p5'I2'p5'A	++	
[14] ppp5'A2'p5'A2'p5' (br/me8A)	+++	}
[15] ppp5'A2'p5'A2'p5' (br/me2A)	++	

Fig. 7. Structure-function relationship Studies of 2-5A and Its Analogs (see Ref. 14) for a review)

The relative activities of 2-5A analogs, as compared with canonical 2-5A (ppp5'A2'p5'A2'p5'A), for RNase L activation are shown as “+++” (1/2-), “++” (1/20-1/2), “+” (1/200-1/20), and “-” (-1/200).

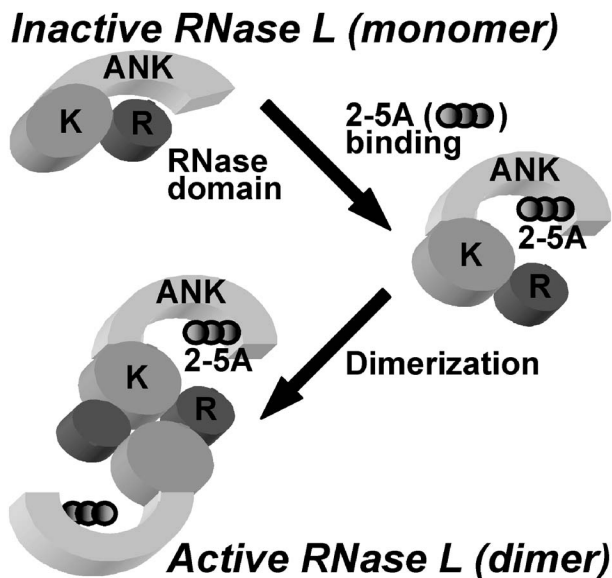


Fig. 8. A Schematic Stepwise Model for Activation of RNase L by 2-5A Binding

媒介で人体に入ったマラリア原虫が赤血球の中で増殖して血球を破壊し、高熱、悪寒、震えなどの症状を起こす病気であり、マラリアによる死者は年間100-300万人と見積もられている。²⁴⁾ ヒトに感染す

るマラリア原虫は4種類知られており、その中で最も危険な原虫が熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* である。マラリアの発生は、熱帯・亜熱帯地域が主流だが、近年の地球温暖化の進行により温帯地域にまで拡大している。さらに、既存の抗マラリア薬に耐性を示すマラリア原虫の出現により、被害は拡大傾向にある。このような状況から、新規抗マラリア薬の開発が求められている。

生体内では、mRNAのキャップ構造の形成に代表されるような種々の重要なメチル化反応が行われている。メチル基供与体として最も広く用いられているのが、S-アデノシル-L-メチオニン (SAM or AdoMet) である。²⁵⁾ 種々のメチル基転移酵素がSAMのメチル基をメチル基受容体に転移し、S-アデノシル-L-ホモシステイン (SAH or AdoHcy) を生じる。メチル化がSAHの蓄積による生成物阻害を受けぬよう、生物は、SAHをアデノシン (Ado) とホモシステイン (Hcy) に加水分解するS-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素 (SAHH or AdoHcy hydrolase) を持っている。このような特徴から、抗ウイルス薬としてのSAHH阻

害剤（主として、ヌクレオシド類似体）の研究が進められてきた。²⁶⁾ 1986年、それら抗ウイルス薬候補の1種であるネプラノシンA (NepA, Ado 類似化合物) が、熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑制するという報告がなされた。²⁷⁾ それ以来、熱帯熱マラリア原虫由来 SAHH (PfSAHH) に対するヌクレオシド型阻害剤が、抗マラリア薬の候補となると期待されている。しかし、NepA やその類縁化合物は哺乳類細胞に毒性を示すため (SAHH は真核生物に普遍的に存在する酵素である)、PfSAHH を選択的に阻害する化合物の開発が望まれてきた。筆者らは、PfSAHH と反応生成物 Ado との複合体の結晶構造解析に成功し、種選択的阻害剤をデザインするための手掛かりを得た。

4-2. 熱帯熱マラリア原虫由来 SAHH の発現・精製・結晶化・結晶構造解析 共同研究者の中西雅之博士より PfSAHH の4種類のコンストラクト (1) タグなし、2) プロテアーゼ切断配列を含む N 末端ヒスチジンタグ付き、3) プロテアーゼ切断配列を含まない N 末端ヒスチジンタグ付き、4) プロテアーゼ切断配列を含まない C 末端ヒスチジンタグ付き) の提供を受け、大量精製、結晶化条件の探索を行った。4年近くの試行錯誤ののち、発現ベクターとして pQE30 (プロテアーゼ切断配列を含まない N 末端ヒスチジンタグ付き)、発現用ホストとして大腸菌 JM109 という組合せで発現させた PfSAHH を、Co-キレート (TALON) カラム、ゲル濾過 (Superdex 200pg) カラムの2段階で精製したところ、以下の如く反応生成物 Ado 存在下での結晶化に成功した。緩衝液：0.1M HEPES, 沈殿剤：1.2M クエン酸ナトリウム, pH 7.5, 温度 20°C, PfSAHH 濃度：4 mg/ml, Ado 濃度：2 mM という条件下において、空間群 $P2_12_12_1$, 格子定数 $a = 77.09 \text{ \AA}$, $b = 86.15 \text{ \AA}$, $c = 333.8 \text{ \AA}$, 結晶のサイズが最大で $0.5 \times 0.2 \times 0.05 \text{ mm}^3$ 程度の板状結晶を得た。²⁸⁾ 4年近くも試行錯誤した末の結晶化成功の鍵は、精製を手早く行うだけでなく、精製後のサンプルがフレッシュな間に徹夜してでも濃縮・結晶化を行うことであった。

PfSAHH 回折強度データの収集においては、低温下で回折強度データを収集するための抗凍結剤の探索に苦労した。試行錯誤の結果、Paratone-N が PfSAHH の結晶に対する唯一有効な抗凍結剤であ

ることを見出し、PF-AR NW12 において、2.4 Å 分解能までの回折強度データを得た。ヒト SAHH (HsSAHH) と NepA との複合体の座標 (PDB code: 1LI4)²⁹⁾ をサーチモデルとした分子置換法により初期位相の決定に成功し、2.4 Å 分解能において構造精密化を行った ($R = 0.213$, $R_{\text{free}} = 0.239$)。

4-3. 熱帯熱マラリア原虫由来 SAHH の立体構造と阻害剤認識機構 結晶構造解析の結果、³⁰⁾ PfSAHH は、各サブユニットが 479 アミノ酸残基からなるホモテトラマーであり、そのサイズは、約 $65 \times 85 \times 100 \text{ \AA}$ であった (Fig. 9)。4つのサブユニットは、点群 222 の対称により関係付けられていた。各々のサブユニットは、基質結合ドメイン、補酵素結合ドメイン、C末端ドメインからなり、それらには1分子ずつの NAD と Ado が結合していた。PfSAHH のサブユニットの構造を HsSAHH の阻害剤複合体、²⁹⁾ RnSAHH の阻害剤フリーの構造³¹⁾ と比較すると、PfSAHH のサブユニットの構造は、HsSAHH の阻害剤複合体と類似の closed form であることが示唆された。

筆者らが明らかにした PfSAHH/Ado 複合体と、既知の HsSAHH/NepA 複合体のヌクレオシド結合部位の構造を比較すると、結合しているヌクレオシドと酵素分子表面との間の水素結合ネットワークは

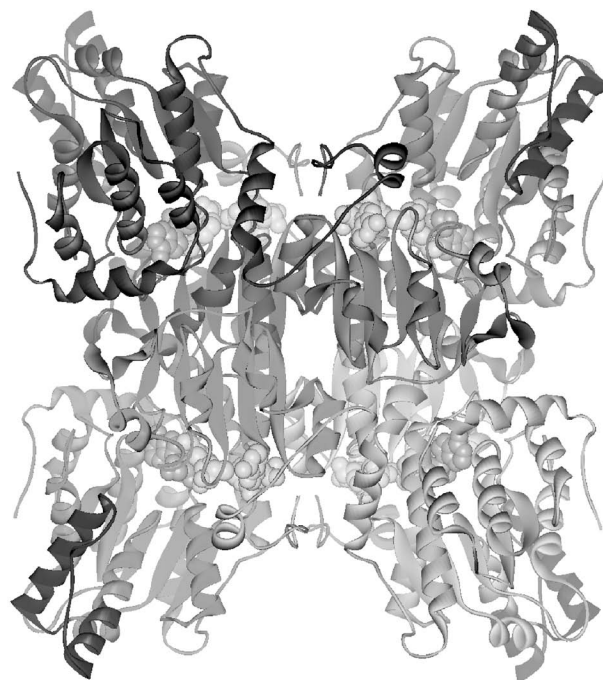


Fig. 9. Overall Structure of PfSAHH Tetramer

両者で完全に保存されていた。しかし、両者のヌクレオシド結合部位には、たった1カ所であるが興味深い違いがあった。Adoのアデニン環2位近傍の側鎖が、HsSAHHではThr60であるのに対し、PfSAHHではCys59となっていた (Fig. 10)。PfSHHのCys59のSH基は、HsSAHHのThr60のメチル基と同様に疎水ポケットに収容されていたため、HsSAHHにおいてThr60のOH基が占有していた部位は、PfSAHHにおいては空間が残されていた。つまり、PfSAHHのAdo結合部位の分子表面には、HsSAHHには存在しない「くぼみ」があることが明らかとなった。

4-4. 種選択的阻害剤デザインの鍵 上記の構造比較に基づき、ヌクレオシド型SAHH阻害剤の種選択性に関し、以下の作業仮説が導かれた。1) ヌクレオシド型阻害剤のアデニン環2位に官能基を導入すると、PfSAHHにおいてはくぼみが埋まるため、阻害活性が上昇する。2) 一方、HsSAHHに対しては、2位の官能基がThr60の水酸基と立体障害を生じ、阻害活性が低下する。3) 結果として、

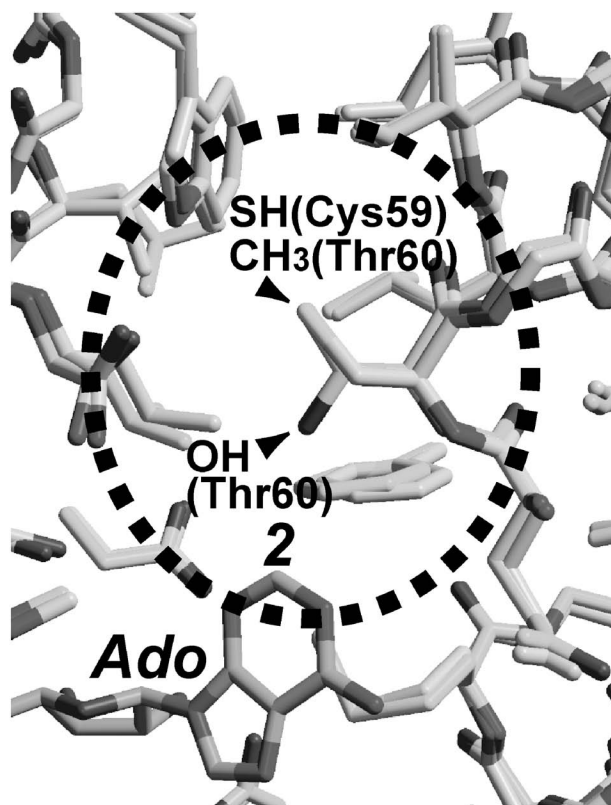
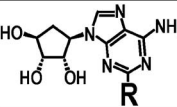


Fig. 10. Comparison of the Ado-binding Site of PfSAHH with That of HsSAHH

アデニン環2位に官能基を導入したヌクレオシド型阻害剤は、PfSAHH選択的阻害剤となる。

実際、共同研究者の北出幸夫教授 (岐阜大・工) らにより報告されていたノルアリステロマイシン (noraristeromycin, NAM) 及び各種誘導体の構造活性相関データ^{32,33})は、上記の作業仮説により見事に説明付けられることが分かった。すなわち、NAMはPfSAHHよりもHsSAHHに対して強い阻害活性を示す (IC₅₀ 値がそれぞれに対し、1.1 μM, 3.1 μM) が、NAMのアデニン環2位にフッ素を導入した2-F-NAMの場合、PfSAHHに比べHsSAHHに対する阻害活性が劇的に低下し (IC₅₀ 値がそれぞれに対し、63 μM, 13 μM)、結果としてPfSAHH選択的阻害剤となっている (Fig. 11)。PfSAHH/Ado複合体の原子座標を用いて2-F-NAMのドッキングスタディーを行ってみると (Fig. 12)、2-F-NAMの2位のフッ素原子は、PfSAHHに特有に存在するくぼみにうまく収容されることが分かった。³⁰

また、PfSAHHとHsSAHHの活性部位におけるわずか1アミノ酸残基 (Cys or Thr) の違いが本当に阻害剤感受性の違いの原因か否かを検証するため、PfSAHHのCys59をThrに置換した置換体 (C59T) を調製し、その阻害剤感受性を調べた。³⁴ その結果、C59Tに対する2-F-NAMの阻害活性はほぼ消失していた (Fig. 11)。これは、CysからThrへの置換によりPfSAHH特有のくぼみが消失し、アデニン環2位の官能基の収容を不可能にした

	IC ₅₀ (μM)			Selective Index*
	HsSAHH (WT)	PfSAHH (WT)	PfSAHH (C59T)	
Noraristeromycin (NAM, R = H)	1.1	3.1	9.6	0.35
2-Amino-NAM (R = NH ₂)	60	18	> 500	3.3
2-Fluoro-NAM (R = F)	63	13	> 500	4.8
2-Bromo-NAM (R = Br)	> 500	> 500	> 500	---

* Selective Index: IC₅₀(HsSAHH_{WT}) / IC₅₀(PfSAHH_{WT})

Fig. 11. Structure-function Relationship Studies of Noraristeromycin and Its Analogs against HsSAHH, PfSAHH, and Mutant PfSAHH (Cys59Thr)

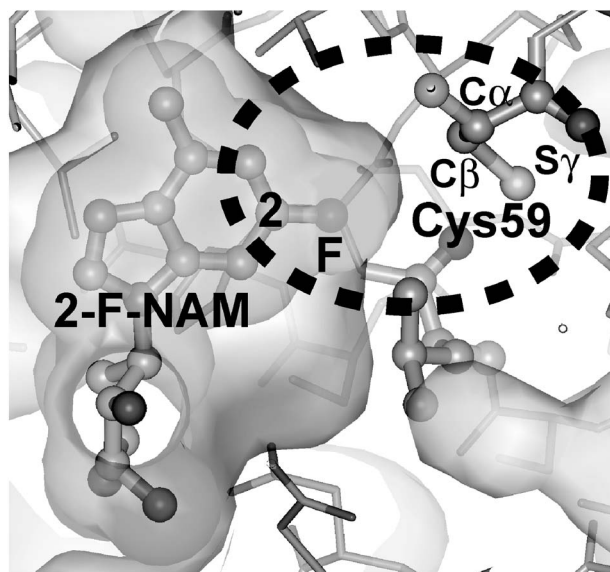


Fig. 12. Surface Representation of the Active Site of PfSAHH

A molecule of 2-F-NAM is modeled into the Ado-binding site of PfSAHH.

ためであると考えられる。

以上のように、PfSAHHの結晶構造解析及びHsSAHHとの構造比較から導かれた阻害剤の種選択性に関する作業仮説は、化学的・生化学的データによってその妥当性が証明された。さらに、筆者らは最近PfSAHH/2-F-NAM複合体の結晶構造解析に成功し、上記のドッキングスタディーで予想したとおりの結合様式で2-F-NAMがPfSAHHに結合していることを確かめることができた(投稿準備中)。

5. おわりに

筆者が学部4年生として研究室(長岡技術科学大学・生物系・三井幸雄教授の研究室の第一期生)に配属された1991年当時、タンパク質のX線結晶構造解析には何年もの歳月を要するのが当たり前であった。現在では、標的遺伝子のクローニングから立体構造決定に至るまで、運がよければほんの数ヶ月で完了する場合がある。そのような時代ではあるが、本研究で紹介した3テーマのうち後半2テーマでは、良好な結晶を得るためにいずれも3年以上の月日を費やした。そのような状況下であきらめずにテーマを持続できたのは、各々のタンパク質(ヒト由来インターフェロン誘導型酵素と熱帯熱マラリア原虫由来酵素)が持つ、機能制御化合物(創薬のシーズ)の標的となり得るといふ「魅力」によるものである。今後も本稿で記述した研究をさらに発展させ

て行くとともに、他のヒト由来疾病関連タンパク質や感染生物由来タンパク質に関し、創薬を志向した構造機能相関研究を積極的に進めていきたい。

謝辞 AMFに関する構造機能相関研究は、Wayne State大学のAvraham Raz教授、岐阜薬科大の羽賀新世博士、船坂龍善博士(現・Wayne State大学)、永瀬久光教授らとの共同研究である。RNase L並びにSAHHに関する構造機能相関研究は、岐阜大学工学部の中西雅之博士(現・松山大学薬学部)、北出幸夫教授らとの共同研究である。本研究は、昭和大学薬学部薬品物理化学教室において、大学院生であった日下部吉男氏・秋山浩子氏・上村洋史氏・那波紀子氏・白岩桂氏・青木謙一氏・福見千晴氏らの協力、そして中村和郎教授の指導により進められた。取り分け、現在当グループの助教として活躍している、日下部吉男氏の貢献が大きい。また、当グループの北川康行准教授・角田大博士(現・いわき明星大学薬学部)・阪本泰光博士らとは、本研究に関し多くの有益な討論をさせていただいた。お世話になった方々に深く感謝いたします。

さらに、本稿で記述した研究は放射光の利用なくしてはなし遂げられなかった。高エネルギー加速器研究機構の鈴木守博士(現・大阪大学)・五十嵐教之博士・松垣直宏博士・山田悠介博士らには、回折強度データの収集の際、昼夜を問わずお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

また、本研究は、タンパク3000プロジェクト・科研費補助金・上原記念生命科学財団研究奨励金・武田科学振興財団薬学系研究奨励金・東京生化学研究会研究奨励金・笹川科学研究助成金等の援助を受けた。関係各位に深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Liotta L. A., Mandler R., Murano G., Katz D. A., Gordon R. K., Chiang P. K., Schiffmann E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3302-3306 (1986).
- 2) Watanabe H., Takehana K., Date M., Shinozaki T., Raz A., *Cancer Res.*, **56**, 2960-2963 (1996).
- 3) Niinaka Y., Paku S., Haga A., Watanabe H., Raz A., *Cancer Res.*, **58**, 2667-2674 (1998).

- 4) Nabi I. R., Watanabe H., Raz A., *Cancer Res.*, **50**, 409–414 (1990).
- 5) Shimizu K., Tani M., Watanabe H., Nagamachi Y., Niinaka Y., Shiroishi T., Ohwada S., Raz A., Yokota J., *FEBS Lett.*, **456**, 295–300 (1999).
- 6) Uemura H., Tanaka N., Funasaka T., Haga A., Nagase H., Raz A., Nakamura K. T., *Protein Pept. Lett.*, **8**, 317–322 (2001).
- 7) Tanaka N., Haga A., Uemura H., Akiyama H., Funasaka T., Nagase H., Raz A., Nakamura K. T., *J. Mol. Biol.*, **318**, 985–997 (2002).
- 8) Tsutsumi S., Gupta S. K., Hogan V., Tanaka N., Nakamura K. T., Nabi I. R., Raz A., *FEBS Lett.*, **534**, 49–53 (2003).
- 9) Yanagawa T., Funasaka T., Tsutsumi S., Raz T., Tanaka N., Raz A., *J. Biol. Chem.*, **280**, 10419–10426 (2005).
- 10) Haga A., Tanaka N., Funasaka T., Hashimoto K., Nakamura K. T., Watanabe H., Raz A., Nagase H., *J. Mol. Biol.*, **358**, 741–753 (2006).
- 11) Naba N., Tanaka N., Shiraiwa K., Kusakabe Y., Funasaka T., Haga A., Nagase H., Raz A., Nakamura K. T., *Acta Crystallogr. D*, **60**, 2084–2086 (2004).
- 12) Tanaka N., Haga A., Naba N., Shiraiwa K., Kusakabe Y., Hashimoto K., Funasaka T., Nagase H., Raz A., Nakamura K. T., *J. Mol. Biol.*, **356**, 312–324 (2006).
- 13) Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R., Silvermann R. H., Schreiber R. D., *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 227–264 (1998).
- 14) Player M. R., Torrence P. F., *Pharmacol. Ther.*, **78**, 55–113 (1998).
- 15) Williams B. R., *Semin. Virol.*, **6**, 191–202 (1995).
- 16) Pavlovic J., Staeheli P., *J. Interferon Res.*, **11**, 215–219 (1991).
- 17) Zhou A., Hassel B. A., Silvermann R. H., *Cell*, **72**, 753–765 (1993).
- 18) Kerr I. M., Brown R. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 256–260 (1978).
- 19) Tanaka N., Nakanishi M., Kusakabe Y., Goto Y., Kitade Y., Nakamura K. T., *Protein Pept. Lett.*, **12**, 387–389 (2005).
- 20) Tanaka N., Nakanishi M., Kusakabe Y., Goto Y., Kitade Y., Nakamura K. T., *EMBO J.*, **23**, 3929–3938 (2004).
- 21) Kohl A., Binz H. K., Forrer P., Stumpp M. T., Pluckthun A., Grutter M. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1700–1705 (2003).
- 22) Nakanishi M., Goto Y., Kitade Y., *Proteins*, **60**, 131–138 (2005).
- 23) Nakanishi M., Tanaka N., Mizutani Y., Mochizuki M., Ueno Y., Nakamura K. T., Kitade Y., *J. Biol. Chem.*, **280**, 41694–41699 (2005).
- 24) Miller L. H., Brauch D. I., Marsh K., Doumbo O. K., *Nature*, **415**, 673–679 (2002).
- 25) Cantoni G. L., *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 435–451 (1975).
- 26) Chiang P. K., *Pharmacol. Ther.*, **77**, 115–134 (1998).
- 27) Whaun J. M., Miura G. A., Brown N. D., Gordon R. K., Chiang P. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 277–283 (1986).
- 28) Tanaka N., Kusakabe Y., Shiraiwa K., Sakamoto Y., Nakanishi M., Kitade Y., Nakamura K. T., *Protein Pept. Lett.*, **11**, 201–205 (2004).
- 29) Yang X., Hu Y., Yin D. H., Turner M. A., Wang M., Borchardt R. T., Howell P. L., Kuczera K., Schowen R. L., *Biochemistry*, **42**, 1900–1909 (2003).
- 30) Tanaka N., Nakanishi M., Kusakabe Y., Shiraiwa K., Yabe S., Ito Y., Kitade Y., Nakamura K. T., *J. Mol. Biol.*, **343**, 1007–1017 (2004).
- 31) Hu W., Komoto J., Huang Y., Gomi T., Ogawa H., Takata Y., Fujioka M., Takusagawa F., *Biochemistry*, **38**, 8323–8333 (1999).
- 32) Kitade Y., Kozaki A., Miwa T., Nakanishi M., *Tetrahedron*, **58**, 1271–1277 (2002).
- 33) Kitade Y., Kojima H., Zulfiquir F., Kim H.-S., Wataya Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3963–3965 (2003).
- 34) Nakanishi M., Yabe S., Tanaka N., Ito Y., Nakamura K. T., Kitade Y., *Mol. Biochem. Parasitol.*, **143**, 146–151 (2005).