

感染症治療薬ターゲットとしての *S*-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素

中西 雅之

***S*-Adenosyl-L-homocysteine Hydrolase as an Attractive Target for Antimicrobial Drugs**

Masayuki NAKANISHI

*Department of Biomolecular Science, Faculty of Engineering, Gifu University,
1-1 Yanagido, Gifu City 501-1193, Japan*

(Received March 19, 2007)

S-Adenosyl-L-homocysteine (SAH) hydrolase catalyzes breakdown of SAH, which arises after *S*-adenosyl-methionine-dependent methylation, into adenosine and homocysteine. The enzyme activity is required for both metabolic pathway of sulfur-containing amino acids and a variety of biological methylations. Because of the essential roles of SAH hydrolase for living cells, inhibitors of SAH hydrolase are expected to be antimicrobial drugs, especially for viruses and malaria parasite. Our research focused on the development of new antimalarials based on the SAH hydrolase inhibition. Malaria parasite employs SAH hydrolase of itself for coping with the toxicity of SAH, so that the target offers opportunities for chemotherapy if structural differences are exploited between the parasite and human enzymes. *In vitro* screens of nucleoside analogs resulted in moderate but selective inhibition for recombinant SAH hydrolase of malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by 2-position substituted adenosine analogs. Similar selectivity was observed in the growth inhibition assay of cultured cells. Following crystal structure analysis of the parasite SAH hydrolase discovered an additional space, which is located near the 2-position of the adenine-ring, in the substrate binding pocket. Mutagenic analysis of the amino acid residue forming the additional space confirmed that the inhibition selectivity is due to the difference of only one amino acid residue, between Cys59 in *P. falciparum* and Thr60 in human. For developing antimalarial drugs, it might be suitable to select target from pathways that are present in the parasite but absent from humans; nevertheless, even if the target was common in parasite and host, slight structural difference such as single amino acid variation is likely to be available for improving inhibitor selectivity.

Key words—*S*-adenosylhomocysteine; antimalarial; nucleoside inhibitor; fine tuning; *Plasmodium falciparum*; antiviral

1. はじめに

ウイルス、細菌や原虫が引き起こす感染症はわれわれ人類にとって古くて新しい問題である。最近でも高病原性インフルエンザウイルスや超多剤耐性結核菌、バンコマイシン耐性を獲得した腸球菌や黄色ブドウ球菌の出現、クロロキン/ピリメサミン耐性マラリア原虫の流行域拡大など、いわゆる新興・再興感染症への早急な対応を迫られている。われわれはあらゆる生物が利用する核酸の類似体が感染症に対する化学療法剤になるというアイデアに基づき、

新規核酸類似体の合成と標的酵素の構造機能相関の解明に取り組んでいる。本稿では *S*-アデノシル-L-ホモシステイン (SAH) 加水分解酵素とそれを阻害する核酸アナログの開発について紹介する。

2. なぜ SAH 加水分解酵素が標的となるのか

SAH 加水分解酵素の生理機能は、生体内メチル化反応及び含硫アミノ酸代謝の文脈で説明される。大部分の生体内メチル化反応は *S*-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体とする種々のメチルトランスフェラーゼによって触媒され、副産物として SAH を生じる (Fig. 1)。SAH は、供与すべきメチル基を持たないものの、SAM 依存性メチルトランスフェラーゼと高い親和性で結合するため、メチル化反応を強力に阻害してしまう。SAH 加水分解酵素は、この阻害を生じさせないように、SAH をアデノシンとホモシステインに分解して

岐阜大学工学部生命工学科 (〒501-1193 岐阜市柳戸 1 番 1)

現住所: 松山大学薬学部生化学研究室 (〒790-8578 松山市文京町 4 番地 2)

e-mail: mnakanis@cc.matsuyama-u.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

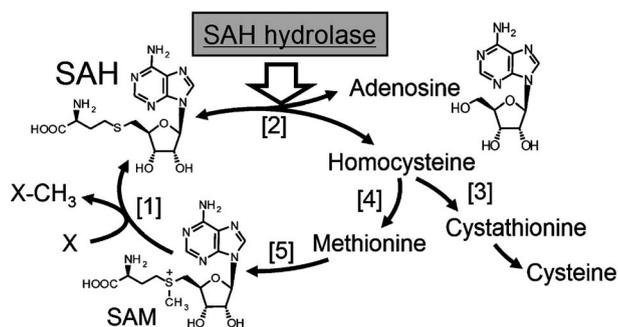


Fig. 1. Physiological Role of SAH Hydrolase

SAH hydrolase is involved in biological methylations and metabolism of sulfur-containing amino acid. [1] Methylation by SAM-dependent methyltransferase, which produces SAH, [2] Hydrolysis of SAH into adenosine and homocysteine by SAH hydrolase, [3] A part of homocysteine is used to synthesize cysteine by reverse transsulfuration pathway, [4] the other homocysteine is converted to methionine and [5] methionine is regenerated to SAM.

SAH の濃度を低く保つ。¹⁾ すなわち、SAH 加水分解酵素は間接的にメチル化反応を促進する役割を担っており、本酵素の働きを止めるだけで、多くの SAM 依存性メチルトランスフェラーゼを阻害することができるのである。また、ここで生じたホモシステインはメチル化を受けてメチオニンに再生されるほか、システインの生合成にも必要であり（逆トランスサルフェーション経路）、SAH 加水分解酵素は含硫アミノ酸代謝の役割も担っている。²⁾ こうした生理機能を持つ SAH 加水分解酵素が、真核生物、古細菌及び一部の真正細菌に至るまで広く分布しており、互いに高いホモロジーを示すことは本酵素の重要性を示唆している。³⁾ 大腸菌や枯草菌など SAH 加水分解酵素を持たない真正細菌ではメチルチオアデノシン/SAH ヌクレオシダーゼが SAH を分解するが、そのような代替経路を持たない生物では SAH 加水分解酵素は生存に必須の酵素である。例えば、ある系統のマウスは SAH 加水分解酵素遺伝子を含むゲノム領域を欠失しているが、この欠失変異を両方のアレルに持つホモ接合体は胚の段階で死亡する。⁴⁾ 最近になって、SAH 加水分解酵素遺伝子に変異を持つヒトが発見された。⁵⁾ このヒトでは一方のアレルにコードされる SAH 加水分解酵素が、全 432 アミノ酸残基のうち、112 残基目で停止、もう一方のアレルに由来する酵素は Tyr143 が Cys に変異しており、SAH 加水分解酵素活性が健常者に比較して、肝臓で 3%、赤血球中及び培養線維芽細胞中で 5-10% 程度しか検出されない。その

臨床所見として精神運動性の遅滞、低血圧、筋異常、脳の白質萎縮が報告されている。これには血清中の SAM 及び SAH の顕著な濃度上昇を伴っており、SAH 加水分解酵素活性の低下が原因になっていることを強く示唆している。このように、含硫アミノ酸代謝と多くのメチル化反応のボトルネックをなす SAH 加水分解酵素は、その活性が低下すると生物に重篤な障害を与える。この毒性をうまくコントロールすれば化学療法剤として高い作用を期待できるものと注目されている。

3. SAH 加水分解酵素阻害剤

SAH 加水分解酵素阻害剤の応用で代表的なものは、抗ウイルス薬としての利用である。そのメカニズムについては、次のように説明されている。SAH 加水分解酵素の阻害によって、SAM 依存性メチル化反応の効率を低下させると、mRNA の 5' 末端キャップ修飾も低下し、この修飾が進行しないとウイルス mRNA が成熟せず、娘ウイルス粒子の生成ができなくなるというものである。⁶⁾ しかし実際には、SAH 加水分解酵素阻害剤を加えてもキャップ修飾に変化がないケースが報告されており、^{7,8)} すべての阻害剤が各々のウイルスに対して一様なメカニズムで作用する訳ではなさそうである。

これまでに、糖部が開環型や炭素環型になった多くのヌクレオシドアナログが抗ウイルス活性を狙って開発されてきた。抗ヘルペス薬としてチェコスロバキアで市販されたことがある (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine (DHPA) (Fig. 2) は、初期に開発された糖部開環型ヌクレオシドの 1 つで、SAH 加水分解酵素を阻害して抗ウイルス作用を発揮すると考えられている。⁹⁾ われわれは、SAH 加水分解酵素の反応機構依存阻害剤 mechanism-based inhibitor として、DHPA のアルデヒド誘導体である 9-[(2'S,3'S)-3'-formyl-2',3'-dihydroxypropyl] adenine (FDHPA) を設計・合成した。¹⁰⁾ FDHPA の、組換え型ヒト SAH 加水分解酵素に対する阻害活性は強力ではなかったが、阻害作用は予想通り不



中西雅之

松山大学薬学部准教授。1968 年岡山県生まれ。岐阜薬科大学卒業、岐阜薬科大学大学院薬学研究科修士課程修了。同博士課程を中退し、岐阜大学工学部助手。この間、英国ダンディー大学に留学、Michael Ferguson 教授に師事。2007 年 4 月より現職。

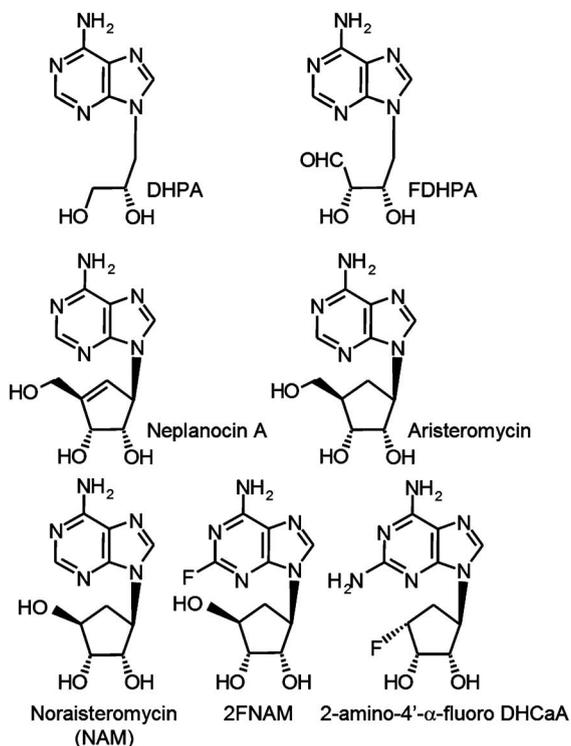


Fig. 2. Structures of SAH Hydrolase Inhibitors

可逆であったため、SAH加水分解酵素のアフィニティーラベル化剤としての活用が期待できる。一方、ネプラノシン A¹¹⁾ やアリストロマイシン¹²⁾ といった炭素環ヌクレオシドは、強力な SAH 加水分解酵素阻害活性と高い抗ウイルス活性を示すが、宿主細胞への毒性も高く、抗ウイルス薬としては使用されていない。

4. 抗マラリア薬としての SAH 加水分解酵素阻害剤

SAH 加水分解酵素阻害剤は、マラリアの化学療法剤としても有望である。マラリアは *Plasmodium* 属の原虫が肝細胞及び赤血球に寄生して引き起こす感染症であり、ヒトでは熱帯熱、三日熱、四日熱及び卵型マラリアの 4 種類がある。この内、*Plasmodium falciparum* が引き起こす熱帯熱マラリアが患者数や重篤度から最も重要視されている。従来、マラリアの治療には特効薬としてクロロキンやピリメサミンが使用されていたが、これらに耐性を示す原虫が蔓延するようになり、新たな抗マラリア薬及びワクチンの開発が進められている。その中で、代表的な SAH 加水分解酵素阻害剤であるネプラノシン A が、クロロキン耐性原虫に対しても増殖抑制効果を示すことが報告された。¹³⁾ これはヒト赤血球と

培養した *P. falciparum* にネプラノシン A を投与すると、原虫の増殖が抑制されるとともに、プリン、ポリアミン及び SAM 濃度が上昇するというものであり、原虫増殖阻害が SAH 加水分解酵素阻害に起因することを示唆している。その後、別の阻害剤 4',5'-不飽和-5'-フルオロアデノシンでも同様の増殖抑制が報告された。¹⁴⁾ ただし、これらの原虫増殖抑制が赤血球の(宿主の) SAH 加水分解酵素の阻害に因るのか、原虫自身の SAH 加水分解酵素の阻害に因るのか議論の残るところである。また、増殖阻害が原虫 SAH 加水分解酵素の阻害に起因するとしても、ヒト SAH 加水分解酵素の阻害による毒性も考慮しなければならない。この場合、原虫由来酵素と宿主酵素の間で阻害剤選択性を付与できるか否かが鍵となり、原虫と宿主両方の酵素を単離してその性状を比較する必要がある。Creedon らは *P. falciparum* から SAH 加水分解酵素をコードする cDNA の同定に成功し、その一次構造を報告した。¹⁵⁾ それによると原虫酵素はアミノ末端から 3 分の 1 の位置に 41 アミノ酸残基の挿入配列を持っていることが明らかになり、その構造上の差異が原虫酵素に選択的な阻害剤の開発に利用できると期待された。

われわれは、原虫 SAH 加水分解酵素を大腸菌で発現、精製することに初めて成功し、その酵素学的性質を明らかにした。¹⁶⁾ 精製した原虫 SAH 加水分解酵素はヒト酵素と同様ホモ四量体で、SAH の加水分解及び逆反応(アデノシンとホモシステインから SAH を合成)を触媒した。その触媒定数 k_{cat} はヒト酵素の 20 分の 1 程度であったが、基質(SAH 及びアデノシン)に対する K_m も低く、原虫酵素は阻害剤の影響を受け易いと期待された。ネプラノシン A による阻害を調べてみると、 IC_{50} はヒト酵素の 101 nM に対して、原虫酵素は 47 nM で、顕著な差異はなかったが、これは選択的阻害剤開発の可能性を示すものであった。また、アリストロマイシンの毒性軽減を目的に作られたノルアリストロマイシン (NAM)¹⁷⁾ では、ヒト酵素と原虫酵素で、それぞれ 1.1 μ M と 3.1 μ M であった。¹⁸⁾

SAH 加水分解酵素阻害剤が原虫酵素に選択性をもたらす条件を求めて、宿主毒性の比較的低い NAM を基本骨格として塩基部に種々の官能基を導入し、それらによる阻害を調べた。¹⁸⁾ その結果、2

位にアミノ基を導入した場合、阻害活性は低下するものの、原虫酵素への選択性が高まることを明らかにした。一方で、同じ位置に臭素やメチル基を導入すると阻害活性は顕著に低下した。導入した官能基のサイズは、アミノ基<メチル基<臭素であるため、共有結合半径の小さい官能基を塩基部2位へ導入することが選択性向上の鍵となると考えられた。これを裏付けるために、2位にフッ素を導入したNAM (2FNAM) を合成し、阻害効果を調べると予想通り、原虫酵素への選択性が上昇する結果が得られた。¹⁹⁾

2FNAM が原虫酵素に選択性を示す理由は、構造生物学的アプローチにより明らかになった。基質(アデノシン)存在下に、組換え型原虫酵素を結晶化し、²⁰⁾ 高エネルギー研究所のビームラインを使用して、その立体構造の解明に成功した。²¹⁾ それまでに、ヒトSAH加水分解酵素の立体構造はTurnerらのグループから報告されていた²²⁾ ため、興味の内容は、1) 原虫SAH加水分解酵素に特有の挿入配列の構造と、それが基質(阻害剤)結合に影響する可能性、及び2) 2位置換NAMが原虫酵素に選択的に作用する要因であった。各サブユニットは、基質結合ドメイン、NAD⁺結合ドメイン及びC末端ドメインに分けられ、これらの基本構造はヒト酵素と同じであった。基質結合ドメインに存在する挿入配列は、しかし基質結合に影響を与え得る位置にはなく、むしろホモ四量体の外側を向く構造であった。哺乳類由来のSAH加水分解酵素は基質を結合すると、基質結合ドメインとNAD⁺結合ドメインの間が狭まり、「閉じた」構造に変化するが、その動きにも挿入配列は関与してなさそうである。したがって、挿入配列が阻害剤選択性を決定するとは考え難く、その機能及び役割については今後の解明が待たれるところである。

では、2位置換NAMの選択性は何に起因するのだろうか？ヒトSAH加水分解酵素と原虫SAH加水分解酵素の基質結合部位はポケット状になっており、アデニン環はポケットの奥側に納まるように位置する。アデニン環は比較的タイトにアミノ酸残基に囲まれているが、この構造を詳細に比較すると、原虫酵素ではヒト酵素に比べて2位を囲む空間に余裕があることが判明した (Fig. 3)。この空間は原虫酵素のCys59で形成されているが、ヒト酵

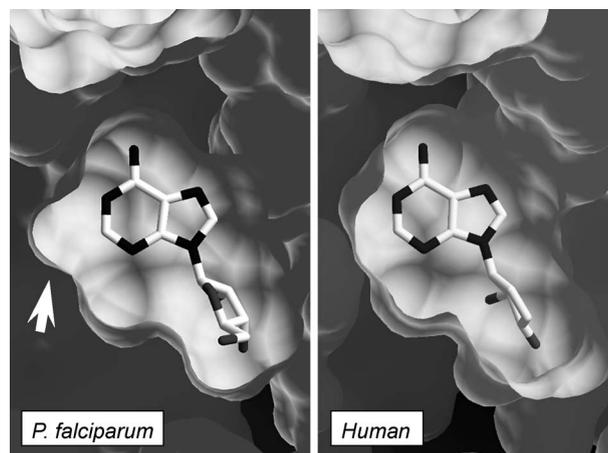


Fig. 3. Comparison of Adenosine Binding Site of *P. falciparum* SAH Hydrolase with Human SAH Hydrolase

Characteristic pothole in the substrate binding site of *P. falciparum* SAH hydrolase was indicated by an arrow (left panel). The corresponding position is occupied by the side-chain of Thr in the case of SAH hydrolase from human (right panel).

素の場合、これに対応するアミノ酸残基は Thr60 であり、その側鎖先端は二股に分かれている。二股の一方のメチル基は Cys59 のチオール基と同様タンパク中に埋没しているが、もう一方のヒドロキシル基はその反対側に突き出して、アデニン環2位付近の空間を埋めている。このわずかな差異が阻害剤の選択性に寄与していると考えられた。そこで、原虫酵素の Cys59 を Thr に置換した変異酵素を作製してみると、確かに2位置換NAMによる阻害を受け難くなっており、わずか一残基のアミノ酸置換で、阻害剤選択性が変換されることが明らかになった。この変化は単に立体障害だけでなく、硫黄原子と酸素原子の電気陰性度の違いに起因する可能性も考えられたため、Cys59 の Ser への置換も実施した。しかし、この変異体には阻害剤感受性を含めた酵素の性状に変化は認められず、2位置換NAMの選択的阻害活性には電気陰性度の寄与は事実上ないことが明らかになった。²³⁾ 逆に、ヒトSAH加水分解酵素でのアミノ酸置換の影響も調べた。ヒト酵素の Thr60 を Cys, Ser 若しくは Ala に置換すると、これら変異体は2FNAMによる阻害を7-20倍受けやすくなった。²³⁾ こうして、2FNAMによる原虫酵素の選択的阻害はCys59の作り出す空間によって成立することを明らかにできた。また、2BrNAMに阻害活性が認められなかったのは、その大きな共有結合半径をCys59の作る空間が収納し切れな

ったことによると考えられる。なお、現在一次構造が報告されているすべての SAH 加水分解酵素の中で、この位置に Cys 残基を持つのは *Plasmodium* 属の原虫のみである。

2FNAM による選択的阻害は、培養細胞を用いた実験でも確認されている。¹⁹⁾ 2FNAM は、NAM に比較してマウス乳がん細胞 FM3A に対する毒性を 100 倍低下させた一方で、赤内型 *P. falciparum* に対する毒性は変化させなかった。ただし、FM3A 細胞に対する NAM の毒性が元々高かったため、EC₅₀ 値は、FM3A と *P. falciparum* でほぼ同じ 7.2 μM 及び 7.4 μM であった。今後は、マラリア原虫に対する選択毒性を更に向上させる必要がある。そのためには、まだ利用されていないホモシステイン結合部位の違いを利用する必要があるが、ホモシステイン結合部位については、*in silico* 研究によって推測されているものの、²⁴⁾ いまだ実証には至っていない。われわれは、ホモシステイン結合部位を阻害剤設計に反映させる可能性を求めて、4'位をフッ素化した炭素環ヌクレオシド、2-amino-4'-α-fluoro 9-[(1'R,2'S,3'R) -2',3'-dihydroxycyclopentan-1'-yl] adenine ((2-amino-4'-α-fluoro DHCaA) を合成した。²⁵⁾ この化合物はヒト SAH 加水分解酵素を阻害しなかったが、マラリア原虫酵素はわずかに阻害した (IC₅₀=220 μM)。このことはホモシステイン結合部分に修飾を加えることで阻害活性を調節できることを示唆しており、今後さらに選択性を高めた化合物の開発が期待できる。

5. おわりに

以上述べてきたように、SAH 加水分解酵素では種間のわずかな差異を利用した選択的阻害剤を見出すことができた。このような手法による阻害剤開発は他の標的についても可能かつ有望である。感染症に対する薬剤開発は、宿主と異なる病原体独自の代謝系を狙い撃つのが上策であるが、共通の代謝経路でもアミノ酸レベルの違いを利用したファインチューニングを進めれば有効な化学療法剤を見出すことができると思われる。今後幅広い標的研究を通して感染症制圧に向けた研究を展開したい。

謝辞 本研究は、岐阜大学工学部生命工学科教授北出幸夫先生をはじめ多くの方々、特に、共同研究者の昭和大学薬学部講師田中信忠先生、同教授中

村和郎先生、同助手日下部吉男先生、岡山大学薬学部教授綿矢有佑先生から支援とご協力を得て遂行することができました。心より感謝を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Cantoni G. L., "Biological Methylation and Drug Design," eds. by Borchardt R. T., Creveling C. R., Ueland P. M., Humana Press, NJ, 1986, pp. 227-238.
- 2) Brosnan J. T., Brosnan M. E., *J. Nutr.*, **136**, 1636S-1640S (2006).
- 3) Stepkowski T., Brzezinski K., Legocki A. B., Jaskolski M., Bena G., *Mol. Phylogen. Evol.*, **34**, 15-28 (2005).
- 4) Miller M. W., Duhl D. M. J., Winkes B. M., Arredondo-Vega F., Saxon P. J., Wolff G. L., Epstein C. J., Hershfield M. S., Barsh G. S., *EMBO J.*, **13**, 1806-1816 (1994).
- 5) Baric I., Fumic K., Glenn B., Cuk M., Schulze A., Finklerstein J. D., Jill James S., Mejaski-Bosnjak V., Pazanin L., Pogribny I. P., Rados M., Sarnavka V., Scukanec-Spoljar M., Allen R. H., Stabler S., Uzelac L., Vugrek O., Wagner C., Zeisel S., Mudd S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 4234-4239 (2004).
- 6) De Clercq E., *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 704-720 (2004).
- 7) Stoltzfus C. M., Montgomery J. A., *J. Virol.*, **38**, 173-183 (1981).
- 8) Chiang P. K., "Nucleic Acid Methylation," eds. by Clawson G. A., Willis D. B., Weissbach A., Jones P. A., Wiley-Liss, New York, 1990, pp. 247-255.
- 9) De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Holy A., *Science*, **200**, 563-565 (1978).
- 10) Kitade Y., Nakanishi M., Yatome C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2737-2740 (1999).
- 11) Yaginuma S., Muto N., Tsujino N., Sudate Y., Hayashi M., Otani M., *J. Antibiot.*, **34**, 359-366 (1981).
- 12) Kusaka T., Yamamoto H., Shibata M., Muroi M., Kishi T., *J. Antibiot.*, **21**, 255-263 (1968).
- 13) Whaun J. M., Miura G. A., Brown N. D., Gordon R. K., Chiang P. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 277-283 (1986).
- 14) Bitonti A. J., Baumann R. J., Jarvi E. T., McCarthy J. R., McCann P. P., *Biochem.*

- Pharmacol.*, **40**, 601–606 (1990).
- 15) Creedon K. A., Rathod P. K., Wellem T. E., *J. Biol. Chem.*, **269**, 16364–16370 (1994).
 - 16) Nakanishi M., Iwata A., Yatome C., Kitade Y., *J. Biochem.*, **129**, 101–105 (2001).
 - 17) Siddiqi S. M., Chen X., Schneller S. W., *J. Med. Chem.*, **37**, 551–554 (1994).
 - 18) Kitade Y., Kozaki A., Miwa Y., Nakanishi M., *Tetrahedron*, **58**, 1271–1277 (2002).
 - 19) Kitade Y., Kojima H., Zulfqar F., Kim H.-S., Wataya Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3963–3965 (2003).
 - 20) Tanaka N., Kusakabe Y., Shiraiwa K., Sakamoto Y., Nakanishi M., Kitade Y., Nakamura K. T., *Protein Pept. Lett.*, **11**, 201–205 (2004).
 - 21) Tanaka N., Nakanishi M., Kusakabe Y., Shiraiwa K., Yabe S., Ito Y., Kitade Y., Nakamura K. T., *J. Mol. Biol.*, **343**, 1007–1017 (2004).
 - 22) Turner M. A., Yuan C.-S., Borchardt R. T., Hershfield M. S., Smith G. D., Howell P. L., *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 369–376 (1998).
 - 23) Nakanishi M., Yabe S., Tanaka N., Ito Y., Nakamura K. T., Kitade Y., *Mol. Biochem. Parasitol.*, **143**, 146–151 (2005).
 - 24) Hu Y., Yang X., Yin D. H., Mahadevan J., Kuczera K., Schowen R. L., Borchardt R. T., *Biochemistry*, **40**, 15143–15152 (2001).
 - 25) Kitade Y., Ando T., Yamaguchi T., Hori A., Nakanishi M., Ueno Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 5578–5583 (2006).