アフリカ睡眠病治療薬の候補化合物と 標的タンパク質との複合体構造

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門 志波智生, 高橋 元, 原田繁春
鳥取大学大学院工学研究科化学生物応用工学専攻応用化学講座 斎本博之
東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物医化学教室 城戸康年, 稲岡ダニエル健, 北 潔

Tomoo SHIBA, Gen TAKAHASHI, Shigeharu HARADA, Hiroyuki SAIMOTO, Yasutoshi KIDO, Daniel Ken INAOKA and Kiyoshi KITA: Crystal Structure of the Trypanosomal Cyanide-Insensitive Alternative Oxidase in Complex with Drug Candidates for African Trypanosomiasis

The cyanide-insensitive alternative oxidase (AOX) is a diiron carboxylate protein that catalyzes the four-electron reduction of dioxygen to water by ubiquinol. In *Trypanosoma brucei*, a parasite that causes human African sleeping sickness, AOX plays a critical role in the survival of the parasite in its bloodstream form. Since AOX is absent from mammals, this protein represents a novel and promising therapeutic target. We determined the first crystal structures of the trypanosomal alternative oxidase in the absence and presence of ascofuranone and its derivatives, which are drug candidates for African trypanosomiasis. All structures reveal that AOX is a homodimer with a non-haem diiron carboxylate active-site buried within a four-helix bundle.

1. はじめに

アフリカトリパノソーマ症は、ヒトではアフリカ睡眠病、家畜ではナガナと呼ばれ、アフリカの広大な地域に広がる寄生虫感染症である。ツェツェバエによって媒介されるこの感染症は、トリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*) の感染によって引き起こされる。¹⁾ 感染が成立すると宿主血流中で増殖し、増殖した原虫はやがて血液脳関門を突破し中枢神経系へと移行、最終的に宿主は死に至る。

アフリカ睡眠病は、サハラ以南の36カ国を含む広大な地域に分布し、毎年約3万人もの人々の死亡が報告されている。しかし、正確な数字は把握されていないのが現状である。治療しないと死に至る疾病であるため、感染者に対しては迅速な診断と治療が必要である。しかし、「顧みられない熱帯病」(Neglected Tropical Diseases (NTDs)) と呼ばれているように先進諸国は、治療薬の開発には積極的でなく、アフリカの貧困層を中心に蔓延している。また、現在用いられている薬は、強い毒性や副作用があるので、より安全で治療効果の高い薬剤の開発が求められている。²⁾

1.1 トリパノソーマ原虫のエネルギー代謝

アフリカトリパノソーマは、宿主である哺乳類や媒介昆虫であるツェツェバエの体内環境に適応して、形態やエネルギー代謝系を変化させる。³⁾ ツェツェバエ体内では、procyclic (昆虫) 型と呼ばれる形態をとり、解糖系、TCA回路、電子伝達系のシトクロムc酸化酵素を介した哺乳類

型のエネルギー代謝を行っている。^{1),3)}

一方、哺乳類の血流中では、鞭毛が伸びた細長い bloodstream (血流) 型に形態を変化させる。このとき、シトクロムc酸化酵素の発現が低下し、解糖系に依存したエネルギー生産に変わる。血流型の原虫では、エネルギー生産に関与する重要な細胞小器官はグリコソームとミトコンドリアである。宿主の血流中に豊富に存在しているグルコースを炭素源として取り込み、グリコソーム内の解糖系酵素を用いてピルビン酸へと代謝し、基質レベルでATPを生産している。この過程でNAD⁺はNADHに還元されるが、解糖系を常に作動させるために、NADHをNAD⁺に再酸化する必要がある。⁴⁾ そのため、ミトコンドリア内膜に存在するグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH))、ユビキノンとシアン耐性酸化酵素 (Trypanosome alternative oxidase ; TAO) から構成されるG3P酸化系が必要不可欠である (図1)。

1.2 シアン耐性酸化酵素 (TAO)

トリパノソーマだけでなく、植物や酵母のミトコンドリアにもシアン耐性酸化酵素が存在し、alternative oxidase (AOX) と呼ばれている。トリパノソーマの alternative oxidase (TAO) は、哺乳類や昆虫型トリパノソーマのミトコンドリアに存在するシアン感受性シトクロムc酸化酵素 (複合体IV) とはまったく異なる酵素で、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素によって生じた還元型ユビキノン (ユビキノール) から酸素分子に電子を渡している。⁴⁾ 哺乳類のシ

図1 血流型トリパノソーマのエネルギー代謝経路.
(Energy metabolic pathway of *Trypanosoma brucei*
in bloodstream form.)

トクロムc酸化酵素は、13個のサブユニットから構成されており、補欠分子族として、ヘム、銅などを含む超分子複合体で、シトクロムcから酵素への電子伝達を触媒する。一方、TAOは、分子量約38 kDaの単一サブユニットの膜表在型のタンパク質であり、補欠分子族としてヘムではなく二核非ヘム鉄を有している。^{4,6)} このシアン耐性酸化酵素は、哺乳類に存在していないので、アフリカトリパノソーマ症の薬剤標的としてきわめて有望であると考えられる。

1.3 アスコフラノン

アスコフラノンは、日本で発見された糸状菌から単離されたプレニルフェノール化合物であり、われわれは、TAOを非常に強く阻害する ($IC_{50} = 0.13$ nM) ことを明らかにしている。動物実験においても、トリパノソーマに感染させたヤギやマウスが、アスコフラノンの投与によって完全に治癒したことから、抗アフリカトリパノソーマ症薬のリード化合物として有望である。^{7,8)} しかし、TAOやAOXの立体構造がわかっていなかったため、どのようにアスコフラノンが作用して酵素を阻害しているかに関する立体構造情報がまったくなかった。そこで、TAOおよびTAO-アスコフラノン複合体の立体構造をX線結晶構造解析で明らかにし、TAOと阻害剤の相互作用の様式を解明することを目的に研究を行った。

2. TAOの結晶化と結晶構造解析

His-tagを付けたTAOを大腸菌内膜に発現させ、ショ糖密度勾配超遠心で精製した内膜から、界面活性剤*n*-オクチルβ-D-グルコピラノシド (OG) で可溶化した。TALON®カラムを用いて精製後、His-tagをプロテアーゼで切断して結晶化に用いた。⁹⁾ 市販のスクリーニングキットを用いてさまざまな界面活性剤の存在下でTAOの結晶化条件を探索したところ、OGとテトラエチレングリコールモノオクチルエーテル (C8E4) からなる混合界面活性剤存在下、結晶化剤としてPEG400を用いた場合に単結晶を得るこ

図2 TAOのサンプルと結晶。(SDS-PAGE image and crystals of TAO.) (a) TAOの結晶化サンプルのSDS-PAGE. (b) TAOの結晶。

とができた(図2)。最初は、放射光実験施設でのX線回折実験で約7 Å分解能の反射が得られる程度であったが、改良を重ねた結果、3 Å分解能を超えるデータを測定できるようになった。¹⁰⁾

TAOは、類縁タンパク質の立体構造がまったく報告されていないので、分子置換法による解析ができない。そこで、多波長異常分散法を適用するため、メチオニンをセレノメチオニンに置換したタンパク質を精製した。しかし、精製途中ですぐに沈殿してしまい、結晶化を行うことができなかった。また、さまざまな重原子同型置換体結晶を調製してX線回折実験を行ったが分解能が悪く解析には至らなかった。そこで、TAOに含まれている二核非ヘム鉄の異常分散効果を利用した単波長異常分散 (SAD) 法で位相情報を得ることにした。データ測定は、KEK-PFのBL-17Aで行い、波長1.7390 ÅのX線を用いて3.2 Å分解能のSADデータを収集した。二核非ヘム鉄の位置の決定と精密化は、プログラムsolveを用いて行った。非対称単位に存在する4分子のTAOすべてで二核非ヘム鉄の位置を見つけることができた。プログラムresolveを用いて溶媒領域の平滑化を行ったところα-ヘリックスを示す電子密度が確認でき、大部分のポリペプチド鎖をトレースすることができた。その後、分解能を2.85 Åに拡張し、構造の精密化を行った。その結果、329残基中、N末およびC末の約30残基を除くすべてのアミノ酸残基をトレースできた。Refmac5を用いた精密化で、信頼性の高い ($R_{work}/R_{free} = 0.192/0.247$, 分解能 30 ~ 2.85 Å) 立体化学的にも妥当な構造を決定することができた。¹¹⁾

3. TAOの結晶構造

3.1 TAOの全体構造

構造解析の結果、TAOは結晶中で二量体として存在していることがわかった(ゲルろ過クロマトグラフィーでも二量体の分子量に相当する位置に溶出される)。一方のサブユニットのN末端領域 (N-terminal arm) が、ダイマーのもう一方へ伸びていき、肩を組むような形で強固な二量体

図3 TAO 二量体の結晶構造. (Crystal structure of TAO dimer.) (a) TAO の二量体の構造. (b) TAO の二量体形成様式. 一方のサブユニットのN末端領域がほかのほうに入り込んで強固な二量体を形成している. A分子は、ヘリックスを円筒で示し、B分子は表面モデルで示している.

を形成していた.³⁾ TAO のモノマーは、6本の長い α -ヘリックス ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) と4本の短いヘリックス (S1-S4) から構成されていた. ヘリックス $\alpha 3$ と $\alpha 6$ には、二核非ヘム鉄結合タンパク質に特有のモチーフ配列 (Glu-X-X-His) が存在し、その中のグルタミン酸残基 (Glu162, Glu266) が二核非ヘム鉄に配位していた. また、ヘリックス $\alpha 2$ と $\alpha 5$ にある2つのグルタミン酸残基 (Glu123, Glu213) も、二核非ヘム鉄に配位していた.¹¹⁾

3.2 TAO の膜結合領域

TAO は、膜表在型の膜タンパク質であることがアミノ酸配列から予想されていたが、X線構造解析によってその詳細が明らかになった. 二核非ヘム鉄への配位に関与していないヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 4$ には、疎水性領域が集中し、その領域の周りを脂質二重膜のリン酸基と静電的な相互作用をするのに適した配置に塩基性アミノ酸残基がとり囲んでいる (図4).¹¹⁾

PPM サーバー¹²⁾ (Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database) でTAOがどの程度膜に埋まっているか

図4 TAO の膜結合領域. (Membrane binding region of TAO.) (a) $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ が形成する疎水性表面. 疎水性の領域を濃い色で示す. (b) 静電ポテンシャル表面. 疎水性表面の周りに分布している塩基性アミノ酸を濃い色で示す.

を計算したところ、およそ8.4 Åになった. 膜との境目にはArg106, Arg143, Arg180, Arg203とArg207が存在し、これらはほとんどの種のAOXで保存されていた. したがって、一般にAOXには二量体を形成し、ヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 4$ に膜結合領域があり、膜との境界面にはアルギニン残基が配置して脂質二重膜のリン酸基と相互作用していると考えられる.

3.3 diiron の構造

TAO は、膜結合型の二核非ヘム鉄タンパク質の立体構造として初めて決定された. しかし、水溶性の二核非ヘム鉄タンパク質は、多くの構造が決定されている. TAOでは、4つのグルタミン酸残基だけが二核非ヘム鉄への配位に関与しているのに対して、水溶性の二核非ヘム鉄タンパク質では、それに加えて1~2個のヒスチジン残基が配位に関与している. しかし、TAOでは対応する2つのヒスチジン残基 (His165とHis269) は、二核非ヘム鉄と配位しているグルタミン酸残基と水素結合し、二核非ヘム鉄の周辺に水素結合ネットワークを形成していた. このネットワ

図5 二核非ヘム鉄結合領域と水素結合ネットワーク. (Diiron binding region and hydrogen bond network of TAO.) 実線は配位結合, 点線は水素結合を表している.

ークにかかわっているアミノ酸残基は, ほとんどの種の AOX で保存されている (図5).

4. TAO-アスコフラノン誘導体の構造

4.1 TAO-アスコフラノン誘導体結晶の調製

アスコフラノン (図6a) のTAOに対する結合様式を調べるため, TAO-アスコフラノン複合体結晶の調製を試みた. DMSO に溶かしたアスコフラノン溶液を使って, 終濃度 1 mM のソーキング溶液を調製したがアスコフラノンは水に溶けにくいので析出してしまった. そこで, アスコフラノンより溶解度の高いアスコフラノン誘導体, AF2779OH (図6b) を 1 mM 含むソーキング溶液に 150 分間ソーキングして複合体結晶を調製し, 液体窒素気流下で凍結後, SPring-8 の BL-44XU で分解能 2.6 Å のデータを収集した. AF2779OH は, アスコフラノンとほぼ同じ濃度で TAO を阻害し ($IC_{50} = 0.48$ nM), トリパノソーマに感染したマウスを完全に治癒できることが確認されている. また, 別のアスコフラノン誘導体, コレトクロリン B (CCB ; $IC_{50} = 0.20$ nM ; 図6c) との複合体の結晶構造も 2.3 Å 分解能で明らかにすることができた.

4.2 TAO-アスコフラノン誘導体の結晶構造

TAO-AF2779OH および TAO-CCB 複合体の結晶構造は, ligand-free 型構造をモデル分子にした分子置換法で決定した. TAO-AF2779OH では分解能 30-2.6 Å, $R_{work}/R_{free} = 0.214/0.256$, TAO-CCB については分解能 30-2.3 Å, $R_{work}/R_{free} = 0.185/0.227$ まで精密化できた.

アスコフラノン誘導体は, 二核非ヘム鉄結合部位近傍にある疎水性ポケットに結合していた (図7). アスコフラノン誘導体の芳香族環は, 疎水性アミノ酸である Leu122, Leu121, Ala216 や Tyr220 に囲まれ, 2位の OH 基は Arg118 と Thr219 が水素結合していた. イソブレン単位からなる tail 領域は, Cys95, Arg96, Glu215 と相互作用し, 1'位の

図6 TAO 阻害剤. (Inhibitors of TAO.) (a) アスコフラノン. (b) AF2779OH. (c) コレトクロリン B.

図7 TAO-AF2779OH の結晶構造. (The crystal structures of TAO-AF2779OH complex.)

図8 AF2779OH の結合部位. (Binding site of AF2779OH.) AF2779OH と二核非ヘム鉄に相互作用しているアミノ酸残基を stick モデルで示している. 点線は水素結合を示している.

置で約 90 度折れ曲がって, ヘリックス $\alpha1$ と $\alpha4$ の間にある疎水性ポケットに結合していた (図8, 9). AF2779OH と CCB は, ほぼ同じ様式で TAO に結合しているが, 分解能が高い TAO-CCB 複合体では, 二核非ヘム鉄に結合している OH⁻ イオンの電子密度をはっきりと確認することができた (OH⁻ イオンの存在は, 分光学的研究から示唆され

図9 CBBの結合部位。(Binding site of CBB.) CCBと二核非ヘム鉄に相互作用しているアミノ酸残基をstickモデルで示している。実線は配位結合、点線は水素結合を示す。CBBと二核非ヘム鉄の電子密度は、1.0と3.0 σ レベルで表されている。

ている^{13),14)}。

また、複合体を形成することにより、二核非ヘム鉄への配位結合様式がligand-free型に比べて大きく変化していた。Ligand-free型では、二核非ヘム鉄に4つのグルタミン酸 (Glu123, Glu162, Glu213とGlu266) が配位していたが、アスコフラノン誘導体との複合体では、二核非ヘム鉄とHis165の位置関係が大きく変化し、His165も二核非ヘム鉄に配位していた。

Cys95を除き、アスコフラノン誘導体と相互作用しているTAOのアミノ酸残基は、ほとんどすべての種のAOXで保存されていること、これらのアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換したTAO変異体 (R118A, R118Q, L122A, L122N, E215A, A216L, A216N, T219VとY220F) は酵素活性を失ったことから、これらのアミノ酸残基が酵素反応や基質認識に関与していると考えられる。¹¹⁾

5. おわりに

本研究で、われわれはアフリカ睡眠病の治療薬の標的タンパク質であるトリパノソーマシアン耐性酸化酵素 (TAO) およびTAOをきわめて強く阻害することができるアスコフラノン誘導体との複合体について結晶構造を明らかにした。この結果は多くのアスコフラノン誘導体を用いた構造活性相関ときわめてよく一致していた。¹⁵⁾ TAOは、宿主である哺乳類には存在しない酵素なので、TAO阻害剤は副作用のない安全な治療薬になり得る。実際、アスコフラノンやアスコフラノン誘導体を用いた動物実験で、トリパノソーマに感染させたマウスやヤギを完全に治癒できることが確認できているので、これらは、アフリカ睡眠病の

治療薬のリード化合物として非常に期待することができる。また、AOXはほかの病原性真菌類にも存在していることから、これらが引き起こす病気に対してもアスコフラノンやその誘導体が治療薬のリード化合物になる可能性がある。

一方、アスコフラノン以外にもTAOの酵素活性を阻害し、動物実験で感染マウスを完全に治癒できる化合物を発見している。TAOとその化合物との複合体構造も決定しており、さらに安全で効果のある化合物のデザインを行っているところである。

謝 辞

この研究を行うにあたり、X線回折強度データの測定でお世話になったKEK-PFのスタッフの皆様、SPRING-8 BL41XUおよびBL44XUのスタッフの皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) M. Chaudhuri, R. D. Ott and G. C. Hill: *Trends. Parasitol.* **22**, 484 (2006).
- 2) M. A. Phillip: *Mol. Microbiol.* **86**, 10 (2012).
- 3) F. R. Opperdoes, P. Borst, S. Bakker and W. Leene: *Eur. J. Biochem.* **76**, 29 (1977).
- 4) A. L. Moore and M. A. Albury: *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1022 (2008).
- 5) M. E. Andersson and P. Nordlund: *FEBS Lett.* **449**, (1999).
- 6) D. Berthold, M. E. Andersson and P. Nordlund: *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 241 (2000).
- 7) Y. Yabu, et al.: *Parasitol. Int.* **52**, 155 (2003).
- 8) Y. Yabu, et al.: *Parasitol. Int.* **55**, 39 (2006).
- 9) Y. Kido, et al.: *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, (2010).
- 10) Y. Kido, et al.: *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 275 (2010).
- 11) T. Shiba, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 4580 (2013).
- 12) M. A. Lomize, I. D. Pogozheva, H. Joo, H. I. Mosberg and A. L. Lomize: *Nucleic Acids Res.* **40**, D370 (2012).
- 13) D. A. Berthold, N. Voevodskaya, P. Stenmark, A. Graslund and P. Nordlund: *J. Biol. Chem.* **277**, 43608 (2002).
- 14) A. L. Moore, et al.: *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 327 (2008).
- 15) H. Saimoto, et al.: *J. Biochem.* **153**, 267 (2013).

プロフィール

志波智生 Tomoo SHIBA
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門
Graduate School of Science and Technology,
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of
Technology
〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
Gosho Kaido-tyo, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto
606-8585, Japan
e-mail: tshiba@kit.ac.jp
専門分野：構造生物学、タンパク質結晶学
現在の研究テーマ：寄生虫の生存に必須のタンパク質の構造解析、創薬関連タンパク質の構造解析

高橋 元 Gen TAKAHASHI
京都工芸繊維大学工学科学研究科応用生物学専攻
Graduate School of Science and Technology,
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of
Technology
〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
Gosho Kaido-tyo, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto
606-8585, Japan
e-mail: 12611021@kit.ac.jp
最終学歴：京都工芸繊維大学工学科学研究科応用
生物学専攻 博士前期課程2年 在学中
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：TAOの結晶構造解析
趣味：マンガを描くこと、ピアノ

城戸康年 Yasutoshi KIDO
東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物
医化学教室
Department of Biomedical Chemistry, Graduate School
of Medicine, The University of Tokyo
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
e-mail: yasutoshikido@gmail.com
最終学歴：博士（保健学）
専門分野：生化学, Neglected Tropical Diseases (NTDs),
熱帯医学
現在の研究テーマ：NTDsやピロリ菌などのゲノ
ム疫学研究と薬剤開発
趣味：旅行, 読書

原田繁春 Shigeharu HARADA
京都工芸繊維大学大学院工学科学研究科応用生物
学部門
Graduate School of Science and Technology,
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of
Technology
〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
Gosho Kaido-tyo, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto
606-8585, Japan
e-mail: harada@kit.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士課程
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：寄生虫タンパク質の構造生物
学とその応用

稲岡ダニエル健 Daniel Ken INAOKA
東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物
医化学教室
Department of Biomedical Chemistry, Graduate School
of Medicine, The University of Tokyo
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
e-mail: danielken@m.u-tokyo.ac.jp
最終学歴：東京大学薬学系研究科・生命薬学
専門分野：生化学・寄生虫学
現在の研究テーマ：呼吸鎖・エネルギー代謝
趣味：釣り, 旅行

斎本博之 Hiroyuki SAIMOTO
鳥取大学大学院工学研究科化学生物応用工学専攻
応用化学講座
Department of Chemistry and Biotechnology,
Graduate School of Engineering, Tottori University
〒680-8552 鳥取市湖山町南4-101
4-101 Minami, Koyama-cho, Tottori 680-8552, Japan
e-mail: saimoto@chem.tottori-u.ac.jp
最終学歴：工学博士
専門分野：有機化学, 天然高分子化学
現在の研究テーマ：ポリオール類の合成デザイン
と機能化
趣味：旅行, 読書

北 潔 Kiyoshi KITA
東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物
医化学教室
Department of Biomedical Chemistry, Graduate
School of Medicine, The University of Tokyo
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
e-mail: kitak@m.u-tokyo.ac.jp
専門分野：生化学, 寄生虫学
現在の研究テーマ：低酸素適応機構, 創薬