

令和元年6月18日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19592

研究課題名(和文)メトトレキサートの効果・副作用発現における標的蛋白質の同定と機序の解明

研究課題名(英文) Identification of methotrexate-target protein and molecular mechanism of anti-inflammatory action

研究代表者

面川 歩 (Omokawa, Ayumi)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80722066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：メトトレキサート(MTX)は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を標的とする葉酸代謝阻害薬として開発され、1950年代から急性白血病の治療に用いられてきた。その後、骨破壊の進行抑制作用を示すことがわかり、関節リウマチ治療の第一選択薬として広く用いられている。MTXの薬理作用は、複数の免疫抑制及び調節効果と考えられているが、DHFRに対する阻害効果だけでは薬効を全ては説明できない。本研究は免疫系におけるMTXの薬理作用の解明を目指し、MTXの新規標的タンパク質の探索と同定を行った。さらに、薬剤-タンパク質間相互作用解析を行い、同定した新規標的タンパク質とMTXとの分子間相互作用様式を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチのより効果的な治療には、MTXの作用機序の解明が重要である。しかし、関節リウマチに対するMTXの薬理作用が、実臨床データから主に得られてきた経緯もあり、免疫系における作用機序に関する基礎研究はあまり進んでいない。本研究では、新規MTX標的タンパク質の同定に成功し、X線結晶構造解析を用いてMTXとの相互作用様式を分子レベルで明らかにすることができた。この新規MTX標的タンパク質は炎症反応、免疫抑制反応に重要な因子であることから、関節リウマチを始めとする自己免疫疾患の病態解明、新規薬剤の創薬に繋がる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Low-dose methotrexate (MTX) is the anchor drug for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) among disease-modifying anti-rheumatic drugs. Although low-dose MTX therapy has been proven clinically effective in various autoimmune diseases, its precise mechanisms of beneficial action in the therapy for a wide variety of immunological disorders remain less clear. Herein, we report identification of a novel MTX-target protein by a drug affinity chromatography using MTX-coupled sepharose for elucidation of the molecular mechanism of anti-inflammatory action of low-dose MTX. The X-ray crystal structure and isothermal titration calorimetry data reveal the the specificity of interaction between the isolated target protein and MTX.

研究分野：免疫学

キーワード：メトトレキサート 免疫調整薬 タンパク質相互作用 X線構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは自己免疫疾患の1つであり、関節滑膜における炎症が慢性化すると関節の破壊や変形が起こり、日常生活に支障をきたす病気である。その罹患率は、世界的に見て人口の1%と見積もられており、日本国内では高齢化が進むに伴い年々増加している。これらの背景から、関節リウマチに対する安全かつ有効な治療薬や治療法の開発が求められている。関節リウマチの病因・発症メカニズムは未だ不明であるため完治は難しく、現在、関節リウマチの治療は、抗リウマチ薬を用いて関節破壊を抑制することによる寛解が目標となっている。

MTX はジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を標的とし葉酸代謝を阻害する薬剤で、1950年代から急性白血病の治療に用いられてきた。その後、骨破壊の進行抑制作用を示すことがわかり、その長期にわたる有効性と安全性から、関節リウマチ治療の第一選択薬、アンカードラッグとして現在広く用いられるようになった。MTXの薬理作用は、複数の免疫抑制及び調節効果の結果と考えられているが、DHFRに対する阻害効果だけではその薬効を説明することは難しい。また、MTXの副作用として、~7%の症例で間質性肺炎を合併し、その死亡率は13%にもなるとの報告があり、副作用の発生機序も、葉酸代謝の阻害効果では説明することができない。今後、MTXによるより安全で効果的な治療を行うために、MTXの作用機序ならびに副作用の発生機序の解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、MTXの作用機序ならびに副作用の発生機序の解明を目指し、MTXが作用する新規標的タンパク質を探索・同定し、その機能に及ぼすMTXの影響について、生化学的手法及び構造化学的手法により評価を行うことを目的とした。

具体的には以下の研究を遂行した。

1. Drug affinity chromatography を用いた MTX 新規標的タンパク質の探索

MTXを固定化したセファロース樹脂を用いた Drug affinity chromatography により、ウシ臓器抽出液から、MTX に対して特異的に結合するタンパク質を単離・同定することで、新規標的タンパク質候補の探索を行う。

2. ヒト由来 MTX 新規標的タンパク質のリコンビナント体作製と MTX との薬剤-タンパク質間相互作用解析

Drug affinity chromatography により同定したウシ由来新規標的タンパク質と相同性の高いヒト由来の新規標的タンパク質遺伝子をクローニングし、大腸菌によるタンパク質発現系を構築する。生化学的手法及び熱力学的手法を用いて、MTX に対する解離定数や結合数を決定することで、MTX がヒト由来新規標的タンパク質に作用することを確認する。

3. MTX とヒト由来 MTX 新規標的タンパク質複合体の X 線結晶構造解析

MTX とヒト由来 MTX 新規標的タンパク質複合体の結晶化を行い、X 線結晶構造解析により、MTX と新規標的タンパク質との結合様式について分子レベルで検討を行う。

3. 研究の方法

1. Drug affinity chromatography を用いた MTX 新規標的タンパク質を探索

MTX をエポキシ活性化セファロース担体に結合させた MTX 固定化カラムを作製し、ウシの脾臓、胸腺のホモジナイズ溶液をアプライした。緩衝液で洗浄後、MTX 溶液で溶出した分画を 15% SDS-PAGE により解析した。得られた各タンパク質バンドを SDS ゲルから抽出後、逆相クロマトグラフィー質量分析装置 LCQ Deca XP (Thermo-Finnigan) により解析した。得られた MS データと MS/MS データを、NCBI nr 20120123 database または Mascot Version 2.3 database (Matrix Science) で検索し、各タンパク質配列の帰属を行った。

2. ヒト由来 MTX 新規標的タンパク質のリコンビナント体作製と MTX との薬剤-タンパク質間相互作用解析

ヒト末梢血単核球 cDNA から、新規標的タンパク質遺伝子のクローニングを行い、pET-21b に導入し、大腸菌発現ベクターを構築した。E. coli BL21(DE3) の形質転換を行い、大量培養後、弱陰イオン交換カラム、弱陽イオン交換カラムにより、リコンビナント体を精製した。

MTX による MTX 新規標的タンパク質の二次構造への影響を、円偏光二色性スペクトル法を用いることで、また高次構造に与える影響をサイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱法 (SEC-MALS) を用いることで、それぞれ検討した。また、等温滴定型カロリメトリー (ITC) 測定により、新規標的タンパク質の MTX に対する解離定数及び結合数を求めた。

3. MTX とヒト由来 MTX 新規標的タンパク質複合体の X 線結晶構造解析

結晶化は 10 mg/mL の新規標的タンパク質を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行

った。リザーバー溶液は 2.0 M 硫酸アンモニウム、4%イソプロパノールを含む 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いた。得られた結晶を、10%グリセロールを含む 4 mM MTX 溶液に 5 分間ソーキングし、X 線回折データを得た。測定は高エネルギー加速器研究機構(つくば、Photon Factory, AR-NW12)にて行った。回折データの processing と scaling はプログラム HKL2000 と CCP4 プログラムシステムを用いて行い、分子置換法により初期位相を決定した。構造精密化の計算には、プログラム CCP4 を用い、タンパク質構造の修正は $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ を係数として計算した電子密度に対してプログラム CCP4 の Coot を用いた。

4. 研究成果

1. Drug affinity chromatography を用いた MTX の新規標的タンパク質を探索

ウシ脾臓の粗抽液を用いて、MTX を固定化したカラムによる Drug affinity chromatography を行い、SDS-PAGE により解析したところ、数種類のタンパク質バンドが得られた(図 1)。各タンパク質バンドをゲルから抽出し、逆相クロマトグラフィー質量分析装置により解析を行った結果、既知の MTX 標的タンパク質である DHFR(図 1 のバンド ①)のほか、炎症関連タンパク質 A(図 1 のバンド ②)の同定に成功した。

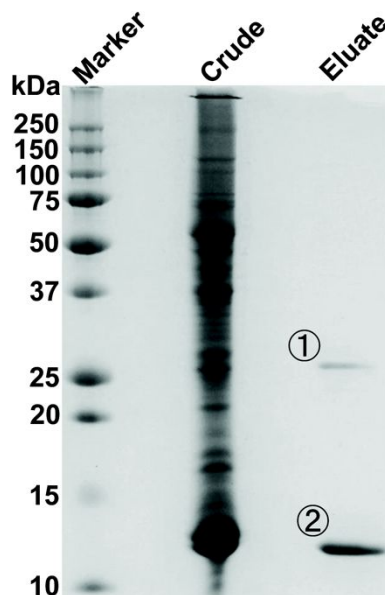


図 1. MTX 溶出分画の SDS-PAGE. MTX 固定化カラムに、牛脾臓のホモジナイズ溶液を流し、洗浄後、MTX 溶液によって、特異的に結合したタンパク質を溶出した。

2. ヒト由来 MTX 新規標的タンパク質のリコンビナント体と MTX との薬剤-タンパク質間相互作用解析

ヒト末梢血単核球 cDNA から炎症関連タンパク質 A 遺伝子のクローニングを行い、大腸菌により、リコンビナント体を発現させた。各種カラムで精製後、15% SDS-PAGE 解析を行ったところ、炎症関連タンパク質 A のアミノ酸一次配列から計算した分子量約 12.5 kDa と一致するバンドが確認できた。また、SEC-MALS により高次構造を解析したところ、炎症関連タンパク質 A は三量体構造であることが明らかになった。

MTX が炎症関連タンパク質 A の高次構造に与える影響を検討した。円偏光二色性スペクトル法を用いて、MTX 存在下における炎症関連タンパク質 A の二次構造への影響を解析したところ、二次構造に大きな変化はみられなかった。また、SEC-MALS を用いて三量体構造への影響を解析したところ、MTX 存在下でも、炎症関連タンパク質 A の三量体構造は保持されていることが明らかになった。次に、ITC 測定により、炎症関連タンパク質 A の MTX に対する結合の熱力学的パラメーターを算出したところ、エンタルピー変化の寄与が大きいことが明らかとなった。また、MTX は炎症関連タンパク質 A に 1:1 の量比で結合し、解離定数 $K_d = 313 \mu\text{M}$ であることがわかった。

炎症関連タンパク質 A と高い構造類似性を有し、サイトカインとして同様な作用を示す炎症関連タンパク質 B が知られている。そこで、MTX の炎症関連タンパク質 B に対する阻害作用を検討するために、ヒト由来炎症関連タンパク質 B をクローニングし、大腸菌によるリコンビナント体を作製した。相互作用解析を行ったところ、炎症関連タンパク質 A と比較して、炎症関連タンパク質 B の構造及び活性に対する MTX の影響は小さかったことが

ら、MTX は炎症関連タンパク質 A の活性を特異的に阻害する可能性があることが示唆された。

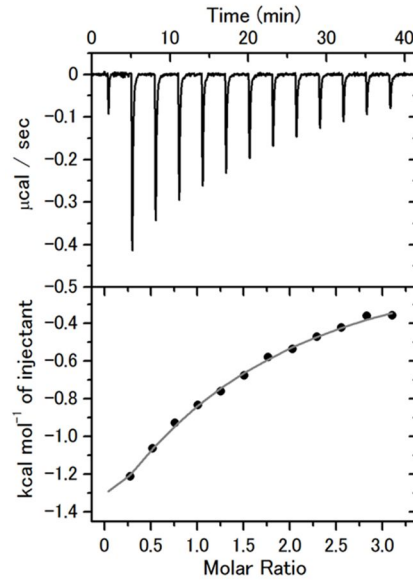


図 2 . ITC 測定による MTX と炎症関連タンパク質 A 複合体の相互作用解析結果

3. MTX とヒト由来 MTX 新規標的タンパク質複合体の X 線結晶構造解析

炎症関連タンパク質 A の単結晶化を行い、X 線結晶構造解析を行った。炎症関連タンパク質 A は、三量体構造をとっていることが明らかになり、SEC-MALS の結果と一致した。次に、炎症関連タンパク質 A の単結晶を MTX 溶液にソーキングし、MTX-炎症関連タンパク質 A 複合体の X 線結晶構造解析を行った。その結果、MTX は炎症関連タンパク質 A 三量体構造のサブユニット間に位置するポケットに結合していることが明らかになった。MTX の結合により、Tyr36 の側鎖が約 90°回転し、MTX のプテリジン環との間に π - π 相互作用の形成がみられた(図 3)。また、MTX の結合による炎症関連タンパク質 A 三量体構造全体の大きな歪みは見られず (RMSD_C α : 0.152 Å)、SEC-MALS の結果と一致した。

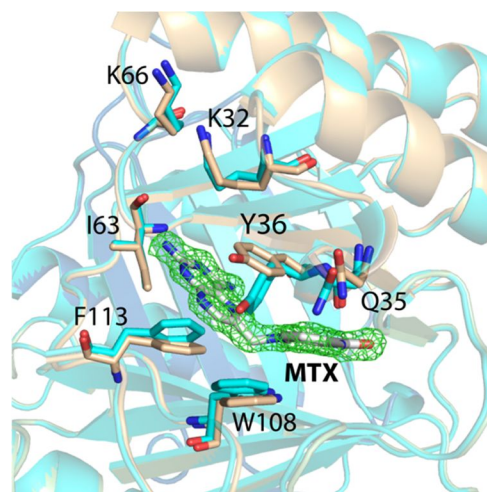


図 3 . MTX と炎症関連タンパク質 A 複合体の X 線結晶構造
炎症関連タンパク質 A の MTX 結合部位の拡大図。MTX ありの結晶構造をシアン色、MTX なしの結晶構造を茶色で示し、重ねて表示している。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計9件)

1. 杉島 小雪、松村 洋寿、面川 歩、布村 渉、堂前 直、長門石 暁、津本 浩平、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, 抗リウマチ薬メトトレキサートとマクロファージ遊走阻害因子の複合体結晶構造解析, 2018 年度日本生物工学会北日本支部秋田シンポジウム, 秋田大学手形キャンパス, 秋田, 2018 年 12 月 22 日
2. 杉島 小雪、松村 洋寿、面川 歩、布村 渉、堂前 直、長門石 暁、津本 浩平、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, Interaction analysis of anti-rheumatic drug methotrexate and macrophage migration inhibitory factor, 平成 30 年度化学系学協会東北大会, 平成 30 年度化学系学協会東北大会, 秋田大学手形キャンパス, 秋田, 2018 年 9 月 21-22 日
3. 杉島 小雪、松村 洋寿、面川 歩、布村 渉、堂前 直、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, 抗リウマチ薬メトトレキサートとマクロファージ遊走阻害因子の複合体結晶構造解析, 第 45 回生体分子科学討論会, 大阪市立大学杉本キャンパス, 大阪, 2018 年 6 月 22-23 日
4. 杉島 小雪、松村 洋寿、面川 歩、布村 渉、堂前 直、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, リウマチ薬メトトレキサートと新規作用標的タンパク質の複合体結晶構造解析, 2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 茨城県立県民文化センター, 茨城, 2018 年 3 月 2-4 日
5. 杉島 小雪、出茂 鮎美、松村 洋寿、面川 歩、布村 渉、堂前 直、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, 抗リウマチ薬メトトレキサートとマクロファージ遊走阻害因子サイトカインファミリーの相互作用解析, 酵素工学研究会第 78 回講演会, 秋田カレッジプラザ, 秋田, 2017 年 10 月 6 日
6. 杉島 小雪、松村 洋寿、面川 歩、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, リウマチ薬メトトレキサート新規標的タンパク質としてのマクロファージ遊走阻害因子の機能及び相互作用解析, 第 69 回日本生物工学会大会, 早稲田大学西早稲田キャンパス, 東京, 2017 年 9 月 11-14 日
7. 松村 洋寿、杉島 小雪、面川 歩、布村 渉、堂前 直、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, メトトレキサート新規標的タンパク質マクロファージ遊走阻害因子の構造機能解析, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 東京大学弥生キャンパス, 東京, 2017 年 9 月 7-9 日
8. 杉島 小雪、松村 洋寿、面川 歩、布村 渉、堂前 直、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, 抗リウマチ薬メトトレキサートと MIF サイトカインファミリータンパク質の相互作用解析, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 東京大学弥生キャンパス, 東京, 2017 年 9 月 7-9 日
9. 杉島 小雪、松村 洋寿、面川 歩、尾高 雅文、廣川 誠、涌井 秀樹, リウマチ薬メトトレキサートと新規標的タンパク質であるマクロファージ遊走阻害因子との相互作用解析, 第 44 回生体分子科学討論会, 秋田カレッジプラザ, 秋田, 2017 年 6 月 23-24 日