

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19580124  
研究課題名 (和文) 新規化学療法剤開発を目指した融合型グルタチオン合成酵素の立体構造解析  
研究課題名 (英文) Structural studies on bifunctional glutathione synthetic enzyme in order to develop a new drug for chemotherapy.  
研究代表者  
日 井 隆 雄 (HIBI TAKAO)  
公立大学法人福井県立大学・生物資源学部・准教授  
研究者番号：00285181

### 研究成果の概要：

病原性グラム陽性菌で発見された新規グルタチオン合成酵素 (GCS-GS) は、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素の融合酵素である。電子吸引性の強い CN 基を導入した sulfoximine 型遷移状態アナログ阻害剤 carboxyCSO は、グルタチオン生合成阻害剤 BSO の約 1/10000 の濃度で本酵素を不可逆的に失活させた。この carboxyCSO と GCSGS の複合体について 2.7 Å 分解能で結晶構造を決定し、阻害剤の結合様式を解明した。

### 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合 計       |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,300,000 | 690,000   | 2,990,000 |
| 2008 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総 計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

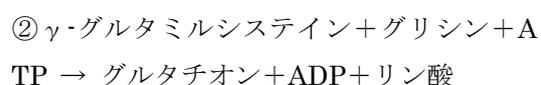
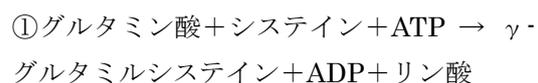
キーワード： グルタチオン、感染症、化学療法、溶レン菌

## 1. 研究開始当初の背景

腸内に常在する *Enterococcus* 属腸球菌は、本来病原性は弱いですが、免疫力が低下すると尿路感染症・創傷感染症・敗血症・心内膜炎などを発症し、いわゆる院内感染症の原因菌として恐れられている。このような院内感染は医療費の増大にもつながり、深刻な社会問題となっている。腸球菌の院内感染が深刻な米国に比べて、我が国におけるその発生率は現時点では低く抑えられている。とはいえ、最も強力な抗生物質バンコマイシンに対して耐性を獲得し、治療手段として使用できる抗生物質が皆無であるバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が既に登場し、その耐性遺伝子がプラスミド上にコードされ他の病原菌に耐性が伝播する可能性が高いことから、我が国においてもその新たな予防法や治療法の必要性があることは言うまでもない。

*Streptococcus* 属溶血性レンサ球菌 (溶レン菌) は、様々な感染症の原因菌として知られているグラム陽性菌である。新生児をはじめ、妊婦、老人、病気療養者など抵抗力の低い人に対して敗血症、髄膜炎、肺炎などの感染症を引き起こすB型溶レン菌 *Streptococcus agalactiae* は、菌体内に高濃度のグルタチオンを蓄積することが既に報告されていたが、その原因の一つとして融合型グルタチオン合成酵素をコードする遺伝子 *gshAB* が見出された。

よく知られているようにグルタチオンの生合成経路は次に示すATP加水分解を利用する二段階の酵素反応からなる。



反応①を触媒する酵素が  $\gamma$ -グルタミルシス

テイン合成酵素 (GCS) であり、反応②を触媒する酵素がグルタチオン合成酵素 (GS) である。一般に、フィードバック阻害を受けることなどからGCSによる反応がGSH生合成の律速段階、すなわち生体内グルタチオンの合成レベル制御の鍵をGCSが握るとされている。溶レン菌類で見出された *gshAB* は、GCSとGSが遺伝的に融合した新規のグルタチオン合成酵素GCS-GSはグルタチオンによるフィードバック阻害が弱く、グルタチオンが蓄積される要因と考えられた。 *gshAB* を保有する腸球菌や溶レン菌は、いずれも菌体に高濃度のグルタチオンを蓄積し、その合成を阻害する事で感染性が低下することが示唆されたことから、本酵素の特異的阻害剤はこれらの感染症に対する化学療法剤として期待された。ところが、これまで一般的に用いられてきたGCS阻害剤であるBSOはGCS-GSに対する阻害定数がmMオーダーと大きく、そのままでは医薬とはなり得ない。

申請者らは、大腸菌由来GCSを特異的に阻害するsulfoximine型遷移状態アナログcarboxy BSOを合成し、その複合体の結晶構造を初めて明らかにした。Carboxy BSOは基質であるL-CysとL-Gluが結合する際の遷移状態を模しており、GCS-carboxyBSO複合体構造から、基質であるL-Cysの結合はその結合部位の構造変化を伴うことが明らかになった。また、L-Cysの側鎖SH基の認識に重要な側鎖結合部位 (ポケット) の構造が明らかになり、本ポケットへの結合様式が阻害剤の親和性に大きく影響することも示唆された。 *Enterococcus* 属由来および *Streptococcus* 属由来GCS-GSそれぞれのGCSドメイン、および大腸菌由来GCSのアミノ酸配列の類似性は高い。従って、GCS-GSにおける阻害剤の親和性の違いについて原因を明らかにするには、GCS-GSのシステイン結合部位にある側鎖認識ポケットの詳細な立体構造解析と阻害剤との結合に

伴う構造解析が重要であり、より強力な阻害剤を設計する上での鍵となると考えられた。

## 2. 研究の目的

病原性グラム陽性菌で発見された新規グルタチオン合成酵素 GCS-GS の X 線結晶構造解析により本酵素のリガンド認識機構を明らかにし、新規化学療法剤として利用可能な GCS-GS の遷移状態アナログ阻害剤の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

大腸菌 GCS の X 線結晶構造解析から得られた知見をもとに、システイン側鎖認識ポケットに適合すると思われる様々な置換基を導入した一連の遷移状態アナログ阻害剤を合成し、それらの阻害活性を調べるとともに、*Streptococcus* 属由来 GCS-GS と遷移状態アナログ阻害剤との複合体について X 線結晶構造解析を実施した。

## 4. 研究成果

sulfoximine 型遷移状態アナログ阻害剤 carboxyBSO のシステイン残基アナログ部分のエチル基を CN 基で置換した、新規遷移状態アナログ阻害剤 carboxyCSO が合成された。この CN 基は、システイン結合部位の側鎖認識ポケットを構成するアルギニン残基との静電的相互作用を強力にすることを狙いとして導入された。そこで、阻害定数  $K_i^*$  を測定した結果、BSO について  $8.6 \times 10^4 \mu\text{M}$  であったのに対して carboxyCSO では  $8.8 \times 10^{-1} \mu\text{M}$  となり、期待された通り、本阻害剤は BSO の約 1/10000 の濃度で GCS-GS を不可逆的に失活させることが明らかになった。次に、GCS-GS の結晶化を行なった。シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化条件を探索した結果、硫酸アンモニウムを結晶化剤とし、さらに還元剤として TCEP を添加することで回折強度収集可能な native 単

結晶を得た。つくばフotonファクトリービームライン BL-5A において到達分解能 2.8 Å でデータ収集を行い、本結晶は、空間群  $I4_1$  に属し、格子定数  $a=141.5 \text{ \AA}$ ,  $b=141.5 \text{ \AA}$ ,  $c=208.2 \text{ \AA}$  であった。さらに、位相決定を目指して、本阻害剤と GCSGS の複合体について X 線結晶構造解析を実施した。ATP、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下で反応させて調製した GCS-GS セレノメチオニン変異体と阻害剤の複合体をもちいて、MAD 法による X 線結晶構造解析を行い、到達分解能 2.7 Å のデータセットを得た。解析の結果、2.7 Å 分解能で結晶構造を決定することができた。各サブユニットは GCS ドメイン (1-419) と GS ドメイン (427-750) からなり、GS ドメイン同士が結合してホモ 2 量体構造をとることが明らかになった。この 2 量体構造は真核生物由来の GS 2 量体が活性中心を 2 回対称軸に対して背中合わせに配置するのとは異なり、2 回対称軸の一方向に対して同じ向きに 2 つの活性中心が開く構造を取ることが明らかとなった。しかし、Mg を含む carboxyCSO との複合体では GCS ドメインに結合した ADP や Mg の電子密度ピークが認められなかった。

そこで、GCS-GS-carboxyCSO 複合体結晶を高濃度の  $\text{Mn}^{2+}$  を含む溶液に浸漬し X 線回折強度測定を行った。分子置換法により初期位相を求め、異常散乱差フーリエ図において阻害剤と推定される明瞭な 3 つのピークを基質結合部位に確認でき、配位した Mn とともに、リン酸化された carboxyCSO の構造を決定することができた。阻害剤の認識には 126 番目のアルギニン残基との相互作用が重要だが、この残基と 122 番目のグルタミン酸残基が塩結合することが本酵素への阻害を低下させる要因となっていることが示唆された。アミノ酸配列配の相同性比較を行なったところ、126 番目のアルギニン残基が GCS

ファミリーにおいてアミノ酸配列上保存されているのに対して、122番目のグルタミン酸残基は GCS-GS のアミノ酸配列にのみ保存され、他の GCS ファミリーでは保存されていないことが判明した。また GS ドメインは ATP-grasp フォールドから構成されるが、これまで知られていなかった挿入領域が存在し、サブドメイン（サムフィンガーサブドメイン）を形成していることが判明した。GCS ドメインの Y418 は GS ドメインの L428, L432, L613, P621, Y725, Y729 と疎水性残基のクラスターを形成していた。特に Y418 とサムフィンガーサブドメインの P621 の間で CH- $\pi$  相互作用している可能性が認められた。このサブドメインは基質グリシンの結合に関与するだけでなく、二量体形成や活性調節に関与することが示唆された。以上の結果から、GCS-GS の特異的な阻害剤にはシステイン結合部位の側鎖ポケットに結合する部位に負に分極した官能基を導入することが必須であることが明らかとなり、今後の GCS-GS 阻害剤開発に重要な知見が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1) Y. Nakashima et al., "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of bifunctional  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase-glutathione synthetase from *Streptococcus agalactiae*." *Acta Crystallogr.* 査読有 **F65** (2009) *in press*.

[学会発表] (計3件)

1) "連鎖球菌由来グルタチオン合成酵素と sulfoximine 型遷移状態アナログ阻害剤複合体の X線結晶構造解析" 中島靖記、日弁隆雄、

Janowiak, Blythe, Griffith, Owen, 平竹 潤. 日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡市

2) " - グルタミルシステイン合成酵素の遷移状態アナログ阻害剤—基質認識にもとづく分子設計と阻害活性—" 川村 直裕、平竹 潤、中島 靖記、日弁隆雄、GRIFFITH, Owen W. 日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 28 日、名古屋市

3) "連鎖球菌由来新規グルタチオン合成酵素の X 線結晶構造解析" 中島靖記、可児義崇、日弁隆雄、Blythe E. Janowiak, Owen W. Griffith, 平竹潤, 日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 28 日、名古屋市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

日弁 隆雄(HIBI TAKAO)

公立大学法人福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：00285181

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

平竹 潤(HIRATAKE JUN)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：80199075

##### (4) 研究協力者

Owen. W. Griffith

Medical College of Wisconsin・Department of Biochemistry・Professor