

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570131

研究課題名(和文) アフリカトリパノソーマの薬剤標的「シアン耐性酸化酵素」の酵素反応機構の解明

研究課題名(英文) The studies of reaction mechanism of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei* (TAO), a promising drug target

研究代表者

志波 智生 (Shiba, Tomoo)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：80401206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アフリカ睡眠病の薬剤標的タンパク質であるトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素(TAO)の構造を阻害剤との複合体構造を含む様々な状態で明らかにすることによって、実用的な薬剤候補となる強力な阻害剤の開発を目的としており、以下の成果を上げることができた。

TAOの酸化型とアスコフラノン誘導体であるAF2779OHとの複合体構造の構造精密化を終了し、それぞれ2.85、2.6 分解能で明らかにすることができた。このTAOの構造は、膜結合型の二核非ヘム鉄タンパク質としては初めての例である(Shiba T et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013)。

研究成果の概要(英文)：Trypanosoma brucei is the causative agent of human African sleeping sickness (trypanosomiasis). The cyanide-insensitive alternative oxidase from *T. brucei* (TAO) is a membrane-bound diiron carboxylate protein which is located on the inner surface of the inner mitochondrial membrane. Since TAO is absent from the mammalian host it is a promising target for the development of anti-trypanosomal drugs.

I have reported on the first crystal structure of TAO in the presence and absence of an ascofuranone (AF)-derivative at 2.6 and 2.85 angstrom resolution, respectively (Shiba T et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013). The structures reveal a membrane binding region and an active-site containing 4 glutamate and 2 histidine residues which are buried in a 4-helix bundle. The binding of the AF-inhibitor results in major conformational changes at the active site.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：トリパノソーマ diironタンパク質 膜表在型タンパク質 アスコフラノン X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

(1) アフリカ睡眠病ともよばれるトリパノソーマ感染症は、ツェツェバエが媒介する寄生性原虫 *Trypanosoma brucei* の感染で発症し、毎年約 30,000 人が死亡する。現在、本疾患に対する治療はあるが、効果も安全性も低いというのが現状である。特に、病原体が中枢神経系に感染した疾患後期の患者に対してはほとんど無力である。原虫の生活環は、ツェツェバエ内にいる昆虫ステージとヒトの体内にいる血流ステージに分けられ、両者でのエネルギー代謝経路は大きく異なる。原虫がエネルギー(ATP)を得るためには、NADHを再酸化する必要があり、その過程でミトコンドリアの内膜に存在するシアン耐性末端酸化酵素 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) が重要な役割を果たしている。我々の研究室では、糸状菌の産出するブレニルフェノール化合物であるアスコフラノンが 0.13 nM という極めて低濃度で抗トリパノソーマ作用を示し、TAO のユビキノ結合部位を競合的に阻害するということが報告されている (Minagawa, N. *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997)。

(2) シアン耐性末端酸化酵素 Alternative Oxidase (AOX) は、トリパノソーマや植物等のミトコンドリアに存在するが、ホストである哺乳類には存在しないために抗トリパノソーマのドラッグデザインのターゲット分子である。また、AOX は膜表面型の膜タンパク質であり、二核非ヘム鉄結合モチーフ(E-X-X-H)を有している。また、呼吸鎖に関係する複合体のほとんどすべての立体構造が明らかにされているが、単一サブユニットの AOX に関しては、立体構造の報告は一例もない。これまで我々は、TAO の立体構造を明らかにするために、TAO を大腸菌で発現させて、精製して活性のあるタンパク質の調整を行い (Kido, Y. *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2010)、結晶化を行って単結晶を得ることに成功し、2.9Å 分解能で X 線回折強度データの収集に成功した。(Kido, Y., Shiba, T. *et al.* *Acta Cryst. F*, 2010)。

2. 研究の目的

(1) 膜表面型で二核非ヘム鉄を活性部位にもつ AOX (TAO) は、ユニークな特徴を有しており、独特の立体構造をしていると考えられている。しかし、その立体構造が明らかにされておらず、TAO の構造を高分解能で明らかにすることが第一目標である。

(2) TAO は、ホストであるヒトには存在せず、トリパノソーマが生存するに必須のタンパク質であるために、アフリカ睡眠病のターゲット分子である。TAO とアスコフラノン(またはその誘導体)の複合体の結晶構造が明らかになれば、どのような機構で薬剤が TAO を阻害しているのかという情報を得ることができ、抗トリパノソーマ薬開発で製薬の分野にも大きく貢献できると考えている。そこで、TAO とアスコフラノン(またはその誘導体)の複合体の高分解能の結晶構造を明らかに

して、その作用機序を明らかにすることを目的とする。得られた作用機序からさらに強力に TAO を阻害するような化合物を探索しようと考えている。

3. 研究の方法

(1) TAO の結晶構造解析

TAO の結晶構造を明らかにするため、TAO の保持している鉄原子(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法(SAD 法)で初期位相を決定した(分解能:3.2 Å)。得られた初期位相を ligand-free 型の最高分解能 2.85 Å まで拡張して、得られた電子密度図を用いて初期モデルの構築を行った。その後、構造の精密化とモデルの構築を繰り返し行い、結晶構造を決定することができた。

(2) TAO とアスコフラノン誘導体との複合体の結晶構造解析

TAO とアスコフラノンとの複合体を作成しようとしたが、アスコフラノンは水に難溶性であり困難であった。そこで、より溶解度が高く、阻害能もアスコフラノンとほぼ同じ誘導体 AF2779OH を用いて TAO との複合体の結晶構造を分解能 2.6 Å で決定することができた。この AF2779OH は、トリパノソーマを感染させたマウスの実験で完全に治療することができることを確認している。さらに、他のアスコフラノン誘導体であるコレトクロリン B (CCB) との複合体を 2.3 Å 分解能で決定することができた。

4. 研究成果

(1) TAO の結晶構造

TAO の ligand-free 型の結晶を 2.85 Å 分解能で決定することができた ($R_{work} / R_{free} = 0.192 / 0.247$)。これは、膜結合型の二核非ヘム鉄タンパク質として初めての報告である (Shiba T, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013)。TAO は、結晶中で強固な二量体を形成していた(図 1)。これは、ゲル濾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結果と一致しており、溶液中でも二量体を形成していると考えられる。TAO の単量体は、6 本の長い α -ヘリックスと短い 4 本のヘリックスで構成されていた(図 1)。N 末端領域が特徴的な構造をとっており、一方のサブユニットの N 末端領域が、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を形成していた(図 1)。

(2) 二核非ヘム鉄の構造

6 本のヘリックス中で、 $\alpha 3$ 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。それに加えて、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。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

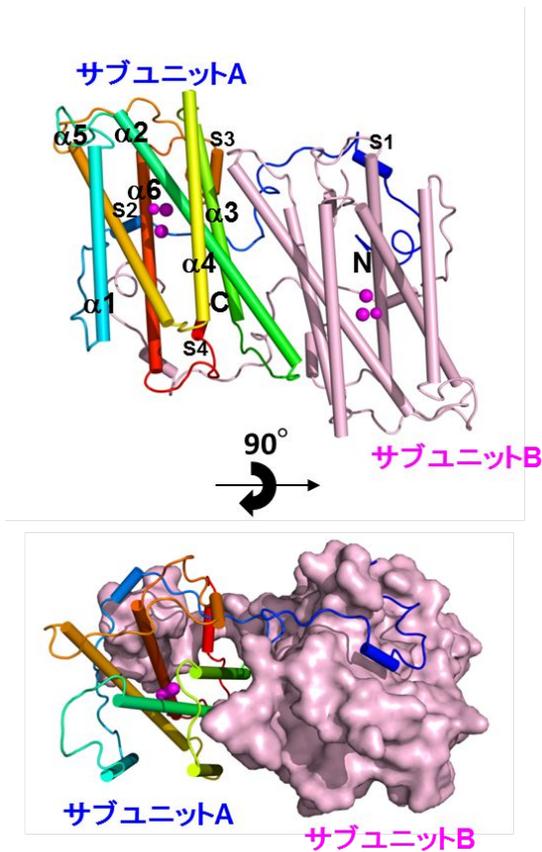


図 1. TAO の二量体の結晶構造

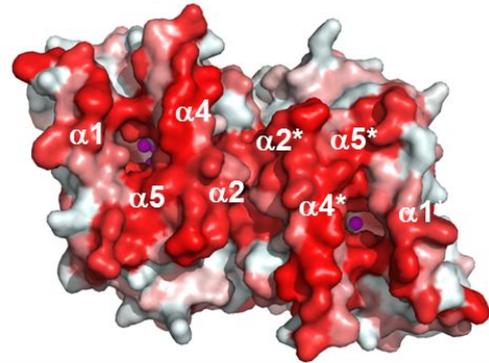
TAO の二量体の構造。サブユニット A を N 末端 (青色) から C (赤色) 末端までを色分けて示している。サブユニット B はピンク色で示している。下図は、上図を 90° 矢印の方向に回転させたものでサブユニット B を表面モデルで示している。

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、直接は二核非ヘム鉄と配位しておらず、二核非ヘム鉄と配位しているグルタミン酸残基 (Glu123, Glu213) 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。このネットワークに関わっているアミノ酸残基は、ほとんどの種の AOX で保存されていた。

(3) 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た (図 2)。PPM サーバー (Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database) で TAO がどの程度膜に埋まっているかを計算したところ、およそ 8.4 になった。膜と

疎水性表面



静電ポテンシャル表面

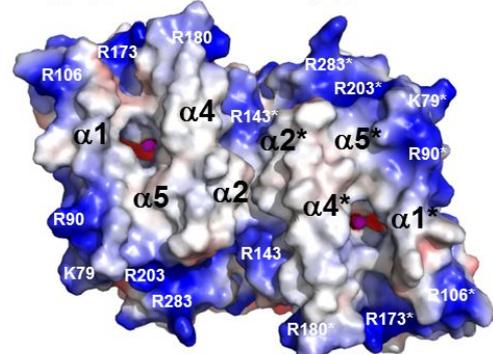


図 2. TAO の膜結合領域

上の図は、赤色の濃さで疎水性の度合いを表している。下の図は、静電ポテンシャル表面を表している。青色の領域が正電荷を帯びている (塩基性アミノ酸) 部分で、赤色の領域が負電荷を帯びている (酸性アミノ酸) 部分を表している。

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。従って、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。

(4) TAO-アスコフラノン誘導体結晶の調製

アスコフラノン (図 3a) 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。エタノール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 3b) 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 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している。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 3c) との複合体の結晶構造も 2.3 分解能で明らかにする

ことができた。

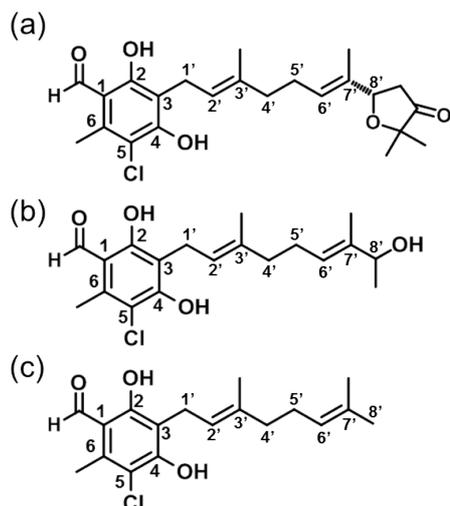


図 3. TAO の複合体の実験に用いた阻害剤 (a)アスコフラノン(b)AF2779OH(c)コレトクロリン B

(5) TAO-アスコフラノン誘導体の結晶構造

TAO-AF2779OH 及び 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、 $R_{work} / R_{free} = 0.214 / 0.256$, TAO-CCB については、分解能 30-2.3、 $R_{work} / R_{free} = 0.185 / 0.227$ まで構造精密化できた。

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 4)。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, Leu212, 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。イソプレノ単位から成る tail 領域は、Cys95, Arg96, Glu215 と相互作用し、1' の位置で約 90 度折れ曲がって、ヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 4$ の間にある疎水性ポケットに結合していた (図 4)。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ている)。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。

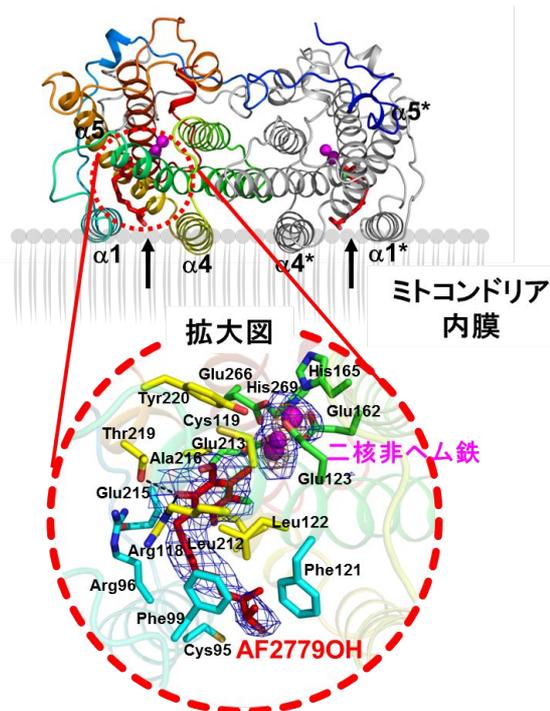


図 4. TAO と阻害剤の複合体構造

TAO-AF2779OH 複合体構造。AF2779OH は膜と相互作用しているヘリックス 1 と 4 の間にあるチャネルに結合している。点線内は、結合部位の拡大図を示しており、二核非ヘム鉄に配位しているアミノ酸残基は緑色、AF2779OH の芳香環と相互作用しているアミノ酸残基は黄色、イソプレノイド鎖と相互作用しているアミノ酸残基はシアンで示されている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 11 件)

北 潔, 志波 智生, 原田 繁春, 希少疾病のアカデミア創薬 - グローバルオーファンドラッグ創成をめざして -, 実験医学増刊, 査読有, Vol. 32, No. 2, 2014, 210-215

Balogun EO, Balogun JAB, Yusuf S, Inuwa HM, Ndams IS, Sheridan P, Inaoka DK, Shiba T, Harada S, Kita K, Esievo KAN, Nok AJ, Anemia amelioration by lactose infusion during trypanosomiasis could be associated with erythrocytes membrane de-galactosylation, *Veterinary Parasitology*, 査読有, 199, 2014, 259-263

Young L, Shiba T, Harada S, Kita K, Albury MS, Moore AL, The alternative oxidases: simple oxidoreductase proteins with complex functions, *Biochem Soc Trans.*, 査読有, 41, 2013, 1305-1311

Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PA, Harada S, Kita K, Biochemical characterization of highly active *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol

kinase, a promising drug target, *J. Biochemistry*, 査読有, 154, 2013, 77-84
志波 智生, 高橋 元, 原田 繁春, 齋本 博之, 城戸 康年, 稲岡 ダニエル 健, 北 潔, 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, 日本結晶学会誌, 査読有, Vol. 55, 2013, 254-259
Moore AL, Shiba T, Young L, Harada S, Kita K, Ito K, Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 査読有, 64, 2013, 637-663
Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto H, Moore AL, Harada S, Kita K, Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 110, 2013, 4580-4585
Natala AJ, Balogun EO, Balogun JA, Inuwa HM, Nok AJ, Shiba T, Harada S, Kita K, Agbede RI, Esievo KA, Identification and characterization of sialidase-like activity in the developmental stages of *Amblyomma variegatum*, 査読有, *J. of Med. Entomol.*, 50, 2013, 85-93
Narikawa R, Ishizuka T, Muraki N, Shiba T, Kurisu G, Ikeuchi M, Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 110, 2013, 918-923
Fukumoto M, Kudou D, Murano S, Shiba T, Sato D, Tamura T, Harada S, Inagaki K, The role of amino acid residues in the active site of L-methionine γ -lyase from *Pseudomonas putida*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 76, 2012, 1275-1284
Shimizu H, Osanai A, Sakamoto K, Inaoka DK, Shiba T, Harada S, Kita K, Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*, *J. Biochemistry*, 査読有, 151, 2012, 589-592

[学会発表] (計9件)

高橋 元, 志波 智生, 上田 慧, 稲岡 ダニエル 健, 城戸 康年, 坂元 君年, 柘植 千明, Balogun EO, 奈良 武司, 青木 孝, 本間 光貴, 田仲 昭子, 井上 将行, 松岡 茂, Moore AL, 齋本 博之, 原田 繁春, 北 潔
アフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素(TAO)と新規阻害剤: フェルレノールとの複合体の結晶構造
第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, 横浜
志波 智生, 高橋 元, 城戸 康年, 稲岡 ダニエル 健, 坂元 君年, 柘植 千明, 辰巳 涼子, Balogun EO, 奈良 武司, 青木 孝, 本間

光貴, 田仲 昭子, 井上 将行, 松岡 茂, Moore AL, 齋本 博之, 原田 繁春, 北 潔
アフリカトリパノソーマの薬剤標的「シアン耐性酸化酵素 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO)」の結晶構造解析
第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, 横浜
Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PA, Kita K, Harada S
The search for inhibitors of African trypanosomes glycerol kinase
第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 12-14 日, 鳥取
志波 智生, 城戸 康年, 高橋 元, 稲岡 ダニエル 健, 坂元 君年, 奈良 武司, 青木 孝, 本間 光貴, 田仲 昭子, 井上 将行, 松岡 茂, 齋本 博之, 原田 繁春, 北 潔
シアン耐性酸化酵素 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) の結晶構造
第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 12-14 日, 鳥取
高橋 元, 志波 智生, 城戸 康年, 稲岡 ダニエル 健, 坂元 君年, 奈良 武司, 青木 孝, 本間 光貴, 田仲 昭子, 井上 将行, 松岡 茂, Moore AL, 齋本 博之, 原田 繁春, 北 潔
アフリカトリパノソーマ症の薬剤標的「シアン耐性酸化酵素 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO)」の精製と結晶構造解析
第 85 回日本生化学会, 2012 年 12 月 14-16 日, 福岡
Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PA, Harada S, Kita K
Structure-based approach for developing trypanosome-specific glycerol kinase inhibitor (s)
第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月 20-22日, 名古屋
志波 智生, 城戸 康年, 稲岡 ダニエル 健, 坂元 君年, 奈良 武司, 青木 孝, 本間 光貴, 田仲 昭子, 井上 将行, 松岡 茂, Moore AL, 齋本 博之, 原田 繁春, 北 潔
アフリカトリパノソーマの薬剤標的「シアン耐性酸化酵素 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO)」の結晶構造
第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月 20-22日, 名古屋
Balogun EO, 稲岡 ダニエル 健, 志波 智生, 城戸 康年, 奈良 武司, 青木 孝, 本間 光貴, 田仲 昭子, 井上 将行, 松岡 茂, Michels PA, 原田 繁春, 北 潔
Structural analysis of glycerol kinase from human African trypanosomes for anti-trypanosomal drug design
第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都
志波 智生, 城戸 康年, 稲岡 ダニエル 健, 坂元 君年, 奈良 武司, 青木 孝, 本間 光

貴, 田仲 昭子, 井上 将行, 松岡 茂, 齋本
博之, Moore AL, 原田 繁春, 北 潔
トリパノソーマ原虫のミトコンドリアの内膜に局
在する「シアン耐性酸化酵素 Trypanosome
Alternative Oxidase (TAO)」の結晶構造」
第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月
21-24 日, 京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.kit.ac.jp/01/topics/2012/pressrelease130305.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

志波 智生 (SHIBA TOMOO)

京都工芸繊維大学工芸科学研究科・准教授

研究者番号: 80401206