

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660231

研究課題名(和文)GMP reductaseを標的とした新規アフリカ睡眠病治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic agents against African sleeping sickness targeted for GMP reductase.

研究代表者

乾 隆 (Inui, Takashi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：80352912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Trypanosoma bruceiにおけるGMP還元酵素(TbGMPR)の反応速度パラメータを決定した。本酵素はribavirin 5'-monophosphate (RMP)存在下で阻害されたのに対し、宿主動物のGMPRは阻害されなかった。培養系において、RMPやその前駆体ribavirinは血流型T. bruceiに対して抗原虫作用を示した。X線結晶構造において、cystathionine γ -synthaseドメインの欠損変異体TbGMPR-dでは、四次構造におけるサブユニットの配置がヒトGMPR2と異なっており、実際にTbGMPR-dでは野生型に比べて活性が低下していた。

研究成果の概要(英文)：We characterized the steady-state kinetics of Trypanosoma brucei (T. brucei) GMP reductase (TbGMPR). TbGMPR but no enzymes of the host mammals was inhibited in the presence of a purine nucleotide analog ribavirin 5'-monophosphate (RMP) with a K_i value of 4.46 μ M. RMP and its precursor ribavirin showed anti-parasitic effect on bloodstream forms of T. brucei in culture, and the IC50 of each compound was ranged around 25 μ M. We further prepared a mutant enzyme (TbGMPR-d) lacking cystathionine γ -synthase domain, which is absent in mammalian GMPRs, to determine its structure by X-ray crystallography. The structure of TbGMPR-d was resolved at 2.36 \AA and found to have a TIM barrel structure commonly observed in GMPRs of other organisms. However, in quaternary structure, TbGMPR-d showed a different subunit orientation as compared to that of human GMPR2. The enzyme assay revealed that the activity of TbGMPR-d was apparently lowered than the wild-type enzyme.

研究分野：酵素化学・構造生物学・薬理学

キーワード：人獣共通感染症 寄生虫 核酸合成系酵素 酵素反応速度論的解析 医薬候補化合物 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

アフリカ睡眠病の病原原虫である *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) は、宿主の血液中で増殖し、感染末期には脳内に侵入し、髄膜脳炎を引き起し、宿主を死に至らしめる。アフリカ睡眠病の治療薬には、副作用など多くの問題があることから、新しい作用機序を持つ薬剤の開発が望まれている。申請者らは、これまでにプリン核酸合成に関連する酵素を薬剤標的とした創薬を目指し、プリン核酸合成酵素の一つである *T. brucei* 由来 IMP dehydrogenase (TbIMPDH) の機能解析を行ってきた (Parasitology, 140, 735-745, 2013)。

準備研究において、我々はトリパノソーマ感染ラットを用いた化合物スクリーニングにより、ribavirin が抗トリパノソーマ活性を示すことを見出した。Ribavirin は抗ウイルス剤の一つであり、日本では C 型肝炎の治療薬として用いられている。また、ribavirin は生体内でリン酸化され、ribavirin 5'-monophosphate (RMP) となり、IMPDH を阻害することが報告されている (Virus Res., 157, 61-70, 2011)。我々は、TbIMPDH、及び宿主(ラット)由来 IMPDH を精製し、酵素反応速度論的解析を行った結果、RMP は両 IMPDH に対して、同程度の阻害活性を示すことを明らかにした。以上より、ribavirin は *in vivo* 感染実験において、抗トリパノソーマ活性を示すが、*in vitro* における酵素阻害実験では、RMP が TbIMPDH 特異的な阻害活性を示さないことから、RMP の標的となる分子が、IMPDH 以外にも存在することが示唆された。

そこで我々は、ribavirin の生体内作用分子として、IMPDH と類似の触媒反応を示す GMP reductase (GMPR) に着目した。GMPR は GMP から IMP への還元反応を触媒する酵素であり、生体内の恒常性維持を担う重要な酵素である。GMPR は IMPDH と類似の触媒メカニズム、及び構造を有することが報告されている (Nat. Chem. Biol., 7, 950-958, 2011)。さらに申請者らは、RMP が濃度依存的に TbGMPR 活性を阻害することを見出している。

2. 研究の目的

TbGMPR を標的としたアフリカ睡眠病の新薬開発を目指し、本研究では、*T. brucei* および宿主であるヒト、及びウシの GMPR についての酵素反応速度論的解析、ribavirin からの RMP の合成とその薬効評価、TbGMPR および TbGMPR/ribavirin アナログ複合体の X 線結晶構造解析を行い、アフリカ睡眠病に対するリード化合物を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) Ribavirin を出発化合物とした RMP の有機合成

Ribavirin からの RMP 合成は、Brookes ら

の方法を改変して行った (Bioconjug. Chem., 17, 530-537, 2006)。市販の ribavirin を塩化ホスホリル、蒸留水とともにリン酸トリエチルに溶解し、室温にて 5 時間反応させた。水酸化ナトリウムを用いて pH 3.0 に調整した後、さらに 15 時間攪拌した。反応液を濃縮した後、析出物をクロロホルムで洗浄し、メタノールによる抽出を行った。抽出物を HPLC で分離することによって RMP を分取し、凍結乾燥品を後の実験に用いた。

(2) *T. brucei* と宿主動物(ヒト、及びウシ)の GMPR についての反応速度パラメータの比較

各組換え型タンパク質の GMPR 活性は、NADPH の消費に伴う吸光度の変化を指標とした。反応液の組成を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、100 mM KCl、3 mM EDTA、1 mM DTT とし、基質 GMP および補酵素 NADPH を 0-500 μ M の範囲で使用した。反応は、組換え型タンパク質 100 nM を加えることで開始し、分光光度計を用いて 340 nm の吸光度を経時的に測定した。それぞれの条件において反応初速度を求め、ミカエリス・メンテン式にあてはめることで GMP および NADPH に対する K_m 値を算出した。

RMP および MZP による阻害活性については、あらかじめ各化合物と組換え型 GMPR を混合し、37°C にて 5 分間静置してから活性測定に用いた。

(3) 培養系を用いた ribavirin の抗原虫作用の評価

血流型 *T. brucei* として、ILTat 1.4 株、及び GUTat 3.1 株を用い、常法にしたがって HMI-11 培地中にて培養した (J. Parasitol., 75, 985-989, 1989)。抗原虫作用については、*T. brucei* 2×10^3 /mL に ribavirin 0-100 μ M を添加後、72 時間培養して生細胞を計数した。また、ヒポキサンチン未添加の HMI-11 培地を使用して同様の操作を行い、通常の培地における結果と比較した。

(4) TbGMPR への変異導入と X 線結晶構造解析

TbGMPR の結晶化にあたり、研究開始時において精製や結晶化を妨げた cystathionine-synthase domain (CBS ドメイン: Phe97-Arg226) を欠損させた変異体 (TbGMPR-d)、さらに触媒残基 Cys318 を Ala に置換した変異体 (TbGMPR-d-C318A) を PCR 法により作製した。これらが大腸菌において強制発現させた後、アフィニティ精製を経て結晶化に用いた。

結晶化における母液の組成は下のとおりとし、それぞれ sitting drop 蒸気拡散法 (20°C) により結晶化を行った。

TbGMPR-d (10 mg/ml)、0.1 M HEPES

(pH 7.5), 0.8 M NaH₂PO₄, 0.8 M KH₂PO₄, TbGMPR-d-C318A (10 mg/ml), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 2 M (NH₄)₃PO₄ 大型放射光施設 SPring-8 (BL38B1)において得られた結晶のX線回折データを取得し、立体構造の精密化等を行った。

4. 研究成果

(1) Ribavirin を出発化合物として RMP を合成したところ、乾燥重量における RMP の収率は 55.4%, HPLC ピーク面積から算出した純度は 97.0% となった。核磁気共鳴法および質量分析法における標品とのスペクトル比較により、生成化合物が RMP であることを確認した。

(2) 各生物種の組換え型 GMPR について k_{cat} 値、および基質 GMP または補酵素 NADPH に対する K_m 値を算出することにより、表 1 の結果を得た。TbGMPR はヒトおよびウシ GMPR に比べ、GMP に対する K_m 値は 4 から 7 倍、NADPH に対しては 1/3 から 1/2 となり、その結果 k_{cat} 値は約 2 倍となった。

表 1. *T. brucei* および宿主 GMPR の反応速度パラメータ (Hs; ヒト, Bt; ウシ)

	K_m GMP (μ M)	K_m NADPH (μ M)	k_{cat} (s^{-1})
TbGMPR	89.3 \pm 9.0	12.3 \pm 0.8	0.519 \pm 0.012
HsGMPR1	22.1 \pm 2.2	34.8 \pm 4.3	0.284 \pm 0.006
HsGMPR2	17.8 \pm 3.5	29.3 \pm 3.2	0.265 \pm 0.016
BtGMPR1	13.5 \pm 1.3	54.1 \pm 5.0	0.243 \pm 0.004
BtGMPR2	22.6 \pm 4.2	62.1 \pm 7.0	0.296 \pm 0.009

RMP 存在下において各酵素における IC₅₀ および K_i 値を求めたところ、TbGMPR のみが阻害を受け (IC₅₀ = 101.8 μ M, K_i = 4.46 μ M), ヒトおよびウシ GMPR においては阻害作用がほとんど認められなかった (図 1)。

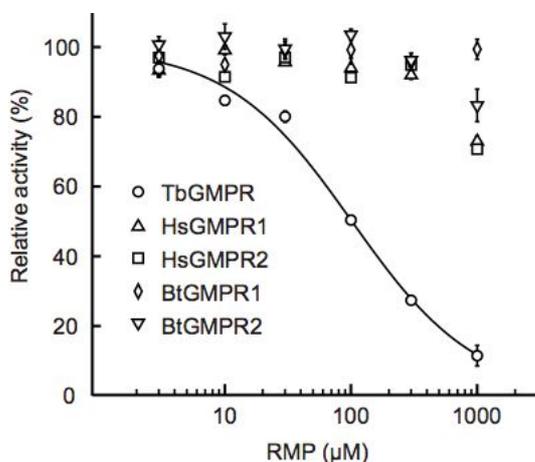


図 1. RMP による TbGMPR 特異的阻害

Lineweaver-Burk プロットから RMP は GMP と TbGMPR の結合を競合的に阻害することが

わかった。さらに、RMP の類似化合物である mizoribine 5'-monophosphate について同様の実験を実施したところ、TbGMPR に対しては RMP よりも強い阻害活性を示したが (IC₅₀ = 23.7 μ M), ヒト GMPR1 および GMPR2 についても IC₅₀ 値が各々 119.9 および 69.3 μ M であったことから、種間における酵素の選択性という点では RMP よりも劣ることがわかった。今後、これらの化合物と TbGMPR の共結晶構造を明らかにすることにより、TbGMPR に対する選択性や阻害活性を向上させた新規化合物の設計が可能になると期待される。

(3) 血流型 *T. brucei* の培養系を用いて、RMP の前駆体である ribavirin の抗原虫作用を検討した。その結果、ribavirin 存在下において *T. brucei* の増殖抑制が認められ、その IC₅₀ 値はおよそ 25 μ M であった (図 2)。また、ヒポキサンチン未添加の培地を用いて同様の実験を行ったところ、IC₅₀ 値が 0.8 μ M にまで低下した。したがって、培地中に添加した ribavirin は *T. brucei* におけるヌクレオシドトランスポーター (FEMS Microbiol. Rev., 29, 987-1020, 2005) を介して細胞内に取り込まれ、アデノシンキナーゼ (Antimicrob. Agents Chemother., 51, 3895-3901, 2007) によって RMP に変換されることで抗原虫作用を発揮することが示唆された。

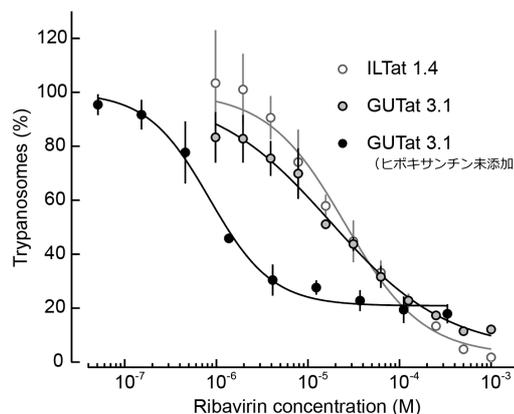


図 2. Ribavirin 存在下における血流型 *T. brucei* の増殖抑制

(4) 立体構造を基にした TbGMPR に対する特異的阻害剤の開発を目指し、X線結晶構造解析により本酵素の立体構造解析を行った。

SPring-8 における X 線回折実験では、TbGMPR-d と TbGMPR-d-C318A についてそれぞれ分解能 2.36Å と 2.40Å までの回折像を得ることができた。TbGMPR と一次構造が最も近似している *Cryptosporidium parvum* 由来 IMPDH (PDBID: 3KHJ) をサーチモデルとした分子置換法により、得られた回折像から各タンパク質の立体構造を決定、精密化した (図 3)。

TbGMPR-d と TbGMPR-d-C318A の三次構造は、これまでに立体構造が決定されている HsGMPR2, *Bacillus anthracis* 由来 GMPR と同様に TIM バレル構造をとっていた。既知の HsGMPR2/IMP/NADP 複合体の構造と重ね合わ

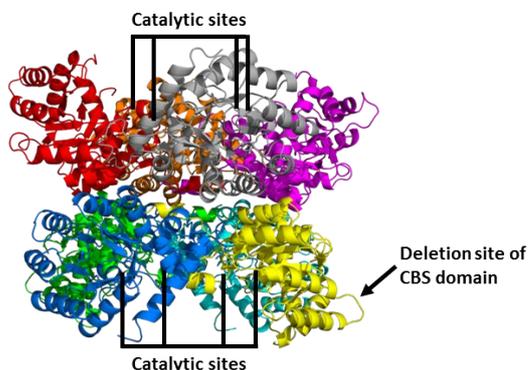


図3. TbGMPR-dのX線結晶構造
8量体中の各サブユニットを異なる色のリボンモデルで示している。

せたところ, TbGMPR-dのアポ状態では触媒残基 Cys318 が IMP の 2 位の炭素から大きく離れており, 基質を攻撃できない位置にあることが明らかになった。また, TbGMPR-dの四次構造について解析したところ, 4つのサブユニットが4回軸で関係づけられた4量体を形成し, さらに2つの4量体が2回軸で関係づけられて最終的に8量体を形成していることがわかった。ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量推定においても, 溶液中において TbGMPR-dの4量体と8量体が平衡状態で存在することが示唆された。しかしながら, HsGMPR2の8量体では各サブユニットの触媒部位が向かい合うように4量体同士が接触しているのに対し, TbGMPR-dの8量体では4量体の反対の面で接触し触媒部位が外側を向いていた。これらの結果から, TbGMPRのCBSドメインを欠損させることによって, 活性中心の構造が大きく変化していることが考えられた。そこで, 野生型 TbGMPR と酵素活性を比較したところ, TbGMPR-d では比活性が 4670 sec^{-1} から 14 sec^{-1} へと大幅に低下していることがわかった。

TbGMPR-dで欠損させたCBSドメインは, 多くの酵素において酵素の機能を調節し, 凝集や多量体形成に関与していることが報告されている(Nat. Commun., 6, 8923, 2015)。野生型 TbGMPRの構造解析は進行中であるが, HsGMPRと同様に触媒部位が向かい合うような8量体を形成しているならば, TbGMPRにおいてもCBSドメイン間の相互作用が適切な四次構造形成を促し, 活性発現に必要なアロステリックな構造変化を引き起こしていることになる。触媒部位へ作用する化合物のみならず, CBSドメインをターゲットとした四次構造形成を阻害する化合物が, TbGMPR 特異的阻害剤のリード化合物になる可能性が考えられる。

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2件)

Bessho, T., Okada, T., Kimura, C., Shinohara, T., Tomiyama, A., Imamura, A., Kuwamura, M., Nishimura, K., Fujimori, K., Shuto, S., Ishibashi, O., Kubata, K., Inui, T. (corresponding author), Novel Characteristics of *Trypanosoma brucei* Guanosine 5'-monophosphate Reductase Distinct from Host Animals. PLOS Negl. Trop. Dis. 10 巻, e0004339, 2016年. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004339, 査読有
Bessho, T., Morii, S., Kusumoto, T., Shinohara, T., Noda, M., Uchiyama, S., Shuto, S., Nishimura, S., Djikeng, A., Duszenko, M., Martin, S.K., Inui, T. (corresponding author), Kubata K.B., Characterization of the novel *Trypanosoma brucei* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, Parasitology, 140 巻 6号: 735頁-745頁, 2013年. 査読有

[学会発表](計8件)

岡田哲也, 別所知明, 富山 愛, 今村 章, 大谷拓也, 桑村 充, 西村和彦, 石橋 宰, 乾 隆, 「Ribavirin 5'-monophosphate による *Trypanosoma brucei* 5'-GMP 還元酵素の阻害および抗原虫作用」, 第85回日本寄生虫学会大会, 2016年3月19日, 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)
大谷拓也, 西村重徳, 今村 章, 多田俊治, 乾 隆, 「*Trypanosoma brucei* 由来 GMP reductase の CBS domain 欠損型変異体の結晶化とX線結晶構造解析」, 第5回バイオ・メディカル・フォーラム 第2回産学連携ナレッジセミナー 2016年2月19日, 大阪府立大学 学術交流会館(大阪府・堺市)
今村 章, 岡田哲也, 篠原貴宏, 木村千浩, 石橋 宰, 乾 隆, 「アフリカトリパノソーマ症の病原原虫 *Trypanosoma brucei* 由来 GMP 還元酵素の一価陽イオンによる活性化」, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
富山 愛, 岡田哲也, 桑村 充, 石橋 宰, 乾 隆, 「*Trypanosoma brucei* における GMP reductase の局在解析」, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
大谷拓也, 西村重徳, 今村 章, 多田俊治, 乾 隆, 「*Trypanosoma brucei* 由来 GMP reductase の CBS domain 欠損型変異体の結晶化とX線結晶構造解析」, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

今村 章,別所知明,篠原貴宏,木村千浩,
岡田哲也,石橋 宰,乾 隆,「アフリカトリ
パノソーマ症の病原性原虫および宿主
におけるグアノシンーリン酸還元酵素の
機能解析」,Bio Medical Forum 2015,2015
年1月23日,大阪府立大学 学術交流会館
(大阪府・堺市)

木村千浩,別所友明,篠原貴宏,岡田哲也,
石橋 宰,乾 隆,「アフリカトリパノソ
マ症の原虫および宿主におけるグアノシ
ンーリン酸還元酵素の機能解析」,第 87
回日本生化学会大会,2014年10月16日,
国立京都国際会館(京都府・京都市)

木村千浩,別所知明,篠原貴宏,石橋 宰,
乾 隆,「アフリカトリパノソーマ症の薬剤
標的候補であるグリシンーリン酸還元酵
素の酵素化学的機能解析」,第36回日本分
子生物学会年会,2013年12月5日,神戸
ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bioinfo.osakafu-u.ac.jp/~inu
it/](http://www.bioinfo.osakafu-u.ac.jp/~inu
it/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

乾 隆 (INUI Takashi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：80352912

(2)研究分担者

石橋 宰 (ISHIBASHI Osamu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教
授

研究者番号：70293214

研究分担者

西村 重徳 (NISHIMURA Shigenori)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：90244665