

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440027

研究課題名(和文) エネルギー代謝経路をターゲットとしたアフリカ睡眠病の薬剤開発

研究課題名(英文) Drug development of African sleeping sickness targeting energy metabolic pathway

研究代表者

志波 智生 (Shiba, Tomoo)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授

研究者番号：80401206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アフリカ睡眠病の薬剤標的であるトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素(TAO)とグリセロールキナーゼ(TGK)とリード化合物との複合体の結晶構造を明らかにし、より実用的な薬剤候補となる阻害剤の開発を目的とし、以下の成果を上げることができた。
新規のTAO阻害剤フェルレノールとTAOとの複合体の結晶構造を2.7 Å分解能で決定した。またTGKの新規阻害剤GK-17bを見出した。この化合物はTAOも同程度の強さで酵素反応を阻害する。

研究成果の概要(英文)：The trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase (TAO) and trypanosome glycerol kinase (TGK) are drug targets for human African sleeping sickness. In this study, I determined the crystal structures of TAO and TGK in complex with its lead compounds to make more potent drug. The crystal structure of TAO in complex with its new inhibitor, ferulenol was determined at 2.7 Å resolution. I found GK-17b which is a novel inhibitor of TGK. In addition, this compound inhibits TAO enzymatic activity with comparable strength.

研究分野：構造生物化学

キーワード：トリパノソーマ 顧みられない熱帯病 エネルギー代謝 二核鉄タンパク質 膜表剤型タンパク質 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 (眠り病)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ことから、新規薬剤の開発が急務である。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。血流ステージでは、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 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) が末端酸化酵素として重要な役割を果たしている。この TAO 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、原虫は TAO が阻害されて解糖系で ATP の生産ができなくなると、原虫特異的なオルガネラであるグリコソーム内のグリセロールキナーゼ(TGK)がグリセロール-3-リン酸と ADP から ATP を生産するので、TGK もアフリカ睡眠病の薬剤標的になる。私は、これらの 2 つの酵素を標的にアフリカ睡眠病の新薬開発に向けた構造生物学的研究を進めた。

(2) アフリカ睡眠病の薬剤標的酵素である Trypanosome Alternative Oxidase (TAO)単体の結晶構造とその強力な阻害剤であるアスコフラノン誘導体(AF2779OH, CCB)の結晶構造はすでに報告済みである(Shiba, T. *et al. PNAS* 2013)。また、トリパノソーマのグリセロールキナーゼ(TGK)についても、Ligand-free 型の結晶構造はすでに解析している。

(3) TGK の新規阻害剤の探索を行ったところ、inh-7(GK-17)を見出した($IC_{50} = 100$ nM for TGK)。また、この化合物は、TAO も阻害することが分かっている($IC_{50} = 900$ nM for

TAO)。TAO と TGK の両酵素は、全体構造や触媒する反応も全く異なるために、どのように inh-7 が両酵素を阻害しているのか、興味もたれるところである。

2. 研究の目的

(1) アスコフラノンとは違った骨格をもった TAO の新規阻害剤であるフェルレノール($IC_{50} = 3.5$ nM for TAO)の TAO の阻害機構を解明するために、TAO-フェルレノール複合体の結晶構造を明らかにする。このフェルレノールは、アスコフラノンやその誘導体に比べて合成の過程が少なくでき、安価に合成できるので、薬剤候補としては有用である。

(2) アフリカ睡眠病のもう一方の薬剤標的の TGK と ligand-free 型や様々な基質や生成物との複合体に結晶構造を明らかにして、TGK の酵素反応機構を明らかにする。

(3) TGK の新規阻害剤である inh-7(GK-17)と TGK の阻害様式を調べるために、TGK-inh-7 複合体の結晶構造を明らかにする。また、所有するキノン系の阻害剤ライブラリーや市販の化学物質から inh-7 よりも TGK や TAO を強く阻害する化合物を見出す。

(4) Inh-7 は TGK の阻害剤として見出されたが、TAO も阻害することが分かっているため、Inh-7-TAO の複合体の結晶構造を明らかにし、なぜ、inh-7 が全体構造や触媒する反応が全く異なる二つの酵素を阻害する理由を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TAO-フェルレノール複合体の結晶構造の決定

リコンビナントの TAO の培養・精製法・結晶下法は、すでに確立されている方法を用いて TAO の結晶を作成する(Kido Y *et al. Acta Cryst. F*, 2010)。5 mM のフェルレノールを含むクライオプロテクタント(安定化溶液)に TAO の結晶を浸し(soaking)、TAO-フェルレノール複合体の結晶を作成して、SPring-8 の放射光を利用して、X 線回折強

度データを収集して、構造解析を行う。

(2) TGKの結晶構造の決定し、その反応メカニズムを解明

リコンビナントのTGKの培養・精製法・結晶下法は、すでに確立されている方法を用いてTGKの結晶を作成する(Balogun EO, *et al. Acta Cryst. F*, 2010)。様々な基質(グリセロール、ADP)や生成物(グリセロール-3-リン酸)との複合体に結晶構造を明らかにして、TGKの酵素反応機構を明らかにする。

(3) TGK-inh-7複合体の結晶構造解析

TGK-inh-7複合体の結晶をsoaking法により作成し、SPring-8, KEK-PFなどの放射光を利用して、複合体の結晶構造を明らかにする。また、得られた複合体の結晶構造を参考に、所有するキノン系の素材剤ライブラリーや市販の化学物質からinh-7よりもTGKやTAOを強く阻害する化合物を見出す。

(4) TAO-inh-7複合体の結晶構造解析

TAO-inh-7複合体の結晶をsoaking法により作成し、SPring-8, KEK-PFなどの放射光を利用して、複合体の結晶構造を明らかにする。TGK-inh-7及びTAO-inh7複合体の結晶構造から、inh-7の両酵素への作用機序についての情報を得る。

4. 研究成果

(1) TAO-フェルレノール複合体の結晶構造

TAOのフェルレノール複合体の結晶構造を2.7分解能で決定することができた($R_{work} / R_{free} = 0.192 / 0.249$)。フェルレノール(図1a)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2)。この結合部位は、アスコフラノン誘導体の結合場所とほぼ同じである。フェルレノールの芳香族環は、疎水性アミノ酸であるLeu122、Leu212、Ala216やTyr220に囲まれ、2位のケト基の酸素原子はArg118とThr219が水素結合していた。イソプレン単位から成る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2)。この水素結合とtail領域の折れ曲がり、アスコフラノン誘導体と同じ様式である。フェルレノールは、アスコフラノンやアスコフラノン誘導体と比較して、合成ステップが少なく、安価で合成できるために薬剤候補としては有望である。

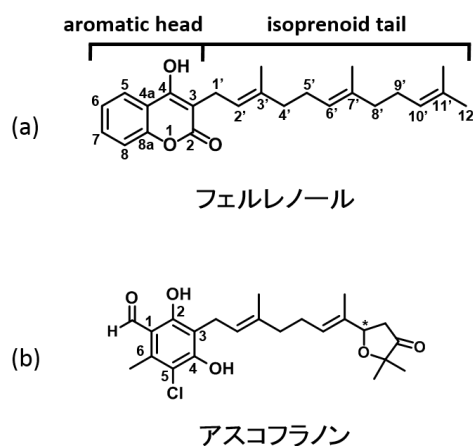


図1. TAOのアスコフラノン認識様式

また、TAO-アスコフラノン(図1b)複合体の結晶構造を2.8分解能で決定することができた($R_{work} / R_{free} = 0.186 / 0.261$)。アスコフラノンでは、十分な動物実験が行われており、薬剤としての効果は実証済みである(Yabu, Y. *et al.*, *Parasitol. Int.* 2003; Yabu, Y. *et al.*, *Parasitol. Int.*, 2006)。

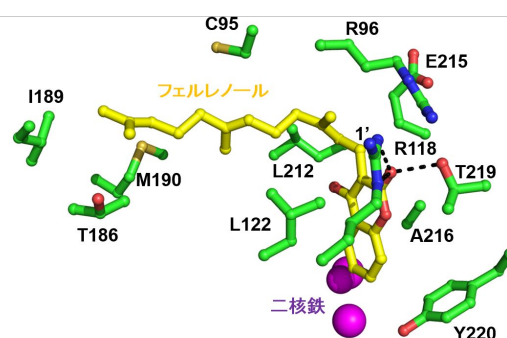


図2. (a) フェルレノールと(b)アスコフラノンの構造式

(2) TGKの反応メカニズム

TGKと様々な基質や生成物との複合体の結晶構造を明らかにした。解析した分解能はそれぞれ、TGK (ligand-free) : 2.9 , TGK-Glycerol : 2.4 , TGK-ADP : 1.9 ,

TGK-Glycerol-3-phosphate : 2.7 である。TGK の全体構造は、2つのドメインで構成されており、ドメイン間のクレフトに基質が結合する活性部位が存在する(図3)。それらの結晶構造から推測される酵素反応メカニズムを提唱した (Balogun EO, *et al. Mol Microbiol.*,2014)。

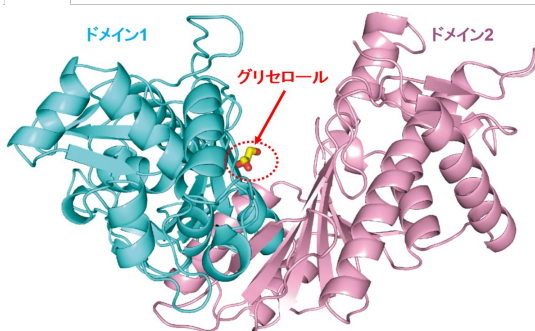


図3. TGK とグリセロールの複合体の結晶構造

(3) TGK-inh-7 複合体の結晶構造

inh-7(図4a)は、TGK を $IC_{50} = 100$ nM で酵素反応を阻害する TGK の新規阻害剤である。TGK の結晶を 5 mM の inh-7 を含むクライオプロテクタントに soaking して複合体の結晶を作成して、2.8 分解能で構造解析した ($R_{work} / R_{free} = 0.186 / 0.261$)。Inh-7 は、活性部位の近傍に結合しており、TGK の Arg84, Glu85, Tyr139, Phe279, Glu314, Trp367 などのアミノ酸の側鎖と相互作用していた。

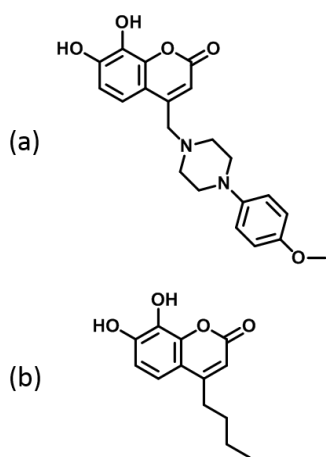


図4. (a) inh-7 (GK-17)と(b) GK-17b の構造式

(4) TAO-inh-7 複合体の結晶構造解析

inh-7 は、TAO の酵素活性も $IC_{50} = 900$ nM で酵素反応を阻害する。その阻害メカニズムを明らかにするため、TAO の結晶を 5 mM の inh-7 を含むクライオプロテクタントに soaking して複合体の結晶を作成して、3.5 分解能で構造解析した ($R_{work} / R_{free} = 0.170 / 0.230$)。フェルレノールやアスコフラノンと同様に inh-7 も二核非ヘム鉄結合部位近傍にある疎水性ポケットの活性部位に結合していた。これらの結果から、inh-7 は、全く立体構造も異なり、触媒する反応も異なる二つの酵素の活性部位に結合して両酵素を阻害することが明らかになった。もう少し精度の高い議論をするために分解能を向上すべきである。また、inh-7 (GK-17) の誘導体である GK-17b(図4b)を見出し、両酵素の阻害活性を計算したところ、($IC_{50} = 120$ nM for TGK, $IC_{50} = 90$ nM for TAO) となり、TGK に対してはほぼ同じであるのに対して、TAO への阻害活性を 10 倍向上することができた。この化合物と両酵素の複合体の結晶構造は、現在、決定中である。

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 8 件)

Sato D, Shiba T, Yunoto S, Furutani K, Fukumoto M, Kudou D, Tamura T, Inagaki K, Harada S, Structural and mechanistic insights into homocysteine degradation by a mutant of methionine γ -lyase based on substrate-assisted catalysis, *Protein Science*, 査読有, in press, *Protein Science*, 26, 2017, 1224-1230

Sato D, Shiba T, Mizuno S, Kawamura A, Hanada S, Yamada T, Shinozaki M, Yanagitani M, Tamura T, Inagaki K, Harada S, The hyperthermophilic

cystathionine γ -synthase from the aerobic crenarchaeon *Sulfolobus tokodaii*: expression, purification, crystallization and structural insights, *Acta Cryst.*, 査読有, *F* 73, 2017, 152-158

González FJF, Ebiloma GU, García CI, Bruggeman V, Villamañán JMS, Donachie A, Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Harada S, Kita K, de Koning HP, Dardonville C, Conjugates of 2,4-Dihydroxybenzoate and Salicylhydroxamate and Lipocations Display Potent Anti-parasite Effects by Efficiently Targeting the *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* Mitochondrion, *J. Med. Chem.*, 査読有, 60, 2017, 1509-1522

Inaoka DK, Iida M, Tabuchi T, Honma T, Lee N, Hashimoto S, Matsuoka S, Kuranaga T, Sato K, Shiba T, Sakamoto K, Balogun EO, Suzuki S, Nara T, da Rocha JR, Montanari CA, Tanaka A, Inoue M, Harada S, Kita K, Open form inducer: a new approach for structure-based drug design, *PLoS One*, 査読有, 11, 2016, e0167078

Inaoka DK, Shiba T, Sato D, Balogun EO, Sasaki T, Nagahama M, Oda M, Matsuoka S, Ohmori J, Honma T, Inoue M, Kita K, Harada S, Structural Insights into the Molecular Design of Flutolanil Derivatives Targeted for Fumarate Respiration of Parasite Mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, 16, 2015, 15287-15308

Yoshino R, Yasuo N, Inaoka DK, Hagiwara Y, Ohno K, Orita M, Inoue M, Shiba T, Harada S, Honma T, Balogun EO, da Rocha JR, Montanari CA, Kita K, Sekijima M, Pharmacophore Modeling for Anti-Chagas Drug Design Using the Fragment Molecular Orbital Method, *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, e0125829

Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Tsuge C, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A,

Inoue M, Matsuoka S, Michels PAM, Kita K, Harada S, Molecular basis for the reverse reaction of African human trypanosomes glycerol kinase, *Mol Microbiol.*, 査読有, 94, 2014, 1315-1329

Young L, May B, Pendlebury-Watt A, Shearman J, Elliott C, Albury MS, Shiba T, Inaoka DK, Harada S, Kita K, Moore AL, Probing the ubiquinol-binding site of recombinant *Sauromatum guttatum* alternative oxidase expressed in *E. coli* membranes through site-directed mutagenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有, 1837, 2014, 1219-1225

〔学会発表〕(計7件)

西藤万智, 志波智生, 上田慧, 稲岡ダニエル健, 城戸康年, バログン エマニエル, アントニー ムーア, 斎本博之, 北潔, 原田繁春, アフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素(TAO)とクマリン骨格をもつ新規阻害剤との複合体結晶構造, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25-27日, 宮城県・仙台市

Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Tsuge C, May B, Sato T, Kido Y, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PAM, Moore AL, Harada S, Kita K, Serendipitous discovery of trypanocidal compounds with dual-inhibition for African trypanosomes glycerol kinase and alternative oxidase, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25-27日, 宮城県・仙台市

志波智生, エマニュエルバログン, 稲岡ダニエル健, 原田繁春, 北潔, トリパノソーマシアン耐性酸化酵素(TAO)とグリセロールキナーゼ(GK)の結晶構造, 日本生体エネルギー研究会 第41回討論会, 2015年12月21-23日, 東京都・文京区 Shiba T, Balogun EO, Inaoka DK, Harada S,

Kita K, The crystal structures of trypanosomal cyanide-insensitive alternative oxidase (TAO) and glycerol kinase (GK), 3rd International Picobiology Institute Symposium -Structural and biological studies on pathogenic and therapeutic targets-, 2015年12月8-9日, 兵庫県・赤穂郡
上田慧, 中井万智, 志波智生, 高橋元, 稲岡ダニエル健, 城戸康年, 坂元君年, 柘植千明, Emmanuel Oluwadare Balogun, 奈良武司, 青木孝, 本間光貴, 田仲昭子, 井上将行, 松岡茂, Moore L. Anthony, 齋本博之, 北潔, 原田繁春, アフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素(TAO)と異なる骨格を持つ阻害剤、アスコフラノン及びフェルレノールとの複合体構造, 第88回日本生化学会大会, 2015年12月1~4日, 兵庫県・神戸市
上田慧, 志波智生, 高橋元, 稲岡ダニエル健, 城戸康年, 坂元君年, 柘植千明, Emmanuel Oluwadare Balogun, 奈良武司, 青木孝, 本間光貴, 田仲昭子, 井上将行, 松岡茂, Anthony L. Moore, 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87回日本生化学会大会, 2014年10月15-18日, 京都府・京都市
上田慧, 志波智生, 高橋元, 稲岡ダニエル健, 城戸康年, 坂元君年, 柘植千明, 本間光貴, 田仲昭子, 齋本博之, 北潔, 原田繁春, 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晶構造, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25日-27日, 神奈川県・横浜市

〔図書〕(計1件)

Young L, May B, Shiba T, Harada S, Inaoka DK, Kita K, Moore AL, Structure and

Mechanism of Action of the Alternative Quinol Oxidases, Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling, Volume 41 of the series Advances in Photosynthesis and Respiration, 2016, 375-394

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・応用生物学系・准教授

研究者番号: 80401206