

# 博士論文

論文題目 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST)の結晶学的研究

氏名 諏訪内 悠介

# 目次

---

1	序論	5
1.1	3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST)について	5
1.2	3MST が担う酵素反応機構について	7
1.3	3MST と疾病との関連について	8
1.4	生体内での硫化水素産生経路と硫化水素の生理作用について	9
1.5	3MST の阻害剤について	10
1.6	研究の目的	11
2	実験方法	17
2.1	発現系の確立	17
2.1.1	マウス 3MST ベクターの作成	17
2.1.2	蛋白質の発現、精製	17
2.1.3	蛋白質の発現・精製条件の変更	19
2.2	マウス 3MST 阻害剤非結合型およびマウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の結晶化・ 構造解析	20
2.2.1	阻害剤非結合型マウス 3MST の結晶化	20
2.2.2	マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の調製	20

2.2.3	結晶構造解析.....	20
2.3	ITC によるマウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の解離定数の決定.....	21
2.4	変異体の作成.....	22
2.5	マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の結晶化・構造解析.....	23
3	マウス 3MST の立体構造.....	32
3.1	結果.....	32
3.1.1	マウス 3MST 阻害剤非結合型の構造.....	32
3.1.2	金属の結合位置.....	34
3.1.3	マウス 3MST 阻害剤非結合型と他の蛋白質との比較.....	34
3.1.4	ローダネーゼドメインの重ね合わせ.....	37
3.2	考察.....	39
3.2.1	マウス 3MST のアミノ酸配列の多型について.....	39
3.2.2	金属の結合について.....	40
3.2.3	マウス 3MST の活性部位付近の構造がヒト 3MST とやや異なった理由.....	41
3.2.4	3MST と哺乳類の RDS について.....	41
3.2.5	SseA 活性部位の構造が他の 3MST と大きく異なる理由について.....	42
3.2.6	3MST の Arg197 の酵素反応への寄与について.....	44

3.2.7	ローダナーゼドメインを持つ蛋白質について .....	45
4	マウス 3MST と 3MP 類似阻害剤との相互作用.....	58
4.1	結果.....	58
4.1.1	マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の構造.....	58
4.2	考察.....	61
4.2.1	2MPA の光学異性体について.....	61
4.2.2	結合様式の比較.....	61
4.2.3	ヒト 3MST-ピルビン酸複合体との比較.....	61
4.2.4	3MP 類似阻害剤による酵素反応阻害 .....	63
4.2.5	他の蛋白質-3MP 類似物質複合体との比較.....	64
5	マウス 3MST と新規 3MST 阻害剤との相互作用 .....	74
5.1	結果.....	74
5.1.1	ITC 実験 .....	74
5.1.2	マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の構造.....	74
5.2	考察.....	78
5.2.1	新規 3MST 阻害剤のマウス 3MST との結合について.....	78
5.2.2	新規 3MST 阻害剤による酵素反応阻害.....	79

5.2.3	高親和性阻害剤の設計における提案 .....	80
5.2.4	他の 3MST や RDS への結合可能性について .....	80
5.2.5	硫黄- $\pi$ 相互作用について .....	87
5.2.6	新規 3MST 阻害剤の結合に関する水素の寄与について .....	87
5.2.7	その他 .....	88
6	総括 .....	101
6.1	阻害剤結合様式の決定に X 線結晶構造解析を用いる意義 .....	101
6.2	まとめと今後の展望 .....	101
7	補足情報・略語など .....	103
8	引用文献 .....	115

# 1 序論

---

## 1.1 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST)について

3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST、EC 2.8.1.2)はローダネーゼドメインを持つ蛋白質であり、ローダネーゼ/CDC25 ホスファターゼスーパーファミリーに分類される[1]。ローダネーゼドメインを持つ主な蛋白質は 3MST、ローダネーゼ(RDS、EC 2.8.1.1)、CDC25 (EC 3.1.3.48)や DUSP (EC 3.1.3.16)など(図 1-1)がある[1]。二重特異性脱リン酸化酵素である CDC25 や DUSP が 1 つのローダネーゼドメインしか持たないのに対し、3MST や RDS は 2 つのローダネーゼドメインを持つ[1]。また、CDC25 はローダネーゼドメインに触媒モジュールを持ち、DUSP はローダネーゼドメイン以外のドメインに触媒モジュールを持つのに対し、3MST や RDS は C 末端側のローダネーゼドメインに触媒モジュールを持つ[1]。ローダネーゼドメインは CH2A と CH2B のモチーフ[2], [3]を持ち、その間に活性部位モチーフ[3]を持つ(図 7-5)。本論文では CH2A モチーフは CDC25A のストランド-ヘリックス-ストランドからなる残基番号(UniProtKB[4]に登録されている残基番号、以下同様) 380-402 に相当する領域、CH2B モチーフは CDC25A のストランド-ヘリックス-短いストランドからなる残基番号 460-489 に相当する領域、活性部位モチーフは CDC25A のストランドの終わりからヘリックスの始まりまでの残基番号 428-438 に相当する領域とする。

3MST と RDS は相同性が高い蛋白質で、哺乳類では 60%前後の配列相同性がある(表 1-1、図 7-1)。活性部位の保存配列はそれぞれ CG[S/T]GVT 、 CRXGX[R/T]である[1]とされている。3MST や RDS は、生体内で多種多様な組織で発現しているが、RDS は細胞内でミトコンドリアに局在するのに対し、3MST はミトコンドリアにも細胞質基質にも存在する[5]。RDS

はチオ硫酸イオンの硫黄をシアン化物イオンに転移させる酵素である[5], [6]。この際チオシアン酸イオンが生成してシアン化物イオンが解毒される[5], [6]。一方、3MSTは3-メルカプトピルビン酸(3MP)の硫黄をシアン化物イオンまたはチオールに転移させる酵素である(図 1-3) [5], [7]。シアン化物イオンに硫黄が転移される場合はローダネーゼの場合と同様にシアン化物イオンが解毒され[5]、チオールに転移される場合は過硫化物が生成し、さらに他のチオールと反応することで硫化水素が生成する[7] (図 1-3)。

ヒト 3MSTには2つのスプライシング変異型があり、一方(UniProtKB 受入番号 P25325)は細胞質基質とミトコンドリアに存在し、もう一方(UniProtKB 受入番号 P25325-2)はN末端側にさらに20残基長く、細胞質基質に存在する[8]。また、ミトコンドリア移行シグナルと思われる配列は共通の配列のN末端側の1-25残基である[8]。UniProtKBの登録配列では、前者は哺乳類一般にみられる3MSTで、後者は霊長目によく見られるタイプに酷似している(図 7-3)。リーシュマニアやトリパノソーマの3MSTは2つのローダネーゼドメインの他C末端側にさらにドメインを持つという点で他の種の3MSTと大きく異なる(図 7-4)。このドメインは森林型熱帯リーシュマニアの3MSTではFK506結合蛋白質と相同性の高い形状であり[9]、シャペロンなどのない条件での再折り畳みに不可欠である[10]。3MSTと相同性の高いウシRDSの再折り畳みについての研究は積極的に行われており[11]-[16]、変性させたRDSの再折り畳みにはシャペロンの一種であるシャペロニンもしくはその一部による折り畳み機構を必要とする[11]-[15]ことなどが報告されている。

## 1.2 3MST が担う酵素反応機構について

三上らの実験では、3MST の含まれているマウス脳破砕液のミトコンドリア画分で硫黄の受容基質にチオレドキシン(Trx)、ジヒドロリポ酸(DHLA)、DTT を使用した場合硫化水素が産生した[17]ことから、生体内では Trx や DHLA が生体内での硫黄の受容基質と想定される。また、3MP のかわりにチオ硫酸を基質にしても硫化水素が産生されたことから、チオ硫酸も 3MST の硫黄の供与基質になると考えられる[17]。文献[17]では、マウス 3MST の野生型と変異体の活性も測定し、R188G または C248S では硫化水素産生が殆どなく、R197G の変異体では産生量が 1/4-2/3 程度に減少したことが報告されているので、Arg188 や Cys248 が 3MST 活性に必須な残基であり、Arg197 は 3MST 活性に重要な残基であると思われる。また、ラットの RDS の活性部位の残基の Arg249、Lys250 両者をそれぞれ 3MST の対応するアミノ酸である Gly、Ser に変異させると RDS 活性が低下し、3MST 活性が上昇した[18]。文献[18]ではシアン化物イオンへの硫黄転移について、C248S では酵素反応が検出できず、R188G では酵素活性が著しく低下し、R197G の変異体では酵素活性が 4%程度に低下したことが報告されている。また、Yadav らはヒト 3MST と基質である 3MP との X 線結晶構造解析の結果から Asp63、His74、Arg188、Arg197、Cys248、Ser250 が酵素活性に関与する酵素反応モデルを提唱している[7] (図 7-10)。

永原らは、ラット 3MST の野生型と変異体について、C65S と C255S は野生型と同様に活性測定前の Trx の処理濃度に依存的な酵素活性を示し C155S、C264S、C155S/C264S は非依存的な酵素活性を示したこと、野生型 3MST に二量体を形成している 3MST が含まれていたことなどから、Cys155 と Cys264 は分子間ジスルフィド結合形成に関わる Cys であり、酵素の活性化の酸化還元スイッチになっていると報告している[19]。



これまで、PDB[20],[21]には4種の3MSTの構造が登録されている。すべてX線結晶構造解析によるもので、ヒト(PDB ID 3OLH[22], 4JGT[7])、森林型熱帯リーシュマニア(大形リーシュマニア)(PDB ID 1OKG[9])、大腸菌(PDB ID 1URH[23])である。また、RDSに分類される蛋白質は28種類報告されている。X線結晶構造解析によるものは、ウシ(PDB ID 1RHD[24], 1ORB[25], 2ORA[25], 1RHS[26], 1BOH[27], 1BOI[27], 1DP2[28])、出芽酵母(PDB ID 3D1P[29], 3UTN[30])、サーマス・サーモフィルス(PDB ID 1UAR[31])、自由生活好気性窒素固定菌(PDB ID 1EOC[32], 1H4K[33], 1H4M[33])、緑膿菌(PDB ID 1YT8[34])、結核菌(PDB ID 3HWI[35], 3HZU[36], 3AAX[37], 3AAY[37])、マイコバクテリウム・サーモレジスティバイル(PDB ID 3P3A[36])、大腸菌(PDB ID 1GMX[38], 1GN0[38], 3IPO[39], 3IPP[39], 2WLR[40], 2WLX[40])である。溶液NMRによるものは、大腸菌(PDB ID 2JTQ[41], 2JTR[41], 2JTS[41])である(表1-2)。

### 1.3 3MST と疾病との関連について

3MSTの機能不全はメルカプト乳酸システインジスルフィド尿症(MCDU)[42]–[46]を引き起こす[47]。Crawhallらは精神遅滞患者の男性の尿にメルカプト乳酸システインジスルフィドが含まれることを報告した[48]が、Niederwieslerらは精神が正常なMCDU患者姉妹の尿にも含まれることを報告した[42]。Lawらは幼児期の成長遅滞などの病歴のある性腺機能低下症による肥満・両側性先天性白内障・眼振を併発している23歳の患者のIQが60歳程度であったことを報告している[44]。Hannestadらは、潰瘍性大腸炎と自己免疫性溶血性貧血の病歴のある精神が正常のMCDU患者の女性で赤血球の3MSTが欠損しておりメルカプト乳酸とメルカプト酢酸の排泄量が多かったことを報告している[45]。また、50人の白色人種の3MSTの遺伝子多型を調べたところ、イントロンの多型(IVS1-110C>GまたはIVS2+39C>T)と、Y85で翻

訳が止まる遺伝子型(IVS1-110C>G、254C>A)が見つかり、前者の発現蛋白質は機能を維持していたが後者は3MST活性を示さなかった[49]。永原らの実験では、3MSTノックアウトマウスは脳の形態異常を示さなかったものの、前頭前野のセロトニンレベルの上昇を伴う不安様行動を示した[47]。

腫瘍における3MSTの活性は腫瘍の種類によって異なる。Włodekらは、エールリッヒ腹水癌では3MST活性がマウス肝臓より低いと述べている[50]。一方で、Jurkowskaらは、腫瘍性の細胞(星状細胞腫U373、神経芽細胞腫SH-SY5Y、黒色腫A375、黒色腫WM35)で3MST活性が高く、CSE活性が低いことから、スルファン硫黄の形成は主に3MSTによると述べている[51]。

また、Frendoらは真性多血症患者の赤血球での3MST活性は健康な人のものと比べて著しく高まっていたことを報告している[52]。

#### 1.4 生体内での硫化水素産生経路と硫化水素の生理作用について

生体内での硫化水素産生経路として、シスタチオニンβ合成酵素(CBS、EC 4.2.1.22)の関与する経路、シスタチオニンγ脱離酵素(CSE、EC 4.4.1.1)の関与する経路、3MSTの関与する経路が報告されており、どの経路でもCysから硫化水素が産生されるとされている[53]–[56]。

CBSやCSEはそれぞれの酵素が関与する1つの酵素反応でL-Cysなどを基質として硫化水素を産生する。CBS、CSEはL-Cysとホモシステインを基質として硫化水素を生成し、CBSはL-Cysの加水分解によっても硫化水素を生成する。一方、3MSTの関与する経路は2つの酵素反応が関与する。まずL-CysまたはD-Cysから3MPが酵素反応によって生成し、3MPから3MSTの関与する酵素反応によって硫化水素が産生する[53]–[56]。L-Cysから3MPを生成する

酵素はシステインアミノ基転移酵素(CAT、EC 2.6.1.3) [53]–[56]、D-Cys から 3MP を生成する酵素は D-アミノ酸酸化酵素(DAO、EC 1.4.3.3) [53], [55], [56]とされている。(図 1-3, 1-4)

CBS、CSE は補欠分子族であるピリドキサルリン酸(PLP)を持ち[53]、PLP 周辺で酵素反応が進行すると考えられているのに対し、3MST は補欠分子族を持たず[53]、活性部位ポケットのシステイン残基周辺で反応が進行すると考えられている[7]。

硫化水素の生理作用として、神経細胞での長期増強、血管拡張作用、細胞保護作用などが報告されている。硫化水素の生理作用は、硫化水素による蛋白質の Cys 残基の S-スルフヒドリル化(この論文ではチオール基に硫黄が結合して過硫黄化することを指すとす)などによると考えられている[57]ものの、不明な点も多い。

## 1.5 3MST の阻害剤について

ウシ 3MST 活性を阻害する物質として、 $\alpha$ -ケトグルタル酸(AKG)[58]、2-メルカプトプロピオン酸[59] (2MPA)などが報告されているが、阻害剤の 3MST への選択性はなく、また阻害定数もそれぞれ 6.1 mM, 17 mM などの可逆的阻害剤であり[58], [59]、生理的条件下で阻害剤として使用することは難しい。一方、東京大学大学院薬学系研究科の薬品代謝化学教室の大学院生であった篠倉は、硫化水素選択的プローブ HSip-1[60]を用いたスクリーニングによって東京大学旧創薬オープンイノベーションセンター(現創薬機構)が保有している約 17 万化合物の中から硫化水素産生酵素のうち 3MST を選択的に阻害する阻害剤を見出した[61]。この化合物は、 $IC_{50}$  値が 2–7  $\mu$ M であり、芳香環を持つ骨格–カルボニル–硫黄–4-ピリミドンの共通骨格を持っていた[61]。この阻害剤はマウス 3MST に対する阻害活性が高く、CBS や CSE、ウシ RDS の

活性を抑制しなかった[61]ことから、この阻害剤は 3MST への選択性に優れていると考えられる。(図 1-5)

## 1.6 研究の目的

これまで 3MST に対し選択的阻害作用を持つ物質は報告されておらず、3MST の機能解明についてはあまり進んでいなかったが、篠倉によって報告された阻害剤(新規 3MST 阻害剤)は硫化水素産生酵素のうち、3MST への高い選択的阻害作用を持つ。この阻害剤の阻害効果は中程度であるが選択性が高いため、この化合物をリード化合物としてさらに 3MST 特異的で阻害活性の高い阻害剤を設計していくことが開発戦略として有効であると考えられる。従って、3MST と新規 3MST 阻害剤との複合体の結晶の構造解析を通じて新規 3MST 阻害剤の阻害機構を明らかにし、それぞれの骨格の意味を明らかにし、さらに 3MST に特異的な阻害剤の開発に役立てることを目的として研究を行った。

また、これまで報告されてきた阻害剤(3MP 類似阻害剤)についても阻害剤との複合体の結晶構造が報告されていないことも、3MST 阻害剤の開発が進んでいない一因と思われる。そこで、3MST と 3MP 類似阻害剤の複合体の結晶の構造解析をしてその結合様式を明らかにし、阻害剤設計に役立てることを目的として研究を行った。

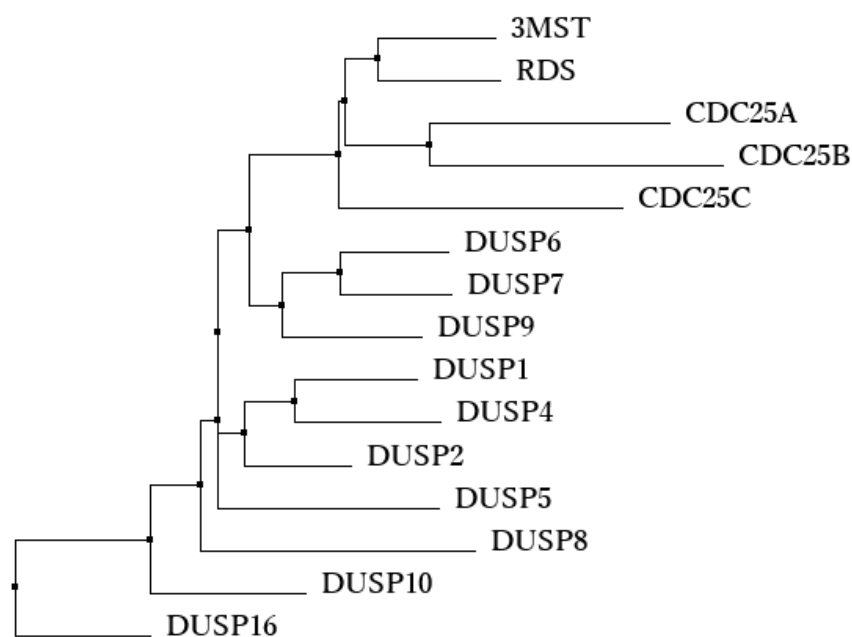


図 1-1 主なローダネーゼドメインを持つヒトの蛋白質の一致度を基にした分子系統樹

3MST(UniProtKB 受入番号 P25325)、RDS(UniProtKB 受入番号 Q16762)、CDC25A(UniProtKB 受入番号 P30304)、CDC25B(UniProtKB 受入番号 P30305)、CDC25C(UniProtKB 受入番号 P30307)、DUSP1(UniProtKB 受入番号 P28562)、DUSP2(UniProtKB 受入番号 Q05923)、DUSP4(UniProtKB 受入番号 Q13115)、DUSP5(UniProtKB 受入番号 Q16690)、DUSP6(UniProtKB 受入番号 Q16828)、DUSP7(UniProtKB 受入番号 Q16829)、DUSP8(UniProtKB 受入番号 Q13202)、DUSP9(UniProtKB 受入番号 Q99956)、DUSP10(UniProtKB 受入番号 Q9Y6W6)、DUSP16(UniProtKB 受入番号 Q9BY84)。

配列アライメントは ClustalX2.1 [62]、表示は Jalview [63]を使用。

表 1-1 3MST と RDS が同一残基数を持つ種での 3MST と RDS のアミノ酸の配列相同性の例

	3MST	RDS	配列相同性
ヒト	P25325	Q16762	59% (176残基/297残基)
ラット	P97532	P24329	60% (178残基/297残基)
マウス	Q505N7	P52196	58% (173残基/297残基)
ウシ	Q3MHG3	P00586	61% (181残基/297残基)

3MST と RDS の欄には使用したアミノ酸配列の UniProtKB 受入番号を記載。配列アライメントは ClustalW2.1 [62]を使用。

哺乳類以外は 3MST と RDS のアミノ酸数が同数でないことが多いので載せていない。

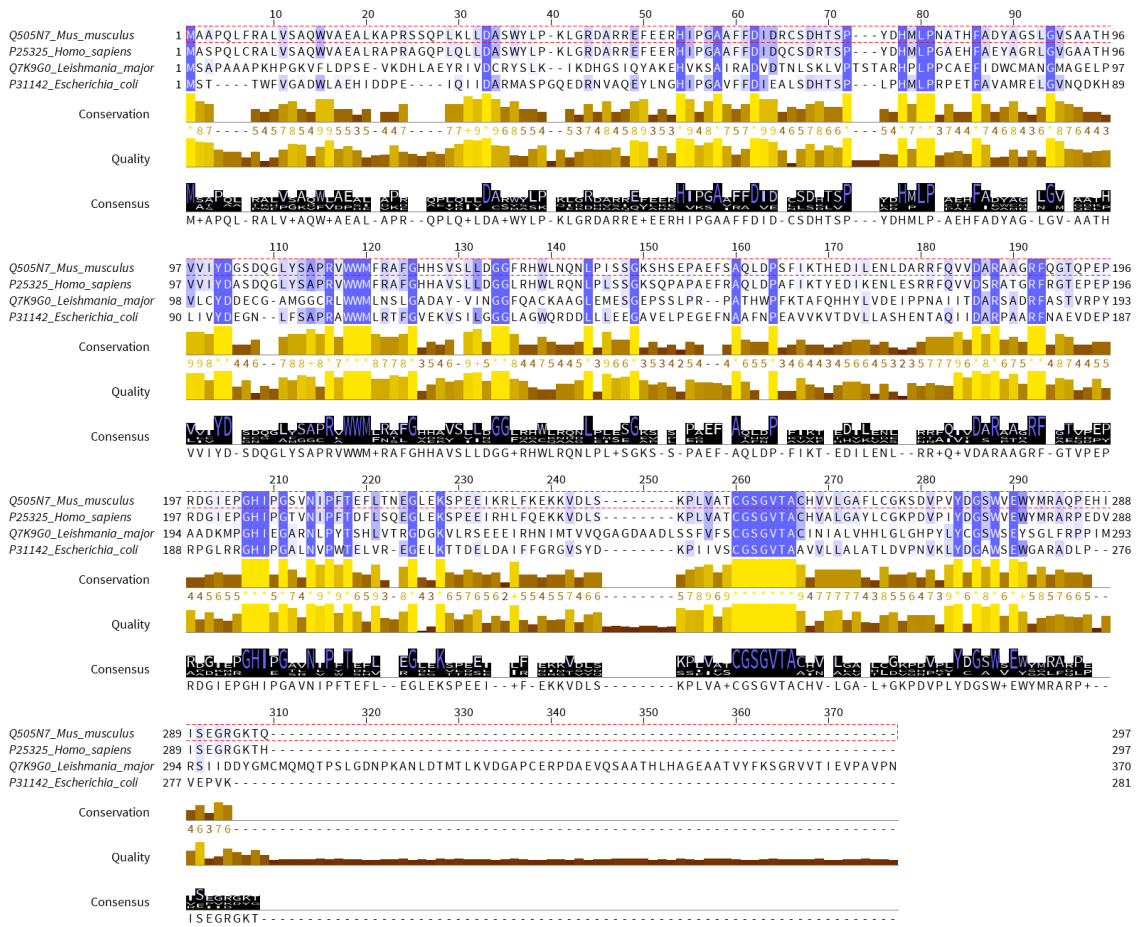


図 1-2 マウス 3MST と PDB に登録されている 3MST との アミノ酸配列のアライメントによる比較

種名の前に UniProtKB 受入番号を表示。マウス 3MST の配列は赤で囲んである。保存度の高い残基ほど濃い紫で示す。アライメントは ClustalX2.1、表示は Jalview を使用。

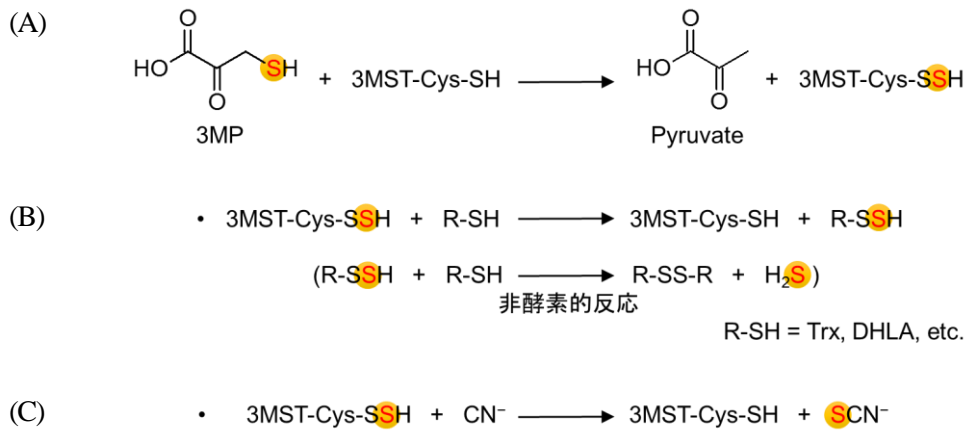


図 1-3 3MST が触媒する酵素反応

- (A) 3MP から 3MST の触媒残基のシステインへの硫黄転移反応  
 (B) 3MST の触媒残基からチオールへの硫黄転移反応と、硫化水素が産生する非酵素的反応  
 (C) 3MST の触媒残基からシアン化物イオンへの硫黄転移反応  
 文献[5], [7], [17]を基に作成。

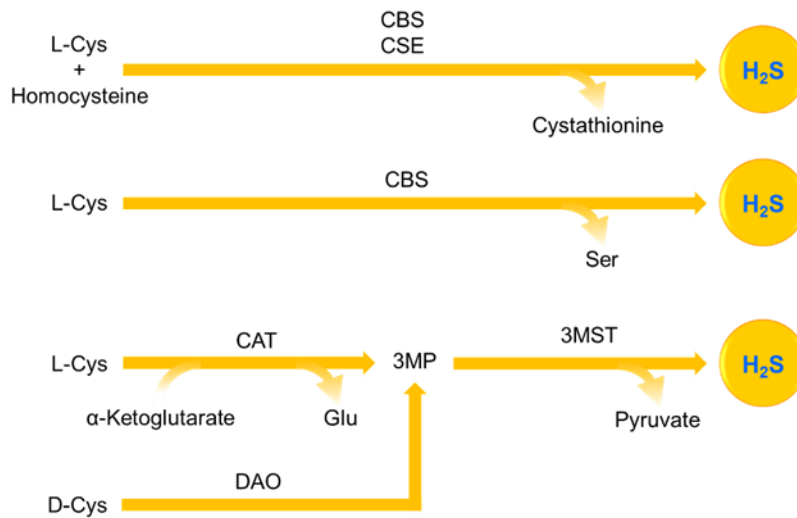


図 1-4 生体内での硫化水素産生経路

文献[56]の図を改変

表 1-2 PDB に登録されている 3MST と RDS

種	学名	蛋白質	UniProtKB	残基数	PDB ID
ヒト	<i>Homo sapiens</i>	3MST	P25325	297	3OLH, 4JGT
森林型熱帯 リーシュマニア	<i>Leishmania major</i>	3MST	Q7K9G0	370	1OKG
大腸菌 K-12株	<i>Escherichia coli (strain K12)</i>	3MST	P31142	281	1URH
ウシ	<i>Bos taurus</i>	RDS	P00586	297	1BOH, 1BOI, 1DP2, 1ORB, 1RHD, 1RHS, 2ORA
出芽酵母 S288c株	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c)	RDS	Q08686	304	3UTN
出芽酵母 S288c株	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c)	RDS	Q12305	139	3D1P
結核菌 H37Rv株	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (strain ATCC 25618 / H37Rv)	RDS	P9WHF9	277	3AAX, 3AAY, 3HWI
結核菌 H37Rv株	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (strain ATCC 25618 / H37Rv)	RDS	P9WHF7	297	3HZU
マイコバクテリウム・ サーモレジステイバイル	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	RDS	E2QRA0	312	3P3A
緑膿菌 PAO1株	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain ATCC 15692 / PAO1 / 1C / PRS 101 / LMG 12228)	RDS	Q9I0N4	527	1YT8
サーマス・ サーモフィルスHB8株	<i>Thermus thermophilus</i> (strain HB8 / ATCC 27634 / DSM 579)	RDS	Q5SJI0	285	1UAR
自由生活好気性 窒素固定菌	<i>Azotobacter vinelandii</i>	RDS	P52197	271	1E0C, 1H4K, 1H4M
大腸菌 K-12株	<i>Escherichia coli (strain K12)</i>	RDS	P78067	435	2WLR, 2WLX, 3IPO, 3IPP
大腸菌 K-12株	<i>Escherichia coli (strain K12)</i>	RDS	P0A6V5	108	1GMX, 1GN0
大腸菌 K-12株	<i>Escherichia coli (strain K12)</i>	RDS	P23857	104	2JTQ, 2JTR, 2JTS

種、学名、アミノ酸配列の UniProtKB 受入番号と登録されている残基数、PDB ID を示す。



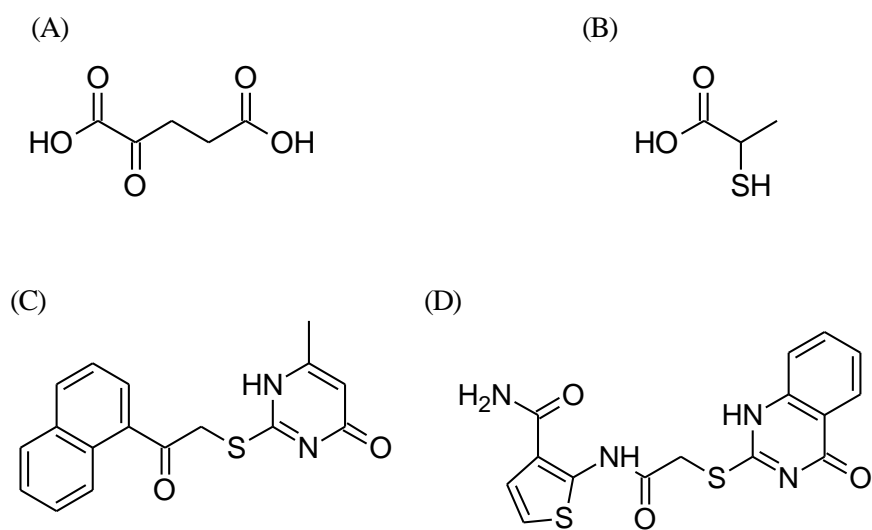


図 1-5 本研究で使用した 3MST の阻害剤の構造式

(A) AKG (B) 2MPA (C) 阻害剤 A (D) 阻害剤 B

阻害剤 A: 4(3H)-Pyrimidinone, 6-methyl-2-[[2-(1-naphthalenyl)-2-oxoethyl]thio]-

阻害剤 B: 3-Thiophenecarboxamide, 2-[[2-[(3,4-dihydro-4-oxo-2-quinazoliny)thio]acetyl]amino]-

## 2 実験方法

---

### 2.1 発現系の確立

#### 2.1.1 マウス 3MST ベクターの作成

マウス 3MST (UniProtKB 受入番号 Q505N7)の遺伝子(図 2-1)は、当時薬品代謝化学教室の大学院生であった篠倉潔博士からいただいたものを用いた。

当研究室所有の pETHP ベクター(pET44a(+)(Novagen)改変ベクター)にマウス 3MST 全長の遺伝子を導入したヒスタグ融合マウス 3MST ベクターを作成した。発現蛋白質の精製を効率化させるため、3MST の N 末端に 6×His タグを付加し、タグ-蛋白質間には HRV 3C 認識配列を導入し、HRV 3C プロテアーゼで切断することによりタグを除去できるようにした。

作成方法は以下の通りである。

まず、マウス 3MST 遺伝子を鋳型 DNA とし、プライマー(表 2-1)、KOD FX Neo (Toyobo)を用いて添付文書のプロトコルに従い遺伝子を増幅した。作成した遺伝子を In fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ)を用いて添付文書のプロトコルに従い pET HP ベクターに組み込んだ。

#### 2.1.2 蛋白質の発現、精製

作成したベクターを当研究室所有の大腸菌株 JM109 (DE3) pRARE2 株に導入し、100 mg/l のアンピシリンを混合した LB 培地の入ったジャーファーメンターで培養した。37°C で培養し、濁度 OD<sub>600</sub> が 0.5 付近になったら終濃度 0.5 mM になるように IPTG を加え、18°C に下げ一晩培養した。回収した大腸菌を破碎バッファーと混合して氷水で冷却しながら超音波破碎したのち、低温で 20,000 rpm、20 分遠心した。

His タグ融合 3MST は、遠心後の液の上清をニッケルアフィニティーカラム(cOmplete His-Tag Purification Resin (Roshe))に通して吸着させた。カラムを洗浄バッファー(2種)で洗浄して溶出バッファーで溶出させ、希釈(主に目安 12.5 倍)して再度別のニッケルアフィニティーカラム (HisTrap (GE healthcare))に吸着させ、HisTrap バッファーA、B を用い、B の濃度を 0%から少なくとも溶出するまで線形勾配をかけて溶出させた。溶出した 3MST に結合したタグを当研究室で作成した GST 融合 HRV 3C プロテアーゼを用いて切断したのち、GS 4B カラムを用いて HRV 3C プロテアーゼを除去し、希釈(主に目安 15 倍)して陰イオン交換カラム(HiTrap Q (GE healthcare))で HiTrap Q バッファーA、B を用い、B の濃度を 0%から少なくとも溶出するまで線形勾配をかけて溶出させた。溶出した 3MST を濃縮してゲル濾過カラム(Superdex 75 pg (GE healthcare))を直径 1 cm、長さ 30 cm のカラムに詰めたものを用いて精製した。精製は 4°Cで行った。培地 1 L 当たり約 2-3 mg の精製蛋白質を得た。各バッファーの組成は以下の通りである。(図 2-2、2-3、2-4、2-5)

破碎バッファー: 0.1 M HEPES pH 8, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 1mM PMSF, 1 mM DTT, 1%

EtOH

洗浄バッファー1: 0.02 M HEPES pH 8, 0.15 M NaCl, 10% glycerol

洗浄バッファー2: 0.02 M HEPES pH 8, 0.15 M NaCl, 10% glycerol, 0.01 M imidazole

溶出バッファー: 0.02 M HEPES pH 8, 0.15 M NaCl, 10% glycerol, 0.25 M imidazole

HisTrap バッファーA: 0.02 M HEPES pH 8, 0.15 M NaCl, 10% glycerol

HisTrap バッファーB: 0.02 M HEPES pH 8, 0.15 M NaCl, 10% glycerol, 0.5 M imidazole

HiTrap Q バッファーA: 0.02 M HEPES pH 8, 10% glycerol

HiTrap Q バッファーB: 0.02 M HEPES pH 8, 1 M NaCl, 10% glycerol

ゲル濾過バッファー: 0.02 M HEPES pH 7.5, 0.3 M NaCl

### 2.1.3 蛋白質の発現・精製条件の変更

マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体結晶の調製には上記の条件で精製したマウス 3MST を使用したが、その他の実験に使用するサンプルについては触媒残基のシステインの酸化を避けるため使用する還元剤を DTT から TCEP に変更し、HisTrap バッファーを除くすべてのバッファー中に TCEP を 0.5 mM 加えることにした。HisTrap バッファーA、B に関しては樹脂の還元を避けるため TCEP の濃度を 0.05 mM にした。

破碎バッファーに glycerol が入っていると破碎効率が低下することが判明したので、新規 3MST 阻害剤との実験に使用する蛋白質を発現させた大腸菌の多くは glycerol を除いた破碎バッファーを使用して破碎した。

JM109 (DE3)株を用いて 18-20°C で培養した方が培養開始から誘導開始までの時間が短いことが判明したため、新規 3MST 阻害剤との実験に使用する蛋白質は JM109 (DE3)株に発現させたものを用いた。また、培地に 2×YT (IPTG 1 mM で誘導)を用いても蛋白質は発現し、ITC 実験に用いた。

## 2.2 マウス 3MST 阻害剤非結合型およびマウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の結晶化・構造解析

### 2.2.1 阻害剤非結合型マウス 3MST の結晶化

阻害剤非結合型マウス 3MST の結晶は PEG 3350 を沈殿剤とする条件で 4°C で析出した。蛋白質溶液に 28 mg/ml マウス 3MST, 0.01 M HEPES pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.25 mM TCEP, 0.05 M 3-mercaptopropionic acid, 0.05 M NaOH を、蛋白質溶液と混合する沈殿剤溶液と平衡用外液に 36% PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 8.1 を使用した際に高分解能の回折データを与える結晶を得ることができた。

### 2.2.2 マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の調製

マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の結晶は、蛋白質溶液に 19 mg/ml 3MST, 0.02 M HEPES pH 7.5, 0.28 M NaCl, 2 mM DTT, 5 mM ATP を、蛋白質溶液と混合する沈殿剤溶液に 40% PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 8.1 を、平衡用外液に 36% PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 8.1 を用いて析出させた結晶(図 2-6)を 0.1 M AKG または 0.1 M 2MPA (2MPA は NaOH で中和), 40% PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 8.1 の溶解した液に 5 日浸漬して作成した。

### 2.2.3 結晶構造解析

結晶化ドロップは約 100 K の窒素気流で凍らなかったので、結晶は抗凍結剤処理せずにクライオチューブで拾った。結晶は多結晶化しやすく、また結晶化ドロップに蛋白質の沈殿と思われるものが生じていることが多かったため、沈殿剤溶液と同じ組成の液などで結晶を一回洗浄してからクライオチューブで拾うこともあった。多くの場合、予め拾った結晶を液体窒素に浸して急速冷却してから放射光施設に運んだ。

X線回折データの取得は、シンクロトロン放射光施設 Photon Factory のビームラインにおいて行った。結晶に照射する X 線の波長は 0.9–1.0 Å の波長を選択し、180°分の回折データを取得した。

回折強度の算出と各フレーム間のスケール因子の算出には HKL-2000[64] (HKL Research, Inc.)を使用し、作成した SCALEPACK ファイルを CCP4i[65] (CCP4[66]の GUI)の SCALEPACK2MTZ を使用して MTZ ファイルに変換した。位相決定は、ヒト 3MST (PDB ID 3OLH)や構造の決まったマウス 3MST の構造をモデルとして CCP4i の MOLREP[67]または Phaser[68]による分子置換法により行った。WinCoot[69]を利用したモデルの構築と修正、CCP4i の REFMAC5[70]および PHENIX[71]による構造精密化を繰り返して精密化した。

水素結合およびファンデルワールス相互作用の解析には LigPlot+[72]を使用し、基本的にファンデルワールス相互作用は 4.0 Å 以下、水素結合は 3.2 Å 以下を拾うこととした。LSQ 方式による立体構造の比較には SUPERPOSE を、SSM 方式による比較には WinCoot または CCP4mg[73]を使用した。その他、CCP4i の SFALL、FFT、QtPISA[74]も解析に利用した。得られた結晶学的統計値は表 2-3 の通りである。

## 2.3 ITC によるマウス 3MST–新規 3MST 阻害剤複合体の解離定数の決定

触媒残基の Cys248 に硫黄を結合させた 3MST と、結合させていない 3MST を調製し、新規 3MST 阻害剤との結合熱を測定し、阻害剤の解離定数を算出した( $n=3$ )。

マウス 3MST と基質である 3MP の混合液 (5 μM 3MST, 25 μM 3MP, 20 μM TCEP, 0.1 M NaCl, 0.02 M glycine–NaOH pH 9) を室温に 2 時間置き、4°C においてアミコン 10 K を用いて濃縮とバッ

ファー(5% DMSO, 0.1 M NaCl, 0.02 M glycine-NaOH pH 9)の置換を行い、触媒残基のCys248に硫黄を結合させた3MSTを準備した。

MicroCal iTC<sub>200</sub> (GE Healthcare)のセル側を3MST (50  $\mu$ M 3MST, 5% DMSO, 0.1 M NaCl, 0.02 M glycine-NaOH pH 9)、シリンジ側を新規3MST阻害剤(250  $\mu$ M 阻害剤Aまたは500  $\mu$ M 阻害剤B, 5% DMSO, 0.1 M NaCl, 0.02 M glycine-NaOH pH 9)の溶解液をサンプルとし、シリンジ側から2  $\mu$ lずつ150秒毎に18回セル側に滴定して発生する熱量を測定した。データは付属のソフトOrigin7 SR4 (OriginLab)を用いて、1サイト結合モデルのもとフィッティングをして処理し、解離定数を求めた。蛋白質サンプルは次の日までに使い切った。

Cys248に硫黄を結合させていない3MSTについても濃縮とバッファー置換を行い同様の条件で解離定数を求めた。

## 2.4 変異体の作成

活性部位以外の Cys 残基と硫黄との反応を抑えるため、活性部位以外の Cys を Ser に変異させた変異体(C65S/C255S/C264S)を作成した。

変異体の作成は、His タグ融合マウス 3MST 遺伝子を組み込んだベクターを鋳型とし、Primestar MAX premix (タカラバイオ)を用いてそれぞれの Cys を Ser の遺伝子の配列にするプライマー(表 2-2)を使用し、添付文書のプロトコルに従い、1箇所ずつ3回に分けて変異を入れて作成した。この変異体遺伝子を大腸菌に導入して発現・精製した蛋白質をマウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の結晶作成に使用した。野生型と同様に精製することができた。

## 2.5 マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の結晶化・構造解析

マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体は、阻害剤の 3MST への結合率が正確に評価できなかったため、以下の濃度は推測値である。また、サンプル調製条件は主なものを記す。

マウス 3MST-阻害剤 A 複合体は、0.08 mg/ml 3MST, 10  $\mu$ M 阻害剤 A, 50  $\mu$ M 3MP, 40  $\mu$ M TCEP, 0.03 M HEPES pH 8.2, 0.1 M NaCl, 1% DMSO を 25°C で一晩置き、濃縮・バッファー (0.02 M HEPES-NaOH pH 8.2, 0.3 M NaCl) 置換して大よそ 10-30 mg/ml の濃度になるように濃縮した。マウス 3MST-阻害剤 B 複合体は、0.08 mg/ml or 0.17 mg/ml 3MST, 10  $\mu$ M 阻害剤 B, 50  $\mu$ M 3MP, 0  $\mu$ M or 40  $\mu$ M TCEP, 0.03 M glycine-NaOH pH 9, 0.1 M NaCl, 1% DMSO を 25°C で一晩置き、濃縮・バッファー (0.02 M glycine-NaOH pH 9, 0.3 M NaCl) 置換して大よそ 10-30 mg/ml の濃度になるように濃縮した。

結晶化には、蛋白質溶液と混合する沈殿剤溶液と平衡用外液として 36% PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 8.1 を使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法で 4°C で析出させた(図 2-7)。3MST-阻害剤 A 複合体については、サンプル調製中に生じた沈殿の中または周辺からよく結晶が析出した。

X 線回折データの取得は、シンクロトロン放射光施設 Photon Factory および SPring-8 のビームラインにおいて行った。結晶は双晶になりやすく、マウス 3MST-阻害剤 B 複合体は Refmac5 の Intensity based twin refinement を使用して精密化した。その他の条件はマウス 3MST 阻害剤非結合型およびマウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の構造解析と同様である。得られた結晶学的統計値は表 2-4 の通りである。



```

atggccgccccgcaacttttccgagctctgggtgtctgcgagtggtggcgaggctctg
M A A P Q L F R A L V S A Q W V A E A L
aaggccccgcgctcctcacagccgctgaagttactggacgcgtcctggtacctaccaag
K A P R S S Q P L K L L D A S W Y L P K
ctgggccgcatgacgacgagcttggaggagcggccacatcccgggcccgccttcttc
L G R D A R R E F E E R H I P G A A F F
gacatcgatcgttgcagtgaccacacgtccccctacgaccacatgctgcctaacgccacg
D I D R C S D H T S P Y D H M L P N A T
cactttgccgactacgcgggagcttgggctgagcggccacgcacgtcgtgatctac
H F A D Y A G S L G V S A A T H V V I Y
gacggcagtgaccagggcctctattccgctccgcggtctggtggatgttccgcgcttc
D G S D Q G L Y S A P R V W W M F R A F
ggccaccactctgtgtcattgctggacggcggcttccgccactggctgaatcagaacctg
G H H S V S L L D G G F R H W L N Q N L
ccaatcagctccggcaaaagccactcggagccccgaggagttcagcgcgagctcgatccc
P I S S G K S H S E P A E F S A Q L D P
tctttcatcaagaccacgaggacatcctggagaacttggatgcccgcgcttccagggtg
S F I K T H E D I L E N L D A R R F Q V
gtggacgcccgcgagctggccgtttccaaggcaccagccagaaccccagatggcatc
V D A R A A G R F Q G T Q P E P R D G I
gaacctggccacatccctggctcagtaaacatcccgttccactgaattcctgaccaacgaa
E P G H I P G S V N I P F T E F L T N E
ggcctggagaagagcccagaggagatcaaacgcctgtttaaggagaagaaggtggacctg
G L E K S P E E I K R L F K E K K V D L
tctaagcccttggtagccacgtgtggctccggtgtcacagcctgccacgtggctcctgggg
S K P L V A T C G S G V T A C H V V L G
gccttcctctgtggcaagtcagacgtgcctgtctatgatggctcctgggtagagtggtac
A F L C G K S D V P V Y D G S W V E W Y
atgcgtgccagccagagcatatcatctctgagggccgaggaagaccagtgga
M R A Q P E H I I S E G R G K T Q -

```

図 2-1 マウス 3MST (GenBank 受入番号 BC094469 / UniProtKB 受入番号 Q505N7) の塩基配列(上段)とアミノ酸配列(下段)

表 2-1 ベクター作成のために使用したプライマー

5'末端側	5'-CCAGGGGCCGGATCCATGGCCGCCCGCAACTTTTCCGAG-3'
3'末端側	5'-GTGCGGCCGCAAGCTTTCCTGAGGCTTCCCTCGGCCCTCA-3'

表 2-2 変異体(C65S/C255S/C264S)作成に用いたプライマー

C65Sセンス鎖	5'-GATCGTTCCAGTGACCACACGTCCCCC-3'
C65Sアンチセンス鎖	5'-GTCACTGGAACGATCGATGTCTGAAGAA-3'
C255Sセンス鎖	5'-ACAGCCTCCCACGTGGTCCTGGGGGCC-3'
C255Sアンチセンス鎖	5'-CACGTGGGAGGCTGTGACACCGGAGCC-3'
C264Sセンス鎖	5'-TTCCTCTCTGGCAAGTCAGACGTGCCT-3'
C264Sアンチセンス鎖	5'-CTTGCCAGAGAGGAAGGCCCCAGGAC-3'

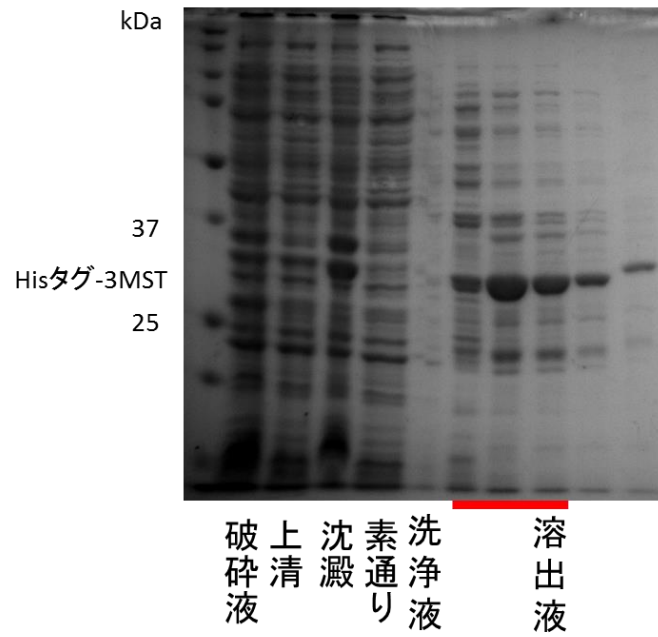
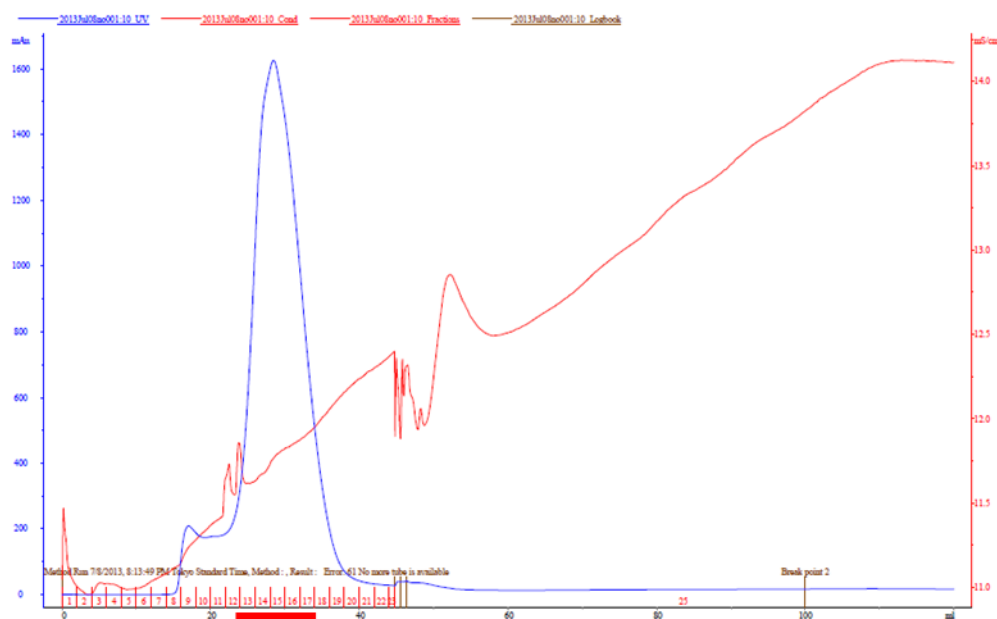
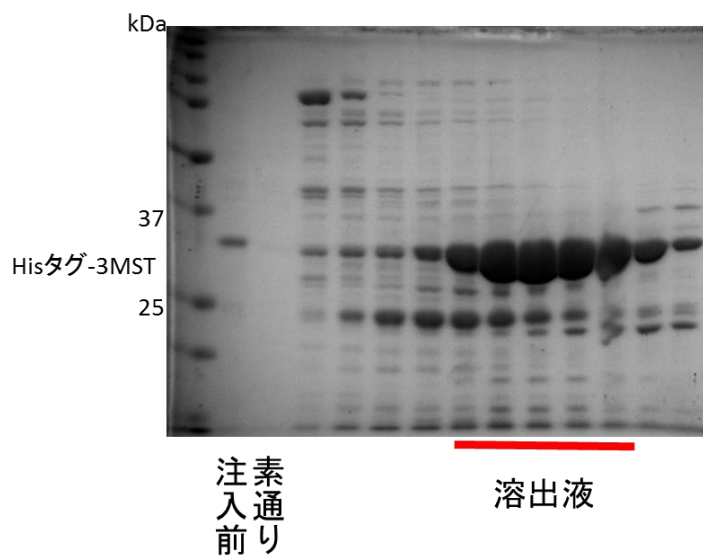


図 2-2 cOmplete His-Tag Purification Resin での蛋白質精製(SDS-PAGE)  
各ウェルのサンプルを下に記す。左端はマーカー。赤線のサンプルを次の精製に用いた。

(A)



(B)



(C)

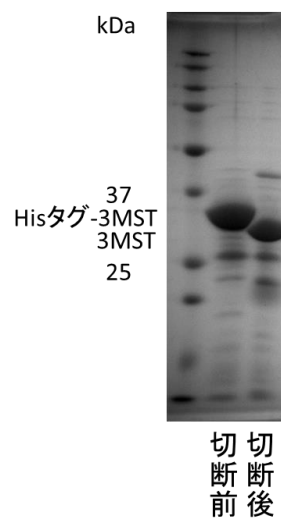
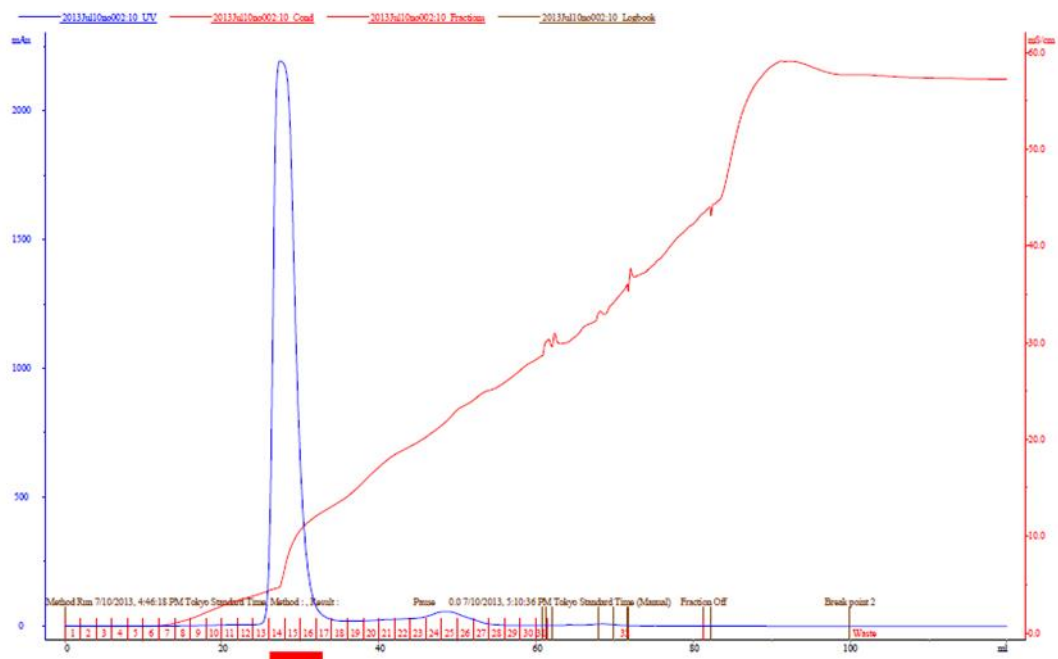


図 2-3 HisTrap カラムによる蛋白質精製の(A)溶出プロファイルと(B) SDS-PAGE、(C) 回収サンプルのタグ切断前後の SDS-PAGE

SDS-PAGE の各ウェルのサンプルを下に記す。左端はマーカー。赤線のサンプルを回収してタグを切断し、次の精製に用いた。

(A)



(B)

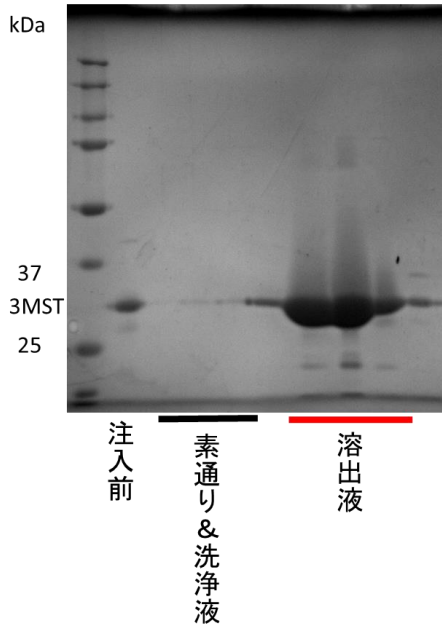


図 2-4 HiTrapQ カラムでの蛋白質精製の(A)溶出プロファイルと(B) SDS-PAGE

SDS-PAGE の各ウェルのサンプルを下に記す。左端はマーカー。赤線のサンプルを回収して次の精製に用いた。

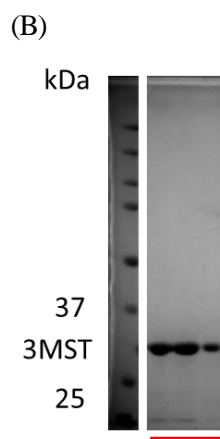
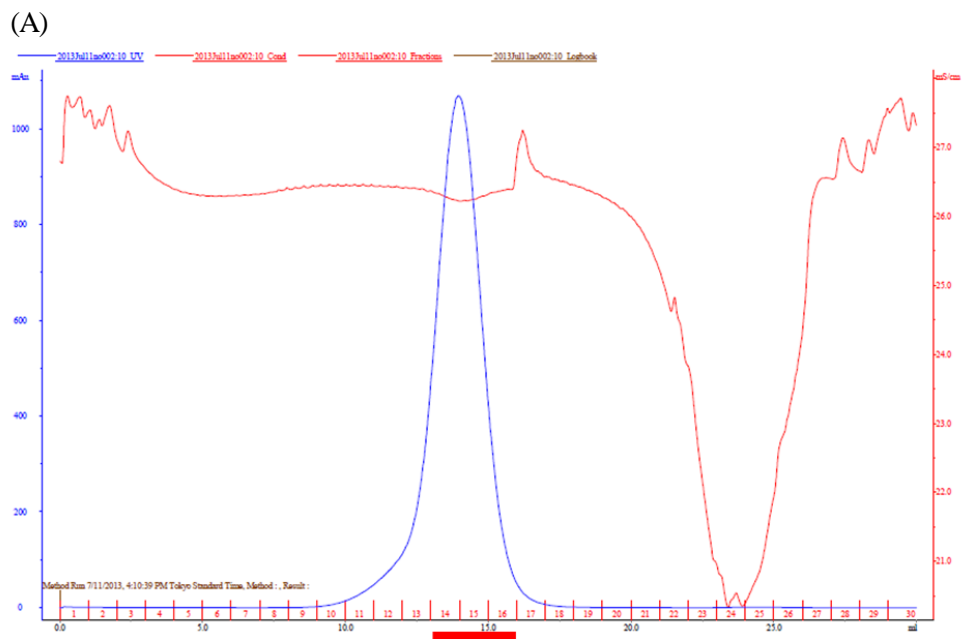


図 2-5 Superdex75pg カラムでの蛋白質精製の(A)溶出プロファイルと(B) SDS-PAGE  
 SDS-PAGE の各ウェルのサンプルを下に記す。左端はマーカー。赤線のサンプルを回収して結  
 晶化に用いた。



図 2-6 阻害剤非結合型マウス 3MST 結晶の結晶写真

表 2-3 阻害剤非結合型マウス 3MST 結晶およびマウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体結晶の結晶学的統計値

	阻害剤非結合型m3MST	m3MST-AKG複合体	m3MST-2MPA複合体
<b>Data collection</b>			
X-ray source	Photon Factory BL-17A	Photon Factory AR-NE3A	Photon Factory AR-NE3A
Wavelength (Å)	0.9800	1.0000	1.0000
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	63.4, 70.8, 67.2	63.4, 70.8, 66.9	63.0, 70.6, 67.5
$\beta$ (°)	110.9	110.1	110.0
Resolution (Å)	50.0-1.0 (1.02-1.00)	50.0-1.5 (1.53-1.50)	50.0-1.5 (1.53-1.50)
No. of reflections	1,023,273	324,928	328,360
No. of unique reflections	282,356	88,128	88,176
$R_{\text{merge}}$	0.10 (>1)	0.07 (0.41)	0.14 (0.56)
$\  \sigma(I) \ $	24.5 (1.4)	23.4 (1.7)	24.7 (2.4)
Completeness (%)	94.7 (91.8)	99.7 (96.6)	99.9 (100.0)
Redundancy	3.6 (3.6)	3.7 (3.0)	3.7 (3.6)
<b>Refinement</b>			
Resolution (Å)	45.5-1.0	50.0-1.5	50.0-1.5
No. of reflections	268,393	83,642	83,782
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.15/0.17	0.19/0.22	0.18/0.20
Average B-factors (Å <sup>2</sup> )	11.3	19.0	16.8
R.m.s deviations			
Bond lengths (Å)	0.013	0.013	0.012
Bond angles (°)	1.62	1.59	1.54

Values in parentheses are for for the highest resolution shell.

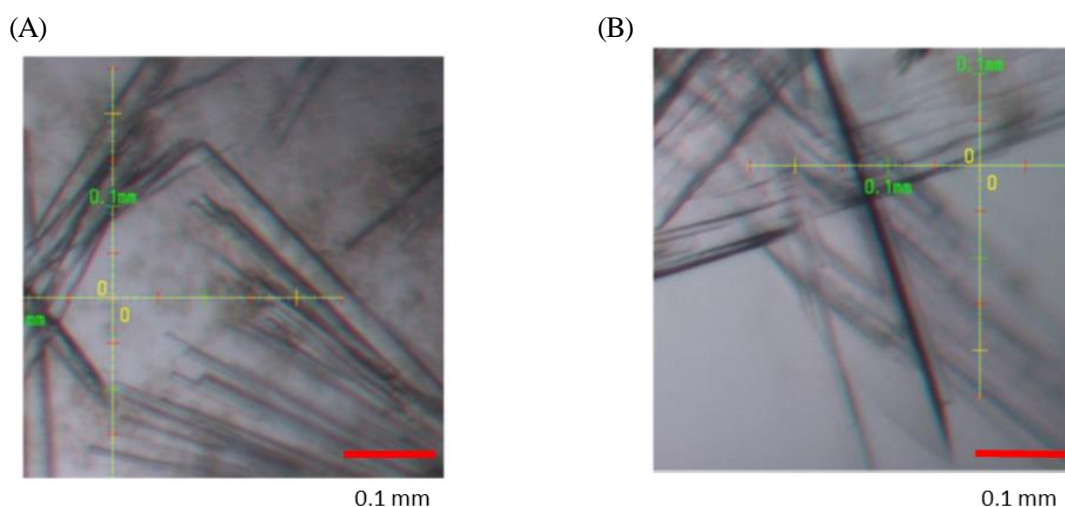


図 2-7 マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体結晶の結晶写真

(A) マウス 3MST-阻害剤 A 複合体 (B) マウス 3MST-阻害剤 B 複合体

表 2-4 マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体結晶の結晶学的統計値

	m3MST-阻害剤A	m3MST-阻害剤B
<b>Data collection</b>		
X-ray source	Photon Factory BL-5A	SPring-8 BL44XU
Wavelength (Å)	1.0000	0.9000
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	37.3, 149.7, 54.0	37.4, 150.4, 54.3
$\beta$ (°)	110.1	110.1
Resolution (Å)	50-1.7 (1.73-1.70)	50-1.2 (1.22-1.20)
No. of reflections	227,437	629,326
No. of unique reflections	59,621	170,429
$R_{\text{merge}}$	0.11 (0.69)	0.07 (0.74)
$\  \sigma(I) \ $	14.5 (2.1)	23.1 (2.3)
Completeness (%)	98.0 (96.6)	97.5 (100.0)
Redundancy	3.8 (3.8)	3.7 (3.6)
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	50-1.7	30.3-1.2
No. of reflections	56,656	162,020
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.17/0.22	0.14/0.17
Twin fraction		0.64/0.36
Average B-factors (Å <sup>2</sup> )	13.9	13.3
R.m.s deviations		
Bond lengths (Å)	0.019	0.015
Bond angles (°)	1.85	1.85

Values in parentheses are for the highest resolution shell.



## 3 マウス 3MST の立体構造

---

### 3.1 結果

マウス 3MST 阻害剤非結合型の結晶は  $P2_1$  に属す結晶であり、非対称単位中に 2 つの 3MST 分子(A 鎖、B 鎖)が存在した。

#### 3.1.1 マウス 3MST 阻害剤非結合型の構造

マウス 3MST は 2 つのローダネーゼドメイン(ローダネーゼ 1 残基番号 1-138、ローダネーゼ 2 残基番号 165-297)を持ち、活性部位は 2 つのドメインの境界面に存在した(図 3-1 (A), (B))。  $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  ストランドをそれぞれ 10 箇所( $\alpha$  ヘリックスの残基番号 13-21、45-51、79-88、110-119、131-137、166-175、186-190、226-235、254-263、275-282、 $\beta$  ストランドの残基番号 10-11、29-33、58-59、96-100、125-128、163-164、179-182、209-210、244-247、271-272)持ち、 $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  ストランドが交互に現れる構造をしていた(図 3-1 (C))。 ストランドは蛋白質内部に集中していた。また、所々に  $3_{10}$  ヘリックス(残基番号 39-41、160-162、213-216、285-287)も見られた。2 つのローダネーゼドメインは、それぞれ  $\alpha$  ヘリックス 5 個、 $\beta$  ストランド 4-5 個、 $3_{10}$  ヘリックス 1-2 個からなる構造をしていた(図 3-1 (C))。残基番号 23-25 付近のループは配置が乱れているらしく、主鎖の電子密度が明瞭でない残基が多かった。以降  $3_{10}$  ヘリックスを  $\eta$  で表す。

1 つ目のローダネーゼドメインの、CH2A モチーフ(残基番号 29-60)、CH2B モチーフ(残基番号 124-149)、活性部位モチーフ(残基番号 98-110)はそれぞれ  $\beta 2-\eta 1-\alpha 2-\beta 3$ 、 $\beta 5-\alpha 5$ 、 $\beta 4$  終わり- $\alpha 4$  始めの二次構造を含んでいた。2 つ目のローダネーゼドメインの、CH2A モチーフ(残基番号 178-211)、CH2B モチーフ(残基番号 268-293)、活性部位モチーフ(残基番号 245-254)

はそれぞれ  $\beta 7-\alpha 7-\beta 8$ 、 $\beta 10-\alpha 10-\eta 4$ 、 $\beta 9$  終わり- $\alpha 9$  始めの二次構造を含んでいた(図 3-1 (C))。また、これらのモチーフは、活性部位側に局在していた(図 3-1 (B))。なお、ローダネーゼドメインを表現する際にはヒト 3MST での定義[7]に従うが、ローダネーゼドメイン同士の比較の際には CDC25A の論文[3]との対応のため、ローダネーゼドメイン 1、2 をそれぞれ残基番号 1-152、153-297 とする。また、ローダネーゼドメイン 2 の直前の  $\eta 2$  や  $\beta 6$  はローダネーゼドメイン 2 に含めてもいい位置に存在するが、ローダネーゼドメイン同士の比較以外の場合はヒト 3MST での定義に従って含めないものとする。

ラットで分子間のジスルフィド形成に関わっている Cys155、Cys264[19]に対応する位置の残基は分子表面または溶媒に容易に露出する位置にあった(図 3-4)。ヒトでミトコンドリア移行シグナルであると指摘された残基(残基番号 1-25) [8]のうち、X 線結晶構造で残基の位置を決定できた残基(残基番号 5-22)は、蛋白質表面に存在して他の残基と水素結合などの相互作用をして立体構造をとっていた。

結晶中の非対称単位の子分子同士の全体構造はよく重なった(RMSD 0.51 Å (SSM)、0.51 Å (LSQ))(図 3-2)。

3MP 類似阻害剤や新規 3MST 阻害剤との相互作用残基の残基(4 章、5 章で後述)の位置は、Trp36、Leu38、Pro39 がローダネーゼドメイン 1 の CH2A モチーフ、Asp63、Asp73、His74 が CH2A モチーフと CH2B モチーフの間、Tyr108 が活性部位モチーフに存在し、Arg184、Arg188、Glu195、Pro196、Arg197 がローダネーゼドメイン 2 の CH2A モチーフ、Cys248、Gly249、Ser250、Val252、Thr253 が活性部位モチーフ、Val277 が CH2B モチーフに存在した。また、Pro39 が  $\eta 1$ 、Arg188 が  $\alpha 7$ 、Val277 が  $\alpha 10$  に存在した。

### 3.1.2 金属の結合位置

マウス 3MST には電子密度や結合距離、他の原子の配位から金属イオンと思われる原子が結合している場所があった(図 3-3)。1 箇所目は Asp73、His74、Ser250、Asp273 の主鎖 O 原子と、Met75 側鎖 S $\delta$  原子、Asp273 側鎖 O $\delta$ 1 原子に囲まれた位置で、2 箇所目は Glu195、Arg197、Ile200 の主鎖 O 原子と、溶媒 3 分子に囲まれた位置であった。1 箇所目はドメインの境界面にあり、2 箇所目はローダネーゼドメイン 2 に存在した。どの位置も 8 面体の中心に金属原子、頂点にアミノ酸の酸素原子や水分子などが置けるような最大 6 配位の構造をとっていた。1 箇所目は 6 方すべてをアミノ酸残基で囲まれ、溶媒と接触していなかった。2 箇所目は蛋白質表面にあり、金属イオンに溶媒分子が配位していた。電子密度は 1 箇所目が明瞭に見える傾向にあり、2 箇所目は占有度が低いこともあった。蛋白質を大量発現させた培地や精製バッファーはナトリウムを大量に含んでいたためナトリウムイオンを置くことにした。結晶によっては金属の結合率が低いのか金属原子や配位子の電子密度が低いものもあった。また、その他にいくつか金属が結合しうる箇所が存在した。今後、1 箇所目の金属結合サイトを金属結合サイト 1、2 箇所目を金属結合サイト 2 と呼ぶことにする。

### 3.1.3 マウス 3MST 阻害剤非結合型と他の蛋白質との比較

#### 3.1.3.1 ヒト 3MST との比較

ヒト 3MST には 2 つのイソ型があり、1 つはマウス 3MST と同じアミノ酸残基数を持つ。もう 1 つは N 末端側に 20 残基長い配列を持つものの、他の残基はすべて同じである。従って、以降では、ヒト 3MST の残基番号はマウス 3MST と同一残基数を持つイソ型の残基番号を用いることにする。

プログラム ClustalW2 により算出したマウス 3MST とヒト 3MST のアミノ酸配列の相同性は 85% (297 アミノ酸のうち 251 アミノ酸)であり、後述する 3MP 類似阻害剤や新規 3MST 阻害剤との相互作用残基は保存されている。ヒト 3MST とマウス 3MST は構造が類似しており (A 鎖同士の RMSD は SSM 方式で 0.76 Å (PDB ID 3OLH)、0.72 Å (PDB ID 4JGT)、LSQ 方式で 1.07 Å (PDB ID 3OLH)、1.15 Å (PDB ID 4JGT)、以下鎖について言及がない限り構造の比較はどの結晶についても A 鎖の比較とする)、C $\alpha$  炭素の位置のずれが大きい残基は表面のループが殆どであった(図 3-6、3-7)。また、3MP 類似阻害剤や新規 3MST 阻害剤との相互作用残基の位置も似通っていた(図 3-5 (A))。ただし、Arg197 側鎖がマウス 3MST では Pro71 主鎖 O 原子と水素結合を形成していたのに対し、ヒト 3MST では活性部位の内側を向いて Ser250 側鎖と水素結合(3OLH では Arg188 側鎖とも水素結合)していたという点が大きく異なった。また、Pro39、Asp73、His74、Glu195、Pro196、Val277 の主鎖または側鎖の位置がややずれていた。

### 3.1.3.2 ウシ RDS との比較

マウス 3MST 阻害剤非結合型と、同じローダネーゼ/CDC25 ホスファターゼスーパーファミリーに属する蛋白質であるウシ RDS との比較をする。ClustalW2 により算出したマウス 3MST とウシ RDS のアミノ酸配列の相同性は 58% (297 アミノ酸のうち 172 アミノ酸)である。PDB に登録されているウシ RDS の構造は 7 種類存在するが、立体構造に殆ど違いがないので最も分解能の高いデータ(PDB ID 1RHS)と比較する。(図 3-5 (B))

ウシ RDS とマウス 3MST は構造がよく重なり(RMSD 0.91 Å (SSM)、1.27 Å (LSQ))、C $\alpha$  炭素の位置のずれが大きい残基は表面のループが殆どであった(図 3-8)。活性残基周辺の側鎖も残基が異なっていた(図 3-5 (A))。マウス 3MST の Leu38、Asp63、Asp73、His74、Tyr108、

Arg197、Gly249、Ser250、Val277 に対応する残基はウシ RDS ではそれぞれ Ser38、Glu62、Glu72、Val73、Phe107、Ala197、Arg249、Lys250、Phe277 であった。また、対応する残基が共通なマウス 3MST の Trp36、Pro39、Pro196 はウシ RDS の構造中の相対的な位置はややずれていた。また、活性部位を構成する残基に Tyr108(マウス 3MST では Ser109 に相当)が、活性部位付近に Asp196 が位置していた。

### 3.1.3.3 森林型熱帯リーシュマニア 3MST との比較

PDB には森林型熱帯リーシュマニア 3MST の構造が登録されている(PDB ID 1OKG)。ClustalW2 により算出したマウス 3MST と森林型熱帯リーシュマニア 3MST のアミノ酸配列の相同性は 25% (280 アミノ酸のうち 71 アミノ酸)である。マウス 3MST と、森林型熱帯リーシュマニア 3MST の C 末端ドメインを除く部分の立体構造は類似性が見られた(RMSD 1.87 Å (SSM)) (図 3-9 (A))。活性部位の保存配列[CGSGVT]の位置は殆ど重なり、活性部位の立体構造にも類似性が見られたものの、詳細は異なった(図 3-9 (B))。マウス 3MST の 3MP 類似阻害剤との相互作用残基のうち、Trp36、Pro39、Tyr108、Pro196 に対応する残基は森林型熱帯リーシュマニア 3MST では Tyr35、Lys38、Met108、Ala195 であり、他の残基は保存されているものの、残基の位置にややずれが見られた。また、後述する新規 MST 阻害剤との相互作用残基のうち、Asp73、Glu195、Val277 はそれぞれ Arg74、Asp196、Ser282 に置き換わっており、Arg197 に相当する残基の位置には残基は存在しない。Arg74 側鎖はヒト 3MST での Arg197 側鎖に相当し、活性部位の方向を向いていたように活性部位方向を向いていた。

### 3.1.3.4 大腸菌 3MST との比較

PDB には大腸菌の 3MST である SseA の構造も登録されている(PDB ID 1URH)。ClustalW2 により算出されたマウス 3MST と SseA のアミノ酸配列の相同性は 37% (297 アミノ酸のうち 110 アミノ酸)である。両者の立体構造には類似性が見られた(RMSD 1.47 Å (SSM))ものの、様々な違いが見られた(図 3-11)。SseA の活性部位の構造はマウス 3MST と大きく異なっていた。マウス 3MST の 3MP 類似阻害剤との相互作用残基のうち、Trp36、Leu38、Tyr108 に対応する残基は SseA では Met28、Ser30、Phe99 であり、Pro196 に対応する残基は存在せず、他の残基は保存されているものの、活性部位の保存配列[CGSGVT]の構造が大きく異なり、S-スルフィドリル化した触媒残基の Cys238 を保存配列のループ部分が蓋をし、活性部位が崩れた構造をしていた。また、新規 MST 阻害剤との相互作用残基のうち、マウス 3MST の Asp63、Asp73、Glu195 はそれぞれ Glu56、Pro66、Asp185、に置き換わっており、Arg197、Val277 に相当する残基の位置には残基は存在しなかった。

### 3.1.4 ローダネーゼドメインの重ね合わせ

ここでは、マウス 3MST のドメインを、文献[3]の RDS のドメインに対応する領域(ローダネーゼドメイン 1-152 残基目まで、ローダネーゼドメイン 2-153 残基目から)とする。

#### 3.1.4.1 マウス 3MST のローダネーゼドメイン同士の比較

マウス 3MST 阻害剤非結合型のローダネーゼドメイン 1 とローダネーゼドメイン 2 は似通っており(RMSD 1.61 Å (SSM))ヘリックスやストランドの位置はほぼ共通していたものの、いくつか大きく異なる点が存在した(図 3-11 (A), (B))。ドメインの N 末端は位置が大きくずれ、 $\alpha 1$ - $\beta 2$  間のループは  $\alpha 6$ - $\beta 7$  間のループより大きかった。CH2A モチーフではローダネーゼドメ

イン1のループは $\alpha 2$ の手前にあるのに対し、ローダネーゼドメイン2のループは $\alpha 7$ より後側に存在した。 $\beta 3$ - $\alpha 3$ 間のループは $\eta 3$ - $\alpha 8$ 間のループより大きく、活性部位モチーフのループはローダネーゼドメイン1の方が大きかった。CH2BモチーフはC末端側が $\alpha 5$ や $\eta 4$ から離れるほど位置がずれていた。

活性部位モチーフはローダネーゼドメイン1のCys248に相当する残基がローダネーゼドメイン2ではAsp101になっていた。また、Ser275に相当する残基はGly131であった。(図3-11(F))金属が結合していた位置については、互いのドメインの対応する位置では共通に金属が結合できるようなアミノ酸残基や構造上の保存性は見出されなかった。金属結合サイト2のローダネーゼドメイン1の対応する位置には残基がなかった。

### 3.1.4.2 他の蛋白質のローダネーゼドメインとの比較

PDBに登録されている他の蛋白質のローダネーゼドメインをPDB IDで区別する。ヒトCDC25A (PDB ID 1C25)、出芽酵母のYgr203w (PDB ID 3F4A)、森林型熱帯リーシュマニアのAcr2 (PDB ID 2J6P)、ヒトDUSP10のローダネーゼドメイン(PDB ID 2OUC)(図7-5参照)をマウス3MST阻害剤非結合型のローダネーゼドメインと比較する。1C25や3F4A、2J6Pは脱リン酸化酵素の活性があるか、配列相同性からあると考えられており、2OUCは活性がない。これらの構造をマウス3MST(ローダネーゼドメイン1に対するRMSDはそれぞれ1.75 Å、2.55 Å、1.90 Å、1.96 Å(SSM))と比較すると、ヘリックスの位置が大体同じでストランドがドメインの中央付近に集中しているという共通点があり、異なる点はマウス3MSTでのドメイン間の差がある箇所に集中していた(図3-11(A)-(C))。活性部位モチーフの長さは酵素活性を持つドメインで短く、活性を持たないドメインで長かった(図3-11(D))。

最も大きな違いは  $\alpha 3$  から活性部位モチーフの前までの領域で、大きなヘリックスを持つものや複数のヘリックスを持つものなどドメインの長さや配置がまちまちであり、少なくとも  $\alpha 3$  の位置のヘリックスは向きと大きさが異なっていた(図 3-11 (E))。

活性部位モチーフは活性を持つものは Cys248 とほぼ同じ位置にシステイン残基を持ち、活性のないものはその位置に Asp 残基を持っていた。(図 3-11 (G), (H))

また、活性部位の近くの Ser275 に相当する残基は、他はすべて Gly だったが、1C25、3F4A、2J6P では Gly251 に相当する残基が Ser となっていた。2OUC では Leu107 に相当する残基が Thr だった。(図 3-11 (G), (H))

## 3.2 考察

### 3.2.1 マウス 3MST のアミノ酸配列の多型について

マウス 3MST のアミノ酸配列は、本研究で使用したもの(UniProtKB 受入番号 Q505N7)以外に 2 種類(UniProtKB 受入番号 Q3UW66、Q99J99)登録されている(図 7-2)。本研究で使用したものと比べ、それぞれ Gly102 が Asp に、Leu107 が Pro に置換されており、どちらも活性部位を形成する残基の近傍である。Gly102 はラットでは保存されているがヒトやウシなどでは Ala であり(図 7-3 (A))、他の生物種で Asp の種も存在する(図 7-4)ことから保存性のやや低い残基と考えられる。ヒト 3MST の全体構造や活性部位の構造がマウス 3MST と大きく変わらないことから、Gly102 の変異は立体構造や酵素活性にほとんど影響を与えないと考えられる。

Leu107 はヒト、ラット、ウシなどで高度に保存されている(図 7-3 (A))。立体構造や活性部位への影響については不明であるが、存在位置が蛋白質内部であり、Leu が置換している種では次の Tyr108 に相当する残基が別のアミノ酸である傾向にあり(リーシュマニアやトリパノソー



マでは LY→AM の傾向にある(図 7-4))、活性部位の立体構造や酵素活性に何らかの影響を与えている可能性はある。従って、どちらの多型でも阻害剤は同様の形式で結合する可能性が高いものの、特に Leu107 が Pro となっている多型では活性部位の立体構造や阻害剤の結合に影響を与える可能性は否定できない。

### 3.2.2 金属の結合について

マウス 3MST では金属が結合する可能性が高い位置が 2 箇所見出された(図 3-3)。これまで 3MST は銅イオンや亜鉛イオン[75], [76]、RDS は亜鉛イオンを含んでいる[77]ことが報告されているので、金属結合サイト 1 や金属結合サイト 2 にこれらの金属イオンが結合する可能性が高いと考えられる。この中で、結晶構造で金属の結合が最も多く観察されたのは金属結合サイト 1 である。この位置にはウシや出芽酵母の RDS で水分子が置かれ、ウシ RDS では Glu72、Val73、Lys250、Asp273 の主鎖 O 原子と、Met74 側鎖 Sδ 原子、Asp273 側鎖 Oδ1 原子と水素結合を形成しており、カチオンの結合部位である可能性が指摘されている[27]。また、大腸菌の RDS である YnjE では、対応する位置付近にナトリウムイオン(PDB ID 3IPO, 3IPP)または水分子(PDB ID 2WLR, 2WLX)が当てはめられている。このイオンまたは水分子には、Trp203、Thr387、Asp410 の主鎖 O 原子と、Asn204 側鎖 Oδ1 原子、Asp410 側鎖 Oδ1 原子、水 1 分子が配位または水素結合している。従って、金属結合サイト 1 は 3MST や RDS で共通する金属結合サイトである可能性があり、これまで報告された銅や亜鉛のイオンが結合する可能性が最も高いと考えられる。この位置は蛋白質表面付近にあり周囲の残基のコンフォメーションによっては溶媒側に露出するため、金属イオンは出入りしうる。銅について言及された論文で含有率が 100%に満たないのはそのためかもしれない。

### 3.2.3 マウス 3MST の活性部位付近の構造がヒト 3MST とやや異なった理由

マウス 3MST の立体構造はヒト 3MST と似通っているのに活性部位付近では Arg197 をはじめとする残基の位置が異なっている。ヒト 3MST では、活性部位の周辺は結晶内での他の 3MST 分子とのパッキングに関与している(3OLH では、結晶学的に対称の位置にある分子の Asp198 側鎖が Asp73 主鎖と水素結合し、4JGT では、C 鎖の Asp198 側鎖が A 鎖の Asp73 主鎖や Arg197 側鎖と水素結合している)が、マウス 3MST ではこの位置の近くには隣の分子が接触しておらず、パッキングに関与していない(図 7-6)。従って、マウス 3MST では Arg197 側鎖が Pro71 主鎖 O 原子と水素結合を形成していたのに対し、ヒト 3MST では他の分子の接触により Arg197 が Pro71 主鎖との水素結合を形成せずに活性部位の内側を向いて Ser250 側鎖や Arg188 側鎖と水素結合するため、活性部位の構造が異なるのであろう。

### 3.2.4 3MST と哺乳類の RDS について

マウス 3MST とヒト 3MST、ウシ RDS の全体構造は似通っており、アミノ酸配列も哺乳類の間でよく保存され(図 7-1)、Ca 炭素の位置のずれが大きい残基は表面のループ部分に集中していた(図 3-6、3-7、3-8)ことから、立体構造は哺乳類の 3MST と RDS に普遍的であると推測できる。

寄生虫の 3MST ではマウス 3MST との比較で述べた残基はリーシュマニアやトリパノソーマでよく保存されており(図 7-4)、立体構造や活性部位の構造もマウス 3MST より森林型熱帯リーシュマニア 3MST に類似していると思われる。膾トリコモナス 3MST では、森林型熱帯リーシュマニア 3MST と残基が保存されているものの複数の残基が異なっており(アミノ酸の配列アライメントでは Asp61→His54、Met108→Asn103、Tyr193→Leu195、Glu196→Arg198、

Val257→Ile248)、脛トリコモナス 3MST の形状はマウス 3MST より森林型熱帯リーシュマニア 3MST に類似しているもののやや異なると思われる。(図 7-4)

### 3.2.5 SseA 活性部位の構造が他の 3MST と大きく異なる理由について

#### 3.2.5.1 セリンの役割

大腸菌の 3MST である SseA の活性部位はマウス 3MST と比較し、保存配列のループの構造が大きく異なり、S-スルフヒドリル化された触媒残基の Cys238 をループ部分が蓋をし、活性部位が崩れた構造をしている。この原因は、マウス 3MST の Ser275 に相当する残基が Ala265 であることによると思われる。Ser275 に相当する残基は殆どの種の 3MST で保存されており、大腸菌だけが Ala である(図 1-2)。マウス 3MST では、この Ser の側鎖 O $\gamma$  原子が触媒残基である Cys248 主鎖 N 原子などと水素結合している。いくつかのマウスや他の種の 3MST のラマチャンドランプロットを見ると、Cys248 や Ser275 に相当する残基の二面角は許容範囲と範囲外の境界付近にある(図 7-7)ため、活性部位の立体構造はやや不安定であり、Ser250 に相当する残基は Cys248 に相当する残基の位置の固定に重要な役割を果たしていると思われる。実際、SseA の結晶構造では Ala265 や前後の残基がマウス 3MST の Ser275 に相当する位置から大きく離れた位置に存在する。SseA の論文では、SseA の結晶化にはチオ硫酸ナトリウムが必要であることが述べられている[78]。また、結晶の非対称単位の 2 つの鎖の活性部位の構造がやや異なることも述べられている[23]。従って SseA は Ala265 が Ser でないことにより保存配列のループのコンフォメーションが安定せず活性部位の立体構造が不安定であり、触媒残基の Cys238 が S-スルフヒドリル化することによって保存配列のループが S-スルフヒドリル化された Cys238 と相互作用して安定化すると考えられる。

また、結晶化前の SseA は 3MP からシアン化物イオンへの硫黄転移反応を触媒した[78]ことから、SseA の活性部位は他の 3MST と同様のコンフォメーションをとり、酵素反応が進行すると考えられる。SseA の論文では結晶構造をもとに触媒機構を推察しており、Arg103 Nη1 原子および Nη2 原子に 3MP のカルボキシル基が水素結合し、His67 Nδ1 原子と 3MP のカルボキシル基が水素結合するところから酵素反応が進行するモデルを述べている(図 7-9)[23]。しかし、他の 3MST では活性部位表面にない Arg (マウス 3MST では Arg 112 が対応)を基に酵素反応モデルを組み立てたモデルであり、このモデルは誤りの可能性が高いと考えられる。恐らく酵素反応時には保存配列が他の 3MST と同様の位置にあり、他の 3MST の活性残基に相当する活性残基(Arg179 など)により酵素反応を進行させるものと思われる。

### 3.2.5.2 金属イオンの結合との関係

マウス 3MST には活性部位近くに金属結合サイト 1 があった。SseA の A 鎖での対応する位置の近傍では、マウス 3MST での相互作用残基は Asp73 が Pro66 となっている以外は保存されている(図 1-2)にも拘らず、活性部位側に位置するはずの Ser240 が離れた位置にあり、形状が崩れていた(B 鎖ではさらに形状が崩れていた)。また、マウス 3MST-AKG 阻害剤複合体で AKG の結合が観察されなかった分子では活性部位の保存配列のループのマルチコンフォマーによると思われる電子密度が見られ、金属の結合がはっきり確認できなかった(4.1.1.2 参照)ことから、金属結合サイト 1 への金属イオンの結合が活性部位の構造を保つ効果を持つことが示唆される。大腸菌の RDS である YnjE では対応する位置付近にナトリウムイオンや水分子が当てはめられている(3.2.2 参照)。YnjE ではマウス 3MST の Ser275 に相当する残基は Gly412 であり、Ser275 側鎖 Oγ 原子の位置の近傍に水分子が存在するものの、立体構造を安定に保つ力は Ser のときの方が強いと考えられる。従って、Ser275 または Gly251 に相当する残

基が Ser でない場合は、金属結合サイト 1 に金属イオンが結合することで活性部位の構造を保っていると考えられる。従って、金属結合サイト 1 に結合している金属イオンは 3MST や RDS の活性部位周辺の立体構造を安定に保つのに寄与していると考えられる。この位置にはウシや出芽酵母の RDS で水分子が置かれ、周囲の残基と金属の配位形式に類似した水素結合を形成している。これまで 3MST は銅イオンや亜鉛イオン、RDS は亜鉛イオンを含むことが報告されている[75]-[77]ので、これらの金属イオンが金属結合サイト 1 に結合する可能性がある(3.2.2 参照)。

一方、この位置の近傍にはヒト 3MST (PDB ID 3OLH, 4JGT)では水分子が置かれているものの、マウスほど強くは水素結合しておらず、マウス 3MST で配位していた原子(特に Asp73 主鎖 O 原子)は少し離れている。また、森林型熱帯リーシュマニア 3MST (PDB ID 1OKG)は Met74 に相当する配位子がなく、金属の代わりに水も当てはめられていない。Ser275 に対応する Ser 残基を持つ RDS ではこの位置で水分子と強く水素結合していない構造が複数登録されている。従って、Ser275 に対応する Ser 残基が存在する場合、金属結合サイト 1 への金属イオンの結合は、活性部位の構造を保つのに必須ではないと考えられる。

### 3.2.6 3MST の Arg197 の酵素反応への寄与について

ヒト 3MST や森林型熱帯リーシュマニア 3MST では結晶構造中でそれぞれ Arg197、Arg74 が活性部位方向を向いている。これまでラット 3MST の変異実験やヒト 3MST の基質との複合体の結晶構造から Arg197 が酵素反応に関与する触媒残基であるモデル(図 7-10 など)が提唱されてきた[7], [18]。ラット 3MST やマウス 3MST では Arg197 の変異が酵素反応に与える影響は大きいものの Arg188 の変異ほどではない[17], [18]ことが報告されている。

マウス 3MST の Arg197 側鎖は結晶構造中では Pro71 主鎖と水素結合を形成し、活性部位とは離れた位置に存在する。マウス 3MST の Arg197 に対応する残基である SseA の Arg188 付近の残基は結晶構造で位置が決められていない残基である。前後の残基である Glu186 や Leu191 の位置はマウス 3MST の対応する残基である Glu195 や Ile200 とは大きく離れた位置に存在するので、Arg188 は結晶中では活性部位の周辺には存在しないと考えられる。溶液中でも Arg188 が活性部位と相互作用しない可能性もある。マウス 3MST の Arg197 側鎖も結晶構造では活性部位に近くない(図 3-5)ので、ヒト 3MST より酵素反応に関与しにくいかもしれない。

### 3.2.7 ローダネーゼドメインを持つ蛋白質について

他の蛋白質のローダネーゼドメインを重ね合わせると、活性を持つ蛋白質は活性部位モチーフが短く Cys248 の位置の残基が Cys であり Ser275 若しくは Gly251 の位置の残基が Ser となり周囲の残基と水素結合(3.5 Å 以内)していた (図 3-11 (D)、(G))。また、触媒残基の Cys の二面角はしばしば許容範囲と範囲外の境界付近( $\phi -160^\circ$ ,  $\psi -150^\circ$  周辺)だった(図 7-7)。また、活性のない蛋白質やドメインは活性部位モチーフが長く Cys248 の位置の残基が Asp であり Ser275 若しくは Gly251 の位置に Ser はなかった(図 3-11 (D)、(H))。また、触媒残基の位置に当たる Asp の二面角は許容範囲内だった。従って、ローダネーゼドメインを持つ蛋白質は触媒残基の Cys の二面角が許容範囲と範囲外の境界付近にあることが酵素活性に好影響を与え、近くに存在する Ser が触媒残基の Cys の位置を固定していると考えられる。また、ローダネーゼドメインのヘリックスやストランドの位置は多くが共通していたことから、ストランドを中央にヘリックスが周囲に存在する構造がドメインの安定性を高めていると考えられる。

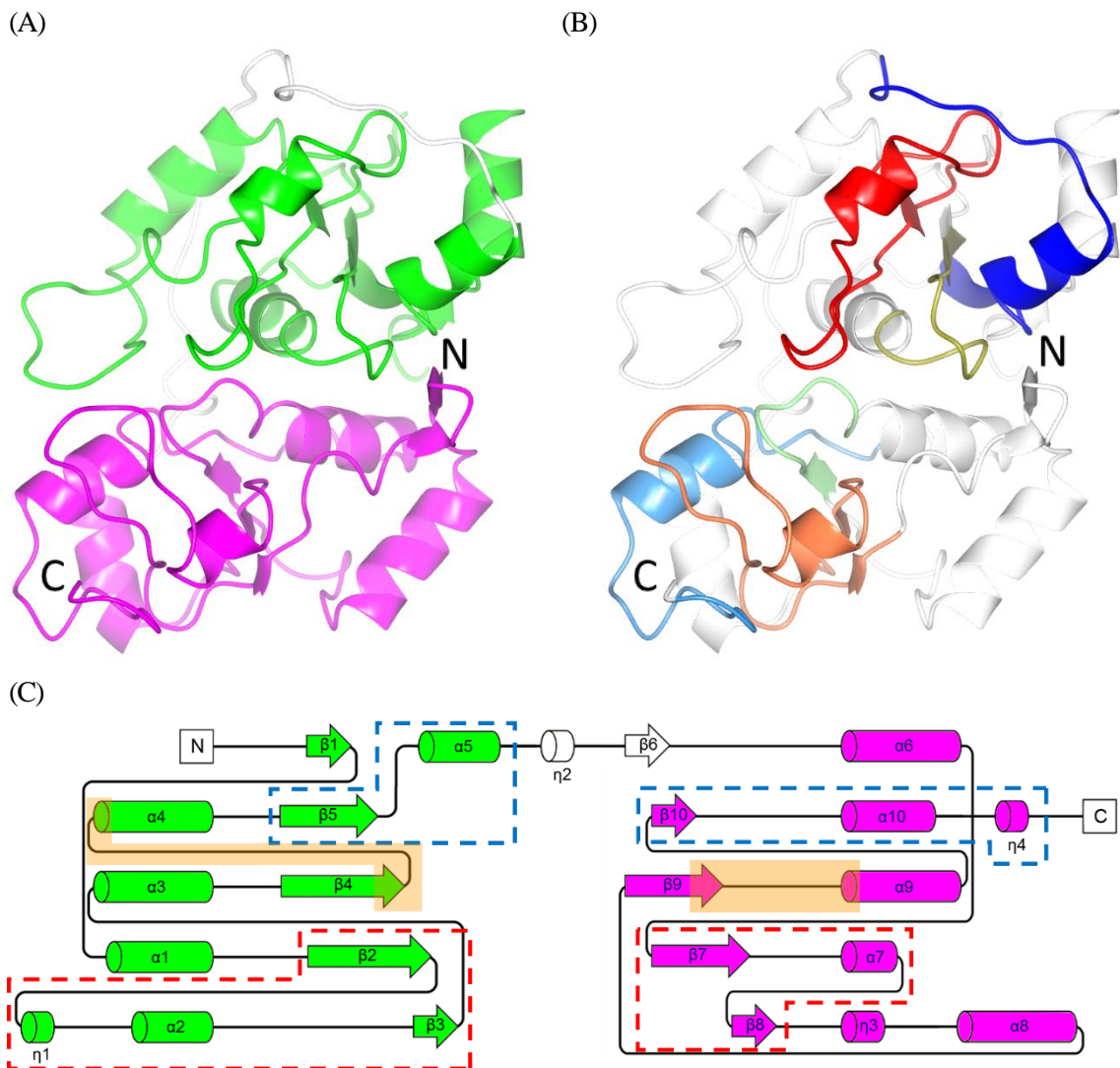
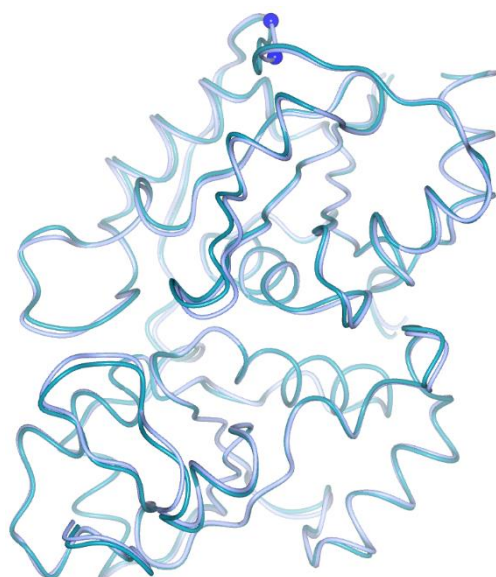


図 3-1 マウス 3MST の全体構造

- (A) マウス 3MST 阻害剤非結合型のドメインのリボン表示(ローダネーゼドメイン 1 (ライム)、ローダネーゼドメイン 2 (マゼンタ))
- (B) マウス 3MST 阻害剤非結合型の CH2A、CH2B、活性部位のモチーフのリボン図表示(CH2A モチーフ(赤)(ローダネーゼドメイン 1)、(オレンジ)(ローダネーゼドメイン 2)、CH2B モチーフ(青)(ローダネーゼドメイン 1)、(薄青)(ローダネーゼドメイン 2)。活性部位モチーフ(金)(ローダネーゼドメイン 1)、(薄緑)(ローダネーゼドメイン 2)、白(該当なし))
- (C) マウス 3MST 阻害剤非結合型のトポロジー図( $\beta$  ストランド(矢印)、 $\alpha$  ヘリックスまたは  $3_{10}$  ヘリックス(円柱)。ローダネーゼドメイン 1 ライム、ローダネーゼドメイン 2 マゼンタ。CH2A モチーフを赤の点線、CH2B モチーフを青の点線、活性部位モチーフをオレンジで囲う。 $\eta$  は  $3_{10}$  ヘリックスを表す。)

全てモデルに阻害剤非結合型 A 鎖を使用。  
二次構造はプログラム DSSP により定義した。

(A)



(B)

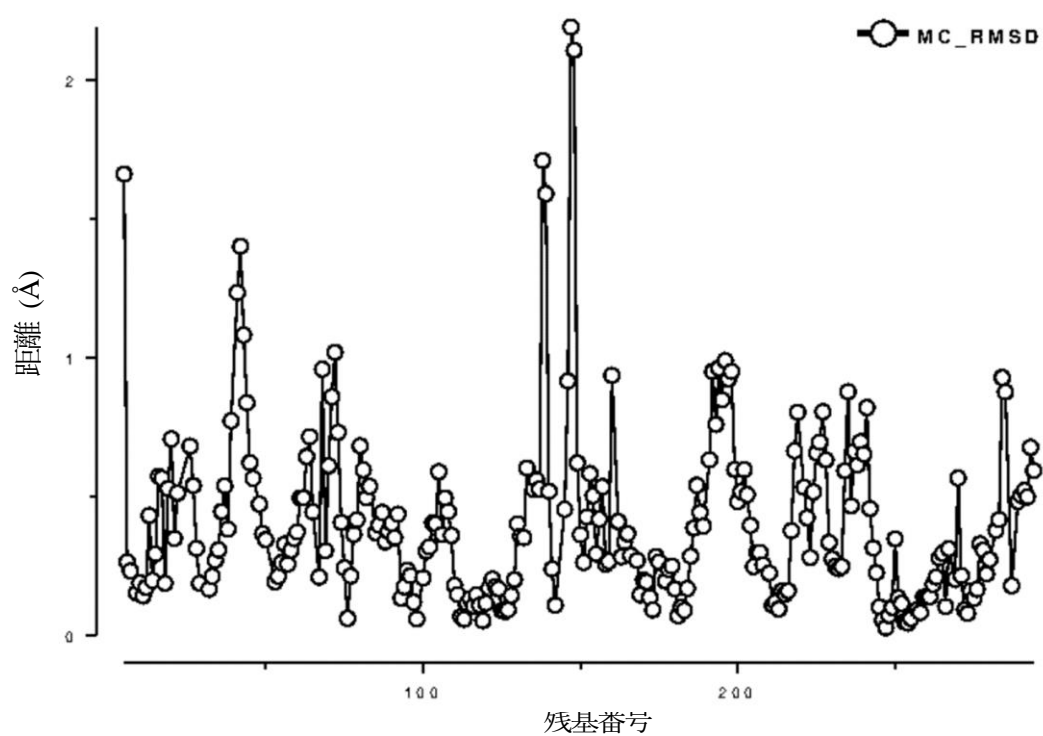


図 3-2 阻害剤非結合型の A 鎖と B 鎖の比較(LSQ 方式)

(A) A 鎖と B 鎖の重ね合わせ(A 鎖(藤色)、B 鎖(暗シアン)、A 鎖と B 鎖の C $\alpha$  の位置のずれが 2 Å 以上の残基(青球))(ワーム表示)

(B) 重ね合わせた際の対応する残基の C $\alpha$  炭素の距離 (Å)



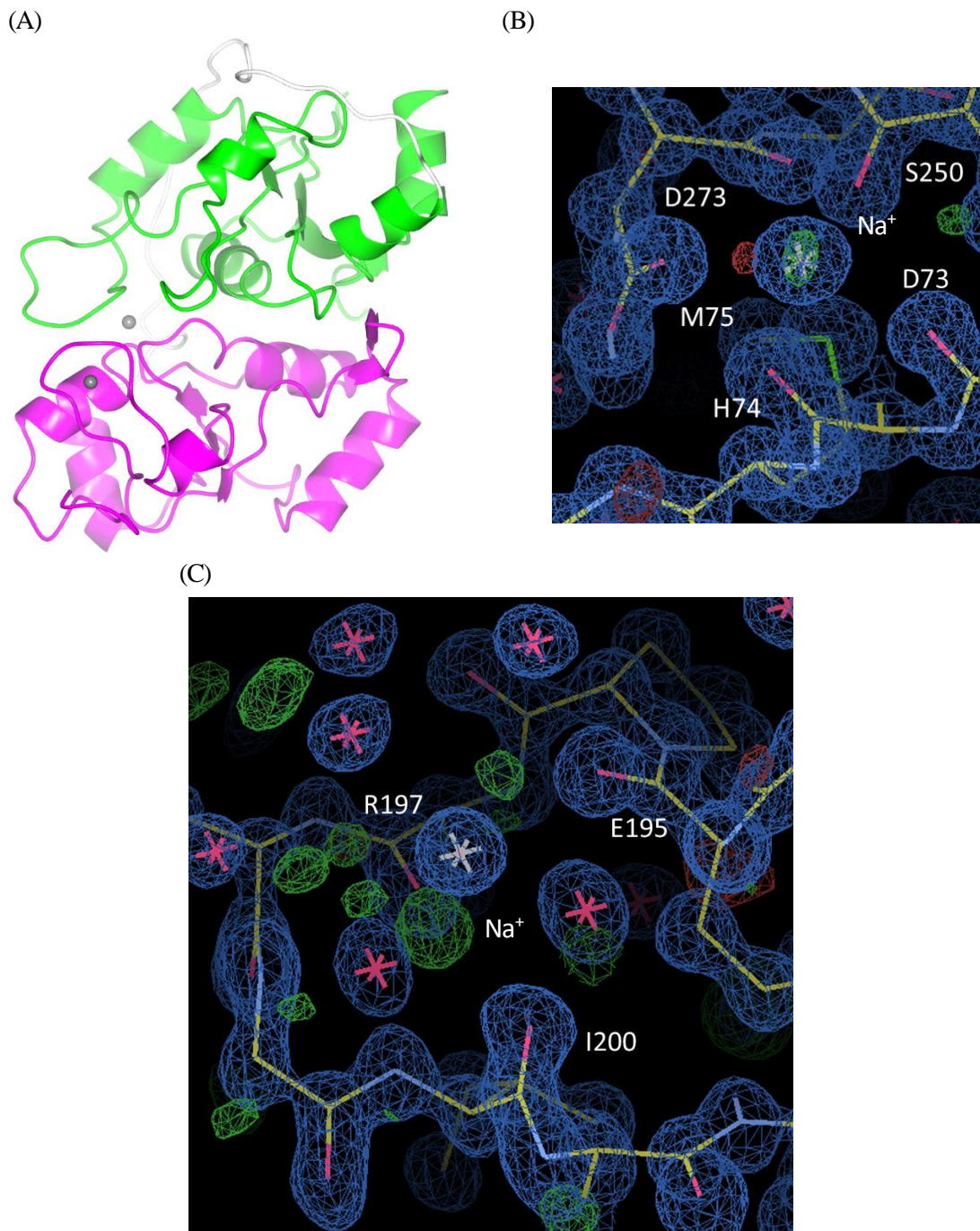


図 3-3 蛋白質に結合する金属原子

(A) 3MST に結合する金属の位置(灰色球)

(B) 金属結合サイトのナトリウム原子(A 上側)(ボンド表示)

(C) 金属結合部位のナトリウム原子(A 下側)(ボンド表示)

アミノ酸残基(黄)、 $2F_o - F_c$  1.5  $\sigma$ (青網)、 $F_o - F_c$  3.0  $\sigma$ (+) (緑網)、 $F_o - F_c$  3.0  $\sigma$ (-) (赤網)、窒素原子(青)、酸素原子(ピンク)、硫黄原子(黄緑)、ナトリウムイオン(灰色、組木型)、水分子(ピンク、組木型)を表示。

すべて阻害剤非結合型 A 鎖。

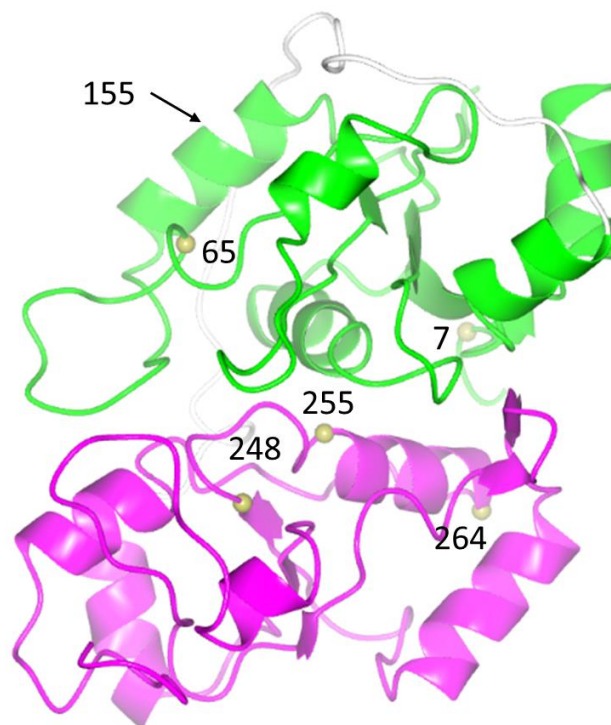


図 3-4 哺乳類の 3MST での Cys の存在する場所

マウス 3MST 阻害剤非結合型の対応する残基の位置の C $\alpha$  炭素を金色の球で表示(7 ヒトのみ、155 ラットのみ)。蛋白質はリボン表示。

ローダネーゼドメイン 1 をライム、ローダネーゼドメイン 2 をマゼンタで表示。

残基番号 155 の残基はヘリックスに隠れた位置にある。

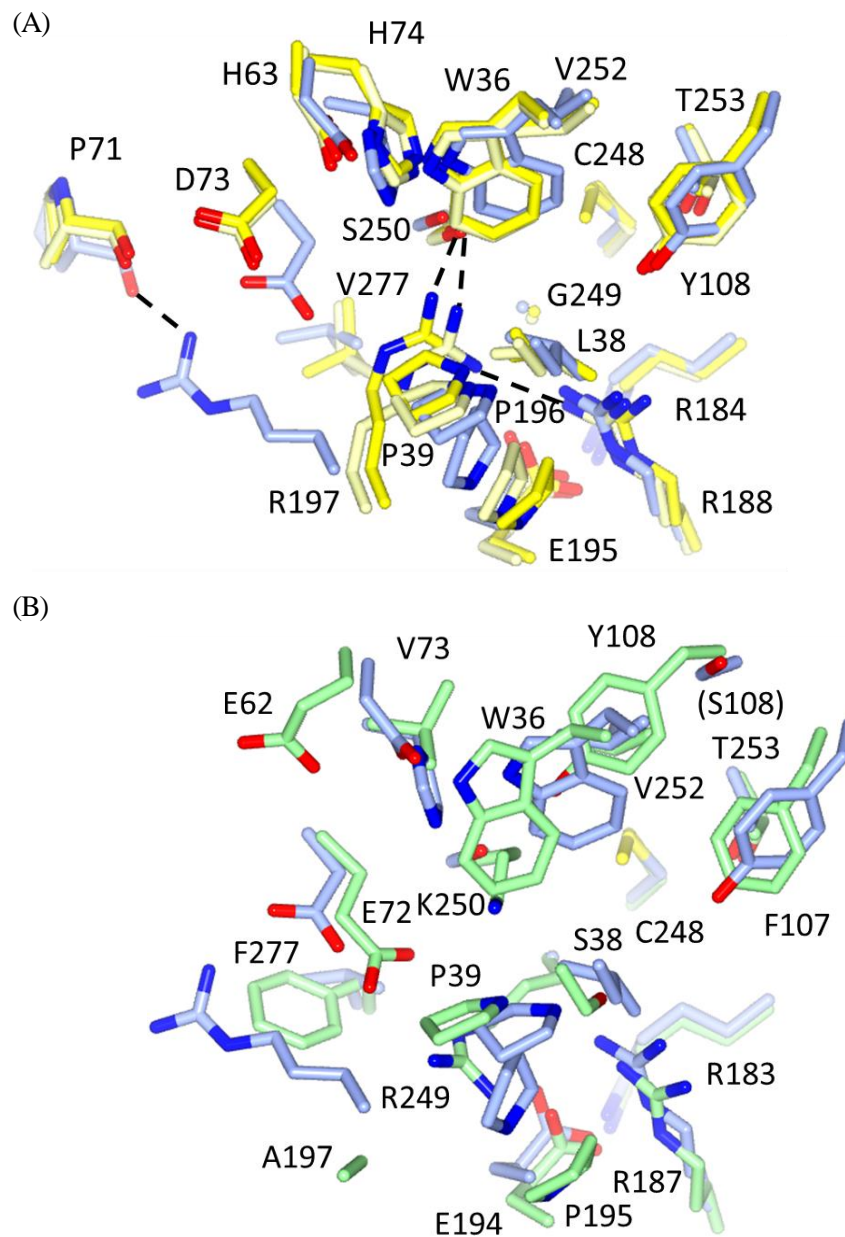


図 3-5 マウス 3MST 阻害剤非結合型とヒト 3MST (PDB ID 3OLH、4JGT)と、ウシ RDS (PDB ID 1RHS)の活性部位付近の残基の比較(SSM 方式) (円筒表示)

(A) マウス 3MST とヒト 3MST の比較

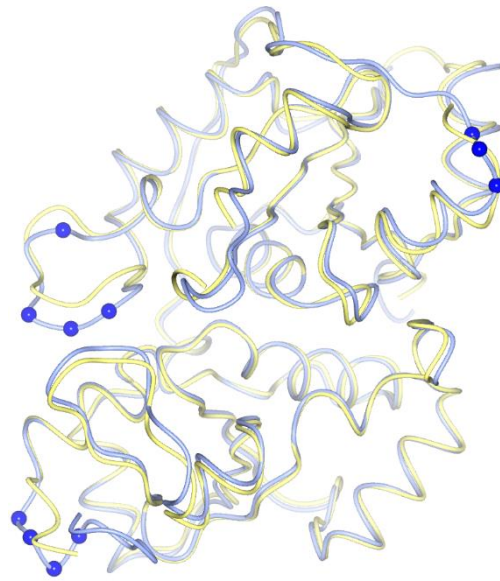
(B) マウス 3MST とウシ RDS の比較

SSM 方式での重ね合わせ、C $\alpha$  炭素と側鎖を中心に表示。

マウス(藤色)、ヒト 3MST (PDB ID 3OLH) (薄黄)、ヒト 3MST (PDB ID 4JGT) (黄)、ウシ RDS (黄緑)、Arg197 側鎖が形成する水素結合(点線)を表示。残基は酸素原子(赤)、窒素原子(青)、硫黄原子(黄)を色分けして表示。残基番号は(A)共通の配列 (B)ウシ RDS(括弧内はマウス 3MST)を表記。

ヒト 3MST (PDB ID 4JGT)と、ウシ RDS の Cys248 は S-スルフヒドリル化されている。

(A)



(B)

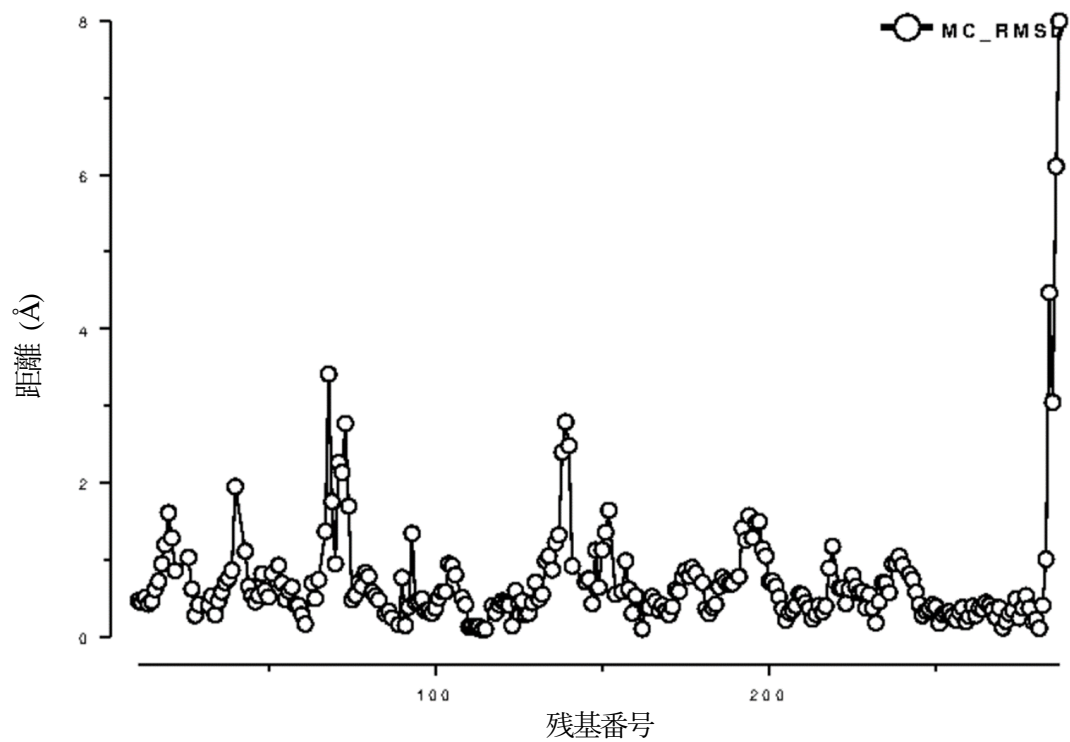
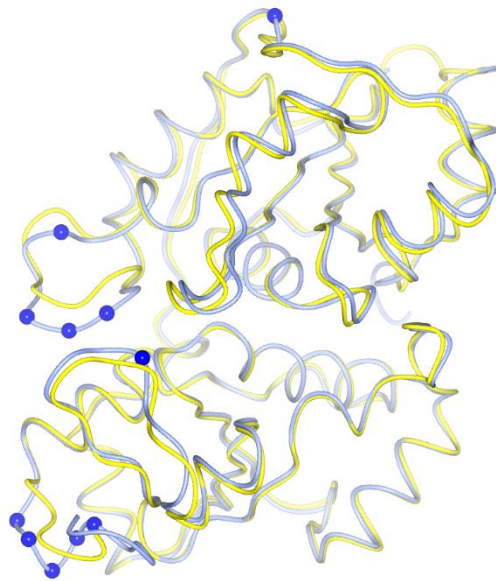


図 3-6 マウス 3MST 阻害剤非結合型とヒト 3MST (PDB ID 3OLH)の比較(LSQ 方式)

- (A) 全体構造の重ね合わせ(マウス(藤色)、ヒト(薄黄)、C $\alpha$  の位置のずれが2Å 以上の残基(青球))  
(ワーム表示)
- (B) 重ね合わせた際の対応する残基の C $\alpha$  炭素の距離 (Å)

(A)



(B)

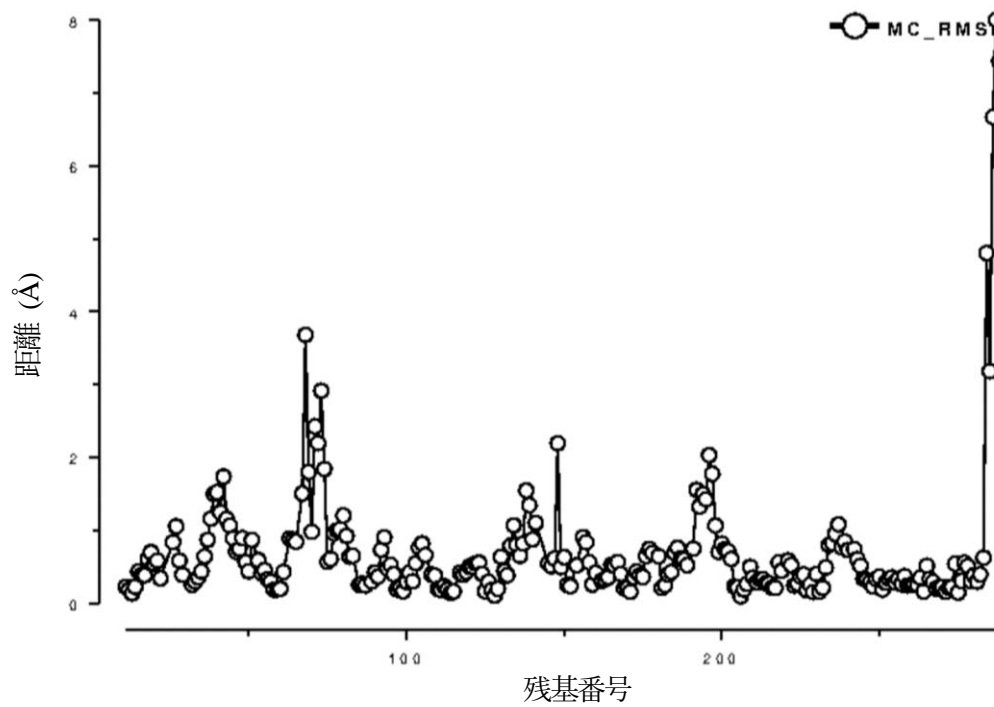
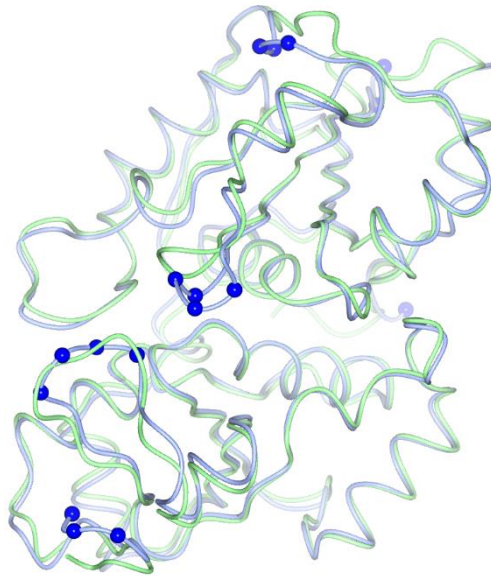


図 3-7 マウス 3MST 阻害剤非結合型とヒト 3MST (PDB ID 4JGT)の比較(LSQ 方式)

- (A) 全体構造の重ね合わせ(マウス(藤色)、ヒト(黄)、C $\alpha$  の位置のずれが 2 Å 以上の残基(青球)) (ワーム表示)
- (B) 重ね合わせた際の対応する残基の C $\alpha$  炭素の距離 (Å)

(A)



(B)

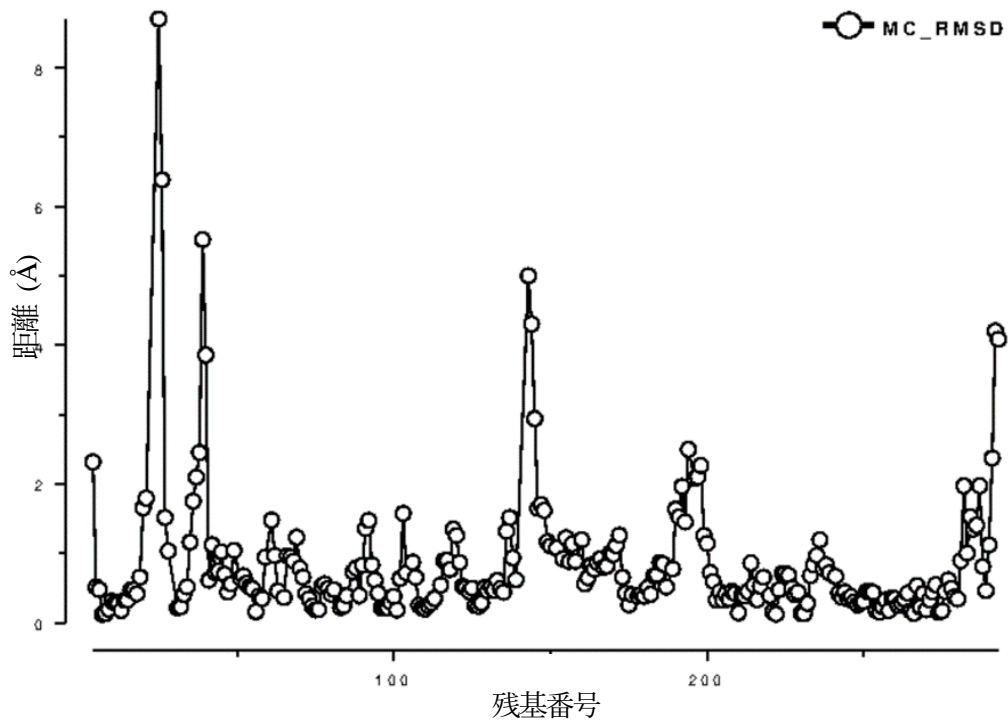


図 3-8 マウス 3MST 阻害剤非結合型とウシ RDS (PDB ID 1RHS)の比較(LSQ 方式)

- (A) 全体構造の重ね合わせ(マウス 3MST(藤色)、ウシ RDS(黄緑)、 $C\alpha$  の位置のずれが  $2\text{\AA}$  以上の残基(青球))(ワーム表示)
- (B) 重ね合わせた際の対応する残基の  $C\alpha$  炭素の距離 ( $\text{\AA}$ )

(A)



(B)

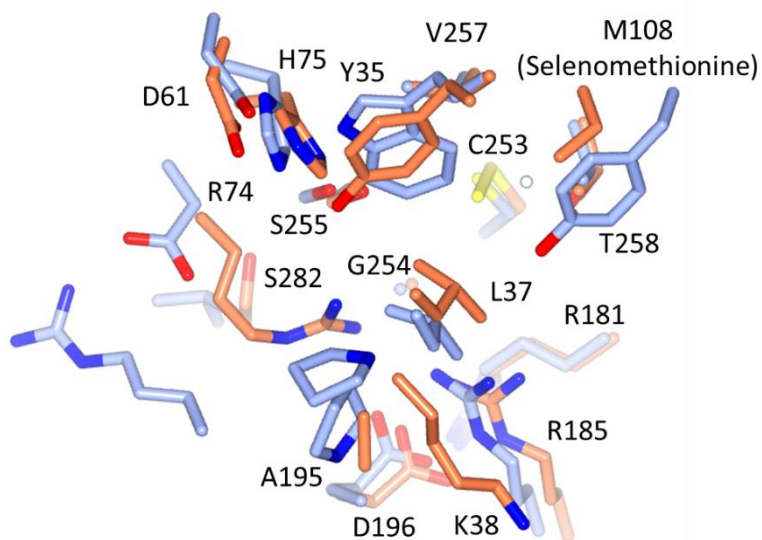


図 3-9 マウス 3MST 阻害剤非結合型と森林型熱帯リーシュマニア 3MST (PDB ID 1OKG)の比較(SSM 方式)

(A) 全体構造の重ね合わせ(ワーム表示)

(B) 活性部位((A)の円内)付近の残基(円筒表示)

マウス(藤色)、森林型熱帯リーシュマニア(オレンジ)を表示。

残基は  $\text{C}\alpha$  炭素と側鎖を中心に表示。森林型熱帯リーシュマニア 3MST の残基番号のみ表示。

森林型熱帯リーシュマニア Cys253 は S-スルフヒドリル化されている。

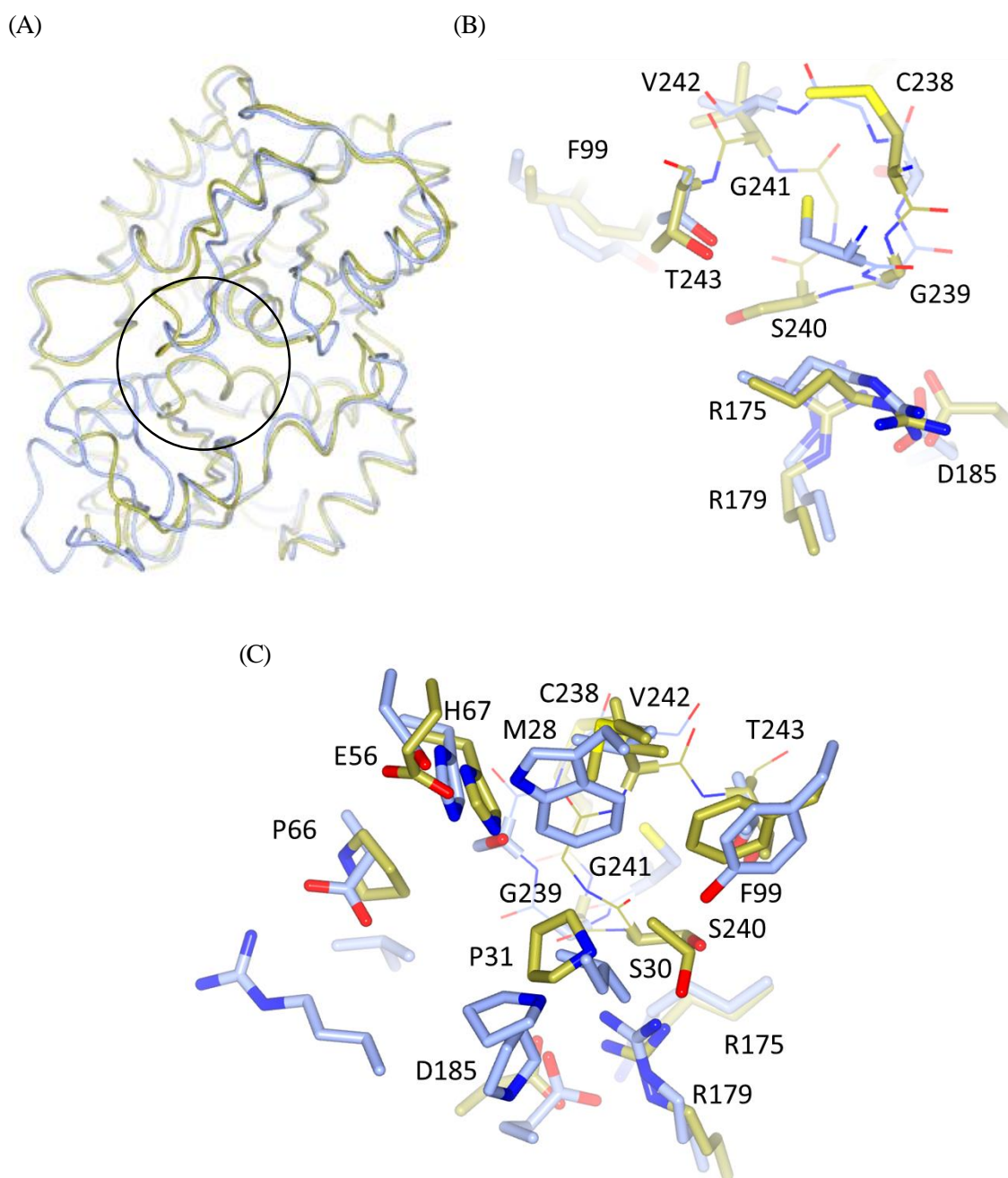


図 3-10 マウス 3MST 阻害剤非結合型と SseA (PDB ID 1URH)の比較(SSM 方式)

(A) 全体構造の重ね合わせ(ワーム表示)

(B) 活性部位の触媒残基側からの表示(円筒表示)

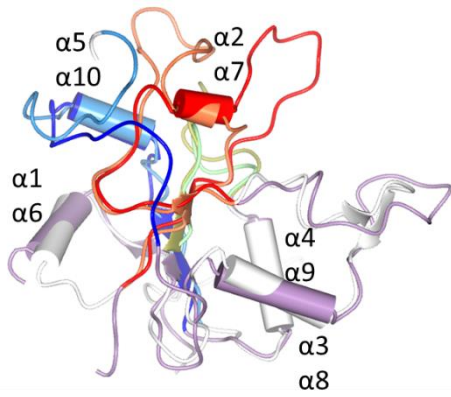
(C) 活性部位((A)の円内)付近の残基(円筒表示)

マウス(藤色)、SseA(金)を表示。残基はCa炭素と側鎖を中心に表示。活性部位の保存配列は全体をボンド表示。SseAの残基番号のみ表示。

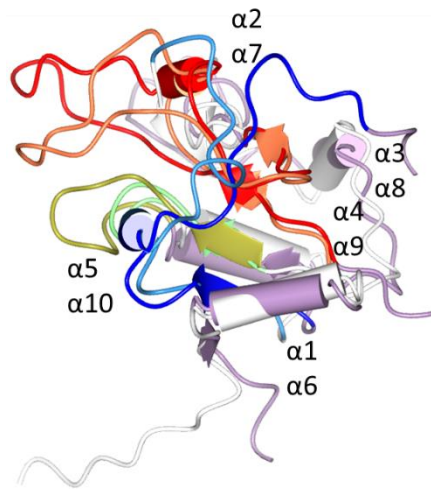
SseAのCys238はS-スルフヒドリル化されている。



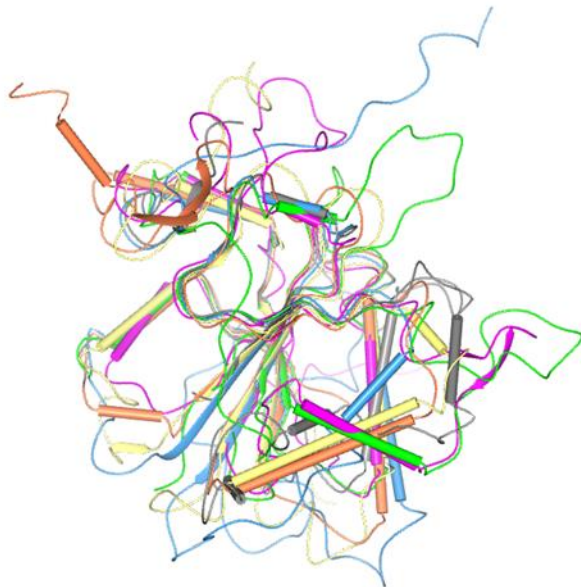
(A)



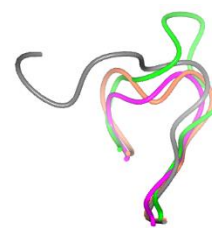
(B)



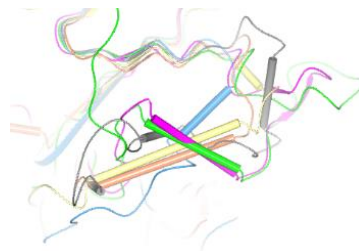
(C)



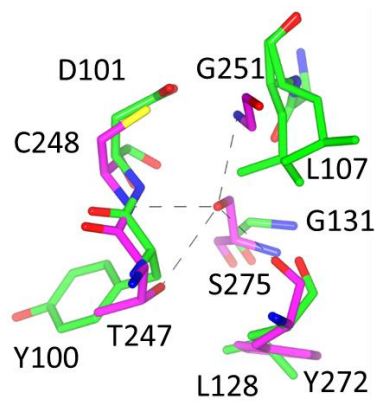
(D)



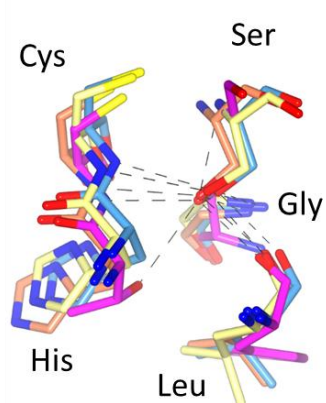
(E)



(F)



(G)



(H)

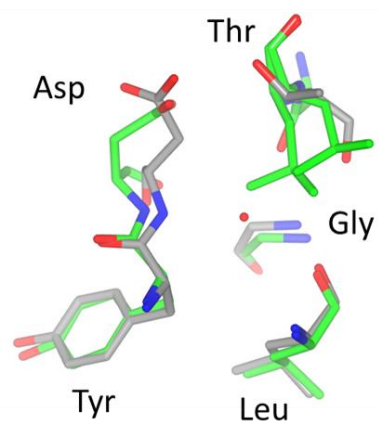


図 3-11 ローダネーゼドメインの SSM 方式による重ね合わせ

- (A) マウス 3MST のローダネーゼ 1 ドメインとローダネーゼ 2 ドメインの重ね合わせ(ワーム/チューブ表示(太))  
(CH2A モチーフ(赤)(ローダネーゼドメイン 1)、(オレンジ)(ローダネーゼドメイン 2)、CH2B モチーフ(青)(ローダネーゼドメイン 1)、(薄青)(ローダネーゼドメイン 2)。活性部位モチーフ(金)(ローダネーゼドメイン 1)、(薄緑)(ローダネーゼドメイン 2)、該当なし(ライラック)(ローダネーゼドメイン 1)、(白)(ローダネーゼドメイン 2))
- (B) (A)の別方向からの表示
- (C) マウス 3MST のローダネーゼドメインと他の蛋白質のローダネーゼドメインとの重ね合わせ(ワーム/チューブ表示(細))
- (D) ローダネーゼドメインの活性部位モチーフの重ね合わせ(ワーム表示)
- (E) ローダネーゼドメインの  $\alpha 3$  付近の重ね合わせ(ワーム/チューブ表示(細))
- (F) マウス 3MST のローダネーゼドメインの重ね合わせ(C248、G251、S275 付近)
- (G) 酵素活性を持つローダネーゼドメインとの重ね合わせ(マウス 3MST の C248、G251、S275 付近)
- (H) 酵素活性を持たないローダネーゼドメインとの重ね合わせ(マウス 3MST の D101、L107、G131 付近)
- マウス 3MST ローダネーゼドメイン 1(ライム)、マウス 3MST ローダネーゼドメイン 2(マゼンタ)、ヒト CDC25A(PDB ID 1C25)(ライトブルー)、出芽酵母 Ygr203w(PDB ID 3F4A)(薄黄)、森林型熱帯リーシュマニア Acr2 (PDB ID 2J6P) (オレンジ)、ヒト DUSP10 ローダネーゼドメイン(PDB ID 2OUC)(灰色)。

## 4 マウス 3MST と 3MP 類似阻害剤との相互作用

---

### 4.1 結果

#### 4.1.1 マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の構造

マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体の結晶は  $P2_1$  に属す結晶であり、非対称単位中に 2 つの 3MST 分子(A 鎖、B 鎖)が存在した。

##### 4.1.1.1 全体構造

3MP 類似阻害剤である  $\alpha$ -ケトグルタル酸(AKG)、2-メルカプトプロピオン酸(2MPA)はどちらも活性部位のポケットに 1 分子入る大きさで、蛋白質 1 分子あたり活性部位ポケット 1 箇所に結合していた。

阻害剤の結合による立体構造の大きな変化は観察されなかった。(阻害剤非結合型との RMSD はそれぞれ 0.26 Å、0.49 Å (SSM))

##### 4.1.1.2 3MP 類似阻害剤の電子密度

マウス 3MST-AKG 複合体は A 鎖のみ AKG の電子密度が確認され(図 4-2 (A))、B 鎖では主鎖のダブルコンフォメーションに由来すると思われる電子密度が確認され阻害剤の結合は確認できなかった(図 4-3 (A))。B 鎖では金属結合サイト 1 の電子密度が弱く金属の結合も特定できなかった。マウス 3MST-2MPA 複合体では A 鎖、B 鎖ともに 2MPA の R 体を当てはめると硫黄原子 S1 の位置((2S)-2MPA の C3 原子の位置)の  $F_o - F_c$  マップが大きく負になってしまった(図 4-3 (C))。2MPA の S 体((2S)-2MPA)を当てはめると硫黄原子 S1 の位置の  $F_o - F_c$  マップの負の大きさが小さかった(図 4-3 (B))ので S 体が結合すると結論づけた(図 4-2 (B))。

#### 4.1.1.3 マウス 3MST と 3MP 類似阻害剤との相互作用

相互作用の記述のため、各非水素原子に図 4-1 のように番号を付けて区別することにする。

##### 4.1.1.3.1 ファンデルワールス相互作用

複合体中で AKG は Trp36、Leu38、Tyr108、Arg184、Arg188、Pro196、Cys248、Gly249、Ser250、Val252、Thr253 とファンデルワールス相互作用していた。2MPA は Trp36、Leu38、Tyr108、Arg188、Pro196、Gly249、Ser250、Val252 とファンデルワールス相互作用していた。

(図 4-4、表 4-1、図 7-8)

##### 4.1.1.3.2 水素結合

AKG は 1 位のカルボキシル基の酸素原子 O1 が Tyr108 側鎖の酸素原子 O $\eta$  と、酸素原子 O2 が Thr253 側鎖の酸素原子 O $\gamma$ 1 と、2 位のカルボニルの酸素原子 O3 が Gly249 主鎖の窒素原子 N と、5 位のカルボキシル基の酸素原子 O4 が Ser250 側鎖の酸素原子 O $\gamma$  と、酸素原子 O5 が Arg188 側鎖の二つの窒素原子 N $\eta$ 1、N $\eta$ 2 と直接水素結合をしていた。また、1 位のカルボキシル基の酸素原子 O2 が Ala185 主鎖の窒素原子 N と水 1 分子を介した水素結合を形成していた。(図 4-4、表 4-1、図 7-8)

2MPA はカルボキシル基の酸素原子 O1 が Arg188 側鎖の窒素原子 N $\eta$ 1 と、酸素原子 O2 が Arg188 側鎖の窒素原子 N $\eta$ 2 と直接水素結合していた。また、カルボキシル基の酸素原子 O1 が Tyr108 側鎖の酸素原子 O $\eta$  と、酸素原子 O2 が Gly249 主鎖の窒素原子 N とそれぞれ水 1 分子を介した水素結合を形成していた。(図 4-4、表 4-1、図 7-8)

#### 4.1.1.4 ポケット内での位置の比較

AKG は 3MST の活性部位の残基と 6 本の直接の水素結合を形成し、活性部位のポケットに深く入り込んでより触媒残基の Cys248 側に位置していた。一方、2MPA は残基との直接の水素結合は 2 本しか水素結合を形成せず、ポケットにもあまり深く入り込まず、ポケットの入口側に位置していた。2MPA は硫黄原子 S1 が活性部位のポケット側に、炭素原子 C3 が開口部側に位置していた。(図 4-2、図 4-5 (C))

#### 4.1.1.5 阻害剤の接触面積と結合によるエントロピー変化

プログラム QtPISA による解析の結果、マウス 3MST-AKG 複合体の AKG は、露出面積  $280.26 \text{ \AA}^2$ 、埋没表面積  $271.17 \text{ \AA}^2$ 、溶媒和効果  $-2.55 \text{ kcal/mol}$ 、溶媒和エネルギー  $2.43 \text{ kcal/mol}$  であった。マウス 3MST-2MPA 複合体の 2MPA は A 鎖、B 鎖それぞれ、露出面積  $237.58 \text{ \AA}^2$ 、 $237.61 \text{ \AA}^2$ 、埋没表面積  $218.85 \text{ \AA}^2$ 、 $220.80 \text{ \AA}^2$ 、溶媒和効果  $-2.35 \text{ kcal/mol}$ 、 $-2.39 \text{ kcal/mol}$ 、溶媒和エネルギー  $1.95 \text{ kcal/mol}$ 、 $2.05 \text{ kcal/mol}$  であった。\*

#### 4.1.1.6 ヒト 3MST-ピルビン酸複合体との比較

ヒト 3MST-ピルビン酸複合体(PDB ID 4JGT)の A 鎖では、ピルビン酸とヒト 3MST が Tyr108、Arg188、Arg197、Ser250、Thr253 と直接または水 1 分子を介した水素結合を形成し、Trp36、Leu38、Tyr108、Arg188、Arg197、S-スルフヒドリル化された Cys248、Gly249、Ser250、Val252 とファンデルワールス相互作用している。マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体とヒト 3MST-ピルビン酸複合体での相互作用残基(表 4-1)に違いが見られるものの、3MP 類似阻害剤はピルビン酸と大体同じ位置に結合していた(図 4-5)。

## 4.2 考察

### 4.2.1 2MPA の光学異性体について

マウス 3MST-2MPA 複合体中での 2MPA の光学異性体の結合は、2MPA の *R* 体と *S* 体の双方を当てはめた時の精密化で結合していると判断した。*R* 体を当てはめると硫黄原子 S1 の位置の  $F_o - F_c$  マップが大きく負になってしまったが、*S* 体を当てはめたときは硫黄原子 S1 の位置の  $F_o - F_c$  マップの負の割合が小さかった。従って、マウス 3MST の活性部位は 2MPA の光学異性体のうち特異的に *S* 体を認識していると考えられる。(図 4-3 (B)、(C))

### 4.2.2 結合様式の比較

マウス 3MST-AKG 複合体とマウス 3MST-2MPA 複合体は、活性部位ポケットに結合するという点では同じであるが、その結合様式は大きく異なる。共通の相互作用は、阻害剤が Trp36、Leu38、Arg188、Pro196、Gly249、Ser250、Val252 とファンデルワールス相互作用し、Arg188 と直接水素結合する。相違点は、AKG は Tyr108、Arg184、Cys248、Thr253 とファンデルワールス相互作用し、Tyr108、Gly249、Ser250、Thr253 と直接水素結合、Ala185 と水 1 分子を介して水素結合するのに対し、2MPA は共通の相互作用残基以外はファンデルワールス相互作用、直接水素結合する残基はなく、Tyr108、Gly249 と水 1 分子を介して水素結合する(図 4-4、表 4-1、図 7-8)。

### 4.2.3 ヒト 3MST-ピルビン酸複合体との比較

PDB には、ヒト 3MST-ピルビン酸複合体(基質と反応させて得た反応中間体)(PDB ID 4JGT)が登録されている。この反応産物であるピルビン酸とより結合様式に近いのは 2MPA であった(図 4-4、4-5)。

マウス 3MST-AKG 複合体とヒト 3MST-ピルビン酸複合体の結合様式は大きく異なり、ヒト 3MST-ピルビン酸複合体ではピルビン酸骨格のカルボキシル基、カルボニル基が Arg188 や Arg197、Ser250 と直接水素結合し、Tyr108、Thr253 と水 1 分子を介して水素結合する。一方、マウス 3MST-AKG 複合体ではピルビン酸骨格の部分は Tyr108、Gly249、Thr253 と直接水素結合し、Ala185 と水 1 分子を介して水素結合する。Arg188 や Ser250 と直接水素結合しているのは別のカルボキシル基である。また、Trp36、Leu38、Tyr108、Arg188、Gly249、Ser250、Val252 の他に、ヒト 3MST-ピルビン酸複合体では Arg197、S-スルフヒドリル化された Cys248 とファンデルワールス相互作用するのに対し、マウス 3MST-AKG 複合体では、Arg184、Pro196、Cys248、Thr253 とファンデルワールス相互作用する。従って、3MP 類似阻害剤であっても極性の官能基の数が多い AKG は、ヒト 3MST-ピルビン酸複合体中のピルビン酸と結合様式が異なり、ピルビン酸と比較してピルビン酸骨格が活性部位ポケットの奥側に結合することが明らかになった。

マウス 3MST-2MPA 複合体とヒト 3MST-ピルビン酸複合体の結合様式は類似しているものの、結合様式は異なる。相違点は、ヒト 3MST-ピルビン酸複合体ではカルボキシル基が Arg188 の他に Arg197 と直接水素結合し、Tyr108 の他に Thr253 と水 1 分子を介して水素結合するのに対し、マウス 3MST-2MPA 複合体はカルボキシル基が R188 の他に直接水素結合する残基はなく、Tyr108 の他に Gly249 と水 1 分子を介して水素結合する点である。また、Trp36、Leu38、Arg188、Gly249、Ser250、Val252 の他に、ヒト 3MST-ピルビン酸複合体では Tyr108、Arg197、S-スルフヒドリル化された Cys248 とファンデルワールス相互作用するのに対し、マウス 3MST-2MPA 複合体では Pro196 とファンデルワールス相互作用する。ヒト 3MST-ピルビン酸複合体では Arg197 側鎖が活性部位ポケット内部を向いているためピルビン

酸と相互作用するのに対し、マウス 3MST-2MPA 複合体は Arg197 側鎖が活性部位ポケット外を向いているため 2MPA と相互作用しない。また、ヒト 3MST-ピルビン酸複合体は反応の中間的な構造であるためピルビン酸が活性残基の Cys248 方向に傾いているが、マウス 3MST-2MPA 複合体は 2MPA が活性部位ポケットの入口側に結合している。

#### 4.2.4 3MP 類似阻害剤による酵素反応阻害

3MP 類似阻害剤は、活性部位のヒト 3MST-ピルビン酸複合体のピルビン酸結合部位とほぼ同じ場所に結合していた。従って、阻害剤は、活性部位への硫黄供与基質である 3MP の結合を妨げることで酵素反応を阻害していると考えられる。3MP 類似阻害剤の活性部位への結合については、AKG は活性部位と複数の水素結合を形成していたことから、水素結合可能な残基は阻害剤の活性部位への結合に有利に働くと考えられる。しかし、水素結合可能な官能基の数が少ない 2MPA が活性部位に結合していたことから、硫黄原子と水素結合可能な官能基を持つ 2MPA のような物質であれば、活性部位への結合は可能であると思われる。AKG は 3MST の活性部位と多数の水素結合を形成して活性部位のポケットの奥側に結合していたのに対し、2MPA はそれほど水素結合を形成せず、ポケットの入口側に結合していた。従って、阻害剤の水素結合を可能にする官能基の数が多いとやや親水的であるポケットの奥側に、官能基の数が少ないとやや疎水的であるポケットの入口側に結合すると考えられる。

また、3MP 類似阻害剤は触媒残基の Cys248 が S-スルフヒドリル化されていなくても活性部位に結合していたことから、3MP 類似阻害剤の結合には Cys248 が S-スルフヒドリル化されていることは必須でないと考えられる。従って、3MP 類似阻害剤は 3MST が触媒する酵素反応



の1段階目、つまり、3MP から触媒残基の Cys248 への硫黄転移反応から阻害するといえよう(図4-6)。

3MP 類似阻害剤の哺乳類 3MST への結合については、3MP 類似阻害剤との相互作用残基が保存されていることから、AKG、2MPA とともにほぼ同様の相互作用で活性部位に結合する可能性が高いと思われる。(図7-1(A), 7-3(A))

3MP 類似阻害剤の寄生虫 3MST への結合については、マウス 3MST の Arg188 に相当する残基は保存されているので、2MPA についてはほぼ同様の相互作用で活性部位に結合するものと思われるが、Trp36、Tyr108 に対応する残基がそれぞれ Tyr、Met であるように水素結合に関与する残基が異なるので、AKG の相互作用様式はマウス 3MST と異なる可能性が高い。(図7-4)

3MP 類似阻害剤の細菌の 3MST への結合については、哺乳類の 3MST と配列相同性が低いので活性部位のポケットの形状がやや異なる可能性もあり、特に AKG の結合様式は異なる可能性が高いと予想される。

#### 4.2.5 他の蛋白質-3MP 類似物質複合体との比較

##### 4.2.5.1 マウス 3MST-AKG 複合体と他の蛋白質-AKG 複合体の結合様式の比較

PDB には蛋白質-AKG 複合体が 100 個以上登録されている。その中から、ヒトのイソクエン酸脱水素酵素(NADP<sup>+</sup>)との複合体(PDB ID 3INM)と、 $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性 2 原子酸素添加酵素ホモログ 7 との複合体(PDB ID 4QKD)について説明する。それぞれを PDB ID で区別する。(図4-8)

3INM では、AKG の 1 位のカルボキシル基と 2 位のカルボニル基の酸素原子が 1 つのカルシウムイオンに配位し、結合部位の Thr77、Ser94、Asn96、Arg100、Arg109、Asp275 と水素結合し、周囲の残基とファンデルワールス相互作用している。AKG はカルボキシル基やカルボニル基を持つため表面電荷は負であり、結合部位の蛋白質側の表面電荷は正である。4QKD では、AKG の 1 位のカルボキシル基と 2 位のカルボニル基の酸素原子が 1 つのマンガンイオンに配位し、結合部位の His121、Asp123、Tyr165、His177、Arg197、Ser199 と水素結合し、周囲の残基とファンデルワールス相互作用している。結合部位の蛋白質側の表面電荷は、Arg 周辺は正であり、開口部周辺は負である。

3INM や 4QKD では、1 つの金属に AKG の 2 つの酸素原子が 2 つの配位子となっている結合様式であり、金属への配位によって蛋白質への結合力が高まっていると考えられる。結合部位の蛋白質側のポケットが必ずしも結合に有利でない負電荷を帯びていても結合しているのはそのためであろう。一方、マウス 3MST-AKG 複合体では活性部位の残基と水素結合し、周囲の残基とファンデルワールス相互作用する結合様式であり、結合部位の蛋白質側は Arg188 表面は正電荷を帯び、その他は全体的に弱い(図 4-7 (A))。従って、AKG の 3MST への結合は水素結合とファンデルワールス相互作用によると考えられる。AKG のマウス 3MST への結合力は、結合部位に金属が存在しないため他の蛋白質への結合よりかなり弱いと考えられる。

#### 4.2.5.2 マウス 3MST-2MPA 複合体と他の蛋白質-3MP 類似物質複合体の結合様式の比較

PDB には 3MP 類似物質のチオグリコール酸(TGA)が蛋白質に結合した構造が登録されている。そのうち、シュードモナス・スタツェリのトルエン、 $\alpha$ -キシレン 1 原子酸素添加酵素

酸素添加酵素との複合体(PDB ID 1T0Q)、セラチア菌の金属β-ラクタマーゼとの複合体(PDB ID 3VQZ)について説明する。それぞれを PDB ID で区別する。(図 4-9)

1T0Q では、TGA のカルボキシル基の 1 つの酸素原子が 2 つの鉄イオンに配位し、結合部位の残基とファンデルワールス相互作用している。TGA の表面電荷はカルボキシル基は負で他の部分は電荷が弱く、結合部位の蛋白質側の表面電荷は負である。3VQZ では、TGA の 1 つの酸素原子が Thr195 と、もう 1 つの酸素原子が Ser193 と水素結合し、この酸素原子と硫黄原子が 2 つの亜鉛イオンに配位している。結合部位の蛋白質側の表面電荷は正である。

1T0Q や 3VQZ では、TGA は 2 つの金属への配位が生じている結合様式であり、TGA の蛋白質への結合は金属への配位によるところが大きいと考えられる。結合部位の蛋白質側のポケットが必ずしも結合に有利でない負電荷を帯びていても結合しているのはそのためであろう。一方、マウス 3MST-2MPA 複合体はカルボキシル基が Arg188 と水素結合し、周辺の残基とファンデルワールス相互作用する結合様式であり、結合部位の蛋白質側は Arg188 表面は正電荷を帯び、その他の部分の電荷は弱い(図 4-7 (B))。従って、2MPA の蛋白質への結合は Arg188 への水素結合とファンデルワールス相互作用によると考えられる。2MPA のマウス 3MST への結合力は、結合部位に金属が存在しないため TGA の他の蛋白質への結合よりかなり弱いと考えられる。

#### 4.2.5.3 蛋白質-3MP 類似物質複合体の相互作用についてのまとめ

既知の蛋白質-3MP 類似物質複合体では、3MP 類似物質が金属に配位して結合する結合様式であった。特に、表面電荷が結合に不利な負電荷である場合(1T0Q、4QKD)や、3MP 類似物質の電荷がやや弱い場合(1T0Q、3VQZ)は、原子番号の大きな金属のイオンに配位していた。

従って、3MP 類似阻害剤は金属原子、つまり強い陽電荷を持つ物質が存在することで蛋白質への結合性が高まることが示唆される。3MP 類似阻害剤の相互作用を基に阻害剤を設計するのであれば、水素結合できる官能基を増やすか、金属イオンのように蛋白質との相互作用を強める原子や官能基を導入するなど、活性部位との相互作用を強める工夫が必要であろう。

※ QiPISA の計算結果は、リガンドの名前を変更すると異なる値を出すことが後に判明した。プログラムのバグなどがあるかもしれない。

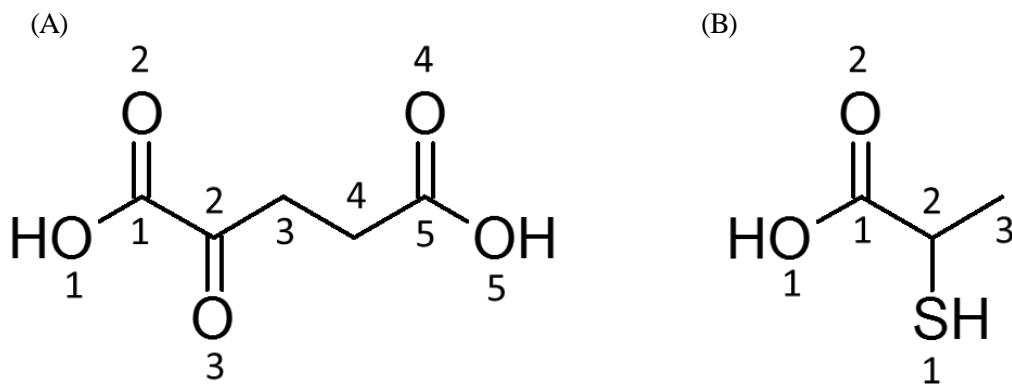


図 4-1 3MP 類似阻害剤の構造式

(A) AKG (B) 2MPA

原子の上または下に各原子を区別するための番号を記す。

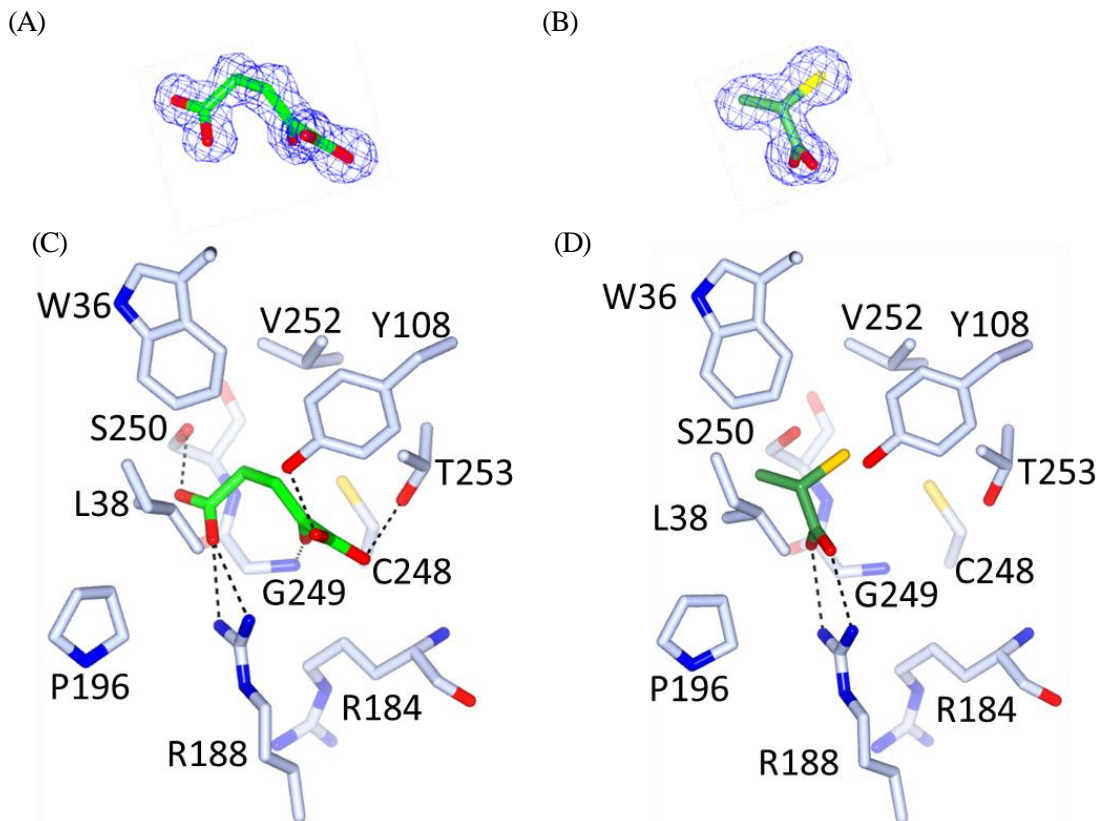


図 4-2 阻害剤の結合位置と阻害剤の電子密度

(A) マウス 3MST-AKG 複合体の AKG のオミットマップ

(B) マウス 3MST-2MPA 複合体の 2MPA オミットマップ

(C) マウス 3MST-AKG 複合体の結合位置

(D) マウス 3MST-2MPA 複合体の結合位置

アミノ酸残基(薄青)、AKG(黄緑)、2MPA(深緑)、オミットマップ( $F_o - F_c$  3.0 $\sigma$ (+))(青網)を表示。

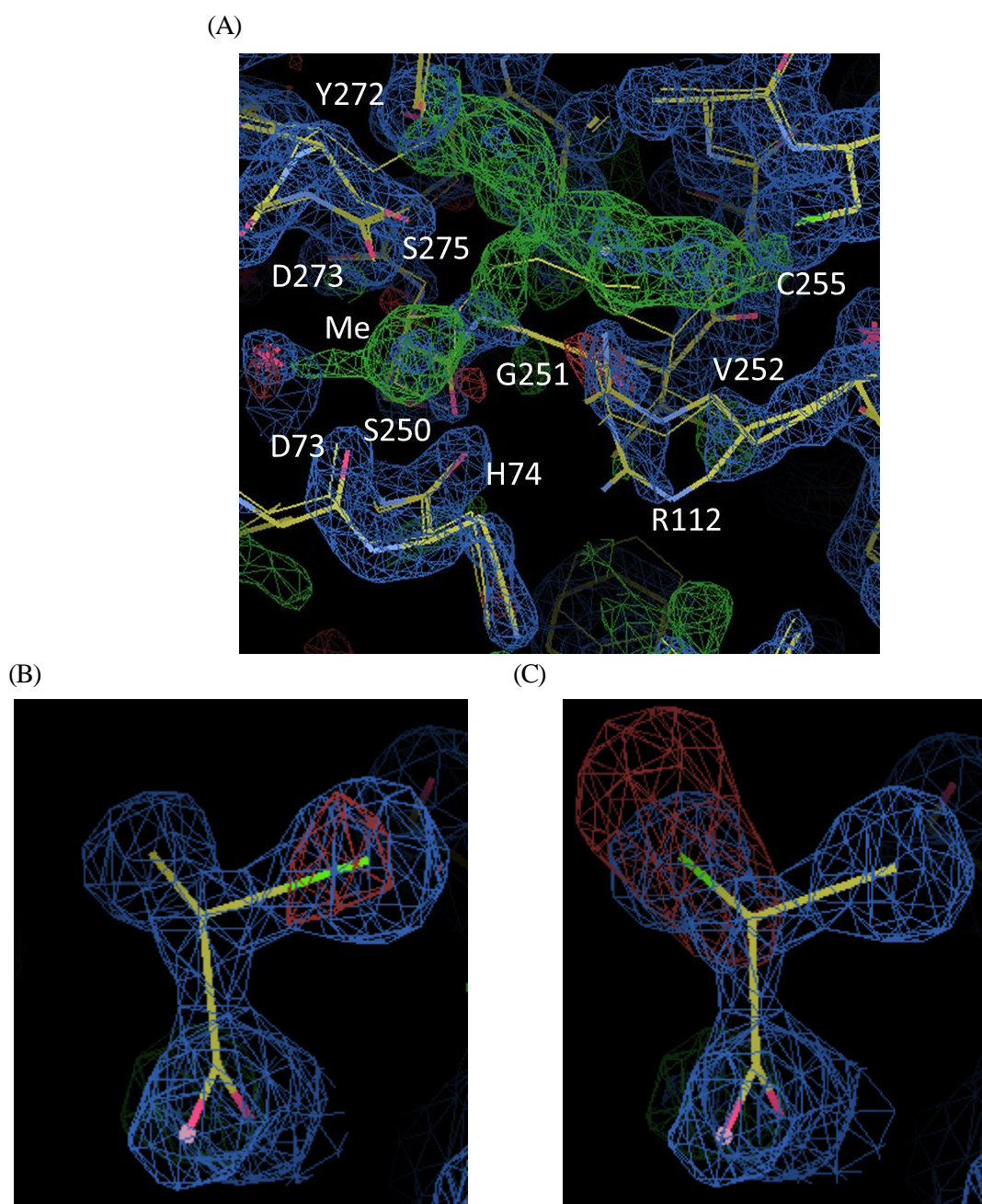


図 4-3 マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体中の電子密度

- (A) マウス 3MST-AKG 複合体で観察された、活性部位の主鎖のダブルコンフォメーションに由来する電子密度(B 鎖)
- (B) マウス 3MST-2MPA 複合体の 2MPA に S 体を当てはめた時の電子密度(A 鎖)
- (C) マウス 3MST-2MPA 複合体の 2MPA に R 体を当てはめた時の電子密度(A 鎖)
- アミノ酸残基(黄)、 $2F_o - F_c$  マップ  $1.5 \sigma$  (青網)、 $F_o - F_c$  マップ  $3.0 \sigma (+)$  (緑網)、 $F_o - F_c$  マップ  $3.0 \sigma (-)$  (赤網)、窒素原子(青)、酸素原子(ピンク)、硫黄原子(黄緑)、水分子(ピンク、組木型)を表示。  
 (A)の細かい線は A 鎖の蛋白質分子を重ね合わせた時の位置。金属結合サイト 1 は“Me”と記す。

表 4-1 3MP 類似阻害剤とピルビン酸の相互作用残基(A 鎖)

	AKG	2MPA	Pyruvate
ファンデルワールス相互作用	W36, L38, Y108, R184, R188, P196, C248, G249, S250, V252, T253	W36, L38, Y108, R188, P196, G249, S250, V252	W36, L38, Y108, R188, R197, CSS248, G249, S250, V252,
直接水素結合	Y108, R188, G249, S250, T253	R188	R188, R197, S250
水1分子を介した水素結合	A185	Y108, G249	Y108, T253

AKG と 2MPA はマウス 3MST との相互作用、ピルビン酸はヒト 3MST との相互作用(PDB ID 4JGT)を抽出。CSS248 は S-スルフヒドリル化された Cys248 である。

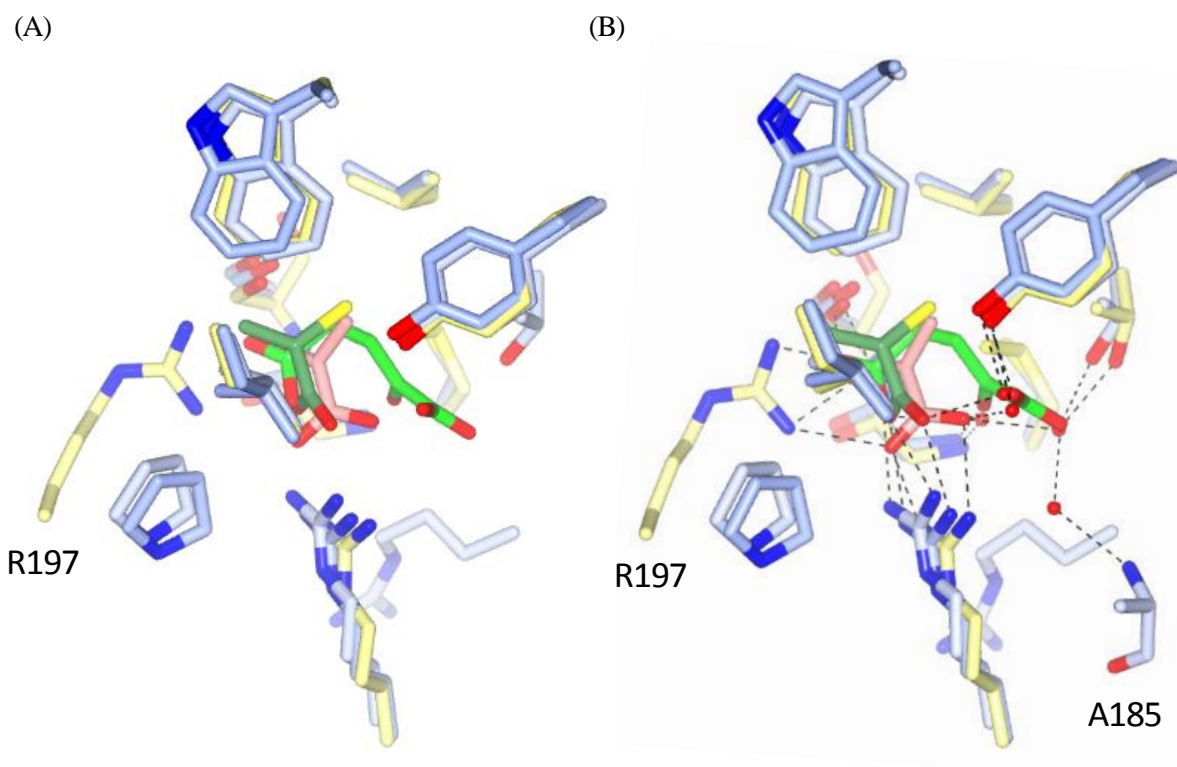


図 4-4 表 4-1 の相互作用残基

(A) ファンデルワールス相互作用のみ (B) 水 1 分子を介した水素結合まで  
 AKG 複合体(薄青)、2MPA 複合体(藤色)、ヒト 3MST (薄黄)、AKG (黄緑)、2MPA (深緑)、ピルビン酸(ピンク)、水(赤球)、水素結合(点線)を表示。  
 残基番号は新出のものを記入。

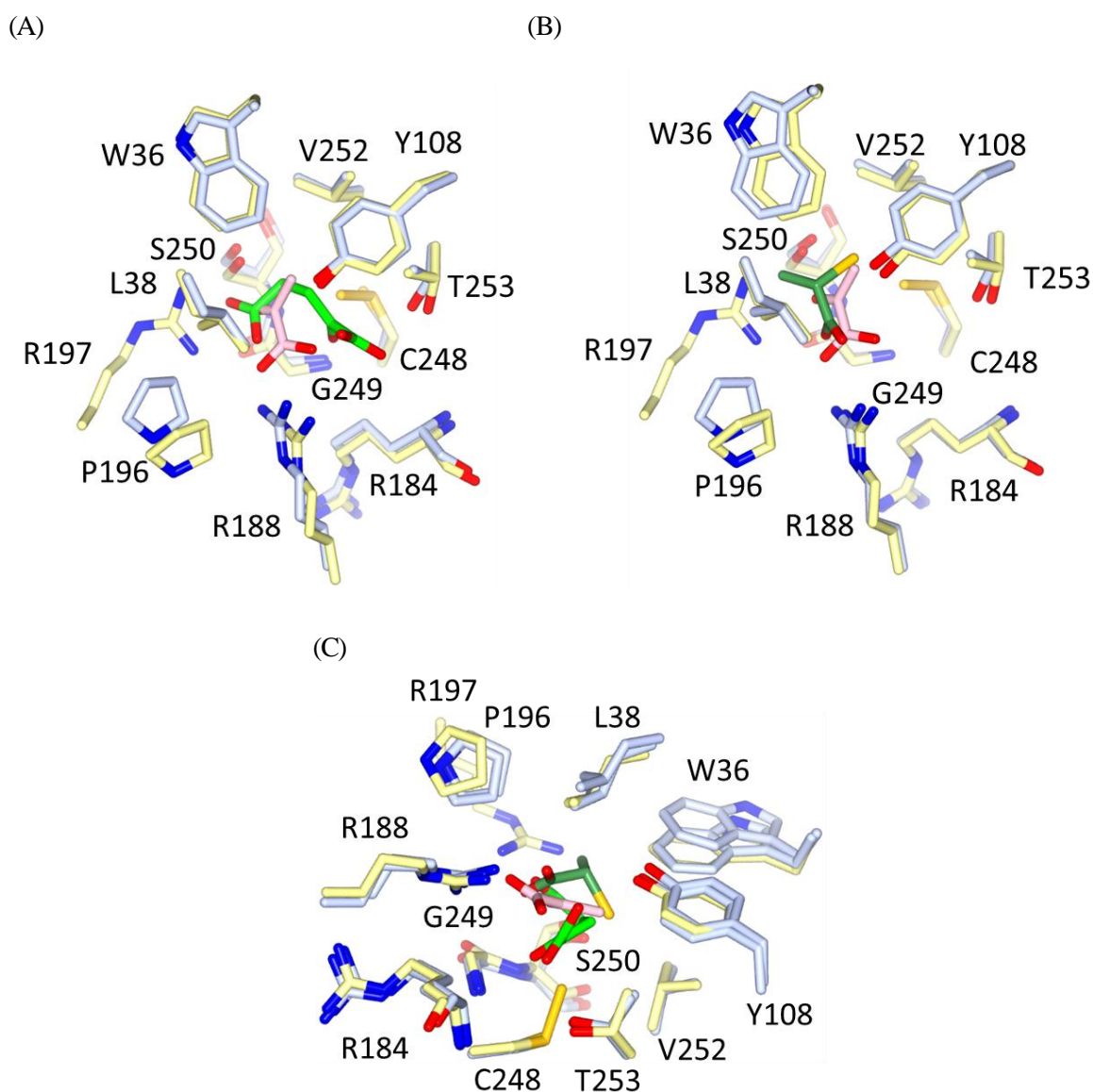


図 4-5 ヒト 3MST-ピルビン酸複合体(PDB ID 4JGT)との比較(SSM 方式)

(A) マウス 3MST-AKG 複合体との比較

(B) マウス 3MST-2MPA 複合体との比較

(C) 複合体の重ね合わせ(触媒残基との距離が分かるように表示)

マウス 3MST (薄青)、ヒト 3MST (薄黄)、AKG (黄緑)、2MPA (深緑)、ピルビン酸(ピンク)を表示。

ヒト 3MST の Cys248 は S-スルフヒドリル化されている。



図 4-6 3MP 類似阻害剤の酵素反応阻害段階



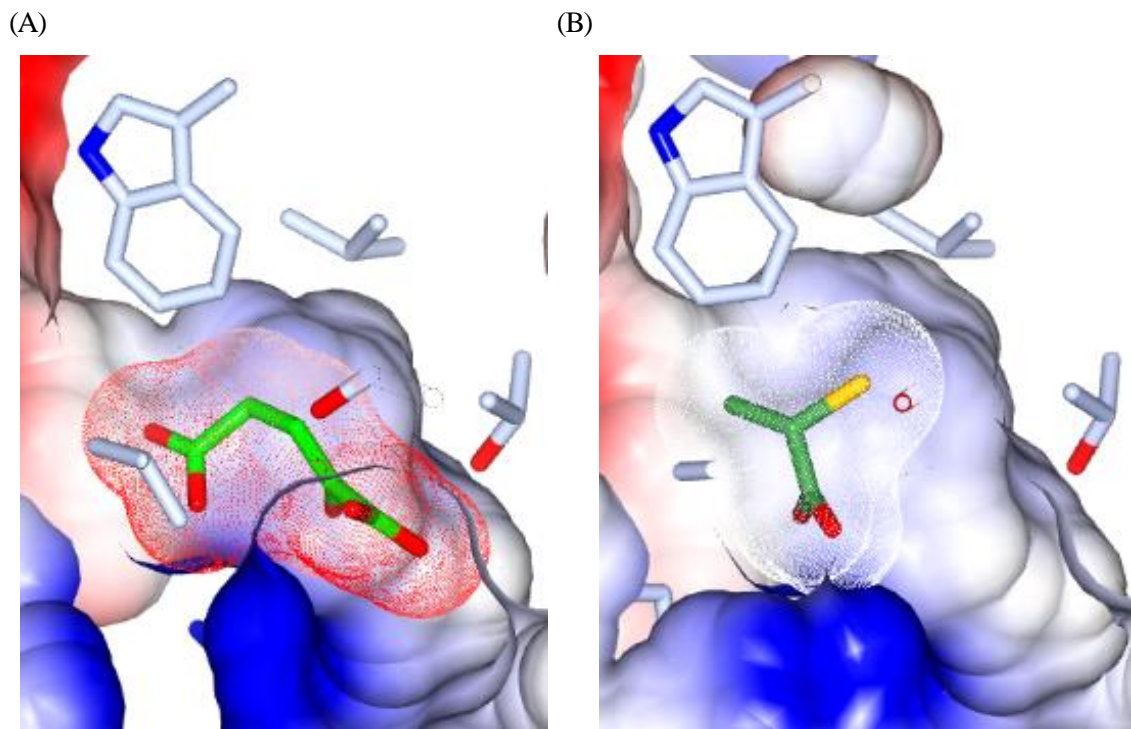


図 4-7 3MP 類似阻害剤の結合部位の表面電荷

(A) マウス 3MST-AKG 複合体 (AKG (黄緑))

(B) マウス 3MST-2MPA 複合体 (2MPA (深緑))

表面電荷は正を青、負を赤、阻害剤を点、蛋白質表面を固体面で表示。

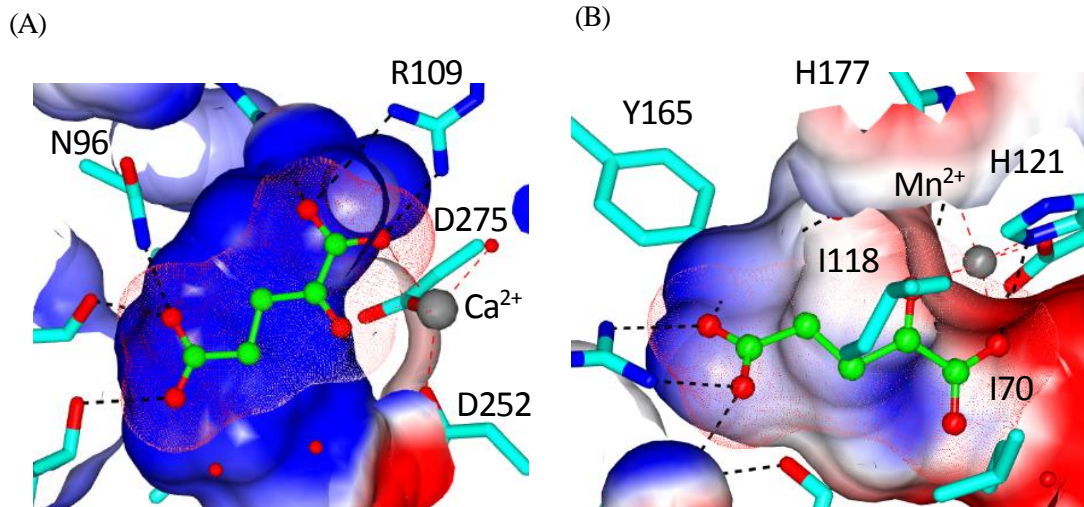


図 4-8 他の蛋白質-AKG 複合体の結合箇所の表面電荷表示

(A) PDB ID 3INM

(B) PDB ID 4QKD

蛋白質(シアン、円筒)、AKG(黄緑、ボールスティック)、金属(灰色、球)、水(赤、小球)と表面電荷を表示。表面電荷は正を青、負を赤、AKG を点、蛋白質表面を固体面で表示。

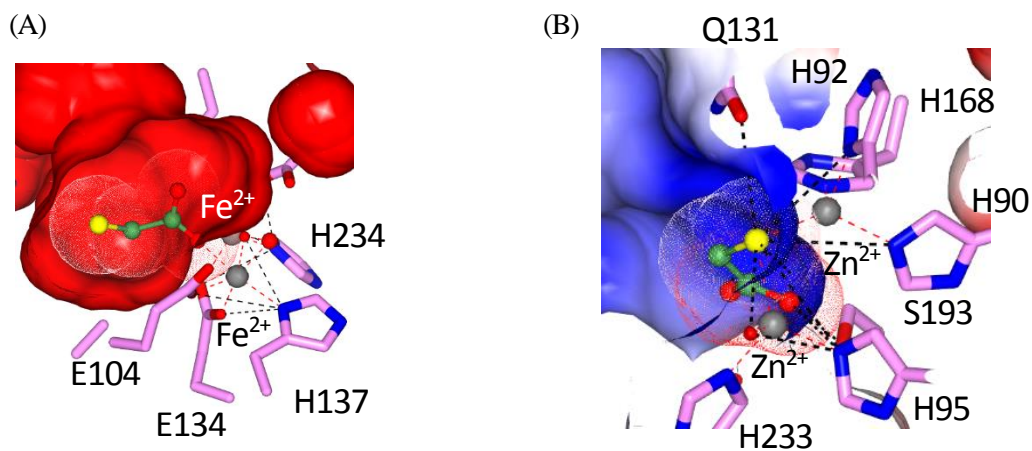


図 4-9 他の蛋白質-TGA 複合体の結合箇所の表面電荷表示

(A) PDB ID 1T0Q

(B) PDB ID 3QVZ

蛋白質(ピンク、円筒)、TGA(深緑、ボールスティック)、金属(灰色、球)表示。表面電荷は正を青、負を赤、TGA を点、蛋白質表面を固体面で表示。

## 5 マウス 3MST と新規 3MST 阻害剤との相互作用

---

### 5.1 結果

#### 5.1.1 ITC 実験

硫黄を結合させていないマウス 3MST ではどちらの阻害剤でも結合熱の発生が観察されず、解離定数が求まらなかったのに対し、Cys248 に硫黄を結合させたマウス 3MST では結合熱の発生が観察され、解離定数  $K_d$  が阻害剤 A、B それぞれ  $0.5 \mu\text{M}$ 、 $3.0 \mu\text{M}$  と求まった。また、蛋白質 1 分子あたりの阻害剤のストイキオメトリー  $N$  は阻害剤 A、B それぞれ  $0.41$ 、 $0.56$  だった。(図 5-2、表 5-1)

#### 5.1.2 マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の構造

##### 5.1.2.1 全体構造

マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の結晶は  $P2_1$  に属す結晶であり、非対称単位中に 2 つの 3MST 分子(A 鎖、B 鎖)が存在した。

阻害剤 A、B はどちらも活性部位を含む領域に結合していた。蛋白質 1 分子あたり阻害剤 1 分子が 1 箇所結合していた(図 5-3)。

構造決定した蛋白質は C65S/C255S/C264S の変異体であるが、阻害剤結合や変異に由来すると思われる全体構造の大きな変化は観察されなかった。(阻害剤非結合型との RMSD はそれぞれ  $0.54 \text{ \AA}$ 、 $0.57 \text{ \AA}$ 、新規 3MST 阻害剤複合体同士は  $0.36 \text{ \AA}$  (SSM))

### 5.1.2.2 新規 3MST 阻害剤の電子密度

マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体は阻害剤 A、B とも芳香環が明確に観察されるほど明瞭な電子密度が確認された(図 5-4)。

### 5.1.2.3 S-スルフヒドリル化された触媒残基 Cys248 S $\delta$ の電子密度

マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体中では阻害剤 A、B とも S-スルフヒドリル化された触媒残基 Cys248 の硫黄原子 S $\delta$  の明瞭な電子密度が確認された(図 5-5)。

### 5.1.2.4 マウス 3MST と新規 3MST 阻害剤との相互作用

相互作用の記述のため、各非水素原子に図 5-1 のように番号を付けて区別することにする。新規 3MST 阻害剤はほぼ同様の相互作用でマウス 3MST に結合していた。(図 5-6)

#### 5.1.2.4.1 ファンデルワールス相互作用

複合体中で阻害剤 A はアミノ酸残基 Trp36、Leu38、Pro39、Asp73、His74、Tyr108、Arg188、Pro196、Arg197、Gly249、Ser250、Val252、Val277、S-スルフヒドリル化された Cys248 の硫黄原子 S $\delta$  とファンデルワールス相互作用していた。阻害剤 B ではこれらの残基に加え、さらに Thr253 ともファンデルワールス相互作用していた。この中で Pro39、Asp73、His74、Arg197、Val277 が 3MP 類似阻害剤とファンデルワールス相互作用しておらず、新たに阻害剤の相互作用残基として確認された(図 5-6 (A)、(B))。

#### 5.1.2.4.2 水素結合

阻害剤の 2 つの芳香環のうち、4-ピリミドン骨格を持つ芳香環(または芳香環とその置換基)は、阻害剤 A、B ともに、4-ピリミドン骨格の窒素原子 N1 が Ser250 側鎖の酸素原子 O $\gamma$  と、窒素原子 N2 が Arg188 側鎖の窒素原子 N $\eta$ 2 と、酸素原子 O1 が Arg188 側鎖の末端の窒素原子

N $\eta$ 1 とそれぞれ直接水素結合し、酸素原子 O1 が Thr253 の側鎖の酸素原子 O $\gamma$ 1、Tyr108 の側鎖の酸素原子 O $\eta$  とそれぞれ異なる水 1 分子を介して水素結合を形成していた。

阻害剤 B の 2 つの芳香環のうち、4-ピリミドン骨格を持たない芳香環上の置換基である一級アミドは、窒素原子 N4 が Asp63 側鎖の酸素原子 O $\delta$ 1 と、酸素原子 O3 が His74 主鎖の窒素原子 N と、それぞれ異なる水 1 分子を介して水素結合していた。

水素結合の距離を 3.6 Å まで考えることにする(Jeffrey は 2.2–2.5 Å、2.5–3.2 Å、3.2–4.0 Å の距離の水素結合をそれぞれ、「strong, mostly covalent」、「moderate, mostly electrostatic」、「weak, electrostatic」と定義している[79])と、阻害剤 A、B とともに、阻害剤の 2 つの芳香環を繋ぐ箇所の硫黄原子 S1 やカルボニルの酸素原子 O2 が、共通の水 1 分子を介して Glu195 側鎖の酸素原子 O $\epsilon$ 1 や Arg197 主鎖の窒素原子 N と水素結合していた。(図 5-6 (C)、(D))

#### 5.1.2.4.3 新規 3MST 阻害剤の芳香環の相互作用

ここではマウス 3MST と新規 3MST 阻害剤の芳香環との相互作用について、阻害剤の結合に重要であると思われる非共有結合性の相互作用について説明する。(図 5-7 (A))

##### 5.1.2.4.3.1 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環の相互作用

阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は、S-スルフヒドリル化した Cys248 の硫黄原子 S $\delta$  と硫黄- $\pi$  相互作用[80](硫黄-アレン相互作用[81])していた(図 5-7 (A))。硫黄は 4-ピリミドン骨格の芳香環の中心ではなく、炭素 C3 方向に寄っていた(図 5-7 (B), (D))。また、フラビン環近くで見られるようなジスルフィド結合と芳香環の平行な相互作用ではなく、S $\gamma$ -S $\delta$  間のジスルフィド結合が芳香環と垂直に近い状態で相互作用していた(図 5-5)。

#### 5.1.2.4.3.2 4-ピリミドン骨格を持たない芳香環の相互作用

4-ピリミドン骨格を持たない芳香環は、阻害剤 A はナフタレン環の主に C11-17 の部分が Arg197 側鎖末端のグアニジノ基とカチオン- $\pi$  相互作用し、ナフタレン環の C8-17 の部分が Arg197 側鎖のグアニジノ基と Asp73 側鎖のカルボキシル基が形成する塩橋によって形成された水素結合ネットワークと平行スタッキング相互作用[81]を形成していた(図 5-7 (A)、(C))。

阻害剤 B でもほぼ同様の相互作用が見られたが、阻害剤 B の芳香環は小さく、芳香環上の 2つの置換基であるアミドも相互作用に関与していると考えられた。つまり、阻害剤 B は主にチオフェン骨格の C11-14、S2 部分が Arg197 側鎖末端のグアニジノ基とカチオン- $\pi$  相互作用し、主にチオフェン骨格の C11-14、S2 部分と 2つのアミドの主に C15、N3、O3 が Arg197 側鎖のグアニジノ基と Asp73 側鎖のカルボキシル基が形成する塩橋によって形成された水素結合ネットワークと平行スタッキング相互作用を形成していた。なお、結晶中の阻害剤 B のアミドに関しては、2つのアミドの N3-O3 間で分子内水素結合が形成されていると考えられた。(図 5-7 (A)、(E))

#### 5.1.2.5 阻害剤非結合型との阻害剤結合部位構造の比較

Arg197 は阻害剤非結合型では Pro71 主鎖と水素結合を形成していたが、新規 3MST 阻害剤の結合により、Asp73 と塩橋を形成できる位置に側鎖が移動し、形成した水素結合ネットワークと新規 3MST 阻害剤の芳香環との間でスタッキング相互作用を形成していた。また、阻害剤の結合により、Trp36 や His74、Pro196 など相互作用残基の位置に変化が見られた。(図 5-8)

### 5.1.2.6 阻害剤の接触面積と結合によるエントロピー変化

プログラム QtPISA による解析の結果、マウス 3MST-阻害剤 A 複合体の A 鎖、B 鎖に結合している阻害剤 A はそれぞれ、露出面積  $496.87 \text{ \AA}^2$ ,  $496.75 \text{ \AA}^2$ 、埋没表面積  $436.63 \text{ \AA}^2$ ,  $434.68 \text{ \AA}^2$ 、溶媒和効果  $-2.94 \text{ kcal/mol}$ ,  $-2.97 \text{ kcal/mol}$ 、溶媒和エネルギー  $2.62 \text{ kcal/mol}$ ,  $2.64 \text{ kcal/mol}$  であった。マウス 3MST-阻害剤 B 複合体の A 鎖、B 鎖に結合している阻害剤 B はそれぞれ、露出面積  $525.59 \text{ \AA}^2$ ,  $530.91 \text{ \AA}^2$ 、埋没表面積  $470.02 \text{ \AA}^2$ ,  $475.05 \text{ \AA}^2$ 、溶媒和効果  $-5.75 \text{ kcal/mol}$ ,  $-5.82 \text{ kcal/mol}$ 、溶媒和エネルギー  $5.68 \text{ kcal/mol}$ ,  $5.75 \text{ kcal/mol}$  であった。\*

## 5.2 考察

### 5.2.1 新規 3MST 阻害剤のマウス 3MST との結合について

新規 3MST 阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は、結晶構造から S-スルフヒドリル化された触媒残基 Cys248 の硫黄原子 S $\delta$  と硫黄- $\pi$  相互作用していた。また、ITC の結果から新規 3MST 阻害剤の結合にはこの硫黄が不可欠であることが判明した。周囲の残基との直接または水 1 分子を介した水素結合も存在したことから、4-ピリミドン骨格では硫黄- $\pi$  相互作用と水素結合が結合上重要な相互作用であると考えられる。

また、4-ピリミドン骨格を持たない芳香環は、結晶構造から Arg197 側鎖とカチオン- $\pi$  相互作用し、Arg197 側鎖と Asp73 側鎖によって形成された水素結合ネットワークとスタッキング相互作用することが分かった。この相互作用については、他の部分の骨格が共通でありながら Arg197 や Asp73 と相互作用する位置に相当する部分の  $\pi$  電子が小さい(ベンゼン環 1 個程度)化合物が初期のスクリーニングで排除されている[61]。このことは、4-ピリミドンを持たない

芳香環についても相互作用に関与できる  $\pi$  電子が十分でないと 3MST に結合できないことを意味していると考えられる。

新規 3MST 阻害剤の芳香環については結合への関与が評価できる一方で、2つの芳香環を結ぶカルボニル-硫黄の結合への重要性は明らかではない。この部分は少なくとも結晶構造ではマウス 3MST との相互作用への寄与が水分子を介した水素結合およびファンデルワールス相互作用であり、一見他の骨格でも良いように思われるものの新規 3MST 阻害剤に共通した骨格であることから、3MST への結合に何らかの意味があるものと思われる。溶液中など動的な環境では何らかの結合に重要な役割を持つのかもしれない。

### 5.2.2 新規 3MST 阻害剤による酵素反応阻害

新規 3MST 阻害剤は触媒残基である Cys248 が S-スルフヒドリル化された 3MST に結合した。従って、この酵素は酵素反応が 3MP から Cys248 への硫黄転移反応と、S-スルフヒドリル化された Cys248 からチオールへの硫黄転移反応の二段階に分けて解釈すると、酵素反応の二段階目を阻害する阻害剤であると結論付けられる(図 5-9)。また、この結果は、3MST が関与する酵素反応(複数基質反応)は逐次機構ではなく、ピンポン機構によっておこることを強く示唆するものである。シアン化物イオンを受容基質とする場合、酵素反応は逐次機構によって進むことが報告されている[82]。チオールを受容基質とする場合、酵素反応が逐次機構で進むと仮定すると活性部位に供与基質と受容基質が同時に結合しなければならないが、活性部位のポケットの体積は硫黄の供与基質である 3MP と受容基質であるチオールが同時に結合するには小さいので酵素反応がピンポン機構であることが強く示唆される。しかしながら、基質の 3MP はチオールであり、硫黄の供与基質であると同時に受容基質にもなるため、酵素反応の



タイプを生化学的に決定するのは容易ではないと考えられる。ITCの結果から阻害剤が触媒残基の Cys248 が S-スルフヒドリル化された 3MST にのみ結合することがわかり、結晶構造解析から S-スルフヒドリル化された Cys248 の S $\delta$  原子が阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環と硫黄- $\pi$  相互作用しピルビン酸の結合は観察されなかったため、ピルビン酸は硫黄が活性残基に転移されてから脱離し、その後阻害剤が結合したと考えられる。

### 5.2.3 高親和性阻害剤の設計における提案

新規 3MST 阻害剤は解離定数が A、B それぞれ 0.5  $\mu$ M、3.0  $\mu$ M であり、結合力は中程度の阻害剤である。阻害剤として 3MST への結合を高めるには、活性部位の水素結合可能な残基 (Tyr108、Arg197、Ser250) との水素結合の追加、水を介した水素結合を直接の水素結合に変更する官能基への変更、Cys248 の S-スルフヒドリル化を必要としない阻害剤の設計 (Cys248 と直接結合する官能基の導入) などの方法で阻害剤を設計していくことが重要であると考えられる。(図 5-10)

また、新規 3MST 阻害剤は芳香環部分が大きく水溶性が低いため、阻害剤として使用しやすくするため水溶性を高めた構造にする必要がある。

### 5.2.4 他の 3MST や RDS への結合可能性について

ここでは新規 3MST 阻害剤の相同性の高い蛋白質への結合可能性について述べる。立体構造はマウス 3MST-阻害剤 A 複合体を用いる。(図 5-11)

#### 5.2.4.1 新規 3MST 阻害剤のヒト 3MST への結合の可能性について

マウス 3MST で新規 3MST 阻害剤と相互作用する残基はヒト 3MST でも全て保存されており(図 7-3 (A))、蛋白質内での相対的な位置も殆ど同じである。活性部位の立体構造は、ヒトで

は Arg197 側鎖が活性部位ポケット方向を向いているがマウス 3MST では外側(Pro71 主鎖方向)を向いているという違いはあるものの、それ以外に大きな違いはない。また、Arg197 側鎖は溶液中では位置が動きやすいと考えられ、新規 3MST 阻害剤の結合の障害となることは考えにくい。従って、新規 3MST 阻害剤はヒト 3MST に結合すると考えられる。

#### 5.2.4.2 新規 3MST 阻害剤の哺乳類 3MST への結合の可能性について

マウス 3MST はウシ 3MST やヒト 3MST をはじめとする哺乳類の 3MST と相同性が高く、3MP 類似阻害剤との相互作用残基はすべて保存されている(図 7-3 (A))。また、マウス 3MST とヒト 3MST の立体構造はよく一致していた。新規 3MST 阻害剤はマウス 3MST と同様の相互作用でウシ 3MST やヒト 3MST をはじめとする哺乳類の 3MST と相互作用し、阻害効果を示すと考えられる。

マウス 3MST の新規 3MST 阻害剤との相互作用残基は、ウシ 3MST で Pro38 が Ala である以外は主な哺乳類の 3MST で保存されている(図 7-3 (A))ので、マウス 3MST と同様の阻害機構で広く哺乳類の 3MST に阻害、結合すると考えられる。

#### 5.2.4.3 新規 3MST 阻害剤の RDS への結合の可能性について

3MST の属するローダネーゼ/CDC25 ホスファターゼスーパーファミリーの代表的タンパク質である RDS への新規 3MST 阻害剤の結合可能性について述べる。

マウス 3MST-阻害剤 A 複合体と PDB に登録されているウシ RDS (PDB ID 1DP2)の構造を重ね合わせると、阻害剤 A とウシ RDS の Glu72、Tyr108、Asp196、Arg249、Lys250 が接触してしまう(図 5-11 (A))。

新規 3MST 阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は、ウシ RDS の S-スルフヒドリル化した Cys248 と硫黄- $\pi$  相互作用でき、Arg187 と直接、Thr253 と水 1 分子を介して水素結合できる位置にあるものの、ウシ RDS ではマウス 3MST の Tyr108、Ser250 に相当するアミノ酸はそれぞれ Phe107、Lys250 であり、それぞれが 4-ピリミドン骨格部分と形成していた直接または水 1 分子を介した水素結合が形成できない。また、マウス 3MST の Ser109 の位置にあるウシ RDS の Tyr108 は 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環に近接している。また、重ね合わせた図では阻害剤 A の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環と Tyr108、Arg249、Lys250 が接触する位置にある。従って、4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は阻害剤と結合部位に相当する残基との衝突や形成できる水素結合の数の問題でウシ RDS に結合できないと考えられる。(図 5-11 (A))

また、もう一方の芳香環は、Glu72、Asp196 と接触する位置にある。またマウス 3MST で見られたような芳香環と効果的にカチオン- $\pi$  相互作用できる側鎖(Arg249 側鎖、Lys250 側鎖は、マウス 3MST の Arg197 側鎖ほど効果的なカチオン- $\pi$  相互作用を形成できる位置にはない)、スタッキング相互作用できる水素結合(マウス 3MST の Asp73 側鎖と Arg197 側鎖が形成する水素結合)は、芳香環の周囲には存在しない。従って、もう一方の芳香環もウシ RDS と結合に効果的な相互作用を形成できないと考えられる。(図 5-11 (A))

従って、新規 3MST 阻害剤はウシ RDS や、ウシ RDS と相同性の高いローダネーゼに結合できないと考えられる。実際篠倉の論文ではウシ RDS の活性を抑制しない[61]ことが述べられており、新規 3MST 阻害剤がウシ RDS に結合しないことが立体構造から明らかにできたと考えられる。

新規 3MST 阻害剤の骨格を基にウシローダネーゼと相同性の高い RDS に対する高親和性阻害剤を設計する場合、Arg249、Lys250 と接触する 4-ピリミドン骨格の代わりに、S-スルフヒドリル化された Cys248 と硫黄- $\pi$  相互作用できるような芳香環または Cys248 と共有結合できる官能基を持つ構造で、かつ Tyr108、Arg187 と直接、Thr253 と直接または水 1 分子を介して水素結合できるような構造に変更することが必要であると考えられるので、4-ピリミドン骨格は変更が不可避であると考えられる。また、もう一方の芳香環の周囲には、Glu72、Asp196、Arg249 が存在する。仮に Arg249 側鎖が Glu72 もしくは Asp196 の側鎖と水素結合を形成した場合、スタッキング相互作用できる位置に阻害剤の芳香環が存在すれば相互作用することが可能である。従って、Arg249 側鎖と Glu72 もしくは Asp196 の側鎖が形成する水素結合ネットワークとスタッキング相互作用できる位置に芳香環を持つような阻害剤を設計することが重要であると考えられる。結合力が弱い場合は、さらに水素結合できる官能基などを導入するのも必要と考えられる。

#### 5.2.4.4 新規 3MST 阻害剤の森林型熱帯リーシュマニア 3MST への結合可能性について

森林型熱帯リーシュマニア 3MST への新規 3MST 阻害剤の結合可能性について述べる。(図 5-11 (B))

新規 3MST 阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は、森林型熱帯リーシュマニア 3MST の S-スルフヒドリル化された Cys253 と硫黄- $\pi$  相互作用でき、Arg185、Ser255 と直接、Thr258 と水 1 分子を介して水素結合できる位置にある。しかし、森林型熱帯リーシュマニア 3MST ではマウス 3MST の Tyr108 に相当するアミノ酸は Met108 (PDB ではセレノメチオニンに置換された構造が登録されている)であり、4-ピリミドン骨格部分と形成していた水 1 分子を介した水素結合が形成できない。そのため、4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は阻害剤と森林型熱帯

リーシュマニア 3MST が形成できる水素結合の数の減少で結合力が少し落ちている可能性がある。なお、重ね合わせた図(図 5-11 (B))では阻害剤 A と Leu37、Arg74、His75 が接触する位置にあるものの、仮に阻害剤が森林型熱帯リーシュマニア 3MST に重ね合わせた図とほぼ同じ形式で結合する場合は接触しない位置に側鎖の位置が移動すると考えられる。

一方、もう一方の芳香環は、森林型熱帯リーシュマニア 3MST の蛋白質表面の溶媒側に大きく露出した位置に存在する。マウス 3MST で見られたような芳香環とスタッキング相互作用できる水素結合は、芳香環の周囲には存在しない(Arg74 側鎖の位置が移動すれば芳香環とカチオン- $\pi$  相互作用が形成できる可能性はある)。従って、もう一方の芳香環は森林型熱帯リーシュマニア 3MST への結合力に大きく寄与しない可能性が高いと考えられる。

従って、新規 3MST 阻害剤は森林型熱帯リーシュマニア 3MST や、森林型熱帯リーシュマニア 3MST と相同性の高い 3MST への結合力は弱いと考えられる。

新規 3MST 阻害剤の骨格を基に森林型熱帯リーシュマニア 3MST に対する高親和性阻害剤を設計する場合、S-スルフヒドリル化した Cys253 と硫黄- $\pi$  相互作用できるような芳香環または Cys253 と共有結合できる官能基を持つ構造で、かつ Arg185、Ser255 と直接、Thr258 と直接または水 1 分子を介して水素結合できるような構造を持つ阻害剤を設計することが重要であると考えられる。マウス 3MST の Tyr108 に相当する残基との水素結合が失われているため、Met108 との相互作用が形成できる構造の検討の必要もあると考えられる。また、Arg74 側鎖が 4-ピリミドン骨格を持った芳香環と水素結合が可能な位置に存在するので、Arg74 側鎖と水素結合できるような構造にするのも効果的であると考えられる。Tyr35 側鎖と阻害剤との水素結合の形成が可能であれば Tyr35 側鎖との水素結合を形成できる構造にするのも一案である。

もう一方の芳香環は森林型熱帯リーシュマニア 3MST との相互作用を形成しない可能性が高いと考えられるので構造を大きく変える必要がある。近くの水素結合可能な残基(Tyr35、Leu37、Asp61、Arg74、His75、Ala195、Lys197)との直接または水分子を介した水素結合の形成を中心に阻害剤を設計したり、Arg74 とカチオン- $\pi$  相互作用できる構造にするなどの必要があると考えられる。結合に重要でなければもう一方の芳香環に相当する構造は全くなくしてしまうのも一案である。結合力が弱い場合は、さらに水素結合できる官能基などを導入するのも必要と考えられる。

#### 5.2.4.5 新規 3MST 阻害剤の SseA への結合可能性について

SseA への新規 3MST 阻害剤の結合可能性について述べる。

SseA の活性部位は S-スルフヒドリル化された Cys238 を保存配列のループ部分が覆うような構造が登録されており、マウス 3MST-阻害剤 A 複合体の A 鎖同士を SSM 方式で重ね合わせると、阻害剤 A は Pro66、His67、Gly239、Ser240、Gly241、Val242 と接触する位置にある。しかし、3 章で述べたように活性部位の保存配列のループは可変であると推測される。従って、活性部位はマウス 3MST とほぼ同様のコンフォメーションを取ったと仮定して議論する。

新規 3MST 阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は、SseA の S-スルフヒドリル化された Cys238 と硫黄- $\pi$  相互作用でき、Arg179、Ser240 と直接、Thr243 と水 1 分子を介して水素結合できると考えられるものの、SseA ではマウス 3MST の Tyr108 に相当するアミノ酸は Phe99 であり、4-ピリミドン骨格部分と形成していた水 1 分子を介した水素結合が形成できない。従っ

て、4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は阻害剤と SseA が形成できる水素結合の数の減少で SseA への結合力が少し弱いと考えられる。

また、もう一方の芳香環は、SseA の蛋白質表面の溶媒側に大きく露出した位置に存在することになる。マウス 3MST で見られたような芳香環とスタッキング相互作用できる水素結合は、芳香環の周囲には存在しない(スタッキング相互作用できる可能性がある芳香環は His67 側鎖のみである)。また、カチオン- $\pi$  相互作用が形成可能である塩基性残基も存在しない。

SseA は Pro187-Gly190 のアミノ酸が欠けた構造が登録されているので、マウス 3MST で新規 3MST 阻害剤と相互作用していた Arg197 に相当する SseA の Arg188 のコンフォメーションは明らかではないものの、Asp73 に相当する残基は Pro66 であるため、SseA の Arg188 側鎖は酸性アミノ酸の側鎖との水素結合を形成できず、新規 3MST 阻害剤の結合に関与できないと考えられる。従って、もう一方の芳香環は SseA への結合力に殆ど寄与しないと考えられる。

従って、新規 3MST 阻害剤は SseA への結合力は弱いと考えられる。

新規 3MST 阻害剤の骨格を基に SseA に対する高親和性阻害剤を設計する場合、S-スルフヒドリル化された Cys238 と硫黄- $\pi$  相互作用できるような芳香環または Cys238 と共有結合できる官能基を持つ構造で、かつ Arg179、Ser240 と直接、Thr243 と直接または水 1 分子を介して水素結合できるような構造を持つ阻害剤を設計することが重要であると考えられる。マウス 3MST の Tyr108 に相当する残基との水素結合が失われているため、Ser30 との直接または水 1 分子を介した相互作用が形成できる構造の検討の必要もあると考えられる。もう一方の芳香環は SseA との相互作用を形成しない可能性が高いと考えられるので構造を大きく変える必要がある。近くの水素結合可能な残基(Glu56、His67、Val184、Asp185、Glu186)との直接または水

分子を介した水素結合の形成を中心に阻害剤を設計するなどの必要があると考えられる。芳香環は残す必要がない可能性が大きいと考えられる。

### 5.2.5 硫黄- $\pi$ 相互作用について

新規 3MST 阻害剤は 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環が S-スルフヒドリル化されたシステインに結合していた。今回得られた結晶構造では S-スルフヒドリル化された Cys248 S $\delta$  が水素を結合しているかどうか判断できなかったが、Cys248 S $\delta$  の水素の結合によって相互作用のエネルギーが変わる可能性が高い。硫黄と  $\pi$  電子の相互作用はベンゼンでは硫化水素で  $-2.64 - -0.74$  kcal/mol[80]、メタンチオールで  $-3.71 - -1.50$  kcal/mol[83]であり、いずれも硫黄と共有結合する水素が  $\pi$  電子と相互作用するほど強い。一方で、s-トリアジンでは塩化物イオンとの相互作用は  $-5.22$  kcal/mol でリチウムイオンとの相互作用  $-6.17$  kcal/mol に匹敵し[84]、イソシアヌル酸では塩化物イオンとの相互作用は  $-15$  kcal/mol 程度[85]であることから、水素が結合していなくても強い負電荷を持てば相互作用エネルギーが結合に十分であるかもしれない。Cys248 S $\delta$  の水素の結合の有無については計算科学的な側面からの評価も有効と考えられる。

### 5.2.6 新規 3MST 阻害剤の結合に関する水素の寄与について

今回の結晶構造解析では水素の位置を正確に決定できたわけではないので阻害剤の結合への水素の寄与についてはっきりとは述べなかったが、阻害剤の結合に水素原子が無視できないほど寄与している可能性がある。Trp36 C $\eta$ 2 に結合した水素原子は新規 3MST 阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持たない芳香環(阻害剤 A のナフタレン骨格の特に C8-12, 17 の部分や阻害剤 B の特に N3, C11, 12, 15, O3 の部分)と CH- $\pi$  相互作用していると考えられる位置にあるはずであり、Leu38 C $\delta$ 2 に結合した水素は位置によっては 4-ピリミドン骨格との CH- $\pi$  相互作用が強ま



るであろう。Val252 C $\beta$  や Leu38 C $\gamma$  に結合した水素は阻害剤 B の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環(特に C3-8 の部分)との CH- $\pi$  相互作用が考えられる位置にある。CH- $\pi$  相互作用は弱い相互作用の一種であるが、動的な環境である溶液中などでは蛋白質と阻害剤の相互作用にある程度寄与している可能性も考えられる。新規 3MST 阻害剤のマウス 3MST への結合には非共有結合性の相互作用の寄与がかなり大きいことを考えると、新規 3MST 阻害剤の 3MST への結合への水素の寄与は無視できないかもしれない。

従って、マウス 3MST の新規 3MST 阻害剤への結合の評価には水素原子の寄与まで含めた評価が必要かもしれない。結合の評価には計算科学的な手法の利用も有効であると考えられる。

## 5.2.7 その他

### 5.2.7.1 ITC で新規 3MST 阻害剤が 3MST に 50%程度しか結合しなかった理由について

3MST は 3MP の硫黄をチオールに転移させる酵素であるが、3MP 自体チオールであり、硫黄の供与基質となるとともに受容基質にもなる。従って、触媒残基に結合した硫黄は常に 3MP に転移される可能性を持っている。従って、触媒残基を 100% S-スルフヒドリル化された 3MST の調製は難しいと考えられる。触媒残基を S-スルフヒドリル化した 3MST への新規 3MST 阻害剤の結合率が 50%程度であったのはこのような理由からと推測している。

### 5.2.7.2 酵素反応の 1 段階目を阻害する化合物が見つからなかった理由について

酵素反応の 1 段階目を阻害する化合物が見つからなかったことは、1 段階目を阻害する化合物はスクリーニングの過程で排除されるか、そもそも阻害効果が弱かったためと考えられる。3MST は触媒残基が Cys であり、1 段階目を阻害する化合物の中にはチオールや硫化水素との

反応性を有する可能性が高い物質が含まれていると考えられる。新規 3MST 阻害剤を発見したスクリーニングでは 3MP や DTT、硫化水素と反応する物質を排除している[61]ので、1 段階目を阻害する化合物はこの段階で相当数排除されてしまったと思われる。また、ウシ 3MST はミカエリス定数が 4.08 mM との報告もあり[58]、基質の結合力自体高い酵素ではない。今回結合様式が明らかになった 3MP 類似阻害剤も阻害定数は数 mM 以上[58], [59]であり、これまで反応性の低い物質で阻害効果が高い物質の報告がなかったことから、3MST の活性部位には非共有結合性の相互作用で結合するのが難しいのであろう。

#### 5.2.7.3 酵素反応の 2 段階目を阻害する阻害剤について

新規 3MST 阻害剤は酵素反応の 2 段階目を阻害する阻害剤であり、類例の少ない阻害剤である。このような阻害剤の利用可能性として、酵素反応の 2 段階目の影響を調べるときに使用できると考えられる。阻害剤を加えてから短時間であれば、主に酵素反応の 2 段階目を阻害したことによる影響が観察されるかもしれない。このような阻害剤は、酵素反応の各段階の影響を調べる際に有効になる可能性がある。

#### 5.2.7.4 他の硫化水素産生酵素についての考察

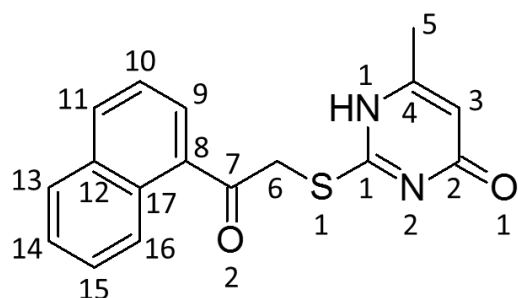
他の硫化水素産生酵素である CBS、CSE は PLP を補欠分子族として持つ酵素で、PLP 周辺で酵素反応が進行すると考えられている。篠倉は新規 3MST 阻害剤が CBS や CSE を阻害しないと述べている[61]。この理由について蛋白質の立体構造から考察する。ヒト CBS やヒト CSE の活性部位付近の構造を見ると、マウス 3MST の活性部位付近と大きく異なる構造をしている。また、新規 3MST 阻害剤での特徴的な相互作用残基に相当する残基(S-スルフヒドリ

ル化すると思われる Cys、水素結合を形成しそうな Arg と Asp の組)を持たない。従って、CBS や CSE には新規 3MST 阻害剤は結合する可能性が低いと考えられる。

現在、硫化水素産生酵素のうち CSE を選択的に阻害する阻害剤は複数存在するものの、これまで CBS の阻害剤として使用されてきたアミノオキシ酢酸は CSE 阻害効果がより強いことが最近明らかとなり[86]、現在のところ CBS を選択的に阻害する阻害剤はない。ヒト CBS とヒト CSE の活性部位付近の立体構造は類似しておらず、CBS や CSE の阻害剤は PLP や活性部位の残基との反応性や相互作用によって阻害効果を発揮していると考えられる。

※ QIPISA の計算結果は、リガンドの名前を変更すると異なる値を出すことが後に判明した。プログラムのバグなどがあるかもしれない。

(A)



(B)

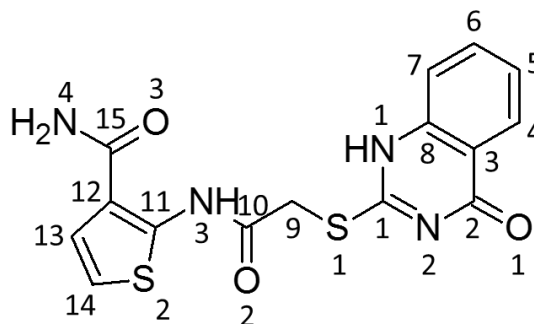


図 5-1 新規 3MST 阻害剤の構造式

(A) 阻害剤 A (B) 阻害剤 B

阻害剤 A: 4(3H)-Pyrimidinone, 6-methyl-2-[[2-(1-naphthalenyl)-2-oxoethyl]thio]-

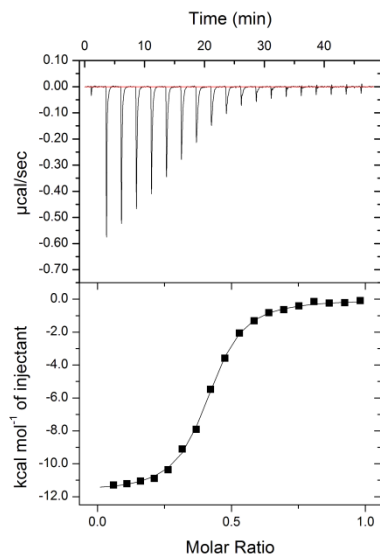
阻害剤 B: 3-Thiophenecarboxamide, 2-[[2-[(3,4-dihydro-4-oxo-2-quinazoliny)thio]acetyl]amino]-

原子の上または下に各原子を区別するための番号を記す。

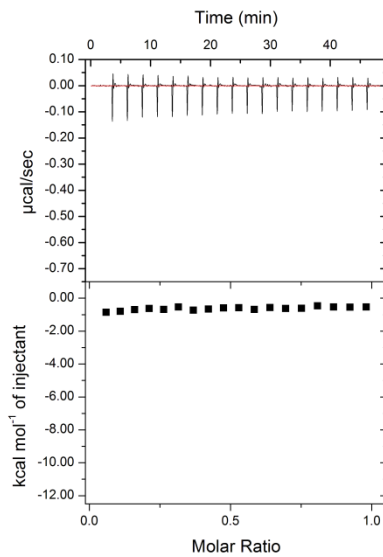
表 5-1 ITC 実験による Cys248 に硫黄を結合させた 3MST と阻害剤の結合に関するパラメータ

	阻害剤A	阻害剤B
N	0.41	0.56
$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	0.52	3.03
$\Delta H$ (kcal/mol)	-11.76	-9.37
$\Delta S$ (cal/mol/deg)	-10.63	-6.15

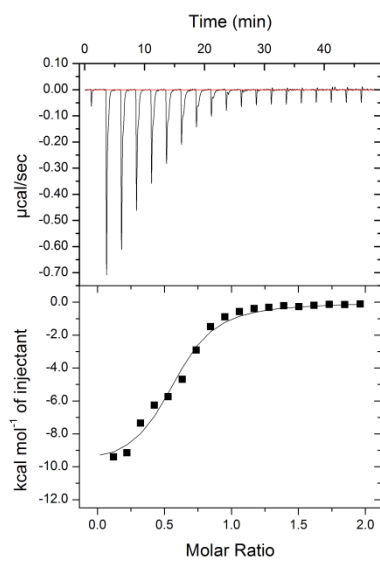
(A)



(B)



(C)



(D)

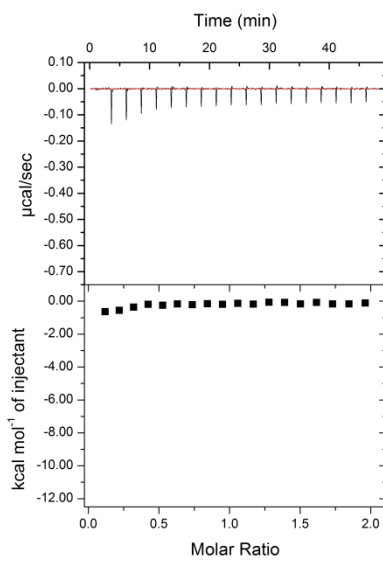


図 5-2 ITC による分析

- (A) Cys248 に硫黄を結合させた 3MST に阻害剤 A を滴下した時のグラフ
- (B) Cys248 に硫黄を結合させなかった 3MST に阻害剤 A を滴下した時のグラフ
- (C) Cys248 に硫黄を結合させた 3MST に阻害剤 B を滴下した時のグラフ
- (D) Cys248 に硫黄を結合させなかった 3MST に阻害剤 B を滴下した時のグラフ

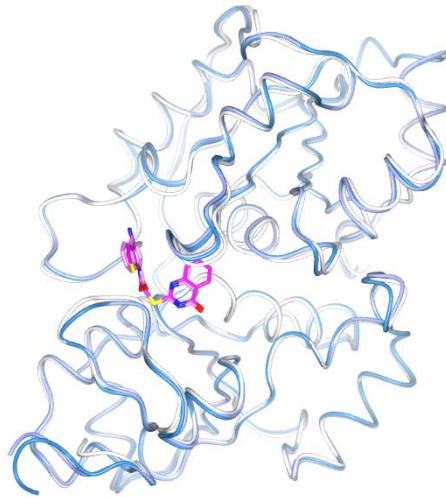
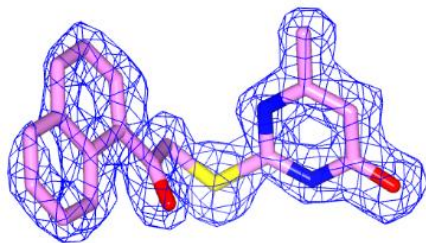


図 5-3 マウス 3MST 阻害剤非結合型とマウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の比較(ワーム表示)

SSM 方式による重ね合わせ。

マウス 3MST-阻害剤 A 複合体(空色)、マウス 3MST-阻害剤 B 複合体(藤色)、阻害剤非結合型(白)、阻害剤 A(ピンク)、阻害剤 B(マゼンタ)を表示。

(A)



(B)

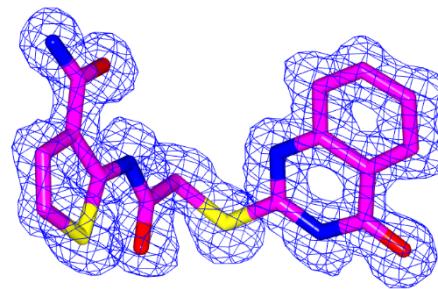


図 5-4 結晶構造中での (A) 阻害剤 A と (B) 阻害剤 B のオミットマップ  
オミットマップ( $F_o - F_c$  3.0  $\sigma$ (+)) (青網)、阻害剤 A(ピンク)、阻害剤 B(マゼンタ)を表示。

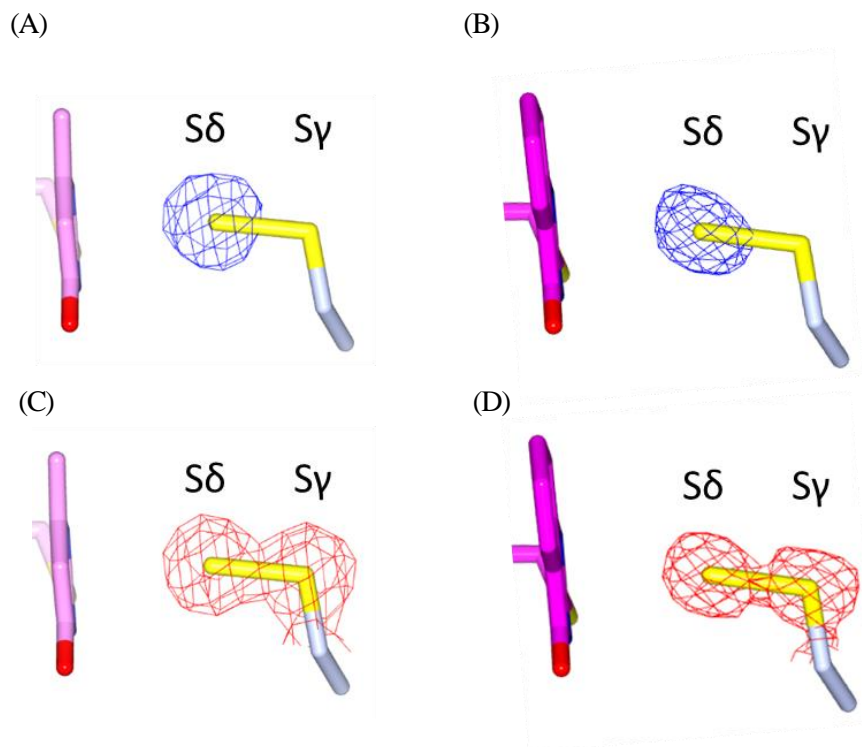


図 5-5 結晶構造中での電子密度マップ

- (A) 3MST-阻害剤 A 複合体中の  $S\delta$  原子のオミットマップ
  - (B) 3MST-阻害剤 B 複合体中の  $S\delta$  原子のオミットマップ
  - (C) 3MST-阻害剤 A 複合体中の  $S\gamma$  原子と  $S\delta$  原子の電子密度マップ
  - (D) 3MST-阻害剤 B 複合体中の  $S\gamma$  原子と  $S\delta$  原子の電子密度マップ
- 4-ピリミドン骨格周辺の様子。

オミットマップ( $F_o - F_c$  3.0  $\sigma$  (+)) (青網)、電子密度マップ( $2F_o - F_c$  1.5  $\sigma$ ) (赤網)、阻害剤 A (ピンク)、阻害剤 B (マゼンタ)、Cys248 側鎖と  $S\delta$  原子(薄青)を表示。硫黄原子は黄色で表示。

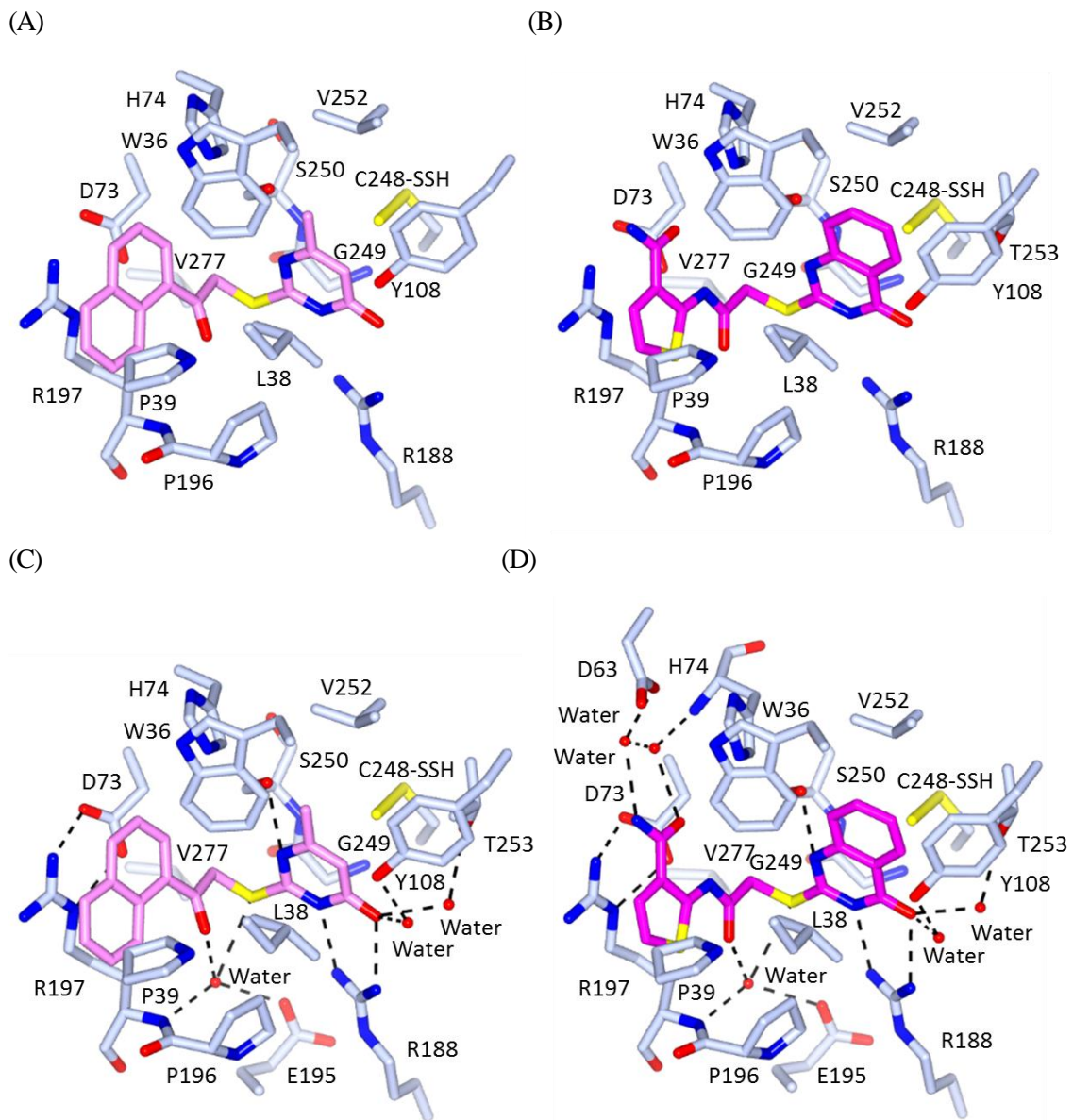


図 5-6 新規 3MST 阻害剤の認識様式

(A) マウス 3MST-阻害剤 A 複合体 (ファンデルワールス相互作用する残基のみ)  
 (B) マウス 3MST-阻害剤 B 複合体 (ファンデルワールス相互作用する残基のみ)  
 (C) マウス 3MST-阻害剤 A 複合体 (水 1 分子を介した水素結合する残基まで)  
 (D) マウス 3MST-阻害剤 B 複合体 (水 1 分子を介した水素結合する残基まで)  
 マウス 3MST(薄青)、阻害剤 A(ピンク)、阻害剤 B(マゼンタ)、水分子(赤球)、水素結合(点線)を表示。



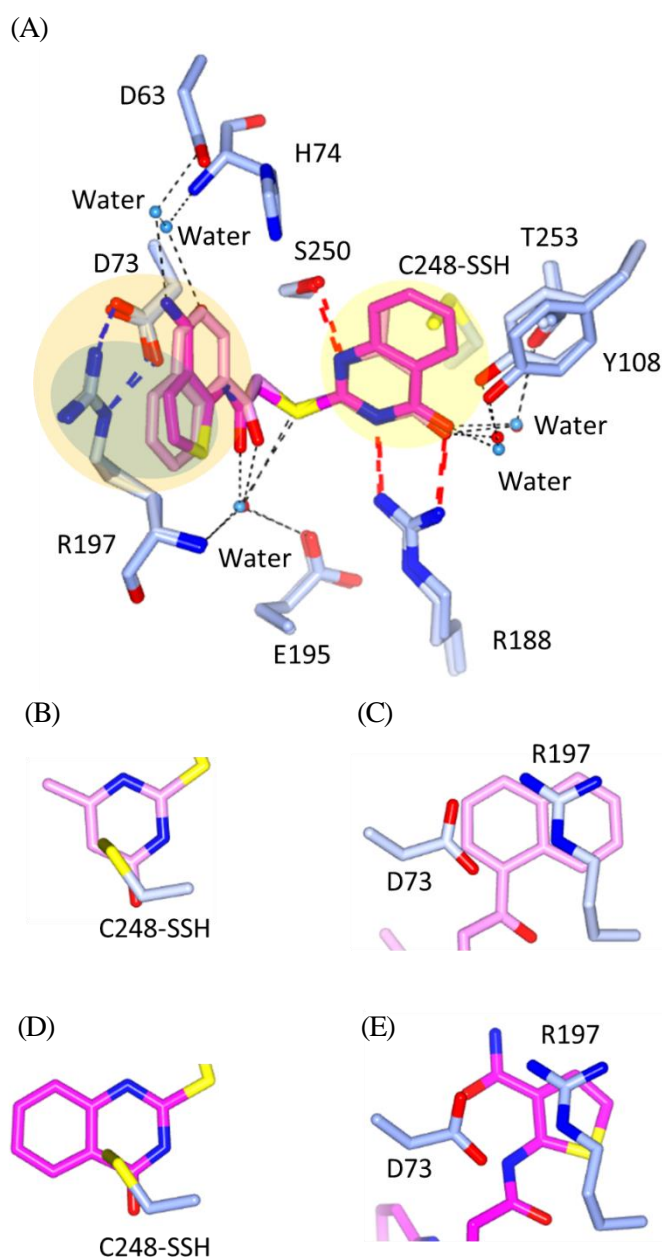


図 5-7 マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤が形成する特徴的な相互作用

(A) ファンデルワールス相互作用以外の相互作用

(硫黄- $\pi$  相互作用(黄色円)、カチオン- $\pi$  相互作用(青色円)、スタッキング相互作用(橙色円)、水素結合(点線(4-ピリミドン-残基間(赤)、D73-R197 間(青)、その他(黒)))

(B) 阻害剤 A 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環と、C248-SSH の位置関係

(C) 阻害剤 A の 4-ピリミドン骨格を持たない芳香環と、D73、R197 の位置関係

(D) 阻害剤 B の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環、C248-SSH の位置関係

(E) 阻害剤 B の 4-ピリミドン骨格を持たない芳香環と、D73、R197 の位置関係

マウス 3MST-阻害剤 A 複合体(薄青)、マウス 3MST-阻害剤 B 複合体(藤色)、阻害剤 A(ピンク)、阻害剤 B (マゼンタ)、水分子(マウス 3MST-阻害剤 A 複合体) (赤球)、水分子(マウス 3MST-阻害剤 B 複合体) (空色)。

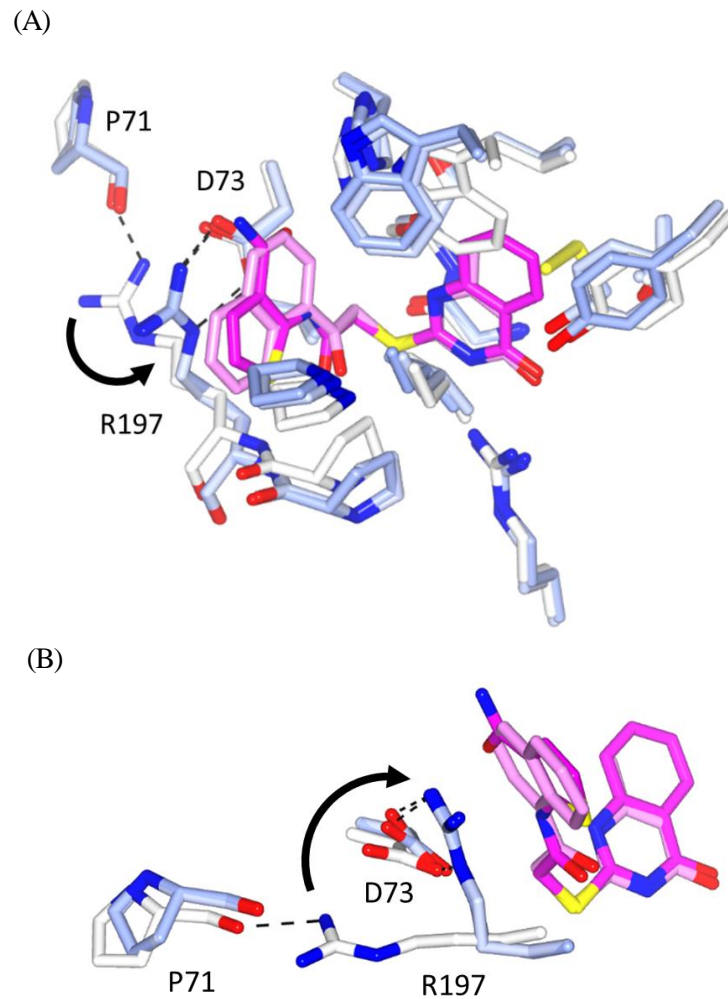


図 5-8 マウス 3MST 阻害剤非結合型とマウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の比較 (結合部位の円筒表示)

(A) 蛋白質表面側からの表示

(B) 新規 3MST 阻害剤、Pro71、Asp73、Arg197 のみ別方向からの表示

SSM 方式による A 鎖同士の重ね合わせ。

マウス 3MST-阻害剤 A 複合体(薄青)、マウス 3MST-阻害剤 B 複合体(藤色)、阻害剤非結合型(白)、阻害剤 A (ピンク)、阻害剤 B (マゼンタ)、Arg197 側鎖が形成する水素結合(点線)を表示。

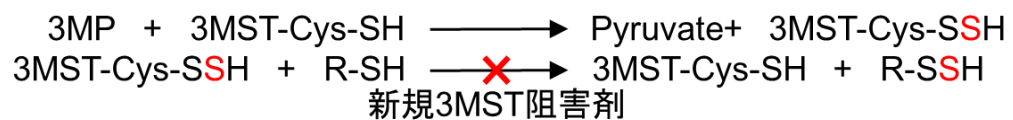


図 5-9 新規 3MST 阻害剤の酵素反応阻害段階

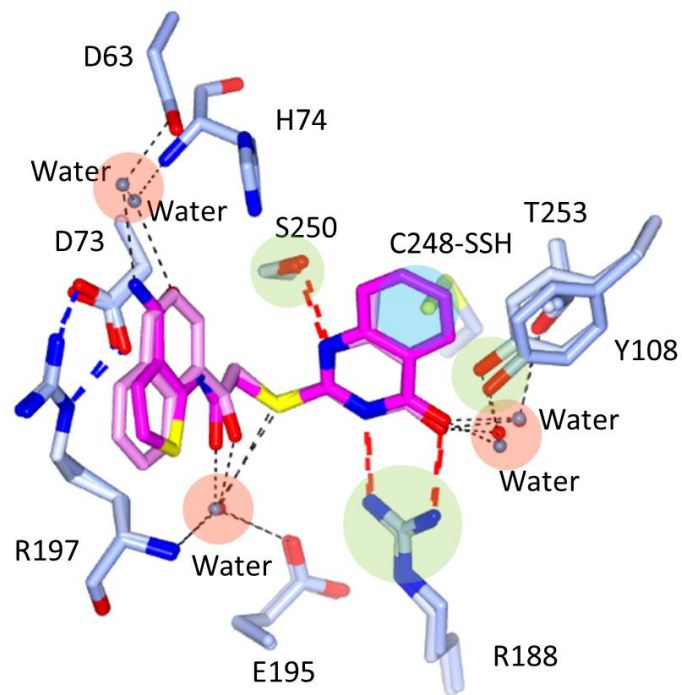
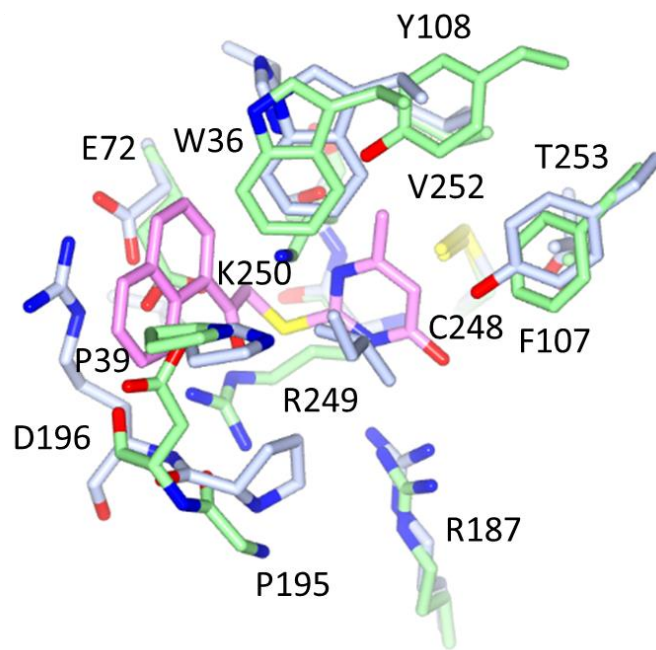


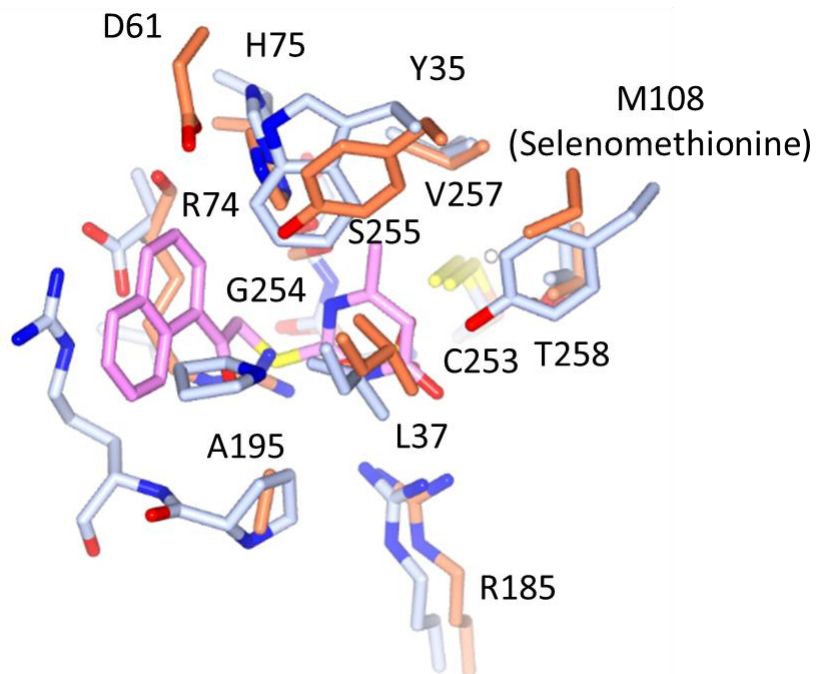
図 5-10 高親和性阻害剤の設計における提案

- 黄緑の円の部分の残基(Tyr108、Arg188、Ser250)と阻害剤との相互作用を強固にするため、さらに水素結合できるように官能基の導入や骨格の変更を検討すべき
- 赤円の部分の水1分子を介した水素結合に関与している水分子の部分に、蛋白質と直接水素結合するような官能基の導入を検討すべき
- 水色の円の部分の硫黄- $\pi$ 相互作用する硫黄の部分に、硫黄が存在しなくても Cys248 に結合できるように官能基の導入を検討すべき

(A)



(B)



(C)

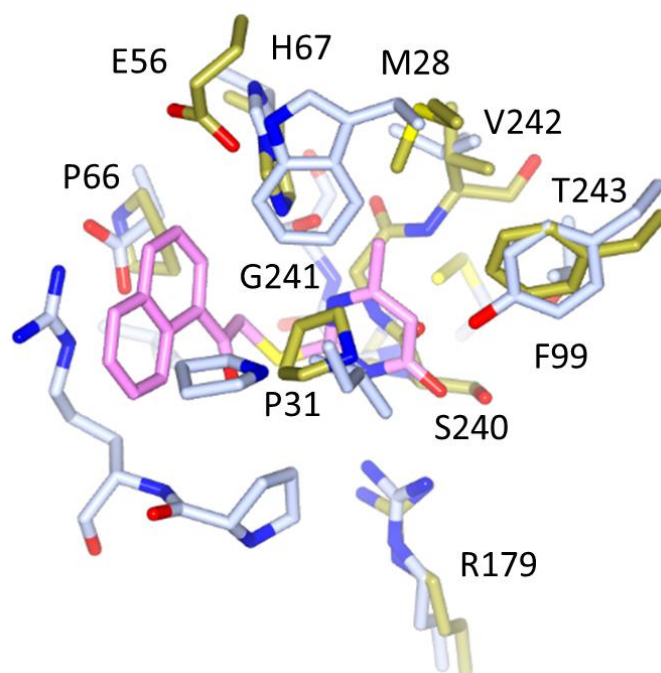


図 5-11 マウス 3MST-阻害剤 A 複合体と相同性の高い蛋白質の比較(SSM 方式による重ね合わせ)

(A) ウシ RDS (PDB ID 1RHS) (黄緑)との重ね合わせ

(B) 森林型熱帯リーシュマニア 3MST(PDB ID 1OKG) (オレンジ)との重ね合わせ

(C) SseA (PDB ID 1URH) (金)との重ね合わせ

残基番号はマウス 3MST 以外のものを記す。

## 6 総括

---

### 6.1 阻害剤結合様式の決定に X 線結晶構造解析を用いる意義

3MST が触媒する反応は 2 基質反応であり、しかも硫黄の供与基質である 3MP がチオールであり受容基質にもなりうることから阻害剤の阻害機構を生化学的に決定するのは容易ではない。また、変異体を用いる方法では酵素の活性残基の特定までは可能だが阻害剤との相互作用残基の決定は難しい。3MP 類似阻害剤はヒト 3MST-ピルビン酸複合体のピルビン酸の結合位置に結合していたものの、相互作用様式は特に AKG で異なり、活性部位のより触媒残基側の残基と水素結合し、2MPA は S 体が活性部位に結合することが結晶構造解析により明らかになった。また、新規 3MST 阻害剤は X 線結晶構造解析により硫黄が結合した Cys248 によって認識され、硫黄- $\pi$ 、カチオン- $\pi$ 、スタッキングなどの特徴的な相互作用を通して特異的に認識されていることが明らかとなった。このように、阻害剤の具体的な阻害機構を明らかにするには X 線結晶構造解析が非常に有効であるといえる。

### 6.2 まとめと今後の展望

今回の研究では、マウス 3MST の阻害剤非結合型およびマウス 3MST-阻害剤複合体の結晶構造を決定することができ、3MP 類似阻害剤と新規 3MST 阻害剤のそれぞれのマウス 3MST への結合様式が明らかになった。

3MP 類似阻害剤は 3MST のピルビン酸の結合部位とほぼ同じ部分に結合し、3MST が担う酵素反応の 1 段階目である 3MP から触媒残基の Cys への硫黄転移反応から阻害することが示唆された。

新規 3MST 阻害剤の 3MST への結合には触媒残基の Cys が S-スルフヒドリル化されていることが不可欠であることが ITC 実験から明らかになり、X 線結晶構造解析を通じて新規 3MST 阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環と S-スルフヒドリル化された触媒残基の S $\delta$  原子が硫黄- $\pi$  相互作用することが明らかになった。また、阻害剤の結合様式から新規 3MST 阻害剤が 3MST の担う酵素反応の 2 段階目である触媒残基の Cys からチオールへの硫黄転移反応を阻害することが明確になった。酵素反応の 2 段階目を阻害する阻害剤というユニークな阻害剤であることも明らかにできた。

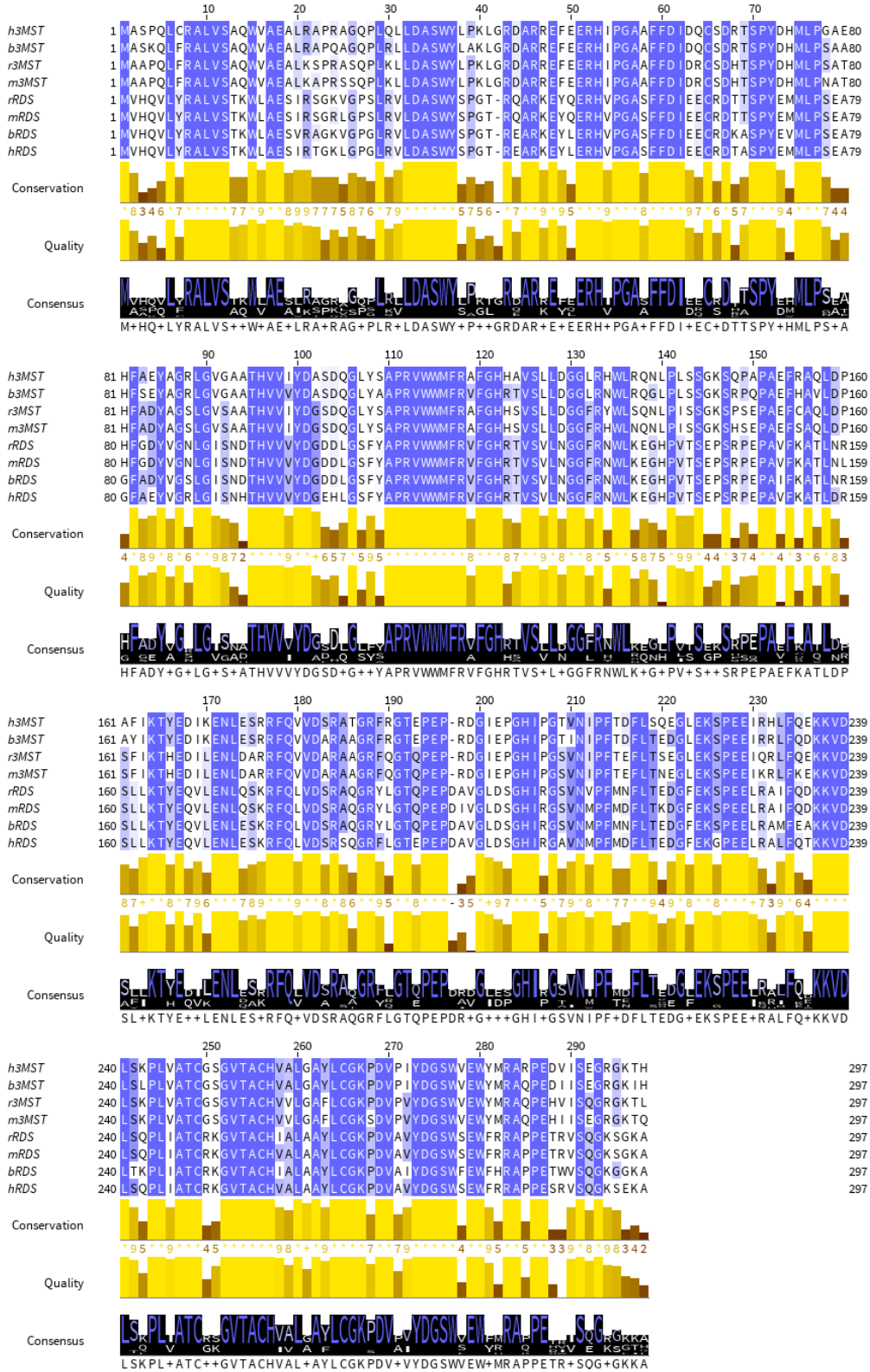
また、X 線結晶構造解析から、新規 3MST 阻害剤の共通骨格である 4-ピリミドン骨格は、3MST と硫黄- $\pi$  相互作用および水素結合を形成し、別の芳香環が Arg 側鎖とカチオン- $\pi$  相互作用を形成しかつ Arg と Asp の塩橋によって形成された水素結合ネットワークとスタッキング相互作用を形成することが明らかになった。今回の研究で 3MST の更なる高親和性阻害剤の設計に重要と考えられる相互作用についての知見を得られたのは大きな成果である。

一方で、新規 3MST 阻害剤の骨格のうち、芳香環を結ぶカルボニル-硫黄の骨格の役割は依然不明のままである。この骨格の重要性については、構造活性相関や計算科学的な手法を通じた評価によって明らかにしていくことが必要であると考えられる。

今後は、SBDD や *in vivo* スクリーニングなども導入しながら 3MST の阻害剤設計を進めていくことで、3MST に特異的な阻害剤の創出が可能になると考えられる。

## 7 補足情報・略語など

(A)





(B)

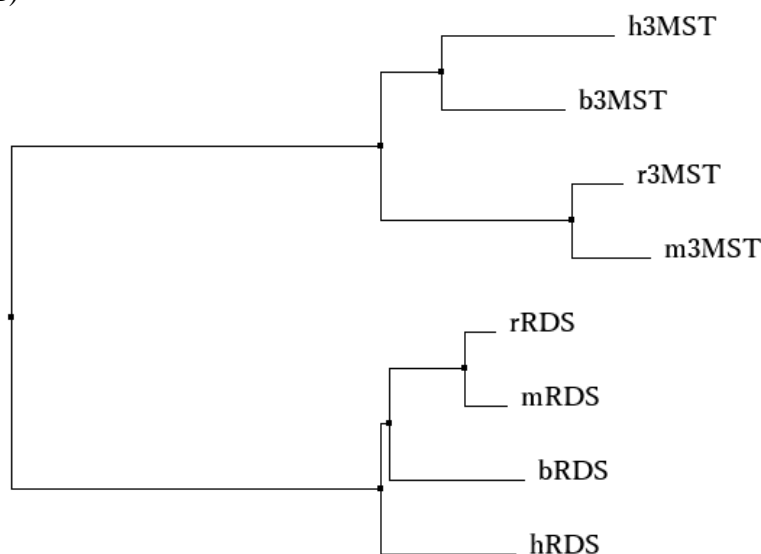


図 7-1 主な哺乳類の 3MST と RDS の(A)配列アライメントと(B)分子系統樹

ヒト(h3MST (UniProtKB 受入番号 P25325), hRDS (UniProtKB 受入番号 Q16762))、ウシ(b3MST (UniProtKB 受入番号 Q3MHG3), bRDS (UniProtKB 受入番号 P00586))、ラット(r3MST (UniProtKB 受入番号 P97532), rRDS (UniProtKB 受入番号 P24329))、マウス(m3MST (UniProtKB 受入番号 Q505N7), mRDS (UniProtKB 受入番号 P52196))。

保存度の高い残基ほど濃い紫で示す。アライメントは ClustalX2.1、表示は Jalview を使用。

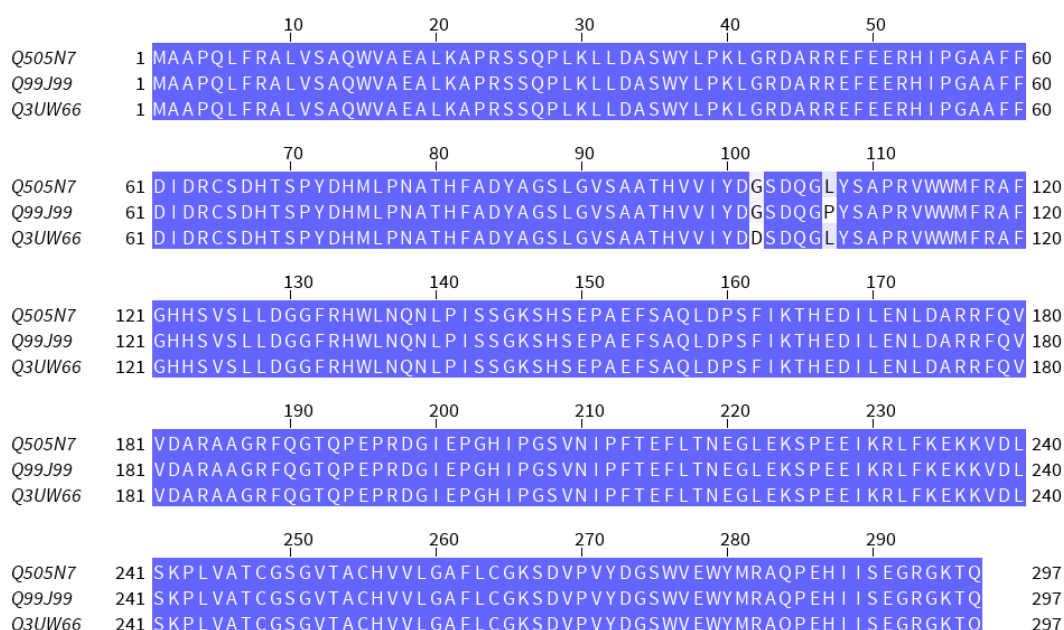
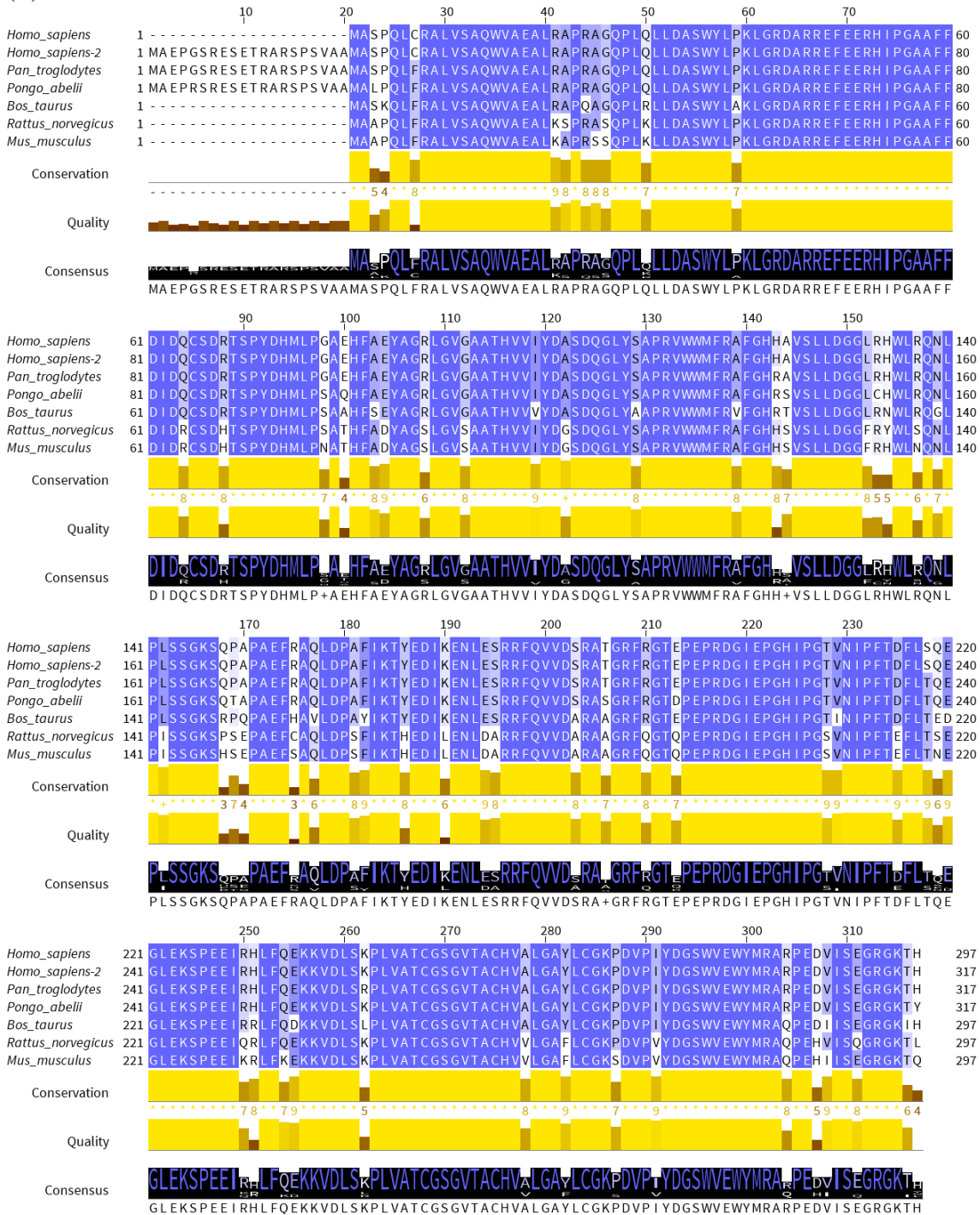


図 7-2 マウス 3MST の多型のアミノ酸配列アライメント

それぞれの多型を UniProtKB 受入番号で示す。保存度の高い残基ほど濃い紫で示す。アライメントは ClustalX2.1、表示は Jalview を使用。

(A)



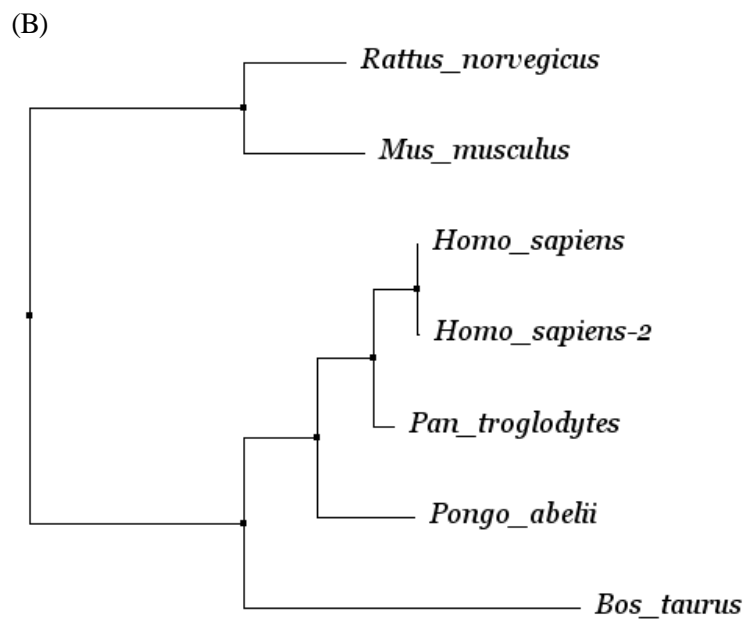


図 7-3 主な哺乳類の 3MST の(A)配列アライメントと(B)一致度を基にした分子系統樹

ヒト *Homo sapiens* (UniProtKB 受入番号 P25325, P25325-2)、チンパンジー *Pan troglodytes* (UniProtKB 受入番号 H2QLL3)、スマトラオランウータン *Pongo abelii* (UniProtKB 受入番号 H2P498)、ウシ *Bos taurus* (UniProtKB 受入番号 Q3MHG3)、ラット *Rattus norvegicus* (UniProtKB 受入番号 P97532)、マウス *Mus musculus* (UniProtKB 受入番号 Q505N7)。

ヒトのイソ型は「-2」をつけて示す。保存度の高い残基ほど濃い紫で示す。アライメントは ClustalX2.1、表示は Jalview を使用。

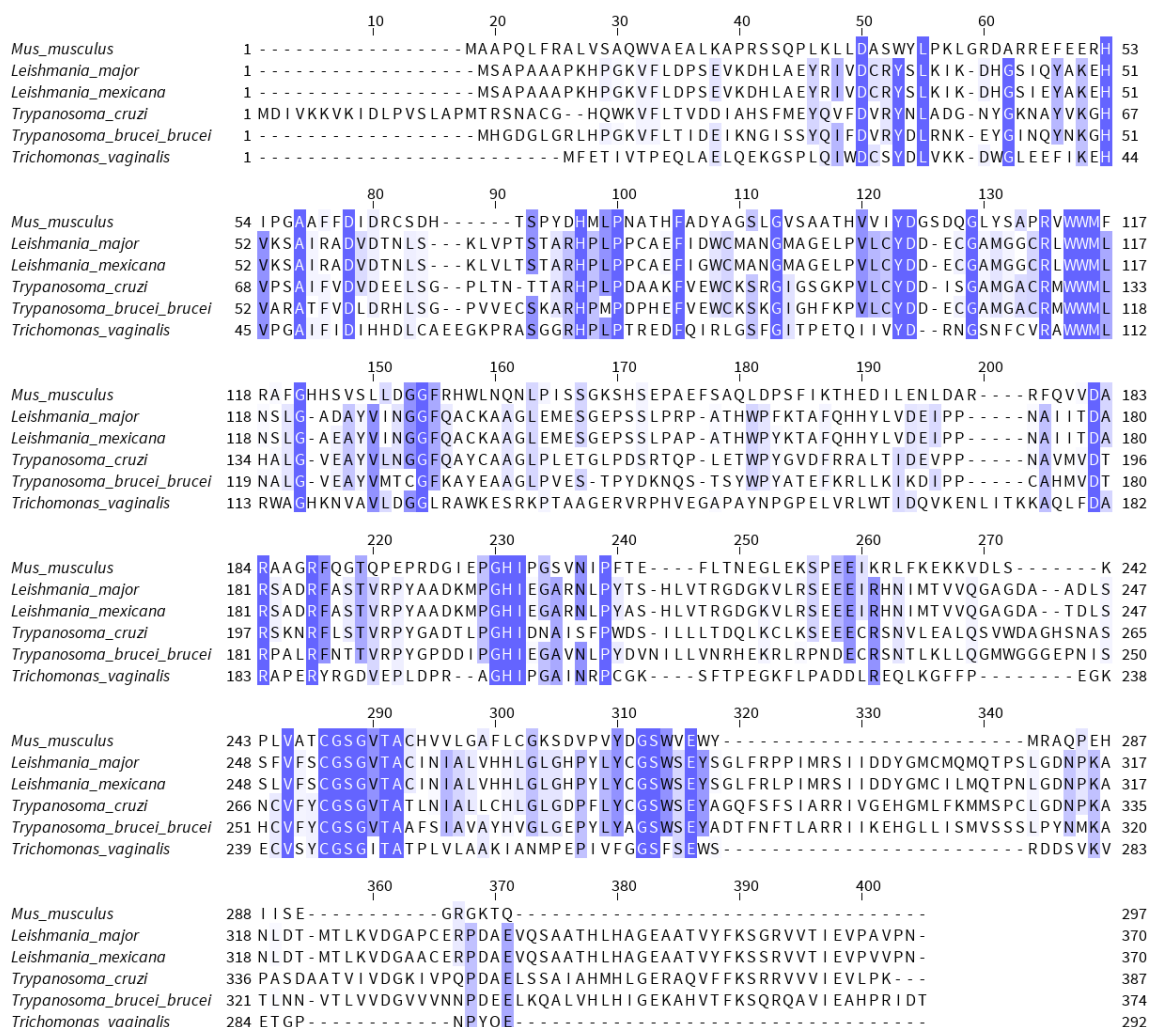


図 7-4 マウスと寄生虫の 3MST のアミノ酸配列アライメント

マウス *Mus musculus* (UniProtKB 受入番号 Q505N7)、森林型熱帯リーシュマニア *Leishmania major* (UniProtKB 受入番号 Q7K9G0)、メキシコリーシュマニア *Leishmania mexicana* (UniProtKB 受入番号 Q8T381)、クルーズトリパノソーマ *Trypanosoma cruzi* (UniProtKB 受入番号 Q4DV84)、ブルーストリパノソーマ *Trypanosoma brucei brucei* (UniProtKB 受入番号 Q582K7)、膾トリコモナス *Trichomonas vaginalis* (UniProtKB 受入番号 A2DI79)。

保存度の高い残基ほど濃い紫で示す。アライメントは ClustalX2.1、表示は Jalview を使用。結晶構造では対応する残基が異なるものもある。

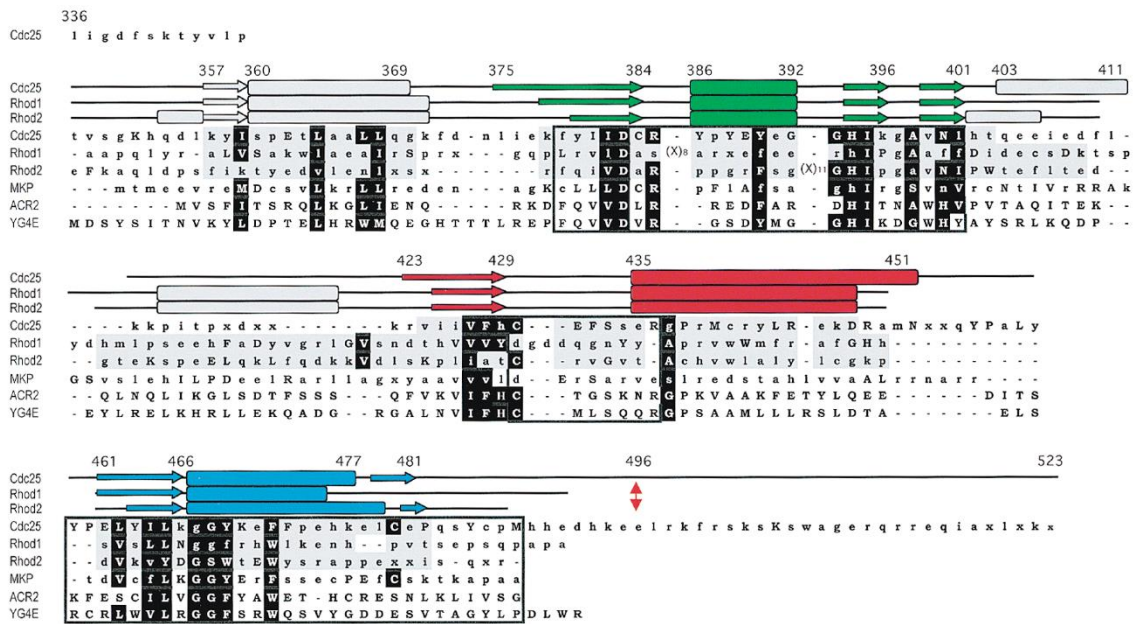


図 7-5 ローダナーゼドメインを持つ蛋白質の各モチーフの位置

それぞれのモチーフを配列を囲った部分とする。(CH2A(緑)、CH2B(青)、活性部位を含む部分(赤))(図は文献[3]より引用)

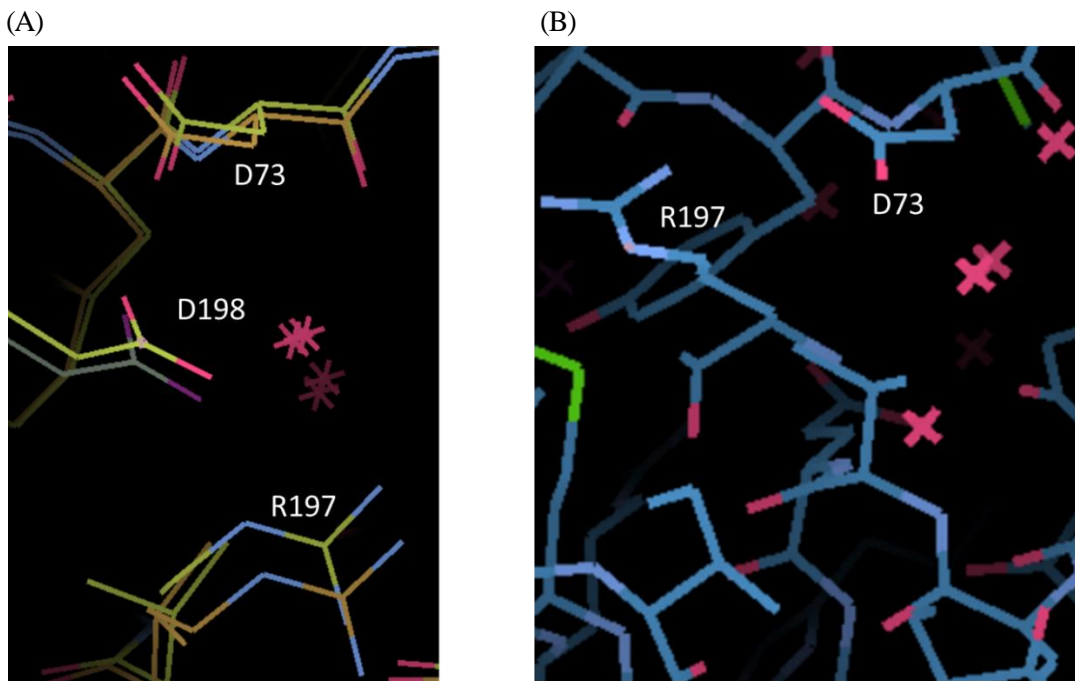


図 7-6 (A)ヒト 3MST 結晶と(B) マウス 3MST 結晶の D73 付近の様子(ボンド表示)

ヒト 3MST (PDB ID 4JGT)(黄)、ヒト 3MST (PDB ID 3OLH)(オレンジ)、マウス 3MST 阻害剤非結合型 (青)を示す。

D198 以外は A 鎖、D198 は C 鎖(4JGT)または結晶学的対称の位置にある A 鎖(3OLH)を表示。

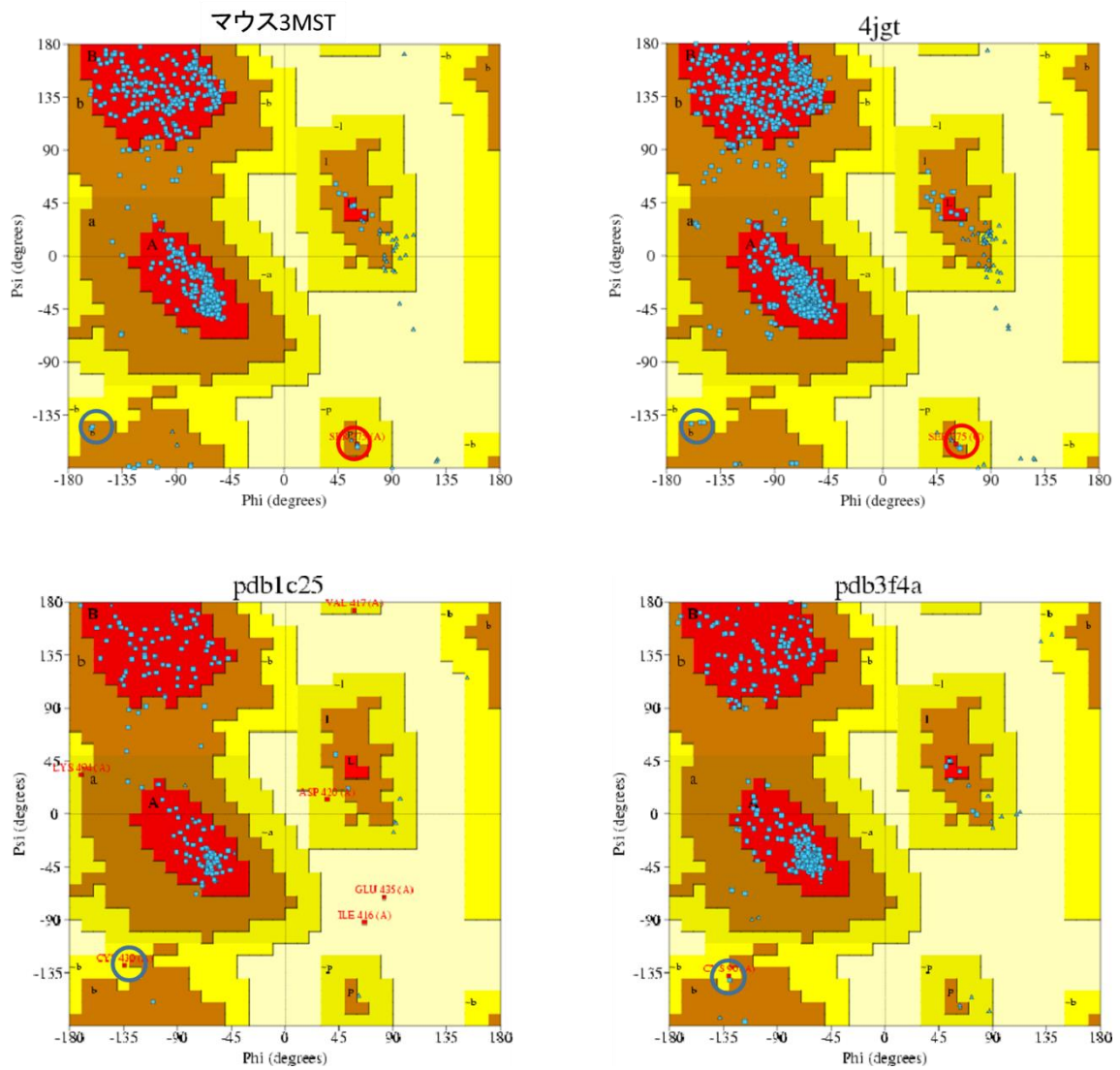


図 7-7 ラマチャンドランプロット( PROCHECK による)

マウス 3MST 阻害剤非結合型、ヒト 3MST (PDB ID 4JGT)、CDC25A (PDB ID 1C25)、Ygr203w (3F4A)を示す。

触媒残基の Cys は青丸、Ser275 (3MST のみ)は赤丸で囲う。

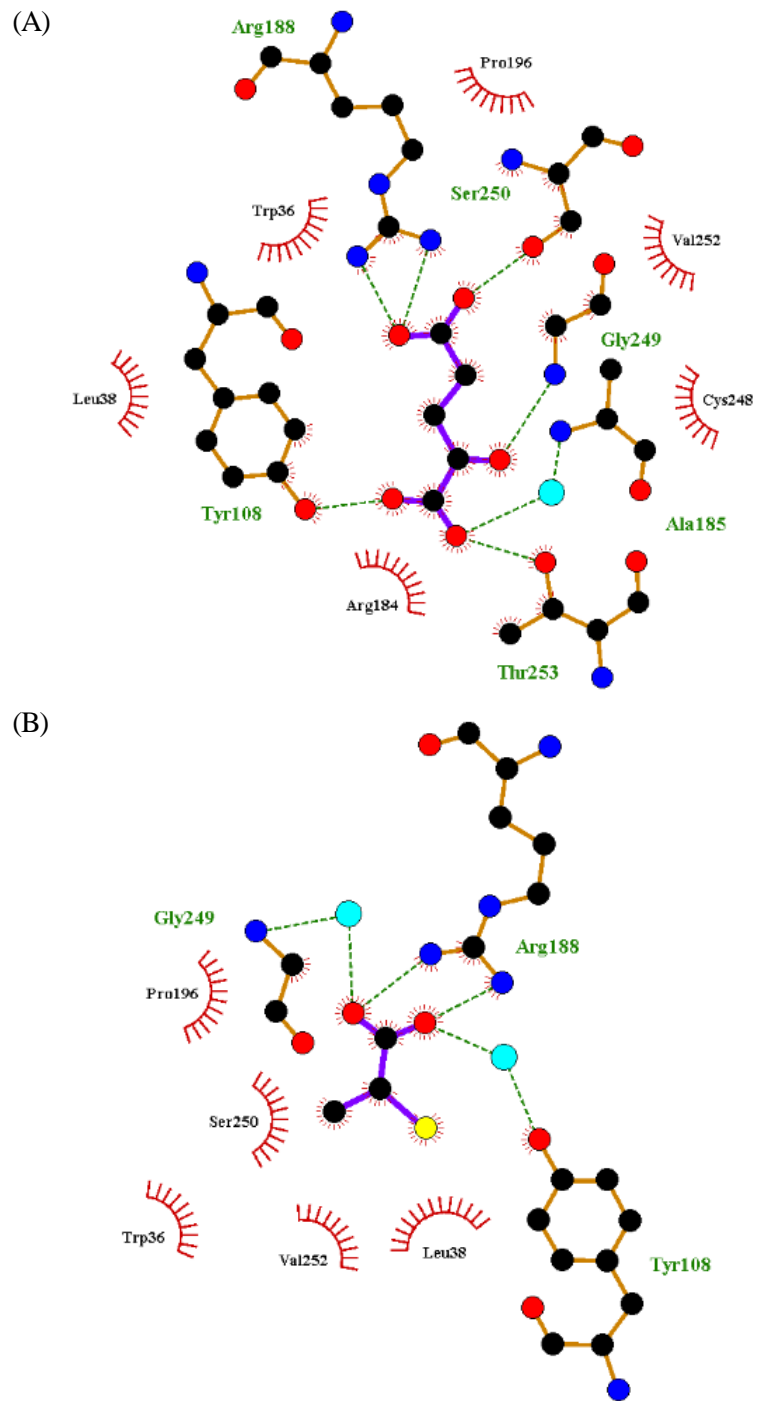


図 7-8 LigPlot+による 3MP 類似阻害剤の相互作用残基の表示

(A) マウス 3MST-AKG 複合体

(B) マウス 3MST-2MPA 複合体

水素結合(緑、点線)、ファンデルワールス相互作用(赤、放射状円弧)を示す。

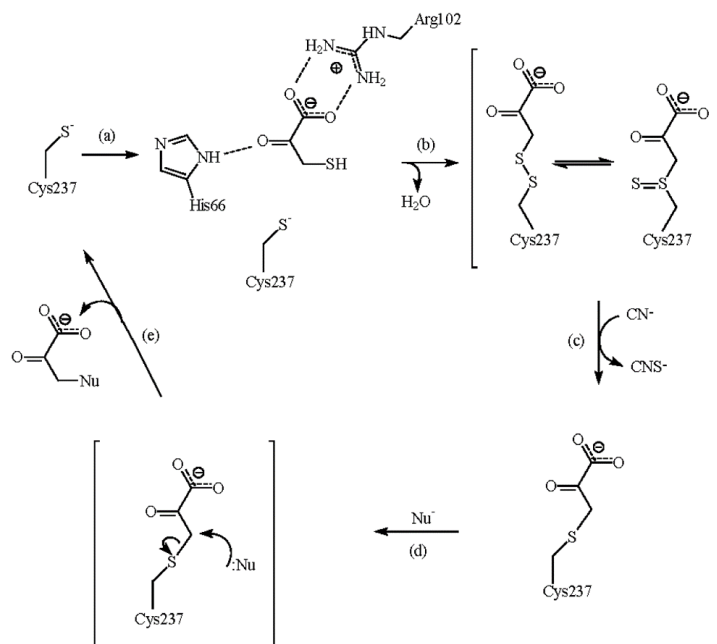


図 7-9 SseA の酵素反応モデル

文献[23]より引用

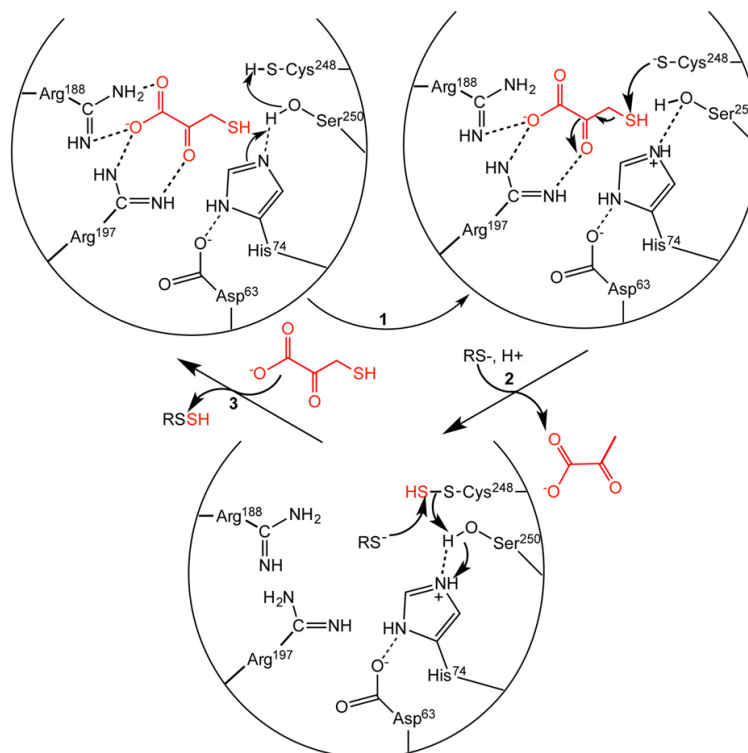


図 7-10 ヒト 3MST の酵素反応モデル

赤は 3MP または 3MP 由来の基または生成物。

文献[7]より引用



図 1-1	主なローダネーゼドメインを持つヒトの蛋白質の一致度を基にした分子系統樹	12
図 1-2	マウス 3MST と PDB に登録されている 3MST とのアミノ酸配列のアライメントによる比較	13
図 1-3	3MST が触媒する酵素反応	14
図 1-4	生体内での硫化水素産生経路	14
図 1-5	本研究で使用した 3MST の阻害剤の構造式	16
図 2-1	マウス 3MST (GenBank 受入番号 BC094469/UniProtKB 受入番号 Q505N7) の塩基配列(上段)とアミノ酸配列(下段)	24
図 2-2	cOmplete His-Tag Purification Resin での蛋白質精製(SDS-PAGE)	26
図 2-3	HisTrap カラムによる蛋白質精製の(A)溶出プロファイルと(B)SDS-PAGE、(C) 回収サンプルのタグ切断前後の SDS-PAGE	27
図 2-4	HiTrapQ カラムでの蛋白質精製の(A)溶出プロファイルと(B)SDS-PAGE	28
図 2-5	Superdex75pg カラムでの蛋白質精製の(A)溶出プロファイルと(B)SDS-PAGE	29
図 2-6	阻害剤非結合型マウス 3MST 結晶の結晶写真	30
図 2-7	マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体結晶の結晶写真	31
図 3-1	マウス 3MST の全体構造	46
図 3-2	阻害剤非結合型の A 鎖と B 鎖の比較(LSQ 方式)	47
図 3-3	蛋白質に結合する金属原子	48
図 3-4	哺乳類の 3MST での Cys の存在する場所	49
図 3-5	マウス 3MST 阻害剤非結合型とヒト 3MST (PDB ID 3OLH、4JGT)と、ウシ RDS (PDB ID 1RHS)の活性部位付近の残基の比較(SSM 方式)(円筒表示)	50
図 3-6	マウス 3MST 阻害剤非結合型とヒト 3MST (PDB ID 3OLH)の比較(LSQ 方式)	51
図 3-7	マウス 3MST 阻害剤非結合型とヒト 3MST (PDB ID 4JGT)の比較(LSQ 方式)	52
図 3-8	マウス 3MST 阻害剤非結合型とウシ RDS (PDB ID 1RHS)の比較(LSQ 方式)	53
図 3-9	マウス 3MST 阻害剤非結合型と森林型熱帯リーシュマニア 3MST (PDB ID 1OKG)の比較(SSM 方式)	54
図 3-10	マウス 3MST 阻害剤非結合型と SseA (PDB ID 1URH)の比較(SSM 方式)	55
図 3-11	ローダネーゼドメインの SSM 方式による重ね合わせ	57
図 4-1	3MP 類似阻害剤の構造式	68
図 4-2	阻害剤の結合位置と阻害剤の電子密度	68
図 4-3	マウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体中の電子密度	69

図 4-4	表 4-1 の相互作用残基.....	70
図 4-5	ヒト 3MST-ピルビン酸複合体(PDB ID 4JGT)との比較(SSM 方式).....	71
図 4-6	3MP 類似阻害剤の酵素反応阻害段階.....	71
図 4-7	3MP 類似阻害剤の結合部位の表面電荷.....	72
図 4-8	他の蛋白質-AKG 複合体の結合箇所の表面電荷表示.....	73
図 4-9	他の蛋白質-TGA 複合体の結合箇所の表面電荷表示.....	73
図 5-1	新規 3MST 阻害剤の構造式.....	91
図 5-2	ITC による分析.....	92
図 5-3	マウス 3MST 阻害剤非結合型とマウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の比較(フォーム表示).....	93
図 5-4	結晶構造中での (A) 阻害剤 A と (B) 阻害剤 B のオミットマップ.....	93
図 5-5	結晶構造中での電子密度マップ.....	94
図 5-6	新規 3MST 阻害剤の認識様式.....	95
図 5-7	マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤が形成する特徴的な相互作用.....	96
図 5-8	マウス 3MST 阻害剤非結合型とマウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の比較 (結合部位の円筒表示).....	97
図 5-9	新規 3MST 阻害剤の酵素反応阻害段階.....	97
図 5-10	高親和性阻害剤の設計における提案.....	98
図 5-11	マウス 3MST-阻害剤 A 複合体と相同性の高い蛋白質の比較(SSM 方式による重ね合わせ).....	100
図 7-1	主な哺乳類の 3MST と RDS の(A)配列アライメントと(B)分子系統樹.....	104
図 7-2	マウス 3MST の多型のアミノ酸配列アライメント.....	104
図 7-3	主な哺乳類の 3MST の(A)配列アライメントと(B)一致度を基にした分子系統樹.....	106
図 7-4	マウスと寄生虫の 3MST のアミノ酸配列アライメント.....	107
図 7-5	ローダネーゼドメインを持つ蛋白質の各モチーフの位置.....	108
図 7-6	(A)ヒト 3MST 結晶と(B) マウス 3MST 結晶の D73 付近の様子(ボンド表示).....	108
図 7-7	ラマチャンドランプロット(PROCHECK による).....	109
図 7-8	LigPlot+による 3MP 類似阻害剤の相互作用残基の表示.....	110
図 7-9	SseA の酵素反応モデル.....	111

図 7-10	ヒト 3MST の酵素反応モデル .....	111
表 1-1	3MST と RDS が同一残基数を持つ種での 3MST と RDS のアミノ酸の配列相同性の例 .....	12
表 1-2	PDB に登録されている 3MST と RDS .....	15
表 2-1	ベクター作成のために使用したプライマー .....	24
表 2-2	変異体(C65S/C255S/C264S)作成に用いたプライマー .....	25
表 2-3	阻害剤非結合型マウス 3MST 結晶およびマウス 3MST-3MP 類似阻害剤複合体結晶の結晶学的統計値 .....	30
表 2-4	マウス 3MST-新規 3MST 阻害剤複合体結晶の結晶学的統計値 .....	31
表 4-1	3MP 類似阻害剤とピルビン酸の相互作用残基(A 鎖) .....	70
表 5-1	ITC 実験による Cys248 に硫黄を結合させた 3MST と阻害剤の結合に関するパラメータ .....	91

略称	意味	3文字表記	1文字表記	アミノ酸
2MPA	2-メルカプトプロピオン酸	Ala	A	アラニン
3MP	3-メルカプトピルビン酸	Arg	R	アルギニン
3MST	3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素	Asn	N	アスパラギン
AKG	$\alpha$ -ケトグルタル酸	Asp	D	アスパラギン酸
CAT	システインアミノ基転移酵素	Cys	C	システイン
CBS	シスタチオン $\beta$ 合成酵素	Gln	Q	グルタミン
CSE	シスタチオン $\gamma$ 脱離酵素	Glu	E	グルタミン酸
DAO	D-アミノ酸酸化酵素	Gly	G	グリシン
DTT	ジチオスレイトール	His	H	ヒスチジン
DUSP	二重特異性脱リン酸化酵素	Ile	I	イソロイシン
GST	グルタチオン-S-転移酵素	Leu	L	ロイシン
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid	Lys	K	リシン
HRV	ヒトライノウイルス	Met	M	メチオニン
IC <sub>50</sub>	半数阻害濃度	Phe	F	フェニルアラニン
K <sub>d</sub>	解離定数	Pro	P	プロリン
K <sub>i</sub>	阻害定数	Ser	S	セリン
K <sub>m</sub>	ミカエリス定数	Thr	T	トレオニン
LSQ	最小二乗法	Trp	W	トリプトファン
PEG	ポリエチレングリコール	Tyr	Y	チロシン
PLP	ピリドキサルリン酸	Val	V	バリン
RDS	ローダネーゼ			
RMSD	平均二乗偏差			
SSM	secondary structure matching (二次構造マッチング)			
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine			

## 8 引用文献

---

- [1] D. Bordo and P. Bork, "The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations," *EMBO Rep.*, vol. 3, no. 8, pp. 741–746, Aug. 2002.
- [2] E. B. Fauman and M. A. Saper, "Structure and function of the protein tyrosine phosphatases," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 21, no. 11, pp. 413–417, Nov. 1996.
- [3] E. B. Fauman, J. P. Cogswell, B. Lovejoy, W. J. Rocque, W. Holmes, V. G. Montana, H. Piwnica-Worms, M. J. Rink, and M. A. Saper, "Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A," *Cell*, vol. 93, no. 4, pp. 617–625, May 1998.
- [4] T. U. Consortium, "UniProt: a hub for protein information," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. D1, pp. D204–D212, Jan. 2015.
- [5] N. Nagahara, T. Ito, and M. Minami, "Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: Molecular properties and mode of detoxification," *Histology and Histopathology*, vol. 14, no. 4, pp. 1277–1286, 1999.
- [6] N. Nagahara, T. Okazaki, and T. Nishino, "Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. Striking similarity in active site amino acid sequence and the increase in the mercaptopyruvate sulfurtransferase activity of rhodanese by site-directed mut," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 27, pp. 16230–16235, Jul. 1995.
- [7] P. K. Yadav, K. Yamada, T. Chiku, M. Koutmos, and R. Banerjee, "Structure and kinetic analysis of H<sub>2</sub>S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 27, pp. 20002–20013, Jul. 2013.
- [8] B. Frasdorf, C. Radon, and S. Leimkuhler, "Characterization and Interaction Studies of Two Isoforms of the Dual Localized 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase TUM1 from Humans," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 50, pp. 34543–34556, Dec. 2014.
- [9] M. S. Alphey, R. A. M. Williams, J. C. Mottram, G. H. Coombs, and W. N. Hunter, "The crystal structure of leishmania major 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. A three-domain architecture with a serine protease-like triad at the active site," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 48, pp. 48219–48227, Nov. 2003.
- [10] R. A. M. Williams, S. M. Kelly, J. C. Mottram, and G. H. Coombs, "3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase of Leishmania contains an unusual C-terminal extension and is involved in thioredoxin and antioxidant metabolism," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 3, pp. 1480–1486, Jan. 2003.
- [11] J. A. Mendoza, E. Rogers, G. H. Lorimer, and P. M. Horowitz, "Chaperonins facilitate the in vitro folding of monomeric mitochondrial rhodanese," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 20, pp. 13044–13049, Jul. 1991.
- [12] Y. Makino, H. Taguchi, and M. Yoshida, "Truncated GroEL monomer has the ability to promote folding of rhodanese without GroES and ATP," *FEBS Lett.*, vol. 336, no. 2, pp. 363–367, Dec. 1993.
- [13] H. Taguchi, Y. Makino, and M. Yoshida, "Monomeric chaperonin-60 and its 50-kDa fragment possess the ability to interact with non-native proteins, to suppress aggregation, and to promote protein folding," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 11, pp. 8529–8534, Mar. 1994.

- [14] Z. W. White, K. E. Fisher, and E. Eisenstein, "A monomeric variant of GroEL binds nucleotides but is inactive as a molecular chaperone," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 35, pp. 20404–20409, Jan. 1995.
- [15] R. Zahn, A. M. Buckle, S. Perrett, C. M. Johnson, F. J. Corrales, R. Golbik, and A. R. Fersht, "Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 26, pp. 15024–15029, Dec. 1996.
- [16] M. Panda and P. M. Horowitz, "Active-site sulfhydryl chemistry plays a major role in the misfolding of urea-denatured rhodanese," *J. Protein Chem.*, vol. 19, no. 5, pp. 399–409, Jul. 2000.
- [17] Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura, N. Nagahara, Y. Ogasawara, and H. Kimura, "Thioredoxin and dihydroliipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide," *Biochem. J.*, vol. 439, no. 3, pp. 479–485, Nov. 2011.
- [18] N. Nagahara and T. Nishino, "Role of amino acid residues in the active site of rat liver mercaptopyruvate sulfurtransferase. CDNA cloning, overexpression, and site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 44, pp. 27395–27401, 1996.
- [19] N. Nagahara, T. Yoshii, Y. Abe, and T. Matsumura, "Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase: An intersubunit disulfide bond serves as a redox switch for activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 3, pp. 1561–1569, Jan. 2007.
- [20] "www.rcsb.org".
- [21] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000.
- [22] S. Karlberg, T. Collins, R. Arrowsmith, C.H., Berglund, H., Bountra, C., Edwards, A.M., Flodin, S., Flores, A., Graslund, S., Hammarstrom, M., Johansson, I., Kotenyova, T., Kouznetsova, E., Moche, M., Nordlund, P., Nyman, T., Persson, C., Sehic, A., Schutz, "Human 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase."
- [23] A. Spallarossa, F. Forlani, A. Carpen, A. Armirotti, S. Pagani, M. Bolognesi, and D. Bordo, "The 'Rhodanese' Fold and Catalytic Mechanism of 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferases: Crystal Structure of SseA from *Escherichia coli*," *J. Mol. Biol.*, vol. 335, no. 2, pp. 583–593, Jan. 2004.
- [24] W. G. Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H., Hol, J. H. Ploegman, G. Drent, K. H. Kalk, and W. G. J. Hol, "Structure of bovine liver rhodanese. I. Structure determination at 2.5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains," *J. Mol. Biol.*, vol. 123, no. 4, pp. 557–594, Aug. 1978.
- [25] M. Gazerro and R. Gliubich, F., Gazerro, M., Zanotti, G., Delbono, S., Bombieri, G., Berni, "Active Site Structural Features for Chemically Modified Forms of Rhodanese," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 35, pp. 21054–21061, Aug. 1996.
- [26] F. Gliubich, R. Berni, M. Colapietro, L. Barba, and G. Zanotti, "Structure of Sulfur-Substituted Rhodanese at 1.36 Å Resolution," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 54, no. 4, pp. 481–486, Jul. 1998.
- [27] R. J. Trevino, F. Gliubich, R. Berni, M. Cianci, J. M. Chirgwin, G. Zanotti, and P. M. Horowitz, "NH<sub>2</sub>-terminal Sequence Truncation Decreases the Stability of Bovine Rhodanese, Minimally Perturbs Its Crystal Structure, and Enhances Interaction with GroEL under Native Conditions," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 20, pp. 13938–13947, May 1999.

- [28] M. Cianci, F. Gliubich, G. Zanotti, and R. Berni, "Specific interaction of lipoate at the active site of rhodanese," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1481, no. 1, pp. 103–108, Aug. 2000.
- [29] A. Nocek, B. Evdokimova, E. Kudritska, M. Savchenko, A. Edwards, A.M., Joachimiak, "Atomic resolution structure of uncharacterized protein from *Saccharomyces cerevisiae*."
- [30] R. Qiu, F. Wang, M. Liu, T. Lou, and C. Ji, "Crystal Structure of the Tum1 Protein from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Protein Pept. Lett.*, vol. 19, no. 11, pp. 1139–1143, 2012.
- [31] Y. Suzuki, Y., Kakuta, "Crystal structure of Rhodanese from *Thermus thermophilus* HB8."
- [32] D. Bordo, D. Deriu, R. Colnaghi, A. Carpen, S. Pagani, and M. Bolognesi, "The crystal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families," *J. Mol. Biol.*, vol. 298, no. 4, pp. 691–704, May 2000.
- [33] D. Bordo, F. Forlani, A. Spallarossa, R. Colnaghi, A. Carpen, M. Bolognesi, and S. Pagani, "A persulfurated cysteine promotes active site reactivity in *Azotobacter vinelandii* rhodanese," *Biol. Chem.*, vol. 382, no. 8, pp. 1245–1252, 2001.
- [34] S. Kumaran, D., Swaminathan, "Crystal Structure of Thiosulfate sulfurtransferase from *Pseudomonas aeruginosa*."
- [35] L. Baugh, I. Phan, D. W. Begley, M. C. Clifton, B. Armour, D. M. Dranow, B. M. Taylor, M. M. Muruthi, J. Abendroth, J. W. Fairman, D. Fox, S. H. Dieterich, B. L. Staker, A. S. Gardberg, R. Choi, S. N. Hewitt, A. J. Napuli, J. Myers, L. K. Barrett, Y. Zhang, M. Ferrell, E. Mundt, K. Thompkins, N. Tran, S. Lyons-abbott, A. Abramov, A. Sekar, D. Serzhinskiy, D. Lorimer, G. W. Buchko, R. Stacy, L. J. Stewart, T. E. Edwards, W. C. Van Voorhis, and P. J. Myler, "Increasing the structural coverage of tuberculosis drug targets," *Tuberculosis*, vol. 95, no. 2, pp. 1–7, Mar. 2014.
- [36] T. E. Edwards, R. Liao, I. Phan, P. J. Myler, and C. Grundner, "Mycobacterium thermoresistibile as a source of thermostable orthologs of Mycobacterium tuberculosis proteins," *Protein Sci.*, vol. 21, no. 7, pp. 1093–1096, Jul. 2012.
- [37] M. N. G. Sankaranarayanan, R., Witholt, S.J., Chemey, M.M., Garen, C.R., Chemey, L.T., James, "The crystal structure of probable thiosulfate sulfurtransferase CysA3 (Rv3117) from *Mycobacterium tuberculosis*."
- [38] A. Spallarossa, J. L. Donahue, T. J. Larson, M. Bolognesi, and D. Bordo, "Escherichia coli GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily," *Structure*, vol. 9, no. 11, pp. 1117–1125, Nov. 2001.
- [39] P. Hänzelmann, J. U. Dahl, J. Kuper, A. Urban, U. Müller-Theissen, S. Leimkühler, and H. Schindelin, "Crystal structure of YnjE from *Escherichia coli*, a sulfurtransferase with three rhodanese domains," *Protein Sci.*, vol. 18, no. 12, pp. 2480–2491, Dec. 2009.
- [40] J. F. Declercq, J.P., Smeets, A., Depuydt, M., Collet, "Structural Analysis of YnjE, a Putative Thiosulfate Sulfurtransferase."
- [41] H. Li, F. Yang, X. Kang, B. Xia, and C. Jin, "Solution structures and backbone dynamics of *Escherichia coli* rhodanese PspE in its sulfur-free and persulfide-intermediate forms: Implications for the catalytic mechanism of rhodanese," *Biochemistry*, vol. 47, no. 15, pp. 4377–4385, Apr. 2008.

- [42] A. Niederwiesler, P. Giliberti, K. Baerlocher, A. Niederwieser, P. Giliberti, and K. Baerlocher, "β-Mercaptolactate cysteine disulfiduria in two normal sisters. Isolation and characterization of β-mercaptolactate cysteine disulfide," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 43, no. 3, pp. 405–416, Feb. 1973.
- [43] A. Niederwiesler, P. Giliberti, and K. Baerlocher, "beta-Mercaptolactate cysteine disulfiduria in two normal sisters. Isolation and characterization of beta-mercaptolactate cysteine disulfide," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 43, no. 3, pp. 405–416, Feb. 1973.
- [44] E. A. Law and B. Fowler, "Beta-mercaptolactate cysteine disulphiduria in a mentally retarded Scottish male," *J. Ment. Defic. Res.*, vol. 20, no. 2, pp. 99–104, Jun. 1976.
- [45] U. Hannestad, J. Mårtensson, R. Sjödal, and B. Sörbo, "3-mercaptolactate cysteine disulfiduria: biochemical studies on affected and unaffected members of a family," *Biochem. Med.*, vol. 26, no. 1, pp. 106–114, Aug. 1981.
- [46] J. C. Crawhall, "A review of the clinical presentation and laboratory findings in two uncommon hereditary disorders of sulfur amino acid metabolism, β-mercaptolactate cysteine disulfiduria and sulfite oxidase deficiency," *Clinical Biochemistry*, vol. 18, no. 3, pp. 139–142, Jun-1985.
- [47] N. Nagahara, M. Nagano, T. Ito, K. Shimamura, T. Akimoto, and H. Suzuki, "Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1986, Jun. 2013.
- [48] J. C. Crawhall, R. Parker, W. Sneddon, E. P. Young, M. G. Ampola, M. L. Efron, and E. M. Bixby, "Beta mercaptolactate-cysteine disulfide: analog of cystine in the urine of a mentally retarded patient," *Science*, vol. 160, no. 826, pp. 419–420, 1968.
- [49] I. Billaut-Laden, E. Rat, D. Allorge, A. Crunelle-Thibaut, C. Cauffiez, D. Chevalier, J. M. Lo-Guidice, and F. Broly, "Evidence for a functional genetic polymorphism of the human mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), a cyanide detoxification enzyme," *Toxicol. Lett.*, vol. 165, no. 2, pp. 101–111, Aug. 2006.
- [50] L. WŁodek, M. Wróbel, and J. Czubak, "Transamination and transsulphuration of l-cysteine in ehrlich ascites tumor cells and mouse liver," *International Journal of Biochemistry*, vol. 25, no. 1, pp. 107–112, 1993.
- [51] H. Jurkowska, W. Placha, N. Nagahara, and M. Wróbel, "The expression and activity of cystathionine-γ-lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in human neoplastic cell lines," *Amino Acids*, vol. 41, no. 1, pp. 151–158, Jun. 2011.
- [52] J. Frendo and M. Wróbel, "The activity of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in erythrocytes from patients with polycythemia vera," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 44, no. 4, pp. 771–773, 1997.
- [53] N. Shibuya and H. Kimura, "Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 4, no. JUL, p. 87, 2013.
- [54] O. Kabil and R. Banerjee, "Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 5, pp. 770–82, Feb. 2014.
- [55] N. Shibuya, S. Koike, M. Tanaka, M. Ishigami-Yuasa, Y. Kimura, Y. Ogasawara, K. Fukui, N. Nagahara, and H. Kimura, "A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 1366, 2013.

- [56] H. Kimura, "Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system," *Neurochemistry International*, vol. 63, no. 5, pp. 492–497, Nov-2013.
- [57] H. Kimura, "Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules," *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, vol. 91, no. 4, pp. 131–59, 2015.
- [58] D. W. Porter and S. I. Baskin, "The effect of three alpha-keto acids on 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activity," *J. Biochem. Toxicol.*, vol. 11, no. 1, pp. 45–50, Jan. 1996.
- [59] D. W. Porter and S. I. Baskin, "Specificity studies of 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase," *J. Biochem. Toxicol.*, vol. 10, no. 6, pp. 287–292, Oct. 1995.
- [60] K. Sasakura, K. Hanaoka, N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, H. Kimura, and T. Nagano, "Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 45, pp. 18003–18005, Nov. 2011.
- [61] 篠倉潔, "硫化水素(H<sub>2</sub>S)選択的蛍光プローブの開発とその応用," 東京大学, 2013.
- [62] M. a. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. a. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins, "Clustal W and Clustal X version 2.0," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947–2948, 2007.
- [63] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. a. Martin, M. Clamp, and G. J. Barton, "Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 9, pp. 1189–1191, 2009.
- [64] Z. Otwinowski and W. Minor, "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode," *Methods in Enzymology*, vol. 276, no. 20, Academic Press, pp. 307–326, 1997.
- [65] E. Potterton, P. Briggs, M. Turkenburg, and E. Dodson, "A graphical user interface to the CCP4 program suite," *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 59, no. 7, pp. 1131–1137, Jul. 2003.
- [66] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, and K. S. Wilson, "Overview of the CCP4 suite and current developments," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 67, no. 4, pp. 235–242, Apr-2011.
- [67] A. Vagin and A. Teplyakov, "MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 30, no. 6, pp. 1022–1025, Dec. 1997.
- [68] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read, "Phaser crystallographic software," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 40, no. 4, pp. 658–674, Aug. 2007.
- [69] P. Emsley and K. Cowtan, "Coot: Model-building tools for molecular graphics," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 60, no. 12 I, pp. 2126–2132, Dec. 2004.
- [70] A. A. Vagin, R. A. Steiner, A. A. Lebedev, L. Potterton, S. McNicholas, F. Long, and G. N. Murshudov, "REFMAC5 dictionary: Organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 60, no. 12 I, pp. 2184–2195, Dec. 2004.



- [71] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, and P. H. Zwart, "PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 2, pp. 213–221, Feb. 2010.
- [72] R. A. Laskowski and M. B. Swindells, "LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 51, no. 10, pp. 2778–2786, Oct. 2011.
- [73] S. McNicholas, E. Potterton, K. S. Wilson, and M. E. M. Noble, "Presenting your structures: The CCP4mg molecular-graphics software," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. 4, pp. 386–394, Apr. 2011.
- [74] E. Krissinel and K. Henrick, "Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State," *J. Mol. Biol.*, vol. 372, no. 3, pp. 774–797, 2007.
- [75] H. Vachek and J. L. Wood, "Purification and properties of mercaptopyruvate sulfur transferase of *Escherichia coli*," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 258, no. 1, pp. 133–146, 1972.
- [76] R. Jarabak, "[38] 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase," *Methods Enzymol.*, vol. 77, no. C, pp. 291–297, 1981.
- [77] M. Volini, F. DeToma, and J. Westley, "Dimeric structure and zinc content of bovine liver rhodanese," *J. Biol. Chem.*, vol. 242, no. 22, pp. 5220–5225, 1967.
- [78] A. Spallarossa, A. Carpen, F. Forlani, S. Pagani, M. Bolognesi, and D. Bordo, "SseA, a 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase from *Escherichia coli*: Crystallization and preliminary crystallographic data," *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 59, no. 1, pp. 168–170, 2003.
- [79] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, 1997.
- [80] A. L. Ringer, A. Senenko, and C. D. Sherrill, "Models of S/ $\pi$  interactions in protein structures: Comparison of the H<sub>2</sub>S–benzene complex with PDB data," *Protein Sci.*, vol. 16, no. 10, pp. 2216–2223, Oct. 2007.
- [81] E. a. Meyer, R. K. Castellano, and F. Diederich, *Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition*, vol. 42, no. 11. 2003.
- [82] R. Jarabak and J. Westley, "Steady-state kinetics of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase from bovine kidney," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 185, no. 2, pp. 458–465, 1978.
- [83] G. DUAN, V. H. SMITH, and D. F. WEAVER, "calculations and protein database analyses," *Molecular Physics*, vol. 99, no. 19, pp. 1689–1699, Oct-2001.
- [84] J. Rodríguez-Otero, E. M. Cabaleiro-Lago, and A. Peña-Gallego, "Cation- $\pi$  and anion- $\pi$  interactions: Changes in aromaticity upon complexation," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 452, no. 1–3, pp. 49–53, 2008.
- [85] A. Frontera, F. Sączewski, M. Gdaniec, E. Dziemidowicz-Borys, A. Kurland, P. M. Deyà, D. Quiñero, and C. Garau, "Anion- $\pi$  interactions in cyanuric acids: A combined crystallographic and computational study," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 11, no. 22, pp. 6560–6567, 2005.

- [86] A. Asimakopoulou, P. Panopoulos, C. T. Chasapis, C. Coletta, Z. Zhou, G. Cirino, A. Giannis, C. Szabo, G. A. Spyroulias, and A. Papapetropoulos, "Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine  $\beta$  synthase (CBS) and cystathionine  $\gamma$  lyase (CSE)," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 169, no. 4, pp. 922–932, Jun. 2013.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、様々なご指導をいただきました東京大学大学院薬学系研究科  
蛋白構造生物学教室清水敏之教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々なご指導をいただきました東京大学大学院薬学系研究科  
蛋白構造生物学教室藤間祥子助教に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々なご指導をいただきました東京大学大学院薬学系研究科  
蛋白構造生物学教室大戸梅治講師に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究の機会をくださいました東京大学大学院薬学系研究  
科薬品代謝化学教室長野哲雄名誉教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究の機会をくださいました東京大学大学院薬学系研究  
科薬品代謝化学教室花岡健二郎准教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究いたしました東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝  
化学教室篠倉潔博士に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究いたしました東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝  
化学教室島本一史修士に感謝申し上げます。

日頃から様々お世話になりました東京大学大学院薬学系研究科蛋白構造生物学教室の皆様  
に感謝申し上げます。