

論文の内容の要旨

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

【背景と研究目的】

硫化水素の生理機能についての研究は近年精力的になされている。硫化水素産生経路の一つに、Cys から 3-メルカプトピルビン酸(3MP)を経て硫化水素を産生する経路があり、3MP からの硫化水素

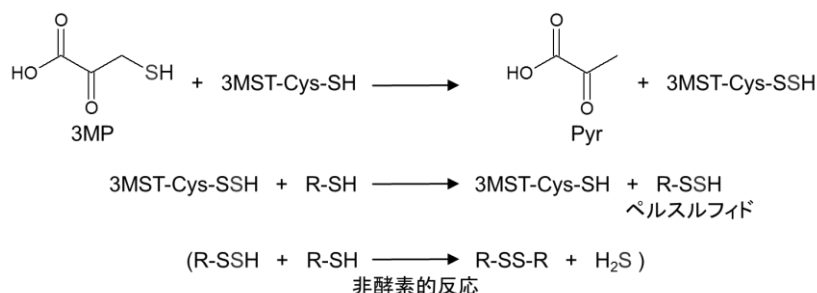


図 1. 3MST の関与する硫化水素産生反応

素の生成には 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST) (EC 2.8.1.2)が関与している。3MST は 3MP の硫黄をシアニドやチオールに転移させる酵素であり、チオールに転移させる場合、生成したペルスルフィドが他のチオールと非酵素的に反応して硫化水素が産生される(図 1)¹。

3MST の機能解析には選択的な阻害剤の開発がのぞまれているが、これまで 3MP 類似阻害剤(α -ケトグルタル酸² (AKG)、2-メルカプトプロピオン酸³ (2MPA) (図 2))と知られている化合物は阻害効果も弱く、選択性も低い。近年、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室によって、東京大学創薬オープンイノベーションセンター(現創薬機構)の化合物ライブラリーの中から、3MST に選択的阻害作用を持つ物質 A、B (阻害剤 A、B (図 3))が見出された⁴。阻害剤 A、B はともに、芳香環-カルボニル-硫黄-4-ピリミドンの共通骨格を持つ。本研究では、既存の 3MP 類似阻害剤と新規 3MST 阻害剤それぞれの 3MST との複合体の結晶構造を明らかにし、それぞれの阻害剤の阻害機構を解明することを目的とした。

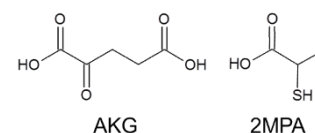


図 2. 3MP 類似阻害剤

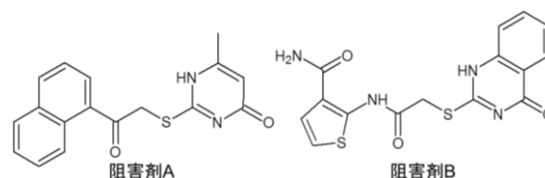


図 3. 新規 3MST 阻害剤

【実験方法】

1. m3MST の発現・精製

全長マウス 3MST (m3MST)を大腸菌に導入し、蛋白質を大量発現させた。三種類のクロマトグラフィーを用いて精製し、高純度の結晶化サンプルを得た。

2. 新規 3MST 阻害剤と m3MST の結合実験

3MPを加えることで Cys248 に硫黄を結合させた m3MST と、結合させていない m3MST を調製し、等温滴定型熱量測定(ITC)により新規 3MST 阻害剤の m3MST への結合熱を測定し、新規 3MST 阻害剤に対する解離定数を算出した。

3. m3MST-阻害剤複合体結晶の調製・構造決定

m3MST の結晶は、PEG3350 を沈殿剤とするシッティングドロップ蒸気拡散法により 4°C で析出した。m3MST-3MP 類似阻害剤複合体の結晶は、阻害剤非結合型 m3MST の結晶を阻害剤の溶解した液に浸漬することで調製した。m3MST-新規 3MST 阻害剤複合体の結晶は、Cys248 に硫黄を結合させた m3MST を調製し、新規 3MST 阻害剤を結合させることで結晶化した。結晶の回折データは、シンクロトロン放射光(Photon Factory および SPring-8)の高輝度 X 線を用いて収集した。位相決定はヒト 3MST (h3MST) (PDB ID: 3OLH)または構造決定した m3MST の構造をモデルとした分子置換法で行い、最終的にどの結晶構造も 1-2 Å での高分解能での構造決定に成功した。

【結果】

1. 3MP 類似阻害剤と m3MST との相互作用(結晶構造)(図 4)

AKG、2MPA はともに m3MST の活性部位に結合していた。AKG は 1 位のカルボキシル基が Tyr108 や Thr253 の側鎖と、2 位のカルボニル基が Gly249 主鎖と、5 位のカルボキシル基が Arg188 や Ser250 の側鎖と直接水素結合していた。また 2MPA はカルボキシル基が Arg188 側鎖と直接水素結合していた。AKG や 2MPA は、h3MST-ピルビン酸(Pyr)複合体(PDB ID: 4JGT)中での Pyr の結合位置とほぼ同じ場所に結合していた。

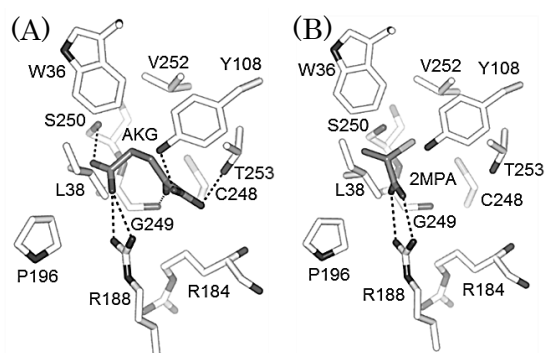


図 4. 3MP 類似阻害剤の認識様式
(A)m3MST-AKG 複合体
(B)m3MST-2MPA 複合体

2. 新規 3MST 阻害剤の m3MST への結合(ITC 実験)(図 5)

触媒残基の Cys248 に硫黄を結合させた m3MST では新規 3MST 阻害剤の結合が観察され解離定数が阻害剤 A、B それぞれ 0.5 μM 、3 μM であった。一方、硫黄を結合させていない m3MST では新規 3MST 阻害剤の結合が観察されなかった。

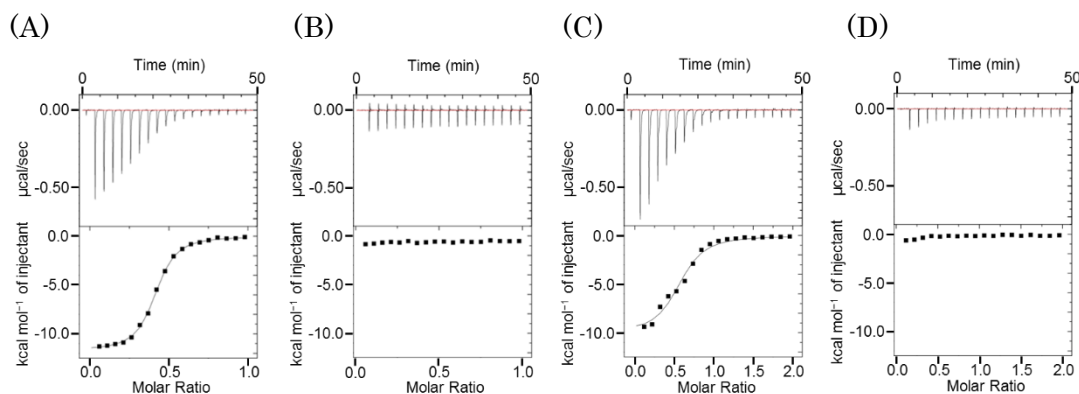


図 5. ITC 実験による阻害剤の m3MST への結合評価

(A)m3MST-Cys-SSH/阻害剤 A (B)m3MST-Cys-SH/阻害剤 A (C)m3MST-Cys-SSH/阻害剤 B (D) m3MST-Cys-SH/阻害剤 B

3. 新規 3MST 阻害剤と m3MST との相互作用(結晶構造) (図 6)

阻害剤 A、B は m3MST にほぼ共通の結合様式で結合しており、3MP 類似阻害剤の認識に関わる残基だけではなく、活性部位周辺領域に存在する Pro39、Asp73、His74、Arg197、Val277 とも相互作用していた。

触媒残基の Cys248 にはどちらの複合体でも硫黄が結合していた。4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は Cys248 の近位側に結合し、S_γ-S_δ 間のジスルフィド結合は芳香環にほぼ垂直に位置し阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環と相互作用(硫黄-π 相互作用)していた。

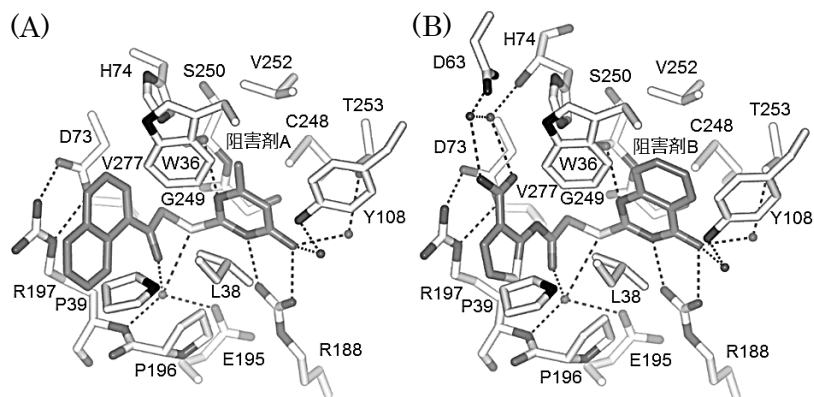


図 6. 新規 3MST 阻害剤の認識様式

(A)m3MST-阻害剤 A 複合体 (B)m3MST-阻害剤 B 複合体

さらに 4-ピリミドン骨格は Tyr108、Arg188、Ser250、Thr253 と直接または水分子を介した水素結合を形成していた。Cys248 とは遠位に位置する芳香環は、Arg197 側鎖とカチオン-π 相互作用を形成し、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していた。その他、阻害剤は結合部位のアミノ酸残基と直接または水を介した水素結合を形成していた。

【考察】

3MP 類似阻害剤は反応生成物である Pyr の結合部位に結合していたことから、3MST が担う 1 段階目の反応、つまり 3MP から触媒残基への硫黄転移反応から阻害すると考えられる。一方、新規 3MST 阻害剤は Cys248 に硫黄を結合させていない m3MST に対しては結合を示さず Cys248 に硫黄を結合させた m3MST に対しては強い結合を示すことから、新規 3MST 阻害剤は 3MST が担う 2 段階目の反応、すなわち 3MST の反応中間体からチオールへの硫黄転移反応を阻害すると考えられる。さらに本研究では、新規 3MST 阻害剤が実際に硫黄が結合した Cys248 によって認識され、硫黄-π、カチオン-π、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を原子レベルで明らかにした。

ここで得られた構造情報はさらに親和性の高い特異的な 3MST 阻害剤の設計に貢献できると考えられる。

【参考文献】

1. Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M. & Banerjee, R. (2013). Structure and kinetic analysis of H₂S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J. Biol. Chem.* **288**, 20002–20013.
2. Porter, D. W. & Baskin, S. I. (1996). The effect of three α-keto acids on 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activity. *J. Biochem. Toxicol.* **11**, 45–50.
3. Porter, D. W. & Baskin, S. I. (1995). Specificity studies of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J. Biochem. Toxicol.* **10**, 287–292.
4. 篠倉潔(2013). 硫化水素(H₂S)選択的蛍光プローブの開発とその応用. 博士論文, 東京大学大学院薬学系研究科.