

## 研究課題評価

1 研究課題名: 2種のプロスタグランジン合成酵素の構造解析と医薬品への応用

2 研究者氏名: 井上 豪

3 研究の狙い:

プロスタグランジン(PG)<sub>D2</sub>やPGF<sub>2</sub>は生体膜由来の局所ホルモンとして、それぞれ、アレルギー情報伝達、子宮平滑筋の収縮という機能を有し、造血器型PGD合成酵素(H-PDGS)およびPGF合成酵素(PGFS)によって生合成されている。本研究では、ヒト由来H-PDGSおよび感染性寄生虫トリパノソマ由来PGFS(TbPGFS)の立体構造をX線回折法により解明し、両酵素の立体構造をもとにした抗アレルギー剤やアフリカ睡眠病の特効薬の開発を目指す。

4 研究結果

I) ヒト由来H-PGDSのX線構造解析とドラッグデザインに関する研究成果

1) Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>結合型のNativeのX線構造を、それぞれ1.8、1.7分解能で解析し、2価イオンが酵素活性を約50%上昇させること、特に、Mg<sup>2+</sup>が補酵素グルタチオン(GSH)のK<sub>m</sub>値を4倍以上下げることを見出した。部位特異的変異の導入および宇宙でのMg<sup>2+</sup>結合型結晶の作製とその解析(1.28分解能)から、そのメカニズムを構造化学的に解明した。

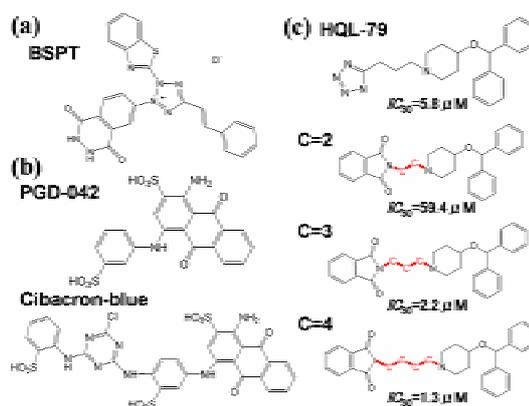
2) 阻害剤BSPT、アントラキノン骨格を共通に有する阻害剤PGD-042とCibacron-blue、経口投与で抗アレルギー効果のあるHQL-79、およびその誘導体との複合体のX線構造解析をCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>存在下で行った(右図)。

3) BSPT, PGD-042, Cibacron-blueの3つは、Mg<sup>2+</sup>存在下で阻害率が大きく低下したが、その理由を複合体のX線構造から検証した。生体中ではMg<sup>2+</sup>が高濃度に含まれ、これを考慮した阻害剤の開発が必要であることを提唱した。

4) HQL-79は経口投与で選択的にH-PGDSに作用して、PGD<sub>2</sub>の産生のみを抑制し、抗アレルギー効果のほかに、筋ジストロフィーや脳損傷に対する改善薬として機能することが判明した。

1.45分解能の複合体のX線解析、BIACOREを使った表面プラズモン共鳴の実験によりHQL-79の結合様式を詳細に解明した。

5) 阻害剤HQL-79の誘導体3種を合成し、阻害率の測定および複合体の構造解析を行い、阻害率と構造との相関関係に関して知見を得た。



II) プロスタグランジンF合成酵素(PGFS)に関する研究

1) Trypanosoma bruce(Tb), Leishmania major(Lm), Trypanosoma cruzi(Tc)由来のPGFSの結晶学的研究に取り組み、TbPGFSおよびLmPGFSについては、それぞれ2.1、1.8分解能での構造解析に、TcPGFSについては2.0分解能までのデータ収集に成功した。

2) TbおよびLmのPGFSはAKRスーパーファミリーに属し、活性中心に保存するCatalytic tetradについてのMutation実験から、Catalytic dyadで反応が進行することを証明した。

5 自己評価:

H-PGDSについては、1997年にラット由来の構造がCellから報告されたが、ヒト由来の酵素でより高分解能の構造解析に成功し、金属イオンによる活性化の発見に至った。金属イオン周辺の

Mutation 実験や、宇宙で作製した結晶による 1.28 Å 分解能の X 線解析により金属イオン効果を構造化学的に解明することができた。しかし、種々の阻害剤との複合体結晶を  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  存在下で調製する必要が生じ、また、それによって複合体の構造が異なる場合があり、構造機能相関に関する議論が予想以上に困難となった。最終的には、阻害剤の  $\text{IC}_{50}$  値や  $K_d$  値と複合体構造との相関についての知見がいくつか蓄積され、強力な阻害剤の開発のための構造基盤が構築できた。中でも HQL-79 は、経口投与によるモデルマウスを使った vivo の実験で、抗アレルギー作用以外に、筋ジストロフィーや脳損傷に対する改善効果が観測でき、実用化を目指した誘導化の必要性を感じた。

一方、感染性寄生原虫による血中への大量の  $\text{PGF}_2$  の放出は流産の原因と考えられ、流産防止薬開発のため TbPGFS の X 線構造解析を行った。Mutation 実験の結果から、同じ AKR スーパーファミリーに属する酵素とは異なる反応機構を提唱したが、そのために欧文雑誌への発表が予想外に遅れた。また、結晶化に用いたクエン酸が活性部位に結合して酵素活性を阻害したため、阻害剤複合体結晶が得られず、阻害剤の開発が進展しなかった。最終年度で *Leishmania major* および *Trypanosoma cruzi* 由来 PGFS を PEG を使って結晶化し、今後これら 2 つの構造をもとにした阻害薬の開発を進める責任を感じている。

#### 6 研究総括の見解:

ヒト由来の酵素で高分解能の構造解析に成功し、金属イオンによる活性化の発見を行い、金属イオン効果を構造化学的に解明したことは、大いに評価できる。その後のプロスタグランジン D およびプロスタグランジン F 合成酵素の阻害剤の開発に向けた研究は、蛋白質の構造機能相関研究特有の複雑な問題に直面して難航しているようだ。そのような状況を集中力で突破することがこの分野の一流の研究者には求められていると思う。1 期生や学会のまとめ役も努め、組織にとってかけがえのない働きをしているが、傍の迷惑をも顧みず自分の研究に集中する悪魔的な面も時には研究には必要で、今後はこの難しい問題を克服していかなければならないだろう。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. T. Inoue, D. Irikura, N. Okazaki, S. Kinugasa, H. Matsumura, N. Uodome, M. Yamamoto, T. Kumasaka, M. Miyano, Y. Kai & Y. Urade. (2003) Mechanism of Metal Activation of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase. *Nat. Struct. Biology*, 10, 291–296.
2. H. Adachi, K. Takano, Y. Hosokawa, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura, M. Yoshimura, Y. Tsunaka, M. Morikawa, S. Kanaya, H. Masuhara, Y. Kai, T. Sasaki. (2003) Laser Irradiated Growth of Protein Crystal. *Jpn.J.Appl.Phys.* 42, L798-800 (2003).
3. 井上豪、甲斐泰. (2003) ヒト由来プロスタグランジン D 合成酵素の金属イオン効果のメカニズム. *日本結晶学会誌*, 45, 190-195 (2003).
4. T. Inoue, Y. Okano, Y. Kado, K. Aritake, D. Irikura, N. Uodome, N. Okazaki, S. Kinugasa, H. Shishitani, H. Matsumura, Y. Kai & Y. Urade. (2004) The First Determination of the Inhibitor Complex Structure of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase. *J. Biochem.*, 135, 279-283.
5. 井上 豪, 甲斐泰\*, 裏出良博. (2005) ヒト造血器型プロスタグランジン D 合成酵素の構造に基づく阻害剤の開発. *有機合成化学協会誌* (2005) 印刷中
6. 井上豪, 裏出良博. (2005) 2 種のプロスタグランジン合成酵素の構造を基にした阻害剤開発. *生物物理学会誌* (2005) 印刷中

##### 特許

1. 特願 2002-084603 プロスタグランジン D 合成酵素の 3 次元立体構造及びその使用

発明者:井上 豪、甲斐 泰、裏出良博、岡野洋介、衣笠茂浩、松村浩由、入倉大祐、  
早石修、山本雅貴、熊坂崇、宮野雅司

出願人:財団法人大阪バイオサイエンス研究所 出願日:平成13年3月25日

2. 特願 2002-171569 ヒト由来プロスタグランジン合成酵素阻害剤

発明者:井上 豪、板井昭子、武藤進、裏出良博、甲斐 泰

出願人:科学技術振興事業団 出願日:平成14年6月12日

3. 特願 2002-350569 プロスタグランジンF合成酵素の結晶化と構造、およびその利用

発明者:井上豪、岡野洋介、KUBATA Bruno Kilunga、裏出良博、甲斐泰

出願人:科学技術振興事業団 出願日:平成14年12月2日

#### 出版物

1. Y. Xie, T. Inoue, Y. Miyamoto, H. Matsumura, K. Kataoka, K. Yamaguchi, S. Suzuki, Y. Kai. (2003) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of mavicyanin from Cucurbita pepo medullosa. Acta Cryst., D59, 1474-1476.
2. T. Inoue, S. Suzuki, N. Nishio, K. Yamaguchi, K. Kataoka, J. Tobari, X. Yong, S. Hamanaka, H. Matsumura & Y. Kai. (2003) The significance of the flexible loop in the azurin (Az-iso2) from the obligate methylotroph Methylomonas sp. strain J. J. Mol. Biol., 333, 117-124.
3. Xie Y, Inoue T, Seike N, Matsumura H, Kanbayashi K, Deligeer, Itoh K, Kataoka K, Yamaguchi K, Suzuki S, Kai Y. (2004) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of dissimilatory nitrite reductase isolated from Hyphomicrobium denitrificans A3151. Acta Cryst., D60, 2383-2386.
4. Xie, Y. Inoue, T. Miyamoto, Y. Matsumura, H. Kataoka, K. Yamaguchi, K. Nojini, M. Suzuki, S. Kai, Y. (2004) Structural Evidence of pH-induced Change Potential of Mavicyanin form Cucurbita pepo medullosa (Zucchini) J. Biochem., (2005), in press.

#### 招待講演

1. 井上 豪、Structural analysis of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase for Anti-allergic drug design、第4回アジア結晶学連合会議、(2001)バンガロール
2. 井上豪、ヒト由来造血器型 PGD 合成酵素の X 線構造に基づく阻害剤の開発、第75回日本生化学会大会、(2002)、京都
3. 井上豪、トリパノソーマ由来プロスタグランジン F2a 合成酵素の結晶構造:アルド-ケト還元酵素によるプロスタグランジン F2a の合成に関する知見、第3回日本蛋白質科学会年会、(2003)、札幌
4. 井上豪、ヒト由来プロスタグランジンD合成酵素の金属イオン効果を考慮した阻害剤の開発、平成15年度日本結晶学会年会シンポジウム、(2003)、熊本
5. 井上豪、ヒト由来 PGD 合成酵素の金属イオンによる活性化を考慮した抗アレルギー剤の開発、第26回日本分子生物学会年会、(2003)、神戸
6. 井上豪、造血器型プロスタグランジン合成酵素の X 線構造解析と医薬品への応用、理研構造生物学 IX シンポジウム、(2004)、理研播磨
7. 井上、プロスタグランジン合成酵素の構造を基にした阻害剤開発と創晶プロジェクト、第42回日本生物物理学会シンポジウム、(2004)、京都