

2007年7月16日

独立行政法人 理化学研究所
米国ハーバード大学ブリガム婦人病院

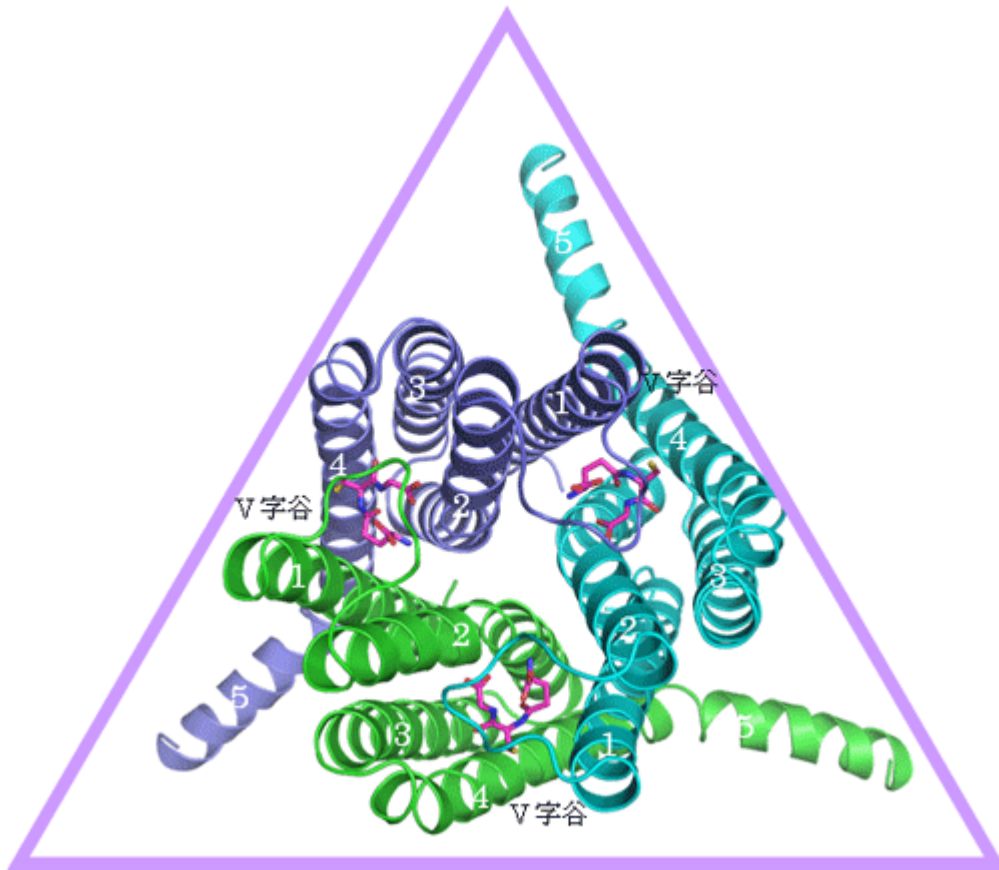
喘息やアレルギーの治療薬開発に確かな道しるべ見出す

- 炎症物質を産生するタンパク質の立体構造を世界で初めて決定 -

免疫機能は私たちの体をウイルスやがん、ばい菌などから守る仕組みで、誰もが備えています。体の中では、異物である抗原が入り込むと、抗体をつくり、免疫細胞を結集させ戦っているのです。ところが、花粉症などの先進諸国で増えている慢性アレルギーは、この免疫機能の乱れが原因になっていると考えられるようになりました。

この免疫機能の重要な役割を担う生体物質のひとつが、喘息や炎症を引き起こす物質「システイニルロイコトリエン」で、これはロイコトリエンC₄合成酵素が生産する「ロイコトリエンC₄」と、ロイコトリエンC₄が代謝された一連の物質群の総称です。これらはアレルギー物質でもあるヒスタミンより、肺の気管支収縮活性で1,000倍も強い「アナフィラキシー遅延反応物質」として知られてきました。

理研放射光科学総合研究センターの宮野構造生物物理研究室は、米国ハーバード大学ブリガム婦人病院と、このロイコトリエンC₄合成酵素の立体構造を世界で初めて明らかにし、合成の仕組みを解明しました。合成酵素は、膜の上に正三角形を作るように3つ集まっており、そのV字型の空間が酵素として働く（触媒）活性の中心的な場所であることがわかりました。さらにロイコトリエンC₄合成酵素は、炎症免疫における強い病理や生理反応を引き起こすロイコトリエンC₄生合成のキー酵素であるため、例えば花粉症、慢性喘息など、未だ十分な薬が無い慢性アレルギー疾患に対する、新たな作用機序を持つ抗炎症抗アレルギー創薬につながる可能性があります。



(図) ヒト由来ロイコトリエンC₄合成酵素の全体構造

2007年7月16日

独立行政法人 理化学研究所
米国ハーバード大学ブリガム婦人病院

喘息やアレルギーの治療薬開発に確かな道しるべ見出す

- 炎症物質を産生するタンパク質の立体構造を世界で初めて決定 -

◇ポイント◇

- ・「ロイコトリエン C₄ 合成酵素」そのものや産生開始の状況を結晶化し解析
- ・“酵素”が3つで正三角形を作り、隙間のV字空間が触媒機能を生み出す
- ・構造解析をもとに薬の候補になる新たな合成阻害分子のデザインも

独立行政法人理化学研究所(野依良治理事長)は、米国のハーバード大学(President Drew Gilpin Faust)ブリガム婦人病院と共同で、喘息や炎症を引き起こす物質であるロイコトリエンC₄(LTC₄)を「ロイコトリエンC₄合成酵素」(LTC₄S)が合成する仕組みを解明しました。さらに、その働きを抑える薬剤を作るために役立つタンパク質表面の特徴的な構造を、X線結晶構造解析で明らかにしました。これは、理研放射光科学総合研究センター(石川哲也センター長)宮野構造生物物理研究室の吾郷(あごう)日出夫専任研究員、入倉大祐協力研究員、宮野雅司主任研究員、米国のハーバード大学ブリガム婦人病院の金岡禧秀助教授、K.フランク・オースティン(K. Frank Austen)教授らによる成果です。

LTC₄Sは、膜貫通型タンパク質^{*1}の一種で、免疫、炎症に関わる細胞が活性化した時に働き、LTC₄という脂質メディエーター^{*2}を産生します。すなわち、LTC₄Sは、脂肪酸LTA₄とグルタチオン^{*3}からLTC₄を産生する反応で、触媒として機能しています。合成したLTC₄とその代謝物は総称してシステインルロイコトリエン(Cys-LT)と呼ばれ、アナフィラキシー^{*4}遅延反応性物質(SRS-A)^{*5}のひとつとして、肺の気管支収縮活性を示すヒスタミン^{*6}より1,000倍強い収縮機能を持つことが、40年以上前から知られています。しかし、LTC₄SがLTA₄とグルタチオンからLTC₄を作る際の、その働きや反応の実態については謎でした。

研究グループは、LTC₄Sの立体構造を、大型放射光施設SPring-8を用いて決定しました。その結果、LTC₄Sが酵素として触媒機能を発揮するためには、3つのLTC₄Sが正三角形の頂点になるように集まり、隣り合う2つの酵素間にV字型の空間を作っていました。このV字型の空間が触媒機能の活性中心となり、その奥には、産生が始まったLTC₄の一部のグルタチオンがU字型の形で深く埋まって結合していました。さらに、このV字型の空間に、LTC₄Sの働きに直接関わると予想された複数のアミノ酸残基が面していました。以上の点から、グルタチオンとLTA₄からLTC₄が作られる触媒機能の活性中心の場所は、隣り合う2つの単量体LTC₄Sの間に存在するV字型の空間であることがわかりました。また、グルタチオンの代わりに、LTC₄の部分構造を持ちLTC₄と形が良く似ているS-ヘキシルグルタチオン^{*7}をLTC₄Sと結合させると、S-ヘキシルグルタチオンもこの空間に結合することが明らかになりました。

LTC₄SはLTC₄生合成のキー酵素として知られており、今回の成果は、例えば花粉症、喘息など十分な薬がまだ無い慢性アレルギー疾患に対する、新たな作用機序を持つ抗炎症・抗アレルギー創薬につながる可能性があります。

本研究の一部は、わが国が推進している「タンパク 3000 プロジェクト」の中で行われ、研究成果は、英国の科学雑誌『Nature』オンライン版(7月15日付け:日本時間7月16日)、8月2日号の印刷版(vol 448, 609-612, 2 August, 2007)に掲載されます。

1. 背景

喘息や炎症を引き起こす生理活性物質LTC₄とその代謝物 (LTD₄、LTE₄) は、生体内に存在するアラキドン酸を出発原料に、さまざまな反応を繰り返し、5-リポオキシゲナーゼの経路を介して産出される脂質メディエーターです (図 1)。LTC₄、LTD₄、LTE₄ (図 1) は、総称してシステニルロイコトリエン (Cys-LT) と呼ばれ、体内に抗原 (アレルゲン) が入り込むと、免疫、炎症に関わる細胞にIgEというタンパク質が結合して抗原抗体反応^{*8}の後に放出される化学物質です。このCys-LTは、特異的な受容体に結合することで、肺の気管支収縮や毛細血管の膜透過性の亢進、粘液の分泌を増加させます。これらの反応は、抗原が体内に入るとすぐに始まり、アレルギー性鼻炎 (花粉症) や気管支喘息の症状を引き起こすこととなりますが、さらに反応が過剰に進むとアナフィラキシーショックという重篤な病態を引き起します。

Cys-LTは、1960年代に、同じく肺の気管支収縮活性を示すヒスタミンより 1,000 倍強く、長時間続く活性があることから、アナフィラキシー遅延反応性物質 (SRS-A) とも呼ばれていました。その後、スウェーデンのベンクト・サムエルソンらが、SRS-A (Cys-LT) の化学構造が、一つの分子中に 4 つの二重結合を持つ脂肪酸と、アミノ酸が 3 つつながったトリペプチドであるグルタチオンが結合したものであることを明らかにして、1982年にノーベル生理学・医学賞を受賞しました。

Cys-LTの一部の働きを阻害する物質が、これらの諸反応を抑制することから、喘息やアレルギー治療薬に用いられています。金岡、オースティンらが作製したLTC₄Sの遺伝子を欠損させたネズミを使った種々の炎症モデル実験では、現在用いられている阻害薬では説明できないCys-LTの生体内での免疫および炎症反応における役割が明らかになっています。このことはLTC₄Sの阻害薬が、新たな喘息、アレルギーの治療薬となる可能性を示唆します。しかし、免疫反応の重要な役割を果たすLTC₄Sの働きやその反応の実態については謎のままです。

2. 研究手法

研究グループは、LTC₄を作る酵素であるLTC₄Sの立体構造を、原子レベルで明らかにするために、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) で遺伝子工学の手法を用いて、生体内とまったく同じ姿をしたLTC₄Sを発現させました。さらに、LTC₄Sの触媒機能を詳しく調べるために、解析には、LTC₄産出に必要なグルタチオンを含んだ、反応がある程度進んだ状態の結晶を作り、X線結晶構造解析によってその構造を明らかにしました。大型放射光施設SPring-8の理研構造生物学IIビームラインBL44B2を使って、LTC₄Sの立体構造を 3.3 Å (オングストローム=10⁻¹⁰m) の精度で測定し、構造を決定しました。

3. 研究成果

ヒト由来LTC₄Sの結晶構造を、基質であるグルタチオンとの複合体として 3.3 Å の精度で決定しました。その結果、LTC₄Sの三次構造は、5本のα-ヘリックスからなり、初めの4つのα-ヘリックスが膜貫通α-ヘリックス束を形成した後、5本目のα-ヘリックスが続く構造となっていました。LTC₄Sが酵素として機能するためには、4回膜貫通型タンパク質であるLTC₄Sが、3分子集まり、正三角形の頂点を基点としたような構造をつくり (図 2)、その隣り合う2つのLTC₄Sの間に角度が 30 度の

V字型の空間を作っていました。また、LTC₄の一部になるグルタチオンはU字型の構造をとり、V字型の空間に深く埋まって結合していました(図3)。LTC₄Sが酵素として機能するためのグルタチオンの結合様式(図2)は、今まで報告されたグルタチオンの代謝に関する他の酵素には、見られないものでした。さらに、LTC₄Sの働きに関わる複数のアミノ酸残基が遺伝子工学的手法により示唆されていましたが、それらはすべてこのV字型の空間に面していることもわかりました(図3)。

以上の点から、グルタチオンとLTA₄からLTC₄が作られる場所(触媒活性部位)は、隣り合う2つの単量体LTC₄Sの間に存在するV字型の空間(図3)であることがわかりました。このことは、LTC₄に似た形をして触媒機能を抑えるS-ヘキシルグルタチオンを加えた結晶を解析し、この反応を阻害する様子も明らかにすることで、さらに支持されました(図4)。研究グループは、この複合体モデル構造から、「グルタチオン近傍に存在し、それぞれ隣り合う2つの酵素から提供される異なる2つのアルギニン残基がLTC₄産生に重要である」という全く新しい分子メカニズムを提案しました(図5)。

4. 今後の期待

LTC₄Sは、アミノ酸配列の類似性から、膜に結合するエイコサノイドとグルタチオンの代謝に関するタンパク質の一群に属しています。その一群は、英語名(Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism)の頭文字をとって「MAPEG superfamily」と呼ばれています。これらの中には、生体内で最も豊富に産出される生理活性脂質プロスタノイド^{*9}の1種であるプロスタグランジンE₂(PGE₂)の産生に関わる酵素(MPGES-1)も含まれており、PGE₂もまた、生命機能において子宮収縮、発熱などの重要な役割を担っています。このタンパク質の一群に属するLTC₄Sで見いだした、グルタチオンの結合様式と基質結合部位の新発見は、MPGES-1を含む「MAPEG superfamily」に属する酵素の働きを理解することに大きく寄与します。また、LTC₄Sは、炎症・免疫における強い病理や生理反応を引き起こすSRS-A生合成のキー酵素であるため、例えば花粉症、慢性喘息など、未だ十分な薬が無い慢性アレルギー疾患に対する、新たな作用機序を持つ抗炎症・抗アレルギー創薬につながる可能性があります。

< 報道担当・問い合わせ先 >

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

放射光科学総合研究センター 宮野構造生物物理研究室

専任研究員 吾郷 日出夫(あごう ひでお)

協力研究員 入倉 大祐(いりくら だいすけ)

主任研究員 宮野 雅司(みやの まさし)

Tel : 0791-58-2815 / Fax : 0791-58-2816

播磨研究推進部 黒柳 拓男(くろやなぎ たくお)

Tel : 0791-58-0800 / Fax : 0791-58-0800

(SPring-8に関する問い合わせ先)

財団法人高輝度光科学研究センター 広報室

Tel : 0791-58-2785 / Fax : 0791-58-2786

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 膜貫通型タンパク質

細胞の脂質二重膜を貫通する形で結合しているタンパク質の総称。過去に SPring-8 において構造決定された、ウシ由来ロドプシンやウサギ由来カルシウムポンプは、このカテゴリーに入る。

※2 脂質メディエーター

生理活性脂質のうち生体内で生産され、細胞外に放出された後に他の細胞上にある細胞膜受容体に結合することによって作用する脂質。反応などを仲介、伝達しているように見えることからメディエーターの名が付いた。

※3 グルタチオン

天然には動物、酵母その他ほとんどの生体細胞中に含まれ、きわめて重要な役割を果たす。アミノ酸が3つ（グルタミン酸、システイン、グリシン）繋がったトリペプチドである。

※4 アナフィラキシー

生体の免疫応答反応のひとつで、IgE というタンパク質が関与する。あらかじめ適当な抗原を注射しておいた動物に、再び同じ抗原を注射すると、その動物が激しいショックを起こす症状をいう。

※5 アナフィラキシー遅延反応性物質(SRS-A)

生体のアナフィラキシー免疫応答反応の際に、免疫や炎症に関与する細胞から、脂質メディエーターとして放出される化学物質。半世紀以上も前からその存在が知られており、肺の気管支や回腸を長時間にわたって収縮させる活性があることから、この名前が付いた。アナフィラキシー遅延反応性物質の英語表記である“Slow Reacting Substance of Anaphylaxis”の英語の頭文字をとってSRS-Aと呼ばれている。その後、スウェーデンの生理学者で、ノーベル医学生理学賞を受賞したベンクト・サムエルソンらによって、SRS-Aの構造が明らかにされ、後にロイコトリエンC₄ (LTC₄) と名づけられた。

※6 ヒスタミン

ロイコトリエンと同様、体内で過剰に遊離するとアレルギーを引き起こすといわれている。市販の抗アレルギー薬の一部は、この物質を標的にしたものである。

※7 S-ヘキシルグルタチオン

グルタチオンの硫黄原子に6つの炭化水素鎖が結合した、化学合成の物質。天然には存在しない。

※8 抗原抗体反応

抗原（アレルゲン）と、これに対応する抗体とが結合して引き起こされる特異的反応。ヒトや動物の体内では、アレルギーの原因となる。

※9 プロスタノイド

ロイコトリエンと同様に、アラキドン酸から産生される。生体内で様々な生理機能を担うばかりでなく、発熱や痛み、炎症などの病状を引き起こすプロスタグランジンやスロンボキサンなどの脂質メディエーターの総称。

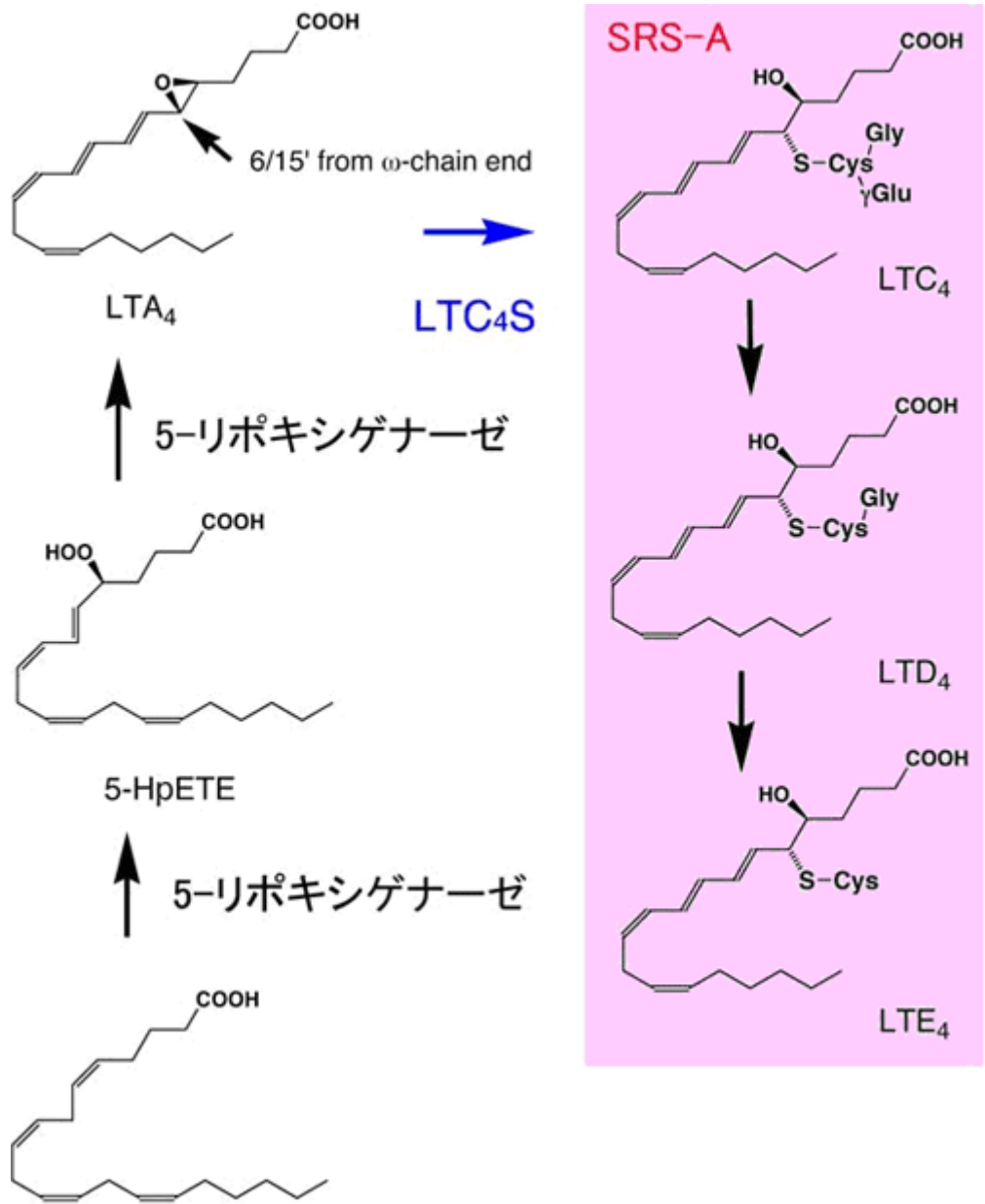


図1 LTC₄の生合成経路

5-HpETE (5-hydroperoxy eicosa tetraenoic acid) : 5-ヒドロ・ペルオキシ・エイコサ・テトラエン酸、Glu: グルタミン酸、Cys: システイン、Gly: グリシン。

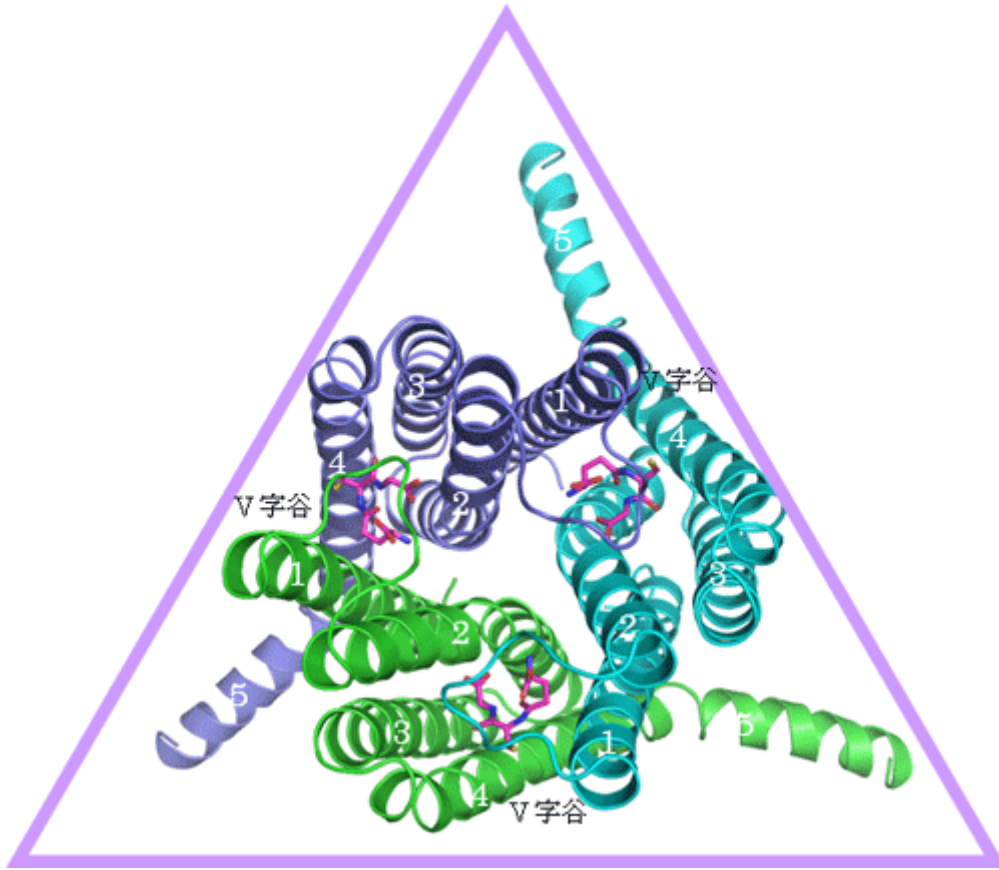


図2 ヒト由来LTC₄Sの全体構造

LTC₄S（紫、水、黄緑色）は5本の α -ヘリックスのみで構成されていた。LTC₄Sは正三角形の頂点になるようにぐるりと3分子集まって酵素として機能する。赤紫色はグルタチオン。

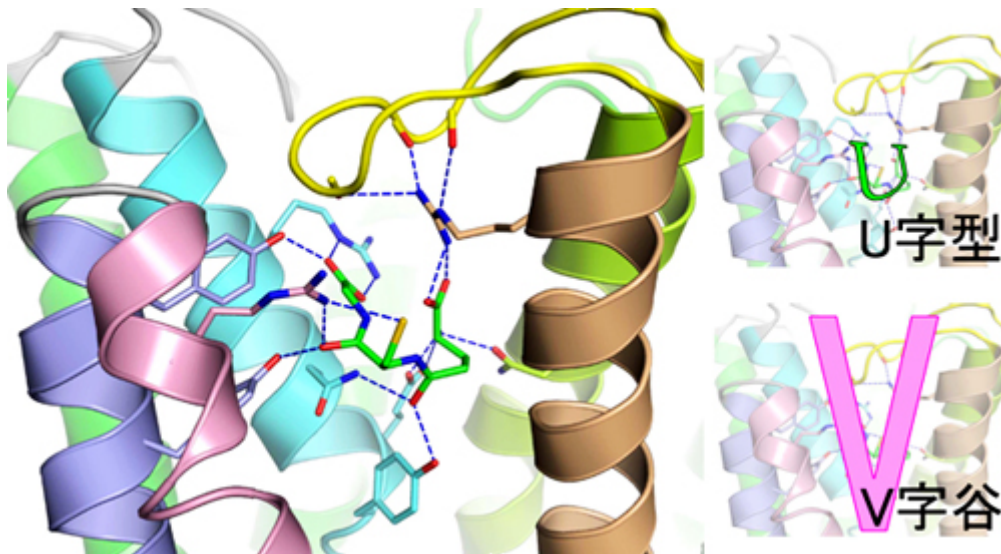


図3 U字型のグルタチオン

グルタチオン（図中央部分：緑色）近傍に存在するさまざまなアミノ酸の相互作用によってU字型が安定していた。

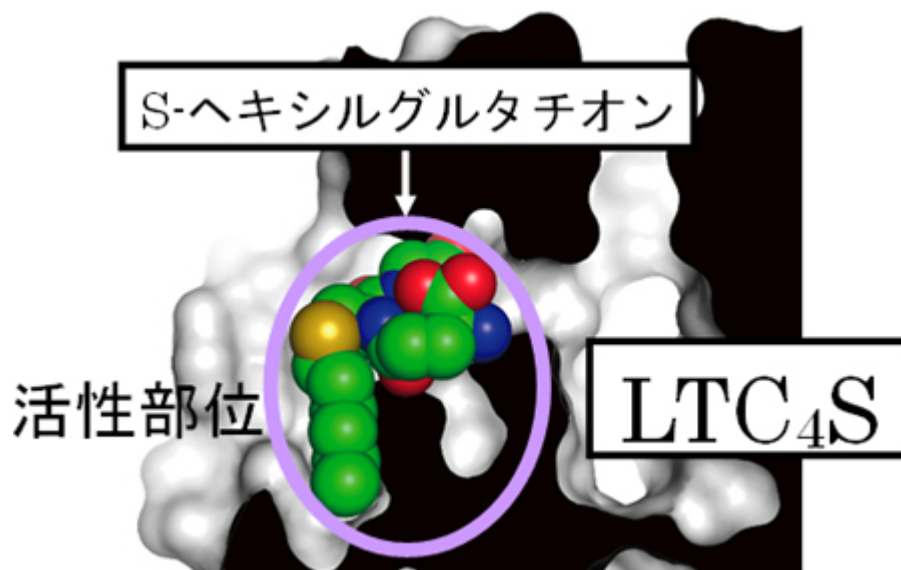


図4 活性部位に結合したS-ヘキシルグルタチオン

活性部位にはLTC₄に似た形をしたS-ヘキシルグルタチオンが結合していた。（白と黒の部分でLTC₄S）

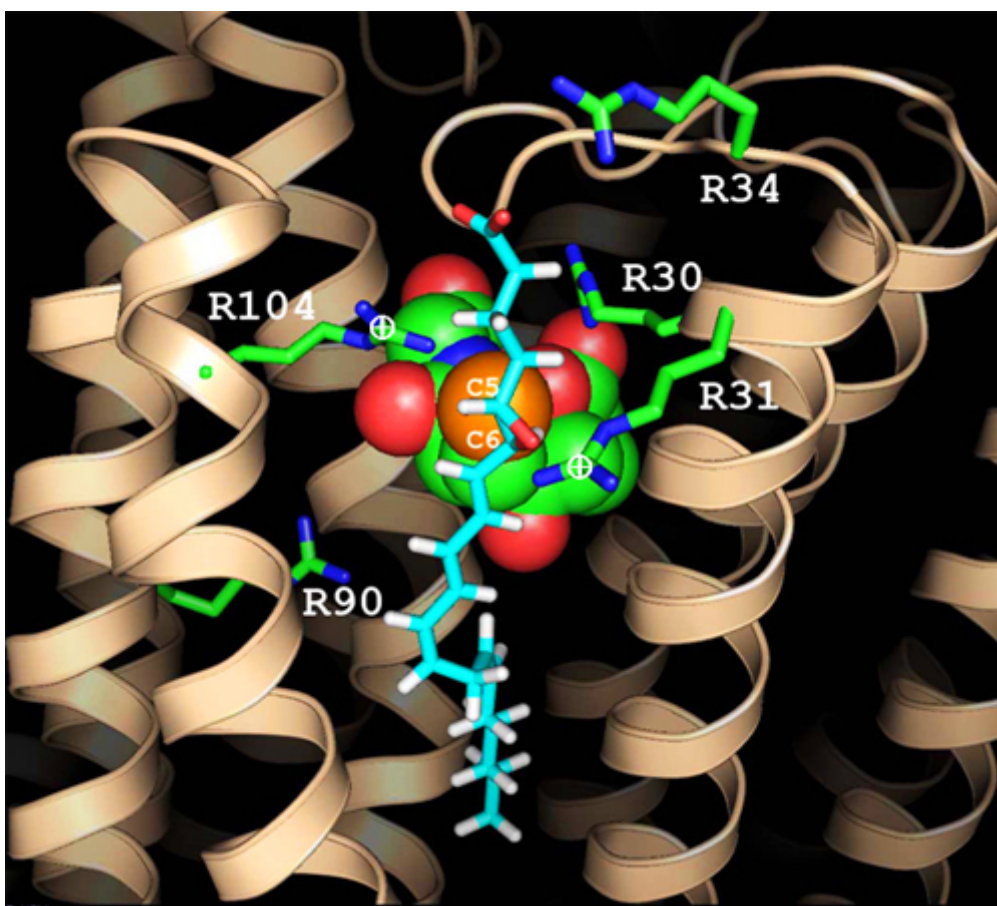


図5 基質LTA₄ (図中央部分：水色) がLTC₄Sの活性部位に結合したモデル

グルタチオン (図中央部分) 近傍に存在し、隣り合う酵素からそれぞれ供される2つのアルギニン残基 (R31 とR104) がLTC₄を産生するという、全く新しい分子メカニズムを提案した。