

チオール化合物によるヘムオキシゲナーゼのアイソザイム選択的阻害

○岩崎真理、河南朋恵、松井敏高、海野昌喜、吉田匡#、齋藤正男

(東北大・多元研、#山形大・医)

mr-iwsk@mail.tagen.tohoku.ac.jp

[緒言] ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、生体内で不要になったヘムを鉄・一酸化炭素・ビリベルジンに分解する酵素であり、哺乳類には相同性の高い2つのアイソザイム (誘導型 HO-1、構成型 HO-2) が存在している。HO は鉄の恒常性維持・シグナル伝達・抗酸化作用などの重要な役割を担っており、その生理的役割を解明するために阻害剤が用いられてきた。しかし、一般的に使用される金属置換ポルフィリンはアイソザイム選択性が乏しいために HO-1 と HO-2 を個別に評価することは困難であり、他のヘム関連酵素も阻害してしまうことも報告されている。そこで本研究では、ポルフィリンとは異なる骨格を持ち、アイソザイム選択性を有する HO 阻害剤の探索を試みた。

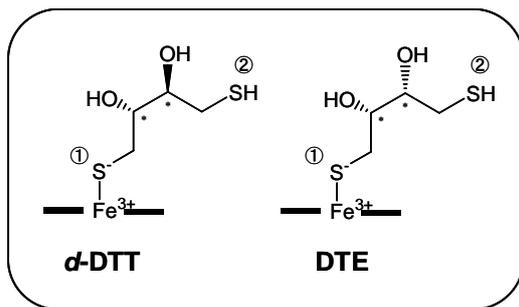


図 1. DTT、DTE のヘムへの配位様式

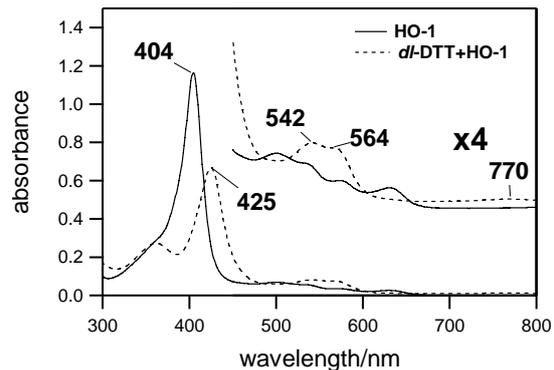


図 2. DTT 結合前後の吸収スペクトル

[結果と考察] HO反応はヘムによる酸素活性化で進行するため、ヘム鉄の配位子によって阻害される。HOのヘム結合部位には特徴的な水素結合ネットワークが存在するため、その構造を基にHO特異的な配位子を探索し、いくつかの化合物についてスクリーニングを行った。その結果、DTT (dithiothreitol, 図 1) がHO中の酸化型ヘム鉄と強く結合することが明らかとなり、結合に伴う吸収変化からチオレート配位が示唆された (図 2)。また、DTT配位によってヘムの還元が遅くなり、HO反応を阻害することが示された。興味深いことにDTTはHO-2 に比べ約 6 倍の親和性でHO-1 に結合し (HO-1: $K_d = 5.1 \mu\text{M}$ 、HO-2: $K_d = 34 \mu\text{M}$)、さらにそのジアステレオマーであるDTE (dithioerythrothreitol, 図 1) はより高いアイソザイム選択性を示した (HO-1: $K_d = 4.6 \mu\text{M}$ 、HO-2: $K_d = 64 \mu\text{M}$)。DTT類似化合物を用いて高い親和性に必要な構造について検討したところ、非配位性チオール基 (図 1, チオール②) が高い親和性に重要であることを見出した。また、2つのチオール基の1つを水酸基に置換した化合物の親和性が1000倍以上低下したことから、チオール②がチオレートとしてHO-1と相互作用していると考えられる。

そこで DTT、DTE 結合型 rat HO-1 の結晶構造解析を行った。一方のチオール基 (図 1, チオール①) は HO 中のへム鉄に配位しており、チオール②は Arg136 の近くに位置していることが明らかになった (図 3)。しかしチオール②と Arg136 の相互作用は N⋯S 間距離と角度から、非常に弱いと考えられる。つまり、チオール②は結合状態を安定化していないと考えられ、実際、解離速度はチオール②の有無によって大きな変化はなく、

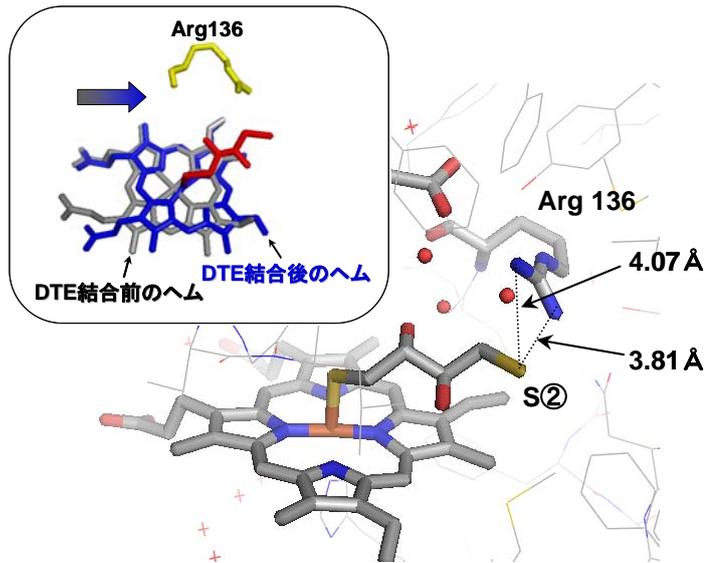


図3. DTE 結合型 HO-1 の結晶構造

DTT 類の親和性は会合速度の増大によって高められていることが明らかとなった。また、ジフテリア菌由来の HO (HmuO) の DTT 結合型結晶構造では、Arg132 (ratHO-1 の Arg136 に相当) の近くにチオール②が位置しておらず、HO と比べて会合が遅く親和性も低いという結果が得られている。以上の結果から、チオール②が Arg136 と相互作用して DTT 類をへム近傍に捕捉し (図 4, I)、引き続いておこるへム鉄への結合を促進することで見かけの会合が速められていると考えられる。その後、へムがチオール①と結合しようと位置をずらし (図 4, II)、結合後元の位置に戻ろうとしてチオール②と Arg136 の相互作用が弱まるのではないかと考えられる (図 4, III)。このため、結晶中においてチオール②と Arg136 の相互作用は非常に弱く、DTT 類結合前後でへムの位置が Arg136 方向へずれているのではないかと考えられる。

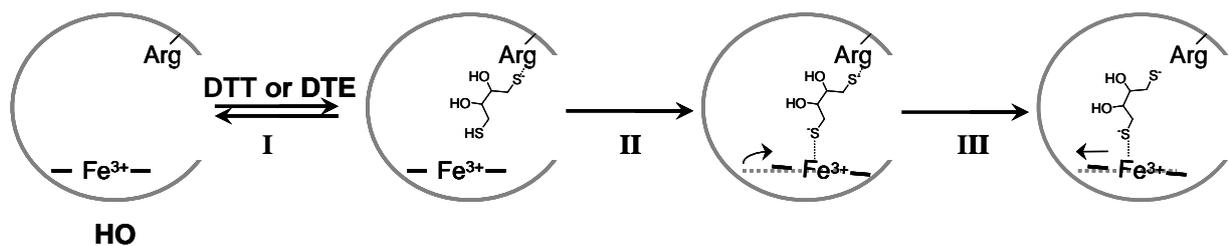


図4. 予想される DTT 類の会合機構

以上本研究では、DTT 類が HO 中のへム鉄へ配位し、HO-1 選択的な阻害剤となることを見出した。DTT 類は強い還元力を有するために生体への適用には問題点が多いが、今後、DTT 類の骨格を基に還元力を抑えた実用的なアイソザイム選択的阻害剤の開発が期待できる。また、選択性の向上には HO-2 と DTT の複合体構造解析が必須であるが、HO-2 の結晶化の成功例は未だなく、現在結晶化条件を検討中である。また、一般的なチオール還元剤 DTT は HO 反応時に添加されている例もあり、これらの阻害剤共存下での活性については再検討が必要と考えられる。