

グルタチオン S-転移酵素の構造と機能

—薬剤による抵抗性発現からの脱却—

宮本 徹*

(平成 24 年 12 月 21 日受付/平成 25 年 1 月 25 日受理)

要約: グルタチオン S-転移酵素 (GST) はミクロソーム酸化酵素であるチトクローム P450 と並んで生物体に広く存在する抱合酵素である。これは生体内で生合成や薬物の代謝分解に於いて重要な役割を演じている。 α , μ , π , σ クラス GST では, チロシンがグルタチオン (GSH) のプロトンを引き抜き, GSH 抱合体を形成する。一方, 昆虫の θ , δ , ε クラス GST では, セリンが近傍のペプチド結合のカルボニル基と相俟って, GSH からプロトンを引き抜き, GSH 抱合体を形成する。植物や大腸菌の GST は昆虫と同じセリンのシステムで GSH を活性化しているようである。本稿では, この GST の触媒機構と多様な機能を計算化学による必須アミノ酸残基の立体配座の視点から解説し, 薬剤開発と抵抗性発現のイタチごっここの解消の足がかりを提案する。

キーワード: グルタチオン S-転移酵素, グルタチオン, チロシン, セリン, 立体配座

1. はじめに

グルタチオン S-転移酵素 (GST) はミクロソーム酸化酵素 (P450) と並んで生物体に広く存在する薬物代謝酵素である。P450 は外来物質を酸化して水溶性物質へと代謝を回す酵素で, ミクロソーム画分に分画される。GST は更にこの極性代謝物をグルタチオン (GSH) に抱合して体外へ排泄する一般には解毒化を回す酵素で, サイトソール画分に分画される。他の抱合酵素と異なる点は, 極性をもつリガンドだけでなく無極性のリガンドを直接 GSH に抱合できるところにある。P450 は FMO (フラビン含有モノオキシゲナーゼ) と並んで, 第二アミンや第三アミン, スルフィドをヒドロキシルアミンや *N*-オキシド, *S*-オキシドに酸化し, 解毒のみならず毒性の発現を招いて選択毒性を生む大きな特徴をもつが, GST にも特異な活性化を導く事例がある。有機リン殺虫剤プロチオホスやチアジアゾリジン系のプロトックス阻害型除草剤が GST により活性化されるという報告である。ベンゾ [a] ピレンは P450 による酸化とエポキシド加水分解酵素による加水分解が組み合わされて初めて発癌性物質に活性化されるが, プロチオホスもこれと同様に P450 による酸化と GST による抱合が連動して初めて特異な殺虫力を発現する。これらはいずれも「薬の開発の基礎知見」になり, 「抵抗性発現と薬剤開発のイタチごっこ」を脱却するヒントになる。GST の機能に関する個々の科学的知見は多くの成書にあるので, 本稿ではこれらは第 6 章, 第 1 節に要点をまとめて解説する。生体内で進むステロイドの合成では, 反応の各ステップを異なる P450 分子種が個別に作用するといった, 生合成に係わる酵素は基質との特異性が高いが, 外界からの有機化合

物の侵入には天然物であれ人工化学物質であれその基質特異性は低い。多種類の薬物代謝酵素ファミリーがありそれぞれ分子多様性をもって外来物質の解毒に対応しているのである。無論これは薬物代謝の性質上からは理にかなったことであるが, そのメカニズムは体系的に多くは語られてこなかった。GST はこの薬物代謝酵素としての役割の他に, 生体内合成や酸化ストレス, 貯蔵やトランスポータとしての働きをもつ典型的な多機能酵素である。

これまでタンパク質の研究は一次構造の相同性, 基質特異性, 部位特異的変異法, X 線結晶解析等により明らかにされてきた。GSH はチオールアニオン (S^-) を分子中央部に突出させ翼のような形をとり, これにリガンドの反応部位が向き合って結合部位に収まり抱合反応が完成する。そのため結合部位はリガンドを認識する特定残基を相応する位置にもち, リガンドの全体構造を保持できる立体空間をもっていることが必要である。ベンゾ [a] ピレンの保持部位のように伸び広げられた C 末端部が結合部位になる事例も見られる。このように GST は, GSH の巧妙な活性化機構とリガンドが都合よく結合できる結合部位を多種類の分子種をもつことにより可能にしている。この点 P450 も, いずれの分子種も Fe を活性部位にもちリガンドを取り込んで $Fe \cdot$ リガンド複合体をつくり, 空気中の分子状酸素を活性化して酸化反応を完結するといった, GST も P450 もリガンドの構造を選ばない中で酸化なり抱合なりの反応が自由度を大きくもって進むように三次構造が形作られていると考えていいのかも知れない。

部位特異的変異法では必須残基を知ることはできるが, その立体構造は分からず, X 線結晶解析では立体構造は分かっても反応時の立体配座には至らない。本稿では, 計算

* 東京農業大学名誉教授

化学を基盤に、タンパクの分子モデリングによる三次構造に有機化学的な構造修飾を加え、立体配座の視点から GST の分子多様性、種々の機能を解説する。

2. GST の分類と一次構造

GST はほとんどの真核生物に存在し、一部の原核生物にもその存在が見つかっている。小胞体に存在する膜結合のミクロソーム GST と細胞質に存在する水溶性のサイトソリック GST がある。両者の間には機能的な関係はない。GST に関する論文はこの 30 年間に約 48000 報余り、動植物、微生物等生物種と係わって GST を扱った論文を検索すると、動植物 GST でそれぞれ 700 報ほど、微生物 GST で 120 報、魚 GST で 400 報余り、昆虫 GST で 500 報ほど、鳥 GST で 20 報ほどで、生物種と GST の概念が少なくともどこかに入っている論文を検索するとこの 5~10 倍の論文数が見つかる。10 年単位で GST に係わる論文を検索すると、1981-1990 年には 4400 報、1991-2000 年にはその 3.6 倍強、2001-2012 年には 6.2 倍強の論文数が検索されてくる。昆虫との係わりで絞って概観すると、1981-1990 年には 53 報、1991-2000 年には 140 報、2001-2012 年には 282 報あり、2009 年から 3 年間では 86 報、2011 年だけを見ると 42 報と、加速度的に論文数が増加していることが窺える。これは GST が P450 と共に多くの基礎反応に関与し毒性に係わって広く生物界に存在することを背景に、医薬や農薬のドラッグデザイン、工業用生物資材の創出といった応用研究が、化学分析や機器分析、分子生物学や計算化学といった種々の学問と技術により活発に行われてきていることが大きな理由であろう。

本稿では薬物代謝酵素としての GST に焦点を絞って、その構造と機能、活用について述べることから、サイトソリック GST のみを取り上げる。GST は一次構造の相同性と基質特異性を基にアルファ (α), ミュー (μ), パイ (π), シータ (θ) のように分類する。これまで研究がよく進められてきたのは高等動物由来の α , μ , π GST で、 θ GST の研究も裾が広い。PRADE, L. *et al.* (1997)¹⁾ はヒト胎盤から 5 種の α , μ , π , σ , θ クラスの GST を基質特異性と一次構造により分類して見出した。この論文で彼らは腫瘍細胞が薬剤耐性を導く GST 分子種の単一過剰発現を示すことを示し、分子種間での構造の違いを新しい抗癌剤の開発に利用できることを示唆した。SHEEHAN, D. *et al.* (2001)²⁾ も細菌、カビ、植物、昆虫、のような非温血生物の GST の分類を概観している。又、MANNERVIK, B. *et al.* (2005)³⁾ はラットやマウスの GST をヒト酵素と同様に分類した。MOHSENZADEH, Sasan *et al.* (2011)⁴⁾ は植物由来の GST の分類と構造を進化の面から 8 クラス、即ち π , T, ζ , θ , λ , dehydroascorbate reductase, tetrachlorohydroquinone dehalogenase の 7 種とミクロソーム GST 1 種に分類できると記している。昆虫の GST については、農薬の代謝分解や抵抗性発現、毒性研究が盛んなため、 θ , δ , ε GST の研究が精力的に行われている。1991-2012 年で検索したところ、論文の多くは α , θ , δ , ε クラスの研究で、高等動物を中心に報告が多くある α , μ , π クラスでは少なくともクラス Ω ,

ζ で同程度であった。DDT やピレスロイド剤に対する抵抗性発現に係わる δ , ε クラスの GST に関する論文が多かった。イエバエや蚊の双翅目昆虫類では、6 種類の GST, θ , δ , ε , σ , Ω , ζ クラスが見つかっている。微生物の GST についても研究が盛んで幅広く行われている。このように、GST は一次構造と基質特異性を基に α , μ , π , σ , θ , δ , ε , Ω , ζ , λ , T 等といった多くのクラスに分類されてきたが、今日では総じて GSH の活性化機構とリガンドの保持残基やその配置の組み合わせで大別分類してもいいのではないかと。

GST の表記法³⁾ については以下のように取り決められている。クラスは alpha, mu, pi 等. のように Greek letters で、短縮する時は A, M, P 等. のように Roman capitals で表記し、クラスメンバーは構成するサブユニットの構造と組み合わせをアラビア数字で区別して表記する。例えば GSTA1-1 は α クラスでサブユニット 1 がホモで構成される GST という意味である。生物種に応じて分子種クラスは概ね決まっているが、多くはその域を超え自身に於いてマイナーなクラスも見つかっており、その生きる上での役割の複雑さが垣間見える。過剰発現し、また新しいサブタイプが創られていく、種々の遺伝子発現 (系統) が成せる業であろう。

3. GST の三次構造

GST は 2 つのドメインをもつサブユニットをホモあるいは極めて構造がよく似たヘテロで構成された 2 量体である。N 末端側ドメインの特定の分子表面に GSH を保持してアニオンへ活性化し、この近縁の C 末端側ドメインの表面にリガンドを保持して GS アニオンと抱合体を形成する。ホモロジーモデリングによる立体構造を観察すると、主鎖のフォールディングは一次構造 (相同性) が種々異なっても一見似ており、また GSH がどのタンパクに於いても必ず同じ特徴ある構造位置に配されてくる。そうであるならば、GST が分子種により異なる反応を異なる程度で見せるのは何故か。

PAULING, L. と COREY, R.B. (1951)⁵⁾ は、ペプチド結合の二次構造を X 線結晶解析により次のように明らかにした。ペプチド結合は、図 1 に示すように、N 原子の孤立電子対が CO 基と共鳴するため C-N 結合に二重結合性をもつ。そのため 2 つの sp^3 C ($C\alpha$) 原子とその間にある C, O, N, H の 4 原子は一つの平面上に乗る。この $C\alpha$ が他の 5 原子と一緒に隣の CO 基の C 原子あるいは NH 基の N 原子を軸に回転することによりポリペプチド鎖を形成する。アミノ酸残基の側鎖構造の違いにより個々回転可能範囲が制限され種々の立体構造を形成する。彼らはこのように説いた。

一次構造のアミノ酸残基の種類と結合順序が変わると、

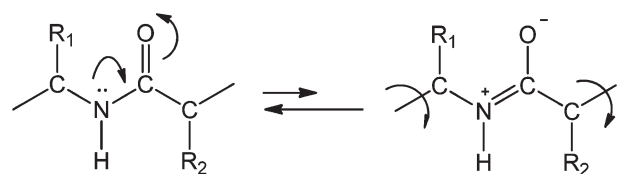


図 1 ペプチド結合

側鎖構造が異なるだけでなく、このように主鎖によるタンパク質全体の立体配座が微妙に違ってくるため、フォールディングはよく似ているように見えるが、タンパク質表面の形や性質は異なり、活性部位では種々の化合物が異なる反応を有機化学的に大胆にまた微妙に違って展開され、機能の面に大きく反映されてくるのである。

GST 分子の活性部位を一般化した模式図で図 2 に示す。酵素表面に結合した GSH の下には GSH を活性化するアミノ酸残基がある。言い換えると GSH を保持する残基が GSH のシステイン (Cys) 部の下にあり、またチオール基 (SH) の下近傍にもチオールアニオンを形成する残基が配されている。この残基が GSH のプロトンを直接引き抜けない時は更にその下にその原動力になるもう一つの残基が潜んでいる。詳細は第 5 章の「GST の触媒機構」の中で立体配座の視点から解説する。

4. 遷移構造の立体配座

(1) ホモロジーモデリング

タンパク質の構造と機能の研究は、これまで X 線結晶解析と高分解能 NMR 分析により行われてきた。しかし、結晶構造のデータはタンパク質の絶対配置 (absolute configuration) を明らかにするものの、その機能を論じるに足り得る情報は多くない。X 線結晶解析はタンパク分子が超高速で運動しその立体配座 (conformation) を逐一変える中で、任意に得られる結晶構造の配座を測定するものであるからである。一方、NMR 分析のデータは活性部位での機能を解析できるが全体構造を明らかにすることは得意ではない。近年のコンピュータの進歩は、三次構造が判明している類縁のタンパク質の構造情報があればこれらを鋳型に組み合わせて目的のタンパク質の三次構造を予測できるホモロジーモデリングの手法を生み出した。ディスプレイ上で構造を有機化学的に修飾でき、構造と機能を計算化学により考えていくことができて、X 線結晶解析では知り得なかった情報を予測できるところに大きな特徴をもつ。タンパク質の機能を考えるためにはその絶対配置だけではなく立体配座の視点が不可欠である。機能分子である酵素などはその反応に立体配座の変化が深く関わっていることを考えると、本手法は大きな武器となり得るのである。

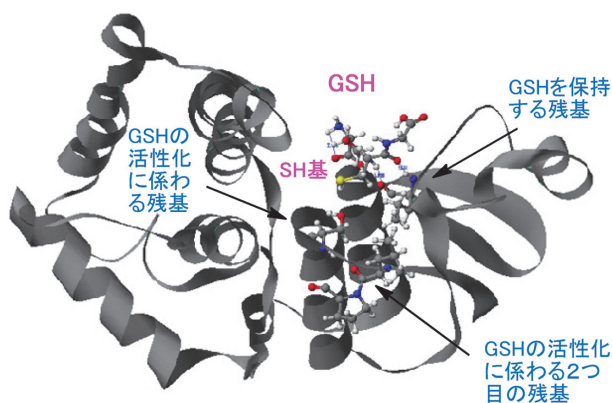


図 2 GST の活性部位の模式図

(2) 分子力学計算 (MM) の限界

ほとんどのタンパク分子は、ネイティブ構造と呼ばれる熱力学的に最も安定な配座構造で一番多く存在すると考えられている。著者らはホモロジーモデリングにより得たイェバエ GST 分子種 6A と 6B の最安定化構造を分子力学計算 (MM) で求めることを試みた^{6-9a)}。MM は、極小値をもつ配座構造を初期構造の近傍で得ることはできる。しかし、その計算はタンパク質のような大きい分子ではエネルギー障壁を越えて計算できないので、その極小値は必ずしも最小値に一致せず、最も安定な構造を得られるとは限らない。MM は初期構造に依存した安定化に過ぎないのである。

(3) 遷移状態下での極小値構造の立体配座

図 3 は横軸に連続する立体配座を、縦軸にその構造がもつエネルギー値を振ったエネルギー関数の模式図である。多くの極小値をもち、厳密にはそれぞれが更に小さな極小値に分離して存在していると考えられる。この中の最も小さい極小値が最小値で、最安定な構造の立体配座を示す。しかし、 n 残基のタンパク質はおよそ 10^n 通りの構造 (配座異性) が考えられ、大きなタンパク質の最安定構造を網羅的に探すことは技術的に不可能といえる。

近年、部分構造の最適化を組み合わせることで立体構造を予測して行く研究¹⁰⁾が進められている。著者らも、イェバエ GST の GSH の活性化を解明するに当たり、反応に係わるセリン残基側鎖 CH_2OH と近傍にあるペプチド結合、GSH の側鎖 CH_2SH をひとつくりにした反応部位の構造体での配座異性に絞って工夫をこらし、遷移状態下での考えられる極小値構造の立体配座から遷移構造の予測¹¹⁾を試みた。具体的には先ず任意に GST 分子種の一次構造から三次構造を立ち上げ、反応部位であるセリン側鎖 sp^3C 原子、GSH の Cys 部の sp^3C 原子に結合する OH 基、SH 基を、図 4 に示すようにそれぞれ他の 2 つの H 原子と入れ替えた 3 つの配座構造の組み合わせにより 9 通りの立体構造を作製した。これらを初期構造として MM による極小化を図った。一つの極小値は 2 つのエネルギー障壁間に必ず 1 つ求められるので、この 9 通りの極小化を計算することは GST タンパク分子のこれら OH 基と SH 基が採り得る全ての配座を網羅する中からこの特定の構造体をもつ 9 つの極小値構造の立体配座を計算していることに等しい。

この戦略は特定の構造体の極小化を図り、その他の構造

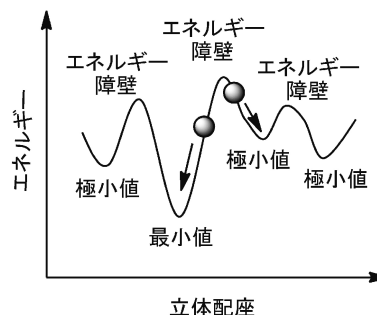


図 3 エネルギー関数の模式図

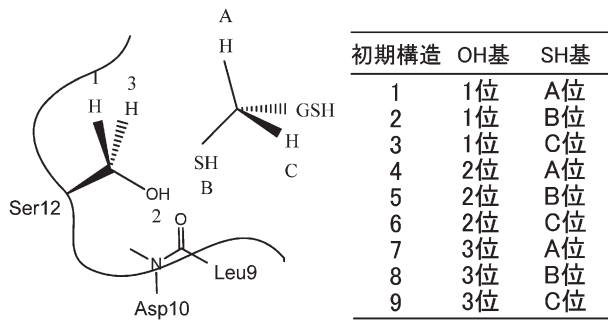


図4 部分構造の最適化のための初期構造

部分の配座は固定して計算しているが、得られた結果が他の科学的要因と照らしてもよく合致しており、仮説の信憑性を評価できるものとする。但し、極小値 (local minimum)、最小値 (global minimum) の配座構造はタンパク自体の安定な構造であり、活性部位に見られる反応部位の構造体の遷移状態下の配座が最安定であることを必ずしも意味しているわけではない。

5. GSTの触媒機構

GSTによるGSH抱合は2つのステップで進み、一つはGSHのGSアニオンへの活性化、もう一つは活性化されたGSアニオンへのリガンドの取り込みで抱合体が形成される。

(1) GSHの保持

GSHは一次構造のN末端から50~60番目辺りのアミノ酸残基により形成される三次構造に於ける固有の湾曲部突端②に保持される(図2)。この残基は活性部位のタンパク表面にあって、その主鎖のCO基とNH₂基がGSHのCys部のNH₂基とCO基と水素結合してGSHを保持している。

(2) GSアニオンの形成

GSHはpKaが約9で有機化学的にはプロトンを容易に解離することはない。GSTに於いて初めてこの反応を生体は可能にしている。これは保持されたGSHのSH基の直ぐ下のタンパク表面、N末端近くにプロトンを引き抜くアミノ酸残基が共通して配されているからで、分子モデリングによる立体構造からその様子が窺える。SH基の求核反応性はプロトンの解離度に依存し、酵素GST・GSH複合体中でのpKaが低いことが重要である。これまでGSHの活性化機構は下記の3通りのメカニズムで考えられてきた。以下にそのメカニズムを相応するクラス群と対応させながら計算化学による立体配座からの視点で解説する。

(a) チロシンによるプロトンの引き抜き

GSHをGSアニオンに活性化する原動力になるアミノ酸残基の一つはGSHの下近傍にあるチロシン(Tyr)である。その側鎖4-OH-ベンジル基を、N末端から最初にある固有の湾曲部①を通りヘリックス構造に至るポリペプチド鎖の内側空間にN末端近くから直立して突き出させ、SH基の

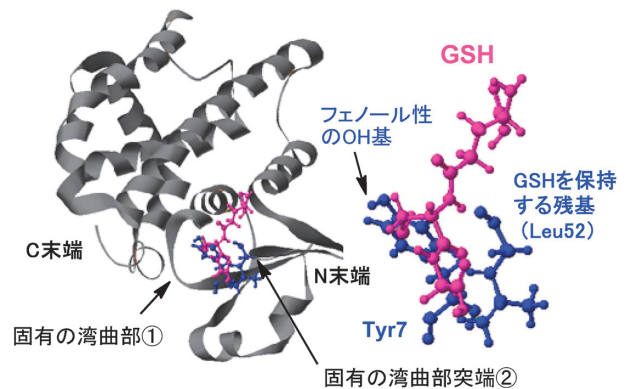


図5 チロシンによるGSHの活性化
ヒト胎盤 π GST (PDB ID: AQW)

プロトンを直接引き抜いてオキソニウムイオンにする中でGSアニオンを形成する(図5)。

哺乳動物由来の α 、 μ 、 π クラスGSTやヤリイカのような σ クラスGSTに共通して見られるメカニズムである。ヒト π GSTのTyr7の側鎖OH基の化学修飾によるCDNB活性の低下や、部位特異的変異法によるTyrのフェニルアラニン(Phe)置換変異種のCDNB活性やエタクリン酸GST阻害活性の低下、GSH複合体のpKaの変化等により証明^{12,13)}されている。図5はPRADE, L. *et al.* (1997)のヒト胎盤 π GST (PDB ID: 1AQW)のX線結晶解析データを分子モデリングしたものである。GSHはロイシン52(Leu52)に保持され、GSHのプロトンはTyr7のフェノール性OH基により引き抜かれる様子がよく分かる。この他の同じ類のGSTの分子モデリングも総合して見ると、GSHが保持される残基やプロトンを引き抜くTyr残基のポリペプチド鎖上の位置は少しずつづれて異なるが、いずれの場合もGSHは前述(1)で述べた固有の湾曲部突端②に保持され、SH基はTyrのOH基の上近傍に位置するようにN末端側ドメインは形作られていることが窺い知れる。また、Tyr残基の側鎖が突出する空間には、ポリペプチド鎖を構成する一連の残基の側鎖は外側に向いて無いか、脂溶性側鎖があるだけで、どれ一つ大きく内側に突出した残基側鎖がないのも興味深い事実である。

(b) セリンによるプロトンの引き抜き

GSHの活性化の原動力になるもう一つのアミノ酸残基は、保持されるGSHのSH基の下近傍にあるセリン(Ser)である。N末端から最初のヘリックス構造に至る手前、湾曲部①以後のポリペプチド鎖に乗っている。哺乳動物や昆虫の θ クラスGSTはこのメカニズムによりGSHが活性化される。昆虫等が δ や ϵ クラスのGSTもこのSerが原動力である。植物や大腸菌にも相当するSerが一次構造上に同様に認め得るが、三次構造的見地から疑義が残る。次項(c)で解説する。話を戻すと θ クラスのGSTにも一次構造上で α 、 μ 、 π クラスと同様にN末端近くにTyr残基を有するが、三次構造に立ち上げて観察すると側鎖はポリペプチド鎖を挟んでGSHのSH基とは丁度反対の方向に向いており、一見するだけでGSHのプロトンを引き抜けないことが分かる。これとは逆に原動力となるSerの側鎖はN

末端から固有の湾曲部①を通りヘリックス構造に至るポリペプチド鎖で形成される内側空間に突き出ている (図6)。

この活性化メカニズムについては議論が十分なされぬまま今日に至った。Ser をアラニン (Ala) に置換した部位特異的変異法により GSH の活性化には Ser が必須である¹⁴⁾ことは証されている。しかし、GSH と水素結合をつくる距離にあるとは言えないといわれる中¹⁵⁾それ以上に SerOH 基はアルコール性の水酸基で、Tyr のように単独で GSH のプロトンを引き抜くことは有機化学的にはできない。果たして何がこれを可能にしているのか。

著者らはその秘密が酵素 GST の Ser 残基の奥下、N 末端近くのポリペプチド鎖のペプチド結合 CO 基の酸素原子に隠されていることを予測した。表1に一次構造から見た GSH 活性化に係わるアミノ酸残基とその配列の関係を幾つか事例をもって示す。プロトンを引き抜く Ser 残基は CO 残基から3つ後に位置するという、活性化に必須の共通構造が大腸菌を除くいずれの GST にも見事に内包されていることが窺える。著者らはこのタイプの活性化メカニズムをイエバエ GST の分子種 6A, 6B に於いて明らかにした。その概要を図7に示す¹⁶⁾。ペプチド結合は、図1に

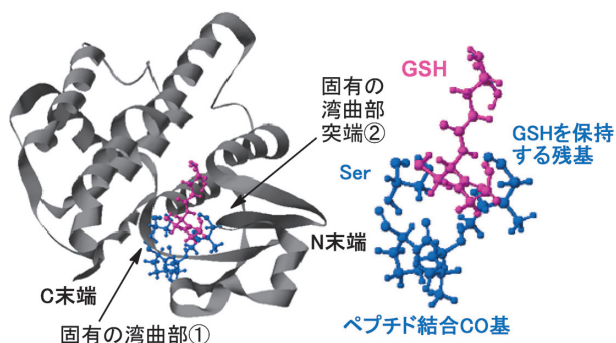


図6 セリンによる GSH の活性化

表1 GST に於ける GSH の活性化に係わるアミノ酸残基

| PDB ID | GST又は生物種 | Serを活性化するペプチド構成残 | H ⁺ を引き抜くセリン残基 | GSHを保持する残 |
|--------|----------|------------------|---------------------------|-----------|
| 2C3Q | θGST | Asp8 Leu9 | Ser11 | Val54 |
| 1PN9 | δGST | Leu6 Pro7 | Ser9 | Ile52 |
| 2IMK | εGST | Leu9 HIS10 | Ser12 | Ile55 |
| 10YJ | 植物 | Phe12 Trp13 | Ser15 | Ile56 |
| 1GNW | 植物 | His8 Pro9 | Ser11 | Val54 |
| 2DSA | 大腸菌 | Ser6 Pro7 | Ser11 | Val52 |

示したように、ケト型の N 原子の孤立電子対が CO 基と共鳴して C-N 結合に二重結合性をもたせたエノール型をとり固有のペプチド鎖を形成している。タンパク分子は構成アミノ酸の構造の違いによりこの回転角に制限を受けペプチド結合毎に個々異なる立体配座を形づくり分子固有のポリペプチド鎖を構成している。

前章の「遷移構造の立体配座」に記した9通りの初期構造 (図4) に、このメカニズムの要のエノール型ペプチド結合と Ser の OH 基をオキソニウムイオンに改変した構造 (図7) を組み込み、酵素反応時の立体配座を網羅する中で MM 計算した。分子種 6A に於ける結果を表2に示す。基本構造、改変構造①では、初期構造のいずれも2組の2原子間距離は水素結合できる程度の距離に安定化されなかった。一方、改変構造②では、初期構造1, 2, 7を除きすべて少なくとも一遷移構造体はこの原子間距離の要件を満足し論理矛盾のない安定構造を採り得ている。またこれら計算結果が部位特異的変異法による結果 (表3) と平行にあることから、Ser による GSH の活性化のメカニズムを図7の如く明らかにした。

(c) 植物、大腸菌での活性化機構

植物や大腸菌の GST も一次構造上は昆虫と同様に Tyr 残基が N 末端に保存されている。三次構造に立ち上げると、GSH を活性化できる側鎖のフェノール性 OH 基はポリペプチド鎖を挟んで GSH と全く反対側に位置し、一見して触媒残基には成り得ないことが分かる。そして、昆虫と同様に、固有の湾曲部①を挟むポリペプチド鎖で形成される内側空間に Ser の OH 基がきている。これがアルコール性の OH 基で単独では GSH のプロトンを引き抜くことができないのは昆虫の場合と同様である。

表2 イエバエ GST6A に於ける GSH 活性化機構

| 初期構造 | CH ₂ OHとCO ⁻ の距離/ CH ₂ OHとGSHの距離*(Å) | | CH ₂ O ⁺ H ₂ とCO ⁻ の距離/ CH ₂ O ⁺ H ₂ とGS ⁻ の距離*(Å) | |
|------|--|-----------|---|------------------|
| | 基本構造 | 改変構造① | 改変構造② | |
| 1 | 4.90/2.74 | 4.99/2.64 | 4.46/2.19 | 4.84/2.74 |
| 2 | 4.81/2.60 | 4.93/2.78 | 4.99/2.04 | 5.26/2.17 |
| 3 | 4.91/6.02 | 4.94/4.76 | 1.99/2.03 | 3.15/3.40 |
| 4 | 2.36/4.56 | 2.01/5.11 | 2.15/2.19 | 2.53/2.13 |
| 5 | 2.36/3.72 | 2.02/2.89 | 2.06/2.15 | 2.68/2.40 |
| 6 | 2.36/6.42 | 2.01/4.95 | 2.08/2.36 | 2.24/2.15 |
| 7 | 2.35/3.72 | 2.01/4.60 | 1.90/5.10 | 1.94/4.85 |
| 8 | 2.37/3.07 | 2.01/4.13 | 1.94/2.36 | 2.05/3.49 |
| 9 | 2.35/6.90 | 2.01/5.68 | 1.92/2.38 | 2.02/3.55 |

* 3つの構造体に於けるSerOH基の活性化とGSHのプロトンの引き抜きに係わる2組の2原子間の距離。

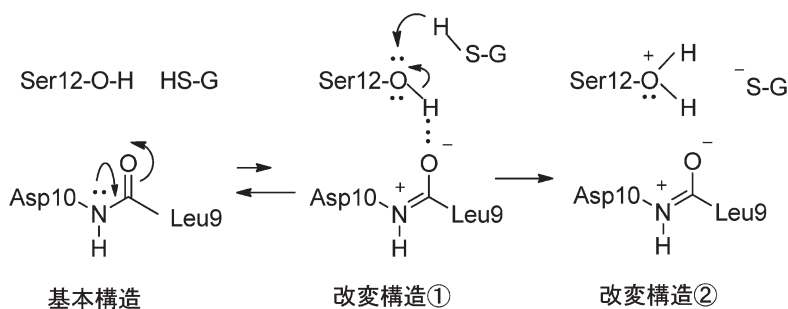


図7 セリンによる GSH の活性化メカニズム

植物の場合は、該当する Ser は昆虫の GST 以上に GSH から距離が離れているとされ¹⁷⁾、部位特異的変異法による試験もなく不確かなまま残されていたが、著者らは前述のイエバエ GST に於ける GSH の活性化機構が植物にも当てはまる可能性を見出した(未発表)。例えば、DIXON, D.P. *et al.* (2003)¹⁸⁾ による Rice GST1 (PDB ID: 10YJ) の X 線結晶解析データを分子モデリングすると、図 8 に示すように、GSH は GST が共通にもつ GSH 保持部位の湾曲部先端②にあるイソロイシン 56 (Ile56) に水素結合し、SH 基を Ser15 の OH 基の上に被さるように保持された。しかしこのセリンの OH 基を何が活性化して GSH のプロトンを引き抜くのか。三次構造を見る限り、N 末端から最初にある固有の湾曲部①を挟んで Ser15 と対極に位置するフェニアラニン 12 (Phe12) とトリプトファン 13 (Trp13) から成るペプチド結合の CO 基しかその役割を演じる残基はないように見えた(表 1)。イエバエ GST の研究に倣って、考えられる 9 通りの基本構造の幾つかの Phe12 と Trp13 間のペプチド結合をエノール型構造に、併せて SerOH 基をオキソニウムイオンに、GSH を GS アニオンに構造を一度に改変し、MM により安定化を図って、 O^+H_2 の H 原子と Phe12CO⁻ の O 原子、⁻SG の S 原子のそれぞれの原子間距離を計測した。 O^+H_2 と Phe12CO⁻ の原子間距離が水素結合できる距離にあると O^+H_2 と ⁻SG の原子間距離が若干離れるといった不適合が残ったが、一方でこれら三者は分子モデリングを実行するディスプレイ上で挙動を同じくして動き、前述で証したイエバエ GST の触媒機構を彷彿させた。REINEMER, P. *et al.* (1996) による *Arabidopsis thaliana* の GST (PDB ID: 1GNW) のヒスチジン 8 (His8) とプロリン 9 (Pro9) 間のペプチド結合から Ser11 へのポリペプチド鎖の立体配座を始め、同じような多くの事例が X 線結晶解析データから認められ、表 1 に示したように植物でも Ser が GSH のプロトンを引き抜いているのではないかと窺い知ることができた。

大腸菌の場合は、井上らは RDSA (PDB ID) の Ser11 側鎖が GSH と反対の方向を向き触媒機構に直接関与しているとは考え難いといい、昆虫由来の機構とは別途異なる機構が存在する可能性を示唆¹⁹⁾している。しかし、これももう一つの可能性として近傍のペプチド結合、但し昆虫や植物の場合とは異なり Ser11 と少し離れたところのペプチド結

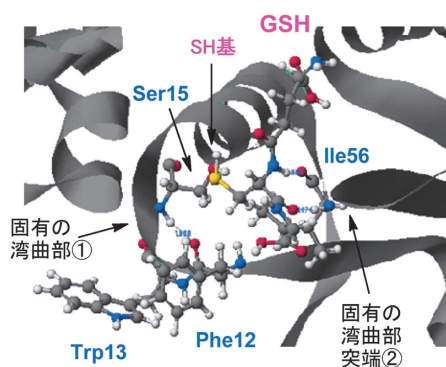


図 8 イネ GST (PDB ID: 10YJ) に於ける GSH の活性化

合の CO 基の O 原子が原動力であることが疑わしく(表 1)、著者らは立体配座による構造解析を進めている(未発表)。又、NISHIDA, M. *et al.* (1998)²⁰⁾ による大腸菌 k-12GST (PDB ID: 1AOF) の X 線結晶解析データを分子モデリングし、イエバエ GST の研究に倣っていくつかの基本構造を MM 計算により安定化して得た GSH の活性化時の立体配座の模式図を図 9 に示す。 O^+H_2 と ⁻SG の原子間距離が水素結合できる距離であると、 O^+H_2 とリジン 6 CO⁻ (Lys6CO⁻) の原子間距離が水素結合するには大きい目の距離を示していた。しかしながら、三者が一体となって活性部位を占めているという点で昆虫、植物と同様であるように見受けられる。

(3) GSH の解離度に係わるポリペプチド鎖の立体配座

θ , δ , ϵ クラス GST に見られる Ser による GSH の活性化では、GSH のプロトン解離には Ser の OH 基の H 原子と近傍のペプチド結合 CO 基の O 原子間の水素結合の強さが影響を与えている。これは有機リン殺虫剤プロチオホスオキソン S-オキシドの抵抗性八千代系統イエバエ由来の GST6B (野生種) とその変異種 Ile9Leu, Ile9Phe, Phe37Met, Phe120Leu, Phe121Leu の 5 種による GSH 抱合反応(反応式 1)でのフェニルホスフェート (PP) の生成量と、これら 6 種の分子種の分子モデリングにおける Ser12 の OH 基の H 原子とペプチド結合 Ile9CO 基の O 原子との原子間距離の相関(表 3)¹⁶⁾ から明らかになった。Ile9 を Leu に替

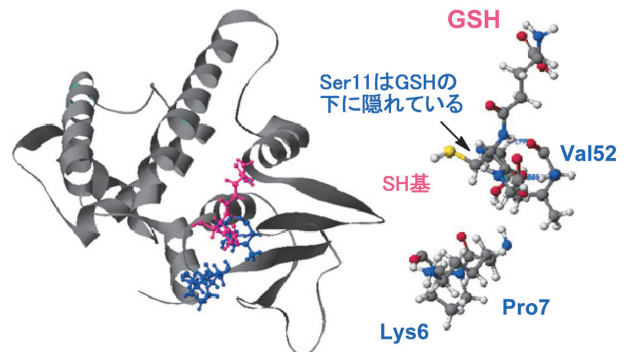
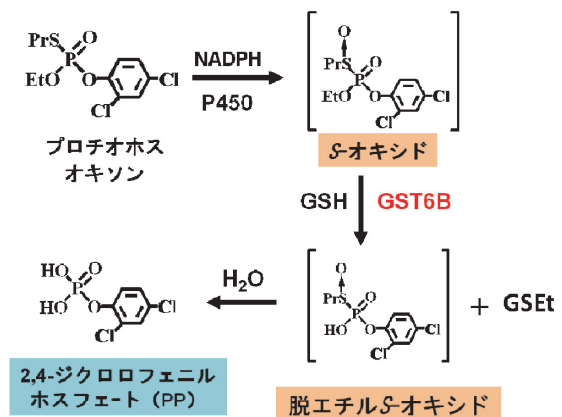


図 9 大腸菌 GST (PDB ID: 1AOF) に於ける GSH の活性化



反応式 1: プロチオホスオキシソンの GST6B による酸化的 GSH 抱合反応

表 3 Ser12OH 基の H 原子と Leu9CO 基の O 原子との原子間距離と酸化的 GSH 抱合反応に於けるフェニルホスフェートの生成量

| 分子種 | Ser12OH基のH原子とLeu9CO基のO原子との原子間距離 (Å) | | 2,4-ジクロロフェニルホスフェート (PP) の生成量 (nmol/min/mg) |
|-----------|-------------------------------------|----------------------|--|
| | 分子力学法 (MM2) | 半経験的分子軌道法 (LocalSCF) | |
| 野生種 | 2.35 | 2.23 | 0.44±0.05 |
| 変異種 | | | |
| Ile9Leu | 2.38 | 2.42 | 0.38±0.08 |
| Ile9Phe | 2.37 | 3.25 | ND |
| Phe37Met | 2.35 | 3.55 | ND |
| Phe120Leu | 2.33 | 2.25 | 0.31±0.043 |
| Phe121Leu | 2.34 | 2.22 | 0.32±0.034 |

えると原子間距離は少し大きくなり PP の生成量は 86% に減じ、Phe に置換すると原子間距離は 1 Å 以上大きくなって PP は全く生成されてこなかった。これは残基の側鎖構造が変わったため、ペプチド鎖の結合様式は変わらないが、その立体配座に変化が生じたため、SerOH 基との距離に差が生まれ、PP の生成量に大きな違いが生じたものと考えられる。水素結合の強さが GSH の活性化、解離の大きさに影響を与えていたのである。一方、Phe37 をメチオニン (Met) に置換した変異種 Phe37Met においても、原子間距離は 1 Å 以上と大きく変化し Ile9 は野生種のままなのに PP の生成が認められなかった。このことは水素結合の強さが大きく影響していることを示唆している。Phe120, Phe121 を共に Leu に置換しても原子間距離に変化は出ず PP の生成量だけが 70% に減少したのは残基の置換によるものと考えられる。

6. GST の機能とリガンドを保持する残基

(1) GST の機能

最も大きな役割は薬物代謝酵素としての GSH 抱合反応である。薬物は一般に第 I 相反応により水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基などの官能基をもつ極性化合物に変化し体外に排泄される。これらは同時に第 II 相反応により GSH やグルクロン酸などの極性ある生体分子に抱合され一層体外へ排泄され易くなる。抱合体は通例解毒代謝物であるが中には活性代謝物であることもある。本酵素は電子吸引性基をもつ薬物を補酵素 GSH と反応させ GSH 抱合体を形成する。一般に抱合反応は極性基をもつ薬物や酸化、加水分解により生成した極性代謝物を受けるが、GST は脂溶性ニトロ化合物、ハロゲン化アルキルやアリール、 α, β -不飽和カルボニル化合物、エポキシドのような非極性化合物をも直接抱合できる。GST の多くはこのように解毒化を図るが、有機リン殺虫剤プロチオホスやチアジアゾリジン系のプロトックス阻害型除草剤は GST により活性化が図られる数少ない事例²¹⁻²³⁾ である。また、サリゲニン環状リン酸エステルや殺菌剤 IBP、種々のカルコンの GSH 抱合体は殺虫活性は認められないものの、この反応を進める GST を逆に阻害²⁴⁻²⁸⁾ する。またこの抱合反応はロイコトリエン C4 の生合成²⁹⁾ や植物色素の GSH 抱合体の液泡への輸送³⁰⁾ にも利用されている。GST は肝臓では可溶性タンパク質の約 10% を占める。また一部は

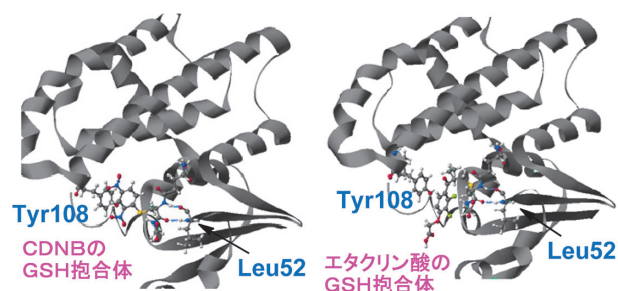


図 10 CDNB とエタクリン酸の GSH 抱合体

更に β -リアーゼにより C-S 結合が開裂され S-メチル化物に変換される。GSH 抱合体は動物では大半が腎臓で、植物では液泡で、グルタミン酸、グリシンの順にはずれてメルカプツール酸に代謝され排出される。GSH 抱合体は GSH 抱合体トランスポータに認識させる荷札の役割を示しているのかも知れない。GST にはこれら抱合反応の他に、有機過酸化物の GSH 依存的な還元による酸化ストレスの防御³¹⁾、この GST 活性による腫瘍細胞のアドリアマイシンに対する耐性化³²⁾、植物の種々のストレス応答に関与する抗酸化ストレス³³⁾、ヘムやビリルビン、ステロイド等の疎水性化合物の結合タンパクとしての細胞内貯蔵や輸送³⁴⁾ に関与といった機能があるが、いずれも生理的意義が明確ではないものが多い。

(2) リガンドを保持する必須残基

GSH は GST の N 末端側ドメインの特定の残基に保持され概ね同じメカニズムで GS アニオンへと活性化が図られる。一方、リガンドは反応に係わる部位をチオールアニオン S⁻ に向け、全体構造がうまく結合部位表面に収納されるよう保持されて抱合化されるが、この時その固有の部分構造を少なくとも表面のアミノ酸残基に認識されていなければならない。本節ではこの必須残基が GST のどこに位置しリガンドをどのようにタンパク表面に保持しているのかを解説する。

- (a) 必須残基が C 末端側ドメインの 101~120 辺りの残基
 - i) μ, π, σ クラス GST

ヒト π GSTP1-1 の CDNB やエタクリン酸の GSH 抱合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 18GS, 11GS)^{35,36)} を分子モデリングで GSH と比較すると、GSH は Leu52 に水素結合して

保持されているのに対して、CDNB あるいはエタクリン酸の GSH 抱合体は図 10 に示すようにそれぞれの芳香環を Tyr108 の芳香環と比較的近接な位置で平行に保って保持されている一方、GSH 部は同時に Leu52 に水素結合していることが見てとれる。このことからヒト π GSTP1-1 下で CDNB あるいはエタクリン酸を保持する必須残基は Tyr108 で、静電的相互作用によって両化合物を保持し、Tyr7 で活性化された GSH と置換あるいは付加反応をさせ、それぞれの抱合体を形成させていることが窺い知れる。

ブタ π GSTP1-1 の 2GSR (PDB ID)³⁷⁾ でも GSH は Leu50 に保持され Tyr7 で活性化される一方、リガンドは Tyr106 に保持されて抱合体が形成されていることが予測される。 μ GST の 6GST (PDB ID) でも GSH は Leu59 に保持され Tyr6 により活性化されると共にリガンドは Tyr115 で保持されるようである。ヤリイカ σ GST の 1GSQ (PDB ID)³⁸⁾ では Met50 が GSH を保持し Tyr7 で活性化された GSH が Phe106 で保持されたリガンドを取り込み抱合化していることが分かる。造血器型プロスタグランジン D 合成酵素 (PDB ID: 3EE2)³⁹⁾ も σ GST の一つであり、同様の保持を分子モデリングから見るができる。このように μ , π , σ クラスの GST では C 末端側ドメインの残基 101~120 辺りの芳香族アミノ酸残基が必須残基として多く用いられている。

ii) θ , δ , ϵ クラス GST

GST は昆虫の殺虫剤抵抗性にこれまで重要な役割を演じてきた。近年、GST の過剰発現により DDT に対する抵抗性を獲得することがショウジョウバエ、ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*)、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*)

に於いて示されている。ガンビエハマダラカの DDT 抵抗性系統では、8 クラス中 5 クラスの GST に過剰発現が見い出され、 ϵ クラスの AgGSTe2 は同蚊がもつ δ クラスの AgGSTd1-6 に比べて約 350 倍の活性があり、抵抗性発現を生む最も重要な GST であると考えられている。

WANG, Y. *et al.* (2008)⁴⁰⁾ はこの特異な AgGSTe2 による DDT の解毒活性が高い秘密は N 末端側ドメインの H4 ヘリックスにある Phe108, Arg112, Glu116, Phe120 残基にあり、活性の弱い AgGSTd1-6 (Tyr105, Ala109, Tyr113, Phe117) と比べた構造的証拠を X 線結晶解析 (PDB ID: 2IL3, 2IMI, 2IMK, 1PN9) から提起している。両酵素の活性発現の違いをこれからだけでは満足いく説明はできないが、 δ , ϵ GST のリガンドを認識する必須残基、特に Arg112, Glu116 に大きな違いがあることは確かである (図 11)。更に C 末端側ドメインの残基領域のフォールディングが若干異なっているところに活性の違いを加速する秘密があるかもしれない。ヒト θ GST も Ag dirus の δ GST⁴¹⁾ と同じフォールディングをもつようである。

また、著者らのイエバエ GST6B の Phe108, Arg113, Thr116, Phe121 の 4 残基が今述べてきた AgGSTe2 の 4 残基に一次構造上で相当する。しかし、残基側鎖の立体配座から観察すると、6B の Arg113 は 90 度近く遅れて、Phe120 は 90 度近く早く、他の Phe108, Thr116, Phe121 に比べ GS アニオンに向く配座をとっていることが窺える。CDNB 活性に於いて Arg113 は必須残基ではなく、Phe108 は必須残基であることが別途部位特異的変異法から実証^{9b)}された。一方、本節(d)項で詳細に述べるが、ヒト π GST の 11GS の Ile107, Tyr108 と同じ役割をもつ残

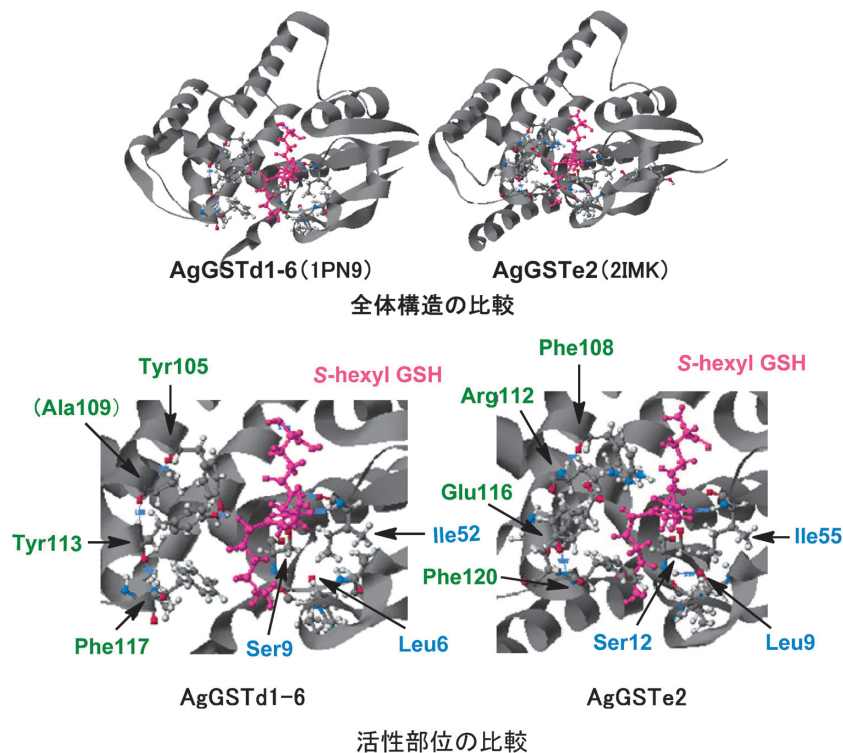


図 11 ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*) の δ , ϵ GST の比較

基として、イェバエ 6B では Phe120, Phe121 が、6A では Leu120, Phe121 が相当し、Tyr108 と Phe121 の側鎖芳香環の向きが同じか異なるかで有機リン殺虫剤プロチオホスの殺虫活性に大きな差異が生まれ、毒性発現に大きな影響を与えることが分かっている。AgGSTe2 では Leu119 と Phe120 がこれらに相当する残基で、Phe120 の芳香環の配座がイェバエ 6B と同じであることが三次構造から分かった。同じクラスであれ異なるクラスであれ、このように側鎖の配座異性は薬物に対する酵素活性、阻害活性に大きな影響を与えることになる。

(b) 必須残基が C 末端側ドメインの末端伸長部残基

多環芳香族炭化水素のベンゾ [a] ピレンは CYP1A1 により 7,8-エポキシドに酸化され、エポキシド加水分解酵素によって 7,8-ジオールに加水分解されて、最後に CYP1A1 により活性代謝物 7,8-ジオール 9,10-エポキシド (benzo[a]pyrene 7(R), 8(S)-diol 9(S), 10(R)-epoxide) に酸化され発癌性を示す。一方でこの発癌性代謝物は一般に α GSTA1-1 や 2-2 によって GSH に抱合化されて解毒される。murine (マウス) の α GSTA1-1 と α GSTA2-2 はこの発癌性代謝物の GSH 抱合に対して高い触媒能力をもつ。両者のアミノ酸残基は 10 残基しか違わないが、 α GSTA1-1 の触媒能力は α GSTA2-2 に比較して 3 倍以上高い。Gu, Y. *et al.* (2000) は murine の α GSTA1-1 の GSH 複合体と、この発癌性代謝物の GSH 抱合体との複合体 (PDB ID : 1F3A, 1F3B) の結晶構造を解析し⁴²⁾、又、2003 年には murine の α GSTA2-2 におけるこの発癌性代謝物の GSH 抱合体 (PDB ID : 1ML6) の結晶構造の解析⁴³⁾を行っている。先ずこれら結晶構造はいずれも多くのクラスの GST と違って結合部位を構成する残基群が乗る C 末端側ドメインの候補残基領域が GS アニオンから少し離れており、前述の μ や π , α GST のようなメカニズムはとることができない。替わってヘリックス α 9 に伸長変化が見られ、ここに必須残基が立体配座に重要な違いをもって乗り反応に対応していることが窺える。図 12 に 1F3A (a), 1F3B (b), 1ML6 (c) の立体配座を示す。

図 a のように GSH は Val54 に保持されている。発癌性代謝物の GSH 抱合体の芳香環は図 b では Arg216 のグアニジル基と平行に位置し、図 c では Phe221 の芳香環と平行に位置して、共にその GSH 部は Val54 に水素結合している。これらから発癌性代謝物は α GSTA1-1 では Arg216 が、 α GSTA2-2 では Phe221 が認識し GS アニオンに抱合されるものと考えられる。Phe219 は 3 つの結晶構造共に同じ立体配座を示すことから認識には係わっていないことが想像され、また Arg216 は図 a, 図 c で同じ立体配座をもち、図 b のみ多環芳香環に作用する様が見取れる。GRAHN, E. *et al.* (2006) が発表したヒト α GST1-1 の結晶構造 (PDB ID : 1PKW)⁴⁴⁾ を 2 つの murine の酵素と比較したところ、GSH の活性化については 3 酵素とも同じメカニズムであるが、リガンドの必須残基についてはヒト α GST1-1 は murine の α GSTA2-2 と同じで、この発癌性代謝物の GSH 抱合を最も効率よく担うのが murine の α GSTA1-1 であることとよく符合している。

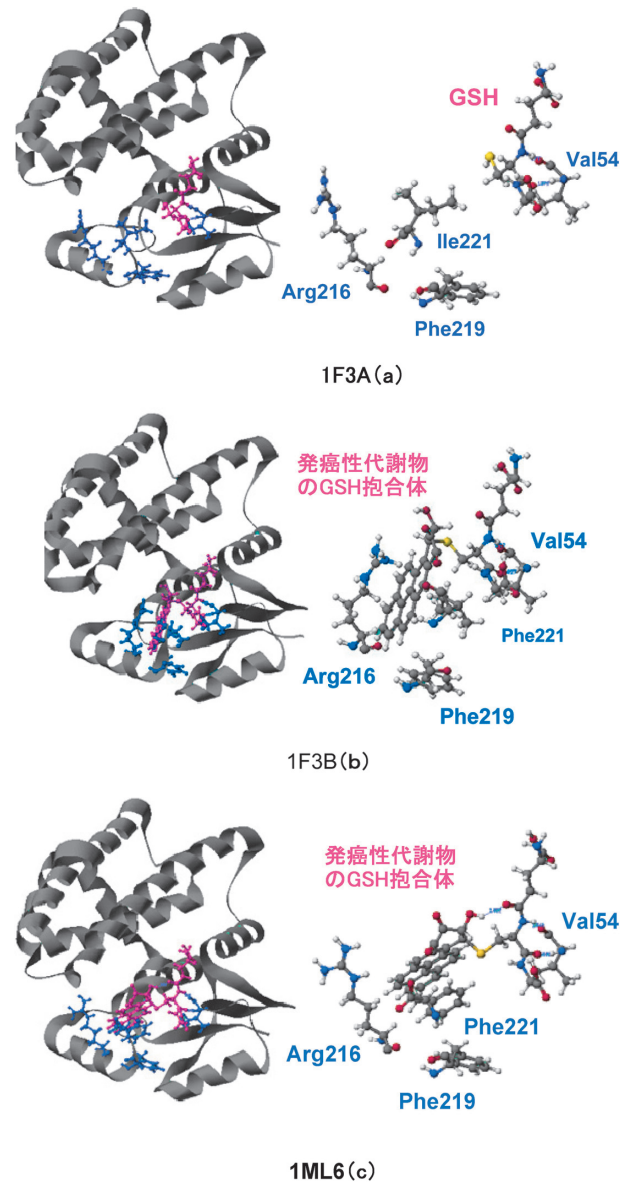


図 12 ベンゾ [a] ピレンの発癌性代謝物の GSH 抱合体

(c) 必須残基の立体配座と変異

i) 抗癌剤のデザイン

PRADE, L. *et al.* (1997) はヒト胎盤から 5 種の α , μ , π , σ , θ クラスの GST を一次構造の相同性と基質特異性により分類し、この中で腫瘍細胞が薬剤耐性を導く GST 分子種を単一に過剰発現させている¹⁾ ことを発見した。これまで α , μ GST の構造と変異種に関する研究は数多くあるが、 π GST については多くない。分子種間での三次構造とその立体配座の違いを利用した新規抗癌剤の開発の可能性を説いている。しかしながらこの後に関連の報告が見当たらない。

ii) Murine の α GSTA1-1, 2-2 における Arg216, Phe221 の側鎖立体配座^{42,43)}

前項 (b) で述べたように、1F3A は α GSTA1-1 に GSH が保持された結晶構造で、1F3B はこれに発癌性代謝物が作用して GSH 抱合体を形成した結晶構造である。1F3B の

Arg216の側鎖グアニジル基は発癌性代謝物のGSH抱合体の芳香環と平行な配座に変化し、Phe219はその配座に変化は見られない。一方、1ML6は α GSTA2-2に発癌性代謝物のGSH抱合体が形成された時の結晶構造で、その芳香環はPhe221の芳香環と平行な配座をとっている。この時、Arg216の側鎖は1F3Aの抱合反応前のArg216の配座と同じである。これらのことから、発癌性代謝物を保持する必須残基は、 α GSTA1-1ではArg216で、 α GSTA2-2ではPhe221であってArg216ではないこと、Phe219は両酵素で抱合反応に係わっていないことが窺えた。これらは発癌性代謝物を抱合できる2つの分子種が遺伝子発現の過程で異なって作られてくる事例であるが、この両者の代謝活性にもっと大きな差がある分子種を作製できれば、抗癌剤の新規開発の新たな指標となるであろう。

iii) 殺虫剤 DDT に対する抵抗性昆虫における薬物代謝酵素の過剰発現

この場合は前項 (b) と違って、DDT の解毒活性の高い AgGSTe2 に対して既存の DDT 類縁体を中心に殺虫試験をし、解毒が抑えられる薬剤のスクリーニングを agGST1-6 と比較しながら行うことが先ず考えられる。

(d) プロチオホスオキソン S-オキシドの GST による活性化と選択毒性^{21,22,45)}

プロチオホスは汎用の有機リン剤に対して抵抗性を示すリン剤抵抗性害虫にも殺虫活性がほとんど低下しない有機リン剤である。これは図 13 に記したように、既知活性体の S-オキシドのみならずこれが更に脱エチル化されたもう一つの活性体の脱エチル S-オキシドが AChE を不可逆的に強く阻害するからである。ここに新奇な GST6B による抱合反応に係わってくる。プロチオホスオキソンは GST6A, 6B によって脱エチル化され解毒化されるが、S-オキシドを脱エチル化し活性化できるのは GSTB のみである。6A と 6B の構造のどこが異なるから GST6B だけが S-オキシドの GSH 抱合を進め脱エチル化できるのか。答は図 14 に示すように 6B, 6A 両分子種の Phe121 の側鎖ベンジル基の芳香環の向きの違い、立体配座の違いであった。図 14 は R

系イェバエ GST6B あるいは 6A とヒト π GST11GS の活性部位の立体配座を比較したものである。図 a は R 系 6B の Phe120, Phe121 とヒト 11GS の Ile107, Tyr108 のペプチド結合 5 原子同士を重ね合わせたもの、図 b は R 系 6A の Leu120, Phe121 とヒト 11GS の Ile107, Tyr108 のペ

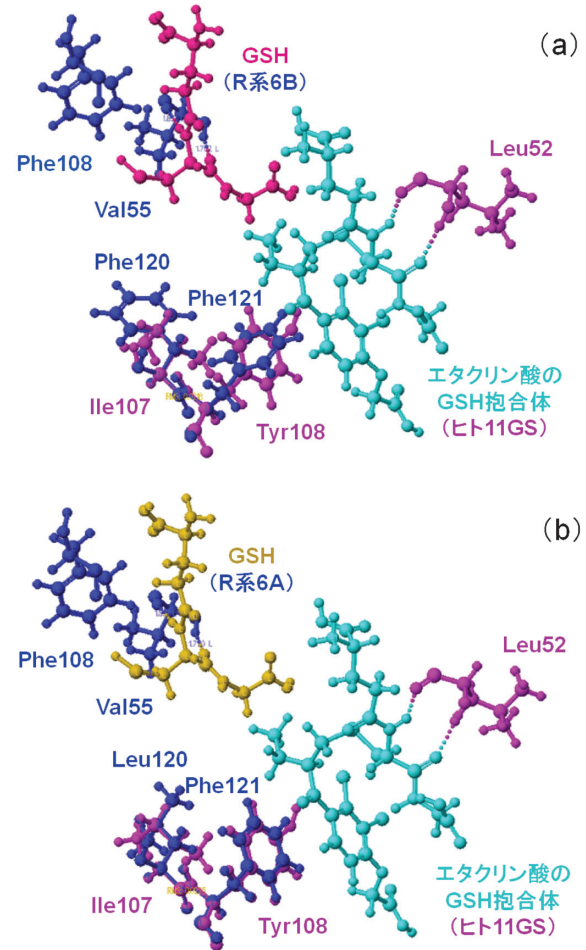


図 14 R 系イェバエ GST6B あるいは 6A とヒト π GST11GS の活性部位での立体配座の比較

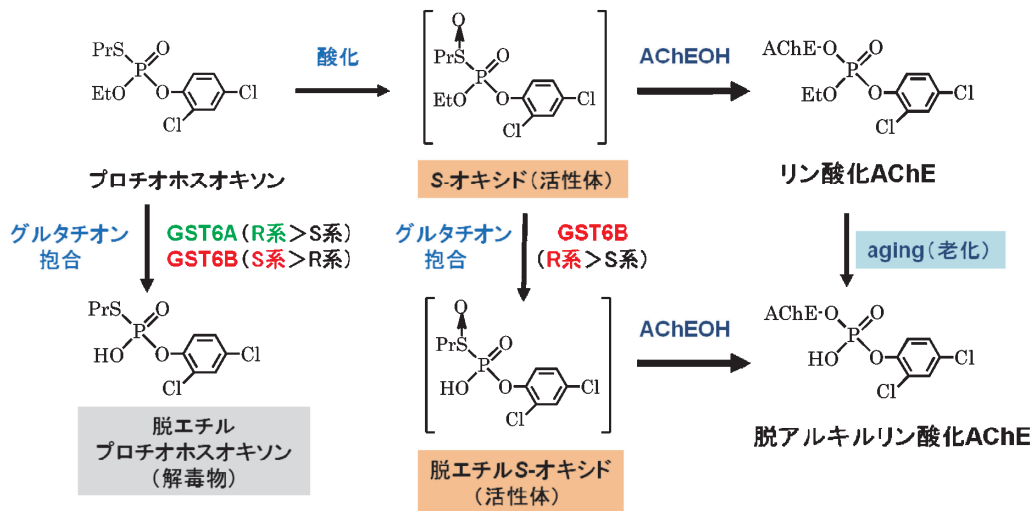


図 13 リン剤抵抗性昆虫に卓効なプロチオホスオキソンに隠された秘密

ブチド結合5原子同士を重ね合わせたものである。

更なる疑問はヒトをはじめ温血動物にも昆虫と同じ毒性が発現しないのかということである。プロチオホスのラットやマウスに対する急性毒性はそれぞれLD₅₀値で925 mg/kg, 940 mg/kgで、毒性の区分は普通物である。この答えも図14にあった。ヒトπGST (PDB ID: 11GS)を解析すると、イエバエ6B (又は6A)のPhe120 (又はLeu120), Phe121に相当する残基はIle107, Tyr108で、Tyr108の側鎖の4-OH-ベンジル基の芳香環の向きがイエバエ6Aの芳香環の向きと同じであった。即ち、6AはS-オキシドを脱エチル化できなかつたことからヒトの場合もこの脱エチル化反応は進まずAChEを不可逆的に阻害することがないから毒性が発現がないことが予測できる。このように、アミノ酸残基は同じであっても、その側鎖の芳香環の向きが同じあるいは異なるといった立体配座の違いが、リン剤抵抗性の虫にも高い殺虫活性を示し、ヒトとの間に大きな選択毒性を生んでいるのである。

7. 薬剤開発と抵抗性発現のイタチごっこ

農薬は有効性と安全性の両面をバランス良く満足させた選択毒性の高い「薬」という化学物質として開発され質的向上が図られてきた。即ち、農薬の分子構造に、ヒトや有用生物とターゲット間の種差に起因する受容体や薬物代謝酵素の構造上のわずかな違いを認識する秘密を隠しもたせて来たのである。しかし、薬剤に対する抵抗性昆虫の発現には我々は今も飽くなき闘いを演じている。なぜなら、昆虫の殺虫剤への抵抗性発現は「劣性個体の優性化が主たる原因」であって、薬剤開発がその時々々の優性種をターゲットとしている限り、優性種と若干異なる作用点や薬物代謝酵素をもつ劣性種の個体には薬剤の殺虫効果が乏しく、その時々々の優性種に代わって新たに劣性種の優性化が進んで

抵抗性が発現するからである。作用点の異なる新剤の開発も遅かれ早かれ抗する抵抗性個体群が生まれてくることは避けられず、正に「薬剤開発と抵抗性発現はイタチごっこ」である。

それではこの「抵抗性発現を抑制する」ことは可能であろうか？作用点の異なる薬剤の併用が昔から説かれてきた。これは前述の「劣性個体の優性化」を遅らせる漠然たる知恵であったろう。本提言⁴⁵⁾は、ここから歩を更に一歩進めた確たる知見による知恵を忍ばせたものである。即ち、抵抗性発現の理由の一つであるGST活性の高い抵抗性個体の優性化を逆手に、そこに生まれる解毒化とは逆の活性化に働く分子種を見つけ防除の要として応用していこうというものである。ここで本提言をシミュレートした生物制御化学研究室で2年間に渡り行ったダイアジノンとプロチオホスを使い分けての淘汰イエバエを用いたダイアジノンとプロチオホスによる殺虫試験の結果を表4に紹介する。ダイアジノンを連続して投与し淘汰してきたリン剤抵抗性イエバエ (GST6A, 6Bが多い個体、表4右側)はダイアジノンが効かなくなつて増える中、ダイアジノンに代わりプロチオホスを投与し始めると (表4左側) GST6Bによる活性化のためその殺虫力が暫時働いて、リン剤 (ダイアジノン) 抵抗性イエバエが逆に減少することに成功、ダイアジノンに本来感受性の個体が再優性化して個体数が復活してきたのである。即ち、プロチオホスによる淘汰イエバエに対して改めてダイアジノンを主薬剤として防除に当たることができて、ダイアジノンは従来通りの殺虫活性をもった有意な農薬として利用できるという訳である。この観点から言えば、プロチオホスは汎用の有機リン剤をエコ農薬化し、自身もエコ農薬として担い得るのである。無論これは室内実験で圃場にて直ぐに実用化できるものではないが、我々に大きな防除示唆を与えるものである。

表4 「薬剤開発と抵抗性発現のイタチごっこ」は解消できるか？

| 試験日 | イエバエ世代 | LD50 (μg/fly) | | | |
|------------|--------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | | プロチオホスによる淘汰イエバエ | | ダイアジノンによる淘汰イエバエ | |
| | | ダイアジノン | プロチオホスオキシソン | ダイアジノン | プロチオホスオキシソン |
| 2005/12/17 | 05 | 12 | 0.43 | 14 | 0.49 |
| 2006/02/01 | 08 | 11 | 0.45 | 15 | 0.51 |
| 2006/03/15 | 11 | 8.1 | 0.48 | 15 | 0.48 |
| 2006/04/27 | 14 | 7.2 | 0.51 | 13 | 0.43 |
| 2006/06/06 | 17 | 6.7 | 0.53 | 16 | 0.41 |
| 2006/07/18 | 20 | 5.3 | 0.49 | 19 | 0.35 |
| 2006/09/01 | 23 | 4.4 | 0.58 | 18 | 0.35 |
| 2006/10/14 | 26 | 3.6 | 0.62 | 20 | 0.32 |
| 2006/12/09 | 29 | 2.8 | 0.63 | 22 | 0.31 |
| 2007/1/21 | 32 | 2.5 | 0.69 | 23 | 0.33 |
| 2007/3/3 | 35 | 2.2 | 0.75 | 23 | 0.26 |
| 2007/4/15 | 38 | 2.3 | 0.67 | 26 | 0.27 |
| 2007/5/31 | 41 | 2.4 | 0.61 | 24 | 0.28 |
| 2007/7/15 | 43 | 2.3 | 0.68 | 27 | 0.27 |
| 2007/9/1 | 46 | 2.4 | 0.61 | 23 | 0.29 |
| 2007/10/13 | 49 | 2.1 | 0.71 | 22 | 0.31 |
| 2007/12/25 | 52 | 2.5 | 0.68 | 25 | 0.27 |

リン剤
抵抗性
減少

リン剤
抵抗性
増大

殺虫力大
殺虫力小

殺虫力小
殺虫力大

8. おわりに

GSTの機能は、GSHの活性化とGSアニオンのリガンドとの抱合反応を基軸に考えねばならない。先ず前者について、活性化を直接担える残基と他の力を借りて活性化を図る残基の2つの原動力がある。後者はもっと複雑で、リガンドをGSアニオンの横で収容できる空間が第一に必要で、そして結合させるに必須の物理化学的諸性質をもった残基がリガンドの構造に併せて結合部位の相当する位置にあって初めて反応が稼働するのである。このため分子表面で、且つGSアニオンといった一点での反応故に、少し異なる構成残基の結合部位をもつ分子種の数だけ反応の数が増えることになり、これがGSTが生物界に幅広く分布し多くの解毒を中心とした役割を担える酵素となり得る所以である。P450もNAD(P)H存在下で分子状の酸素を活性化して、その一原子をリガンドに取り込ませて酸化し、もう一原子を水に還元する反応を触媒する。このためP450による酸化を一原子酸素添加反応とかMFO反応と呼ぶ。P450, GST共に多くの生物に存在し、大きな役割を果たす分子種が多くあるのはこのためであろう。計算化学の手法はこの必須残基を探し残基側鎖の立体配座の違い等を有機化学的に知り、活性発現の有無等を、分子生物学では知り得ない研究上のもう一方のウイングで解析するのに役立つ。分子生物学との二人三脚がこの研究領域の発展に大きく貢献するであろう。尚、本稿の計算化学による研究はScigress Explorer (Ver.7.6) (IH BioMedCACHe) (FUJITSU)の計算化学ソフトを用いて行われた。使用したツールは、分子モデリング、三次構造とアミノ酸配列の対比、分子構造の改変、分子の重ね合わせ、分子力学法や半経験的分子軌道法による計算、その他のBio Applicationである。いずれも計算化学を実行する上で不可欠な基本ツールで、SN2反応やドッキング法といった一つの使用目的をもった応用ツールではない。近年、計算化学はこれらを薬剤開発や材料科学等の分野でスクリーニング的に活用し発展してきたが、本稿のように基本ツールを研究者が自らの知恵と融合させれば、計算化学は従来の基礎化学だけでは追求仕切れない生命のメカニズムのような未知なる難問に個々に活用出来る手立てとなり得ることを示した。

参考文献

- 1) PRADE L, HUBER R, MANOHARAN T, HERBERT F, WILLIAM E, REUTER W (1997) Structures of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with substrate, transition-state analog and inhibitor. *Structure (London)* **5** : 1287-1295.
- 2) SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY V M, DOWD C A (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* **360** : 1-16.
- 3) MANNERVIK B, BOARD P G, HAYES J D, LISTOWSKY I, P, W R (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in Enzymology* **401** : 1-8.
- 4) MOHSENZADEH S, ESMAELI M, MOOSAVI F, SHAHRTASH M, SAFFARI B, MOHABATKAR H (2011) Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *African Journal of Biotechnology* **10** : 8160-8165.
- 5) PAULING L, COREY R B (1951) *Configuration of polypeptide chains*. **168** : 550-1.
- 6) 箕川 剛, 須恵雅之, 宮本 徹 (2006) イエバエ GST6B の特異的基質と計算化学による活性中心の構築, 日本農薬学会第 31 回大会 (要旨集 B205)
- 7) 箕川 剛, 須恵雅之, 宮本 徹 (2007) プロチオホスオキシソンの脱エチル S-オキシドを生成するイエバエ GST6B の活性中心における必須のアミノ酸残基, 日本農薬学会第 32 回大会 (要旨集 B311)
- 8) 箕川 剛, 須恵雅之, 宮本 徹 (2008) イエバエ GST 分子種 6B の GSH の活性化機構, 日本農薬学会第 33 回大会 (要旨集 B216)
- 9) a) 中村ちひろ, 須恵雅之, 矢嶋俊介, 宮本 徹 (2009) イエバエ GST の結晶構造解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (要旨集 3P0073A)
b) NAKAMURA C, YAJIMA S, MIYAMOTO T, SUE M (2013) Structural analysis of an epsilon-class glutathione transferase from housefly, *Musca domestica*. *Biochemical Biophysical Research Communications* **430** : 1206-1211
- 10) 宇野尚子 (2005) 部分構造最適化の組み合わせによるタンパク質立体構造予測の提案. 第 83 回月例発表会 (2005 年 12 月)
- 11) 宮本 徹, 柴 敬大, 若井 淳, 須恵雅之 (2010) 計算化学による GSH 抱合のメカニズムの解明—有機リン殺虫剤プロチオホスのイエバエに於ける新奇活性化を事例に一, 日本農薬学会第 35 回大会 (要旨集 C216)
- 12) KONG K H, NISHIDA M, INOUE H, TAKAHASHI K (1992) Tyrosine-7 is an essential residue for the catalytic activity of human class Pi glutathione S-transferase. *chemical modification and site-directed mutagenesis studies* **182** : 1122-9.
- 13) KONG K H, TAKASU K, INOUE H, TAKAHASHI K (1992) Tyrosine-7 in human class Pi glutathione S-transferase is important for lowering the pKa of the thiol group of glutathione in the enzyme- glutathione complex. **184** : 194-7.
- 14) BOARD P G, COGGAN M, WILCE M C, J, PARKER M W (1995) Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. *Biochemical Journal* **311** : 247-50.
- 15) WILCE M C J, BOARD P G, FEIL S C P, MICHAEL W (1995) Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO Journa.* **14** : 2133-43.
- 16) MIYAMOTO T, MIKAWA T, SUE M Activation mechanism of glutathione by conformation in the active site in housefly glutathione S-transferase. *J. Pestic. Sci.* (in the middle of submission)
- 17) REINEMER P ; PRADE L, HOF P ; NEUEFEIND T, HUBER R ; Zettl Rolf P K, Schell J K, Ingo et al. (1996) Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from Arabidopsis thaliana at 2.2 Å resolution : structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *Journal of Molecular Biology* **255** : 289-309.
- 18) DIXON D P, McEWEN A G, LAPHORN A J, EDWARDS R (2003) Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* **278** : 23930-23935
- 19) NISHIDA M, KONG K H, INOUE H, TAKAHASHI K (1994) Molecular cloning and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from Escherichia coli. The conserved tyrosyl

- residue near the N terminus is not essential for catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **269** : 32536-41
- 20) NISHIDA M, HARADA S, NOGUCHI S, SATOW Y, INOUE H, TAKAHASHI, K (1998) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: catalytic roles of Cys10 and His106. *J. Mol. Biol.* **281** : 135-147
- 21) a) 箕川 剛, 須恵雅之, 宮本 徹 (2004) 有機リン殺虫剤プロチオホスのイエバエ腹部グルタチオン S-転移酵素 6B による新奇抱合反応, 東京農大農学集報 **49** 号 : 82-88
b) MIYAMOTO T, MIKAWA T (2005) Oxidative glutathione conjugation and its novel role in activation of the organophosphorus insecticide prothiofos. *J. Pestic. Sci.* **30** : 31-38.
- 22) SUE M, MIKAWA T, UEDA T, NOMOTO Y, MIYAMOTO T (2006) A novel function of housefly glutathione S-transferase 6B—Its effect on the retention and increase of insecticidal activity of the insecticide prothiofos. *J. Pestic. Sci.* **31** : 139-145.
- 23) JABLONKAI I, KOMIVES T, BOGER P, SATO Y, WAKABAYASHI K (1999) Chemical catalysis of the isomerization of peroxidizing herbicidal thiadiazolidines. *Pestic. Sci.* **55** : 657-658
- 24) MIYAMOTO T, SILVA M, HAMMOCK B.D. (1987) Inhibition of epoxide hydrolases and glutathione S-transferases by 2-, 3-, and 4-substituted derivatives of 4'-phenylchalcone and its oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **254** : 203-213
- 25) MIYAMOTO T, YAMAMOTO I. (1994) Glutathione conjugates as the activated form of chalcones for glutathione S-transferase inhibition. *J. Pestic. Sci.* **19** : 53-58
- 26) MIYAMOTO T, YAMAMOTO I. (1995) Inhibition of housefly glutathione S-transferase by chalcone and comparison of its isozymes with rat. *J. Pestic. Sci.* **20** : 75-82
- 27) SHIOTSUKI T, KOISO A, ETO M (1989) Glutathione conjugation as a mechanism for glutathione transferase inhibition by saligenin cyclic phosphates. *J. Pestic. Sci.* **14** : 337-344
- 28) SHIOTSUKI T, ETO M (1991) A mechanism for synergism of fungicide IBP with fenitrothion against fenitrothion-resistant houseflies. *J. Pestic. Sci.* **16** : 673-675.
- 29) NICHOLSON DW, ALI A, VAILLANCOURT JP, CALAYCAY JR, MUMFORD RA, ZAMBONI RJ, Ford-HUTCHINSON AW (1993) Purification to homogeneity and the N-terminal sequence of human leukotriene C4 synthase : A homodimeric glutathione S-transferase composed of 18-kDa subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90** : 2015-2019.
- 30) MARRS KA, ALFENITO MR, LLOYD AM, WALBOT V (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375** : 397-400
- 31) ISHIKAWA T (1989) ATP/magnesium-dependent cardiac transport system for glutathione S-conjugates. A study using rat heart sarcolemma vesicles. *J. Biol. Chem.* **264** : 17343-17348
- 32) MARTINOIA E, GRILL E, TOMMASINI R, KREUZ K, AMRHEIN N (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364** : 247-249.
- 33) EZAKI B, YAMAMOTO Y, MATSUMOTO H (1995) Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminum treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiol. Plant* **93** : 11-18
- 34) LITWACK G, KETTERER B, ARIAS IM (1971) Ligandin, a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens, and a number of exogenous organic anions. *Nature* **234** : 466-467
- 35) OAKLEY AJ, LO BM, MAZZETTI AP, FEDERICI G, PARKER MW (1997) The glutathione conjugate of ethacrynic acid can bind to human pi class glutathione transferase P1-1 in two different modes. *FEBS Lett.* **419** : 32-36
- 36) OAKLEY AJ, LO BM, NUCCETELLI M, MAZZETTI, AP, PARKER, MW (1999) The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J. Mol. Biol.* **291** : 913-926
- 37) DIRR H, REINEMER P, HUBER R (1994) Refined crystal structure of porcine class Pi glutathione S-transferase (pGST P1-1) at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **243** : 72-92.
- 38) JI X, von ROSENVINGE EC, JOHNSON W W, TOMAREV SI, PIATIGORSKY J, ARMSTRONG RN, GILLILAND GL (1995) Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry* **34** : 5317-5328
- 39) WEBER JE, OAKLEY AJ, CHRIST AN, CLARK AG, HAYES JD, HALL R, HUME DA, BOARD PG, SMYTHE ML, FLANAGAN JU (2010) Identification and characterisation of new inhibitors for the human hematopoietic prostaglandin D (2) synthase. *Eur. J. Med. Chem.* **45** : 447-454
- 40) WANG Y, QIU L, RANSON H, LUMJUAN N, HEMINGWAY J, SETZER WN, MEEHAN EJ, CHEN L (2008) Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. *Journal of Structural Biology* **164** : 228-235.
- 41) OAKLEY AJ, HARNNOI T, UDOMSINPRASERT R, JIRAJAROENRAT K, KETTERMAN AJ, WILCE MC (2001) The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1-3 and 1-4 from *Anopheles dirus* species B. *Protein Sci.* **10** : 2176-2185
- 42) GU Y, SINGH SV, JI X (2000) Residue R216 and catalytic efficiency of a murine class alpha glutathione S-transferase toward benzo [a] pyrene 7 (R), 8 (S)-diol 9 (S), 10 (R)-epoxide. *Biochemistry* **39** : 12552-12557
- 43) GU Y, XIAO B, WARGO HL, BUCHER MH, SINGH SV, JI X (2003) Residues 207, 216, and 221 and the catalytic activity of mGSTA1-1 and mGSTA2-2 toward benzo [a] pyrene-(7R, 8S)-diol-(9S, 10R)-epoxide. *Biochemistry* **42** : 917-921
- 44) GRAHN E, NOVOTNY M, JAKOBSSON E, GUSTAFSSON A, GREHN L, OLIN B, MADSEN D, WAHLBERG M, MANNERVIK B, KLEYWEGT GJ (2006) New crystal structures of human glutathione transferase A1-1 shed light on glutathione binding and the conformation of the C-terminal helix. *Acta Crystallogr., Sect. D* **62** : 197-207
- 45) 宮本 徹 (2011) 有機リン殺虫剤プロチオホスが分子中に隠しもつ毒性発現のための秘密—抵抗性発現を生まない農業開発への提言—日本農薬学会誌 **36** : 304-307

Structure and Function of Glutathione S-transferases

—Breakaway from the Resistant Expression with Medicine—

By

Toru MIYAMOTO*

(Received December 21 2012/Accepted January 25, 2013)

Summary : Glutathione S-transferase (GST) is a conjugating enzyme which is widely present in organisms along with the cytochrome P450 which is oxidizing enzyme. This is playing an important role in biosynthesis or drug metabolism and degradation. In alpha, mu, and pi class GSTs, tyrosine draws out the proton of glutathione (GSH) and forms GSH conjugates. On the other hand, in theta, delta and epsilon class GSTs in insect, serine draws out the proton from GSH conjointly with carbonyl group of the nearby peptide bond, and forms GSH conjugates. It seems that GST of plant or E. coli is activating GSH by the system of the same serine as insect. In this paper, the catalytic mechanism and function of GST are explained from the viewpoint of conformation of the essential amino acid residue by computational chemistry, and a foothold for the breakaway from vicious circle of drug development and resistance discovery is proposed.

Key words : glutathione S-transferase, glutathione, tyrosine, serine, conformation

* Professor Emeritus, Tokyo University of Agriculture