

リソソーム病の酵素補充療法を目的とした人工改変酵素の構造解析

Structural study of modified lysosomal enzyme for the development of enzyme-replacement therapy

真板 宣夫^{1,*}, 櫻庭 均², 伊藤 孝司³¹徳島大学 疾患酵素学研究センター, 〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15²明治薬科大学 臨床遺伝学, 〒204-8588 清瀬市野塩 2-522-1³徳島大学 医薬創製教育研究センター, 〒770-8505 徳島市庄町 1-78Nobuo Maita^{1,*}, Hitoshi Sakuraba², and Koji Itoh³¹Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramotocho, Tokushima, 770-8503, Japan²Department of Clinical Genetics, Meiji Pharmaceutical University, Noshio, Kiyose, Tokyo, 204-8588, Japan³Institute for Medicinal Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, 1-78 Shomachi, Tokushima, 770-8505, Japan

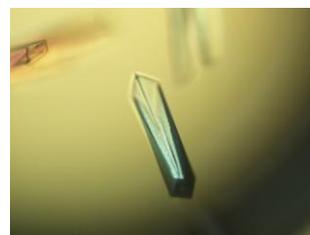
1 はじめに

リソソームは細胞で生じた老廃物を分解する小器官である。そのためリソソーム内にはグリコシダーゼ、リパーゼ、ホスファターゼ、ヌクレアーゼなど様々な加水分解酵素が多数存在している。リソソーム病は、リソソームで機能する分解酵素の先天的不全により老廃物がリソソームに蓄積し、それによって様々な発育障害を引き起こす病気である。リソソーム病は乳幼児で発症し、重篤になりやすく治療が困難である。

リソソーム病の治療には酵素補充療法(Enzyme Replacement Therapy)が効果的である。しかしながら、先天的にリソソーム酵素を全欠損している患者に対してはERTは拒否反応を起こし危険である。そこで構造的・機能的に類似な酵素の活性部位を、人工的に欠損した酵素の物に置き換えるというアプローチで有効な治療法の確立を目指している。Tay-Sachs病はGM2 ガングリオシドーシスとも呼ばれ、HexAの機能不全により引き起こされる。HexAはHex α とHex β のヘテロ 2 量体で、 α と β はとてもよく似ている(60%ホモロジー)。Hex α 欠損の Tay-Sachs 病も報告されている。そこで Hex β の残基をデザインし、人工的に Hex α 型に改変した酵素を作製したところ HexA 活性が認められた[1]。この改変型 Hex β の活性部位及び基質特異性を詳細に明らかにするため、結晶構造解析を行った。

2 実験および結果

CHO 細胞で発現させた改変型 Hex β のハンプトンの Index キットを用いて結晶化スクリーニングを行った。初期スクリーニングで得られた結晶はクラスター化していたため、Micro Seedingにより大きい単結晶を得ることが出来た(図1)。この結晶を抗凍結剤に移してから液体窒素で急速凍結して、PF-AR NE3Aで回折データを収集した(表1)。

図1: 改変型 Hex β の結晶

2.45 Åまでの回折データを iMosflm で処理し、空間群 $P4_22_12$ と判明した。 V_M の値から、非対称単位は1分子であると推測された。Hex β の構造を基に分子置換で解を得て、現在精密化計算を行っている。

表1: 回折データの統計値

X-ray source	PF-AR NE3A
Wavelength	1.0000 Å
Spacegroup	$P4_22_12$
Unit Cell parameters	$a=b=126.5, c=88.3$ Å
Max. resolution	2.45 Å
Completeness	100% (100%)
Multiplicity	12.1 (10.4)
$\langle I/\sigma I \rangle$	14.0 (3.6)
R-merge	0.131 (0.563)

3 まとめ

改変型 Hex β の結晶化を行い、2.45 Åまでの回折データを取ることが出来た。

参考文献

- [1] K. Matsuoka, T. Tamura, D. Tsuji, Y. Dohzono, K. Kitakaze, K. Ohno, S. Saito, H. Sakuraba, K. Itoh. *Mol. Ther.* **19**, 1017-1024 (2011).

* nmaita@tokushima-u.ac.jp