

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06600

研究課題名（和文）抗がん剤標的酵素の精密構造解析

研究課題名（英文）Crystallographic analysis of an anticancer target enzyme at high resolution

研究代表者

中村 照也（Nakamura, Teruya）

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：40433015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、微量重力下で得られた結晶を用いた超高分解能X線結晶構造解析、大型結晶を用いたX線・中性子結晶構造解析を行うことで、ヒト酸化ヌクレオチド加水分解酵素の基質認識・阻害剤結合に重要な活性部位の水素原子の位置を明らかにした。また、新規基質の同定、その他の基質複合体構造解析を行うことで、基質特異性の構造的知見を積み上げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素などのタンパク質の機能を原子レベルで理解するには、水素原子までをも明らかにする精密構造解析が必要不可欠である。本研究では、酸化ヌクレオチド加水分解酵素の精密構造解析を行うことで、酵素反応機構、阻害剤結合において重要な活性部位の水素原子を含めた構造情報を得た。

研究成果の概要（英文）：In this research, we investigated mechanisms of an enzymatic reaction and inhibitor binding of an oxidized nucleotide hydrolase. We carried out the crystallization under microgravity and determined the high-resolution crystal structure. The structure revealed the protonation state in the active site with higher accuracy and precision. In addition, we obtained structural insights into the substrate specificity of the hydrolase by experiments of X-ray crystallography, activity measurement, and substrate binding.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 X線結晶構造解析 中性子結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う DNA は、紫外線、放射線、化学物質や活性酸素種によって容易に損傷を受ける。生命活動において産生される活性酸素種は、DNA のみならずその前駆体であるヌクレオチドの酸化損傷も引き起こす。DNA 中に生じた酸化損傷は、突然変異、ひいてはがんの原因となる。生物はこのような DNA の酸化損傷を回避する機構を有しており、ヒト酸化ヌクレオチド加水分解酵素 (human MutT homologue-1: MTH1) は、細胞内の酸化ヌクレオチドを加水分解し、DNA 中への酸化ヌクレオチドの取り込みを阻害することで突然変異を抑制している。一方で、MTH1 は、がん細胞に高発現することで、がん細胞の生存にも寄与することが新たに報告されていることから、新規作用機構の抗がん剤ターゲットとしても注目されている。

2. 研究の目的

これまでに我々は MTH1 の高分解能 X 線結晶構造解析と反応速度論解析を行い、活性部位に存在する 2 つのアスパラギン酸残基 (Asp119, 120) がプロトン化状態を変えることで化学構造の異なる 2 つの酸化ヌクレオチド (8-oxo-dGTP と 2-oxo-dATP) を同程度の親和性で認識し加水分解するという幅広い基質特異性の発現機構を提案した。よって、MTH1 の酵素反応機構・阻害剤結合を理解するには、活性部位の水素原子までも明らかにする精密構造が必要不可欠であることがわかった。本研究は、超高分解能 X 線結晶構造解析と水素原子を高感度で検出することのできる中性子結晶構造解析を連携させた MTH1 の精密構造解析を行い、水素原子レベルでの酵素反応機構を明らかにすると同時に、新たな阻害剤探索のための活性部位の詳細な構造情報も得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 微小重力下での結晶化・構造解析

タンパク質構造中の水素原子の位置について X 線結晶構造を用いて詳細に議論するには、1.0 Å を超える高分解能の結晶、すなわち高品質かつ大型の結晶を調製することが必要となる。我々は、地上での結晶大型化実験を進めると同時に (3 の(2)を参照)、JAXA 高品質タンパク質結晶生成実験 (JAXA、コンフォーカルサイエンス、丸和栄養食品の協力下) に参加することで、微小重力下で MTH1 と 8-oxo-dGTP 複合体の結晶を得た。本結晶を用いて放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XU で X 線回折実験を行ったところ、これまでの最高となる 1.04 Å 分解能の回折強度データを収集した (Table 1)。得られたデータについて、プログラム PHENIX、SHELXL、COOT を用いて X 線結晶構造の精密化を行った (Table 2)。

Table 1 Data collection statistics

Wavelength (Å)	0.9
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell lengths (Å)	$a = 45.49, b = 48.10,$ $c = 123.94$
Resolution range (Å)	38.00-1.04 (1.06-1.04)
No. of observed reflections	1,657,713
No. of unique reflections	131,109
Completeness (%)	99.9 (100.0)
* R_{merge} (%)	10.9 (90.0)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	65.7 (4.8)

* $R_{\text{merge}} = 100 \times \sum_{hkl} \sum_i |I(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I(\text{hkl})$, where $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ is the mean value of $I(\text{hkl})$.

Table 2 Refinement statistics

Resolution range (Å)	38.00-1.04
No. of reflections used	131,001
Completeness (%)	99.8
* $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	13.3/15.8
Ramachandran plot (%)	
Favored	99.7
Allowed	0.3
R.m.s.d. in bonds (Å)	0.008
R.m.s.d. in angles (deg.)	1.376

* $R_{\text{work}} = 100 \times \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$. R_{free} was calculated from the test set (5% of the total data).

(2) X 線・中性子結晶構造解析のための結晶の大型化・構造解析

X 線・中性子結晶構造解析を行うため、結晶の大型化条件を検討した。結晶の大型化はマクロシーディング法により行った。マクロシーディング法とは、得られた結晶を種結晶として、新しい結晶化母液に植えつぐことで、結晶をより大きく成長させる手法である。タンパク質や沈殿剤の濃度だけでなく、種結晶の新鮮さやスケールアップするタイミングなども検討しながら、 μL スケールで析出した種結晶を 30~50 倍以上の結晶化ドロップへと移すことで結晶の成長を促した。最終的に 2 種類の基質複合体の大型結晶を調製することに成功した。大型結晶の中性子回折実験は、ドイツの FRMII の BIODIFF と茨城県の J-PARC/MLF の iBIX でそれぞれ収集した。同一の結晶を用いた X 線回折データ収集は Photon Factory のビームライン AR-NE3A で

行った。中性子と X 線のデータを用いてプログラム PHENIX による joint refinement により構造の精密化を行った。

4. 研究成果

(1) 微小重力下での結晶化・構造解析

上述した通り、MTH1 は、基質・阻害剤の結合に応じて活性部位の 2 つの Asp 残基のプロトン化状態を変化させることで幅広い基質特異性を発揮することを提案している。宇宙実験で得られた 1.04 Å という高分解能データを用いることで、結合長解析による Asp 残基のプロトン化状態をこれまでよりも高い精度で議論することができた。プログラム SHELXL を用いた結合長解析を行ったところ、Asp119 の C-O 間の距離は、それぞれ 1.206 (15)、1.311 (15) Å、Asp120 の場合は、1.236 (13)、1.264 (14) Å であったため、8-oxo-dGTP 結合時には、Asp119 がプロトン化、Asp120 が脱プロトン化状態であることがわかった (図 1、2)。本結果により、これまでに我々が提案している活性部位のプロトン化を介した基質認識機構をより高い精度で実証することができた。

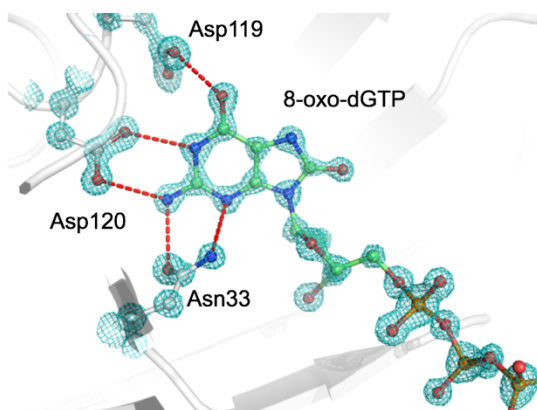


図 1 基質結合部位の電子密度

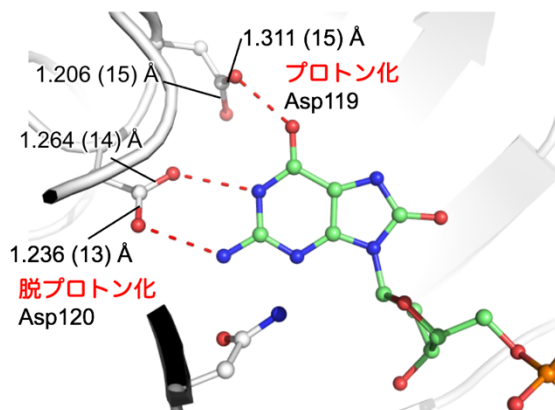


図 2 結合長解析の結果

(2) X 線・中性子結晶構造解析

X 線と中性子の両データを用いた joint refinement により、基質複合体構造の精密化を完了した。その結果、基質結合に重要な活性部位の水素原子を観察することができた。もう一つの基質複合体データについては、現在データ処理を行っている。さらに、新たな基質との複合体についても大型結晶を調製した。

また、これまで基質ではないとされてきたヌクレオチド (新規ヌクレオチド) が基質となりうる可能性が示唆されたため、新規ヌクレオチドの複合体結晶を調製し、放射光施設 Photon Factory のビームライン AR-NE3A にて 1.0 Å 分解能の X 線回折強度データを収集した (Table 3)。構造解析を行った結果 (Table 4)、新規ヌクレオチドの加水分解部位がこれまでの基質と同様の様式で活性部位に結合していることがわかった。さらに、結晶内反応を行うことで、新規ヌクレオチドが生成物へと加水分解されることを確認した。これらの実験に加え、新規ヌクレオチドの加水分解活性測定、活性阻害効果の検証を行うことで、本新規ヌクレオチドは結合親和性が非常に高い基質であることを明らかにした。

Table 3 Data collection statistics

Wavelength (Å)	1.0
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell lengths (Å)	$a = 46.15, b = 47.94,$ $c = 124.35$
Resolution range (Å)	50.0-1.00 (1.06-1.00)
No. of observed reflections	1,884,547
No. of unique reflections	139,997
Completeness (%)	93.7 (86.1)
* R_{merge} (%)	9.5 (46.2)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	16.9 (2.2)

* $R_{\text{merge}} = 100 \times \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean value of $I(hkl)$.

Table 4 Refinement statistics

Resolution range (Å)	50.0-1.00
No. of reflections used	131,001
Completeness (%)	99.8
* $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	12.9/14.9
Ramachandran plot (%)	
Favored	99.0
Allowed	1.0
R.m.s.d. in bonds (Å)	0.006
R.m.s.d. in angles (deg.)	1.296

* $R_{\text{work}} = 100 \times \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$. R_{free} was calculated from the test set (5% of the total data).

さらに、MTH1 特有の幅広い基質特異性をさらに理解するために、親和性の低い基質との複合体の X 線結晶構造解析を試みた。基質大過剰の条件下で結晶化を行い、得られた結晶を用いて Photon Factory のビームライン BL17A にて 3 Å 分解能のデータを収集した。結晶化条件を検討することで高分解能データ収集を見込める結晶が得られたので、本結晶を用いて X 線回折実験を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mustofa Md Kawsar, Tanoue Yuki, Chirifu Mami, Shimasaki Tatsuya, Tateishi Chie, Nakamura Teruya, Tateishi Satoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 RAD18 mediates DNA double-strand break-induced ubiquitination of chromatin protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Ryoma, Taharabaru Toru, Nishida Takumi, Ohno Yoshitaka, Maeda Yuki, Sato Masahiro, Ishikura Kandai, Yanagihara Kazunori, Takagi Hiroki, Nakamura Teruya, Ito Shingo, Ohtsuki Sumio, Arima Hidetoshi, Onodera Risako, Higashi Taishi, Motoyama Keiichi	4. 巻 328
2. 論文標題 Lactose-appended α -cyclodextrin as an effective nanocarrier for brain delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 722 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.09.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Tomofumi, Nakamura Teruya, Amano Masayuki, Miyakawa Toshikazu, Yamagata Yuriko, Matsuoka Masao, Nakata Hiroto	4. 巻 94
2. 論文標題 A Conformational Escape Reaction of HIV-1 against an Allosteric Integrase Inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00486-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00486-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Teruya, Hashikawa Chie, Okabe Kohtarō, Yokote Yuya, Chirifu Mami, Toma-Fukai Sachiko, Nakamura Narushi, Matsuo Mihoko, Kamikariya Miho, Okamoto Yoshinari, Gohda Jin, Akiyama Taishin, Semba Kentarō, Ikemizu Shinji, Otsuka Masami, Inoue Jun-ichiro, Yamagata Yuriko	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural analysis of TIFA: Insight into TIFA-dependent signal transduction in innate immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61972-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura T, Hirata K, Fujimiya K, Chirifu M, Arimori T, Tamada T, Ikenizu S, Yamagata Y	4. 巻 36
2. 論文標題 X-ray Structure Analysis of Human Oxidized Nucleotide Hydrolase MTH1 using Crystals Obtained under Microgravity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Microgravity Sci. Appl.	6. 最初と最後の頁 360103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15011//jasma.36.360103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Masatoshi, Yoshizawa Tatsuya et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 SIRT7 has a critical role in bone formation by regulating lysine acylation of SP7/Osterix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05187-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hira Daisuke, Kitamura Ryuji, Nakamura Teruya, Yamagata Yuriko, Furukawa Kenji, Fujii Takao	4. 巻 430
2. 論文標題 Anammox Organism KSU-1 Expresses a Novel His/DOPA Ligated Cytochrome c	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1189 ~ 1200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2018.02.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中村照也
2. 発表標題 自然免疫に関わるシグナル分子TIFAの構造学的研究
3. 学会等名 日本結晶学会 令和2年度年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村照也
2. 発表標題 酵素の基質特異性に関わる水素原子の観察
3. 学会等名 CBI学会 2020年大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 照也
2. 発表標題 酵素の精密構造解析 抗がん剤標的分子の基質認識における水素原子の役割
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 2019年大会・第70回日本電気泳動学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤宮 佳菜、中村 照也
2. 発表標題 ヒト酸化ヌクレオチド加水分解酵素の新規基質の同定
3. 学会等名 第43回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 照也
2. 発表標題 ゲノム安定性維持機構の構造生物学
3. 学会等名 第2回熊本大学ライフサイエンスシーズ探索研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teruya Nakamura
2. 発表標題 Crystal structure of human oxidative nucleotide hydrolase in complex with a newly found substrate
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 照也
2. 発表標題 ヒト酸化ヌクレオチド加水分解酵素の構造学的研究-水素原子レベルでの酵素反応機構の解明を目指して-
3. 学会等名 平成30年度 iBIX-JAXA-KEK物構研-QST合同タンパク質研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関