

平成 21年 5月 28日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007年度～2008年度  
課題番号：19570111  
研究課題名 (和文) 高選択的 JNK1 阻害剤創出を目指した超高分解能 X 線及び中性子線構造解析  
研究課題名 (英文) Ultra-high resolution X-ray and neutron analyses aimed for producing highly selective JNK1 inhibitors  
研究代表者  
木下 誉富 (KINOSHITA TAKAYOSHI)  
大阪府立大学・理学系研究科・准教授  
研究者番号：90405340

## 研究成果の概要：

研究目的達成のために必須となる大型結晶の調製には、高純度 JNK1 サンプルの安定的かつ大量供給が成功のカギとなる。不安定要因である 7つのシステイン残基をすべてアミノ酸置換することで、安定な JNK1 サンプルの大量供給を可能にした。スクリーニングの結果から、微小結晶 (20 $\mu$ m 程度) を得た。X 線回折予備実験を行い、4 Å 分解能までの回折点を観測した。今後、実験を継続して超高分解能及び中性子線構造解析実験を進め、高選択的 JNK1 阻害剤を創出する。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：JNK1、阻害剤、X 線結晶構造解析、中性子線構造解析、ドラッグデザイン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、糖尿病治療薬の開発を目指して JNK1 に注目した。JNK は 3つのサブタイプが確認されている (JNK1, JNK2, JNK3)、生体内でそれぞれ異なる役割を担っており、異なる疾患との関わりが報告されている。したがって、サブタイプ間での選択性が確保できないと、副作用を引き起こす可能性が高い。すでに中程度分解能の X 線構造に基づく Structure-Based Drug Design (SBDD) 研究も

進んでいるが、選択性を確保するには水素原子を含む高精度構造情報が必須である。

## 2. 研究の目的

超高分解能 X 線構造解析と中性子線構造解析を相補的に用いることにより、水素原子を含めた JNK1 の高精度構造を明らかにする。これらにより、JNK1 と阻害剤の結合エネルギーについて、定量的な議論が可能となり、高

精度なデザインが期待できる。大型放射光の発展に伴い、中程度分解能 X 線結晶構造解析を基盤とした SBDD はいまや創薬手法に必要不可欠となっているが、原子力研究開発機構内の J-PARC の中性子線回折実験施設が 2008 年度に稼動しており（現状では低出力稼動）、超高分解能 X 線構造解析と中性子線構造解析を相補的に用いた SBDD も創薬手法の一翼を担う時代も近いと考えている。本研究は、これら高精度構造解析に基づく SBDD の先駆的な研究となる。

X 線回折法では立体構造を精度高く求めることができる。しかし水素原子の位置の決定は苦手である。一方、中性子線を用いれば水素原子の位置を明確に決めることができるが、一片が数ミリにもおよぶタンパク質結晶としては異常と言えほどの大きさの結晶が必要である。JNK1 は構造内部に 4 箇所と表面に 3 箇所のシステイン残基があり、これらが酸化条件下において失活や凝集を引き起こす原因となり、安定した巨大な結晶を作ることが困難であると考えられる。そこで、全 7 箇所のシステインを変異させた変異体 (M7)、内部のシステイン残基はそのまま残し、表面3箇所だけを変異させた変異体 (M3)、および野生型 (M0) を調製し (Fig. 1 及び Table 1)、巨大な結晶を作り出せるサンプル調整法の探索を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発現プラスミドの構築

JNK1 の構造解析論文 (*EMBO J.* **23** (2003), 2185-2195) に従い実験を進めた。M0、M3 および M7 遺伝子を発現プラスミド pET24a のマルチクローニングサイト NdeI/XhoI に組み込んだ。

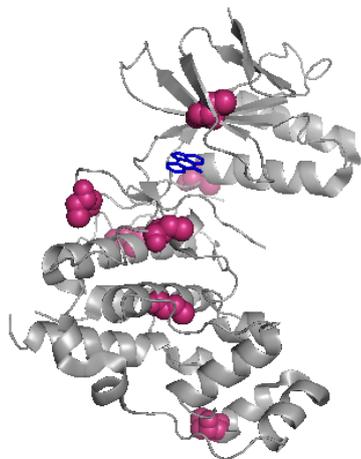


Fig 1. JNK1 のシステインの位置

Table1. アミノ酸変異箇所

M3	分子表面 : C116S, C163A, C245S
M7	分子内部 : C41V, C79V, C137V, C213V 分子表面 : C116S, C163A, C245S

#### (2) 大量発現、精製

得られたベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、大腸菌を  $OD_{600}=0.5$  程度になるまで  $37^{\circ}\text{C}$  で培養し、 $0.3\text{mM}$  IPTG で誘導をかけ、さらに  $18^{\circ}\text{C}$  で 16 時間培養した。大腸菌を超音波で破碎後、不溶画分を除去する。可溶画分からアフィニティーカラム、イオン交換カラム、分子ふるいカラムを組み合わせ JNK1 (M0, M3, M7) を精製した。結晶化実験に必要な純度は、5 マイクログラムのサンプルを SDS-page に流して検定した。

#### (3) 各サンプルの特性検査

##### ① 活性化ループのリン酸化状態の検討

JNK1 のリン酸化部位 を特異的に認識する一次抗体 (pThr183/pTyr185) を使用したウエスタンブロット法により、M0, M3, M7 の活性化に必要な部位がリン酸化されているかどうかの確認を行った。

##### ② anti-phospho-cJun 抗体による活性測定

JNK1 の基質である c-Jun に対してリン酸化反応を行い、リン酸化 c-Jun 抗体 (pSer63/ pSer73) を用いた ウエスタンブロット法により M0, M3, M7 の活性測定を行った。

##### ③ 動的散乱測定

動的散乱測定装置 DynaPro Titan (Wyatt Technology Cooperation) を用い、M0, M3, M7 の動的散乱半径の分布を測定した。

#### (4) 結晶化

M7 精製サンプルを  $10\text{mg/ml}$  にまで濃縮し、その溶液に JNK 阻害剤 SP600125 をけん濁した。蛋白質表面のシステインを変異により分子同士の相互作用に影響が起きて、結晶化条件が変化する可能性が高いと推測できたので、Crystal Screen-HT, Index-HT (Hampton Research), Wizard I, II, III (Emerald Biosystems) などのキットを用いて結晶化条件をスクリーニングした。

#### (5) X線データ測定

得られた M7 結晶を paraton-N (Hampton Research) 抗凍結剤として液体窒素下で凍結し、大型放射光 (高エネルギー加速器研究機

構NE-3A) においてX線回折データ測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各サンプルの発現

野生型 M0 に比べて変異体 M3 および M7 の発現量が高くなっており、この2つの変異体では中性子回折実験に必要な大量取得の可能性が示唆された。また、それぞれ可溶性画分に多く存在する (Fig. 2)。

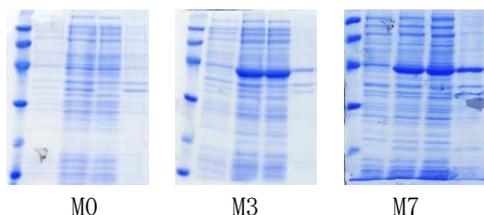


Fig.2 JNK1 の発現比較：それぞれ、左からマーカー、誘導前菌体、誘導後菌体、誘導後可溶性画分、誘導後沈殿。最も太くなっているバンドが JNK1 に相当する。

##### (2) 各サンプルの精製

3 種ともに SDS-PAGE において純度の高いサンプルを得る事が出来た (Fig. 3)。精製収量を比較すると、M7 が最も高く、M0 より約 10 倍高い収率であった (Table 2)。大腸菌 50 ml 培養量で約 1 mg と極めて多量な結晶化サンプルを得ることができた。本来 JNK1 は酸化的不安定さを持っているため、時間経過とともに精製収量が低下する傾向がある (M0 精製は 0.1 mg 以下の収率であった)。しかし、M7 の精製は還元剤を加えることなく、大量生産することも可能になった。これは、変異を加えたことで JNK1 の安定性も上がったのではないかと考えている。

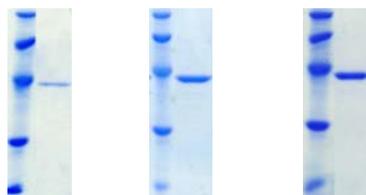


Fig.3 JNK1 の精製純度：それぞれ、左はマーカー。

Table 2. 精製収量の比較

変異体	M0	M3	M7
菌体湿重量 (g)	0.4	0.6	0.5
精製収量 (mg)	0.05	0.5	0.6

\* 50ml 培養量

##### (3) 各サンプルの特性

###### ① 活性化ループのリン酸化状態

M0, M3, M7 は Active JNK1 (di-phosphorylated state) に比べると発色が弱かったがリン酸化が確認された (Fig. 4 上段)。しかし、実際のタンパク量は Active JNK1 に比べて、各 JNK1 サンプルの方がはるかにタンパク質量は多いことから (Fig. 4 下段 SDS)、大部分の JNK1 が mono-phosphorylated 状態である可能性が示唆される。

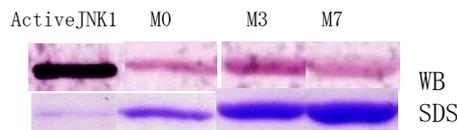


Fig.4 JNK1 のリン酸化状態

###### ② 活性測定

M0, M3, M7 のすべてで発色が確認されたことから c-Jun をリン酸化し活性を持つことが分かった (Fig. 5)。また、M3, M7 は M0 と比較して発色の強さに大きな違いがなかったため、M3, M7 は、変異導入によって活性に関わるほどの大きなコンフォメーションの変化がなかったものと考えられる。

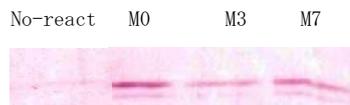


Fig.5 c-Jun に対するリン酸化

###### ③ 動的光散乱

3 種とも単分散であり、動的光半径が均一であるが、その中で M7 のピーク幅 (%Pd) が最も小さい値を示したことから、M7 が溶液中で最も均一な粒子として存在していると考えられる (Table 3)。よって M7 を結晶化サンプルとして選抜した。

Table 3. 動的光散乱の結果

変異体	M0	M3	M7
光半径 (nm)	2.0	2.4	2.9
%pD	36.4	23.8	4.8

##### (4) M7 変異体の結晶化

Crystal Screen I D2 条件 (1.4M Sodium citrate, 0.1M HEPES (pH7.5)) で微結晶を得た (Fig. 6)。この条件は中性子回折実験に有利となる重水素置換可能な試薬の使用が

可能である。



Fig.6 JNK1-M7の結晶

#### (5)M7 結晶の X 線回折データ測定

データ収集の結果、結晶学的パラメータを決定することができた (Table 4)。結晶の Mosaicity はよく、格子定数もさほど大きくなかったことから、中性子回折に用いることが出来ると考えている。

今後、中性子回折を視野にいれ、まずは X 線測定において高分解能データ収集を行い、変異部位の構造を確認する。さらに中性子回折に耐えうるより大きな結晶の作製を試みたい。

Table 4. データ測定及び結晶学的パラメータ

データ測定場所	PF-AR/NE3A
波長	1 Å
測定温度	100K
空間群	P6 <sub>3</sub> 22
格子定数	a=b=156 Å, c=86 Å
分解能	4 Å

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① T. Tamada, T. Kinoshita, K. Kurihara, M. Adachi, T. Ohhara, K. Imai, R. Kuroki, T. Tada, Combined high-resolution neutron and X-ray analysis of inhibited elastase confirms the active-site oxyanion hole but rules against a low-barrier hydrogen bond, *J. Am. Chem. Soc.*, in press. 査読有
- ② T. Kinoshita, I. Yoshida, S. Nakae, K. Okita, M. Gouda, M. Matsubara, K. Yokota, H. Ishiguro, T. Tada Crystal structure of human mono-phosphorylated ERK1 at Tyr204, *Biochem. Biophys. Res. Commun.***377**, 1123-1127 (2008). 査読有
- ③ T. Kinoshita, T. Tamada, K. Imai, K. Kurihara,

T. Ohhara, T. Tada, R. Kuroki, Crystallization of porcine pancreatic elastase and preliminary neutron diffraction experiment, *Acta Cryst.* **F63**, 315-317 (2007). 査読有

- ④ 木下 誉富、「X線結晶構造解析から Structure-Based Drug Designへの応用と展開」日本薬理学会誌くすりとかからだ、**129-3**、186-190 (2007). 査読無
- ⑤ 木下 誉富、「開発候補化合物探索での構造情報 (X線結晶構造解析) の利用」、メディカル・サイエンス・ダイジェクト **33-10**, 18-21 (2007). 査読無

[学会発表] (計 52 件)

- ① 仲庭哲津子、井上達矢、木下 誉富、多田俊治、安達基泰、玉田太郎、黒木良太、「中性子構造解析を目的とした変異体 human c-Jun N-terminal kinase の結晶調製法の探索」、第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009 年 5 月 21 日、熊本市
- ② 木下 誉富、「アデノシンデアミナーゼ阻害剤の Structure-Based Drug Design」、先端科学セミナー京都 ケミカルバイオロジーシンポジウム、2008 年 12 月 15 日、京都府立大学
- ③ 木下 誉富、「ハイブリッド型 SBDD : アデノシンデアミナーゼ阻害剤の創出」、CBI 学会第 280 回研究講演会「酵素阻害剤開発における SBDD の最前線」、2007 年 12 月 5 日、東京都
- ④ 玉田太郎、木下 誉富、大原高志、栗原和男、多田俊治、黒木良太、「エラスターゼおよび薬物候補化合物複合体の中性子構造解析」、日本中性子科学会第 7 回年会、2007 年 11 月 28 日、九州大学
- ⑤ 木下 誉富、多田俊治、今井啓祐、「Structure-Based Drug Design の新展開 - エラスターゼを題材として -」、第 7 回蛋白質科学会ワークショップ「歩き始めた新しい構造研究プローブ」、2007 年 5 月 25 日、仙台市
- ⑥ 玉田太郎、木下 誉富、多田俊治、栗原和男、大原高志、黒木良太、「エラスターゼおよび薬物候補化合物複合体の中性子構造解析」、第 7 回日本蛋白質科学会年会、2007 年 5 月 25 日、仙台市

[図書] (計 1 件)

- ① 木下 誉富 (著者分担)、X線結晶構造解析を利用した医薬品創出、タンパク質結晶の新展開 - 新しい育成技術から構造解析・応用研究へ、シーエムシー出版 (2008) 205-214

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

- ①「新規化合物、リン酸化阻害剤、インスリン抵抗性改善剤、及び糖尿病の予防乃至治療剤、並びに、スクリーニング方法」

発明者：木下誉富（大阪府立大学）、土井健太郎、朝永惇、杉山肇、和田睦世（以上、富士通株式会社）

権利者：同上

出願番号：特願 2009-039997 号

出願日：平成 21 年 2 月 23 日

国内

〔その他〕

○プレス発表

- ①「強い中性子で夢の成果－太陽系の起源解明、がん治療－」、日本原子力研究開発機構、大阪府立大学、京都薬科大学、平成 19 年 7 月 10 日 コメント掲載（東京新聞、中日新聞（WEB 版）に掲載）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 誉富 (KINOSHITA TAKAYOSHI)

大阪府立大学・理学系研究科・准教授

研究者番号： 9 0 4 0 5 3 4 0