

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790046

研究課題名(和文) CYP3A4の高分解能構造解析による薬物相互作用の分子論的
解明研究課題名(英文) Investigation of the drug-CYP3A4 interaction by the use of high
resolution structure analysis

研究代表者

安達 基泰 (ADACHI MOTOYASU)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究職

研究者番号：60293958

研究成果の概要(和文)：CYP3A4は医薬品代謝を担う主要な分子であり、CYP3A4の構造活性相関の研究は、新規医薬品設計の観点から極めて重要なテーマである。しかしながら、ヒト由来チトクロームP450の多くが可溶性タンパク質として大量発現させることが困難なため、本研究を推進するためには、可溶性蛋白質として回収される活性型CYP3A4の調製系を構築することが研究推進において重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：CYP3A4 is a key enzyme responsible for drug metabolism. The study in structure-function relationship of the enzyme is important with respect to design for new drug. However, it is difficult to obtain enough amount of recombinant CYP3A4 as a soluble protein. Thus, the preparation of CYP3A4 remains an important problem.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：P450、大腸菌発現、結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

放射光施設等の整備によって、数多くの創薬標的蛋白質の立体構造解析が報告されるようになった。しかし低分子薬物との複合体の構造解析では、より高分解能の精密な立体構造解析が要求される。その際には単位胞体積の縮小と分子間のパッキングの改善が必要である。この問題を解決するためには、再度結晶化スクリーニングを行い、高分解能の回折像を与える結晶化条件を探索することになる。近年では結晶化スクリーニングの微量化・ロボット化によって、すでに数多くの結晶化条件が探索済みであり、新たな空間群の

結晶を得ることは難しい状況である。一方、蛋白質表面のアミノ酸を数残基だけ改変することによって、これまでに結晶化できなかった蛋白質の結晶化に成功した例や[Yamada et al., Prot. Science (2007)]、あるいは分子間のパッキングを変更した例[Banatao et al., PNAS (2006)]が報告され始めている。従って、このような蛋白質工学的アプローチは、超高分解能結晶構造解析を目的とした結晶の“質”の改善に対して技術的な妥当性がある。

本研究で対象としているヒトのチトクローム P450 は、医薬品や化学物質の生体内に

おける薬物代謝に関与する最も重要な酵素である。中でも、CYP3A4 は肝臓および消化管に存在するアイソザイムであり、チトクローム P450 が関与する医薬品代謝の 50%以上を担っていることから、薬物代謝を研究するうえにおいても重要な酵素と考えられる。2004 年に Williams らによつてはじめて CYP3A4 の 2.7 Å 分解能の X 線結晶構造解析が報告された [Williams, P.A. et al. Science 305, 683-686 (2004)]. しかし、高分解能解析は報告されていない。

2. 研究の目的

蛋白質の立体構造解析においては、3 Å の分解能が解析を可能にする目安とされるが、低分子薬物との相互作用の解明には、高分解能の精密な構造解析が要求される。本提案では、そのような低分解能の情報しか得られていない蛋白質を、最小限のアミノ酸置換によつて高分解能の解析を可能とする手法を開発する。対象蛋白質としてはヒト・チトクローム P450 3A4 分子を用いる。CYP3A4 は医薬品代謝を担う主要な分子であるが、特定の医薬品 (HIV プロテアーゼ阻害剤のリトナビルなど) による CYP3A4 阻害や、CYP3A4 に生じた 1 塩基置換 (SNPs) によつて、医薬品の代謝が大きく影響を受け、その薬理作用を大きく変化させる原因となる。したがつて、CYP3A4 の構造活性相関の研究は、新規医薬品設計の観点から極めて重要なテーマである。これまでに決定された CYP3A4 の立体構造は 2.7 Å と分解能が低いため、より高分解能の解析を目的とした技術開発には最適の分子である。本研究終了時には CYP3A4 とリトナビルとの複合体を原子分解能レベルで構造決定することをめざす。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

CYP3A4 の遺伝子は、大腸菌発現系用に最適化した配列を設計し、人工合成により作製した。大腸菌用の発現ベクターは、pET24a (Merck 社)、pColdIII (タカラバイオ社) を使用した。GroEL/ES の共発現ベクターは、pGro7 (タカラバイオ社) を使用した。

(2) 実験方法

大腸菌の形質転換は、エレクトポレーション法によつて行った。大腸菌発現では、培地として LB 培地を使用して、発現誘導後に得られた菌体を遠心機にて 12000rpm で 5min 遠心し、沈殿画分を回収した。細胞内蛋白質の抽出は、大腸菌を抽出液に懸濁後、超音波破碎処理を行い、12000rpm で 5min の遠心後に、得られた上清画分を可溶性画分とした。一方、その時の沈殿画分を不溶性画分とした。再生実験では、大腸菌発現で得られた CYP3A4 の沈殿画分を 5mM DTT と 20mM の TrisHCl (pH8.5)

を含む 6M グアニジン塩酸塩で溶かしたものを蛋白質溶液とした。蛋白質定量は Bradford の方法で行い、希釈後のタンパク質濃度は、0.1mg/mL となるように設定した。

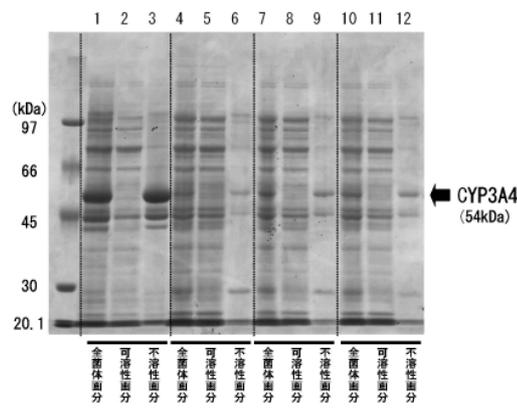
4. 研究成果

CYP3A4 の高分解能 X 線結晶構造解析を実施するためには、均一な試料が得られる調製系の確立が最も重要な課題である。また、CYP3A4 は、非常に他種類の医薬品化合物の代謝を担う酵素であることから、簡便な試料調製系の確立が望まれる。そこで、本研究では、CYP3A4 が SS 結合を有しない細胞内蛋白質であることから、大腸菌発現系を利用して CYP3A4 の試料調製を検討した。

(1) pET ベクターを用いた発現実験

人工合成した遺伝子を pET24a ベクターに組み込んで、蛋白質発現の確認を行った。図 1 レーン 1 および 3 に示されるように、CYP3A4 は大量発現していることが確認された。しかしながら、CYP3A4 は、不溶性画分に存在し、構造形成が行われていなかった。そこで、単位時間当たりの蛋白質発現量を減少させるために培養温度を 30°C に下げて、さらに IPTG の濃度に依存した発現誘導が可能な大腸菌 Tunner (DE3) を用いて発現実験を実施した。その結果、CYP3A4 の発現レベルは、30°C の場合に比較して、大きく下がったが、可溶性の画分に CYP3A4 由来のバンドは確認できなかった。

(図 1)



(2) pCold ベクターを用いた発現実験と GroEL/ES との共発現実験

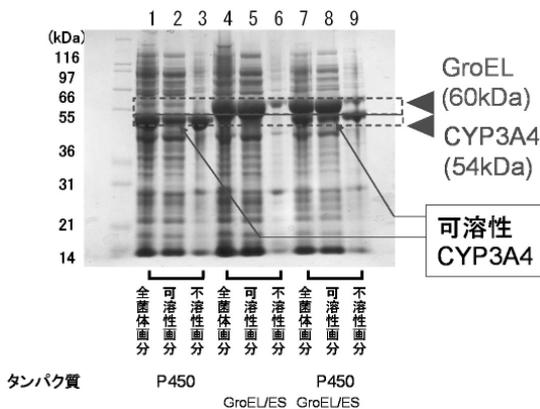
pET ベクターを用いた発現実験では、CYP3A4 が可溶性の画分に存在していなかったことから、低温での発現が可能な、pCold ベクターを使用して、実験を実施した。pCold を利用することで、目的タンパク質は穏やかに立体構造を形成し、本来の立体構造を形成することが期待できる。また、大腸菌由来の余分なタンパク質が少なく、低温培養のため夾雑プロテアーゼの活性が低いことが利点

である。

pCold ベクターを用いて発現実験を実施した結果、CYP3A4 を可溶性の蛋白質として高レベルで発現させることに成功した(図 2 レーン 2)。なお、データは示さないが、発現誘導後の温度は、15°C よりも 10°C の方が、可溶性の CYP3A4 を得るのに効果的であった。

さらに、CYP3A4 を高レベルで発現させるために蛋白質の立体構造形成を促進する GroEL/ES 蛋白質との共発現実験を実施した。しかしながら、GroEL/ES の有無にかかわらず、CYP3A4 の発現レベルに変化は無かった(図 2 レーン 2 と 8)。つまり、GroEL/ES の共発現は、CYP3A4 の可溶化に対して有意な効果がなかったものと考えられる。

(図 2)

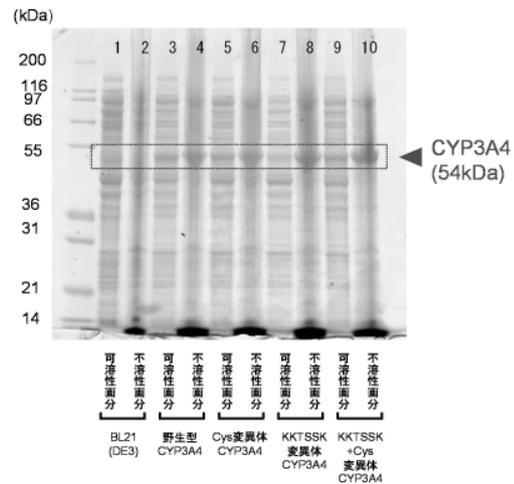


(3) Cys 変異体と N 末端修飾体の発現実験

CYP3A4 は、計 7 つの Cys 残基を有している。遊離の Cys が存在すると Cys 残基酸化によって結晶の質が低下することが懸念される。そこで、ヘムに配位する Cys442 を除く 6 つの Cys 残基に変異を導入した CYP3A4 (ここでは Cys 変異体と称する) を作製した(図 3)。

野生型 CYP3A4 と Cys 変異体の発現レベルを比較した結果、Cys 変異体は野生型 CYP3A4 と同等のレベルで、可溶性蛋白質として発現していることが確認された(図 3 レーン 3 と 5)。また、N 末端に可溶性のペプチド KKTSSK の配列を付加した変異体を作製し発現レベルを比較した結果、可溶性蛋白質としての発現レベルに顕著な増加は、見られなかった(図 3 レーン 7 と 9)。これらの結果は、N 末端を修飾していない Cys 変異体が質の高い結晶を作製するために有効であることを示唆している。

(図 3)



さらに、得られた可溶性の野生型 CYP3A4 と Cys 変異体が、Cys 残基を介してヘムと結合しているかどうかを確認するために、両者の粗抽出液に一酸化炭素を吹き込み、一酸化炭素差スペクトルを測定した。その結果、ヘム結合型の CYP3A4 のスペクトルが観察されたことから、活性型 CYP3A4 が得られていることが示された。しかしながら、活性型 CYP3A4 の割合は得られている可溶性 CYP3A4 の 10% 以下であった。今回得られている可溶性の CYP3A4 は、ほとんどがヘム非結合型であることが示された。

(4) CYP3A4 の再生実験

大腸菌で得られた可溶性の CYP3A4 の大部分は、ヘム非結合型であることが示されたことを受けて、CYP3A4 の再生を検討した。再生は、野生型の CYP3A4 を用いて、希釈法にて実施した。pH および変性剤、塩、グリセロールの濃度を検討した結果、0.5M の塩(酢酸ナトリウム)を添加することが、可溶性の CYP3A4 を得るのに有効であることが分かった。可溶化された CYP3A4 をゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した結果、単量体の位置にピークが確認され、その紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、すでに報告されている活性型 CYP3A4 とよく似ていた。今後、再生された CYP3A4 の諸性質を確認する必要があるが、おそらく P450 蛋白質の再生に成功したはじめての例だと考える。

(5) CYP2B4 と X 線結晶構造解析

CYP3A4 は、試料調製が非常に困難であったことから、哺乳動物に広く存在する 2B サブファミリーの一つである CYP2B4 の結晶構造解析に取り組んだ。PEG と MPD を沈殿剤として使用して結晶化に取り組んだ結果、長さ 1mm 以上の大型の結晶を取得することに成功した。しかしながら、放射光施設で回折データの収集を行った結果、分解能は 3.0 Å であり、高分解能の解析を実施することはできな

かった。

(6)今後の検討課題

本研究によって、CYP3A4 の試料調製に関する様々な重要なデータが得られた。薬物代謝に関わる P450 の研究を進めていくうえで、基礎的で重要度の高い結果である。残された今後の検討課題としては、①再生された CYP3A4 の諸性質の確認、②可溶性蛋白質として発現した CYP3A4 に対して、再生処理の条件を利用した試験管内でのヘム結合実験を実施することが挙げられる。一旦試料調製系が確立できれば、部位特異的変異体の調製も容易であることから、変異導入によって質の高い CYP3A4 の結晶を作製することが可能となる。最終的には、リトナビルをはじめ、種々の化合物との複合体の高分解能構造解析を実施する計画である。

本研究である CYP3A4 のリトナビルとの複合体の高分解能 X線結晶構造解析が効果的に進展すれば将来的には大型結晶の作製に取り組み、中性子結晶構造解析によって水素水和構造を決定する。リトナビルとの複合体の水素水和構造を解析することによって、基質と阻害剤の分子認識メカニズムの違いをより詳細に検討する。申請者らは、現在 HIV プロテアーゼの中性子結晶構造解析を進めており、CYP3A4 とリトナビルとの複合体の構造を明らかにすることで、水素水和構造情報を用いた創薬研究の基盤を確立する。

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 Kuroki, R., Okazaki, N., Adachi, M., Ohhara, T., Kurihara, K., Tamada, T., Towards investigation of the inhibitor-recognition mechanisms of drug-target proteins by neutron crystallography. (2010) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 66, 1126-1130. (査読有)
- ② Hidaka, K., Kimura, T., Abdel-Rahman, H. M., Nguyen, J. T., McDaniel, K. F., Kohlbrenner, W. E., Molla, A., Adachi, M., Tamada, T., Kuroki, R., Katsuki, N., Tanaka, Y., Matsumoto, H., Wang, J., Hayashi, Y., Kempf, D. J., Kiso, Y., Small-sized human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors containing allophenylnorstatine to explore the S2' pocket., J Med Chem. (2009) 52 (23), 7604-7617. (査読有)
- ③ Tamada, T., Kinoshita, T., Kurihara, K., Adachi, M., Ohhara, T., Imai, K., Kuroki, R., Tada, T., 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. (2009) 131, 11033-11040.

- ④ Adachi, M., Ohhara, T., Kurihara, K., Tamada, T., Honjo, E., Okazaki, N., Arai, S., Shoyama, Y., Kimura, K., Matsumura, H., Sugiyama, S., Adachi, H., Takano, K., Mori, Y., Hidaka, K., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., Kuroki, R., Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography., Proc Natl Acad Sci USA. 2009, 106, 4641-4646. (査読有)
- ⑤ Matsumura, H., Adachi, M., Sugiyama, S., Okada, S., Yamakami, M., Tamada, T., Hidaka, K., Hayashi, Y., Kimura, T., Kiso, Y., Kitatani, T., Maki, S., Yoshikawa, H. Y., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Kuroki, R., Mori, Y., Crystallization and preliminary neutron diffraction studies of HIV-1 protease cocrystallized with inhibitor KNI-272., Acta Crystallogr Sect 2008, F64, 1003-1006. (査読有)
- ⑥ Honjo, E., Tamada, T., Adachi, M., Kuroki, R., Meher, A., Blaber, M., Mutagenesis of the crystal contact of acidic fibroblast growth factor., J. Synchrotron Radiat. (2008) 15, 285-287. (査読有)
- ⑦ 黒木良太、玉田太郎、栗原和男、大原高志、安達基泰、中性子と放射光の相補的な利用による創薬標的タンパク質の立体構造解析、薬学雑誌、(2010) 130 巻、657-664. (査読有)
- ⑧ 安達基泰、黒木良太、中性子を用いた創薬標的蛋白質の立体構造解析、蛋白質核酸酵素、(2010) 55 巻、82-87. (査読有)
- ⑨ 玉田太郎、安達基泰 中性子回折による創薬標的蛋白質の構造解析、RADIOISOTOPES 誌 (査読有)、59, 299-308 (2010)
- ⑩ 安達基泰、黒木良太、HIV-1 プロテアーゼの中性子結晶構造解析、中性子科学会誌「波紋」(査読有)19, 214-217 (2009)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 安達基泰(代表者)、Structure of HIV-1 Protease in Complex with Potent Inhibitor KNI-272 Determined by Neutron Crystallography, The 5th

- International Peptide Symposium、2010. 12. 9.、京都国際会議場（京都市）
- ② 安達基泰(代表者)、放射光と中性子を相補的に用いたヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼ阻害剤の立体構造解析，酵素工学研究会第64回講演会、2010. 11. 19.、東京大学「山上会館」（東京都文京区）
 - ③ 安達基泰(代表者)、Structure of HIV-1 Protease in Complex with Inhibitor KNI-272 Determined by Neutron Crystallography, 11th China-Japan-Korean Joint Symposium on Enzyme Engineering[第11回日中韓酵素工学会議]、2010. 11. 7.、Green Land Hotel（中国成都）
 - ④ 安達基泰(代表者)、薬剤耐性 A17 型 HIV-1 プロテアーゼと阻害剤複合体の X 線結晶構造解析，第10回日本蛋白質科学会年会、2010. 6. 16.、札幌コンベンションセンター（札幌市）
 - ⑤ 安達基泰(代表者)、Structure of HIV-1 Protease in Complex with Inhibitor KNI-272 Determined by Neutron Crystallography, Joint Conference of the Asian Crystallographic Association & Chinese Crystallography Society、2009. 10. 24.、Jingyi Hotel（中国北京）
 - ⑥ 安達基泰(代表者)、HIV-1 プロテアーゼの中性子結晶構造解析，第9回日本蛋白質科学会年会、2009. 5. 22.、熊本全日空ホテルニュースカイ（熊本市）
 - ⑦ 安達基泰(代表者)、Neutron Crystallography for Investigation of Catalytic Mechanism of HIV-1 Protease, ATI International Forum 2009 “Protein Structure Determination and Applications”、2009. 3. 10.、原子力機構・テクノ交流館リコッティ（茨城県東海村）
 - ⑧ 安達基泰(代表者)、HIV-1 プロテアーゼと KNI-272 との複合体の中性子構造解析，International Symposium on Integrated Medicinal Science - On the basis of traditional medicine to biomolecular system -, 2008. 12. 13.、京都薬科大学愛学館（京都市）
 - ⑨ 安達基泰、HIV-1 プロテアーゼの中性子結晶構造解析，日本中性子科学会第8回年会、2008. 12. 2.、名古屋大学東山キャンパス 豊田講堂（名古屋市）

[図書] (計1件)

- ① 安達基泰、角南智子、黒木良太 第2章 酵素を見る。「医療関連酵素」pp. 34-37、酵素利用技術体系 小宮山眞 監修（エヌ・ティー・エス、2010年4月16日発行）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 基泰 (ADACHI MOTOYASU)

独立行政法人日本原子力研究会発機構・量子ビーム応用研究部門・研究職

研究者番号：60293958