

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03377

研究課題名(和文) 水素原子位置の観測による創薬標的タンパク質の量子論型基盤構築

研究課題名(英文) Development for quantum-theoretical approach by observing hydrogen atom positions in drug target proteins

研究代表者

安達 基泰 (Adachi, Motoyasu)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・上席研究員

研究者番号：60293958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,650,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、医薬品設計に関わる5つの酵素(ヒトジヒドロ葉酸還元酵素、ヒトモノアミン酸化酵素、ヒトシトクロムP450 2D6、アミノ酸ラセマーゼ、ヒトDOPA脱炭酸酵素)を対象とし、将来的には中性子結晶構造解析により水素原子を含む高精度な立体構造情報を得ることを目指して、タンパク質試料と結晶の作製に注力した。ヒトジヒドロ葉酸還元酵素については、標的である葉酸とNADPとの3者複合体のX線結晶構造解析に成功した。ヒトシトクロムP450 2D6については、抗うつ薬として用いられるパロキセチンとの相互作用を解析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、水素原子の原子核位置を決定できる中性子結晶構造解析によって、通常観測される位置とは異なった位置に水素原子を観測してきている。そのことは、タンパク質がその機能発揮に有利となる特殊な環境を局所的に作り出していることを示唆している。本研究では、創薬標的タンパク質の中でも補酵素をもったタンパク質を研究対象として展開した。研究の基礎となる試料調製での成果が中心であったが、将来、中性子結晶構造解析の実現によって、量子化学計算での技術開発に貢献し、補酵素の光物理過程の量子ダイナミクス解析の土台となり、タンパク質機能およびタンパク質と薬剤との分子間相互作用の理解を深化する量子論型研究につながる。

研究成果の概要(英文)：Five enzymes related to drug design (human dihydrofolate reductase, human monoamine oxidases, human cytochrome P450 2D6, amino acid racemase, and human DOPA decarboxylase) were targeted, and this study focused on preparing protein samples and crystals with the aim of obtaining highly accurate three-dimensional structural information including hydrogen atoms by neutron crystal structure analysis in the future. For human dihydrofolate reductase, X-ray crystal structure analysis of the target ternary complex with folic acid and NADP was succeeded. For human cytochrome P450 2D6, this study succeeded in analyzing the interaction with paroxetine, which is used as an antidepressant.

研究分野：量子生物学

キーワード：酵素 補酵素 結晶構造解析 中性子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の最大の特徴の一つは、非常に多くの原子が規則正しく整列し、ユニークな反応場を形成することである。近年、水素原子の原子核位置を決定できる中性子結晶構造解析を行うなかで、通常観測される位置とは異なった位置に水素原子を観測してきている[1]。そのことは、タンパク質がその機能発揮に有利となる特殊な環境を局所的に作り出していることを示唆している。本研究では、創薬標的タンパク質の中でも補酵素をもったタンパク質を研究対象として展開した。

2. 研究の目的

本研究課題では、タンパク質のもつ特殊な反応場の形成機構とその機能性の解明に向けて、タンパク質と薬剤との分子間相互作用の理解を深化することを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質のもつ特殊な反応場として、静電ポテンシャル面を明らかにするために、中性子結晶構造解析によって水素原子を含んだ立体構造を決定することが必要と考えている。それを実現するためには、質の高い大型の結晶の作製が必要であることから、試料調製系の確立に取り組んだ。結晶の評価は、放射光施設(KEK-PF)を利用して、X線結晶構造解析を行った。以下に、対象とした5つのタンパク質試料について、着目点と方法とともに成果を報告する。

4. 研究成果

(1) human Dihydrofolate Reductase (hDR)

hDRは、NADPHを電子供与体としてジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元する酵素である。テトラヒドロ葉酸は補酵素として核酸合成に寄与することから、DNA合成を阻害するメトトレキサートが、がん細胞を標的とした薬剤として使われている。とくに着目していることは、NADPHと阻害剤が3.2Åの距離で近接し、阻害剤の6員環がゆがむことで平面性がなくなっている点である。そこには、通常的位置からずれた水素原子が観測される可能性が高く、中性子結晶構造解析によって水素原子の位置を明らかにすることが、ユニークな反応場の理解につながる。さらに水素原子を含めた阻害剤の歪み構造と変異体解析から、酵素の機能性を追究できる。

まず、hDRの人工遺伝子を合成後、それをpET発現ベクターに導入し、大腸菌発現系を構築した。独自の可溶性HisTagを付加して大腸菌発現系を改良したところ、hDRの大量発現を確認した。培地はLB培地を、発現誘導は20°Cでオーバーナイトにて行った。hDRの精製は、NiカラムおよびStrepカラムを用いて行った。さらに、得られた発現系を用いて、hDRを高純度に精製に成功することができた。最終的に、付加したTagをエンテロキナーゼの切断によって除去し、結晶化用の試料を調製した。結晶化は、既存のスクリーニングキットを使い試みたところ、複数の結晶を取得することができた。放射光施設でそれぞれの結晶を評価したところ、多くが多結晶であったものの、解析可能な単結晶が見つかり、2.6Å分解能の回折データの収集とX線結晶構造解析を実施した。その結果、目的としている葉酸とNADPとの3者複合体であることを確認した(図1)。今後の取り組みの課題としては、大腸菌で大量発現しているものの、培地1Lあたり1mgの収量にも満たなかったことから、精製法の改良が必要である。また、多結晶の中には、分解能が1.4Åのものもあり、結晶の形も中性子結晶構造解析に適したものであったため、結晶化条件の検討も必要であると考えられる。

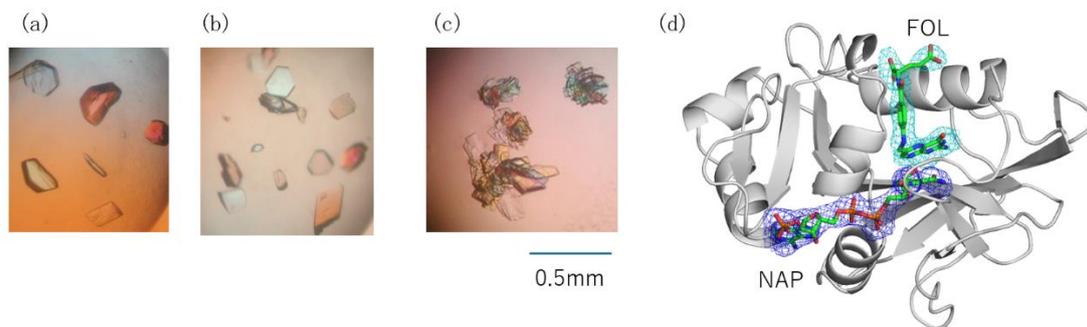


図1. 結晶の写真(a, b, c)とX線結晶構造解析で得られた立体構造のモデル(d)。(a)と(b)の結晶からは、それぞれ、1.4および1.5Å分解能の回折点が得られたが、多結晶のデータ収集には至らなかった。(c)の結晶より、2.6Å分解能の回折データを収集した。結晶化条件は、22%(v/v) PEG 3350, 5%(v/v) PEG 400, 0.1M 酢酸Na緩衝液(pH 5.5)、温度は20°C。(d)構造解析の結果、葉酸:FOLとニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸:NAPの明確な差フリーエマップ(2σレベル)を観測した。

(2) human Monoamine Oxidases (hMO)

hMO は、FAD を補酵素とし、アミン類の分解を促進する酵素である。hMO は、中枢神経系でドーパミン、アドレナリンやセロトニンなどの神経伝達物質の濃度調整を担っていることから、モノアミン酸化酵素阻害薬が、抗うつ薬や抗パーキンソン病の治療薬と成り得る。hMO に関しては、FDA/阻害剤/hMO の複合体の X 線結晶構造解析が報告されており、FAD と阻害剤が共有結合を形成するとともに、FAD のイソアロキサジン環が約 30 度の角度でゆがんでいることに着目している。

本試料は、すでに、独自の可溶性 HisTag を用いて大腸菌発現系を作製していたことから、hMO の調製系の改良をすすめた。しかしながら、本期間内に、hMO の大腸菌での生産量を実用化レベルまで上げることはできなかった。一方で、大腸菌の系のかわりに、ラン藻を用いた系を構築することを考え、ラン藻の発現ベクターを作製し、ラン藻での生産を計画したが、形質転換体の取得に至っていない。今後の課題としては、試料の大量調製系の確立をすすめる。まず、大腸菌およびラン藻の発現ベクターの改良が必要と考えられる。

(3) human Cytochrome P450 2D6 (2D6)

薬物代謝酵素 P450 は、補酵素としてヘムを含有する。2D6 は、3A4 ならびに 2C9 と合わせると医薬品代謝の 75% に関わると言われており、2D6 は重要な P450 薬物代謝酵素の一つとなっている。2D6 は、フルボキサミンなど多くの精神疾患の薬剤の代謝に関わっていることが知られているが、その中でも特に、2017 年に FDA で承認されたデューテトラベナジン(テトラベナジンの一部が重水素化)に着目した。一般に、C-D 結合は C-H 結合に比べ、重水素効果によって、数倍から 10 倍程度、反応速度が低いことが知られている。

試料調製は、大腸菌の発現系の構築から開始し、すでに作製例があった 2C9 の大腸菌発現系を参考に発現ベクターを構築した。既報の立体構造解析結果に従い、可溶性向上を目的に F-G loop に位置する 230-231 位に変異を導入した CYP2D6 変異型 (L230D/L231R) と CYP2D6 野生型の代謝活性の測定を行った。代謝活性を確認後、X 線結晶構造解析に向けた結晶化と等温滴定型カロリメトリー法により、CYP2D6 の基質との相互作用の解析を行った。結果として、X 線結晶構造解析可能な結晶の取得には至らなかったが、基質となるパロキセチンとの相互作用解析を ITC にて行うことができた(図 2)。得られたパラメータは、 $KD=7.05e-5$ (M)、 N (site) = 1.09 であり、 $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$, $-T\Delta S < 0$ の熱力学的プロファイルから、特異性の高い水素結合の形成と共に疎水性相互作用が結合に関与していると考えられた。今後の課題としては、大腸菌発現系における生産性の向上と結晶の取得である。

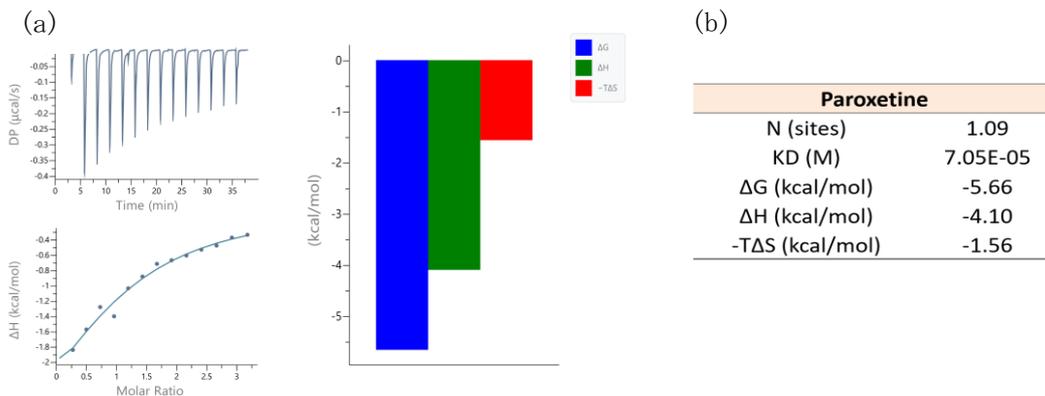


図 2. CYP2D6 と Paroxetine の ITC 測定による等温滴定曲線 (a) と熱力学的プロファイル (b)

(4) Amino acid Racemase (AR)

AR は、アミノ酸のラセミ化を触媒する酵素であり、食品の観点から注目度が高い酵素であるが、抗生物質の開発においても標的となるタンパク質である。今回は、これまでに対象としていたヒスチジンラセマーゼを乳酸菌由来のヒスチジンラセマーゼとは進化的に異なる *Weissella viridescens* DSM 20410 由来のアミノ酸ラセマーゼ (Wv-AAR) を対象とした。一次構造の解析から、Wv-AAR は、N 末端側にホロアシルキャリアプロテインシンターゼドメイン (Wv-AARN)、C 末端側に PLP 依存性アミノ酸ラセマーゼドメイン (Wv-AARC) を持つ新規な一次構造を有するアミノ酸ラセマーゼホモログであることがわかっている。そこで、Wv-AAR、Wv-AARN、Wv-AARC をそれぞれ大腸菌で発現した。発現系の構築には pET システムを用い、それぞれ His タグ融合タンパク質として発現し、精製した。分子質量は、ゲルろ過及び Multi-angle static light scattering (SEC-MALS) で測定したところ、Wv-AAR はホモ 12 量体と推定された。このような巨大な四次構造を持つ AlaR の報告例はなく、本酵素が最初の例である。アラニンラセマーゼ 活性については、D-または L-アラニンを基質として用い、*Bacillus stearothermophilus* 由来 L-Alanine dehydrogenase または Human D-amino acid oxidase を使用し測定した。Wv-AAR 及び Wv-AARc は、AlaR 活性を示すことが明らかとなった。今後の課題としては、X 線結晶構造解析による立体構造を明らかにすることである。

(5) human DOPA decarboxylase (DDC)

DDC は、神経伝達物質であるドーパミンとセロトニンの合成を担う酵素であり、上述の AR と同様に PLP を補酵素とする。DDC は、パーキンソン病や高血圧病などの広い疾患にかかる創薬標的タンパク質となっている。DDC の阻害剤は、補酵素である PLP とヒドラゾン結合による共有結合を形成している。

まず、DDC の人工遺伝子を合成後、それを pET 発現ベクターに導入し、大腸菌発現系を構築した。独自の可溶性 HisTag を付加して大腸菌発現系を改良したところ、hD の発現が大腸菌内でもっとも主要なものであることを確認した。培地は LB 培地を、発現誘導は 15°C でオーバーナイトにて行った。hD の精製は、Ni カラム、Strep カラム、陰イオン交換カラムを用いて行った。最終的に、1L の培養液から、約 5mg の試料を精製し、既存のスクリーニングキットを使い結晶化を試みたが、結晶の取得には至らなかった。DDC においても、試料の合成量を増強するために、昨年度作製したラン藻の発現ベクターを使って、ラン藻の形質転換を試みたが、コロニーの取得に至っていない。引き続き、ラン藻の形質転換の条件検討を継続する。

<引用文献>

[1] Shibasaki C, Arai S, Shimizu R, Saeki M, Kinoshita T, Ostermann A, Schrader ET, Kurosaki Y, Sunami T, Kuroki R, Adachi M, Hydration structures of the human protein kinase CK2 α clarified by joint neutron and X-ray crystallography. *J Mol Biol* 430, 5094-5104 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shibazaki Chie, Shimizu Rumi, Kagotani Yuji, Andreas Ostermann, Tobias E. Schrader, Adachi Motoyasu	4. 巻 2020
2. 論文標題 Neutron diffraction experiments of green fluorescent protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annual Reports / MLZ - Heinz Maier-Leibnitz Zentrum	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 米谷 佳晃, 安達 基泰	4. 巻 23
2. 論文標題 水のアクセスと蛋白質-リガンド解離の関係について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 分子シミュレーション学会会誌	6. 最初と最後の頁 182-187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 安達 基泰	4. 巻 779
2. 論文標題 タンパク質の分子論的研究はいずこへ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Isotope News	6. 最初と最後の頁 7-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 籠谷勇児、安達基泰	4. 巻 39(464)
2. 論文標題 光捕集タンパク質の2次元電子分光	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OPTRONICS	6. 最初と最後の頁 84-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井川 佑美 , 若松 三友紀 , 高橋 知里 , 安達 基泰 , 前川 京子
2. 発表標題 等温滴定型カロリメトリーを用いた薬物代謝酵素P450と薬物との相互作用測定法の構築
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島 尚哉 , 安達 基泰 , 加藤 志郎 , 老川 典夫
2. 発表標題 乳酸菌Weissella viridescens JCM1174の新規2ドメイン型アミノ酸ラセマーゼの大腸菌での発現系の構築と酵素科学的特性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Adachi Motoyasu
2. 発表標題 Recent Activity of D-lab in MLF, J-PARC
3. 学会等名 DEUNET Virtual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達 基泰
2. 発表標題 タンパク質の中性子結晶構造解析と重水素
3. 学会等名 重水素化学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島 尚哉、安達 基泰、加藤 志郎、山中 一也、老川 典夫
2. 発表標題 乳酸菌Weissella viridescens JCM1174の新規2ドメイン型アミノ酸ラセマーゼの発見と基礎的性質
3. 学会等名 第16回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motoyasu Adachi
2. 発表標題 Recent Activity of D-lab in MLF, J-PARC
3. 学会等名 DEUNET Virtual meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	岡島 俊英 (Okajima Toshihide) (10247968)	大阪大学・産業科学研究所・准教授 (14401)	
研究分担者	高橋 知里 (Takahashi Chisato) (70833680)	同志社女子大学・薬学部・特任助手 (34311)	
研究分担者	老川 典夫 (Oikawa Tadao) (80233005)	関西大学・化学生命工学部・教授 (34416)	

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
---------	---------