

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390010

研究課題名（和文）中性子回折法による創薬標的タンパク質のリガンド認識機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Protein-Ligand Interactions Using Neutron Diffraction

研究代表者

黒木 良太（KUROKI RYOTA）

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・研究主席

研究者番号：30391246

研究成果の概要（和文）：中性子結晶回折法を用いて、リガンドの存在下・非存在下における創薬標的タンパク質の立体構造解析を行った。その結果、創薬標的タンパク質と低分子リガンドの相互作用に深く関与する水素原子を含む立体構造的な相補性、およびリガンド結合に伴って排除される水和水や無機イオンの構造的な特徴を得ることができた。これらの知見はより親和性の高い医薬品候補分子の設計に重要な知見を与える。

研究成果の概要（英文）：Tertiary structures including hydrogen and hydration structural information for the liganded and unliganded forms of a drug target protein were determined using neutron diffraction. Structural compatibilities between the drug-target protein and potent ligand, and the information for ionization state of catalytic residues and the hydration structure were clarified. This structural information is important to design potent inhibitors as drug candidates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：タンパク質・中性子回折・創薬標的・水和水・阻害剤・分子設計

### 1. 研究開始当初の背景

中性子を用いたタンパク質の立体構造解析により、これまで観測が難しかったタンパク質の水素原子の存在と位置を正確に求めることができる。しかし中性子ビームの強度が低いことから、実際の解析には大型の結晶試料が必要であり、利用にも多くの制限があった。近年実現された中性子とX線回折データの同時利用（N-X立体構造解析）や、完全重水素化試料の利用、さらには茨城県東海村

の日本原子力研究開発機構施設内に建設された大強度陽子加速器施設（J-PARC）の稼動によって、中性子利用に伴う困難は徐々に克服されつつあり、中性子ビームを利用する研究課題設定が可能となった。

### 2. 研究の目的

創薬標的タンパク質と低分子リガンドとの相互作用においては、分子間の相補性（van der Waals 接触や静電相互作用）とともに、

タンパク質へのリガンド結合に伴う脱水和や無機イオンの脱離に伴うエントロピーの変化が大きく寄与している。創薬標的タンパク質低分子リガンドの相互作用の相補性やの水和状態の変化を、中性子を用いた結晶回折法によって詳しく解析し、さらにリガンド結合に伴う熱力学的変化に関する知見を加えることにより、分子間相互作用を総合的に評価する。

本研究による分子間相互作用に関する原理原則の解明によって、合理的な薬物設計の基盤となる知見を取得することを目的とする。

### 3. 研究の方法

中性子による全原子構造解析の対象として、ガン治療の標的となる Ser/Thr キナーゼや薬剤耐性ヒト免疫不全ウイルス由来プロテアーゼなどを遺伝子組換え法によって発現・調製し、大型の結晶を得る。そして、それぞれの中性子構造解析をリガンドあり(複合体)・なし(水和状態)で行うことによって、創薬標的タンパク質-低分子リガンド相互作用を決定する。さらに滴定型熱量計や表面プラズモン共鳴分析等の熱力学的手法を使って、低分子結合時の熱力学変化の解析を行い、既に中性子解析によって得た全原子構造からの知見を加え、創薬標的タンパク質に結合する有機低分子との相互作用を総合的に理解する。

### 4. 研究成果

(1)創薬標的タンパク質の中性子解析を実現するための、タンパク質物性の改良

解析対象となる創薬標的タンパク質に必要な最小限のアミノ酸置換を導入することによって中性子構造解析に適した結晶試料の作製を試みた。その一つはタンパク質ブッセ員改良である。長期間の結晶化実験において試料の化学的な安定性を高めるため、化学的に不安定な配列の除去を行った。この試料を用いることにより、解析対象となるタンパク質結晶の回折分解能の向上に成功した。

また、結晶化条件において複数の結晶型を与える創薬標的タンパク質において、結晶内の分子接触部位に関わっているアミノ酸へ変異を導入することにより、中性子解析に有利な結晶格子体積の小さい結晶系への誘導を実現した。

これらの手法によって得たタンパク質試料の結晶大型化を行うため、大型結晶を得ることに特化した結晶化条件の検討を行った。その結果、大型結晶の作製には、比較的高いタンパク質濃度での結晶化が有効であり、沈殿剤濃度を低く保つとともに結晶核形成の抑制効果を持つ添加剤の利用が効果的であることがわかった。ここで得た知見を用いて、

さらに効果的なスクリーニング系の構築を実施したい。

### (2) 結晶試料冷却条件の検討

試料冷却による結晶内分子の温度因子を低下させることにより、高い分解能の中性子回折データの取得が可能となる。そこで、高分解能中性子回折データの取得を目指して、大型結晶(体積 $>1\text{mm}^3$ )を再現性良く冷却する条件(試料冷却方法や添加剤)を検討した。検討の結果、今回用いた大型結晶試料は得られた条件でフラッシュ冷却法による冷却が可能であった。

### (3) 創薬標的タンパク質と阻害剤複合体の中性子構造解析

こうして取得した創薬標的タンパク質の阻害剤複合体の大型結晶を用いて、X線および中性子回折データを取得した。解析対象としたのは、膵臓エラスターゼと $\beta$ ラクタマーゼである。その結果、創薬標的タンパク質の触媒基が活性部位という特殊な環境下で異常解離状態(異常 pKa)を示すことや、活性部位において水和水と同定されていた一部の水分子が、無機イオンや水酸化物イオン(OH<sup>-</sup>)として存在している可能性があることがわかった。現在、結合する分子種を同定するため、より分解能の高い精密な解析を目指している。

### (4) 創薬標的タンパク質と阻害剤の相互作用解析

構造的な知見の取得だけでなく、創薬標的タンパク質と阻害剤の相互作用を速度論的(表面プラズモン共鳴法)および熱力学的な手法(等温滴定型カロリメトリー)で解析した。化学合成された阻害剤の一部は、極めて高い親和性を示したので、触媒残基や基質結合部位に変異導入が生じた薬剤耐性変異型タンパク質を用いたり、別途、低親和性のリガンドを競合させることによって、リガンドの親和性を正確に評価した。

以上の結果から、リガンド結合部位においては、立体構造的な相補性だけでなく、リガンド結合部位における水和水や無機イオンの解離に伴うエントロピーの増大がリガンドの親和性に大きく影響を及ぼすことがわかった。中性子解析で明らかになる水和水や無機イオンの特徴は、このエントロピー効果を推定する重要な手がかりになると思われる。

### 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9件)

- ① Yamada T, Kurihara K, Ohnishi Y, Tamada T, Tomoyori K, Masumi K, Tanaka I, Kuroki R, Niimura N., Neutron and X-ray crystallographic analysis of the human  $\alpha$ -thrombin-bivalirudin complex at pD 5.0: Protonation states and hydration structure of the enzyme-product complex. *Biochim Biophys Acta*. 2013  
DOI:pii:S1570-9639(13)00211-2.  
10.1016/
- ② Nakaniwa T, Fukada H, Inoue T, Gouda M, Nakai R, Kirii Y, Adachi M, Tamada T, Segawa S, Kuroki R, Tada T, Kinoshita T., Seven cysteine-deficient mutants depict the interplay between thermal and chemical stabilities of individual cysteine residues in mitogen-activated protein kinase c-Jun N-terminal kinase 1., *Biochemistry*, 51, 2012, 8410-8421.  
DOI: 10.1021/bi300918w
- ③ Shoyama Y, Tamada T, Kurihara K, Takeuchi A, Taura F, Arai S, Blaber M, Shoyama Y, Morimoto S, Kuroki R. Structure and function of delta-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase, the enzyme controlling the psychoactivity of *Cannabis sativa*. *Journal of Molecular Biology*, 423, 2012, 96-105.  
DOI: 10.1016/j.jmb.2012.06.030
- ④ Okazaki N, Tamada T, Feese MD, Kato M, Miura Y, Komeda T, Kobayashi K, Kondo K, Blaber M, Kuroki R, Substrate recognition mechanism of a glycosyltrehalose trehalohydrolase from *Sulfolobus solfataricus* KML. *Protein Science*, 287, 2012, 14023-14039.  
DOI: 10.1002/pro.2039
- ⑤ Arai S, Yonezawa Y, Okazaki N, Matsumoto F, Tamada T, Tokunaga H, Ishibashi M, Blaber M, Tokunaga M, Kuroki R, A structural mechanism for dimeric to tetrameric oligomer conversion in *Halomonas* sp. nucleoside diphosphate kinase, *Protein Science*, 287, 2012, 498-510,  
DOI: 10.1002/pro.2032
- ⑥ Okazaki N, Adachi M, Tamada T, Kurihara K, Ooga T, Kamiya N, Kuramitsu S, Kuroki R, Crystallization and preliminary neutron diffraction studies of ADP-ribose pyrophosphatase-I from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun*, 68, 201, 2011, 49-52,  
DOI: 10.1107/S1744309111044551
- ⑦ 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. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66, 2010, 1126-1130.  
DOI: 10.1107/S0907444910034967.
- ⑧ Kawamura K, Yamada T, Kurihara K, Tamada T, Kuroki R, Tanaka I, Takahashi H, Niimura N., X-ray and neutron protein crystallographic analysis of the trypsin-BPTI complex., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67, 2010, 140-148.  
DOI: 10.1107/S0907444910053382
- ⑨ 黒木 良太、他4名、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*、130, 2010, 1126-1130.
- [学会発表] (計7件)
- ① 黒木 良太、中性子利用による新しい蛋白質科学研究、第12回蛋白質科学会ワークショップ、中性子を用いたタンパク質科学研究の新展開、2012年6月21日、名古屋国際会議場(名古屋市)
- ② Motoyasu Adachi and Ryota Kuroki, The 12th Japan China Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012年5月29日、金沢全日空ホテル(金沢市)
- ③ 黒木 良太、生体物質の構造解析、中性子利用技術移転推進プログラム・シンポジウム、2012年2月9日、日本科学未来館(東京都)
- ④ 黒木 良太 Peptidic inhibitor recognition of the drug target proteins investigated by neutron diffraction 第14回ペプチドフォーラム、2011年12月17日、鹿児島大学理学部1号館2階大会議室(鹿児島市)
- ⑤ 黒木 良太、創薬標的タンパク質の立体構造解析、日本化学会関東支部講演会「創薬を指向したタンパク質科学」、2011年10月16日、日本化学会7階ホール(東京都)
- ⑥ 新井 栄揮、黒木 良太、放射能汚染と蛋白質科学-汚染を除去する蛋白質の創製は可能か? 第11回日本蛋白質科学会年会、2011年6月9日、ホテル阪急エキスポパーク(吹田市)
- ⑦ 黒木 良太、生体高分子専用高分解能中性子結晶回折計~装置のコンセプト~装置を使った研究の展開、2010年12月11日、東北大学多元物質科学研究所(仙台市)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：生産性および不凍活性を向上させた改変型不凍タンパク質とその製造方法

発明者：西宮 佳志 外5名

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所および独立行政法人日本原子力研究開発機構

種類：特許

番号：特許出願2010-105583

出願年月日：平成22年4月30日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：生体分子の大型結晶育成のための方法および装置発明者：新井 栄揮、黒木良太  
権利者：独立行政法人日本原子力研究開発機構

種類：特許

番号：特許第5234654号

登録年月日：平成25年4月5日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 良太 (KUROKI RYOTA)

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・研究主席

研究者番号：30391246

(2) 研究分担者

城所 俊一 (KIDOKORO SHUN-ICH)

長岡技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：80195320

(H23→H24：連携研究者)

玉田 太郎 (TAMADA TARO)

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・研究主幹

研究者番号：50391248

(H22→H23：連携研究者)

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・研究副主幹

研究者番号：60293958

(H22→H23：連携研究者)

大原 高志 (OHARA TAKASHI)

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・研究副主幹

研究者番号：60391249

(H22→H23：連携研究者)

栗原 和男 (KURIHARA KAZUO)

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・研究副主幹

研究者番号：50354890

(H22→H23：連携研究者)

(3) 連携研究者

城所 俊一 (KIDOKORO SHUN-ICH)

長岡技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：80195320

(H24年度)

玉田 太郎 (TAMADA TARO)

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・研究主幹

研究者番号：50391248

(H23年度)

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・研究副主幹

研究者番号：60293958

(H23年度)

栗原 和男 (KURIHARA KAZUO)

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・研究副主幹

研究者番号：50354890

(H23年度)