

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790052

研究課題名（和文） ヒト α 1-酸性糖蛋白質の薬物結合機構の解明

研究課題名（英文） Structural basis for the drug binding of human alpha1-acid glycoprotein

研究代表者

中村 照也 (NAKAMURA TERUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：40433015

研究成果の概要（和文）：ヒト α 1-酸性糖蛋白質（AGP）は、体内に投与された薬物と結合してその体内動態に影響を与える。AGP には薬物結合特異性の異なる 2 つのバリエーションが存在する（A 体および F1*S 体）。本研究では、A 体と 2 種類の三環系薬物との複合体結晶構造を決定し、これら薬物の結合様式を明らかにした。さらに、構造から明らかになった薬物選択性に関わるアミノ酸残基の変異体を調製し、これらの残基が薬物結合特異性に与える影響を評価した。

研究成果の概要（英文）：Human α 1-acid glycoprotein binds to a variety of drugs and thereby regulates their tissue distribution. AGP exists as a mixture of two genetic variants, the A and F1*S variants, which bind drugs with different selectivities. In this study, we determined crystal structures of the A variant in complex with two types of tricyclic drugs, and revealed their binding modes in the pocket of the A variant. Also, we mutated the amino acid residues which are involved in drug binding, and examined the binding properties of the mutants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：薬物結合蛋白質，構造活性相関，X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ヒト α ₁-酸性糖蛋白質（AGP）は、塩基性薬物やステロイドホルモンなどと強く結合する血清蛋白質であり、血清アルブミンほど血中に多量に存在しないものの、生体反応の急性期（ストレス，外傷，炎症，腫瘍等）に血中および組織中で著しい増加が見られることから、炎症・疾患時に投与された薬物の体内動態，薬理発現を左右する重要な因子である。実際，AGP は臨床で用いられている多くの薬物と結合することが知られており，

近年の代表的な分子標的薬も AGP と強く結合して，その薬物動態に大きな影響をうけることが報告されている。この様に，AGP は炎症・疾患時の薬物結合の主要因子の 1 つであり，AGP の薬物結合の研究は，薬物の体内動態，薬理発現を考える上で重要である。

AGP には，2 つのバリエーション（F1*S 体と A 体）が存在し，これらのアミノ酸配列は 88% という高い相同性を示すが，F1*S 体と A 体との薬物に対する結合特異性は大きく異なり，薬物結合の選択性がみられる。その一例とし

て、A 体は、主に三環系抗うつ薬としての共通骨格を持つアミトリプチリン、イミプラミンなどに対して高い親和性を有する。一方、F1*S 体は、抗血液凝固薬ワルファリンや血管拡張薬ジピリダモール、最近の知見として分子標的抗がん薬イマチニブなどに対して高い親和性を示すことがわかっているが、これらの構造には類似性が見られず、非常に幅広い薬物結合性を有する。さらに、生体内では F1*S 体と A 体が約 2:1 の割合で存在するが、この割合には、個体差および急性期における著しい変化が認められている。

この様に、急性期の発現量の変動に加え、バリエーション間での薬物結合選択性がみられる AGP の生体内での薬物結合を理解するには、バリエーションそれぞれの薬物結合機構を解明することが必要不可欠である。AGP の薬物結合様式や結合部位に関する研究は、アミノ酸化学修飾法や光アフィニティラベル法などにより行われてきたが、AGP の薬物結合の詳細は未だ不明であった。

我々は、AGP の薬物結合様式を原子レベルで解明することを目的に、AGP の構造生物学研究を立ちあげた。そして、A 体について、単独および 3 種の薬物（アミトリプチリン、クロロプロマジン、ジソピラミド）との複合体の構造解析に成功し、A 体による、類似骨格を持つこれら薬物の認識機構を初めて明らかにした。Schönfeld らにより、もう 1 つのバリエーションである F1*S 体の単独の結晶構造が決定されていたが、A 体と F1*S 体の薬物結合ポケットの構造は大きく異なり、我々が明らかにした A 体と薬物との複合体の構造情報を合わせても、F1*S 体の薬物結合を予測することは不可能であった。これらの研究経過から、AGP の薬物結合機構の詳細を理解するには、A 体および F1*S 体の両バリエーションの薬物複合体のさらなる構造学的知見を積み上げることが必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、X 線結晶構造解析による AGP の 2 つのバリエーションと様々な薬物との複合体構造の決定に加え、薬物結合に重要なアミノ酸残基変異体を用いて薬物結合特性の変化を調べることで、AGP の薬物の結合様式と親

和性の相関を理解することを目的とする。

A 体については、既に構造を決定しているアミトリプチリンやクロロプロマジンと類似した三環系骨格を持った薬物との複合体構造を決定し、これらの薬物結合の共通性および多様性の構造学的知見を得る。F1*S 体の構造解析では、体内動態を理解する上で重要な薬物の結合様式を明らかにする。

AGP の薬物認識機構から、A 体と F1*S 体の薬物結合選択性に関わるアミノ酸残基を明らかにする。これらアミノ酸残基を A 体と F1*S 体間でスイッチさせた変異体を調製して、薬物結合特性の変化を調べることにより、AGP の薬物結合、特にバリエーション間の薬物結合選択性を理解する。これらの知見を集積することは、その他の AGP 結合薬物の結合様式の予測のみならず、化学構造式からの AGP への結合予測に役立つと考えており、本研究を AGP 結合薬物の構造活性相関の研究へと展開することを目指す。

3. 研究の方法

(1) AGP-薬物複合体の X 線結晶構造解析

AGP の A 体および F1*S 体は、それぞれ大腸菌を用いて糖鎖非結合型として発現させ、精製を行う。得られた A 体および F1*S 体の薬物複合体の結晶化は、これまで結晶が得られている条件で行う。また、従来の条件で結晶が得られない場合は、微量結晶化装置を用いて新たな結晶化条件を探索する。X 線回折実験は、大型放射光施設のビームラインで行い、高分解能の回折強度データを収集する。構造解析は、既に決定している A 体および F1*S 体の構造をサーチモデルとした分子置換法により行う。

(2) AGP 変異体を用いた薬物結合の評価

決定した薬物複合体の構造から、A 体および F1*S 体の薬物選択性に関わるアミノ酸残基を明らかにする。そして、それら残基を A 体と F1*S 体間でスイッチさせた変異体を作製し、野生型 AGP の精製法を用いて大量調製を行う。AGP 変異体の薬物結合は、誘起 CD スペクトル測定により評価する。

4. 研究成果

(1) 糖鎖非結合型 A 体および F1*S 体は、大腸菌を用いた系で発現させ、種々のカラムにより、結晶化実験に適した純度で精製した。A 体と薬物複合体の結晶化は、従来の結晶化条件で行った。この条件で結晶が得られなかったものについては、微量結晶化装置を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。最終的に、A 体とイミプラミンの複合体、A 体とチオリダジンの複合体の結晶を得て(図 1, 2)、大型放射光施設において X 線回折強度データを収集した。

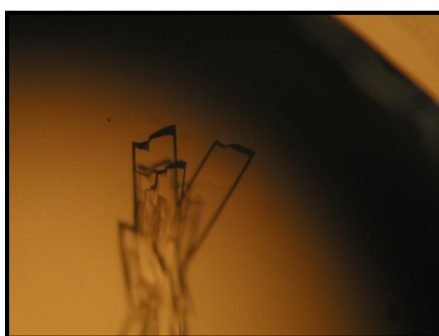


図 1 A 体とイミプラミン複合体結晶

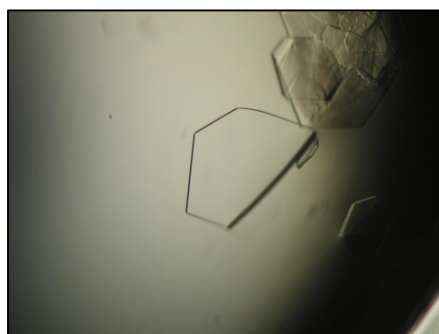


図 2 A 体とチオリダジン複合体結晶

構造解析は、既に決定している A 体の構造をサーチモデルとして PHASER を用いた分子置換法により行った。構造の精密化には、CNS と PHENIX を用いた。A 体とイミプラミンの複合体は、1.49 Å 分解能 ($R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}} = 0.159/0.199$) で、A 体とチオリダジンの複合体は、1.58 Å 分解能 ($R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}} = 0.166/0.180$) で構造の精密化を完了した。構造解析の結果、イミプラミンの芳香環部分は、これまでの薬物と同様、A 体の既存の結合部位で認識されていた。一方、チオリダジンの芳香環部分は、この既存の結合部位を含むさらに広範な領域で認識され、A 体による芳香環部位の認識に多様性が見られた。これ

らの結果から、A 体は、これまで考えていたよりも広い結合領域で、その他の三環系薬物の芳香環部位を認識する可能性が示唆された。これらの立体構造情報をあわせることで、A 体および F1*S 体の薬物結合ポケット内の 4 つのアミノ酸残基の違いが、両バリエーションの薬物結合特異性に寄与していることを明らかにした。

F1*S 体については、三環系薬物および F1*S 体との強い結合が知られる分子標的薬を用いて結晶化条件のスクリーニングを進めている。

(2) 上述した 4 つの残基を A 体および F1*S 体間で交換した変異体を調製し (M1 : 1 残基置換 ~ M4 : 4 残基置換)、薬物結合性を誘起 CD スペクトル測定により評価した。その結果、A 体 M1 および F1*S 体 M1 では、薬物結合にほとんど変化が見られなかったため、1 残基のみでは薬物結合特異性に寄与しないことが考えられた。そこで、A 体 M4 および F1*S 体 M4 を調製したが、CD 測定から両変異体とも正しい立体構造をとっていないことが明らかになったため、現在、A 体および F1*S 体の M2, M3 変異体を用いて薬物結合を評価し、バリエーション間の特異性を明らかにしようとしている。

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 5 件)

① 中村照也, 山縣ゆり子, Wei Yang, 時分割タンパク質結晶学による DNA ポリメラーゼ η のヌクレオチド転移反応の可視化, 日本結晶学会誌, 55, 42-46 (2013), 査読有

② Koga, Y., Inazato, M., Nakamura, T., Hashikawa, C., Chirifu, M., Michi, A., Yamashita, T., Toma, S., Kuniyasu, A., Ikemizu, S., Nakabeppu, Y., Yamagata, Y. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human MTH1 with a homogeneous N-terminus. *Acta Cryst.* F69, 45-48 (2013), 査読有, 10.1107/S1744309112048002

③ Nakamura, T., Zhao, Y., Yamagata, Y., Hua, Y. J., Yang, W. Watching DNA polymerase η make a phosphodiester bond. *Nature* 487, 196-201 (2012), 査読有, 10.1038/nature11181

④ Arimori, T., Tamaoki, H., Nakamura, T., Kamiya, H., Ikemizu, S., Takagi, Y., Ishibashi, T., Harashima, H., Sekiguchi, M., Yamagata, Y. Diverse substrate recognition and hydrolysis mechanisms of human NUDT5. *Nucleic Acids Res.*, 39, 8972-8983 (2011), 査読有, 10.1093/nar/gkr575

⑤ Nishi, K., Ono, T., Nakamura, T., Fukunaga, N., Izumi, M., Watanabe, H., Suenaga, A., Maruyama, T., Yamagata, Y., Curry, S., Otagiri, M. Structural insights into differences in drug binding selectivity between two forms of human α 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms. *J. Biol. Chem.*, 286, 14427-34 (2011), 査読有, 10.1074/jbc.M110.208926

[学会発表] (計9件)

① 中村照也, DNA ポリメラーゼ η によるヌクレオチド転移反応の可視化, 日本薬学会第133年会, 2013.3.29, パシフィコ横浜 (横浜)

② 中村照也, 時分割 X 線結晶構造解析による DNA ポリメラーゼ η のヌクレオチド転移反応過程の追跡, 回折構造生物 第169委員会第42回研究会, 2013.2.21, ゆうぼうと (東京)

③ 中村照也, MutT による 8-oxo-dGTP 加水分解反応機構の解明, 第29回日本薬学会九州支部大会, 2012.12.8, 熊本大学薬学部 (熊本)

④ Teruya Nakamura, Visualization of oxidized nucleotide processing by *E. coli*

MutT, Zing conferences, Nucleic Acids Conference 2012, 2012.11.17, The Occidental Grand Xcaret (Mexico)

⑤ 中村照也, DNA ポリメラーゼ η によるヌクレオチド転移反応の時分割 X 結晶構造解析, 平成24年度日本結晶学会年会, 2012.10.25, 東北大学 (仙台)

⑥ 中村照也, ヒト DNA polymerase η によるヌクレオチド転移反応機構の解明, 遺伝研究集会 「遺伝情報の安定性を支える分子メカニズム」2012.10.3, 国立遺伝学研究所 (三島)

⑦ Teruya Nakamura, Watching DNA polymerase η make a phosphodiester bond, 第50回日本生物物理学会年会, 2012.9.23, 名古屋大学 (名古屋)

⑧ 中村照也, ヒト α 1-酸性糖タンパク質による薬物結合の構造学的基盤, 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012.6.21, 名古屋国際会議場 (名古屋)

⑨ Teruya Nakamura, Visualization of reaction processes by nucleic acids enzymes, DNA Repair Mini-Symposium Featuring Eminent Japanese Scientists at NIH, 2012.4.10, National Institutes of Health (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 照也 (NAKAMURA TERUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 40433015