

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860022

研究課題名(和文)中性子回折による水和構造理解と新規FPPS阻害剤の開発

研究課題名(英文) Neutron Diffraction Analysis of Human Farnesyl Pyrophosphate Synthase in Complex with Bisphosphonate

研究代表者

横山 武司 (Yokoyama, Takeshi)

富山大学・医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50524162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ファルネシルニリン酸合成酵素(FPPS)とリセドロネート(RIS)複合体の中性子結晶構造解析を行い、FPPSに結合した状態でのRISのプロトン化および水和状態を決定した。構造解析の結果、RISのリン酸基は完全に脱プロトン化しており、FPPSに結合した状態ではそのpKaが異常に低下していることがわかった。また、リガンド結合に伴う余分な負電荷はE93やD264のプロトン化によって相殺されていることが示唆された。中性子結晶構造解析によって得られた情報はFPPS阻害薬の発展に役に立つだろう。

研究成果の概要(英文)：Neutron crystal structure of human farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) in complex with risedronate (RIS) was determined, and the protonation state and hydration of RIS were elucidated. The structural analysis revealed that the phosphate groups of RIS were fully deprotonated with the abnormally decreased pKa. In addition, it was suggested that the roles of E93 and D264 consisted of canceling the extra negative charges upon the binding of ligands. This information would be helpful for the development of non-bisphosphonate FPPS inhibitors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：構造生物学 中性子結晶構造解析 医薬品化学 構造活性相関 プロトン化状態 pH リン酸基 ビスホスホネート

### 1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート(BP)は骨粗鬆症薬剤として広く使われている。BPはP-C-P骨格を持ち、骨に吸着する。破骨細胞が骨を溶かして細胞内に取り込むと同時にBPも取り込まれる。細胞内に取り込まれたBPはテルペンの生合成に関わるファルネシル二リン酸合成酵素(FPPS)の活性を阻害し、破骨細胞の機能を低下させ、骨の溶解を抑制する。FPPSは細胞の生命機能維持に重要なタンパク質であり、骨粗鬆症薬だけでなく、抗寄生虫病薬や抗がん剤の標的タンパク質としても注目を集め研究が盛んに行われている。しかし、BPはP-C-P骨格を持つため細胞膜を通過せず、BPをこれらの疾病に転用することは難しい。P-C-P骨格を持たない、BPではないFPPS阻害剤の開発が抗寄生虫病薬や抗がん剤開発に繋がる。しかし、通常のインシリコ創薬での新規阻害剤の開発は難しい。

### 2. 研究の目的

中性子結晶構造解析を用いてリガンド結合部位の物理化学的特徴とFPPS-BP相互作用に関わる水分子の役割を明確に決定する。FPPSとの結合に重要な水分子とその水素結合を論理的に導き、必要な水分子だけを考慮したインシリコ創薬によってBPではない新規FPPS阻害薬の創製を目指す。

### 3. 研究の方法

中性子結晶構造解析には大きな結晶を作成する必要がある。その結晶化方法にはマクロシーディング法を適用した。まず、400  $\mu$ Lのタンパク質溶液 [17 mg/mL FPPS, 5 mM  $MgCl_2$ , 2 mM RIS, 0.5 M NaCl, 15 mM 酢酸-D4, 35 mM 酢酸ナトリウム-D3 in  $H_2O$ ]をリザーバー溶液 [1 M NaCl, 30 mM 酢酸-D4, 70 mM 酢酸ナトリウム-D3 in  $H_2O$ ]に対してシリコングリスで密閉した容器内で平衡化することで、親結晶を得た。得られた結晶を60  $\mu$ Lのタンパク質溶液 [12 mg/mL FPPS, 3.3 mM  $MgCl_2$ , 1.2 mM RIS, 0.27 M NaCl, 13.3 mM 酢酸-D4, 53.3 mM 酢酸ナトリウム-D3 in  $D_2O$ ]に浸漬し、1 mLのリザーバー溶液 [0.4 M NaCl, 20 mM 酢酸-D4, 80 mM 酢酸ナトリウム-D3 in  $D_2O$ ]に対して平衡化することで、親結晶を成長させることができた。このマクロシーディングは結晶が十分な大きさになるまで繰り返し行い、最終的に、2.8 $\times$ 2.5 $\times$ 1.5 mm程度まで成長した(図1)。さらにFPPSの基質であるイソペンテニル二リン酸(IPP)複合体結晶を得るため、マクロシーディング法によって得られたFPPS-RIS複合体大型結晶を[1.5 M NaCl, 20 mM 酢酸-D4, 80 mM 酢酸ナトリウム-D3, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM IPP in  $D_2O$ ]に2ヶ月間浸漬することで、FPPS-RIS-IPP複合体結晶得られた。

FPPS-RIS結晶の中性子回折データはドイ

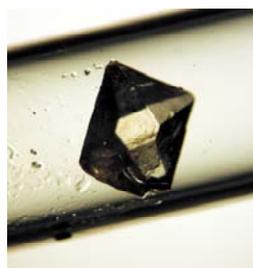


図1. キャピラリーに封入したFPPS-RIS複合体の大型結晶の写真。長い辺がおよそ2.8 mm程度。

ツの研究用原子炉FRMIIに建設されたBIODIFFで収集した。FPPS-RIS-IPP複合体結晶の中性子回折測定はJ-PARCに建設されたiBIXで行い、キレイな回折点が観測された(図2)。どちらも最高分解能が2.4 Åであり、構造解析するに十分なデータが得られた(表1)。

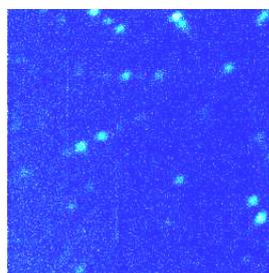


図2. iBIXで測定したFPPS-RIS-IPPの回折像をTOF方向に投影したもの。いわゆるラウエパターンが明瞭に観測された。

表1. 結晶データ

	FPPS-RIS	FPPS-RIS-IPP
線源	FRMII-BIODIFF	J-PARC-iBIX
結晶データ		
空間群	$P4_12_12$	$P4_12_12$
分解能(Å)	2.4	2.4
完全性(%)	98.4	98.1
$R_{\text{pim}}$ (%)	5.8	14.3
冗長性	3.8	2.8
精密化データ		
$R, R_{\text{free}}$ (%)	18.6, 22.9	26, 28.7

### 4. 研究成果

水素原子を含めた構造精密化の結果、最終的なFPPS-RISのR因子は18.6%となり、精度の高いモデルを構築することができた。オミット差フーリエ図によって、RISの側鎖であるピリジン環はプロトン化されていることがわかった(図3)。これにより、T201、Q240、D240、D243、RIS、水分子を含む大きな水素結合ネットワークが形成され、RISの結合を安定化していることが示唆された。さらに、RISのリン酸基近傍のオミット差フーリエ図を注意深く観察すると、リン酸基の酸素原子に結合したピークは観測されず、リン酸基の酸素原子は水素結合のドナーと配位したマグネシウムイオンに囲まれていることがわかった。このことから、リン酸基はプロトン化されうる空間がなく、完全に脱プロトン化されていることが示唆された。一方で、リン酸基近傍の電荷バランスを計算することによ

り、RIS の脱プロトン化状態は支持される。つまり、リン酸基近傍(10-15 Å以内)のアミノ酸のプロトン化状態を鑑み、さらに、リン酸基が完全に脱プロトン化されているとした上で、電荷を数えると±0になった。興味深いことに、E93 は FPPS-RIS では脱プロトン化されているが、FPPS-RIS-IPP 複合体では E93 はプロトン化されていた。おそらく、IPP の結合によって生じた余分な負電荷を E93 のプロトン化によって相殺しているのだろう。さらに、FPPS-RIS-IPP における IPP 近傍の総電荷を数えてみても±0となる。これらのことは、RIS のリン酸基が、FPPS 結合状態では完全に脱プロトン化していることを支持し、また、E93 の役割が IPP 結合に伴う電荷バランスの調整であることが示唆される。

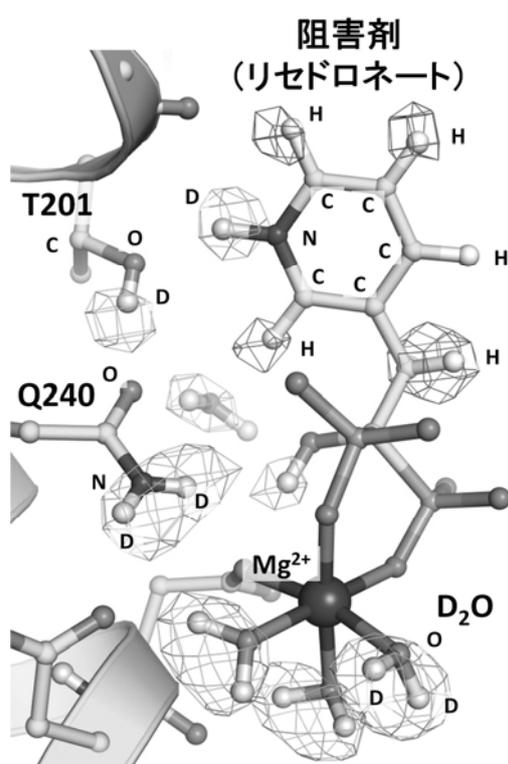


図3. RIS 近傍の中性子散乱密度図 (オミット差フーリエ、 $-3.3, 4\sigma$ )。RIS のピリジン環窒素の傍に明瞭なフーリエ図が観測される。

本研究では、FPPS 阻害剤である RIS のプロトン化状態と、その結合に伴うプロトン化状態の変化を明らかにした。RIS 近傍には多数の水和水が水素結合で連なっており、この複雑な水素結合ネットワークは理論的創薬研究を困難なものにしてきた。中性子結晶構造解析で明らかにした水素結合のドナー・アクセプターの情報は、ファーマコフォアモデルの構築に非常に有意義なものになるだろう。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. Yokoyama, T.; Takaki, S.; Chosa, K.; Sato, T.; Suico, M. A.; Teranishi, Y.; Shuto, T.; Mizuguchi, M.; Kai, H. Structural stabilization of transthyretin by a new compound, 6-benzoyl-2-hydroxy-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione. *J Pharmacol Sci* **2015**, *129*, 240-243.
2. Yokoyama, T.; Mizuguchi, M.; Ostermann, A.; Kusaka, K.; Niimura, N.; Schrader, T. E.; Tanaka, I. Protonation State and Hydration of Bisphosphonate Bound to Farnesyl Pyrophosphate Synthase. *J Med Chem* **2015**, *58*, 7549-7556.
3. Yokoyama, T.; Kosaka, Y.; Mizuguchi, M. Structural Insight into the Interactions between Death-Associated Protein Kinase 1 and Natural Flavonoids. *J Med Chem* **2015**, *58*, 7400-7408.
4. Yokoyama, T.; Ueda, M.; Ando, Y.; Mizuguchi, M. Discovery of  $\gamma$ -Mangostin as an Amyloidogenesis Inhibitor. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 13570.
5. Yokoyama, T.; Kosaka, Y.; Mizuguchi, M. Inhibitory Activities of Propolis and its Promising Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester, against Amyloidogenesis of Human Transthyretin. *J Med Chem* **2014**.
6. Yokoyama, T.; Ostermann, A.; Mizuguchi, M.; Niimura, N.; Schrader, T. E.; Tanaka, I. Crystallization and preliminary neutron diffraction experiment of human farnesyl pyrophosphate synthase complexed with risedronate. *Acta Crystallographica Section F* **2014**, *70*, 470-472.
7. Yokoyama, T.; Kosaka, Y.; Mizuguchi, M. Crystal structures of human transthyretin complexed with glabridin. *J Med Chem* **2014**, *57*, 1090-1096.
8. Yokoyama, T.; Mizuguchi, M.; Nabeshima, Y.; Kusaka, K.; Yamada, T.; Hosoya, T.; Ohhara, T.; Kurihara, K.; Tanaka, I.; Niimura, N. Hydrogen-bond network and pH sensitivity in human transthyretin. *J Synchrotron Radiat* **2013**, *20*, 834-837.

[学会発表] (計15件)

1. 横山武司: トランスサイレチン型アミロイドーシスの治療を目指した構造生物学的研究, 第1051回金曜セミナーおよび第4回 neutrons in biology研究会, 2016, 3, 25, 東海
2. 横山武司: 天然物の結合によるヒトトランスサイレチンの構造変化, 第53回日本生物物理学会年会, 2015, 9, 13-15, 金沢

3. 小坂友人, 水口峰之, 横山武司 : Structural insight into the interaction between Death-associated protein kinase 1 and natural flavonoids, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015, 9, 13-15, 金沢
  4. 横山武司 : 創薬標的タンパク質の中性子結晶構造解析および天然物阻害剤との相互作用解析, 2015 年度第一回水和ナノ構造研究会, 2015, 9, 1-2, 塩原
  5. 小坂友人, 横山武司, 水口峰之 : プロポリスとその有効成分CAPE のトランスサイレチンアミロイド線維形成阻害効果, 第 15 回日本蛋白質科学会, 2015, 6, 24-26, 徳島
  6. 横山武司, 水口峰之 :  $\gamma$ -マンゴスチンはトランスサイレチンのアミロイド線形成を阻害する, 第 15 回日本蛋白質科学会, 2015, 6, 24-26, 徳島
  7. 横山武司 : FPPS-ビスホスホネート複合体におけるプロトン化状態の変化と水和構造, 第 15 回日本蛋白質科学会, 2015, 6, 24-26, 徳島
  8. 横山武司 : FPPS-ビスホスホネート複合体におけるプロトン化状態の変化と水和構造, 第 8 回iBIX研究会, 2015, 1, 28, 東海
  9. Takeshi Yokoyama, Andreas Ostermann, Mineyuki Mizuguchi, Nobuo Niimura, Tobias Schrader, Ichiro Tanaka : Neutron crystal structure of human FPPS complexed with risedronate, XXIII Congress and General Assembly International Union of Crystallography (IUCr2014), 2014, 8, 1-8, Montreal
  10. Chosa, K., Yamakawa, R., Sato, T., Yokoyama, T., Mizuguchi, M., Suico, M., Shuto, T., Kai, H. : The endoplasmic reticulum-oriented drug development for familial amyloid polyneuropathy, 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology, 2014, 7, 13-18, Cape Town
  11. A. Yamaguchi, N. Niimura, S. Nakamura, S. Kidokoro, T. Chatake, T. Yokoyama, I. Tanaka : ATP-binding and hydration state analysis in DAPK towards neutron protein crystallography, The 2nd International Symposium on Science at J-PARC, 2014, 12, 15, つくば
  12. 横山武司, オスターマン アンドレアス, 水口峰之, 新村信雄, シュレイダー トビアス, 田中伊知朗 : ファルネシル二リン酸合成酵素の中性子結晶構造解析, 第 14 回日本蛋白質科学会, 2014, 6, 25-27, 横浜
  13. 小坂友人, 横山武司, 水口峰之 : トランスサイレチンとグラブリジンの複合体結晶構造解析, 第 14 回日本蛋白質科学会, 2014, 6, 25-27, 横浜
  14. Chosa, K., Yamakawa, R., Sato, T., Yokoyama, T., Mizuguchi, M., Suico, M., Shuto, T., Kai, H. : The Endoplasmic Reticulum-Oriented Drug Development For Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy, IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, 2013, 10, 13, Brazil
  15. Yokoyama, T. : Hydrogen-bond network and pH sensitivity in human transthyretin, 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology, 2013, 5, 26-29, 名古屋
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
横山 武司 (YOKOYAMA TAKESHI)  
富山大学 大学院医学薬学研究部 (薬学)・助教  
研究者番号 : 5 0 5 2 4 1 6 2