

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：55301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14637

研究課題名（和文）ゲル内結晶化法を応用した新しい作用機序のプロテアソーム調節薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of a proteasome regulator with a new mechanism of action using the in-gel crystallization method

研究代表者

高木 賢治（Takagi, Kenji）

津山工業高等専門学校・総合理工学科・准教授

研究者番号：90647322

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）：本研究では、構造解析が困難なプロテアソームと化合物の複合体構造を基にした高活性な新規薬剤開発を目指した。当初ゲル内結晶化法を参考に、プロテアソーム結晶形成後に疎水性の化合物を浸漬・結合させることを想定して研究を進めていたが、結晶作製が困難なこと、低分解能で化合物の構造決定が困難なことから、低分子量で構造未解明なプロテアソーム活性調節因子をターゲットにすることに変更した。この結果、新規植物プロテアソームシャペロンPBAC5の発現系構築を完了し、安定なPBAC5精製法を確立した。また、酵母のPba1のホモログとなるPBAC1との複合体精製にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当初ゲル内結晶化法を用いて、プロテアソームと新規薬剤の構造決定を目指していたが、プロテアソーム結晶の場合、ゲル内でも有機溶媒の影響が大きく、分解能が十分に上がらなかった。今後この方法に適したターゲットや結晶を選択し、結晶化法や浸漬法に改良を加えることで構造解析が可能になると考えられる。また、プロテアソーム分子集合については不明な部分が多く、PBAC5-PBAC1複合体の安定発現系の構築により、機能解明が早まると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a highly active new drug based on the complex structure of proteasome and compound, which is difficult to analyze. Initially, we were conducting research on the assumption that hydrophobic compounds would be immersed and bonded after the formation of proteasome crystals, with reference to the in-gel crystallization method. Due to the difficulty, we changed to targeting proteasome activity regulators with low molecular weight and unstructured. As a result, we completed the construction of an expression system for the novel plant proteasome chaperone PBAC5 and established a stable PBAC5 purification method. We also succeeded in purifying a complex with PBAC1, which is a homologue of yeast Pba1.

研究分野：構造生物学

キーワード：プロテアソーム X線結晶構造解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) プロテアソームは、細胞内でタンパク質の分解を担う巨大な分解酵素複合体である。その機能の破たんは広く疾患の原因となるため、重要な薬剤ターゲットである。しかし、既存の薬剤による本複合体活性の調節機構は多様性に乏しい。例えば、多発性骨髄腫の治療薬としてプロテアソーム阻害剤(ボルテゾミブなど)が開発されているが、これらはすべてプロテアソームの活性部位に直接結合して拮抗阻害するものであり、正常な細胞に対する副作用も報告されている。

(2) 一方、活性部位以外に結合して間接的に活性調節する薬剤は、副作用が少なく、細胞恒常性を維持して疾患を予防する有効な手段になると予想されるが、開発が遅れている。このような新しい作用機序の薬剤開発に向けて、プロテアソームの活性を調節する化合物のスクリーニングが、阻害剤、活性化剤を含めて広く行われている。その結果、水溶性の阻害剤とともに多数の難水溶性化合物が候補として得られている。

(3) 難水溶性化合物は薬剤としてそのまま使用することができず、親水性官能基を持たせる必要がある。また正確な相互作用情報を得るため、結晶構造解析が必要となる。しかし、難水溶性化合物を、タンパク質との複合体結晶として得るには、有機溶媒などに溶解してタンパク質結晶に浸透させる必要があり、結晶自体に物理的ダメージが加わるため、解析が困難である。このため、難水溶性化合物は新しい作用機序の薬剤候補として期待されるが、複合体構造解析例がない。

(4) タンパク質と難水溶性化合物の複合体 X 線構造解析は、ハイドロゲルを使用した方法が既にモデルタンパク質を用いて試みられている。この方法では、ゲル内でタンパク質結晶を作製することで結晶が物理的に強化され、有機溶媒に浸漬しても結晶が損傷を受けにくい。この方法は、プロテアソームのような脆いタンパク質結晶に適用するための条件は確立されていないが、条件を最適化し、結晶へのダメージを軽減する他の手法と組み合わせることで、難水溶性化合物を結合した複合体構造解析が可能になると考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は新しい薬剤開発アプローチによる薬剤候補の増加を目的とした。タンパク質の活性を調節する薬剤の開発は、従来、水溶性化合物とタンパク質の複合体構造を基にして行われてきたが、本研究は、難水溶性化合物の結合状態の構造情報を基にして、水溶性の薬剤を開発するという全く新しいアプローチ法の開発を目的とする。

(2) 本研究は、新規な作用機序のプロテアソーム調節化合物の獲得を目指す。プロテアソームの活性を調節する既存の薬剤は、水溶性で尚且つ活性部位に直接結合するものが主であり、類似のメカニズムで働く。本研究で着目する難水溶性化合物は、これらの水溶性の薬剤とは性質が異なり、本質的に異なるメカニズムで働くことが予想される。本研究は、プロテアソームの新規な作用機序の薬剤の開発を目的とする。

(3) 結晶の物理的強度を高めるゲル内結晶化法は、これまでリゾチームのようなモデルタンパク質では試されてきたが、プロテアソームのような溶媒含有率の高い脆い結晶では試されていない。本研究でのゲル中結晶作製の条件を最適化することで、これまで取り扱いが困難であったタンパク質結晶も構造解析が可能になり、新規作用メカニズムの解明につながると考えられる。

(4) 本研究で検討するゲル内結晶化法が、構造解析の促進につながると考えられるターゲットの探索を同時に進める。特に、弱い相互作用を介したタンパク質複合体の強化などにもゲル内結晶化は適用できると考えられるため、プロテアソームの構造形成にかかわる、シャペロン複合体などにも焦点を当て、ターゲット探索を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 報告されているプロテアソームの結晶化条件及びゲル内結晶化法を参考に、良質なゲル内プロテアソーム結晶を複数の条件で調整した。プロテアソーム結晶の有機溶媒による浸漬条件を検討するため、複数の浸漬用バッファを用意し、結晶に与えるダメージを調べた。同時にハンドリング可能なゲル濃度を決定するために、種々の濃度のゲルを作製し、結晶調整や結晶の切り出しが可能か、標準的なタンパク質サンプル（リゾチーム）を用いて検討した。

(2) プロテアソーム結晶は結晶格子が大きく実験室系装置では高分解能の構造解析が困難なため、放射光 X 線を用いて回折実験を行い、複合体構造の決定を試みた。波長可変性の放射光 X 線

を用いることで異常散乱効果を示す原子の位置特定も可能であるため、構造解析における結晶中への化合物の取り込みの確認や、分解能が不十分なデータでの化合物結合位置の特定を試みた。

(3) 新規な作用機序のプロテアソーム機能調節薬剤を開発するため、ゲル内結晶化による X 線結晶構造解析のほかに、プロテアソーム関連タンパク質複合体 (VCP) のクライオ電子顕微鏡法を使用した構造解析を試みた。VCP 単独状態および化合物との複合体構造の解析を行い、これらの構造を比較し化合物の結合部位を探索した。

(4) 新規な作用機序のプロテアソーム機能調節薬剤を開発するため、解析ターゲットとなるプロテアソーム関連タンパク質の対象を広げ探索を行った。この結果新たに報告があった植物のプロテアソームシャペロンについて、構造解析を視野に入れた発現系構築を行った。また得られた発現系を用いて実際にタンパク質精製を行い、ゲル内結晶化法の影響があると考えられるサブユニット同士の複合体形成解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) プロテアソーム機能調節薬剤の開発を目指し、難水溶性化合物との複合体構造決定を可能にするゲル内結晶化法の開発に取り組んだ。まず、プロテアソームのゲル内結晶化条件の検討 (pH, ゲル濃度、沈殿剤濃度、サンプル: リザーバー比) を行い、物理的強度が向上したゲル内結晶を得た。プロテアソームの機能を調節する化合物の DMSO 溶液にこの結晶を浸漬した結果、既存の化合物 (MG132) ではプロテアソームとの複合体構造解析が可能であった。このことから、DMSO を含んだバッファでの浸漬に耐えうる結晶が作製できたといえる。

(2) 研究開始当初考案していたゲル内結晶化法のほか、アガロースゲルを作成後、タンパク質結晶化サンプルを湿潤させてゲル内に結晶を作製する方法も検討した。数パーセント濃度のアガロースゲル条件ではゲル自体の作製が可能であることを確認した。

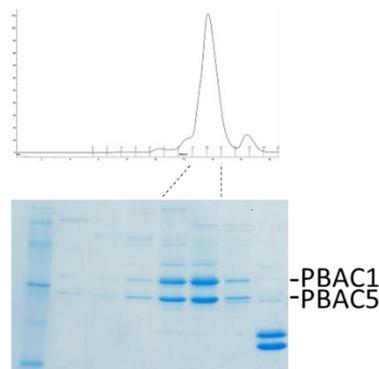
(3) 高濃度の DMSO 溶液にしか溶解しない化合物の浸漬による構造解析では、結晶構造は決定されたものの、分解能が低く、化合物との複合体構造は得られなかった。結晶が損傷しない DMSO 濃度条件にはさらなる工夫が必要であると考えられる。また、結晶の損傷を抑えたうえでの薬剤浸漬は、DMSO 濃度が低く、溶液中への化合物の溶解が不十分であり複合体形成が行われなかったと考えられる。

(4) 20S プロテアソームと難水溶性化合物との複合体構造解析では、クライオ電子顕微鏡法を使用した構造解析を行った。その結果、単独状態および化合物との複合体構造をそれぞれ 3.0、3.1 オングストローム分解能で構造決定した。これらの構造を比較し化合物の結合部位を探索したが、この分解能では化合物の結合および、それによるループ部分の顕著な構造変化は観察できなかった。

(5) ゲル内結晶化条件の検討をする上でプロテアソームは大量調整が困難であるため、高収量の代用サンプルとして、簡便に条件検討可能なタンパク質の検討を行った。この結果プロテアソーム関連タンパク質複合体 (VCP) を精製して使用した。

(6) プロテアソームの形成に関与するシャペロン分子はプロテアソームの複合体形成に影響し結果として細胞内のプロテアソームの活性に関与する。重要なターゲット分子として新規植物プロテアソームシャペロンが報告された。本分子は対応するホモログが存在せず構造解析が進められていない。また、すでにホモログの構造決定が行われているシャペロン分子に関しても、ヒトや酵母とアミノ酸配列の相同性が低く、新たな制御メカニズムの発見につながる可能性もある。本分子の制御によりプロテアソーム構築の制御メカニズムの詳細が明らかになれば、プロテアソーム機能の制御という点から高活性な新規薬剤の開発につながることを期待され、本分子及び相互作用する分子等の複数の発現系の構築を行った。

(7) 植物で新規に報告されたプロテアソームシャペロン PBAC5 及び、それと相互作用する PBAC1/2 やプロテアソームを構成するサブユニット等複数の発現系の構築を行った。可溶性タグを融合した複合体発現系を用いることにより、PBAC5-1 複合体の安定な精製条件が確立できた (右図)。ヒトや酵母のプロテアソーム形成には PBAC1/2 のホモログである PAC1/2 や Pba1/2 が機能するが、PBAC5 が PBAC1/2 に結合し、共同でプロテアソーム構築に関与していることが予想される。現在、構造解析のための結晶化条件の検討中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keito Hiragi, Kenji Takagi, Akira Nishide, Kim Minsoo, Tsunehiro Mizushima
2. 発表標題 赤痢菌エフェクターIpaH1.4/2.5基質認識ドメインのX線結晶構造解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田本和宏, 藤岡美季彦, 高木賢治, 水島恒裕
2. 発表標題 プロテアソーム形成シャペロンNas2によるRptサブユニットのHbYXモチーフ認識機構
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東浦彰史, 高木賢治, 中川敦史, 杉山成
2. 発表標題 薬剤スクリーニングの効率化を目指した蛋白質結晶の高圧凍結とハイドロゲル結晶化とのハイブリッド法の開発
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東浦彰史, 高木賢治, 中川敦史, 杉山成
2. 発表標題 薬剤スクリーニングの効率化を目指した蛋白質結晶の高圧凍結とハイドロゲル結晶化とのハイブリッド法の開発
3. 学会等名 平成30年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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