

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870016

研究課題名（和文）

3次元構造を基にした、生理活性小分子化合物のデザイン

研究課題名（英文）

Structure-based design of a bioactive small molecule

研究代表者

佐藤 慎一 (SATO SHINICHI)

京都大学 物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：70534478

研究成果の概要（和文）：

本研究では、生理活性物質レンチノロールとその標的タンパク質複合体の構造を解析し、その構造情報を基にレンチノロールを分子設計し、標的タンパク質への特異性の向上を目指した。

：成果：

1. リコンビナント S-100A11、S-100A13 および S-100A16 を大量発現・精製を行った。
2. レンチノロールを合成により、大量調整した。
3. 調整した S100 タンパク質とレンチノロールは完全な S100 タンパク質-wrenchnolol 複合体を形成させるために、モル比で wrenchnolol 過剰となるように混ぜることで複合体形成を行い、最濃度 2 mM の S100 タンパク質-wrenchnolol 複合体を得た。
4. 得られた S100A11-wrenchnolol 複合体溶液は、共結晶作成条件をキットによりそれぞれ 960 種の条件をスクリーニングし、数種類の結晶を作成することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The goal of this project is to solve the X-ray structure of wrenchnolol-target-protein complex and to obtain a wrenchnolol analogue which has a good potency by structure-based design.

：Research results：

1. Three kinds of S100 protein (S100A11, A13 and A16), which are purified as protein targets of wrenchnolol, were prepared by using E.coli expression system.
2. 1 g of wrenchnolol was prepared by chemical synthesis.
3. The S100 protein-wrenchnolol complex was formed by mixing and incubating on ice for 30 min, and then concentrated by ultrafiltration.
4. The initial crystallization conditions for the complex were screened by using crystal screening kits. In this screening, several protein crystals were obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010 年度	990,000	297,000	1,287,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,080,000	624,000	2,704,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、標的タンパク質同定、生理活性化合物、分子設計、分子認識

1. 研究開始当初の背景

タンパク質間相互作用を標的とする薬剤は、しばしば複数の相互作用を標的することから、高い特異性を有する薬剤開発は困難である。本研究では、生理活性小分子化合物レンチノロールと標的タンパク質の複合体構造解析を行い、その三次元構造情報を基にしたデザインを行うことで、高い標的特異性を有する薬剤への改変を目指す。

2. 研究の目的

タンパク質間相互作用を標的とする薬剤は、しばしば複数の相互作用を標的することから、高い特異性を有する薬剤開発は困難である。レンチノロールにおいても、その標的タンパク質同定の結果から、ESX-Sur-2 複合体の相互作用を標的とするだけでなく、S-100A11-アネキシン I の複合体も標的とすることが明らかになった（未発表）。そこで本研究では、レンチノロール-標的タンパク質複合体の構造を解析し、その構造情報を基にレンチノロールを分子設計し、対象となる相互作用（ESX-Sur-2）に、より高い特異性を有する分子への最適化を目指す。

3. 研究の方法

X線結晶構造解析を行うために必要量のリコンビナント S-100A11 を大量発現・精製する。また、レンチノロールも大量合成により調製する。得られた S-100A11 とレンチノロールはそれぞれ、レンチノロール過剰になるように混ぜ合わせ、終濃度 2 mM の S100-A11-レンチノロール複合体溶液を調製する。S100-A11-レンチノロール複合体溶液の共結晶の作製条件は、スクリーニングキットにより決定する。得られた共結晶を X線構造解析することで、レンチノロールの標的タンパク質への結合様式を特定する。続いて、得られた 3次元構造情報を基に Structure-based Design の手法を用いて、レンチノロールを Sur-2 に対しての最適化を目指す。

4. 研究成果

結晶構造解析を行うために、レンチノロールアフィニティー樹脂により同定した、標的タンパク質 S-100A11、S-100A13 および S-100A16 を大腸菌発現系により大量発現・精製を行った。また、レンチノロールを合成により、大量調整した。調整した S100 タンパク質とレンチノロールは完全な S100 タンパク質-wrenchnolol 複合体を形成させるために、モル比で wrenchnolol 過剰となるように混ぜることで複合体形成を行った。複合体の形成は、wrenchnolol-S100 タンパク質の UV 吸収をモニタリングすることで行った。複合体の UV 吸収波形は、レンチノロールの UV 吸収波形と S100 タンパク質の UV 吸収波形をそれぞれ合算することで予想した。得られた S100 タンパク質-wrenchnolol 複合体は、限外ろ過を利用して緩衝液の置換（50 mM Tris-HCl (pH. 7.0) containing 1 mM CaCl₂）を行い、最終的に 2 mM の濃度まで S100 タンパク質-wrenchnolol 複合体を濃縮した。得られた S100A11-wrenchnolol 複合体溶液は、共結晶作成条件をキットによりそれぞれ 960 種の条件をスクリーニングした。このスクリーニングにより数種類の結晶を作成することに成功した。しかしながら、X線結晶解析が行える良質のタンパク質の結晶を得るまでには至らず、再度、結晶化条件を検討することで良質の結晶を得られる条件を決定する必要がある。今後、良質な共結晶を作製し、X線結晶解析により wrenchnolol-S100A11 複合体の共結晶の構造を解く予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Murata, A., Sato, S., Kawazoe, Y., Uesugi M., Small-molecule fluorescent probes for specific RNA targets Chem. Comm., 47 (16), 4712 - 4714, 2011

(査読有)

2. Sato, S., Murata, A., Orihara, T., Shirakawa, T., Suenaga, K., Kigoshi, H.,

Uesugi, M., Marine Natural Product Aurilide Activates the OPA1-Mediated Apoptosis by Binding to Prohibitin
Chem. Biol., 18(1), 131-139, 2011

(査読有)

3. Shirakawa, T., Kawazoe, Y., Tsujikawa, T., Jung, D., Sato, S., Uesugi M., Deactivation of STAT6 through serine 707 phosphorylation by JNK J. Biol. Chem., 286(5), 4003-4010, 2011 (査読有)

4. Sato, S., Murata, A., Shirakawa, T., Uesugi, M., Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies
Chem. Biol., 2010, 17(6), 616-623, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. Sato, S., Murata, A., Orihara, T., Suenaga, K., Kigoshi, H., Uesugi, M., Marine Natural Product Aurilide Activates the OPA1-Mediated Apoptosis by Binding to Prohibitin. The 8th iCeMS International Symposium: "Meso-Control of Functional Architecture", Kyoto, Japan, November 9, 2010

2. Sato S., Protein Target Identification of Bioactive Small Molecules., Athens, Georgia, USA, University of Georgia, Department of Chemistry Seminar, October 6, 2010 (招待講演)

3. Murata, A., Sato, S., Kawazoe, Y., Uesugi M., Small molecule-based FRET probes for specific RNA targets. The 5th Japan-Korea Chemical Biology Symposium, Busan, Korea, January 26, 2010

4. Sato, S., Murata, A., Orihara, T., Suenaga, K., Kigoshi, H., Uesugi, M., Marine Natural Product Aurilide Activates the OPA1-Mediated Apoptosis by Binding to Prohibitin. The 25th Naito Conference on Chemical Biology [II], Sapporo, Japan, September 10, 2009

[図書] (計 4 件)

1. 佐藤慎一, 村田亜沙子, 白川貴詩, 上杉志成, 生理活性物質による創薬標的の同定のコツ, 羊土社出版, 創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析, 別冊, 141-146, 2010

2. 佐藤慎一, 上杉志成, 化合物推理ゲーム, ファルマシア, 46(1), 83-86, 2010

3. 佐藤慎一, 村田亜沙子, 上杉志成, 海洋天然物のケミカルジェネティクス, 学研メディアカル秀潤社出版, 細胞工学, 28, 332-337, 2009

4. 佐藤慎一, 上杉志成, 化合物推理ゲーム, ファルマシア, 45(12), 1263-1266, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 慎一 (SATO SHINICHI)

京都大学 物質-細胞統合システム

拠点・助教

研究者番号 : 70534478