

## 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 5 月 22 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590039

研究課題名（和文）核酸分子の新規スイッチパーツ機能の創製と応用展開

研究課題名（英文）Basic research for development of novel switch part on conformation and delivery of nucleic acid

研究代表者

藤井 敏 (FUJII SATOSHI)

静岡県立大学・薬学部・客員教授

研究者番号：10107104

研究成果の概要（和文）：

核酸分子は金属など存在する環境に応答して、多様な構造形態を形成する。リポソーム様構造の鉄貯蔵タンパク質に核酸分子を標的部位への薬物送達の可能性を見出し、新規な機能を持ったこの蛋白質担体に着目した。新規の結晶格子を用いた鉄、亜鉛、カドニウムイオンなどをドーピングした6結晶構造を高い分解能で構造解析した。高含水率の結晶格子を形成しており、これを用いて金属の取り込み経路などの結晶学的研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

The nucleic acid molecule responds to the existing environment like the metal concentration and forms the various structures. The iron storage protein adopts the shell structure like to liposome and becomes a novel drug carrier to deliver nucleic acid and to release it at the target cell. The new crystal lattice structure of the candidate protein has been determined in six forms, in which the metal ions such as ferric, zinc and cadmium ions are doped. The highly solvated packing of the dodecamer shell is suitable for the crystallographic study of the metal ion uptake pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：生物物理化学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 核酸は薬物または創薬ターゲットである。特に、制がん剤の分野では代謝拮抗の概念から開発・展開されてきており、最近は、遺伝子治療のみならずウイルス増殖の阻止や細胞増殖の抑制、免疫系および炎症の調節

などの働きをするサイトカインであるイン

ターフェロン誘導においても注目されている。

(2) 核酸分子は金属、温度、pH、濃度など

存在する環境に応答して、多様な構造形態を形成する。二重らせん構造での塩基対形成の構造基盤は、プリン・ピリミジンの水素結合による相互認識能とこの塩基対のらせん構造への形態的適合の普遍性にある。しかも、このゆるやかならせんを形成する糖-リン酸骨格は剛直性と柔軟性を併せ持っており、これが遺伝情報の厳密性と冗長性の発現でもある。金属イオンと核酸との反応・相互作用は多様である。金属イオンはリン酸基のカウンターイオンとしての構造安定化の役割以外に、塩基間または塩基対間に組み込むことにより多様な構造を誘導・導入できることが知られている。金属イオンを介した Wooble 塩基対もこの多様性発現で、その生物学意義も認められている。この塩基対様式などが金属イオンによって多様な改変・スイッチが可能となると、医療および DNA コンピュータなどのナノテクノロジー素材への応用が期待される。

(3) ピロリ菌由来の好中球活性蛋白質 (HP-NAP: *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein) は、4本の $\alpha$ -helixのバンドルサブユニットからなる殻状の12量体構造を形成して、その中空の溶媒域に多量の鉄イオンを取り込み、貯蔵し、かつ放出する。また、核酸を活性酸素種から保護する抗酸化作用も有する。この殻状のリポソーム様構造に核酸分子、金属イオンを標的部位へのDDS (Drug Delivery System、薬物送達)の可能性を見出し、リポソームにはない新規な機能を持った蛋白質担体に着目した。

## 2. 研究の目的

(1) 核酸分子を薬物または創薬ターゲットとして応用展開をするために、新規な構造スイッチパーツの構築と新規な薬物送達系 (DDS) の構築を目指し、金属、pH感受性による多様性の導入とその制御の構造基盤を検討する。グアニン塩基特異のG-カルテット構造では $K^+$ 、 $Na^+$ イオンがG-カルテット間中央に組み込まれている。そして塩基種認識能の改変のトリガーとして、金属を用いた研究も活発である。制がん剤開発ターゲットとしてテロメアに着目し、このG-カルテット構造を金属イオンで制御する可能性を探った。鉄やマグネシウムをはじめとする多くの元素と安定な錯体を形成するポルフィリンに着目した。その $\pi$ スタッキング力は核酸分子との超分子構造を安定化し、関連酵素には金属イオン結合サイトがあることから、機能の制御素子となることが期待できる。その核酸複合体での会合様式をX線結晶構造解析によって明らかにする。

(2) 核酸分子は塩基のスタッキング力が核となり、温度などの環境に応答したらせん構造となる。このらせん構造のバンドル外側は、帯状のポリアニオンと糖環の疎水面の構造である。この構造特性により多重らせん、ループ、ヘヤーピンなどの多様なバンドル (bundle) 様式が形成される。これらが環境に応答するものであれば、天然にはない付加価値の高い機能制御になると考えられる。この視点に立って、制がんとしての核酸分子を標的部位に薬物送達し、pHおよび金属イオン環境に応答する核酸分子高次構造のスイッチパーツ導入を実現する。このDDSの構築を目指し、遺伝子工学、蛋白質工学、高次構造解析などにより、構造基盤の基礎研究を行う。

(3) DDSキャリアー分子は、リポソーム様の多量体構造を形成するHP-NAPを利用する。HP-NAPはバンドルサブユニットからなる殻状の12量体構造を形成して、その中空の溶媒域に多量の鉄イオンを貯蔵し、放出する。鉄イオンを酸化・無毒化、金属塊として貯蔵する。また、核酸を保護する抗酸化作用を有する。がん細胞などの標的部位で鉄などの金属イオン環境に応答する新規なDDS蛋白質担体に着目した。このリポソーム状多量体内部に核酸分子の効率よいドーピングおよび標的部位での放出機能の創製を目的に、結晶化および多量体形成の安定化に寄与している高濃度グルタミン酸と沈殿剤MPDの役割と多量体形成機構の結晶学的解明を行う。まず高分解能の高含水領域をもつ結晶の作製技法を確立する。これを用いて、鉄イオンのない状態 (apo 結晶)、共結晶法および浸潤法の異なる金属ドーピングによるFe (三価) イオンの結合様式および多量体構造変化、さらに、金属種として生体内金属である鉄イオンと亜鉛イオンを念頭に、鉄だけでなく、亜鉛 $Zn^{2+}$ および $Cd^{2+}$ などの二価イオンについても apo 結晶を利用した金属イオン挿入結晶を得て解析する。その構造基盤のX線結晶学的アプローチを進める。

## 3. 研究の方法

(1) ポルフィリンと核酸複合体結晶の作成のために、試料の化学合成と会合検索を行う。会合能が高い誘導体を得るために、ピロール間のメソ炭素原子上におよびピロール環ベータ位に様々な置換基の導入を計画した。しかしながら、多くのピロール重合体が生成するため、収率および同定が困難であった。年度内に候補誘導体を得ることが出来ていない。DNAオリゴマーと金属イオンの共結晶化を行った。DNA、RNA分子の結晶化は困難である。ポリアニオン体であること、さ

らに高い溶解性にその起因を求めることができる。また、混在する陰イオンによって金属と沈殿を起こさないように配慮したが、試料調製、精製(回収)が困難であったために、年度内に候補複合体結晶を得ることが出来ていない。

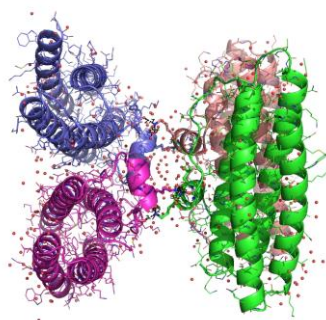
(2) 2つのHP-NAPの*H. pylori* YS29株とYS39株(ともに日本臨床分離株であり、アミノ酸配列が1ヶ所異なっている。)由来にHis-Tagを融合させて発現、精製して調製した。精製の過程でHP-NAPの凝集・沈殿を抑えるために、多量体形成を含めた蛋白質フォールディングに寄与すると考え、L-arginineを添加し精製を達成した。また、結晶化にもこのL-arginineの添加が必須であった。

(3) 放射光施設 KEK Photon Factory (Tsukuba, Japan)のビームライン NW12A and BL6A で回折データを収録し、解析を行った。金属を含まないApo結晶は、空間群F432と対称性が高く、また、大きな溶媒領域を持つ含水率が非常に高い結晶であった。この結晶化系を金属イオンの取り込み実験およびその構造変化の構造化学的解明に利用することにした。金属イオンを2種類の方法(共結晶化と浸潤法)で導入(ドーピング)した。金属種は $Fe^{2+}$ ( $FeSO_4$ ),  $Zn^{2+}$ ( $ZnSO_4$ ),  $Cd^{2+}$ ( $CdSO_4$ )で、内在性の $Fe^{3+}$ がApo結晶などに存在しないことを蛍光X線スキャン法で確かめ、それぞれの金属種に適した波長で測定した回折データを用いて、金属配位部位を同定した。分解能は2.5Åから2.1Åで構造精密化を行い、PDB登録した。PDB-IDは, 3T9J (YS39 apo), 3TA8 (YS39 Fe), 4evb (YS39 Zn), 4evc (YS39 Cd), 4evd (YS29 Cd), 4eve (YS29 apo) である。

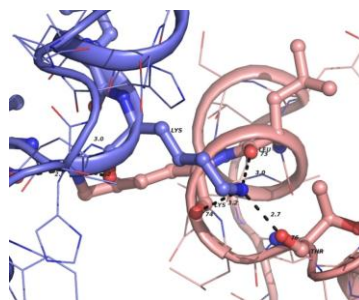
#### 4. 研究成果

(1) HP-NAPの新規結晶格子を用いて、金属イオンの取り込み、排出機構について構造化学的知見を得た。精製の過程でHP-NAPの凝集・沈殿を抑えるため、多量体形成を含む蛋白質フォールディングに寄与すると考えられるL-arginineを添加し、精製を達成した。また、結晶化にもL-arginineの添加が必須であり、これは、L-arginineが結晶格子形成に寄与し結晶化溶液中の蛋白質高次構造の均一化に寄与していることを示唆している。Apo体結晶は、空間群F432と対称性が高く、また、大きな溶媒領域を持つ、含水率が高い結晶であった。この12量体間のパッキングは4組のlysine側鎖が架橋し、狭い領域で強固な相互作用を形成した興味深いものであり、この高い含水率の結晶格子を安定化していることが明らかになった。下図は高含水

結晶格子形成に寄与している4組のサブユニット(色分けしている)間相互作用様式で、強固な橋渡し構造である。また、多くの固定水も観測出来た。



次図で、この橋渡し構造でのlys残基が水素結合と疎水結合で安定化している様子を示している。

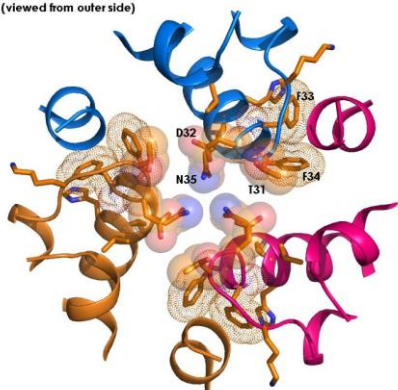


(2) HP-NAPと同様に鉄貯蔵タンパク質であるferritinおよび酸化ストレスからDNAを保護するDps(DNA-protecting protein under starved conditions)タンパク質との構造比較を行い、機能との相関を考察した。HP-NAPは12量体を形成し3回回転軸上に2種類の孔構造(pore I, pore II)を持つのに対し、ferritinは24量体を形成し3回回転軸上に8個、4回回転軸上に6個の孔構造を持つ。この構造の差異は、ferritinで4回回転軸に関する相互作用を形成していたC末端のヘリックスがHP-NAPでは存在しないためであると考えられる。また、構造を用いた静電ポテンシャル計算では、Dpsやferritinに比べHP-NAPの多量体表面で広範囲の正電荷分布が明らかになり、lysineなど、塩基性残基の好中球活性化機能への寄与様式が示唆された。

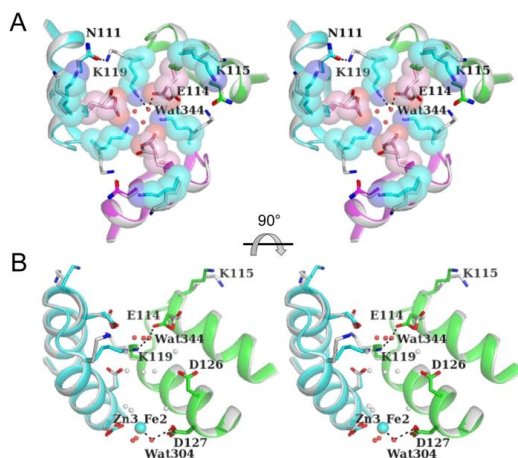
(3) 金属を含まないApo結晶と2種類の方法で金属をドーピングしたFe-load体の結晶構造解析により、構造比較を行った。Fe-load体では、12量体全体で16ヶ所の鉄結合部位が同定され、そのうち1ヶ所はHP-NAP 26695でも報告され、鉄イオン酸化部位として知ら

れる ferroxidase center であった。Apo 体の ferroxidase center と比較すると、金属配位に関わる残基および近傍のいくつかの残基で側鎖の配向変化が見られ、また、金属配位により ferroxidase center を形成する  $\alpha$ -ヘリックスが相対的に平行移動していることが見出された。さらに pore I で鉄イオンの特異的結合部位を同定し、pore I が鉄イオンの流入に関わることが示唆された。図に示すように、pore II においても、孔周辺の金属の出入りに関係すると考えられるアミノ酸側鎖の配向の変化を認めた。

Fore-I (viewed from outer side)



(4) 浸潤法により亜鉛イオンを導入した Zn-soak 体では、亜鉛イオンは 2 個イオンであり、第一鉄イオンの結合様式を反映することが期待できる。Zn-soak 体では 7 ヶ所の亜鉛イオン結合部位が観察され、ferroxidase center においては Fe-load 体とは異なり 2 個の亜鉛イオンが観察された。また、この結晶は Apo 体に比べ格子定数の格子長が 3.9 Å も短くなっており、検討した結果 12 量体の径が小さくなっていった。特に、ferroxidase center を形成する  $\alpha$ -ヘリックス領域に大きな構造変化が見られ、12 量体の縮小は金属結合能と深く関わっている可能性がある。また、この Zn-soak 体では、次図に示すように pore (孔) II に  $Zn^{2+}$  イオンが見出され、この孔も金属取り込み機構として働いていることが明らかになった。更に、Cd<sup>2+</sup> においても、Fe-load 体との金属配位様式の



差異などの構造知見を得た。

## 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 H. Yokoyama, N. Takizawa, D. Kobayashi, I. Matsui, S. Fujii, Crystal Structure of a Membrane Stomatin-Specific Protease in Complex with a Substrate Peptide, *Biochemistry*, 査読有, 51 巻, 2012, 3872-3880  
DOI: 10.1021/bi300098k
- ② T. Ikawa, A. Takagi, M. Goto, Y. Aoyama, Y. Ishikawa, Y. Itoh, S. Fujii, H. Tokiwa, S. Akai, Regio-complementary cycloaddition Reactions of Boryl- and Silylbenzynes with 1,3-Dipoles: Selective Synthesis of Benzo-Fused Azole Derivatives, *J. Org. Chem.*, 査読有, 78 巻, 2013, 2965-2983  
DOI: 10.1021/jo302802b
- ③ O. Tsuruta, H. Yokoyama, S. Fujii, A new crystal lattice structure of Helicobacter pylori neutrophil-activating protein (HP-NAP), *Acta Cryst.*, 査読有, F68 巻, 2012, 134-140
- ④ K. Matsuno, H. Yamazaki, Y. Isaka, K. Takai, Y. Unno, N. Ogo, Y. Ishikawa, S. Fujii, O. Takikawa, A. Asai, Novel candesartan derivatives as indole-amine-2,3-dioxygenase inhibitors, *Med. Chem. Commun.*, 査読有, 2012, 475-479  
DOI: 10.1039/C2MD00278G
- ⑤ Y. Ishikawa, S. Fujii, Binding mode prediction and inhibitor design of anti-influenza virus diketo acids targeting metalloenzyme RNA polymerase by molecular docking, *Bioinformatics*, 査読有, 6 巻, 2011, 221-225
- ⑥ T. Ikawa, T. Nishiyama, T. Shigeta, S. Mohri, S. Morita, S. Takayanagi, Y. Terauchi, Y. Morikawa, A. Takagi, Y. Ishikawa, S. Fujii, Y. Kita, S. Akai, ortho-Selective Nucleophilic Addition of Primary Amines to Silylbenzynes: Synthesis of 2-Silylanilines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 50 巻, 2011, 5674-5677
- ⑦ Y. Ishikawa, T. Yamashita, S. Fujii, T. Uno, 1,1',1'',1'''-[Porphyrin-5,10,15,20-tetra-yltetraakis(3,1-phenylene-methylene)]tetraquinolinium etrabromide, *Molbank*, 査読有, 2010, M704
- ⑧ T. Takahashi, H. Satoh, M. Takaguchi,

S. Takafuji, H. Yokoyama, S. Fujii, T. Suzuki, Binding of sulphatide to recombinant haemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system, *J. Biochem.*, 査読有, 147 巻, 2010, 459-462

- ⑨ H. Yokoyama, O. Tsuruta, N. Akao, S. Fujii, Structural study for the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori*, Photon Factory Activity Report 2009, 査読無, 27 巻, 2010, 226-226

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tsuruta, H. Yokoyama, S. Fujii, A new crystal lattice structure of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein (HP-NAP), 国際結晶学会, 2011 年 8 月 23 日, スペイン (マドリッド)
- ② 鶴田修, 横山英志, 藤井敏, ヘリコバクターピロリ好中球活性化タンパク質による金属イオンの貯蔵・放出の構造基盤～金属注入法の違いによる配位様式の差異～, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 静岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 敏 (FUJII SATOSHI)  
静岡県立大学・薬学部・客員教授  
研究者番号：10107104

### (2) 研究分担者

横山 英志 (YOKOYAMA HIDESHI)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号：70433208