

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770129

研究課題名(和文) 中性子による酵素阻害剤結合部位の水和構造解析

研究課題名(英文) Structural Analysis of Inhibitor Binding Site of Enzyme by Neutron Crystallography

研究代表者

安達 基泰 (ADACHI, Motoyasu)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号：60293958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：エイズウイルスのプロテアーゼ(HIVPR)は、エイズ治療のための重要な創薬標的タンパク質の一つである。本研究では、阻害剤非結合型HIVPRの活性部位に存在する水和水の立体構造を中性子結晶解析によって観測し、その特徴を解析することを目的とした。HIVPRはプロテアーゼであり、自己消化反応が生じるために、一本鎖型HIVPRとクロスリンク型HIVPRを設計した。一本鎖型HIVPRとクロスリンク型HIVPRを調製し、阻害剤複合体のX線結晶構造解析に成功した。それらのHIVPRは中性子結晶構造解析に必要な大型結晶作製とより正確な阻害剤の親和性の評価に有利であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human immune deficiency virus protease (HIVPR) is one of the important drug target proteins for the acquired immune deficiency syndrome. For the efficient drug discovery, it is of importance to obtain structural information of bound water molecules at the active site of HIVPR for the binding of potent inhibitors. Since HIVPR involves the self-degradation, the single-chained and cross-linked HIVPR were designed. The both HIVPR were prepared, and their tertiary structure was determined by X-ray crystallography. The designed HIV-PR will be useful for evaluate the affinity of newly designed inhibitors from kinetic and thermodynamic point of view and preparation of large crystal for neutron crystallography.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：HIV プロテアーゼ 結晶構造解析 中性子

1. 研究開始当初の背景

(1) 中性子を用いると水和構造を観測できるタンパク質を取り囲む水分子や水素結合は、タンパク質の機能発現に重要な役割を担っている。従ってタンパク質の水素・水和構造を観測することは、阻害剤などとの分子間相互作用を理解する上で非常に重要である。タンパク質の水和構造を高精度で決定できる方法の一つは、中性子結晶構造解析である。タンパク質を構成する代表的な原子を中性子とX線で観測するとその特徴は大きく異なる。X線は、散乱強度が電子数に依存するのに対し、中性子は核との相互作用に依存している。中性子を使った場合、炭素、窒素、酸素原子とほぼ同程度の感度で水素(重水素)原子を観察できる。つまり、タンパク質分子の約半数を構成する水素原子を観測することによって、原子座標として約2倍の情報量を得ることが可能になる。同時に水和水の一部である水素原子も観測される。電気陰性度の高い酸素原子に結合した水素原子の観測も容易である。

(2) HIVPR と阻害剤複合体の中性子結晶構造解析の成功

HIVPR に対する阻害剤開発は、立体構造情報に基づく薬物設計(SBDD)における最初の成功例として知られている。研究代表者は、SBDDの対象となる本酵素に着目し、既にHIVPRとその遷移状態アナログである阻害剤複合体(holo型)の中性子結晶構造解析に取り組み、1.9Åの分解能で全原子構造を解析した。その結果、阻害剤との相互作用、ペプチド加水分解における触媒残基の役割および阻害剤の結合に関与する水分子の構造を明らかにした。

(3) 阻害剤結合時の水和水の脱水和の効果

SBDDでは、阻害剤とタンパク質の立体構造や電荷の相補性が考慮されるが、阻害剤の結合部位に生じる脱水和効果についてはほとんど考慮されていない。先に行われたタンパク質の中性子結晶構造解析において、水和水は様々な相互作用の特徴を持つことが明らかにされており、それらの特徴は水和水のタンパク質表面における自由度の違いを反映しているものと解釈される。このような自由度の異なる水和水の脱水和は阻害剤結合にも大きな影響を与える。

2. 研究の目的

本研究では、阻害剤結合型 HIVPR と同型性の高い阻害剤非結合型 HIVPR 構造に、どのような水和水が現れるかを、中性子結晶構造解析によって観測することを目的とした。これまでに作製された阻害剤非結合型、阻害剤結合型の結晶は異なった空間群を持つ。そこで異なる空間群によるパッキングの違いに起因する立体構造変化を避けるため、阻害剤非結合型 HIVPR が阻害剤結合型と同型で結晶

化される条件を探索する。これら2つの立体構造を基にして自由エネルギー計算を行い、実験で得られる阻害剤の結合の自由エネルギー変化と比較し、水和水の脱水和の効果をもつことを最終目標とした。

本報告では阻害剤非結合型 HIVPR の活性部位に存在する水和水の立体構造を中性子結晶構造解析によって観測し、その特徴を解析するために、一本鎖型 HIVPR とクロスリンク型 HIVPR の設計・調製・X線結晶構造解析を実施した。HIVPR はプロテアーゼで自己消化反応が生じるために、それらの HIVPR は、中性子結晶構造解析に必要な大型結晶作製に有利と考えられる。さらに、それらの HIVPR は、2量体から単量体への解離が生じないため、より正確な阻害剤の親和性の評価につながり、薬物設計の高度化に資することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 一本鎖型(sc-HIVPR)およびクロスリンク型(c1-HIVPR)の調製

HIVPR は、大腸菌発現系を用いて調製した。発現ベクターとして pET24a を、宿主として HMS174(DE3)を用いた。培地としては、LB 培地を用い、培養温度は 37°Cで行った。抗生物質としてカナマイシンを、15 μg/mL の濃度で使用した。菌体は、培養液から遠心分離によって回収し、20 mM TrisHCl 緩衝液(pH8.0)中で、超音波破碎し、遠心分離後に得られた不溶性の画分を回収した。得られた不溶性の画分を、2回、20 mM TrisHCl 緩衝液(pH8.0)で洗浄した後、再生処理した。再生処理としては、不溶化している HIVPR を 50%(v/v)酢酸溶液で溶解し、10%(w/v)のグリセロールと 5%(w/v)のエリレングリコールを含む 50 mM 酢酸緩衝液(pH5.5)に 4°Cで希釈する方法で行った。その後、SP-セファロースを用いた陽イオン交換カラムクロマトグラフィーと SourceRPC を用いた逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。クロスリンク型 HIVPR については、SS 結合の形成を促進させるために、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーの後、20 mM TrisHCl 緩衝液(pH8.0)に対して透析処理した後に、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製の各過程の試料の純度は SDS-PAGE で分析した(図1)。

(2) 一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR の結晶化と X 線結晶構造解析

結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。タンパク質濃度は 2mg/ml、沈殿剤は 0.8 M or 1.2 M Ammonium sulfate、緩衝液は、125mM NaCitate, 62 mM NaPi (pH5.0) を使用し、結晶化温度は 20°Cで行った。クライオプロテクタントとしては、グリセロールを用いた。結晶構造の精密化は、プログラム Phenix を、分子モデルの構築は、プログラム XtalView を用いて行った。

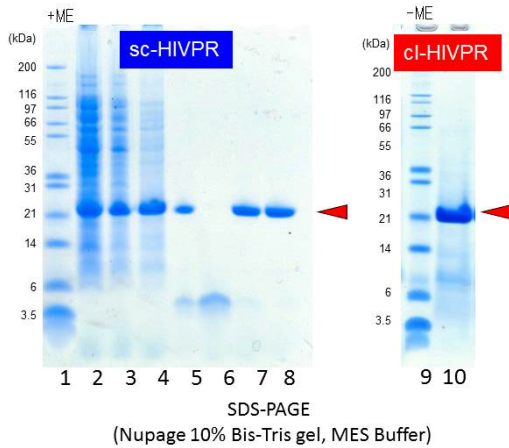


図 1. 各精製過程で得られた HIVPR の SDS-PAGE による分析。レーン 1: 分子量マーカー Mark12、2: 全菌体画分、3: 沈殿画分、4: 洗浄した沈殿画分、5: SP-Sepharose で精製した試料、6: SourceRPC で精製したときの不純物画分、7: 精製した sc-HIV-PR、8: 精製した sc-HIV-PR と阻害剤 KNI-272 の複合体、9: 分子量マーカー Mark12、10: 精製した c1-HIVPR。SS 結合の形成により、分子量約 2 万の位置にバンドが検出された。

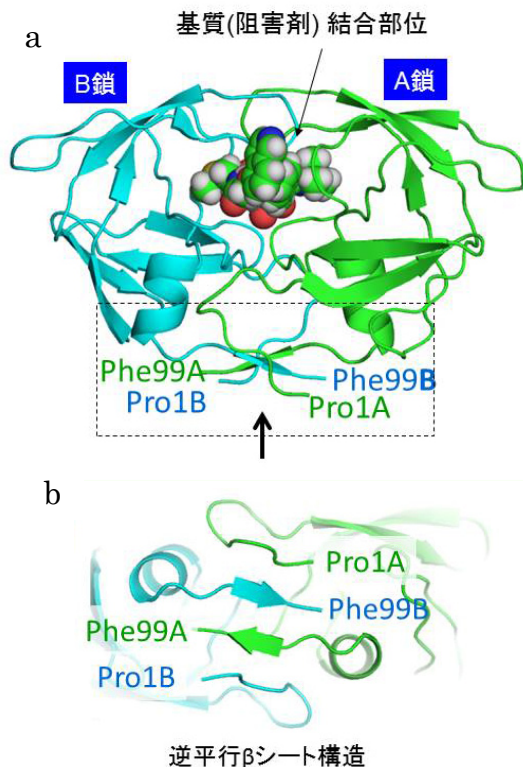


図 2. (a) HIVPR の全体構造。A 鎖を黄緑、B 鎖を水色のリボンモデルで示す。基質結合部位は、細い矢印で、C2 対称軸は、太い矢印で示している。A 鎖の N 末端のアミノ酸である Pro1A、C 末端である Phe99A、B 鎖の N 末端のアミノ酸である Pro1B、C 末端である Phe99B をラベルしている。(b) a の図で分子を下から見た図。

4. 研究成果

(1) 一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR の設計

HIVPR は、それぞれ同じ 99 のアミノ酸を含む A 鎖と B 鎖の 2 つのポリペプチド(プロトマー)から構成され、分子全体として C2 対称軸をもった 2 量体タンパク質である(図 2)。本研究では、HIVPR の N および C 末端が逆平行 β シートを形成し(図 2b)、A 鎖の C 末端である Phe99A と B 鎖の N 末端である Pro1B が隣接していることに着目した。逆平行 β シートの水素結合のパターンを解析した結果、HIVPR の遺伝子を 2 つ連続で接続し、Phe99A と Pro1B の間に 2 つのアミノ酸を導入することで、一本鎖型 HIVPR の作製が可能であると考えられた。さらに、C 末端から 2 番目の残基である Asn98A と Asn98B は、C2 回転軸の近くに位置し、両アミノ酸残基を Cys98A と Cys98B に置換することで、A 鎖と B 鎖の間に SS 結合(ジスルフィド結合)を導入し、A 鎖と B 鎖の間に共有結合を形成させ、一本鎖型 HIVPR と同様の特徴を持つ、単量体へ解離しない HIVPR の作製が可能と考えた。それをクロスリンク型 HIVPR とした。一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR の模式図を図 3 に示す。

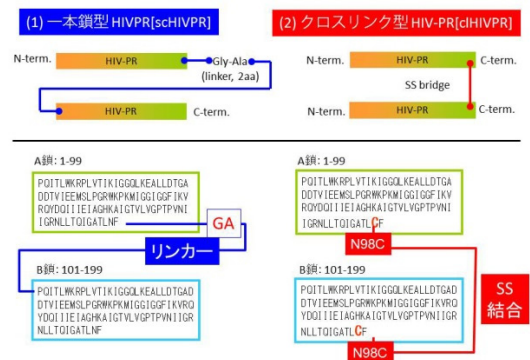


図 3. 一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR の模式図。

(2) 一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR の X 線結晶構造解析

一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR が、設計通りの構造を形成しているかどうか、野生型と同様の全体構造を有しているかどうかを確認するために、X 線結晶構造解析を実施した。阻害剤 KNI-272 との複合体を作製した後、野生型 HIVPR と同様の条件の下で結晶化実験を行った結果、一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR とともに、2 つのタイプの結晶が得られた(図 4)。X 線回折データの収集は、播磨の放射光施設 SPring-8 の BL38B1 のビームラインにて行った結果、分解能 1.40 から 1.05 Å の高分解能 X 線回折データを収集することができた。空間群は、見かけ上板状の結晶 1 が $P2_12_12$ で、見かけ上ロッド状の結晶 2 が $P2_12_12_1$ であった。そして、格子定数とともに、野生型と同等であった。

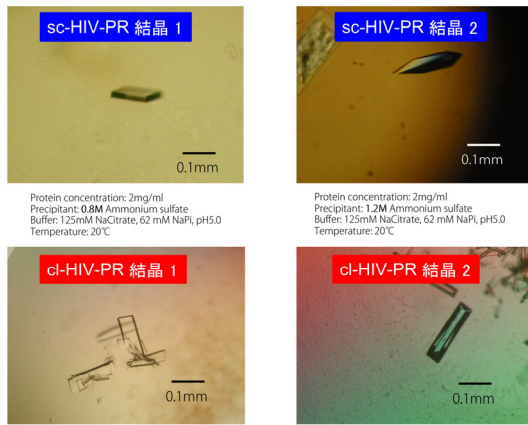


図 4. 得られた一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR の結晶の写真

一本鎖型 HIVPR のリンカー部分とクロスリンク型 HIVPR の SS 結合の部分が、どのような立体構造を形成しているかを確かめるために、結晶構造の精密化を行い、電子密度マップを観測した。その結果、一本鎖型 HIVPR の場合、A 鎖および B 鎖の N 末端付近にリンカー部分に由来する電子密度マップは、観測されなかった。さらに、末端の 4 つのアミノ酸残基 (Pro1A、Phe99A、Pro1B、Phe99B) の電子密度マップは、比較的不明瞭であった (図 5a)。SDS-PAGE の結果 (図 1) より、一本鎖型 HIVPR が切断を受けていないことが示されていることから、リンカー部分の構造は固定されておらずフレキシブルで、いくつかの構造が混ざった状態であると考えられた。また、HIVPR の分子が対称であることから、A 鎖と B 鎖が入れ替わった状態も存在することも電子密度が不明瞭になる理由と考えられる。

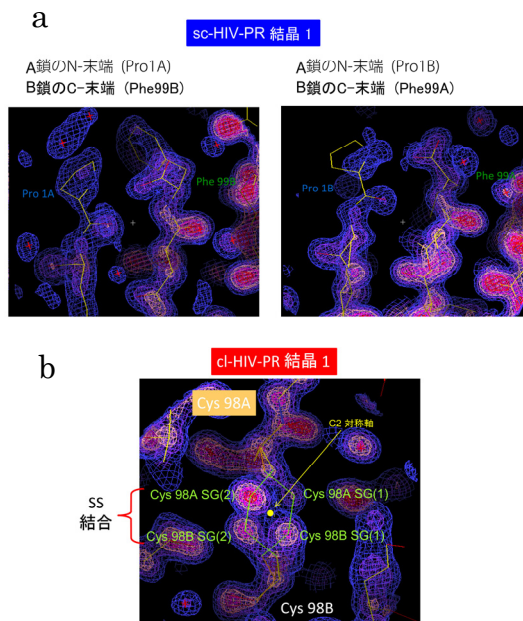


図 5. 得られた一本鎖型 (a) およびクロスリンク型 (b) HIVPR の電子密度マップ

一方で、クロスリンク型 HIVPR の SS 結合の部分については、硫黄原子の明瞭な電子密度マップが観測され、設計通りに SS 結合が導入できていることが、確認できた。硫黄原子間の結合距離から、2 通りの SS 結合の電子密度マップが存在すると考えられた。

(3) 今後の展望と予定

本研究によって、一本鎖型およびクロスリンク型 HIVPR の調製法を確立し、野生型とほぼ同じ全体構造を有することが明らかとなった。HIVPR はプロテアーゼで自己消化反応が生じるために、それらの HIVPR は、中性子結晶構造解析に必要な大型結晶作製に有利と考えられる。今後、基質結合部位の水和構造を明らかにするため、阻害剤非結合型の HIVPR の中性子結晶構造解析に向けて大型結晶作製をすすめていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 安達 基泰、新井 栄揮、廣本 武史、黒木 良太、タンパク質中性子結晶構造解析の実例と応用、波紋、査読有、24 巻、2014、45-49

[学会発表] (計 5 件)

- ① 安達 基泰、不活性型一本鎖 HIV-1 プロテアーゼと阻害剤 KNI-272 との複合体の X 線結晶構造解析、第 12 回日本蛋白質科学会、2013 年 6 月 9 日、とりぎん文化会館 (鳥取市)
- ② 安達 基泰、X-Ray Structure Analysis of the Single-Chain Derivatives of HIV-1 Protease in Complex with Inhibitor、Asian Crystallographic Association (AsCA12)、2012 年 12 月 3 日、アデレードコンベンションセンター (オーストラリア、アデレード)
- ③ 安達 基泰、SS 結合の導入による HIV-1 プロテアーゼの一本鎖化、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 21 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
- ④ 安達 基泰、1 本鎖化 HIVPR の阻害剤との複合体の X 線結晶構造解析、第 12 回日中韓酵素工学会議、2012 年 5 月 29 日、金沢エクセルホテル東急 (石川県金沢市)
- ⑤ 安達 基泰、HIV-1 プロテアーゼの一本鎖化と阻害剤複合体の X 線結晶構造解析、第 10 回日本蛋白質科学会、2011 年 6 月 14 日、ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 基泰 (ADACHI Motoyasu)

独立行政法人 日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号： 60293958