

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860089

研究課題名(和文) 個別化医療の実現を目指したVKORC1の立体構造解析

研究課題名(英文) A structural study of VKORC1 for development of personalized medicine

研究代表者

日下部 吉男 (Kusakabe, Yoshio)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：30338537

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)：ヒト由来VKORC1およびラット由来VKORC1について、バキュロウイルス発現系におけるコドンの最適化を行い、発現系を構築した。続いて発現ウイルスを作成し、力価測定を行った結果、タンパク質を発現させるのに十分な感染力を持ったウイルスの発現に成功した。

同時にin silicoの手法を用いてヒト由来、ラット由来、ウシ由来VKORC1に対してホモロジーモデリングを行うことでそれぞれの立体構造を予測し、ヒト由来VKORC1、ラット由来VKORC1に関してはワルファリンとのドッキング計算を行い、それぞれのVKORC1に対してワルファリンの結合部位および結合様式を予測することが出来た。

研究成果の概要(英文)：To increase the expression of Homo Sapiens VKORC1 (HsVKORC1) and Rattus Norvegicus VKORC1 (RnVKORC1), we performed the codon optimization and cloned the HsVKORC1 and RnVKORC1 gene into the expression vector. After co-transfection of insect cells with baculovirus DNA and the expression vector, the recombinant baculovirus was amplified to obtain a higher titer stock solution. Virus titer was detected virus infections and plaque formation. While we performed homology modeling of HsVKORC1, RnVKORC1, and Bos taurus VKORC1(BtVKORC1), as their three-dimensional (3D) structures had not been reported. Then, we performed molecular docking of Warfarin bound to HsVKORC1 and RnVKORC1 in molecular docking studies. As a result, our study revealed the binding site and binding mode of Warfarin into HsVKORC1, RnVKORC1, and BtVKORC1 from our docking model.

研究分野：個別化医療

キーワード：個別化医療 X線結晶構造解析 ワルファリン VKORC1

1. 研究開始当初の背景

ワルファリンは、抗凝血剤あるいは抗凝固剤として古くから日本のみならず世界中で広く使用されてきた薬剤の一種であるが、至適投与量に個人差がある上に治療域が狭いため、専門医を超えて広く使用される状況にはない。ワルファリンのターゲットとなる VKORC1 の遺伝子多型はワルファリン使用量の最重要決定因子であるが、哺乳類由来 VKORC1 の立体構造が明らかになっていないため、分子メカニズムやワルファリンによる阻害機構は明らかにされていない。本研究では、VKORC1 とワルファリン複合体の立体構造を高分解能で明らかにし、分子メカニズムやワルファリンによる阻害機構を解明することで、様々な変異に対して有効なワルファリン類似薬開発の手がかりを得ることを目指す。

2. 研究の目的

(1) X 線を用いた結晶構造解析を行うためには、大量の純品タンパク質が必要となる。目的タンパク質であるヒト由来 VKORC1 (HsVKORC1) をバキュロウイルス発現系を用いて発現させ、精製し、結晶化を行ったが、一度の培養での発現量が少ないために、数百条件の結晶化スクリーニングを行うとなると莫大な量の培養が必要となる。そこで、一度の培養で大量に得られる VKORC1 の発現系の再構築を行うために、コドンの最適化を行い、発現系の構築を行った。

(2) 創薬などの観点から、HsVKORC1 の構造を明らかにするのが理想だが、哺乳類由来の構造が未知である VKORC1 の構造解析を迅速に行うために、ラット由来 VKORC1 (RnVKORC1) に関して併行して研究を進めた。HsVKORC1 と同様にコドンの最適化を行い、発現系の構築を行った。

(3) 本研究の目的は、VKORC1 の変異にも有効な新規ワルファリン類似薬の開発を目指しており、

それを行うためには立体構造が不可欠である。X 線を用いた構造解析が順調に進まなかった時のために、X 線構造解析と並行して、HsVKORC1, RnVKORC1 およびウシ由来 VKORC1 (BtVKORC1) の立体構造予測を計算科学の手法を用いて行った。

3. 研究の方法

(1)(2)- コドンの最適化

HsVKORC1 および RnVKORC1 に対して、GeneScript 社にコドンの最適化を依頼し、DNA の合成を行った。

(1)(2)- 発現系の構築

構造解析を行うためには大量の VKORC1 が必要である。そこで、バキュロウイルスを用いた発現系の構築を行った。最適化した HsVKORC1 遺伝子および RnVKORC1 遺伝子をバキュロウイルス発現ベクター pBac-1 内に組み込み、HsVKORC1 および RnVKORC1 発現ベクターを作成した。

(1)(2)- 発現ウイルスの作成

1×10^6 の Sf9 細胞をディッシュに播種した。発現ベクター、バキュロウイルス DNA, トランスフェクション試薬を混合し、ディッシュ中の培地を取り除き、トランスフェクション混合液を細胞に加えた後、28℃ で 12 時間インキュベーション後、細胞に血清入り培地を加え、さらに 5 日間インキュベーションした。

(3)- 未だ立体構造が明らかになっていない HsVKORC1, RnVKORC1, および BtVKORC1 に対してホモロジーモデリングを行うにあたり、鋳型を探すため、ホモロジーサーチを行った結果、以下の結果が得られた。

目的タンパク質	Template PDBID	タンパク名	相同性
HsVKORC1	4NV6	<i>Synechococcus</i>	22.48
	3KP9	<i>Synechococcus</i>	22.05
	4NV5	<i>Synechococcus</i>	22.40
	4NV2	<i>Synechococcus</i>	22.40
RnVKORC1	4NV6	<i>Synechococcus</i>	25.38
	3KP9	<i>Synechococcus</i>	26.23
	4NV5	<i>Synechococcus</i>	25.40
	4NV2	<i>Synechococcus</i>	25.40
BtVKORC1	4NV6	<i>Synechococcus</i>	19.35
	3KP9	<i>Synechococcus</i>	18.85
	4NV5	<i>Synechococcus</i>	19.01
	4NV2	<i>Synechococcus</i>	19.01

上記の結果に基づき、タンパク質の柔軟性を考慮するためにも、複数の構造を基にホモロジーモデリングを行う必要があると考え、これら4つの構造を鋳型として、HsVKORC1, RnVKORC1 および BtVKORC1 に対して、プログラム MODELLER を用いたホモロジーモデリングを行い、立体構造モデルを構築した。

(3)- 得られた立体構造モデルに対するワルファリンの分子ドッキング計算を行い、結合様式および結合親和性を明らかにした。ドッキング計算は、ドッキングプログラム MF MyPresto を用いて行った。

4. 研究成果

(1)- 発現ベクター内に HsVKORC1 遺伝子が組み込まれているか確認するためにインサートチェックを行った。ベクターと VKORC1 遺伝子の2本のバンドが確認できたことから(図1)、発現系の構築に成功したことがわかった。

(1)- 作成したウイルスの力価を測定した結果を図2に記す。下の写真は Sf9 細胞にウイルス溶

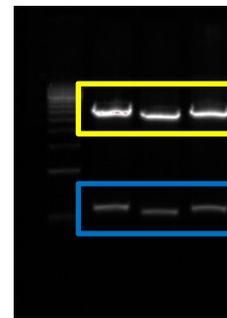


図1 HsVKORC1 発現系の構築における、インサートチェックの結果

液を加えないコントロールで、上の写真は、ウイルス溶液を 1/100 に希釈したものを細胞に感染させたものである。コントロールと感染細胞を比較した所、ウイルス感染細胞には大きいプラークを確認することができた。また、ニュートラルレッドで染色し、顕微鏡で確認した所、ウイルス感染により死滅した細胞を確認できたことから、タンパク質を発現させるのに十分な力価を持ったウイルスを作成することに成功したことがわかった。

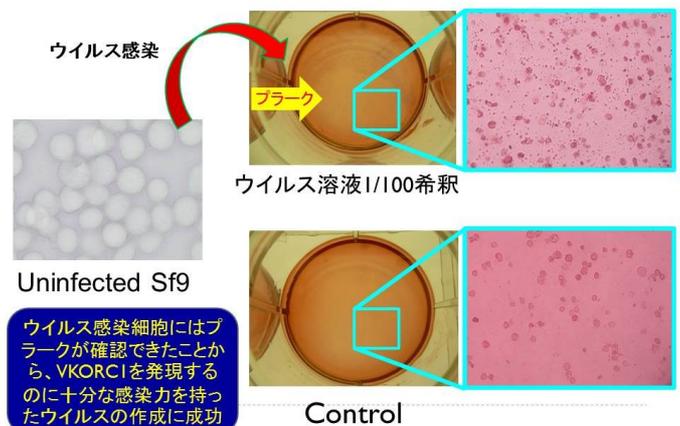


図2 ウイルス力価実験の結果

(2)- 発現ベクター内に RnVKORC1 遺伝子が組み込まれているか確認するためにインサートチェックを行った。ベクターと VKORC1 遺伝子の2本のバンドが確認できたことから(図3)、発現系の構築に成功したことがわかった。

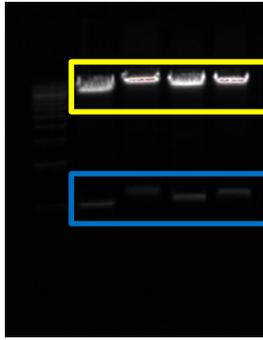


図3 RnVKORC1 発現系の構築におけるインサートチェックの結果

(2)- 作成したウイルスの力価を測定した結果を図4に記す。図に出ている4つのウエル中、右下のウエルは Sf9 細胞にウイルス溶液を加えないコントロールで、右上のウエルは、ウイルス溶液を 1/100 に希釈したもの、左上のウエルはウイルス溶液を 1/10 に希釈したものを細胞に感染させたものである。コントロールと感染細胞を比較した所、ウイルス感染細胞には大きいプラークを確認することができた。また、ニュートラルレッドで染色し、顕微鏡で確認した所、ウイルス感染により死滅した細胞を確認できたことから、タンパク質を発現させるのに十分な力価を持ったウイルスを作成することに成功したことがわかった。

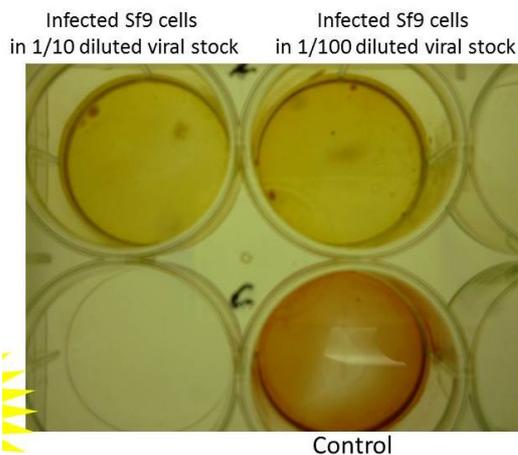


図4 ウイルス力価実験の結果

(3)- 4つの鋳型モデルを用いて構築した立体構造モデルを重ね合わせた図を下に記す。

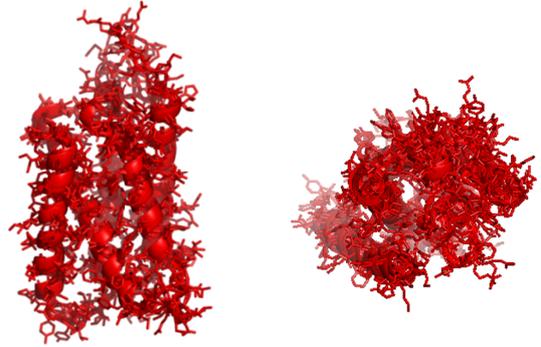


図5 構築した4つのHsVKORC1の立体構造モデルの重ね合わせ(左:正面から見た図、右:上から見た図)

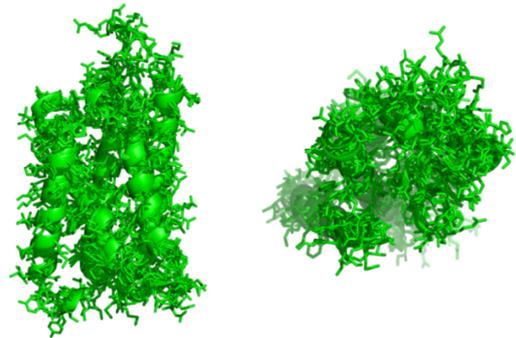


図6 構築した4つのRnVKORC1の立体構造モデルの重ね合わせ(左:正面から見た図、右:上から見た図)

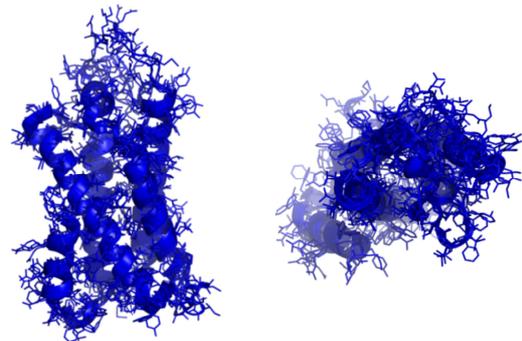


図7 構築した4つのBtVKORC1の立体構造モデルの重ね合わせ(左:正面から見た図、右:上から見た図)

全てほぼ同じ構造をとっており、5本の α ヘリックスがヘリックス束を形成し、束の中央に空洞が存在していた。また、それぞれのVKORC1に対して、4つの鋳型モデルを用いてモデルを構築することにより、様々なポーズの立体構造を得るこ

とが出来たことから、タンパク質の柔軟性を考慮することが出来た。また、4本目と5本目のヘリックスをつないでいるループに動きがみられることから、この部分はとてもフレキシブルになっていることが考えられる。

次に、構築した HsVKORC1, RnVKORC1 および BtVKORC1 の立体構造モデルを重ね合わせ、違いを比較した。

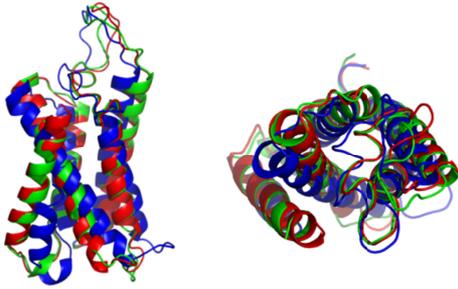


図 8 HsVKORC1(赤), RnVKORC1 (緑) および BtVKORC1(青)の構造モデルの重ね合わせ

構造を重ね合わせ、比較することによって違いを明らかにすることができた。すべて5本のヘリックスからなるヘリックス束を形成し、ほぼ同じ構造をとっているが、BtVKORC1は、N末端の1本目のヘリックスが他の2つと比べて短くなっているために、BtVKORC1では、ヒト由来VKORC1とRnVKORC1と比べて、3本目のヘリックスが中央付近から外側に曲がっていた。この違いにより、ヘリックス束の中央に存在する空洞の入り口が他の2つと比べて大きくなっていた。

(3)- HsVKORC1 とワルファリンとのドッキング計算から得られた結合様式を下記に記す。

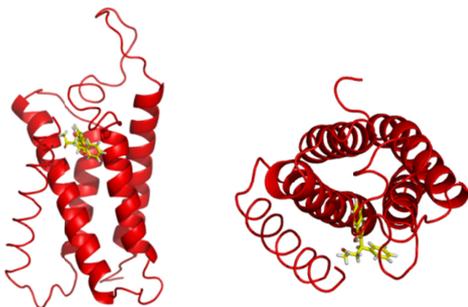


図 9 ドッキング計算から得られた HsVKORC1(赤)モデルとワルファリン(黄)の結合様式 (左: 正面から見た図、右: 上から見た図)

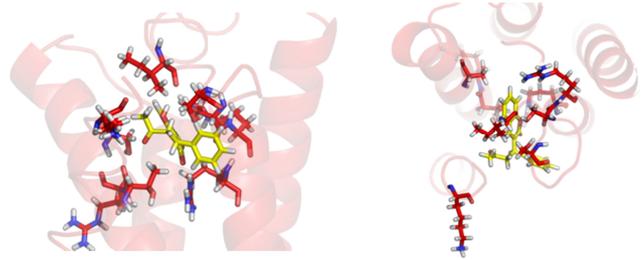


図 10 ドッキング計算から得られた HsVKORC1(赤)モデルとワルファリン(黄)の結合部位 (左: 正面から見た図、右: 上から見た図)

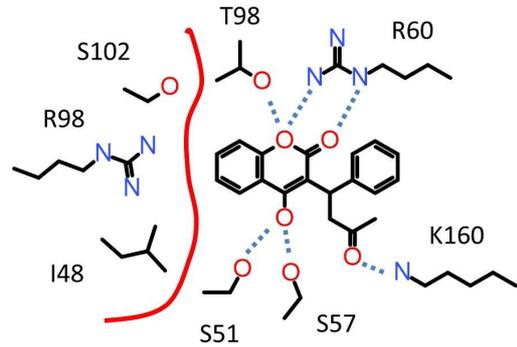


図 11 ドッキング計算から得られた HsVKORC1モデルとワルファリンの結合様式

クマリン中のカルボニル基の酸素と6員環中の酸素は、60番のア르기ニンと水素結合しており、さらに6員環中の酸素は、98番のスレオニンとも水素結合を形成していた。また、クマリンの水酸基は51番と57番の2つのセリン残基と水素結合していた。また、クマリンは、102番のセリン、98番のア르기ニン、48番のイソロイシンによって形成された疎水ポケットに結合していた。

RnVKORC1 とワルファリンとのドッキング計算から得られた結合様式を下記に記す。

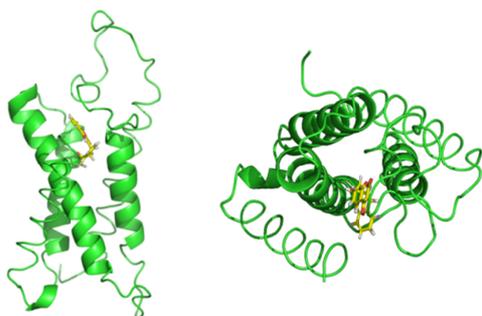


図 12 ドッキング計算から得られた RnVKORC1(緑)モデルとワルファリン(黄)の結合様式 (左：正面から見た図、右：上から見た図)

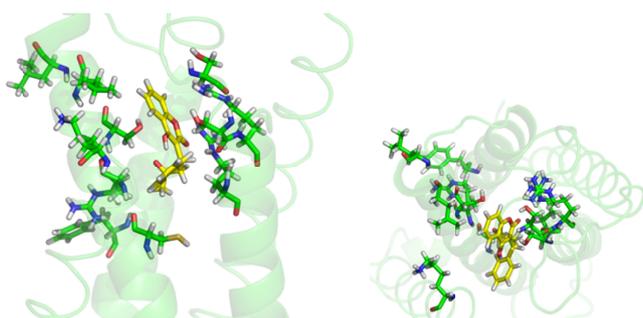


図 13 ドッキング計算から得られた RnVKORC1(緑)モデルとワルファリン(黄)の結合部位 (左：正面から見た図、右：上から見た図)

【まとめおよび考察】

本研究では、VKORC1 とワルファリン複合体の立体構造を高分解能で明らかにし、分子メカニズムやワルファリンによる阻害機構を解明することで、様々な変異に対して有効なワルファリン類似薬開発の手がかりを得ることを目指した。そこで、X 線結晶構造解析を目指し、HsVKORC1 および RnVKORC1 について、バキュロウイルス発現系におけるコドンの最適化を行い、発現系を構築した。

大量培養に用いる Sf9 細胞の大量培養を試みたところ、バキュロウイルスに感染させるのに十分な量の細胞培養に成功したので、HsVKORC1 および RnVKORC1 発現ウイルスを作成し、力価を測定した所、タンパク質を発現させるのに十分な感染力を持ったウイルスの作成に成功した。今後は、これらのウイルスを用いて大量にタンパク質を発

現させ、精製し、結晶化・構造解析まで進めたい。

実験的な構造解析に関しては、残念ながらここまでしか進むことが出来なかった。

そこで、すでに構造が明らかになっている原核生物由来 VKORC1 の立体構造を鋳型とし、*in silico* の手法を用いて HsVKORC1, RnVKORC1 および BtVKORC1 に対してホモロジーモデリングを行うことでそれぞれの立体構造を予測し、HsVKORC1 および RnVKORC1 に関してはワルファリンとのドッキング計算を行い、それぞれの VKORC1 に対してワルファリンの結合部位および結合様式を予測することが出来た。

今後はこれらの構造に対して、ワルファリンの効果を下げると言われているアミノ酸変異部位に対して変異モデルを作成し、変異によりなぜワルファリンの効きが悪くなるのかを構造の面から明らかにしたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

・ [Kusakabe, Y., Ishihara, M., Umeda, T., Kuroda, D., Nakanishi, M., Kitade, Y., Gouda, H., Nakamura, K., & Tanaka, N.](#) Structural insights into the reaction mechanism of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Scientific Reports*. **5**, article number 16641 (2015).

[学会発表] (計 1 件)

・ 新規ピロリ菌除菌剤の開発を志向したシアル酸合成酵素の構造解析

日下部 吉男、梅田 知伸、北川 康行、田中 信忠、合田 浩明

平成 26 年 3 月 日本薬学会第 134 年会(熊本県熊本市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日下部 吉男 (KUSAKABE, Yoshio)

帝京大学・薬学部・基礎化学研究室・講師

研究者番号：30338537