

# 創薬標的タンパク質の中性子構造解析

利用者 今瀬肇<sup>1</sup>、高野佳樹<sup>1</sup>、木村成伸<sup>2</sup>、木村要<sup>3</sup>、安達宏昭<sup>4</sup>  
 所属 <sup>1</sup>茨城県企画部、<sup>2</sup>茨城大学、<sup>3</sup>キリンビール、<sup>4</sup>(株)創晶

## 1.目的

茨城県は県内の企業や大学機関から構成される新薬創生研究会の要請により、創薬研究に直結する創薬標的タンパク質としてヒト免疫不全ウイルス由来のプロテアーゼ(HIVプロテアーゼ)を選択し、軽水及び完全重水素化したHIVプロテアーゼの中性子構造解析を行う。

## 2.実施手順

- i) 重水素化HIVプロテアーゼの調製及びX線結晶解析： HIVプロテアーゼ発現大腸菌を重水素化培地中で培養し、完全重水素化HIVプロテアーゼを調製する。さらに同試料を用いて結晶化及びX線結晶構造解析を行い、軽水HIVプロテアーゼとの構造比較を行う。
- ii) 軽水HIVプロテアーゼの中性子回折実験： 提案メンバーの(株)創晶が大型化した軽水HIVプロテアーゼについて、JRR3に設置されたBIX4で中性子回折データの収集を行う。

## 3.実施結果

i) 重水素化HIVプロテアーゼの調製及びX線結晶解析： HIV-プロテアーゼの発現ベクターとしてカナマイシン耐性であるpET28aを用い、さらに培養中に鉄イオンを添加することによりHIVプロテアーゼを重水素化培地中で効率良く発現させることに成功した。さらにリフォールディング回収率を向上させるため、発現した封入体の界面活性剤による洗浄を精製工程に加え、さらにリフォールディング条件の検討を行った。リフォールディングpHをこれまでの5.5から7.5に変更することにより1リットルの培養液当たり7.8 mgの重水素化HIVプロテアーゼを調製することに成功した(図1 BSDS-PAGE参照)。これは軽水HIVプロテアーゼと同等の調製効率である。重水素化HIVプロテアーゼを、軽水中で蟻酸を沈殿剤として用い結晶化(図2A)し、X線回折データを収集し構造決定を行った(図2B)。重水素化HIVプロテアーゼの主鎖構造や温度因子は同じ条件で結晶化した軽水HIVプロテアーゼと大きな差は見られなかった。さらに、調製時に添加したHIVプロテアーゼ阻害剤(KNI-272)の電子密度も軽水HIVプロテアーゼ同様に確認できた(図2C)。

ii) 軽水HIVプロテアーゼの中性子回折実験： 原子力機構から提供されたHIV-プロテアーゼ試料に京都薬科大学木曾研究室から提供を受けたHIV-プロテアーゼ阻害剤(KNI-272)を結合させ複合体とした後、(株)創晶で結晶化および大型化を行った(1.9x1.9x0.4 mm、図2)。本結晶を重水で調製した緩衝液に置換し、原子力機構の研究用原子炉JRR3に設置されたBIX4を用いて中性子回折実験を行った。本測定に入る前に露出時間を検討したところ、6時間露光で2.3 の回折点を確認することができた(図3)。そこで露光時間を6時間とし、第7、第8サイクルのビームタイムを使って、測定領域50.4°でデータ収集を試みた。その結果、分解能が2.3 Å、データの完全性が83%、Rmerge が 8.1% のデータを収集することができた(表1)。X線結晶構造解析で取得されている構造を初期モデルとして、プログラムCNSによりR値22%、free-R値34%まで精密化した。KNI-272のヒドロキシル基と触媒残基であるアスパラギン酸残基(Asp)の水素結合が観測された(図5)。

今後、本プログラムで軽水HIVプロテアーゼ結晶の中性子回折データから得られた分子モデルの精密化を行い、水素原子を含めた分子の評価を行う。また、重水素化HIVプロテアーゼについては結晶の大型化を行い、すでに1.0 x 1.0 x 0.1 mm程度の結晶を得ることに成功していることから、来年度も研究会としてビームタイムが確保できれば、さらに高分解能回折データ収集を目指すとともに、タンパク質の完全重水素化の有効性に関しても考察したい。

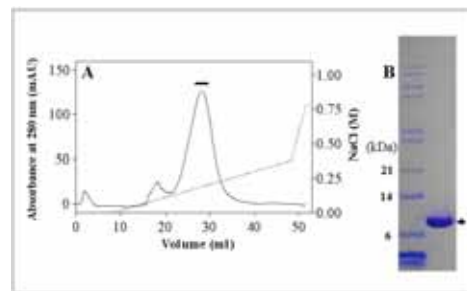


図1 陽イオン交換クロマトグラフィーによる重水素化HIVプロテアーゼの精製(A)及び精製されたプロテアーゼのSDS電気泳動分析(B)

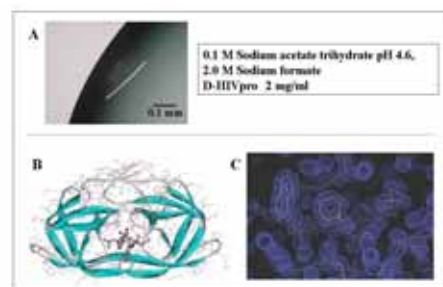


図2 重水素化HIVプロテアーゼの結晶(A)、1.4 Å分解能のX線結晶構造(B)及び活性部位に結合した阻害剤(KNI-272)の電子密度(C)

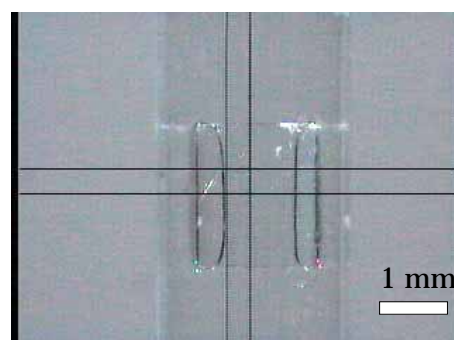


図3 回折実験に用いた結晶

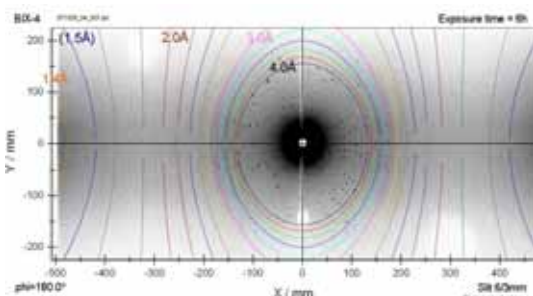


図4 中性子回折像(6時間照射)

表1 HIVプロテアーゼ中性子回折データ収集の統計値

Shell	Lower Limit (Å)	Upper Limit (Å)	Unique reflections	R <sub>merge</sub> (%)	I <sub>sig</sub> (I)	Completeness (%)	Redundancy
100	4.96	941	3.9	22.4	75.5	2.0	
4.96	3.93	960	4.9	18.5	82.6	1.9	
3.93	3.44	963	5.9	13.4	84.4	1.8	
3.44	3.12	964	8.0	9.0	86.6	1.7	
3.12	2.90	995	10.7	6.8	86.9	1.6	
2.90	2.73	970	15.2	4.5	87.3	1.5	
2.73	2.59	958	17.7	3.7	85.6	1.5	
2.59	2.48	937	20.3	3.4	84.7	1.4	
2.48	2.38	903	23.6	3.0	80.8	1.4	
2.38	2.30	882	26.6	2.5	80.3	1.3	
All hkl		9,473	8.1	7.7	83.4	1.6	

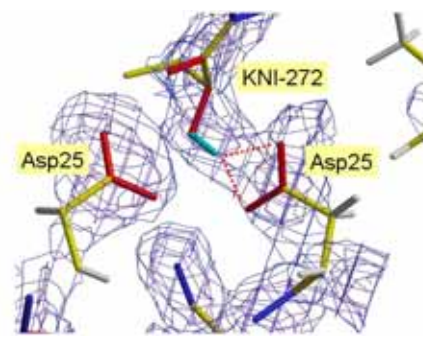


図5 触媒中心の核密度マップとボンドモデル

水色:重水素原子 灰色:水素原子, 赤色:酸素原子, 青:窒素原子

# 中性子結晶回折法によるタンパク質-医薬品

## 相互作用の解析

利用者 今瀬肇<sup>1</sup>、高野佳樹<sup>1</sup>、木村要<sup>2</sup>、安達宏昭<sup>3</sup>  
 所属 <sup>1</sup>茨城県企画部、<sup>2</sup>キリンビール、<sup>3</sup>(株)創晶

### 1.目的

茨城県は県内の企業や大学機関から構成される新薬創生研究会の要請により、創薬研究に直結する創薬標的タンパク質としてヒト免疫不全ウイルス由来のプロテアーゼ(HIVプロテアーゼ)を選択し、軽水及び完全重水素化したHIVプロテアーゼの中性子構造解析を行う。

### 2.実施手順

HIVプロテアーゼ発現大腸菌を重水素化培地中で培養し、完全重水素化HIVプロテアーゼの調製、結晶化及びX線結晶構造解析による軽水HIVプロテアーゼとの構造比較を行った。また大型化した軽水HIVプロテアーゼについては中性子回折データの収集を行った。

### 3.実施結果

完全重水素化HIVプロテアーゼ結晶の大型化及び中性子回折実験：2.6 mg/ml 完全重水素化HIVプロテアーゼ(+KNI272)を用いて0.1 M 酢酸ナトリウム(pH 4.6)、0.2 M 酢酸アンモニウム、0.95 M 蟻酸ナトリウムを用いて軽水中で結晶の大型化を行った。中性子回折データ収集を行うに当たり、溶媒環境を完全重水へ置換するため、0.2 mg/ml重水素化HIVプロテアーゼ(+KNI272)を含む0.1 M重水素化酢酸ナトリウム(pD 4.2)、0.2 M 重水素化酢酸アンモニウム、1.2 M 重水素化蟻酸ナトリウムを調製し、結晶母液を数日間かけて徐々に置き換えた。それに伴い、リザーバー溶液には重水素化HIVプロテアーゼを含まない前述の溶液に置換した。結晶の右上部には気泡を内包しており(図1)、結晶右中央部には成長方向の異なる結晶(図1矢印)が付着している。20日以上重水置換した完全重水素化HIVプロテアーゼ結晶(およそ1 mm<sup>3</sup>、図1左)をキャピラリーに封入し、6時間露光で角度を変え回折実験を実施した。しかしながら4 分解能までの回折点しか観察されず、その数も非常に少なかった(図1右)。また、小さめの予備結晶についても同様に実験を実施したが、良好な結果をえることはできなかった。この原因を確かめるため同結晶のX線による回折点を調べたところ、2 程度まで回折点は確認できたが、複数の結晶が存在しているかのような回折点が観察され、長期間におよぶ結晶成長の際に多結晶になってしまったものと考えられた(図3)。

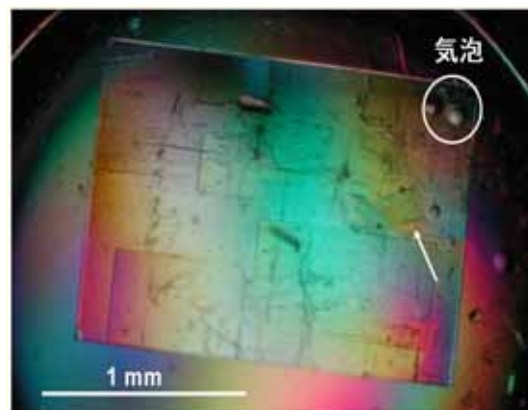


図1 重水置換中のHIVプロテアーゼ結晶

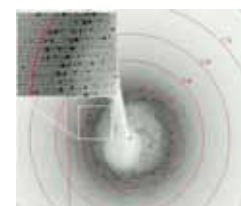
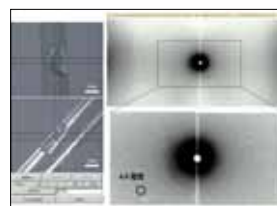


図2 重水素化HIVプロテアーゼ結晶(左) 図3 中性子回折実験に用いた結晶のX線回折パターン

軽水素HIVプロテアーゼの中性子回折実験：(株)創晶で昨年度よりもさらに体積で2.6倍(3.7 mm<sup>3</sup>)大型化した軽水HIVプロテアーゼ結晶(4.3 x 2.5 x 0.8 mm、図3左)を重水置換し中性子回折実験を行った。6時間露光では2.0 Åを越える回折点を確認することができた(図3)。そこで露光時間を6時間とし測定領域54.3°でデータを収集した。その結果、昨年度とほぼ同じ統計処理をすることにより、昨年度は2.3 Å分解能のデータであったが、今回1.9 Å分解能までのデータにすることができた(表1)。図3の結晶を回折実験後、X線回折実験を実施し1.4 Å分解能のデータを収集し、両回折データを用いてHIVプロテアーゼの水素・水和水を含むモデル構造の精密化を行った。その結果、R/R<sub>free</sub> = 19.3/22.2まで精密化が進み、88個のD<sub>2</sub>O分子、5個のDO分子及び50個のO原子の位置を決定することができた(図4)。

表1 昨年度(左)及び今年度(右) HIVプロテアーゼ中性子回折データの統計値

Shell					Shell				
Lower	Upper				Lower	Upper			
Limit(Å)	limit(Å)	R <sub>range</sub> (%)	I/σ(I)	Comp. (%)	Limit(Å)	limit(Å)	R <sub>range</sub> (%)	I/σ(I)	Comp. (%)
100	4.96	3.9	22.4	75.5	100.00	4.09	3.9	26.5	84.2
4.96	3.93	4.9	18.5	82.6	4.09	3.25	6.0	17.0	90.0
3.93	3.44	5.9	13.4	84.4	3.25	2.84	10.2	9.3	91.1
3.44	3.12	8.0	9.0	86.6	2.84	2.58	15.3	5.4	91.2
3.12	2.90	10.7	6.8	86.9	2.58	2.39	18.3	4.0	87.0
2.90	2.73	15.2	4.5	87.3	2.39	2.25	23.0	3.1	86.4
2.73	2.58	17.7	3.7	85.6	2.25	2.14	29.0	2.7	82.4
2.58	2.48	20.3	3.4	84.7	2.14	2.05	34.0	1.9	80.0
2.48	2.38	23.6	3.0	80.8	2.05	1.97	35.8	1.6	75.8
2.38	2.30	26.6	2.5	80.3	1.97	1.90	36.7	1.7	67.5
All hkl		8.1	7.7	83.4	All hkl		8.8	7.3	83.6

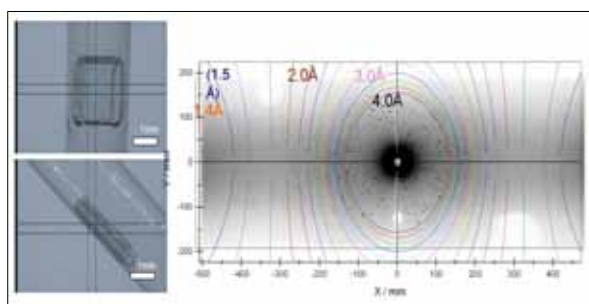


図3 軽水素HIVプロテアーゼの大型結晶(左)と中性子回折パターン(右)

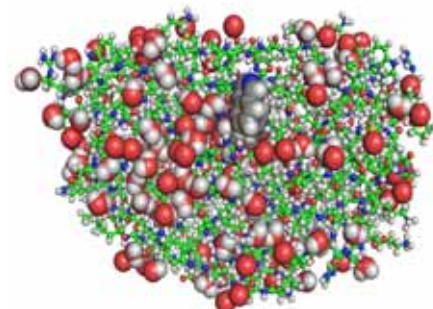


図4 水素・水和水を含むHIVプロテアーゼの構造

今後、軽水HIVプロテアーゼ結晶の中性子回折データから得られた分子モデルについて、活性部位付近の水素原子や活性残基アスパラギン酸のプロトン化の様子について評価を行う。