

# ヒトトランスサイレチンと天然物の複合体結晶構造 Crystal Structures of Human Transthyretin in Complex with Natural Products

横山武司\*

富山大学 医学薬学研究部 (薬学), 〒930-0914 富山県杉谷 2630 番地

Takeshi Yokoyama

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama, 930-0914

## 1 はじめに

トランスサイレチン(TTR)は血清に含まれるホモ 4 量体タンパク質で、ホルモン物質・サイロキシン(T4)やレチノールを運搬する役割を担っている。一方で、TTR はアミロイド性タンパク質としても知られており、特に V30M などの変異が原因である家族性アミロイドニューロパシー(FAP)は致死性の難病である。TTR のアミロイド線維はミスフォールディングを経て形成されることがわかっている。それゆえ、TTR に結合してその構造を安定化する化合物の開発は、有効なアミロイドーシス治療戦略の一つである。

本報告書では TTR アミロイド線維化阻害剤として同定した天然物のグラブリジンやフェルラ酸フェネチルエステル、およびその類似化合物と TTR 複合体結晶構造解析を網羅的に行い、原子レベルで阻害剤の構造-活性相関を見出した研究成果について記載する (図 1) [1, 2]。

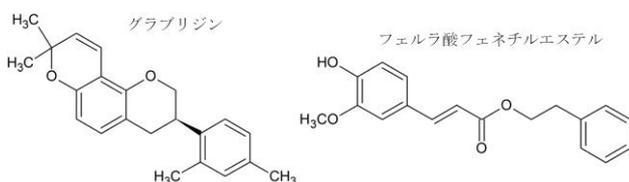


図 1: グラブリジンとフェルラ酸フェネチルエステルの化学構造。

## 2 実験

本課題では FAP 患者に最も多く見られる V30M 変異 TTR (V30M)を使用した。天然物を 1-2 mM 程度になるように TTR と混合し、共結晶化を行った。複合体結晶は[15-30% PEG400, 0.1 M HEPES pH 5-7.5, 0.2-0.4 M CaCl<sub>2</sub>]で得られ、結晶を凍結する直前に PEG400 の濃度を 30-34%にした結晶化剤に浸漬した。BL-5A, AR-NW12A, AR-NE3A で実験を行い、概ね 1.5-2 Å 分解能の回折データを得た。アポ型 V30M を鋳型として用いた分子置換法で位相を決定した。

## 3 結果および考察

グラブリジンおよび 4 種類のフェルラ酸フェネチルエステルを含むカフェイン酸誘導体と 2 種類のノ

ルジヒドログアイアレチン酸誘導体の複合体結晶構造を決定した。天然物はサブユニット界面に位置する T4 結合部位に結合していた。

グラブリジン複合体とアポ型の立体構造を比較した結果、A108 に大きな構造のずれが観測された。A108 の C<sup>β</sup>原子はグラブリジンの A リングと CH-π 水素結合を形成しており(3.7 Å)、これによってグラブリジンの結合が安定化していると考えられる。このような構造変化は他の阻害剤では観測されておらず、グラブリジンの結合に特有な誘導適合であると考えられる。また、グラブリジンは高い阻害能力を有するにもかかわらず(EC<sub>50</sub> = 6.4 μM)、V30M との水素結合が乏しく、主に疎水性相互作用によって結合していることがわかった。

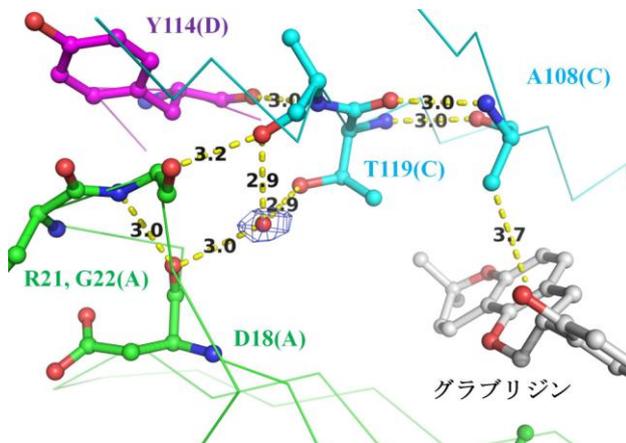


図 2: V30M-グラブリジン複合体構造。括弧のアルファベットはサブユニット名 (A-D) を記している。

フェルラ酸フェネチルエステルはカフェイン酸フェネチルエステル(CAPE)の 3-OH がメチル化した類似化合物であり、阻害効果は有意に高かった (EC<sub>50</sub> = 7.9 μM)。S117 との水素結合パターンは同じであるため、より体積の大きいメトキシ基によって相互作用面積が増加し、親和性が高いと考えられる(図 3)。また、フェネチルエステル部位は主に疎水性アミノ酸残基と相互作用していた。カフェイン酸エステル誘導体の阻害効果を調べた結果、メチルエステル→エチルエステル→ジメチルアリルエステル→ベンジルエステル→フェネチルエステルの順、つまり

体積が大きくなるにつれて阻害効果が高まった。このことは、V30M を安定化する化合物の疎水性の高さも重要な因子であることを示している。

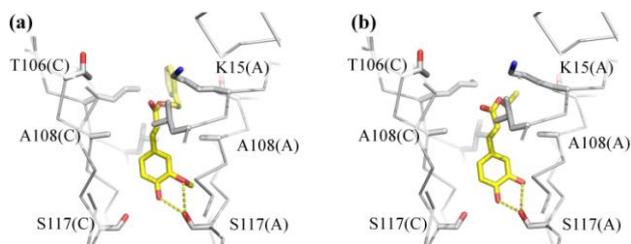


図 3 : (a) V30M-フェルラ酸フェネチルエステル、(b) V30M-カフェイン酸エチルエステル複合体の結晶構造。黄色の点線は水素結合を表している。

#### 4 まとめ

V30M-グラブリジン/フェルラ酸フェネチルエステル複合体結晶構造解析から、TTR を安定化する化合物の特徴として、疎水性の高さも重要であることがわかった。グラブリジン複合体で観測された A108 の構造変化はフェルラ酸フェネチルエステル複合体では観測されておらず、結合に伴う構造変化も化合物の構造によって異なる。本研究の結果は、疎水性相互作用を最適化することによって、より効果の高いアミロイド線維形成阻害剤を創製できる可能性があることを示唆している。

#### 参考文献

- [1] T. Yokoyama, *et al.*, *J. Med. Chem.* **57**, 1090 (2014).
- [2] T. Yokoyama, *et al.*, *J. Med. Chem.* **57**, 8928 (2014).

\* tyokoya3@pha.u-toyama.ac.jp