

# トランスサイレチンと天然物複合体の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of 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)はホルモン物質サイロキシン(T4)を運搬する血漿タンパク質である。TTR はアミロイド性タンパク質として知られており、特にアミロイド性の高い V30M や L55P 点変異は家族性ポリアミロイドニューロパシーや家族性アミロイド心筋症などを引き起こす。TTR は生理条件下でホモ四量体を形成しているが、単量体への解離およびミスフォールディングが、TTR アミロイド線維化の過程における律速段階であると考えられている。実際、T4 は TTR 四量体に結合し、四量体構造を安定化することでアミロイド線維化を阻害することが知られている。この原理はアミロイドーシス治療戦略に利用されている。臨床応用されているファイザー社のタファミディスや抗炎症薬ジフルニサルは T4 と同様に TTR 四量体に結合し、その立体構造を安定化することによって TTR のアミロイド線維化を阻害し、アミロイドーシスの進行を遅らせる。しかし、ジフルニサルは V30M などの変異キャリア患者など限定的に有効であったり (アミロイドーシスを発症する点変異は 100 種類以上報告されている)、タファミディスは薬価が高いこともあり、さらに効果の高い TTR を安定化する化合物を開発する必要がある。

著者は近年、東南アジア原産の果物マンゴスチーンの果皮に含まれる  $\alpha$ -mangostin( $\alpha$ -M)および  $\gamma$ -mangostin( $\gamma$ -M) (図 1) に TTR アミロイド線維形成阻害活性があることを発見した。本レポートでは、PF 構造生物学ビームラインを利用した、アミロイド性変異体 V30M-TTR と  $\alpha$ -M/ $\gamma$ -M 複合体の X 線結晶構造解析について報告する[1, 2]。

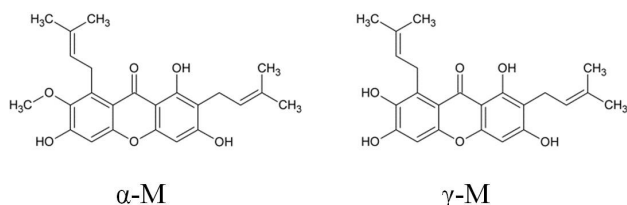


図 1 :  $\alpha$ -M と  $\gamma$ -M の化学構造

## 2 実験

$\alpha$ -M または  $\gamma$ -M が 1-2 mM になるように V30M-TTR(16.2 mg/mL)と混合して結晶化に用いた。結晶

化条件は[12-16% PEG400、0.1 M 酢酸ナトリウム pH 5.5、0.2 M 塩化カルシウム]で、ハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化した。概ね 1 週間以内に結晶が析出し、X 線回折測定に十分な大きさ(>0.2 mm)に成長した。これらの結晶を[32% PEG400、0.1 M 酢酸ナトリウム pH 5.5、0.2 M 塩化カルシウム]に浸漬することによって抗凍結化した。V30M-TTR- $\alpha$ -M および V30M-TTR- $\gamma$ -M 複合体の X 線回折測定はそれぞれ AR-NW12A および AR-NE3A で行い、最高分解能 1.4 Å、1.5 Å のデータを得た (表 1)。

表 1: 結晶データ

	V30M- $\alpha$ -M	V30M- $\gamma$ -M
空間群	$P2_12_12$	$P2_12_12$
格子定数(Å)	a=43.6 b=85.4 c=64.7	a=43.4 b=85.8 c=64.1
分解能(Å)	27.6-1.4	33.2-1.5
独立な反射点	48115	38590
重複度	5.8	6
完全性 (%)	99.3	97.7
$R_{\text{sym}}$ (%)	6	4.5
$I/\sigma(I)$	26.7	49.6
$R, R_{\text{free}}$ (%)	19.2, 23.5	18.4, 21.9
RMSD bonds (Å), angles (°)	0.015, 1.8	0.014, 1.9

## 3 結果および考察

結晶構造解析の結果、 $\alpha$ -M、 $\gamma$ -M どちらも TTR の T4 結合部位に結合することが明らかになった (図 2)。これは ANS を蛍光プローブとして用いた ANS 競合結合実験の結果と一致する[1]。TTR の T4 結合部位は結晶学的二回回転軸上に存在するため、 $\alpha$ -M や  $\gamma$ -M の占有率は 50%として精密化を行った (図 3)。 $\alpha$ -M と  $\gamma$ -M の結合位置および結合方向はほぼ同じであり、キサントン骨格が結晶学的二回回転軸に対して 45° 斜めに位置していることが特徴である。この結合方向の特徴は、二回回転軸上に平衡に結合するタファミディスとは異なっており、キサントン誘導体は新規の結合様式で TTR に結合することが明らかになった。また、TTR への結合は水分子や塩化物イオンが関係していることが明らかになった (図 4)。

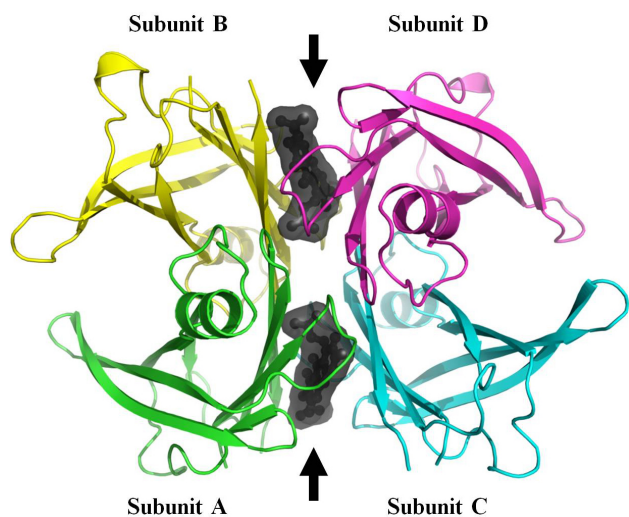


図 2 : TTR- $\alpha$ -M 複合体の結晶構造。矢印は  $\alpha$ -M を示す。

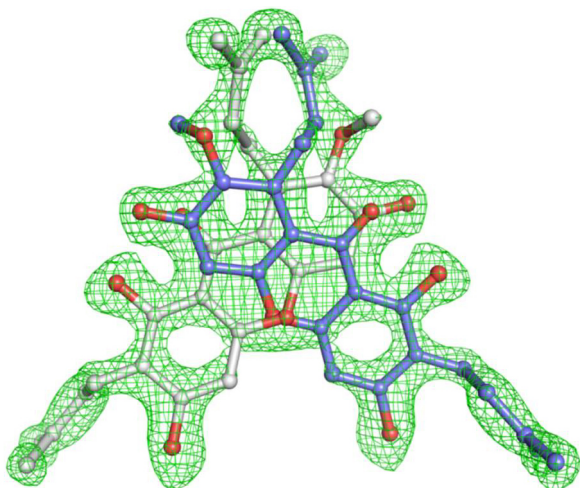


図 3 :  $\alpha$ -M のオミット差フーリエ図 (3.3 $\sigma$ )。

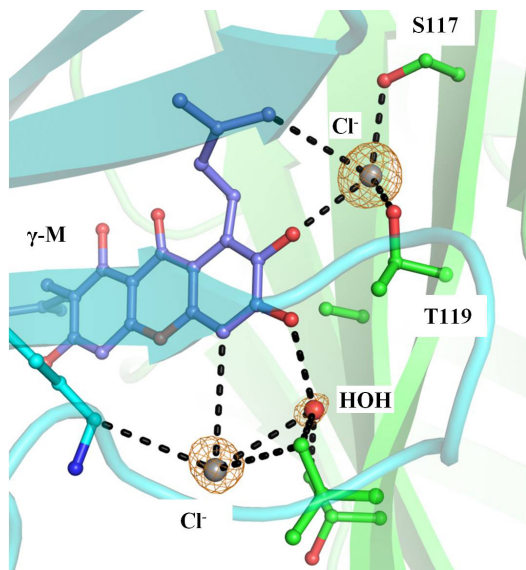


図 4 :  $\gamma$ -M と TTR の相互作用。黒点線は水素結合を表している。グレーの球は塩化物イオンを、赤い球は水分子の酸素原子を表している。

#### 4 まとめ

V30M 変異体 TTR と  $\alpha$ -M/ $\gamma$ -M 複合体の X 線結晶構造を高分解能で決定した。キサントン誘導体は既存の薬剤とは異なる結合様式で TTR に結合しており、アミロイドーシス阻害剤として新規骨格を有する化合物を同定した。

#### 参考文献

- [1] T. Yokoyama *et al.*, *Sci. Rep.* **5**, 13570 (2015).
- [2] T. Yokoyama *et al.*, *J. Pharm. Sci.* **129**, 240 (2015).

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