

# リボソーム不活性化タンパク質と新規阻害剤との相互作用解析 Interaction analysis of ribosome inactivating proteins with novel inhibitors.

須田 菜月, 久保野 愛莉, 小柳 琢, 渡辺 崇靖, 平戸 祐喜, 後藤 勝\*  
東邦大学理学部, 〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

Natsuki SUDA, Airi KUBONO, Taku KOYANAGI, Takayasu WATANABE, Yuki HIRATO,  
Masaru GOTO\*

Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

## 1 はじめに

リボソーム不活性化タンパク質 (RIP) は、真核生物におけるタンパク質合成反応の活性中心であるリボソーム RNA (rRNA) に対して *N*-グリコシダーゼ活性を持ち、リボソームを不活性化させる。RIP は多くの植物で発現しており、*in vitro* では抗菌活性、抗真菌活性、抗ウイルス活性、および殺虫活性を示し、昆虫や病原体に対する防御の役割を担っている。RIP の一種であるリシンは、トウゴマの種子から抽出される毒素であり、細胞結合性の B ドメインと *N*-グリコシダーゼ活性を持つ A ドメイン (ricin toxin A-chain : RTA) から構成される。RTA は、28S rRNA における普遍的に保存された  $\alpha$ -サルシン-リシンループの GAGA ヘアピンから、アデニン残基を特異的に切断する。RTA の活性部位は、28S rRNA の 4324 残基のアデニンが結合する第 1 ポケットと、4325 残基のグアニンが結合する第 2 ポケットで構成される。治療薬として有効な RIP 阻害剤は開発・販売されていないが、*in vitro* での RTA に対するプテリン酸の IC<sub>50</sub> は中程度の 0.6 mM であることが報告されている。プテリン誘導体は、RTA の第 1 ポケットに結合することが X 線結晶構造解析によって明らかにされている[1]。しかしながら、1 分子で RTA の両ポケットに結合する化合物はほとんど報告されていないため、本申請では、RIP 特異的な阻害剤の開発に向けて、RTA の両ポケットに結合する化合物の創生を目的として、X 線結晶構造解析の手法を用いて新規プテリン誘導体と RTA の相互作用を調査した。

## 2 実験

RTA の結晶は、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて 23°C で、10~20% PEG2000、0.2 M 硫酸リチウム、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.5 の結晶化溶液によって析出させた。プテリン誘導体(N2-(2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridine-7-carbonyl)glycyl-L-phenylalanyl-N6-((benzyloxy)carbonyl)-L-lysine, 7CP-GFKCbz)との RTA 複合体結晶は、RTA 結晶を~3.0 mM の化合物を含む結晶化溶液にソーキングするこ

とによって得た。X 線回折強度データは、BL-5A、BL-17A、NE-3A で収集した。RTA 複合体結晶は、空間群  $P4_12_12$  に属し、格子定数  $a=b=67.8 \text{ \AA}$ 、 $c=141.3 \text{ \AA}$  であった。位相は、RTA と N-(N-(pterin-7-yl)carbonylglycyl)-L-phenylalanine (PDBID : 4HUO) をサーチモデルとした分子置換法によって決定した。構造の精密化はプログラム Refmac 5 と COOT を用いて行い、最終的に 1.45  $\text{\AA}$  分解能の RTA の結晶構造を  $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.222/0.242$  の精度で得ることに成功した。

## 3 結果および考察

得られた複合体の活性部位の構造を図 1, 2 に示す。プテリン誘導体 7CP-GFKCbz のプテリン環部分は RTA の第 1 ポケットにおいて、Gly121、Asn122、Tyr123、Ile172、Arg180 と相互作用しており、これは他のプテリン誘導体で以前に観察されたものと同じ相互作用であることがわかった。これは、プテリン誘導体のペンダント基の構造にかかわらず、プテリン部分と RTA の第 1 ポケットとの結合様式が一定であることを示している。本研究では、7CP-GFKCbz の他にもさまざまな 7CP-トリペプチド誘導体についても試みたが、これらでは、トリペプチド部分の位置決定に失敗した。おそらく第 1 ポケットに収まったのはプテリン部分のみで、ペンダント部分は自由に動けたためであると考えられる。これとは対照的に、7CP-GFKCbz の場合、構造全体が同定され、特に C 末端のリジン残基上の Cbz 基が第 2 ポケットに収容されていた。これは単一の小さな有機分子が RTA 活性部位の二つのポケットを同時に塞ぐ初めての例である[2]。RTA と 7CP-GFKCbz の複合体の結晶構造を詳細に調べたところ、7CP-GFKCbz 中のフェニルアラニン残基が RTA の Trp211 残基の側鎖と T 字型の CH- $\pi$ 相互作用で結合していることが明らかになった。また、RTA 活性部位の 2 つのポケットを隔てる Tyr80 残基は、7CP-GFKCbz のフェニル基との反発により Trp211 残基の反対側に移動していた。さらに、7CP-GFKCbz 中の Cbz のカルボニル

基は、第2ポケットの「入口」にある Arg48 残基および Asn78 残基と、それぞれ水素結合を形成しており、それに応じて Cbz 基のベンゼン環は第2ポケット内に配置されていた。

#### 4 まとめ

本研究では、RTA と 7CP-GFKCbz の複合体結晶の X 線結晶構造解析により、7CP-GFKCbz は第1ポケットに強固に結合するだけでなく、RTA の活性部位の第2ポケットを塞ぐことが明らかになった。これは RTA 活性部位の二つのポケットを同時に塞ぐことができる小分子有機阻害剤のはじめての例である。

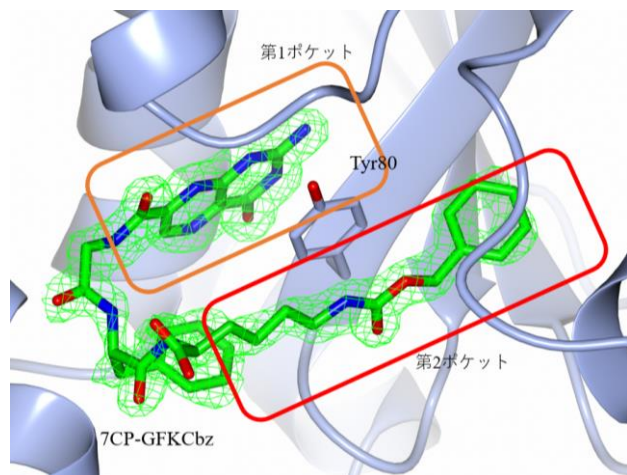


図1：RTAの活性ポケットとプテリン誘導体

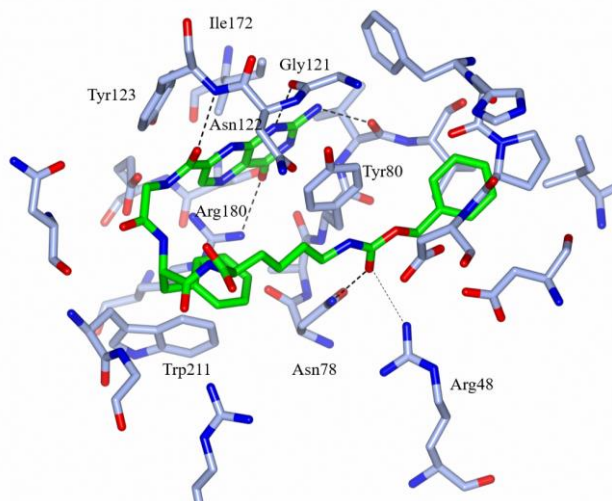


図2：RTA複合体の活性部位構造

#### 謝辞

本研究の X 線回折強度データ収集にご協力いただきましたビームラインスタッフの皆さまに感謝申し上げます。

#### 参考文献

- [1] Pruet J. M., Jasheway K. R., Manzano L. A., Bai Y., Anslyn E. V., Robertus J. D. *Eur. J. Med. Chem.* (2011), **46**, 3608–3615.
- [2] Saito R, Goto M, Katakura S, Ohba T, Kawata R, Nagatsu K, Higashi S, Kurisu K, Matsumoto K, Ohtsuka K. *PLoS One.* (2022) 17(12):e0277770.

\* goto@biomol.sci.toho-u.ac.jp