



先端研究施設共用促進事業 フォトンファクトリーにおける産業利用促進 利用報告書

課題番号： 2009I010
研究責任者： 辻 英一 キッセイ薬品工業株式会社 創薬研究部 創薬基盤研究所
利用施設： 高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設 PF AR-NE3A
利用期間： 2010年 2月～2010年 3月

ヒト由来核内受容体とリガンド複合体の結晶構造解析 Structural studies of human nuclear receptor and their ligand

辻 英一¹、岡崎 浩輔¹
Eiichi Tsuji¹, Kosuke Okazaki²

¹キッセイ薬品工業株式会社

アブストラクト：

ヒト由来核内受容体とリガンド複合体の構造解析の為のデータを AR-NE3A を利用して取得した。その結果、リガンド相互作用部位に目的とするリガンドの電子密度を確認出来た。更なる構造精密化を行い、2.4Å 分解能で構造決定した。anti-target の構造と本実験で得られた構造を比較することより、選択性獲得の為のドラッグデザインの指針を得る事が出来た。

Abstract:

Nuclear receptor has a crucial role of hormonal balances or homeostasis within an organism. Here we report the structural studies of human nuclear receptor and their ligand. Data collection was done at PF AR-NE3A beam line and determines the structure at 2.4Å resolution. The obtained structure illustrates the selectivity of binding against anti-target.

キーワード：蛋白質結晶構造解析，ドラッグデザイン

1. はじめに：

背景：核内受容体はホルモンバランスなどを含め生体内の恒常性に深く関与している。その受容体と天然リガンドとの相互作用バランスが崩れることでガンや糖尿病などの疾病を引き起こす事が知られており、この受容体への agonist, antagonist の創製は疾病の治療に大きな役割を有している。

目的：ヒト由来の 270 残基からなる核内受容体と公知のアゴニストとの複合体結晶を調整した後、複合体結晶の回折データ収集及び構造解析を行い、リガンドと蛋白の相互作用を解析する。それにより、新規リガンド創製に関する化合物設計に関する情報を取得する。

目標：PF のビームラインを利用することにより、リガンドー蛋白質相互作用が解析可能なデータを取得し、リード化合物探索を推進したいと考えている。しかし、当該蛋白質と公知リガンドとの複合体結晶は未だ得られておらず、構造情報が無い。一方で、当研究グループは PF の利用

経験が乏しく、どの程度の結晶であれば目的を達成できるようなデータが取得できるかを把握出来ていない。そこで、トライアルユースの機会を活用し、上記の課題を克服し、解析可能なデータの取得を目指したい。さらには、ビームラインの有効性、及びビームラインでの回折実験の効率性について確認したい。これらのデータは、出発母核構造の選定や、PF 利用の可否の判断等、今後の創薬プロジェクトの方向性を決める上で極めて重要な情報であり、早期に着手して明らかにしたい。

2. 実験：

(1) 利用しようとする実験手法

PF の蛋白用 BL を使用し、一定波長による複合体結晶の回折データを取得する (注)。得られたデータをもとに、PDB(Protein Data Bank)に登録されている公知の座標を基にした分子置換法による構造解析を試みる。

(2) 試料

アミノ酸 270 残基からなるヒト由来の核内受容体及び公知化合物

(3) 大きさ

約 200 ~ 400 micron.

(4) 量及び濃度

蛋白質は 4.5mg/ml の濃度である。リガンドは 10mM の濃度である。

(5) 測定

結晶は振動法で測定し、温度は吹き付け低温の -173°C の窒素気流下で実施する。

(6) 要求スペック

分解能は 2.5\AA 以上で、高角の redundancy は 5.0 以上を目指す。また、 $(I)/\sigma(I)$ も全分解能レンジにおいて 10.0 以上を目指す。

(注) リガンドの電子密度を解釈する上で、当該蛋白質とリガンド複合体の結晶の目標とする分解能は 2.5\AA 以上と想定しているが、その為には結晶はどの程度の大きさが必要で、どの程度の露光時間が必要であるかを検証したい。また、適切な実験条件が見つかった場合、全データセットを取得し、その解析結果から *in vitro* assay で既に確認されている活性の強さ、及び *anti-target* に対しての高選択性獲得の理由を考察し、初期母核構造選定の為のエビデンスを獲得したい。

3. 結果および考察：

●データ測定

(1) Crystal 1

露光時間：2.0sec

アッテネータ：Al (700 micron)

結晶の大きさ：400 micron

検出器までの距離：315 mm

振動角度： 0.5°

振動範囲： 180°

最大分解能： 2.46\AA

格子定数：a=103.537, b=62.566, c=266.974 (\AA),

$\beta=89.977^{\circ}$

空間群：C2

HKL2000 による統計値：

Total reflections: 54505

Completeness: 0.964 (0.963) overall (highest shell)

R-factor (square) = 0.109 (50 - 6.65\AA)

R-factor (square) = 0.292 (2.49 - 2.46\AA)

$(I)/\sigma(I) = 5.1$ (50 - 6.65\AA)

Average redundancy = 1.8

(2) Crystal 2

露光時間：1.0sec

アッテネータ：Al (700 micron)

結晶の大きさ：200 micron

検出器までの距離：315mm

最大分解能： 2.83\AA

当初の目的分解能に到達しなかったため、全フレームは測定していない。

●構造解析

Crystal 1 のデータを基に、構造解析を行った。

分子置換は Phaser⁽¹⁾、構造精密化は REFMAC⁽²⁾ を用いた。

結果

Resolution range: 31.28 - 2.46\AA (54468 reflections)

R/ R-free = 0.233 / 0.267

RMSD bond length (\AA): 0.004

RMSD bond angle ($^{\circ}$): 0.347

B-factor:

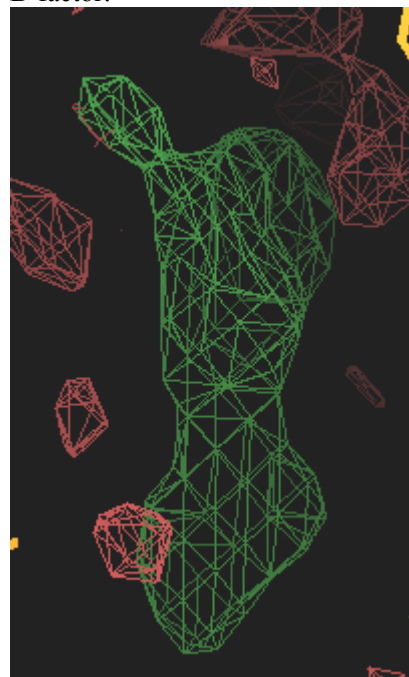


図1：リガンドの電子密度 (Fo-Fc map ; 3.0σ)

図1に示すようにリガンドの電子密度を捕らえることができ、当初の目的は達成した。また、ある特定の置換基が、*anti-target* 比較してかさ高さが違うアミノ酸側鎖部分と Van der Waals 相互作用をしている事が確認できた。これが原因で、本化合物は *anti-target* との選択性を獲得していることが推測できた。

一方、同じバッチから拾った Crystal 2 (200 micron) は、予定の分解能には届かなかった。露光時間を長く設定しても、目的とする分解能には到達しなかった。

●操作性

AR-NE3A の GUI は非常に使い易く、短時間ではあったが、効率的に実験ができた。今回は結晶も少なかったため、マニュアルマウントであったが、次回はサンプルチェンジャーも試用してみたい。

4. まとめ：

我々は本実験で得られた解析結果を，Structure-Based Drug Design による新規リガンド探索の基礎データとして活用した．創薬プロジェクトとしては初期段階の為，事業化，製品化については現時点では未定であるが，選択性獲得の為の基礎データを得ることができた．テーマの初期段階においては，様々な基本構造の違うリガンドと蛋白質複合体の構造を解析する必要がある．出発母核としてどの構造が適切であるかを選定する為には複合体の構造情報は極めて重要であり，本実験により得られた構造データは合成研究者もしくは計算化学研究者へのフィードバックを行った．今後も，PF の継続利用により高品質のデータを取得し，ドラッグデザインのスピードを加速させていきたい．

参考文献

- (1) McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. J. Appl. Cryst. (2007). 40, 658-674.
- (2) G.N. Murshudov, A.A.Vagin and E.J.Dodson, Acta Cryst. D53, (1997), 240-255.

成果発表状況：

学会及び論文発表：該当なし．

特許：該当なし．