

## 放射光と中性子を相補的に用いたヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼ-阻害剤の立体構造解析

安達 基泰<sup>1</sup>、大原 高志<sup>1</sup>、栗原 和男<sup>1</sup>、玉田 太郎<sup>1</sup>、本庄 栄二郎<sup>1</sup>、岡崎 伸生<sup>1</sup>、新井 栄輝<sup>1</sup>、  
正山 祥生<sup>1</sup>、松村 浩由<sup>2,3,4</sup>、杉山 成<sup>2,3</sup>、安達 宏昭<sup>2,3,4</sup>、高野 和文<sup>2,3,4</sup>、森 勇介<sup>2,3,4</sup>、日高 興士<sup>5</sup>、  
木村 徹<sup>5</sup>、林 良雄<sup>5</sup>、木曾 良明<sup>5</sup>、黒木 良太<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>原子力機構・量子ビーム、<sup>2</sup>大阪大学・工学部、<sup>3</sup>CREST JST、<sup>4</sup>(株)創晶、<sup>5</sup>京都薬科大学)

HIV-1 プロテアーゼはヒト免疫不全ウイルス（エイズウイルス）が産生する酸性プロテアーゼであり、Asp25 と Asp125 を触媒残基としている。HIV-1 プロテアーゼはエイズウイルスの増殖に必須であることから、エイズ治療のための創薬標的タンパク質となっている。本研究では、HIV-1 プロテアーゼとその医薬品候補分子との分子間相互作用を原子レベルで解明することを目的として、阻害剤 KNI-272 との複合体の結晶構造解析を X 線および中性子の両方の量子ビームを用いて実施した。

タンパク質の中性子回折データ収集を行うには、まず高品質な大型結晶作製のために大量のタンパク質試料が必要となる。本研究では、コドン(DNA)配列を大腸菌発現に最適化した人工遺伝子を化学合成し、その遺伝子を導入した大腸菌発現系を構築することによって、HIV-1 プロテアーゼの大量調製系を確立した。高品質の結晶作製のためには均一な試料の調製が必要となるが、逆相クロマトグラフィーを用いることで自己分解物を完全に除去した純度の高い試料を調製して結晶化を行った。結晶化は、2液バッチ法を用いることによって体積 3.6mm<sup>3</sup> の大型結晶を作製することに成功した[1]。得られた結晶を用いて JAEA の JRR-3 に設置している BIX-4 にて中性子回折データ(室温)を収集した結果、1.9 分解能の回折データを得ることができた。さらに同一条件で得られた結晶から PF6A において、1.4 分解能の X 線回折データ(室温)も収集し、中性子と X 線の両方の回折データを用いてプログラム PHENIX により立体構造を精密化した。同時精密化によって中性子と X 線の回折データを相補的に使うことで、中性子の回折データのみを用いる場合に比較して信頼度の高い精密化を行うことが可能となる。最終的に中性子のデータに対し R 値 19.3%(freeR 値 22.2%)、X 線のデータに対し R 値 17.3%(freeR 値 20.3%)まで構造を精密化し、HIV-1 プロテアーゼの中性子結晶構造解析に成功した。活性中心における水素(重水素)原子の存在と位置を確認するために  $F_o-F_c$  オミットマップを作成したところ、下図のように Asp25 のカルボキシル基がプロトン化されていることを示す顕著なピークと阻害剤のヒドロキシル基に由来する水素(重水素)原子のピークを得た。さらに、SPring-8 の BL41XU において、クライオ条件(100K)で分解能 0.93 の回折データを取得し、プログラム SHELX-97 により構造を R 値 10.4%(freeR 値 12.4%)にまで精密化した。そして、触媒残基のカルボキシル基の炭素原子と酸素原子の間の結合長を求めた結果、触媒残基の 2 つのアスパラギン酸(Asp25 と Asp125)のうち Asp25 のみがプロトン化されていることが示唆され、中性子構造解析の結果と一致した。これらの知見は、HIV-1 プロテアーゼの触媒機構の解明およびより親和性の高い医薬品候補分子の創製において重要である。現在、本研究で得られた結果を基にさらに高機能の阻害剤の検討を行っている。

[1] Matsumura H, *et al.* (2008) *Acta Crystallogr F* 64:1003-1006.

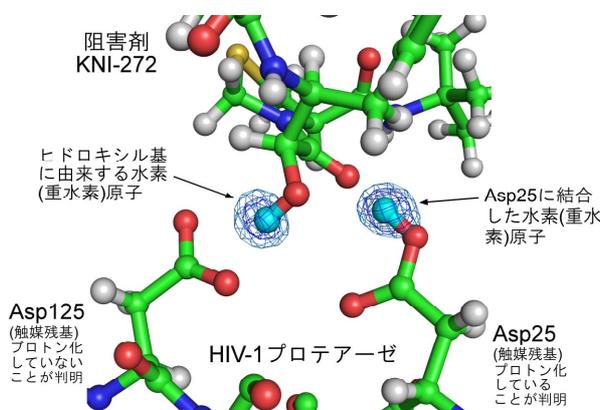


図. HIV-1 プロテアーゼの触媒中心の構造