

# 創薬標的タンパク質の中性子結晶構造解析

量子科学技術研究開発機構 玉田太郎

## 1. Introduction

中性子結晶構造解析は他の構造生物学的手法では困難なタンパク質中の水素原子の直接観察が可能という特長を有しており、その特長が医薬品設計の上で有用であることは製薬企業の構造生物学研究者にも認知はされている。しかしながら、「通常の X 線結晶構造解析の 1000 倍以上の体積の大型結晶が必要」、「1 データを収集するのに 1 週間~2 週間程度要する」という技術的ハードルの高さから製薬企業の医薬品開発ペースに乗れていない。この状況は原理的に劇的に改善することは難しい。

よって、まずはアカデミア創薬という立ち位置で、これらの技術的ハードルの軽減を目指した研究を推進しその成果を産業界ユーザーに示すことが、将来的なユーザー獲得に繋がると考える。そこで、実験責任者は内閣府の官民研究開発投資拡大プログラム「PRISM」に応募し、まずはフィージビリティースタディー (FS) として採択された。FS ではモデルタンパク質の中性子結晶構造解析を通じて、技術的ハードルの軽減と中性子結晶構造の創薬への有用性を産業界ユーザーに示すことが求められていることから、2 つの創薬標的タンパク質の中性子結晶構造解析に着手した。

## 2. Experiment

申請の段階ではモデルタンパク質としてトランスサイレチン (TTR) とシトクロム P450 (CYP) の 2 つを想定していたが、CYP については現時点では中性子回折データ収集には不十分な結晶サイズであったため、代わりに近年抗がん剤開発の創薬標的として注目を集めている分子シャペロン Hsp90 の中性子回折データ収集を実施した。Hsp90 結晶は完全重水素化試料を用いて作成しており、従来よりも小さい結晶から中性子回折データ収集を実現できれば、上述の技術的ハードル軽減を示すことが出来る。

TTR については、家族性アミロイドポリニューロパシーの原因変異である Y116S 変異体を対象とし、 $2\text{mm}^3$  程度の結晶を回折実験に供した (図 1 A)。測定は茨城県生命物質構造解析装置 (BL03/iBIX) において、1 セットあたり約 7 時間照射 ( $T_0=555400$ , 730kW 運転) で空間群  $P2_12_12_1$  として標準である計 28 セット以上を目指し、室温下で収集した。Hsp90 については、完全重水素化 Hsp90 と基質である ATP との複合体結晶を作製した。 $0.22\text{mm}^3$  の結晶を用い (図 2 A)、BL03/iBIX において 1 セットあたり約 8 時間照射 ( $T_0=648000$ , 730kW 運転) で、空間群が  $P2_1$  であるため計 35 セットを目指し、室温下で収集した。回折データ処理はいずれも解析ソフト STARGazer を用いたが、Hsp90 についてはデータのスケールリングは CCP4 パッケージの SCALA を用いた。

## 3. Results

TTR については、最終的に計 32 セットを収集できた。回折点の形状は良好 (図 1 B) で、 $1.9\text{\AA}$  分解能の回折データとして処理を行った (表 1)。Photon Factory の BL5A において同一結晶から  $1.4\text{\AA}$  分解能の X 線回折データ収集し、現在両データを用いた構造精密化を実施中である。

Hsp90 については、最終的に計 39 セットを収集できた。回折点の形状は良好 (図 2 B) で、 $2.1\text{\AA}$  分解能の回折データとして処理を行った (表 2)。Photon Factory の BL5A において同一結晶から  $1.5\text{\AA}$  分解能の X 線回折データ収集し、現在両データを用いた構造精密化を実施中である。X 線回折データからは基質である ATP (実際には 1 つ脱リン酸化した ADP) の明瞭な電子密度が確認できた。しかしながら、中性子回折データにおいてはいくつかのデータセットに問題が見られた。原因としては装置由来と結晶由来の双方があげられ、後者については結晶格子の長さの変化 (b 軸が  $1.5\text{\AA}$  程度) に寄ると考えられる。b 軸が異なる 4 データセットを除くと R 値は 5%程度改善した (表 2 右カラム)。

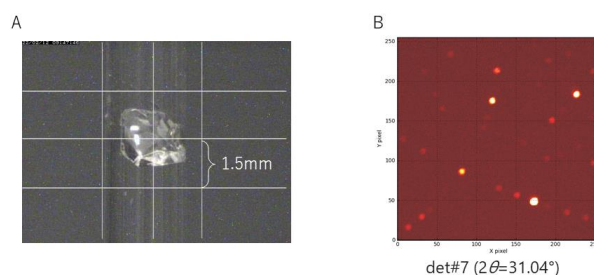


図1 中性子回折実験に供したTTRの結晶 (A) と回折イメージ (B)

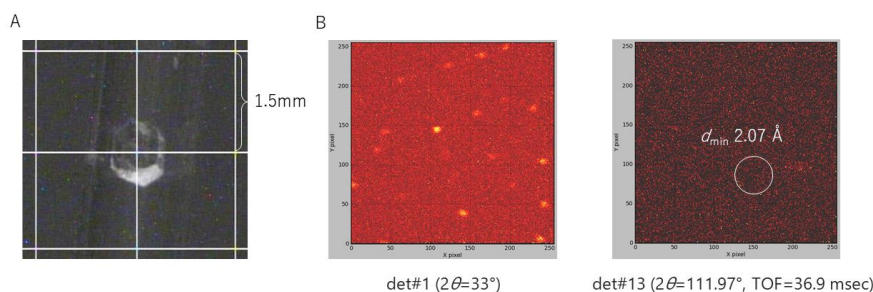


図2 中性子回折実験に供したHsp90/ATP複合体の結晶 (A) と回折イメージ (B)

表1 TTRの中性子回折データ (統計値)

No. of data set	31 (#24494-24528)
Space group	$P2_12_12_1$
Unit cell $a, b, c$ (Å)	86.0, 43.4, 66.9
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0
Resolution (Å)	22.5-1.90 (1.97-1.90)
Observed	142416
Unique	20269
Completeness (%)	99.2 (98.9)
$\  \sigma(I) \ $	14.1 (2.3)
$R_{int}$ (%)	16.2 (73.5)
$R_{\sigma}$ (%)	6.5 (34.9)
Wavelength (Å)	2.63-6.06

表2 Hsp90/ATP複合体の中性子回折データ (統計値)

No. of data set	38 (#24639-#24680)	34 (#24643-#24680)
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell $a, b, c$ (Å)	54.4, 42.5, 54.9	54.4, 42.5, 54.9
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 116.3, 90.0	90.0, 116.3, 90.0
Resolution (Å)	21.3-2.10 (2.18-2.10)	19.5-2.10 (2.18-2.10)
Observed	65174	58295
Unique	13111	13012
Completeness (%)	98.5 (98.4)	97.8 (97.4)
$\  \sigma(I) \ $	10.3 (2.4)	9.9 (2.4)
$R_{int}$ (%)	30.6 (75.8)	25.4 (71.9)
$R_{\sigma}$ (%)	15.6 (40.6)	13.9 (40.7)
Wavelength (Å)	2.63-6.06	2.63-6.06

#### 4. Conclusion

TTR、Hsp90 の双方で構造解析可能な回折データ収集に成功した。また、Hsp90 については完全重水素化試料を用いることで、従来よりも小型の結晶から中性子構造解析が可能なデータを収集できることを示すことができた。今後、構造精密化を進め、解析結果を国際誌に発表するとともに産業界にも広くアピールすることで中性子利用を促進していきたい。なお、今回の実験結果も踏まえ、今年度 PRISM の本申請を行い採択に至った。実験機会を与えていただいたことに感謝したい。