(MS71) 薬物標的へのリガンドの結合を計測する 生物物理学的手法

Vernalis / U York Roderick E. HUBBARD

副座長：エーザイ株式会社創薬研究本部 川上善之

Roderick E. HUBBARD and Yoshiyuki KAWAKAMI: (MS71) Biophysical Techniques for Detecting Ligand Binding to Pharmaceutical Targets

タンパク質の構造解析は薬物分子設計に多くの情報を与えることから創薬プロセスにおいて Structure-Based Drug Discovery (SBDD) の基盤技術として定着している。また、国内研究開発型製薬企業の多くは「つくば構造生物産業利用推進共同体 (KEK)」と「蛋白質構造解析コンソーシアム (日本製薬工業協会)」に参加して Photon Factory や SPring-8 を使ってタンパク質構造解析を行っている。最近では SBDD 手法の 1 つとしてフラグメントアプローチ (FBDD) という方法が急速に広がってきている。これは標的タンパク質の鍵穴の一部に結合するフラグメント分子を探し、異なる部位に結合するフラグメント同士を合成的につなぎ合わせることで鍵穴全体にフィットして強い結合親和性をもつ化合物を探索する方法である。FBDD により得られる化合物は分子量が小さく、そのため構造修飾の範囲が広くなり、構造最適化しやすい特徴をもつ。

SBDD の主な段階は 1) 標的タンパクに結合する低分子化合物を見出す (ヒット確認), 2) どのようにヒット化合物が標的に結合しているのか特徴付けていかにヒット化合物をよりよくするかという考えを展開し (ヒットからリードへ), 3) 薬として最適な性質をもつように合成展開する (リード最適化), という過程である。ここ 10 年以上, X 線結晶構造解析法によるタンパク構造決定は上に述べた 3 つすべての段階でますます有効となってきている。結晶構造は結合部位と相互作用様式の精巧で詳細な情報を与える。しかし, X 線結晶構造解析は化合物スクリーニングのように多くの化合物に関してルーチンに解析できる方法ではない。そこで NMR や表面プラズモン共鳴法 (SPR), 質量分析法といった生物物理学的手法が相補的に使われるようになった。すなわち, それらの生物物理学的手法が低分子フラグメントを含む化合物のスクリーニングに使われたり, タンパクとリガンドの結合部位や, ときには結合の配向, 結合のオン・オフレートに関して速度論的解析などが行われている。

このセッションでは FBDD を含む SBDD の実際や生物

物理学的手法の利用などについて 5 人の演者に講演してもらった。

MS.71.1 X-ray structural analysis and biophysical assays in drug discovery

Armin Ruf, F. Hoffmann-La Roche Ltd.

メガファーマの 1 つであるロッシュにおいて SBDD は化学合成展開における薬物設計をリードしている。DPP-IV 阻害剤の開発では, 最初に発見した非常に弱い活性しかもたない化合物を SPR と X 線結晶構造解析の構造情報活用により 10 万倍の活性増強に成功した。また, β セクレターゼ阻害剤の FBDD では, フラグメント分子を SPR によりスクリーニングし, X 線結晶構造解析により結合様式を解析して, 計算化学を駆使した結果, 非常に有望なリード化合物を得た。

MS.71.2 Studies of protein-protein and protein-RNA complexes by mass spectrometry

Satoko Akashi, Yokohama City University

エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) は非共有結合性の高分子複合体の分子サイズを測定できることはもちろんだが, 結合定数も決定できる。この発表では RNA とタンパクリガンドとの複合体について構造解析した結果で, ESI-MS 法がほかの方法よりも優っている点について示した。内容については講演者の記事を参考にされたい。

MS.71.3 Characterising protein-ligand binding in support of structure-based drug discovery

Roderick E. Hubbard, Vernalis

ベンチャー企業であるヴァーナリス社では FBDD を中心に新薬探索を行っている。SPR と NMR により標的酵素の活性部位に結合するフラグメント分子を得た。それを X 線結晶構造解析により詳細な結合様式の分析を行い, バーチャルスクリーニングにより合成展開を行った。得られたリード化合物は分子量 250 以下で構造多様性をもっていた。この低分子量リード化合物から結合親和性が高く, 選

択性のある、薬らしい化合物への構造最適化は従来のSB-DDよりも効果的で、タンパク質ファミリー内の選択性獲得においてもよい結果が得られた。

MS.71.4 Mechanism of the cofactor-less urate oxidase : X-ray structures with molecular oxygen or cyanide

Laure Gabison, Universite Paris Descartes

Urate oxidase (UOX) の触媒機構は尿酸を 5-hydroxyisourate (5-HIU) に水酸化するときコファクターも金属イオンもなくただ分子状酸素のみで酵素触媒として働くということが非常に興味をもたれている。純粋酸素下で拮抗阻害剤との UOX 複合体結晶構造は hydroperoxyisourate 中間体で提唱された分子状酸素の存在位置と同じであった。さらに、尿酸様阻害剤との複合体の結晶構造の解析で、尿酸モノアニオンから生成されるプロトンが水分子の活性化に

関与することがわかった。

MS.71.5 Flavopiridol binding to P-TEFb (CDK9/cyclin T1)

Louise N. Johnson, Diamond Light Source

白血病治療剤として開発中の Flavopiridol は cyclin dependent protein kinase (CDK) の非選択的阻害剤として知られている。最近の研究で CDK の中でも CDK9 阻害作用はほかの CDK に比べて 10 倍以上強いことがわかってきた。演者らは Flavopiridol と CDK9/cyclin T1 との複合体結晶構造解析に成功し、Flavopiridol が CDK9 の ATP 結合部位に予期しない構造変化を起こしていることを発見した。すなわち、阻害剤が入り込むことで protein kinase の glycine rich loop に構造変化を引き起こしたものである。ほかの protein kinase への阻害様式との違いから CDK9 への強い阻害活性の説明ができた。

質量分析によるタンパク質—タンパク質およびタンパク質— RNA 複合体の構造研究 — X 線結晶構造解析と質量分析で見えてくる 生体超分子の構造— (MS71)

講演者：横浜市立大学大学院国際総合科学研究科

明石知子, 渡邊真宏, Jonathan G. HEDDLE, 雲財 悟, 朴 三用, Jeremy R. H. TAME

Satoko AKASHI, Masahiro WATANABE, Jonathan G. HEDDLE, Satoru UNZAI, Sam-Yong PARK, and Jeremy R. H. TAME: Studies of Protein-Protein and Protein-RNA Complexes by Mass Spectrometry (MS71)

生命現象は、複数のタンパク質や核酸分子からなる複合体である生体超分子によって高次に制御されており、これら生体超分子の構造と機能を明らかにすることは生命現象の解明につながる。そのため、生体超分子の原子レベルでの構造研究が X 線結晶構造解析や NMR を用いて盛んに行われている。しかしながら、生体超分子の構造生物学において質量分析 (MS) がきわめて大きな役割を果たすことはあまり認識されていない。われわれは、X 線結晶構造解析と超遠心分析に加えナノエレクトロスプレーイオン化質量分析 (nanoESI-MS) を駆使することで、リガンドが結合し活性型となったタンパク質が、ターゲットである RNA と形成する複合体、およびその活性を制御するタンパク質と形成する複合体の全体像について構造解析を行った。

Bacillus 属のバクテリアでは、トリプトファン (Trp) の細胞内濃度の変化に対応して、*trp* RNA binding attenuation

protein (TRAP) と anti-TRAP (AT) という 2 つのタンパク質で Trp の生合成を制御している。細胞内の Trp 濃度が上昇すると、TRAP は Trp が結合して活性化され、Trp 生合成にかかわる酵素群をコードする *trp* オペロンの mRNA に結合して Trp の生合成を抑制する。逆に、Trp 濃度が減少すると、AT が TRAP に結合して TRAP と mRNA との結合を阻害することで Trp 生合成を促進させる。TRAP は 8.4 kDa のポリペプチドで、Trp の結合した 11 量体 (91 kDa) の構造およびそれと RNA との複合体の構造がこれまでに明らかになっている。anti-TRAP は 5.7 kDa のポリペプチドで、3 量体が 4 つ会合した 12 量体 (68 kDa) の構造がこれまでに解かれている。しかしながら TRAP-AT 複合体の構造はこれまでに報告されていなかった。われわれは、*B. stearothermophilus* TRAP (wild-type (wt) および mutant) と AT との複合体について、X 線結晶構造解析で構造を決定した。その過程において、nanoESI-MS がこのような巨大

な生体超分子複合体の構造機能解析においてきわめて重要な役割を果たすことを見出した。

1. 実験

大腸菌発現系で調製した wt および mutant TRAP (T3A7 ; wt TRAP 3 分子を Ala 7 残基からなる 2 本のリンカーで直列につないだ 3 量体 TRAP) と AT を実験に用いた。ESI-MS の測定は、ナノスプレーイオン源を装着した Q-Tof2 (Waters) で行った。

2. 結果

試料を酢酸アンモニウム水溶液に透析し、nanoESI-MS に供して実験したところ、以下のような結果が得られた。

(1) wt TRAP および T3A7 の nanoESI-MS

wt TRAP および T3A7 とともに X 線結晶構造解析で解かれている構造 (wt TRAP は 11 量体, T3A7 は 12 量体) と矛盾のない質量が得られた。wt TRAP のマスペクトルでは 12 量体の存在を示すごく弱いイオンも合わせて観測された。

(2) TRAP-RNA 複合体の nanoESI-MS

T3A7 は wt TRAP に比べ凝集しやすかったものの、Trp 存在下 55 mer RNA (11 GAGAA repeats) と混合することで、wt TRAP 11 量体および T3A7 12 量体とも 55 mer RNA と 1 : 1 で結合することを示すマスペクトルが得られた。

(3) AT の nanoESI-MS

AT は、報告されている結晶構造のとおり、pH6.8 ではモノマー当たり 1 つの Zn^{2+} を抱えて 3 量体を形成し、さらにそれが 4 つ会合した 12 量体として検出された。

(4) TRAP-AT 複合体の nanoESI-MS

TRAP-AT 複合体の X 線結晶構造解析の結果、wt TRAP および T3A7 いずれの場合でも TRAP 12 量体と AT 3 量体 6 つで構成される複合体の構造が決定された。また超遠心分析では TRAP1 リング (11 量体 (wt), 12 量体 (T3A7))

当たり 6 モル等量の AT 3 量体で複合体の形成が完了することが示唆された。そこで TRAP 1 リング当たり 6 モル等量の AT 3 量体を混合し、nanoESI-MS の測定を pH6.8 で行ったところ、wt TRAP では異なるストイキオメトリーをもつ少なくとも 4 種類の TRAP-AT 複合体 (TRAP11 量体 + AT15 分子, TRAP11 量体 + AT12 分子, TRAP11 量体 + AT9 分子, TRAP12 量体 + AT18 分子) が存在するのに対し、T3A7 では X 線結晶構造解析で解かれたものと同じ 1 種類のストイキオメトリー (TRAP12 量体 + AT18 分子) をもつ複合体のみが観測された。また wt TRAP-AT 複合体で観測された各イオンの強度は、TRAP11 量体 + AT15 分子が最も強く、TRAP12 量体 + AT18 分子が最も弱かった。

3. 考察

溶液ではさまざまなストイキオメトリーをもつヘテロな状態の複合体であっても、X 線結晶構造解析に必要な結晶化の過程では、対称性がよくパッキングしやすい構造の複合体のみが選別・結晶化され、構造解析で明らかになった構造は wt TRAP および T7A3 とともに、TRAP 12 量体と AT 3 量体 6 つの複合体のみであったと考えられる。また wt TRAP 単独の nanoESI-MS ではほとんどが 11 量体を示していることから、複合体の結晶化において、wt TRAP は一部が 11 量体から対称性のよい 12 量体へ形を変えて AT との複合体を形成した可能性も否定はできない。これらの結果は、巨大な生体超分子複合体の構造解析で得られる結果を理解し生体超分子の機能を解明する場合、X 線結晶構造解析のみの情報、あるいは ESI-MS だけの情報では構造機能解析を行うには不十分であり、両者を組み合わせることで生体超分子の機能とメカニズムを正しく理解することができ、生命現象の解明につながることを示すものである。