

Molecular Grabber 新結晶スポンジ法の開発 タンパク質で化合物の構造解析という新発想

松本 崇*, 山野 昭人*, 中島 良介**, 西野 邦彦**

1. はじめに

新規有機化合物の分子構造を決定するうえで、単結晶X線構造解析は最も強力な手法の一つである。分子構造の決定は、分子設計の最適化だけでなく、薬物候補とその代謝物の特定や合成プロセス中の不純物の構造決定にも使用できるため、医薬品、農薬、香料等の開発において非常に有用な分析手法である。その有用性の反面、単結晶X線構造解析は目的化合物の結晶を必要とする。結晶を得るためには、試行錯誤を繰り返さなければならないため、大量の高純度な化合物が必要となる。しかし、中には多大な労力を費やしても、単結晶X線構造解析に耐え得る質の結晶が得られないこともあり、この場合、構造決定を断念せざるを得ない。装置やソフトウェアが発達した今日では、単結晶X線構造解析の最大の障壁は、化合物の結晶化と言っても過言ではない。この化合物の結晶化が不要となれば、単結晶X線構造解析はさらに広い分野で使われる分析手法になると考えられる。この化合物の結晶化を

不要とした技術が、結晶スポンジ法である⁽¹⁾。

結晶スポンジ法は、金属イオンと有機架橋配位子が自己組織化により集積したMetal-Organic-Framework, いわゆるMOFと呼ばれる細孔性結晶を利用する。目的化合物をMOFの空孔へソーキングにより浸み込ませ、多孔性ネットワーク内で配向させることにより構造決定を行うという手法である。2013年に東京大学の藤田誠教授らによるNatureへの報告以降、世界中で研究・分析が行われており、従来法ではあきらめざるを得なかった多くの未知化合物の構造が、結晶スポンジ法により決定されている。しかしながら結晶スポンジ法にもいくつかの制限があり、適応できない化合物も存在する。このため、異なるタイプの結晶スポンジを使用し、補い合うことが必要と考えられる。

これまで結晶スポンジ法は、化合物の“容れ物”としてMOFを使用してきたが、複数の化合物と結合する能力を持つ容れ物を用意できれば、必ずしもMOFでなくても良いのではないかというアイデアが浮かん

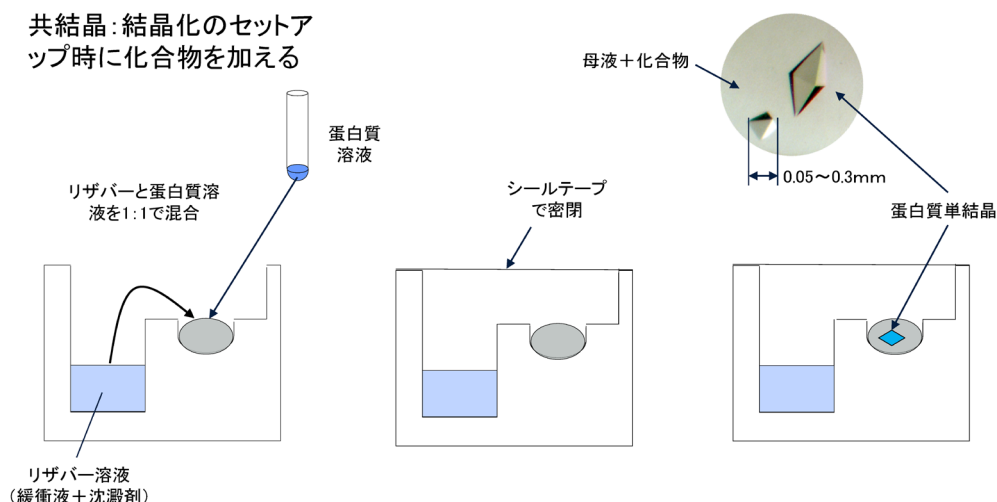


図1. シットティングドロップ蒸気拡散法。

* 株式会社リガク 応用技術センター

** 大阪大学 産業科学研究所

できた。そこで、目を向けたのがタンパク質である。タンパク質の中には、アニオン性、カチオン性、両性イオン性および中性の化合物等、様々な有機化合物に対して親和性を持つものがある。そこで、タンパク質結晶を用いた有機化合物の分子構造決定手法の確立に着手した⁽²⁾。

2. “容れ物”としてのタンパク質の選定

容れ物として使用するタンパク質は、結晶スポンジ法として使用するため、複数の化合物と結合する能力を持つことが必須である。さらに、このタンパク質には、安定であること・大量に調整ができること・高分解能での構造解析が可能な結晶が得られることが求められる。そこで、これらの要件を満たすタンパク質を探索した結果、転写因子であるRamRが最適であると考えた⁽²⁾。RamRは多剤耐性菌の多剤排出タンパク質であるAcrABの発現を制御するタンパク質であるため、多種多様な化合物を補足する結合ポケットを備えている。この結合ポケットは、複数の荷電性アミノ酸と疎水性アミノ酸で構成され、各化合物は異なる組み合わせのアミノ酸と相互作用する。さらに、RamRは大量発現・精製が容易で、高分解能に回折する結晶を得るための結晶化条件が確立しており、新規結晶スポンジ法の“容れ物”として求められているすべての要件を満たしている。これらの理由から、RamRが新規結晶スポンジ、すなわち未知化合物の“容れ物”として最適であると考えた。

3. 実験方法

3.1. 化合物の導入及び共結晶化

目的化合物のRamRへの導入には、あらかじめ準備した結晶に後から化合物をしみこませる“ソーキング法”ではなく、あらかじめタンパク質と化合物を混合後に結晶化を行う“共結晶化法”を使用した。目的化合物をRamRの濃縮液の中へ添加し、一晚静置した。静置後のRamR-目的化合物混合液を用いて、25°Cでのシッティングドロップ蒸気拡散法(図1)で結晶化を行ったところ、約1週間でRamR-目的化合物複合体の結晶が析出した。結晶化条件は、再現性の良い下記の2種類を採用した。2種類しか使用しないため、消費する目的化合物量を最小限に抑えることが可能である。

- ①10%–15% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 3350,
0.2 M ammonium sulfate,
0.1 M sodium citrate pH 5.6
- ②15%–20% (w/v) PEG3350,
0.2 M sodium acetate,
0.1 M 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES)-Na pH 6.5

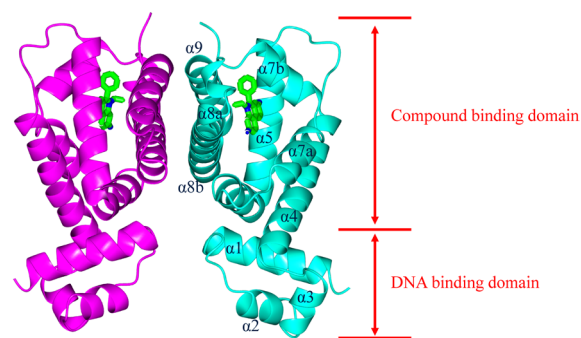


図2. RamRの分子構造。

DNAと結合する“DNA binding domain”と化合物と結合するポケットを持つ“Compound binding domain”の2つのドメインからなる。

3.2. 測定及び構造解析

一般的に、タンパク質結晶のX線回折データの測定には、放射光が必須と考えられており、実験室系X線装置はもっぱら放射光で測定する結晶を選別するための予備測定用と考えられている。しかしながら、X線発生装置、検出器、ゴニオメーター、ソフトウェアなどの要素技術は飛躍的に進化しており、最新技術を組み合わせたXtaLAB Synergyでは、タンパク質結晶の測定も十分可能である。本実験でのすべての測定は、X線源に超高輝度X線発生装置FR-Xを用いたXtaLAB SynergyCustomで実施した。

RamRの構造は既知であるため、各RamR-目的化合物複合体の構造解析には、最も簡易な位相決定法である分子置換法を使用した。

4. 検証結果

4.1. RamRの構造

RamRは $\alpha 1$ – $\alpha 9$ の9つの α ヘリックスを持ち、N末の $\alpha 1$ – $\alpha 3$ からなるDNA結合ドメインとC末の $\alpha 4$ – $\alpha 9$ で構成される化合物結合ドメインの2つのドメインで構成されている。この化合物結合ドメインの中央に化合物が結合する結合ポケットが存在している(図2)。

4.2. エチジウム複合体

最初に、RamRの基質として有名なエチジウムとの複合体の構造解析を実施した。エチジウムは、DNAの染色剤として使用されており、分子生物学者には馴染み深い化合物である。分子置換法による構造解析の結果、図3に示すように結合している化合物の電子密度図がはっきりと浮かび上がった。この電子密度の形より、間違いなくエチジウムであるということが分かった。このRamR-エチジウム複合体では、各RamR単量体あたり1つのエチジウムが結合していた(図4)。エチジウムは、RamRのPhe155と平行に位置しており、RamR-エチジウム間で π - π 相互作用が形成されていると考えられた。また、 π - π 相互作用以外にも、図4に示したアミノ酸残基とエチジウム間で複数の水素

Camera length (mm)	40
Exposure time (sec.)	25
Resolution (Å)	Inf. - 1.70 (1.76 - 1.70)
Rint (%)	7.2 (35.0)
Completeness (%)	98.7 (95.8)
R-factor / R-free (%)	16.85 / 23.48

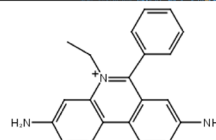
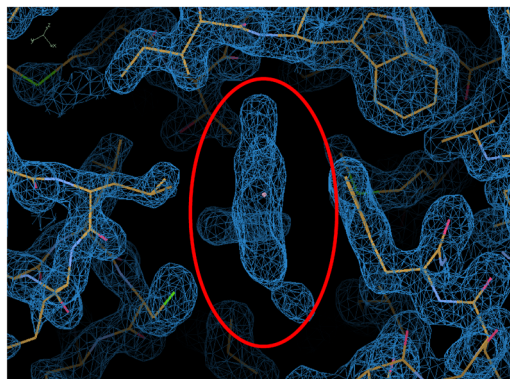


図3. エチジウムの解析結果.

1.70 Åでの測定・解析に成功し、右図のエチジウムに相当する明確な電子密度が現れた.

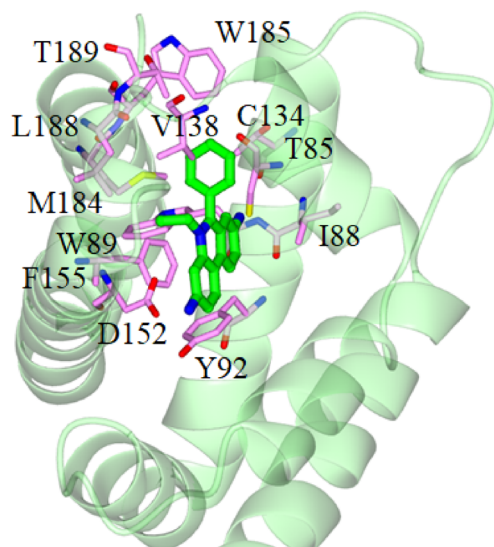


図4. 結合ポケット内のエチジウム.
エチジウムとの結合の鍵となるアミノ酸を桃色で示した.

結合が形成されており、RamRとエチジウムがしっかりと結合していた.

4.3. ローダミン6G, クリスタルバイオレット, ベルベリン複合体

Yamasakiらが行った、数種類のRamR-基質複合体(ローダミン6G: PDB code 3VVZ, クリスタルバイオレット: PDB code 3VW1, ベルベリン: PDB code 3VW2)の構造解析結果⁽³⁾を図5に示す. 各化合物はエチジウムとの複合体の時と同様に、Phe155と平行に位置しており、 π - π 相互作用が形成されていると考えられた. しかし、他の結合に関しては、各化合物でエチジウムと異なるアミノ酸残基の組み合わせが用いられていた. このように、化合物毎に作用するアミノ酸残基が異なる結合様式は、マルチサイト結合メカニズムと呼ばれる. RamRは、このマルチサイト結合メカニズムを持つことで、多種多様な化合物との結合を達成しているといえる.

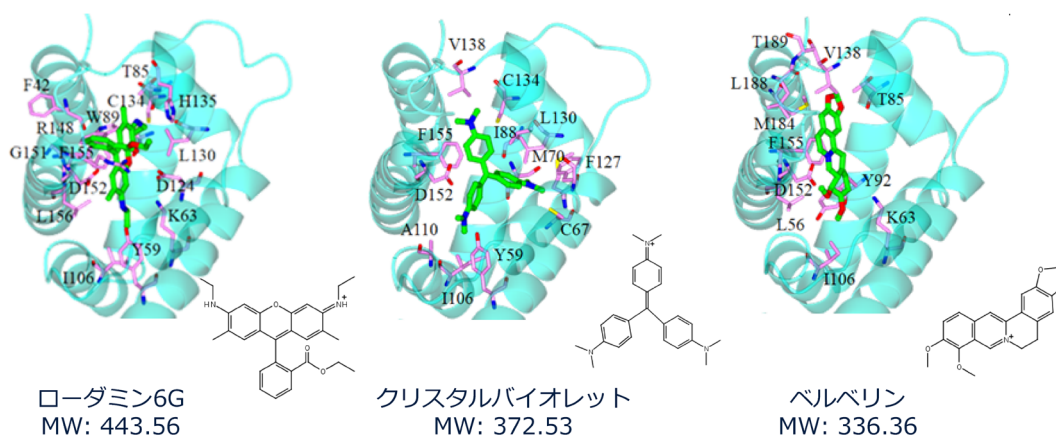


図5. 結合ポケット内のローダミン6G, クリスタルバイオレット, ベルベリン.
各化合物との結合の鍵となるアミノ酸を桃色で示した.

Camera length (mm)	40
Exposure time (sec.)	29
Resolution (Å)	Inf. - 1.55 (1.61 - 1.55)
Rint (%)	3.1 (47.1)
Completeness (%)	99.5 (97.6)
R-factor / R-free (%)	14.61 / 20.38

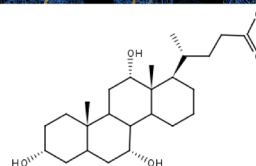
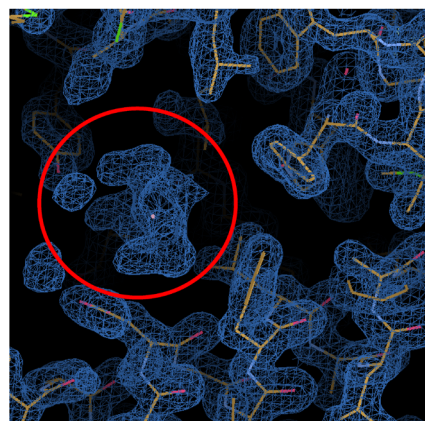


図6. コール酸の解析結果.

1.55 Åでの測定・解析に成功し、右図のコール酸に相当すると思われる明瞭な電子密度が現れた.

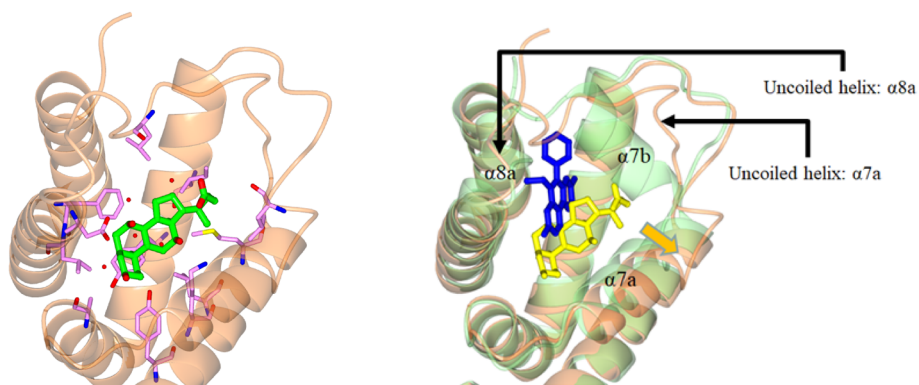


図7. 結合ポケット内のコール酸.

コール酸の結合の鍵となるアミノ酸を桃色で示した. $\alpha 7b$ と $\alpha 8a$ の2つのヘリックスが構造変化を起こしてループとなり、さらにこのループが分子の外側にシフトすることにより、結合ポケットのサイズを拡張していた.

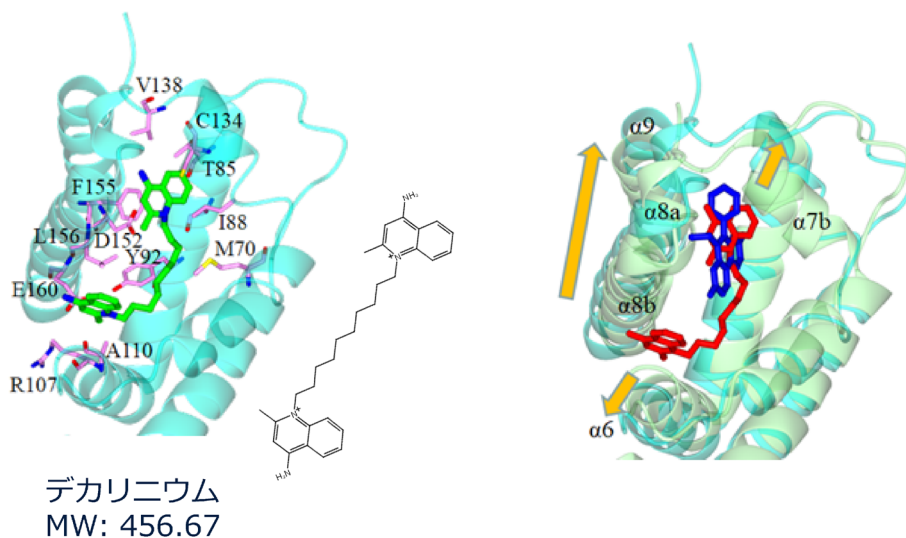


図8. 結合ポケット内のデカリニウム.

結合ポケット内のデカリニウムとの結合に関与するアミノ酸を桃色で示した. $\alpha 6$, $\alpha 7b$, $\alpha 8a$, $\alpha 8b$, $\alpha 9$ が分子の外側へシフトすることにより、ポケットが細長く変形していた.

Camera length (mm)	40
Exposure time (sec.)	45
Resolution (Å)	Inf. – 2.20 (2.28 – 2.20)
Rint (%)	9.7 (46.1)
Completeness (%)	99.3 (99.0)
R-factor / R-free (%)	21.96 / 29.92

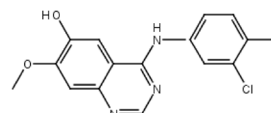
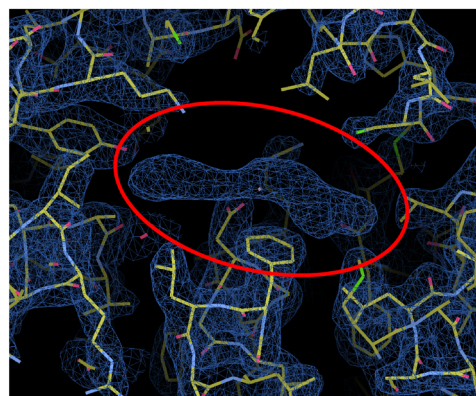


図9. Gefitinib Intermediate 1の解析結果.

2.20 Åでの測定・解析に成功し、右図のGefitinib Intermediate 1に相当する明瞭な電子密度が現れた。電子密度の形から平面構造であることが分かった。

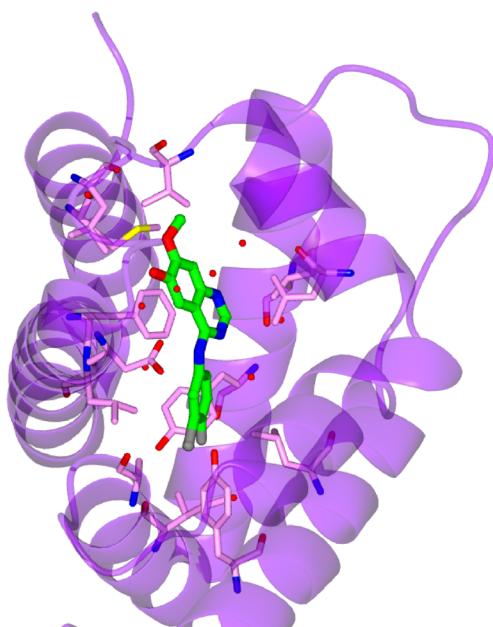


図10. 結合ポケット内のGefitinib Intermediate 1.
Gefitinib Intermediate 1との結合の鍵となるアミノ酸をピンク色で示した。

4.4. コール酸複合体

次に、一見するとRamRの結合ポケットに収まらない大きさと形状を持つコール酸がRamRへ結合するのかを試した。コール酸は、ステロイド骨格をもつ分子量が408の化合物であり、消化液の成分として脂質の消化吸収を助けることで知られている。RamR-コール酸複合体結晶では、1.55 Åという高分解能のデータ収集に成功し、構造解析の結果、図6に示すように、結合しているコール酸に対応する鮮明な電子密度が現れた。図7より、結合ポケットの複数のアミノ酸残基が手を伸ばすかのようにして、大きく剛直なコール酸と

結合しているのが明らかとなった。コール酸は、エチジウムと異なり、 π - π 相互作用を介さず、水素結合と結合ポケットとの疎水性相互作用により結合していた。

エチジウム複合体とコール酸複合体の構造を比べたところ、驚くことに、結合ポケットを形成するヘリックスに大きな違いが見られた。通常ヘリックスを形成している $\alpha 7b$ と $\alpha 8a$ の2つのヘリックスがほどけループとなっていた。さらにこのループが分子の外側にシフトすることにより、結合ポケットのサイズを拡張することで、大きく剛直なコール酸を収容していた。この解析結果より、RamRの結合ポケットは柔軟性を持ち、結合ポケットの大きさすらも変化させることが分かった。

4.5. デカリニウム複合体

Yamasakiらが解析したRamR-デカリニウム複合体(PDB code 3VW0)⁽³⁾を図8に示す。長く柔軟な炭素数10の直鎖アルカンを持つデカリニウムを収納するために、RamRは、結合ポケットを形成している $\alpha 6$, $\alpha 7b$, $\alpha 8a$, $\alpha 8b$, $\alpha 9$ を分子の外側へシフトさせ、ポケットを細長い形に変形することにより、デカリニウムと結合していた。この結果より、RamRはヘリックスの位置を再配置させることでも、結合ポケットの形状を柔軟に変化させ、化合物の形へ最適化する事が可能であることが示された。

4.6. 構造未知化合物：Gefitinib Intermediate 1

ここまで様々な化合物の構造をRamR結晶を用いて構造を明らかにしてきた。最後に、構造が未知の化合物の構造解析について紹介する。Gefitinib Intermediate 1は抗ガン剤で有名なゲフィチニブの合成中間体であるが、その立体構造は未だ明らかになっていなかった。そこで、RamRを用いた手法で構造解析ができる

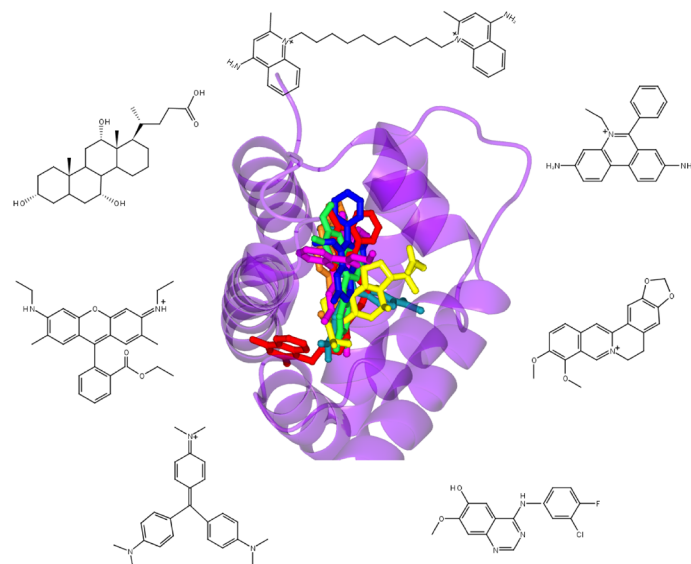


図11. RamRに結合した化合物の重ね合わせ。
結合ポケット内のエチジウム, ローダミン6G, クリスタルバイオレット,
ベルペリン, コール酸, デカリニウムおよびGefitinib Intermediate 1を示す。

かを試みた。その結果図9に示すように、結合している Gefitinib Intermediate 1 の電子密度が現れた。この電子密度より、Gefitinib Intermediate 1 は平らな構造を持つ化合物であるということが明かとなった。図10に示すように Gefitinib Intermediate 1 は Phe155 との π - π 相互作用及び Tyr59 および Asp152 と水素結合で RamR と結合していた。

さらに驚いたことに、Gefitinib intermediate 1 は、エチジウムやコール酸と比べて、1/10 モル濃度という低濃度しか加えていないにもかかわらず、Gefitinib intermediate 1 は RamR にしっかりと結合していることが明らかとなった。この結果より、RamR は有機化合物と結合した分子が優先的に結晶化することが示唆された。このことは、限られた量の未知有機化合物試料に対しても、RamR を用いた新しい構造解析法が有効であることを示している。

5. おわりに

RamR は、結合ポケットを変形させるだけでなく、そのサイズをも拡張させる柔軟性を持ち、さらにマルチサイト結合メカニズムを持つことで、多種多様な化合物をつかむ様に結合することを可能にしていることが明らかとなった。目的物 RamR 複合体を利用することで、簡便な分子置換法により、捕捉された有機化合物の構造を、図11に示すように明らかにできることを示した。この“有機化合物を様々な様式でつかむように結合する”という RamR の特徴的な性質を利用することから、この手法を“Molecular Grabber”法と名付けた。

Molecular Grabber 法は結晶スポンジ法と同様に、結晶化が難しい有機化合物の X 線構造解析に使用できる可能性がある。さらに、Molecular Grabber 法では、化合物と RamR 間の相互作用を分析することで、化合物が何らかの活性物質である場合、標的タンパク質のアミノ酸残基と相互作用する可能性のある官能基を特定することにも使用できる。また、低濃度でありながら、Gefitinib intermediate 1 の構造解明が可能であったことから、錠剤、カプセル、または粉末薬の微量中間体の構造分析にも使用可能なケースが多いのではないかな。

Molecular Grabber 法が、化合物の構造解析と化合物と標的タンパク質との相互作用部位の同定を通じて、革新的な新薬や化合物の開発および残留中間体の同定に貢献できることを願ってやまない。

本手法には、ライセンスを設定していないため、興味のある研究者は誰でも試すことができるのも特徴である。

参考文献

- (1) Y. Inokuma, S. Yoshioka, J. Ariyoshi, T. Arai, Y. Hitora, K. Takada, S. Matsunaga, K. Rissanen and M. Fujita: *Nature*, **495** (2013), 461–466.
- (2) T. Matsumoto, R. Nakashima, A. Yamano and K. Nishino: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **518** (2019), 402–408.
- (3) S. Yamasaki, E. Nikaido, R. Nakashima, K. Sakurai, D. Fujiwara, I. Fujii and K. Nishino: *Nat. Commun.*, **4** (2013), 1–7.