

## 薬学研究科・創薬分子設計学研究室

### 1. 研究課題名

「タンパク質の立体構造に基づくシード・リード最適化および新規リガンド探索研究」

### 2. 研究メンバー

仲西 功	近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室・教授
中村 真也	近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室・助手
高平 和典	近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室・4年生
大迫 久晃	近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室・4年生

### 3. 研究成果

糖尿病の特効薬としてインドやスリランカの伝統医学アーユルヴェーダでは、*salacia* 族植物である *S.reticulata* や *S.oblonga* などが用いられている。これらの植物から、糖尿病治療薬 *acarbose* や *voglibose* に匹敵する強い  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示し、チオ糖スルホニウム硫酸分子内塩構造を有する *salacinol* や *kotalanol* が単離されている。両化合物をシードとした化合物展開が生命有機化学研究室において実施されているが、より論理的な医薬品設計を進めるために、当研究室ではこれらの化合物と  $\alpha$ -グルコシダーゼとの複合体構造に基づいて新規化合物を設計する研究に着手した。まず、 $\alpha$ -グルコシダーゼとの複合体構造を X 線結晶構造解析により決定するために、 $\alpha$ -グルコシダーゼの大量発現系の構築を開始した。一方、 $\alpha$ -グルコシダーゼと *acarbose* との複合体構造は既に報告されているため、この情報を利用して計算化学的に *salacinol* との複合体構造の推定を行っている。

#### 3-1. $\alpha$ -グルコシダーゼの大量発現系の構築

Maltase-glucoamylase (MGAM) はヒト小腸刷子縁膜の上皮細胞上に存在する酵素で、Glycoside Hydrolase family 31 (GH31) に属している。本酵素は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を有しており、炭水化物などのでんぷんの消化において二糖類から単糖類への分解を促進する。図 1 に示すように、MGAM には 2 つの活性ドメインが存在し、MGAM の膜側にある活性ドメインを N-terminal catalytic domain (NtMGAM) と呼び、既に X 線結晶構造が Apo form で分解能 2.0 Å、同時に Soaking によって *acarbose* との複合体 が分解能 1.9 Å で解析されている<sup>1</sup>。

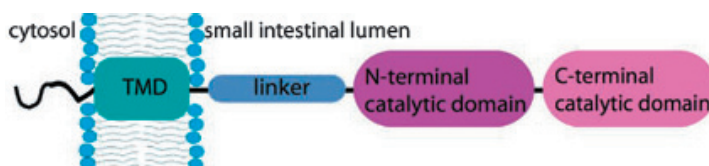


図 1 小腸刷子縁膜上の MGAM のドメイン構造 (文献 2 より)

NtMGAM は、いくつかのサブドメインからなり、Catalytic domain は図2において赤色で示すアミノ酸残基 270 番から 652 番に存在する( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel 構造を形成している。今回、Simらと同様に、他のサブドメインを含めた NtMGAM 全体構造を得るために、NtMGAM の大量発現系の構築を開始した。はじめに、発現ベクターである pET-30(a) に NtMGAM 遺伝子を挿入し、発現したタンパク質の精製を考慮して His-Tag を付加したプラスミドの構築を試みた。PCR 法で NtMGAM に制限酵素認識配列を付加して増幅後、末端の制限酵素サイトの切断効率を考慮して TA クローニングを行った。しかし、制限酵素によって切断したところ、インサート内に制限酵素サイトが多数見付き、使用できる制限酵素や発現ベクターの再検討が必要となった。そこで新たに、発現用ベクターに pTrcHis2A と pET-28(a)を用いた発現プラスミドの構築を行うことにした。この発現プラスミドでは前回と同じく C 末端に His-Tag を付加するように設計した (図3)。

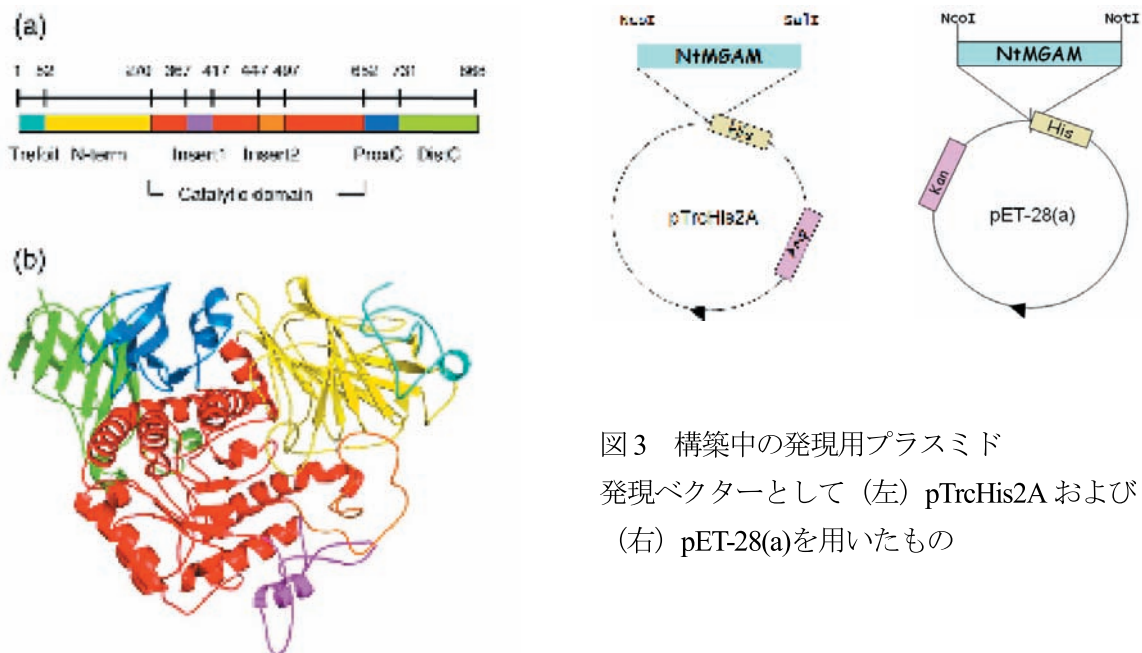


図3 構築中の発現用プラスミド  
発現ベクターとして (左) pTrcHis2A および  
(右) pET-28(a)を用いたもの

図2 NtMGAM のドメイン構成と全体構造 (文献1より)

(a) ドメイン構成と色分け、(b) 全体構造

制限酵素の NcoI については、インサート内に 2箇所 の認識配列が存在することがシーケンス解析から確認されているので、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を参考に Pfu Turbo polymerase(Stratagene)を用いて Point Mutation を行った。ただし、この変異を入れることによって、制限酵素により切断されず、かつアミノ酸配列も変わらないように設計した (図4)。現在、変異を入れた NtMGAM のシーケンス解析を行い、発現プラスミドの変異の確認を行っているところである。今後は、TA ベクターから発現用のそれぞれのベクターへ NtMGAM 遺伝子を乗せかえ、この発現プラスミドを大腸菌 [BL21 (DE3)] に形質転換し、IPTG を加えた発現条件の検討を行う予定である。

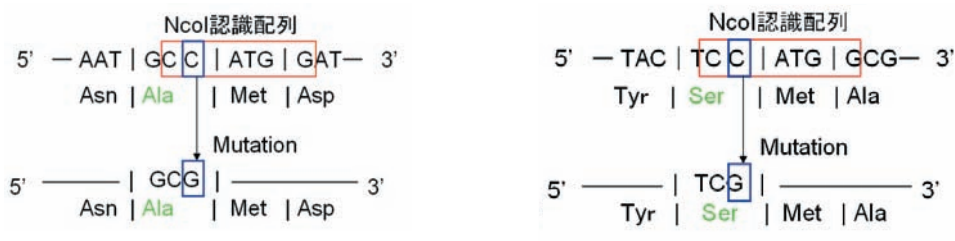


図4 NtMGAM 内の制限酵素の認識配列と変異

左側はNtMGAM (2604 塩基) の720 番目付近に、右側は1510 番目付近に存在する

### 3-2. Salacinol の $\alpha$ -グルコシダーゼ結合様式の推定

X 線結晶構造解析と並行して、ドッキングシミュレーションによって salacinol の結合様式の予測を試みた。結合様式が未知の化合物のシミュレーションを行う際には、結合様式が既知である化合物の結合様式を再現 (再ドッキング) できる計算条件を探索する必要がある。今回はすでに複合体構造が報告されていた NtMGAM と acarbose との結合様式<sup>1</sup>の再現性を指標とし、再ドッキングを行うこととした。acarbose は4つの糖単位で構成されているが、結晶構造解析からは図 5a に示すようにタンパク質と多数の水素結合により強く相互作用している部分は2つのみであることがわかっている。また、acarbose のアンモニウムイオン部は Asp542 側鎖カルボキシルイオンと塩橋を形成している。一方もう2つの糖部分はタンパク質の結合ポケット中ではなく溶媒部分に露出している。溶媒露出部分はタンパク質との相互作用が少なく、その部分の立体配座・配向を予測することは困難であるため、該当部分を除外したモデル化合物(図 6a)を用いて再ドッキングを行った。

ドッキングシミュレーションにはプログラム DOCK4.01<sup>3</sup> を用い、タンパク質構造の荷電状態や配向決定に用いるための探索球の数など様々な条件の組み合わせを検討した。その結果、結晶構造との RMSD 値が 0.3 Å となる結合様式 (図 6b) を予測可能な条件を得ることができた。一般的に RMSD 値が 2.0 Å を下回っていれば再ドッキングは成功と言えることを鑑みると、非常に高精度で予測可能なドッキング条件が同定できたと言える。

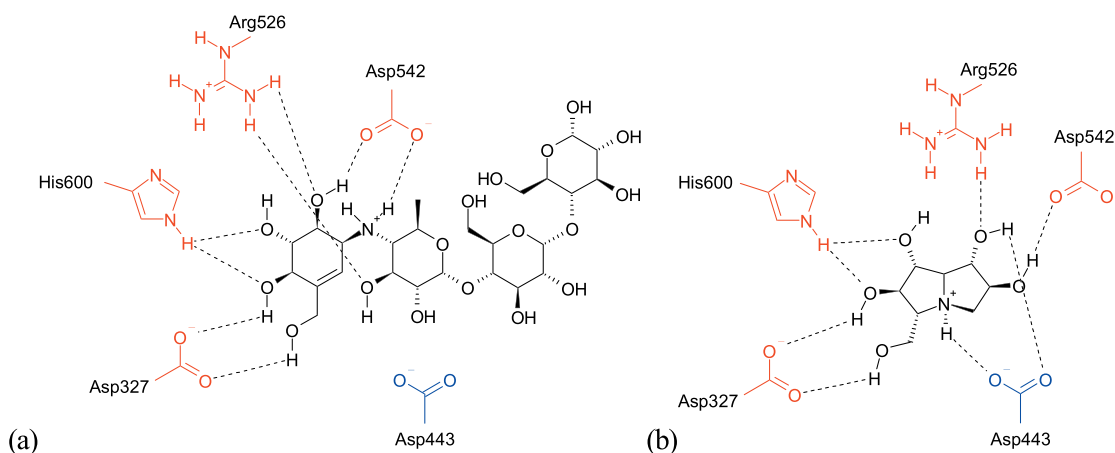


図5 NtMGAM と既存阻害薬との結合様式 (a) acarbose、(b) casuarine

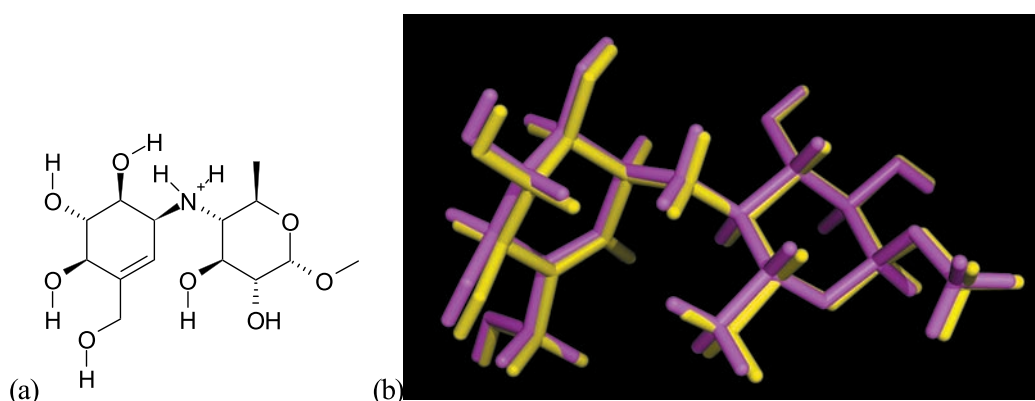


図6 acarbose の再ドッキング用モデル化合物  
(a)構造式、(b)再ドッキングの結果 (黄：ドッキング結果、紫：結晶構造)

同定したドッキング条件を元に、salacinol のドッキングシミュレーションを行った。このとき、構造式からは salacinol に含まれる環状チオ糖のスルホニウムカチオンは acarbose のアンモニウムイオンと同様に Asp542 と相互作用するということが推測された。しかしドッキングの結果と acarbose の構造と重ね合わせを行った結果 (図7)、スルホニウムカチオンは Asp542 とは距離的に離れてしまい、ポケットの対面側の壁を形成する Asp443 の方がむしろ距離的に近いという結果が得られた。この結果を acarbose 等と同様に模式的に書くと図 8a のようになった。水素結合は acarbose の7本に比べ3本とかなり少なく、またスルホニウムカチオンも Asp443 側鎖カルボキシルイオンとの距離が 3.4 Å とやや遠く、塩橋を形成していると言える距離にはなかった。

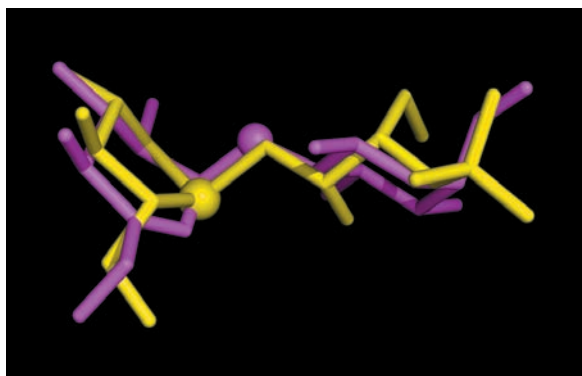


図7 salacinol と acarbose との重ね合わせ図  
黄：salacinol、紫：acarbose、球で示した原子がカチオンの位置を示す

結果の妥当性について検討を行っていたところ、新たに他の阻害剤 casuarine と NtMGAM との複合体の結晶構造が報告された<sup>4</sup>。casuarine と NtMGAM との結合様式を図 5b に示す。それによると casuarine はほぼすべての極性原子が水素結合の形成に参与しているが、アンモニウムイオンの相互作用様式が acarbose とは異なっている。acarbose のアンモニウムイオンは Asp542 と塩橋を形成するが、casuarine では Asp443 と塩橋を形成しており、これは我々が推定した salacinol の結合様式に近い。これは salacinol のスルホニウムイオンの相互作用位置の妥当性を

裏付ける結果であると考えられる。

ただし、salacinol のドッキングを行った条件を用いて casuarine のドッキングを行ったところ、最良の結合様式と判断されたもので結晶構造との RMSD 値は 4.7 Å、候補構造の中で最も小さい RMSD 値を持つものでも 2.4 Å であり、結晶構造を再現しているとは言えなかった。salacinol の結合様式は、構造式からは acarbose よりも casuarine の方が類似していると考えられるため、精度の高いドッキング結果を得るためには、acarbose だけでなく casuarine の結晶構造も再現できるドッキング条件を探索する必要がある。

これまでのドッキング結果や既存阻害薬との結合様式からは、salacinol は図 8b のような状態で結合していると推定される。すなわち、チオ糖の水酸基の配置は casuarine と立体的にほぼ同一であるため同様の水素結合を形成し、また、側鎖部分も salacinol 類縁体との構造活性相関から、水酸基は Asp542 などと水素結合を形成する一方、硫酸基は溶媒側へ露出しているというものである。今後、ドッキング条件をさらに精査し、分子動力学シミュレーションなどにより、すでに報告されている salacinol 類縁体との構造活性相関を説明可能な妥当な結合モデルが得られると期待できる。

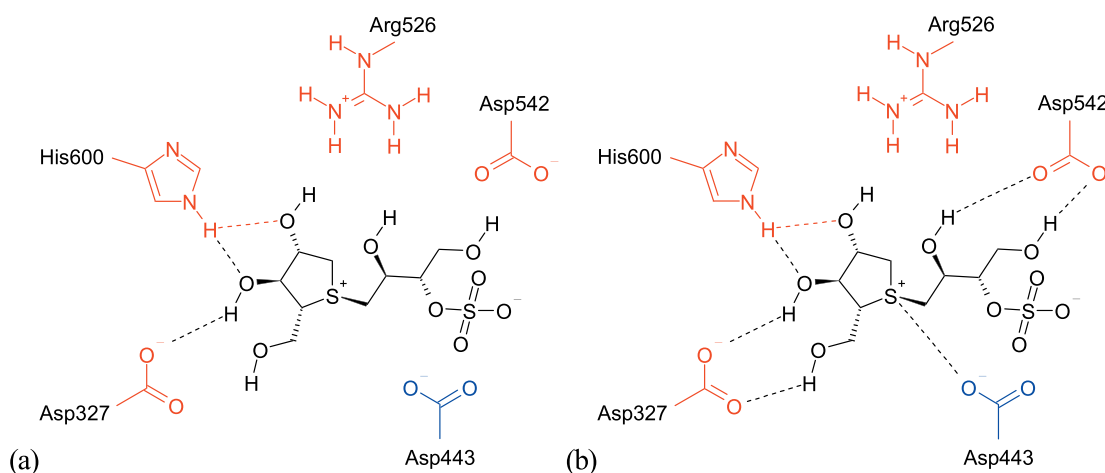


図 8 salacinol の結合様式 (a)ドッキングの結果、(b)想定される結合様式

#### 引用文献

- 1) Sim L., Quezada-Calvillo R., Sterchi E. E., Nichols B. L., Rose D. R.: *J. Mol. Biol.*, **375**, 782-792 (2008).
- 2) Rossi E. J., Sim L., Kuntz D. A., Hahn D., Johnston B. D., Ghavami. A., Szczepina M. G., Kumar N. S., Sterchi E. E., Nichols B. L., Pinto B. M., Rose D. R. : *FEBS J.*, **273**, 2673-2683 (2006).
- 3) Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E.: *J. Mol. Biol.*, **161**: 269-288 (1982).
- 4) Cardona F., Parmeggiani C., Faggi E., Bonaccini C., Gratteri P., Sim L., Gloster T. M., Roberts S., Davies G. J., Rose D. R., Goti A.: *Chem. Eur. J.*, **15**, 1627-1636 (2009).