

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*属植物である*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 α -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^{1,2}。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 α -グルコシダーゼとの複合体構造の解析に着手した。まず、 α -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、 α -グルコシダーゼの大量発現系の検討を行なった。一方、 α -グルコシダーゼとacarboseおよび植物由来阻害剤casuarineとの複合体構造は既に報告されているため^{3,4}、これら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た。

3-1. Maltase-glucoamylase の N-terminal catalytic domain 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、 α -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 がそれぞれ分解能 1.9 Åで解析されている³。また、casuarineとの複合体は分解能 2.1 Åで解析されている⁴

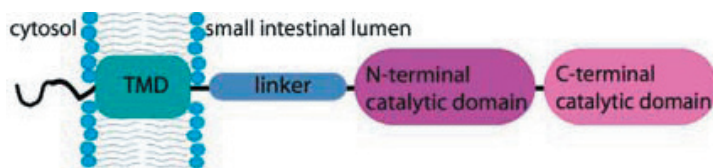


図1 小腸刷子縁膜上のMGAMのドメイン構造 (文献5より)

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(β/α)₈ 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。

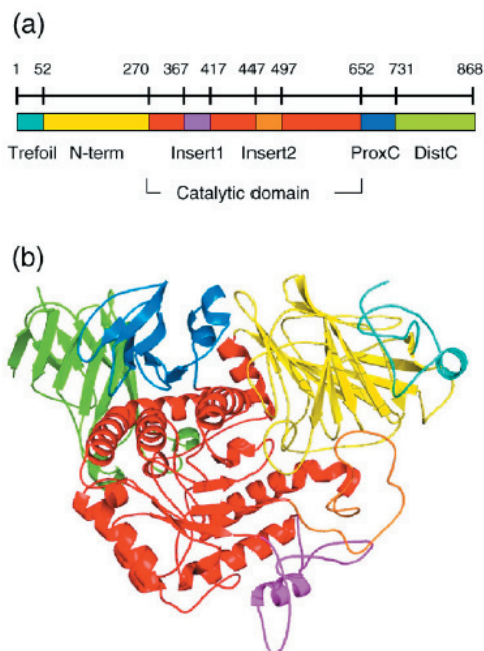


図2 NtMGAM のドメイン構成と全体構造 (文献3 より)

(a) ドメイン構成と色分け、(b) 全体構造

3-1-1. 発現プラスミドの構築

X線結晶構造解析を行うにあたり、目的タンパク質の変異導入や大量培養を可能にするために大腸菌を利用した発現系の構築を行った。また、その精製を簡便かつ高純度で行うために、C末端にヒスチジンタグを付加した。

全長のMGAM遺伝子よりN末端活性ドメインの遺伝子(塩基259番目~2862番目)を増幅するように設計した2種類のプライマーを用いて、MGAMを鋳型としてPCR反応を行った。1%アガロースゲル電気泳動によって確認した結果、約2.6 kbpの特異的なDNA断片の増幅が認められた(図3)。計算上のNtMGAM遺伝子の長さに一致するので、NtMGAMを増幅する事ができたと考えられる。

プラスミドの構築に必要な制限酵素 *Nco* I・*Not* Iは、末端での切断効率の低い酵素であるため、このPCR産物を用いてTAクローニングを行った。また、NtMGAM遺伝子配列内に、*Nco* Iサイトが2カ所存在したので、部位特異的変異法を用いたサイレントミューテーションにより、制限酵素サイトをコードするアミノ酸を変えず、他の塩基に置換した。ミューテーションの処理をしたプラスミドを *Nco* Iで消化し、1%アガロースゲル電気泳動でDNAの大きさを確

認した (図4)。その結果、約 6 kb の DNA 断片が確認でき、付加した制限酵素切断部位以外に *Nco* I で消化された部位は無いと考えられる。このことから、変異が導入されている事が確認できた。

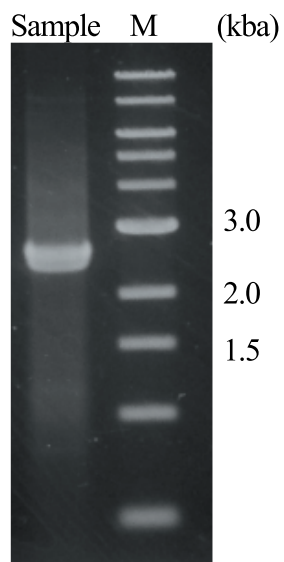


図3 PCR 法により増幅した、NtMGAM 遺伝子の電気泳動
M: 1Kb DNA Ladder

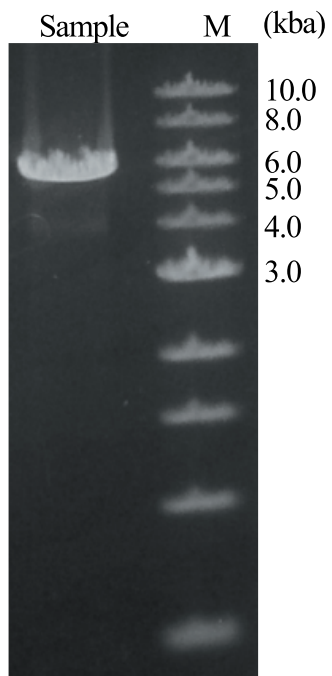


図4 *Nco*I 消化による DNA 断片
M: 1kb DNA Ladder

次に、得られた pGEM-T Easy-NtMGAM の *Nco*I・*Not*I 消化により NtMGAM 遺伝子断片を切り出し、大腸菌用発現ベクター-pET-28a(+) (Novagen) に連結し、C 末端に His-tag をもつ NtMGAM の発現プラスミド pET-28a-NtMGAM (図 5) を得た。このプラスミドについて *Nco*I・*Not*I 消化を行い、1%アガロースゲル電気泳動で DNA の大きさを確認したところ、NtMGAM 遺伝子と考えられる約 2.6 kbp の DNA 断片が挿入されていることが確認できた(図 6)。DNA シーケンサーにより、pET-28a(+)-NtMGAM の挿入断片の塩基配列を確認した結果、目的とした部位に正しく変異が導入されており、それ以外の塩基配列と NtMGAM 遺伝子の塩基配列との相同性は 100%であることが認められ、発現プラスミドの構築が確認できた。

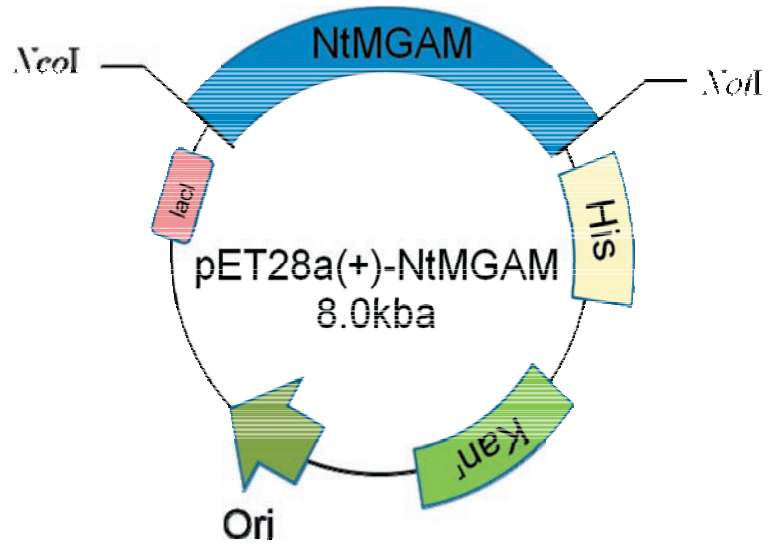


図 5 NtMGAM 発現プラスミド pET28a(+)-NtMGAM

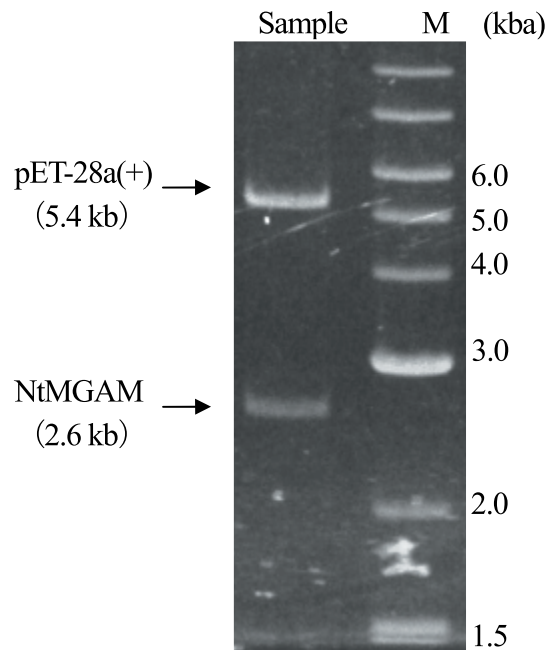


図 6 pET-28a(+)-NtMGAM の *Nco*I・*Not*I 消化後の電気泳動
M: 1kb DNA Ladder

3-1-2. 発現条件の検討

得られたプラスミドpET-28(a)-NtMGAMを用いて発現条件の検討を行った。大腸菌宿主であるBL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS、Rosetta2にそれぞれ形質転換し、この形質転換株を用いて、発現条件の検討を行った。37°Cで振とう培養を行いOD₆₀₀値が0.4になるまで本培養した。タンパク質発現の誘導剤としてIPTGを終濃度0.5 mMまたは1.0 mMになるように添加し、37°Cで5時間または20時間、および16°Cで20時間培養を行った。得られた菌体を超音波破碎して遠心分離(4°C, 15000 rpm, 20 min)し、SDS-PAGEで確認を行った。その結果、目的タンパク質と考えられる約100 kDaのバンドが検出された(図7)。

(a)

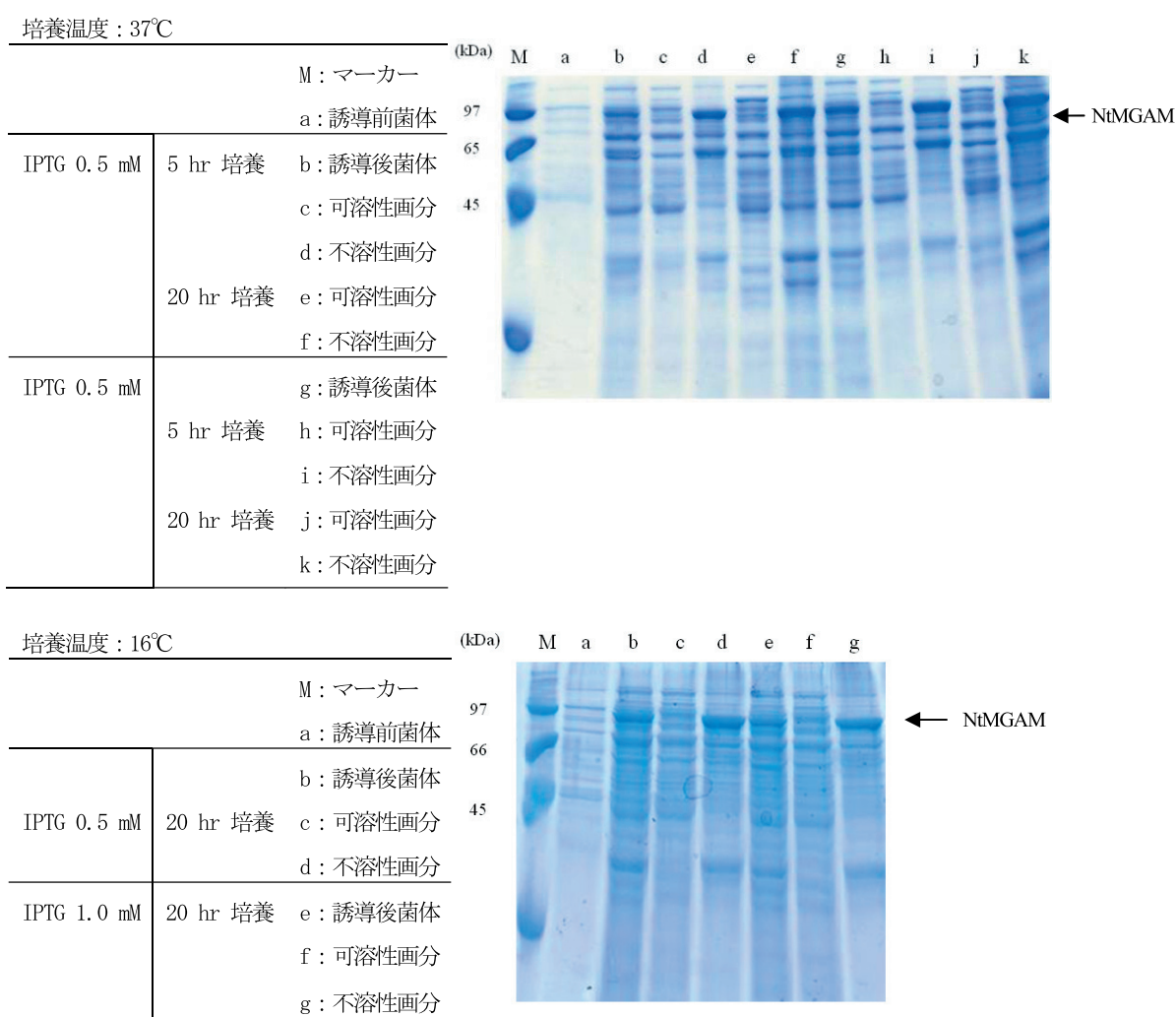
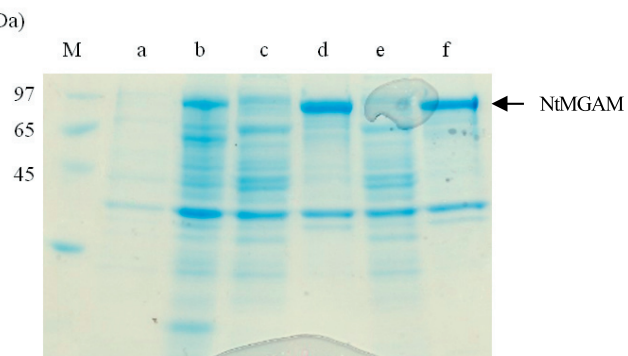


図7 各種大腸菌での発現量の確認 (a) BL21(DE3), (b) BL21(DE3)pLysS, (c) Rosetta2

(b)

培養温度 : 16°C BL21 (DE3) pLysS		(kDa)
M : マーカー		
a : 誘導前菌体		
b : 誘導後菌体		
IPTG 0.5 mM	20 hr 培養	c : 可溶性画分 d : 不溶性画分
IPTG 1.0 mM	20 hr 培養	f : 可溶性画分 g : 不溶性画分



(c)

培養温度 : 16°C Rosetta2		(kDa)
M : マーカー		
a : 誘導前菌体		
b : 誘導後菌体		
IPTG 0.5 mM	20 hr 培養	c : 可溶性画分 d : 不溶性画分
IPTG 1.0 mM	20 hr 培養	f : 可溶性画分 g : 不溶性画分

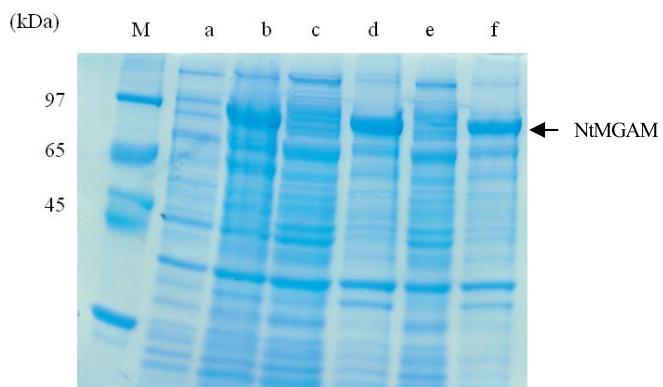


図7 つづき

いずれの宿主を用いても IPTG 誘導後の菌体で約 100 kDa のバンドが確認できることから、目的タンパク質が発現していると考えられる。しかし、すべての条件で NtMGAM は不溶性画分 (沈殿) に多く発現しており、大腸菌宿主間では大きな違いは認められなかった。そこで、可溶性画分 (上清) での発現量が比較的多く、大腸菌由来の夾雑物が少ないことから、タンパク質発現には BL21 (DE3) を宿主として IPTG 0.5 mM、16°C・20 時間の条件を用いることとした。

3-1-3. Ni-アフィニティークロマトグラフィーの条件検討

Ni-アフィニティークラムには、HisTrap HP を使用した。溶出は 50, 100, 150, 250, 500 mM imidazole で段階的に濃度を上げて行った。5ml ずつ画分を採取し、Ni-アフィニティークロマトグラフィーでの溶出条件の検討を行った。その結果、50 mM の imidazole 濃度でカラムに吸着したタンパク質が夾雑物と共に溶出される事が分かった(図 8)。

得られた溶出画分を Binding Buffer に対して透析を行い、溶液中の imidazole を除いたサンプルを用いて、溶出条件を変えて Ni-アフィニティークロマトグラフィーを行うことにした。溶出は 2, 6, 10, 20, 50 mM imidazole で段階的に imidazole 濃度を上げて行き、溶出されたタンパク

質を SDS-PAGE で確認した。その結果、6 mM から 10 mM の imidazole で約 100 kDa の目的タンパク質と考えられるものが溶出された (図 9)。また、この画分については α -グルコシダーゼ活性がある事が確認できたため、次の精製のサンプルとした。

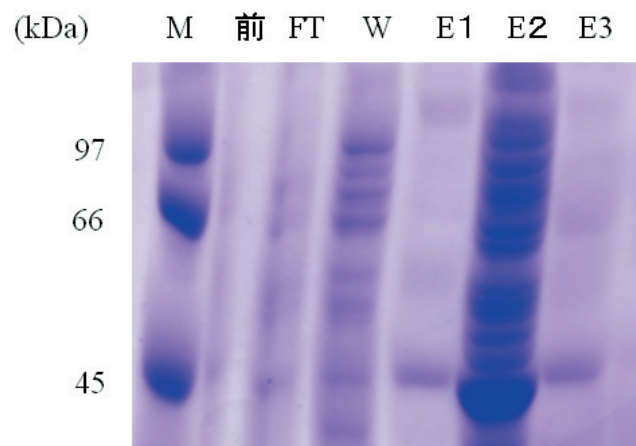


図 8 溶出後の SDS-PAGE

M : マーカー, 前 : 精製前, FT : 素通り画分, W : 洗い, E1~3 : 50 mM imidazole の溶出画分
 Elution : 50→500 mM imidazole gradient in 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.5

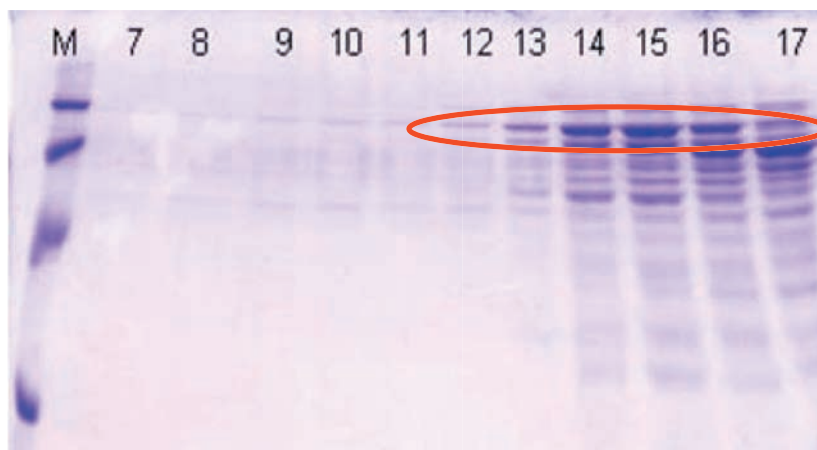


図 9 溶出後の SDS-PAGE

M : マーカー, 数字 : 溶出画分

Elution : 2→50 mM imidazole gradient in 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.5

3-1-4. イオン交換クロマトグラフィーの条件検討

先のNi-アフィニティークロマトグラフィーで得られた画分を20 mM Tris-HCl (pH 8.5) に対して透析を行い、NaCl を除いた溶液をイオン交換クロマトグラフィーのサンプルとした。カラムには強陰イオン交換カラムである MonoQ (GE Healthcare) を使用した。20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5 で洗浄した後、20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, 100 mM~400 mM NaCl で吸着したタンパク質を直線濃度勾配法で溶出させ、更に20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, 500mM NaCl で溶出させ、SDS-PAGE で確認を行った。その結果、サンプル番号23~35 に約100kDa の目的タンパク質と考えられるバンドが確認できた (図10)。サンプル番号23~35 の α -グルコシダーゼ活性を *p*NP-glucose 法で測定したところ、約100 kDa にあるバンドの濃さに相関して活性がある事が分かった (表1)。NtMGAM の発現プラスミドを形質転換していないコントロールにおいても、少しの α -グルコシダーゼが認められるが、これは大腸菌由来の α -グルコシダーゼによるものだと考えられる。約100kDa のバンドは目的タンパク質の分子量に一致し、 α -グルコシダーゼ活性もあることから、これは目的タンパク質であると考えられる。

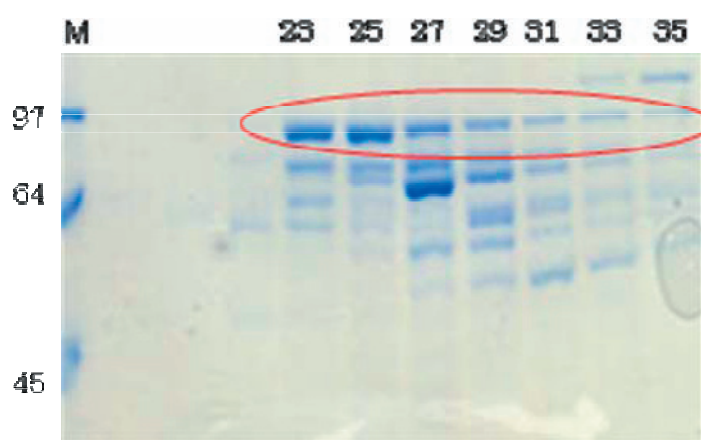


図10 溶出後の SDS-PAGE

M : マーカー, 数字 : 溶出画分

表1 α -グルコシダーゼ活性

サンプル		Unit ^a
	コントロール	19.7
	精製前	25.2
溶出画分	23	69.2
	25	63.8
	27	45.9
	29	33.8
	31	21.6
	33	13.4
	35	10.4

^a 1Unit = 1mM *p*NP min⁻¹

タンパク質の結晶化には、単一のバンドとして得られる純度の高いものが望ましい。そのため、先の溶出条件で得られたタンパク質は結晶化に用いることはできない。結晶化に用いる事が可能な、さらに純度の高いタンパク質を得るために、溶出条件を変えて再度陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにした。

20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, 100 mM NaCl で洗浄した後、20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, 100 mM~400 mM NaCl で吸着したタンパク質を直線濃度勾配法で溶出させ、更に 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, 500 mM NaCl で溶出させ、SDS-PAGE で確認を行った。その結果、NtMGAM と考えられるバンドが見られた (図 11 赤丸)。しかし単一のバンドにはならず、NaCl の濃度勾配を緩やかにしたため、目的タンパク質のピークが広くなり先の条件よりバンドは薄くなった。また、夾雑物と考えられる約 65kDa のタンパク質 (図 11 緑丸) の方が NtMGAM よりも多く溶出されていることがわかる。クロマトグラフィー装置の検出器のデータから、約 65 kDa の夾雑物の大きなピーク (図 12 緑丸) が確認できるが、NtMGAM (図 12 赤丸) との分離はできていると考えられる。以上の結果から、目的タンパク質の収量が少なく、精製の過程を増やすことでのロスを検討すると、夾雑物を分離するには他の溶出条件や、カラムの選択を検討する事が必要であると考えられる。

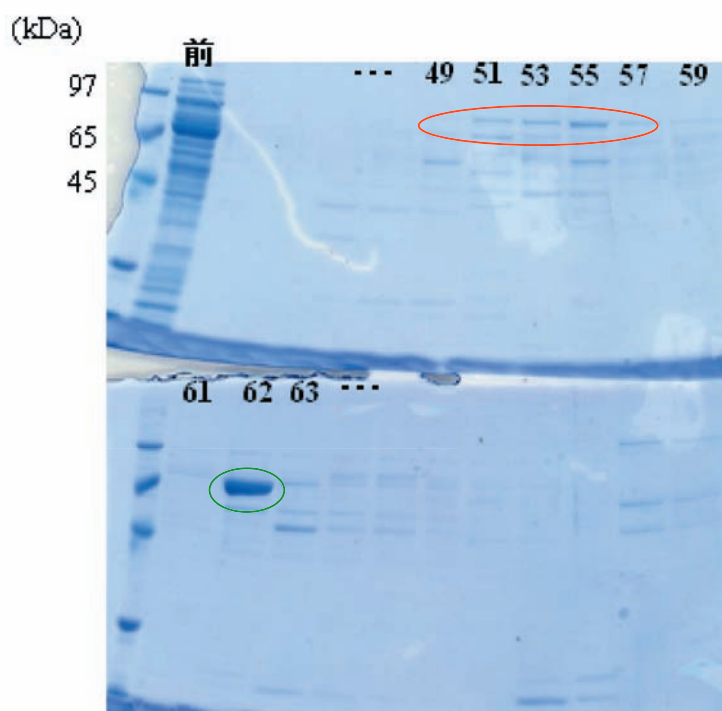


図 11 溶出後の SDS-PAGE

前：精製前, 数字：溶出画分

0.1→0.5 M NaCl gradient in 20 mM Tris-HCl, pH 8.5

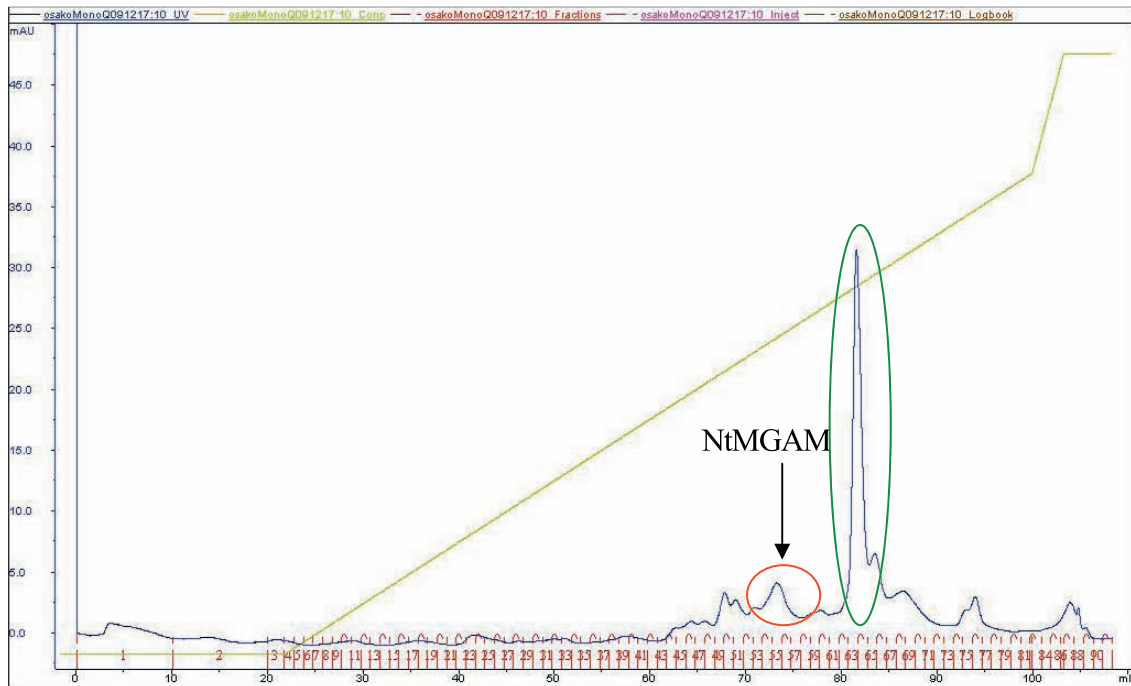


図 12 陰イオン交換クロマトグラフィーの結果

縦軸 青色：UV(mAU), 緑色：NaCl(%)

横軸 赤色：フラクシオン番号, 黒色：送液量

3-1-5. 硫酸分画

陰イオン交換クロマトグラフィーの結果から、純度の高いNtMGAMを得るためには、他の方法で夾雑物を分離する必要があると考えられた。そこで、Ni-アフィニティークロマトグラフィーの段階に入る前の粗精製を目的に、硫酸分画を行った。まず、硫酸アンモニウムを30%飽和濃度になるよう粗酵素液に加えて沈殿したものを除いた。その後、70%飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加え、タンパク質を沈殿させた。この沈殿を再懸濁し、SDS-PAGEで精製の度合いを確認した(図13)。その結果、硫酸分画前後ではほとんど差は見られなかった。

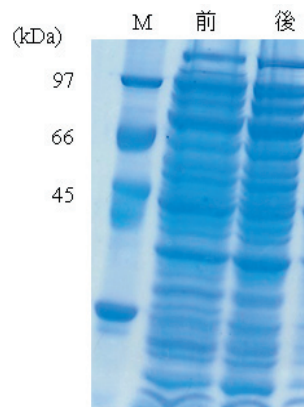


図 13 硫酸分画後の SDS-PAGE

M：マーカー, 前：硫酸分画前, 後：硫酸分画後

3-2. Salacinol の α -グルコシダーゼ結合様式の推定と構造活性相関

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 (図 14) 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。

既知化合物との複合体として、NtMGAMとacarboseならびにcasuarine (図 14) との二つの化合物の結合様式の再現性を指標として、再ドッキングを行った。この際、acarboseに関してはモデル化合物 (図 14) を用いて計算を行った。この理由として、acarboseは4つの糖単位で構成されているが、結晶構造解析³からは図 15a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つのみであり、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ことである。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り、実験的にも該当部分の温度因子が大きく、位置が不確かであるため、該当部分を除外して再ドッキングを行った。カシュアリンについては、相互作用は図 15bに示した通りであり、この再現を行った。

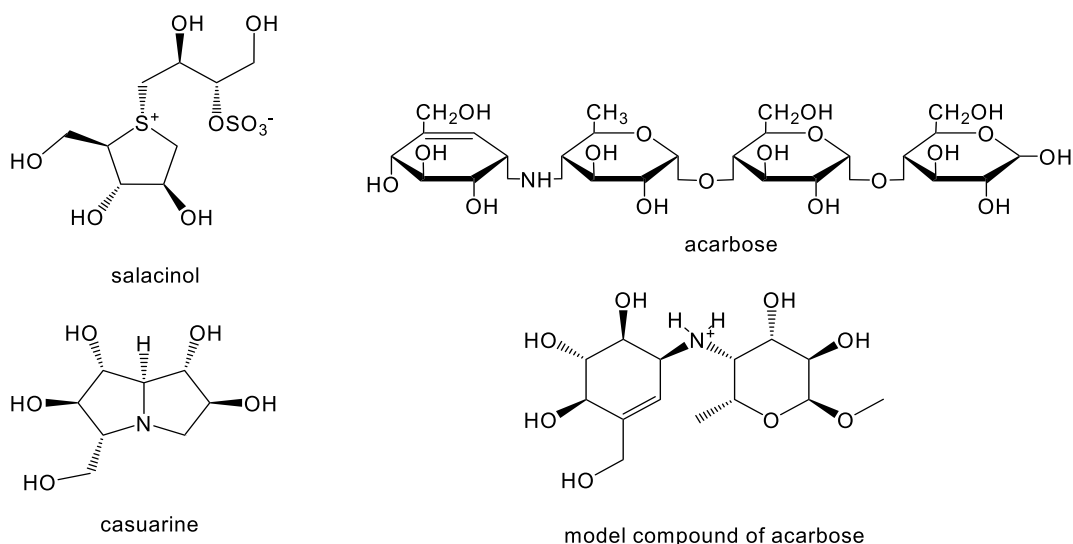


図 14 α -グルコシダーゼ阻害剤と acarbose の再ドッキング用モデル化合物

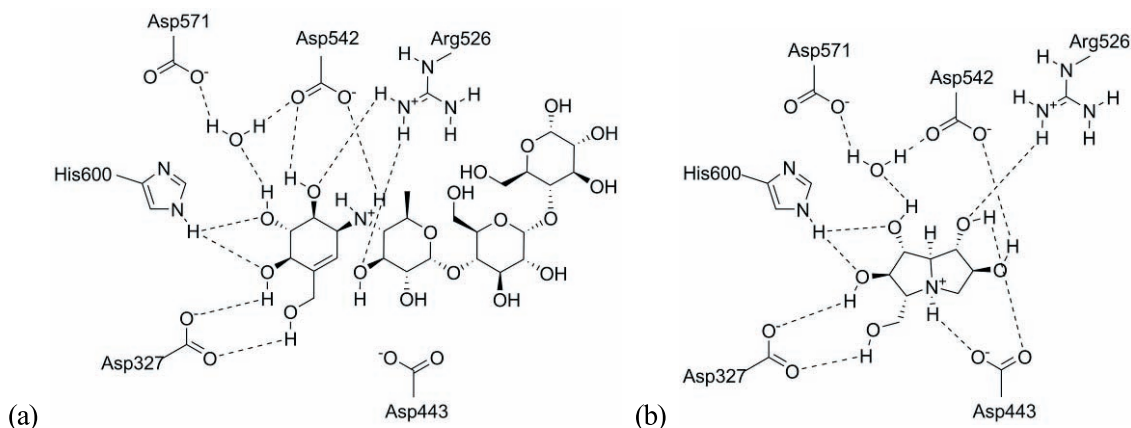


図 15 NtMGAM と既存阻害薬との結合様式 (a) acarbose、(b) casuarine

ドッキングシミュレーションにはプログラムDOCK4.01⁶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、acarboseの結晶構造とのRMSD値が0.6 Åとなる結合様式(図16a)およびcasuarineは0.3 Åとなる結合様式(図16b)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。

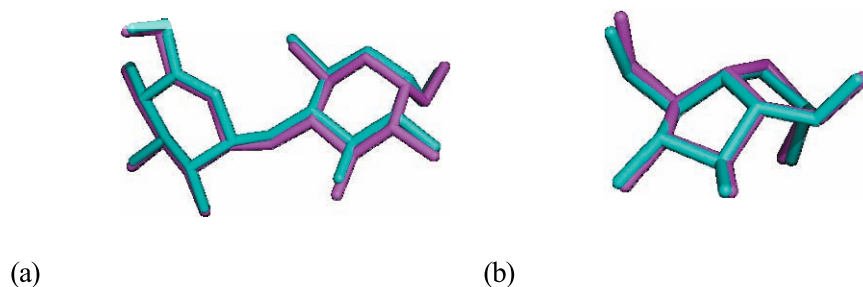


図16 再ドッキングの結果 (a)acarbose (b)casuarine
(シアン：結晶構造、マゼンタ：ドッキング構造)

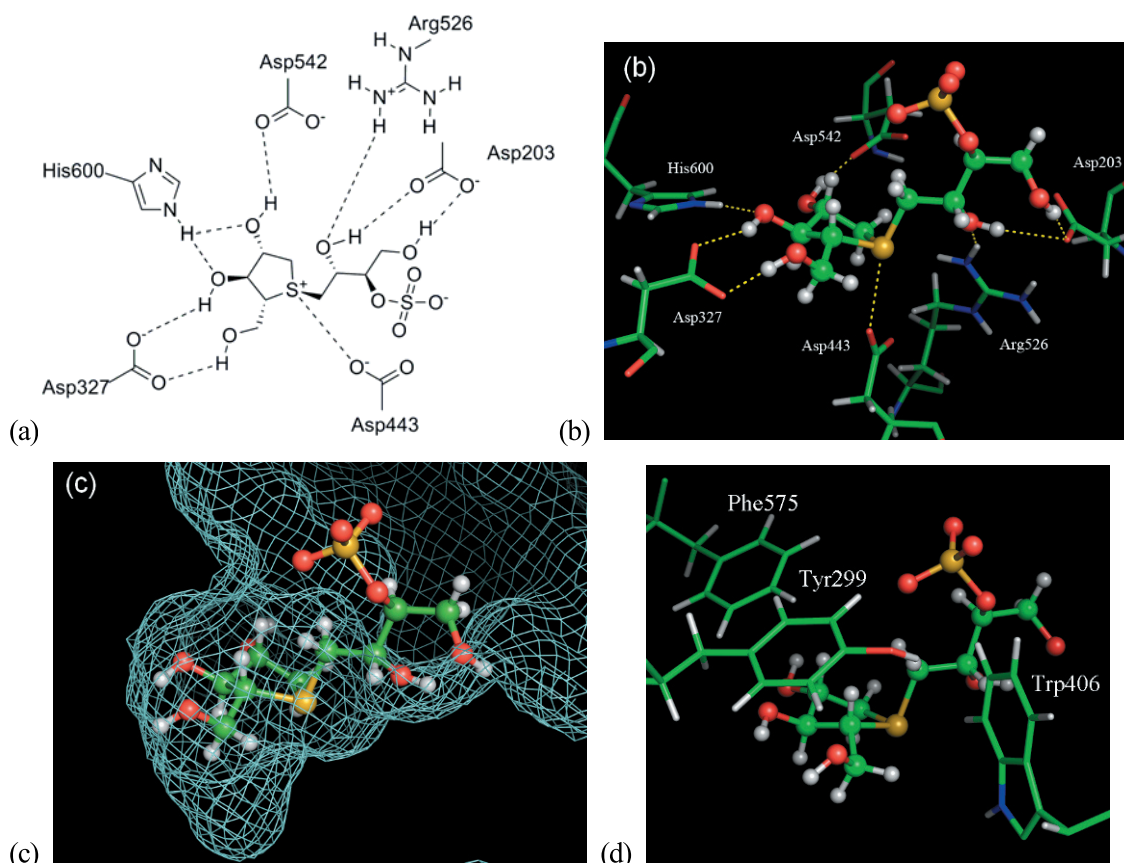


図17 ドッキング結果 (a)模式図 (b)salacinol 結合部位周辺アミノ酸残基との結合様式 (c) salacinol 結合部位周辺アミノ酸残基に対する Connolly 表面 (d)硫酸基周辺のアミノ酸残基

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ところ、図 17 に示される結合様式が得られた。まずチオ糖の水酸基の立体配置はcasuarineと同一であるためほぼ同様の水素結合を形成していた。これは、salacinolの既存類縁体で、糖部の水酸基が立体反転することで活性が 100 倍以上低下することから裏付けられる。ここで図 15、図 18a のようにacarboseやcasuarineはAsp542 との間に結晶水が存在し^{3,4}、間接的に水素結合を行っている。このような結晶水は、リガンドが直接水素結合する場合などの様々な結合様式を考えるためにドッキング計算では除かれることが多く、今回の計算でもこの結晶水は計算に含めていなかった。そこで図 18b のように結晶水をsalacinolのドッキング構造に重ね合わせたところ、結晶水が存在できる余地が十分あり、salacinolもAsp542 とは本来水分子を介した間接的な相互作用をしていることが推測された。

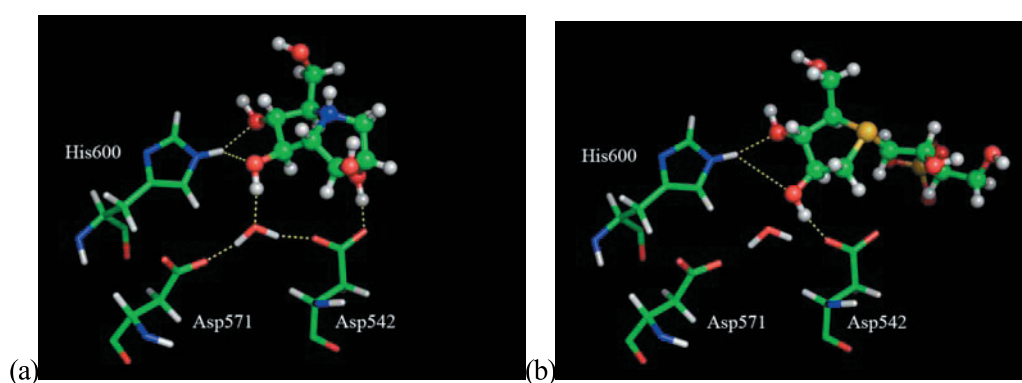


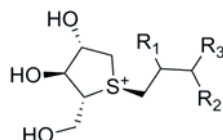
図 18 Asp542 との相互作用 (a)casuarine の実験構造 (b)salacinol のドッキング構造に(a)の結晶水を重ね合わせたもの

また側鎖部分に関しては、タンパク質と水酸基が水素結合を形成している一方、より極性の強い硫酸基は顕著な相互作用を示していなかった。この側鎖の結合様式を表 2 に挙げる既存類縁体との構造活性相関により検証した。まずR₁の水酸基はArg526 とAsp203 によって認識されているため、欠損や立体反転により相互作用が失われ、活性が減弱することが推測される。同様にR₃のヒドロキシメチル基も水素結合を行っているため、この欠損は活性を大きく低下させる。また、R₂の硫酸基に関してはほとんどが溶媒側に露出しているため、立体反転しても活性が変化しないことは説明可能であった。しかし、硫酸基を水酸基へ変換することで活性が僅かに減弱し、置換基の欠損で活性が 10 倍程度減弱することが構造からは判断が難しかった。このため、より精密な相互作用計算を行い、検討を行った。

R₂の置換基が異なる 3 つの化合物 (1、6、12) について、ドッキング後の構造をさらに Generalized Born/Volume Integral (GB/VI)水和モデル⁷を含めたMMFF94x力場⁸により構造最適化し、その相互作用について詳細を計算したところ、表 3 のようになった。3 つの化合物の活性の差は、立体的な相互作用と静電的な相互作用のバランスにより成り立っていると考えられる。化合物 1 (salacinol) は 6 (neosalacinol) や 12 よりも van der Waals相互作用が有利である。この理由は、硫酸基の中でも一部タンパク質と近くなっている末端のO原子周囲に芳香族性アミノ酸のCHが比較的多いことから、CH-O的な相互作用が積み重なって結合を有利にしていると考えられる。逆に周囲には水酸基と水素結合を行っているAspのような酸性アミノ酸残基が多く、負電荷をもつ硫酸基は静電相互作用的には不利となる。化合物 6 も 12 も立体的な van der Waals

相互作用では化合物 **1** に比べ不利であるが、負電荷をもたない分静電的には有利である。しかし化合物 **12** は極性の置換基を持たないため、水酸基を持つ化合物 **6** よりは静電的に不利である。この立体的な相互作用と静電的な相互作用のバランスにより活性を説明することが可能であり、計算された相互作用は活性の順番を再現した。

表2 salacinol 類縁体の構造と活性値



	R ₁	R ₂	R ₃	pIC ₅₀ ^a
salacinol (1)	(S)-OH	(S)-OSO ₃ ⁻	-CH ₂ OH	5.28
neosalacinol (6)	(S)-OH	(S)-OH	-CH ₂ OH	5.10
salaprinol (7)	(S)-OH	-OSO ₃ ⁻	-H	ca. 3
8	-H	(S)-OSO ₃ ⁻	-CH ₂ OH	< 3
9	-H	-OSO ₃ ⁻	-H	< 3
10	(R)-OH	(R)-OSO ₃ ⁻	-CH ₂ OH	< 3
11	(R)-OH	(R)-OH	-CH ₂ OH	< 3
12	(S)-OH	-H	-CH ₂ OH	3.94

^aラットのマルターゼ 50%阻害濃度(M)の対数値

表3 3つの化合物の相互作用エネルギー (kcal/mol)

	$E_{\text{int}}^{\text{a}}$	$E_{\text{vdw}}^{\text{b}}$	$E_{\text{eff-ele}}^{\text{c}}$	$E_{\text{ele}}^{\text{d}}$	$G_{\text{solv}}^{\text{e}}$
1	-37.0	-19.6	-17.4	-317.4	300.0
6	-36.4	-14.5	-21.9	-479.3	457.4
12	-35.5	-14.7	-20.8	-472.1	451.3

^a相互作用 ($E_{\text{int}} = E_{\text{vdw}} + E_{\text{eff-ele}}$)であり、結合自由エネルギーとして用いる。

^bvan der Waals 相互作用

^c有効静電相互作用を示し、クーロン相互作用と脱溶媒和ペナルティから成る($E_{\text{eff-ele}} = E_{\text{ele}} + G_{\text{solv}}$).

^dクーロン相互作用

^e結合における脱溶媒和ペナルティであり、GB/VI水和モデルから計算される。

引用文献

- 1) Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G., Muraoka O. : *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8367-8370 (1997).
- 2) Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H. : *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1339-1340 (1998).
- 3) Sim L., Quezada-Calvillo R., Sterchi E. E., Nichols B. L., Rose D. R.: *J. Mol. Biol.*, **375**, 782-792 (2008).

- 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).
- 5) 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).
- 6) Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R. Ferrin T. E. : *J. Mol. Biol.*, **161**, 269-288 (1982).
- 7) Labute P: *J. Comput. Chem.* **29** 1693-1698 (2008).
- 8) Halgren T. A.: *J. Comput. Chem.* **17**, 587-615 (1996).