



結晶構造解析によるプロスタグランジン合成酵素阻害剤のスクリーニング

伊中浩治¹, 古林直樹¹, 加茂昌之¹, 有竹浩介²
1 株式会社丸和栄養食品, 2 第一薬科大学・薬学部

キーワード：Structure Based Drug Design, HPGDS, デュシャンヌ型筋ジストロフィー

1. 測定実施日

2021年6月16日 BL2S1 (1シフト)
2021年8月26日 BL2S1 (1シフト)
2021年12月9日 BL2S1 (1シフト)
2022年1月27日 BL2S1 (1シフト)

2. 概要

生体内の炎症反応や睡眠誘導といった重要な働きを担っているプロスタグランジン D2 合成酵素 (HPGDS)の反応を特異的に阻害あるいは増幅することが可能になる医薬品の開発が期待されているが医薬品開発に貢献できる詳細な構造情報は未だ充分ではない。タンパク質の立体構造に立脚した医薬品開発がこの分野の喫緊の課題である。医薬品開発に貢献出来る高分解能のデータの取得には放射光での測定が不可欠である。本実験ではヒトおよびラット由来の HPGDS といくつかの特異的阻害化合物との複合体結晶を作製し回折実験を行うことで分子設計に必要な構造情報を得ることが目的である。本研究で得られた成果はデュシャンヌ型筋ジストロフィーや多発性硬化症などの難病の治療薬開発に貢献することが期待できる。

3. 背景と研究目的

ヒト由来 HPGDS (hHPGDS) は、アラキドン酸カスケードを構成する酵素のひとつであり、プロスタグランジン(PG)類の共通の中間体である Prostaglandin H₂ (PGH₂) から PGD₂ への異性化反応を触媒する。PGD₂ は末端組織の肥満細胞や Th2 リンパ球で産生されアレルギー反応のメディエーターとして働くこと、中枢神経系の主要 PG としても生産され、睡眠や痛覚の調節も担っていることが報告されている一方、本酵素の過剰発現が X 染色体に起因した筋ジストロフィーに関連していることも報告されている。

最近動物実験により同酵素の阻害剤が、デュシャンヌ型筋ジストロフィーの治療薬となりうる可能性があることを見出してきた。デュシャンヌ型筋ジストロフィーは、骨格筋細胞の構造を支持するために必要なタンパク質「ジストロフィン」の異常により発症する筋ジストロフィーの中でも、最も重篤なタイプの難病である。進行性の筋肉の疾患で 5 歳頃に診断され、その後は全身の筋肉がやせ、10 歳前後で歩行困難になり、さらに病状が進行するにつれて全面的な介護が必要となり、20 歳前後で心不全や呼吸不全のため死亡する可能性が高いという、極めて深刻な疾病である。X 染色体の劣性遺伝のため、男児 3500 人に約 1 人の割合で発症し、現在の国内患者数は約 3000 人である。未だ根本的な治療法が確立しておらず、病気の進行を遅らせることや合併症の発生予防のため、リハビリテ

ーションなどの対症療法のみが行われているのが現状である。このようにデュシェンヌ型筋ジストロフィーは難病で根本的な治療法がなく治療薬の開発が期待されているが、様々な開発リスクのために製薬企業は資本や人員の投下をためらっている。医薬品開発には莫大な費用がかかるうえ、開発中止により費用回収が不可能となるケースも多いことから、製薬企業は、希少疾病などの患者数が少なく収益が見込めない疾病の医薬品開発にはなかなか踏み切ることができない状況にある。また、本疾患は標的タンパク質の同定が進んでいなかったことも医薬品開発が進行していない背景のひとつである。

昨今、創薬の新しい試みとしてタンパク質立体構造情報に基づく医薬品開発 (Structure Based Drug Design, SBDD) が盛んにおこなわれている。ハイスループットスクリーニングに代表される従来の方法に比べて、大規模な化合物ライブラリーを持つ必要がないためコストを抑え効率的な医薬品開発が期待される。我々は HPGDS と化合物複合体の立体構造の解析結果に基づき新たな化合物の開発を行い、リード化合物として製薬会社等に導出することを目的としている。

4. 実験内容

大腸菌で大量発現させた HPGDS をイオン交換クロマトグラフィーの組み合わせにより高度精製した。HPGDS と化合物を結合させたのち、既に報告されている結晶化条件で結晶化を行った。当該化合物は、第一薬科大学と製薬企業及び公立研究機関との共同研究で入手したものをを用いた。

通常、HPGDS は蒸気拡散法では単結晶になりにくく、解析には不向きなクラスター結晶になってしまう場合が多い。そのため本研究では蒸気拡散法ではなく液-液拡散法を用いることで結晶の成長速度を制御した結果、回折実験に供することが出来る単結晶を得ることに成功した。これらの結晶を用いてあいち SR BL2S1 において項目 1 で記載した計 4 シフトを用いて回折実験を行い、合計 8 個のデータセットを取得した。得られた回折データは XDS を用いて数値化し CCP4 を用いて構造解析を行った。

5. 結果および考察

液-液拡散法を用いた結晶化により写真下右に示すような単結晶を得ることに成功した。蒸気拡散法で得られた結晶 (写真下左) と比較するとその差は明瞭である。

得られた単結晶を用いて合計 8 個の回折データを 4 シフトのビームタイムを用いて取得した。

回折実験時の代表的なデータ取得条件を表 1 示す。また、取得したデータセットのうち、代表的な統計値を表 2 に示す。いずれの結晶からも良好な回折データを取得することが出来、XDS を用いた数値化に成功した。数値化したデータセットを用いて、既に PDB に登録済みの座標データ (PDB_ID : 5Y9Z) を用いて分子置換法による構造解析を行ったところ、8 個のデータセットのうち 4 個の構造解析に成功した。これら 4 個の構造解析をもとに座標の精密化を行ったところ、蛋白質分子に結合した化合物分子の電子密度を明瞭に確認することができ、結合分子のモデル構築と精密化も成功した。

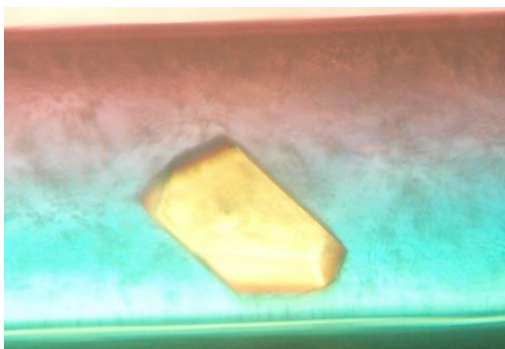
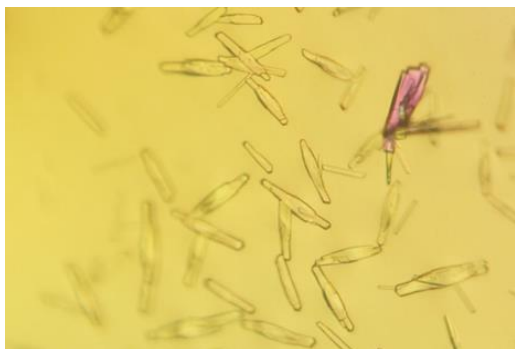


表.1 回折データ取得条件

| | |
|------------|------------------|
| ビームライン： | あいち SR BL2S |
| カメラシステム： | ADSC Quantum 270 |
| 波長： | 1.12Å |
| コリメータサイズ： | 100 μ m |
| 露光時間： | 30 sec./frame |
| 一枚当たりの回転角： | 0.5 度 |
| 総回転角： | 180 度 |

表.2 回折データの統計値

| | |
|---------------|--|
| 空間群： | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ |
| 格子定数： | a=54.5, b=80.2, c=96.5, α = 90.0, β =90.0, γ =90.0 |
| 分解能： | 50.0 Å – 1.80 Å |
| 反射数： | 74,219 |
| Rmerge： | 0.088 |
| Completeness： | 99.8% |
| I / σ： | 3.4 |
| Mosaicity： | 0.32 |

6. 今後の課題

現在、取得したデータセットを用いて構造解析及び構造精密化を進めている。電子密度図には、hHPGDS に結合した化合物の電子密度が確認できているので、化合物の原子座標も精密化できるものと考えられる。得られた化合物の座標データをもとに、さらに高活性の阻害剤化合物の設計が可能になると考えられ、デュシェンヌ型筋ジストロフィーや多発性硬化症などの難病の治療薬の開発につながることを期待される。

これまでも基本骨格が異なる複数の化合物と HPGDS 複合体の構造解析を行ってきた。今後はこれまで蓄積したデータを整理し有望な基本骨格の選定を行う。選定された基本骨格構造に基づき、新たな化合物を合成し HPGDS との共結晶の作製、回折データの取得を行う。今後はより効率的な化合物の選定と回折データの取得が課題である。