

第3回 MLFシンポジウム 2012年 1月 19～20日

トランスサイレチンの中性子結晶構造解析

—トランスサイレチンにおける水素結合ネットワークとpH感受性—

富山大学 大学院 医学薬学研究部(薬学)

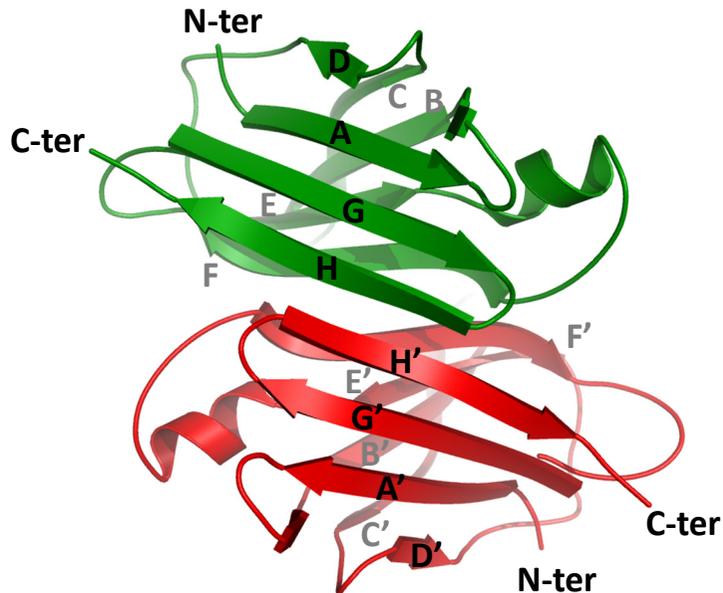
横山 武司

トランスサイレチン

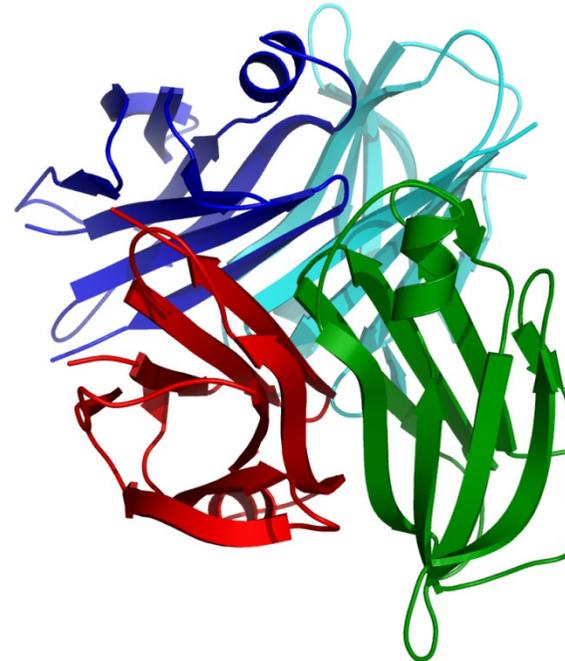
(transports thyroxine and retinol, transthyretin, TTR)

- 主に肝臓で合成され、血漿に多く含まれるタンパク質
- サイロキシン、レチノール結合タンパク質と結合し輸送する役割
- 127アミノ酸残基からなり、8つの β -シートと一つの α -ヘリックスの三次構造を形成
- ホモ4量体を形成し、総分子量は約55kDa

TTRの二次構造



TTR四量体の立体構造



TTRはアミロイド線維を形成する

アミロイドーシスとは:

アミロイド線維と呼ばれる繊維状の不溶性異常蛋白が沈着して臓器の機能障害をおこす病気の総称。その多くが厚生労働省により『特定疾患』に指定されている。

①家族性アミロイドポリニューロパシー (Familial Amyloid Polynueropathy : FAP):

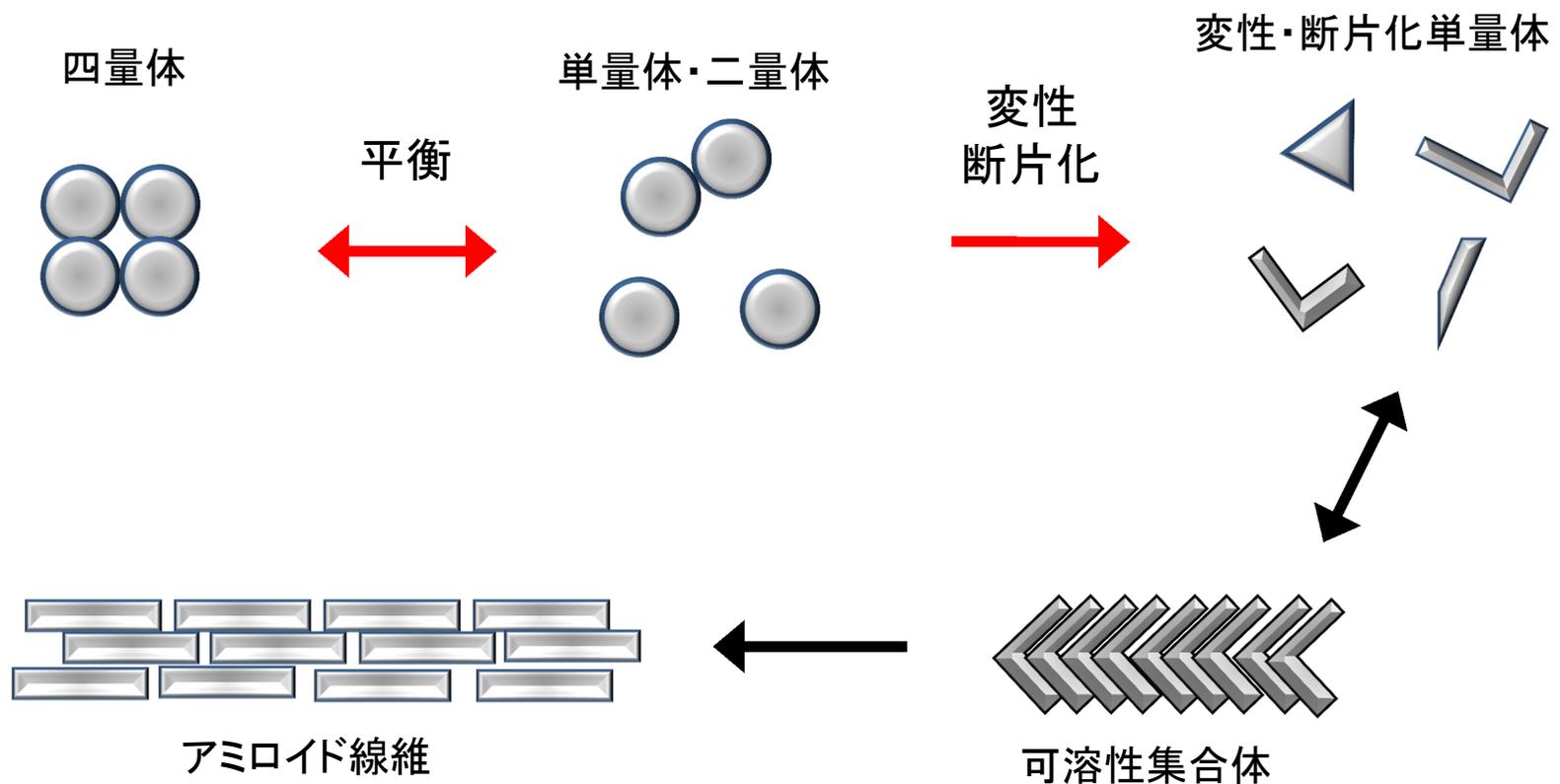
TTR等の遺伝子変異によるアミロイド線維蓄積が原因の多発性神経障害。アミロイド線維が神経と筋肉組織全体に沈着し、感覚障害、運動障害、自律神経障害等を呈する。FAPは診断後数年で死に至ることもある難病であるが、現在確立されている治療法は肝移植のみである。

②老人性全身性アミロイドーシス (Senile Systemic Amylodosi: SSA) :

野生型TTRの主に心臓への病的な沈着によって引き起こされる。SSAは高齢者での頻度が高く、80歳以上の高齢者では22-25%の頻度で心臓へのアミロイド沈着が認められる。SSA患者は通常、無症状であるか心症状を呈することが多い。

TTRのアミロイド線維形成モデル

経時的・pH低下による構造不安定化・単量体化が
アミロイド線維形成の律速段階であると考えられている



TTR中性子結晶構造解析の目的

➤ pH低下と構造不安定化・単量体化の関係を構造的に説明

プロトン化状態の確認、プロトン化状態に依存した結合の有無を調査

水分子の方位を決定

プロトン化と構造不安定化・四量体解離の関係を調査

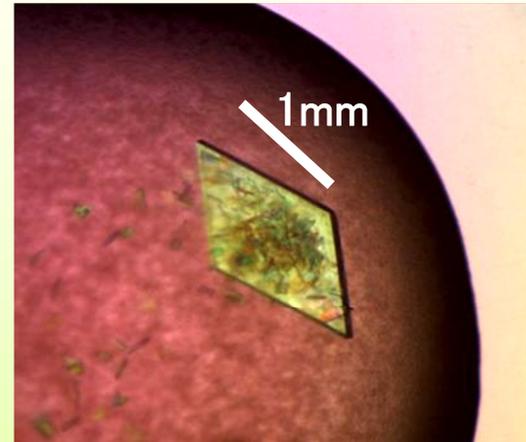
アミロイド線維形成の初期段階である四量体解離の分子メカニズムを解明し、

得られる中性子構造モデルを元に創薬インフォマティクス基盤を構築

結晶化

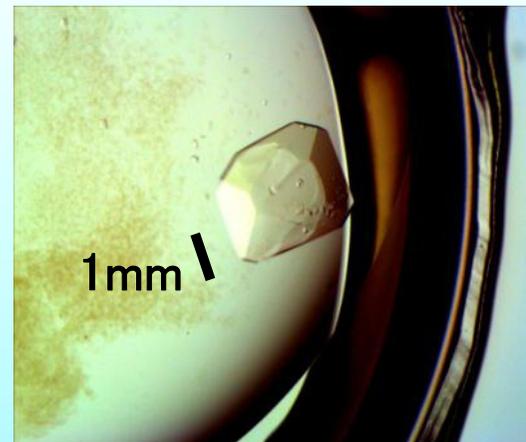
野生型 TTR:

マクロシーディング法等を用いて、一年半で約 0.5mm^3 程度まで成長。しかし、結晶性は悪く、部分的なヒビや、親結晶を種とした小さな結晶が多数生じており、回折測定には不向き。



Δ N11 - TTR :

N末端12残基目から始まる変異体。結晶成長速度が比較的速く、大型結晶作成にマクロシーディング法を必要としない。3ヶ月～4ヶ月程で $2.0 - 2.5\text{mm}^3$ 程度まで成長し、中性子回折測定に適している。この変異体を用いて回折測定を行った。



中性子回折測定・データ収集



結晶化方法: シットティング
ドロップ蒸気拡散法

20°Cで3~4ヶ月程度静置

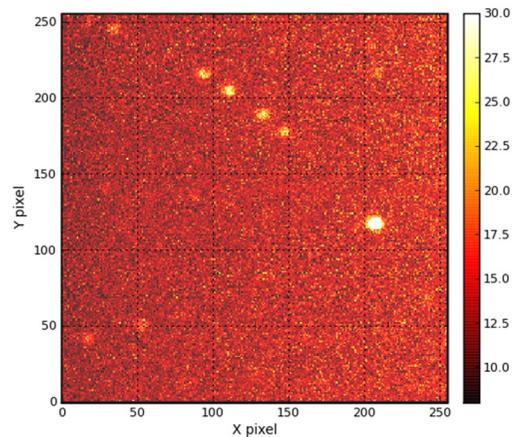
リザーバー溶液 (5 ml):
1.85 M クエン酸三アンモニウム
pD 7.4

ドロップ溶液 (400 μl):
9.5 mg ml⁻¹ TTR
1.0 M クエン酸三アンモニウム pD 7.4
0.2M 塩化マグネシウム

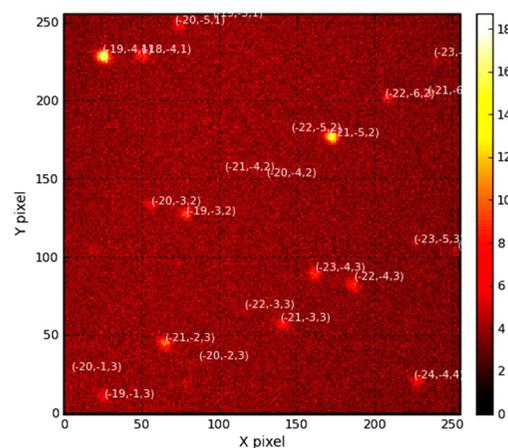
測定条件

結晶の体積	2.5 mm ³	
測定温度	20 °C	
検出器台数 ($2\theta_{\text{center}}$)	13 台 (33.0 – 139.4°)	
波長範囲	2.7 – 6.7 Å	
収集セット数	41	
測定時間 / セット (加速器出力)	約 20 時間 (120 kW)	約 12 時間 (220 kW)

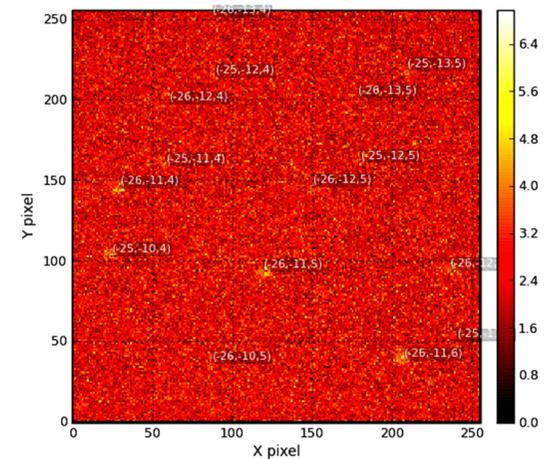
$2\theta_{\text{center}} = 33^\circ$ の検出器の回折像
(分解能領域 3.74 – 14.34 Å を表示)



$2\theta_{\text{center}} = 51^\circ$ の検出器の回折像
(分解能領域 3.16 – 5.03Å を表示)



$2\theta_{\text{center}} = 118^\circ$ の検出器の回折像
(分解能領域 2.44 – 2.74Å を表示)



データ処理・構造精密化

Crystal data

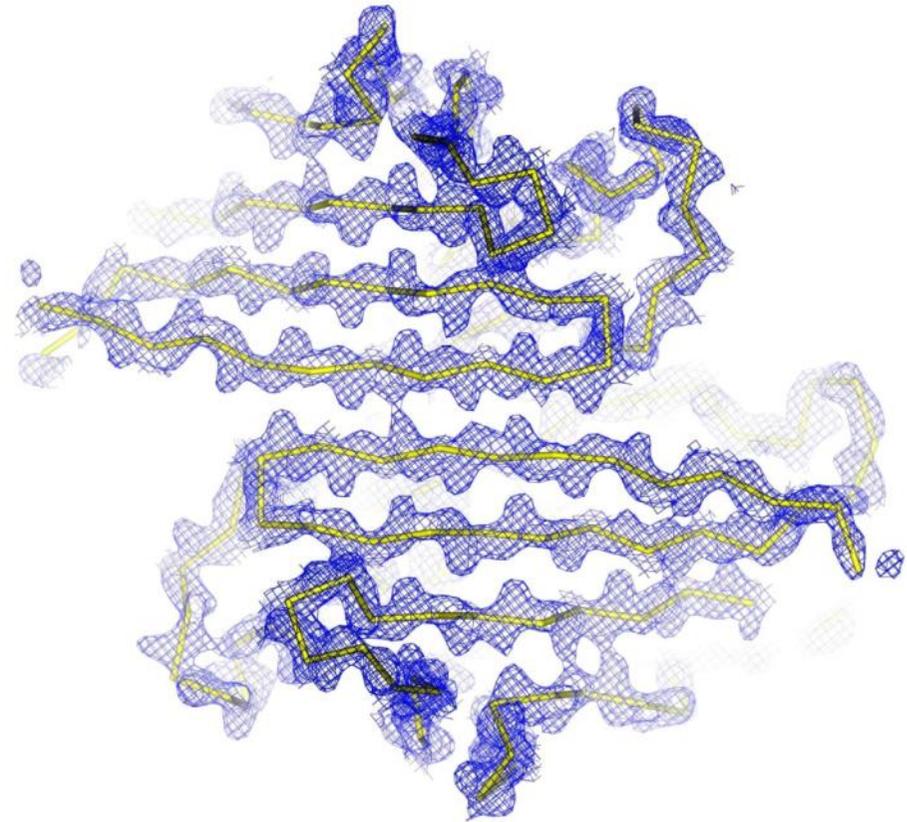
Wavelength range (Å)	3.2 – 6.2
Space group	$P 2_1 2_1 2$
Unit cell	a=44.3, b=86.4, c=66.7
Maximum resolution (Å)	2.0
Observed reflections	39,810 (2,080)
Unique reflections	15,307 (1,243)
R_{sym} (%)	19.1 (30.6)
Completeness (%)	86.4 (72.5)
I/sigma	4.3 (1.5)
redundancy	2.6 (1.7)

Refinement data

R_{factor} (%)	23.4		
R_{free} (%)	27.2		
R.M.S.D bonds (Å)	0.010		
R.M.S.D angles (°)	1.478		
No. of water molecules	55		
No. of atoms (occupancy) in asymmetric unit			
C	1,127	S	4
N	286	H	1,708 (1505.28)
O	398 (397.50)	D	393 (234.82)
total	3,916 (3555.50)		

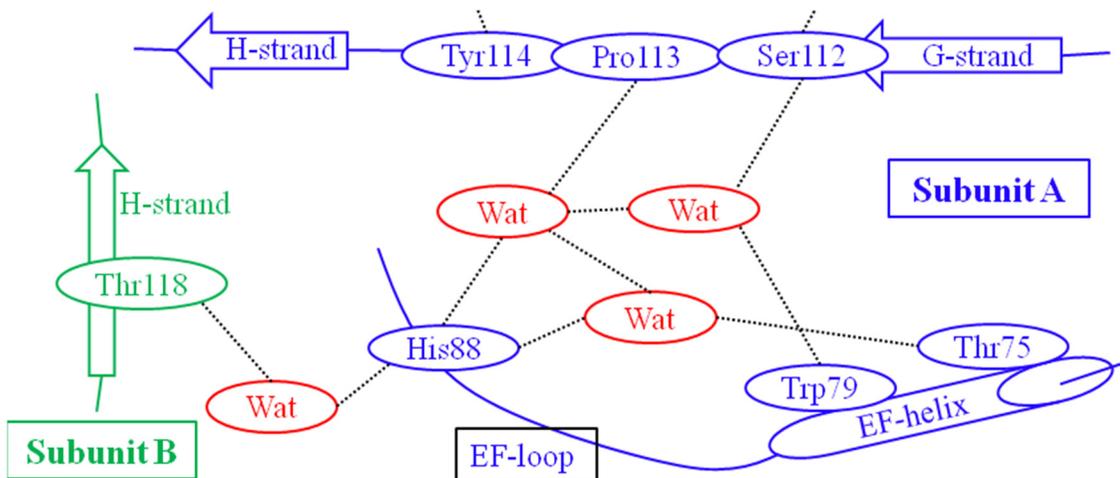
TTRのC α モデルと主鎖の中性子散乱長密度図

($2|F_o| - |F_c|$ map, 1.5σ)

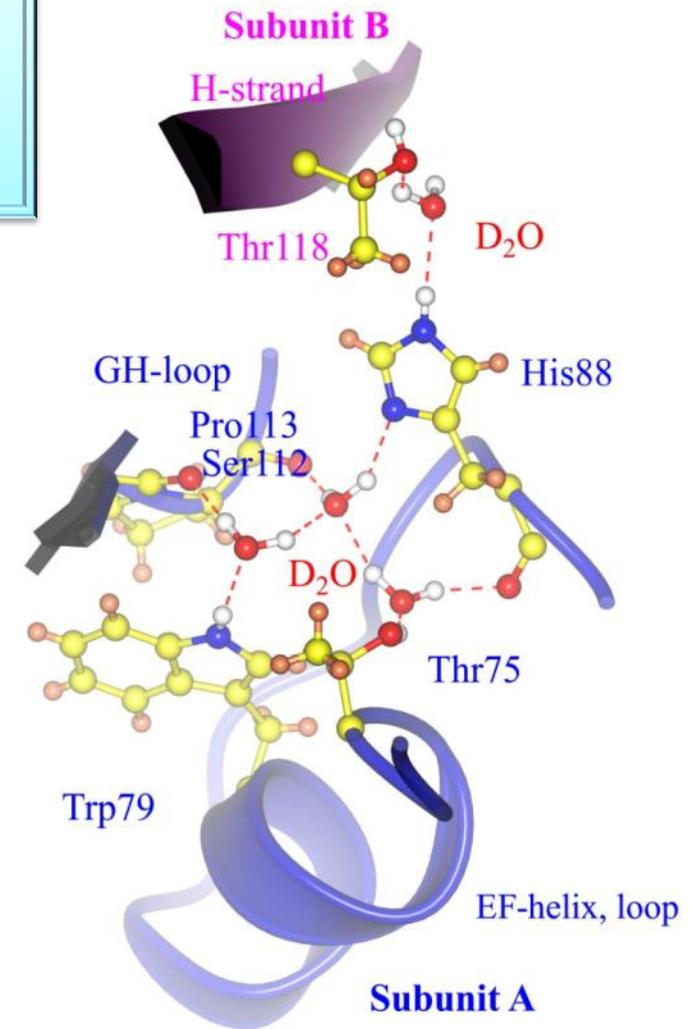


His88近傍の水素結合ネットワーク

His88のプロトン化状態はEF-ループ・ヘリックス近傍の水素結合ネットワーク形成において重要な要素である。pH低下によってHis88がダブルプロトン化されると水素結合ネットワークを消失し、TTRの構造が不安定化することが示唆された。



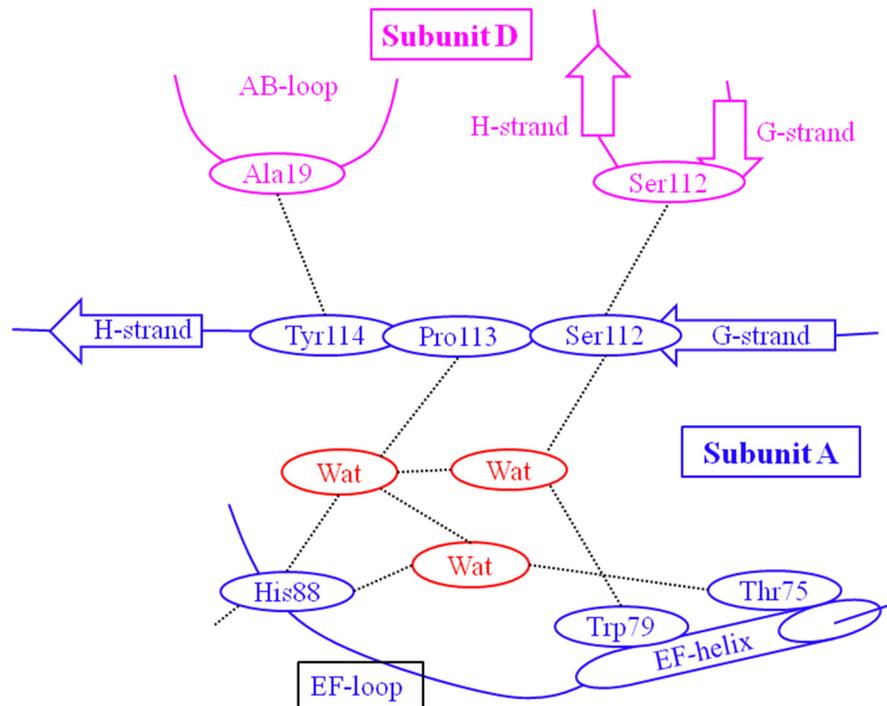
水素結合ネットワークの模式図



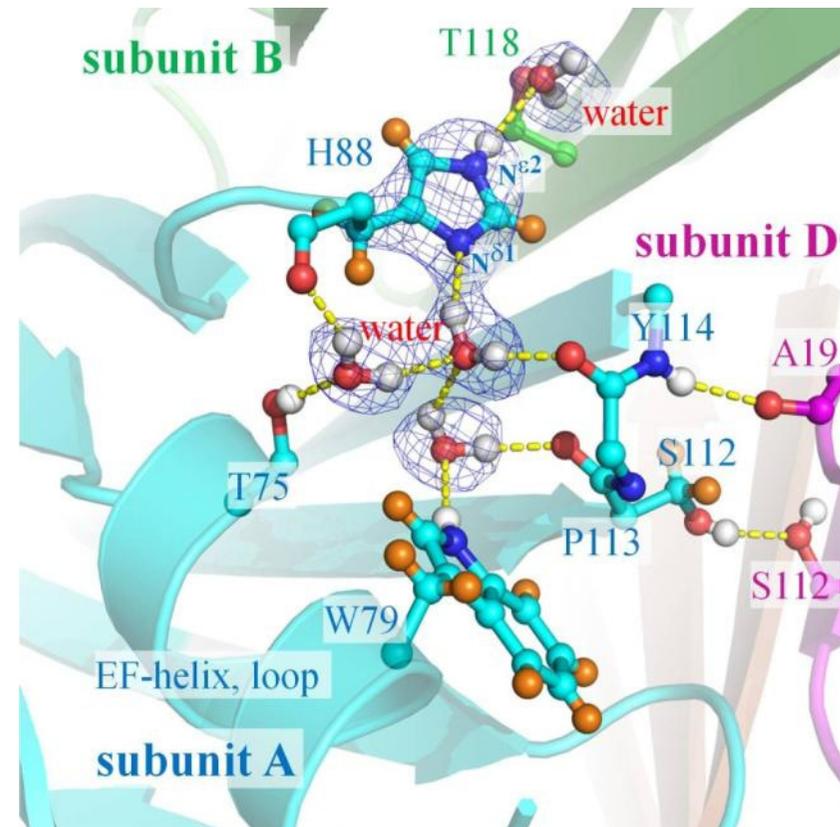
His88近傍の中性子構造モデル

His88近傍の水素結合ネットワークとサブユニット間相互作用

水素結合ネットワークはTTR内部の構造安定化だけでなく、単量体間相互作用 (Subunit A-B) の形成と、GHループの構造を安定化することによって二量体間相互作用 (Subunit A-D) の形成も手助けしている。



水素結合ネットワークと二量体間接触の模式図



二量体間接触近傍の中性子構造モデルと
中性子散乱長密度図 (オミット差フーリエ: 3.0σ)

TTRのpH感受性に関わるアミノ酸残基の特定

アミノ酸残基	プロトン結合状態	相互作用	pH4.0のX線結晶構造*
Asp18	非プロトン化	Val20, Arg21, Tyr78と水素結合	中性と同じ
Glu54	非プロトン化	His56と水素結合	中性と同じ
His56	N ϵ ² プロトン化	Glu54と水素結合	中性と同じ
Asp74	非プロトン化	Ser77と水素結合	水素結合消失
His88	Nϵプロトン化	水分子, Thr75, Trp79, Ser112, Pro113で 水素結合ネットワークを形成	水素結合消失
Glu89	非プロトン化	Lys76と塩橋、Thr96と水素結合	塩橋・水素結合消失
Glu72	非プロトン化	相互作用無し	中性と同じ
His31	N δ ¹ ・N ϵ ² プロトン化	結晶学的等価な分子と水素結合	中性と同じ
His90	N ϵ ² プロトン化	Glu92と部分的に水素結合	中性と同じ
Asp38, Asp39, Glu51, Glu61, Glu62, Glu63, Glu92, Asp99: ディスオーダー			

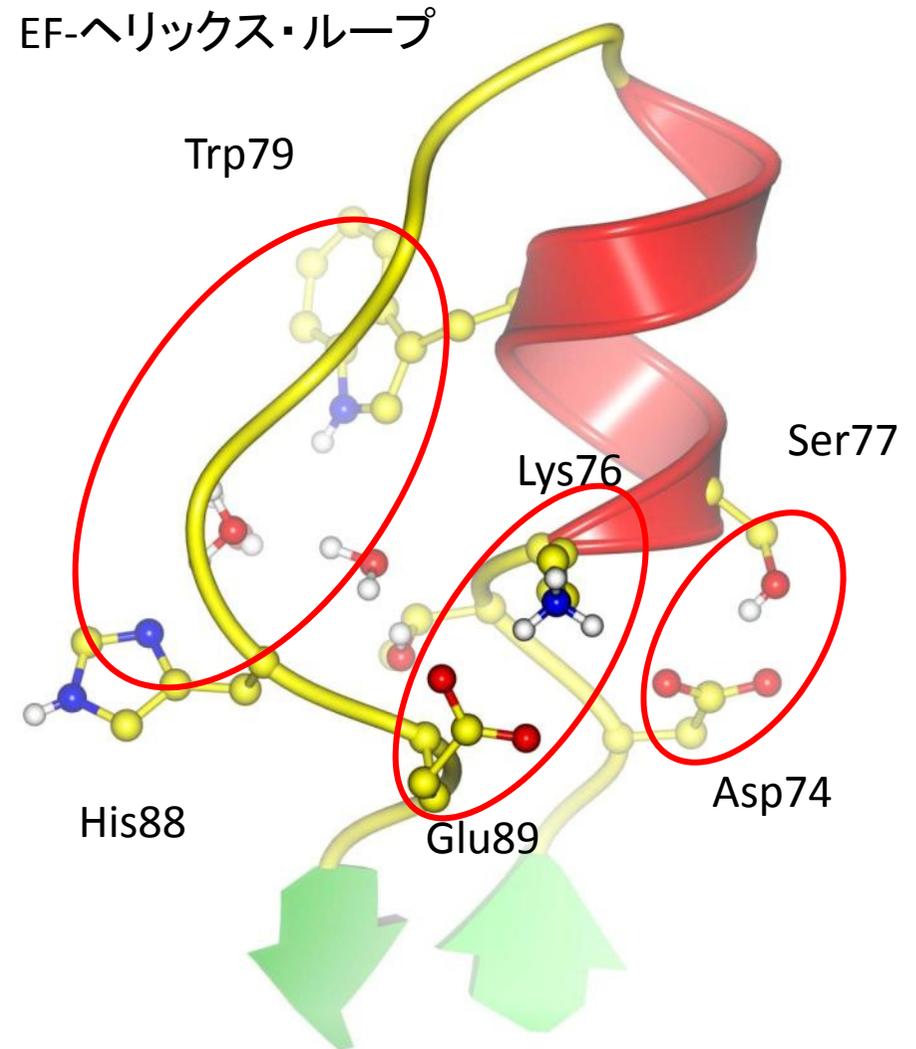
* : PDBID: 3D7P を参照

プロトン化と構造変化の関係

本研究でプロトンが結合すると示唆された Asp74, His88, Glu89は全てEF-ヘリックス・ループ上のThr75, Lys76, Ser77, Trp79と直接・間接的に相互作用している。

これまでの研究によると、WT-pH4.0, WT-pH3.5, I84S-pH4.6, I84S-pH4.6等の酸性pHで作成した結晶構造では主にEF-ヘリックス・ループ (75-87) にのみ大きな構造変化が見受けられている。

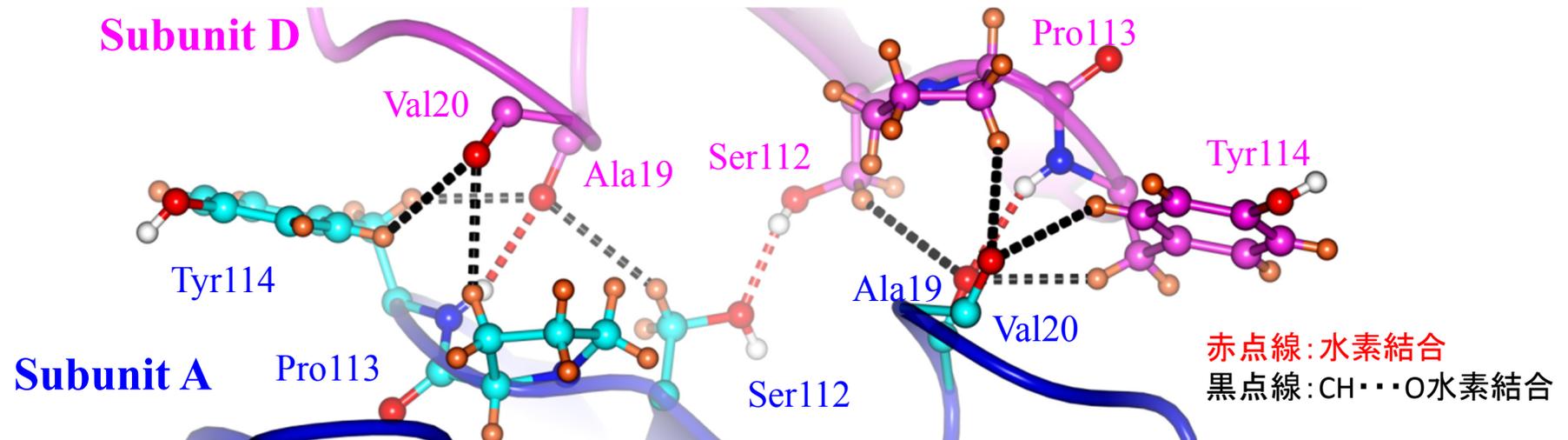
つまり、この構造変化は Asp74, His88, Glu89がプロトン化し、その結果、水素結合を消失・構造不安定化したことに起因していることがわかる。



EFヘリックス・ループの中性子構造モデル (H原子は非表示)

CH...O水素結合による四量体安定化

三つの水素結合と八つのCH...O水素結合が二量体間相互作用 (Subunit A-D) に寄与している。特に、Tyr114の側鎖が関わるCH...O水素結合数は半分を占め、四量体形成に重要な役割を果たしている。



アクセプター	ドナー	結合距離 (Å)	
水素結合 (3)		O...O, O...N	O...D
Ala19(A) - O	Tyr114(D) - D	3.0	2.2
Ser112(A) - O γ	Ser112(D) - D γ	2.5	1.9
Ala19(D) - O	Tyr114(A) - D	3.0	2.2
CH...O 水素結合 (8)		O...C	O...H
Ala19(A) - O	Tyr114(D) - H β^2	3.4	2.6
Val20(A) - O	Pro113(D) - H β^2	3.6	2.8
Val20(A) - O	Tyr114(D) - H δ^1	3.4	2.8
Ala19(A) - O	Ser112(D) - H β^3	3.7	2.9
Ala19(D) - O	Ser112(A) - H β^3	3.6	2.9
Val20(D) - O	Pro113(A) - H β^2	3.6	2.7
Ala19(D) - O	Tyr114(A) - H β^2	3.4	2.6
Val20(D) - O	Tyr114(A) - H δ^1	3.4	2.8

結果のまとめ・考察

- ・ TTR の大型結晶化・BL-03 iBIXを利用した回折データ収集、構造解析に成功
- ・ His等のプロトン化状態、水分子の方位を決定
- ・ TTRのサブユニット内・サブユニット間に形成された水素結合ネットワークを発見
- ・ pHが低下する際のプロトン結合部位を同定

1. pH低下によるアミロイド線維形成促進の構造的要因を解明した

TTRのpH感受性は主にHis88とその水素結合ネットワークに起因している

- ・ その形成がHis88のプロトン化状態に依存している
- ・ 計10本の水素結合から形成されている
- ・ pH4.0の結晶構造では形成されていない

2. 本研究結果はアミロイド線維形成阻害の標的として、His88と近傍の水分子にも目を向けるべきという新規の指針をとった

3. 現在、中性子構造モデルを用いたインシリコ創薬による新規薬剤開発に取り組んでいる

謝辞

富山大学

水口 峰之 先生

鍋島 裕子 様

iBIX開発コアメンバー

茨城大学 新村 信雄 先生

田中 伊知朗 先生

日下 勝弘 先生

山田 太郎 先生

細谷 孝明 先生

友寄 克亮 博士

CROSS 大原 高志 博士

JAEA 栗原 和男 博士

茨城県