

I - 4 SR-阻害薬複合体の立体構造解析

富山大学・大学院医学薬学研究部 構造生物学研究室 教授 水口 峰之

【研究目的】

SRの阻害薬は、神経変性疾患の新たな治療薬になりうると期待されている。SRを標的とした新たな神経変性疾患治療薬を開発するには、ヒトSRの阻害剤の作用機構を三次元立体構造から解明する必要がある。得られる立体構造は、新たな薬物デザインの根拠となる重要な情報になると期待される。従って、本研究は、ヒトSRとその阻害薬の立体構造をX線結晶構造解析によって明らかにし、阻害剤の作用機構を解明することを目的として実施した。

【研究結果】

タンパク質のX線結晶構造解析を成功させるには、高純度のタンパク質試料が数十ミリグラム必要である。また、タンパク質が不安定な場合には結晶化が困難であるため、安定なタンパク質試料を得ることも重要である。ヒトSRは340アミノ酸残基からなるタンパク質であり、Cysを7つ有する。Smithらは、Cys2とCys6をAspに変異させたヒトSRは安定で立体構造解析に適していると報告している(Smith et al., 2010)。Smithらの方法にしたがって、我々はヒトSRのC2D/C6D変異体の発現・精製を行った。

ヒトSRのC2D/C6D変異体のDNAを挿入したpET21aベクターを使って大腸菌BL21(DE3)RIPLを形質転換し、目的タンパク質を発現させた。この方法は昨年度と同様であるが、さらに発現量を向上させるために発現プロトコルを改良した。その結果、以下の発現プロトコルが、目的タンパク質の発現量を大幅に改善させることがわかった。まず、培養プレートの大腸菌コロニーをスクレイパーですべてとり、100 mLのLB培地に加えて、2～3時間程度37°Cで前培養を行った(LB培地にはアンピシリンとピリドキシンをそれぞれ50 µg/mLと0.01%になるように加えた)。わずかに白く懸濁したら、1 LのLB培地に加え、600 nmのODが0.5になるまで37°Cで培養した。その後、IPTGを0.3 mMになるように加え、37°Cで約18時間培養した。回収した大腸菌を超音波で破碎し、上清画分に含まれる目的タンパク質を精製した。

ヒトSRのC末端にHisタグを付加しているため、HisタグとNi²⁺イオンのアフィニティークロマトグラフィーで精製を行った。精製したヒトSRの純度はSDS-PAGEを用いて確認した。LB培地2 Lを用いて大腸菌を培養した場合、最大で9.6 mgのヒトSRを得ることができた。昨年度までのプ

ロトコールでは0.14~0.39 mgであったので大幅に改善されたといえる。

【考察と今後の展望】

研究代表者の研究によって、野生型 SR は C2D/C6D 変異体よりも活性が高いことが判明した。今後は、改良されたプロトコールを野生型 SR に適用し、結晶化に十分な量のタンパク質を得る。また、理化学研究所 NMR 施設の立体構造解析パイプラインによる無細胞タンパク合成の利用も検討する。さらに、創薬等支援技術基盤プラットフォームの利用も検討し、立体構造解析が成功するよう多方面から研究を進める。

【全体の今後の展望】

神経変性疾患ならびにてんかん発作等の神経細胞の過剰興奮が引き起こす病態に関わる SR を標的として、分子生物学、分子遺伝学、有機合成化学、構造生物学が共同する本研究は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなり、さらに和漢薬資源等からも新たなSR阻害作用物質を見出す事が期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める一連の手法を実施する事は、富山県の薬業の振興にも資すると考えられる。

【文献】

- Inoue, R., Hashimoto, K., Harai, T., Mori, H. NMDA- and β -amyloid₁₋₄₂-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. **J. Neurosci.** 28 : 14486-14491, 2008.
- Izumi, H., Ishimoto, T., Yamamoto, H., Nishijo, H., Mori, H. Bioluminescence imaging of Arc expression enables detection of activity-dependent and plastic changes in the visual cortex of adult mice. **Brain Struct. Funct.**, 216 : 91-104, 2011.
- Harai, T., Inoue, R., Fujita, Y., Tanaka, A., Horio, M., Hashimoto, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. Decreased susceptibility to seizures induced by pentylentetrazole in serine racemase knockout mice. **Epilepsy Research** 102 : 180-187.
- Ito T, Takahashi K, Naka T, Hemmi H, Yoshimura T. Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Anal. Biochem.** 371 : 167-172, 2007.
- Mori, H., Inoue, R. Serine racemase knockout mice. **Chemistry & Biodiversity** 7 : 1573-1578, 2010.
- Mustafa AK, Ahmad AS, Zeynalov E, Gazi SK, Sikka G, Ehmsen JT, Barrow RK, Coyle JT, Snyder SH, Doré S. Serine racemase deletion protects against ischemia and excitotoxicity. **J. Neurosci.** 30 : 1413-1416, 2010.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet,

J-P., Oliet, S.H.R. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor are gated by different endogenous coagonists. **Cell** 150 : 633-646, 2012.

Smith MA, Mack V, Ebneith A, Moraes I, Felicetti B, Wood M, Schonfeld D, Mather O, Cesura A, Barker J. The structure of mammalian serine racemase: evidence for conformational changes upon inhibitor binding. **J. Biol. Chem.** 285 : 12873-12881, 2010.

Strísovský K, Jirásková J, Mikulová A, Rulíšek L, Konvalinka J. Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity decarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the beta-eliminase activity. **Biochemistry** 44 : 13091-13100, 2005.

Wang, W. and Barger, S.W. Roles of quaternary structure and cystein residues in the activity of human serine racemase. **BMC Biochemistry**, 12 : 63, 2011.

Wolosker, H. and Mori, H. Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. **Amino Acids** 43 : 1895-1904, 2012.