

 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report) 2017年5月30日
課題番号(Project No.) 2016PX0005 実験課題名(Title of experiment) 抗がん薬標的ヌクレオチド分解酵素の活性部位プロトン化状態の解明 実験責任者名(Name of principal investigator) 山縣ゆり子 所属(Affiliation) 熊本大学大学院生命科学研究部	装置責任者(Name of responsible person) 日下勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX 実施日(Date of Experiment) (2017年1月19日~1月20日) 2017年2月26日~3月30日

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

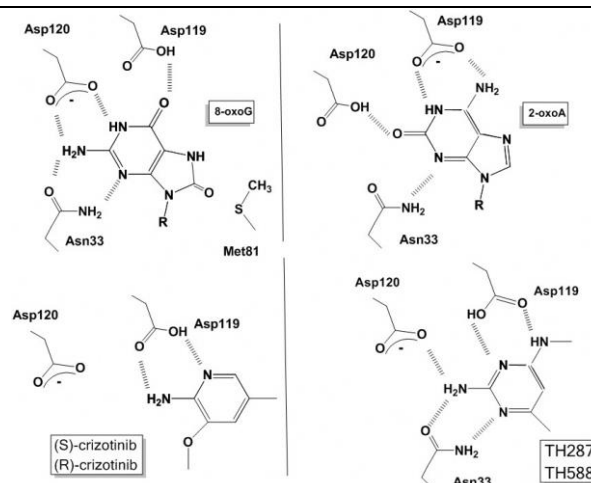
Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 実験目的(Objectives of experiment)

我々が研究対象としているヒト MTH1 は、酸化ストレスによる DNA の突然変異を抑えるのに加え、がん細胞で強く発現していることやさらに最近その阻害剤ががん細胞の増殖を抑えていることが示され、新しいがん治療薬の標的タンパク質として注目されている (Nature, 508, 215 & 222, 2014)。

MTH1 の活性部位、特に基質の塩基認識部位には多くの疎水性残基とともに2つの Asp 残基 (Asp119 と Asp120) が存在している。我々は、幅広い基質特異性やこれまでに報告されている阻害剤の化学構造の多様性 (左図) を説明するためには、2つの Asp のプロトン化部位がリガンドの化学構造に応じて変化するという新しい考えを提案したが、その証明には中性子解析によるプロトンの同定が必須である。

本研究では、まず、MTH1 フリー型の活性部位のプロトン化状態、次に複数の基質を含むリガンドとの結合時のプロトン化状態を中性子と高分解能 X 線解析と合わせて決定し、フリー型から基質や阻害剤結合におけるプロトン化状態の変化の仕組みを水素位置の情報から解明する。それには計算機科学の研究者との共同研究も行う。その結果は、ガン関連の異なる基質を同等の効率で認識する仕組みの解明とがん治療薬の候補となる阻害剤の効率的な設計に極めて有用な構造的知見を提供する。



2. 試料及び実験方法

Sample(s), chemical compositions and experimental procedure

2.1 試料 (sample(s))

1. ヒト MTH1 フリー結晶

2.2 実験方法(Experimental procedure)

ヒト MTH1 フリーの中性子回折実験用大型結晶を作製し、重水を用いた結晶化溶媒中で重水素交換後、結晶を100Kの窒素気流中で瞬間凍結し、宅急便で送付、中性子回折実験試料とした。本凍結結晶4個について1月19日にMFLのiBIXにおいて日下教授のビームタイムでテスト測定として、1結晶当たり約90分測定し、それぞれの分解能を調べたところ、3個の結晶(体積 $0.54\sim 0.9\text{ mm}^3$)が 3 \AA 近くの分解能を有することが分かった。そのうちの1個の結晶について約16時間1方位で測定(150kW)したところ、分解能 2.3 \AA 程度のデータ収集可能であることが判明した。その結果2月26日より、20日間の予定で24方位を測定する本測定を実施、途中、ビームが止まる時期もあり、3月30日9時にデータ収集を終了した。NX-refinementを行うために4月21日にSPring-8のビームラインBL44XUで本中性子回折実験に用いた結晶のX線データを収集した。

3. 実験結果及び考察 (実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。)

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

MTH1 フリーの本測定データを目視で観測すると $2.0\text{--}2.2\text{ \AA}$ の反射も見えた。現在、茨城大学日下グループとの共同研究で収集したデータの処理を行い、最終的な確認を行っているところである。中性子とX線データを用いた同時に構造精密化を行うために、測定したX線データの統計値は、次の通りである。

分解能 0.87 \AA 、格子定数、45.877, 48.147, 14.404、空間群 P212121、Rmerge 7.2% (59.7%)、 $I/\sigma I$ 61.0 (3.2)、Redundancy 7.1 (3.1)、Completeness 98.7 (86.9)。()内は最外殻分解能の値である。

X線データを用いて構造の精密化を行ったところ、 0.87 \AA 分解能で $R/R_{\text{free}}=14.2/16.7\%$ (1.0 \AA 分解能で $R/R_{\text{free}}=12.6/15.2\%$)の精密構造を得ている。今後、本精密構造と処理完了後の中性子データを合わせてMTH1フリー体の水素の位置を決定する予定である。

4. 結論(Conclusions)

中性子データの処理が完了するとX線データによる精密化構造と処理完了後の中性子データを合わせてMTH1フリー体の水素の位置を決定できると考えている。