

 <b>茨城県</b> <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	<b>MLF Experimental Report</b>	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2019PX2005 実験課題名(Title of experiment) 分子シャペロン Hsp90 の中性子結晶構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 玉田 太郎 所属(Affiliation) 量子科学技術研究開発機構 量子生命科学領域		装置責任者(Name of responsible person) 日下 勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) BL03 実施日(Date of Experiment) 2019/4/5~16 , 6/29

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.

<b>1. 実験目的(Objectives of experiment)</b>
<p>熱ショック蛋白質 Hsp90 は近年抗がん剤開発の創薬標的蛋白質として注目を集めている。Hsp90 はシャペロンとしての機能をがんの増殖や生存に関わる多くの蛋白質に施すことで細胞のがん化を促進していることが知られている。よって、Hsp90 阻害剤は Hsp90 を標的にした単一の分子標的薬であるが、結果的に複数の標的の機能を阻害するユニークな抗がん剤として働くことが期待されている。Hsp90 は ATP と結合することでその機能を発揮するため、抗 Hsp90 阻害剤としては、ATP 骨格を有する化合物が候補とされてきたが、最近では異なる骨格を有する化合物も見つかっており、開発競争が激化している。本実験は、Hsp90 と ATP、ATP アナログおよび新規骨格化合物複合体の中性子結晶解析を通じて、Hsp90 の機能発現に必須の分子認識機構解明と新規化合物デザインに繋がる知見の創出を目的とする。</p>
<b>2. 試料及び実験方法</b>
Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
<b>2.1 試料 (sample(s))</b> Hsp90 (完全重水素化試料) Hsp90 (完全重水素化試料) と ATP 複合体  <b>2.2 実験方法(Experimental procedure)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ビーム出力 : 532kW (4/5~16), 537kW (6/29)</li> <li>・測定温度 : 室温</li> <li>・測定法 : 静止写真法</li> <li>・phase delay : -44 °</li> </ul>

### 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.

#### 1) Hsp90（完全重水素化試料）

体積 1.15mm<sup>3</sup> の結晶からフルデータ収集を行った。1 セットあたりの照射時間は 7 時間で、計 31 セットの回折データを収集した。2.1Å 分解能の回折点を確認できたため、この分解能でデータ処理を行った(図 1、表 1)。データ処理は複数の積分方法を試し、精密化にはデータの完全性が最も高かった Profile fitting していないデータ(左列)を用いた。同一結晶から収集した X 線回折データ(分解能 1.5Å で処理)を相補的に用いて、中性子の R 値 17.9% (free R 値 21.7%)まで精密化を実施し、構造精密化はほぼ終了している。タンパク質中のほぼ全水素原子に相当する 1848 原子を観測したが、一部(68 原子)は軽水素として観測されている(精製および結晶化を軽水環境で実施したため、その際に置き換わった水素原子が重水置換後もそのまま軽水素のまま残っていたと思われる)。水(重水)については計 177 分子観測し、うち 107 分子は D<sub>2</sub>O としてアサインすることができた。ATP 結合部位には多くの水分子が結合しており、水素結合ネットワークを形成していた。また、ATP 認識及び分解に関わると考えられている酸性アミノ酸残基のプロトン化状態も確認できた。

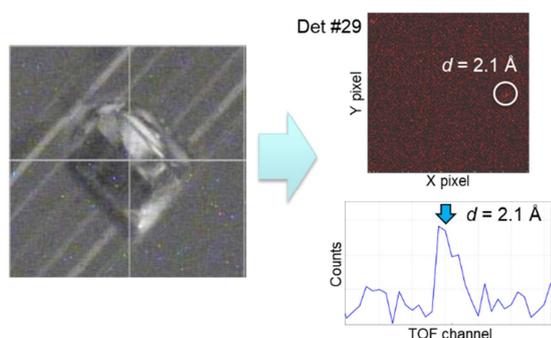


図1.Hsp90(完全重水素化試料)結晶と高角側の回折点

表1.Hsp90(完全重水素化試料)中性子回折データ統計値

積分方法	Elliptic col	Elliptic col	Elliptic col
反射選択		Profile fitting (rectangle)	Profile fitting (ellipse)
Resolution range (Å)	21.8-2.1 (2.18-2.10)	21.8-2.1 (2.18-2.10)	21.8-2.1 (2.18-2.10)
Space group	I222		
Unit cell a, b, c (Å)	101.01, 90.24, 66.44		
Observed reflections	112599	102509	91209
Unique reflections	17806	17767	17685
Redundancy	6.3 (5.9)	5.8 (5.4)	5.2 (4.9)
Completeness (%)	98.5 (99.0)	98.3 (98.8)	97.9 (98.2)
$I/\sigma(I)$	10.0 (2.0)	9.7 (1.9)	9.1 (1.8)
$R_{int}$ (%)	24.6 (61.2)	23.8 (60.4)	22.6 (58.9)
$R_{pim}$ (%)	10.8 (36.5)	10.9 (37.6)	10.9 (38.3)

#### 2) Hsp90（完全重水素化試料）と ATP 複合体

体積 0.15mm<sup>3</sup> の結晶を用いて予備的回折実験を実施した。計 19 時間照射した結果、約 3.0Å 分解能の回折点を確認した。ATP 複合体結晶は Hsp90 単独結晶とは異なる晶系として析出するが、X 線回折実験からは単独結晶と遜色ない分解能を確認できているため、結晶大型化の試みを継続することで構造解析可能な回折データが収集可能になると考えている。

### 4. 結論(Conclusions)

Hsp90 単独については、完全重水素化試料を用いることで 2.1Å 分解能のフルデータを収集することに成功し、構造精密化もほぼ終了している。ATP 複合体については、まだ十分な回折点を確認するには至っていないが、今後の研究展開の指標となる予備的結果を取得できた。今後は ATP 複合体、および阻害剤複合体のフルデータを収集し、これらを比較することから、Hsp90 の機能発現に必須の分子認識機構解明と新規化合物デザインに繋がる知見の創出を目指す。