

 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report) 2021年11月19日
課題番号(Project No.) 2020PX2008 実験課題名(Title of experiment) 中性子回折を用いた抗リウマチ薬 MTX 新規標的タンパク質 マクロファージ遊走阻害因子の構造解析 実験責任者名(Name of principal investigator) 松村 洋寿 所属(Affiliation) 秋田大学大学院理工学研究科	装置責任者(Name of responsible person) 日下 勝弘 教授 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX/BL03 実施日(Date of Experiment) 2020年6月12日、6月16日～24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)
<p>関節リウマチ治療の第一選択薬として使用されているメトトレキサート (MTX) の作用機序解明および新規抗リウマチ薬の開発を目指して、MTX 新規標的タンパク質として見出した炎症性サイトカインであるマクロファージ遊走阻害因子 (MIF) と MTX 複合体の中性子構造解析を行い、精密構造データを取得することを目的とした。これまで、MTX-MIF 複合体の中性子構造解析に向けて、軽水で調製したリザーバー溶液を用いた MIF (単体) の大型結晶作成し重水置換後、中性子回折実験のテスト測定を行ってきた。本実験では、中性子回折データの分解能を向上させるために、重水で調製したリザーバー溶液を用いて、MIF (単体) の大型結晶を作成して、中性子回折データの取得を行うこととした。</p>
2. 試料及び実験方法 Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
2.1 試料 (sample(s)) マクロファージ遊走阻害因子(MIF)(重水で調製したリザーバーで作成) 2.2 実験方法(Experimental procedure) 石英キャピラリーに封入した MIF (単体) の結晶を用いて、iBIX/BL03 において常温で中性子回折実験のテスト測定を行った。最も高い分解能が得られた結晶を用いて、本測定を行った。

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.

MIF（単体）の大型結晶作成の条件検討および中性子回折実験

軽水で調製したリザーバー溶液を用いて、MIF（単体）結晶を作成したところ、高い再現性で大型結晶が得られた。1.5 mm³の結晶を重水置換し、18 時間の中性子回折実験のテスト測定を行ったところ、最大分解能 2.3 Å の中性子回折データが得られた。重水置換の際に結晶の溶解や崩れがみられたことから、重水置換による結晶へのダメージを軽減するために、重水で調製したリザーバー溶液を用いて MIF（単体）の結晶作成を行った。重水で調製したリザーバー溶液を用いた場合においても、高い再現性で大型結晶が得られた。3.6 mm³の結晶を用いて、6.5 時間のテスト測定を行ったところ、最大分解能 1.9 Å の中性子回折データが得られた。このことから、重水で調製したリザーバー溶液で結晶を作成することで、結晶へのダメージが抑えられ、より高い分解能の中性子回折データが得られることが明らかになった。重水で調製したリザーバー溶液で作成した MIF（単体）大型結晶を用いて、7.5 日間の本測定を行ったところ、分解能 2.0 Å の中性子回折データセットを取得することができた。

MIF（単体）の中性子構造解析

分解能 2.0 Å の中性子回折データが得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory/BL-5A で X 線回折データ収集を行い、中性子回折データと併せたジョイントリファインメントを行った。その結果、水素原子を含む MIF（単体）の精密構造を決定することに成功した。MIF は受容体 CD74 と結合することで、炎症性シグナル伝達を惹起することが知られている。MIF の精密構造から、CD74 の結合に重要であるアミノ酸残基のプロトン化状態やその傍近の水素結合状態を、初めて明らかにすることができた。また、MTX-MIF 複合体の X 線結晶構造解析によって明らかになっている MTX 結合部位のアミノ酸残基のプロトン化状態についても情報を得ることができた。現在、MTX-MIF 複合体の中性子回折実験に向けて結晶を準備中である。今後、MIF（単体）と MTX-MIF 複合体の中性子構造を比較することで、MTX による MIF の炎症性サイトカイン活性の阻害機構を明らかにしたい。

4. 結論(Conclusions)

重水リザーバー溶液を用いることで、中性子回折データの分解能向上がみられ、MIF（単体）の中性子構造解析に成功した。得られた精密構造から、MIF の受容体 CD74 の活性化に重要であるアミノ酸残基や MTX 結合に関与するアミノ酸残基のプロトン化状態、またそのアミノ酸残基傍近の水素結合状態を明らかにすることができた。本成果は、今年度内の論文発表を目指して、投稿準備中である。また現在、MTX による MIF の炎症性サイトカイン活性の阻害機構を明らかにするために、MTX-MIF 複合体の中性子回折実験に向けて、MTX-MIF 複合体結晶の作成条件の最適化を行っている。