

## 論文の内容の要旨

論文題目 NMR 分析と計算科学的手法に基づく分子間相互作用部位の迅速な解析法の開発

氏名 小玉 優哉

### 【序論】

遺伝子産物であるタンパク質は、種々の生命活動を支える最も重要な物質の 1 つであり、生体内におけるタンパク質-タンパク質間、タンパク質-低分子間相互作用の阻害剤や促進剤が医薬品として開発されている。したがって、これら創薬の標的となるタンパク質の相互作用部位を迅速に明らかにし、その部位の構造や化学的な特徴に基づく合理的なリード化合物設計の起点となる情報を速やかに取得することは、効率的に創薬研究を展開するうえで極めて重要である。しかしながら、既存の手法はいずれも多大な時間と労力を要し、NMR 分析法においては、特に「シグナルの帰属」のために大量のサンプルおよび多数の複雑な実験と解析を必要とする点が課題となっている。

そこで本研究では、分子間相互作用部位の迅速な同定を可能にすべく、タンパク質単体の立体構造さえ既知であれば、シグナルの帰属を行わずに 1 つのサンプルに関する簡単な実験と解析のみで、迅速、簡便かつ客観的にタンパク質-タンパク質間相互作用部位およびタンパク質-低分子間相互作用部位を同定できる手法を開発した。

### 【本論】

#### 1. タンパク質-タンパク質間相互作用部位同定法の開発

これまでにも、既知のタンパク質立体構造情報を用いることでシグナルの帰属を回避する手法が提案されていた。しかしながら、大量のサンプルおよび多数の実験が必要であるため、依然として多くの時間と労力を要し、さらには、得られる結果に解析者の主観と手法に起因するバイアスが含まれる等、課題が多かった。

そこで本研究では、既知のタンパク質立体構造情報を用いる既報の概念を活用しつつ、1 サンプルに関する簡単な実験と解析のみから迅速かつ簡便に客観的な結果が得られる、新しい手法を開発した。その概要は下記のとおりである。(1)特別な工夫により、各シグナルが対応するアミノ酸残基の種類を初めから明らかにする。(2)相互作用物質の添加に伴い、化学シフトが大きく変化する(すなわち、相互作用部に存在する可能性が高い)アミノ酸残基の種類と数を明らかにする。(3)解析対象のタンパク質立体構造の表面において、先の実験で得られたアミノ酸残基の種類と数が存在する箇所を探索し、相互作用部位を同定する。本手法を実現するにあたり、まず要素技術として下記(I)~(III)を開発し、続いてそれらを用いた本手法の有効性を実証した。

#### (I) シグナルが対応するアミノ酸残基の種類を初めから明らかとする手法

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  の相関シグナルは、各種のアミノ酸残基の部位ごとに、特定の範囲の化学シフト値を示すことが統計的に知られている。したがって、シグナルがとり得る化学シフト値の範囲が重ならないよう、統計情報を基に  $^{13}\text{C}$  で標識する原子の組み合わせを慎重に選択することで、各シグナルがどの

アミノ酸残基種に由来するか初めから明らかとなるようにした。また、 $^{15}\text{N}$  標識も施し、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  の相関シグナルを併用することで得られる情報量を増やした。標識するアミノ酸残基の種類と部位の組み合わせは、とり得る化学シフト値の範囲が重ならないことを前提に、相互作用部位における各アミノ酸残基種の存在傾向に関する統計値や標識試薬の入手可能性なども考慮し、最適なものを選択した。

## (II) 測定を短時間かつ高分解能で行う手法

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$  と  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  の相関シグナルを一度の実験で観測でき、さらに化学シフト異方性の影響が大きい芳香環由来の  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  相関シグナル、およびアミド由来の  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  相関シグナルの観測に横緩和最適化分光法を適用した、新たな NMR 実験用パルスシーケンスを開発した。これにより、測定時間が短縮され、さらに間接観測軸方向へのシグナルの広幅化を抑制し高分解能の測定を可能にすることで、解析可能な分子量の上限を拡大した。

## (III) 実験結果に一致する箇所を迅速かつ客観的に探索する手法

実験結果を基に相互作用部位を同定する際、目視による探索では解析に時間と労力を要し、得られる結果が解析者の主観に依存してしまう。そこで、実験結果から相互作用部位に存在するアミノ酸残基を選び出す手順を規定しプログラム化することで、解析者に依らず同じ結果を迅速かつ簡便に得られるようにした。

## 有効性の実証

前述の要素技術を組み合わせた本手法の有効性を、複合体構造が既知である分子量 26.4 k のユビキチン加水分解酵素 (Ubiquitin Hydrolase、以下 UH) と分子量 8.6 k のユビキチン (Ubiquitin、以下 Ub) を用いて確認した。まず、(I) で述べたように安定同位体標識を施した UH を調製し、(II) で述べたパルスシーケンスを用いて NMR スペクトルを取得したところ、想定通り、各シグナルの化学シフト値から対応するアミノ酸残基の種類を判別することが可能であった。次に、Ub を添加して相互作用実験を行い、化学シフト変化が大きいシグナルの個数をアミノ酸残基の種類ごとに取得した。得られた結果と UH の立体構造情報を入力情報として、(III) で述べたプログラムで解析したところ、Ub との相互作用部位に存在するアミノ酸残基が同定された。また、Ub についても同様に実験と解析を行い、相互作用部位に存在するアミノ酸残基が同定されることを確認した。以上のように、本手法により迅速、簡便かつ客観的にタンパク質-タンパク質間相互作用部位の同定が可能であることが示された。また、本手法の結果を用いたドッキングシミュレーションにより、複合体構造の高精度な予測が可能であることを併せて確認した。

## **2. タンパク質-低分子間相互作用部位同定法**

### 低分子用の新しい解析法の開発

タンパク質-低分子間相互作用部位の同定も同様の概念で可能であるが、相互作用様式が異なるために、実験結果に一致する箇所を探索するためには新たな解析法が必要であった。そこで、タンパク質-タンパク質間の場合のように連続した相互作用「面」を形成するアミノ酸残基を探索するのではなく、周辺に存在するアミノ酸残基と実験結果との一致度が高い「空間」を探索する手法

を考案し、解析用のプログラムを開発した。

#### p38 $\alpha$ と阻害剤を用いた有効性の実証

前述の新しい解析法を組み合わせることで、タンパク質-低分子間相互作用部位の同定が可能であることを、炎症性疾患などに対する創薬の標的タンパク質としてよく知られている p38 $\alpha$  (分子量 41 k) と、p38 $\alpha$  との複合体構造が既知である阻害剤 2-amino-3-benzyloxypyridine (分子量 200) を用いて実証した。タンパク質-タンパク質間の場合と同様の方針で標識された p38 $\alpha$  を調製し、阻害剤を添加して、化学シフト変化が大きいシグナルの個数をアミノ酸残基の種類ごとに取得した。この結果と p38 $\alpha$  の apo 体の構造を用いて本手法で解析したところ、相互作用部位の空間として同定された箇所は、複合体構造で確認される阻害剤の相互作用部位であった。

#### p38 $\alpha$ とデカン酸を用いた有効性の実証

近年、脂質の一種である *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ( $\beta$ -OG) が、p38 $\alpha$  の MAP kinase insert region と呼ばれる領域付近へ相互作用することが、複合体結晶構造の解析により明らかとなっている。また、脂肪酸やその誘導体が、p38 経路を活性化すると報告がある。そこで脂肪酸が、 $\beta$ -OG と同様に MAP kinase insert region に相互作用し、さらにはアロステリックエフェクターとして働く可能性を考え、デカン酸を例に本手法による相互作用部位の同定を試みた。前述の阻害剤を用いた実験と同様に、標識された p38 $\alpha$  を調製しデカン酸の添加実験を行ったところ、デカン酸との特異的な相互作用が確認された。また、実験結果を基に本手法で解析した結果、デカン酸との相互作用部位とされた箇所は、 $\beta$ -OG との相互作用部位と同じであった。結果の妥当性を確認するため、 $\beta$ -OG との相互作用部位に存在する Trp197 に対応するシグナルを変異実験により帰属し、その化学シフトが  $\beta$ -OG、デカン酸のどちらを添加しても同様に変化することを確認した。これらの結果から、デカン酸の相互作用部位は、本手法で示されたとおり  $\beta$ -OG と同じ箇所であることが強く示唆された。また同時に、デカン酸が p38 $\alpha$  へ特異的に相互作用することが初めて示された。

以上のように、本手法により迅速、簡便かつ客観的に、タンパク質-低分子間相互作用部位の同定が可能であることが示された。また、薬様化合物以外の低分子化合物との相互作用解析にも、本手法を活用できることが示された。さらに、手法の有効性を実証する過程で、デカン酸が p38 $\alpha$  へ特異的に相互作用することが示され、その相互作用部位を強く示唆する結果を取得した。

### 3. 総括

解析対象のタンパク質単体の立体構造さえ既知であれば、1 サンプルについて簡単な NMR 実験を行うだけで、迅速、簡便かつ客観的にタンパク質-タンパク質間またはタンパク質-低分子間の相互作用部位を同定できる手法を開発した。さらに、本手法の有用性を示す過程で、p38 $\alpha$  へデカン酸が特異的に相互作用することを初めて明らかにし、その相互作用部位が ATP 結合部位から離れた MAP kinase insert region 付近であることを強く示唆する結果を得た。これらの知見は、p38 $\alpha$  を対象とした創薬を新たな観点から展開するうえで有用である可能性がある。本研究で開発した手法により、相互作用部位の構造や化学的な特徴を迅速に明らかにできるため、これらの手法は、例えば創薬研究の初期段階において、構造情報に指南された化合物設計を行う際に特に有用であると考えられる。