

## 特集：タンパク質構造機能相関再考

## NMR で見るタンパク質-低分子相互作用

廣 明 秀 一

核磁気共鳴法 (NMR) は、水溶液中でタンパク質とそれに相互作用する低分子リガンドを、解離会合の平衡状態のまま観測することができる測定法である。そのため、X線結晶解析と比較して、結合の弱いタンパク質-低分子相互作用に関して、強みを発揮する。相互作用検出を目的とした方法論として、大別すると、安定同位体標識を導入したタンパク質の原子を観測する方法論と、標的タンパク質の存在下・非存在下でのスペクトル差に着目して、リガンド側のシグナルに着目する方法論の2種類に大別される。後者は、分子認識機構のような詳細な情報は得られないものの、安定同位体を必要とせず、短時間の測定で結果が得られるため、医薬品スクリーニング法の一つとして注目されている。本稿では、まず両者の主要な方法論のいくつかの原理について概説し、筆者の研究室で得られた成果の一部を報告する。

## 1. はじめに～NMRによるタンパク質-リガンド相互作用解析法の概要～

NMR法は、化合物中の原子核(主に $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ など)の核スピンの磁場中でそれぞれ固有の周波数の電磁波に共鳴することを利用して、化学構造の決定を行うための分析手法である。近年、多核多次元NMR法の進歩、装置の高磁場化、高感度プローブの開発、測定技術の高速化などの技術革新が進んだ。現在、150残基程度のタンパク質(単体)の立体構造解析はルーチン的に行うことができる。その一方で、タンパク質-低分子化合物の構造決定を苦手とする手法である。国際タンパク質立体構造データベース(protein data bank: PDB, <http://www.pdb.org/>)を見ても、NMRによる複合体の構造解析の例は多くない。それは、NMR法が、分子認識機構の解明を目的

とした場合、得られる情報量と解析スピードの観点から、X線結晶構造解析と比較して、不十分であることに起因する。例えばNMR法には、X線結晶解析と比べて次のような限界がある。(1)解析可能な分子量の上限があり、(溶液中での会合状態をも含めた)見かけの分子量が30,000以下のものにしか適用できない。(2)試料は $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ などの安定同位体で標識する必要がある。(3)NMRにはX線における分子置換法のような既存の立体構造座標を出発点にして計算機によって構造を精密化する方法の開発が未熟であるため、複合体の立体構造決定にかかる手間と時間に短縮効果がない。(4)複合体の立体構造を高精度に決定するためには、良質なスペクトルを得る必要がある、そのためにタンパク質との親和性が十分強いリガンドしか構造決定できない。(5)(4)の条件を満たすような強固に結合するリガンドは、タンパク質のNMRシグナルの化学シフトに大きな変化を引き起こすため、解析に最も時間がかかるステップであるシグナル帰属を、最初からやり直す必要性が生じる。(3)の制限と併せると、酵素-基質アナログ複合体の系統的な解析のような研究がとりわけ苦手であることがわかる(表1)。

それでは、NMR法を用いたタンパク質-リガンド相互作用の研究には、良い点はないのか?というところ、もちろんそんなことはない。相互作用研究におけるNMR法

名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻創薬分子構造学講座構造分子薬理学分野(〒464-8601 名古屋市千種区不老町 名古屋大学高等総合研究館416)

NMR methods for observing protein-ligand interaction  
Hidekazu Hiroaki (Laboratory of Structural and Molecular Pharmacology, Division of Structural Biology, Department of Basic Medicinal Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University (Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-City 464-8601, Japan))

の強みは、逆に、(1)弱い相互作用を検出することができること、(2)相互作用が弱くても特異的な相互作用と非特異的な相互作用を見分けることができること、(3)結合状態と解離状態の二状態のあいだの化学交換をそのまま観測でき、また測定から交換速度を見積もることができること、(4)NMR 試料管内で滴定実験を行うことで、飽和曲線から  $K_d$  が算出可能なこと、などがあげられる。これらの特徴は、NMR 法が、試料管内に含まれる非常に多数の核スピン (の外部磁場による影響の結果) を、平均として観測しているという、その原理に由来している。しかも NMR 法は、測定中に平衡状態や後述する化学交換が存在する場合は、観測している時間内での時間平均を見ている測定法なのである。言い換えれば、NMR 法は、タンパク質 + 低分子化合物の混合物 (あえて複合体とは呼ばない) を試料とし、その動的平衡状態を計測することができる。このことについては、本特集の楯による総説「NMR によるタンパク質の動的構造解析」により詳細に解説されている。そこで本稿では、タンパク質-低分子の相互作用の解析に特化した、いくつかの溶液 NMR 手法について概説し、最後に筆者の研究室での実例を紹介したい。なお、本稿では、主に創薬スクリーニングにおける応用を想定して、分子量 1,000 以下のペプチドを含む低分子化合物を、単に「リガンド」と呼ぶことにする。

さて、タンパク質とリガンドの相互作用の有無・強弱および部位を NMR により観測するにあたって、タンパク質側の NMR 信号の変化を観測する方法 (「タンパク質ベース」相互作用解析法) と、リガンドの NMR 信号の変化に

着目して解析する方法 (「リガンドベース」相互作用解析法) の 2 種類の異なる戦略が存在する。以下、本稿では、それぞれの方法論を、単にタンパク質ベース法、リガンドベース法と略記する (表 1)。なお、本特集号の他の稿との比較のために、X 線結晶解析との比較についても表に示した。

## 2. タンパク質側のシグナルに着目した手法 “タンパク質ベース NMR 法”

タンパク質ベース法では、(従来のタンパク質の立体構造解析の手順に準じて) タンパク質試料に安定同位体を導入して、リガンドの添加量を変化させながら二次元・三次元 NMR を測定することで、リガンドとの相互作用の有無ならびに相互作用残基の特定を行うことができる。通常、全アミノ酸を  $^{15}\text{N}$  で標識した試料を用いて、 $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) 法や、その高分子量タンパク質に適用するための変法である TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) 法<sup>1)</sup>、測定時間を短縮するための変法である SOFAST-HMQC (band-selective optimized-flip-angle short-transient heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy) 法<sup>2)</sup> などにより、タンパク質試料由来のシグナルのみを観測し、ペプチド主鎖アミド基の  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  化学シフト相関スペクトルを解析する。リガンドとの相互作用の有無を判別するだけの目的ならば、必ずしもタンパク質由来 NMR シグナルの配列特異的帰属は必要ない。しかし、あらかじめ NH シグナルの帰属の情報とその立体構造情報がともに揃っている場合に

表 1 NMR を用いた二つのタンパク質-リガンド相互作用の検出法と、X 線結晶解析法の比較

方法	メリット	デメリット
タンパク質ベース NMR 法	短時間の測定で相互作用の有無を判定 夾雑物の影響を受けにくい 特異的な相互作用を判定可能 リガンド結合部位がわかる (ただし帰属が必要) $K_d$ が算出可能	安定同位体標識が必要 測定に要する試料量がリガンドベース法よりも多い 高分離の HSQC スペクトルが観測できる条件検討が必要 適用可能な分子量に上限 (3 万程度まで) 精密な複合体構造決定をしないかぎり分子認識機構はわからない 複数のリガンドの混合物から、相互作用をするリガンドを選択することができない
リガンドベース NMR 法	安定同位体標識が不要 信号の帰属が不要 弱い相互作用の検出が得意 標的タンパク質の分子量に上限がない 短時間で測定可能でスループットが高い 複数のリガンドの混合物から、相互作用をするリガンドを決定できる 必要なタンパク質試料量が少ない	結合部位・ファーマコフォア* (* 本文参照) の情報は得られない 強い相互作用 ( $k_{off}$ が遅い相互作用) は検出できない リガンドと溶媒の特性に合わせた条件検討が必須 特異的結合と非特異的結合が判別できない (競合実験の必要性)
X 線結晶解析	構造情報が得られ、分子認識機構が解明できる 分子置換法により、異なるリガンドを結合する複合体のシリーズ解析が容易	結晶化が必須 (夾雑物の影響を受けやすい) 通常、タンパク質単体の結晶を必要とする ソーキングによる複合体形成が必要 弱い結合や非特異的結合が判別できない スループットを高くするためには専用ビームラインが必要

は、相互作用の有無のみならず、タンパク質のポケットのどの部位にリガンドが結合したかについても情報が得られる。この特徴は、特に、アフィニティーの弱い化合物（フラグメントと呼ばれる）を出発物質として、よりアフィニティーの高い化合物を合理的に設計する fragment-based drug design (FBDD) と呼ばれる、創薬戦略と組み合わせると、特に強力であることが知られている。図 1 には、タンパク質ベース法の FBDD への代表的な応用法である SAR-by-NMR 法<sup>3)</sup>と fragment-growing 法の模式図を示した。

タンパク質ベース NMR 法の最大のメリットは、特に<sup>15</sup>N 標識タンパク質試料を使用する場合の NMR 測定の実用的な S/N 比がよく、また、添加するリガンド溶液由来の夾雑物（補助溶媒を含む）の影響を受けにくいことである。その結果、NMR 測定の装置設定が簡便であり、試料ごとに特別な条件最適化等を行う必要もない。この方法を用いて実際の実験を行う場合は、通常、0.05~0.1 mM の<sup>15</sup>N 標識タンパク質試料を用意し、リガンド非存在下で<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H 二次元スペクトルを測定する。近年広く普及した極低温プローブを使用し、かつ SOFAST-HMQC 法を利用すれば、数分以内で測定が完了することが多い。次に、タンパク質に対し、1~10 等量のリガンドを添加し、同様の測定を行い、両者のスペクトルを比較すればよい。添加するリガンド濃度を変化させて複数の測定点をとれば、大きく移動した任意のシグナルに着目した飽和曲線を作成することで、リガンドの結合定数を決定することも可能である。注意しなければならないのは、しばしば医薬品スクリーニングの原料となる有機低分子化合物の水への溶解度が低いことで、終濃度で 10% 程度のジメチルスルホキシド (DMSO) が補助溶媒として使われるケースが多い。その場合、リガ

ンドフリーのスペクトルも、DMSO 存在下で測定するなどの工夫が必須である。また、この方法で多種類の化合物のスクリーニングを行う場合に、貴重な<sup>15</sup>N 標識試料を回収・再利用するために、タンパク質とリガンドの混合、二次元 NMR 測定、基準となるスペクトルとの比較評価、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) によるタンパク質試料の再分離と回収までを自動で行う LC-NMR システムが開発された<sup>4)</sup>。

### 3. リガンドの NMR シグナルに着目した手法 “リガンドベース NMR 法”

一方、複合体形成時の（ないし標的タンパク質との相互作用の有無に応じた）リガンドの NMR 信号の変化に着目した測定法が、多数、考案されている（表 2）。代表的な方法の原理と特徴の紹介に入る前に、溶液 NMR 法を理解する上で重要な概念である「磁氣的等価性」と「化学交換」について説明する。

いわゆるパルス FT-NMR 法（現在、高磁場 NMR のほとんどの装置はこの方式である）において、0.1~数秒の間に減衰する free induction decay (FID) 信号を記録し、それをフーリエ変換 (FT) することによって横軸が共鳴周波数である NMR スペクトルを得る。もし、ある核スピンの異なる共鳴周波数を持つ二つの状態 A と B の間を、任意の交換速度で変化する場合に、交換速度が NMR の観測時間軸に比べて十分遅い場合（言い換えれば状態 A および状態 B の寿命が十分長い場合）は、A と B の 2 本の独立したシグナル  $\omega(A)$  と  $\omega(B)$  が観測される [ $\omega(A)$  と  $\omega(B)$  はそれぞれ A と B に相当する NMR シグナルの共鳴周波数で、単位は Hz であるとする、図 2]。一方、状態 A と状態 B の交換が極めて早い（たとえばミリ秒以下）場

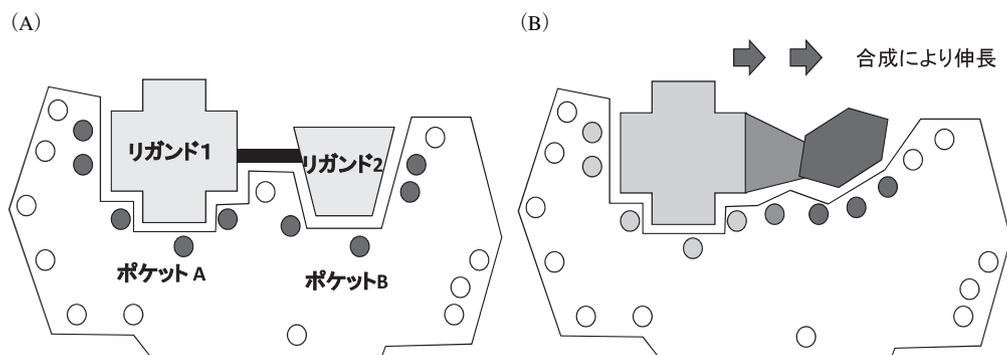


図 1 タンパク質ベース NMR 法の主要な二つの方法の模式図

○●●は NH を意味し、○はリガンド添加によりシグナル位置の変化しなかった NH を、●●●は変化が見られた NH を表す。(A) SAR-by-NMR 法。タンパク質上の近接したポケット A と B に、それぞれ独立に結合するリガンドフラグメント 1 と 2 を NMR シグナルの変化を指標に同定し、その二つを適切なリンカーで連結することで、アフィニティーの高い新規のリード化合物を得る方法である。(B) fragment-growing 法。初めにポケットの一部分に結合するリガンドを出発化合物として、ポケットのより広い部分に結合するように、NH シグナルの変化を指標にしつつ、化合物展開合成を行う手法である。

表2 タンパク質-リガンド相互作用の検出に利用されるリガンドベース NMR 法のいろいろ

変化するパラメータ		原 理 な ど
$T_1/T_2$ フィルター測定法	緩和時間 $T_1/T_2$	緩和時間は $T_1$ , $T_2$ とも分子量が大きいほうが短いことを利用する。タンパク質がない状態でのスペクトルを対照として、相互作用のある化合物由来のシグナル強度の減少を見る。
転移 NOE 法	交差緩和, NOE	NOE は、分子量が小さいと正に、分子量が大きいと負に出ることから、タンパク質に結合状態のリガンド由来の NOE 信号が観測される。精密化により結合状態のリガンドのコンホメーションがわかる。
DOSY	並進拡散係数	分子のブラウン運動による並進拡散は、分子量が小さいほど早い。磁場グラジエントを利用した NMR 測定により、横軸を $^1\text{H}$ 化学シフト、縦軸を拡散係数とした二次元 NMR を測定し、 $^1\text{H}$ スペクトルを拡散係数の違いで二次元に展開する。
STD	交差緩和の効率	交差緩和の効率は分子量が大きいほどよいので、タンパク質の $^1\text{H}$ スピンの磁化が先に飽和し、その後、結合したリガンドに移動する。励起パルスの有無で、リガンドのシグナルの強度変化を観察する。
WaterLOGSY	交差緩和の効率	同上。ただし、タンパク質の $^1\text{H}$ を直接励起するのではなく、水分子の磁化を励起して、それを化学交換によりタンパク質に移す。
INPHARMA	交差緩和の効率	同上。ただし、タンパク質の $^1\text{H}$ を直接励起するのではなく、既知のリガンドから飽和移動させ、さらに未知リガンドへと移動させる。

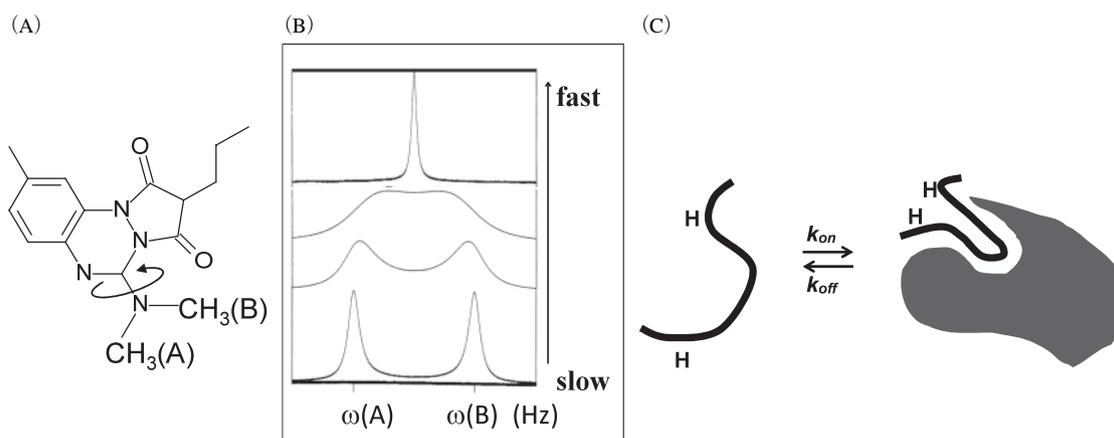


図2 NMRにおける化学交換の模式図

(A) azapropazone の化学構造。N に結合した A と B の二つのメチル基は、温度が低いときには矢印が記された単結合の回転運動が制限されているため磁氣的に非等価で、2本の独立した NMR 信号を与える。(B) 化学交換の速度と、NMR シグナルの縮重の関係。化学交換速度が速まるにつれて、2本のシグナルが平均化されて1本の尖鋭なシグナルに縮重する。なお、交換速度が中程度の場合には、シグナルは極端に広幅化し、しばしば見かけ上消失する。(C) タンパク質-リガンド結合平衡反応における化学交換の模式図。この場合も、結合・解離反応速度が速いと、遊離状態のリガンド由来の NMR シグナルと、結合状態のシグナルの間で平均化が見られる。

合は、状態 A と状態 B の存在比率が等しい場合は、本来観測されるべき A 由来シグナルと B 由来シグナルの midpoint の位置、 $[\omega(A) + \omega(B)]/2$  に相当する周波数に1本の信号が観測される (図2)。このとき、NMR では状態 A と状態 B を区別することができず、一緒に観測してしまっていることになる。このように、分子運動や平衡反応・化学交換を全て加味した上で、NMR 現象の観測時間軸の範囲内で、異なるスピンの磁氣的環境が見かけ上等しい関係となることを、磁氣的等価性と呼ぶ。

化学交換を説明する場合によく引き合いに出されるの

が、azapropazone の N に結合した二つのメチル基の信号である。温度を上げると窒素と芳香環の間の単結合の回転運動が激しくなり、低温では2本独立して観測されていた信号が縮重することが知られている。この例は分子内での化学交換の例であるが、同じ現象が分子間の結合・解離反応でも起こる。リガンド由来 NMR 信号に着目するとして、タンパク質に結合していない状態のリガンドと、結合状態のリガンドが、それぞれ異なる NMR 信号を与える場合である (図2c)。リガンドの分子量を仮に 500、タンパク質の分子量を仮に 20,000 と仮定すると、結合状態と非結合

状態では、リガンドの見かけの分子量が40倍も異なる。その場合、リガンド由来のNMR信号は、化学シフトのみならず、 $T_1/T_2$ 緩和時間や、リガンド内プロトンの交差緩和の効率、並進拡散係数など、化学シフト以外のパラメータも相互作用の有無により、大きく変化する。そして、それらのパラメータについても、交換速度が速ければ、それぞれの状態の存在比率を反映した観測時間軸内での平均化が、前述の化学交換が存在する際の化学シフトと同様に起こる。そこで、多くのリガンドベースNMR法では、興味の対象とするリガンドを0.1~0.5 mMのNMR試料として、それに結合する標的タンパク質を1/100~1/10程度添加した混合試料を用意し測定する。その際、モル比としてはリガンドがタンパク質に対して大過剰となるが、タンパク質に結合していないリガンド由来の一次元NMR信号を

観測し、スペクトルのさまざまなパラメータの変化を測定する。したがって、タンパク質ベース法とは異なり、タンパク質のシグナルやタンパク質-リガンド複合体のシグナルの帰属は必要ない。そのかわり、対照実験としてタンパク質が無添加の状態（リガンド単独の試料）のスペクトルが必要なのはいうまでもない。

表2には、リガンドベース法において比較的よく利用される測定法につき、相互作用の有無により変化が期待されるNMRのパラメータについてまとめた。これらのうち、後述するNMRスクリーニングの手法として、よく用いられる方法が、飽和移動差分法（saturation transfer difference：STD法）とWaterLOGSY法である（図3）。

STD法は、 $^1\text{H}$ のスピン間の磁化移動（交差緩和ともいう）の効率が、その $^1\text{H}$ が属する分子の分子量に依存する

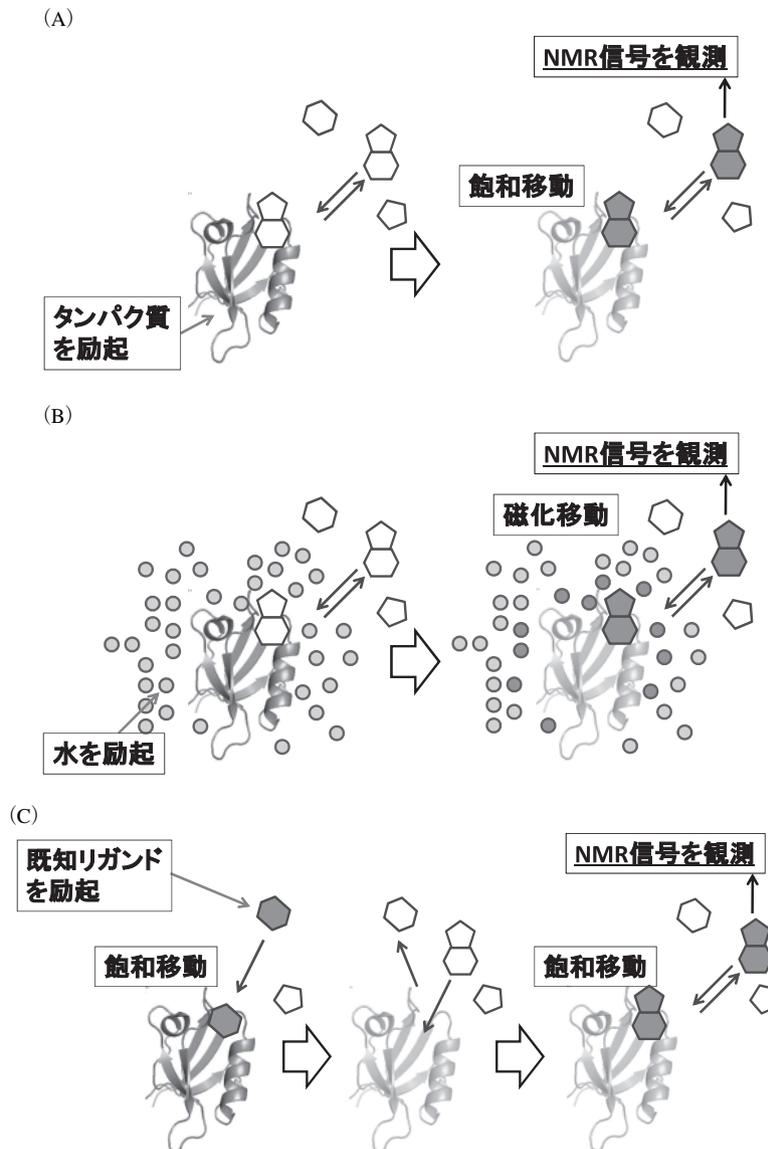


図3 リガンドベースNMR法の三つの方法の模式図  
(A) STD法. (B) WaterLOGSY法. (C) INPHARMA法.

ことを利用した測定法である<sup>5)</sup>。距離的に近接した二つのプロトン間では、一方の<sup>1</sup>Hスピンの、その共鳴周波数のラジオ波の照射により励起されて飽和すると、隣のプロトンに磁化の飽和が伝播することが知られている。飽和移動の効率は分子量の大きなタンパク質のほうがリガンドに比べて高い。そこで、タンパク質と複数のリガンドの混合物の試料を用意し、安全のために、リガンド由来の<sup>1</sup>Hのスペクトルがない周波数領域に存在するタンパク質由来の<sup>1</sup>Hシグナルに、選択パルスを照射して選択的に励起・飽和してやると、まず飽和移動により、タンパク質内の全ての<sup>1</sup>Hスピンの磁化が飽和される。そこに、複数あるリガンドのうち一つだけがタンパク質と結合できたとすると、短時間の過渡的な複合体形成の瞬間に、近傍にあったタンパク質のプロトンから化合物にエネルギーが移動し、リガンドの<sup>1</sup>Hスピンも一部が飽和される。そこで、選択励起パルスの照射ありなしによる差スペクトルを測定すれば、複数存在するリガンドのうち、タンパク質と相互作用するリガンドだけを、NMRスペクトル上で判定できる。

一方、WaterLOGSY法は、NMR溶媒である水分子を利用する方法である<sup>6)</sup>。まず水の<sup>1</sup>Hスピンを選択的に励起すると、その励起されたプロトンはタンパク質の（主に表面にある）NH基と化学交換する。リガンドがタンパク質に結合すると、交差緩和を通じてリガンドの<sup>1</sup>Hに磁化が移動し励起の度合いが変化する。その結果、タンパク質と結合したリガンドにのみ、スペクトルに変化が現れるので、それにより結合の有無が判定できる。<sup>1</sup>H間の交差緩和による磁化移動（NMRの用語でNOEと呼ぶ）の効率の符号が、分子量1,000～2,000のあたりを境にして反転するため、タンパク質やタンパク質-リガンド複合体では、負のNOEが観察される。したがって、溶媒（水分子）とリガンドの間に直接NOEが生じたとしても、符号が逆となり、判定が可能となる。

さて、上記二法も含めて、ほとんどのリガンドベース法では、標的タンパク質との相互作用のあり／なしを判定するには有効であるが、化合物のどの原子団が標的タンパク質と接触しているのかという、分子認識に重要な情報を得ることができないという欠点がある。おそらく唯一の例外は、Carlomagnoらが開発したINPHARMAの方法論であろう<sup>7)</sup>。これは、タンパク質の<sup>1</sup>H磁化を飽和移動によりタンパク質に結合したリガンドに移して観測するという点では、WaterLOGSYと似ている。しかし、最初にタンパク質の磁化を飽和する際に、溶媒の水ではなく、標的タンパク質に対する既知のリガンドの<sup>1</sup>Hを励起して、標的タンパク質の結合ポケット周辺にのみ磁化のラベリングを行うところが、他法と大きく違う点である。Carlomagnoらは、tubulin阻害剤の系に対し、既知リガンドであるbaccatin IIIからの磁化移動を利用して、新規リガンドEpothilone Aの

活性部分構造の推定に成功した<sup>7)</sup>。これは、タンパク質やリガンド複合体の構造解析を省略しつつファーマコフォア（化合物に含まれる薬理作用に必須な部分構造）を直接決定する新しい方法論として注目されている。

リガンドベースNMR法は、全ての方法が、結合状態とフリー状態の間の化学交換を利用している。そのため、 $k_{on}/k_{off}$ それぞれが速いリガンド結合平衡系でなければ測定できない（熱力学的な厳密さを取って簡略化すれば、弱い結合リガンドしか観測できない）という欠点がある。更に、タンパク質の表面に非特異的に吸着するような化合物と、特定のポケットに特異的に結合する化合物を、NMR法からでは区別できないなどの欠点がある。その一方で、標的となるタンパク質に同位体標識を必要としない、タンパク質量が比較的少量で済む、標的タンパク質の分子量に上限がない、などの利点を併せ持つ。以上を総合すると、創薬研究の初期段階において、医薬品スクリーニング法の一つの計測法として用いるのに最適である、と言える。

#### 4. バイオインフォマティクスの検証法としてのNMR法の利用～筆者の研究室での取り組み

前述のように、NMR法は特にインシリコスクリーニングなどで候補化合物が絞り込まれた後のタンパク質-低分子相互作用の検証法として優れた方法である。そこで筆者の所属する研究室では、本誌特集の著者の一人でもある、東北大学木下賢吾教授と共同研究を行い、バイオインフォマティクス手法により予測された一群のタンパク質ドメインと、それに結合すると予測された低分子化合物間の相互作用の、半網羅的検証を試みたので、ここにその成果の一部を紹介する。

まず、名古屋大学の太田、産業技術総合研究所の本野らが、ヒトゲノム中の全遺伝子産物の立体構造モデルのデータベースであるSAHG (structural atlas of human genome) を構築した<sup>8)</sup>。このデータベースは、マルチドメインタンパク質が多く含まれるヒトゲノムに対し、ドメイン境界やリンカー（天然変性領域）を予測した上で、PDB中の類似構造を最大限に活用してモデリングを施した、タンパク質構造を収載したデータベースである。次に、収載された構造に対して、実験により決定された構造かモデル構造かを問わず、木下らが開発した分子間相互作用予測プログラムeF-seekによる網羅的な解析を施し、タンパク質-リガンド相互作用の半網羅的予測を行った<sup>9)</sup>。最後に、筆者らが、その解析結果の一部について、NMRにより検証した。

検証対象の選定は、まず木下らが、SAHGデータベース構築の過程で、先行して網羅的ホモロジーモデリングが終了した10本の染色体から、956個のアポ体モデルを選択した。これらのうちeF-seekにより真陽性率50%の閾値を超えるスコアでリガンド結合を予測されたものは709個

であった。モデルとリガンドペアの総数は2,095であり、1モデルについては平均3個のリガンドが予測された。これらについて、実証実験計画に必要な観点から絞り込みを行った。(1)タンパク質の発現系構築が容易、(2)相互作用の予測されているリガンドが緩衝液成分や沈殿剤成分などではなく、ドラッグライクな化合物である、(3)予測されたリガンドが、標的タンパク質の本来の機能を阻害する可能性がある、(4)予測されたリガンドがそのタンパク質ドメインの既知の結合相手とは異なる母核構造を有している、の4条件に留意して絞り込みを行った。その結果、計114個のタンパク質ドメインが残った。その内訳は、RNA結合ドメイン28、ユビキチン関連ドメイン25、PDZドメイン17、SH3ドメイン11、DEATHドメイン5、PHドメイン5、その他23であった。また、これらのタンパク質と、相互作用するリガンドとのペア数は約350であり、リガンドは83種類であった。

そこで、筆者らは、PDZドメインに着目して検証実験を進めることとした。PDZドメインは、タンパク質-タンパク質相互作用に関わる100アミノ酸程度からなる小さなドメインである(図4)。このドメインを持つタンパク質には、神経伝達物質受容体や細胞接着装置などの膜タンパク質の直下で、分子集合とシグナル伝達を制御する医学的に重要なものが多い。そこで、14個のヒトのPDZドメインについて、筆者らが開発したタンパク質発現系の並行高速構築システムであるPRESAT-vector<sup>10</sup>を利用し、大腸菌

発現系を構築した。筆者の研究室が既に保有していた2個のマウス由来のPDZドメイン発現系と合わせ、16個のPDZドメインのタンパク質試料を得た。PDZドメインに結合すると予測された低分子リガンドは23種であったが、既に研究室が保持しているものと、市販品として入手可能なものとして13種を揃えた。これらのうち、溶解度が低いリガンド3種を除外し、10種を検証するリガンドとした(図4b)。これらを掛け合わせ、160個の相互作用を総当たりでNMR測定により検証した。相互作用の検出は、まずWaterLOGSYを試し、次にタンパク質ベースNMR法である<sup>15</sup>N-二次元NMR法により実施した。<sup>15</sup>N-二次元NMR法では、WaterLOGSY法では相互作用の有無が判別しにくいケースにおいても、相互作用が特異的なものかどうかが明確に判別できるという利点がある。10種のリガンドを、水溶性のもの(化合物群I)とそれ以外(化合物群II)に分けて、2セットのNMR実験を行った。WaterLOGSYの実験からは、どの群の化合物が実際に相互作用しているのかの判定が確定できなかった。その結果、I群の化合物を添加したときに、8種類のPDZドメインで<sup>15</sup>N-SOFAST-HMQCスペクトルに変化が見られた。さらにSOFAST-HMQC法で個別の化合物との相互作用の有無を精査することで、PDZドメイン相互作用する化合物として3種類の化合物を同定することができた。通常の*in silico*スクリーニングと組み合わせたNMRによるシード化合物探索では、数十~数百の化合物を測定する。それに

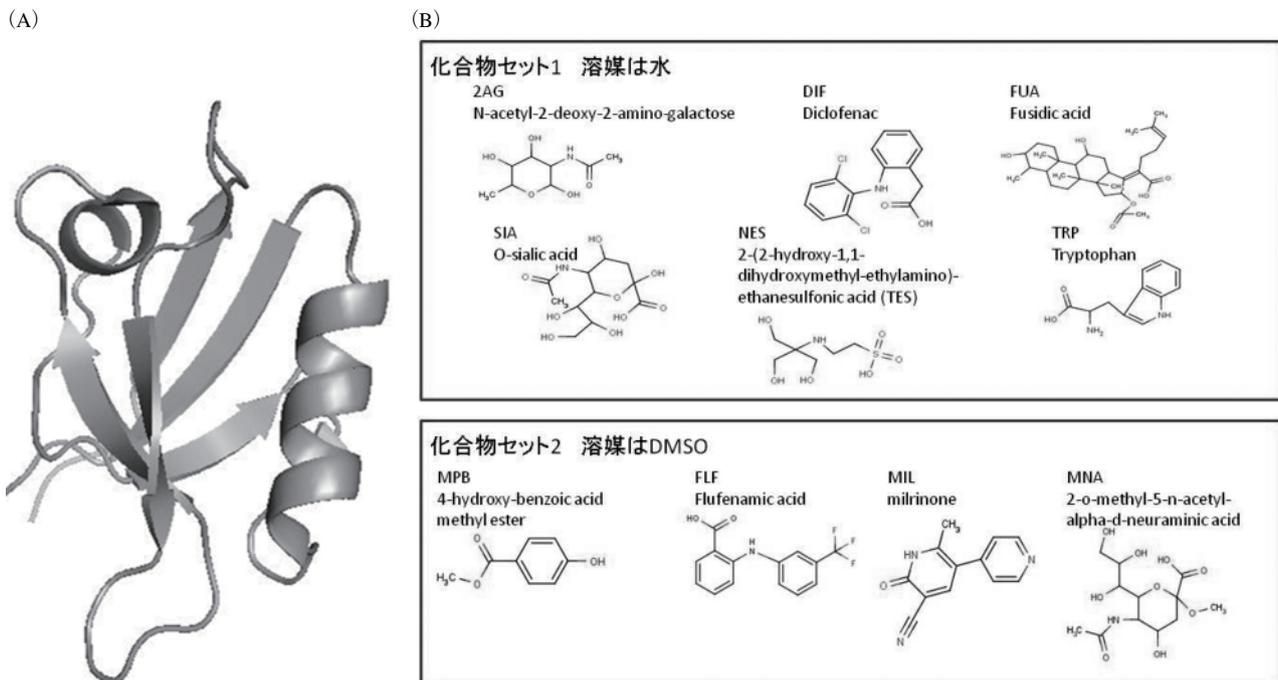


図4 ヒトゲノムに含まれるPDZドメインに結合するタンパク質の半網羅的探索と検証

(A) PDZドメインのリボン図。ペプチド結合部位となるポケットを正面に表示した。(B) 今回検証したPDZドメインに結合する可能性のある化合物群。水溶性の高いものと低いものの二群に分けて検証実験を行った。

対して、今回はわずか10種の化合物しか試していないにも関わらず、相互作用する化合物が得られた。このことはeF-seekが高い相互作用予測力を有していることを示唆している。

### 5. おわりに

タンパク質-リガンド相互作用の探索研究と応用は、成長分野となることが期待されている創薬をはじめとして、ケミカルバイオロジー、システムバイオロジー、グリーンイノベーションなど、多方面の研究領域にまたがる基盤となる概念である。これまで、NMRを活用したタンパク質-リガンド相互作用検出の方法論は、特にリガンドベース法において、筆者の知る限りでは欧米の大学・研究機関が開発したものが主であった。しかし、文部科学省のプロジェクトとして、昨年度から創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業が、今年度からは先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業が、それぞれ事業の一部として、最先端のNMR測定法の開発・高度化と、装置の共同利用の支援を開始した。今後の関連分野の更なる発展のためには、異分野の多数の研究者がNMR研究に興味を持ってくれることと、若手研究者の育成が欠かせない。本稿が、その入門の一助になれば幸いである。

### 文 献

- 1) Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., & Wüthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366-12371.
- 2) Schanda, P., Kupce, E., & Brutscher, B. (2005) *J. Biomol. NMR*, **33**, 199-211.
- 3) Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., & Fesik, S.W. (1996) *Science*, **274**, 1531-1534.
- 4) 野村 充, 西村善文 (2006) 分光研究, **55**, 129-130.
- 5) Mayer, M. & Meyer, B. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1784-1788.
- 6) Dalvit, C., Pevarello, P., Tatò, M., Veronesi, M., Vulpetti, A., & Sundström, M. (2000) *J. Biomol. NMR*, **18**, 65-68.
- 7) Sánchez-Pedregal, V.M., Reese, M., Meiler, J., Biommers, M. J., Griesinger, C., & Carlomagno, T. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 4172-4175.
- 8) Motono, C., Nakata, J., Koike, R., Shimizu, K., Shirota, M., Amemiya, T., Tomii, K., Nagano, N., Sakaya, N., Misoo, K., Sato, M., Kidera, A., Hiroaki, H., Shirai, T., Kinoshita, K., Noguchi, T., & Ota, M. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, D487-493.
- 9) Kinoshita, K., Murakami, Y., & Nakamura, H. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, W398-402.
- 10) Goda, N., Tenno, T., Takasu, H., Hiroaki, H., & Shirakawa, M. (2004) *Protein Sci.*, **13**, 652-658.