

令和 4 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21391

研究課題名（和文）細胞内のタンパク質と薬剤の解離定数を決定するための新規方法論開発

研究課題名（英文）Development of a new methodology for determining dissociation constants of proteins and drugs in cells

研究代表者

菅瀬 謙治（Sugase, Kenji）

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00300822

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内におけるタンパク質と薬剤の解離定数が決定された例はない。本研究ではFKBP12とピメクロリムスを対象として、それぞれの¹⁹F標識体を調製し、in-cell NMR法・NMR緩和法・定量NMR法を組み合わせた方法論により細胞内の解離定数を算出することを目標として研究を行った。その結果、まずはNMR緩和法と定量NMR法を用いた方法論を確立し、バッファー中と夾雑環境中における解離定数を決定できた。また¹⁹F標識FKBP12と¹⁹F標識ピメクロリムスの調製にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、バッファー中と夾雑環境中における解離定数を決定し、さらに¹⁹F標識FKBP12と¹⁹F標識ピメクロリムスの調製に成功した。細胞内のタンパク質と薬剤の解離定数を決定することは、夾雑環境の基礎研究としての意義だけでなく創薬にも直結する。薬剤は一般に疎水性が高く、標的タンパク質以外の生体内分子と非特異的に吸着しうる。そのためバッファー中の解離定数だけでは、本来、不十分なはずである。ニーズは高いが技術的な困難さが理由で、未だ細胞内における解離定数が決定されていない。そのため、本研究の成果は（in-cell NMR測定は現在実施中）は基礎科学と創薬を進展させることにつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：No dissociation constants have been determined for proteins and drugs in cells. In this study, ¹⁹F-labeled FKBP12 and ¹⁹F-labeled pimecrolimus will be prepared and studied with the aim of estimating their intracellular dissociation constants using a combination of in-cell NMR, NMR relaxation, and quantitative NMR methodologies. As a result, we first established a methodology using NMR relaxation and quantitative NMR, and we were able to determine dissociation constants in buffer and in crowded environments. We also succeeded in preparing ¹⁹F-labeled FKBP12 and ¹⁹F-labeled pimecrolimus.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 - 薬剤相互作用 難水溶性薬剤 解離定数 in-cell NMR ¹⁹F-NMR 化学交換

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質と薬剤の解離定数は、基礎研究や創薬における非常に基本的なパラメータであるが、細胞内の解離定数が決定された例はない。細胞内は、多種多様なタンパク質が高濃度でひしめき合った複雑環境で、近年、タンパク質本来の機能や物性を理解するべく複雑環境に関する研究が盛んに行われている¹。これまでに細胞内の解離定数を算出した報告は4例あるが²⁻⁵、いずれの研究でもタンパク質-タンパク質相互作用を対象としており、タンパク質と薬剤の解離定数を決定した報告は未だない。しかし、薬剤では蛍光標識により性質が大きく変わりうる。加えて、一般に水への溶解度が低いいため遊離薬剤の濃度を定量するのが難しい。細胞内のタンパク質と薬剤の解離定数はニーズが高いにも関わらず、その方法論が確立していない。

2. 研究の目的

本研究では in-cell NMR 法・NMR 緩和法・定量 NMR 法を組み合わせた方法論を開発し、生きた細胞内の FKBP12 と免疫抑制剤ピメクロリムスとの解離定数を決定することを目的とした。上記の4研究では、相互作用する各タンパク質を蛍光タンパク質と融合し、その蛍光から遊離タンパク質濃度([A], [B])、結合タンパク質濃度([AB])、および解離定数($K_D = [A][B]/[AB]$)を決定している。しかし、薬剤は一般に水に溶けにくく、遊離状態の濃度を定量するのが難しい。本研究で用いるピメクロリムスも難溶于水溶性である。そこで本研究では、FKBP12 に結合したピメクロリムスの NMR シグナルから結合速度 k_{on} と解離速度 k_{off} を求め、解離定数 $K_D = k_{off}/k_{on}$ を算出することとした。この方法論では遊離薬剤の濃度を定量する必要はない。

3. 研究の方法

(1) 試験管内に再現した複雑環境における FKBP12-ピメクロリムス相互作用の解離定数の決定

in-cell NMR 法で細胞内のタンパク質と薬剤の相互作用をいきなり解析するのは、薬剤の低い溶解度・¹⁹F 標識の試料調製・細胞導入の最適化・NMR 感度などと解決すべき問題が多く難易度が高いため、まずは薬剤の溶解度が低いという問題に着目し、バッファー中の FKBP12 と薬剤との相互作用を定量 NMR 法と NMR 緩和法により解析することとした。さらに、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて試験管内に複雑環境 (200 g/L BSA) を作り出し、この環境における FKBP12-ピメクロリムス相互作用の解離定数を解析した。

(1-1) NMR 滴定実験と定量 NMR 法を組み合わせた方法論の開発

320 μ M [¹⁵N]-FKBP12 に対して、0, 0.2, 1, 2, 3, 6 当量のピメクロリムスを滴定し、各濃度比において二次元 ¹H-¹⁵N 相関 NMR スペクトルを測定した。ピメクロリムス-FKBP12 複合体の濃度は、観測されたピメクロリムス結合型 FKBP12 のシグナル強度と遊離型 FKBP12 のシグナル強度から見積もった。一方、ピメクロリムスの濃度については、元々、ピメクロリムスがバッファー中に溶解しにくく沈殿が生じたため、定量 NMR 法により溶解したピメクロリムスの実効濃度を見積もった。具体的には、ピメクロリムスは DMSO には本実験における最も濃い条件でも溶解するため、FKBP12 溶液に滴定して沈殿したピメクロリムスを DMSO に溶解した。この溶液の 1D ¹H-NMR 測定を行い、ピメクロリムスの NMR シグナルの強度を、前もって測定しておいた 500 μ M ピメクロリムス DMSO 溶液の NMR シグナルの強度と比較することによって、滴定実験で沈殿したピメクロリムスの濃度を見積もった。FKBP12 溶液に溶かそうとしていたピメクロリムスの全量はその重さから求めているため、その濃度から沈殿した分を引き算することによ

ってFKBP12 溶液に溶解したピメクロリムスの濃度を決定した (図1 青丸)。また、BSA を用いて試験管内に夾雑環境 (200 g/L BSA) を作り出し、その中におけるFKBP12 とピメクロリムスとの相互作用を同様に解析した。

(1-2) R_2 dispersion 法による結合-解離速度の解析

NMR 緩和法の一つである R_2 dispersion 法を用いてFKBP12 に結合したピメクロリムスのNMR シグナルから結合-解離の速度を解析した。 R_2 dispersion 法は二状態間(遊離状態⇄結合状態)を行き来する分子の状態変化の速度を定量する NMR 法である。ただし、ここで求まる速度は、 $[FKBP12]k_{on}$ と k_{off} である。 $[FKBP12]$ は遊離FKBP12 の濃度である。具体的には、500 μ M [15 N]-FKBP12 に1当量のピメクロリムスを加えた試料を調製し、700 MHz と 950 MHz の2つのNMR 装置を用いて二次元 15 N R_2 dispersion スペクトルを取得した。この測定では、CPMG 時間を 50 ms に固定し、 $1/\tau_{CP}$ を 40~2000 s^{-1} の間で変化させ、CPMG のないリファレンス測定を含む全部で19枚のNMR スペクトルを測定した。

(2) 19 F 標識FKBP12 と 19 F 標識ピメクロリムスの調製

細胞内におけるFKBP12 とピメクロリムスとの相互作用を in-cell NMR 法で定量的に解析することを目指して、本研究では両者を 19 F 標識することとした。 19 F は生体内には0.0005%しか存在しないため、バックグラウンドフリーのNMR スペクトルが得られる。また 19 F 標識は細胞内におけるタンパク質-タンパク質相互作用解析に用いられている蛍光標識と比較して非常に小さい修飾と言える。

(2-1) 19 F 標識FKBP12 の調製

FKBP12 の 19 F 標識は、芳香属アミノ酸の生合成阻害剤であるグリフォセートを 1 g/L、芳香属アミノ酸 (70 mg/L L-Trp, 70 mg/L L-Tyr) に加えて、*p*-フルオロフェニルアラニンが大腸菌育成培地に添加することによって調製を試みた。用いた大腸菌株としては、従来タンパク質の大量発現に用いられている BL21(DE3)とフッ素標識アミノ酸の取り込みに実績のある DL39(DE3)を用いた⁶。*p*-フルオロフェニルアラニンのFKBP12 への取り込み率については、MALDI-TOF によって確認した。

(2-2) 19 F 標識ピメクロリムスの調製

ピメクロリムスには水酸基が2つ存在するが、これにエステル結合でトリフルオロメチル基を導入することとした。具体的には、20 mg のピメクロリムスに対して過剰量の無水トリフルオロ酢酸を0°Cのピリジン中で10分間反応させた。反応の確認は 1 H-NMR・ 19 F-NMR・薄層クロマトグラフィー・ESI-MSにより行った。

4. 研究成果

(1) 試験管内に再現した夾雑環境におけるFKBP12-ピメクロリムス相互作用の解離定数の決定

NMR 滴定実験で決定したピメクロリムス-FKBP12 複合体の濃度と定量 NMR 法で決定したFKBP12 溶液に溶解したピメクロリムスの濃度のプロファイルを理論式 ($K_D = [A][B]/[AB]$)にフィッティングすることによって解離定数を $34 \pm 3 \mu$ M と決定した (図1 青)。なお定量 NMR 法を適用せず、FKBP12 溶液に溶かそうとしていたピメクロリムスが全量溶解したとした場合 (図1 黒)、解離定数は $2.3 \pm 1.2 \mu$ M と見積もられた。これは定量 NMR 法を用いた場合よりも一桁小さい値であるため、難水溶性薬剤の場合、沈殿した分を考慮する必要があることが見て取れる。

また、200 g/L BSA の夾雑環境における FKBP12 とピメクロリムスとの相互作用を同様に解析した。その結果、定量 NMR 法を適用した場合の解離定数は $92 \pm 15 \mu\text{M}$ で、定量 NMR 法を適用しなかった場合は $6.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$ であった。夾雑環境の場合も、定量 NMR 法の適用ありなしで得られた解離定数に一桁の違いがあった。ゆえに、やはり沈殿（溶解）した薬剤の量を正しく見積もる必要があると言える。また、混雑環境で得られた解離定数が希薄溶液（バッファのみ）で得られた解離定数の約 2.7 倍 ($92 \pm 15 \mu\text{M}$ と $34 \pm 3 \mu\text{M}$) であったことから、混雑環境は FKBP12 とピメクロリムスとの相互作用に少し影響を及ぼすと言える。一般に夾雑環境では排除体積効果により結合がより強くなるが、今回の場合は結合が弱くなった。このことは、まずピメクロリムス自体の体積が非常に小さいため、排除体積効果の影響があまりなかったと考えられる。加えて、BSA は様々な分子を吸着する性質を持っているため、ピメクロリムスがわずかに BSA に結合し、この結合が FKBP12 に対する結合に拮抗したため、結合が弱くなったように観測されたと考えられる。

続いてピメクロリムス結合状態の FKBP12 に対して R_2 dispersion 測定を行った。得られた NMR スペクトルから各 $1/\tau_{\text{CP}}$ における実効横緩和速度 R_2^{eff} を見積もり、このプロファイル（図 2）を理論式にフィッティングすることによって k_{off} を $6.8 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ と決定した。同じ実験を BSA により作り出した夾雑環境で実施し、この場合の k_{off} を $8.0 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ と決定した。なお、希薄溶液条件で得た R_2 dispersion のプロファイルと夾雑環境で得た R_2 dispersion のプロファイルは非常に似ていた。このことは BSA が遊離状態およびピメクロリムス結合状態の FKBP12 の立体構造にほとんど影響を及ぼさないことを意味する。

すでに上記の NMR 滴定実験と定量 NMR 法を組み合わせた方法論から、解離定数 K_D を求めているため、 $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ から k_{on} の値を算出した。その結果、希薄溶液条件では、 $k_{\text{on}} = (3.0 \pm 1.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ で夾雑環境では $k_{\text{on}} = (1.2 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。この夾雑環境で結合速度が遅くなるという結果は、先にも述べたように BSA があるとピメクロリムスがわずかに BSA の結合し、この結合が FKBP12 とピメクロリムスとの結合と拮抗することを意味する。

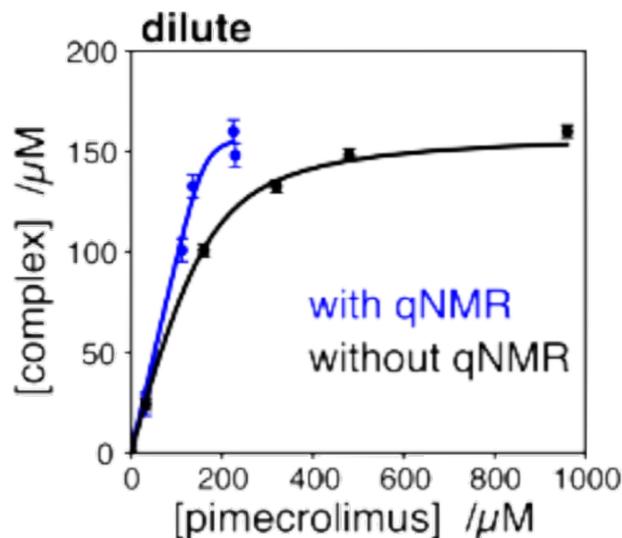


Fig. 1. 希薄溶液条件における NMR 滴定実験
縦軸は FKBP12-ピメクロリムス複合体の濃度、横軸は添加したピメクロリムスの濃度を表す。ただし、青色は定量 NMR 法によりピメクロリムスの濃度を精密に決定したもので、黒色は定量 NMR 法を行っていないものである。

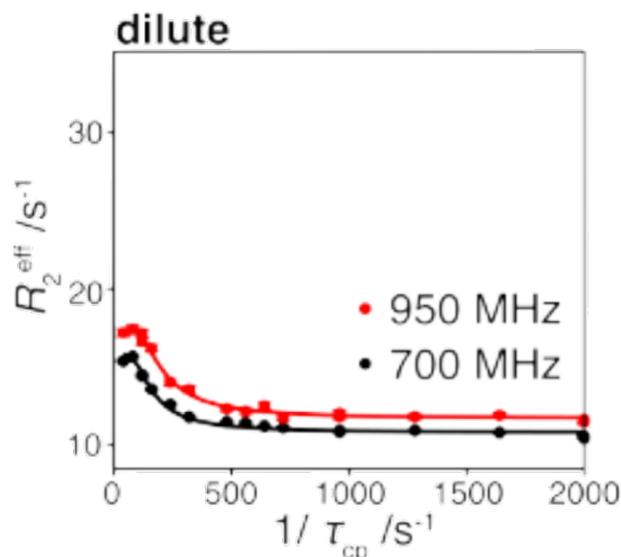


Fig. 2. 希薄溶液条件における R_2 dispersion 実験
縦軸は実効横緩和速度 R_2^{eff} 、横軸は CPMG における 180 度パルスの照射レート $1/\tau_{\text{CP}}$ を表す。赤色と黒色はそれぞれ 950 MHz と 700 MHz の NMR 装置で測定した結果である。

(2) ¹⁹F 標識 FKBP12 と ¹⁹F 標識ピメクロリムスの調製

大腸菌株 BL21(DE3)を用いて [¹⁹F-Phe]-FKBP12 の調製を試みたが、FKBP12 へ ¹⁹F-Phe 取り込みがあまり良くなかった。そこで大腸菌株を BL21(DE3)から DL39(DE3)に変え、[¹⁹F-Phe]-FKBP12 の大量発現を試みた。その結果、かなり高い標識率で ¹⁹F-Phe が FKBP12 に取り込まれるようになった。また、ピメクロリムスの ¹⁹F 標識も試みた。以前に、ピメクロリムスと同様な免疫抑制剤であるラパマイシンに対して無水トリフルオロ酢酸処理し、エステル結合によって ¹⁹F 標識ラパマイシンを得る手法が米国特許に報告されていたため、ここでも同様な手法を適用した。当初、ピメクロリムスの場合、その構造から無水トリフルオロ酢酸処理によるエステル結合の形成が難しいと考えられたが、条件検討の結果、ピメクロリムスに2つ存在する OH 基の両者に CF₃ 基を導入することに成功した。ただし、¹⁹F 標識ピメクロリムスがラセミ化することが分かった。しかし、いずれのジアステレオマーも FKBP12 と結合することを NMR で確認した。

<引用文献>

- ① Gnutt et al., *J. Biol. Chem.* **397**(1), 37–44 (2016).
- ② Maeder et al., *Nat. Cell Biol.* **9**(11), 1319–1326 (2007).
- ③ Slaughter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(51), 20320–20325 (2007).
- ④ Sadaie et al., *Mol. Cell Biol.* **34**(17), 3272–3290.
- ⑤ Komatsubara et al., *J. Biol. Chem.* **294**(15), 6062–6072.
- ⑥ Pomerantz et al., *ACS Chem. Biol.* **7**(8), 1345–1350 (2012).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Hirakawa T., Walinda E., Morimoto D., Sugase K., “Rigorous analysis of the interaction between proteins and low water-solubility drugs by qNMR-aided NMR titration experiments.” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**(38), 21484–21488 (2021). 査読あり, DOI: 10.1039/d1cp03175a

[学会発表] (計 2 件)

- ① 平河 卓也、森本 大智、菅瀬 謙治、白川 昌宏、分子夾雑環境による免疫抑制剤結合タンパク質 FKBP12 の薬剤認識への影響の NMR 動的構造解析、日本薬学会第 141 年会、2021
- ② Takuya Hirakawa, Daichi Morimoto, Kenji Sugase, Highly Accurate Analysis of the Interaction Between Proteins and Low Water-solubility Drugs by qNMR-aided NMR Titration Experiments, ISMAR-APNMR2021, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirakawa Takuya, Walinda Erik, Morimoto Daichi, Sugase Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Rigorous analysis of the interaction between proteins and low water-solubility drugs by qNMR-aided NMR titration experiments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 21484 ~ 21488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1cp03175a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平河 卓也、森本 大智、菅瀬 謙治、白川 昌宏
2. 発表標題 分子夾雑環境による免疫抑制剤結合タンパク質FKBP12の薬剤認識への影響のNMR動的構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Hirakawa, Daichi Morimoto, Kenji Sugase
2. 発表標題 Highly Accurate Analysis of the Interaction Between Proteins and Low Water-solubility Drugs by qNMR-aided NMR Titration Experiments
3. 学会等名 ISMAR-APNMR2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------