

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21473

研究課題名（和文）動的構造に基づいた創薬標的膜タンパク質の動作機構解明

研究課題名（英文）Novel techniques to investigate function-related dynamics of membrane proteins

研究代表者

幸福 裕（Kofuku, Yutaka）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：80737940

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）：膜タンパク質の動作機構の解明には、核磁気共鳴（NMR）法による動的構造の解析が有効である。しかしながら、多くの膜タンパク質の発現に必須な哺乳細胞発現系での安定同位体標識がボトルネックとなり、これまで膜タンパク質のNMR解析は進んでいなかった。本研究では、哺乳細胞発現系において、メチオニンメチル基を選択的に¹³C標識し、その周囲のアミノ酸残基を70%以上の高効率で重水素標識する方法を新規に開発した。これにより、膜タンパク質の高感度NMR解析による、動作機構の解明が可能な基盤が確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法を、様々な創薬標的膜タンパク質に適用することで、NMR法を用いた動的構造解析が飛躍的に進展し、膜タンパク質の動作する様子を精緻に描写することが可能になる。従来の創薬研究では、静的な高分解能構造にもとづき、標的タンパク質に高い親和性で結合する化合物の創製が主流であった。一方、NMR法を用いた動的構造解析が進展すれば、動的構造にもとづき、望ましい活性を有する化合物を戦略的に設計するなど、新たな創薬戦略が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is a powerful tool to investigate the function-related dynamics of membrane proteins. However, NMR analyses of membrane proteins are still challenging, because methods for observations of NMR signals of large proteins expressed in a mammalian expression system are limited. Here, we developed a method to incorporate ¹³C-labeled methyl groups in highly deuterated proteins expressed in mammalian expression systems. The developed method enabled the NMR analyses of pharmaceutically important membrane proteins with high sensitivities.

研究分野：構造生物学

キーワード：核磁気共鳴法 膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の機能を理解するには、実際に膜タンパク質が動作する様、すなわち動的性質を描写することが必要である。研究代表者は、溶液状態でのタンパク質の動的性質を直接とらえることのできる、核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の動的構造解析をおこない、GPCR が不活性型と活性型の動的交換にあることが、リガンドが結合した際の薬効度を決定していることなどを示してきた (Kofuku et al, Nat Commun 2012)。

一方で、NMR 法を用いて高分子量の膜タンパク質の解析をおこなうには、高度に重水素標識された膜タンパク質をミリグラムオーダーで得る必要がある。しかしながら、創薬標的となる膜タンパク質の多くは、様々な安定同位体標識法が確立されている大腸菌・酵母での発現が困難である (図 1)。研究代表者は、この課題を解決し、膜タンパク質の NMR 解析を可能とするため、すでに昆虫細胞発現系における様々な安定同位体標識法を確立している (Kofuku et al, Angew Chem Int Ed 2014)。一方で、哺乳細胞でしか十分な発現量が得られない膜タンパク質も報告されており (Goehring et al, Nat Protoc 2014)、様々な膜タンパク質に NMR 解析を適用するには、哺乳細胞での安定同位体標識条件を確立する必要があった。



図 1 これまでに立体構造が解かれた真核生物由来膜タンパク質の発現ホストの分類

2. 研究の目的

本研究では、多くの膜タンパク質の発現に必須である、哺乳細胞発現系における、高度な重水素標識を含む安定同位体標識法を確立することを目的とした。これにより、創薬標的膜タンパク質について、NMR 解析を用いて動的構造を描写することで、膜タンパク質の動作機構にもとづいた新たな創薬研究を可能とする基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 哺乳細胞発現および発現量の評価

緑色蛍光タンパク質 (GFP)、大腸菌由来チオレドキシン (Trx)、ヒト由来 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) の遺伝子を、プラスミドベクター pEZT-BM に導入した。タンパク質の発現は、プラスミドベクターをポリエチレンイミンによりトランスフェクションする方法、または、組み換えバキュロウイルスを調製して、添加する方法 (BacMam 法、Dukkipati et al, Protein Expr Purif 2008) によりおこなった。 β_2 AR を発現した哺乳細胞を界面活性剤で可溶化し、蛍光リガンドを加えて蛍光サイズ排除クロマトグラフィーにより解析することで、リガンド結合活性を保持した β_2 AR の発現量を算出した。

(2) 安定同位体標識および標識率の算出

安定同位体標識は、アミノ酸を除いた哺乳細胞培地に、様々な安定同位体標識アミノ酸を添加することでおこなった。発現条件の最適化は、GFP の発現量を指標とした。この条件で Trx を発現し、 ^1H - ^{13}C 2次元相関スペクトルを測定することで、その NMR シグナル強度から、各アミノ酸残基の安定同位体標識率を算出した。

(3) 哺乳細胞での安定同位体標識の有用性の検証

確立した哺乳細胞発現系での安定同位体標識が、膜タンパク質の NMR 解析に有用であることを検証するため、 β_2 AR の安定動態標識試料を調製し、 ^1H - ^{13}C 2次元相関スペクトルを測定した。また、同時に高度な重水素標識をおこなわない試料も調製し、スペクトルを比較することで、哺乳細胞発現系においても、重水素化による高感度化が達成できているか検証した。

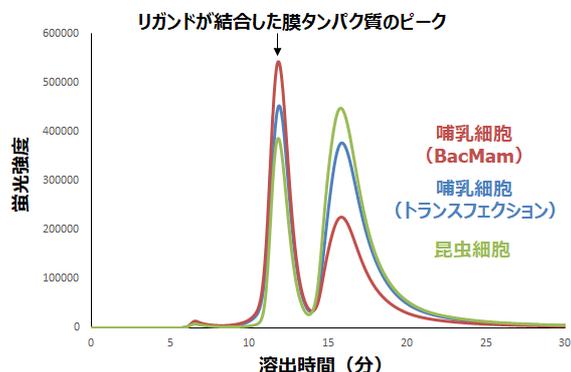


図 2 哺乳細胞および昆虫細胞発現系における膜タンパク質の発現量の比較

4. 研究成果

(1) 哺乳細胞発現および発現量の評価

哺乳細胞発現系として、構造生物学的解析でよく用いられる、PEI によるプラスミドのトラン

スフェクションと、組み換えバキュロウイルスを添加する方法 (BacMam 法) を比較することとした。代表的な膜タンパク質であり、GPCR の一種である、 β_2 AR の発現量を指標として比較をおこなった結果、BacMam 法の方が高い発現量が達成できた (図 2) ことから、以降は、この方法を採用することとした。また、同様に膜タンパク質の構造生物学的に用いられる昆虫細胞発現系と比較した結果、哺乳細胞の方が培養体積あたりの発現量は高いこともわかった (図 2)。以上のことから、BacMam 法を用いた哺乳細胞発現系は、膜タンパク質の発現に適していることがわかった。

(2) 安定同位体標識および標識率の算出

創薬標的膜タンパク質は、界面活性剤可溶性状態で、見かけの分子量が 100K を超えることが多く、NMR 解析の場合には測定感度が課題となる。このような高分子量タンパク質においても、高感度で NMR 解析をおこなうには、メチル基選択的な ^{13}C 標識と、メチル基の周囲の高度な重水素標識をおこなった上で、methyl-TROSY 法を適用することが有効である。特に、メチル基の周囲のアミノ酸は 70% 以上の標識率で重水素標識することが有効である (図 3)。そこで、メチオニンメチル基を選択的に ^{13}C 標識し、その周囲を 70% 以上重水素標識できる条件を確立することとした。

哺乳細胞発現系において、アミノ酸を除いた哺乳細胞培地に、様々な安定同位体標識アミノ酸を添加する

ことで、安定同位体標識をおこなった。利用するアミノ酸の添加量は、発現量にも影響することから、GFP の発現量を指標に条件を最適化した。最適化した条件にて Trx を発現し、 ^1H - ^{13}C 2次元相関スペクトルを測定することで、その NMR シグナル強度から、各アミノ酸残基の安定同位体標識率を算出した。その結果、メチオニンのメチル基の ^{13}C 標識率、およびシステイン、トリプトファンなど一部のアミノ酸の重水素標識率は高い一方で、多くのアミノ酸の重水素標識率は 70% 以下であった (図 4)。そこで、前培養においても標識アミノ酸を添加する方法を検討した。同様に GFP の発現量を指標として条件を最適化した上で、Trx の安定同位体標識率を算出した。その結果、多くのアミノ酸で重水素標識率は 70% 以上を達成できた (図 4)。

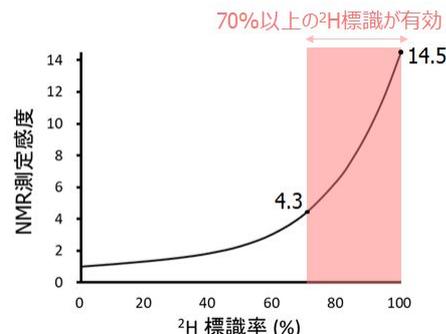


図 3 典型的な膜タンパク質の NMR 測定感度のシミュレーション結果

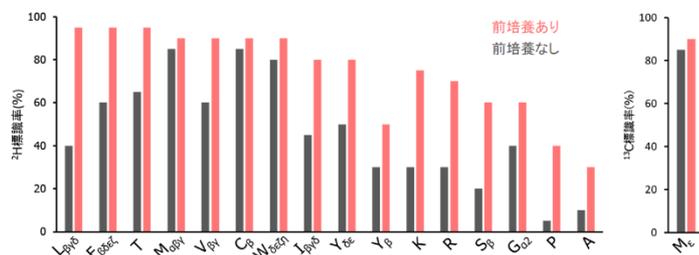


図 4 哺乳細胞で発現した Trx の各アミノ酸残基の重水素標識率およびメチオニンメチル基の ^{13}C 標識率

(3) 哺乳細胞での安定同位体標識の有用性の検証

確立した哺乳細胞発現系での安定同位体標識が、膜タンパク質の NMR 解析に有用であることを検証するため、代表的な膜タンパク質として、 β_2 AR の安定動態標識試料を調製し、 ^1H - ^{13}C 2次元相関スペクトルを測定した (図 5)。その結果、 β_2 AR のメチオニンメチル基に由来する NMR シグナルを高感度に観測することに成功した。重水素標識をおこなわない条件と比較した結果、NMR 測定感度は 4 倍程度に上昇していた (図 5)。このことから、哺乳細胞発現系においても高い重水素標識率を達成でき、その結果、創薬標的膜タンパク質の高感度 NMR 解析が可能になったと結論した。本手法を、様々な GPCR や膜タンパク質に適用することで、NMR 法を用いた動的構造解析が可能になり、膜タンパク質の動的構造情報から、その動作機構が明らかになることが期待できる。これにより、従来の静的高分解能構造にもとづいた創薬だけでなく、活性が発現される機構をもとにした、新たな創薬戦略が期待できる。

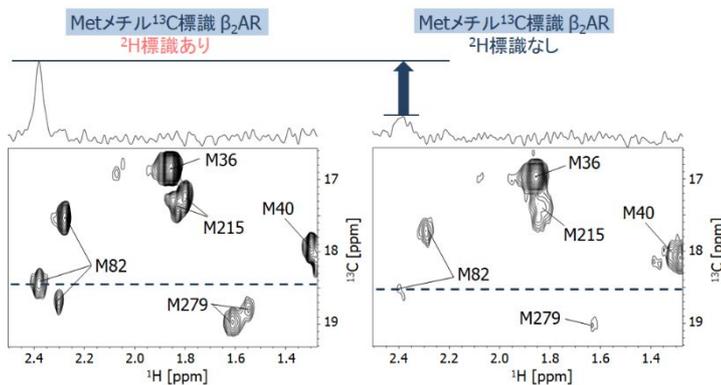


図 5 哺乳細胞で発現した膜タンパク質の NMR 解析における高度な重水素標識の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaneko Shun, Imai Shunsuke, Asao Nobuaki, Kofuku Yutaka, Ueda Takumi, Shimada Ichio	4. 巻 119
2. 論文標題 Activation mechanism of the μ -opioid receptor by an allosteric modulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2121918119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2121918119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi Koh, Kofuku Yutaka, Imai Shunsuke, Ueda Takumi, Tokunaga Yuji, Toyama Yuki, Shiraishi Yutaro, Shimada Ichio	4. 巻 11
2. 論文標題 Function-Related Dynamics in Multi-Spanning Helical Membrane Proteins Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 604 ~ 604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/membranes11080604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shiraishi Yutaro, Kofuku Yutaka, Ueda Takumi, Pandey Shubhi, Dwivedi-Agnihotri Hemlata, Shukla Arun K., Shimada Ichio	4. 巻 12
2. 論文標題 Biphasic activation of β -arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27482-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 幸福 裕、今井 駿輔、上田 卓見、嶋田 一夫	4. 巻 53
2. 論文標題 GPCRのNMR・ESR解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 280-284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幸福裕, 横溝智貴, 今井駿輔, 白石勇太郎, 五十嵐俊介, 山口秀幸, 水越利巳, 鈴木榮一郎, 嶋田一夫
2. 発表標題 昆虫細胞発現系におけるアラニン選択標識法の開発
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 幸福 裕
2. 発表標題 昆虫細胞 - バキュロウイルス発現系での安定同位体標識と膜タンパク質のNMR解析への応用
3. 学会等名 蛋白研セミナー 基礎から学ぶ最新NMR解析法 第3回ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子 舜, 今井 駿輔, 浅尾 信央, 幸福 裕, 上田 卓見, 嶋田 一夫
2. 発表標題 動的構造平衡に基づいた μ オピオイド受容体の活性化機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室ホームページ
<https://biophys.f.u-tokyo.ac.jp/>

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
---------	---------