

平成21年 6月10日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18550082
 研究課題名 (和文) 標的タンパク質との複合体における低親和性リード化合物の高感度
 選択的検出法の開発
 研究課題名 (英文) Development of the sensitive and selective methods for detection
 of the weak interaction between the target proteins and ligands
 研究代表者
 田代 充 (TASHIRO MITSURU)
 明星大学・理工学部・化学科・准教授
 研究者番号：40315750

研究成果の概要：レセプターであるタンパク質と、それに対して低い親和性をもつ低分子化合物との相互作用解析を行うための検出方法の開発を行った。分析機器として核磁気共鳴法を用い、Water-LOGSY 法をベースに、選択的に水シグナルを励起するパルス系列を開発し、親和性のあるリード化合物を選択的に検出することが可能になった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	600,000	4,200,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生物学的分析、高感度選択的検出

1. 研究開始当初の背景

(1) 核磁気共鳴(NMR)法の薬剤スクリーニングへの応用が試みられており、新規なスクリーニング法として注目されていた。最初に提案された手法は、 ^{15}N 標識タンパク質とリガンドとの相互作用を2次元NMRスペクトルにより解析するものであった。リガンド結合するタンパク質のアミドシグナルの化学シフトが変化することを前提としている。利点としては、短時間で少量の試料で測定が可能なことであった。但し、2次元スペクトルの測定の場合、 ^{15}N などの安定同位体の使用が必要となり、大量発現に必要なコストの面での短所があった。

(2) 多用されている測定法として NOE-ポンピング法、Saturation Transfer Difference (STD)法などが提案されていたが、開発段階初期であり、生化学的データとの整合性が取れない試料もあり、結果の信頼性において、疑問視する研究者もいた状況であった。このため、信頼性の高い評価方法の開発が望まれた。

2. 研究の目的

(1) 当時、汎用されていた STD 法では、通常、タンパク質のメチル基領域を選択励起するため、リガンド分子にメチル基領域のシグ

ナルが存在する場合、適用できない。また、重水溶媒での適用例が報告されたものの、軽水溶媒での適用に疑問があった。タンパク質の場合、溶媒交換により貴重な試料を失うことがあるため、軽水溶媒での測定が望ましい。

(2) 本研究では、軽水で使用される Water-LOGSY 法をベースに NMR 測定法を検討し、リガンド検出の選択性が高く、かつ高感度な測定法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト血清アルブミン-トリプトファン複合体、およびリゾチーム-グルコース複合体をモデル化合物とした。溶媒には 90% H₂O, 10% D₂O を使用した。水シグナルの選択励起パルスとして、DPFGSE および WATERGATE を使用し、また、混合時間内における効率的な磁場勾配パルスの検討も行った。

4. 研究成果

【概要】 新規に開発したパルスにより、水を選択励起し、その磁化をトリプトファンに移して低分子のシグナルを選択的に検出した。また、アルブミンより分子量の小さいリゾチームに関しても、スピロックの使用により、良好な結果を得ることができた。

(1) 水シグナルの選択方法の開発

図 1 に示すパルスシーケンスを用いて、水シグナルをいかに選択的に残すかを検討した。通常の場合では、水シグナルを選択的に励起し、他の不要なシグナルを除去することを考えるが、本研究では逆の発想をすることにより、水シグナルの磁化を選択的に残す手法を採用した。

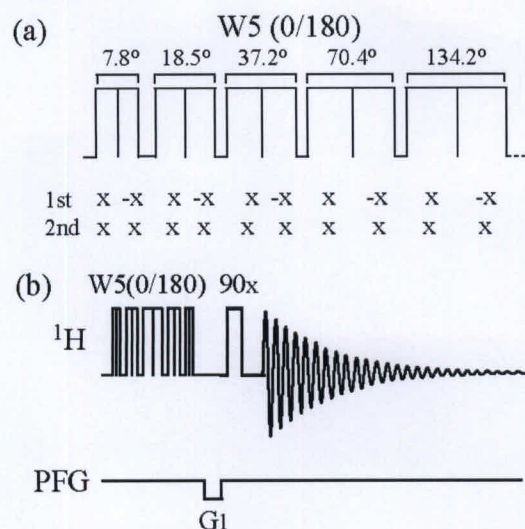


図 1. 水シグナル観測のためのパルスシーケンス。(a) WATERGATE W5 パルスの詳細。各々のパルスを 2 つに分割し、1 回目と 2 回目のスキャンで位相を交互に変えて差を取る。(b) WATERGATE W5 パルスを取り入れた水シグナル観測のためのパルスシーケンス。

図 2 に観測位置を変えながら測定した水シグナルを示す。WATERGATE を使用して、通常のスเปクトルと足しあわすことにより、図 2(c) のように、水シグナルのみが選択的に残されることが判る。この水シグナルの磁化を複合体に移し、最終的にはリガンド分子に移して検出する。

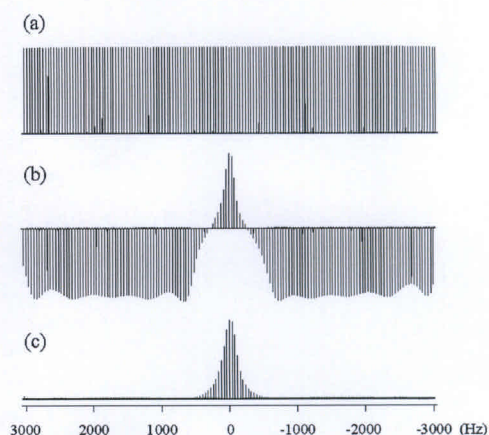


図 2. 観測位置を変えながら測定した水シグナル。(a) 通常の観測。(b) WATERGATE を使用した場合。(c) (a) と (b) のスペクトルの足し合わせ。

(2) Water-LOGSY パルスシーケンスへの応用

図 3 (a) に通常使用されている Water-LOGSY パルスシーケンス、図 3 (b) に DPFGE パルスを用いた手法を示す。DPFGE (double pulsed field gradient spin-echo) は、選択励起パルスとして、その効果が知られているパルスであり、これにより、水シグナルを選択的に励起した。図 3 (c) は、今回開発した WATERGATE W5 パルスを使用した手法である。(a, b) と (c) では水シグナルの選択手法が逆であるが、目的は同じである。

混合時間 (mix) の初期に磁場勾配パルス G4 を入れ、その後、断続的に弱い磁場勾配パルス G5 を入れた。特に、G5 は不要なシグナルの除去に有効であった。

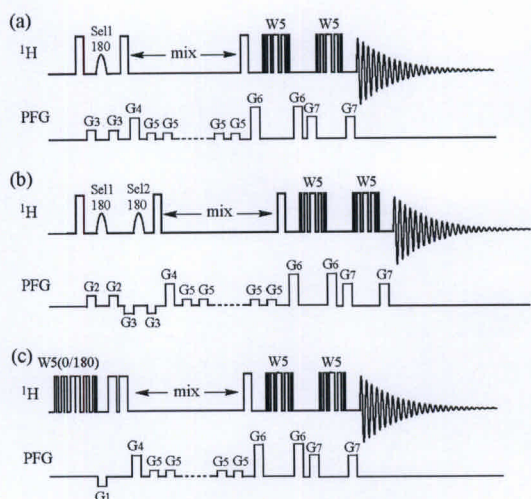


図3. Water-LOGSY パルスシーケンス。(a) これまでに提案された手法。(b) DPFGE法により、水シグナルを選択励起した手法。(c) 今回開発した WATERGATE W5 を使用した手法。

(3) ヒト血清アルブミン-トリプトファン複合体への応用

図4にヒト血清アルブミン-トリプトファン複合体への応用例を示す。上のスペクトルが複合体、下のスペクトルはトリプトファンのみで測定したものである。結合しない低分子シグナルが下向きに観測されるので、混合試料であっても、親和性のあるリガンドを選択的に検出することが可能である。

WATERGATE W5 を使用した(c)のスペクトルを見ると、最も高感度であることがわかる。トリプトファンのみで測定したスペクトルとの比を比較しても、今回開発した WATERGATE Water-LOGSY パルスシーケンスが最も高感度であり、その有効性が示された。

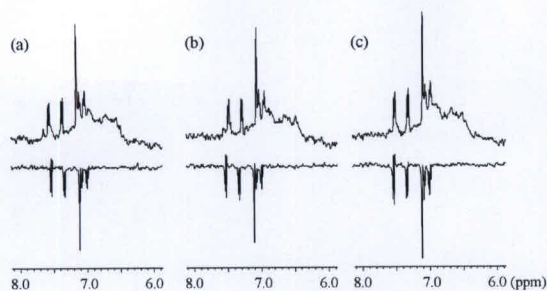


図4. 図3の puls シーケンス (a-c) で測定した Water-LOGSY スペクトル。トリプトファンの芳香環プロトンが 7.0-7.7 ppm 領域に観測されている。上のスペクトルが複合体、下のスペクトルはトリプトファンのみで測定した。結合しない低分子シグナルが下向きに

観測される。

[総括] 軽水溶媒において、標的タンパク質と親和性のあるリガンド分子の選択検出法の開発を行った。本手法は薬学のみならず、生化学、分子生物学の分野においても有効に利用される分析方法となることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件) 全て査読有り

1. "Characterization of the molecular reorientational dynamics of the neat ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide in the super cooled state using ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy" Mamoru Imanari, Hiroyuki Tsuchiya, Hiroko Seki, Keiko Nishikawa and Mitsuru Tashiro *Magn. Reson. Chem.* 2009, **47**, 67-70.
2. "Specific interactions between Silver(I) Ions and Cytosine-Cytosine Pairs in DNA Duplexes" Akira Ono, Shiqi Cao, Humika Togashi, Mitsuru Tashiro, Takashi Fujimoto, Tomoya Machinami, Shuji Oda, Yoko Miyake, Itaru Okamoto and Yoshiyuki Tanaka, *Chem. Comm.* 2008, 4825-4827.
3. "An efficient use of the WATERGATE W5 sequence for observing a ligand binding with a protein receptor" Kazuo Furihata, Sakurako Shimotakahara and Mitsuru Tashiro *Magn. Reson. Chem.* 2008, **46**, 799-802.
4. "NMR study for self aggregation of 1-butyl-3-methylimidazolium bromide in aqueous solution" Hiroyuki Tsuchiya, Mamoru Imanari, Shinji Ishihara, Masamichi Nakakoshi, Keiko Nishikawa, Hiroko Seki, and Mitsuru Tashiro, *Anal. Sci.* 2008, **24**, 1369-1371.

5. "Characterization of fibrillation process of α -synuclein at the initial stage" Mitsuru Tashiro, Masaki Kojima, Hiroshi Kihara, Kouki Kasai, Tomoaki Kamiyoshihara, Kenji Uéda, and Sakurako Shimotakahara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, **369**, 910-914.
 6. "Crystal Structures of 1-Isopropyl-3-methylimidazolium Iodide and 2,3-Dimethyl-1-isopropylimidazolium Iodide" Takashi Fujimoto, Masatoshi Kawahata, Masamichi Nakakoshi, Tomoya Machinami, Hiroko Seki and Mitsuru Tashiro, *Anal. Sci.* 2007, **23**, x223-x224.
 7. "Expression and characterization of a pleckstrin homology domain in phospholipase C, PLC- η 1" Toru Imai, Kouki Kasai, Junichi Kurita, Kiyoko Fukami, Mitsuru Tashiro, and Sakurako Shimotakahara, *Protein Express. Purif.* 2007, **56**, 247-252.
 8. "Reduction of aluminum toxicity by 2-isopropylmalic acid in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*" Taisuke Suzuki, Shun Tamura, Hiromi Nakanishi, Mitsuru Tashiro, Naoko K. Nishizawa, Etsuro Yoshimura, *Biol. Trace Elem. Res.* 2007, **120**, 257-263.
 9. "Crystal Structure of 2,3-Dimethyl-1-isopropylimidazolium Bromide" Takashi Fujimoto, Masatoshi Kawahata, Masamichi Nakakoshi, Kentaro Yamaguchi, Tomoya Machinami, Hiroko Seki, Keiko Nishikawa and Mitsuru Tashiro, *Anal. Sci.* 2007, **23**, x107-x108.
 10. "Characterization of the malate-aluminum(III) complex using ^1H and ^{27}Al NMR spectroscopy" Mitsuru Tashiro, Kazuo Furihata, Takashi Fujimoto, Tomoya Machinami and Etsuro Yoshimura, *Magn. Reson. Chem.* 2007, **45**, 518-521.
 11. "Observation of multiple intermediates in α -synuclein fibril formation by singular value decomposition analysis" Tomoaki Kamiyoshihara, Masaki Kojima, Kenji Uéda, Mitsuru Tashiro, and Sakurako Shimotakahara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, **355**, 398-403.
 12. "Crystal Structure of 2,3-Dimethyl-1-propylimidazolium Bromide" Takashi Fujimoto, Masamichi Nakakoshi, Tomoya Machinami, Hiroko Seki, Keiko Nishikawa and Mitsuru Tashiro, *Anal. Sci.* 2007, **23**, x9-x10.
 13. "Crystal structure of 1-butyl-3-methylimidazolium iodide" Masamichi Nakakoshi, Motoo Shiro, Takashi Fujimoto, Tomoya Machinami, Hiroko Seki, Mitsuru Tashiro and Keiko Nishikawa, *Chem. Lett.* 2006, **35**, 1400-1401.
 14. "Crystal structure of α,α -trehalose-calcium chloride monohydrate complex" Takashi Fujimoto, Kazuyuki Oku, Mitsuru Tashiro and Tomoya Machinami, *J. Carbohydr. Chem.* 2006, **25**, 521-532.
- [学会発表] (計 10 件)
1. 田代 充、降旗一夫、田代櫻子 「Practical use of WaterLOGSY and STD Techniques for Observing a Ligand Binding with a Protein Receptor」 The 50th experimental NMR conference (Asilomar, USA) 2009 年 3 月 29 日-4 月 3 日
 2. 笠井 恒希、田代 充、下高原櫻子 「パーキンソン病原因タンパク質 α -synuclein のアミロイド形成機構の解明」 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2008 年 12 月 9-12 日

3. 降旗一夫、田代 充、田代櫻子 「Water 選択励起 pulse の開発—新 WaterLOGSY 法について」第 47 回 NMR 討論会 2008 年 11 月 12-14 日 (筑波)
4. 田代 充、加藤敏代、坪野浩二、降旗一夫、鴨 修、町並智也、藤本 崇 「Structural characterization of Ca-1,6-anhydro-beta-maltotriose complex」日本分析化学会第 57 年会(福岡) 2008 年 9 月 10-12 日
5. 田代 充、加藤敏代、藤本 崇、加藤隆之、鴨 修、坪野浩二、町並智也 「Structural characterization of Rb-1,6-anhydro-beta-maltotriose complex」第 69 回分析化学討論会 (名古屋) 2008 年 5 月 15-16 日
6. 田代 充、降旗一夫、田代櫻子 「Improvement of WaterLOGSY techniques for observing a ligand binding with a protein receptor」 The 49th experimental NMR conference (Asilomar, USA) 2008 年 3 月 9-14 日
7. 土屋浩之、田代 充、今成 司、関 宏子 「NMR 法を用いた 1,6-anhydro-beta-D-glucopyranose と金属との相互作用の検討」日本分析化学会第 56 年会 (徳島) 2007 年 9 月 19-21 日
8. 田代 充、上吉原智晃、小島正樹、上田健治、田代櫻子 「パーキンソン病原因タンパク質 alpha-synuclein のアミロイド線維形成の解析」第 68 回分析化学討論会 (宇都宮) 2007 年 5 月 19-20 日
9. 土屋浩之、田代 充、木村由美子、中越雅道、今成司、関宏子 「核磁気共鳴法によるイオン液体 1-butyl-3-methylimidazolium bromide の分子運動の解析」日本薬学会第 127 年会 (富山) 2007 年 3 月 28-30 日
10. 田代 充、藤本 崇、降旗一夫、町並智也、吉村 悦郎 「Structural and spectroscopic characterization of malate-aluminum(III) complex」第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006 年 5 月 13-14 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 充 (TASHIRO MITSURU)
明星大学・理工学部・化学科・准教授
研究者番号: 40315750

(2) 研究分担者

吉村 悦郎 (YOSHIMURA ETSURO)
東京大学・農学生命科学・教授
研究者番号: 10130303

(3) 連携研究者

なし。