

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03376

研究課題名(和文) NMR・MRIに基づくシステインを介する生体内分子置換反応の解明

研究課題名(英文) A study of in vivo cysteine-mediated molecular replacement reactions, based on NMR and MRI methods

研究代表者

寺沢 宏明 (Terasawa, Hiroaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：10300956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、標的タンパク質に含まれるシステインのチオール基に作用する化合物を用いて、生体内分子置換反応をひき起こすことにより、標的タンパク質の機能を制御する戦略を確立し、炎症シグナリングを抑制することを目的とする。

ケモカイン受容体に結合し、白血球の細胞遊走を制御する細胞内タンパク質FRONT(フロント)を対象として、その阻害剤の阻害メカニズムについて、核磁気共鳴法(NMR)と質量分析法を用いて解析を行った。また、阻害剤を実験動物に投与し、機能的磁気共鳴イメージング法(fMRI)を用いて、脳機能への影響に基づいて、炎症シグナリングの抑制効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究グループは、以前、免疫細胞の遊走を制御するタンパク質フロントを同定した。また、フロントが、がんを増悪化させること、および、嫌酒薬ジスルフィラムがフロントに結合して、抗がん作用を示すことを明らかにしてきた。

本研究において、標的タンパク質のアミノ酸の一種(システイン)に作用する化合物を用いて生体内分子置換反応をひき起こすことにより、機能を制御する戦略を提案した。これは、がんをはじめとする炎症性疾患の治療薬を創出する新たな戦略である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to suppress inflammation signaling pathways by establishing a strategy to regulate functions of target proteins using in vivo cysteine-mediated molecular replacement reactions.

NMR and MS analyses were applied to the intracellular protein, FRONT, which binds to chemokine receptors and regulates immune cell migration as the target protein in order to elucidate the inhibitory mechanism of thiol-containing compounds. Functional MRI analyses were also applied to animal models to elucidate the effects of the cysteine-targeting compounds on brain functions.

研究分野：protein NMR and preclinical MRI

キーワード：生体内分子置換反応 システイン 炎症シグナリング NMR MRI

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

システインは、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸の1つであり、唯一、反応性の高いチオール基(-SH)をもつことが特徴である。酸化によるスルフェン(-SOH)やスルフィン(-SOOH)、ニトロソ化(-SNO)、グルタミン酸・システイン・グリシンからなるトリペプチドであるグルタチオンが付加するグルタチオン化(-SSG)など、生体内における様々なシステインの化学修飾が、そのタンパク質の生理機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた(図1)。近年では、システインのチオール基(-SH)に過剰に硫黄原子が付加した、より反応性の高いシステインパースルフィド(-S-(S)<sub>n</sub>-H)が生成されることが確認され、その生理機能の解明が注目されている。

本研究グループは、近年、炎症シグナリングを担うケモカイン受容体とその細胞内制御因子フロントの相互作用を阻害する抗炎症化合物ジスルフィラム(DSF)を見出し、抗がん作用をもつことを明らかにした(Nature Commun., 2020)(図2)。また、核磁気共鳴法(NMR)を用いて、フロント上のケモカイン受容体結合ドメインCRBD(Chemokine Receptor-Binding Domain)(図2)の立体構造を明らかにした(未発表)。さらに、NMRと質量分析法を用いた*in vitro*の解析において、CRBDに含まれるシステイン残基に、DSFが共有結合にて結合することにより、フロント-ケモカイン受容体相互作用を阻害することを明らかにした(未発表)。

これらの一連の結果より、システインに作用する化合物を用いて生体内分子置換反応をひき起こすことで、フロントをはじめとする標的タンパク質の局在や立体構造を変化させ、細胞内シグナリングを制御できると考えた。

### 2. 研究の目的

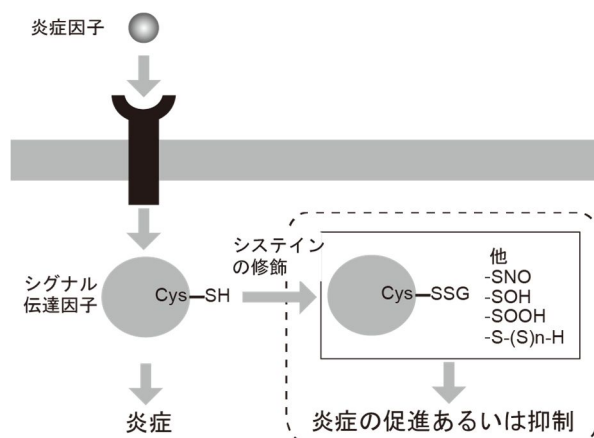
本研究は、標的タンパク質に含まれるシステインのチオール基に作用する化合物を用いて、生体内分子置換反応をひき起こすことにより、標的タンパク質の機能を制御する戦略を確立し、炎症シグナリングを抑制することを目的とした。

### 3. 研究の方法

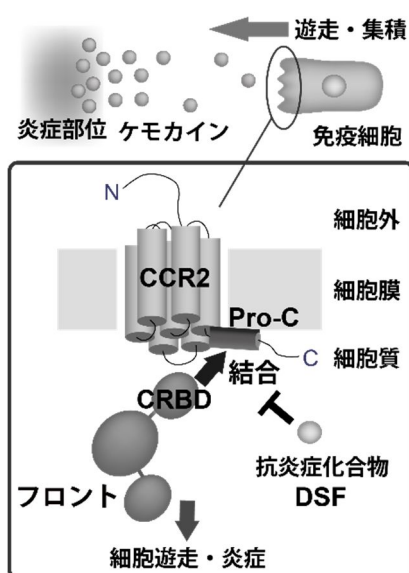
フロントタンパク質CRBDを対象として、その阻害剤であるDSF、および、反応性・特異性を指標として改変した化合物について、NMRと質量分析法を用いて*in vitro*の解析を行った。なお、DSFは、アルデヒド脱水素酵素(ALDH)を阻害する嫌酒薬として上市されており、本酵素やフロントを含む複数のタンパク質を標的とする。そのため、フロントに特異性が高い改変体を優先的に作製し、実験に用いた。蛍光エネルギー移動(FRET)を利用して、フロントとケモカイン受容体CCR2の結合を観測するHTRFアッセイ系により、阻害活性を定量化した。NMRには、超高感度極低温検出器(クライオプローブ)付属の600 MHz AVANCE III 分光計(Bruker)、質量分析には、ESI-Q-q-TOF(Bruker)を用いた。

また、近年、哺乳細胞に安定同位体標識したタンパク質を導入し、その細胞をそのままNMR観測することにより、細胞内環境(In-cell)におけるタンパク質の立体構造解析を行うIn-cell NMR技術が発展してきている。本手法をフロントタンパク質CRBDに適用し、細胞内環境において、フロントと阻害剤の結合を観測するためのIn-cell NMR実験系を確立した。

さらに、生体内(*in vivo*)において阻害剤の炎症シグナリング抑制効果を評価するため、実験動物モデル(ラット)の脳機能への影響に基づいて、機能的磁気共鳴イメージング法(fMRI)を用いて評価する*in vivo* fMRI実験系を確立した。fMRIには、小動物用7T MRIと4チャンネルラット脳用検出器(Bruker)を用いた。



(図1) システインを介して制御される炎症シグナリング



(図2) CCR2-フロントによる炎症シグナリング

#### 4. 研究成果

大腸菌を用いて調製した  $^{15}\text{N}$  安定同位体標識フロントタンパク質 CRBD を含む溶液に対して、DSF、および、その改変化化合物を滴定し、CRBD の  $^{15}\text{N}$  核 NMR 信号の化学シフト変化を指標とし、結合反応の有無、速度を評価した。その結果、得られた改変体は、結合反応速度が多少異なるものの、すべてが結合することが分かった。質量分析により、フロント上のシステインとジスルフィド結合を介した複合体を形成していることが確認できた。化合物によって化学シフトおよび信号強度の変化量が大きく異なることから、複合体形成による立体構造や安定性の変化の程度を反映していることが示唆された。

一方、正常な細胞内においては、還元的環境が保たれていることから、ジスルフィド結合が還元され、複合体が解離することが想定される。したがって、複合体の安定性について、細胞内の還元的環境の維持に関わる分子群と混合後、上記の NMR 実験系にて評価した。その結果、細胞内因子によって、CRBD 阻害剤複合体の NMR スペクトルの変化が異なることが分かった。つまり、複合体のスペクトルに影響を与えないケース、また、複合体とも、遊離した CRBD ともスペクトルが異なるケースが生じた。後者について質量分析にて確認した結果、阻害剤が細胞内因子と置換して結合していることが分かった。この置換した状態においても、CRBD の CCR2 結合能が抑制されているため、阻害剤は、フロントと直接結合したまま阻害するのに加えて、細胞内因子との置換反応後も阻害したままという、二重の阻害メカニズムをもつことがうかがえた。なお、この細胞内因子を直接 CRBD に加えても結合しないことは確認できている。

次に、実際の細胞内にあるフロントと阻害剤の結合状態を評価するため、 $^{15}\text{N}$  安定同位体標識フロントタンパク質 CRBD を導入した HeLa 細胞を用いた In-cell NMR 実験系を確立した。導入効率の観点から電気穿孔法を用いて導入を試みたが、当初、CRBD の溶解度が低いため、導入できたタンパク質の量が少なく、12時間の積算を行っても NMR 信号を検出できなかった。そのため、溶解度低下の原因である CRBD 同士の会合界面の候補となるアミノ酸残基15個を NMR により同定し、それぞれ変異を導入することで、この中から、5倍以上の溶解度をもつ変異体を取得できた。本変異体を用いて In-cell NMR 実験を実施した結果、細胞内に導入した CRBD 由来の NMR 信号の検出に初めて成功した。信号が広幅化しており、すべての信号が見えている状況ではないため、細胞膜等の細胞内因子との相互作用が示唆された。今後、実験系を最適化し、CRBD 阻害剤複合体の結合状態を評価する。

また、生体内において、阻害剤の炎症シグナリング抑制効果を評価するため、慢性疼痛モデルラットの脳機能への影響に基づいて評価する *in vivo* fMRI 実験系を確立した。慢性疼痛を発症している生体の脊髄後角において、ケモカインの作用によってミクログリアが活性化されていることから、フロント阻害剤による疼痛抑制効果が期待できる。生理食塩水の投与後に、左後肢に痛み刺激を与えた際に、脳内の島皮質や体性感覚野などの痛み応答領域に、血流増大に基づく活性化が見られた。一方、フロント阻害剤投与後には、これらの活性化が有意に抑制されることが分かった。*in vivo* fMRI 実験系を用いて、阻害剤の炎症シグナリング抑制効果を評価することが可能となった。

以上より、原子・分子レベルから動物個体レベルまでの *in vitro*、In-cell、*in vivo* の各実験系を確立し、標的タンパク質に含まれるシステインのチオール基に作用する化合物を評価する基盤を整えることができたと考える。今後、がんをはじめとする炎症性疾患の治療薬を創出する新たな戦略として最適化し、習熟させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tsuji, T., Yoshinaga, S., Takeda, M., Sato, T., Sonoda, A., Ishida, N., Yunoki, K., Toda, E., Terashima, Y., Matsushima, K., Terasawa, H.	4. 巻 59
2. 論文標題 Rational Design of Monodispersed Mutants of Proteins by Identifying Aggregation Contact Sites Using Solubilizing Agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3639 ~ 3649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00414	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 -

1. 著者名 Higashi, A., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.	4. 巻 28
2. 論文標題 NMR and MRS studies of proteins delivered into cultured cells, towards MR analyses of proteins under physiological conditions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 2986
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 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14件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Uchida, K., Yoshinaga, S., Sato, T., Takeda, M., Terashima, Y., Toda, E., Matsushima, K., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Preparation of phosphorylated FROUNT protein, a regulator of chemokine receptors, for structural and functional analyses
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato, T., Udatsu, H., Higashi, A., Takeda, M., Terashima, Y., Toda, Et., Matsushima, K., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 In-cell NMR analysis of the structure of a chemokine-signaling protein and the interaction with its inhibitory compound
3. 学会等名 第50回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村早姫、吉永壮佐、佐藤貴文、武田光広、寺島裕也、遠田悦子、松島綱治、寺沢宏明
2. 発表標題 細胞遊走シグナル制御因子R1-15の立体構造解析と細胞内NMR解析に向けた試料調製
3. 学会等名 第16回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇田津晴香、東愛理、佐藤貴文、武田光広、寺島裕也、遠田悦子、松島綱治、吉永壮佐、寺沢宏明
2. 発表標題 熱安定性の低いタンパク質のIn-cell NMR解析に向けたタンパク質の培養細胞への導入法の検討
3. 学会等名 第16回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Higashi, A., Sato, T., Udatsu, H., Yoshinaga, S., Takeda, M., Toda, E., Terashima, Y., Matsusima, K., and Terasawa, H
2. 発表標題 NMRを用いたタンパク質の細胞内解析に向けた自己会合抑制変異体の利用によるスペクトル改善の試み
3. 学会等名 第49回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤貴文、吉永壮佐、東愛理、宇田津晴香、武田光広、寺島裕也、遠田悦子、松島綱治、寺沢宏明
2. 発表標題 In-cell NMRを用いたケモカインシグナル制御タンパク質の細胞内における構造評価
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田恵介、吉永壮佐、佐藤貴文、武田光広、寺島裕也、遠田悦子、松島綱治、寺沢宏明
2. 発表標題 ケモカイン受容体制御因子FROUNTのリン酸化による立体構造とケモカイン受容体結合能への影響の解析
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田津晴香、東 愛理、佐藤貴文、武田光広、吉永壮佐、寺沢宏明
2. 発表標題 細胞内環境におけるタンパク質のNMR解析システムの構築
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 愛理、宇田津晴香、佐藤貴文、武田光広、吉永壮佐、寺沢宏明
2. 発表標題 In-cell NMR 測定に向けたタンパク質導入細胞の調製方法の検討
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshinaga, S., Sato, T., Higashi, A., Takeda, M., Terashima, Y., Toda, E., Matsushima, K., and Terasawa, H.
2. 発表標題 In-cell NMR analysis of an anticancer candidate compound against a chemokine-signaling protein FROUNT
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato, T., Yoshinaga, S., Higashi, A., Takeda, M., Terashima, Y., Toda, E., Matsushima, K., and Terasawa, H.
2. 発表標題 In-cell analysis of an inhibitory compound against a chemokine-signaling protein with the in-cell NMR method
3. 学会等名 第48回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Higashi, A., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 NMR and MRS studies of proteins delivered into cultured cells, towards MR analyses of proteins under physiological conditions
3. 学会等名 ISMRM& SMRT Virtual Conference & Exhibition, (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sameshima, M., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Analysis of BOLD responses against green laser stimulation in a chronic pain animal model after administration of an analgesic candidate
3. 学会等名 第48回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉永壮佐
2. 発表標題 立体構造解析に向けたタンパク質の溶解度向上戦略 ~立体構造に基づく抗がん剤開発への道~
3. 学会等名 2020年度日本分光学会NMR分光部会 集中講義(招待講演)
4. 発表年 2020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
研究分担者	吉永 壮佐 (Yoshinaga Sosuke) (00448515)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・講師  (17401)	
研究分担者	武田 光広 (Takeda Mitsuhiro) (90508558)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教  (17401)	
研究分担者	松島 綱治 (Matsushima Kouji) (50222427)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授  (32660)	
研究分担者	寺島 裕也 (Terashima Yuya) (90538729)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・講師  (32660)	

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