

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550108

研究課題名(和文) 標的タンパク質との複合体におけるリガンド分子結合部位の高精度特異的検出法の開発

研究課題名(英文) Development of the specific detection methods to identify the binding epitope of ligand interacting with the target protein

研究代表者

田代 充 (Tashiro, Mitsuru)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：40315750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：核磁気共鳴法の試料溶液としては100% 重水が測定しやすいが、溶媒置換の操作が不可避となり、貴重な試料を損失することがある。本研究では、軽水溶液(95% H₂O+5% D₂O)として測定可能であり、ターゲットであるレセプター分子と結合するリガンドを、精確に検出できる高感度な測定法の開発を行った。具体的には、飽和移動差スペクトル法およびWater-LOGSY法をベースに、巨大な水シグナルを効率的に消去し、高感度化を目指した。本法の特徴は、¹³C、¹⁵Nなどの高価な安定同位体を使用せずに、1次元1Hスペクトルより、目的のリガンド分子を短時間で検出できることにある。

研究成果の概要(英文)：In acquiring NMR spectra, it is easier to use samples containing 100% D₂O on the point of setting parameters. However, loss of valuable samples is inevitable due to the solvent exchange process. In the present research, the novel method, which is suitable to detect ligand binding to a protein receptor in solution containing 95% H₂O+5% D₂O, was developed. The pulse scheme, which can effectively attenuate huge water signal, was incorporated in STD and Water-LOGSY experiments. An advantage of the present method is the sensitive detection of the binding ligand in acquiring 1D spectra without using expensive isotopes such as ¹³C and/or ¹⁵N.

研究分野：分析化学

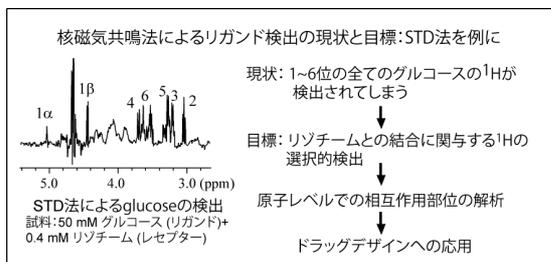
キーワード：分子間相互作用 タンパク質 リガンド 特異的検出 核磁気共鳴法

1. 研究開始当初の背景

医薬品の開発過程において有効なスクリーニング系の確立は不可欠であり、特に *in vitro* でのスクリーニング系として簡便、廉価な方法が望まれる。ここ数年、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る。既存の方法の代表例として、レセプターとなるタンパク質を ^{15}N などの安定同位体で標識し、そのタンパク質と結合するリガンド (薬剤などに相当) との分子間相互作用を 2次元 NMR で観測することにより、高親和性のリガンドを探索する手法がある。20-30 分程度の短時間で結果を得られる長所があるが、安定同位体などのコストがかかることや帰属が可能なタンパク質の分子量に制限 (約 30 kD) があることが短所として挙げられる。他の測定法として、NOE-ポンピング法、Saturation Transfer Difference (STD)法などが 1990 年代後半に提案されているが、製薬会社で使用されている実践的なスクリーニング法は、論文や学会など外部で発表されることは極めて少なく、NMR 以外のバイオアッセイ法を含め、多くの研究者が手探り状態であるのが実情であった。

2. 研究の目的

現在までに考案されている数種類の測定法の長所・短所を踏まえ、軽水溶液 (95% H_2O + 5% D_2O) として測定可能であり、ターゲットであるレセプター分子との結合に寄与するリガンドの部位を精確に特定できる高感度な NMR 測定法の開発を目指す。ここ数年主流となっている STD 法および Water-LOGSY 法が他の方法と比較して、高親和性のリガンドに対しても応用可能と報告されていることより、これら 2 種類の測定法をベースに高感度化・高精度化の開発を行う。



本研究では、既存の測定方法の短所を克服すべく、高価な安定同位体を使用せず、1次元スペクトルにより標的レセプター分子と親和性のあるリガンドを短時間で識別し、リガンド分子中のどの部位が結合に関与するかの情報を得ることを目的とする。既存の NMR によるスクリーニングでは、レセプターに結合するリガンドの検出は可能であるが (上図のスペクトル) 結合に関与する部位の特定はほとんど行われていない。上図に現

状と当申請課題での目標との関係を示す。

3. 研究の方法

複合体の調製では、レセプターおよびリガンド共に市販品を使用し、試料調製を簡略化する。実際のモデルシステムとして、ヒト血清アルブミン - トリプトファンおよびリゾチーム - オリゴ糖を使用する。既存の測定法では、これらのモデルシステムにおいて、レセプターに結合するリガンド分子全体の ^1H が観測されている。結合に関与する水素原子のみを特異的に検出するためのパルスシーケンスの開発を行う。既存の測定では、最初に水またはタンパク質を選択励起し、その磁化をリガンドに移動させる。選択励起方法および磁化移動の方法に焦点をあてて、パルスシーケンスの検討を行う。

研究計画は、(a) Water-LOGSY および STD 法での高感度化の検討、(b) エレクトロスプレーイオン化質量分析法による複合体形成の確認、(c) Water-LOGSY および STD 法での水シグナルの消去方法の確立、(d) STD 法での選択励起シーケンスおよび磁化移動方法の検討、(e) 他の複合体への応用、の各項目から構成されている。研究体制の概略を下図に示す。

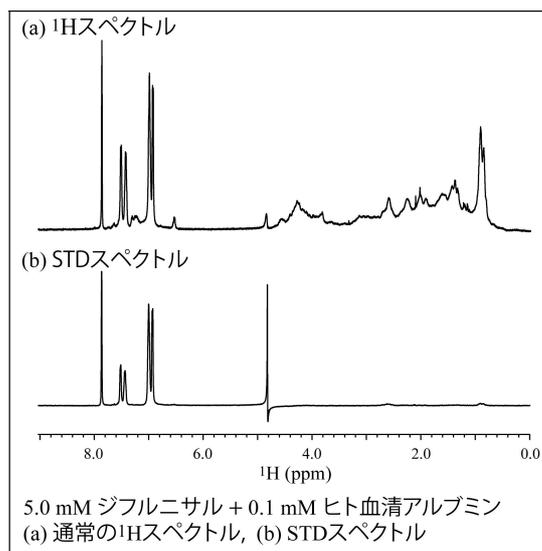


4. 研究成果

核磁気共鳴 (NMR) 法の試料溶液としては 100% D_2O が測定しやすいが、溶媒置換の操作が不可避となり、貴重な試料を損失することもある。本研究では、軽水溶液 (95% H_2O + 5% D_2O) として測定可能であり、ターゲットであるレセプター分子との結合に寄与するリガンドの部位を、精確に特定できる高感度な NMR 測定法の開発を行った。具体的には、ここ数年主流となっている Saturation Transfer Difference (STD) 法および Water-LOGSY 法をベースに、高感度化・高精度化を目指してきた。本法の特徴は、 ^{13}C , ^{15}N などの高価な安定同位体を使用せずに、1次元 ^1H スペクトルにより、リガンド分子中のどの部位が標的レセプター分子との結合に関与するかの情報を得ることにある。

Water-LOGSY および STD 法での水シグナルの消去方法の確立に関しては、水シグナル

近傍のリガンドシグナルを検出するため、巨大な水シグナルを効率的に消去するパルステクニックを開発し、実際のパルスシーケンスに取り入れた。下図に示すように、WATERGATE W5 シーケンスおよびZ-filterを用いて、良好な結果が得られている。



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 17 件)

1. “Analysis of weak affinity of β -D-fructofuranosyl-(2 \leftrightarrow 1)-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside for yeast β -fructofuranosidase using NMR spectroscopy” C. Sakuma, K. Furihata, T. Nishio, T. Miyakawa, M. Tanokura, M. Tashiro, *J. Carbohydr. Chem.* 2014, **33**, 498-505.
2. “BASHD-*J*-resolved-HMBC, an efficient method for measuring proton-proton and heteronuclear long range coupling constants” K. Furihata, M. Tashiro, *Magn. Reson. Chem.* 2014, **52**, 27-31.
3. “Crystal Structure of 1,3,4,5-Tetra-*O*-acetyl- α -D-tagatopyranose” D. Miura, T. Fujimoto, M. Tashiro, T. Machinami, *X-ray Structure Analysis Online*, 2014, **30**, 3-4.
4. “Enzymatic synthesis of novel oligosaccharides from *N*-acetylsucrosamine using β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*” T. Nishio, M. Juami, T. Wada, Y. Sugimoto, H. Senou, W. Komori, C. Sakuma, T. Hirano, W. Hakamata, M. Tashiro, *Carbohydr. Res.*, 2013, **382**, 108-112.
5. “Crystal Structure of β -D-fructofuranosyl 4-chloro-4-deoxy- α -D-galactopyranoside” T. Fujimoto, D. Miura, A. Iwamoto, T. Machinami, M. Tashiro, *X-ray Structure Analysis Online*, 2013, **29**, 43-44.
6. “Complex formation of 1,6-anhydro- β -maltose and sodium ions using single-crystal X-ray crystallography and NMR spectroscopy” T. Fujimoto, D. Miura, T. Kato, O. Kamo, Y. Shimoikeda, T. Machinami, M. Tashiro, *American Journal of Anal. Chem.*, 2013, **4**, 361-367.
7. “Dopamine cannot promote oligomerization of unoxidized α -synuclein” S. Shimotakahara, M. Matsui, C. Sakuma, T. Takahashi, T. Fujimoto, K. Furihata, M. Kojima, S. Seino, T. Machinami, Y. Shibusawa, K. Ueda, M. Tashiro, *J. Biophys. Chem.* 2013, **4(3)**, 110-114.
8. “Luminescence amplification by enzymatic Eu^{2+} oxidation to Eu^{3+} for time-resolved peroxidase activity measurement” K. Matsumoto, H. Kimura, N. Kon, K. Yoshida, M. Abo, E. Yoshimura, *Anal. Sci.*, 2013, **29**, 971-977.
9. “Microcirculation System with a Dialysis Part for Bioassays Evaluating Anticancer Activity and Retention” Y. Imura, E. Yoshimura, K. Sato, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1683-1688.
10. “Ostzf1, a CCCH-tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes” A. Jan, K. Maruyama, D. Todaka, S. Kidokoro, M. Abo, E. Yoshimura, K. Shinozaki, K. Nakashima, K. Y. Shinozaki, *Plant Physiol.* 2013, **161**, 1202-1216.
11. “Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis” Y. Osakabe, N. Arinaga, T. Umezawa, S. Katsura, K. Nagamachi, H. Tanaka, H. Ohiraki, K. Yamada, So-Uk Seo, M. Abo, E. Yoshimura (他 2 名) *Plant Cell.* 2013, **25**, 609-625.
12. “BASHD-*J*-resolved-COSY: a new method for measuring proton-proton spin coupling constants of multiplet signals” K. Furihata, M. Tashiro, *Magn. Reson. Chem.* 2012, **50**, 713-716.
13. “Selective COSY-*J*-resolved-HMBC, a new method for improving sensitivity of cross peaks of methine proton signals attached to a methyl group” K. Furihata, M. Tashiro, *Magn. Reson. Chem.* 2012, **50**, 409-414.
14. “Demonstration of three dopamine molecules bound to α -synuclein: Implication of oligomerization at the initial stage” S. Shimotakahara, Y. Shiroyama, T. Fujimoto, M. Akai, T. Onoue, H. Seki, S. Kado, T. Machinami, Y. Shibusawa, K. Ueda, M. Tashiro, *J. Biophys. Chem.* 2012, **3**, 149-155.
15. “Comparison of methanol and acetonitrile eluents for the quantitation of chelators specific to soft-metal ions by HPLC” S.

Ogawa, E. Yoshimura, *J. Chromatography B*, 2012, **909**, 34-36.

16. "Micro total bioassay system for oral drugs: evaluation of gastrointestinal degradation, intestinal absorption, hepatic metabolism, and bioactivity" Y. Imura, E. Yoshimura, K. Sato, *Anal. Sci.*, 2012, **28**, 197-199.
17. "Substrate inhibition competes with halide inhibition in polyphenol oxidase" G. G. F. Lim, Y. Imura, E. Yoshimura, *Protein J.* 2012, **31**, 609-614.

〔学会発表〕(計3件)

1. "Observation of oligomerization process of α -synuclein in association with dopamine using NMR spectroscopy" K. Furihata, M. Tashiro, 55th Experimental NMR conference 2014年3月23-28日, Boston, USA
2. "BASHD-J-Resolved-HMBC: A New Method for Measuring Heteronuclear Long Range Coupling Constants and Proton-Proton Coupling Constants of Multiplet Signals" K. Furihata, M. Tashiro, 54th Experimental NMR conference 2013年4月14-19日, California, USA
3. "BASHD-J-Resolved-COSY: A New Method for Measuring Proton-Proton Spin Coupling Constants of Multiplet Signals" K. Furihata, M. Tashiro, H. Seto, 53th Experimental NMR conference 2012年4月15-20日, Miami, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：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・教授

研究者番号：40315750

(2) 研究分担者

吉村 悦郎 (Yoshimura Etsuro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

授

研究者番号：10130303

(3) 連携研究者：なし

()

研究者番号：