

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：最先端 NMR 構造解析に向けた蛋白質試料評価調製システムの高度化と外部支援
3. 研究開発代表者：所属 国立大学法人大阪大学蛋白質研究所
役職 教授 氏名 藤原 敏道
4. 研究開発の成果

【事業計画に対する進捗】

平成 27 年度は、前年度までに確立した試料調製支援体制や高度化技術を利用し、コンサルティングおよび支援を継続して多数実施すること、蛋白質試料評価調製システムを高度化すること、前年度までに高度化した技術を実際の支援に適用することを計画し、これらを達成した。具体的には、コンサルティングおよび支援を多数実施し、製薬企業へのコンサルティングや事業の紹介を引き続き積極的に行い、前年度とは異なる製薬企業からの応募に至った。また、蛋白質と膜との相互解析に重要なフォスファチジルイノシトールリン酸含有ナノディスクの作成技術や、¹⁹F 化合物ライブラリーを用いた NMR スクリーニング技術などの薬剤蛋白質相互作用を網羅的に解析するための試料評価調製システムをさらに発展させることに成功し、現在論文の投稿準備を進めている。蛋白質生産技術においては、創薬ターゲットとして有望な蛋白質キナーゼを対象に、大腸菌大量発現系を用いた高効率な NMR 試料生産技術の構築に成功した。

【支援の進捗及び成果】

大腸菌 SPP 法を用いて新規なセグメント安定同位体標識技術、還元耐性スピンドラベル剤や還元耐性シフト剤を用いた化学標識技術、ナノディスク作成技術、薬剤蛋白質相互作用を網羅的に解析するための試料評価調製システム、蛋白質キナーゼの大腸菌および昆虫細胞を用いた生産技術など、支援依頼や相談のあった阪大グループで高度化した技術を支援技術として確立し、実際に支援に適用した。平成 27 年度のコンサルティング実績は 7 件（平成 24 年度からの総計は 25 件となる）である。7 件中 1 件はサイトビジットであり、コンサルティングを行った 7 件中 2 件で支援申請が行われ、その全てが受理された。さらに、7 件中 5 件が支援申請の準備中である。平成 27 年度までに整備した支援体制を利用し、受理された 2 件の支援作業を進めた。

支援作業は、目的蛋白質の大腸菌発現用プラスミドベクターの構築から大腸菌発現系における発現量の確認、同位体標識のための培養、精製条件の検討、NMR 測定による性状確認までを行い、検討結果はデータとともにレポートを作成した。目的蛋白質の大腸菌発現用プラスミドベクターとしては、阪大グループが開発した pCold-GST を選択した。pCold-GST の利用で、通常ベクターでは発現困難であった蛋白質の発現を劇的に改善させた。支援の結果においても、pCold-GST ベクターを用いた全ての場合で目的蛋白質が大量発現し、NMR 測定に十分な量の蛋白質が得られた。同位体標識、蛋白質精製、NMR 測定などの支援作業も順調であり、実施済みの支援案件の全てで目的蛋白質の性状確認に成功した。

【高度化の進捗及び成果】

安定同位体標識技術の高度化では、NMR 測定のための大腸菌等の大量培養と同位体標識、および、翻訳後同位体標識の高度化技術開発の体制を整備し、蛋白質翻訳後の化学的修飾法による部位選択的同位体標識法と、大腸菌高密度培養法による経済的高効率標識法の開発、新規セグメント標識法の開発を進めた。

化学的修飾法では、NMR の高感度観測を可能にする ^{13}C 標識メチル基を、翻訳後リジン側鎖に化学的に結合させて測定する方法を確立した。この手法により、蛋白質間相互作用解析が極めて低濃度 ($0.2\ \mu\text{M}$, 世界最高感度) で可能になったこと、通常測定では解析困難な高分子量蛋白質に対して、この手法でシグナルの検出・解析可能であることを明らかにし、既に論文報告している。平成 27 年度は、本手法を用いることによりリジン側鎖に架かる塩橋が高精度に検出できることを新たに見出し、NMR 法では初めてとなる塩橋を介した距離情報の取得とそれらを用いた構造解析に成功した。現在投稿準備を進めている。

大腸菌高密度培養法については、従来法の約 5 倍の効率で同位体標識に成功し、アミノ酸選択標識が可能な培養法に発展させた。これにより、高分子量化による NMR 解析のボトルネックが解消するだけでなく、高密度培養法によって培地量が少なくなり、同位体標識のコストが大幅に下がり、アミノ酸選択標識が現実的な手法へと発展した。また、これらの手法を支援に利用し、一般に有効と考えられているメチル基 ^{13}C 標識体では Met 以外で再現性が乏しいこと、分子量 5 万程度までであれば重水素標識していない主鎖 ^{15}N 標識体が Met/Lys などのアミノ酸で有効であることが明らかとなった。実際にいくつかの高分子量蛋白質およびキナーゼについてアミノ酸選択的同位体標識を行い、重水素標識が無くともリガンドとの相互作用の解析が可能であることも見出している。さらに、NMR を用いた構造解析において特に重要な情報をもたらすアミノ酸 7 種類について、当該アミノ酸の代謝およびアミノ酸選択的同位体標識の効率に関する詳細な解析を行い、代謝によって標識効率が十分に達成できないアミノ酸であっても目的アミノ酸の NMR シグナルを選択的に抽出することを可能にする NMR パルスシーケンスを開発した。現在投稿準備を進めている。

新規セグメント標識法の開発では、大腸菌 SPP 法の特性を利用した、蛋白質の目的領域だけを標識する“セグメント標識”に成功しつつある。このセグメント標識法は従来法に比べて極めて簡便であることが特徴であり、高分子量蛋白質の NMR 解析や *In situ/in cell* NMR 測定において、スペクトルの質を大きく改善する。さらに、中性子小角散乱においても距離情報を与えると考えられており、中性子小角散乱を有効に利用するための予備実験を開始している。

NMR 性状評価においては、NMR によるインタクト Cell での構造評価が可能な支援技術の確立に着手し、測定に成功した。さらに、インタクト Cell 中の同位体標識蛋白質の直接観測法について、実験条件を検討した。その結果、試みた全ての蛋白質でスペクトルが改善する発現条件を発見し、現在投稿準備を進めている。さらに電気穿孔法によるヒト細胞への安定同位体標識蛋白質の導入にも成功している。NMR 高度利用では、*In situ/in cell* NMR などを含む高度な NMR 測定を可能とする新規技術の確立に着手し、蛋白質の立体構造情報を取得する新手法として細胞内の還元条件下でも蛋白質に標識できるスピラベル剤やシフト剤の開発を行った。従来、還元条件ではスピラベル剤やシフト剤は標識することが困難であったが、本手法により新規スピラベル剤やシフト剤は蛋白質に対して長時間安定に結合を維持させることが可能になり、還元条件下でも原子間距離を正確に測定することが可能になった。

本研究課題が、NMR 試料調製の基盤技術の開発で世界をリードすることにより、その知財に基づいて日本および世界の経済活動に貢献するだけでなく、画期的な薬剤が創製される可能性が高まることで世界的に人類の健康や公衆衛生の改善などに寄与できる。また、NMR 試料生産ではコストの高い同位体標識が必須であるが、本事業で高度化された濃縮培養技術やアミノ酸選択標識技術は、コストを大幅に引き下げる観点から重要である。

本事業で開発された *In cell* での試料性状評価技術は、そのまま技術移転が可能である。他にも企業との共同研究を進めており、課題終了後のすみやかな技術移転や普及が大いに期待できる。

【他課題との連携による成果】

制御拠点の長野哲雄教授（東京大学）・辻川和丈教授（大阪大学）の助力を得て、2万化合物による一次スクリーニングを完了し、複数のヒット化合物を得ることに成功した。制御拠点の前仲勝実教授（北海道大学）と連携して蛋白研¹⁹F化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、複数のヒット化合物を得ることに成功した。解析拠点の澤崎達也教授（愛媛大学）とスクリーニングに関する情報共有を行った。情報拠点の金城玲准教授・川端猛准教授（大阪大学）、解析拠点の塩崎一裕教授（奈良先端大）と連携して、PDBに登録されている結晶構造および本機関で決定したNMR構造をベースに複合体モデルの構築に成功した。解析拠点の中川敦史教授（大阪大学）と連携して結晶構造解析に成功した。本事業での成果をベースに、国内外の事業外研究者約30名と共同研究/受託研究/共同利用を、製薬企業10社を含む事業内外約20社の研究者と共同研究/受託研究を行った。