

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（SAIL アミノ酸の高度化と標識蛋白質供給体制の整備支援）
3. 研究開発代表者：SAIL テクノロジーズ株式会社 取締役 甲斐荘正恒
4. 研究開発の成果

SAIL テクノロジーズ株式会社は、SAIL アミノ酸等の高度な同位体標識アミノ酸合成技術及び SAIL アミノ酸を用いて蛋白質を効率よく標識するための蛋白調製技術を開発し、我が国の蛋白質 NMR 基盤技術開発を多角的に支援する。平成 27 年度は、前年度からの継続案件を含め合計 3 件の支援を実施した。

また、SAIL アミノ酸の経済的合成の開発、Mini SAIL” タンパクの調製、改良型 SAIL アミノ酸の合成の高度化を実施した。

【支援】

支援課題名：カルモジュリンと膜タンパク質の相互作用様式の解明

カルモジュリン (CaM) は、様々なタンパク質と結合しそれらを活性化させる働きを持つ。本課題では CaM と膜タンパク質 mGluR7 (metabotropic glutamate receptor 7) の CaM 結合部位に相当するペプチドとの相互作用様式や複合体の構造について、SAIL アミノ酸を用いた動態解析を実施する。CaM は mGluR7 ペプチドの結合時において安定なひとつの複合体構造をとらず多型であることが確認されている。この平衡をより効果的にとらえるため、CaM の分子表面に存在する 9 個のメチオニン (Met) 残基に着目し、これらのメチル基を利用した動態解析を行う。平成 27 年度は、メチオニン- $^{13}\text{CH}_3$ および SAIL メチオニンを合成し提供した。これらの標識アミノ酸を用いた SAIL 標識タンパク質の合成は本事業高度化により開発したアミノ酸選択標識技術のノウハウを技術移管することにより北陸先端大内において大腸菌系 *in vivo* 発現系により調製した。現在は解析領域・廣明秀一教授グループにおいて高圧 NMR を用いた解析が進められている。

支援課題名：ABC トランスポーター ABCB1 の動的な多剤認識・排出機構の解明

ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーを利用して基質を輸送する膜タンパク質である。この輸送機構を理解するために基質輸送に伴う構造変化の途中状態、および様々な基質との過渡的な相

互作用を捉える必要がある。

本支援課題では、ヒト P-gp

のホモログである好熱性真

核生物 *Cyanidioschyzon*

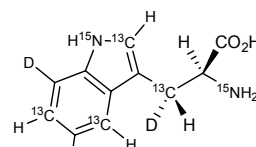
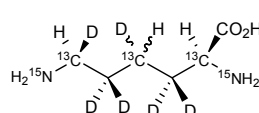
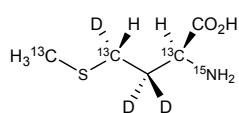


図 1：支援対象の改良型 SAIL アミノ酸

merolae 由来 ABC トランスポーター (CmABCB1) の基質結合の動態解析を目的とし、その解析に最適な改良型 SAIL-トリプトファン、改良型 SAIL-メチオニン、改良型 SAIL-リジンの合成を検討した。27 年度は、型 SAIL メチオニンの合成は完了し、タンパク質に導入後 NMR 測定解析を行い、この標識アミノ酸の評価試験を実施した。この支援に用いる改良型 SAIL アミノ酸は、新規化合物でありまた高度な合成技術を要するため、高度化課題の一環として合成研究が進められている。この合成技術の一部は平成 28 年度中の特許化を検討している。

【高度化】

1. SAIL アミノ酸の経済的合成の開発

平成 27 年度は、セリンスルフィドラーゼを用いた SAIL セリン水酸基のメルカプトへの置換反応による SAIL システインへ変換を検討した。その結果、SAIL セリン側鎖の立体選択性を保持した SAIL-システインへ変換され、従来法に比べて安価な SAIL システインの合

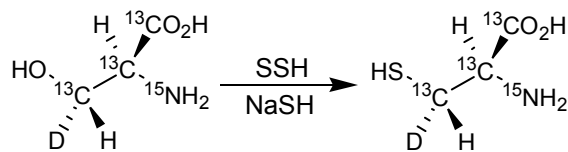


図 2： SAIL システインの酵素合成

成法を確立することができた。トレオニンの合成については、従来の有機化学的手法を用いた合成法に代わり、アミノ酸合成酵素を用いた $^{13}\text{CH}_3$ 標識体の合成法を検討した。27 年度は、トレオニン生合成に使用されている酵素類の入手と大量発現系の構築を検討した。また、プロキラルなメチル基を立体選択的に ^{13}C 標識したバリンおよびロイシンについて、非標識体の原料を用いることにより、より安価な合成経路を確立することができた。

2. 改良型 SAIL アミノ酸の合成

改良型 SAIL メチオニン、トリプトファンおよびリジンなどの高度化研究については、支援と並行して進められ、支援依頼内容に最適な改良型 SAIL アミノ酸の設計と合成を検討した。

meso-ジアミノピメリン酸は、細胞中に存在するジアミノピメリン酸脱炭酸酵素によりリジンへと変換される。このアミノ酸生合成系を、標識体合成に利用することにより、目的タンパク質中のリジン残基を立体選択的に重水素標識できると期待される。改良型 SAIL リジンの合成は、2H および ^{13}C が位置・立体選択的にリジンに導入されているため、有機合成を利用した場合には、短期間に且つ安価に合成することは困難である。そこで、この大腸菌中に存在するジアミノピメリン酸脱炭酸酵素を利用して、簡便に目的とする改良型 SAIL リジンの合成を検討

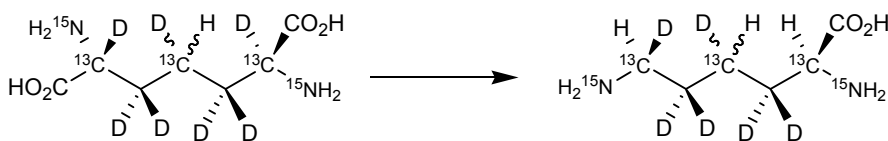


図 3： 改良型 SAIL リジンの酵素合成

した。今年度は、改良型 SAIL リジンの前駆体となる同位体標識ジアミノピメリン酸を合成し、検討実験用として無細胞タンパク質合成系を利用して、タンパク質が標識可能かどうか検討した。

改良型 SAIL メチオニンについては合成が完了し、名古屋大学・解析領域・廣明秀一教授グループにおいてこの改良型 SAIL メチオニンのタンパク質への組み込みと NMR 測定を実施した。

改良型 SAIL トリプトファンに関しては、28 年度中には合成を完了する予定である。

3. Mini SAIL” タンパクの調製

mini-SAIL 法に関しては、すでにタンパク質調製まで完了し、現在、フランクフルト大学 Peter Güntert 教授に協力いただき構造計算を検討している。