

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

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）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）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）
（英語）Support and upgrade of sample evaluation/preparation system for
advanced protein NMR study (Developing the infrastructure
for supplying proteins labeled by SAIL amino acids with
re-optimized isotope-labeling patterns)

補助事業担当者（日本語）SAIL テクノロジーズ株式会社 甲斐荘正恒

所属 役職 氏名：（英語）Masatsune Kainosho, SAIL TECHNOLOGIES

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

過去 5 年間、改良型 SAIL アミノ酸を含む、様々な安定同位体標識アミノ酸の供給を通じて、幅広いユーザーに対する創薬支援活動に専念してきた。その中で、技術移転の促進を図るとともに、新規創薬指標の開発に向けた同位体標識技術の高度化にも取り組んだ。

(1) *in vivo* 発現系による SAIL 蛋白質調製: 無細胞以外の蛋白質調製技術が無いことが SAIL 法普及にむけた課題の一つとされてきた経過を踏まえ、大腸菌発現系を用いる SAIL 蛋白質調製の可能性を検討した。即ち、各アミノ酸の添加量 vs. 標識率の相関関係を質量分析法により精密に計測することにより、アミノ酸代謝に関連する酵素活性の阻害剤による制御、更には酵素活性を欠失させた変異体の導入を含めた大腸菌発現系の改良を検討した。この結果、比較的少量の標識アミノ酸添加量においても、蛋白質

構成アミノ酸の内、半数以上のアミノ酸に関して個別、或いは同時に同位体標識した蛋白質の調製条件を確立することができた。これにより、より広範な支援要求に対応することが可能となった。

(2) 残基選択的 SAIL 標識法：大腸菌発現系により、SAIL アミノ酸等で残基選択的に標識した蛋白質を経済的、且つ容易に調製できることは安定同位体 NMR 技術基盤の高度化につながる重要な技術基盤となる。残基選択的に標識した試料を用いれば、分子量 100 kDa を越えるような高分子量蛋白質・複合体、或いは抗体・膜蛋白質等の創薬ターゲットとして興味が持たれる蛋白質に関して、新たな局所構造・動態情報の取得が可能となる。このために、名古屋大学 NMR 研究グループとも密接に協力し、創薬支援活動を念頭に下記項目の開発に携わり所期の目的を達成した。

(a) 高分子量蛋白質の立体構造情報の取得：蛋白質の立体構造自体は X 線等により迅速且つ容易に決定できる状況となり、NMR に期待される役割は薬剤開発に関連する特定部位の詳細な構造動態情報の取得に大きくシフトしている。このため、蛋白質内部や表面に広範に分布するメチル基、芳香環 NMR シグナルの効率的観測、配列帰属手法の高度化を進めた。SAIL アミノ酸の横緩和(T_2)機構をより改良した様々な改良型 SAIL アミノ酸を合成し、それらを用いて残基選択的に標識した蛋白質を用い、全メチル基と芳香環 NMR シグナルの位置・立体選択的観測技術を確立した。

(b) 蛋白質-薬剤相互界面における動態情報の選択的取得：位置情報に加え、時間軸が加わることが NMR 情報の最大の特徴である。従来、創薬への NMR 法の利用は薬剤結合に伴い誘起される化学シフト変化を利用するに留まり、NMR 情報の利点を十分に生かし切れていなかった。本課題では改良型芳香族 SAIL アミノ酸類を用いて標識した試料により、芳香環の反転運動を定量的に観測する基本技術を初めて確立した。本法を用いて薬剤ターゲットとなる蛋白質表面に存在する芳香環クラスターが異なる薬剤の結合により、結合界面の構造上の差異は見られないにも関わらず、芳香環反転頻度で示される大振幅動態に著しい薬剤構造依存性を示すことを明らかとした。このような、時間軸を含む NMR 動態情報の構造依存性は今後の薬剤設計の新たな指標となり得ると考えられる。

英文

During the past five years, we have supported the drug-design activities of numerous scientists in Japan by providing various isotope-labeled amino acids, including novel SAIL amino acids with specialized labeling patterns. In so doing, we facilitated the dissemination of the SAIL method and searched for useful information for structure-based drug design.

(1) Preparation of SAIL proteins using *in vivo* expression systems: Considering the fact that the cell-free expression imposes an extra obstacle to disseminating the SAIL method, we re-examined conventional *E. coli* expression protocols for preparing labeled proteins. To do so, we used mass spectrometry to measure the relationships between the incorporation rates vs. the amounts of added amino acids under various conditions; *i.e.*, by controlling the enzymatic activities related to the amino acid metabolism with various inhibitors, or by using auxotrophic mutants lacking pertinent genes. Consequently, we successfully prepared proteins with as many as 13 labeled amino acids.

(2) Residue-selective SAIL labeling: Having established a practical alternative to prepare residue-selectively labeled proteins using *in vivo* expression systems, we pursued further innovation of the SAIL method, in order to obtain structural and dynamic information for the selected regions of drug targets, such as larger protein complexes, antibodies, or membrane proteins. To this goal, we closely collaborated with the NMR research scientists at Nagoya

University, and developed various novel methodologies aiming to support drug development activities.

(a) Obtaining valuable structural information for larger proteins: Nowadays, the structures of proteins can be readily determined by X-ray analysis or electron microscopy; therefore, the role of NMR as a structure determination tool has rapidly diminished in drug development endeavors. For this reason, the methyl NMR signals are widely used as the sole structural probes for larger proteins with known structures. We have extended this “methyl only” approach by including aromatic ring signals, which could be observed for the first time by using relaxation optimized SAIL amino acids. The “methyl and aromatic ring” approach allows us to obtain more reliable information from residues that are ubiquitously distributed in the protein interiors and surfaces.

(b) Interface dynamics for protein-drug complexes: The most prominent feature of the structural information obtained by NMR is that it contains a time variance together with the coordinates for atomic positions. Conventional NMR approaches for drug development activities largely depend on the chemical shift changes in proteins induced by drug binding. We investigated the interfacial dynamics for protein-drug complexes by using proteins selectively labeled with SAIL aromatic amino acids, and found that even though the static structures are almost identical, the large-amplitude dynamics, monitored by the aromatic ring flipping rates, could be distinct for different drugs. The observation opens a new possibility for “dynamic structure-based drug design”.

Ⅲ. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 7 件）

1. Miyanoiri Y, Takeda M, Okuma K, Ono A, Terauchi T, Kainosho M. Differential isotope-labeling for Leu and Val residues in a protein by E. coli cellular expression using stereo-specifically methyl labeled amino acids. *J Biomol NMR*. 2013, 57, 237-249.
2. Schmidt E, Ikeya T, Takeda M, Löhr F, Buchner L, Ito Y, Kainosho M, Güntert P. Automated resonance assignment of the 21 kDa stereo-array isotope labeled thioldisulfide oxidoreductase DsbA. *J. Magn. Res.* 2014, 249, 88-93.
2. Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Yang C-J, Kainosho M. Use of H/D isotope effects to gather information about hydrogen bonding and hydrogen exchange rates. *J. Magn. Reson.* 2014, 241, 148-154.
3. Wang S, Parthasarathy S, Nishiyama Y, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, Ishii Y, Nano-Mole Scale Side-Chain Signal Assignment by ¹H-Detected Protein Solid-State NMR by Ultra-Fast Magic-Angle Spinning and Stereo-Array Isotope Labeling. *PLoS One*. 2015;10, e0122714.
4. Yang C-J, Takeda M, Terauchi T, Jee J, Kainosho M. Differential Large-Amplitude Breathing Motions in the Interface of FKBP12–Drug Complexes. *Biochemistry*. 2015, 54, 6983-6995.
5. Wang S, Parthasarathy S, Xiao Y, Nishiyama Y, Long F, Matsud I, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, Ishii Y, Nano-mole scale sequential signal assignment by ¹H-detected protein solid-state NMR. *Chem. Commun.* 2015, 51, 15055-15058.

6. Miyanoiri Y, Ishida Y, Takeda M, Terauchi T, Inouye M, Kainosho M, Highly efficient residue -selective labeling with isotope-labeled Ile , Leu , and Val using a new auxotrophic E. coli strain. *J. Biomol. NMR*. 2016, 65, 109-119.
7. Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Kainosho M. ¹³C-NMR studies on disulfide bond isomerization in bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *J. Biomol. NMR*, 2016, 67, 37-53.
8. 宮ノ入洋平, 武田光広, 寺内勉, 甲斐荘正恒. 立体選択的 ¹³C 標識 Leu, Val の高分子量蛋白質の NMR 研究への応用. *分光研究*, 2016, 65, 46-49.
9. 宮ノ入洋平, 武田光広, 甲斐荘正恒. 高分子量蛋白質の動態に迫る NMR 技術の開発. *生化学*, 2016, 88, 452-464 .

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 新規安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の溶液立体構造解析, 口頭, 宮ノ入洋平, 武田光広, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16, 国内.
2. Large-amplitude, slow breathing motions in proteins as evaluated by aromatic ring flipping motions-Insights into the dynamics of protein interiors and protein-ligand interfaces. 口頭, Kainosho M, *The 42nd Naito Conference: In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences*, 2016/10/07, 国内.
3. Structural Studies of Larger Proteins using Relaxation Optimized SAIL Amino Acids, ポスター, Miyanoiri Y, Takeda M, Terauchi T, Ishida Y, Inouye M, Kainosho M, *The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 2016/8/21, 国内.
4. Large-amplitude, slow breathing motion in proteins: New insights for the dynamics of protein interiors and protein-ligand interfaces. 口頭, Kainosho M, *Biomolecular Structure and Dynamics: Recent Advances in NMR, Pacificchem 2015* , 2015/12/17, USA.
5. Recent Progress in the Selective SAIL Method for Studying Structures and Dynamics of Proteins and Protein Complexes. 口頭, Kainosho M, *The 14th FAOBMB Congress & 84th Annual Meeting of SBC - Current Excitements in Biochemistry and Molecular Biology for Agriculture and Medicine*, 2015/11/29, India.
6. Relaxation Optimized SAIL Method for Studying Structures and Dynamics of Large Proteins and Protein Complexes-The New Wave of Isotope Labeling. 口頭, Kainosho M, *Colloquium at TIFR Center for Interdisciplinary Science* , 2015/12/2, India.
7. 核緩和最適化 SAIL アミノ酸を利用した高分子量蛋白質複合体の溶液立体構造解析法の開発, ポスター, 宮ノ入洋平, 武田光広, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6, 国内
8. Perspectives of the SAIL Method for Studying Structures and Dynamics of Proteins and Protein Complexes. 口頭, Kainosho M, *Symposium: Recent Advances in Nuclear Magnetic Resonance*, 2015/7/3, Taiwan.
9. Stable-isotope Labeling Methods for Protein NMR Studies. 口頭, Kainosho M, *Workshop on NMR on Science and Drug Discovery*, 2015/5/31, China.

10. Relaxation Optimized SAIL Method for Studying Structures and Dynamics of Proteins and Protein Complexes-The Next Wave of Isotope Labeling. 口頭, Kainosho M, *The Frontier NCPSS Series, 2015 NMR Forum and Summer School for Protein NMR and Drug Discovery, Symposium on Future of Biomolecular NMR*, 2015/6/2, China.
11. Perspectives of the SAIL Method for Studying Structures and Dynamics of Larger Proteins, 口頭, Kainosho M, *Advanced Isotopic Labelling Methods for Integrated Structural Biology*, 2015/2/4, France
12. Escherichia coli Expression System Aimed at Improving the Versatility of Stereo-Array Isotope Labeling, ポスター, Terauchi T, *Advanced Isotopic Labelling Methods for Integrated Structural Biology*, 2015/2/4, France
13. SAIL 法を利用したタンパク質構造揺らぎの NMR 研究, 口頭, 武田光広, 甲斐荘正恒, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/4, 国内
14. 大腸菌蛋白質合成系を利用した新規 SAIL アミノ酸標識法の開発, ポスター, 宮ノ入洋平, 石田洋二郎, 武田光広, 寺内勉, 井上正順, 甲斐荘正恒, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/4, 国内
15. 芳香族アミノ酸側鎖のダイナミクスによる蛋白質と蛋白質及び蛋白質とリガンド相互作用の観測, ポスター, 楊淳竣, 武田光広, 宮ノ入洋平, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/4, 国内
16. Application of H/D isotope effects for gathering information about hydrogen bonding and hydrogen exchange rates for polar side-chains in proteins. Kainosho M, *The 5th Japan-Taiwan NMR Symposium*, 2014/9/29, 国内.
17. Large-Amplitude Slow Breathing Motions of Protein-ligand Interfaces as Revealed by Relaxation-Optimized SAIL Method, 口頭, Yang C-J, Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Kainosho M, *The 26th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 2014/8/24, USA.
18. Interface Dynamics in FKBP12-ligand complexes as Studied by the SAIL NMR Method at High Pressure, ポスター, Yang C-J, Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Kainosho M, *The 26th International Council on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 2014/8/24, USA.
19. NMR method for investigating hydrogen exchange rate of lysine side-chain amino group, ポスター, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, *International Council on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 2014/8/24, USA
20. Perspective of Protein NMR Technology, 口頭, Kainosho M, *IPR Seminar: Practical Aspects of Non-uniform Sampling in Multi-dimensional NMR Spectroscopy & Applications for Biological Systems*, 2014/6/19, 国内.
21. 高分子量蛋白質の立体構造解析に向けた新規 SAIL アミノ酸標識法の開発, 口頭, 宮ノ入洋平, 武田光広, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 第 52 回 NMR 討論会, 2013/11/12, 国内
22. Interface Dynamics Studies in Protein-Ligand Complexes with the Aid of SAIL and High-Pressure NMR Techniques, ポスター, 楊淳竣, 武田光広, 宮ノ入洋平, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 第 52 回 NMR 討論会, 2013/11/12, 国内
23. The Exquisite Art in NMR: Selective Enhancement and Attenuation of NMR Signals by Stable-isotope Labeling, 口頭, Kainosho M, *The 36th Molecular Biology Society of Japan*, 2013/12/3, 国内.

24. 蛋白質リジン残基側鎖アミノ基の水素交換速度の解析, ポスター, 武田光広, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 第 52 回 NMR 討論会, 2013/11/12, 国内.
25. 大腸菌を用いた大量発現系によるアミノ酸選択標識技術の最適化, ポスター, 寺内勉, 宮ノ入洋平, 武田光広, 近藤早恵, 甲斐荘正恒, 第 52 回 NMR 討論会, 2013/11/12, 国内
26. Latest Developments in the SAIL Methods-Beyond Structure Determination, 口頭, Kainosho M, *The 5th Asia-Pacific NMR Society Symposium* , 2013/10/27030, Australia.
27. Progress of Stable-Isotope Aided Technology in Biological NMR Research, 口頭, Kainosho M, 第 13 回日本蛋白質科学会, 2013/6/14, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願