

実施課題名 結合が弱いタンパク質複合体の迅速構造解析手法の開発

【背景】(実施課題の背景・目的を簡潔に具体的に記載してください。)

本研究課題の目的は、弱い相互作用からなるタンパク質複合体の迅速な立体構造解析手法を開発することである。結合が弱い複合体においては、従来のNMR法において複合体構造解析の鍵となる分子間の距離情報 (NOE)の取得が困難であり、複合体立体構造決定は容易ではない。そこで、長距離の構造情報を取得できるランタノイドプローブ法を高度化することで、実用的かつ簡便な、結合が弱い複合体立体構造解析法を構築する。

【実施内容】(別紙の利用報告書に記載してある実施内容を簡潔に具体的に記載してください。)

既存のランタノイドプローブ法が試料調製の難しさ、解析の煩雑さ、ランタノイド結合タグの入手の難しさなどの理由により、汎用性や実用性に乏しかった。これらを解決するための方法として、常磁性緩和 (PRE) のみを観測し構造情報として利用するための手法の構築を行った。ランタノイドイオンは15種類あり、それぞれ磁気的特性が異なる。そのため、固定化するランタノイドイオンの種類を変えることでPREの強さを自在に変えることができる。これは、ラジカルを用いた常磁性標識法にはない大きな特徴である。FGFR1とFGFR4のキナーゼドメイン間の2量体構造をモデルとして、複合体立体構造解析手法の構築を行った。FGFR4の表面に露出したCysをあらかじめ他のアミノ酸に置換した変異体を作製し、分子表面残基に人為的に1残基のCysを新たに導入した変異体を作製した。その変異体に市販されているMaleimide-monoamide-DOTAを反応させ、この試料に対してLa³⁺、Tb³⁺、Gd³⁺を結合させ、PREの観測を試みた。その結果、当初の目論見通りPCSIによりシグナル移動は観測されず、PREのみが観測されていることが確認された。得られた構造情報に基づき構造計算を行い、複合体構造モデルを得た。得られた構造モデルの妥当性について生化学実験により検証した。

• Fig.1

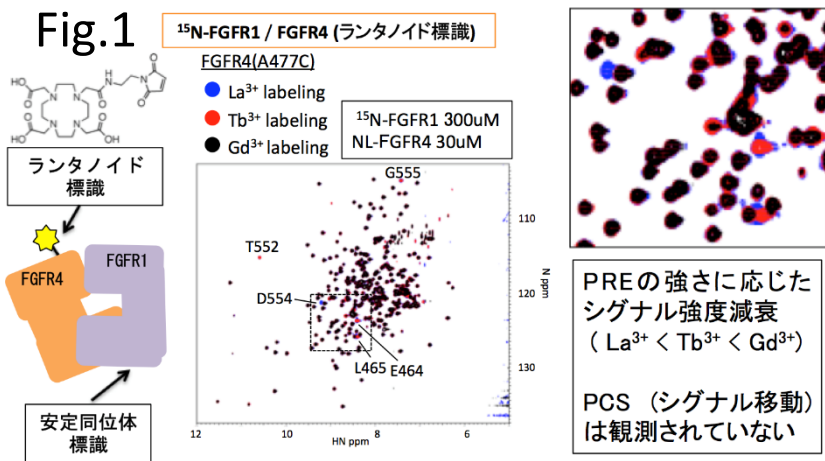


Fig.1 PREの観測：Tb³⁺は本来PCSI (シグナル移動) も観測されるが、目論見通りPREのみが観測されている

• Fig.2

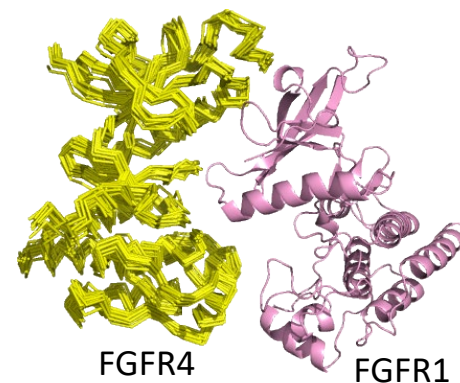


Fig.2 FGFR4とFGFR1のキナーゼドメイン間の2量体構造

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

課題受付番号	PF16-01-H-002		
利用課題名	結合が弱いタンパク質複合体の迅速構造解析手法の開発		
実施機関名	熊本大学		
実施部署名	大学院生命科学研究部（薬）生命分析化学分野		
実施責任者管理職名・氏名	職名	准教授	氏名 小橋川 敬博
実施部署所在地	熊本市中央区大江本町 5-1		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	<p>本研究課題では、数 μM～数百 μM 程度の解離定数 (K_d) を有する弱い相互作用からなるタンパク質複合体の迅速な立体構造解析手法を開発する。シグナル伝達、酵素反応など多くの生体反応が、弱い相互作用を介してなされている。立体構造情報は、分子認識や反応機構などに関して、多くの知見を与える。しかし、弱い結合からなるタンパク質間複合体の立体構造解析は容易ではない。現在、タンパク質の立体構造解析には X 線回折や NMR 法が用いられている。結合が弱い複合体の場合は、X 線回折では複合体結晶の取得が困難になり、NMR 法では複合体構造決定の鍵となる分子間の距離情報 (NOE) の取得が困難となる。また、NMR 法による複合体構造解析では、主に 3 次元による多くの多次元 NMR 測定を行うのが一般的であり、データの取得および解析には合計で 3～4 ヶ月程度を要する。産業上重要な創薬標的となる 3～5 万程度の分子量をもつタンパク質-低分子複合体の場合には、さらに時間を要する。本研究課題では、NMR を用いた迅速なタンパク質複合体の立体構造解析手法を開発する。</p> <p>これまで、ランタノイドプローブ法の高度化に取り組み、擬コンタクトシフト (PCS) のみを利用してタンパク質複合体構造を決定できることを示してきた (Saio <i>et al.</i>, 2009, 2015; Kobashigawa <i>et al.</i>, 2012)。テンソル解析ならびにランタノイドイオン座標の厳密な決定が必須であり、タンパク質にランタノイドイオンを部位特異的にかつ強固に固定化する必要があった。そのため、ランタノイド結合タグを SS 結合やペプチド結合により 2 点で固定する必要がある。ペプチドタグは溶解性の問題があり、キレートタグは Cys を 2 箇所導入する必要があり、それによりタンパク質の溶解性が低下することが問題となっている。加えて、2 点固定のキレートタグは市販されておらず、入手は容易ではない。そこで、本研究では、市販されているキレートタグを使用し、テンソル解析およびランタノイドイオン座標の厳密な決定が不要な常磁性緩和 (PRE) に基づく距離情報を使用した複合体構造情報を取得する手法の開発を試みた。</p>		
利用実施時期、及び期間	平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 30 年 9 月 30 日		
	総利用日数：30 日		
	当初計画変更 (変更理由) 当初よりも 10 日間使用日数が多くなった。平成 28 年の 4 月に発生した熊本地震の影響により、熊本での事前の条件検討を十分に行うことができず、		

		<p>プラットフォーム装置において条件検討と検証の両方の測定を行う必要があった。条件検討および検証測定過程において、サンプル安定性検証のために、異なる温度での測定セットを揃える必要があった。以上のような予期せぬトラブル等により、想定よりも多くのマシンタイムが必要となった。</p>
<p>利用施設 北海道大学</p>	<p>NMR装置 (該当部分に ○)</p>	<p>利用装置① ・(○)溶液 800MHz (Agilent)、()溶液 600MHz、()固体 600MHz 利用期間1:平成28年10月 1日~平成28年11月30日</p> <p>利用装置② ・(○)溶液 800MHz (Bruker)、()溶液 600MHz、()固体 600MHz 利用期間1:平成28年10月 1日~平成28年10月31日 利用期間2:平成28年12月 1日~平成29年 1月31日</p>
<p>その他の 利用施設</p>		<p>熊本大学薬学部付属創薬研究センター機器分析施設</p>
<p>成果の 概要</p>	<p>実施内容 (字数制限はありませんが400字~800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>常磁性効果のうち、擬コンタクトシフトが観測されてしまうと NMR シグナルが移動してしまうために解析が煩雑になる。常磁性緩和の影響は残しつつ、擬コンタクトシフトを消す工夫が必要である。そこで、キレートタグである Maleimide-monoamide-DOTA (以下、MN-DOTA) を使用してランタノイドを固定化した。このタグは、Cys 残基と選択的に結合するマレイミド基を有する。また、マレイミド基とキレート本体である DOTA との間に複数の化学結合が存在し、自由度が高い。磁化率テンソルの異方性を平均化することが可能であり、常磁性緩和は観測されるが、擬コンタクトシフトは観測されなくなると考えられた。また、Cys を1残基しか導入しないため、タンパク質の安定性および溶解性への影響が比較的小さいと考えられる。FGFR1 および FGFR4 のキナーゼドメイン同士によるヘテロ2量体をモデルとして研究を行った。</p> <p>FGFR4 分子表面に Cys 残基を導入した変異体を作成し、反応条件の最適化を行うことで MN-DOTA を導入した FGFR4 (ランタノイド標識 FGFR4) が得られた。¹⁵N 標識 FGFR1 に対して三種類のランタノイド標識 FGFR4 (La³⁺、Tb³⁺、Gd³⁺) を 0.1 等量添加した状態で北大の 800MHz の NMR 装置を用いて ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。その結果、ランタノイドイオンの常磁性の強さに応じて FGFR1 のシグナルの一部が移動することなく減衰することが確認した。また、減衰したシグナルが立体構造上局限することを確認した。クロスリンク実験により得られた距離情報 (8 個) と常磁性から得られた距離情報 (7 個) を用いて Rigid Body Docking による構造計算を行い、複合体立体構造を得た。その結果、helix-G が FGFR1 と FGFR4 の間の相互作用面の一部を形成していた。そこで、helix-G に変異を導入した FGFR1 を用いたリン酸化実験を行い、変異によりリン酸化が抑えられることを確認し、構造の妥当性を検証した。</p>

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>当初の目標では、チロシンキナーゼおよび一本鎖抗体 (scFv) をモデルタンパク質として実施する予定であった。しかし、人為的に Cys を導入した scFv は調製が容易ではなかった。そこで、当初は計画していなかったクリック反応を用いた部位特異的修飾法の利用について検討を行った。クリック反応はアジドとアルキンの間の選択的な反応である。アンバーコードンを利用して非天然アミノ酸であるアジドフェニルアラニン (AzF) を大腸菌発現系において導入する手法が報告されている。この方法を用いて、AzF を導入した scFv の調製に成功している。市販の DBCO を含むローダミン誘導体を用いたクリック反応にも成功している。末端アルキンを有する DOTA 誘導体や、銅フリークリック反応に使用可能な DBCO を付加した DOTA が市販されており、今後、利用できると考えている。</p> <p>ランタノイドによる常磁性緩和を利用したタンパク質複合体立体構造解析は(1) ランタノイド結合タグを如何にしてタンパク質に固定化するか、また、(2) タグ分子を如何にして入手するかが実用面での課題として残されていた。(1)に対しては、人為的に導入した Cys を標的としたタグの固定化法、部位特異的に導入した AzF を標的としたクリック反応による固定化法の2種類について提案することができた。さらには、(2)に対しては市販のキレートタグのみでの実施が可能であることを示した。</p> <p>当初の目標では3～5万程度の結合が弱いタンパク質複合体を対象とした複合体構造解析法の構築を目指していたが、本課題で実施した FGFR1 および FGFR4 のキナーゼドメイン同士によるヘテロ2量体は分子量が6万程度であり、申請時に想定していた分子量よりも大きな複合体への適用に成功している。当初目標の対応する成果が得られたと考えている。</p>
<p>成果発表</p>	<p>FGFR4 活性化に関わる FGFR4-FGFR1 キナーゼドメイン間相互作用の NMR による解析 逆瀬川 知佳, 雨宮 舜, 与座 魁斗, 姫野 梨花, 林田 大輝, 赤星 璃, 佐藤 卓史, 森岡 弘志, 小橋川 敬博 第55回 NMR 討論会 (広島県広島市 広島国際会議場) 2016年11月16日～18日</p> <p>受容体チロシンキナーゼ FGFR のキナーゼドメイン間相互作用の解析とそれに基づく活性化ペプチドの創製 逆瀬川 知香, 松下 舞, 雨宮 舜, 佐藤 卓史, 森岡 弘志, 小橋川 敬博 新学術領域研究「数理シグナル」第2回 若手ワークショップ (滋賀県大津市 アヤハレークサイドホテル) 2018年8月31日～9月2日</p> <p>FGFR4 シグナル活性化に関わる FGFR4-FGFR1 キナーゼドメイン間相互作用の解析 逆瀬川 知香, 雨宮 舜, 林田 大輝, 矢口 悠, 志岐 優花, 佐藤 卓史, 森岡 弘志, 小橋川 敬博 生命分子科学研究会 (熊本県高森町 休暇村南阿蘇) 2018年3月7日～9日</p>

<p>今後の展開 (字数制限はありませんが 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>受容体型チロシンキナーゼの活性化において、キナーゼドメイン同士が過渡的に 2 量体構造を形成することが必須であることが明らかにされつつある。キナーゼドメイン間相互作用は弱く(Kd 数 μM～数百 μM 程度)、結晶構造解析は困難である。そのため、解析はほとんど進んでいない。本研究課題で開発した手法を適用し、肝細胞増殖因子 (HGF) の受容体である c-Met についてもキナーゼドメイン間 2 量体構造の解析を進めている。これらの知見に基づき、キナーゼドメイン間 2 量体構造の分子間相互作用面を標的とした阻害ペプチドの探索を進めている。これまで開発されてきたキナーゼ阻害剤の大半は ATP 結合ポケットを標的としており、薬剤耐性変異体の出現が問題となっている。キナーゼドメイン間相互作用面が新たな標的部位となることが明らかにできれば、薬剤耐性変異体にも効果を発揮する阻害剤の創製に寄与すると期待される。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見直し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>次世代創薬分子として分子間相互作用 (PPI:Protein-Protein Interaction) 阻害薬が挙げられる。現在、細胞外の PPI 阻害は抗体医薬品が利用でき、nM オーダーの強い結合ペアに対しても効果を発揮し得る。細胞外の PPI 阻害の創薬標的は枯渇しつつあるとも言われており、次世代 PPI 阻害薬開発では、細胞内分子が中心となる。抗体医薬では細胞内標的を狙うことは難しく、低分子もしくは中分子が開発対象となる。低分子や中分子は、抗体に比べて相互作用面が小さく、結合が強い分子間相互作用を阻害することは容易ではない。すなわち、相互作用が弱いタンパク質間相互作用が標的となる可能性がある。しかし、結合が弱いタンパク質複合体の解析は困難であったため、現在までのところ十分な構造情報が得られているとは言い難い。本研究課題の成果により、結合が弱いタンパク質複合体の立体構造解析が進めば、次世代創薬のニーズにマッチすると考えられる。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>北大の施設を利用した。施設に常駐している技術員の方のレベルが高く、測定に関して色々と有意義な意見をいただくことができ、感謝している。技術職員が非常勤であり、移動する可能性があることを考えると楽観することはできない。また、地震による長時間停電の影響により、高磁場装置の先行きが見通せない状況になってしまっていると聞いている。この点も楽観できないと感じている。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>弱い分子間相互作用を検出したり、結合が弱い複合体の構造情報を取得できる点は他の手法にはない NMR の大きな特徴である。上述したが、今後の創薬標的として弱い相互作用が対象となる可能性があり、NMR を使いこなせる人材の産業界への供給は重要事項だと考えている。運営交付金の減額により、多くの大学では NMR の維持管理が困難になってきている。そのため、高磁場 NMR を研究ツールとして使いこなせる人材の育成に支障を来している。高額な機器使用料と旅費がかかる現状では、学生の NMR 教育の一環として共用プラットフォームを利用することは難しい。産業界での NMR 利用促進には、後進の育成は重要事項である。学生を対象とした旅費および機器使用料を支援する教育的プログラムがあってもいいのではないかと思う。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>(○) あり : () なし 「あり」の場合理由：報告書の内容の一部に特許出願および論文発表を考えている内容が含まれるため</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>