

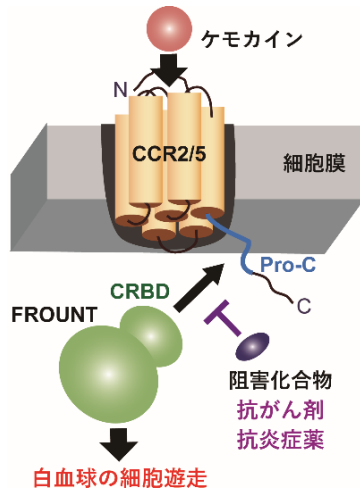
実施課題名: 炎症および認知症関連タンパク質の立体構造と相互作用の解析

【背景】 腫瘍随伴マクロファージの増悪因子であるタンパク質 FROUNT のケモカイン受容体との相互作用は、マクロファージの遊走・浸潤に必須である(Fig. 1)。我々は、FROUNT のケモカイン受容体結合ドメイン(CRBD)を同定した。CRBD は、単体あるいは複合体において会合体を形成し、高分子量化するため、立体構造解析には、高磁場 NMR を適用する必要がある。CRBD 単体は、自己会合面に位置するアミノ酸に変異を施すことにより、ケモカイン受容体結合能を保持したまま単量体化に成功し、溶液 NMR を用いて立体構造を決定した。CRBD-ケモカイン受容体の相互作用を阻害し、腫瘍随伴マクロファージの機能を抑制する抗がん剤の開発に向けて、CRBD-阻害化合物、および、CRBD-ケモカイン受容体の立体構造解析に着手した。

【実施内容】 FROUNT に含まれるケモカイン受容体結合ドメイン(CRBD)のケモカイン受容体との結合を阻害し、腫瘍随伴マクロファージの機能を抑制する抗がん剤の開発に向けて獲得した低分子阻害化合物との複合体を調製した。CRBD 単体と比較して、複合体の溶解度が低下したため、100 μ M 濃度の試料を調製し、立体構造解析に向けて、CRBD-阻害化合物の分子間の距離情報(NOE)の収集条件について、大阪大学の溶液 950 MHz NMR 装置を用いて検討した。化学シフト変化の解析により、阻害化合物の結合部位の情報を得ることができた(Fig. 2)。同位体フィルター実験において分子間 NOE を観測したが、立体構造解析に供するには不十分と判断した。本結果は、より強く結合する改変型阻害化合物の設計に結び付いた。

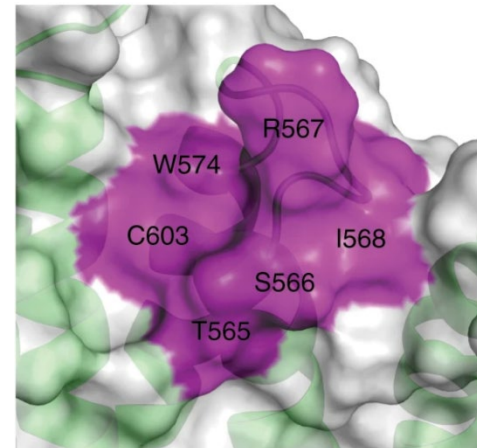
また、FROUNT のケモカイン受容体結合能が亢進した家族性慢性腎盂炎の患者にみられる変異を含む安定同位体標識 CRBD を調製し、立体構造解析に供する NMR スペクトルの取得について、北海道大学の溶液 800 MHz NMR 装置を用いて検討した。現在、ケモカイン受容体結合能が亢進する立体構造基盤の解明に向けて、立体構造解析を進めている。

Fig. 1



腫瘍随伴マクロファージの細胞遊走シグナリングを担う CRBD-ケモカイン受容体間相互作用を標的とした創薬開発

Fig. 2



CRBD における低分子阻害化合物の結合部位の分子表面モデル

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF23-01-068		
利用課題名	炎症および認知症関連タンパク質の立体構造と相互作用の解析		
所属機関	国立大学法人熊本大学		
所属部署	大学院生命科学研究部		
役職・氏名	役職	教授	氏名 寺沢宏明
利用実施時期、及び期間	2023年12月1日～2025年12月31日 総利用日数：9日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) 試料調製に難航し、当初の利用計画より利用日数が少なかった。		

1. 本課題の概要・目的

我々は、創薬ターゲットとなる炎症および認知症関連タンパク質の立体構造、および結合分子の認識メカニズムを明らかにし、立体構造に基づいて制御化合物をデザイン・改変することにより、創薬開発を進めている。しかし、大腸菌の大量発現系および精製系を確立済みであるが、単体、あるいは結合分子との複合体のいずれかにおいて大きな会合体を形成し、解析に行き詰まっているものを複数所持している。これらの中には、溶液NMRを用いて単体の立体構造決定には成功したが、結合分子を添加すると会合体を形成するもの、あるいは、単体で会合体を形成し、結合分子を添加すると分子量相応の大きさになるが、全体として通常の溶液NMR解析には難しい大きさのものがある。

本課題において、超高磁場技術などを用いて、これらのタンパク質について良質なNMRスペクトルを取得し、立体構造解析および相互作用解析に供することを目的とする。

2. 成果の概要

実施内容

炎症関連タンパク質 FROUNT に含まれるケモカイン受容体結合ドメイン (CRBD) のケモカイン受容体との結合を阻害し、腫瘍随伴マクロファージの機能を抑制する抗がん剤の開発に向けて獲得した低分子阻害化合物との複合体を調製した。CRBD 単体と比較して複合体の溶解度が低下したため、100 μ M 濃度の試料を用いて、立体構造解析に向けて、CRBD-阻害化合物の分子間の距離情報 (NOE) の収集条件を大阪大学の溶液 950 MHz NMR 装置を用いて検討した。化学シフト変化の解析により、阻害化合物の結合部位の情報を得ることができた。同位体フィルター実験において分子間 NOE が観測したが、立体構造解析に供するには不十分と判断した。本結果は、より強く結合する改変型阻害化合物の設計に結び付いた。

また、FROUNT のケモカイン受容体結合能が亢進した家族性慢性腎盂炎の患者にみられる変異を含む安定同位体標識 CRBD を調製し、立体構造解析に供する NMR スペクトルの取得について、北海道大学の溶液 800MHz NMR 装置を用いて検討した。現在、ケモカイン受容体結合能が亢進する立体構造基盤の解明に向け

て、立体構造解析を進めている。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

当初目標においては、高磁場 NMR を用いて、CRBD-阻害化合物の立体構造情報を取得し、立体構造を基盤とした特異性の高い創薬設計を目指したが、複合体における溶解度低下、および、阻害化合物の結合が動的である可能性のため、立体構造決定に至らなかった。しかし、この情報をもとに、より強く結合する改変型低分子化合物を獲得できたため、今後の創薬展開の礎となった。

別の炎症関連タンパク質の CRBD について立体構造解析の予定であったが、現状のコンストラクトでは溶解度が非常に低く、NMR 解析に供する試料の調製に至らなかった。

成果発表

(総説)

吉永壮佐, 寺島裕也, 寺沢宏明

NMR を用いたタンパク質の会合状態の観測と制御に基づく立体構造解析戦略と創薬開発

～ 細胞遊走シグナル制御因子 FROUNT を例として ～

NMR-based protein structural analyses and drug developments by observation and control of protein association states of the cell migration-signal regulator FROUNT

JSMI Rep. **18**, 8-15 (2025)

(学会発表)

神経科学分野における MRI・NMR を用いた創薬研究

吉永壮佐、寺沢宏明

MRI 技術を活用した神経科学研究会 Neuroscience meeting with magnetic resonance imaging (NEWTON)(御殿場高原時之栖、静岡)招待講演、2025.12.15

細胞内における DSF の FROUNT 作用メカニズムの解析

吉永壮佐、寺沢宏明

第6回 GPCR 病因シグナル研究シンポジウム(オンライン開催)招待講演、2025.8.11

熊本大学における MRI・NMR を用いた創薬研究

吉永壮佐、寺沢宏明

第3回研究用 MRI 共有プラットフォーム事業・若手研究交流会(大阪大学医学部保健学科、吹田)口頭発表、2025.8.5

白血球遊走タンパク質 FROUNT の構造機能制御の NMR・MRI 解析

吉永壮佐

日本生物物理学会サブグループ「次世代 NMR ワーキンググループ」金曜 spin-off 会(オンライン開催)招待講演、2024.9.27

NMR を用いた DSF ハイブリッド化合物の FROUNT 反応性の解析

吉永壮佐、寺沢宏明

第12回細胞病理セミナー・第1回ジスルフィラム関連プチ研究会(オンライン開催)招待講演、2024.8.29

NMR を用いた DSF ハイブリッド化合物の FROUNT 反応性の解析

吉永壮佐、寺沢宏明

第4回 GPCR 病因シグナル研究シンポジウム(オンライン開催)招待講演、2024.8.12

今後の展開

我々の解析対象のタンパク質試料は溶解度の低いものが多いため、高磁場NMRに加えて、限られたマシンタイムにおいて効率的にNMRスペクトルを収集できるNUS法を適用することで、立体構造情報の収集を試みる。また、低分子化合物にフッ素原子を導入し、¹⁹F核を利用した立体構造情報の収集を試みる。さらには、常磁性タグを用いて結合時の相対配向を決定する戦略をとる。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

現在、生涯のうち、2人に1人ががんに罹患する時代となってきた。抗がん療法として、外科療法、放射線療法、化学療法に加えて、免疫療法や光免疫療法が開発されてきているが、未だに、多種多様ながんの患者を治癒することは難しい。本研究は、立体構造情報に基づいて、腫瘍随伴マクロファージの増悪因子であるFROUNTを特異的に阻害する新たな免疫制御療法の開発を目指す。目標が達せられれば、多くのがん患者を救うことができるため、社会・経済への波及効果は非常に高い。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

(大阪大学・北海道大学の利用)

当方の要望に、丁寧で迅速にご対応いただき、誠にありがとうございました。遠隔のため、試料送付やTeamViewerを用いたオンライン利用にもご対応いただきました。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

引き続き、共用事業をご継続いただき、高磁場における測定環境および測定技術のご提供をいただけますと幸いです。当方のような遠隔地の利用者のために、試料送付の送料や、施設利用のための旅費・宿泊費についてもご支援いただけますと非常に有難く存じます。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

特にございません。

8. 利用施設

北海道大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2025 年 6 月 13 日~2025 年 6 月 14 日

大阪大学

溶液 950MHz

利用期間 1: 2025 年 4 月 1 日~2025 年 4 月 8 日

9. その他の利用施設

なし