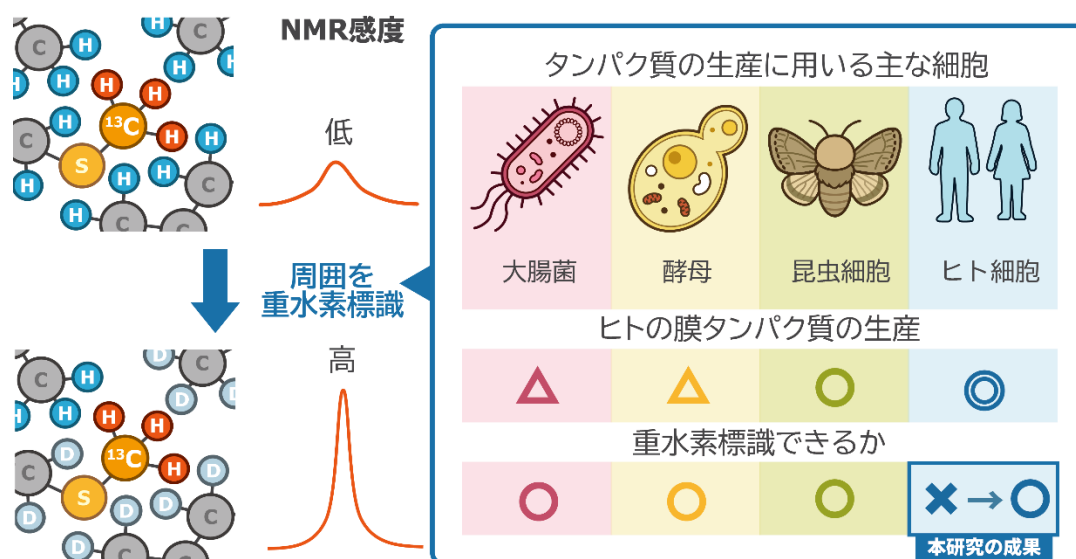


東京大学
理化学研究所
バイオ産業情報化コンソーシアム
千葉大学
大阪大学

ヒト膜タンパク質のダイナミックな動きを 高感度でとらえる技術を開発 ——創薬標的分子が機能するメカニズムの解明に期待——

発表のポイント

- ◆創薬上重要な標的であるヒトの膜タンパク質分子のダイナミックな動きを高感度に観測する技術の開発に成功しました。
- ◆ヒトの膜タンパク質の生産に適したヒト細胞における高効率な重水素標識法を開発することにより、核磁気共鳴法を用いた観測における従来法の約4倍の高感度化を達成しました。
- ◆創薬標的の50%を占めるヒト膜タンパク質が機能するメカニズムの解明や、生きたヒト細胞内でタンパク質が機能するメカニズムの解明への応用が期待されます。



NMR測定に向けたヒト細胞を用いた重水素標識法の開発

概要

東京大学大学院薬学系研究科の竹内恒教授、幸福裕講師、外山侑樹助教、山本泰雅大学院生と、理化学研究所生命医科学研究センターの嶋田一夫チームディレクター（研究当時、兼：バイオ産業情報化コンソーシアム（JBIC）特別顧問（研究当時））、千葉大学大学院薬学研究院の西田紀貴教授、大阪大学大学院薬学研究科の上田卓見教授らによる研究チームは、溶液中での生体分子の動きを原子分解能で解析できる核磁気共鳴（NMR）法（注1）を用いて、ヒトの膜タンパク質（注2）のダイナミックな動きを高感度に観測する技術を新たに開発しました。

本研究では創薬標的の 50%を占めるとされるヒト膜タンパク質を高効率に生産できるヒト細胞を用いて、従来は困難であるとされた高度な重水素（注 3）標識を可能とする技術を開発し、NMR 法を用いたヒトの膜タンパク質の解析で従来の約 4 倍の高感度化を達成しました。本技術は、重要な創薬標的である膜タンパク質の機能解明に役立つ他、生きた細胞内のタンパク質を原子分解能で解析するインセル NMR 法（注 4）にも応用できることから、創薬研究を含めた様々な応用研究が期待できます。

発表内容

G タンパク質共役型受容体（注 5）や免疫受容体（注 6）など、ヒトの膜タンパク質は、創薬標的のおよそ半数を占めることから、その立体構造解析が注目されています。近年の結晶構造解析や電子顕微鏡構造解析技術の進展により、多くの膜タンパク質の構造が解明されてきました。一方で、例えば、医薬品の薬効度（注 7）は、単純に立体構造だけで決まるわけではなく、構造の揺らぎなど、動的な性質によっても左右されることが明らかとなっており、溶液中でのダイナミックな動きを解析できる NMR 法の必要性が指摘されていました。しかしながら、ヒトの膜タンパク質では、ミリグラムスケールの試料を生産することが難しい場合が多く、NMR 法の適用には測定感度の問題が障害となっていました。このような場合に重水素標識を行うことで、感度向上が期待できることは報告されていましたが、その適用範囲は、大腸菌、酵母、昆虫細胞で生産可能なタンパク質にとどまっていた。しかし、ヒトの膜タンパク質の中には、ヒトを含む哺乳類の細胞を用いてのみ生産可能なものも多く、これらの膜タンパク質への NMR 法の適用は困難でした。

この度、本研究チームはヒト由来細胞の一種である Expi293F™ 細胞（注 8）を用いて、平均標識率約 70%となる高度な重水素標識を可能とする技術を、世界で初めて開発することに成功しました（図 1）。この技術の開発にあたっては、細胞培養の条件の最適化や培地（注 9）に含まれるアミノ酸組成などの最適化が不可欠でした。

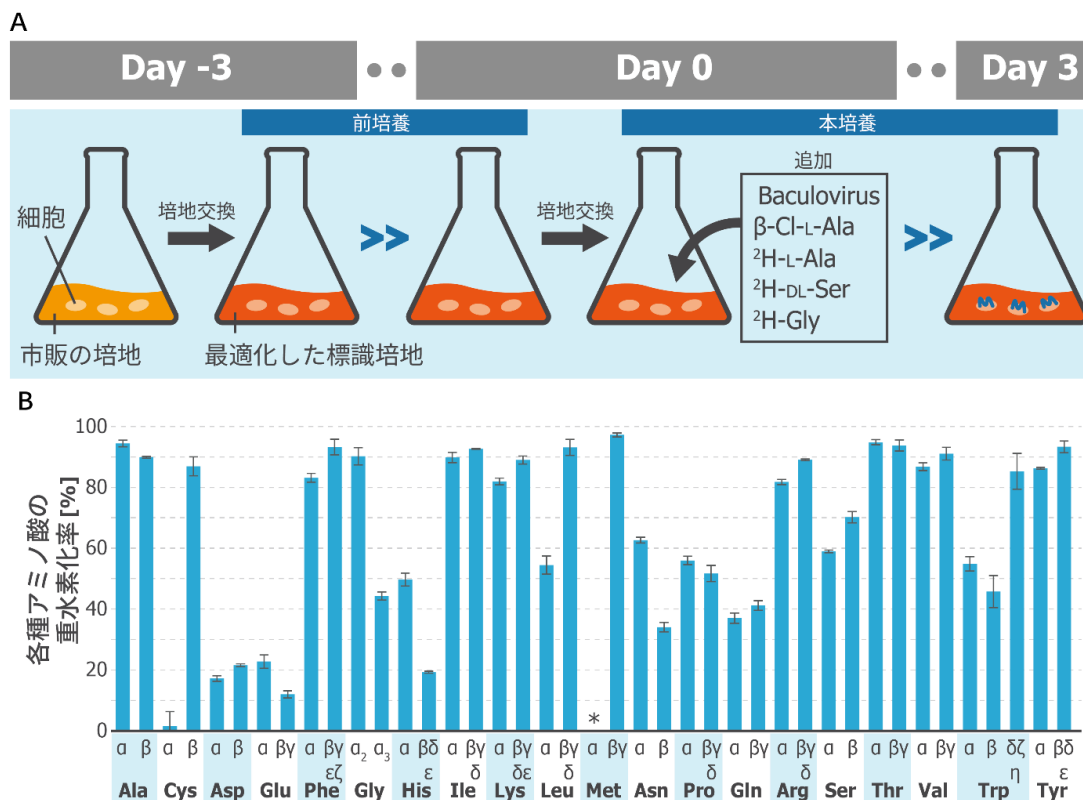


図 1：開発した重水素標識技術と達成した重水素標識率

- (A) 開発した重水素標識法を示した図。ヒト由来細胞 Expi293F™ 細胞を開発した組成の培地で 3 日間培養後、新しい培地に交換し、タンパク質発現のために追加で試薬を加えてタンパク質を合成します。
- (B) 開発した手法で発現したタンパク質の各種アミノ酸残基に含まれる水素が、どの程度重水素標識されているかを示した図。アスタリスクの付いたメチオニン残基 (Met) の α 位の水素については、NMR シグナルが不明瞭であったため、算出対象外としました。

この技術を用いて、代表的な創薬標的膜タンパク質である G タンパク質共役型受容体の一種、ヒト β_2 アドレナリン受容体（注 10）の NMR 解析を行った結果、重水素標識を行わない場合と比較して、約 4 倍に測定感度が向上しました（図 2）。この結果、従来は見過ごされていた存在割合の低い状態の観測にも成功しました。このことは、ヒト β_2 アドレナリン受容体が様々な立体構造の間を揺れ動いていることを示すものであり、このような知見は医薬品の薬効などの正確な測定、また望ましい薬効を示す医薬品の合理的な設計の指針を立てる上で役に立つ可能性があります。

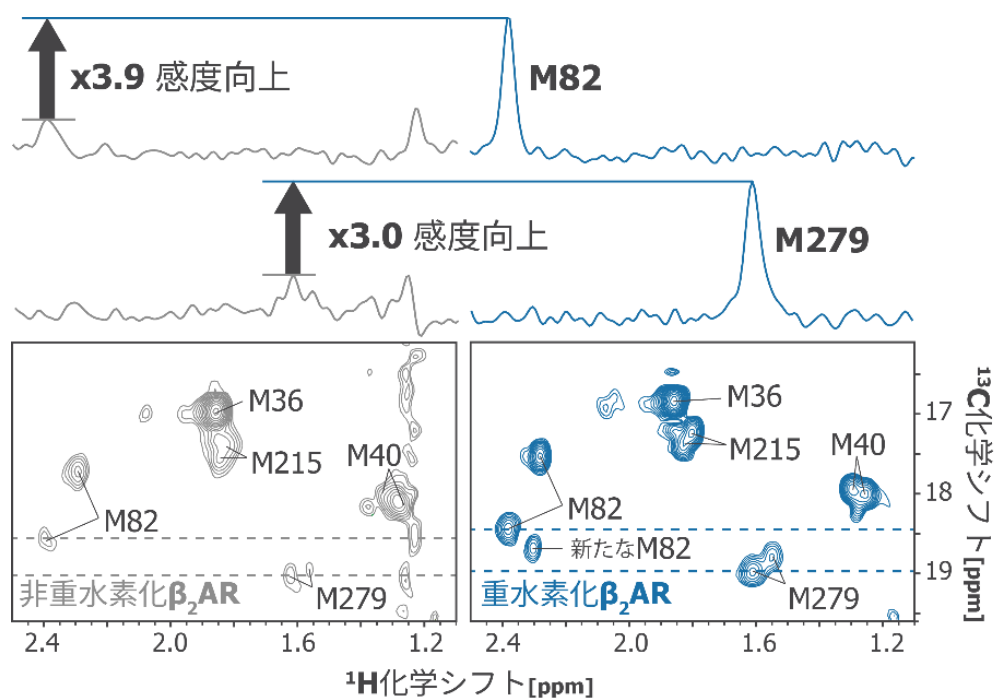


図2：重水素標識していないヒト β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) と重水素標識した β_2 AR の NMR スペクトル
 β_2 AR に含まれるメチオニン残基由来のシグナル強度を比較した図。下部の2次元 NMR スペクトルは等高線で表しており、上部の1次元 NMR スペクトルは点線部分での切り出しを表しています。切り出しから、感度が向上していることが分かります。また、M82 は82番目のメチオニン残基由来のシグナルであることを示しており、重水素化した β_2 AR では M82 について新たに1つのシグナルが観測されていることが分かります。

さらに、本技術を利用することで、Expi293F™ 細胞でのみ生産実績のある免疫受容体の一種 CD19 (注 11) と CD81 (注 12) の複合体について、初めてその NMR スペクトルを観測することに成功しました (図 3)。例えば、CD19 を標的とする抗体が IgG4 関連疾患 (注 13) の治療薬として使用されているなど、免疫受容体の機能を制御することは、免疫疾患に対する創薬上の課題です。本研究は、このような免疫受容体の解析、免疫受容体を標的とした創薬研究への応用も期待できます。

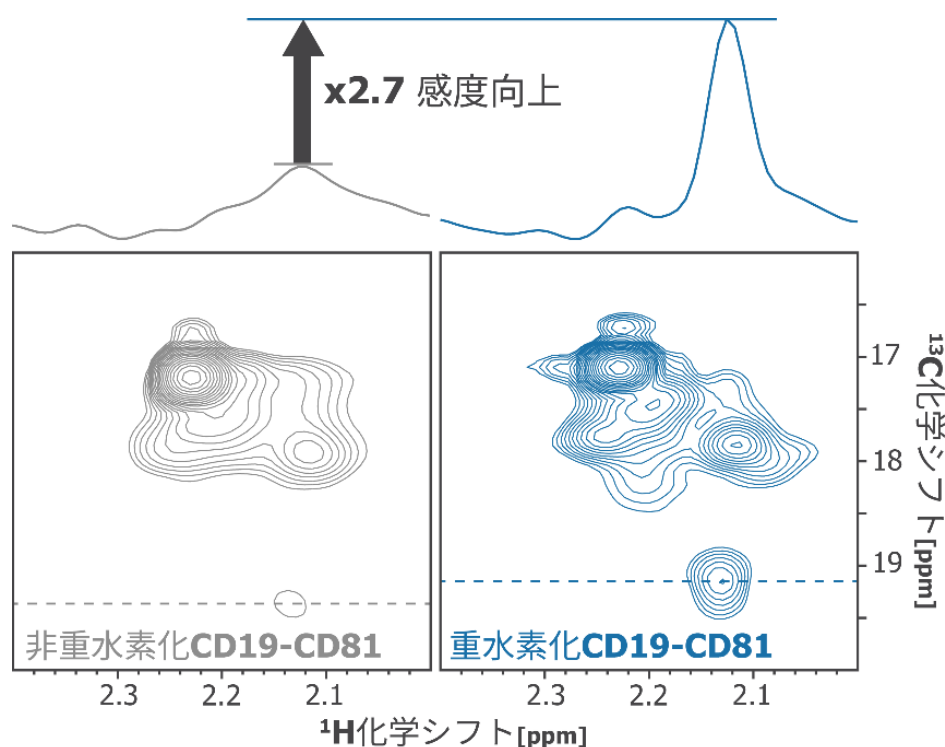


図 3：重水素標識していない CD19-CD81 複合体と重水素標識した CD19-CD81 複合体の NMR スペクトル
CD19-CD81 複合体に含まれるメチオニン残基由来のシグナル強度を比較した図。下部の 2 次元 NMR スペクトルは等高線で表しており、上部の 1 次元 NMR スペクトルは点線部分での切り出しを表しています。切り出しから、 β_2 AR 同様、感度が向上していることが分かります。

細胞内では様々な種類のタンパク質が機能しています。生きた細胞の中のタンパク質の構造や動きを観測するインセル NMR 技術の発展により、試験管内のタンパク質と、細胞内に存在するタンパク質では、その構造や活性が異なることが分かってきています。本研究で開発した技術は、インセル NMR 技術のさらなる高度化にも役立ちます。従来は、大腸菌など異種細胞で生産した標識タンパク質をヒトの細胞に導入することで、インセル NMR 解析を行うことが主流でした。一部には、ヒトの細胞で標識タンパク質を細胞内に発現させ、そのまま観測するインセル NMR 解析も報告されていました。しかし、高度な重水素標識技術なしでは、測定感度が低く、その適用範囲は広がっていませんでした。本研究では、細胞内の酸化ストレス応答に関わるタンパク質であるチオレドキシン（注 14）を、ヒト細胞内で発現し、重水素標識を行うことで、高感度なインセル NMR 観測が可能になることを示しました（図 4）。本技術により、細胞内でのタンパク質の機能解析についても、さらなる進展が期待されます。

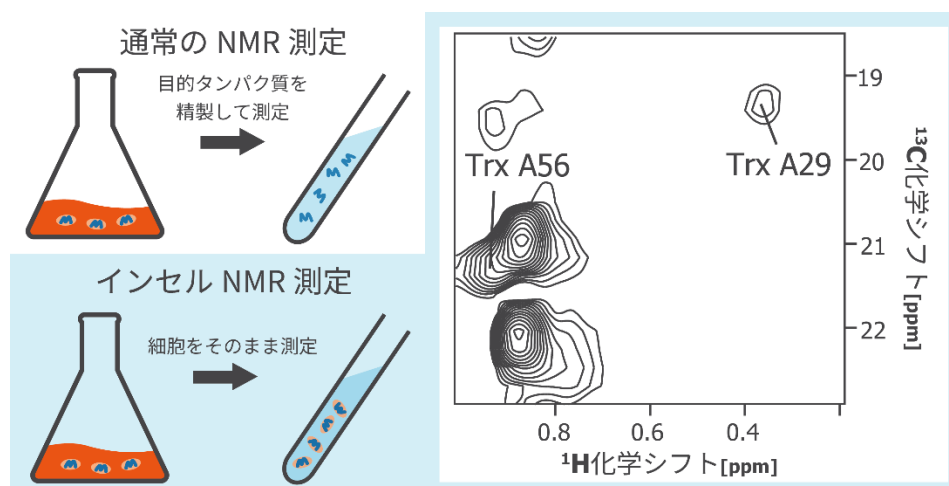


図 4：インセル NMR の概要図と得られたチオレドキシン(Trx)の NMR スペクトル

(左)本研究で実施したインセル NMR の概要図。(右)Trx のインセル NMR で得られたスペクトル。A29 および A56 は 29 番目および 56 番目のアラニン残基由来のシグナルであることを示しています。その他のシグナルは培地中や細胞内の化合物由来のシグナルです。

発表者・研究者等情報

東京大学大学院薬学系研究科

竹内 恒 教授

幸福 裕 講師

外山 侑樹 助教

山本 泰雅 大学院生 (博士課程)

魚返 祐太郎 研究当時：学部生

千葉大学大学院薬学研究院

西田 紀貴 教授

趙 慶慈 助教

大阪大学大学院薬学研究科

上田 卓見 教授

理化学研究所生命医科学研究センター生体分子動的構造研究チーム

嶋田 一夫 研究当時：チームディレクター

兼：広島大学副学長 (研究当時)

兼：バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC) 特別顧問 (研究当時)

現：理化学研究所生命医科学研究センター NMR 共用促進チーム客員主管研究員

論文情報

雑誌名：Journal of the American Chemical Society

題 名：High-level deuteration in mammalian cells for NMR studies of membrane proteins

著者名：Taiga Yamamoto, Yutaka Kofuku, Yutaro Ogaeri, Qingci Zhao, Noritaka Nishida, Takumi Ueda, Yuki Toyama, Ichio Shimada, Koh Takeuchi

DOI: 10.1021/jacs.6c11086

URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.6c11086>

研究助成

本研究は、科研費「多様なリガンドによる G タンパク質共役型受容体の活性制御機構の解明（課題番号：JP25K02398）」、「G タンパク質共役型受容体二量体構造の解明と創薬への応用（課題番号：JP25K22519）」「核磁気共鳴法を用いた G タンパク質共役型受容体によるシグナル制御機構の解明（課題番号：JP23K21289）」「NMR 法を用いたリガンド受容体間の弱い相互作用によるシグナル伝達制御機構の解明（課題番号：JP23H04055）」「動的構造に基づいた創薬標的膜タンパク質の動作機構解明（課題番号：JP20K21473）」「GPCR 細胞内シグナル伝達の立体構造に基づく定量的解析（課題番号：JP19H04946）」「溶液 NMR 法による効率的な特殊ペプチドの動的立体構造解析法の開発（課題番号：JP23K18177）」「GPCR の活性化状態が薬物の親和性を規定するメカニズムの解明（課題番号：JP23H02618）」「薬物と GPCR の弱い相互作用が滞在時間に応じて生体応答を制御する機構の解明（課題番号：JP21H05509）」「核磁気共鳴法による G 蛋白質共役型受容体の活性制御機構の解明（課題番号：JP20H03375）」「動的構造平衡情報に基づく数理解析による GPCR のシグナル制御機構の解明（課題番号：JP19H04951）」「長鎖構造非形成タンパク質の構造・機能解析を可能にする基盤技術の確立（課題番号：JP25K22521）」「NMR 法を用いた細胞内創薬技術の開発（課題番号：JP22K18374）」「高活性化化合物を創生し創薬標的の枯渇を解消する動的構造創薬技術の確立（課題番号：JP20H03378）」「中分子の膜透過を評価し膜透過活性を付与する創薬基盤技術の構築（課題番号：JP20K21494）」「核磁気共鳴法による膜タンパク質の *in situ* 機能解明（課題番号：JP17H06097）」、触媒科学計測共同研究拠点、日本医療研究開発機構 (AMED) 「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (RNA 標的創薬技術開発・革新的中分子創薬技術の開発)」、科学技術振興機構 (JST) 「革新的計測技術による相転移ダイナミクスの解明」、理化学研究所構造細胞生物学プロジェクト、内藤記念科学振興財団、武田科学振興財団の支援により実施されました。

用語解説

(注 1) 核磁気共鳴 (NMR) 法

溶液中の化合物や生体分子などを対象に、強い磁場中に置くことで生じる原子核の共鳴現象を観測することで、その化学構造や運動性といった情報を原子レベルで解析できる分光法。磁場の中に置いた試料に電磁波を照射し、そこから放出される電磁波を NMR シグナルとして検出する。NMR は Nuclear Magnetic Resonance の略。

(注 2) 膜タンパク質

細胞の脂質二重膜に埋め込まれたタンパク質の総称。細胞内と細胞外の間でシグナル伝達を担うことなどから、創薬標的として注目されている。現在市販されている医薬品の約半数が膜タンパク質を標的とするという報告もある。

(注 3) 重水素

水素原子の安定同位体。通常の水素（軽水素）の原子核が陽子 1 個からなるのに対し、重水素の原子核は陽子と中性子から成る。軽水素と重水素で化学的性質にほとんど違いがないのに対し、強い磁場に置いたときの磁氣的性質は大きく異なる。

(注 4) インセル NMR 法

通常の生体高分子の NMR 解析では、精製した分子の水溶液を試験管に入れて測定するのに対し、細胞の懸濁液を試験管に入れて、細胞内の生体分子を直接 NMR 解析する方法。観測したい生体高分子のみを安定同位体標識することで、選択的な観測が可能となる。

(注 5) G タンパク質共役型受容体

細胞膜表面に発現し、細胞外からの刺激を受容して、細胞内の G タンパク質を活性化することで細胞応答を引き起こす膜タンパク質の総称。細胞膜を α ヘリックスが 7 回貫通する構造を特徴とする。

(注 6) 免疫受容体

T 細胞受容体、B 細胞受容体など、細胞外の異物を認識したり、細胞外からのシグナルに反応して、免疫細胞を活性化する膜タンパク質の総称。

(注 7) 薬効度

医薬品が十分な濃度存在し、標的に完全に結合した理想的な条件において示す最大の活性。例えば、G タンパク質共役型受容体では、同一標的に結合する医薬品でも薬効度が様々に異なり、強い活性を示す作動薬や、結合しても薬効をほとんど示さない阻害剤、逆に医薬品が存在することで活性が下がる逆作動薬などに分類されることが知られている。

(注 8) Expi293F™ 細胞

ThermoFisher Scientific 社より販売されているヒト由来細胞。抗体や膜タンパク質の生産能力が高いことが知られている。

(注 9) 培地

細胞を培養する時に用いる溶液。アミノ酸や糖、ビタミンなど、細胞の生育に必要な成分が含まれており、pH や浸透圧も細胞の生育に最適な条件に整えられている。

(注 10) β_2 アドレナリン受容体

気管支などの平滑筋に発現しており、アドレナリンに応じて平滑筋を弛緩させ、気管支を拡張させるはたらきがある、G タンパク質共役型受容体の一種。

(注 11) CD19

B 細胞の活性化に必須な B 細胞受容体の共受容体。B 細胞受容体と複合体を形成することで、そのシグナル伝達を増幅させるはたらきを有する膜タンパク質。

(注 12) CD81

細胞膜を α ヘリックスが 4 回貫通するテトラスパニンと呼ばれる膜タンパク質の一種。CD19 と複合体を形成し、CD19 を細胞膜表面に輸送することが知られており、B 細胞の活性化に必須なタンパク質として知られる。

(注 13) IgG4 関連疾患

血液中の IgG4 という種類の抗体が増え、さまざまな臓器に炎症や腫れを生じる原因不明の指定難病。

(注 14) チオレドキシン

大腸菌のような微生物からヒトまで、あらゆる生物で細胞内に存在しているタンパク質。細胞内の酸化還元環境の維持に関わっており、酸化ストレス応答との関連も深い。

問合せ先

<研究内容について>

東京大学大学院薬学系研究科

教授 竹内 恒 (たけうち こう)

Tel : 03-5841-4811 E-mail : koh-takeuchi@mol.f.u-tokyo.ac.jp

<機関窓口>

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム

Tel : 03-5841-4702 E-mail : shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

理化学研究所 広報部 報道担当

Tel : 050-3495-0247 Email : ex-press@ml.riken.jp

バイオ産業情報化コンソーシアム 問い合わせ窓口

URL : <https://www.jbic.or.jp/contact>

千葉大学 広報室

Tel : 043-290-2018 E-mail : koho-press@chiba-u.jp

大阪大学 大学院薬学研究科 庶務係

TEL : 06-6879-8144 FAX : 06-6879-8154 E-mail : yakugaku-syomu@office.osaka-u.ac.jp