

の2つの制約から、N端とC端が細胞質側にあることも考えると、実現可能なAQP1の折り畳みは細胞外から見てFig. 3の8つになる。ここで、この8つのモデルの中でどれがもっとも実際の立体構造と対応するかを検討するために、いろいろな膜タンパク質の膜貫通ヘリックスのすべての残基をvalineで置き換えてAQP1の電位図に最適化して、各膜貫通ヘリックスの向きを予想した。α-ヘリックスでは通常側鎖がN端側へ突き出るので、側鎖に対応する電位まで考慮することにより、向きを決めることができる。そしてFig. 3に示したモデルが電位図にもっともよく合っていることがわかった。

このかなり複雑な折り畳みのもっとも顕著な特徴は、LCの位置であろう。H3からH4をつなぐグループが、分子を横切るように長く横たわることになる。実際、アクアポーリンファミリーで最短のLCの長さは16残基と予想されており¹⁷⁾このモデルとよく一致している。また、このLCの配置のためには、LEが最後にLCとぶつかるように折り畳まれないといけないことは、複雑な折り畳みの経路を示唆するのかもしれない。

おわりに

このように、まだ分解能は原子モデルを作成するには十分ではないが、電子線結晶解析を用いてAQP1の立体構造を得た。そして、その構造から予想される水チャネルの構造と機能の関連について、議論の余地のあることまで含めて、得られた知見についてまとめた。現在、より高い分解能の解析を進めており、その結果、上の議論を確認すると共に水分子の透過の詳細な分子機構がわ

かると考えている。電子線結晶解析は、二次元結晶さえできれば、X線結晶解析と同様に原子モデルを得ることができる手段のひとつとしてほぼ確立されつつあり、膜タンパク質のような三次元結晶作成が困難な試料への応用が期待される。

本AQP1に関する研究は、藤吉好則教授、Prof. Peter AgreとProf. Andreas Angelの3グループの共同研究の結果であり、ここで、このグループにいたすべての共同研究者に厚く感謝の意を表します。また、本稿の図の作成を手伝ってくれた廣明洋子さんと大嶋篤典君に感謝致します。

文 献

- 1) Henderson, R. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **213**, 899 (1990).
- 2) Nogales, E. *et al.*: *Nature*, **391**, 199 (1998).
- 3) Borgnia, M. *et al.*: *Annu. Rev., Biochem.*, **68**, 425 (1999).
- 4) Preston, G. M. *et al.*: *Science*, **256**, 385 (1992).
- 5) Kühlbrandt, W.: *Quart. Rev. Biophys.*, **25**, 1 (1992).
- 6) Baldwin, J. and Henderson, R.: *Ultramicroscopy*, **14**, 319 (1984).
- 7) Miyazawa, A.: *J. Mol. Biol.*, **288**, 765 (1999).
- 8) Walz, T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **269**, 1583 (1994).
- 9) Li, H. *et al.*: *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 263 (1997).
- 10) Walz, T. *et al.*: *Nature*, **387**, 624 (1997).
- 11) Cheng, A. *et al.*: *Nature*, **387**, 627 (1997).
- 12) Mitsuoka, K. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **128**, 34 (1999).
- 13) Kimura, Y. *et al.*: *Nature*, **389**, 206 (1997).
- 14) Grigorieff, N. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **259**, 393 (1996).
- 15) Doyle, D. A. *et al.*: *Science*, **280**, 69 (1998).
- 16) de Groot, B. L. *et al.*: *J. Mol. Biol.* in press (2000).
- 17) Heymann, J. B. and Engel, A.: *J. Mol. Biol.* **295**, 1039 (2000).

NMRによる構造生物学と創薬の橋渡し

廣 明 秀 一

近年、医薬品の開発の戦略として新しい方法論が定着した。(1)コンビナトリアル・ケミストリーとハイスループット・スクリーニング(HTS)の組み合わせ、(2)論理的薬物設計(rational design)のアプローチ、(3)薬理ゲノム学、の3つである。三者には、いずれも最先端の科学・技術の利用という思想が共通している。たとえば、(1)はリード化合物探索の高速化のためにロボティクスを利用することである。また、(2)は構造生物学の進歩により増加し続けるタンパク質の立体構造情報をリード創製・リード最適化に利用するための方法論である。

(3)では創薬の標的となる新規の遺伝子を効率的に探索するために、ゲノム情報を利用する。

NMR(核磁気共鳴法)の特徴は、タンパク質や核酸の立体構造を決定するためにその水溶液を測定することである。この特徴を活かして、タンパク質の構造決定のみにとどまらず、タンパク質と低分子リガンドの相互作用を解析するための手法がいくつも実用化されている。こうした手法は、いずれもリード探索と論理的薬物設計の両方の段階に適用可能であり、まさに「NMRにより構造生物学と創薬が橋渡しされる」と言っても過言では

ない。ここでは、分子間相互作用の解析に特化した NMR の手法を紹介する。

NMR により得られる情報と立体構造決定の現状

NMR によりタンパク質の立体構造が最初に決定されたのは1985年のことである。¹⁾その後わずか十数年のうちに、ハード・ソフト両面で技術革新がなされ、NMR は立体構造決定の手段として広く認知されるようになった。現時点で PDB に登録されている座標のうち、およそ15%が NMR によるものである。

溶液中の NMR により得られる主な情報は、(1)化学シフト、(2)結合定数(二面角)、(3)NOE (^1H 間距離)、(4)緩和時間(運動性)、(5)水素結合、および(6)異方性(分子の磁場配向パラメーター)である。これらの情報は一連のスペクトルデータの解析を進めることにより逐次蓄積される。Fig. 1 に NMR による立体構造決定の流れを示した。最終的な立体構造座標に至る途中の段階でも、試料の性質を定性的に表すさまざまな情報が得られる点が、X 線結晶構造解析とは異なる点である。したがって他の手法、とりわけ分子生物学やタンパク質工学との同時進行が可能で、時間の節約と大きな成果が期待できる。また、測定する試料溶液中に他のタンパク質やリガンドを添加することで相互作用の情報が得られ、しかも解離定数(K_d)が mM オーダーの弱い相互作用も検出可能なことが NMR の特徴である。

タンパク質の複雑な NMR 信号を帰属・解析するためには、多核多次元(2~4次元) NMR の測定が必要のため、試料は目的と分子量に応じて ^{15}N 、 ^{13}C 、 ^2H で安定同位体標識を行う。実用的な目安としては、50アミノ酸以上で ^{15}N 標識、100アミノ酸以上で $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 二重

標識、150アミノ酸以上ではさらに ^2H (重水素)での三重標識が必要となる。NMR で構造解析を行うのに必要な試料の量は、約 1 mM の水溶液が 0.5 ml である。これは分子量 2 万のタンパク質で 10 mg に相当し、決して少ないとは言えない。安定同位体標識は高価なため、コスト低減は重要な課題で、大腸菌や酵母など最少培地で生育可能な宿主-ベクター系を利用した高効率のタンパク質発現系の有無が、実験の成否をわける。

また、NMR では構造決定可能なタンパク質の分子量に上限がある。ことに巨大なタンパク質分子では、感度の低下と信号の重なりが深刻である。前者については Wüthrich らが開発した TROSY 法により、かつて言われていた「分子量 2 万の壁」はとりはらわれつつある。²⁾後者については、インテンシンによるタンパク質の分子間スプライシング反応を用いた区分標識法の応用が期待されている。³⁾それでも現時点で構造決定が実的に可能な分子量の上限は 4 万程度である。

分子間相互作用の観測と NMR スクリーニング

NMR で得られる情報のうち、化学シフトと緩和時間は原子の局所的な磁気的環境を反映しており、相互作用の有無やそれともなうタンパク質の構造変化に敏感である。たとえば、主鎖の信号が帰属されている ^{15}N 標識のタンパク質があれば、任意のリガンドの結合部位の残基を容易に同定できる。すなわち、リガンドを段階的に添加した試料の ^{15}N - ^1H 2次元 NMR を測定し、各残基のシグナルの移動や消失を追跡すればよい。滴定点を増やせば飽和曲線から K_d 値を見積もることもできる。この方法を化学シフト摂動法(chemical shift perturbation)という。タンパク質-リガンド複合体の三次元座標から得られる原子分解能の情報量には較べるべくもないが、そうした構造解析には長い時間が必要である。NMR 滴定実験の利点は、早期の段階で情報が得られ、いくつかの化合物の比較や、温度・塩強度・pH などの条件検討が容易であることである。

SAR by NMR 前述の化学シフト摂動法を拡張しランダムスクリーニングと組み合わせて、より高い結合能をもつリードを設計する方法が提案された。Fesik らによる Structure-Activity-Relationship (SAR)-by-NMR がそれである。⁴⁾これは、標的タンパク質に 2 つのリガンド結合部位がある場合に、主鎖アミド基の NMR シグナルを指標に、まず一方の結合部位のリガンドを最適化し、つぎに第 2 の結合部位についても最適化する。最終的に二者を適当なリンカーでつなぐことで、相乗的に

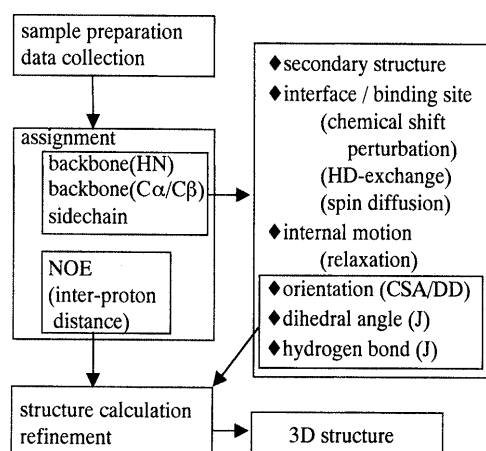


Fig. 1. Schematic diagram for 3D structure determination of proteins by NMR. Left column shows a flow of works. Right column shows available information by NMR.

強く結合するリード化合物を設計するという方法である (Fig. 2).

Affinity NMR 一方, リガンドのみに着目して, 数種類の低分子リガンドの混合物溶液中から, 標的タンパク質に結合する化合物だけ(またはしない化合物だけ)を選択的に観測する方法があり, Affinity NMR と呼ばれている.⁵⁾ この方法では10~100 μM の標的タンパク質と, およそ10倍濃度のリガンド(複数)の混合溶液を測定する. 試料溶液中でタンパク質と解離平衡状態にあるリガンドは, 見かけの分子量が増大するため, 並進の拡散速度定数とスピン-スピン緩和時間(T_2)が共に減少する. そこで, 拡散速度のちがいを利用したパルスプログラムで測定を行うと, 拡散の遅い(すなわち標的タンパク質と相互作用しない)リガンドのシグナルを選択的に観測することができる (Fig. 3a). DOSY (diffusion ordered spectroscopy) 法は, 拡散速度をもう一方の軸とした二次元 NMR であり,⁶⁾ Affinity NMR に用いれば混合物の解析がさらに容易になる. 逆にリガンドの見かけの T_2 緩和時間の減少は, 1D-NMR 測定からでもシグナルの線幅の増大により容易にわかる. そのため T_2 緩和時間の減少を強調するような測定法を用いて, 標的タンパク質と相互作用していない分子のスペクトルのみを抽出できる (Fig. 3c).

NMR スクリーニング SAR-by-NMR と Affinity NMR は, いずれも NMR をスクリーニング装置として用いたものであるが, NMR の感度は決して高くはない

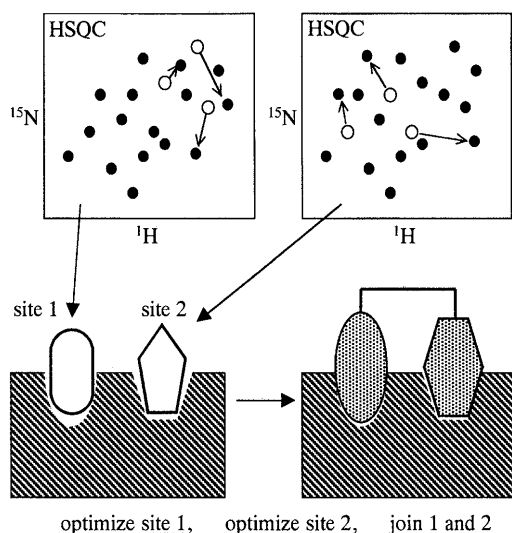


Fig. 2. Principle of structure-activity relationships (SAR) by NMR. On the basis of chemical shift changes, two weak binding sites are defined, and the ligands to those sites are optimized. Finally, a suitable linker is designed to join the two ligands, yielding much higher affinity.

ので, 測定時間の長さは無視できない. 対象となるリガンドがしばしば水に溶解しにくいことも実験の妨げになる. NMR の高磁場化と, HPLC 装置に直結可能なキャピラリープローブや, 従来より10倍以上感度の良いクライオプローブの開発は, これらの問題を一部解決することができる.

trNOE 法-リガンドの結合コンフォメーション決定

NOE (Nuclear Overhauser Effect) とは空間的に近接したスピン同士で磁化のエネルギーが移動する現象であり, およそ5 Å 以内にある ^1H 核間で観測される. 磁化移動の効率 ρ は ^1H 核間距離の6乗に反比例する. したがって NOE を解析することでタンパク質の立体構造の計算に必要な距離の情報を収集できる.

さて, 標的タンパク質 (10~100 μM) に大過剰 (10~100倍) の低分子リガンドが入っている試料の場合を考える. リガンドはフリーの状態では磁化移動の効率が悪く, 符号が「正」の微弱な NOE しか観測されない (Fig. 4a). 一方, リガンドがタンパク質に結合している状態では, 効率の良い磁化移動が起こる (Fig. 4b). その結果, 結合とフリーの平衡状態にある試料では, フリーの状態のリガンドの信号から符号が「負」の強い NOE が観測される (Fig. 4c). しかも, このとき観測されたりガンドの NOE の強度は標的タンパク質に結合した際のコンフォメーションを反映している. この方法を transferred NOE (trNOE) 法といい, 生理活性物質の活性コンフォメーションを決定した例が数多くある.⁷⁾ また, 複数のリガンド分子が結合するタンパク質の場合には, リガンド分子間の NOE も観測できる.⁸⁾ trNOE 法では

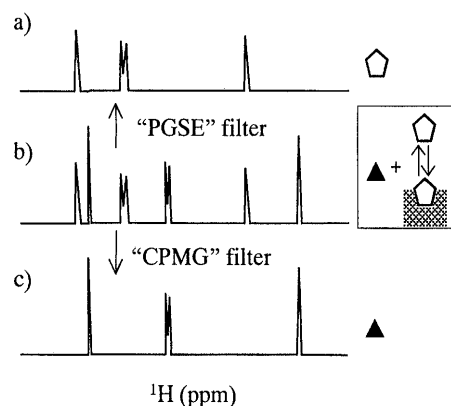


Fig. 3. Principle of affinity NMR. A schematic representation of 1D NMR spectrum of a mixture of ligands with the target protein (b). Using appropriate filter experiments, either the ligand signals interacting (a) or those not interacting (c) to the protein can be extracted.

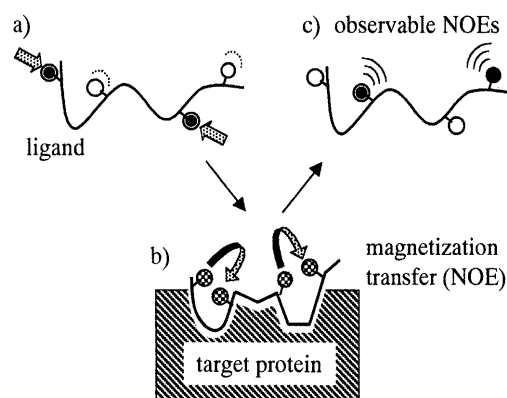


Fig. 4. Principle of transferred NOE (trNOE). A free ligand of small molecular weight only gives a weak, positive NOE signals (a). Under equilibrium condition, efficient magnetization transfer occurs during a period of bound-state (b), which arises observable negative NOEs between the ligand protons (c).

タンパク質のシグナルを解析する必要はないため、標的タンパク質の分子量の上限がなく、また解析期間も短いという利点がある。リード化合物の活性コンフォメーションの決定は、論理的薬物設計や三次元薬物構造活性相関(3D-QSAR)においてきわめて有用である。

NMR による水素結合の直接観測

前述したように、NMR では共有結合を通じて2つのスピン間にスカラーカップリングが観察され、単一線の信号が多重線になる。最近いくつかのグループが、タンパク質や核酸で水素結合を通じたスカラーカップリングの観測に成功し、個々の水素結合を直接同定する方法として注目されている。核酸の塩基対間のNH...Nタイプの水素結合の結合定数は、 $^2J_{NN}$ ではかなり大きく(6~10 Hz)、対応する $^1J_{NH}$ では比較的小さい(1~3 Hz)が、いずれも感度よく観測できる。タンパク質のNH...OC'タイプ水素結合では、 $^3J_{NC'}$ と $^2J_{NC'}$ はさらに小さい(それぞれ0.2~0.9 Hzと0.4~0.6 Hz)ため、核酸に較べると感度はかなり低い。最近、白川らは低分子量Gタンパク質Ras-GTP複合体の、GTPのリン酸

基とそれを認識しているタンパク質主鎖アミド基との間で、NH...OP水素結合における $^3J_{NP}$ と $^2J_{HP}$ を感度よく観測することに成功した。⁹⁾これはタンパク質-リガンド間の分子間水素結合の例であるということと、リン酸基を分子認識する水素結合の直接観測という二点で意義深い。水素結合が分子認識において果たす寄与はいうまでもなく、その評価は論理的薬物設計においても重要である。今後の創薬への応用が期待される。

おわりに

ここで紹介したように、NMRは標的タンパク質の性質や創薬研究のさまざまな段階に応じて、アミノ酸残基レベルの相互作用情報から原子レベルの立体構造情報まで、種々の情報を得ることができる。NMRの構造生物学の最大の特徴はその柔軟性であり、X線・分子モデリングなど他の構造生物学的手法や、分子生物学・生化学・タンパク質工学的手法と組み合わせることで、創薬を効率化することが期待できる。ゲノムプロジェクトの完成を控え、構造ゲノム学、機能ゲノム学、プロテオミクスといった新しいパラダイムが登場するなかで、NMRが果たす役割は大きいと信じている。

文 献

- 1) Williamson, M. P. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **182**, 295 (1985).
- 2) Wider, G. and Wüthrich, K.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 594 (1999).
- 3) Yamazaki, T. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5591 (1998).
- 4) Shuker, S. B. *et al.*: *Science*, **274**, 1531 (1996).
- 5) Chen, A. and Shapiro, M. J.: *Anal. Chem.*, **71**, 669A (1999).
- 6) Morris, K. F. and Johnson, C. S. Jr.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3139 (1992).
- 7) Lian, L-Y. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **239**, 657 (1994).
- 8) Li, D. *et al.*: *J. Biomol. NMR*, **15**, 71 (1999).
- 9) Mishima, M. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5883, (2000).

コンピュータによるタンパク質構造情報を 利用したドラッグデザイン

黒田 正孝*・白井 宏樹

1990年代に入って、ハイスループットスクリーニング (HTS), コンビナトリアルケミストリ(CC)に代表され

* 著者紹介 (代表) 田辺製薬(株)創薬研究所基盤技術ユニット (研究員)

〒532-8505 大阪市淀川区加島3-16-89 TEL. 06-6300-2561 FAX. 06-6300-2590

E-mail: m-kuro@tanabe.co.jp http://www.tanabe.co.jp