

第一回 進歩賞（日本核磁気共鳴学会）

NMRを用いた動的構造解析への取り組みと創薬への展開

竹内 恒

産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門

Participation to dynamic structural biology by using NMR and application to drug developments

Solution NMR spectroscopy is a unique and powerful technique to directly connect the structural dynamics of proteins under physiological conditions to their biological activity and function. Taking advantage of the NMR capacity to quantify the conformational equilibrium of proteins, we have been analyzing the dynamics of several protein systems to unveil their functional mechanism. The analysis of protein dynamics is not only important for the understanding of biological function, but also in the design of specific ligands for pharmacologically important proteins. Here, we discuss our recent studies in transcription regulation mechanism of multidrug transcription factors, our methodological developments that would contribute to the structural analysis of large protein systems, and application of NMR dynamics information to drug developments.

タンパク質は生体内において、構造を柔軟に変化させ、他の生体高分子や代謝物などと複合体を形成することで機能を発揮する。そのため、タンパク質機能の理解には、動的構造解析が必須であり、生理条件において原子レベルでの動的構造解析が可能なNMR法の活用が極めて有効となる。私たちは、動的平衡を定量的に解析可能なNMRの利点を生かしながら、イオンチャネルやT細胞レセプター、キナーゼなどを始めとする複数のタンパク質の機能メカニズムを明らかにする研究を行ってきた。

近年では、すべての生物種に保存された外来化合物に対する最も基本的かつ普遍的な防御機能であり、病原性細菌や癌による獲得が医療分野において問題となっている「多剤耐性」が、どのような分子機構により引き起こされるのかを、溶液NMR法を中心とする動的構造解析により明らかにすることに取り組んでいる。その際、構造や大きさの異なる様々な薬剤を高い親和性で認識し、多剤排出ポンプの発現を亢進させる多剤結合転写制御因子（MDTR）に着目し、これまでの結晶構造解析などからは、十分に明らかでなかったその機能メカニズムの解明を試みた。その結果、MDTRに共通して、非結合時にすでに薬剤結合構造やDNA結合構造を含む構造平衡下にあること。また、X線結晶構造解析では明らかにすることができなかった（図1A）、化合物の種類に応じた異なるレベルでの多剤結合転写因子の活性化を（図1B）、構造平衡中の活性化構造の割合により説明できることを明らかにするなど（図1C）、動的構造に基づく多剤耐性機構の理解に貢献した（文献1）。

また、タンパク質の動的構造解析は、生命現象の理解のみならず、創薬の推進においても、重要である。近年顕在化してきた創薬における標的の枯渇とリード創生の困難さは、創薬モダリティを低分子医薬に限定することを許さず、抗体などの高分子バイオ医薬、中分子医薬など、新たなモダリティへの展開を促している。

NMR法は、X線結晶構造解析やクライオ電顕など他の構造解析手法と異なり、標的タンパク質やその複合体が、過渡的に形成する準安定的な構造を定量的に捉えることが可能である。この特徴を生かすことで、我々は、創薬標的タンパク質に潜在的かつ動的に存在するドラッグブルな構造を捉えると同時に、NMR情報に基づき、そのような構造を安定化する変異体を確立する手法を構築することに成功した（文献2）。当該変異体は、ドラッグブルな構造を構造平衡の中で多く含むため、リガンドへの結合活性が強く、またスクリーニングの効率が改善された。よって、NMRを用いた標的タンパク質の動的制御により、標的の枯渇とリード創生の困難さを同時に解決することが可能になった。

また、近年の創薬モダリティの多様化にも対応し、バイオ医薬の代表格である抗体を、様々な添加物を含む処方条件において、低温保存温度（4℃）で解析する新たな手法N-CRINEPT法の確立にも成功している（図2、文献3）。本手法は、我々が取り組んできた¹⁵N直接検出法を発展させたものであり、100 kDaを超えるタンパク質を、重水素化せずに解析できることから、大腸菌で発現できないヒトの膜タンパク質などの動的構造解析に活用することが期待される。

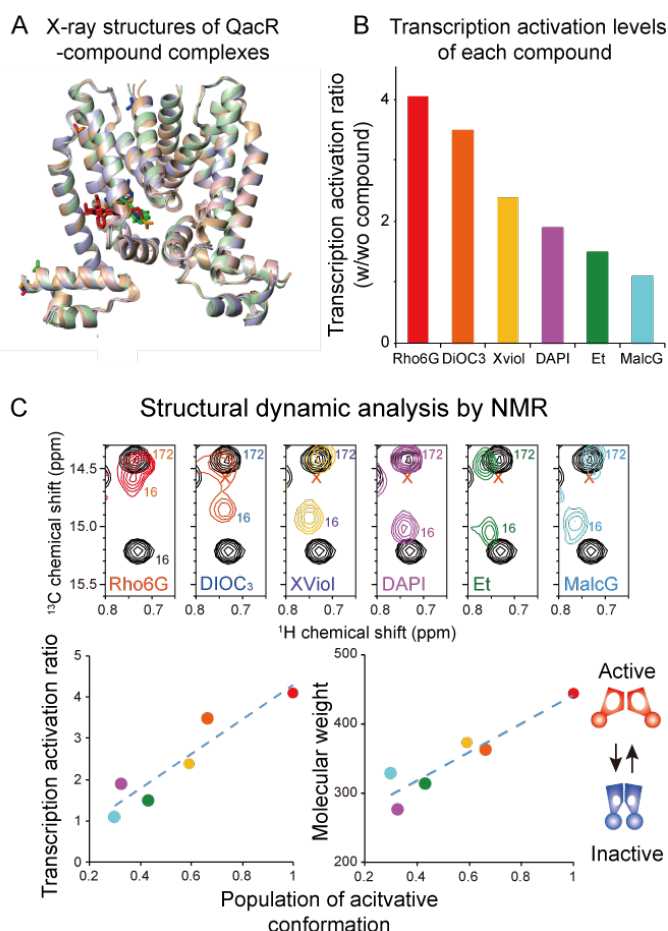


Fig. 1 Conformational equilibrium of MDTR, QacR

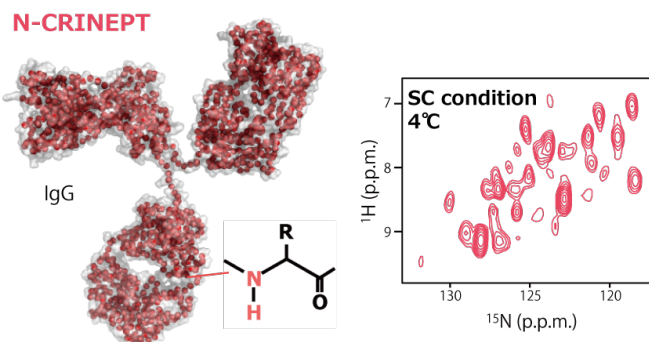


Fig. 2 Structural fingerprint of mAb by N-CRINEPT

1. ***Takeuchi K**, Imai M, *Shimada I. *Proc Natl Acad Sci*, (2019) **116**, 19963-19972.
2. **Mizukoshi Y, ****Takeuchi K**, Tokunaga Y, Matsuo H, Imai M, Fujisaki M, Kamoshida H, Takizawa T, Hanzawa H, *Shimada I. *Sci Adv*. (2020) **6**, eabd0480.
3. Tokunaga Y, ***Takeuchi K**, Okude J, Ori K, Torizawa T, *Shimada I. *J Med. Chem.*, (2020) **63**, 5360-5366.