

Application of NMR techniques to identify compounds with binding affinity to macromolecules

佐久間 千勢子 (東京薬科大学・中央分析センター)

論文要旨

核磁気共鳴法(NMR) は試料の状態により、溶液 NMR および固体 NMR に大別されるが両分野においての最近の進歩はめざましいものがある。ハード面においては超伝導磁石の高磁場化、極低温プローブによる高感度が挙げられる。測定法においても拡散係数の測定による混合物解析が可能になった。本研究において、薬剤スクリーニング系への応用も可能なレセプター (タンパク質など) に親和性をもつ低分子化合物 (リガンド) を選択的に検出する手法を用い分子間相互作用の解析を検討した。また、関連化合物新規オリゴ糖の構造解析や紅茶を試料として多変量解析手法を用いての混合物解析についても検討した。

第1部：低分子化合物の構造解析

N-アセチルスクロサミンからの酵素反応による新規オリゴ糖の NMR による構造解析

N-アセチルスクロサミンを出発物質として *Aspergillus oryzae* 由来のインベルターゼより、2種類の新規オリゴ糖を生成し、その構造決定を行った(Fig. 1-1)。その結果、*N*-アセチル-1-1 ケストサミン (Fig. 1-1A) および *N*-アセチルニストサミン (Fig. 1-1B) であることが判明した。*N*-アセチルニストサミンでは、当初 20°C では、3つの2位の4級炭素の化学シフト値がほとんど同じであったため、温度を変えて最も離散的な化学シフト値を与える条件を模索した。各種1次元、2次元 NMR 測定から最初に糖ユニット毎に帰属を行い、続いて HMBC スペクトルにおいて、グリコシル結合を介してのロングレンジカップリングおよび NOESY スペクトルにおける近距離情報を総合的に考慮し、構造解析を行った。

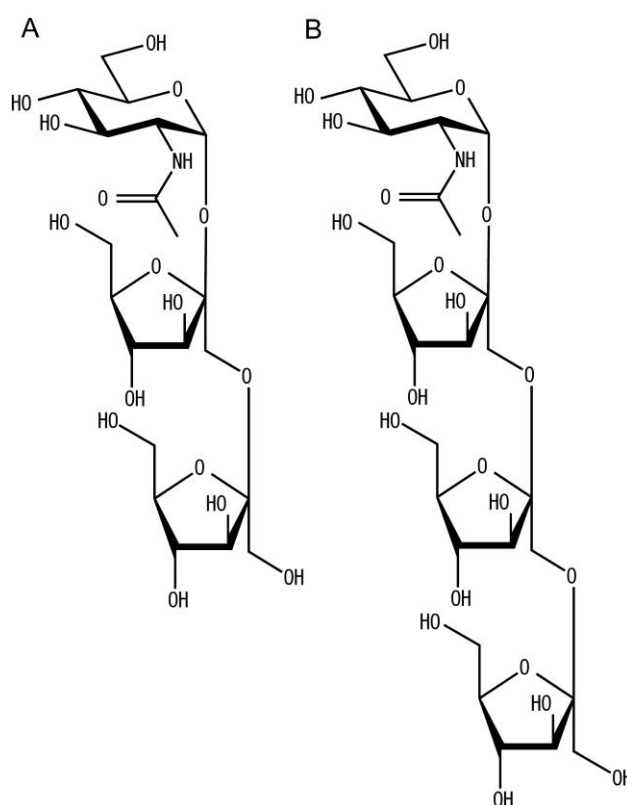


Fig. 1-1 (A) *N*-アセチル-1-1 ケストサミン, (B) *N*-アセチルニストサミンの構造式

第2部：分子間相互作用解析

第1章 酵母β-フルクトフラノシダーゼと *N*-アセチルスクロサミンの分子間相互作用の解析

N-アセチルスクロサミンはスクロースと *N*-アセチルグルコサミンから酵素反応により生産される二糖である。*N*-アセチルスクロサミンは、スクロースと類似の構造を有するが (Fig. 2-1)、酵母β-フルクトフラノシダーゼ (インベルターゼ) に対して異なる反応を示す。スクロースとは異なり、*N*-アセチルスクロサミンはインベルターゼにより加水分解されない。また、*N*-アセチルスクロサミン存在下において、スクロースの加水分解が抑制されることが TLC および ^1H NMR により明らかになった。単糖である *N*-アセチルグルコサミンでは、アセチル基を有すものの、インベルターゼに対する阻害活性は見いだされなかった。

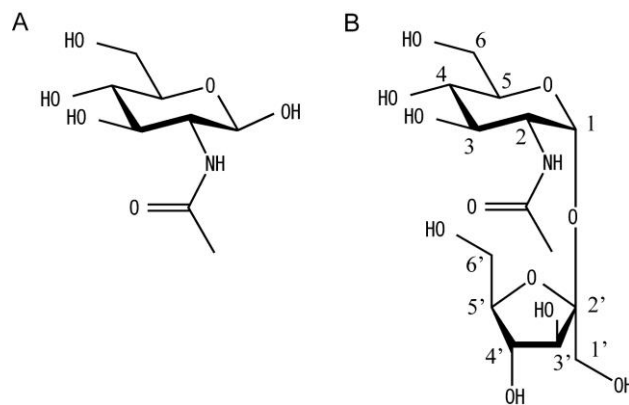


Fig. 2-1 (A) *N*-アセチルグルコサミン、(B) *N*-アセチルスクロサミンの構造

この結果より、*N*-アセチルスクロサミンはインベルターゼと何らかの分子間相互作用することが考えられ、等温滴定カロリーメトリー (ITC) および NMR による解析を試みた。ITC では、分子間相互作用する際の微小な熱量変化を観測する。インベルターゼ濃度を 0.2 mM にまで上げ、*N*-アセチルスクロサミンを滴定して測定を行ったが、熱量変化は検出できなかった。次に、NMR による解析として、

Saturation Transfer

Difference (STD) ス

ペクトル測定を行っ

た (Fig. 2-2B)。この測定では、インベルターゼに結合活性を有するリガンドのシグナルの検出が可能

である。特に、H1', H4 のシグナル強度が大きく、インベルターゼとの結合に大きく関与することが

示唆された (Fig. 2-2C)。

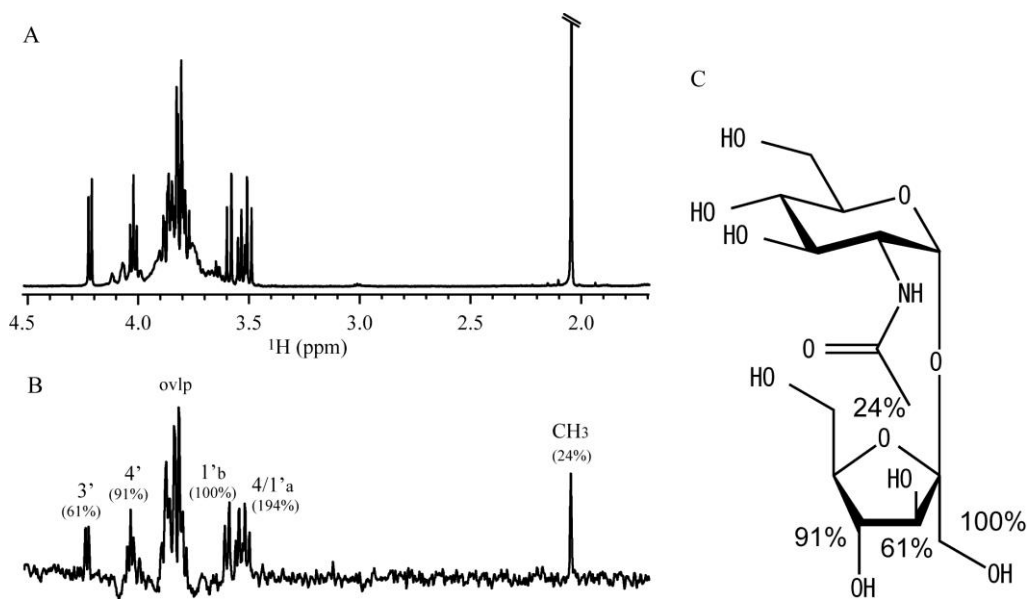


Fig. 2-2 (A) 3 mM スクロース + 6 μM インベルターゼの ^1H スペクトル、(B) STD スペクトル、(C) H1' のシグナル強度に対する相対強度、分離したシグナルに対してのみ相対強度を示した。

た (Fig. 2-2B)。この測定では、インベルターゼに結合活性を有するリガンドのシグナルの検出が可能である。特に、H1', H4 のシグナル強度が大きく、インベルターゼとの結合に大きく関与することが示唆された (Fig. 2-2C)。

第2章 α -シヌクレイン重合化におけるドパミンとの相互作用解析

パーキンソン病 (Parkinson's Disease : PD) は脳内物質の一種であるドパミンが正常に働かなくなり、分泌量が少なくなることでおこる神経変性疾患の一つである。パーキンソン病において出現する Lewy 小体の主要成分がアミロイド繊維化した α -シヌクレインである。 α -シヌクレインは 140 アミノ酸残基から構成されている分子量 14460 Da の核内タンパク質である。*in vitro* では立体構造を持たず、ランダムコイル様構造をとる。アミノ酸配列は、N 末端領域に KTKEGV モチーフを含む不完全な繰り返し配列が 7 個存在していて、中央部には疎水性領域が存在している。C 末端には強い酸性領域が存在し、可溶化に寄与していると考えられている。また *in vitro* で形成された α -シヌクレインアミロイド線維は、他のアミロイド形成タンパク質と同様に β -sheet 構造を有する。一方、オリゴマー化した α -シヌクレインは神経変性毒性をもち、オリゴマー化した際にはアミロイド線維化が抑制されることが知られている。本研究では、NMR により、オリゴマー形成における α -シヌクレインとドパミンの相互作用を明らかにすることを目的とした。NMR による解析では

WaterLOGSY を測定した。この測定法では、タンパク質に結合する低分子化合物が上向きに観測され、結合活性のない化合物のシグナルは下向きに観測される。

Fig. 2-3(A)より、ドパミンは α -シヌクレインに結合することが分かった。グルタチオンが存在する還元状態においても、グルタチオンとは結合せず、ドパミンと結合することが明らかとなった。

WaterLOGSY は Fig. 2-2(B)で示した STD と共に、タンパク質に結合するリガンドの観測に汎用されている測定法であり、薬剤スクリーニングの新規測定法として

開発されたものである。本章では、同一サンプルで WaterLOGSY および STD の測定を行い、両測定法の特徴についても考察した。

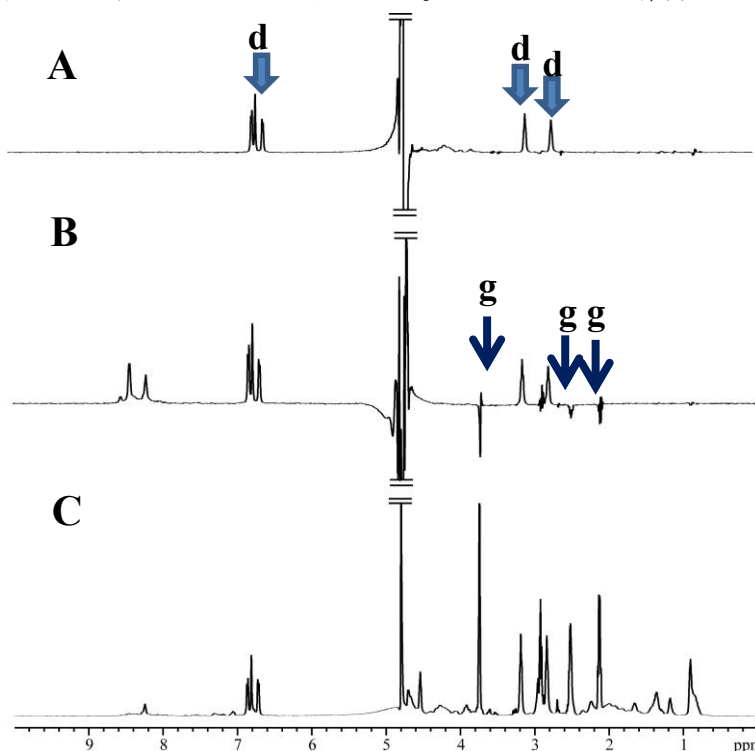


Fig. 2-3 WaterLOGSY スペクトル. (A) 0.1 mM α -syn+8 mM ドパミン(d), (B) 0.1 mM α -syn+8 mM ドパミン+8 mM グルタチオン(g), (C) (B)の ^1H スペクトル

第3章 フッ素化合物ジフルニサル-ヒト血清アルブミンの相互作用解析

医薬品として多種類存在する含フッ素化合物の場合、 ^1H 検出も有効な手法であるが ^{19}F も ^1H 同様に高周波核であり、天然存在比が 100%であることから、NMR による観測が有効になるものと考えられる。本研究では、タンパク質の ^1H から含フッ素化合物の ^{19}F への飽和移動を起こし、 ^{19}F での検出を試みた。通常の NMR 装置では、高周波の観測は ^1H または ^{19}F のどちらか一つしかできないため、2 次元 ^1H - ^{19}F スペクトルの測定は不可能である。高周波チャンネルを増設すれば 2 次元 ^1H - ^{19}F 相関スペクトルの測定は可能になるが、高額の設定費用がかかるため、汎用性に欠ける。本研究では、高周波チャンネルが一つのみの汎用 NMR 装置において、2 次元 ^1H - ^{19}F スペクトル測定を試み、 ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ STD 法への応用を行った。

5.0mM ジフルニサル+0.1mM ヒト血清アルブミン試料での結果を Fig. 3-1 に示す。(a) ^{19}F スペクトルでは、-112.9 ppm に 4'位の ^{19}F および -114.8 ppm に 2' 位の ^{19}F が観測されている。(b) に示す ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ STD スペクトルでは、4' 位の ^{19}F のシグナル強度大きくっており、HSA と近接しているものと考えられる。また、逆の ^1H $\{^{19}\text{F}\}$ STD 法も試み、解析を行った。本法が含フッ素化合物に関して汎用性の高い測定法として応用されると期待できる。

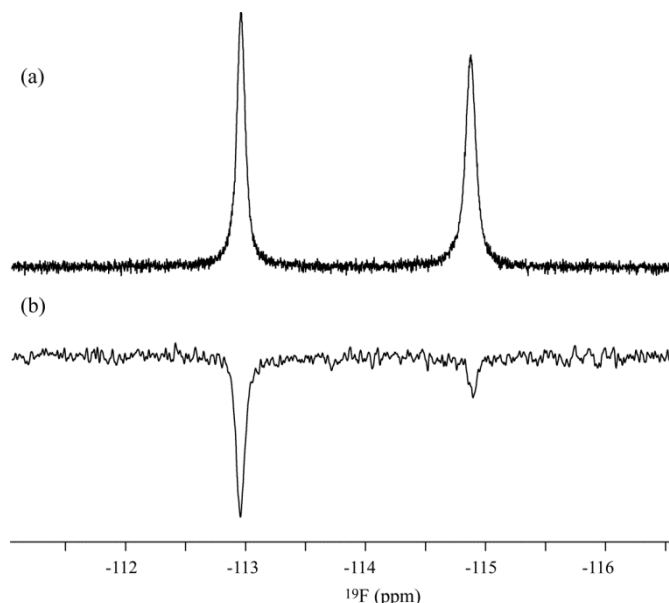


Fig. 3-1 5.0mM ジフルニサル+0.1mM ヒト血清アルブミンの (a) ^{19}F スペクトルおよび (b) ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ STD スペクトル. (b) では ^1H :0.0 ppm を選択照射した.

第3部：多変量解析

NMR 法による紅茶の成分分析

本研究では ^1H NMR スペクトルを多変量解析する手法によりスリランカの標高の異なる 4 カ所の茶園で栽培・製造された紅茶葉の品質の違いについて評価を行った。さらに、1 次元と 2 次元の ^1H NMR の測定から紅茶の成分分析を行った。解析の結果、成分としてテアニン、カフェイン、テアフラビン、3,3'二没食子酸テアフラビン、3,3'二没食子酸テアルビジンが特定され、標高の違いによる成分量の違いを特徴づけることができた。食品薬学分野において品質管理・評価などへの本手法の応用が期待できる。

[研究成果の掲載誌] 1) *Carbohydr. Res.*, 2013, 382, 108-112. 2) *J. Carbohydr. Chem.*, 2014, 33, 498-505. 3) *J. Biophy. Chem.* 2013, 4, 110-114. 4) *Magn. Reson. Chem.* (in press) 5) *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 5181-5187.