

NMRに基づく薬理作用の定量的解明



研究室紹介

上田 卓見*

NMR-Based Quantitative Understanding of Pharmacological Actions

Key Words : Structural biology, NMR, GPCR

はじめに

くすりの受容体であるタンパク質は、特定の立体構造を形成した上で、その構造をたえず変化させることで、生理機能を発揮している。NMR法では、生理的環境に近い溶液条件下において、タンパク質がどのような構造の間を、どのような割合や速度で交換するかといった、動的構造平衡に関する定量的な時空間情報を得ることができる。また、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析では、精緻な立体構造を実験的に明らかにすることが可能である。昨年2024年の4月に設立された我々の研究室では、こうした構造生物学的手法に基づいて、創薬標的タンパク質における、活性と直結する動的立体構造を明らかにして、さらに原子レベルから細胞レベルに至る多階層の知見を統合することで、薬理作用を解明して創薬を加速する研究を進めている。本稿では、筆者らがこれまでに進めてきた研究の概要と、当研究室が今後展開していく研究の指針を紹介する。

これまでに進めてきた研究:GPCRの薬効度を規定するメカニズムの解明

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、神経伝達物質やホルモン等の受容体として機能しており、現在市販されている医薬品の30%以上はGPCRを標的とする。現在も300種類以上のGPCRリガンドの臨床

試験が進められている。GPCRは、作動薬との結合により活性化すると、細胞内のGタンパク質を活性化して、cAMP濃度変化等のシグナルを誘起する。

GPCRをNMR解析する上では、分子量の大きさ、収量および安定性の低さ、さらに活性体の発現に用いられる昆虫細胞発現系での安定同位体標識法の制約といった技術的課題があり、取得できる情報の量が限られる点が大きなボトルネックとなっている。

我々はこれらの課題を解決する新規手法を開発しそれを応用することで、GPCR等の活性に直結する動的構造平衡の解明を進めてきた。例えば、複雑な構造平衡を規定する多数の速度定数をNMRシグナルから決定する上では、必要な計算量が速度定数の数に対して累乗的に増大し、従来法では現実的に解析が困難であった。そこで我々は、機械学習分野で用いられている交換モンテカルロ法を利用して、多数の速度定数を網羅的かつ効率的に探索して、NMRスペクトルを再現する複雑な構造平衡モデルを推定する手法を独自に開発した^{1,2)}。

リガンドがGPCRを活性化する程度は薬効度と呼ばれており、各リガンドの薬効度は以下のように異なることが知られている。GPCRは、リガンドが結合していない状態でも弱く活性化しており、この活性は基礎活性と呼ばれる。基礎活性を低下させるリガンドは逆作動薬、変化させないリガンドは遮断薬と呼ばれる。また、標的GPCRを完全に活性化するリガンドは完全作動薬と呼ばれる。一方、標的GPCRを弱く活性化する、部分作動薬と呼ばれるリガンドも存在する。このような薬効度の違いは薬効に影響することが知られている。例えば、代表的なGPCRである β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) では、完全作動薬が急性の喘息に有効である一方、慢性喘息の長期治療では副作用の小さい部分作動薬が有効であることが報告されている。

* Takumi UEDA

1977年6月生まれ
 東京大学大学院 薬学系研究科
 機能薬学専攻博士後期課程 (2005年)
 現在、大阪大学大学院 薬学研究科
 定量生命物理化学分野 教授 薬学博士
 TEL : 06-6879-8220
 E-mail : ueda@phs.osaka-u.ac.jp



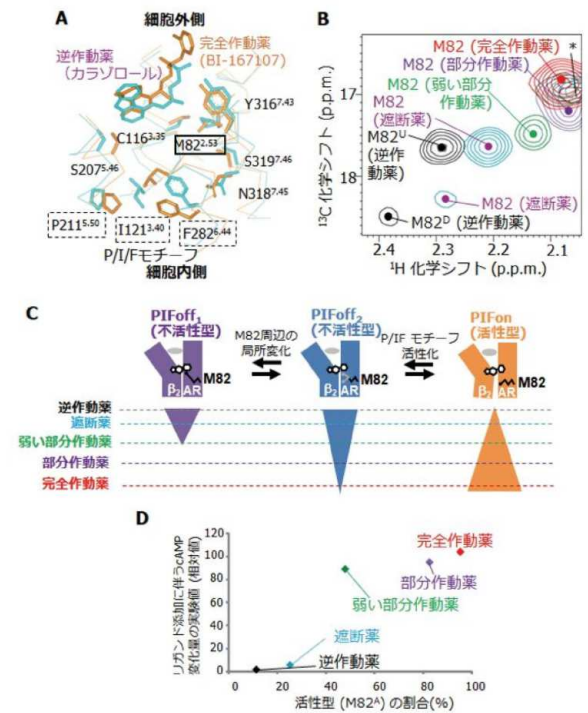


図1 β_2AR の薬効度を規定する動的構造平衡。A. β_2AR のM82の位置。B. 逆作動薬、遮断薬、弱い部分作動薬、部分作動薬、完全作動薬が結合した状態のM82のNMRシグナルの重ね合わせ。C. β_2AR の不活性型と活性型の構造平衡および各種リガンド存在下における各状態の存在割合の模式図。D. β_2AR のNMRシグナルから導出したcAMP変化量と、細胞におけるcAMP変化量の実験値のプロット。

そこで我々は、薬効度を規定するメカニズムを解明するために、逆作動薬、遮断薬、弱い部分作動薬、部分作動薬、完全作動薬が結合した状態の β_2AR における、リガンド結合部位とGタンパク質結合部位を結ぶ位置にあるM82 (図1A) 等のシグナルを観測した^{1,3,4}。その結果、シグナルの数、化学シフトおよび線幅が薬効度に応じて変化した (図1B)。これらの結果から、 β_2AR が複数の不活性型と活性型の動的平衡状態にあり、結合する薬物の薬効度に応じて存在割合が変化することが示された (図1C)。この構造平衡における活性型の割合と結合した薬物の β_2AR 産生細胞に薬物を添加した時のcAMP濃度変化率は良く対応したことから (図1D)、 β_2AR の薬効度は、構造平衡が決定していることが示された。

今後の指針: NMRに基づく薬理作用の定量的解明

我々は、以上の研究に加え、 μ オピオイド受容体やアデノシンA_{2A}受容体を対象としたNMR研究⁵⁻⁷)により、生理的環境に近い溶液条件下における

GPCR等の動的構造平衡が、シグナル伝達活性と直結することを明らかにしてきた。さらに本稿では詳細は省略するが、作動薬が結合した β_2AR がGPCRキナーゼによりリン酸化された上で、アレスチンを活性化することで、Gタンパク質とは異なるシグナルを誘起することを可能とする構造的基盤も明らかにした^{1,8,9}。これらの成果を受けて、NMRによる生体分子の立体構造解明でノーベル化学賞を受賞したKurt Wüthrich博士からの共著の打診を受け、執筆した総説がNature Reviews Drug Discovery誌に採択されるに至った¹⁰。このことから我々の研究は国際的にも高い評価を受けていると考える。

また、このような構造平衡の量比や交換速度の情報は、細胞内シグナル伝達の数理モデルと組み合わせることができる。我々は、NMRにより同定した β_2AR の作動薬結合に伴う不活性型と活性型の量比および交換速度の変化と、Gタンパク質の活性化からアデニル酸シクラーゼによるcAMP産生に至る各反応の速度定数の文献値を組み合わせることで、cAMP濃度変化をシミュレーションして、cAMP濃度変化が秒単位の迅速なタイムスケールで生じることを定量的に説明した⁴) (図2)。さらに交換モンテカルロ法を用いることで、NMRの結果と細胞内シグナル伝達のリアルタイム観測の結果を全て説明するような、動的構造平衡を取り入れた細胞内シグナル全体の複雑な数理モデルを構築することも可能である。このように、NMRにより得られる動的構造平衡の情報は、それ自体が活性と密接に関係するのみならず、立体構造情報と生化学や細胞生物学の知見を時空間

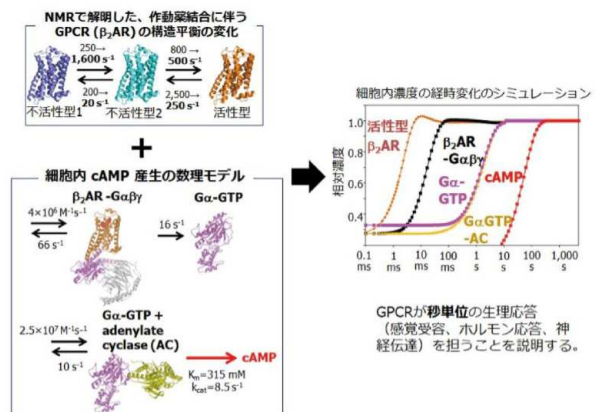


図2 β_2AR の構造平衡の交換速度と、Gタンパク質活性化およびcAMP産生の速度の組み合わせによる、細胞内シグナル活性化のシミュレーション。

的に統合する上で重要な役割を果たす。

そこで我々は、GPCRを含む様々な生理的に重要な機能を担うタンパク質を対象として、活性を規定する動的構造平衡をNMRで解明するとともに、その情報をもとに機械学習や情報科学を活用して、精緻な立体構造情報と細胞生物学的な知見を統合した薬理現象全体の数理モデルを構築する研究を進めている(図3)。さらに、変異導入や薬物により動的構造平衡や細胞機能全体を制御することを目指している。

特に、動的構造平衡を制御する新たな方法として、従来の低分子化合物や抗体では困難であった細胞内のタンパク質-タンパク質相互作用に作用できることが期待されている、非典型ペプチドに注目している。我々は、非典型ペプチドの溶液中の立体構造やcis-trans異性化状態をNMRで効率良く解析する手法を確立した上で、膜透過性や標的分子への親和性を規定する構造的特徴を同定する研究も進めている¹¹⁻¹⁴⁾。このような、定量構造生命科学とも呼べる研究を通して、生命現象の理解と創薬研究の加速を図り、薬学および科学の発展に貢献していく所存である。

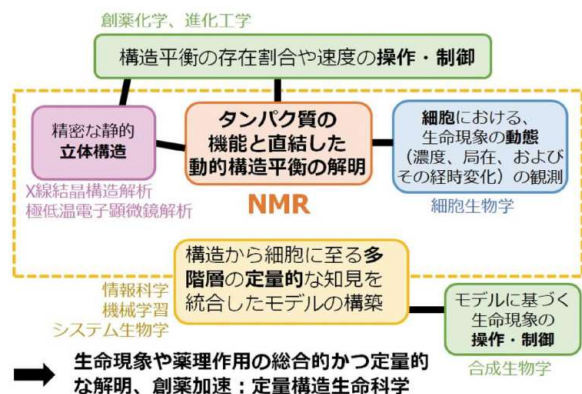


図3 NMRを中心とした研究展望の模式図。

参考文献

- 1) S. Imai, T. Yokomizo, Y. Kofuku, Y. Shiraiishi, T. Ueda, I. Shimada, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 430–439 (2020)
- 2) Y. Minato, T. Ueda, A. Machiyama, H. Iwaï, I. Shimada, *Sci. Rep.*, **7**, 16462 (2017)
- 3) Y. Kofuku, T. Ueda, J. Okude, Y. Shiraiishi, K. Kondo, M. Maeda, H. Tsujishita, I. Shimada, *Nat.*

- Commun.*, **3**, 1045 (2012)
- 4) Y. Kofuku, T. Ueda, J. Okude, Y. Shiraiishi, K. Kondo, T. Mizumura, S. Suzuki, I. Shimada, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 13376–13379 (2014)
- 5) T. Mizumura, K. Kondo, Y. Kofuku, M. Natsume, S. Imai, T. Ueda, I. Shimada, *Sci. Adv.*, **6**, eaay8544 (2020)
- 6) J. Okude, T. Ueda, Y. Kofuku, M. Sato, N. Nobuyama, K. Kondo, Y. Shiraiishi, T. Mizumura, K. Onishi, M. Natsume, M. Maeda, T. Tsujishita, T. Kuranaga, M. Inoue, I. Shimada, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 15771–15774 (2015)
- 7) S. Kaneko, S. Imai, N. Asao, Y. Kofuku, T. Ueda, I. Shimada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e212198119 (2022)
- 8) Y. Shiraiishi, M. Natsume, Y. Kofuku, S. Imai, K. Nakata, T. Mizukoshi, T. Ueda, H. Iwaï, I. Shimada, *Nat. Commun.*, **9**, 194 (2018)
- 9) Y. Shiraiishi, Y. Kofuku, T. Ueda, S. Pandey, H. Dwivedi-Agnihotri, A.K. Shukla, I. Shimada, *Nat. Commun.*, **12**, 7158 (2021)
- 10) I. Shimada, T. Ueda, Y. Kofuku, M.T. Eddy, K. Wüthrich, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 59–82 (2019)
- 11) J. Morimoto, M. Yokomine, Y. Shiratori, T. Ueda, T. Nakamuro, K. Takaba, S. Maki-Yonekura, K. Umezawa, K. Miyaniishi, Y. Fukuda, T. Watanabe, M. Suga, A. Inayoshi, T. Yoshida, W. Mizukami, K. Takeuchi, K. Yonekura, E. Nakamura, S. Sando, *Chem. Sci.*, **16**, 10512–10522 (2025)
- 12) Y. Otani, A. Ichinose, X. Wang, Z. Huang, A. Kasahara, M. Ishii, E. Watanabe, K. Kanamitsu, K. Tai, H. Kusuhara, T. Ueda, K. Takeuchi, T. Ohwada, *Chem. Commun.*, **60**, 9242–9245 (2024)
- 13) M. Yokomine, J. Morimoto, Y. Fukuda, T. Ueda, K. Takeuchi, K. Umezawa, H. Ago, H. Matsuura, G. Ueno, A. Senoo, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, S. Sando, *Chem. Sci.*, **15**, 7051–7060 (2024)
- 14) Y. Hosono, S. Uchida, M. Shinkai, C.E. Townsend, C.N. Kelly, M.R. Naylor, H.W. Lee, K. Kanamitsu, M. Ishii, R. Ueki, T. Ueda, K. Takeuchi, M. Sugita, Y. Akiyama, S.R. Lokey, J. Morimoto, S. Sando, *Nat. Commun.*, **14**, 1416 (2023)