

【技術資料】タンパク質—リガンド相互作用系のエピトープ構造解析 ～ 2次元 NMR ^1H - ^{13}C DIRECTION-HSQC 測定 ～

概要

病気の元となるタンパク質の薬剤認識様式(エピトープ)を詳細に解析することで、薬剤認識メカニズムを把握でき、高い結合活性を有する薬剤を開発するための指針を得ることができます。NMR は結晶化等の操作が必要無く、溶液状態で簡便にエピトープ解析が可能です。

本技術資料では、独自に開発したタンパク質—リガンド相互作用解析手法 2次元 ^1H - ^{13}C DIRECTION-HSQC 測定による、糖鎖—タンパク質相互作用系のエピトープ構造解析事例をご紹介します。

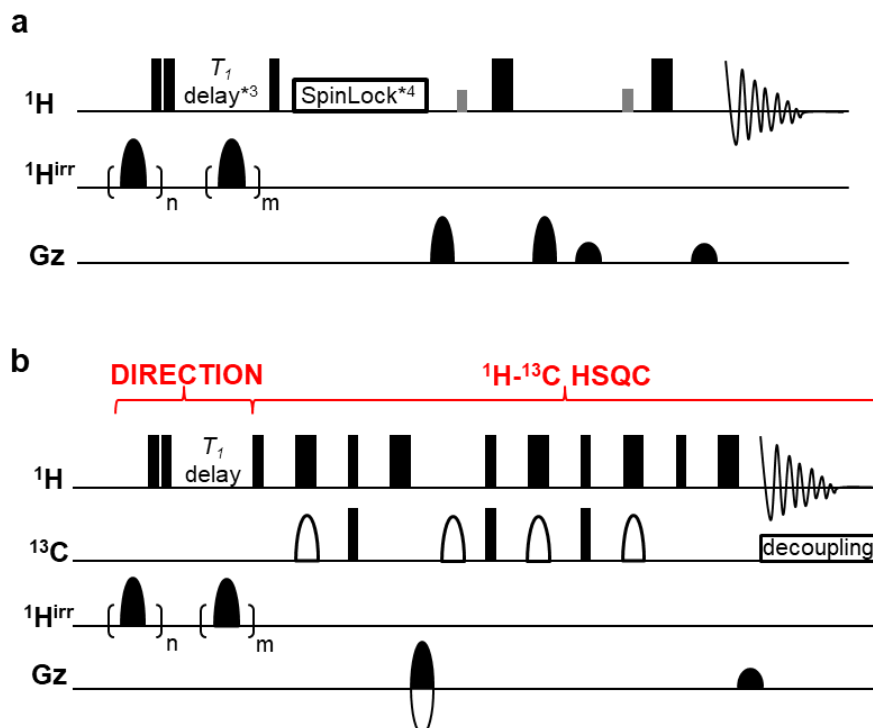
分析方法・分析装置

- ・ 分析方法 : 1次元 ^1H DIRECTION^{*1}、2次元 ^1H - ^{13}C DIRECTION-HSQC^{*2}
- ・ 分析装置 : 700MHz NMR、500MHz NMR

^{*1} Difference of inversion recovery rate with and without target irradiation

^{*2} Heteronuclear single quantum coherence

以下にパルスシーケンスダイアグラムを示します。



【図 1】 1次元 ^1H DIRECTION 測定(a)及び ^1H - ^{13}C DIRECTION-HSQC 測定(b)のパルスシーケンス

^{*3} 縦緩和遅延時間 : DIRECTION 法では相互作用の有無を縦緩和時間で検出します

^{*4} 横磁化ロック用パルス : タンパク質の ^1H シグナルを減衰させ、綺麗なスペクトルを得ます

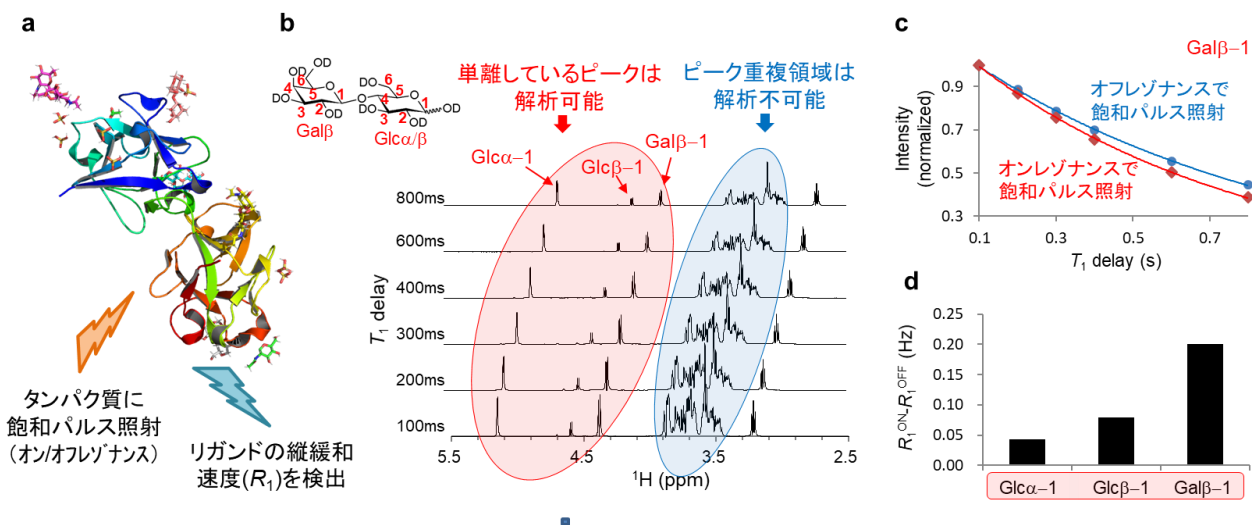
試料

ラクトース/レクチン(SNA^{*5})混合溶液
濃度：ラクトース 21.7mM、SNA 772μM
溶媒：リン酸緩衝生理食塩水(PBS(-), 100% D₂O)

*5 *Sambucus Nigra* Agglutinin

結果

DIRECTION 法では、タンパク質にオンまたはオフレゾナンスで飽和パルス照射した際の、リガンドの縦緩和速度差を解析します(図 2a)。1次元 DIRECTION 測定¹⁾では、単離している¹Hピークを解析でき(図 2b,c)、エピトーププロファイル(縦軸の値が大きい程、相互作用部位に近い)を得ることが可能です(図 2d)。ただし、ピーク重複領域の解析は困難でした(図 2b 青)。



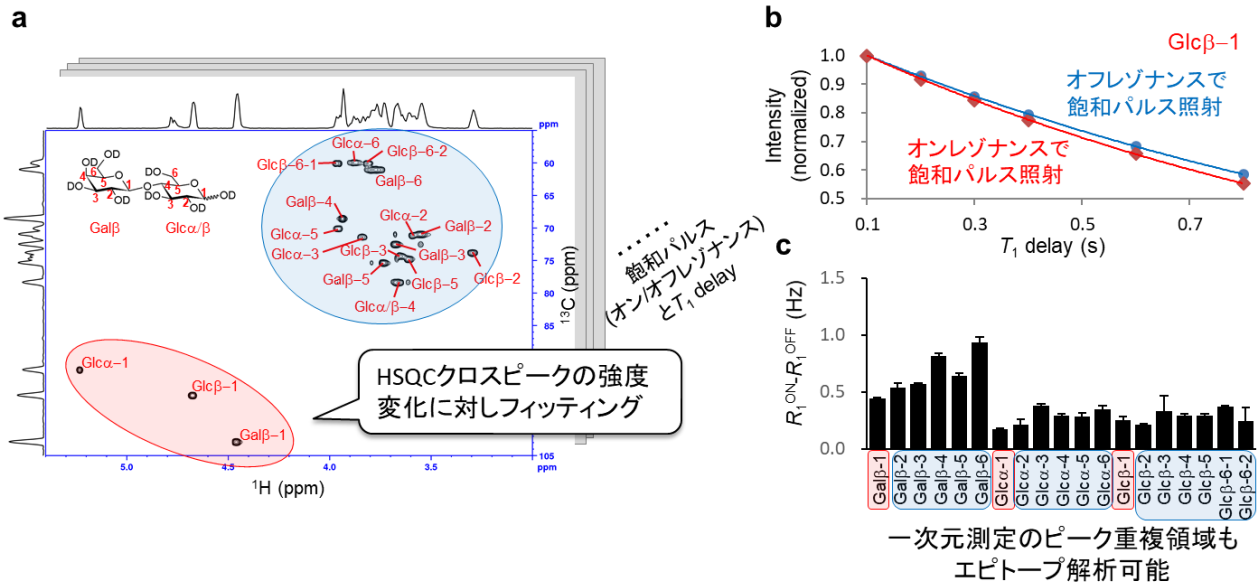
【図 2】 DIRECTION 法の原理とラクトース/SNA 相互作用系の 1次元 DIRECTION スペクトル及び解析例

- DIRECTION 法の原理
- 1次元 DIRECTION スペクトル
- タンパク質シグナルに対しオン/オフレゾナンスで飽和パルス照射した際の T_1 緩和曲線
- 1次元 DIRECTION スペクトル解析結果(エピトーププロファイル)

R_1^{ON} : オンレゾナンスでタンパク質に飽和パルス照射した際の縦緩和速度

R_1^{OFF} : オフレゾナンスでタンパク質に飽和パルス照射した際の縦緩和速度

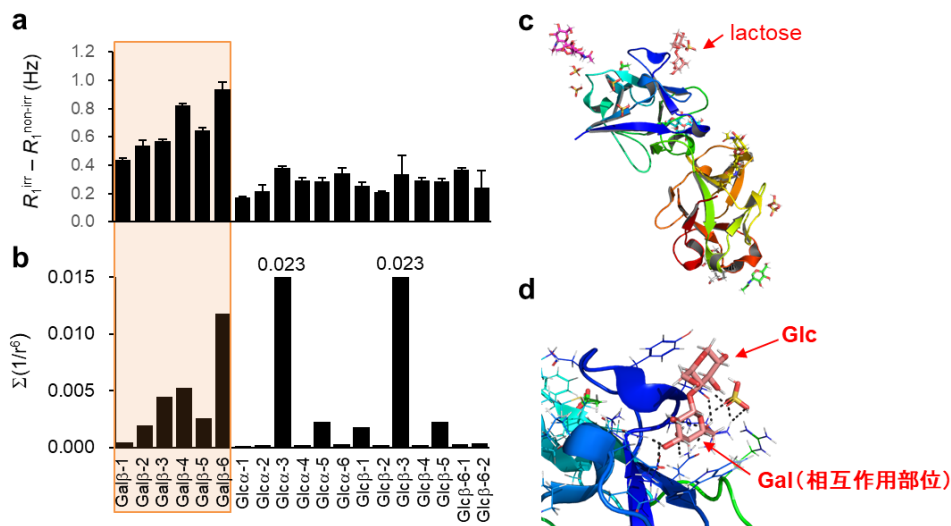
そこで、弊社では 2次元 ¹H-¹³C DIRECTION-HSQC 測定手法を開発しました。これにより、ピーク重複領域の¹Hピークも一意的に解析でき、リガンド(ラクトース)の全¹H原子のエピトーププロファイルを得ることが可能となりました(図 3)。



【図 3】ラクトース/SNA 相互作用系の 2 次元 ^1H - ^{13}C DIRECTION-HSQC 測定イメージ図と解析例

- 2 次元 DIRECTION-HSQC 測定イメージ図
- タンパク質シグナルに対しオン/オフレゾナンスで飽和パルス照射した際の T_1 緩和曲線
- 2 次元 DIRECTION-HSQC スペクトル解析結果 (エピソードプロファイル)

ラクトース/SNA 相互作用系の DIRECTION-HSQC 解析結果を図 4a に示します。ラクトース/SNA 複合体の X 線結晶構造 (図 4c,d) に基づく ^1H 原子密度予測 (図 4b) と比較し、相互作用部位であるガラクトース (Gal) のエピソードプロファイルを大凡正しく捉えていると推定されました。



【図 4】ラクトース/SNA 相互作用系の DIRECTION-HSQC 解析結果

- 2 次元 DIRECTION-HSQC スペクトル解析結果 (エピソードプロファイル)
- 結晶構造に基づく ^1H 原子密度予測 ($\leq 7 \text{ \AA}$)
- ラクトース/SNA 複合体の X 線結晶構造 (PDB-ID : 3CA4)
- ラクトース結合部位のリボンモデル図

まとめ

1次元 DIRECTION 測定や2次元 DIRECTION-HSQC 測定を用いることで、エピトープ構造を把握することが可能です。特に2次元 DIRECTION-HSQC 測定は、1次元測定ではピークが重複する¹Hピークについても一意的にエピトープ解析が可能です。またDIRECTION法では、汎用的な測定法である飽和移動差解析(STD)法よりも正確にエピトープ解析が可能との報告がなされており¹⁾、タンパク質の薬剤認識メカニズムの解析、リード化合物の構造最適化等への応用が期待されます。

参考文献

- 1) Mizukoshi, Y. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 1362–1365 (2012).

適用分野：NMR、エピトープ、構造解析、相互作用解析、認識メカニズム

キーワード：リガンド、糖鎖、薬剤、リード化合物、タンパク質、創薬、医薬品