

【助成 41-42】

溶液試料の核磁気共鳴 (NMR) の感度を室温で約 1000 倍のオーダーで向上させた創薬 NMR 実験法の開発

研究者

北里大学薬学部 准教授 杉木 俊彦

大阪大学大学院基礎工学研究科 助教 宮西 孝一郎

大阪大学 量子情報・量子生命研究センター 准教授, 副センター長 根来 誠

〔研究の概要〕

溶液核磁気共鳴 (溶液 NMR) 分光法は、標的タンパク質に結合する化合物の探索 (スクリーニング) 等の創薬研究に不可欠な手法である。しかし NMR の「感度の低さ」に加え、化合物の水溶性の低さが創薬 NMR 実験における最大の障壁となる。本研究では、動的核偏極 (DNP) 法の発展型である「トリプレット DNP」技術を応用し、溶液試料の NMR 実験の感度を室温で約 1000 倍のオーダーで抜本的に向上させる技術の開発を進めている。

〔研究経過および成果〕

核磁気共鳴 (NMR) 分光法、特に溶液状態の試料分子の構造情報を生理的条件下で観測できる溶液 NMR 分光法は、タンパク質をはじめとする生体分子や化合物などの立体構造や分子間相互作用の機序などについて、原子レベルの高分解能で解析することを可能にする。これらの特長から、生体分子に結合する化合物や薬剤を探索するリガンドスクリーニング等の創薬研究においても不可欠な分析手法となっている。しかし、高分解能である一方で、NMR は原理的に「感度が低い」という本質的な弱点を抱えており、これが実際の NMR 実験における最大の障壁となっている。低感度さゆえ、溶液 NMR で観測するための試料の濃度は一般的にマイクロモルからミリモルのオーダーが必要であり、他の実験に比べても試料が大量に必要となるため、その事情から実験の実施が不可能となる場合も多い。また、大量の試料を入手できたとしても、その試料の溶解度が低い場合、マイクロモル～ミリモルの比較的高濃度な溶液にすることが困難な場合も

多い。特に、薬剤として成熟性の高い化合物ほど水溶性が低いことしばしばであるため、溶液 NMR の検出限界を下回ってしまい、標的タンパク質との相互作用を溶液 NMR で検出できないというケースに直面することも多い。このように、NMR の根本的な低感度さと化合物の水溶性の限界が相加的な要因となり、新たな構造や作用を発揮する新規化合物を創出するという創薬研究における深刻なボトルネックとなる。

本研究は、NMR の本質的な課題である「感度の低さ」を抜本的な解決に導くことで、水溶性が低いためにマイクロモルを下回る化合物の溶液 NMR 信号を観測可能にし、それによって化合物とタンパク質との結合実験の適用可能性を大幅に押し広げることで、特に創薬研究が直面しやすい「NMR の低感度問題」と「化合物・薬剤の低濃度問題」のジレンマを打開する技術を開発することを目的としている。

そのための技術として我々が着目したのが動的核偏極 (Dynamic nuclear polarization; DNP) 技術である。核スピンを観測する NMR 分光法が低感度である原因

は、静磁場中での核スピンの分極率の小ささ(核スピン数十万個に対し僅か1個分程度の分極率)にある。一方、電子のスピンは、最も一般的な NMR 観測核である ^1H の核スピンに比べて約 660 倍大きな分極率を持つ。そこで、電子スピンの分極率を、DNP の量子力学的操作でもって核スピンへと移す超核偏極を起こすことにより、NMR の感度を 100~1000 倍のオーダーで根本的に向上させることが可能となる。

DNP 技術で試料中の NMR 観測核原子を超偏極する場合、試料を極低温 (-270°C 以下) で凍結状態としたうえで、さらに高磁場下に曝して高周波を照射する方法が、電子スピンの偏極率を最大限に高めることができる結果、最も高い効率で達成できる。しかしその方法では、DNP 処理後に凍結試料を溶解したうえで溶液 NMR 測定を行う必要がある。しかしこの手順では、タンパク質などの生体分子には必ずしも適していないため、生体分子と化合物の相互作用を検出した創薬研究には応用しにくい。すなわち、創薬研究での溶液 NMR 実験が直面している感度問題を解決するには、タンパク質と化合物を含む試料溶液を凍結融解することなく、生理的な条件を維持したまま DNP 処理する必要がある。これは極めて難しい課題であったが、近年、国内(大阪大学及び理研)のグループを中心として、試料を凍結融解することなく、室温で、溶液状態のまま、高い効率で NMR 観測核原子の超偏極を達成できる「トリプレット DNP」技術が開発された。この技術によって、タンパク質などの生体分子を試料とする溶液 NMR 実験の感度を抜本的に向上させるブレイクスルーが現実的なものとなってきた。

本研究は、リガンドスクリーニングをはじめとする創薬指向型の溶液 NMR 実験法の感度を、根本的かつ大幅に向上させる技術を開発することを目指し、タン

パク質と化合物の相互作用を検出する溶液 NMR 実験をトリプレット DNP 技術で高感度化する試みを進めている。溶液 NMR 実験で観測する核種は、フッ素原子 (^{19}F) とした。 ^{19}F は NMR 観測の感度が高い核種であり、かつ生体分子内にはほとんど含まれていないため、化合物のほうを ^{19}F 標識しておくことで、共存するタンパク質由来の NMR 信号は出現せず、化合物由来の NMR 信号のみを観測できる等、様々な利点があるため、膨大な数のタンパク質-化合物相互作用の判別や解析を行う創薬 NMR 実験において最も主要な実験戦略の一つとなっている。本研究では、ヒト血清アルブミン(HSA)タンパク質を標的タンパク質の一つとし、その高親和性リガンドである ^{19}F 標識サリチル酸 (^{19}F -SA) との結合を溶液 ^{19}F -NMR 実験で観測した。その結果、 ^{19}F -NMR シグナルの化学シフト変化から、 ^{19}F -SA が HSA に結合する様子を容易かつ確実に観測できる系を確立した。そこで次に、本助成にて購入させていただいた 12 種の新規構造化合物からなる独自の化合物ライブラリーを構築し、 ^{19}F -SA/HSA 溶液に混和して ^{19}F -NMR 実験を行った。その結果、観測された ^{19}F -NMR 信号の化学シフト値から、HSA 上から ^{19}F -SA を競合的に追い出すことのできる新規化合物を発見した。また、得られた新規化合物は、既存の高親和性リガンド(ワルファリン)よりも高いアフィニティで HSA 上の薬剤結合ポケットに結合することも判明した¹。現在、この溶液 NMR 実験にトリプレット DNP 技術を適用し、創薬指向型リガンドスクリーニング NMR 実験の高感度化を達成すべく検討を進めている。

〔発表論文〕

1. 杉木俊彦, 高草木洋一, 根来 誠. 創薬および生体分子のための溶液 NMR の高感度化研究. 月刊「細胞」令和 7 年 4 月号