

大阪大学蛋白質研究所先端核磁気共鳴装置群利用報告書

(トライアルユース)

利用企業名	帝人ファーマ株式会社	
利用者部署、氏名	生物医学総合研究所 創薬化学研究所・分子構造設計担当課長 上村 みどり	
連絡先 住所	〒191-8512 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号	
連絡先 電話番号 Fax、E-Mail	Tel. 042-586-8283 Fax 042-586-8219 E-mail m.kamimura@teijin.co.jp	
利用課題名	フッ素含有化合物ライブラリーの溶解度試験	
概要	<p>^{19}F 核は磁気回転比が ^1H の 0.83 倍で、天然存在比は 100%であるため、^1H と同等に感度が良い事、生体分子内には存在しない核であるためタンパク質由来のバックグラウンドが観測されない事、等の理由から、近年 ^{19}F 核を利用した NMR スクリーニング法が注目されている。</p> <p>NMR スクリーニング法では、化合物を高濃度に溶解させる必要があるため、タンパク質が安定に存在できる水系バッファーへの溶解度試験は、必要不可欠である。そこで、本課題では、ライブラリーの 125 化合物全てを、水系バッファーに溶解して、^{19}FNMR スペクトルを測定し、溶解度とケミカルシフトを確認した。</p> <p>これらの化合物を混合してもケミカルシフトの変化は観測されることがわかった。また、実際に化合物を水系バッファーに溶解すると、信号がブロードになるものや、二つに分裂して観測されるものがあった。</p> <p>水系バッファーに溶解した化合物の ^{19}FNMR スペクトルに基づき化合物の混合パターンを最適化し、予備的な実験としてモデル蛋白質に適用することで、調製された化合物ライブラリーがスクリーニングに利用可能であることが分かった。</p>	
利用実施時期及び期間	平成 26 年 2 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日 総利用日数：34 日 (400MHz)、3 日 (800MHz) 当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由) サンプルチェンジャーがなかったため、測定に時間を要した。	
利用 NMR 装置	<input type="checkbox"/> 950 MHz (超低温プローブ、溶液) <input checked="" type="checkbox"/> 800 MHz (超低温プローブ、溶液) <input type="checkbox"/> 700 MHz (固体) <input type="checkbox"/> 600 MHz (超高感度固体 DNP) <input type="checkbox"/> 600 MHz (溶液) <input type="checkbox"/> 500 MHz (固体) <input type="checkbox"/> 500 MHz (溶液) <input checked="" type="checkbox"/> 400 MHz (溶液)	
成果の概要	目的	<p>^{19}F 核は磁気回転比が ^1H の 0.83 倍で、天然存在比は 100%であるため、^1H と同等に感度が良い事、生体分子内には存在しない核であるためタンパク質由来のバックグラウンドが観測されない事、等の理由から、近年 ^{19}F 核を利用した NMR スクリーニング法が注目されている。</p>

		<p>NMR スクリーニング法では、化合物を高濃度に溶解させる必要があるため、タンパク質が安定に存在できる水系バッファーへの溶解度試験は、必要不可欠である。そこで、本課題では、ライブラリーの 125 化合物全てを、水系バッファーに溶解して、¹⁹F NMR スペクトルを測定し、溶解度とケミカルシフトを確認した。</p>
	実験内容	<p>化合物を D 化 DMSO に 40mM の濃度に溶解し、DMSO ストック溶液を作成した。次に化合物の DMSO ストック溶液を、終濃度 40uM で水系バッファー (50mM Sodium Phosphate, 50mM NaCl, pH6.8) に溶解させ、¹⁹F NMR スペクトルを測定した。DMSO の濃度は、全て 1% となるよう、調製した。</p> <p>また、ライブラリーのスクリーニングを行うため、化合物を混合させたものを作成し、¹⁹F NMR スペクトルを測定した。</p>
	結果及び考察	<p>ライブラリー化合物を DMSO に溶解させる際、3 化合物は、40mM の濃度では、DMSO に溶解しなかった。DMSO に溶解した、122 化合物について、¹⁹F NMR スペクトルを測定したところ、3 化合物では、信号がブロードになり (図 1)、6 化合物では、信号が二つ観測された (図 2)。また、¹⁹F NMR スペクトルでは、合成の際に混入したと思われる、F⁻ の信号が、-119.6 ppm 付近に殆ど全ての化合物で観測された。</p> <p>これらの化合物を除いた計 113 化合物について、10~11 化合物を混合し、再び ¹⁹F NMR スペクトルを測定し、単体で測定したケミカルシフトと変化がないことが確認できた。</p> <p>¹⁹F 核は GSA (ケミカルシフトの異方性) が大きく、化学構造の違いやコンフォメーション変化により、ケミカルシフトが大きく変化する。このため、信号が二つに分裂したり、ブロードになった化合物では、水溶液中での構造多型や、複数ある解離基の protonation の多型などを考慮する必要があると考えられる。</p> <p>水系バッファーに溶解した化合物の ¹⁹F NMR スペクトルに基づき化合物の混合パターンを最適化し、予備的な実験としてモデルタンパク質に適用することで、調製された化合物ライブラリーがスクリーニングに利用可能であることが分かった。</p>
社会・経済への波及効果の見通し		
成果公開時期の希望	<input checked="" type="checkbox"/> 即時公開 <input type="checkbox"/> 論文・特許公開後 (最大 2 年後まで)	
利用周辺環境に関する希望	<p>オートサンプルチェンジャーがあれば、測定時間の短縮が図れます。ご検討いただければ、と思います。</p>	
その他	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>	

本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての資料作成または発表をお願いする場合があります。

スペクトルまたは図の添付欄

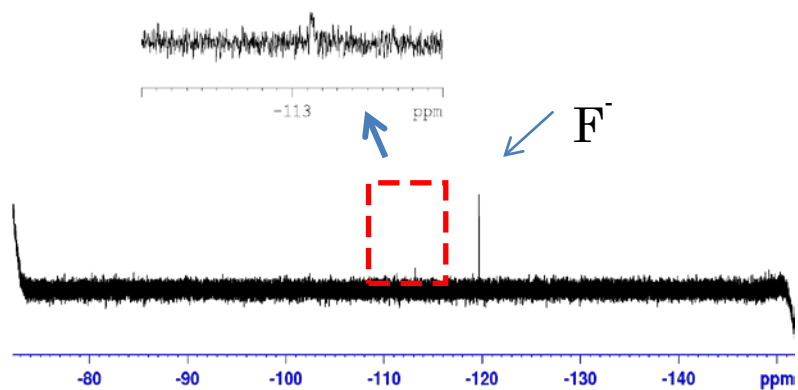


図 1. 化合物 A の ^{19}F NMR スペクトル。信号がブロードになった。

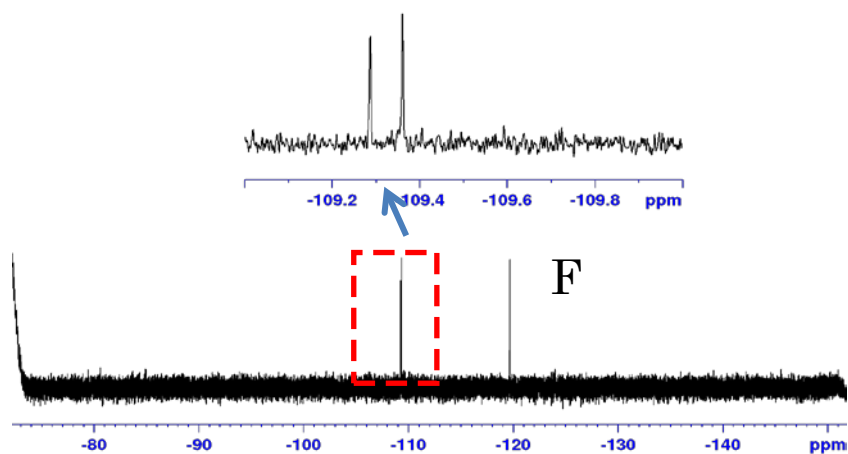


図 2. 化合物 B の ^{19}F NMR スペクトル。信号が二本に分かれた。

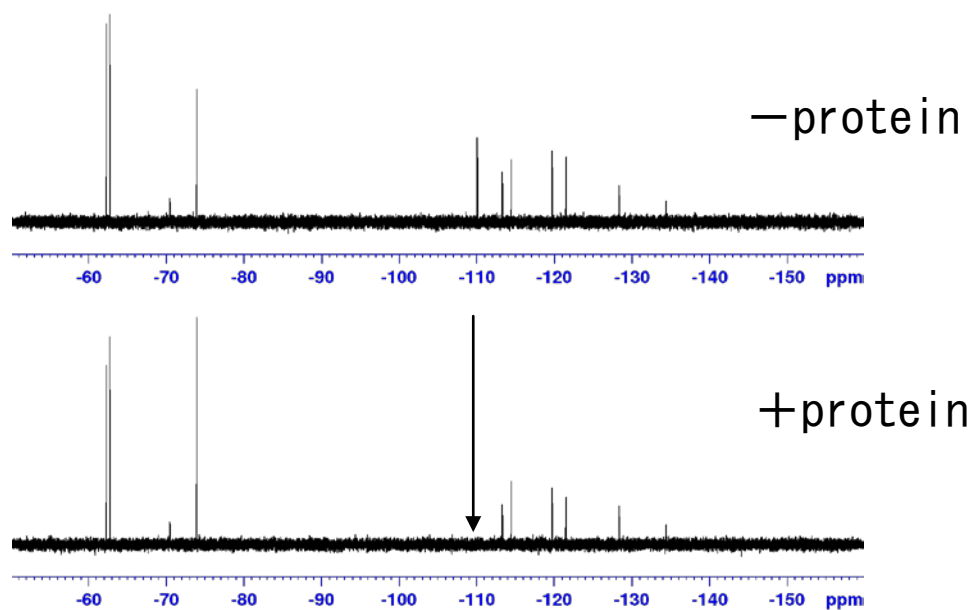


図 3. モデルタンパク質を用いたスクリーニング結果。矢印のピークがタンパク質添加によって、消失した。

