

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ないことがわかった。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 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 7 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) 感度が悪かったため、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 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 checked="" 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>

		平成 25 年度末までに、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 F 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。次にモデルタンパク質で、R ₂ フィルター法でスクリーニングを行い、ライブラリーが利用可能であることを確認した。平成 26 年度では、本課題の続きとして、スクリーニングでヒットした化合物のバリデーションを行うことを目的とした。
	実験内容	R ₂ フィルター法で相互作用が検出された化合物について、HSQC スペクトルを測定することにより、蛋白質側からの相互作用の確認を行った。また、結合部位を確認するため、蛋白質に結合する既知の低分子化合物を用い、 ¹⁹ F の R ₂ フィルター法で競合実験を行った。
	結果及び考察	平成 25 年度末の報告書に記載したように、モデルタンパク質を用いて R ₂ フィルター法でスクリーニングを行い、ライブラリーの中から、相互作用しているとみられる化合物を 3 個見出した。そこで、蛋白質側から、相互作用を確認するため、ヒット化合物を添加し、濃度依存的に、モデルタンパク質の HSQC の信号が変化するかどうか、調べた。その結果、化合物の濃度依存的な HSQC スペクトルの信号変化が観測され、化合物が相互作用していることが確認された (図 1)。次に、化合物の結合部位を確認するため、既知の結合物質 (K _D =1nM) を添加し、R ₂ フィルター法で調べたところ、既知化合物の添加によって、R ₂ フィルター法で消失したピークが再び観測された (図 2)。これは、化合物の結合が既知化合物によって阻害されたことを示しており、今回見出されたヒット化合物は、既知化合物と同じ結合部位であることが確認された。
社会・経済への波及効果の見通し		特になし
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		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。
その他		(上記の項目以外でご意見等お願いします。)

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

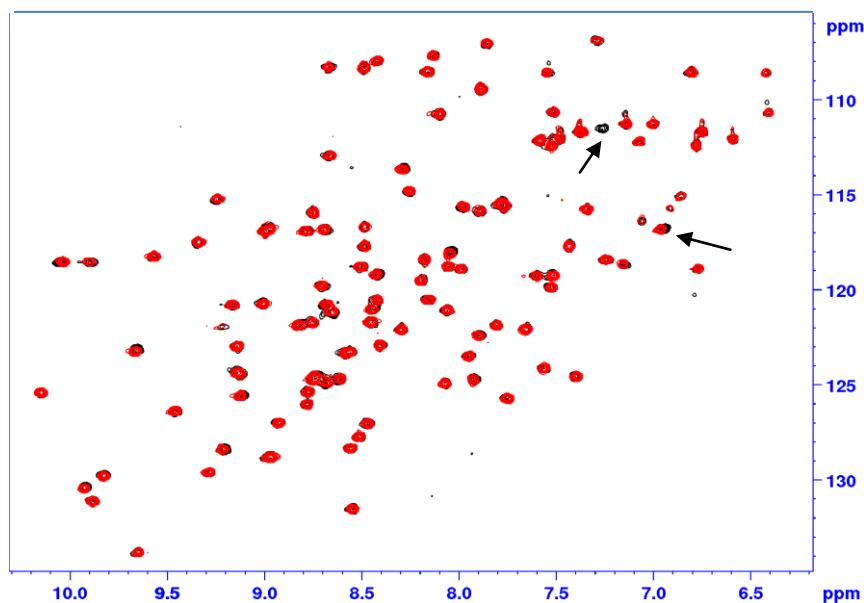


図 1. (赤) モデルタンパク質 (11uM) の ^{15}N HSQC スペクトル。(黒) モデルタンパク質 (11uM) に化合物 A (40uM) を添加した際の ^{15}N HSQC スペクトル。矢印のピークが変化し、化合物 A の結合が蛋白質側からも確認できた。

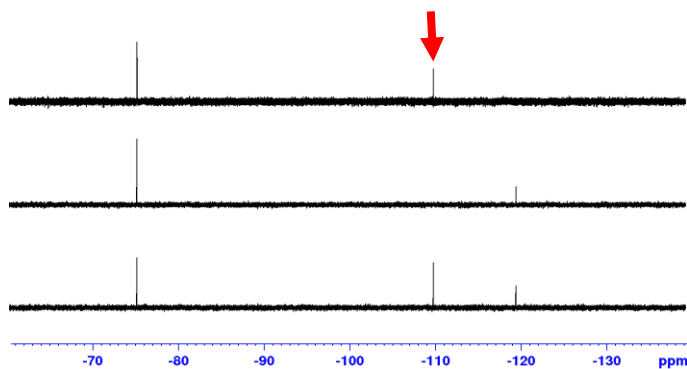


図 2. 化合物 A の ^{19}F R_2 フィルター NMR スペクトル。
(上) : 化合物 A (80uM) の ^{19}F R_2 フィルター スペクトル。化合物 A の信号は赤矢印。
(中) : モデルタンパク質 (11uM) に化合物 A (80uM) を添加した ^{19}F R_2 フィルター スペクトル。
(下) : (中) のスペクトルに既知結合化合物 (30uM) を添加した、 ^{19}F R_2 フィルター スペクトル。既知結合化合物によって、化合物 A の結合が阻害されたため、化合物 A の信号が再び観測された。