

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を用いたスクリーニング	
概要	<p>昨年度トライアルユースに採択していただいた利用課題「フッ素含有化合物ライブラリーの溶解度試験」で、水系バッファーに対する化合物の溶解度を調べたところ、殆どの化合物について、スクリーニングに使用可能であることが確認できた。さらに、試験的にFKBPを用いたスクリーニングを行った結果、3つのヒット化合物を見出すことができた。今回の申請では、本手法の優位性を示すため、製薬会社でターゲットとなることの多いタンパク質（キナーゼ）を用いて、¹⁹F核を用いた化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。</p> <p>二種類のキナーゼについて、スクリーニングを試したところ、ヒットする化合物の種類がキナーゼによって異なることがわかった。また、ATP結合部位に結合する既知阻害剤を用いて、競合実験を行ったところ、ヒット化合物は、ATP結合部位に結合していることがわかった。</p>	
利用実施時期及び期間	平成26年9月15日～平成27年3月14日 総利用日数：20日(400MHz)、3日(800MHz) 当初計画どおり 当初計画変更 (変更理由)	
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>平成25年度トライアルユースに採択していただいた利用課題「フッ素含有化合物ライブラリーの溶解度試験」で、水系バッファーに対する化合物の溶解度を調べたところ、殆どの化合物について、スクリーニングに使用可能であることが確認できた。今回の課題では、本手法の優位性を示すため、創薬ターゲットとして知られているタンパク質（キナーゼ）を用いて、400MHz NMR装置で¹⁹F核を用いた化合物ライブラリーのスクリ</p>

		ーニングを行うことを目的とした。
	実験内容	二種類のキナーゼについて、R ₂ フィルター法でフッ素含有化合物ライブラリーをスクリーニングした。化合物濃度は、40 μMで、20 化合物の混合、またキナーゼ濃度は 5 μMとした。また、R ₂ フィルター法の待ち時間は、280ms とした。さらに、相互作用が検出されたものについては、キナーゼの既知阻害剤を用いて、競合実験を行い、結合部位の推定も行った (図 1、図 2)。
	結果及び考察	二種類のキナーゼについて、200 化合物のスクリーニングを行ったところ、複数化合物について、結合が検出された (図 1、図 2)。また、同じ種類の化合物混合物でも、キナーゼの種類によって、ヒットする化合物の種類が異なることがわかった (図 1、図 2 の赤矢印)。例えば、図 1 の赤線で示した 3 つの化合物は、キナーゼ A に対しては、結合するが (図 1)、キナーゼ B に対しては、結合しないか、その結合が非常に弱い (図 2) ことが示唆された。二種類のキナーゼに使用した阻害剤は、ATP binder であることが知られている。結合したフラグメントの殆どは、阻害剤によって結合は阻害され、ATP 結合部位であることが確認された。 ヒット化合物が、ATP binder であるにも関わらず、キナーゼの種類によって、結合の有無が違うことが示唆されたのは、非常に興味深い。結合の強さについては、おそらく R ₂ フィルターの信号強度の比が小さいものほど結合が強いものと推察されるが、検証が必要である。
社会・経済への波及効果の見通し		¹⁹ F 核観測の実験では、プロトン観測に比べて、バッファーや溶媒の大きな信号を気にすることなく、スクリーニングが可能であり、重水素化溶媒を用いなくてよいという点で、非常に経済的である。今回の実験により、創薬ターゲットとしてよく知られているキナーゼについては、本法によりスクリーニング可能であることがわかった。多くの創薬ターゲットを含む膜タンパク質をターゲットとしたスクリーニングが本法により簡便になれば、これまで困難であった分野の新薬の開発が加速されることが見込まれ、新薬開発において非常に大きなインパクトを与えるものと思われる。
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。

Mix19

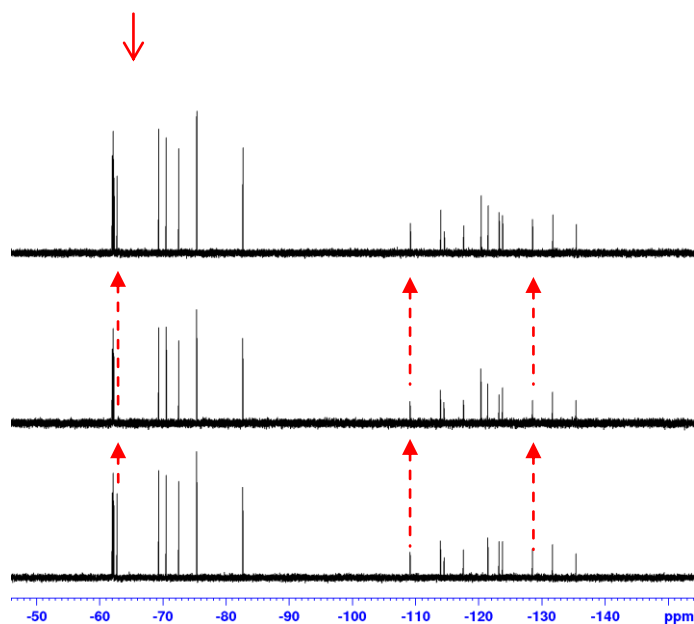


図 1. 化合物混合物の ^{19}F R_2 フィルター NMR スペクトル。

- (下) : 化合物混合物(それぞれ 40 μM)の ^{19}F R_2 フィルタースペクトル。
- (中) : kinaseA (5 μM)に化合物混合物(40 μM)を添加した ^{19}F R_2 フィルタースペクトル。
- (上) : (中)のスペクトルに既知阻害剤(30 μM)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、赤矢印の結合が阻害され、信号が再び観測された。

R2 filter

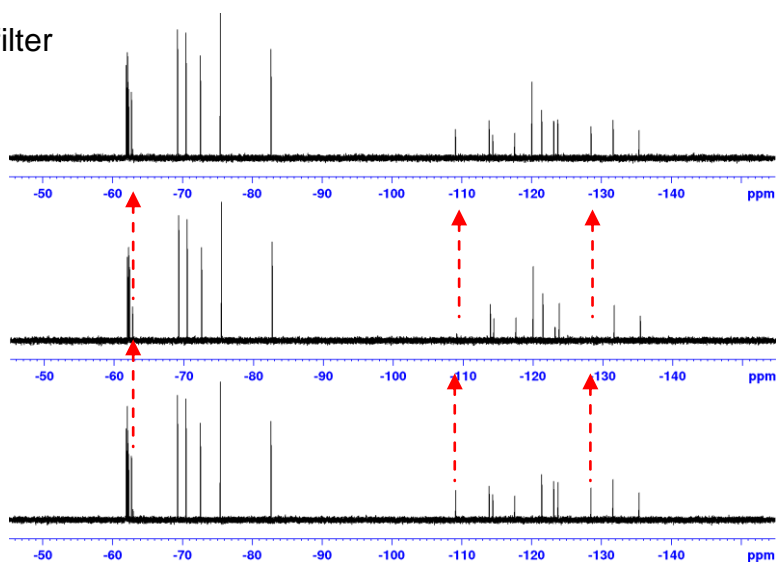


図 2. 化合物混合物の ^{19}F R_2 フィルター NMR スペクトル。

- (下) : 化合物混合物(それぞれ 40 μM)の ^{19}F R_2 フィルタースペクトル。
- (中) : kinaseB (5 μM)に化合物混合物(40 μM)を添加した ^{19}F R_2 フィルタースペクトル。
- (上) : (中)のスペクトルに既知阻害剤(10 μM)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、赤矢印の結合が阻害され、信号が再び観測された。