

実施課題名 ^{19}F 核を利用した低親和性リガンドの結合モード決定法の開発

【背景】

NMR 測定において、 ^{19}F 核は、 ^1H 核に次いで感度が良く、また、生体分子には存在しないので、バックグラウンドが見えない。近年、この利点を活かし、 ^{19}F NMRを用いたリガンド-タンパク質間の相互作用研究が盛んになりつつある。これまでに私たちは、 ^{19}F 含有フラグメントのNMR スクリーニング系の構築を行ってきた。スクリーニングヒットの誘導体化を展開する場合には、化合物とタンパク質の複合体構造が必要となる。ところが、親和性の低い化合物の場合、結晶構造解析が困難な場合が多い。そこで、本課題では、溶液NMR を用い、 ^{19}F 核を利用して、低親和性化合物の結合モードが決定できる方法を確立することを目的とする。

【実施内容】

リガンドの ^{19}F 信号の飽和または非飽和下で、 ^1H - ^{13}C HMQCを測定し、差スペクトルからリガンド-タンパク質間の相互作用情報を取得することを旨とし、今回は主にそのための条件検討を実施した。実験にはFKBP12タンパク質と、 ^{19}F スクリーニングによりFKBP12に結合することを同定した2化合物を用いた。まず、TrNOE の検討を行ったところ、2化合物のうちのひとつ(以下、化合物A という。)においてTrNOEの信号が確認できた(Fig.1)。次に、化合物A 単独、あるいは化合物A とFKBP12 を混合したサンプルを用い、 ^{19}F 飽和による ^1H 1D スペクトルの強度変化の検出を試みた。FKBP12由来の信号に関しては、飽和移動差(STD)は検出できなかったが、化合物由来の信号に関しては、単独及びFKBP12存在下ともに、STDが検出された。化合物のSTDスペクトルのパターンは、FKBP12の有無で異なっており、FKBP12との相互作用様式を反映している可能性が考えられた(Fig.2)。また、同様のサンプルを用い、 ^1H - ^{19}F HOESY実験を行った。化合物A分子内の信号のみが観測され、化合物AとFKBP12の間のNOEは観測されなかったが、化合物内のHOESYピーク強度がFKBP12の有無で変化することから、FKBP12との相互作用を反映していると考えられた。

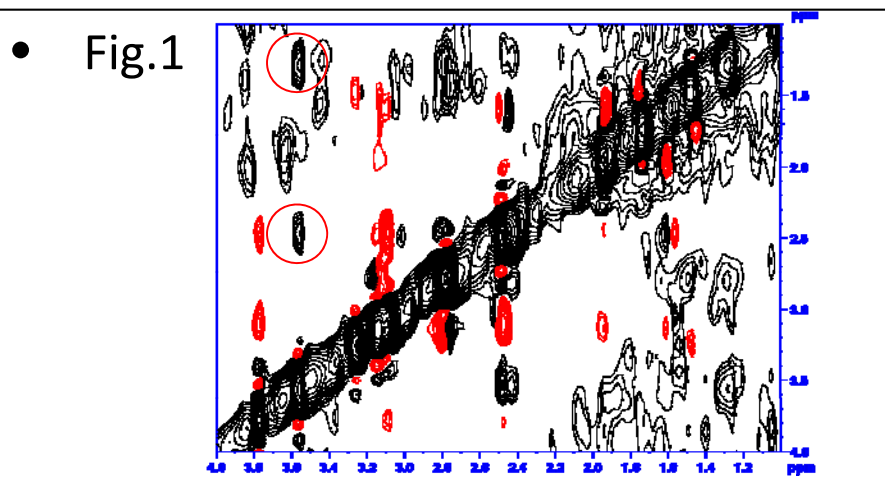


Fig.1説明 TrNOE スペクトル。負のNOE を赤で囲んで示す。

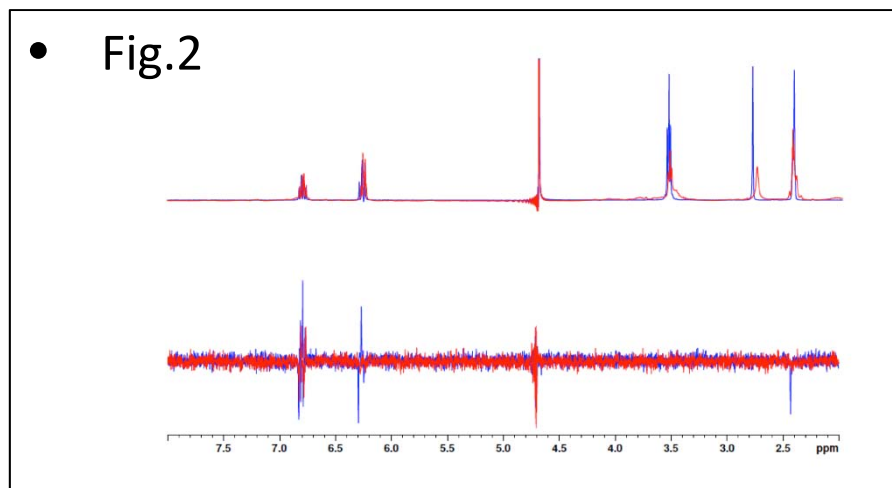


Fig.2説明 ^{19}F 飽和 ^1H 観測 STD測定。リファレンス(上)及びSTD(下)。青は化合物のみ、赤は化合物+タンパク質。

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用
利用報告書

申請番号	PF018	課題受付番号	PF15-400-003
実施機関名	帝人ファーマ株式会社		
実施部署名	生物医学総合研究所 創薬科学研究所		
実施責任者管理職名・氏名	職名	分子構造設計担当課長	氏名 上村みどり
実施部署所在地	〒191-8512 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号		
利用課題名	¹⁹ F 核を利用した低親和性リガンドの結合モード決定法の開発		
本課題の概要・目的	<p>¹⁹F 核は、¹H に次いで感度のよい核であり、また、生体分子には存在しない核であるので、バックグラウンドが見えない。近年、この利点を活かした ¹⁹F を用いたリガンドタンパク質間の相互作用研究が盛んになりつつある。</p> <p>これまで我々は、¹⁹F 核を利用した NMR スクリーニング法を確立すべく、大阪大学蛋白質研究所の NMR 装置群で、平成 25 年 2 月に、「フッ素含有化合物ライブラリーの溶解度試験」の課題名で、また平成 26 年 8 月には、「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」の課題名でトライアルユースに応募し、実験を行った。2 課題の利用によって、ライブラリー化合物の溶解度を調べて、使用可能な化合物を絞り込み、ライブラリーを作成することができた。また、R₂ フィルターでスクリーニングを行い、FKBP12 や複数のキナーゼに相互作用する化合物を見出し、本法の有効性を確認した。</p> <p>ヒットフラグメントから化合物の誘導体化を展開する場合には、化合物とタンパク質の複合体構造が必要となる。ところが、親和性の低い化合物の場合、結晶構造解析では、化合物結合モードを明確にできない場合が多い。そこで、本課題では、¹⁹F 核含有化合物という特徴を活かし、¹⁹F 核を利用して、化合物の結合モードが決定できる方法を確立することを目指す。</p>		
利用実施時期、及び期間	平成 27 年 1 月 9 日～平成 28 年 5 月 12 日 総利用日数： 27 日 当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由) 条件検討で問題があり、理研で実施予定であった実験を取りやめた。		
利用施設 大阪大学	NMR 装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・() 固体 500MHz、() DNP 固体 600MHz、 () DNP 固体 700MHz (高度化後)、() 固体 700MHz、 () 溶液 400MHz、() 溶液 500MHz、(○) 溶液 600MHz、 (○) 溶液 800MHz、(○) 溶液 950MHz 利用期間 1：平成 27 年 1 月 9 日～平成 27 年 1 月 12 日 利用期間 2：平成 27 年 1 月 27 日～平成 27 年 1 月 29 日 利用期間 3：平成 27 年 2 月 16 日～平成 27 年 2 月 16 日 利用期間 4：平成 27 年 2 月 25 日～平成 27 年 2 月 25 日 利用期間 5：平成 27 年 3 月 16 日～平成 27 年 3 月 16 日	

		<p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 固体 500MHz、() DNP 固体 600MHz、 () DNP 固体 700MHz (高度化後)、() 固体 700MHz、 (○) 溶液 400MHz、() 溶液 500MHz、() 溶液 600MHz、 () 溶液 800MHz、() 溶液 950MHz <p>利用期間 1 : 平成 28 年 4 月 9 日～平成 28 年 4 月 10 日 利用期間 2 : 平成 28 年 4 月 16 日～平成 28 年 4 月 17 日 利用期間 3 : 平成 28 年 4 月 20 日～平成 28 年 4 月 21 日 利用期間 4 : 平成 28 年 4 月 28 日～平成 28 年 5 月 1 日 利用期間 5 : 平成 28 年 5 月 6 日～平成 28 年 5 月 12 日</p>
その他の 利用施設		
成果の 概要	実施内容	<p>リガンドの ^{19}F 信号の飽和または非飽和下で、^1H-^{13}C HMQC を測定し、差スペクトルからリガンド-タンパク質間の相互作用情報を取得することを目指し、今回は主にそのための条件検討を実施した。実験には FKBP12 タンパク質と、^{19}F スクリーニングにより FKBP12 に結合することを同定した化合物を用いた。</p> <p>まず、TrNOE の検討を行った。2 種のヒット化合物、ネガティブコントロールとして FKBP12 との結合が見られなかった 1 種の化合物、および FKBP12 を混合して、タンパク質濃度、測定温度を変化させて 2 次元 NOESY スペクトルを測定した。</p> <p>次にヒット化合物のうちの一つ (以下、化合物 A という。) について、化合物のみ、および化合物と FKBP12 を混合したサンプルを用い、^{19}F 飽和 ^1H 検出の 1D 飽和移動差 (STD) 実験を行った。^{19}F 照射時間、サンプル濃度、測定温度を変化させ、^{19}F 飽和あるいは非飽和化で ^1H1D スペクトルを測定した。</p> <p>さらに、同様のサンプルを用い、^1H-^{19}F HOESY 実験を行った。サンプル濃度、測定温度、ミキシング時間を変化させて測定を行った。</p>
	本課題により得られた成果と当初目標との比較	<p>TrNOE 測定では、化合物 A について、タンパク質濃度が化合物の約 3%以上、温度 288 K 以下で TrNOE 信号が確認できた。^{19}F 飽和の STD 実験では、FKBP12 由来の信号に関しては、STD は検出できなかった。化合物由来の信号に関しては、単独及び FKBP12 存在下ともに、STD が検出された。低温 (283 K) では、化合物の STD のパターンが FKBP12 の有無で異なっていた。FKBP12 添加による STD への影響は、化合物の部位によって異なっており、FKBP12 との相互作用様式を反映している可能性が考えられた。^1H-^{19}F HOESY 実験では、化合物 A 分子内の信号のみが観測され、化合物 A と FKBP12 の間の NOE は観測されなかった。低温 (283 K) では化合物内の HOESY ピーク強度が FKBP12 の有無で変化することが分かった。</p> <p>予定ではリガンドの ^{19}F 信号の飽和または非飽和下で、タンパク質信号の STD を検討する予定であったが、今回の実験ではタンパク質側の STD は検出できなかった。タンパク質の STD 信号は弱いいため、オーバーラップの激しい ^1H1D 測定では検出が難しいと考えられた。</p>
	成果発表	無し

今後の展開	<p>今回の実験により、FKBP12 と化合物の間に NOE 生じさせるには低温が良いことが分かった。今回の測定結果をもとに、今後は 2 次元スペクトルを用い、¹⁹F 飽和によるタンパク質側の STD の検出を試みる。また、タンパク質の有無による化合物の STD や HOESY スペクトルの変化が見られたので、この変化から相互作用情報が取得できないかを検討する。</p> <p>FKBP12 での実験が成功すれば、キナーゼにも応用し、ターゲットを選ばないことを示したい。</p>
社会・経済への波及効果の見通し	<p>今回の結果はそのままでは波及効果は期待できない。今後の研究の進展により、簡便な方法で低親和性リガンドの結合モードが決定できることを示すことができれば、結晶構造解析の代替ツールとしての利用が期待でき、¹⁹F スクリーニング法とともに Drug discovery のプロセスの加速に貢献できると思われる。</p>
利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望	<p>高感度の ¹⁹F プローブの導入を希望します。</p>
今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待	
成果公開延期の希望の有無	<p>() あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :</p>
その他	