

実施課題名 ^{19}F -NMRを利用した薬剤蛋白質複合体モデルの構築

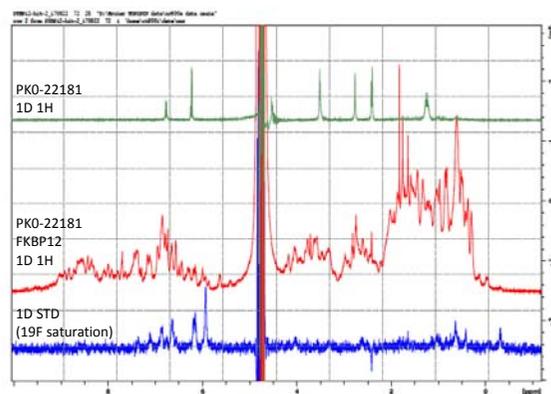
【背景】

これまで児嶋らは、フラグメントを中心とするフッ素含有化合物ライブラリを整備し、 ^{19}F -NMRスクリーニングの有効性を確認してきた。しかし、フラグメントヒット化合物をリード化合物へと効率的に展開するためには、化合物と蛋白質との複合体の構造情報の取得が重要なカギとなる。一般にフラグメントと蛋白質の親和性は低く、複合体の結晶構造を得ることは困難である。そこで、本課題では、 ^{19}F -NMRによる薬剤蛋白質間の結合情報を取得し、薬剤蛋白質複合体モデルの構築を目指す。

【実施内容】

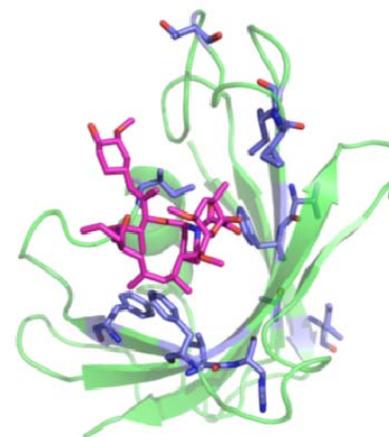
これまで児嶋らはフラグメントを中心とするフッ素含有化合物ライブラリを整備し、 ^{19}F -NMRスクリーニングの有効性を確認してきたが、本研究課題では、フッ素含有化合物ライブラリのさらなる整備に取り組み、フッ素含有化合物ライブラリを880化合物へと拡充することに成功した。フラグメントヒット化合物をリード化合物へと効率的に展開するために必要な化合物と蛋白質との複合体の構造情報の取得については、INPHARMA実験に取り組み、様々なターゲットで利用可能な実験条件の最適化に成功した。 ^{19}F -NMRによる薬剤蛋白質間の結合情報の取得に関しては、理化学研究所にて ^{19}F 信号飽和前後の ^{13}C -HSQC差スペクトルを測定した。感度が低い実験で、当初は信号が検出できなかったが、理化学研究所の協力を得てパラメータを最適化することで、1Dレベルではあるものの薬剤蛋白質間の距離情報を与える信号の検出に成功した(Fig.1)。このスペクトルの解析を進め信号の帰属を行うことで、薬剤蛋白質複合体の距離情報の取得に成功した。従来法によるNMR測定で得られた構造情報に ^{19}F -NMRで得られた構造情報を加え総合的に解析することで、最終的により精度の高い薬剤蛋白質複合体の構造モデルを構築することが可能となった(Fig.2)。

● Fig.1



^{19}F 信号飽和による ^{13}C -edited- ^1H 1D差スペクトル(ノイズが軽減され、薬剤蛋白質間の距離情報が得られた)

● Fig.2



蛋白質薬剤複合体構造(^{19}F -NMRから距離情報が得られたアミノ酸残基を青色で示している)

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

課題受付番号	PF16-01-R0-003		
利用課題名	19F-NMR を利用した薬剤蛋白質複合体モデルの構築		
実施機関名	横浜国立大学		
実施部署名	大学院工学研究院		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 児嶋長次郎
実施部署所在地	横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5		
本課題の概要・目的	<p>フラグメントヒット化合物をリード化合物へと効率的に展開するためには、化合物と蛋白質との複合体の構造情報の取得が重要なカギとなる。一般にフラグメントと蛋白質の親和性は低く、複合体の結晶構造を得ることは困難である。そこで、本課題では、19F-NMR による薬剤蛋白質間の結合情報を取得し、薬剤蛋白質複合体の構造モデルの構築を目指した。</p> <p>本研究課題では、フッ素含有化合物ライブラリのさらなる整備に取り組み、フッ素含有化合物ライブラリを 880 化合物へと拡充することに成功した。フラグメントヒット化合物をリード化合物へと効率的に展開するために必要な化合物と蛋白質との複合体の構造情報の取得については、INPHARMA 実験に取り組み、様々なターゲットで利用可能な実験条件の最適化に成功した。19F-NMR による薬剤蛋白質間の結合情報の取得に関しては、理化学研究所にて 19F 信号飽和前後の 13C-HSQC 差スペクトルを測定することで、薬剤蛋白質複合体の距離情報の取得に成功した。従来法による NMR 測定で得られた構造情報に 19F-NMR で得られた構造情報を加え総合的に解析することで、最終的により精度の高い薬剤蛋白質複合体の構造モデルを構築することが可能となった。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 28 年 9 月 7 日～平成 30 年 3 月 31 日</p> <p>総利用日数：28 日</p> <p>当初計画どおり・当初計画変更</p> <p>(変更理由)当初目的を概ね達成したため、早期終了する。</p>		
利用施設 理化学研究所	NMR 装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・(○) 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1：平成 28 年 12 月 6 日～平成 28 年 12 月 12 日 利用期間 2：平成 29 年 4 月 17 日～平成 29 年 4 月 24 日 利用期間 3：平成 29 年 8 月 21 日～平成 29 年 8 月 28 日</p>	

<p>利用施設 大阪大学</p>	<p>NMR装置 (該当部分に ○)</p>	<p>利用装置①</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 固体 500MHz、() DNP 固体 600MHz、() DNP 固体 700MHz、 () 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 9 月 7 日～平成 28 年 9 月 10 日</p>
		<p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 固体 500MHz、() DNP 固体 600MHz、() DNP 固体 700MHz、 () 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 10 月 1 日～平成 28 年 10 月 1 日</p>
		<p>その他の 利用施設</p>
<p>成果の 概要</p>	<p>実施内容</p>	<p>19F 核は 1H に次いで感度が良く、1H と比較してスペクトルが単純なこと、生体内に存在しないためバックグラウンドが見えないことなどから、近年 19F-NMR を用いた創薬研究が注目されている。これまで申請者らは、フラグメントを中心とするフッ素含有化合物ライブラリを整備し、19F-NMR スクリーニングの有効性を確認してきた。しかし、フラグメントヒット化合物をリード化合物へと展開するためには、化合物蛋白質複合体の構造情報が必要となる。一般にフラグメントと蛋白質の親和性は低く、複合体の結晶構造を得ることは困難である。そこで、本課題では、19F-NMR を用いて薬剤蛋白質複合体の構造情報を取得し、構造モデルを構築することを目指した。</p> <p>具体的な実施内容は、フッ素含有化合物ライブラリの整備、INPHARMA 実験、19F-NMR 実験、薬剤蛋白質複合体の構造モデルの構築の 4 つからなる。フッ素含有化合物ライブラリの整備では化合物の拡充を、INPHARMA 実験では実験条件の最適化を、19F-NMR 実験では 19F 信号飽和または非飽和下での 13C-HSQC 差スペクトルの測定条件の最適化を検討し、最終的に構造モデルの構築に取り組んだ。</p>

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較</p>	<p>フッ素含有化合物ライブラリの整備では、フッ素含有化合物ライブラリを 220 化合物から 880 化合物へと拡充することに成功した。フラグメントヒット化合物をリード化合物へと効率的に展開するために必要な化合物と蛋白質との複合体の構造情報の取得については、INPHARMA 実験に取り組み、様々なターゲットで利用可能な実験条件の最適化に成功した。19F-NMR による薬剤蛋白質間の相互作用情報の取得に関しては、理化学研究所にて 19F 信号飽和前後の 13C-HSQC 差スペクトルを測定した。感度が低い実験で、当初は信号が検出できなかったが、理化学研究所の協力を得てパラメーターを最適化することで、1D レベルではあるものの薬剤蛋白質間の距離情報を与える信号の検出に成功した。このスペクトルの解析を進め信号の帰属を行うことで、薬剤蛋白質複合体の距離情報の取得にも成功した。従来法による NMR 測定で得られた構造情報に 19F-NMR で得られた構造情報を加え総合的に解析することで、最終的により精度の高い薬剤蛋白質複合体の構造モデルを構築することが可能となった。</p> <p>当初目標は概ね達成された。</p>
<p>成果発表</p>	
<p>今後の展開</p>	<p>本課題で得られた成果については、その詳細を論文として公表することで、広くノウハウを共有する。また、拡充されたフッ素含有化合物ライブラリについては、19F-NMR スクリーニングサービスとして大阪大学を通じて有償で公開する。今後の方向性としては、異なる蛋白質でも本技術が有効であることを示すとともに、高分子量蛋白質など困難な系で利用可能な技術を開発したい。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>本課題では 19F-NMR を用いることで低親和性フラグメントでも薬剤蛋白質複合体の構造モデルが構築可能であることが示された。このような簡便な方法で低親和性リガンドの複合体の構造モデルが構築可能であることから、19F スクリーニング法とともに、創薬研究のプロセスの加速に NMR が大きく貢献すると期待できる。</p>
<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>	<p>施設利用については大阪大学も理化学研究所もよく整備されていると感じた。両施設の施設スタッフのサポートに心より感謝したい。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>NMR 技術開発や基礎研究への継続的なサポートを期待する。</p> <p>NMR 共用プラットフォーム（利用したのは大阪大学と理化学研究所）の持つポテンシャルの高さを考えると世界を牽引することが可能だと思われるが、外部利用者による装置利用と施設側の研究者の相乗的な効果は不十分であり、非常にもったいないと感じた。一般に、生体系 NMR 研究では試料調製が可能な実験室と測定場所を近くに設置することで飛躍的に利便性が向上する。国内有数のレベルの高い研究者が多数利用する大型 NMR 施設において、試料調製が可能な滞在型オープンラボを設置することで、国内外からトップサイエンティストが集うことが期待され、研究レベルの相乗的な向上も期待できる。これによって、海外に流れがちな国内企業の投資を国内に呼び戻し、企業およびアカデミックの循環的かつ相乗的な研究力アップ</p>

	<p>が期待できる。これら一連のプロセスによって、外部利用者による装置利用と施設側の研究者に相乗的な効果が生まれ、世界を牽引する施設が生まれるのではないか。NMR 共用プラットフォームの施策によって、5年後10年後にそのようなNMR施設が多数生まれることを期待する。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>