

実施課題名：高分子量蛋白質をターゲットとした ^{19}F -NMRスクリーニング

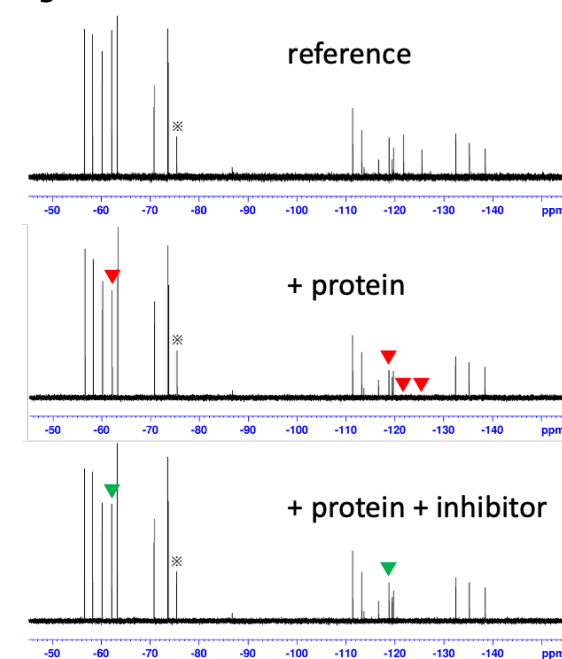
【背景】フラグメント創薬ではNMRが主要技術の一つとして広く認知されており、その中でもフッ素含有化合物ライブラリを用いた ^{19}F -NMRスクリーニング技術は世界的に利用頻度が高い。本利用者は大阪大学と共同で分子量300以下の高溶解度化合物に特化したフッ素含有化合物ライブラリを構築しており、本課題ではこれを高分子量蛋白質に適用した。本利用者らはすでに ^{19}F -NMRスクリーニング技術が膜蛋白質にも適用可能であることを示している (Shinya et al., RSC Med Chem 2022)。しかし、NMRを用いて薬剤蛋白質複合体の構造情報を得る手法は低分子量蛋白質をターゲットにした場合に限られるため、高分子量蛋白質をターゲットにした新たなNMRフラグメント創薬技術の開発が待ち望まれている。そこで、本課題では、大阪大学蛋白質研究所NMR装置群が保有するフッ素含有化合物ライブラリと ^{19}F 創薬装置技術を用い、高分子量蛋白質をターゲットとしたNMRフラグメント創薬技術の開発を試みた。

【実施内容】本研究では、高分子量蛋白質をターゲットとしたNMRフラグメント創薬技術を開発するために、試料調製、 ^{19}F -NMRスクリーニング、相互作用部位解析、の3つを実施した。スクリーニングに用いる高分子量蛋白質の試料調製では横浜国立大学の児嶋長次郎教授らの協力を、 ^{19}F -NMRスクリーニングと相互作用部位解析では大阪大学蛋白質研究所NMR施設の協力を得て実施した。具体的には、高分子量蛋白質の試料調製では、複数の蛋白質発現コンストラクトを作成し、大腸菌大量発現系を用いて発現精製を行った。スクリーニングには、可溶性で高純度に精製できたコンストラクトの中で最も全長に近いものを用いた。 ^{19}F -NMRスクリーニングでは、蛋白質試料の濃度を通常より低く、観測時の T_2 フィルターのエコー時間を長く設定し、サンプルロットを変えて複数回測定した。相互作用部位解析では、結合部位が既知の薬剤を用いて ^{19}F -NMR競合実験を行った。

【本課題により得られた成果】本課題では、高分子量蛋白質をターゲットにしたNMRフラグメントスクリーニング手法の開発を行い、以下の成果を得た。

- 1) 高分子量蛋白質をターゲットとした ^{19}F -NMRスクリーニングは概ね従来法と同じだが、測定条件を少し工夫することで安定にヒット化合物を得ることが出来る。具体的には、ターゲット蛋白質の濃度を低く、 T_2 フィルターのエコー時間を長く設定し、サンプルロットを変えて複数回測定することで改善する。
- 2) 高分子量蛋白質をターゲットにしたNMRフラグメントスクリーニングではヒット化合物が多くなる。
- 3) 高分子量蛋白質をターゲットにしたNMRフラグメントスクリーニングにおいても従来法と同様に、結合部位既知の化合物を競合阻害に用いることでヒット化合物の結合部位解析を進めることが出来る。例えば、本研究において結合部位既知の阻害剤と競合しない薬剤が多数存在したことから、薬剤の結合部位が複数存在する可能性が高いと考えられる。他のターゲットで頻繁にヒットする化合物を除外するなど、この結合部位解析技術を発展させることによって、非特異的に結合する化合物や弱く結合する化合物をヒット化合物から除外できるようになると期待される。

Fig. 1



高分子量蛋白質をターゲットとした ^{19}F -NMRスクリーニング、および、相互作用部位解析の結果

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF23-01-065			
利用課題名	高分子量蛋白質をターゲットとした ^{19}F -NMR スクリーニング			
所属機関	CBI 研究機構			
所属部署	量子構造生命科学研究所			
役職・氏名	役職	所長	氏名	上村 みどり
利用実施時期、及び期間	2024 年 2 月 7 日～2024 年 7 月 11 日 総利用日数: 15 日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) 当初予定よりも早い段階で候補化合物が得られ、当初計画より測定時間を短縮した。			

1. 本課題の概要・目的

【概要・目的】本課題では、大阪大学蛋白質研究所 NMR 装置群が保有するフッ素含有化合物ライブラリと ^{19}F -NMR 創薬装置技術、および、東京大学大学院薬学系研究科 NMR 施設が保有する高分子量蛋白質解析技術を用い、高分子量蛋白質をターゲットとした NMR フラグメント創薬技術を開発した。

【背景】フラグメント創薬では NMR が主要技術の一つとして広く認知されており、その中でもフッ素含有化合物ライブラリを用いた ^{19}F -NMR スクリーニング技術は世界的に利用頻度が高い。本利用者は大阪大学と共同で分子量 300 以下の高溶解度化合物に特化したフッ素含有化合物ライブラリを構築しており、本課題ではこれを高分子量蛋白質に適用した。本利用者らはすでに ^{19}F -NMR スクリーニング技術が膜蛋白質にも適用可能であることを示している (Shinya et al., RSC Med Chem 2022)。しかし、薬剤蛋白質複合体の構造情報を得る手法は低分子量蛋白質をターゲットにした場合に限られ、高分子量蛋白質をターゲットにした NMR フラグメント創薬技術の開発が待ち望まれている。近年、東京大学の竹内恒教授らによって ^{15}N 直接観測 TROSY 法や ^{19}F - ^{13}C TROSY 法などの革新的な高分子量蛋白質解析技術が開発され、今まで困難であった薬剤蛋白質複合体の構造情報が得られる可能性が高まっている。

2. 成果の概要

実施内容

本研究では、高分子量蛋白質をターゲットとした NMR フラグメント創薬技術を開発するために、試料調製、 ^{19}F -NMR スクリーニング、相互作用部位解析、の 3 つを実施した。スクリーニングに用いる高分子量蛋白質の試料調製では横浜国立大学の児嶋長次郎教授らの協力を、 ^{19}F -NMR スクリーニングと相互作用部位解析では大阪大学蛋白質研究所 NMR 施設の協力を得て実施した。具体的には、高分子量蛋白質の試料調製では、複数の蛋白質発現コンストラクトを作成し、大腸菌大量発現系を用いて発現精製を行った。スクリーニングには、可溶性で高純度に精製できたコンストラクトの中で最も全長に近いものを用いた。 ^{19}F -NMR スクリーニングでは、蛋白

質試料の濃度を通常より低く、観測時の T_2 フィルターのエコー時間を長く設定し、サンプルロットを変えて複数回測定した。相互作用部位解析では、結合部位が既知の薬剤を用いて ^{19}F -NMR 競合実験を行った。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

【本課題により得られた成果】本課題では、高分子量蛋白質をターゲットにした NMR フラグメントスクリーニング手法の開発を行い、以下の成果を得た。

- 1) 高分子量蛋白質をターゲットとした ^{19}F -NMR スクリーニングは概ね従来法と同じだが、測定条件を少し工夫することで安定にヒット化合物を得ることが出来る。具体的には、ターゲット蛋白質の濃度を低く、 T_2 フィルターのエコー時間を長く設定し、サンプルロットを変えて複数回測定することで改善する。
- 2) 高分子量蛋白質をターゲットにした NMR フラグメントスクリーニングではヒット化合物が多くなる。
- 3) 高分子量蛋白質をターゲットにした NMR フラグメントスクリーニングにおいても従来法と同様に、結合部位既知の化合物を競合阻害に用いることでヒット化合物の結合部位解析を進めることが出来る。例えば、本研究において結合部位既知の阻害剤と競合しない薬剤が多数存在したことから、薬剤の結合部位が複数存在する可能性が高いと考えられる。他のターゲットで頻繁にヒットする化合物を除外するなど、この結合部位解析技術を発展させることによって、非特異的に結合する化合物や弱く結合する化合物をヒット化合物から除外できるようになると期待される。

【当初目標との比較】当初目標は、大阪大学蛋白質研究所 NMR 装置群が保有するフッ素含有化合物ライブラリと ^{19}F 創薬装置技術、および、東京大学大学院薬学系研究科 NMR 施設が保有する高分子量蛋白質解析技術を用い、高分子量蛋白質をターゲットとした NMR フラグメント創薬技術を開発することであった。しかし、 ^{19}F -NMR スクリーニングで用いた高分子量蛋白質は収量が少なく濃縮も困難であり、東京大学の高分子量蛋白質解析技術は一定レベル以上の収量と濃度が必要なことから、本課題において性状の優れた高分子量蛋白質の調整を進めてきたが、今のところ性状の大幅な改善には至っていない。

成果発表

なし

今後の展開

本課題で得られた成果は、論文や特許として広く世界に公開するとともに、X 線結晶構造解析や化合物の合成展開などと相補的に組み合わせることで創薬につなげる。本課題により得られた NMR 技術は、他の高分子量蛋白質へ適用していくことで汎用性と適用限界を明らかにしていきたい。本課題で取り組んだ高分子量蛋白質をターゲットにした NMR フラグメント創薬技術開発は学術的に未開拓であり、電子顕微鏡技術と連携した新しい NMR 技術の開発など、従来型の発想にとらわれない革新的なアプローチが有効である可能性がある。今後は、様々なアプローチで本技術を完成させてゆきたい。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

最初に述べたように、フラグメント創薬では NMR が主要技術の一つとして広く認知されており、その中でもフッ素含有化合物ライブラリを用いた ^{19}F -NMR スクリーニング技術は世界的に利用頻度が高い。また、高分子量蛋白質をターゲットにした NMR フラグメント創薬技術はニーズが高い。本研究では、このニーズに応える形で高分子量蛋白質をターゲットとした ^{19}F -NMR スクリーニング技術の開発に取り組み、すでに一定の成果を得ている。今後の研究の進展によって本研究の当初目標が達成され、フラグメント創薬技術が大きく発展することで、創薬研究が大幅に加速されると期待される。これによって、病気の治療に貢献できていない患者さんへの新たな選択肢の提供や既存の薬では治療が難しい病気への対応が加速され、その結果、将来のパンデミックや医療の危機に備える国民の健康と安全保障に寄与する。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

大阪大学が保有するフッ素含有化合物ライブラリと ^{19}F 創薬装置技術を用いたフラグメントスクリーニング技術は高い運用実績があり、ヒット率も高く、非常に有益ですので、今後も、是非、この優れた利用環境を維持していただきたい。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

世界最先端の NMR 装置利用環境を維持していただくとともに、創薬への継続的なサポートをお願いしたい。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

成果報告書の公開延期は希望しないが、具体的な創薬ターゲットに関する情報は、論文や特許として公開されるまで情報公開の延期を希望する。

7. その他

8. 利用施設

大阪大学

溶液 400MHz

利用期間 1: 2024 年 2 月 7 日～2024 年 2 月 10 日

利用期間 2: 2024 年 2 月 14 日～2024 年 2 月 16 日

利用期間 3: 2024 年 6 月 19 日～2024 年 6 月 24 日

利用期間 4: 2024 年 7 月 10 日～2024 年 7 月 11 日

9. その他の利用施設