

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05185

研究課題名（和文）標的タンパク質との相互作用における含フッ素リガンド結合部位の高感度検出法の開発

研究課題名（英文）Development of the sensitive methods for detection of the fluorinated compounds bound to the target proteins

研究代表者

田代 充（Tashiro, Mitsuru）

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：40315750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、標的タンパク質と結合するフッ素化合物（リガンド）の検出において、フッ素原子核を選択的マーカーとして、高感度に検出可能な核磁気共鳴法（NMR）の開発を行った。この測定法では、分子間相互作用に参与するリガンド中の部位を、フッ素原子で特異的に検出し、原子レベルで解析できる特徴を有する。

実際の測定では、 ^1H 照射 - ^1H 検出飽和移動差（STD）スペクトル、および ^1H 照射 - ^{19}F 検出STDスペクトル測定を行い、フッ素核の直接検出した。また、 ^{19}F 観測による縦緩和時間、および拡散係数測定をタンパク質存在下、非存在下で行い、タンパク質との相互作用解析に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤とタンパク質との相互作用は、酵素阻害剤など生体反応において重要な役割を果たす。本研究では、フッ素を含む薬剤とタンパク質との相互作用解析に焦点を当てた。通常、フッ素はタンパク質には含まれないため、フッ素検出が直接的に含フッ素薬剤の検出になる。この選択制を利用し、フッ素原子核および水素原子核を観測し、含フッ素薬剤の構造において、どの部分がタンパク質との相互作用に強く関与するかを解析した。抗ウイルス薬など、酵素阻害剤としての機能を有する含フッ素医薬品の作用機序の解析に役立つ分析手法と考えられ、社会的要請度の高い研究と思われる。

研究成果の概要（英文）：In the present research, the NMR-based screening techniques with selective ^{19}F detections were applied to a protein-ligand complex. The highly sensitive and selective methods to observe ligands at the atomic level were developed. In purpose of identifying the ^{19}F as well as ^1H binding epitopes of the fluorinated compounds, the combinatorial analysis using $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ and $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ saturation transfer difference (STD) experiments and were carried out. The ^{19}F -T1 and ^{19}F -diffusion coefficients were also measured to observe the intermolecular interaction between fluorinated compounds and proteins.

研究分野：分析化学

キーワード：フッ素医薬品 タンパク質 分子間相互作用 核磁気共鳴スペクトル

1. 研究開始当初の背景

医薬品の開発過程において簡便、廉価なスクリーニング系の確立は不可欠であり、特に *in vitro* でのスクリーニング系として有効な方法が望まれる。ここ数年、核磁気共鳴 (NMR) 法の薬剤スクリーニングへの応用が試みられており、有効なスクリーニング法として注目されている。既存の方法の代表例として、レセプターとなるタンパク質を ¹⁵N などの安定同位体で標識し、そのタンパク質と結合するリガンド (薬剤などに相当) との分子間相互作用を 2 次元 NMR で観測することにより、高親和性のリガンドを探索する手法がある。20-30 分程度の短時間で結果を得られる長所があるが、安定同位体などのコストがかかることや帰属が可能なタンパク質の分子量に制限 (約 30 kD) があることが短所として挙げられる。他の測定法として、WaterLOGSY 法、NOE-ポンピング法、Saturation Transfer Difference (STD) 法などが 1990 年代後半に提案されているが、製薬会社で使用されている実践的なスクリーニング法は、論文や学会など外部で発表されることは極めて少なく、一部の成功例のみが発表されている。NMR 以外のアッセイ法を含め、多くの手法が試みられていた。

2. 研究の目的

論文などで発表されている数種類の測定法の長所・短所を踏まえ、ターゲットであるレセプター分子との結合に寄与するリガンドの部位を原子レベルで精確に特定できる高感度な NMR 測定法の開発を目指す。本申請課題では、標的タンパク質と結合する含フッ素化合物 (リガンド) の検出において、フッ素原子をマーカーとして、高感度および選択的に検出できる核磁気共鳴法の開発を行った。軽水溶液 (95% H₂O+5% D₂O) として測定可能であり、親和性のあるリガンドの高精度選択的検出に加え、分子間相互作用に参与するリガンド中の原子団を、フッ素原子に着目して特異的に検出し、原子レベルで解析できる手法の開発を目的とした。一般的に普及している NMR 分光計を使用し、新規 ¹⁹F-¹H スペクトルの測定を行う。

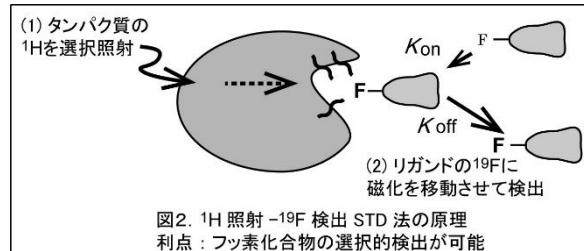
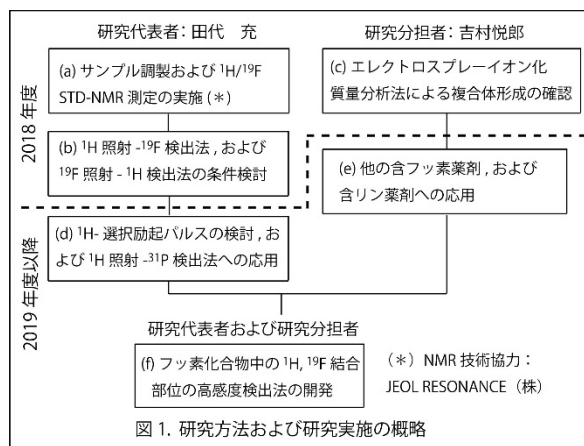
3. 研究の方法

【概要】 研究方法および研究実施の概略を図 1 に示す。複合体調製、核磁気共鳴法に関する研究は研究代表者が担当し、質量分析および他のモデルシステムの構築は研究分担者が担当した。また、HFx プローブや分光計に関しては JEOL RESONANCE (株) に技術協力を要請し、必要に応じて測定依頼を行った。

【レセプター分子との複合体における含フッ素化合物の高精度選択的検出法の開発】
複合体の調製では、レセプターおよびリガンド共に市販品を使用し、試料調製を簡略化する。実際のモデルシステムとして、ヒト血清アルブミン - フレロキサシンを使用した。既存の測定法では、レセプターに結合するリガンド分子の ¹H 以外に、タンパク質由来の ¹H シグナルも観測されることが多く、リガンド検出の妨害シグナルとなる。フレロキサシンなどの含フッ素化合物をリガンドとして用いる場合、フッ素による特異的検出が有効な解析法になるものと期待できる。最初に水またはタンパク質の ¹H を選択励起し、その磁化をリガンド中の ¹⁹F に移動させる (図 2)。選択励起方法および磁化移動の方法に焦点をあてて、パルスシーケンスの検討を行った。

4. 研究成果

【フッ素化合物 - タンパク質複合体の解析】 図 2 に示す ¹H 照射 - ¹⁹F 検出飽和移動差 (STD) 測定法の原理に基づき、含フッ素化合物のみに存在する ¹⁹F での選択的検出を行った。図 3 にフルロキサシンの構造式、(下) ¹⁹F NMR スペクトル、(上) ¹H 照射 - ¹⁹F 検出 STD スペクトルを示す。試料は 0.06 mM ヒト血清アルブミン



ン + 6.0 mM フルロキサシンである。フルロキサシン 1 分子中に 3 原子のフッ素が存在する。図 2 に示す ^{19}F 選択的検出は可能になった。 ^{19}F は ^1H と同様に NMR 法では高周波核に分類され、通常の 1 次元スペクトル測定では、 ^1H と同等の検出感度を得られた(図 3 下)。 ^1H , ^{19}F 共に高周波核であり、 ^1H を 1.00 としたときの ^{19}F の相対感度は 0.833 であることより、当初、 $^1\text{H} \cdot \cdot \cdot ^{19}\text{F}$ 測定と $^1\text{H} \cdot \cdot \cdot ^1\text{H}$ 測定では、ほぼ同等の感度を得られるものと予想したが、 ^1H 照射 - ^{19}F 検出での感度が予想外に低くなる結果が得られた(図 3 上)。 ^1H 選択照射パルスの検討を行い、高感度なスペクトルが得られるパルスシーケンスを検討した。

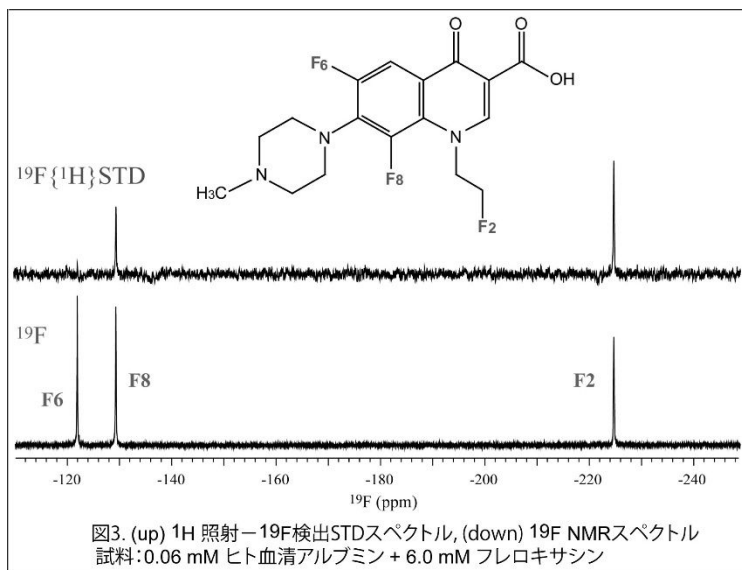


図3. (up) ^1H 照射 - ^{19}F 検出 STD スペクトル, (down) ^{19}F NMR スペクトル
試料: 0.06 mM ヒト血清アルブミン + 6.0 mM フルロキサシン

【リン化合物—タンパク質複合体解析への応用】

ヒリン化合物として 2'-GMP、タンパク質としてヒストンを選択し、 ^{31}P 検出に着目して複合体解析を行った(図 4)。ヒストンは細胞中の核に存在するタンパク質であり、染色体である DNA を巻き付けて、コンパクトに納める役割を果たしている。このタンパク質とヌクレオチドである 2'-GMP との相互作用を NMR 観測核である ^{31}P を選択的マーカーとして検出して解析を行った。

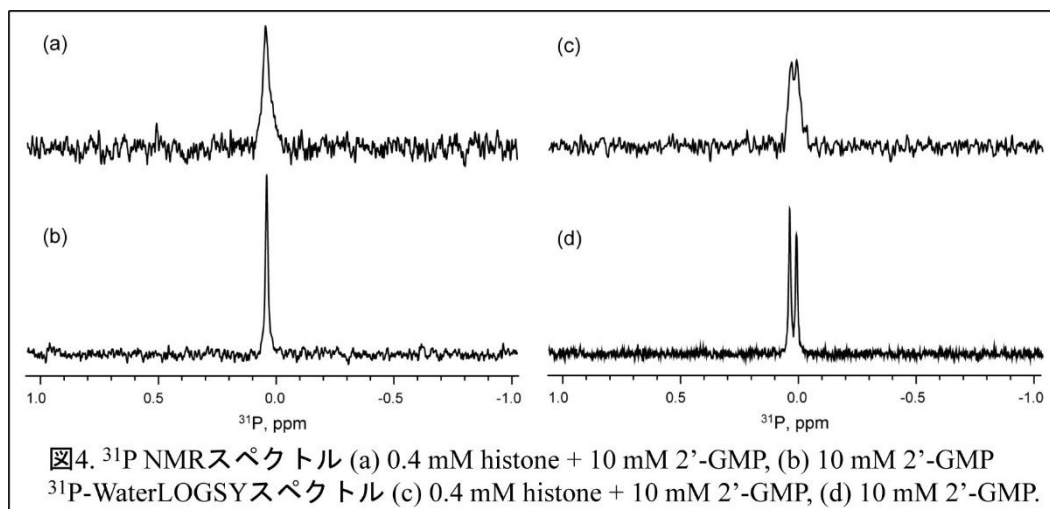


図4. ^{31}P NMR スペクトル (a) 0.4 mM histone + 10 mM 2'-GMP, (b) 10 mM 2'-GMP
 ^{31}P -WaterLOGSY スペクトル (c) 0.4 mM histone + 10 mM 2'-GMP, (d) 10 mM 2'-GMP.

また、 ^{31}P 検出による拡散係数測定、たて緩和時間測定をモル比を変えて行い、水溶液中における分子の挙動、原子の運動性に着目して、相互作用解析を行った(表 1)。

表 1 ^{31}P diffusion coefficients and ^{31}P - T_1 of 2'-GMP at various molar ratio.

Sample (histone : 2'-GMP) ^a	^{31}P diffusion coefficients ($\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)	^{31}P - T_1 (s)
10 mM 2'-GMP	3.75±0.12	1.77±0.05
1 : 160	3.43±0.15	1.69±0.03
1 : 80	3.22±0.08	1.61±0.02
1 : 50	2.99±0.24	1.49±0.08
1 : 25	2.66±0.07	1.23±0.04

^a A concentration of 2'-GMP was fixed to 10 mM in each solution.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hiroki Hosaka, Sayaka Shirai, Sora Fujita, Mitsuru Tashiro, Takako Hirano, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio	4. 巻 67(4)
2. 論文標題 Enzymatic Synthesis and Structural Confirmation of Novel Oligosaccharide, D-Fructofuranose-linked Chitin Oligosaccharide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Appl. Glycosci.	6. 最初と最後の頁 129-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2020_0009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Noriyuki SUKA, Kaori OKIZUMI, Kazuo FURIHATA and Mitsuru TASHIRO	4. 巻 36(12)
2. 論文標題 Analysis of Binding Mode of 2'-GMPto Proteins Using 1H/31P NMR Spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1551-1553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20N014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kazuo FURIHATA and Mitsuru TASHIRO	4. 巻 36(7)
2. 論文標題 Identification of Binding Epitopes of Fluorinated Compound Bound to Proteins using 1H/19F NMR spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 881-883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19N033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kazuo Furihata and Mitsuru Tashiro	4. 巻 5(2)
2. 論文標題 Sensitive Water-ligand Observed via Gradient Spectroscopy with 19F Detection for Analysis of Fluorinated Compounds Bound to Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magnetochemistry	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/magnetochemistry5020029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuo Furihata and Mitsuru Tashiro	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 Improved $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ saturation transfer difference experiments for sensitive detection to fluorinated compound bound to proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magnetochemistry	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/magnetochemistry5010001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuo Furihata and Mitsuru Tashiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Improved $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ saturation transfer difference experiments for sensitive detection to fluorinated compound bound to proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magnetochemistry	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/magnetochemistry5010001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuo Furihata and Mitsuru Tashiro	4. 巻 56
2. 論文標題 DPFGSE-MDEC-J-resolved-COSY: An efficient method for selectively measuring proton-proton spin coupling constants of the multiplet signals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Magn. Reson. Chem.	6. 最初と最後の頁 1183-1187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrc.4783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kazuo Furihata, Mitsuru Tashiro
2. 発表標題 Improved $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ Saturation Transfer Difference Experiments for Sensitive Detection to Fluorinated Compound Bound to Proteins
3. 学会等名 60th Experimental NMR Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Furihata, Mitsuru Tashiro
2. 発表標題 Semi-selective-J-Resolved-HMBC: A New Method for Measuring Heteronuclear Long Range Coupling Constants of Oxi-methine Signals in Polyketides
3. 学会等名 60th Experimental NMR Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Furihata and Mitsuru Tashiro
2. 発表標題 Application of NMR screening methods with ¹⁹ F detection to fluorinated compounds bound to proteins
3. 学会等名 59th Experimental NMR Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuo Furihata and Mitsuru Tashiro
2. 発表標題 COSY-J-resolved-2D and BASHD-COSY-J-Resolved-2D : New method for measuring proton-proton spin coupling constants of multiplet signals
3. 学会等名 59th Experimental NMR Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	吉村 悦郎	放送大学・教養学部・特任荣誉教授	
	(Yoshimura Etsuro)		
	(10130303)	(32508)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------