

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05550

研究課題名(和文) 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

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) 3,700,000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、水素核、および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(NMR)の開発を目指した。この測定法はリガンドの高精度選択的検出に加え、分子間相互作用に関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により、軽水溶液(95% H_2O +5% D_2O)においても、容易に選択的検出が可能であることが明確になった。

研究成果の概要(英文)：In the present research, the combinational use of 1D NMR-based screening techniques with ^1H and ^{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 ^1H and ^{19}F 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. Because ^{19}F of the fluorinated compounds was detected, the sample solutions containing 95% H_2O +5% D_2O can be easily applied using the proposed methods.

研究分野：分析化学

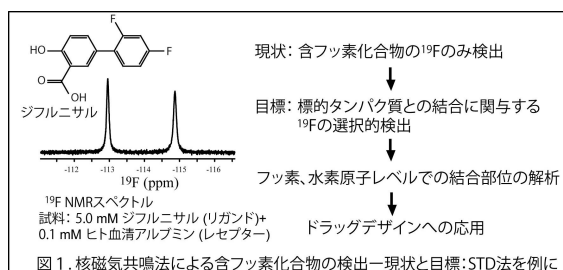
キーワード：分子間相互作用 リガンド レセプター 核磁気共鳴法

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 ^{15}N 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、多くの研究者が試行錯誤状態であった。

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、軽水溶液 (95% H_2O + 5% D_2O) として測定可能であり、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正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目指す。軽水溶液 (95% H_2O +5% D_2O) 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、分子間相互作用に關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する。一般的に普及している NMR 分光計を使用し、新規 ^{19}F - ^1H スペクトルの測定を行う。図 1 に現状と当申請課題での目標との関係を示す。

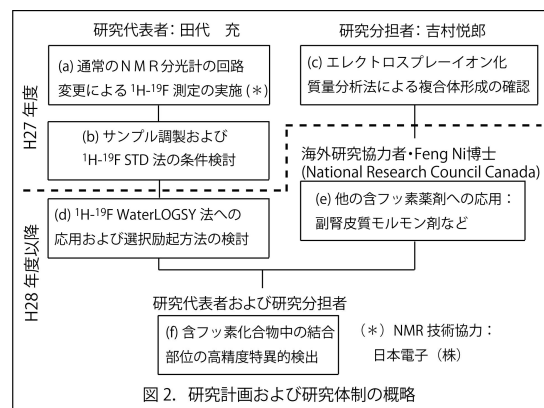


3. 研究の方法

【概要】 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 - ジフルニサルおよびヒト血清アルブミン - フルフェナミン酸を使用する。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。ジフルニサル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 ^{19}F に移動させる。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う。

【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】

研究計画および研究体制の概略を図 2 に示す。核磁気共鳴法に関する研究は研究代表者、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する。また、分光計の回路変更などは、日本電子 (株) に技術協力を要請する。タンパク質の ^1H 照射→リガンドの ^{19}F 検出が可能なパルスシーケンスをデザインし、含フッ素化合物を選択的に検出する新規手法の検討を行う。



4. 研究成果

1 次元 ^1H , ^{19}F NMR スペクトルを図 3 に示し、 ^1H 照射 - ^1H 検出 STD、および ^1H 照射 - ^{19}F 検出 STD スペクトルを図 4 に示す。各スペクトルにおいて、目的とするシグナルは観測され、選択的検出が可能になった。

^{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、両原子核共に同等の検出感度が得られた (図 3)。 ^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、ほぼ同等の感度が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。¹H 照射 - ¹H 検出 STD と ¹H 照射 - ¹⁹F 検出 STD スペクトルの比較を図 4 に示す。¹H-¹⁹F HOESY においても同様の傾向が確認された。¹⁹F 検出での高感度化が今後の課題である。

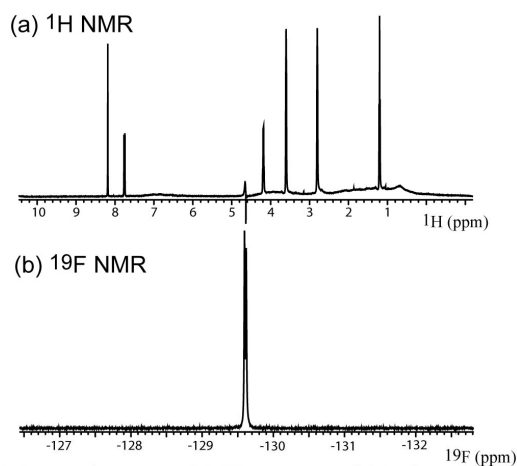


図3. (a) ¹H NMR, (b) ¹⁹F NMR スペクトル

試料: 0.05 mM ヒト血清アルブミン + 5.0 mM エノキサシン
測定時間は共に 1 分

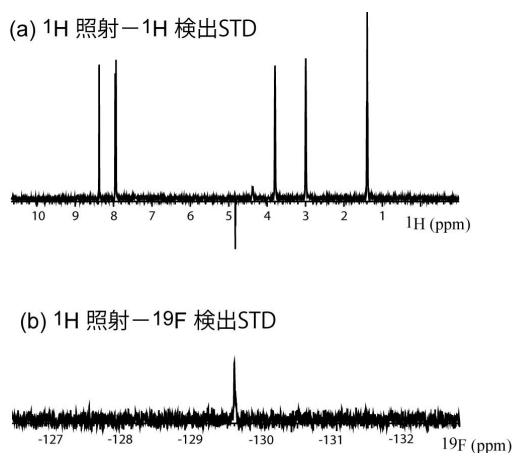


図4. (a) ¹H{¹H} STD, (b) ¹⁹F{¹H} STD スペクトル

試料: 0.05 mM ヒト血清アルブミン + 5.0 mM エノキサシン
測定時間: (a) 8分, (b) 6時間

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. "Chemoenzymatic synthesis of sucronic acid using D-glucurono-6,3-lactone and sucrose as raw materials, and properties of the product" Hiroki Hosaka, Saori Mizoguchi, Mitsuru Tashiro, Takashi Fujimoto, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 110, 53-60.
2. "Application of NMR screening methods with ¹⁹F detection to fluorinated compounds bound to proteins" Kazuo Furihata, Moe Usui and Mitsuru Tashiro, *Magnetochemistry*, 2018, 4(1), 3
3. "Crystal Structure of β -D-fructofuranosyl-[2 \leftrightarrow 1]-6-amido-6-deoxy- α -D-glucopyranoside" Takashi Fujimoto, Toshiyuki Nishio, Hiroki Hosaka, Saori Mizoguchi and Mitsuru Tashiro, *X-ray Structure Analysis Online*, 2017, 33, 63-64.
4. "Crystal Structure of β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-fructofuranosyl-(2 \leftrightarrow 1)-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside" Takashi Fujimoto, Akihito Yamano, Toshiyuki Nishio, Yohei Suzuki and Mitsuru Tashiro, *X-ray Structure Analysis Online*, 2017, 33, 35-36.
5. "Applicability of the NMR-based Screening Methods with ¹⁹F detection to the Fluorinated Compound" Moe Usui, Kazuo Furihata, Hiroaki Utsumi, Toshiyo Kato and Mitsuru Tashiro, *Journal of Res. Anal*, 2017, 3(1), 34-36.
6. "Chemoenzymatic synthesis and properties of sucronamide" Saori Mizoguchi, Hiroki Hosaka, Mitsuru Tashiro, Takako Hirano, Wataru Hakamata and Toshiyuki Nishio, *J. Carbohydr. Chem.* 2016, 35, 435-444
7. "Enzymatic synthesis and the structure elucidation of novel trisaccharides comprised of D-galactose, N-acetyl-D-glucosamine and D-fructose" Mitsuru Tashiro, Takashi Fujimoto, Kazuo Furihata, Yohei Sakaki, Takako Hirano, Wataru Hakamata and Toshiyuki Nishio, *J. Carbohydr. Chem.* 2016, 35, 378-386.
8. "Practical evaluation of the NMR-based screening methods in application to the fluorinated compound" Kazuo Furihata, Hiroaki Utsumi, Toshiyo Kato, Takashi Fujimoto, Moe Usui and Mitsuru Tashiro, *Journal of Res. Anal*, 2016, 2(3), 73-76.
9. "Enzymatic synthesis of novel oligosaccharides from N-acetylsucrosamine and melibiose using *Aspergillus niger* α -galactosidase, and properties of the products." Yohei Sakaki, Mitsuru Tashiro, Moe Katou, Chiseko Sakuma, Takako Hirano, Wataru Hakamata and Toshiyuki Nishio, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80, 1836-1842.
10. "Application of the ¹⁹F-WaterLOGSY type

experiment for NMR-based screening of fluorinated compounds” Kazuo Furihata, Hiroaki Utsumi, Toshiyo Kato, Chiseko Sakuma and Mitsuru Tashiro, *Pharm. Anal. Chem.* 2016, 2, 111

11. “Structural basis for action of the external chaperone for a propeptide-deficient serine protease from *Aeromonas sobria*” Hidetomo Kobayashi, Toru Yoshida, Takuya Miyakawa, Mitsuru Tashiro, Keinosuke Okamoto, Hiroyasu Yamanaka, Masaru Tanokura and Hideaki Tsuge, *J. Biol. Chem.* 2015, 290(17), 11130-11143
12. “Achievement of ^1H - ^{19}F heteronuclear experiments using the conventional spectrometer with a shared single high band amplifier” Chiseko Sakuma, Jun-ichi Kurita, Kazuo Furihata and Mitsuru Tashiro, *Magn. Reson. Chem.* 2015, **53**, 327-329,

〔学会発表〕(計 3 件)

1. “Practical evaluation of the NMR-based screening methods in application to the fluorinated compound” Moe Usui; Kazuo Furihata; Toshiyo Kato; Hiroaki Utsumi; Mitsuru Tashiro, 2017 年 3 月 26 - 31 日、カリフォルニア州、アメリカ合衆国
2. “Application of ^1H - ^{19}F STD experiments for NMR-based screening” Kazuo Furihata; Hiroaki Utsumi; Toshiyo Kato; Chiseko Sakuma; Mitsuru Tashiro, 2016 年 4 月 10 - 15 日、ペンシルベニア州、アメリカ合衆国
3. “Achievement of ^1H - ^{19}F heteronuclear experiments using the conventional spectrometer with a shared single high band amplifier” Chiseko Sakuma; Jun-ichi Kurita; Kazuo Furihata; Mitsuru Tashiro, 56th Experimental NMR Conference, 2015 年 4 月 19 - 24 日、カリフォルニア州、アメリカ合衆国

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

吉村 悦郎 (YOSHIMURA Etsuro)

研究者番号：10130303

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし

()