

## 1-1-3 研究成果

中テーマ名：タンパク質回収フロー型自動NMR測定装置の開発 サブテーマ名：フロー型NMR装置の構築技術の開発	
中テーマリーダー（所属、役職、氏名） 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授 西村善文	
研究従事者（所属、役職、氏名） (株)資生堂 マテリアルサイエンス研究センター 副主幹研究員 城田 修 平山 綾 ブルカー・バイオスピン（株） アプリケーション部 佐藤 一 旭化成ファーマ（株） 創薬第一研究所 主幹研究員 小路弘行 小上裕二 山本 有 小川 潔	
研究の概要、新規性及び目標 ①研究の概要 本研究の目的は、ブルカー社製フロー型検出器を装着したNMRシステムと(株)資生堂社製タンパク質回収システムを接合することにより、サンプル注入、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ 相関NMRスペクトル測定、Similarity計算およびタンパク質分離・回収までの流れのオンライン自動化を確立し、実際のタンパク質に結合する薬物候補の低分子化合物を網羅的に探索することである。 5年間のうち、前半では相互作用判定機能が完成し、設定した相互作用マッチ度に応じてNMR測定後の処理を行い、相互作用のある場合はカラムへ送液せずそのまま回収し、相互作用がない場合はカラムへ送液する等の一連の処理ができるようになった。さらに最終年度では、本タンパク質回収システムを実際の医薬品開発で議論されるタンパク質-薬物に近い系を対象としてスクリーニング測定の検証を行った。 さらに、蛋白質X及び蛋白質Xと結合する低分子化合物とのフロー型NMR装置を用いたTROSYスペクトルの取得を試みた。  ②研究の独自性・新規性 Abbott社の方法（SAR by NMR）では、NMRチューブを用いて薬物候補の低分子化合物を探索しているのに対して、本研究ではNMRチューブを使わずフロー型NMR検出器を用いている。また自動でタンパク質と低分子化合物の混合溶液を調製し、NMRスペクトル測定後、2つのスペクトルのSimilarity計算を行なう。そしてこの結果を基に、タンパク質回収プロトコルが選択されて回収されるが、自動で相互作用の有無を判断するだけでなく、判断に応じてタンパク質を再生回収することに独自性がある。また、蛋白質XのTROSYスペクトルの取得は非常に少なく、フロー型NMR装置によるスペクトル取得は皆無である。  ③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） スクリーニング測定を想定し、実際のタンパク質を用いて、薬物ライブラリーを想定した100種類の化合物を用いた連続自動試験を行い、ヒット化合物を網羅的に探索する。また、Similarity計算ソフトAMIXの計算精度と再現性の更なる向上を図り、自動化に組み込む。	
研究の進め方及び進捗状況 標準的なタンパク質と低分子化合物を用いて、目的とするフロー型NMR装置が自動運転することを確認した。すなわちNMRスペクトル自動測定用ソフトICON-NMRに、Similarity計算ソフトAMIXを組み込み、計算結果をオンラインにより資生堂社製タンパク質回収システムに送信することができた。タンパク質回収システムは計算結果によって、タンパク質と低分子化合物を分離して回収するかどうかを判断した。液処理システムとNMR解析ソフトの相互通信が完成し、相互作用判定結果に応じてタンパク質を高回収率で再生回収することができた。さらに100種類の化合物の中から相互作用有として既知の薬物を正しく検知でき、スクリーニング検証という実際の動作においてなんら問題のなかったことを確認した。当初予定になかった個々の化合物の回収機能も追加し、目標は100%達成した。	

主な成果  
 具体的な成果内容：  
 タンパク質回収フロー型自動NMR測定装置を構築し、低分子化合物ライブラリーを用いて当装置を稼動した。その結果、実際のタンパク質に結合する化合物がヒットすることを確認した。一方、Similarity計算の精度と再現性を向上させる工夫を行い、オフラインで成功した。

特許件数：1      論文数：0      口頭発表件数：1

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比  
 自動で相互作用を判別するシステムは見られるが、その結果に応じてさらにタンパク質を再生回収できるシステムは国内外に存在しない。本分野において最高水準の機能を有している。また、現在<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N相関NMRスペクトルの測定はルーチンで難しいことではない。しかしそれらは研究者自身が、NMRチューブにタンパク質と低分子化合物の混合物をサンプリングし、測定を仕掛けるという流れとなっていると考えられる。それに対して、本研究では単独のタンパク質と低分子化合物を独立に用意し、NMR実験の直前に混合してフロー型NMR検出器に注入する行程を自動化した。その後のNMR実験、Similarity計算ならびにタンパク質回収までオンラインで推進することができた。これらは低分子化合物の検体数が多くなればなるほど価値の高い装置と考えられる。しかし、フロー型NMR検出器はNMRチューブ用検出器に比べて感度が低い。更なる実用化に向けて、タンパク質水溶液の濃度を最適化したり、NMR検出器を高感度化したりするなどの工夫が必要と考えられる。一方、タンパク質XのTROSYスペクトルの取得は非常に少なく（国外で1報、国内で0報）、フロー型NMR装置によるスペクトル取得は皆無である。

2 実用化に向けた波及効果  
 高い評価は得られると思うが、このシステムには高価なNMRを有していることが前提であるため、高機能NMRの普及次第と思われる。また、本研究で開発した装置がAbbott社の特許に抵触しないように十分注意する必要がある。さらに、タンパク質Xと結合する低分子化合物のTROSYスペクトルをフロー型NMR装置で取得することができれば、医薬品の研究開発が非常に効率的に行える可能性がある。

残された課題と対応方針について  
 タンパク質の粘度または濃度により、NMRシグナルの線形およびケミカルシフト値は微妙に変化する。この変化に対応できるようにSimilarity計算の精度と再現性を改善すれば、タンパク質と低分子化合物の「弱い」相互作用を観測できると考えられる。次に、この弱い相互作用と化合物の構造を蓄積し、リード化合物の開発に結びつける。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合計
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	
人件費	0	0	0	0	0	0	0		8,234	6,000	2,880	4,800	3,600	25,514	25,514
設備費	0	12,623	0	0	0	0	12,623	0	22,400	0	0	0	0	22,400	35,023
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	877	0	0	0	0	877	0	1,905	6,005	3,982	5,101	5,445	22,438	23,315
旅費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計	0	13,500	0	0	0	0	13,500	0	32,539	12,005	6,862	9,901	9,045	70,352	83,852

代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]  
 JST負担による設備：  
 地域負担による設備：

※複数の研究課題に共通した経費については按分する